

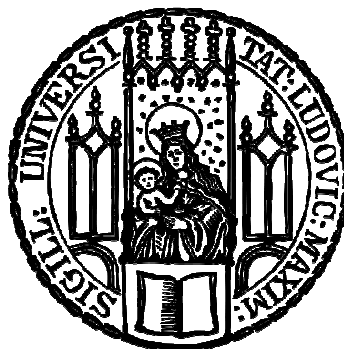
Aus dem Max von Pettenkofer-Institut
für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl: Virologie

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

Genomweite Analyse des nukleo- zytoplasmatischen Transports herpesviraler Proteine

Dissertation

**zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**



vorgelegt von
Verena Raschbichler
aus München

- 2011 -

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

Betreuerin: PD Dr. rer. nat. Susanne M. Bailer

Zweitgutachter/in: Prof. Dr. Karl-Klaus Conzelmann

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

Tag der mündlichen Prüfung: 16.07.2012

Ehrenwörtliche Versicherung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter der Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt wurde. Weiterhin versichere ich, dass die Dissertation nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt wurde und dass ich bisher keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

München,

Verena Raschbichler

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

A.	Abkürzungsverzeichnis.....	I
B.	Abbildungsverzeichnis.....	V
C.	Tabellenverzeichnis.....	VII
1	Zusammenfassung.....	1
1.1	Genomweite Analyse des nukleo-zytoplasmatischen Transports herpesviraler Proteine.....	1
1.2	Genome-wide analysis of nucleo-cytoplasmic transport of herpesviral proteins.....	2
2	Einleitung.....	5
2.1	Herpesviren.....	5
2.1.1	Das Herpes Simplex Virus-1 (HSV-1).....	6
2.1.1.1	Partikelbau, Genom und Proteom von HSV-1.....	6
2.1.1.2	Der Replikationszyklus von HSV-1.....	14
2.1.1.3	Die nukleäre Auswanderung von HSV-1-Capsiden.....	16
2.1.1.4	Der nukleo-zytoplasmatische Transport herpesviraler Proteine....	19
2.2	Nukleo-zytoplasmatischer Transport.....	19
2.2.1	Kernlokalisationssequenzen.....	23
2.2.2	Kernexportsequenzen.....	24
2.2.3	Strukturelle Eigenschaften der Transportrezeptoren.....	25
2.2.4	Der klassische Kernimport.....	27
2.2.5	Der Importin β -vermittelte Kernexport.....	29
2.2.6	Unkonventionelle Funktionen der Importin α/β -Familie und Ran.....	30
2.3	Zielsetzung.....	31
3	Material und Methoden.....	32
3.1	Material.....	32
3.1.1	Laborgeräte und <i>Software</i>	32
3.1.2	Verbrauchsmaterialien und Kits.....	33
3.1.3	Chemikalien.....	34
3.1.4	Enzyme und Molekulargewichtsstandards.....	36

3.1.5	Antikörper und Seren.....	37
3.1.6	Oligonukleotide.....	38
3.1.7	Plasmide.....	42
3.2	Organismen.....	55
3.3	Methoden.....	56
3.3.1	Bakterienkultur (<i>E. coli</i>).....	56
3.3.1.1	Kultivierung und Nährmedien.....	56
3.3.1.2	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien.....	56
3.3.1.3	Transformation chemisch kompetenter Bakterien.....	57
3.3.2	Hefekultur (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>).....	57
3.3.2.1	Kultivierung und Nährmedien.....	57
3.3.2.2	Herstellung chemisch kompetenter Hefezellen.....	58
3.3.2.3	Transformation chemisch kompetenter Hefezellen.....	58
3.3.3	Gewebekultur von Säugerzellen.....	59
3.3.3.1	Kultivierung und Konservierung.....	59
3.3.3.2	DNA-Transfektion.....	59
3.3.3.3	Gen- <i>Silencing</i> mittels RNA-Interferenz.....	59
3.3.3.3.1	siRNA-Design und –Transfektion.....	59
3.3.3.3.2	Herstellung der Lysate zur <i>Silencing</i> -Kontrolle.....	60
3.3.4	Virologische Methoden.....	60
3.3.4.1	Vermehrung des Virusstamms.....	60
3.3.4.2	HSV-1-Infektion von Säugerzellen.....	61
3.3.4.3	<i>Plaque-Assay</i> zur Bestimmung des Virustiters.....	61
3.3.4.4	Kinetik der Virusreplikation.....	62
3.3.5	Molekularbiologische Methoden.....	62
3.3.5.1	Plasmid-DNA-Mini-Präparation aus <i>E. coli</i>	62
3.3.5.2	Bestimmung der DNA-Konzentration.....	62
3.3.5.3	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	62
3.3.5.4	Horizontale Agarose-Gelelektrophorese.....	63
3.3.5.5	DNA-Isolierung aus Agarosegelen.....	63
3.3.5.6	Klonierung mit Hilfe sequenzspezifischer Rekombination (<i>Gateway</i> ®-Klonierung).....	63
3.3.5.7	DNA-Restriktionsverdau.....	64
3.3.5.8	DNA-Ligation.....	64
3.3.5.9	Sequenzierung von DNA.....	65
3.3.5.10	Zielgerichtete Mutagenese.....	65
3.3.6	Biochemische Methoden.....	65
3.3.6.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	65
3.3.6.2	Western Blot.....	66
3.3.6.3	Rekombinante Proteinexpression und Aufreinigung von Fusionsproteinen aus <i>E. coli</i>	67
3.3.6.3.1	Expression.....	67
3.3.6.3.2	Aufreinigung.....	67
3.3.7	Methoden zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen.....	68
3.3.7.1	Hefe-2-Hybridsystem.....	68
3.3.7.1.1	Durchführung des Hefe-2-Hybridsystems.....	69
3.3.7.1.2	Hefe-2-Hybridsystem im Hochdurchsatz: <i>Y2H Direct Mating</i>	70
3.3.7.2	<i>LUMIER-Assay</i>	71
3.3.7.3	<i>Pulldown-Assay</i>	73

3.3.8	Methoden zur Identifikation von Proteinen mit nukleärer Export-Aktivität.....	73
3.3.8.1	Rapamycin-induzierbarer nukleärer Export-Assay.....	73
3.3.8.2	Interspezies Heterokaryon Assay.....	74
3.3.9	Indirekte Immunofluoreszenz (IF).....	75
4	Ergebnisse.....	76
4.1	Interaktionen zwischen humanen Transportfaktoren und dem Proteom von HSV-1.....	76
4.1.1	<i>Yeast-2-Hybrid</i> (Y2H)-Analysen.....	76
4.1.2	Die subzelluläre Lokalisation herpesviraler Proteine.....	81
4.1.3	Vergleichende Analyse der identifizierten HSV-1-Interaktoren.....	83
4.1.4	Validierung der Y2H-Interaktionen mittels LUMIER-Assay.....	85
4.2	Die Bedeutung von Cse1L für die HSV-1-Replikation.....	87
4.3	Die Identifizierung nukleärer Lokalisationssignale.....	89
4.3.1	Die vorhergesagte NLS von UL34 interagiert direkt mit Importin α -Transportfaktoren.....	89
4.3.2	Die NLS des UL34 vermittelt den nukleären Import von zytoplasmatisch-lokalisiertem EYFP.....	92
4.3.3	Die nukleäre Lokalisation von UL34 ist unabhängig von dessen vorhergesagter NLS.....	93
4.3.4	Die vorhergesagte NLS von UL31 interagiert direkt mit Importin α -Transportfaktoren.....	95
4.3.5	Die NLS des UL31 vermittelt den nukleären Import von panzellulär-lokalisiertem EYFP.....	96
4.3.6	Die nukleäre Lokalisation von UL31 ist abhängig von dessen vorhergesagter NLS.....	97
4.3.7	Die Interaktion zwischen UL31 und UL34 ist durch die UL31-Mutation nicht beeinträchtigt.....	98
4.3.8	Die NLS von UL31 ist für die korrekte Lokalisation von UL34 erforderlich.....	99
4.4	Ermittlung der nukleären Export-Aktivität von HSV-1-Proteinen.....	101
4.4.1	Der Rapamycin-induzierbare nukleäre Export-Assay.....	101
4.4.2	Das Vektor-System für die Hochdurchsatz-Analyse des nukleären Protein-Exports.....	103
4.4.3	Der Rapamycin-induzierbare nukleäre Export-Assay am Beispiel von UL4.....	104
4.4.4	Der Interspezies-Heterokaryon-Assay am Beispiel von UL4.....	108
4.4.5	Der Export-Assay auf HSV-1-Proteom-Ebene.....	110
5	Diskussion.....	122
5.1	Die Identifizierung von Interaktionen zwischen humanen Transportfaktoren und HSV-1-Proteinen mittels Y2H und LUMIER.....	122

5.1.1	Kritische Betrachtung des Hefe-2-Hybrid (Y2H)-Systems.....	122
5.1.2	Verifizierungsmöglichkeiten.....	125
5.1.3	Protein-Protein-Interaktionen zwischen zellulären Transportfaktoren und HSV-1-Proteinen.....	126
5.2	Die Rolle von Cse1L für die HSV-1-Replikation.....	128
5.3	Der Transport von UL34 an die innere Kernmembran.....	130
5.4	Der NLS-vermittelte nukleäre Import von UL31.....	131
5.5	VP22 als potentielles Import- und Export-Substrat.....	134
5.6	Der nukleäre Kernexport.....	135
5.6.1	Methoden zur Identifizierung von Proteinen mit nukleärer Export- Aktivität.....	135
5.6.2	HSV-1-Proteine mit nukleärer Export-Aktivität.....	137
5.7	Ausblick.....	140
6	Literaturverzeichnis.....	141
7	Lebenslauf.....	162
8	Publikationen und Kongressbeiträge.....	163
9	Danksagung.....	165

A Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
AD	Aktivierungsdomäne
Amp	Ampicillin
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumperoxodisulfat
3-AT	3-Aminotriazole
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
BD	Bindedomäne
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cDNA	<i>copyDNA</i>
cNES	klassische nukleäre Kernexportsequenz
cNLS	Klassische nukleäre Kernlokalisationssequenz
Co-IP	Co-Immunopräzipitation
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Dapi	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	1,4 Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EYFP	enhanced yellow fluorescent protein
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FKBP12	FK506-Bindeprotein
for	<i>forward</i>
FRB	FKBP12-Rapamycin Bindedomäne von FRAP1
g	Gramm

x g	Multipliziert mit der mittleren Erdbeschleunigung g (= 9,81 m/s ²)
GDP	Guanosindiphosphat
Gent	Gentamicin
Gent ^R	Genatmicin-Resistenz
GFP	grünfluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
h.p.i.	Stunde(n) nach Infektion (hours post infection)
H ₂ O _{bidest.}	bidestilliertes Wasser
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HIS	Histidin
HIS ⁻	Histidin-Mangelmedium
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSV-1	Herpes simplex Virus-1
IgG	Immunglobulin G
INM	innere Kernmembran (<i>inner nuclear membrane</i>)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
k	Kilo (10 ³)
Kan	Kanamycin
Kan ^R	Kanamycin-Resistenz
Kb	Kilobasenpaar
KDa	Kilodalton
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LUMIER	<u>L</u> uminescence-based <u>M</u> ammalian <u>I</u> nt <u>E</u> Ractome mapping
μ	micro (10 ⁻⁶)
m	milli (10 ⁻³)
M	Molar, Mol pro Liter
4-MuX	4-Methylumbelliferyl α-D-galactopyranoside
MBP	Maltose-Bindeprotein
mCMV	murines Cytomegalovirus
MGC	<i>mammalian gene collection</i>
min	Minute(n)
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure

mRNA	Boten (<i>messenger</i>) RNA
n	nano (10^{-9})
NEAA	nichtessentielle Aminosäuren
NEC	Kern-Export-Komplex (<i>Nuclear Egress Complex</i>)
Neo ^R	Neomycin-Resistenz
NES	nukleäre Kernexportsequenz
NFκB	nuclear factor kappa-B
NLS	nukleäre Kernlokalisationssequenz
nm	nanometer (Wellenlänge)
NPC	Kernporenkomplexe (<i>nuclear pore complex</i>)
Nr.	Nummer
nt	Nucleotid
OD	optische Dichte
ONM	äußere Kernmembran (<i>outer nuclear membrane</i>)
ORF	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
ori	Replikationsursprung (<i>origin of replication</i>)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatpuffer (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PCA	<i>protein fragment complementation assay</i>
PEG	Polyethylenglycol
PFU	Plaque bildende Einheit (<i>plaque forming unit</i>)
p.i.	<i>post infection</i>
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride
Ran	<i>ras-related nuclear protein</i>
rev	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNAi	RNA-Interferenz
RNP	Ribonukleoprotein-Komplexe
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfate
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
sog.	sogenannt
Spec	Spectinomycin
Spec ^R	Spectinomycin-Resistenz
Tab.	Tabelle

TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
TGN	trans-Golgi-Netzwerk (<i>trans golgi network</i>)
TM	Transmembrandomäne
Tris	Tris(-hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer RNA
U	<i>Unit</i> , relative Enzymeinheit
u. a.	unter anderem
UE	Untereinheit
UN	unbekannt
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
WB	Western-Blot-Analyse
Wt	Wildtyp
w/v	Gewicht/Volumen
Y2H	Yeast-two-Hybrid (Hefe-2-Hybrid)
YPD	Yeast extract Peptone Dextrose
z. B.	zum Beispiel

B Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Das HSV-1-Partikel.....	7
Abb. 2:	Schematischer Aufbau des HSV-1-Genoms.....	7
Abb. 3:	Der HSV-1-Replikationszyklus.....	15
Abb. 4:	Schematische Darstellung der nukleären Capsid-Auswanderung.....	17
Abb. 5:	Strukturen der Transportrezeptoren Importin α und β	26
Abb. 6:	Schematische Darstellung des klassischen α/β 1-vermittelten Kernimports.....	28
Abb. 7:	Der klassische Kernexport.....	29
Abb. 8:	Schema des Hefe-2-Hybridsystems.....	69
Abb. 9:	Hefe-2-Hybridsystem im Hochdurchsatz (<i>Direct Mating</i>).....	70
Abb. 10:	Prinzip des LUMIER Assays.....	72
Abb. 11:	Vortests zur Ermittlung autoaktiver Transportfaktoren.....	78
Abb. 12:	Exemplarische Darstellung eines Y2H-Datensatzes.....	79
Abb. 13 :	Subzelluläre Lokalisation ausgewählter HSV-1-Proteine.....	82
Abb. 14:	Vergleichende Analyse der mit Importin α -interagierenden HSV-1-Proteine.....	84
Abb. 15:	Validierung identifizierter Y2H-Interaktionen mittels LUMIER-Assay.....	86
Abb. 16:	Die HSV-1-Replikation in Cse1L-siRNA transfizierten Zellen.....	88
Abb. 17:	Funktionelle Interaktionsanalyse zwischen UL34 und den α -Importinen KPNA2, 4 und 5.....	91
Abb. 18:	Transfer der potentiellen UL34-NLS auf EYFP.....	93
Abb. 19:	Die NLS-unabhängige nukleäre Lokalisation von UL34 Δ TM.....	94
Abb. 20:	NLS-vermittelte Interaktion zwischen UL31 und den α -Importinen KPNA2, 4 und 5.....	96
Abb. 21:	Transfer der potentiellen UL31-NLS auf EYFP.....	97
Abb. 22:	Die NLS-vermittelte nukleäre Lokalisation von UL31.....	98
Abb. 23:	Bindestudien zwischen UL34 Δ TM und verschiedenen UL31-Varianten.....	99
Abb. 24:	Die Bedeutung der UL31-NLS für die Lokalisation von UL34.....	100
Abb. 25:	Schematische Darstellung des Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assays.....	102
Abb. 26:	Für den Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay generierte Vektoren.....	103

Abb. 27:	Vorhersage einer klassischen NES im herpesviralen UL4.....	105
Abb. 28:	Vergleich der subzellulären Lokalisation von gM mit gM-FKBP bzw. myc-UL4 mit EYFP-NLS-UL4.....	106
Abb. 29:	Analyse der Export-Aktivität des UL4-NES mit Hilfe des Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assays.....	107
Abb. 30:	Schematische Darstellung des Interspezies-Heterokaryon-Assays.....	108
Abb. 31:	Heterokaryon-Assay zur Analyse der nukleäre Export-Aktivität des HSV-1-Proteins UL4.....	110
Abb. 32:	Ergebnisse des Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assays aller löslichen HSV-1-Proteine.....	111
Abb. 33:	Vergleichende Analyse der identifizierten HSV-1-Proteine mit nukleärer Export-Aktivität.....	117
Abb. 34:	Weiterführende Analyse potentieller NES der im Export-Assay identifizierten Proteine.....	118
Abb. 35:	<i>Shuttling</i> -Proteine und entsprechende NES-Mutanten im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay.....	119

C Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Überblick der acht humanen Herpesviren.....	5
Tab. 2:	Das Proteom von HSV-1.....	8
Tab. 3:	Überblick der subzellulären Lokalisation von C-terminal Flag- <i>getaggt</i> HSV-1- Proteinen in transformierten 293T-Zellen.....	14
Tab. 4:	Zusammenfassung der bekannten humanen Transportfaktoren der Importin α - und β -Familie mit ihren Bezeichnungen und Substraten.....	20
Tab. 5:	Verwendete Primärantikörper und Seren.....	37
Tab. 6:	Verwendete Sekundärantikörper.....	37
Tab. 7:	Oligonukleotide für die <i>Gateway</i> ® Klonierungen.....	38
Tab. 8:	Oligonukleotide für die Fusions-PCR zweier DNA-Fragmente.....	39
Tab. 9:	Oligonukleotide für klassische Klonierungen.....	39
Tab. 10:	Oligonukleotide für die zielgerichtete Mutagenese.....	40
Tab. 11:	Vorhandene <i>Gateway</i> ®-kompatible Leervektoren.....	42
Tab. 12:	Weitere vorhandene Vektoren.....	42
Tab. 13:	In dieser Arbeit neu konstruierte Plasmide.....	44
Tab. 14:	Plasmide der HSV-1-Kollektion.....	52
Tab. 15:	Bakterienstämme (<i>E. coli</i>).....	55
Tab. 16:	Hefestämme.....	55
Tab. 17:	Säugerzelllinien.....	55
Tab. 18:	Sequenzen der siRNA-Oligonukleotide.....	60
Tab. 19:	Im Y2H- <i>Screen</i> detektierte Interaktionen zwischen humanen Transportfaktoren und HSV-1-Proteinen.....	80
Tab. 20:	Zusammenfassung der Ergebnisse des Rapamycin-induzierbaren Export- Assays für 54 HSV-1-Proteine und Proteinfragmente.....	115

1 Zusammenfassung

1.1 Genomweite Analyse des nukleo-zytoplasmatischen Transports herpesviraler Proteine

Bei Herpes simplex virus-1 (HSV-1) handelt es sich um ein großes doppelsträngiges DNA-Virus, das zur Familie der *α-Herpesviridae* gehört. Entscheidende Prozesse des HSV-1-Lebenszyklus einschließlich DNA-Replikation, Gen-Transkription und RNA-Export, Capsid-Morphogenese und -Auswanderung ereignen sich im Zellkern des Wirts und sind davon abhängig, dass zahlreiche virale Proteine zwischen Zytoplasma und Zellkern transportiert werden. Die koordinierte räumlich-zeitliche Verteilung von Virusproteinen zwischen Zytoplasma und Zellkern ist somit für die virale Replikation essentiell. Ganz allgemein wird der Transport von Proteinen und einigen RNAs zwischen Zytoplasma und Zellkern durch direkte oder indirekte Bindung an Transportfaktoren der humanen Importin α - und β -Familien vermittelt und entlang eines Gradienten der kleinen GTPase Ran geführt.

Bislang ist der Mechanismus des nukleo-zytoplasmatischen Transports für eine große Anzahl viraler Proteine unbekannt. Für eine umfassende Analyse von Protein-Protein-Interaktionen zwischen HSV-1-Proteinen und allen bekannten Transportfaktoren der humanen Importin α - und β -Familien wurde das Yeast-Two-Hybrid-System (Y2H) eingesetzt. Die Validierung identifizierter binärer Komplexe erfolgte mit Hilfe des LUMIER-Verfahrens (LUminescence-based Mammalian IntERactome mapping). Hierbei konnten von insgesamt 24 mittels Y2H ermittelten Protein-Protein-Interaktionen 18 validiert werden. Die identifizierten viralen Proteine interagierten fast ausschließlich mit Transportfaktoren der Importin α -Familie. Zudem waren einige HSV-1-Proteine befähigt, an verschiedene α -Importine zu binden, was im Einklang mit der typischen Redundanz des klassischen Transportsystems steht. Diese Redundanz erschwerte allerdings die funktionelle Analyse einzelner α -Importine. Zur Lösung dieses Problems wurde die RNA-Interferenz (RNAi) des Importin α -Exporters Cse1L angewendet, welcher der Rückführung aller α -Importine ins Zytoplasma dient. Auf diese Weise konnte die Bedeutung des klassischen Transportsystems für die virale Replikation gezeigt werden.

Eine detaillierte Analyse erfolgte für die HSV-1-Proteine UL31 und UL34, die zusammen einen für die nukleäre Capsid-Auswanderung essentiellen Komplex an der inneren Kernmembran (INM) bilden. Unter Verwendung von Y2H, LUMIER und subzellulären Lokalisationsstudien von Wildtyp-UL31 sowie einigen Mutanten desselben konnte eine klassische nukleäre Lokalisationssequenz (cNLS) in UL31 identifiziert werden. Weiterhin konnte die Funktionalität dieser cNLS mittels Transfer auf ein nicht verwandtes zytoplasmatisches Protein gezeigt werden. Obwohl eine funktionelle Bedeutung der

identifizierten UL31-Sequenz im viralen Kontext mittels HSV-1 BAC-Mutagenese belegt werden konnte (236), war sie nicht auf eine nukleäre Import-Funktion zurückzuführen. Infolgedessen kann nicht ausgeschlossen werden, dass dieser Sequenz eine, unabhängig vom nukleären Import, unbekannt Rolle während der viralen Replikation zukommt. Außerdem liegt vermutlich ein redundanter Mechanismus für den nukleären Import von UL31 vor. Entsprechende Experimente deuteten auch auf eine potentielle cNLS im Typ II-Membranprotein UL34 hin. Dennoch konnte weder die Rolle dieser Sequenz für die nukleäre Lokalisation von UL34, noch die Bedeutung im viralen Kontext über BAC-Mutagenese (236) dargestellt werden. Wie im Fall von UL31 ist anzunehmen, dass ein zusätzlicher Import-Mechanismus für den Transport von UL34 zur INM verantwortlich ist.

Während Untersuchungen zum nukleären Import von viralen Proteinen bisher große Beachtung fanden, ist der Export zurück ins Zytoplasma weniger gut erforscht. Allgemeine Gründe für den Transport von Proteinen zurück ins Zytoplasma sind der nukleäre Export gebundener Moleküle, zusätzliche Funktionen in anderen Kompartimenten oder die Regulation nukleärer Aktivität. Aufgrund der Tatsache, dass keine viralen Proteine mit nukleärer Export-Aktivität mit Hilfe des Y2H-Systems identifiziert werden konnten, wurde zur Analyse herpesviraler Proteine mit potentieller nukleärer Export-Aktivität eine neue *in vivo*-Hochdurchsatz-Methode entwickelt. Bei dieser Methode werden Proteine, die konstitutiv in den Zellkern importiert werden, im Zytoplasma aufgrund ihrer Export-Aktivität immobilisiert. Von insgesamt 54 untersuchten HSV-1-Proteinen wurden 12 aktiv aus dem Kern transportiert. Durch zielgerichtete Mutagenese konnte die Export-Aktivität für 8 der identifizierten Proteine auf klassische nukleäre Exportsequenzen zurückgeführt werden. Diese Analyse gewährt nicht nur einen besseren Einblick in die nukleo-zytoplasmatische Verteilung von viralen Proteinen während der HSV-1-Infektion, sondern ist auch Grundlage für die anschließende bioinformatische Modellierung in Zeit und Raum und bietet neue Angriffspunkte zur antiviralen Intervention.

1.2 Genome-wide analysis of nucleo-cytoplasmic transport of herpesviral proteins

Herpes simplex virus-1 (HSV-1) is a large double stranded DNA virus of the α -herpesviridae encoding more than 80 proteins. Crucial aspects of its life cycle including DNA replication, gene transcription and RNA export, capsid morphogenesis, and egress occur in the host nucleus and require that numerous herpesviral proteins are transported between the host cytosol and the nucleus. The coordinated spatio-temporal distribution of herpesviral proteins between nucleus and cytoplasm is thus vital for viral replication. In general, transport of proteins and some RNAs between cytoplasm and nucleus is mediated by direct or indirect

binding to transport factors of the importin α - and β -families and occurs along a gradient of the small GTPase Ran.

So far the mechanism of nucleo-cytoplasmic transport is unknown for a large number of viral proteins. To comprehensively analyse the interactions between all HSV-1 proteins and all known transport factors of the human importin α - and β -families the yeast-two-hybrid-(Y2H) system was used. Validation of the identified binary complexes was performed by the *LUMIER*-assay (LUminescence-based Mammalian IntERactome mapping). Thereby 18 of in total 24 protein interactions could be confirmed. Nearly all of the interactions occur between HSV-1 proteins and transport factors of the importin α -family and show the typical redundancy of the classical transport system. This redundancy complicates the functional analysis of single α -importins. To circumvent this problem RNA interference of the α -importin exporter Cse1L, that acts in the nuclear to cytoplasmic reshuffling of importin α 's was applied. By means of this experiment the importance of the classical transport route for viral replication could be determined.

In depth analysis has been performed for the HSV-1 proteins UL31 and UL34 that form a complex at the inner nuclear membrane (INM) essential for the nuclear egress of herpesviral nucleocapsids. A classical nuclear localisation signal (cNLS) of UL31 was characterized by Y2H, LUMIER and subcellular localisation studies of several wildtype and mutant UL31 proteins. The functionality of this cNLS was furthermore shown by its transfer to an unrelated typical cytoplasmic protein. Although HSV-1 BAC-mutagenesis revealed the functional significance of the identified UL31 sequence for the viral life-cycle, it could not be reduced to its nuclear import function (236). Therefore it is possible that this sequence exhibits an essential still unknown function independent of nuclear import. Furthermore it could not be excluded that another or redundant mechanism is responsible for the transport of UL31 from the cytoplasm to nucleus. Corresponding experiments also reveal a putative cNLS in the type II membrane protein UL34. Nevertheless the importance of this sequence for the nuclear localisation of UL34 or the significance in the viral context via BAC-mutagenesis (236) could not be demonstrated. As in the case of UL31 an additional import mechanism might lead to the transport of UL34 to the INM.

The analysis of nuclear import of viral proteins has attracted a lot of attention while their potential to be exported back to the cytoplasm remained largely unexplored. In general, proteins may be shuttled back to the cytoplasm in order to transport associated molecules out to the cytoplasm, to perform additional functions in other compartments, or to regulate its nuclear activity. Due to the fact that no proteins with nuclear export activity could be identified by the Y2H-screen a novel *in vivo* high through-put assay has been developed to comprehensively analyze the nuclear export activities associated with the HSV-1 ORFeome. In this assay proteins are constitutively imported into the nucleus but immobilized in the

cytoplasm following their nuclear export. A total of 54 HSV-1 proteins was analysed using this assay 12 of which were actively transported out of the nucleus. Mutational analysis revealed classical nuclear export sequences in 8 of the 12 proteins that drive nuclear export. These results will not only provide new insights into the nucleo-cytoplasmic trafficking of viral proteins in the course of infection. Our knowledge of the functional impact these proteins have in different compartments is also expected to be the basis of bioinformatic modelling of spatio-temporal distribution and reveal novel strategies for anti-herpesviral treatment.

2 Einleitung

2.1 Herpesviren

Die Klassifizierung der Herpesviren wurde im Jahr 2009 vom ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*) aktualisiert. Seitdem begründen die alte Familie der *Herpesviridae* (Virus Spezies bei Vögeln, Säugetieren und Reptilien) und die beiden neuen Familien der *Alloherpesviridae* (Spezies bei Fischen und Fröschen) und der *Malacoherpesviridae* (Herpesvirus Spezies bei Austern) die neue Ordnung der *Herpesvirales* (63). Basierend auf Aminosäuresequenzhomologien und anderen Eigenschaften, wie z. B. Pathogenität und Tropismus wird die Familie der *Herpesviridae* in 3 Unterfamilien der α -, β - und γ -Herpesviren unterteilt (265). Unter diesen sind bisher acht humane Herpesviren bekannt (humane Herpesviren, HHV-1-8, siehe Tab. 1), deren akute Infektionen sich in Erkrankungen unterschiedlicher Organe, überwiegend der Haut, des neuronalen oder des lymphatischen Systems manifestieren.

Tab. 1: Überblick der acht humanen Herpesviren.

Unterfamilie	Arten	Manifestationsort	Latenzort
α	HHV-1: Herpes Simplex Virus-1 (HSV-1) HHV-2: Herpes Simplex Virus-2 (HSV-2) HHV-3: Varicella Zoster Virus (VZV)	Epithelzellen der Haut	Sensorische neuronale Ganglien
β	HHV-5: Cytomegalovirus (CMV) HHV-6: Humanes Herpesvirus 6 HHV-7: Humanes Herpesvirus 7	Lymphatisches System	Leukozyten, T-Lymphozyten
γ	HHV-4: Epstein-Barr-Virus (EBV) HHV-8: Kaposi Sarkom-assoziiertes Herpesvirus (KSHV)	Lymphatisches System	B-Lymphozyten

Obwohl die durch Herpesviren verursachten Symptome stark variieren, gleichen sich bei allen Vertretern dieser Virusfamilie die Partikelmorphologie und die molekularbiologischen Eigenschaften. Die Virionen der *Herpesviridae* besitzen je nach Spezies eine Größe zwischen 120 und 200 nm im Durchmesser. Ihr Genom ist zwischen 125 - 235 kbp groß und kodiert 70 - 200 verschiedene Proteine (135,265). Damit zählen die Vertreter der *Herpesviridae* neben der Familie der *Poxviridae* bezüglich ihres Genoms und ihrer Morphologie zu den größten und komplexesten Viren. Ein weiteres charakteristisches

Merkmal aller Herpesviren ist ihre Fähigkeit, nach der Erstinfektion, die zur Lyse der Wirtszellen führt, latent im Organismus zu verbleiben. In diesem Zustand ist die Produktion von infektiösen Partikeln unterbunden und die Zellen überleben. Es werden nur wenige virale Proteine exprimiert, deren Aufgabe darin besteht, die Latenz aufrechtzuerhalten und das Immunsystem des Wirts zu unterdrücken. Während dieser Phase ist jedoch eine wiederholte Reaktivierung des lytischen Infektionszyklus möglich, der meist durch bestimmte endogene und exogene Faktoren, wie z. B. Immunsuppression, Hormone, Stress oder UV-Licht hervorgerufen wird. Außerdem zeichnen sich Herpesviren durch ein mehr oder weniger enges Wirtsspektrum aus, da sie normalerweise nur eine bestimmte Wirtsart befallen.

2.1.1 Das Herpes Simplex Virus-1 (HSV-1)

Das Herpes Simplex Virus-1 ist ein humanpathogener Vertreter der α -Herpesviren und weltweit in über 90 % der Bevölkerung verbreitet. Meistens äußert sich eine Primärinfektion nach ca. einer Woche in der Bildung von typischen vesikulären Läsionen auf mukösem Gewebe der Lippen und Mundschleimhaut, die von Fieber, angeschwollenen Lymphknoten und Ödemen im Gesichtsbereich begleitet sein kann. Neben diesen gibt es jedoch auch seltene, schwer verlaufende HSV-1-Infektionen, wie z. B. die Enzephalitis, die Keratitis, die generalisierte HSV-Sepsis bei immunsupprimierten Patienten und die generalisierte HSV-Infektion bei Neugeborenen. Ausgehend von den infizierten Epithelzellen werden über Zell-Zell-Kontakte sensorische Neuronen befallen, in denen die Viren eine lebenslange Latenz ausbilden. Wird das Virus reaktiviert, infiziert es von neuem die Hautregion, die von dem betroffenen Neuron versorgt wird, und verursacht erneut ähnliche, meist abgeschwächte Symptome der Primärinfektion. Dieser Vorgang kann sich viele Male wiederholen.

2.1.1.1 Partikelbau, Genom und Proteom von HSV-1

HSV-1-Virionen haben einen Durchmesser von 150 bis 200 nm, bestehen aus mehr als 30 verschiedenen Proteinen und sind aus vier Hauptstrukturelementen aufgebaut (Abb. 1). Der innere Kernbereich, der das lineare, doppelsträngige Virusgenom enthält, wird von einem 100 nm großen ikosaedrischen Capsid umgeben, das aus 12 pentameren und 150 hexameren Capsomeren aufgebaut ist. Dieses sog. Nukleocapsid wird von einer Art Matrix aus 23 unterschiedlichen viralen Proteinen (193), dem sog. Tegument umgeben und dadurch von der Virushülle getrennt. Primär wird das Capsid von einer Hülle umgeben, die von der inneren Kernmembran gebildet, dann in komplexen Vorgängen wieder entfernt und schließlich durch die Membran der trans-Golgi-Vesikel ersetzt wird. Die Virushülle enthält 13

bis 15 virale Glycoproteine, die eine wichtige Rolle bei der Interaktion von extrazellulären Virionen mit den entsprechenden zellulären Rezeptoren spielen.

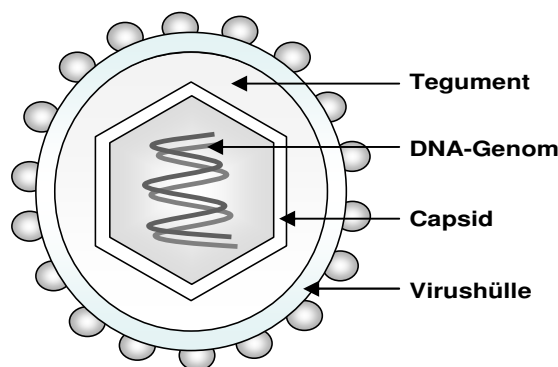


Abb. 1: Das HSV-1-Partikel. Schematisches Modell eines HSV-1-Partikels mit seinen vier Hauptbestandteilen. Von innen nach außen: Das virale Genom, Capsid, Tegument und die Virushülle.

Das lineare, doppelsträngige DNA-Genom von HSV-1 ist mit einer fibrillären Proteinmatrix, dem Virus-Core assoziiert (113), besitzt eine Größe von 152 kbp und kodiert etwa 84 Proteine (253,266). Es ist in ein langes (*long L*, 126 kbp) und ein kurzes (*short S*, 26kbp) Segment unterteilt. Jedes enthält einen Abschnitt einmaliger Sequenzfolgen, die als *unique long* (U_L -Region) und *unique short* (U_S -Region) bezeichnet und von invertierten Einheiten wiederholter Sequenzen flankiert werden (Abb. 2). Nach ihrer Lage im Genom bezeichnet man sie als *terminal repeat* (TR) oder *internal repeat* (IR); (320).

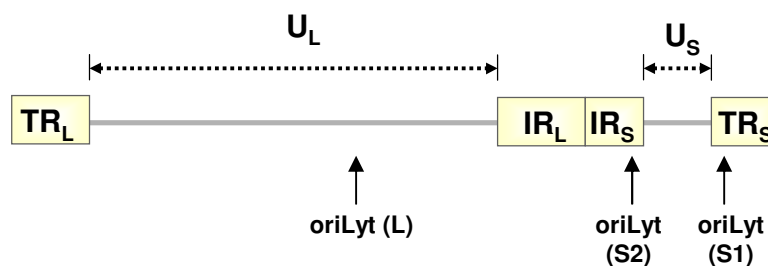


Abb. 2: Schematischer Aufbau des HSV-1-Genoms. Das Genom von HSV-1 wird in einen L- (*long*) und S- (*short*) Bereich unterteilt. Die beiden einmalig vorkommenden Genomabschnitte U_L (*unique long*) und U_S (*unique short*) sind als graue Striche, die Genomregionen mit Sequenzwiederholungen [Lage an den Genomenden TR (*terminal repeat*), innerhalb des Genoms IR (*internal repeat*)] als gelbe Balken dargestellt. Die Positionen der Replikationsursprünge (oriLyt), die während des lytischen Replikationszyklus eine Rolle spielen, sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Nach Eintritt in den Zellkern wird das lineare Genom in ein zirkuläres Molekül, das Episom, überführt und von drei Replikationsursprüngen [oriLyt (L), oriLyt (S1 und 2), Abb. 2] nach dem *rolling circle*-Mechanismus (127,179,245,279,310) vervielfältigt. Dabei wird ein langes, aus sich wiederholenden Genom-Sequenzen bestehendes sog. Konkatermer gebildet, das bei der späteren Verpackung in nukleäre Capsidvorläufer wieder entsprechend prozessiert wird (66,310).

In Tab. 2 sind alle 84 Proteine von HSV-1 im Überblick dargestellt. Die Nomenklatur der Herpesvirusproteine ist sehr komplex, so findet man in der Literatur für dasselbe Protein mehrere alternative Bezeichnungen. Oft werden sie entsprechend ihres Leserahmens (*open reading frame*, ORF) benannt. Zur Unterscheidung von den Genen, wird den Proteinen oft ein p angehängt (z. B. UL31p). Strukturproteine sind mit der Abkürzung VP (Virionprotein) und einer Nummer versehen, die sich nach dem Laufverhalten des jeweiligen Proteins im SDS-Polyacrylamidgel richtet. Daneben werden Proteine, die in infizierten Zellen exprimiert werden, mit ICP (*infected cell protein*) bezeichnet und in analoger Weise durchnummeriert. Die Gruppe der Glycoproteine wird mit g abgekürzt, dem ein großer Buchstabe folgt (z. B. gM). Die Buchstaben beziehen sich dabei auf die Reihenfolge, in der die entsprechenden Proteine entdeckt wurden. Darüberhinaus sind in Tab. 2 die Synthesephasen, die Lokalisation und die bisher bekannten Funktionen der einzelnen Proteine zusammengefasst.

Tab. 2: Das Proteom von HSV-1. Die Tabelle gibt einen Überblick über die einzelnen Proteine von HSV-1, ihre alternativen Bezeichnungen, die Phase ihrer Synthese und ihre bekannten Funktionen und Eigenschaften. Die 41 *Core*-Orthologen sind rot hervorgehoben. Falls nicht extra vermerkt, stammen die Daten im Wesentlichen aus folgenden Quellen(179,193,216,253,266,296). (?) wird noch diskutiert; UN unbekannt; UE Untereinheit

ORF	Protein	Synthesephase	Lokalisation (Virus / Wirt)	Funktionen und Eigenschaften
RL1	ICP34.5, γ 34.5	γ 1	Tegument / Nukleus	Neurovirulenz-Faktor
RL2	ICP0, α 0	α	Tegument / Nukleus	α -regulatorisches Protein; nicht spezifischer Aktivator der Transkription (aktiviert auch nicht-HSV-Promotoren)
UL1	gL	γ 2	Envelope / Golgi-,Plasma-membran	Glykoprotein; Zellfusion; Entry; während des Transports zur Zytoplasmamembran im Komplex mit gH (UL22p)
UL2		β	Nukleus	Uracil-DNA-Glykosylase
UL3		γ	Nukleus	Phosphoprotein
UL4		γ 2	Zytoplasma, Nukleus	Kolokalisierung mit dem nukleären ICP22 über die Interaktion mit UL3 (331)
UL5		β	Nukleus	Komponente des Helikase/Primase-Komplexes; 5'→3'-Helikase; besitzt ATP-Bindestellen; im Komplex mit UL52p
UL6		γ	Capsid	Portal-Protein; DNA-Packaging
UL7		γ	Tegument (?) / Zytoplasma, Mitochondrien, Nukleus	Interaktion mit dem mitochondrialen Wirtsprotein Adenin-Nukleotid-Translokator 2 (ANT2) ; (308)

ORF	Protein	Synthese- phase	Lokalisation (Virus / Wirt)	Funktionen und Eigenschaften
UL8		β	Nukleus	Komponente des Helikase/Primase-Komplexes; Stimulation d. Primersynthese; Stimulation der UL5p/UL52p-Funktion; im Komplex mit UL29p
UL8.5	OBPC-2	γ 1	Nukleus	C-terminale Isoform des ori-bindenden Proteins (OBP); Bindung an ori; Regulation der viralen DNA-Replikation (10,183)
UL9	ICP9, OBP	β	Nukleus	ori-bindendes Protein (OBP); DNA-Helikase-Aktivität; ATP-Bindestelle
UL9.5		γ 2	UN	ORF <i>antisense</i> zu UL10-ORF
UL10	gM	γ	Envelope / Golgi-, Plasma- membran	Glykoprotein; an finaler Umhüllung neu gebildeter Capside beteiligt (178)
UL10.5		UN	UN	UN
UL11		γ	Tegument	myristyliertes Protein; am <i>Egress</i> beteiligt
UL12		β	Nukleus	DNase (alkalische Endo-/Exonuklease)
UL12.5		β	Zytoplasma	N-terminal verkürzte Form von UL12; Endo-/Exonuklease-Aktivität; weniger aktiv als UL12p (28,255)
UL13		γ	Tegument	Proteinkinase (Serin/Threonin)
UL14		γ 2	Tegument	Zell-zu-Zell-Ausbreitung; Kerntransport von α -TIF(UL48p) und Capsiden
UL15		γ	Nukleus	<i>Assembly</i> ; DNA- <i>Packaging</i> ; virale Terminase-UE A; RNA wird <i>gespliced</i>
UL15.5		γ	UN	N-terminal verkürzte Form von UL15p (342)
UL16		γ	Tegument / Nukleus, Zytoplasma	Capsid-assoziiert; an Capsid-Reifung und/oder -Auswanderung beteiligt (213,227)
UL17		γ	Capsid- Außenseite	DNA-Reifung und - <i>Packaging</i>
UL18	VP23	γ 1	Capsid	Capsid-Triplexprotein; DNA- <i>Packaging</i> , Terminase
UL19	VP5, ICP5	γ 1	Capsid	Hauptcapsidprotein; über Disulfidbrücken mit VP19C (UL38p) verknüpft
UL20		γ	Envelope / Golgi-, Plasma- membran	intrazellulärer Partikeltransport während Virusmorphogenese; Zellfusion
UL20.5		γ 2	Nukleus	(321)
UL21		γ 1	Tegument / Zytoplasma	Interaktion mit Mikrotubuli; am intrazellulären Virion-Transport beteiligt (306)

ORF	Protein	Synthese-phase	Lokalisation (Virus / Wirt)	Funktionen und Eigenschaften
UL22	gH	$\gamma 2$	Envelope / Golgi-, Plasmamembran	Glykoprotein; am <i>Entry</i> beteiligt; während des Transports zur Zytoplasmamembran Komplexbildung mit gL (UL1p)
UL23	ICP36	β	Tegument / Nukleus	Thymidinkinase
UL24		γ	Membran-assoziiert, Nukleus	beteiligt an Relokalisierung (Verteilung) von Nukleolin (198,241)
UL25		$\gamma 2$	Capsid (Außenseite)	<i>minor</i> Capsidprotein; DNA-Reifung und -Packaging
UL26	VP21 (Pra, ICP35b) + VP24 (Prn)	γ	im Capsidinneren	Protease; Autoproteolyse des UL26p-Vorläufers in VP21 (Pra) und VP24 (Prn = kleinste Form der aktiven Protease); <i>Scaffolding</i> (Gerüst für Capsidbildung); <i>Assembly</i> -Protein im Capsidinneren
UL26.5	VP22a, ICP35e-f	γ	im Capsidinneren „unreifer“ Capside	<i>Assembly</i> -Protein; <i>Scaffolding</i> ; Substrat für UL26p
UL27	gB, VP7/8.5	$\gamma 1$	Envelope / Golgi-, Plasmamembran	Glykoprotein; am <i>Entry</i> beteiligt; Zellfusion; proteolytische Spaltung in zwei Teile; liegt als Dimer vor
UL28	ICP18.5	γ	Nukleus	<i>Assembly</i> ; DNA-Packaging; virale Terminase-UE B
UL29	ICP8, SSB	β	Nukleus	Einzelstrang-DNA-Bindeprotein; stimuliert DNA-Polymerase- und -Helikase (UL9p)-Aktivität; kann vor Beginn der viralen DNA-Replikation die Transkription von γ -Genen herunterregulieren
UL30		β	Nukleus	DNA-Polymerase (katalytische UE) mit 5'→3'-Polymerase- und 3'→5'-Exonuklease-Funktion; Heterodimer mit UL42p
UL31		$\gamma 2$	Nukleus	beteiligt an CapsidAuswanderung aus dem Nukleus, Substrat von US3p
UL32		$\gamma 2$	Zytoplasma, Nukleus	DNA-Packaging; beteiligt am Transport neu gebildeter Capside zum Ort des DNA-Packaging (170)
UL33		$\gamma 2$	Tegument (?), Capsidoberfläche (?) / Nukleus	<i>Assembly</i> -Protein; DNA-Packaging, Terminase (DNA-Cleavage)
UL34		$\gamma 1$	Kernmembran	Typ II-Membranprotein, beteiligt an Capsid-Auswanderung aus dem Nukleus; Substrat von US3p
UL35	VP26	$\gamma 2$	Capsid	Vertexprotein im Capsid

ORF	Protein	Synthese-phase	Lokalisation (Virus / Wirt)	Funktionen und Eigenschaften
UL36	ICP1/2	γ2	Tegument, mit Capsidoberfläche assoziiert (?) / Zytoplasma, Golgi	großes Tegumentprotein; Interaktion mit Kernporen, Freisetzung der viralen DNA; DNA-Cleavage; essenziell für finale Umhüllung neu gebildeter Capside (53,261)1)
UL37	ICP7	γ1	Tegument / Zytoplasma, Golgi (mit UL36)	an finaler Umhüllung neu gebildeter Capside beteiligt (68)
UL38	VP19C, ICP32	γ2	Capsid	Capsid-Triplexprotein, über Disulfidbrücken mit VP5 (UL19p) verknüpft; mit VP23 (UL18p) und viraler DNA assoziiert
UL39	ICP6/10	β	Nukleus	Ribonukleotid-Reduktase (große UE); Proteinkinase
UL40		β	Nukleus	Ribonukleotid-Reduktase (kleine UE)
UL41	VHS-Protein	β oder γ1 (?)	Tegument	Virion-associated Host Shutoff-Protein; führt zu Destabilisierung und Abbau der Wirts- (und teilweise auch der viralen) mRNA (bewirkt Abspaltung der 5'-Caps)
UL42		β	Nukleus	Prozessivitätsfaktor, im Komplex mit viraler DNA-Polymerase (UL30p); DNA-Bindung
UL43		β oder γ (?)	Envelope (?)	Glykoprotein; PrV-Homolog in Fusionsprozesse involviert
UL43.5		γ2	Tegument / akkumuliert in Assembly-Sites im Nukleus	Accessory-Protein während Capsid-Zusammenbau
UL44	gC, VP8	γ2	Envelope / Golgi-, Plasmamembran	Glykoprotein; Adsorption; Bindung an C3b-Komponente des Komplements und dadurch Blockierung der Komplement-vermittelten Virusneutralisierung
UL45		γ2	Envelope / ER-assoziert	Unterstützung der fusogenen gB (UL27p)-Funktion beim Entry (112)
UL46	VP11/12	γ	Tegument / Nukleus	α-TIF(UL48p)-Modulator
UL47	VP13/14	γ	Tegument / Nukleus	α-TIF(UL48p)-Modulator
UL48	VP16, ICP25, α-TIF, Vmw65	γ1	Tegument / Nukleus	α-trans inducing-Faktor, induziert die Transkription der α-Gene
UL49	VP22	γ1	Tegument / Zytoplasma, Nukleus	Umorganisation von Mikrotubuli; Beeinflussung des Virion-Zusammenbaus (speziell Einlagerung von ICP0 und ICP4); (75,341)
UL49.5	UL49A, gN	γ2	Envelope (?) / Golgi-, Plasmamembran	über Disulfidbrücken mit gM (UL10p) komplexiert; HHV8, EHV und PrV: (im Komplex mit gM) inhibitorische Wirkung auf Membranfusion (156,160)
UL50		β	Tegument (?) / Nukleus	dUTPase

ORF	Protein	Synthesephase	Lokalisation (Virus / Wirt)	Funktionen und Eigenschaften
UL51		γ	Tegument / Golgi	Virion-Reifung (nach primärer Umhüllung); (229)
UL52		β	Nukleus	Komponente des Helikase/Primase-Komplexes, 5'→3'-Helikase, Primase (?) im Komplex mit UL5p
UL53	gK	γ	Envelope (?) / Kern-, ER-Membran	Glykoprotein; finale Umhüllung der Viruscapside; Zellfusion (125,126)
UL54	ICP27, α 27, IE63	α	Nukleus	α -regulatorisches Protein; mit Zn-Finger; Verstärkung der γ -Gen-Expression; Inhibierung der α - und der Wirtsgen-Expression, v.a. auf mRNA-Transport- und <i>Splicing</i> -Ebene
UL55		γ 1	Tegument (?) / HSV-2: Nukleus	HSV-2: Hilfsfunktion bei Virion-Reifung (?); (334)
UL56		γ 2	Tegument oder Envelope (?) / HSV-2: Golgi-, Plasmamembran	Typ II-Membranprotein, HSV-2: Beteiligung am vesikulären Transport
RS1	ICP4	α	Tegument / Nukleus	α -regulatorisches Protein; induziert Expression aller (außer der α -) Gene; reprimiert Expression von ICP4 (selbst), ICP0 (RL2p) und LAT-RNA ORF O und ORF P)
US1	ICP22, α 22	α	Nukleus	α -regulatorisches Protein, verstärkt v.a. Expression von γ -Genen, durch UL13p und US3p phosphoryliert, mRNA wird <i>gespliced</i>
„US1.5“		α	Nukleus (?)	identisch zum C-terminalen Teil von ICP22 (US1p) => <i>Splice</i> -Produkt; regulatorisches Protein; phosphoryliert durch UL13p und US3p
US2		β oder γ (?)	Tegument	UN
US3		β	Tegument	Proteinkinase (Serin/Threonin); beteiligt an CapsidAuswanderung aus dem Nukleus; Substrat von UL13p
US4	gG	γ	Envelope / Golgi-, Plasmamembran	Glykoprotein; Zell-zu-Zell-Ausbreitung; Umhüllung der Nukleocapside mit modifizierter Trans-Golgi-Membran
US5	gJ	γ	Envelope (?) / Golgi-, Plasmamembran	Glykoprotein; Blockierung der Apoptose
US6	gD, VP 17/18	γ 1	Envelope / Golgi-, Plasmamembran	Glykoprotein; beteiligt am <i>Entry</i>
US7	gI	γ	Envelope / Golgi-, Plasmamembran	Glykoprotein; bildet Heterodimer mit gE (US8p); Fc-Rezeptor; Zell-zu-Zell-Ausbreitung; vermittelt (mit gE) Umhüllung der Nukleocapside mit modifizierter Trans-Golgi-Membran

ORF	Protein	Synthese- phase	Lokalisation (Virus / Wirt)	Funktionen und Eigenschaften
US8	gE, VP 12.3/12.6	γ 1	Envelope / <i>Golgi-, Plasma- membran</i>	Glykoprotein; bildet Heterodimer mit gI (US7p); Fc- Rezeptor; Zell-zu-Zell-Ausbreitung; vermittelt (mit gI) Umhüllung der Nukleocapside mit modifizierter Trans- Golgi-Membran
US8.5	US8A	γ 1	<i>Nukleolus</i>	Phosphoprotein
US9		γ	<i>Envelope</i>	Phosphoprotein; zusammen mit US7p/US8p an anterograder Virusausbreitung im Wirts-Nervensystem beteiligt (26,284)
US10		γ 1	<i>Tegument / Nukleus</i>	Phosphoprotein (333)
US11		γ 1	<i>Tegument (?) / Nukleolus</i>	RNA-Bindeprotein; bindet große (60S) ribosomale UE; Bindet an UL34-mRNA (Regulation der UL34p-Expression); (268)
US12	ICP47, α 47	α	<i>Nukleus, Zytoplasma</i>	Inhibierung des Splicings (frühe Infektionsphase); Kernexport von mRNA (späte Infektionsphase); Interaktion mit zellulärem TAP (transporter associated with antigen processing) => Beeinflussung der immunologischen Peptidpräsentation; mRNA wird gesplitt
ORF O		prä- α	<i>Nukleus</i>	Latenz-assoziiert; ORF fast vollständig antisense zu RL1 (ICP34.5); Interaktion mit ICP4 (RS1p) => Inhibierung der regulatorischen ICP4-Funktion; Expression inhibiert durch ICP4
ORF P		prä- α	<i>Spliceosomen</i>	Latenz-assoziiert, blockt Synthese viraler Proteine, die von gesplitteter mRNA ausgehen, Expression inhibiert durch ICP4

Sind Proteine funktional verwandt und stammen von einem gemeinsamen Vorläufer ab, spricht man von Orthologen. Dabei handelt es sich meistens um essentielle Proteine, die an grundlegenden Prozessen beteiligt sind. Auch das Genom von HSV-1 kodiert 41 sog. *Core-Orthologe*, die innerhalb der Herpesviren konserviert sind (208,209). Ihre entsprechenden ORFs sind in Tab. 2 rot hervorgehoben. Nahezu die Hälfte der HSV-1-Proteine sind für die Replikation nicht essentiell, spielen aber bei der Ausweitung des Gewebetropismus, bei der Etablierung der Latenz oder bei der Unterdrückung der Immunantwort des Wirtes *in vivo* eine Rolle.

Während die Funktionen einiger HSV-1-Proteine schon hinreichend charakterisiert sind, ist über die Funktion vieler anderer Proteine nur sehr wenig oder überhaupt nichts bekannt. Die Bestimmung der subzellulären Lokalisation ist ein geeigneter Ausgangspunkt für die Charakterisierung eines Proteins, da es z. B. einen Einblick über die mögliche Rolle des Proteins während der viralen Replikation gewährt. So zeigten Salsman *et al.* (2008) mit Hilfe

eines genomweiten Screens die subzelluläre Lokalisation von 50 C-terminal Flag-getaggen HSV-1-Proteinen in transformierten 293T-Zellen (Tab. 3); (272). Sie unterschieden dabei Proteine mit pan-zellulärer, pan-nukleärer, pan-zytoplasmatischer, sub-nukleärer und sub-zytoplasmatischer Lokalisation. Mit den Bezeichnungen pan bzw. sub wird die Lokalisation eines Proteins im gesamten bzw. eingeschränkten jeweiligen Bereich bezeichnet. So wird mit pan-nukleär z. B. eine gesamtnukleäre Lokalisation bezeichnet. Dagegen lokalisiert ein sub-nukleäres Protein nur in bestimmten Bereichen innerhalb des Zellkerns, z. B. im Nukleolus.

Tab. 3: Überblick der subzellulären Lokalisation von C-terminal Flag-getaggen HSV-1-Proteinen in transformierten 293T-Zellen (272).

Zellkern (pan-nukleär, sub-nukleär)	Zellkern / Zytoplasma (pan-zellulär)	Zytoplasma (pan-zytoplasmatisch, sub-zytoplasmatisch)
UL3, UL8.5, UL20.5, UL26, UL38, UL42, UL54, UL56, US1.5, RL1, UL24, UL26.5, UL27.5, UL31, US1, US11	UL7, UL8, UL14, UL15.5, UL16, UL18, UL21, UL25, UL29, UL30, UL33, UL35, UL43.5, UL48, UL50, UL51, US3, US10, US12	ORF0, UL4, UL12, UL13, UL19, UL32, UL37, UL40, UL52, US2, UL49, UL49.5, US8.5, US9

2.1.1.2 Der Replikationszyklus von HSV-1

Der Replikationszyklus von HSV-1 beginnt mit einer Interaktion der viralen Glykoproteine C und D mit spezifischen Oberflächenrezeptoren auf der Wirtszelle (Abb. 3-1); (290). Anschließend erfolgt durch Fusion der viralen Hüllmembran mit der zellulären Plasmamembran der Eintritt des Viruspartikels ins Innere der Zelle (Abb. 3-2). Es konnte gezeigt werden, dass bei diesem Vorgang die Glykoproteine D, B, H und L eine entscheidende Rolle spielen (289). Neben der Membranfusion kann HSV-1 auch über die pH-abhängige rezeptorvermittelte Endozytose in die Zelle eindringen und diese erfolgreich infizieren (228). Während des Eintritts in die Zelle kommt es zur Freisetzung des viralen Nukleocapsids und der Tegumentbestandteile ins Zytoplasma. Einige Tegumentproteine erfüllen wichtige regulatorische Funktionen während der Frühphase des Replikationszyklus oder sind in der Lage, die Wirtszelle zu ihrem Vorteil zu verändern. Zu diesen gehört z. B. das Vhs-Protein (*virus host shutoff*), das die Proteinneusynthese in der Wirtszelle ausschaltet, indem es gezielt zelluläre mRNAs abbaut (165). Nach Eintritt ins Zytoplasma wird das Viruscapsid entlang von Mikrotubuli zu den Kernporen transportiert (Abb. 3-3); (285), durch welche die virale DNA in den Zellkern geschleust wird (Abb. 3-4). Es konnte gezeigt werden, dass für diesen Prozess zelluläre Faktoren, wie Importin β , Ran und ATP benötigt

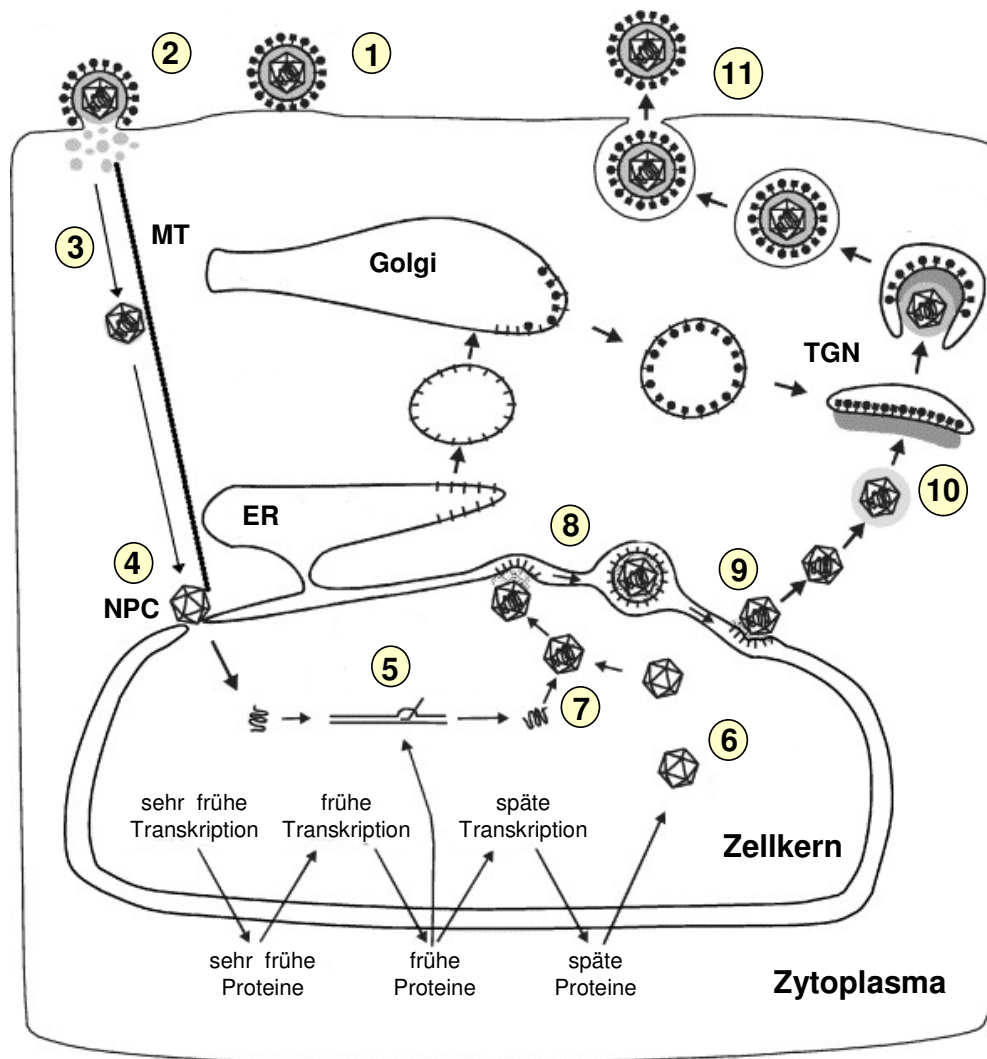


Abb. 3: Der HSV-1-Replikationszyklus. 1) Anheftung an die Wirtszelle, 2) Fusion der Virushülle mit der Zellmembran und Freisetzung des Nukleocapsids und Komponenten des Teguments ins Zytoplasma, 3) Transport des Capsids entlang von Mikrotubuli (MT), 4) Andocken am Kernporenkomplex (NPC), 5) DNA-Replikation, 6) Capsidzusammenbau, 7) Verpacken des viralen Genoms, 8) Knospen und primäre Umhüllung des Nukleocapsids an der INM (*primary envelopment*), 9) Freisetzung aus dem perinukleären Raum durch Membranfusion (*De-envelopment*), 10) Knospen und sekundäre Umhüllung des Nukleocapsids an Vesikeln des Trans-Golgi-Netzwerks (TGN); (*secondary envelopment*), 11) Freisetzung des reifen Virions an der Zelloberfläche. ER Endoplasmatisches Retikulum. [Modifiziert nach (216)]

werden (234). Ist die virale DNA im Kern angelangt, schließt sie sich zu einem Ring und liegt somit episomal vor. Die Transkription der viralen Gene erfolgt durch die zelluläre RNA-Polymerase II, sowie weiteren Faktoren der Wirtszelle (55,310) und wird in drei zeitlich getrennte Stadien [*immediate early* (α), *early* (β) und *late* (γ)] unterteilt (119). Die in den einzelnen Stadien exprimierten Proteine sind an jeweils ähnlichen Aufgaben beteiligt. So sind die frühen (*early*, β) Proteine vor allem an der Genomreplikation beteiligt und die späten (*late*, γ) Proteine am Aufbau des Virions. Die meisten γ -Gene kodieren für Strukturproteine, die nach dem Zeitpunkt ihrer Expression weiter in $\gamma 1$ (*leaky late*)- und $\gamma 2$ (*true late*)-Gene unterteilt werden können. Nach Eintritt des Virus in die Wirtszelle induziert das im

Zytoplasma freiwerdende Tegumentprotein pUL48 (α -TIF) zusammen mit den zellulären Faktoren Oct1 und HCF-1 (*host cell factor*) die Expression der sehr frühen (*immediate early*, α) Proteine. Diese kodieren erneut Transkriptionsregulatoren, welche die Expression der frühen Proteine auslösen (12,293) und so an der Einleitung der nachfolgenden Phasen beteiligt sind. Nach der Replikation des viralen DNA-Genoms mit Hilfe viraler und zellulärer Proteine in spezialisierten nukleären Bereichen, den sog. Replikationszentren (Abb. 3-5), wird die konkatamere DNA während der Verpackung in Vorläufer-Capside in einzelne vollständige Genome gespalten (Abb. 3-7). Der Zusammenbau und die Reifung der Viruscapside finden in einem autokatalytischen Prozess im Zellkern statt (Abb. 3-6). Auf welchem Weg diese Capside schließlich die Zelle als infektiöse, umhüllte Viruspartikel verlassen, wurde lange Zeit diskutiert (266). Mittlerweile geht man davon aus, dass die Auswanderung nukleärer Capside (*Egress*) und die Reifung der Virionen im Zytoplasma nach dem Mechanismus des *Envelopment/De-envelopment/Re-envelopment*-Modells funktioniert (215). Dabei werden die reifen Capside zunächst durch Knospung (*Budding*) an der inneren Kernmembran (INM, *inner nuclear membrane*) in den perinukleären Raum transloziert, wodurch sie ihre primäre Hülle erlangen (Envelopment); (Abb. 3-8); (107,226,280). Diese primäre Hülle geht allerdings durch Fusion mit der äußeren Kernmembran (ONM, *outer nuclear membrane*) wieder verloren, wodurch das Nukleocapsid ins Zytoplasma freigesetzt wird (De-envelopment); (Abb. 3-9); (31,107,215). Nach Translokation ins Zytoplasma führen sequenzielle Protein-Protein-Interaktionen zwischen Tegumentproteinen sowohl untereinander als auch mit Capsid- und einigen viralen Glykoproteinen, die in die Membran des Trans-Golgi-Netzwerks (TGN) eingelagert sind, zur sog. Tegumentation des viralen Nukleocapsids (44,47,78,87,109,319). Aufgrund der Wechselwirkungen mit viralen Glykoproteinen kommt es am TGN zur Knospung bzw. finalen Umhüllung der tegumenthaltigen Viruscapside (*Re-envelopment*); (Abb. 3-10). Durch Transport der Viruspartikel in sekretorischen Vesikeln zur Zelloberfläche und der darauffolgenden Fusion mit der Plasmamembran erfolgt die Freisetzung der reifen Virionen in den extrazellulären Raum (Abb. 3-11).

Im Zusammenhang mit der Thematik dieser Arbeit befasst sich folgender Abschnitt ausführlicher mit der nukleären Auswanderung von HSV-1-Capsiden.

2.1.1.3 Die nukleäre Auswanderung von HSV-1-Capsiden

Die primäre Umhüllung der Nukleocapside an der INM ist ein komplexer Prozess, für den virale und zelluläre Faktoren rekrutiert werden müssen. Während über die beteiligten zellulären Proteine erst wenig bekannt ist, sind die zwei hoch konservierten viralen Proteine UL34 und UL31, die bei diesem Prozess eine entscheidende Rolle spielen, bereits gut charakterisiert (96,215,258,276). UL34 ist ein Typ II-Membranprotein, das mit seiner C-

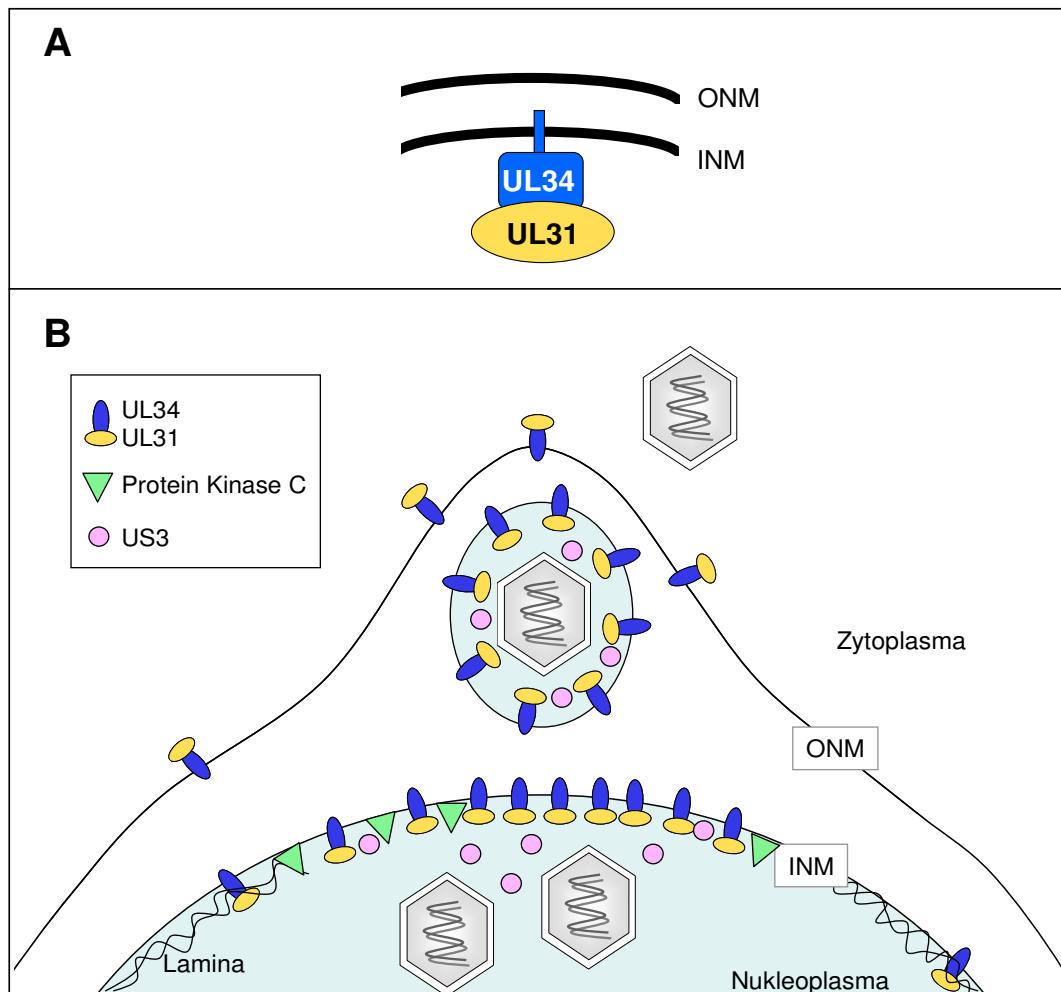


Abb. 4: Schematische Darstellung der nukleären Capsid-Auswanderung. A) Der Kern-Export-Komplex (NEC: *Nuclear Egress Complex*) verankert über den C-Terminus von UL34 in der INM. **B)** Der Rolle des NEC, der zellulären Protein Kinase C und der viralen Proteinkinase US3 bei der nukleären Capsid-Auswanderung. INM *inner nuclear membrane*, ONM *outer nuclear membrane*. [Modifiziert nach (216)]

terminalen Transmembrandomäne in die Kernmembran eingelagert wird (276). Das basische Phosphoprotein UL31 liegt in Abwesenheit von UL34 verteilt im Zellkern vor (37). Sind jedoch beide Proteine vorhanden, werden sowohl UL31 als auch UL34 an die INM verlagert, wo sie zusammen den sog. Kern-Export-Komplex (NEC: *Nuclear Egress Complex*) ausbilden (Abb. 4A); (96,181,257,335). Dieser Komplex ist innerhalb der Herpesviren konserviert und essentiell für die Auswanderung der Nukleocapside aus dem Zellkern (Abb. 4B). Fehlt nur eines der beiden Proteine, kommt es zwar zur Bildung reifer Capside im Zellkern, jedoch nicht zu deren Auswanderung ins Zytoplasma (38,269). Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von UL31 und UL34 in α -Herpesviren ausreicht, um Membranvesikel von der INM abzuschneiden, die Ähnlichkeit mit primären Virushüllen aufweisen. Infolgedessen nimmt man an, dass die beiden Proteine bei Anwesenheit eines Capsids auf eine Art interagieren, die eine Krümmung der inneren nukleären Membran um die Capside induziert (154). Roller *et al.* (2010) konnten diese Hypothese stützen, indem sie zeigen konnten, dass

UL31 und UL34 über eine zusätzliche Sequenz interagieren, die nicht an der NEC-Bildung beteiligt und die möglicherweise für die Krümmung der INM um die Capside verantwortlich ist (267). Dabei handelt es sich um eine Interaktion zwischen N-terminalen Sequenzen von UL34 mit einer C-terminalen Domäne von UL31 (UL34N/UL31C-Interaktion). Ein Modell, das sowohl die Beobachtungen von Klupp *et al.* (2007) als auch von Roller *et al.* (2010) stützt, umfasst folgende Schritte zur Membrankrümmung um Capside an der INM: (i) Zuerst führt die schon lang bekannte Interaktion zwischen UL34 und UL31 zu deren gemeinsamer Lokalisation an der INM. Bis zu diesem Stadium blockiert eine Sequenz im N-Terminus von UL31 die UL34N/UL31C-Interaktion. (ii) Nach Auflösung der nukleären Lamina kommt es durch einen UL34 und möglicherweise durch andere virale oder zelluläre Faktoren vermittelten Prozess zu Wechselwirkungen zwischen Capsiden mit der INM. (iii) Das Andocken der Capside löst eine Strukturänderung im UL31/UL34-Komplex aus, welche die zweite Interaktion von UL34 mit UL31 zur Folge hat. (iiii) Diese Interaktion erlaubt dann, womöglich durch eine weitere Konformationsänderung in einem oder beiden Proteinen, die Multimerisierung der UL31/UL34-Komplexe, die zu einer Krümmung der Kernmembran um die Capside führt (154,267). Die Lokalisierung von UL31 und UL34 an der INM führt zur Rekrutierung anderer Proteine, wie der herpesviralen Serin/Threonin-Kinase US3 und der zellulären Proteinkinase C. Diese Kinasen spielen eine Rolle bei der Phosphorylierung nukleärer Lamine, was zur lokalen Auflösung des Lamin-Netzwerkes am Ort der primären Umhüllung und somit zu einem leichteren Zugang der Nucleocapside führt (20,173,223). US3 ist zwar nicht essentiell und zudem nur innerhalb der α -Herpesviren zu finden, ist aber an der Freisetzung des primär umhüllten Virions ins Zytoplasma beteiligt. Das Fehlen der US3-Kinase führt zur Anhäufung umhüllter Virionen innerhalb des perinukleären Raums, zu einer Mislokalisierung des UL31/UL34-Komplexes und zu einer verspäteten Produktion infektiöser Viren (140,155,223,258,271). Folglich nimmt man an, dass die Kinase eine Rolle beim *De-envelopment* an der ONM spielt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass UL34 und UL31 durch die US3 Kinase phosphoryliert werden können (20,155,223,224,240,249). Es ist jedoch unbekannt, welche Rolle diese Phosphorylierungen während der viralen Replikation spielen. Sowohl UL31 als auch UL34 konnten assoziiert mit primär umhüllten Virionen im perinukleären Raum, jedoch nicht in Verbindung mit zytoplasmatischen oder extrazellulären Viruspartikeln, detektiert werden (96,156,258). Dagegen ist US3 auch ein Bestandteil reifer, extrazellulärer Viruspartikel (108,258). Trotz dieser Erkenntnisse ist der genaue molekulare Mechanismus der Vesikelbildung, Abschnürung und Fusion noch nicht geklärt.

2.1.1.4 Der nukleo-zytoplasmatische Transport herpesviraler Proteine

Entscheidende Prozesse des herpesviralen Lebenszyklus wie DNA-Replikation, Gen-Transkription, RNA-Export, Capsid-Morphogenese, Verpackung der Virus-DNA und Capsid-Auswanderung ereignen sich im Zellkern der Wirtszelle und erfordern, dass sämtliche für diese Vorgänge benötigten Virusproteine zwischen Zytoplasma und Zellkern transportiert werden. Man kennt die Transportfaktoren bzw. Transportsignale, die den nukleo-zytoplasmatischen Transport vermitteln, jedoch nur für eine geringe Zahl von Virusproteinen. Zu diesem Transport bedienen sich Herpesviren am Transport-Mechanismus ihrer Wirtszelle, auf den im Folgenden genauer eingegangen wird.

2.2 Nukleo-zytoplasmatischer Transport

Im Gegensatz zu prokaryotischen Zellen, denen ein definierter Zellkern fehlt und die eine vereinfachte innere Organisation aufweisen, besitzen eukaryotische Zellen eine komplexe innere Struktur, u. a. einen Zellkern, der von einer Doppelmembran (Kernhülle) umschlossen ist und Nukleoplasma von Zytoplasma trennt. Einerseits müssen Proteine, die für den Kern bestimmt sind, vom Ort ihrer Synthese, dem Zytoplasma, in den Kern gelangen. Dabei handelt es sich z. B. um Proteine, die eine Rolle bei der DNA-Replikation, der Transkription und dem Zusammenbau von Ribonukleoprotein-Komplexen (RNPs) spielen. Andererseits müssen Komponenten, die im Kern hergestellt (z. B. RNA-Moleküle) oder zusammengesetzt (z. B. ribosomale Untereinheiten) werden bzw. sich nur temporär darin befinden, den Kern verlassen. Dieser nukleo-zytoplasmatische Austausch erfolgt über sog. Kernporenkomplexe (*nuclear pore complex*, NPC), die einen direkten Durchgang durch die Kernhülle bilden. Bei höheren Eukaryonten besitzen diese supramolekularen Komplexe eine molekulare Masse von ca. 125 MDa (84) und sind aus mind. 30 verschiedenen Proteinen, den sog. Nukleoporinen aufgebaut (57,270), die in einer oktagonalen Rotationssymmetrie angeordnet sind. Ungefähr ein Drittel aller identifizierten Nukleoporine enthalten charakteristische Strukturmodule aus Wiederholungen von Phenylalanin- und Glycin-Resten (FG-Motive), die vor allem den inneren Transportkanal säumen (3,295,304,313). Von einer Kanal bildenden Struktur, welche die Doppelmembran durchspannt, erstrecken sich Fibrillen einerseits ins Zytoplasma und andererseits ins Kerninnere. Auf der Kerninnenseite konvergieren diese Fibrillen zu korbartigen, flexiblen Strukturen. Die Translokation von Ionen, kleinen Molekülen und Proteinen mit einem Molekulargewicht bis zu 40 kDa, die nicht mit Nukleoporinen interagieren, erfolgt durch passive Diffusion (105), wohingegen der aktive und selektive Transport größerer Proteine und RNPs in der Regel durch Bindung an Transportfaktoren der evolutionär konservierten Importin α - β -Familie (Karyopherine) vermittelt wird (252). Diese

Familie umfasst 14 Mitglieder in der Hefe, während das humane Genom mehr als 20 Gene enthält (Tab. 4); (61,94,105,199,222). Je nach Transportrichtung werden die Transportfaktoren als Importine oder Exportine bezeichnet (106), die über Kernlokalisationssequenzen [nukleäre Lokalisationssequenzen (NLS) oder nukleäre Exportsequenzen (NES)] mit ihren Substraten interagieren. Die meisten Transportfaktoren binden direkt an ihre Substrate, während KPNB1 ebenso indirekte Interaktionen mit Hilfe sog. Adaptoren eingeht. Die Verwendung verschiedener Adaptoren verhilft KPNB1 zu großer Vielseitigkeit (45,81). So erkennt es mit Hilfe von Mitgliedern der Importin α -Familie (KPNA1-6) Proteine, die klassische NLS (cNLS) aufweisen (104,221). Zudem ist KPNB1 jedoch auch in der Lage, über den Adapter Snurportin Uracil-reiche kleine nukleäre RNAs (uracil-rich small nuclear RNAs, U snRNAs) im Anschluss an deren zytoplasmatische Prozessierung zu reimportieren (123). Ferner bindet KPNB1 wie andere Transportfaktoren an verschiedene Proteine direkt. Dazu gehören u. a. virale Proteine und ribosomale Proteine, die für den nukleolären Zusammenbau der prä-ribosomalen Untereinheiten importiert werden müssen (Tab. 4); (130,237,314). Im Allgemeinen erkennt und bindet ein einziger Transportfaktor verschiedene Substrate. Für viele Substrate ist jedoch eine gewisse Redundanz der Transportsysteme erforderlich, da sie für eine ausreichende Lokalisation mehrere unterschiedliche Transportfaktoren benötigen. So erlauben die Transportsignale von ribosomalen Proteinen nicht nur die Assoziation mit bestimmten, sondern mit verschiedenen Karyopherinen (94,301). Unter den Faktoren sind auch bifunktionale Vertreter, wie TNPO2 und IPO13, die sowohl als Exporter als auch als Importer fungieren.

Tab. 4: Zusammenfassung der bekannten humanen Transportfaktoren der Importin α - und β -Familie mit ihren Bezeichnungen und Substraten. Die Einteilung nach Importinen und Exportinen erfolgt aufgrund ihrer Transportrichtung. Mitglieder der Importin β -Familie sind gelb, Mitglieder der Importin α -Familie blau hinterlegt. cNLS klassische NLS; cNES klassische NES

Importine		
ORF	Synonyme Bezeichnungen der Proteine	Substrate
IPO4	Importin 4, Imp4	Ribosomale Proteine (133), Vitamin D Rezeptor (219), HIF-1 α (36), Transition Protein 2 (246)
IPO5	Importin 5, RanBP5	Ribosomale Proteine (130), Histone (114)
IPO7	Importin 7, RanBP7	Ribosomale Proteine (130), Import von Histon H1 durch Importin β /Importin 7-Heterodimer (129), HIF-1 α (36), SMAD Proteine (340)
IPO8	Importin 8, RanBP8	SMAD Proteine (340), SRP19 (64)

Importine		
ORF	Synonyme Bezeichnungen der Proteine	Substrate
IPO9	Importin 9, Imp9	Ribosomale Proteine (132), Sox2 (103)
IPO11	Importin 11, RanBP11	UbcM2 (243), UbcH6, Ribosomale Proteine L12 der Maus (243)
IPO13	Importin 13, Imp13, RanBP13	hUBC9 (218), Glucocorticoid Rezeptor (309)
TNPO1	Transportin 1, Importin β 2, MIP, TRN, IPO2, MIP1, KPNC2	hnRNP Proteine (A1, D, F, M, HuR, DDX3, Y-box binding protein); (24,85,110,141,244,254,278,305), ribosomale Proteine (130), Histone (114), mRNA export factor TAP (7,315), SRP19 (64), ADAR1 (95)
TNPO2	Transportin 2, Importin 3, Karyopherin β 2b, IPO3, KPNC2B, TRN2	mRNA-Bindeprotein HuR (98)
TNPO3	Transportin 3, TRN-SR, MTR10A, TRN-SR2	Proteine mit SR-Domäne (139,167)
KPNC1	Karyopherin (Importin) β 1, NTF97, IPOB, IMB1, Impnb	Ribosomale Proteine (130), virale Proteine Tat, Rev von HIV (314), Cyclin B1 (220,307), Smad Proteine (330), T-Zell Protein Tyrosin Phosphatase (312), SREBP-2 (177), PTHrP (168), NK3R (134) <u>Adaptoren:</u> Importin α /cNLS-tragende Proteine, Importin α /4 ^E -T (71), Snurportin 1/ <i>m</i> ³ G-capped U snRNPs (123), Importin 7/Histon H1 (129)
KPNA1	Karyopherin α 1, Importin α 5, SRP1, RCH2, NPI-1, IPOA5	STAT1, STAT2 (214), p52, c-Rel, RelB (83), EBNA-1 von EBV (145)
KPNA2	Karyopherin α 2, Importin α 1, RAG cohort 1, SRP1 α , IPOA1, QIP2, RCH1	EGFR (191), Zac1 (122), PB2 und NP von Influenza A (97)
KPNA3	Karyopherin α 3, Importin α 4, SRP1 γ , SRP4, hSRP1, IPOA4	Notch1 (124), p52 (83)

Importine		
ORF	Synonyme Bezeichnungen der Proteine	Substrate
KPNA4	Karyopherin α 4, Importin α 3, QIP1, SRP3, IPOA3	SV40-NLS, Notch1 (124), p52 (83)
KPNA5	Karyopherin α 5, Importin α 6, SRP6, IPOA6	p52, c-Rel, RelB (83)
KPNA6	Karyopherin α 6, Importin α 7, IPOA7, KPNA7	Notch1 (124), c-Rel (83)
Exportine		
XPO1	Exportin 1, CRM1 (Homolog der Hefe)	cNES-tragende Proteine, Snurportin 1 (239), EGFR (191)
XPO2	Exportin 2, CAS, Cse1L	Importin α (163)
XPO4	Exportin 4	eIF-5A (184)
XPO5	Exportin 5	ILF3 (30), eEF1A, tRNAs (34), JAZ (42), Vorläufer-miRNAs (195), ADAR1 (95)
XPO6	Exportin 6, RanBP20	Profilin/Aktin (303)
XPO7	Exportin 7, RanBP16	E2A (175)
XPOT	Exportin 3 (Export von tRNAs), XPO3	tRNAs (5,6,164)
XPOTP1	Exportin 3P1, Pseudogene 1, XPO3P1	tRNAs
IPO13	Importin 13, Imp13, RanBP13	eIF-1A (218)
TNPO2	Transportin 2, Importin 3, Karyopherin β 2b, IPO3, KPNB2B, TRN2	mRNA-Bindeprotein HuR (98)

Die Transportfaktoren weisen nicht nur eine Affinität zum jeweiligen Substrat, sondern auch zu Phenylalanin-Glycin- (FG-) reichen Nukleoporinen auf und ermöglichen dadurch die Translokation der Substrate durch die Kernporen. Im Ruhezustand weist der Transportkanal

des NPC einen Durchmesser von 9 nm auf (88,143), der sich während des aktiven Transportes auf bis zu 45 nm weiten kann (297). Somit liegt die Ausschlussgrenze der transportierbaren Moleküle bei einem Durchmesser von etwa 40 nm (50 MDa); (238). Bezüglich des genauen Mechanismus der Translokation werden drei verschiedene Modelle diskutiert (84,259,270). Die Regulation des Transportes und die Energiebereitstellung erfolgt über einen Gradienten der kleinen GTPase Ran (*ras-related nuclear protein*); (251). Diese kommt in zwei definierten konformativen Zuständen vor, abhängig davon, ob GTP oder GDP gebunden ist. Der Wechsel zwischen den beiden Zuständen wird von zwei regulatorischen Proteinen gesteuert, dem zytoplasmatischen GTPase-aktivierenden Protein RanGAP1 (GAP, *GTPase-activating protein*), das mit Unterstützung der Ran-Binde-Proteine RanBP1 und RanBP2 (*Ran-binding protein*) die hydrolytische Spaltung von Ran gebundenen GTP einleitet und dadurch RanGTP in RanGDP umwandelt, und dem im Kern befindlichen Guaninnukleotid-Austauschfaktor (RanGEF, *guanine nucleotide exchange factor*) RCC1, der den Austausch von GDP gegen GTP katalysiert (13,17,18,54,151,152). Da RanGAP1 und RanBP1 ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert sind und sich RanGEF durch Chromatinbindung im Kern befindet, kommt es zu einem steilen Gradienten von RanGDP/GTP über beide Kompartimente, der dem Transport seine Richtung verleiht (137,232,282,323).

2.2.1 Kernlokalisationssequenzen

Importine interagieren mit ihren Substraten über spezifische Signalsequenzen. Die am besten charakterisierten sind die klassischen nukleären Lokalisationssequenzen (cNLS), die von der Gruppe der α -Importine gebunden werden. Klassische NLS bestehen entweder aus einem einzigen Cluster basischer Aminosäuren (*monopartite* NLS) oder aus zwei basischen Sequenzabschnitten (*bipartite* NLS), die durch eine *Linker*-Region voneinander getrennt sind (69,138,260). Die als erstes entdeckten Typen beider Gruppen sind die *monopartite* NLS des großen T-Antigens des Simian Virus 40 (*SV40 large tumor antigen* NLS, ¹²⁶PKKKRKV¹³²); (138) und die *bipartite* NLS von Nucleoplasmin (¹⁵⁵KRPAATKKAGQAKKKK¹⁷⁰); (260). Es existieren jedoch auch *monopartite* cNLS wie z. B. die c-Myc NLS (³²⁰PAAKRVKLD³²⁸), welche nur drei basische Aminosäuren enthalten (62). Die Consensus-Sequenz *monopartiter* NLS lautet somit K-K/R-X-K/R (39,200), wobei X für jede beliebige Aminosäure steht. Die Consensus-Sequenz *bipartiter* NLS wurde wie folgt definiert K/R-K/R-X₁₀₋₁₂-K/R_{3/5}, wobei das K/R_{3/5}-Motiv mindestens drei basische Reste (Arginin oder Lysin) in fünf aufeinander folgenden Aminosäuren enthält. Die Linkerregion besteht in der Regel aus 10-12 variablen Aminosäuren, wobei Prolin und saure Reste häufiger vertreten sind als hydrophobe Reste.

Mittlerweile sind jedoch auch Kristallstrukturen von Importin α mit unterschiedlichen NLS bekannt, die nicht mit der Consensus-Sequenz klassischer NLS übereinstimmen (49,50,91,92). Mit Hilfe einer Hochdurchsatz-Analyse zufälliger Peptid-Banken konnten sechs verschiedene NLS-Typen identifiziert werden, die mit Importin α eine Interaktion eingehen. Dabei konnte auch gezeigt werden, dass Unterschiede in den flankierenden Sequenzbereichen und im Linkerbereich *bipartiter* NLS zusätzlich zu variablen NLS-Aktivitäten führen (159).

Es gibt auch Substrate, deren NLS direkt an Rezeptoren der Importin β -Familie binden. Jedoch erschwert die Komplexität der damit verbundenen Signalsequenzen die Vorhersage neuer Substrate. Ein Beispiel dafür ist der relativ gut untersuchte Importweg von Transportin 1 (TNPO1), für den bisher mehrere mRNA prozessierende Proteine als Substrate identifiziert werden konnten (Tab. 4). Das am besten charakterisierte ist der *Splicing*-Faktor hnRNP A1 (heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein A1), der über eine 38 Aminosäure lange Sequenz, der M9NLS mit TNPO1 interagiert (24,244). Allerdings besitzen die NLS der anderen bekannten Substrate von TNPO1 nur sehr geringe bis keine Homologien zur M9NLS. Mittels strukturellen und biochemischen Analysen konnten jedoch folgende drei Regeln für die NLS-Interaktion mit TNPO1 festgelegt werden, die auch für die Vorhersage weiterer Substrate behilflich sein können: in ungebundenem Zustand sind die NLS strukturell ungeordnet, besitzen insgesamt einen basischen Charakter und verfügen über ein zentrales hydrophobes oder basisches Motiv, das von der C-terminalen Consensus-Sequenz R/H/KX₂₋₅PY gefolgt ist. Daraus ergibt sich der Name PY-NLS für diese Signalklasse (174).

2.2.2 Kernexportsequenzen

Die am besten charakterisierten nukleären Exportsequenzen (NES) bestehen aus einer kurzen hydrophoben Sequenz und wurden erstmals im Rev-Protein (⁷³LQLPPLERL⁸³) des menschlichen Immunschwächevirus HIV (89) und im zellulären cAMP-abhängigen Proteinkinase A-Inhibitor PKI (³⁷LALKLAGLD⁴⁷) identifiziert (325). Bei diesen sog. klassischen NES (cNES) sind vier hydrophobe Aminosäure-Reste (Φ^1 - Φ^4), meist Leucin, aber auch Isoleucin, Valin, Methionin oder Phenylalanin durch geladene, polare oder kleine Reste (x) unterbrochen. Mittlerweile konnte mit Hilfe der Consensus-Sequenz Φ^1 -(x)₂₋₃- Φ^2 -(x)₂₋₃- Φ^3 -x- Φ^4 eine Vielzahl funktionell verwandter Exportsequenzen sowohl in zellulären als auch in viralen Proteinen nachgewiesen werden. Diese klassischen NES gehen mit dem Importin β -verwandten Exportfaktor Crm1/Exportin1/XPO1 über hydrophobe Wechselwirkungen eine direkte Interaktion ein. Der nukleäre Import-Rezeptor für snRNPs Snurportin 1 (SPN1) ist ebenfalls ein Substrat von Crm1, dessen NES den klassischen NES stark ähnelt, jedoch fünf statt nur vier entscheidende hydrophobe Reste besitzt (Φ^0 - Φ^4). Die NES-

Bindungsstelle in Crm1 mit ihren fünf Bindungstaschen für die hydrophoben Φ -Reste ist sehr starr und kann sich den individuellen NES nicht anpassen. Da ihre hydrophoben Reste unterschiedliche Abstände voneinander aufweisen, müssen die NES-Liganden sehr flexibel sein, um mit Crm1 interagieren zu können. Diese Anpassung erfolgt mit Hilfe verschiedener Konformationen, die von einem α -helikalen bis zu einem annähernd ausgestreckten Zustand der NES-Liganden reichen (111).

Sowohl die NES-Diversität als auch die Häufigkeit leucinreicher Sequenzen machen die NES-Vorhersage zu einer sehr schwierigen Aufgabe. So besitzen z. B. Membranproteine amphipatische α -helikale Transmembranregionen, die den leucinreichen nukleären Exportsequenzen sehr ähnlich sind. Um eine NES vorherzusagen bzw. zufriedenstellend zu beschreiben, müssen neben der Consensus-Sequenz auch noch benachbarte Sequenzen, die Flexibilität, die Zugänglichkeit und die Sekundärstruktur in Betracht gezogen werden (166). Man nimmt z. B. an, dass zusätzlich zu den hydrophoben Resten auch benachbarte Sequenzen aus Glutamat, Aspartat und Serin für die NES-Funktionalität wichtig sind. Wahrscheinlich tragen sie zur hohen Flexibilität der NES-Liganden bei (166).

Nicht alle Crm1-Substrate werden konstitutiv aus dem Nukleus transportiert. So können NES zu bestimmten Zeitpunkten durch Protein-Protein-Interaktionen maskiert und wieder freigegeben werden (56,116,157,180,274,298). Zudem können verschiedene Phosphorylierungszustände (32,82,210,231,345) und die Ausbildung von Disulfidbrücken (161,162,336) die Export-Aktivität eines Proteins beeinflussen.

Der klassische Export mittels Crm1 ist sensitiv gegenüber dem Fungizid Leptomycin B (LMB) und kann somit von anderen Exportwegen unterschieden werden (161,329). LMB bindet kovalent an einen Cysteinrest von Crm1 und hemmt so dessen Interaktion mit einem Export-Substrat.

2.2.3 Strukturelle Eigenschaften der Transportrezeptoren

Die molekulare Grundlage der Interaktion zwischen Importin α und der cNLS eines Transport-Substrates konnte mittels Röntgenstrukturanalyse gezeigt werden (49,50,91,92). Importin α besteht aus einer großen gebogenen Domäne, die 10 hintereinander liegende sog. Armadillo (ARM)-Motive umfasst, und einer flexiblen N-terminalen Domäne (IBB-Domäne), die sowohl bei der Bindung an Importin β (104) als auch bei der Substrat-Dissoziation (86,115,158) eine Rolle spielt (Abb. 5B). Die Wiederholung der ARM-Motive, bei dem jedes aus drei α -Helices (H1, H2, H3) aufgebaut ist (Abb. 5A), erzeugt eine superhelikale Struktur mit einer gewölbten Außenfläche und einer konkaven Innenfläche, in der sich zwei - eine

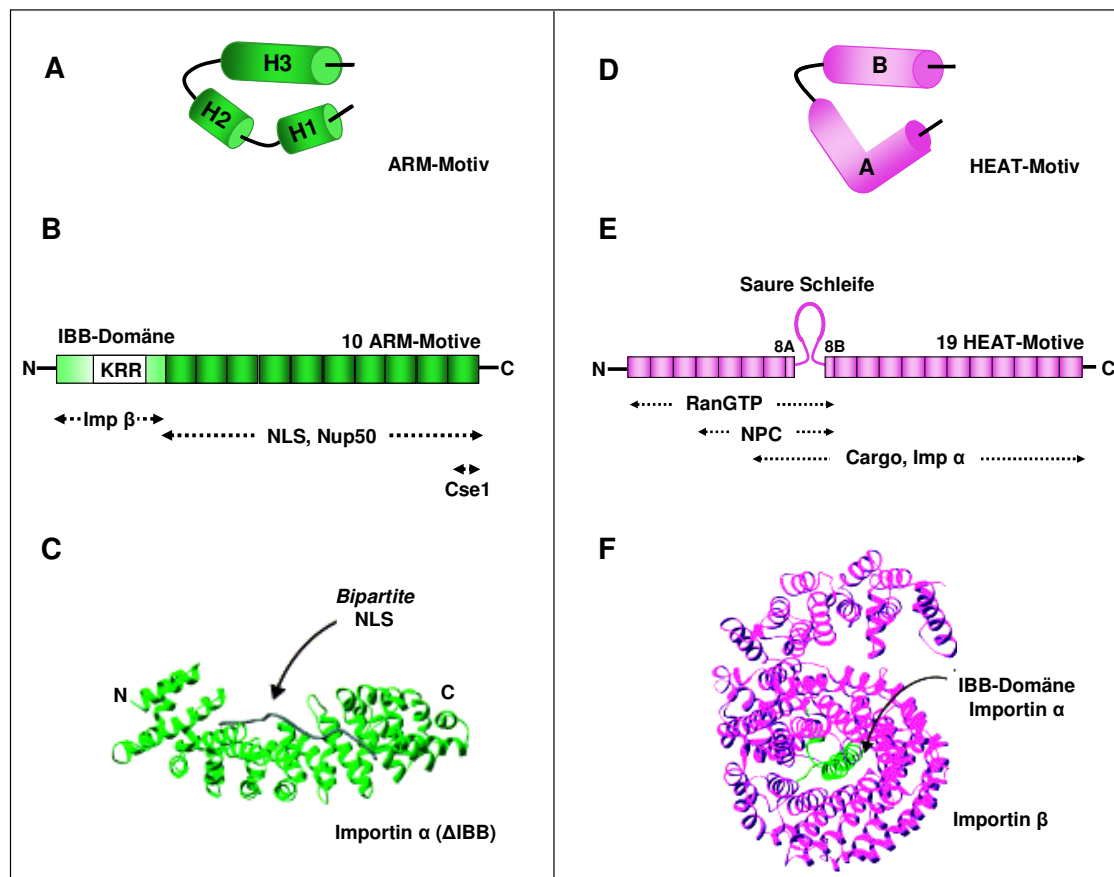


Abb. 5: Strukturen der Transportrezeptoren Importin α und β . **A)** Schematische Darstellung eines ARM-Motivs von Importin α , das aus drei α -Helices H1-3 aufgebaut ist. **B)** Importin α ist aus 10 HEAT-Motiven und einer flexiblen N-terminalen IBB-Domäne zusammengesetzt. Die Bindungsstellen für Importin β , NLS-tragende Proteine, das Nukleoporin Nup50 und den Exportfaktor Cse1 sind gekennzeichnet. Die Lage des autoinhibitorischen KRR-Motivs ist ebenfalls abgebildet. **C)** Die Struktur von Importin α mit gebundener *bipartite* NLS. **D)** Schematische Darstellung eines HEAT-Motivs von Importin β , bestehend aus zwei α -Helices A und B, die über eine kurze Schleife verbunden sind und starke Ähnlichkeiten zu dem ARM-Motiv von Importin α aufweist. **E)** Importin β ist aus 19 HEAT-Motiven zusammengesetzt. Die A- und B-Helices im HEAT-Motiv 8 sind von einer sauren Schleife voneinander getrennt, die eine wichtige Rolle bei der Regulation der Substrat-Bindung und -Freigabe spielt. Die HEAT-Motive 1-8 interagieren mit RanGTP, die Motive 7-19 mit der IBB-Domäne von Importin α und die Motive 4-8 mit Nukleoporinen des NPC. **F)** Die Struktur von Importin β mit gebundener IBB-Domäne von Importin α (grün). Die Strukturen von C und F sind dem *Review* von Conti und Izaurralde (2001) entnommen (48).

größere N-terminale und eine kleinere C-terminale - NLS-Bindungstaschen befinden, die von konservierten Asparagin- und Tryptophan-Resten gesäumt sind (Abb. 5C); (50,158). Somit sind bei der NLS-Bindung an Importin α sowohl polare als auch hydrophobe Wechselwirkungen beteiligt. Während die größere Bindungstasche mit *monopartiten* NLS und mit dem längeren basischen Sequenzabschnitt *bipartiter* NLS interagiert, bindet die kleinere Bindungstasche nur an die kurzen basischen Sequenzabschnitte *bipartiter* NLS (50,158). Wie bereits erwähnt, erfüllt die N-terminale IBB-Domäne zwei Funktionen: Autoinhibition und Importin β -Bindung (Abb. 6). Bei der Autoinhibition konkurriert eine NLS-ähnliche Sequenz aus KRR-Resten in der IBB-Domäne durch Interaktion mit der größeren NLS-Bindungstasche im Importin α um die Bindung an eine cNLS. Nach Import des trimeren

Komplexes führt die RanGTP-induzierte Dissoziation von Importin β zu einer freien IBB-Domäne, die nun mit der großen NLS-Bindetasche interagieren und somit die Substratfreigabe im Kern einleiten kann (50,91,115,158). Bei der Bindung von Importin α an Importin β sind ebenfalls basische Aminosäuren der IBB-Domäne beteiligt. Dabei wird die IBB-Domäne von einer C-terminalen Region von Importin β spiralförmig umschlossen, wobei der Innenbereich der Importin β -Wicklung negativ geladen und damit elektrostatisch komplementär zur IBB-Domäne ist (46). Schon frühe Mutations- und Deletionsstudien belegen, dass Importin β aus drei einfachen Domänen zusammengesetzt ist. Dabei handelt es sich um eine N-terminale RanGTP bindende Domäne, eine zentrale Domäne, die mit Nukleoporinen des NPC interagiert und eine C-terminale Importin α - bzw. Substrat-bindende Domäne (Abb. 5E). Mittels Röntgenstrukturanalyse wurde gezeigt, dass Importin β ähnlich wie Importin α aus hintereinander geschalteten Helix-Motiven, den 19 sog. HEAT-Motiven, aufgebaut ist. Jedes HEAT-Motiv besteht aus zwei α -Helices, A und B, die über eine Schleife verbunden sind (Abb. 5D). Im HEAT-Motiv 8 trennt eine große saure Schleife beide Helices (Abb. 5E). Diese HEAT-Motive führen zu einer superhelikalen Struktur, deren Außenfläche von den gekrümmten A-Helices und deren konkaver Innenfläche von den B-Helices gebildet wird (Abb. 5F); (46,48). Die enorme Flexibilität von Importin β erlaubt die Bindung an eine Vielzahl verschiedener Proteine.

2.2.4 Der klassische Kernimport

Der am besten untersuchte Transportzyklus ist der des klassischen Kernimports (Abb. 6). Hierbei bildet sich im Zytoplasma ein trimerer Komplex bestehend aus Importin α , Importin β (Karyopherin β 1; KPNB1) und Substrat (104). Während Importin α mit seiner Adaptor-Funktion sowohl an die NLS des Substrats als auch an Importin β 1 bindet, tritt Importin β 1 mit den Nukleoporinen (insbesondere mit Nukleoporinen, die FG-Wiederholungen besitzen) des NPC in Wechselwirkung und transportiert so den Komplex in das Nukleoplasma (105). Im Zellkern konkurriert RanGTP mit Importin α um die Bindung an Importin β 1, da sich ihre Bindungsdomänen im Bereich der sauren Schleife überlappen (Abb 5E); (46,176,318). Zudem veranlasst die Bindung von RanGTP an Importin β 1 eine Konformationsänderung, wodurch der Importin α -Substrat Komplex freigesetzt wird (176). Eine autoinhibierende Region in der Importin β -bindenden (IBB) Domäne von Importin α (115,158), das Nukleoporin Nup50 (101,204,206) und der Exportfaktor CSE1L (205) tragen gemeinsam zur Dissoziation des Substrates von Importin α und dessen Freigabe in den Nukleus bei. Für einen erneuten Importzyklus wird Importin α durch den Exportrezeptor CSE1L in einem trimeren Komplex mit RanGTP zurück ins Zytoplasma transportiert (121,163). Importin β 1 und RanGTP verlassen den Kern als Komplex (118,128), der im Zytoplasma in Anwesenheit

von Importin α , dem C-Terminus von Nup1, RanGAP1 und RanBP1 dissoziiert (90). Um einer resultierenden zytoplasmatischen Akkumulation von Ran entgegenzuwirken, wird dieses vom Transportfaktor NTF2 reimportiert, der keine Homologie zu Karyopherinen aufweist (281).

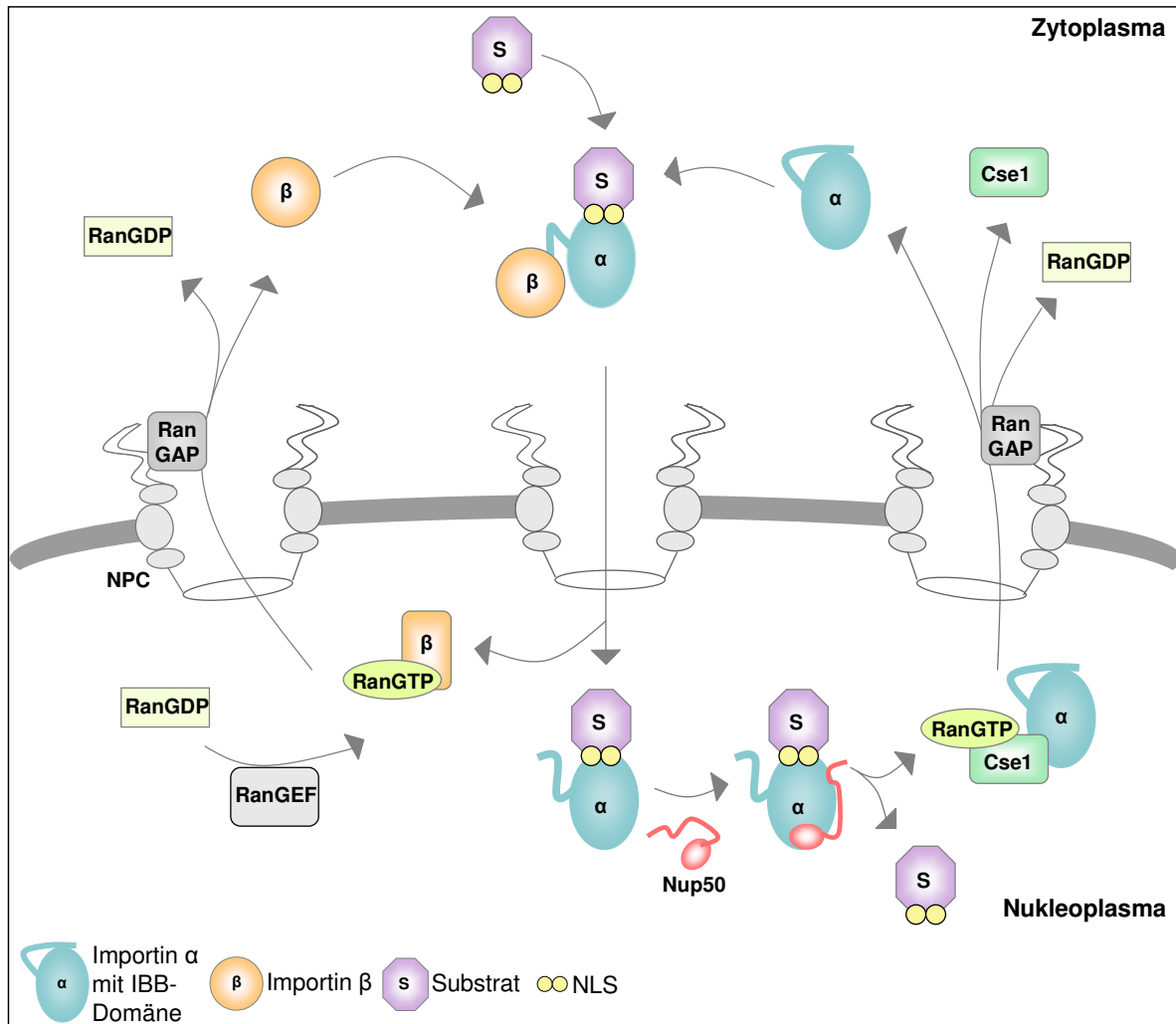


Abb. 6: Schematische Darstellung des klassischen α/β -vermittelten Kernimports. Der im Zytoplasma gebildete Importkomplex, bestehend aus Importin α , Importin β und Substrat, gelangt durch Kernporenkomplexe (NPC) in den Zellkern. Dort führt die Bindung von RanGTP, das mit Hilfe des chromatingebundenen RanGEF (RCC1) gebildet wurde, zu einer Konformationsänderung im Importin β , das dadurch von der IBB-Domäne von Importin α abdissoziiert und den Kern in RanGTP-gebundener Form wieder verlässt. Die autoinhibierende IBB-Domäne erleichtert zusammen mit Nup50 und Cse1 die Substratfreigabe im Nucleoplasma. Auch Importin α wird für einen neuen Importzyklus mit Hilfe des RanGTP-gebundenen Exportfaktors Cse1 zurück ins Zytoplasma transportiert. Im Zytoplasma führt die von RanGAP katalysierte Hydrolyse des Ran-gebundenen GTP zur Dissoziation der Exportkomplexe (Importin β /RanGTP; Importin α /Cse1/RanGTP).

Dieser klassische Importin α/β -vermittelte Transportweg ist weit verbreitet. Es sind jedoch auch Signalsequenzen bekannt, die keine Ähnlichkeiten zu den klassischen NLS besitzen und direkt von Rezeptoren der Importin β -Familie gebunden und transportiert werden können.

2.2.5 Der Importin β -vermittelte Kernexport

Der am besten untersuchte Importin β -vermittelte Kernexport erfolgt über das Exportin Crm1/Exportin1/XPO1. Im Nukleoplasma bindet es kooperativ an die klassische NES (cNES) ihres Substrates, sowie an RanGTP (Abb. 7), dabei erhöht RanGTP die Affinität des Exportins für das Substrat. Nachdem dieser Komplex die Kernpore passiert hat, stimuliert RanGAP, das im Zytoplasma lokalisiert ist, die Umwandlung von RanGTP zu RanGDP. Die damit verbundene Konformationsänderung des Ran-Proteins führt zur Dissoziation des Komplexes und somit zur Freisetzung des Cargo-Proteins. Der Rücktransport des unbeladenen Exportins in den Zellkern erfolgt selbständig, der von Ran mit Hilfe des Transportfaktors NTF2 (94,301).

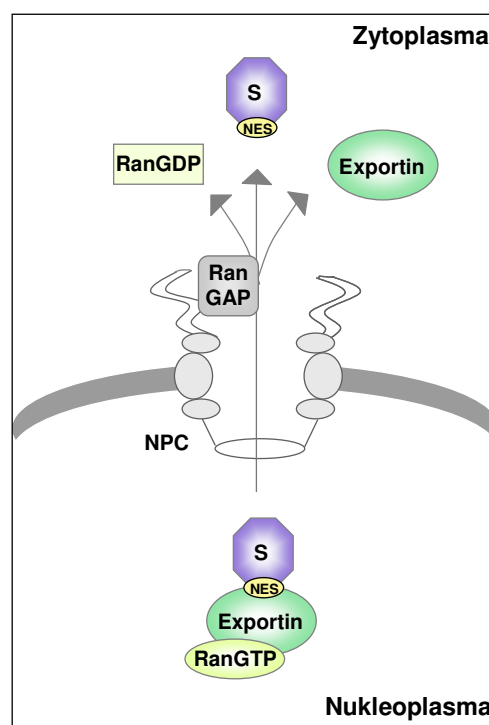


Abb. 7: Der klassische Kernexport. In Anwesenheit von RanGTP im Kern bindet der Exportrezeptor Xpo1/Exportin1 an die leucinreiche NES eines Cargo-Proteins. Nach Transfer des trimeren Komplexes durch die Kernpore (NPC) ins Zytoplasma vermittelt RanGAP die Hydrolyse von Ran-gebundenen GTP zu GDP, wodurch der Exportkomplex zerfällt und das Substrat freigesetzt wird.

Neben Proteinen werden auch RNA-Moleküle von Transportfaktoren der Importin β -Familie exportiert. Der Export von tRNAs wird von den Transportrezeptoren Exportin t (XPOT) und Exportin 5 (XPO5) vermittelt, die sich durch eine direkte Bindung der RNA-Substrate von anderen Karyopherinen unterscheiden (5,30,34,52). Exportin 5 ist zudem für den Export sog. Prä-microRNAs (Prä-miRNAs) verantwortlich (195,235). Prä-miRNAs werden im Zytoplasma prozessiert und übernehmen im reifen Zustand als ca. 22 Nukleotide lange, endogene, nicht-kodierende RNA-Moleküle eine bedeutende Rolle bei der post-transkriptionellen Genregulation, insbesondere beim Gen-Silencing (23,195). Sowohl XPOT als auch XPO5

erkennen ihre Substrate sequenzunabhängig und nur in korrekt prozessierter Form. Die konkave Seite beider Karyopherine ist von positiv geladenen Resten gesäumt, die mit dem negativ geladenen Phosphatrückgrat der Nukleinsäuren elektrostatisch wechselwirken. Dagegen beruht die spezifische Bindung auf besonderen strukturellen Merkmalen reifer RNAs (51).

Die Voraussetzung für den Export zellulärer mRNAs ist eine vorangegangene Prozessierung, Verpackung in RNPs mit Hilfe RNA-bindender Protein und Interaktion mit Exportfaktoren. Für den nukleären Export von mRNAs sind im Allgemeinen zwei unterschiedliche Mechanismen bekannt. Einer basiert auf dem oben beschriebenen Exportfaktor CRM1, der indirekt über Adaptermoleküle mit den mRNA-Molekülen interagiert. Ein Beispiel für solch einen Adaptor ist das Protein Rev des humanen Immunschwäche-Virus (HIV). CRM1 ist jedoch nicht allein für den mRNA-Export in Säugerzellen verantwortlich. Der humane mRNA-Exporter TAP leistet einen weitaus größeren Beitrag. In Säugerzellen ist ein schneller und effizienter mRNA-Export vom Spleißvorgang der prä-mRNAs abhängig (190). Das Protein REF koppelt beide Prozesse, indem es direkt mit TAP interagiert (302) und zu Bereichen rekrutiert wird, an denen Spleißosomen gebildet werden (171,172,196). Die Bindung von REF an gespleißter mRNP erhöht die Rate und Effizienz des mRNA-Exports (264,346). Für zelluläre intronlose mRNAs, die nicht mit Spleißosomen assoziiert vorliegen, ist die Export-Effizienz deutlich geringer. Da die meisten Transkripte von HSV-1 keine Introns enthalten, kodiert das Virus ein essentielles regulatorisches Protein (UL54), das virale intronlose mRNAs bindet und dessen effektiven nukleären Export vermittelt (273). UL54 besitzt eine klassische leucinreiche NES und verbindet somit virale mRNAs mit dem Exportfaktor CRM1 (273). Außerdem konnte gezeigt werden, dass UL54 mit REF interagiert, was zu einer Rekrutierung des Transportfaktors TAP und somit zum nukleären Export der viralen mRNA führt (40).

2.2.6 Unkonventionelle Funktionen der Importin α/β -Familie und Ran

Neben seiner Aktivität als nukleärem Transportrezeptor fungiert Importin β ebenso als globaler Regulator für diverse zelluläre Vorgänge. Als Chaperon verhindert es die Aggregation basischer Proteine wie ribosomale Proteine und Histone im Zytoplasma, indem es an sie bindet und ihre basischen Domänen abschirmt (131). Außerdem vermutet man, dass Importin β als Adaptorprotein beim Transport von Proteinen und Cargos wie HSV-1-Partikel entlang Mikrotubuli-Filamenten zum Zellkern eine Rolle spielt (35,99,169). Importin α , β und ihr Gegenspieler Ran kontrollieren zudem entscheidende Prozesse während der

Mitose, dazu gehören u. a. die Bildung des Spindelapparates, der Kernmembran und NPCs (114).

2.3 Zielsetzung

Die Regulation der räumlichen und zeitlichen subzellulären Verteilung viraler Proteine ist wesentlich für die erfolgreiche Virusvermehrung und die Analyse der beteiligten Mechanismen ein wichtiger Schritt hin zu einem umfassenden Modell der Herpesvirus-Infektion. Aus diesem Grund soll in diesem Projekt der nukleo-zytoplasmatische Austausch herpesviraler Proteine mit Hilfe Hochdurchsatz-basierter Methoden umfassend untersucht werden. Dazu sollen alle Proteine von HSV-1, die über spezifische Signale an Transportfaktoren der humanen Importin α - und β -Familien binden, identifiziert werden. Mit Hilfe dieser Ergebnisse kann die Bedeutung bestimmter Transportwege für den herpesviralen Replikationszyklus dargestellt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Laborgeräte und *Software*

Adobe Photoshop CS	Adobe
Brutschränke	Heraeus, Memmert
DNAMAN 6.0	Lynnon Bio Soft
E.A.S.Y.Win 32 Gel-Dokumentations-System	Herolab
Eppendorf Tischzentrifugen	Eppendorf
Expositionskassette für Western Blots, Hypercassette™	Amersham
Filmentwickler FPM-100A	Fuji
Fluoreszenzmikroskop AF6000 mit Kamera und Software	Leica
French Press	SLM-AMICO Instruments
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
Multi-Plattenlesegerät Fluostar	BMG-Labtech
Nanodrop ND-1000 Spektralphotometer	Peqlab
Nasstransfersystem Mini-Protean II	Biorad
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld
PCR Thermocycler	Applied Biosystems
pH Meter	WTW
Pipetten; 20, 200, 1000 µl	Abimed
Pipettierhilfe, Accu-Jet Pro	Brand

Proteinelektrophorese System Mini-Protean II	Biorad
Spannungsquellen für die Elektrophorese	Biorad
Spektrometer Libra S12	Biochrom
Sterilbank	BDK
Thermomixer comfort	Eppendorf
Tiefkühlschrank (-20°C)	Liebherr
Tiefkühltruhe (-80°C)	Forma Scientific Inc.
Tischautoklav, LTA 1x2x3	Zirbus Technology
UV-Transilluminator	LKB
UV-VIS Spektrophotometer Nanodrop ND-1000	Peqlab
Vortex Mixer	IKA Labortechnik
Wasserbad	Julabo
Zentrifuge Multifuge 3L	Heraeus

3.1.2 Verbrauchsmaterialien und Kits

0,5 % Trypsin-EDTA (1 x)	Invitrogen
-Ade/-His/-Leu/-Trp DO Supplement	Clontech
Ampuwa	Fresenius Kabi
Deckgläser, rund 12 mm	Roth
DharmaFECT Transfektionsreagenz	Dharmacon
DNA-Ladepuffer (6 x)	Fermentas
dNTP Mix (jeweils 10 mM)	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
Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Nunc
Fötale Kälberserum (FCS)	Invitrogen
Glaswaren	Duran, Schott
Kryo-Röhrchen	Nunc
Kunststoffküvetten für Photometer	Sarstedt
-Leu/-Trp DO Supplement	Clontech
L-Glutamin-Lösung (200 mM)	Invitrogen

Lipofectamin 2000	Invitrogen
Liquidatorspitzen	Steinbrenner
Minimal SD Base	Clontech
Mounting Medium	Dianova
Nichtessentielle Aminosäuren (NEAA, 100 x)	Invitrogen
Nitrocellulosemembran	Schleicher und Schüll
Objektträger	Roth
Penicillin/Streptomycin-Lösung (100 x)	Invitrogen
Petrischalen	Greiner Bio One
Pipettenspitzen	Fa. Peske GmbH & Co.KG
Protease Inhibitor, Complete, Mini, EDTA-frei	Roche
PS-Mikroplatten (96-well) in U- und F-Form	Greiner Bio-One
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Reaktionsgefäße (2 ml, 1,5 ml, 0,5 ml)	Eppendorf
Röntgenfilm Cronex 5	Agfa
Serologische Pipetten	Sarstedt
Sterilfilter 0,22 und 0,45 µm	Millipore
Sterilfiltrationseinheiten (250 ml)	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

3.1.3 Chemikalien

1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth
3-Aminotriazol (3-AT)	Sigma Aldrich
3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Merck
4',6-Diamidin-2-phenylindol (Dapi)	Sigma Aldrich
4-Methylumbelliferyl- α -D-galactopyranosid (4-MuX)	Sigma Aldrich
Adenin	Sigma Aldrich

Agarose für Elektrophorese	Invitrogen
Ammoniumperoxodisulfat	Roth
Ampicillin Natriumsalz	Roth
Anisomycin	Sigma Aldrich
Bacto Agar	Gibco
Bacto Trypton	Gibco
Bacto Hefeextrakt	Gibco
Bicin	Sigma Aldrich
Bovines Serum Albumin (BSA)	Roth
Bromphenolblau	Sigma Aldrich
Calziumchlorid	Roth
Carboxymethylcellulose	Sigma Aldrich
D(+)-Glucose-Monohydrat	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Dodecylsulfat Natriumsalz (SDS)	Roth
Essigsäure, Eisessig	Roth
Ethanol, absolute (EtOH)	Roth
Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml)	Roth
Ethylenglycol	Sigma Aldrich
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth
Formaldehyd (37%)	Roth
Gentamycin-Lösung (10 mg/ml)	Sigma Aldrich
Glyzerin	Roth
GSH-Sepharose	GE-Healthcare
HEPES	Roth
Humane IgG	Sigma Aldrich
Imidazol	Sigma Aldrich
IPTG	Roth
Isopropanol	Roth
Kaliumacetat	Roth
Kaliumchlorid	Merck
Kanamycin Sulfat	Roth
Kristallviolett	Sigma Aldrich
Magnesiumacetat	Roth
Magnesiumchlorid	Roth

Magnesiumsulfat	Roth
Manganchlorid	Roth
Methanol	Roth
Milchpulver	Roth
NaHCO ₃	Roth
Nickel-NTA-Agarose	Qiagen
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Roth
Natriumchlorid	Roth
Paraformaldehyd	Sigma Aldrich
PEG 1000	Roth
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma Aldrich
Ponceau S	Roth
Rapamycin	Sigma Aldrich
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1) Acrylamid/Bisacrylamid	Roth
Salzsäure	Roth
Sorbitol	Roth
Tris-HCl	Roth
Triton X-100	Roth
Trypanblau	Fluka
Tween 20	Roth

3.1.4 Enzyme und Molekulargewichtsstandards

Benchmark Protein Ladder	Invitrogen
BP-Clonase Mix	Invitrogen
Gene Ruler 1kb DNA Ladder	Fermentas
HotStar HiFidelity Polymerase Kit	Qiagen
LR-Clonase Mix	Invitrogen
QuickChange Site-directed Mutagenesis Kit	Stratagene
Quick Ligation Kit	NEB
Restriktionsendonukleasen	NEB

3.1.5 Antikörper und Seren

Tab. 5: Verwendete Primärantikörper und Seren

Antikörper	Anwendung (Verdünnung)	Quelle
Kaninchen anti-c-myc, polyklonal	IF (1:300)	Cell Signalling
Kaninchen anti-gM, polyklonal	IF (1:5000)	Mettenleiter
Maus anti- β -Aktin, monoklonal	WB (1:1000)	Abcam
Maus anti-Cse1L, monoklonal	WB (1:100)	Sigma
Maus anti-c-myc, monoklonal	IF (1:300)	Santa Cruz
Maus anti-HA, monoklonal	IF (1:300)	Roche
Maus anti-His, monoklonal	WB (1:1000)	Qiagen
Maus anti-ICP0, monoklonal	IF (1:2000)	Santa Cruz
Maus anti-Strep-Tag II	IF (1:100)	IBA
Maus anti-TNPO1, monoklonal	WB (1:4000)	Sigma
Ratte anti-HA, polyklonal	WB (1:1000)	Invitrogen
Ziege anti-GST, polyklonal	WB (1:1000)	SLS
Ziege anti-IPO7, polyklonal	WB (1:1000)	Sigma
Ziege anti-Lamin B, polyklonal	WB (1:500)	Santa Cruz

IF Immunfluoreszenz; WB Western Blot

Tab. 6: Verwendete 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-Ratte	WB (1:3000)	Dianova
Peroxidase-gekoppelt anti-Ziege	WB (1:1000)	Dianova

IF Immunfluoreszenz; WB Western Blot

3.1.6 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion synthetisiert.

Tab. 7: Oligonukleotide für Gateway®-Klonierungen

Nr.	Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
1	attB1_for	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT
2	attB2_rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT
3	IPO4_for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGGAGTCAGCCGGGCTAGA
4	IPO4_rev	AGAAAGCTGGGTTCGGAGAGGCCAGTACAGCCTGGAG
5	IPO7_for (<i>Xenopus laevis</i>)	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGGACCCCAACATCCTGAT
6	IPO7_rev (<i>Xenopus laevis</i>)	AGAAAGCTGGGTTCATTTCCTGGGGCCGGGT
7	IPO8_for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGGACCTCAACCGGATCAT
8	IPO8_rev	AGAAAGCTGGGTTCGTTGTTGCTGGGCACAGTCCCAA
9	IPO9_for (<i>Mus musculus</i>)	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGGCGGCAGCGGCGGCAGC
10	IPO9_rev (<i>Mus musculus</i>)	AGAAAGCTGGGTTCGATGCCGATAGTCTGTAGGA
11	KPNB1_for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGGAGCTGATCACCATTCT
12	KPNB1_rev	AGAAAGCTGGGTTCAGCTTGGTTCTTCAGTTTCCTCAG
13	RanQ69L_for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGGCTGCGCAGGGAGAGCC
14	RanQ69L_rev	AGAAAGCTGGGTCCAGGTCATCATCCTCATCCGGGAG
15	UL28 ₁₀₂₉₋₂₃₅₈ _for (UL28b)	AAAAAGCAGGCTCCGCCGAGACCGCCGCGGTG
16	UL28 ₁₀₂₉₋₂₃₅₈ _rev (UL28b)	AGAAAGCTGGGTCTACGGGGGCCCGTC
17	UL46 ₁₀₀₉₋₂₁₅₇ _for (UL46b)	AAAAAGCAGGCTCCGCCACCACGCCAGTATATC
18	UL46 ₁₀₀₉₋₂₁₅₇ _rev (UL46b)	AGAAAGCTGGGTCTCACCGGCTCCGGCGTCC
19	UL52_for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGGGGCAGGAAGACG
20	UL52_rev	AGAAAGCTGGGTCTCAAGACGACGGTTG
21	UL31 ₄₅₋₃₀₆ _for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGCCGCCTCACGCCCGCAAAC
22	SV40-NLS-UL31_for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGCCAAAAAAGAAGAGAAAGG TATATGACACCGACCCCATC
23	UL31_rev	AGAAAGCTGGGTCTACGGCGGAGGAAACTC
24	XPO1_for	AAAAAGCAGGCTCCGCC ATGCCAGCAA TTATGACAAT G
25	XPO1_rev	AGAAAGCTGGGTTC ATCACACATT TCTTCTGGAA TCTC
26	XPO2_for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGGAAGTACAGCGATGCAA
27	XPO2_rev	AGAAAGCTGGGTCAAGCAGTGTCACTGGCTGCCTG
28	XPO4_for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGATGGCGGCGGCGCTGGG

Nr.	Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
29	XPO4_rev	AGAAAGCTGGGTCTTTTACACAAAGGAGACCACCAAC
30	XPO5_for	AAAAAGCAGGCTCCGCCATGGCGATGGATCAAGTAAA
31	XPO5_rev	AGAAAGCTGGGTCTGGGTTCAAAGATGGTGGCCAGGCC

Tab. 8: Oligonukleotide für die Fusions-PCR zweier DNA-Fragmente

Nr.	Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
32	IPO4 ₁₆₁₁₋₃₂₄₃ _for	TCAGCCTGTGCAGATCCAGA
33	IPO4 ₁₋₁₆₃₀ _rev	TCTGGATCTGCACAGGCTGA
34	IPO7 ₁₅₅₁₋₃₁₁₄ _for (<i>Xenopus laevis</i>)	AGCCATCGCCCTCCAAGTAC
35	IPO7 ₁₋₁₅₇₀ _rev (<i>Xenopus laevis</i>)	GTACTIONGGAGGGCGATGGCT
36	IPO8 ₁₅₅₁₋₃₁₁₁ _for	AGCTGCCCTTGCTCTTCAGT
37	IPO8 ₁₋₁₅₇₀ _rev	ACTGAAGAGCAAGGGCAGCT
38	IPO9 ₁₅₅₁₋₃₁₂₀ _for (<i>Mus musculus</i>)	CCTACAGGCAACAGTCAGTG
39	IPO9 ₁₋₁₅₇₀ _rev (<i>Mus musculus</i>)	CACTGACTGTTGCCTGTAGG
40	XPO2 ₁₄₅₁₋₂₉₁₃ _for	GTATCAAATATATTATGATT
41	XPO2 ₁₋₁₄₇₀ _rev	AATCATAATATATTTGATAC
42	XPO4 ₁₇₂₁₋₃₄₅₃ _for	CTGAAGTTGACATTAATACA
43	XPO4 ₁₋₁₇₄₀ _rev	TGTATTAATGTCAACTTCAG
44	XPO5 ₂₅₈₁₋₂₈₂₅ _for	GACTTCTATACTGTGGAGGA
45	XPO5 ₂₅₈₁₋₂₈₂₅ _rev	CCACACAGCAGGCTCCTTTG

Tab. 9: Oligonukleotide für klassische Klonierungen

Nr.	Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
46	NdeI_TNPO1_for	TAACATATGGTGTGGGACCGGCAAAC
47	BamHI_TNPO1_rev	ATAGGATCCTTAAACACCATAAAAAGCTG
48	NcoI_TNPO3_for	TAACCATGGAAGGAGCAAAGCCGAC
49	BamHI_TNPO3_rev	ATAGGATCCCTATCGAAACAACCTGG
50	NdeI_XPO6_for	TATCATATGGCATCTGAAGAAGCCTC
51	BamHI_XPO6_rev	TATGGATCCCTAGAGCTTCACAGTG
52	NheI_pEYFP-Nuc_for	TCAGATCCGCTAGCGCTACCGGTCGCCACCATGG TGAGCAAGGGCGAG
53	UL31-NLS ₁₋₁₃ _pEYFP-Nuc_rev	GAGTCCCGCCGGCCGCGAGAGGAGCGCGACCGC CGGCGCTCAGCTCGAGATCTGAG

Nr.	Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
54	BamHI_UL31-NLS _{9,23} _rev	TTTGGATCCCTACTTCCGGGAGGCCCGACGCACC ACGCCAGAGTCCCGCCGGCCGC
55	UL34-NLS _{1,11} _pEYFP-Nuc_rev	CTGCTCGGCGGCGCGGCACAGAATCCGTCTCGT AGCTCGAGATCTGAG
56	BamHI_UL34-NLS _{7,19} _rev	TTTGGATCCTAAGGTTCCGGCGGCGACGGGTAATA GCCTGCTCGGCGGCGC
57	NheI_myc_SV40-NLS _{1,6} _for	TATAGCTAGCATGGAGGAGCAGAAGCTGATCTCA GAGGAGGACCTGCCAAAAAAGAAGAGAAA
58	NheI_myc_UL31_for	TATAGCTAGCATGGAGGAGCAGAAGCTGATCTCA GAGGAGGACCTG TATGACACCGACCCCATC
59	BamHI_UL31_rev	ATTAGGATCCCTACGGCGGAGGAACTC
60	BamHI_FRB_for	TATAGGATCCTGGCATGAAGCCTGGAAG
61	BglII_FRB_rev	ATTAAGATCTGCCTGCTTTGAGATTCGTCG
62	HindIII_EYFP_for	TATAAAGCTTCGCCACCATGGTGAGCAAGGGC
63	NheI_FRB_rev	ATTAGCTAGCCTGCTTTGAGATTCGTCGGAAC
64	NheI_HA_UL10_for	TATAGCTAGCATGGAGTACCATACGACGTACCA GATTACGCTCATGCAGGTGGACGCCCGGCCCC AGAG
65	HindIII_UL10_rev	ATTAAGCTTACCTGCCAACGGCGGACGGTGCT G

Tab. 10: Oligonukleotide für die zielgerichtete Mutagenese

Nr.	Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
66	UL4_L181A-I184A-L86A_for	CTGCTGGTAGAGGTGGCGCGGAGGCTCAAGCG AGCCCCGCCCTGG
67	UL4_L181A-I184A-L86A_rev	CCAGGGCGGGGCTCGCTTGAGCCTCCCGCGCCA CCTCTACCAGCAG
68	UL5_L215A-L219A-L221A_for	GCCCTGGCCGCGCGGAACGGACCGCGGGGGC GGCCGAGGGCGC
69	UL5_L215A-L219A-L221A_rev	GCGCCCTCGGCCGCCCGCGGTCCGTTCCGCG GCGGCCAGGGC
70	UL13-L496A-L500A-L502A_for	CTGCCTCCCGAGGCTAAGCCTCTCGCGGTGGCG GTGTCCCGCCTGTGTC
71	UL13-L496A-L500A-L502A_rev	GACACAGGCGGGACACCGCCACCGCGAGAGGCT TAGCCTCGGGAGGCAG
72	UL18_L133A-L137A-F139A_for	CGCCTGGATTCGGCGGACCTCACGGCGCGGGCT CCCGTTCCGCTTCC
73	UL18_L133A-L137A-F139A_rev	GGAAGCGGAACGGGAGCCCGCGCCGTGAGGTCC GCCGAATCCAGGCG
74	UL21_V485A-L488A-L490A_for	GCGGCTGACAGGGGCGACCTCCGCGGTGGCAGC GGTGGGTGACG
75	UL21_V485A-L488A-L490A_rev	CGTCAACCACCGCTGCCACCGCGGAGGTGCCCC CTGTCAGCCGC

Nr.	Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
76	UL25_L467A-L470A-L472A_for	CAGCTGTTTTCCCGGCGCGGCCGCGGTGTGCT GACGCCAGGCG
77	UL25_L467A-L470A-L472A_rev	CGCCTGGGCGTCAGCACACGCGGGCGGCCGCGC CGGGAAACAGCTG
78	UL26_L125A-V128A-L130A_for	CCTGATCACCAACTACGCGCCCTCGGCCTCCGCG GCCACAAAACGCC
79	UL26_L125A-V128A-L130A_rev	GGCGTTTTGTGGCCGCGGAGGCCGAGGGCGCGT AGTTGGTGATCAGG
80	UL31_R21N-R22A-R23A_for	CCCTATCACGGCAAGGAGAACGCGGCGTCCGCGC TCCTCTGCG
81	UL31_R21N-R22A-R23A_rev	CGCAGAGGAGCGCGACGCGCGTTCTCCTTGCC GTGATAGGG
82	UL31_R37N-R38A-R41A_for	CTCTGGGCGTGGTGAATGCGGCCTCCGCGAAGA GCCTGCCGCC
83	UL31_R37N-R38A-R41A_rev	GGCGGCAGGCTCTTCGCGGAGGCCGCATTACCC ACGCCAGAG
84	UL34_R192N-R194N_for (Mut-1)	GAGCAGGCTATTACCCGTAACCGCAACACCCGGC GGTCCCGG
85	UL34_R192N-R194N_rev (Mut-1)	CCGGGACCGCCGGGTGTTGCGGTTACGGGTAAT AGCCTGCTC
86	UL34_R192N-R193N-R194N_for (Mut-2)	CGCCGAGCAGGCTATTACCCGTAACAACAACACC CGGCGGTCCCGGGG
87	UL34_R192N-R193N-R194N_rev (Mut-2)	CCCCGGGACCGCCGGGTGTTGTTGTTACGGGTA ATAGCCTGCTCGGCG
88	UL37_L256A-L259A-L261A_for	CCCTCACACGGGCGCCTTTACGGCGGCCGCGG TGGACGAGTACC
89	UL37_L256A-L259A-L261A_rev	GGTACTCGTCCACCGCGGCCCGTAAAGGCGG CCCGTGTGAGGG
90	UL38_L345A-L349A-I351A_for (1)	GGCCCTGGAGCGGGCGTTTTGGGCGCGCCCGGG CCACCAACACGATTC
91	UL38_L345A-L349A-I351A_rev (1)	GAATCGTGTGGTGGCCGGGCGCGCCCAAACG CCCGCTCCAGGGCC
92	UL38_L295A-L299A-L301A_for (2)	GTGCGTTCGTGGACGCGGACGCCGAGGCGGGG GCGGGGGGCCCG
93	UL38_L295A-L299A-L301A_rev (2)	CGGGCCCCCGCCCCGCCTCGGCGTCCGCGTC CACGAACGCAC
94	UL47-V291A-L294A-I296A_for	GGCGGATGCCGCGGTGCGGGCGGCCCAACG GGTGGGTGTG
95	UL47-V291A-L294A-I296A_rev	CACACCCACCCGTTGGCGGCCGCCGACGGCG GCATCCGCC
96	UL48-L226A-L230A-L232A_for	CGTCTGGCGCGTGTGCGTTTTTGCATGCGTATG CATTTTTGACCCGCGAG
97	UL48-L226A-L230A-L232A_rev	CTCGCGGGTCAAAAATGCATACGCATGCAAAAAC GCAACACGCGCCAGACG

3.1.7 Plasmide

Tab. 11: Vorhandene Gateway®-kompatible Leervektoren

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
pDONR207	Gent ^R , <i>Entry</i> -Vektor	Invitrogen
pGADT7-Dest	Amp ^R , Selektion in Hefe mittels LEU2 Marker, <i>Gateway</i> B-Kassette von Invitrogen im pGBKT7-Basisvektor (Clontech), Hefe-Expressionsvektor (ADH1-Promotor), exprimiert Proteine mit N-terminal fusionierter Gal4-Aktivierungsdomäne (AD), nukleärer Import des Fusionsproteins mit Hilfe der nukleären Lokalisationssequenz (NLS) des großen T-Antigens des Simian Virus 40 (<i>SV40 large tumor antigen</i>), Verwendung im Y2H-Assay, Zielvektor	Laborkollektion J. Haas, München
pGBKT7-Dest	Kan ^R , Selektion in Hefe mittels TRP Marker, <i>Gateway</i> -Kassette von Invitrogen im pGBKT7-Basisvektor (Clontech), Hefe-Expressionsvektor (ADH1-Promotor), exprimiert Proteine mit N-terminal fusionierter Gal4-DNA-Bindedomäne (BD), nukleärer Import des Fusionsproteins mit Hilfe der nukleären Lokalisationssequenz (NLS) des großen T-Antigens des Simian Virus 40 (<i>SV40 large tumor antigen</i>), Verwendung im Y2H-Assay, Zielvektor	Laborkollektion J. Haas, München
pcDNA3+Rluc	Amp ^R , Expressionsvektor mit N-terminaler Renilla-Luciferase zur Verwendung im LUMIER-Assay, Zielvektor	M. Kögl, Heidelberg
pTREX	Amp ^R , Expressionsvektor mit N-terminalem Protein A-Tag zur Verwendung im LUMIER-Assay, Zielvektor	M. Kögl, Heidelberg
pCR3-C-HA	Amp ^R /Kan ^R , eukaryotischer Expressionsvektor (CMV-Promotor), Zielvektor	A. Baiker, München
pCR3-N-c-myc	Amp ^R /Kan ^R , eukaryotischer Expressionsvektor (CMV-Promotor), Zielvektor	A. Baiker, München

Tab. 12: Weitere vorhandene Vektoren. MGC mammalian gene collection

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
pCR3-N-HA-UL10	Amp ^R /Kan ^R , eukaryotischer Expressionsvektor (CMV-Promotor), Zielvektor	H. Striebinger, München
pDONR223-EIF5A	Spec ^R , <i>Entry</i> -Vektor mit humanem EIF5A	MGC
pDONR223-IPO5	Spec ^R , <i>Entry</i> -Vektor mit humanem IPO5	MGC
pDONR223-IPO11	Spec ^R , <i>Entry</i> -Vektor mit humanem IPO11	MGC
pDONR223-IPO13	Spec ^R , <i>Entry</i> -Vektor mit humanem IPO13	MGC
pDONR223-KPNA1	Spec ^R , <i>Entry</i> -Vektor mit humanem KPNA1	MGC
pDONR223-KPNA2	Spec ^R , <i>Entry</i> -Vektor mit humanem KPNA2	MGC
pDONR223-KPNA3	Spec ^R , <i>Entry</i> -Vektor mit humanem KPNA3	MGC
pDONR223-KPNA4	Spec ^R , <i>Entry</i> -Vektor mit humanem KPNA4	MGC
pDONR223-KPNA5	Spec ^R , <i>Entry</i> -Vektor mit humanem KPNA5	MGC
pDONR223-KPNA6	Spec ^R , <i>Entry</i> -Vektor mit humanem KPNA6	MGC
pDONR223-RpS7	Spec ^R , <i>Entry</i> -Vektor mit humanem RpS7	MGC
pDONR223-TNPO2	Spec ^R , <i>Entry</i> -Vektor mit humanem TNPO2	MGC
pDONR223-XPO7	Spec ^R , <i>Entry</i> -Vektor mit humanem XPO7	MGC

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
pEXPR-IBA5-UL34 (SM1653)	Amp ^R /Neo ^R , eukaryotischer Expressionsvektor (CMV-Promotor), exprimiert das HSV-1 UL34 mit N-terminal fusioniertem N-Strep-Tag	Laborkollektion S. Bailer, München
pEYFP-Nuc (SM1392)	Kan ^R /Neo ^R , eukaryotischer Expressionsvektor (CMV-Promotor), kodiert EYFP (<i>enhanced yellow fluorescent protein</i>) und drei Kopien der nukleären Lokalisationssequenz (NLS) des großen T-Antigens des Simian Virus 40 (<i>SV40 large tumor antigen</i>)	Clontech
pEYFPΔNuc (SM1454)	Kan ^R /Neo ^R , pEYFP-Nuc-Basisvektor (Clontech) ohne SV40-NLS	Laborkollektion S. Bailer, München
pFLAG-CMV-3xFKBP	Amp ^R , Excision von 3xFKBP12 mittels HindIII und Sall für die Zwischenklonierung in den pQE-32-Vektor und anschließender Konstruktion von pCMV-N-HA-UL10-FKBP	Ohba, Schirmer und Gerace, La Jolla
pGADT7 (SM1020)	Amp ^R , Selektion in Hefe mittels LEU2 Marker, Hefe-Expressionsvektor (ADH1-Promotor), exprimiert Proteine mit N-terminal fusionierter Gal4-Aktivierungsdomäne (AD), nukleärer Import des Fusionsproteins mit Hilfe der nukleären Lokalisationssequenz (NLS) des großen T-Antigens des Simian Virus 40 (<i>SV40 large tumor antigen</i>), Verwendung im Y2H-Assay	Clontech
pGBKT7-UL34 ₁₋₂₀₃ (SM1409)	Kan ^R , pGBKT7 (Clontech), exprimiert HSV-1 UL34 ₁₋₂₀₃ , Verwendung im Y2H-Assay	Laborkollektion S. Bailer, München
pGBKT7-UL34 ₁₋₁₈₀ (SM1408)	Kan ^R , pGBKT7 (Clontech), exprimiert HSV-1 UL34 ₁₋₁₈₀ , Verwendung im Y2H-Assay	Laborkollektion S. Bailer, München
pGBKT7-UL34 ₁₋₁₆₈ (SM1445)	Kan ^R , pGBKT7 (Clontech), exprimiert HSV-1 UL34 ₁₋₁₆₈ , Verwendung im Y2H-Assay	Laborkollektion S. Bailer, München
pGBKT7 (SM1019)	Kan ^R , Selektion in Hefe mittels TRP Marker, Hefe-Expressionsvektor (ADH1-Promotor), exprimiert Proteine mit N-terminal fusionierter Gal4-DNA-Bindedomäne (BD), nukleärer Import des Fusionsproteins mit Hilfe der nukleären Lokalisationssequenz (NLS) des großen T-Antigens des Simian Virus 40 (<i>SV40 large tumor antigen</i>), Verwendung im Y2H-Assay	Clontech
pQE32 (SM1126)	Amp ^R , Expressionsvektor, zur Zwischenklonierung bzw. Herstellung von UL10-3xFKBP mit HindIII- und BamHI-Überhängen	Qiagen
pQE32-RanQ69L	Amp ^R , pQE32 (Qiagen), Verwendung für rekombinante Proteinexpression und Aufreinigung von RanQ69L mit N-terminalem His ₆ -Tag	D. Görlich, U. Kutay, Heidelberg
pQE60-KPNA5	Amp ^R , pQE60 (Qiagen), Verwendung für rekombinante Proteinexpression und Aufreinigung von KPNA5 mit C-terminalem His ₆ -Tag	D. Görlich, U. Kutay, Heidelberg
pQE60-KPNB1	Amp ^R , pQE60 (Qiagen), Verwendung für rekombinante Proteinexpression und Aufreinigung von KPNB1 mit C-terminalem His ₆ -Tag	D. Görlich, U. Kutay, Heidelberg
SM1146	Kan ^R , pET9d (New England Biolabs), Verwendung für rekombinante Proteinexpression und Aufreinigung von	Laborkollektion S. Bailer,

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
	HSV-1 UL34ΔTM mit N-terminalem GST-Tag	München
SM1767-UL31	Kan ^R /Neo ^R , Rückgrat von pEYFP-Nuc (Clontech), eukaryotischer Expressionsvektor (CMV-Promotor), exprimiert das HSV-1 UL31 mit N-terminal fusioniertem myc-Tag	Laborkollektion S. Bailer, München

Tab. 13: In dieser Arbeit neu konstruierte Plasmide

Nr.	Bezeichnung	Beschreibung
Entry-Plasmide		
1	pDONR207-IPO4	Gent ^R , Entry-Vektor mit humanen IPO4, PCR mit Oligos Nr. 3, 4, 32 und 33, Template von A. Moustakas, Uppsala
2	pDONR207-IPO7	Gent ^R , Entry-Vektor mit IPO7 von <i>Xenopus laevis</i> , PCR mit Oligos Nr. 5, 6, 34 und 35, Template: pQE9-IPO7 von D. Görlich, U. Kutay, Heidelberg
3	pDONR207-IPO8	Gent ^R , Entry-Vektor mit humanen IPO8, PCR mit Oligos Nr. 7, 8, 36 und 37, Template von A. Moustakas, Uppsala
4	pDONR207-IPO9	Gent ^R , Entry-Vektor mit IPO9 von <i>Mus musculus</i> , PCR mit Oligos Nr. 9, 10, 38 und 39, Template: pQE32-IPO9 von D. Görlich, U. Kutay, Heidelberg
5	pDONR207-KPNB1	Gent ^R , Entry-Vektor mit humanen KPNB1, PCR mit Oligos Nr. 11 und 12, Template: pQE60-KPNB1 von D. Görlich, U. Kutay, Heidelberg
6	pDONR207-RanQ69L	Gent ^R , Entry-Vektor mit humanen RanQ69L, PCR mit Oligos Nr. 13 und 14, Template: pQE60-RanQ69L von D. Görlich, U. Kutay, Heidelberg
7	pDONR207-UL31 ₄₅₋₃₀₆	Gent ^R , Entry-Vektor mit UL31 ₄₅₋₃₀₆ von HSV-1, PCR mit Oligos Nr. 21 und 23, Template: pDONR207-UL31 der HSV-1-Kollektion
8	pDONR207-SV40-NLS-UL31-Mut	Gent ^R , Entry-Vektor mit UL31-NLS-Mutante von HSV-1, PCR mit Oligos Nr. 22 und 23, Template: Plasmid Nr. 197
9	pDONR207-XPO1	Gent ^R , Entry-Vektor mit humanen XPO1 PCR mit Oligos Nr. 24 und 25, Template: pDONR223-XPO1 der MGC (Fehler an Aminosäureposition 1 durch PCR behoben)
10	pDONR207-XPO2	Gent ^R , Entry-Vektor mit humanen XPO2, PCR mit Oligos Nr. 26, 27, 40 und 41, Template: humane cDNA (Placenta) von J. Haas, München
11	pDONR207-XPO4	Gent ^R , Entry-Vektor mit humanen XPO4, PCR mit Oligos Nr. 28, 29, 42 und 43, Template: humane cDNA (Placenta) von J. Haas, München
12	pDONR207-XPO5	Gent ^R , Entry-Vektor mit humanen XPO5, PCR mit Oligos Nr. 30, 31, 44 und 45, Template: humane cDNA (Placenta) von J. Haas, München
Ziel-Plasmide		
13	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL2	Kan ^R /Amp ^R , Gateway-Klonierung, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay
14	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL3	Kan ^R /Amp ^R , Gateway-Klonierung, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay

Nr.	Bezeichnung	Beschreibung
15	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL4	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay und in der Interspezies-Heterokaryon-Analyse
16	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL5	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay
17	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL6	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay
18	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL7	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay
19	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL8	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay
20	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL9a	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay
21	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL9b	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay
22	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL11	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay
23	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL12	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay
24	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL13	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay
25	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL14	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay
26	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL15	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay
27	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL16	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay
28	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL17	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay
29	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL18	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay
30	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL19	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay
31	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL21	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay
32	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL23	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay
33	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL24	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay
34	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL25	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay
35	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL26	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay
36	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL26.5	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay
37	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL28a	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay
38	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL30	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay

Nr.	Bezeichnung	Beschreibung
39	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL31	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay und in der Interspezies-Heterokaryon-Analyse
40	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL32	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay
41	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL33	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay
42	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL35	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay
43	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL36a	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay
44	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL36b	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay
45	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL37d1 1	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay
46	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL38	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay
47	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL39	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay
48	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL40	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay
49	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL41	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay
50	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL42	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay
51	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL46a	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay
52	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL46b	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay
53	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL47	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay
54	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL48	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay
55	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL49	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay
56	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL50	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay
57	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL51	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay
58	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL52	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay
59	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL54	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay
60	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL55	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay
61	pCMV-EYFP-NLS-FRB-US1	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay
62	pCMV-EYFP-NLS-FRB-US2	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay

Nr.	Bezeichnung	Beschreibung
63	pCMV-EYFP-NLS-FRB-US3	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay
64	pCMV-EYFP-NLS-FRB-US10	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay
65	pCMV-EYFP-NLS-FRB-US11	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay
66	pCMV-EYFP-NLS-FRB-US12	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay
67	pCR3-C-HA-UL34	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, subzelluläre Lokalisation mittels indirekter Immunfluoreszenz
68	pCR3-C-HA-UL34ΔTM	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, subzelluläre Lokalisation mittels indirekter Immunfluoreszenz
69	pCR3-C-HA-UL34ΔTM-Mut-2	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, subzelluläre Lokalisation mittels indirekter Immunfluoreszenz
70	pCR3-N-c-myc-UL2	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, subzelluläre Lokalisation mittels indirekter Immunfluoreszenz
71	pCR3-N-c-myc-UL4	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, subzelluläre Lokalisation mittels indirekter Immunfluoreszenz
72	pCR3-N-c-myc-UL5	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, subzelluläre Lokalisation mittels indirekter Immunfluoreszenz
73	pCR3-N-c-myc-UL6	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, subzelluläre Lokalisation mittels indirekter Immunfluoreszenz
74	pCR3-N-c-myc-UL9a	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, subzelluläre Lokalisation mittels indirekter Immunfluoreszenz
75	pCR3-N-c-myc-UL9b	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, subzelluläre Lokalisation mittels indirekter Immunfluoreszenz
76	pCR3-N-c-myc-UL11	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, subzelluläre Lokalisation mittels indirekter Immunfluoreszenz
77	pCR3-N-c-myc-UL15	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, subzelluläre Lokalisation mittels indirekter Immunfluoreszenz
78	pCR3-N-c-myc-UL17	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, subzelluläre Lokalisation mittels indirekter Immunfluoreszenz
79	pCR3-N-c-myc-UL23	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, subzelluläre Lokalisation mittels indirekter Immunfluoreszenz
80	pCR3-N-c-myc-UL28a	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, subzelluläre Lokalisation mittels indirekter Immunfluoreszenz
81	pCR3-N-c-myc-UL31	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, subzelluläre Lokalisation mittels indirekter Immunfluoreszenz
82	pCR3-N-c-myc-UL31-Mut	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, subzelluläre Lokalisation mittels indirekter Immunfluoreszenz
83	pCR3-N-c-myc-SV40-NLS-UL31-Mut	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, subzelluläre Lokalisation mittels indirekter Immunfluoreszenz
84	pCR3-N-c-myc-UL36a	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, subzelluläre Lokalisation mittels indirekter Immunfluoreszenz
85	pCR3-N-c-myc-UL36b	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, subzelluläre Lokalisation mittels indirekter Immunfluoreszenz
86	pCR3-N-c-myc-UL39	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, subzelluläre Lokalisation mittels indirekter Immunfluoreszenz
87	pCR3-N-c-myc-UL41	Kan ^R /Amp ^R , <i>Gateway</i> -Klonierung, subzelluläre

Nr.	Bezeichnung	Beschreibung
		Lokalisation mittels indirekter Immunfluoreszenz
88	pCR3-N-c-myc-UL46a	Kan ^R /Amp ^R , Gateway-Klonierung, subzelluläre Lokalisation mittels indirekter Immunfluoreszenz
89	pCR3-N-c-myc-UL46b	Kan ^R /Amp ^R , Gateway-Klonierung, subzelluläre Lokalisation mittels indirekter Immunfluoreszenz
90	pCR3-N-c-myc-UL47	Kan ^R /Amp ^R , Gateway-Klonierung, subzelluläre Lokalisation mittels indirekter Immunfluoreszenz
91	pCR3-N-c-myc-UL55	Kan ^R /Amp ^R , Gateway-Klonierung, subzelluläre Lokalisation mittels indirekter Immunfluoreszenz
92, 93	pGADT7-DEST, pGBKT7-DEST-EIF5A	Amp ^R , Kan ^R , Gateway-Klonierung, Verwendung im Y2H-Assay
94, 95	pGADT7-DEST, pGBKT7-DEST-IPO4	Amp ^R , Kan ^R , Gateway-Klonierung, Verwendung im Y2H-Assay
96, 97	pGADT7-DEST, pGBKT7-DEST-IPO5	Amp ^R , Kan ^R , Gateway-Klonierung, Verwendung im Y2H-Assay
98, 99	pGADT7-DEST, pGBKT7-DEST-IPO7	Amp ^R , Kan ^R , Gateway-Klonierung, Verwendung im Y2H-Assay
100, 101	pGADT7-DEST, pGBKT7-DEST-IPO8	Amp ^R , Kan ^R , Gateway-Klonierung, Verwendung im Y2H-Assay
102, 103	pGADT7-DEST, pGBKT7-DEST-IPO9	Amp ^R , Kan ^R , Gateway-Klonierung, Verwendung im Y2H-Assay
104, 105	pGADT7-DEST, pGBKT7-DEST-IPO11	Amp ^R , Kan ^R , Gateway-Klonierung, Verwendung im Y2H-Assay
106, 107	pGADT7-DEST, pGBKT7-DEST-IPO13	Amp ^R , Kan ^R , Gateway-Klonierung, Verwendung im Y2H-Assay
108, 109	pGADT7-DEST, pGBKT7-DEST-KPNA1	Amp ^R , Kan ^R , Gateway-Klonierung, Verwendung im Y2H-Assay
110, 111	pGADT7-DEST, pGBKT7-DEST-KPNA2	Amp ^R , Kan ^R , Gateway-Klonierung, Verwendung im Y2H-Assay
112, 113	pGADT7-DEST, pGBKT7-DEST-KPNA3	Amp ^R , Kan ^R , Gateway-Klonierung, Verwendung im Y2H-Assay
114, 115	pGADT7-DEST, pGBKT7-DEST-KPNA4	Amp ^R , Kan ^R , Gateway-Klonierung, Verwendung im Y2H-Assay
116, 117	pGADT7-DEST, pGBKT7-DEST-KPNA5	Amp ^R , Kan ^R , Gateway-Klonierung, Verwendung im Y2H-Assay
118, 119	pGADT7-DEST, pGBKT7-DEST-KPNA6	Amp ^R , Kan ^R , Gateway-Klonierung, Verwendung im Y2H-Assay
120, 121	pGADT7-DEST, pGBKT7-DEST-KPNB1	Amp ^R , Kan ^R , Gateway-Klonierung, Verwendung im Y2H-Assay
122, 123	pGADT7-DEST, pGBKT7-DEST-RanQ69L	Amp ^R , Kan ^R , Gateway-Klonierung, Verwendung im Y2H-Assay
124, 125	pGADT7-DEST, pGBKT7-DEST-RpS7	Amp ^R , Kan ^R , Gateway-Klonierung, Verwendung im Y2H-Assay
126, 127	pGADT7-DEST, pGBKT7-DEST-TNPO2	Amp ^R , Kan ^R , Gateway-Klonierung, Verwendung im Y2H-Assay
128, 129	pGADT7-DEST, pGBKT7-DEST-XPO1	Amp ^R , Kan ^R , Gateway-Klonierung, Verwendung im Y2H-Assay
130, 131	pGADT7-DEST, pGBKT7-DEST-XPO2	Amp ^R , Kan ^R , Gateway-Klonierung, Verwendung im Y2H-Assay

Nr.	Bezeichnung	Beschreibung
132, 133	pGADT7-DEST, pGBKT7-DEST-XPO4	Amp ^R , Kan ^R , Gateway-Klonierung, Verwendung im Y2H-Assay
134, 135	pGADT7-DEST, pGBKT7-DEST-XPO5	Amp ^R , Kan ^R , Gateway-Klonierung, Verwendung im Y2H-Assay
136, 137	pGADT7-DEST, pGBKT7-DEST-XPO7	Amp ^R , Kan ^R , Gateway-Klonierung, Verwendung im Y2H-Assay
138	pGADT7-DEST-SV40-NLS-UL31-Mut	Amp ^R , Gateway-Klonierung, Verwendung im Y2H-Assay
139	pGBKT7-DEST-UL31-Mut	Kan ^R , Gateway-Klonierung, Verwendung im Y2H-Assay
140	pGBKT7-DEST-UL31 ₄₅₋₃₀₆	Amp ^R , Gateway-Klonierung, Verwendung im Y2H-Assay
141	pGBKT7-DEST-UL34ΔTM-Mut-1	Amp ^R , Gateway-Klonierung, Verwendung im Y2H-Assay
142	pGBKT7-DEST-UL34ΔTM-Mut-2	Amp ^R , Gateway-Klonierung, Verwendung im Y2H-Assay
143, 144	pTREX-, pcDNA3+Rluc-KPNA2	Amp ^R , Amp ^R , Gateway-Klonierung, Verwendung im LUMIER-Assay
145, 146	pTREX-, pcDNA3+Rluc-KPNA3	Amp ^R , Amp ^R , Gateway-Klonierung, Verwendung im LUMIER-Assay
147, 148	pTREX-, pcDNA3+Rluc-KPNA4	Amp ^R , Amp ^R , Gateway-Klonierung, Verwendung im LUMIER-Assay
149, 150	pTREX-, pcDNA3+Rluc-KPNA5	Amp ^R , Amp ^R , Gateway-Klonierung, Verwendung im LUMIER-Assay
151, 152	pTREX-, pcDNA3+Rluc-UL7	Amp ^R , Amp ^R , Gateway-Klonierung, Verwendung im LUMIER-Assay
153, 154	pTREX-, pcDNA3+Rluc-UL15	Amp ^R , Amp ^R , Gateway-Klonierung, Verwendung im LUMIER-Assay
155, 156	pTREX-, pcDNA3+Rluc-UL16	Amp ^R , Amp ^R , Gateway-Klonierung, Verwendung im LUMIER-Assay
157, 158	pTREX-, pcDNA3+Rluc-UL31	Amp ^R , Amp ^R , Gateway-Klonierung, Verwendung im LUMIER-Assay
159, 160	pTREX-, pcDNA3+Rluc-UL31-Mut	Amp ^R , Amp ^R , Gateway-Klonierung, Verwendung im LUMIER-Assay
161, 162	pTREX-, pcDNA3+Rluc-SV40-NLS-UL31-Mut	Amp ^R , Amp ^R , Gateway-Klonierung, Verwendung im LUMIER-Assay
163, 164	pTREX-, pcDNA3+Rluc-UL34ΔTM	Amp ^R , Amp ^R , Gateway-Klonierung, Verwendung im LUMIER-Assay
165, 166	pTREX-, pcDNA3+Rluc-UL34	Amp ^R , Amp ^R , Gateway-Klonierung, Verwendung im LUMIER-Assay
167, 168	pTREX-, pcDNA3+Rluc-UL38	Amp ^R , Amp ^R , Gateway-Klonierung, Verwendung im LUMIER-Assay
169, 170	pTREX-, pcDNA3+Rluc-UL56	Amp ^R , Amp ^R , Gateway-Klonierung, Verwendung im LUMIER-Assay
171, 172	pTREX-, pcDNA3+Rluc-US1	Amp ^R , Amp ^R , Gateway-Klonierung, Verwendung im LUMIER-Assay
Klassisch klonierte Plasmide		
173	pCMV-EYFP-NLS-FRB-ccdB	Kan ^R /Amp ^R , eukaryotischer Expressionsvektor (CMV-Promotor), exprimiert Proteine mit N-terminal fusioniertem EYFP (<i>enhanced yellow fluorescent protein</i>), gefolgt von drei Kopien der nukleären Lokalisationssequenz des großen T-Antigens des Simian

Nr.	Bezeichnung	Beschreibung
		Virus 40 (SV40-NLS) und der FRB-Domäne (FKBP12-Rapamycin Bindedomäne von FRAP1), konstruiert durch Klonierung des EYFP-3xSV40-NLS-FRB-Fragmentes in die HindIII- und NheI-Schnittstellen des Gateway-kompatiblen Expressionsvektors pCR3-C-HA, PCR mit Oligos Nr. 62 und 63, <i>Template</i> : Plasmid Nr. 175, Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay und in der Interspezies-Heterokaryon-Analyse, Zielvektor
174	pCMV-N-HA-UL10-FKBP	Kan ^R /Neo ^R , eukaryontischer Expressionsvektor (CMV-Promotor), exprimiert das Fusionsprotein aus gM und drei Kopien von FKBP12 mit N-terminal gekoppeltem HA-Tag, kloniert durch Triple-Ligation von HA-UL10 (PCR mit Oligos Nr. 64 und 65, <i>Template</i> : pDONR207-UL10 der HSV-1-Kollektion) und 3xFKBP (Excision aus pFLAG-CMV-3xFKBP und Zwischenklonierung in pQE-32) über NheI und BamHI in das Rückgrat von pEYFP-Nuc (Clontech), Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay
175	pEYFP-Nuc-FRB	Kan ^R /Neo ^R , pEYFP-Nuc (Clontech) mit FRB (FKBP12-Rapamycin Bindedomäne von FRAP1), kodiert das Template EYFP-3xSV40-NLS-FRB für die Klonierung von pCMV-EYFP-NLS-FRB-ccdB, PCR mit Oligos Nr. 60 und 61, <i>Template</i> von Ohba, Schirmer und Gerace, The Scripps Research Institute, La Jolla
176	pEYFP-Nuc-UL31-NLS	Kan ^R /Neo ^R , eukaryotischer Expressionsvektor (CMV-Promotor), exprimiert UL31 ₂₁₋₄₂ (Bereich der potentiellen NLS) von HSV-1 mit N-terminal fusioniertem EYFP (<i>enhanced yellow fluorescent protein</i>), PCR mit Oligos Nr. 52, 53 und 54, <i>Template</i> : pEYFP-Nuc (Clontech), subzelluläre Lokalisation mittels direkter Immunfluoreszenz
177	pEYFP-Nuc-UL34-NLS	Kan ^R /Neo ^R , eukaryotischer Expressionsvektor (CMV-Promotor), exprimiert UL34 ₁₇₈₋₁₉₄ (Bereich der potentiellen NLS) von HSV-1 mit N-terminal fusioniertem EYFP (<i>enhanced yellow fluorescent protein</i>), PCR mit Oligos Nr. 52, 55 und 56, <i>Template</i> : pEYFP-Nuc (Clontech), subzelluläre Lokalisation mittels direkter Immunfluoreszenz
178, 179	pGADT7-, pGBKT7-TNPO1	Amp ^R , Kan ^R , Verwendung im Y2H-Assay, PCR mit Oligos Nr. 46 und 47, <i>Template</i> : pQE60-TNPO1 von D. Görlich, U. Kutay, Heidelberg
180, 181	pGADT7-, pGBKT7-TNPO3	Amp ^R , Kan ^R , Verwendung im Y2H-Assay, PCR mit Oligos Nr. 48 und 49, <i>Template</i> von A. Moustakas, Uppsala
182	pGADT7-, pGBKT7-XPO6	Amp ^R , Kan ^R , Verwendung im Y2H-Assay, PCR mit Oligos Nr. 50 und 51, <i>Template</i> : humane cDNA (Placenta) von J. Haas
183	SM1767-UL31-Mut	Kan ^R /Neo ^R , Rückgrat von pEYFP-Nuc (Clontech), Eukaryotischer Expressionsvektor (CMV-Promotor), exprimiert die UL31-NLS-Mutante mit N-terminal fusioniertem myc-Tag, zielgerichtete Mutagenese mit Oligos Nr. 58 und 59, <i>Template</i> : Plasmid Nr. 8
184	SM1767-SV40-NLS-UL31-Mut	Kan ^R /Neo ^R , Rückgrat von pEYFP-Nuc (Clontech), Eukaryotischer Expressionsvektor (CMV-Promotor), exprimiert die UL31-NLS-Mutante mit N-terminal fusioniertem SV40-NLS und N-terminal davon

Nr.	Bezeichnung	Beschreibung
		fusioniertem myc-Tag, PCR mit Oligos Nr. 57 und 59, <i>Template</i> : Plasmid Nr. 8
Durch zielgerichtete Mutagenese generierte Plasmide		
185	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL4-NES-Mut	Kan ^R /Amp ^R , Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay und in der Interspezies-Heterokaryon-Analyse, Zielgerichtete Mutagenese mit Oligos Nr. 66 und 67, <i>Template</i> : Plasmid Nr. 15
186	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL5-NES-Mut	Kan ^R /Amp ^R , Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay, Zielgerichtete Mutagenese mit Oligos Nr. 68 und 69, <i>Template</i> : Plasmid Nr. 16
187	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL13-NES-Mut	Kan ^R /Amp ^R , Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay, Zielgerichtete Mutagenese mit Oligos Nr. 70 und 71, <i>Template</i> : Plasmid Nr. 24
188	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL18-NES-Mut	Kan ^R /Amp ^R , Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay, Zielgerichtete Mutagenese mit Oligos Nr. 72 und 73, <i>Template</i> : Plasmid Nr. 29
189	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL21-NES-Mut	Kan ^R /Amp ^R , Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay, Zielgerichtete Mutagenese mit Oligos Nr. 74 und 75, <i>Template</i> : Plasmid Nr. 31
190	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL25-NES-Mut	Kan ^R /Amp ^R , Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay, Zielgerichtete Mutagenese mit Oligos Nr. 76 und 77, <i>Template</i> : Plasmid Nr. 34
191	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL26-NES-Mut	Kan ^R /Amp ^R , Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay, Zielgerichtete Mutagenese mit Oligos Nr. 78 und 79, <i>Template</i> : Plasmid Nr. 35
192	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL37d11-NES-Mut	Kan ^R /Amp ^R , Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay, Zielgerichtete Mutagenese mit Oligos Nr. 88 und 89, <i>Template</i> : Plasmid Nr. 45
193	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL38-NES-Mut (1)	Kan ^R /Amp ^R , Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay, Zielgerichtete Mutagenese mit Oligos Nr. 90 und 91, <i>Template</i> : Plasmid Nr. 46
194	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL38-NES-Mut (2)	Kan ^R /Amp ^R , Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay, Zielgerichtete Mutagenese mit Oligos Nr. 92 und 93, <i>Template</i> : Plasmid Nr. 46
195	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL47-NES-Mut	Kan ^R /Amp ^R , Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay, Zielgerichtete Mutagenese mit Oligos Nr. 94 und 95, <i>Template</i> : Plasmid Nr. 53
196	pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL48-NES-Mut	Kan ^R /Amp ^R , Verwendung im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay, Zielgerichtete Mutagenese mit Oligos Nr. 96 und 97, <i>Template</i> : Plasmid Nr. 54
197	pDONR207-UL31-Mut	Gent ^R , <i>Entry</i> -Vektor mit UL31-NLS-Mutante von HSV-1, PCR mit Oligos Nr. 80, 81, 82 und 83, <i>Template</i> : pDONR207-UL31 der HSV-1-Kollektion
198	pDONR207-UL34ΔTM-Mut-1	Gent ^R , <i>Entry</i> -Vektor mit UL34ΔTM-NLS-Mutante-1 von HSV-1, PCR mit Oligos Nr. 84 und 85, <i>Template</i> : pDONR207-UL34 der HSV-1-Kollektion
199	pDONR207-UL34ΔTM-Mut-2	Gent ^R , <i>Entry</i> -Vektor mit UL34ΔTM-NLS-Mutante-2 von HSV-1, PCR mit Oligos Nr. 86 und 87, <i>Template</i> : pDONR207-UL34 der HSV-1-Kollektion

Tab. 14: Plasmide der HSV-1-Kollektion. Alle HSV-1-Gene enthalten ein Start- und ein Stoppcodon und sind entweder in voller Länge (VL) oder als Fragmente im entry-Vektor pDONR207 (*1) und in den Hefevektoren pGBKT7-DEST (*2) und pGADT7-DEST (*3) vorhanden. Einige Inserts liegen in den Hefevektoren pGBKT7 (*4) und pGADT7 (*5) klassisch kloniert vor. Δ TM deletierte Transmembrandomäne.

Insert (Vektor)	Insert-Größe [bp]	Herkunft
RL1 (*4, 5)	1-747 (VL)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
RL2 Exon 2 (*1, 2, 3)	58-723 (VL 2328)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
UL1 (*1, 2, 3)	1-675 (VL)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
UL2 (*1, 2, 3)	1-1005 (VL)	T. Stellberger, Karlsruhe
UL3 (*1, 2, 3)	1-708 (VL)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
UL4 (*1, 2, 3)	1-600 (VL)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
UL5 (*1, 2, 3)	1-2649 (VL)	T. Stellberger, Karlsruhe
UL6 (*1, 2, 3)	1-2031 (VL)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
UL7 (*1, 2, 3)	1-891 (VL)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
UL8 (*1, 2, 3)	1-2253 (VL)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
UL9a (*1, 2, 3)	1-1200 (VL 2556)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
UL9b (*1, 2, 3)	1201-2553 (VL 2556)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
UL10 (*1, 2, 3)	1-1422 (VL)	E. Fossum, Edinburgh
UL11 (*1, 2, 3)	1-291 (VL)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
UL12 (*1, 2, 3)	1-1881 (VL)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
UL13 (*1, 2, 3)	1-1557 (VL)	E. Fossum, Edinburgh
UL14 (*1, 2, 3)	1-660 (VL)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
UL15 (*1, 2, 3)	1-2208 (VL)	E. Fossum, Edinburgh
UL16 (*1, 2, 3)	1-1122 (VL)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
UL17 (*1, 2, 3)	1-2112 (VL)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
UL18 (*1, 2, 3)	1-957 (VL)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
UL19 (*1, 2, 3)	1-4125 (VL)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
UL20 (*1, 2, 3)	1-669 (VL)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
UL20 A (*1, 2, 3)	1-189 (VL 669)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
UL21 (*1, 2, 3)	1-1608 (VL)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
UL22 (*1, 2, 3)	1-2517 (VL)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
UL23 (*1, 2, 3)	1-1131 (VL)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
UL24 (*1, 2, 3)	1-810 (VL)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
UL25 (*1, 2, 3)	1-1743 (VL)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
UL26 (*1, 2)	1-1908 (VL)	Dissertation T. Schmidt, Homburg

Insert (Vektor)	Insert-Größe [bp]	Herkunft
UL26.5 (*1, 2, 3)	1-990 (VL)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
UL27 B (*1, 2, 3)	2398-2712 (VL 2715)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
UL28a (*1, 2, 3)	1-1011 (VL 2358)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
UL28b (*1, 2, 3)	1029-2355 (VL 2358)	diese Arbeit
UL30 (*1, 2, 3)	1-3708 (VL)	E. Fossum, Edinburgh
UL31 (*1, 2, 3)	1-921 (VL)	E. Fossum, Edinburgh
UL32 (*1, 2, 3)	1-1791 (VL)	E. Fossum, Edinburgh
UL33 (*1, 2, 3)	1-393 (VL)	E. Fossum, Edinburgh
UL34 (*1, 2, 3)	1-828 (VL)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
UL34 Δ TM (*1, 2, 3)	1-741 (VL 828)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
UL35 (*1, 2, 3)	1-339 (VL)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
UL36a (*1, 2, 3)	1-3000 (VL 9420)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
UL36b (*1, 2, 3)	3001-6000 (VL 9420)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
UL37d11 (*1, 2, 3)	34-3372 (VL 3372)	T. Stellberger, Karlsruhe
UL37b (*1, 2, 3)	1501-3372 (VL 3372)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
UL38 (*1, 2, 3)	1-1398 (VL)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
UL39 (*1, 2, 3)	1-3414 (VL)	E. Fossum, Edinburgh
UL40 (*1, 2, 3)	1-1023 (VL)	E. Fossum, Edinburgh
UL40 A (*1, 2, 3)	1-537 (VL 1023)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
UL40 B (*1, 2, 3)	607-1020 (VL 1023)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
UL41 (*1, 2, 3)	1-1470 (VL)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
UL42 (*1, 2, 3)	1-1467	Dissertation T. Schmidt, Homburg
UL43 (*1, 2, 3)	1-1302	Dissertation T. Schmidt, Homburg
UL43 A (*1, 2, 3)	1-222 (VL 1302)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
UL43 B (*1, 2, 3)	643-1095 (VL 1302)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
UL44 (*1, 2, 3)	1-1536 (VL)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
UL45 (*1, 2, 3)	1-519 (VL)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
UL45 A (*1, 2, 3)	145-516 (VL 519)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
UL46a (*1, 2, 3)	1-1008 (VL 2157)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
UL46b (*1, 2, 3)	1009-2157 (VL 2157)	diese Arbeit
UL47 (*1, 2, 3)	1-2082 (VL)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
UL48 (*1, 2, 3)	1-1473 (VL)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
UL49 (*1, 2, 3)	1-906 (VL)	Dissertation T. Schmidt, Homburg

Insert (Vektor)	Insert-Größe [bp]	Herkunft
UL49A-Gen (*1, 2, 3)	1-276 (VL)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
UL49A-Gen A (*1, 2, 3)	79-174 (VL 276)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
UL50 (*1, 2, 3)	1-1116 (VL)	E. Fossum, Edinburgh
UL51(*1, 2, 3)	1-735 (VL)	T. Stellberger, Karlsruhe
UL52 (*1, 2, 3)	1-3177 (VL)	diese Arbeit
UL53 (*1, 2, 3)	1-1017 (VL)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
UL53 A (*1, 2, 3)	97-366 (VL 1017)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
UL54 (*1, 2, 3)	1-1539 (VL)	E. Fossum, Edinburgh
UL55 (*1, 2, 3)	1-561 (VL)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
UL56 (*1, 2, 3)	1-705 (VL)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
RS1a (*4, 5)	265-1161 (VL 3897)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
RS1b (*4, 5)	1303-3459 (VL 3897)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
US1 (*1, 2, 3)	1-1263 (VL)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
US2 (*1, 2, 3)	1-876 (VL)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
US3 (*1, 2, 3)	1-1446 (VL)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
US4 (*1, 2, 3)	1-717	Dissertation T. Schmidt, Homburg
US4 A (*1, 2, 3)	88-570 (VL 717)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
US5 (*1, 2, 3)	1-279 (VL)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
US5 A (*1, 2, 3)	73-150 (VL 279)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
US6 (*1, 2, 3)	1-1185 (VL)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
US6 A (*1, 2, 3)	1-1023 (VL 1185)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
US7 (*1, 2, 3)	1-1173 (VL)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
US7 A (*1, 2, 3)	1-819 (VL 1173)	T. Stellberger, Karlsruhe
US7 B (*1, 2, 3)	889-1170 (VL 1173)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
US8 (*1, 2, 3)	1-1653 (VL)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
US8 A (*1, 2, 3)	1-1263 (VL 1653)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
US8 B (*1, 2, 3)	1333-1650 (VL 1653)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
US8A-Gen (*1, 2, 3)	1-480 (VL)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
US9 (*1, 2, 3)	1-273 (VL)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
US9 A (*1, 2, 3)	1-192 (VL 273)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
US10 (*1, 2, 3)	1-939 (VL)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
US11 (*1, 2, 3)	1-486 (VL)	Dissertation T. Schmidt, Homburg
US12 (*1, 2, 3)	1-267 (VL)	Dissertation T. Schmidt, Homburg

3.2 Organismen

Tab. 15: Bakterienstämme (*E. coli*)

Stamm	Genotyp	Referenz
BL21(DE3)	F- <i>ompT hsdSB (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)	Novagen
DB3.1	F- <i>gyrA462 endA1 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(rB⁻, mB⁻) supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(SmR) xyl-5 λ⁻ leu mtl1</i>	Invitrogen
DH5α	F- <i>φ80dlacZM15 (lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(r k⁻, m k⁺) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ⁻</i>	Invitrogen
JM101	F' <i>traD36 proA+B+ lacIq Δ(lacZ)M15 / Δ(lac-proAB) thi-1 supE</i>	(339)
M15/pREP4	<i>lac, ara, gal, mtl, recA⁺, uvr⁺</i> [pREP4, <i>lacI, kana^r</i>]	Qiagen
XL1-Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac</i> [F'proAB, lac1q. ZΔM15, Tn10 (tetr)]	Stratagene

Tab. 16: Hefestämme

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

Tab. 17: Säugerzelllinien

Zelllinie	Herkunft	Morphologie	Referenz
HeLa	humane Cervix Karzinomzellen	epithelial, Monolayer	ATCC-Nr. CCL-2
Hep2	humane Larynx Karzinomzellen	epithelial, Monolayer	ATCC-Nr. CCL-23
NIH3T3	murine Fibroblastenzellen	Monolayer	ATCC-Nr.CRL-1658
Vero	Nierenzellen der grünen Meerkatze (<i>Cercopithecus aethiops</i>)	fibroblastenähnlich, Monolayer	ATCC-Nr. CCL-81

3.3 Methoden

3.3.1 Bakterienkultur (*E. coli*)

3.3.1.1 Kultivierung und Nährmedien

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in LB-Medium bei 37°C im Schüttelinkubator oder auf LB-Agarplatten.

LB-Medium (1 l):	10 g	Bacto Trypton
	5 g	Bacto Hefeextrakt
	5 g	NaCl

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

Zur Selektion Plasmid-tragender Bakterien wurde dem LB-Medium je nach Resistenz das entsprechende Antibiotikum in folgender Konzentration zugesetzt:

100 µg/ml	Ampicillin
15 µg/ml	Gentamycin
50 µg/ml	Kanamycin
50 µg/ml	Spectinomycin

3.3.1.2 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Die Kultivierung der Bakterien erfolgte in LB-Medium bei 37°C im Schüttelinkubator. Zur Herstellung chemisch kompetenter Bakterien wurden 400 ml Medium mit einer Vorkultur eines Einzelklons inokuliert (OD_{600} von 0,05) und bis zu einer optischen Dichte OD_{600} von 0,6 inkubiert. Danach erfolgte eine Abkühlung der Suspension auf Eiswasser für 10 min. Anschließend erfolgten alle Schritte bei 4°C oder auf Eis. Die Bakterien wurden in einer Kühlzentrifuge (10 min, 2.500 x g, 4°C) sedimentiert und anschließend in 120 ml eiskaltem TfBI-Puffer aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in 16 ml eiskaltem TfBI-Puffer resuspendiert, aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

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

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

3.3.1.3 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Die zu transformierende DNA (1 µl einer Miniprep, 5 µl eines Rekombinationsansatzes und 20 µl eines Ligationsansatzes) wurde mit 100 µl chemisch kompetenten Bakterien 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (1 min, 42°C) erfolgte eine kurze Inkubation auf Eis (2 min), die Zugabe von 1 ml LB-Medium und eine erneute Inkubation von 1 h bei 37°C. Zuletzt wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsmedium ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.3.2 Hefekultur (*Saccharomyces cerevisiae*)

3.3.2.1 Kultivierung und Nährmedien

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

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

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

Zur Selektion Plasmid tragender Hefezellen bzw. zur Überprüfung von Reporter-genaktivität wurden folgende *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
	0,64 g	-Ade/-His/-Leu/-Trp DO Supplement
	20 mg	L-Adenin

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

3.3.2.2 Herstellung chemisch kompetenter Hefezellen

Die Kultivierung der Hefezellen erfolgte in YPD-Medium bei 30°C im Schüttelinkubator (200 Upm). Zur Herstellung chemisch kompetenter Hefezellen wurden 25 ml Medium mit einer Vorkultur inokuliert (OD₆₀₀ von 0,1) und bis zu einer optischen Dichte OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in einer Kühlzentrifuge (5 min, 930 x g, 4°C) sedimentiert und in 12,5 ml SBEG-Lösung gewaschen. 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

Die zu transformierende DNA (1 µg einer Miniprep) wurde mit 100 µl kompetenten Hefezellen gemischt und nach Zugabe von 750 µl PEG/Bicin-Lösung 1 h bei 30°C inkubiert. Nach einem Hitzeschock (5 min, 45°C) wurden die Hefezellen pelletiert (5 min, 2.700 x g), in 1 ml NB-Puffer gewaschen und 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 Konservierung

HeLa-, Hep2- NIH3T3- und Verozellen wurden in DMEM, welches mit 10 % fötalem Kälberserum, 1 % Penicillin/Streptomycin und L-Glutamin versetzt wurde, bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Zum Passagieren wurde 0,5 % Trypsin/EDTA verwendet. Für die Konservierung wurden die Zellen einer konfluenten 10 cm-Zellkulturschale 5 min bei 300 x g sedimentiert und in 0,5 ml eiskaltem DMEM mit 40 % FCS resuspendiert. Anschließend wurde unter Schütteln tropfenweise 0,5 ml DMEM mit 20 % DMSO zugegeben. Danach wurde die Zellsuspension in ein eisgekühltes Kryo-Röhrchen überführt und für 24 h bei -80°C abgekühlt. Die Lagerung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff. Zum Auftauen der Zellen wurden sie kurz in einem 37°C warmen Wasserbad unter Schütteln erwärmt, mit 10 ml Zellkulturmedium gewaschen und in Kultur genommen.

3.3.3.2 DNA-Transfektion

Zur Transfektion von Säugerzellen mit Plasmid-DNA wurde das Effectene Transfektionsreagenz (Qiagen) nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

3.3.3.3 Gen-Silencing mittels RNA-Interferenz

Die Transfektion von Säugerzellen mit kurzen, chemisch synthetisierten dsRNA-Molekülen [small interfering RNA (siRNA)] führt zu einer transienten Inhibierung des Zielproteins (Silencing). Dabei kommt es zu einer Wechselwirkung des Antisense-Stranges der siRNA mit der komplementären mRNA unter Beteiligung des Effektorkomplexes RISC (RNA induced silencing complex). Als Folge wird die mRNA in mehrere Bruchstücke gespalten und die Translation verhindert.

3.3.3.3.1 siRNA-Design und -Transfektion

Die doppelsträngigen siRNAs zum *Silencing* von Cse1L wurden von der Firma Thermo Scientific chemisch synthetisiert. Parallel zu den spezifischen siRNA wurde eine Kontroll-siRNA verwendet, die keine für einen *Silencing*-Effekt komplementäre Zielsequenz im HeLa-Zellgenom besitzt. Diese stammt von der Firma Qiagen. Die Sequenzen des jeweiligen *Sense*-Stranges der siRNA-Oligonukleotide sind in Tab. 18 aufgelistet.

Tab. 18: Sequenzen der siRNA-Oligonukleotide

siRNA-Oligonukleotide	Sequenz des <i>Sense</i> -Stranges
Cse1L-siRNA- <i>Pool</i>	GGACUGAAAUUAAGCUUGU GCAAUCUGCAAACACUAA AUAGUGCACUUGAUGCUUA UGGUUUGUGUUGAGCGUUU
Kontroll-siRNA	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT

Um den Einfluss des zellulären Proteins Cse1L auf den Infektionsverlauf von HSV-1 zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen mit den entsprechenden siRNA SMARTpools (je 4 siRNAs) und einer Kontroll-siRNA transfiziert. Zur Bildung der Transfektionskomplexe wurde 1 µl siRNA (Endkonzentration 20 nM) in 150 µl *Hanks' Balanced Salt Solution* (HBSS) und 1,5 µl Dharmafect 1 (Dharmacon, ThermoFisher Scientific, Endkonzentration 0,15 %) ebenfalls in 150 µl HBSS im 12 *well* gemischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden $1,2 \times 10^5$ HeLa-Zellen (in 700 µl DMEM/F12, 5 % FCS) zu dem Transfektionsansatz gegeben und unter Standardbedingungen inkubiert. 48 h nach siRNA-Transfektion erfolgte die Infektion mit HSV-1-F-Wildtyp (Prof. Dr. Beate Sodeik, MHH Hannover) mit einer MOI von 0,1. Zur Quantifizierung infektiöser Partikel wurden für den anschließenden *Plaque Assay* auf Vero-Zellen zu bestimmten Zeitpunkten Überstände entnommen. Der Einfluss der siRNA Transfektion auf das Überleben der Zellen erfolgte durch Bestimmung der Anzahl ungefärbter Zellen in Trypanblau Lösung (0,4 %Trypanblau in PBS).

3.3.3.3.2 Herstellung der Lysate zur *Silencing*-Kontrolle

Die Effizienz der RNA-Interferenz wurde mittels SDS-PAGE und Western-Blot dargestellt. 48 h nach siRNA-Transfektion wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst, in eiskaltem PBS aufgenommen und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Zentrifugation (3000 x g, 4°C, 5 min) wurde das Zellpellet sofort in Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Zur Analyse wurde das Pellet in 150 µl 2 x SDS-Probenpuffer resuspendiert und 5 min bei 98°C gekocht. Es wurden jeweils 10 µl der Lysate auf ein SDS-Gel aufgetragen.

3.3.4 Virologische Methoden

3.3.4.1 Vermehrung des Virusstamms

Zur Vermehrung des HSV-1-F-Wildtyps wurden subkonfluente Kulturen von Vero-Zellen in 15 cm-Zellkulturschalen kultiviert und anschließend mit dem Virusstamm (MOI von 0,02) infiziert. Nach ungefähr 3 Tagen wurde der Überstand geerntet, bei -80°C gefroren und erneut aufgetaut, um noch vorhandene Zellen zu lysieren. Um Zelltrümmer zu entfernen,

wurde die Suspension 10 min bei 850 x g zentrifugiert, der virushaltige Überstand anschließend in Kryo-Röhrchen aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.3.4.2 HSV-1-Infektion von Säugerzellen

HeLa- oder Vero-Zellen wurden bis zur Subkonfluenz kultiviert, mit dem gewünschten HSV-1-Virusstamm inokuliert bzw. zur Kontrolle (mock) mit virusfreiem Medium versetzt und 1 h bei 37°C und 5 % CO₂ unter gelegentlichem Bewegen inkubiert. Um die Infektion abzustoppen, wurde das Medium mit den nicht-adsorbierten Viren nach einem Waschschrift mit PBS durch frisches Zellkulturmedium ersetzt 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. Bei einer MOI von 1 werden genau so viele infektiöse Viruspartikel eingesetzt, wie sich Zellen in der Kultur befinden.

3.3.4.3 *Plaque-Assay* zur Bestimmung des Virustiters

Zur Bestimmung des Virustiters einer Probe wurde der sog. *Plaque-Assay* angewendet. Um konfluente Kulturen von Vero-Zellen in 24-*well*-Zellkulturschalen zu erreichen, wurden am Vortag 8 x 10⁴ Zellen pro *well* ausgesät. Serielle 10-fache Verdünnungen der virushaltigen Probe wurden in DMEM hergestellt und in Triplikaten mit den Vero-Zellen 1 h unter Standardbedingungen inkubiert. Anschließend wurde der Überstand durch Methylcellulosehaltiges Medium ersetzt und 3 Tage unter Standardbedingungen inkubiert. Die Methylcellulose bewirkt eine ausschließlich lokale Ausbreitung neu gebildeter Viruspartikel, wodurch sog. Plaques entstehen. Um diese sichtbar zu machen, wurden die Zellen mit Kristallviolett-Lösung sowohl fixiert als auch angefärbt. Durch Auszählung der neugebildeten Plaques und unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnung und des Volumens konnte die Zahl infektiöser Partikel als *plaque forming units* (pfu) pro ml ermittelt 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 Nichtessentielle Aminosäuren (NEAA)
5 ml	Pen/Strep-Lösung
24,7 ml	NaHCO ₃

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 Virusreplikation

Um den Einfluss von Cse1L auf den Infektionsverlauf von HSV-1 zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen zunächst wie unter Abschnitt 3.3.3.3.1 beschrieben mit den entsprechenden siRNAs transfiziert und nach 48h mit HSV-1-F-Wildtyp (MOI von 0,1) infiziert. Anschließend wurden in definierten Zeitabständen Kulturüberstände zur Bestimmung der extrazellulären Viruspartikel entnommen und bei -80°C tiefgefroren. Durch Zentrifugation der Überstände (1 min, 13.000 x g) wurden Zelltrümmer entfernt und anschließend *Plaque-Assays* zur quantitativen Bestimmung der infektiösen Partikel durchgeführt.

3.3.5 Molekularbiologische Methoden

3.3.5.1 Plasmid-DNA-Mini-Präparation aus *E. coli*

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

3.3.5.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration und Reinheit isolierter DNA wurde mit Hilfe eines Nanodrop ND-1000 Spektrophotometers (PepqLab) gemessen. Da das Absorptionsmaximum von DNA und RNA bei 260 nm, das von Proteinen bei 280 nm liegt, kann aus der optischen Dichte OD_{260} die DNA-Konzentration und aus dem Quotienten OD_{260}/OD_{280} die Reinheit der Lösung bestimmt werden. Dabei entspricht eine OD_{260} von 1 50 µg/ml dsDNA bzw. 40 µg/ml RNA, während der optimale Reinheitsquotient bei 1,8 liegt.

3.3.5.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

DNA-Templates wurden mit Hilfe des HotStar High Fidelity Polymerase Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers amplifiziert. Für die *Gateway*®-Klonierung wurden die attB-Sequenzen in einer zweistufigen nested PCR an die DNA-Fragmente angefügt. Zur Amplifikation sehr großer Gene, wie die einiger Transportfaktoren, wurde die sog. Fusions-PCR eingesetzt. Dabei wurden zwei zueinander komplementäre Primer P2 und P3 verwendet, die in der Mitte des entsprechenden Gens hybridisieren konnten. In zwei

unabhängigen Reaktionen wurden die beiden Hälften des Gens amplifiziert, die von den Primern P1 und P2 (vordere Gen-Hälfte) bzw. P3 und P4 (hintere Gen-Hälfte) flankiert wurden. In der darauf folgenden Fusions-PCR wurden beide PCR-Produkte eingesetzt. Sie können an ihren komplementären Enden hybridisieren, und am 3'-Ende von der Polymerase verlängert werden. Durch Zugabe der Primer P1 und P4 konnte anschließend das gesamte Gen amplifiziert werden.

Nach Auftrennung mittels Agarose-Gelelektrophorese wurden die DNA-Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) aufgereinigt.

3.3.5.4 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung unterschiedlich großer DNA-Fragmente wurde die horizontale Agarose-Gelelektrophorese angewendet. Je nach Größe der DNA-Fragmente wurden entsprechende Mengen Agarose (0,8-2,0 %; in der Regel 1 %) in TAE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und nach Abkühlung auf ungefähr 50°C mit 0,25 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Anschließend wurde die Agarose-Lösung in eine passende Gelkammer mit Taschenkamm gegossen und nach der vollständigen Polymerisation in eine Gel-Apparatur überführt und mit TAE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit der entsprechenden Menge 6 x DNA-Ladepuffer (Fermentas) versetzt und im Agarosegel bei einer Spannung von 120 V aufgetrennt. Zur Ermittlung der DNA-Fragment-Größen wurde ein Molekulargewichtsstandard (Gene Ruler 1kb DNA Ladder) verwendet. Durch eine Interkalation von Ethidiumbromid in Nukleinsäuren können die DNA-Banden mittels UV-Licht ($\lambda = 302 \text{ nm}$) sichtbar gemacht werden.

TAE-Puffer (1 l):

4,84 g	Tris
1,14 ml	Essigsäure
2 ml	0,5 M EDTA pH 8

3.3.5.5. DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Die Präparation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers.

3.3.5.6 Klonierung mit Hilfe sequenzspezifischer Rekombination (*Gateway*®-Klonierung)

Bei der *Gateway*®-Klonierung (Invitrogen) handelt es sich im Vergleich zu herkömmlichen Klonierungsstrategien um eine sehr effiziente Klonierungstechnik. Die Technik beruht auf dem sequenzspezifischen Rekombinationssystem des Phagen λ , der mit Hilfe bestimmter Enzyme seine DNA in das Genom des Bakteriums *E. coli* integriert. Für diesen Vorgang sind

jedoch spezifische Rekombinationssequenzen im sog. *entry*-Vektor sowie an den Enden der zu transferierenden DNA-Fragmente erforderlich.

Mittels *nested* PCR werden DNA-Fragmente (*Inserts*) amplifiziert, die von spezifischen Rekombinationssequenzen (*attachment sites*, *attB1* und *attB2*) flankiert werden. Diese können über sequenzspezifische Rekombination mit Hilfe des BP-Clonase Mix (Invitrogen) in *entry*-Vektoren inseriert werden. Diese *entry*-Vektoren besitzen ein sog. *ccdB*-Gen, das an beiden Enden die spezifischen *attP1*- und *attP2*-Rekombinationssequenzen trägt. Bei dem *ccdB*-Gen handelt es sich um ein Selbstmordgen, dessen Genprodukt auf die im Labor normalerweise verwendeten Bakterienstämme toxisch wirkt, indem es die bakterielle DNA-Gyrase hemmt. Die BP-Reaktion sorgt also für den Austausch des Selbstmordgens gegen das gewünschte *Insert*, das nun im *entry*-Vektor von *attL*-Sequenzen flankiert wird. Dieser Austausch ermöglicht also die Selektion erfolgreicher Rekombinanten, da er das Wachstum transformierter DH5 α -Zellen ermöglicht. Von dem *entry*-Vektor aus kann nun das *Insert* mit Hilfe des LR-Clonase Mix (Invitrogen) in jeden beliebigen Zielvektor (DEST-Vektor), der über *attR*-Sequenzen verfügt, übertragen werden. Auch hier erfolgt die Selektion über das *ccdB*-Gen. Die Klonierung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

3.3.5.7 DNA-Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau von DNA mittels sequenzspezifischen Restriktionsendonukleasen wurde zur herkömmlichen klassischen Klonierung eingesetzt, um DNA-*Inserts* und Zielvektoren mit kompatiblen Enden zu generieren, die anschließend zielgerichtet ligiert werden konnten. Zudem wurde diese Technik zur Kontrolle aller Klonierungen eingesetzt. Alle Restriktionsenzyme und Puffer wurden von NEB bezogen und nach Angaben des Herstellers eingesetzt. In der Regel wurden ca. 1,5 μ g DNA bei der empfohlenen Temperatur mit 6 U Enzym (3 h bei klassischen Klonierungen, 1 h zum Kontroll-Verdau) verdaut und anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

3.3.5.8 DNA-Ligation

Für die DNA-Ligation wurde die T4 DNA-Ligase des Quick Ligation Kits (NEB) nach Angaben des Herstellers verwendet. Vor der Ligation mussten die DNA-*Inserts* und Zielvektoren jeweils mit Restriktionsendonukleasen verdaut werden, die kompatible Enden generieren. Der Ligationsansatz wurde anschließend in kompetente DH5 α -Zellen transformiert.

3.3.5.9 Sequenzierung von DNA

Die Richtigkeit klonierter Plasmide wurde durch Sequenzierung der Firma AGOWA GmbH (Berlin) überprüft.

3.3.5.10 Zielgerichtete Mutagenese

Zur gezielten Einführung von Punktmutationen in die zu untersuchenden Gene wurde das QuikChange Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Transformation der mutierten Plasmide erfolgte in *Epicurian Coli* XL1-Blue superkompetenten Zellen.

3.3.6 Biochemische Methoden

3.3.6.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen aufgrund ihres Molekulargewichts wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese angewendet. Zur Herstellung der Zelllysate wurden trypsinisierte HeLa-Zellen eines 12-wells pelletiert (300 x g, 5 min, 4°C), 1 x mit PBS gewaschen und mit 150 µl 2 x SDS-Probenpuffer gekocht (95°C, 5 min). Es wurden diskontinuierliche Gele mit einem 10 %-igen Trenngel und einem 5 %-igen Sammelgel gegossen. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V und 20 mA, bis die Bande des Probenauftragspuffers das untere Ende des Gels erreicht hatte. Als Größenmarker wurde der Benchmark Protein Ladder (Invitrogen) verwendet.

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)]
4,01 ml	H ₂ O _{bidest.}
100 µl	APS [10 % (w/v)]
35 µl	TEMED

Sammelgel (5 %):

1,25 ml	Tris-HCl pH 6,5
650 µl	Acrylamid/Bisacrylamid (37, 5:1)
50 µl	SDS-Lösung [10 % (w/v)]
3,05 ml	H ₂ O _{bidest.}
35 µl	APS [10 % (w/v)]
35 µl	TEMED

4 x SDS- Probenpuffer:	130 mM	Tris-HCl pH 6,8
	4 % (w/v)	SDS
	20 % (v/v)	Glycerin
	0,02 % (w/v)	Bromphenolblau
	100 mM	DTT
Laufpuffer (1 l):	1 g	SDS
	3,03 g	Tris
	14,4 g	Glyzin

3.3.6.2 Western Blot

Zur qualitativen oder quantitativen Proteinanalyse wurden die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine mit Hilfe einer Nassblot-Apparatur durch horizontale Elektrophorese (100 V, 250 mA, 60 min) auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (Western Blot). Zur Überprüfung des Transfererfolgs wurde die Membran anschließend mit einer Ponceaurot-Lösung gefärbt und die Banden des Größenstandards mit einem Bleistift nachgezeichnet. Nach Entfärben der Membran in 1 x TBST wurden unspezifische Antikörperbindestellen durch Inkubation in 5 % Milchpulver/TBST 1 h auf dem Kippschüttler gesättigt. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit dem spezifischen Primärantikörper in 5 % Milchpulver/TBST ebenfalls auf dem Kippschüttler inkubiert. Nach drei Waschschrritten (10 min) mit TBST erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden Peroxidase-gekoppelten (*horseradish* peroxidase HRP) Sekundärantikörper 3 h bei Raumtemperatur in 5 % Milchpulver/TBST. Nach weiteren 3 Waschschrritten in PBS wurden die spezifisch markierten Proteine durch die Entwicklung des Peroxidase-Signals mit Hilfe des ECL-Systems (*enhanced chemiluminescence*, GE Healthcare) auf einem Röntgenfilm (Agfa) sichtbar gemacht.

Transferpuffer pH 8,3 (1 l):	3,03 g	Tris
	14,4 g	Glyzin
	200 ml	Methanol
Ponceaurot-Lösung:	0,1 % (w/v)	Ponceau S
	5 % (v/v)	Essigsäure
TBST (1 l):	9 g	NaCl
	10 ml	Tris-HCl pH 7,8
	1 ml	Tween 20

3.3.6.3 Rekombinante Proteinexpression und Aufreinigung von Fusionsproteinen aus *E. coli*

3.3.6.3.1 Expression

Zur Expression der Fusionsproteine (KPNA5-His₆, KPNB1-His₆, His₆-RanQ69L und GST-UL34ΔTM) wurden die entsprechenden Plasmide in geeignete bakterielle Expressionsstämme [JM101 (pQE60-KPNB1, pQE32-RanQ69L), BL21(DE3); (GST-UL34ΔTM) und M15/pREP4 (pQE60-KPNA5)] transformiert. Von einer Übernachtskultur dieser Bakterien in adäquatem LB-Selektionsmedium wurde am nächsten Tag eine Hauptkultur (400 ml) angeimpft und bei 37°C unter Schütteln bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 kultiviert. Da die Ausbeute von KPNA5-His₆ sehr schlecht war, erfolgte dessen Expression in 2 l Hauptkultur. Danach wurde die Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die weitere Inkubation erfolgte bei RT für 4 h. Zur Ernte der Bakterien wurde die Kultur für 15 min bei 3000 x g und 4°C zentrifugiert, das Pellet mit H₂O_{bidest.} gewaschen und anschließend entweder sofort zur Proteinreinigung eingesetzt oder bei -20°C gelagert. Im Falle der KPNA5-His₆-Expression wurde bereits vor der Ernte 340 mg PMSF in 20 ml Ethanol zugesetzt.

3.3.6.3.2 Aufreinigung

Zur Reinigung der rekombinant exprimierten Fusionsproteine wurden Bakterienpellets in 10 ml Reinigungspuffer pro 100 ml ursprünglicher Kultur mit Proteaseinhibitor (EDTA-free Protease Inhibitor, Roche) resuspendiert und mit Hilfe einer French Press aufgeschlossen. Nach dreimaliger Durchführung und Klärung der Suspension wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (10.000 x g, 20 min, 4°C) entfernt. Im Anschluss wurde der Überstand dann mit einer entsprechenden, in Reinigungspuffer äquilibrierten Matrix für 1 h bei 4°C auf dem Drehrad in einer Säule inkubiert. Für das GST-*getaggte* UL34ΔTM wurden 500 µl Glutathion-Sepharose und für die His₆-*getaggten* Proteine 400 µl Ni²⁺-NTA-Agarose verwendet. Nach dem Durchlauf wurde das Säulenmaterial 2 x mit 7 ml Reinigungspuffer gewaschen. Die Elution der GST-*getaggten* Proteine erfolgte mit Reinigungspuffer und 10 mM Glutathion-S-Transferase (GST) in 7 Fraktionen zu je 250 µl. Die His₆-*getaggten* Proteine wurden in 6 Fraktionen zu je 250 µl mit Reinigungspuffer und 500 mM Imidazol eluiert. Zur Kontrolle wurde von jeder Fraktion 10 µl in einer SDS-PAGE analysiert. Die Fraktionen mit dem höchsten Proteingehalt wurden vereint und in Aliquots bei -80°C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung der gereinigten Proteine erfolgte durch Vergleich deren Bandendicke mit einem vorhandenen BSA-Standard nach SDS-PAGE.

Reinigungspuffer für GST-Fusionsproteine pH 7,5:	20 mM	HEPES
	100 mM	Kaliumacetat
	2 mM	Magnesiumacetat
	0,1 %	Tween 20
	10 %	Glyzerin

Reinigungspuffer für His ₆ -Fusionsproteine pH 7,5:	20 mM	HEPES
	100 mM	Kaliumacetat
	2 mM	Magnesiumacetat
	20 mM	Imidazol
	0,1 %	Tween 20
	10 %	Glyzerin

3.3.7 Methoden zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen

3.3.7.1 Hefe-2-Hybridsystem

Zur Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen unter *in vivo*-ähnlichen Bedingungen wurde das Hefe-2-Hybridsystem (*Yeast-2-Hybrid*, Y2H) verwendet (Abb. 8). Grundlage für diese Methode ist der Transkriptionsfaktor Gal4 von *Saccharomyces cerevisiae*, der aus zwei Funktionsdomänen besteht, einer DNA-Bindedomäne (BD) und einer Aktivierungsdomäne (AD). Die beiden Domänen werden als Teil von zwei Fusionsproteinen mit jeweils einem der beiden potentiellen Interaktionspartner in Hefe exprimiert. Das an die DNA-Bindedomäne fusionierte Protein wird dabei als *Bait* (Köderprotein), das an die Aktivierungsdomäne fusionierte Protein als *Prey* (Beuteprotein) bezeichnet. Kommt es zwischen den beiden Proteinen zu einer Bindung, resultiert daraus in der Regel eine funktionelle Rekonstitution des Transkriptionsfaktors, was eine Expression des Reportergens (*HIS3* und *MEL1*) zur Folge hat.

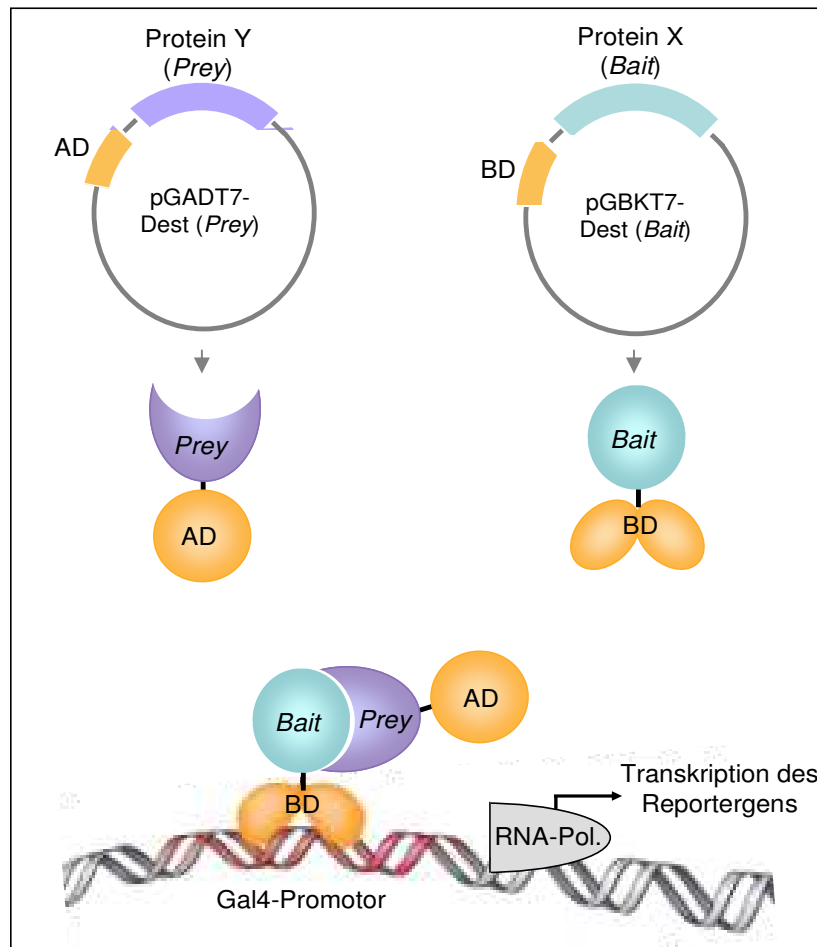


Abb. 8: Schema des Hefe-2-Hybridsystems Das *Bait*-Fusionsprotein bindet an den Gal4-Promotor vor einem Reportergen im Genom einer Hefezelle. Ist das *Prey*-Fusionsprotein in der Lage, an das *Bait*-Fusionsprotein zu binden, kann die Funktion des Gal4-Transkriptionsfaktors [DNA-Bindedomäne (BD) und Aktivierungsdomäne (AD)] rekonstituiert werden, was eine Expression des Reportergens zur Folge hat. Über dieses kann die Interaktion detektiert werden.

3.3.7.1.1 Durchführung des Hefe-2-Hybridsystems

Zur Durchführung des Hefe-2-Hybridsystems im kleinen Maßstab wurden zwei verschiedene Hefestämme [Y187 (Tryptophan-auxotroph) und AH109 (Leucin-auxotroph)] mit gegensätzlichem Paarungstyp mit den jeweiligen *Bait*- und *Prey*-Plasmiden (pGBKT7-DEST und pGADT7-DEST) transformiert und auf entsprechenden Agarplatten selektioniert. Um die *Bait*- und *Prey*-Plasmide in dieselbe Hefezelle zu bringen, wurde das Prinzip der Verpaarung (*Mating*) genutzt. Dafür wurden die beiden transformierten Hefestämme auf YPD-Agarplatten vermischt, 3 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf Doppelselektivplatten übertragen (SD-LW). Nach ungefähr 2 Tagen bei 30°C erfolgte die Überprüfung der *HIS3*-Reportergenaktivität auf Dreifachselektivplatten (SD-LWH) und erneuter Inkubation (3 Tage 30°C). Das *HIS3*-Gen kodiert für die Histidin-Synthase, die es den Hefezellen ermöglicht, auf histidinfreiem Nährmedium zu wachsen. Um hohe Hintergrundsignale von falsch-positiven Interaktionen zu vermeiden, wurden dem Medium unterschiedliche Konzentrationen an 3-Aminotriazol (3-AT) zugesetzt. 3-AT unterdrückt als kompetitiver Inhibitor der Histidin-

Synthese die Basisaktivierung des *HIS3*-Reportergens. Um sicherzustellen, dass das Reporter gen nicht schon durch Expression des *Bait*- oder *Prey*-Proteins allein aktiviert werden kann, mussten für alle untersuchten Proteine Vortests zur Autoaktivierung durchgeführt werden.

3.3.7.1.2 Hefe-2-Hybridsystem im Hochdurchsatz: Y2H *Direct Mating*

Um einzelne Proteine im Hochdurchsatz gegen eine Vielzahl definierter und potentieller Interaktionspartner zu testen, wurde das Hefe-2-Hybridsystem im 96-well-Maßstab in Flüssigmedien etabliert (Abb. 9).

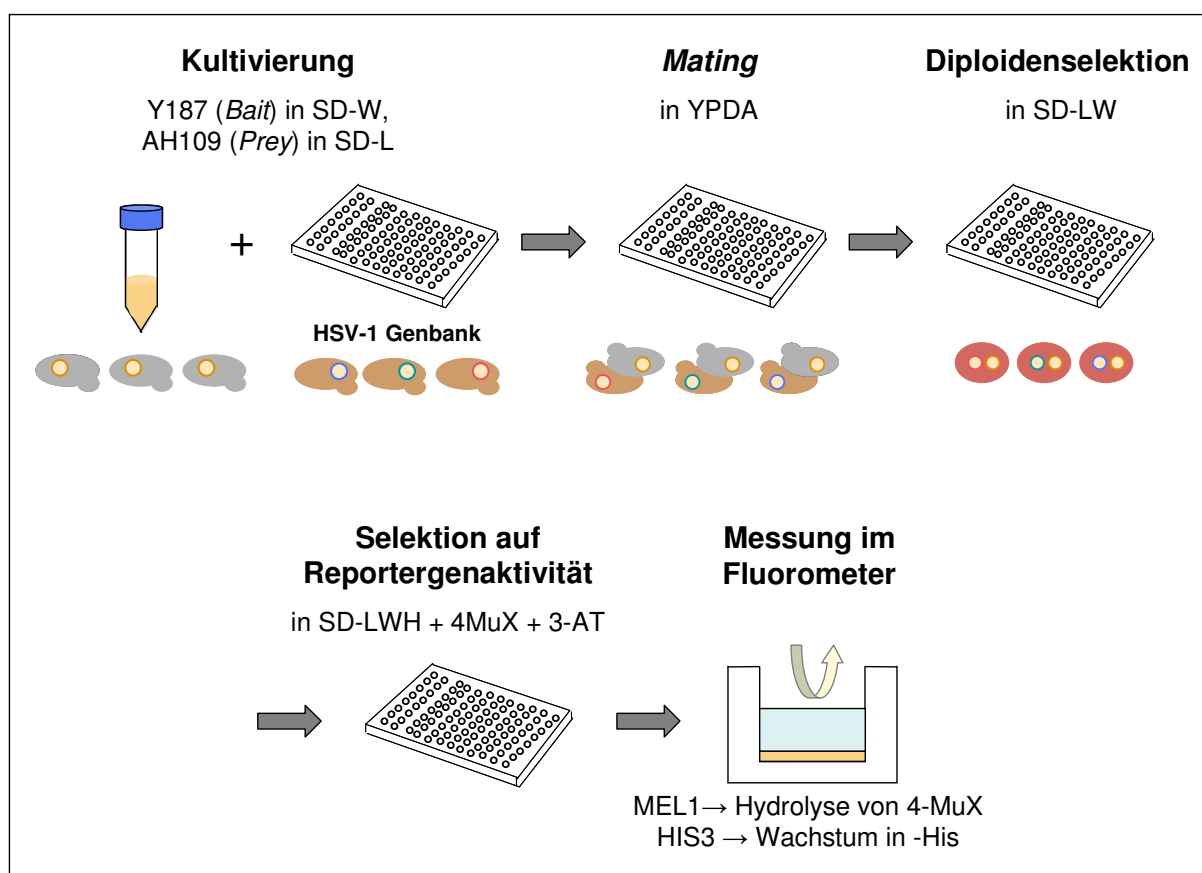


Abb. 9: Hefe-2-Hybridsystem im Hochdurchsatz (*Direct Mating*). Das Hefe-2-Hybridsystem im Hochdurchsatz erfolgt im 96-well-Maßstab in Flüssigmedien. Dabei wird ein *Bait*- bzw. *Prey*-Protein (z. B. ein Transportrezeptor) gegen eine Vielzahl definierter *Prey*- bzw. *Bait*-Proteine (HSV-1-Genbank) getestet. Die transformierten, haploiden Hefezellen werden über Nacht in YPDA zur Paarung gebracht und am darauffolgenden Tag zur Diploidenselektion in Doppel-Selektivmedium überführt. Nach 2 Tagen werden die diploiden Hefen zur Selektion auf Reporter genaktivität in Dreifach-Selektivmedium mit 4-Methylumbelliferyl α -D-glucosid (4-MuX) und 3-Aminotriazol (3-AT) 3 Tage inkubiert. Kommt es zu einer Interaktion von *Bait* und *Prey*, führt die Expression des *HIS3*-Reporter gens zum Wachstum der Hefen in Histidin-freiem Medium. Zudem führt die Transkription des zweiten Reporter gens *MEL1* zur Expression der α -Galactosidase, die das Substrat 4-MuX zu einem Produkt hydrolysiert, das im Fluorometer gemessen werden kann.

Dafür wurden die mit den entsprechenden Vektoren transformierten, haploiden Hefestämme unterschiedlicher Paarungstypen über Nacht in einfachem Selektivmedium (SD-L bzw.

SD-W) in 96-well-Mikrotiterplatten bzw. 50-ml-Falconröhrchen bei 30°C kultiviert und am darauffolgenden Tag zur Paarung gebracht. Zur Paarung 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, vorsichtig sedimentiert (1 min, 1000 x g) und über Nacht bei 30°C inkubiert. Nach weiteren 2 Tagen Inkubation von 15 µl des *Mating*-Ansatzes in 200 µl Doppelselektivmedium (SD-LW) bei 30°C wurden 15 µl der diploiden Hefezellen in 96-well Mikrotiterplatten (F-Form) mit Dreifach-Selektivmedium (SD-LWH) überführt. Dieses sog. Detektionsmedium enthielt 50 µM 4-Methylumbelliferyl α -D-galactopyranoside (4-MuX) und verschiedene 3-AT-Konzentrationen. Nach drei Tagen Inkubation bei 30°C im Detektionsmedium erfolgt die Messung der Reporterogenaktivität im Fluorometer. Nur wenn es zwischen den potentiellen Interaktionspartnern zu einer Bindung kommt, resultiert daraus eine Expression der Reportergene *HIS3* und *MEL1*. *HIS3* ist für das Wachstum der Hefen in Histidin-freiem Medium verantwortlich, die α -Galactosidase Mel1 katalysiert die Hydrolyse von 4-MuX zu 4-methylumbelliferone, das im Fluorometer bei einer Extinktion von 365 nm und einer Emission von 448 nm detektiert werden kann. Als Wachstumskontrolle der diploiden Hefen wurden zusätzlich Platten mit Doppelselektivmedium mitgeführt und von diesen die optische Dichte bei 600 nm gemessen. Außerdem wurden alle verwendeten Hefemedien zur Vermeidung von Bakterienkontamination mit 0,5 % Penicillin/Streptomycin-Lösung (Invitrogen) versetzt.

3.3.7.2 LUMIER-Assay

Zur Validierung der im Hefe-2-Hybridsystem ermittelten Interaktionen wurde die sog. LUMIER-Methode (LUminescence-based Mammalian IntERactome mapping) in Zusammenarbeit mit Manfred Kögl (DKFZ, Heidelberg) durchgeführt. Abb. 10 stellt neben dem Ablauf des LUMIER-Assays auch die Expressionsvektoren schematisch dar. Diese Methode wurde angelehnt an das Protokoll von Barrios-Rodiles *et. al.* (2005) durchgeführt (11), wobei statt des *Flag-Tags* ein Protein *A-Tag* verwendet wurde. Die zwei potentiellen Interaktionspartner wurden jeweils fusioniert an den C-Terminus des *Staphylococcus aureus* Protein A-Tag oder an die *Renilla reniformis* Luziferase in HEK293 Zellen exprimiert. Hierfür wurden je 20 ng des entsprechenden Konstruktes in 1×10^4 HEK293-Zellen mit 0,05 µl Lipofectamine 2000 (Invitrogen) in 96-well Mikrotiterplatten transfiziert. Nach 40 h wurde das Medium entfernt und die Zellen auf Eis mit 10 µl eiskaltem Lysepuffer [20 mM Tris/HCl (pH 7,5), 250 mM NaCl, 1 % TritonX-100, 10 mM EDTA, 10 mM DTT, Benzonase (Novagen), Protease & Phosphatase Inhibitor Cocktail (Roche); (Stocklösung.: 1 Tablette gelöst in 2 ml H₂O_{bidest.} davon pro 10 ml Puffer 100 µl)], der Schaf-anti-Kaninchen IgG-gekoppelte magnetische Kügelchen (Invitrogen, Dynabeads M280, Endkonzentration: 2 mg/ml) enthielt, lysiert. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurde je 100 µl Waschpuffer (PBS, 1 mM DTT) zugegeben und 10 % des verdünnten Lysates für die spätere Bestimmung der bestehenden

Luziferase-Aktivität vor den Waschschrinen entnommen. Anschließend wurde das übrige Lysat im Tecan Hydroflex *plate washer* 6 x mit Waschpuffer gewaschen und dann die Luziferase-Aktivität sowohl der Lysate als auch der gewaschenen Kügelchen gemessen.

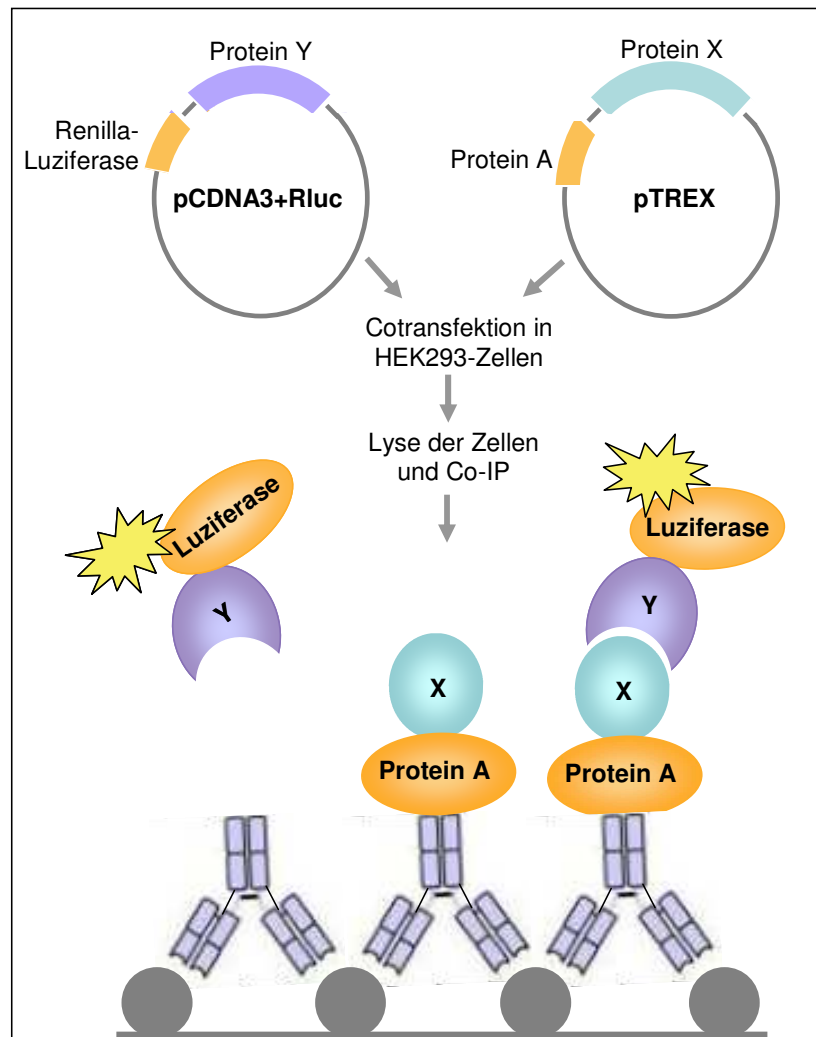


Abb. 10: Prinzip des LUMIER-Assays. Das System basiert auf der kreuzweisen Fusion der zu untersuchenden Proteine (X und Y) an Protein A und an die Renilla-Luziferase. Die entsprechenden LUMIER-Expressionsvektoren werden in HEK293-Zellen kotransfiziert. Nach 40 h werden die Zellen lysiert. Protein A dient der Aufreinigung der Interaktionskomplexe über IgG-gekoppelte Magnet-Kügelchen und die Luziferase-Aktivität der Ermittlung einer Protein-Protein-Interaktion. (Co-IP Co-Immunopräzipitation)

Als Negativkontrolle wurde jedes Luziferase-Hybridprotein auf eine Interaktion mit einem Protein A-Protein A-Hybridprotein untersucht. Für jede Probe ergaben sich insgesamt 4 Werte: die bestehende Luziferase-Aktivität in 10 % des Lysates vor dem Waschen (*input*), das Signal der gewaschenen Kügelchen (*bound*) und die gleichen Werte für die Negativkontrollen (*input nc* and *bound nc*). Die auf die Transfektionseffizienz normalisierten Luziferase-Werte wurden wie folgt berechnet: $\text{Log}(\text{bound})/\text{log}(\text{input})$. Um die Werte auf Hintergrund-Bindungen zu korrigieren, wurden von den normalisierten Werten die Werte der entsprechenden Negativkontrolle abgezogen: $\text{Log}(\text{bound})/\text{log}(\text{input}) - \text{Log}(\text{bound nc})/\text{log}(\text{input nc})$.

(*input* nc). Diese Werte wurden anschließend wie folgt z-transformiert: Mittelwert der Probe/Standardabweichung. Werte mit einem Z-Faktor größer oder gleich 1 wurden als positiv gewertet.

3.3.7.3 **Pulldown-Assay**

Der *Pulldown-Assay* ist eine Methode, die verwendet wird, um Protein-Protein-Interaktionen *in vitro* nachzuweisen. Bei dieser Technik wird ein Fusionsprotein an eine geeignete Matrix gebunden und anschließend mit Zelllysate oder einer definierten Proteinlösung inkubiert. Mittels Western Blot und spezifischen Antikörpern können gebundene Interaktionspartner nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurden GST-*getaggte* Proteine an GSH-Sepharose immobilisiert und potentielle Bindepartner über His₆-Tags im Western Blot analysiert.

Zur Immobilisierung wurden je 1 µg des gereinigten GST-*getaggten* Proteins in 200 µl Reinigungspuffer mit 30 µl GSH-Sepharose für 1 h bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Um auszuschließen, dass eine Interaktion möglicherweise auf dem *Tag* beruht, wurde GST auch ohne das daran fusionierte Protein zur Kontrolle vorgebunden. Anschließend wurde der Ansatz 1 min bei 300 x g abzentrifugiert und 3 x in Reinigungspuffer gewaschen. Dann wurde 1 µg des auf Interaktion zu testenden His₆-*getaggten* Proteins in 200 µl Reinigungspuffer zugegeben und für 1 h bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Nach erneuten 3 Waschschrritten wurden die gebundenen Proteine in 30 µl 2 x SDS-Probenpuffer 5 min bei 95°C eluiert.

3.3.8 Methoden zur Identifikation von Proteinen mit nukleärer Export-Aktivität

3.3.8.1 **Rapamycin-induzierbarer nukleärer Export-Assay**

Zur Untersuchung des nukleären Exports herpesviraler Proteine wurde eine neue *in vivo* Hochdurchsatz-Methode in Anlehnung an Klemm *et al.* (1997) entwickelt (153). Bei dieser Methode werden Proteine, die konstitutiv in den Nukleus importiert werden, im Zytoplasma aufgrund ihrer Export-Aktivität immobilisiert. Diese Immobilisierung basiert auf einer Rapamycin-vermittelten, hochaffinen Interaktion zwischen dem Immunophilin FKBP12 und FRB (FKBP12-Rapamycin Bindedomäne von FRAP1). In diesem Assay werden zwei Fusionsproteine in HeLa-Zellen koexprimiert. Das erste Protein ist eine Fusion aus EYFP, der SV40-NLS, FRB und dem zu untersuchenden HSV-1-Protein. Das andere Fusionsprotein besteht aus dem herpesviralen Glycoprotein M (gM), das am TGN lokalisiert, und 3 Tandemwiederholungen von FKBP12 am C-Terminus. Da die Topologie des gM den C-Terminus zum Zytoplasma orientiert (300), eignet sich die C-terminale Fusion dazu,

FKBP12 zur Dimerisierung ins Zytoplasma zu exponieren. 20 h nach Transfektion der jeweiligen Plasmide (pCMV-EYFP-NLS-FRB-ORF X, pCMV-N-HA-UL10-FKBP) wurden die Zellen 10 min bei 37°C mit 50 µM Anisomycin vorbehandelt, um die Proteinneusynthese im Zytoplasma zu unterdrücken. Anschließend erfolgt eine Inkubation mit 50 µM Anisomycin und 150 ng/ml Rapamycin für 2 h. Entsprechende Kontrollen wurden ohne Rapamycin analog behandelt. Im Falle einer funktionellen nukleären Exportsequenz (NES) sollte das untersuchte Protein nach Rapamycin-Zugabe am TGN akkumuliert und mit Hilfe von direkter Immunofluoreszenz über EYFP detektiert werden können.

3.3.8.2 Interspezies-Heterokaryon-Assay

Der in dieser Arbeit etablierte Rapamycin-vermittelte nukleäre Export-Assay sollte mit Hilfe der sog. Interspezies-Heterokaryon-Analyse validiert werden. Diese *in vivo*-Methode zur Untersuchung der Export-Aktivität eines Proteins wurde erstmals von Pinol-Roma und Dreyfuss (1992) beschrieben (242). Grundlage dieser Methode ist die Verwendung von zwei verschiedenen Zelllinien, deren Zellkerne aufgrund einer unterschiedlichen Chromatinorganisation mittels Dapi-Färbung gut im Fluoreszenzmikroskop unterschieden werden können. So wurden in dieser Arbeit HeLa-Zellen, die das zu untersuchende Fusionsprotein mit Hilfe einer integrierten NLS im Kern akkumulieren, mit Hilfe einer Polyethylenglycol-Behandlung mit NIH3T3-Mauszellen fusioniert. Um die Proteinneusynthese zu verhindern, wurden die Zellen vor der Fusion und während des gesamten Versuchs mit Anisomycin behandelt. Besitzt das konstitutiv importierte Fusionsprotein eine funktionelle NES, ist es in der Lage zwischen Zellkern und Zytoplasma hin- und herzuwandern. Infolgedessen wird es sich nach einer gewissen Zeit in beiden Zellkernen des Heterokaryons anreichern.

Für eine optimale Fusion sind folgende Aspekte von großer Bedeutung. Da die Zellen eine extrazelluläre Matrix sezernieren, welche die Fusionseffizienz drastisch vermindern kann, müssen die Zellen bald nach dem Aussäen fusioniert werden. Zudem muss der Zellrasen mit den beiden Zelltypen vor der Fusion möglichst homogen und zu 80-90 % konfluent sein, um die Zellen in räumliche Nähe zu bringen.

10 h nach Transfektion mit dem gewünschten Plasmid des Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assays (pCMV-EYFP-NLS-FRB-ORF X) wurden die HeLa-Zellen (ca. 3×10^5) mit der äquivalenten Menge an nicht-transfizierten NIH3T3-Mauszellen in 12-wells auf Deckgläsern ausgesät. Nach weiteren 10 h, währenddessen sich beide Zelllinien angeheftet und ausgebreitet hatten, wurden sie 30 min in 50 µM Anisomycin (in DMEM) inkubiert, das die Proteinneusynthese verhindert. Nach einem Waschschrift mit PBS erfolgte die Zellfusion durch Behandlung für 2 min in 50 % Polyethylenglykol 6000 (PEG 6000); (in FCS-freiem DMEM). Da das PEG hochviskos ist, wurden die Zellen danach intensiv mit PBS (ca. 6 x

gewaschen und anschließend in frisches Medium mit 50 μM Anisomycin überführt. Nach 4 h wurden die Zellen fixiert und mittels direkter Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

3.3.9 Indirekte Immunfluoreszenz (IF)

Die zu untersuchenden Hep2- oder HeLa-Zellen wurden in der Regel mit einer Dichte von 1×10^5 Zellen pro 12-well auf Deckgläschen ausgesät und abhängig vom entsprechenden Versuch behandelt (unbehandelt, DNA- oder siRNA-Transfektion). Im ersten Schritt wurden die Zellen mit 2 % Formaldehyd (in PBS) bei Raumtemperatur 15 min fixiert, 3 x kurz in PBS gewaschen, 5 min mit eiskaltem 0,5 % Triton X-100 (in PBS) permeabilisiert und erneut gewaschen. Anschließend erfolgte die Bindung der spezifischen Primärantikörper (in PBS) 20 min bei Raumtemperatur. Nach 3 Waschschritten für 5 min in PBS wurden die Zellen mit dem entsprechenden Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper markiert (20 min bei RT in PBS) und anschließend erneut gewaschen. Um die Intensität der Fluoreszenzfarbstoffe zu erhalten, erfolgten ab hier alle weiteren Schritte unter einem Dunkelhut. Zur Markierung der Zellkerne wurde die zelluläre DNA mit dem Fluorochrom Dapi gefärbt (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 5 min in PBS). Zum Schluss wurden die Deckgläschen 3 x für jeweils 5 min mit PBS und zur Entfernung aller Salze 1 x mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gewaschen und mit 5 μl *Mounting-Medium* (Dianova) mit der zellbeschichteten Seite nach unten auf Objektträger montiert. Die Mikroskopie erfolgte entweder am Fluoreszenzmikroskop (Leica AF6000) oder am Konfokalmikroskop (Leica TCS SP5). Die Bilder wurden mit der jeweiligen, zugehörigen Kamera und *Software* dokumentiert und mit Hilfe von Adobe Photoshop prozessiert.

4 Ergebnisse

4.1 Interaktionen zwischen humanen Transportfaktoren und dem Proteom von HSV-1

4.1.1 Hefe-2-Hybrid (Y2H)-Analysen

Zur Identifizierung viraler Proteine von HSV-1, die über spezifische Signale an Transportfaktoren der humanen Importin α - und β -Familien binden, wurden Hefe-2-Hybrid (Y2H)-Analysen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Gene aller bekannten humanen Transportfaktoren (Tab. 4, mit Ausnahme der tRNA-Exporter XPOT und XPOTP1) mit Hilfe des Gateway®-Systems von Invitrogen in die Hefevektoren pGADT7-DEST (*Prey*) und pGBKT7-DEST (*Bait*) kloniert. Ein Teil der Gene stammte aus einer laboreigenen Kollektion bestehend aus etwa 12.000 humanen cDNA-Klonen (*mammalian gene collection*, MGC), die bereits in pDONR-Vektoren (pDONR223) vorlagen. Alle anderen Klone standen aus verschiedenen Kooperationen zur Verfügung. Diese Klone wurden als Template zur PCR-Amplifizierung genutzt, die kodierenden Sequenzen dabei mit Rekombinationssequenzen versehen und in pDONR-Vektoren (pDONR207) kloniert. Anschließend wurden alle Klone aus den pDONR-Vektoren in beide Y2H-Expressionsvektoren rekombiniert, so dass jeder Transportfaktor als *Bait* (Köderprotein) gegen alle HSV-1-Proteine als *Preys* (Beuteprotein) und jeder Transportfaktor als *Prey* gegen alle HSV-1-Proteine als *Baits* analysiert werden konnte. Die meisten Gene von HSV-1 lagen bereits entweder in voller Länge oder als Genfragmente in beiden Y2H-Vektoren vor (Tab. 14); (93). Virale Membranproteine wurden als Fragmente ohne Transmembrandomäne kloniert, da diese stark hydrophob sind und eventuelle Interaktionen im Y2H-System stören können. In dieser Arbeit wurde die HSV-1-Kollektion durch Klonierung der HSV-1-Gene UL28b, UL46b und UL52 in pDONR207 sowie in beide Y2H-Vektoren erweitert. Die Richtigkeit aller neu generierten Plasmide wurde durch Sequenzierung überprüft. Noch fehlende Klone konnten auch nach mehrmaligen Versuchen nicht kloniert werden.

Für Y2H-Analysen im Hochdurchsatz wurde ein Verfahren im 96-*well*-Maßstab in Flüssigmedium etabliert. Dabei wurden zunächst die haploiden Hefestämme Y187 bzw. AH109 mit den entsprechenden Hefevektoren *Bait* und *Prey* transformiert und anschließend zur Paarung gebracht. Nur wenn es zwischen den potentiellen Interaktionspartnern zu einer Bindung kommt, resultiert daraus eine Expression der Reportergene *HIS3* und *MEL1*. Das *HIS3*-Genprodukt gewährleistet das Wachstum der Zellen in histidinfreiem Medium, während die α -Galactosidase *MEL1* die Umsetzung des Substrates 4-Methylumbelliferyl α -D-

galactopyranoside (4MuX) zu 4-Methylumbelliferone katalysiert, welches bei einer Extinktion von 365 nm und einer Emission von 448 nm im Fluorimeter detektiert werden kann.

Die N-terminalen *Tags* der Transportfaktoren können zu Veränderungen in der Faltung der zudem meist sehr großen Proteine führen. Aus diesem Grund könnte ein Transportfaktor auch die Fähigkeit zur Interaktion mit spezifischen Cargos verlieren. Um zumindest weitreichende Konformationsänderungen der Transportfaktoren ausschließen zu können, wurden diese zunächst in einem Y2H-Vorversuch auf Agarplatten auf Interaktion mit der kleinen GTPase Ran untersucht, da die Wechselwirkung mit Ran ein gemeinsames charakteristisches Merkmal aller Vertreter der Importin β -ähnlichen Transportfaktoren ist. In diesem Versuch konnten für alle Rezeptoren wenn auch unterschiedlich starke Interaktionen mit Ran gezeigt werden. Die meisten Transportfaktoren interagierten nur als *Bait*-Fusionsprotein mit Ran, andere sowohl als *Bait* und als *Prey*. Dies legt den Schluss nahe, dass die N-terminalen *Tags* immerhin keine schwerwiegenden Konformationsänderungen der Transportfaktoren zur Folge haben und erhöht gleichzeitig die Wahrscheinlichkeit, dass, falls vorhanden, auch die natürlicherweise auftretenden Wechselwirkungen mit den herpesviralen Proteinen nicht beeinträchtigt sind.

Um hohe Hintergrundsignale durch falsch-positive Interaktionen zu vermeiden, wurden unterschiedliche Konzentrationen von 3-Aminotriazole (3-AT) eingesetzt, die in Vortests für jedes Protein bestimmt werden mussten. 3-AT unterdrückt als kompetitiver Inhibitor der Histidin-Synthase die Basisaktivierung des *HIS3*-Reportergens. Als Wachstumskontrolle der diploiden Hefen wurden Platten mit doppelt selektivem Medium mitgeführt und von diesen die optische Dichte bei 600 nm gemessen. Da im Y2H-Assay die Reporteraktivität als Antwort einer Transkriptionsaktivierung gemessen wird, kommt es zu Problemen, wenn das zu untersuchende Protein die Transkription direkt aktivieren oder unabhängig von einem Gal4-Fusionspartner an die Gal4 DNA-Bindedomäne bzw. Gal4 Aktivierungsdomäne binden kann. Solche Proteine werden als autoaktiv bezeichnet. Um potentielle autoaktivierende Proteine, die zu falsch-positiven Ergebnissen führen würden, zu vermeiden, wurden mit allen 23 Transportfaktoren und allen herpesviralen Proteinen Vortests mit den entsprechenden Leervektoren durchgeführt. Sowohl die Vortests als auch der Y2H-Assay wurden in beiden Orientierungen durchgeführt, d. h. dass jedes zelluläre *Bait*-Protein gegen alle viralen *Prey*-Proteine und jedes zelluläre *Prey*-Protein gegen alle viralen *Bait*-Proteine auf Interaktion untersucht wurde. Wie sich herausstellte, konnten die 7 Transportfaktoren KPNA1-KPNA6 und IPO13 im Y2H System nur als *Prey* eingesetzt werden, da ihre autoaktivierende Eigenschaft als *Baits* auch mit 10 mM 3-AT nicht unterdrückt werden konnte (Abb. 11). IPO4 hingegen zeigte nur eine leichte Hintergrundaktivierung, die schon durch 2,5 mM des Inhibitors stark vermindert werden konnte. Die Y2H-Analyse für IPO4 wurde schließlich einheitlich in Reporterselektionsmedium mit 2,5 mM 3-AT durchgeführt. Dagegen konnten

alle *Prey*-Transportfaktoren im Assay eingesetzt werden. Alle zeigten ähnlich niedrige Fluoreszenzwerte wie die Negativkontrolle (*Prey*-Leervektor); (Abb. 11B). Bei den viralen Proteinen kam es nur bei sehr wenigen zur Autoaktivierung der Reportergene.

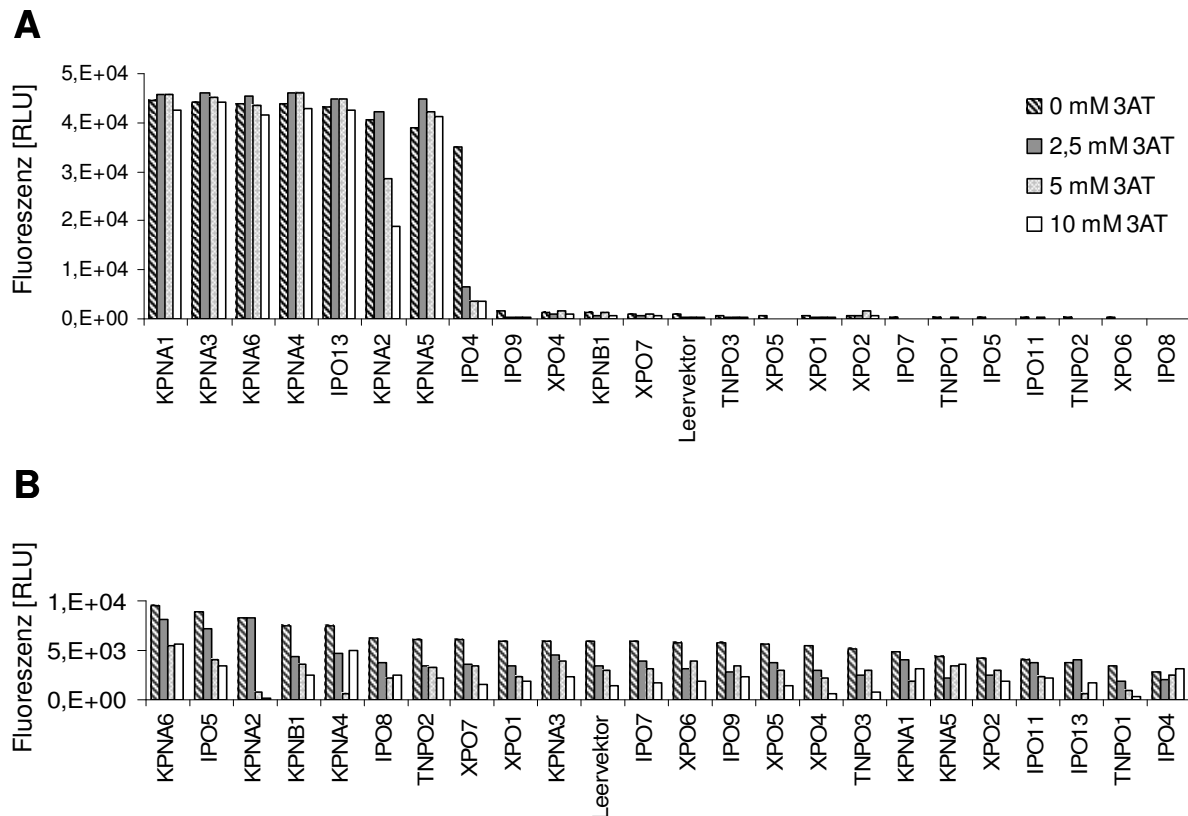


Abb. 11: Vortests zur Ermittlung autoaktiver Transportfaktoren. Dabei wurde mittels Y2H-Analyse **A)** der *Prey*-Leervektor gegen alle 23 *Bait*-Transportfaktoren und **B)** der *Bait*-Leervektor gegen alle 23 *Prey*-Transportfaktoren bei unterschiedlichen 3-AT-Konzentrationen getestet. Als Negativkontrolle diente die Kombination beider Leervektoren (*Bait* und *Prey*). Hohe Fluoreszenzwerte (RLU, *relative light units*) lassen auf Reporteraktivität schließen und wurden als Autoaktivität der entsprechenden Proteine gewertet. KPNA1-6 und IPO13 konnten somit nicht als *Baits* im Y2H-Assay eingesetzt werden.

Die Tests auf Bindung der HSV-1-Fusionsproteine mit den Transportfaktor-Fusionsproteinen wurden analog zu den Vortests durchgeführt. Um Autoaktive in jedem Fall ausschließen zu können, wurden in jedem Durchgang alle Proteine gegen die entsprechenden, von den Leervektoren exprimierten Proteine (Gal4-Aktivierungs- bzw. DNA-Bindedomäne) erneut getestet. Das ribosomale Protein RpS7 und der Translations-Initiations-Faktor EIF5A (*Eukaryotic translation initiation factor 5A-1*) sind als Substrate einiger Transportfaktoren bekannt und dienten in dieser Arbeit als Positivkontrollen. Beide Klone stammten aus der laboreigenen MGC. Im Y2H-Assay ging RpS7 als *Prey* eine starke Bindung mit den *Bait*-Proteinen IPO5, IPO7, KPNB1 und TNPO1 ein. Dagegen interagierte EIF5A mit dem Export-Faktor XPO4 in beiden Richtungen.

Zur Veranschaulichung sind in Abb. 12 die Ergebnisse des Y2H-Assays für KPNB5 (*Prey*) gegen die HSV-1 Genbank (*Bait*) graphisch dargestellt. In den beiden linken Graphen von

Abb. 12A und B sind die mittels Y2H ermittelten Fluoreszenzintensitäten (RLU *relative light unit*) aller 91 HSV-1-Proteine bzw. Proteinfragmente dargestellt, die entweder auf Interaktion mit der Gal4-Aktivierungsdomäne des Leervektors (Abb. 12A) oder mit dem Transportfaktor KPNA5 (Abb. 12B) untersucht wurden.

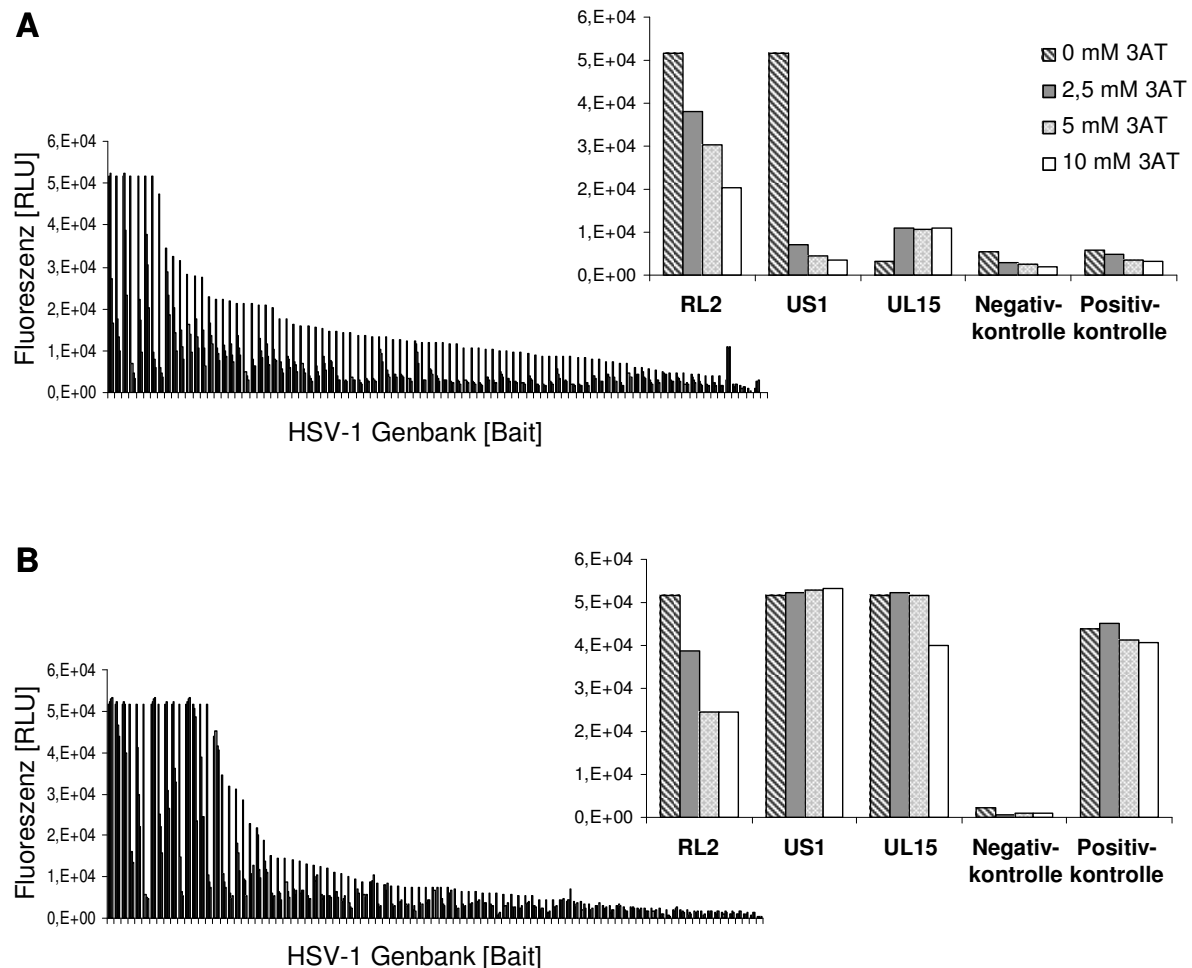


Abb. 12: Exemplarische Darstellung eines Y2H-Datensatzes. Als Beispiel ist die Analyse von KPNA5 (*Prey*) gegen die HSV-1 Genbank (*Bait*) dargestellt. Links sind die jeweiligen Fluoreszenzwerte (RLU, *relative light units*) aller 91 HSV-1-Proteine (*Bait*) dargestellt, die entweder **A**) auf Interaktion mit der Gal4-Aktivierungsdomäne des Leervektors (*Prey*) oder **B**) mit dem Transportfaktor KPNA5 (*Prey*) untersucht wurden. Die rechten Graphen in **A**) und **B**) zeigen einige ausgewählte Beispiele der jeweiligen linken Datensätze. Der *Bait*-Leervektor dient als Negativkontrolle, die Interaktion zwischen RpS7 (*Prey*) und KPNB1 (*Bait*) als Positivkontrolle. Hohe Fluoreszenzwerte verglichen mit der Positivkontrolle lassen bei Ausschluss einer Autoaktivierung auf eine Interaktion der beiden beteiligten Proteine schließen. In diesem Beispiel wurde KPNA5 als Interaktionspartner der viralen Proteine US1 und UL15 identifiziert.

Von allen Rohdaten wurde zunächst der Null-Wert (Medium ohne Zellen) subtrahiert und die daraus resultierenden Daten entsprechend dem höchsten Fluoreszenzwert bei 0 mM 3-AT sortiert, um einen Überblick über die Datenfülle zu erhalten. Die Sortierung hätte jedoch ebenso nach anderen Kriterien erfolgen können. Da es in dem Kontinuum der Messwerte nicht einfach war, den Schwellenwert für eine positive Bindung zu definieren, wurde jede Interaktion, für sich betrachtet, allen Kontrollen gegenübergestellt. Alle folglich als positiv

gewerteten Interaktionen wurden in kleinem Maßstab zusätzlich auf entsprechenden Agarplatten auf ihre Wachstumsfähigkeit überprüft (Daten nicht dargestellt). In Abb. 12A und B sind rechts einige Interaktionen exemplarisch herausgegriffen und vergrößert dargestellt. Das virale Protein RL2 ist ein Beispiel für ein autoaktives Protein, da es in der Kontrolle mit dem Leervektor (*Prey*) gleich hohe Fluoreszenzwerte wie mit KPNA5 aufweist. RL2 war als *Bait* im *Screen* somit nicht einsetzbar. Dagegen konnte das virale UL15 durch Abgleich mit der Negativ- und Positivkontrolle als Interaktionspartner von KPNA5 bestimmt werden. Auch bei US1 handelt es sich wahrscheinlich um einen Bindepartner von KPNA5. Dem hohen Fluoreszenzwert bei 0 mM 3-AT gegen den *Prey*-Leervektor könnte eine starke Basisaktivierung des Reportergens durch das US1-Protein zugrunde liegen. Während der Wert in der Kontrolle schon bei 2,5 mM 3-AT drastisch abfällt, bleibt er in Gegenwart von KPNA5 bis 10 mM 3-AT stabil, was auf eine spezifische Interaktion hinweisen könnte. Auf dieselbe Weise wurde auch mit allen weiteren Y2H-Daten verfahren. Die gesamte Auswertung ist in Tab. 19 zusammengefasst.

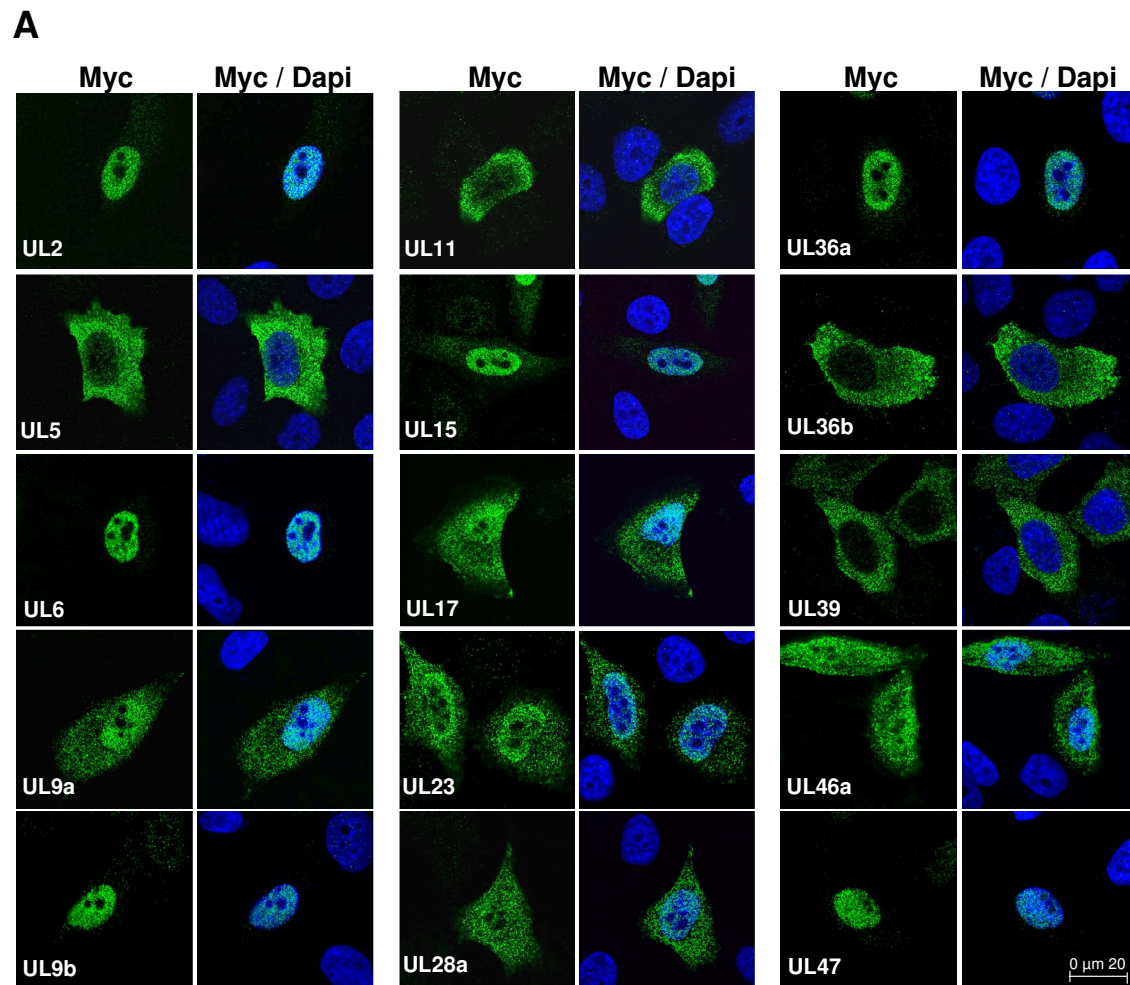
Tab. 19: Im Y2H-Screen detektierte Interaktionen zwischen humanen Transportfaktoren und HSV-1-Proteinen.

Transportfaktoren	HSV-1-Proteine
<i>Prey</i>	<i>Bait</i>
KPNA2	UL16, UL31, UL34ΔTM, UL38, UL56, US1
KPNA3	UL7, UL56
KPNA4	UL15, UL16, UL31, UL34ΔTM, UL38, UL56, US1
KPNA5	UL15, UL16, UL31, UL34ΔTM, UL38, UL56, US1
<i>Bait</i>	<i>Prey</i>
TNPO3	UL49
XPO6	UL49

Es konnten insgesamt 24 Interaktionen zwischen humanen Transportfaktoren und HSV-1-Proteinen identifiziert werden, an denen lediglich 6 verschiedene Transportfaktoren und 9 verschiedene virale Proteine beteiligt waren. Mit Ausnahme von UL49 wurden alle viralen Proteine von Transportfaktoren der α -Importin-Familie gebunden, die ihre Substrate über klassische nukleäre Lokalisationssignale (cNLS) erkennen. Mit Ausnahme von XPO6 wurden keine Interaktionspartner für Exportfaktoren gefunden.

4.1.2 Die subzelluläre Lokalisation herpesviraler Proteine

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die mittels Y2H ermittelten viralen Interaktoren auch *in vivo* eine nukleäre Import-Aktivität aufweisen. Dafür sollten die HSV-1-Proteine mit *Tags* versehen in Zellen exprimiert und anschließend mittels indirekter Immunfluoreszenz deren subzelluläre Lokalisation bestimmt werden. Aufgrund einer im Verlauf dieser Doktorarbeit erschienenen Veröffentlichung von Salsman *et al.* (2008), in der die subzelluläre Lokalisation von 50 C-terminal Flag-*getaggten* HSV-1-Proteinen in transformierten 293T-Zellen gezeigt wurde (Tab. 3); (272), erübrigte sich dieser Versuch größtenteils. Da in dieser Arbeit jedoch zusätzlich noch ein Mengendiagramm zum Vergleich der identifizierten viralen Interaktoren mit allen nukleär lokalisierenden HSV-1-Proteinen dargestellt werden sollte, wurden noch fehlende Daten zu dieser Veröffentlichung mittels indirekter Immunofluoreszenz-Untersuchungen N-terminal myc-*getaggtter* HSV-1-Proteine in Hep2-Zellen ergänzt. Dazu wurden alle entsprechenden, in der laboreigenen HSV-1-Bank verfügbaren Gene mit Hilfe des *Gateway*-Systems in den eukaryotischen Expressionsvektor pCR3-N-c-myc kloniert und die exprimierten Proteine 20 h nach Transfektion in Hep2-Zellen hinsichtlich ihrer Lokalisierung analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 13 zusammengefasst.



B

Pan-zellulär	Pan-zytoplasmatisch	Pan-nukleär	Nicht detektierbar
UL9a, UL17, UL23, UL28a, UL46a	UL5, UL11, UL36b, UL39	UL2, UL6, UL9b, UL15, UL36a, UL47	UL41, UL46b, UL55

Abb. 13: Subzelluläre Lokalisation ausgewählter HSV-1-Proteine. A) Die subzelluläre Lokalisation N-terminal myc-*getaggt*er HSV-1-Proteine (UL2, UL5, UL6, UL9a, UL9b, UL11, UL15, UL17, UL23, UL28a, UL36a, UL36b, UL39, UL46a, UL47) wurde 20 h nach Transfektion von Hep2-Zellen mit Hilfe von Kaninchen-anti-myc-Primärantikörpern und Alexa488-gekoppelten-anti-Kaninchen-Sekundärantikörpern konfokalmikroskopisch analysiert. Die Zellkerne wurden mittels Dapi-Färbung visualisiert. **B)** Die Unterteilung der mittels indirekter Immunofluoreszenz analysierten HSV-1-Proteine unter A) erfolgte aufgrund ihrer subzellulären Lokalisation (pan-zellulär, pan-zytoplasmatisch, sub-zytoplasmatisch, pan-nukleär).

Mit Ausnahme von UL41, UL46b und UL55, die nicht detektierbar waren, konnte die subzelluläre Lokalisation für alle übrigen untersuchten Proteine bestimmt werden. Angepasst an die Daten von Salsman *et al.* (2008) wurden Proteine mit pan-zellulärer, pan-zytoplasmatischer und pan-nukleärer Lokalisation unterschieden (Abb. 13B); (272). UL9a, UL17, UL23, UL28a und UL46a zeigten eine pan-zelluläre Lokalisation, da sie in der gesamten Zelle, also sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern detektiert werden konnten. UL5, UL11, UL36b und UL39 waren dagegen nur im Zytoplasma zu finden und wurden somit

als pan-zytoplasmatisch eingeordnet. 6 der insgesamt 18 untersuchten Proteine wiesen eine pan-nukleäre Lokalisation auf. Dabei handelte es sich um die Proteine UL2, UL6, UL9b, UL15, UL36a und UL47. Da es sich bei einigen der untersuchten Proteine um Proteinfragmente handelte (UL9a, UL9b, UL28a, UL36a, UL36b und UL46b), kann sich deren hier gezeigte Lokalisation von der des Voll-Länge-Proteins unterscheiden. So kann ein Proteinfragment, infolge dessen verringerter Größe, unabhängig von einer funktionalen NLS, durch passive Diffusion in den Zellkern gelangen und dort aufgrund von Interaktionen mit nukleär residenten Proteinen zurückgehalten bzw. akkumuliert werden. Dies könnte für die etwa 37 kDa großen Proteine UL46a und UL28a zutreffen, da die generelle Ausschlussgrenze für die passive Diffusion von Proteinen durch die Kernporen erst über einem Molekulargewicht von 40 kDa liegt (105). Das Molekulargewicht der anderen Proteinfragmente liegt über diesem Wert. Es kann auch noch weitere Gründe für die unterschiedliche Lokalisation zwischen Proteinfragmenten und deren entsprechenden Voll-Länge-Proteine geben. Im Falle der Fragmentierung eines NLS-tragenden Proteins wird sich das NLS nur in einem der Protein-Abschnitte befinden und dessen nukleären Import veranlassen. Dagegen werden die Fragmente ohne NLS im Zytoplasma verbleiben. Somit kann man aufgrund der pan-nukleären Lokalisation von UL36a mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgehen, dass das Voll-Länge-Protein UL36, trotz der pan-zytoplasmatischen Lokalisation von UL36b, im Zellkern lokalisiert.

4.1.3 Vergleichende Analyse der identifizierten HSV-1-Interaktoren

Um die biologische Relevanz der mittels Y2H ermittelten Interaktionen weiter zu untersuchen, wurde mit Hilfe eines Venn-Diagramms eine vergleichende Analyse angestellt (Abb. 14). Dabei wurden die im Y2H-Assay gefundenen Interaktionen zwischen HSV-1-Proteinen und humanen α -Importinen mit Literaturdaten zur nukleären Lokalisation und bioinformatischen Daten zur NLS-Vorhersage verglichen. Daten zur nukleären Lokalisation von HSV-1-Proteinen stammen einerseits aus der Veröffentlichung von Salsman *et al.* (2008); (Tab. 3); (272) und andererseits aus Immunfluoreszenz-Untersuchungen dieser Arbeit (Abb. 13). Klassische nukleäre Lokalisationssignale (cNLS) wurden mit Hilfe bioinformatischer Methoden [[http://cubic.bioc.columbia.edu/predictNLS/\(NLS\)](http://cubic.bioc.columbia.edu/predictNLS/(NLS)); <http://www.expasy.org/cgi-bin/nicedoc.pl?PDOC00015> (*bipartite* NLS)] von Dr. C. Friedel der LMU München vorhergesagt. Hierbei konnten für insgesamt elf Proteine des HSV-1-Orfeoms cNLS prognostiziert werden, die mit Ausnahme von RL1 in Abb. 14 dargestellt sind. Herpesvirale Proteine, die in dieser Arbeit trotz mehrfacher Klonierungsversuche der entsprechenden Gene nicht zur Verfügung standen und demzufolge nicht im Y2H-Assay analysiert werden

konnten, wurden trotz vorhergesagter NLS (RL1) oder nukleärer Lokalisation (RL1, UL8.5, UL20.5, UL27.5 und US1.5) nicht in die vergleichende Analyse einbezogen.

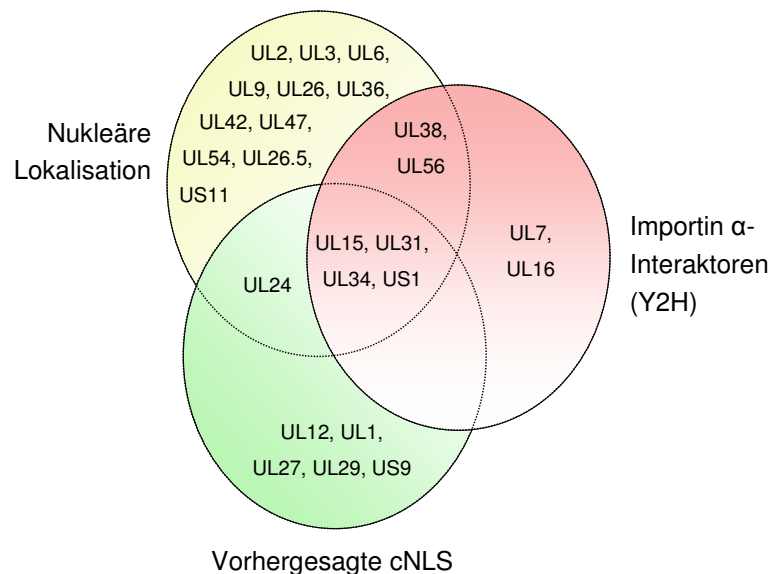


Abb. 14: Vergleichende Analyse der mit Importin α -interagierenden HSV-1-Proteine. Dargestellt ist ein Vergleich der im Y2H-Assay ermittelten Interaktionen zwischen HSV-1-Proteinen und humanen α -Importinen (rot) mit Literaturdaten zur nukleären Lokalisation (gelb) und bioinformatischen Daten zu NLS-Vorhersagen (grün) aller HSV-1-Proteine mit Ausnahme von RL1, UL8.5, UL20.5, UL27.5 und US1.5 (siehe Text). Daten zur nukleären Lokalisation stammen von Salsman *et al.* (2008); (272) und indirekten Immunofluoreszenz-Untersuchungen dieser Arbeit (Abb. 13). cNLS in HSV-1-Proteinen wurden mittels bioinformatischer Methoden vorhergesagt (Dr. C. Friedel; LMU München).

Aus dem Venn-Diagramm wird deutlich, dass der Deckungsgrad zwischen der NLS-Vorhersage und dem experimentellen Befund relativ gering ist. Lediglich vier der insgesamt zehn vorhergesagten NLS-tragenden Proteine konnten im Y2H-Assay identifiziert werden. Ähnliches gilt auch für die nukleär lokalisierten HSV-1-Proteine und die mittels Y2H ermittelten Daten. Nur sechs von 18 nukleären Proteinen interagierten mit humanen Transportfaktoren im Y2H. Dagegen besitzen die hier identifizierten, viralen Importin α -Interaktoren UL15, UL31, UL34 und US1 sowohl eine vorhergesagte cNLS als auch eine nukleäre Lokalisation in Abwesenheit anderer herpesviraler Proteine. Da Proteine mit cNLS in der Regel von Transportfaktoren der Importin α -Familie in den Zellkern transportiert werden, erhöhen diese eng im Zusammenhang stehenden Eigenschaften die Wahrscheinlichkeit echter funktionaler Interaktionen. Die beiden im Y2H-Assay identifizierten Interaktoren UL38 und UL56 besitzen zwar eine nukleäre Lokalisation, jedoch keine vorhergesagte cNLS. Lediglich die Proteine UL7 und UL16 besitzen weder eine vorhergesagte NLS noch eine nukleäre Lokalisation.

4.1.4 Validierung der Y2H-Interaktionen mittels LUMIER-Assay

Die Verifizierung der im Y2H identifizierten Interaktionen erfolgte mit Hilfe des LUMIER-Assays (*LUminescence-based Mammalian IntERactome mapping*) in Zusammenarbeit mit Manfred Kögl (DKFZ, Heidelberg). Dieses alternative System zur Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen basiert auf der kreuzweisen Fusion der potentiellen Interaktionspartner an Protein A bzw. an die Renilla-Luziferase und der darauffolgenden Koexpression der beider Hybridproteine in HEK293-Zellen. Kommt es zu einer Interaktion der beiden Hybridproteine, kann der gebildete Proteinkomplex durch die stabile Bindung des Protein A-Hybridproteins an IgG-gekoppelte Magnet-Kügelchen aus dem Zelllysat aufgereinigt und die Interaktion über die Luziferase-Aktivität des gebundenen Luziferase-Hybridproteins ermittelt werden.

Die entsprechenden Gene wurden mit Hilfe des Gateway®-Systems in die beiden LUMIER-Expressionsvektoren (pTREX, pcDNA3+Rluc) kloniert. Ausgehend von diesen Plasmiden konnten die zwei potentiellen Interaktionspartner, jeweils fusioniert an den C-Terminus des *Staphylococcus aureus* Protein A oder an die *Renilla reniformis* Luziferase, in Säugerzellen koexprimiert werden. Entsprechend der Y2H-Methode wurden alle zu untersuchenden Proteine auch im LUMIER-Assay in beide Richtungen getestet. Zwei Tage nach Cotransfektion wurden HEK293-Zellen lysiert, das an Protein A fusionierte Protein an IgG-gekoppelte magnetische Kügelchen gebunden und über mehrere Waschschrte gereinigt. Kam es zwischen den beiden Fusionsproteinen zu einer Interaktion, konnte die Aktivität der im Komplex gebundenen Luziferase anschließend gemessen werden. Um die Luziferase-Aktivität auf die Transfektionseffizienz zu normalisieren, wurde die Luziferase-Aktivität in 10 % verdünntem Lysat gemessen. Als Negativkontrolle wurde jedes Luziferase-Hybridprotein auf eine unspezifische Interaktion mit einem Protein A-Protein A-Hybridprotein untersucht. Zur Normalisierung der Transfektionseffizienz wurden alle gemessenen Luziferase-Werte logarithmisch transformiert und die Luziferase-Aktivität der gereinigten Proteinkomplexe durch das Signal des Lysates geteilt. Die Korrektur auf eine unspezifische Hintergrundbindung erfolgte durch Subtraktion der normalisierten Werte von den entsprechenden Werten der Negativkontrolle. Zuletzt wurden die Werte z-transformiert, d. h. der Mittelwert der Probe wurde durch die jeweilige Standardabweichung geteilt. Als Positivkontrolle diente die bekannte Interaktion zwischen den beiden Proteinen Jun und Fos, die zusammen den Transkriptionsfaktor AP-1 bilden. Als positiv wurden solche Interaktionen gewertet, die einen Z-Faktor ≥ 1 aufwiesen. Abb. 15 zeigt das Ergebnis der ausgewerteten Daten des LUMIER-Assays der bereits mittels Y2H identifizierten Interaktionen zwischen humanen Transportfaktoren und HSV-1-Proteinen.

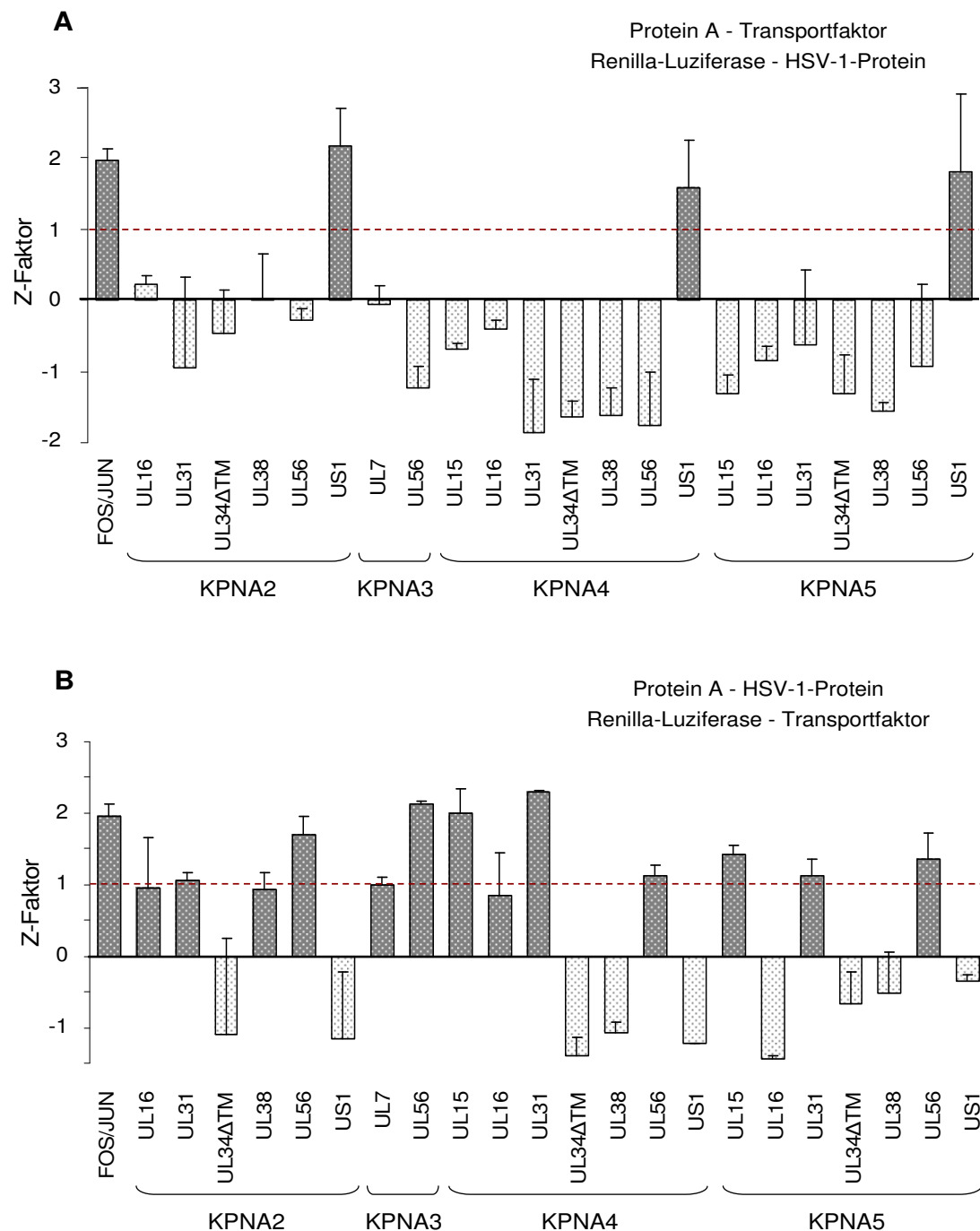


Abb. 15: Validierung identifizierter Y2H-Interaktionen mittels LUMIER-Assay. Die Interaktionsstudie mittels LUMIER-Assay erfolgte zwischen humanen Transportfaktoren der Importin α -Familie (KPNA2, KPNA3, KPNA4, KPNA5) und HSV-1-Proteinen (UL7, UL15, UL16, UL31, UL34 Δ TM, UL38, UL56 und US1). Alle gemessenen Luziferase Daten wurden logarithmisch transformiert. Zur Normalisierung der Daten auf die Transfektionseffizienz wurde die gemessene Luziferase Aktivität des gereinigten Proteinkomplexes durch das Signal des Lysates geteilt. Die Korrektur auf unspezifische Hintergrundbindung erfolgte durch die anschließende Subtraktion der Werte der Negativkontrolle. Zuletzt wurden die Werte z-transformiert, d. h. dass der Mittelwert der Probe durch die jeweilige Standardabweichung geteilt wurde. Als positiv wurden solche Interaktionen gewertet, die einen Z-Faktor ≥ 1 aufwiesen (rot gestrichelte Linie). Eine detailliertere Beschreibung zur Datenauswertung ist Abschnitt 3.3.7.2 zu entnehmen. Insgesamt wurden von 2 Z-Faktoren der Mittelwert und die jeweilige Standardabweichung bestimmt. **A)** Die humanen Transportfaktoren KPNA2, 4 und 5 gekoppelt an Protein A bestätigen jeweils die Interaktionen mit dem an die Renilla-Luziferase-gekoppelten US1 (dunkelgraue Balken). **B)** Die validierten Interaktionen zwischen den an die Renilla-Luziferase gekoppelten Transportfaktoren und den an Protein A gekoppelten HSV-1-Proteinen sind dunkelgrau dargestellt. Die Interaktion zwischen Fos und Jun diente als Positivkontrolle.

Die Protein-Protein-Interaktionen zwischen den humanen Transportfaktoren und den HSV-1-Proteinen konnten mit der Kopplung der Transportfaktoren an die Renilla-Luziferase deutlich besser validiert werden (Abb. 15B) als mit der Kopplung an das Protein *A-Tag* (Abb. 15A). Von den 22 getesteten Interaktionen zeigten 18 ein positives Ergebnis, was eine Bestätigungsrate von 82 % ergibt. So konnten mit Ausnahme von KPNA2/UL34 Δ TM, KPNA4/UL34 Δ TM, KPNA4/UL38, KPNA5/UL16, KPNA5/UL34 Δ TM und KPNA5/UL38 alle in Tab. 19 aufgelisteten Interaktionen zwischen humanen Transportfaktoren der Importin α -Familie und HSV-1-Proteinen validiert werden. Alle positiv bewerteten Interaktionen sind in Abb. 15 als dunkelgraue Balken dargestellt, alle negativen als hellgraue Balken. Da die Messwerte von KPNA2/UL16, KPNA2/UL38 und KPNA4/UL16 nur geringfügig unter dem Schwellenwert (Z-Faktor ≥ 1) lagen, wurden sie als positiv bewertet (Abb. 15B). Außerdem zeigten alle negativ bewerteten Ergebnisse im Vergleich zu den Positiven deutlich niedrigere Werte. Diese wiesen meist sogar einen negativen Z-Faktor auf. Genau wie beim Y2H-Assay konnte keine der ermittelten Interaktionen in beide Richtungen bestätigt werden.

4.2 Die Bedeutung von Cse1L für die HSV-1-Replikation

Die Tatsache, dass herpesvirale Proteine im Y2H-Assay fast ausschließlich mit Transportfaktoren der Importin α -Familie interagierten, ließ vermuten, dass das klassische Transportsystem eine entscheidende Rolle im Replikationszyklus von HSV-1 spielt. Einige virale Proteine wurden sogar von mehreren Importinen der α -Familie erkannt, was eine funktionelle Analyse einzelner α -Importine aufgrund dieser Redundanz erschwerte. Da Cse1L u. a. als Importin α -Exporter fungiert und damit der Rückführung aller α -Importine ins Zytoplasma dient, sollte mittels RNA-Interferenz (RNAi) von Cse1L versucht werden, diese Limitierung zu umgehen. Voraussetzung für diesen Versuch war jedoch, dass die Anwesenheit von Cse1L das Wachstum der Zellen nicht wesentlich behindert. Wie bereits demonstriert werden konnte, hat die RNAi von Cse1L keine Auswirkung auf das Teilungsvermögen von humanen Kolonkarzinom-Zellen (146).

Die Suppression von Cse1L zum Zeitpunkt der Infektion wurde mittels Western Blot kontrolliert. Dabei konnte 48 h nach entsprechender siRNA-Transfektion eine deutliche Cse1L-Abnahme in HeLa-Zellen gezeigt werden (Abb. 16A). Als Kontrolle diente eine siRNA, die keine komplementäre Zielsequenz im HeLa-Genom besitzt und demnach keinen Effekt haben sollte (Kontroll-siRNA). Wie erwartet konnte Cse1L in Kontroll-siRNA transfizierten Zellen nachgewiesen werden. Als Ladekontrolle wurde das in der Zelle stetig synthetisierte β -Aktin dekoriert.

Um die verminderte Virusreplikation nur auf die Abwesenheit von Cse1L zurückführen zu können, muss eine Beeinträchtigung der Zellviabilität aufgrund der Cse1L-Suppression ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund wurden zum Zeitpunkt der HSV-1-Infektion die

Lebendzellzahlen der Cse1L- bzw. Kontroll-siRNA transfizierten Zellen bestimmt. Dies erfolgte durch Auszählen ungefärbter HeLa-Zellen in 4 % Trypanblau-Lösung, da die Zellmembran vitaler Zellen im Gegensatz zu toten Zellen für den Farbstoff undurchlässig ist. Bei diesem Vitalitätstest konnte eine minimale Reduktion der Zellzahl bei Cse1L-siRNA transfizierten Zellen im Vergleich zu den Kontroll-Zellen ermittelt werden (Abb. 16B).

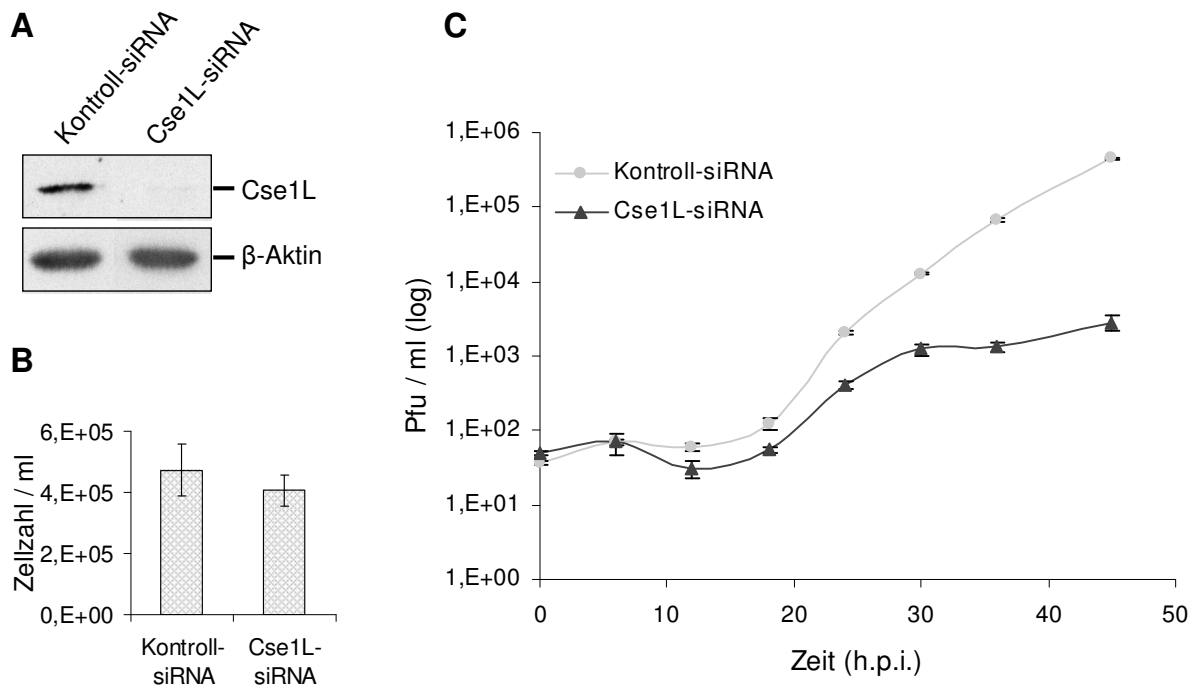


Abb. 16: Die HSV-1-Replikation in Cse1L-siRNA transfizierten Zellen. A) 48 h nach siRNA Transfektion wurde die Menge an Cse1L im Vergleich zu β -Aktin in Cse1L-siRNA und Kontroll-siRNA transfizierten HeLa-Zellen mittels Western Blot analysiert. Die Detektion von Cse1L erfolgte mit primären Maus-anti-Cse1L- und sekundären Ziege-anti-Maus-POD-Antikörpern. Als Ladekontrolle wurde die untere Blothälfte mit Maus-anti- β -Aktin- und sekundären Ziege-anti-Maus-POD-Antikörpern dekoriert. **B)** Lebendzellzahlbestimmung von Cse1L- bzw. Kontroll-siRNA transfizierten Zellen 48 h nach entsprechender siRNA-Transfektion. In 4% Trypanblau-Lösung ungefärbte HeLa-Zellen wurden in einer Neubauer-Zählkammer in Triplikaten ausgezählt. **C)** Der HSV-1-Titer (Pfu *plaque forming units*) von Überständen Cse1L-siRNA und Kontroll-siRNA transfizierter HeLa-Zellen wurden in Triplikaten zu definierten Zeitpunkten (h.p.i. *hours post infection*) mittels *Plaque-Assay* auf Vero-Zellen bestimmt. Die HSV-1-Infektion erfolgte 48 h nach siRNA Transfektion mit einer MOI von 0,1. Die jeweiligen Virustiter sind logarithmisch aufgetragen.

Um die Auswirkung der Cse1L-Suppression auf die Virusreplikation zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen mit Cse1L- bzw. Kontroll-siRNA transfiziert und 48 h später mit HSV-1 (MOI von 0,1) infiziert. Zu definierten Zeitpunkten wurden dann Kulturüberstände entnommen und der Virustiter mittels *Plaque-Assay* auf Vero-Zellen bestimmt. Die Graphik in Abb. 16C zeigt, dass die HSV-1-Replikation in Cse1L-siRNA transfizierten Zellen im Vergleich zu Kontroll-siRNA transfizierten Zellen deutlich herabgesetzt ist. Nach 45 h ist der Virustiter im Überstand der Cse1L-siRNA transfizierten Zellen um mehr als 2 Zehnerpotenzen reduziert. Dieser Versuch zeigt, dass der Importin α -Exporter Cse1L eine wesentliche Rolle während der HSV-1-Replikation spielt. Dies lässt den Schluss zu, dass die klassischen

Transportfaktoren einen wichtigen Beitrag zum nukleären Import herpesviraler Proteine leisten.

4.3 Die Identifizierung nukleärer Lokalisationssignale

Sowohl der Y2H- als auch der LUMIER-Assay geben zwar Auskunft über die potentielle Interaktion von zwei Proteinen, jedoch keine Information darüber, ob diese Interaktion auch tatsächlich *in vivo* stattfindet. Aus diesem Grund sollten in den folgenden Schritten einige Cargo-Transportfaktor-Paare detaillierter untersucht werden. Aufgrund der Tatsache, dass für die beiden im Y2H-Assay identifizierten viralen Proteine UL31 und UL34 bereits nukleäre Lokalisationen bestimmt und bioinformatisch klassische Transportsequenzen prognostiziert worden waren (Abb. 14), wurden sie für weitere Analysen herangezogen. Ferner bilden diese beiden Proteine den für die nukleäre Capsid-Auswanderung essentiellen Kern-Export-Komplex, der derzeit im Fokus des allgemeinen Interesses steht. Zudem könnte das membranverankerte virale Protein UL34 dazu dienen, mehr über den noch wenig verstandenen Transportmechanismus von Membranproteinen zur INM zu erfahren. Bevor jedoch eine vorhergesagte NLS als biologisch funktionell angesehen werden kann, muss sie einige Kriterien erfüllen. Erstens muss sie für den nukleären Import essentiell sein. Das heißt, dass die Mutation einer oder mehrerer Aminosäuren der Consensus-Sequenz die nukleäre Lokalisierung des Proteins verhindern sollte. Zweitens sollte der Transfer dieser Sequenz auf ein nicht verwandtes, zytoplasmatisches Protein ausreichen, um dieses in den Zellkern zu transportieren. Drittens muss das Protein direkt mit seinem Importrezeptor über die identifizierte Sequenz interagieren. Dafür eignen sich *in vitro* Interaktionsstudien in Ab- und Anwesenheit von RanGTP oder RanGDP (61).

4.3.1 Die vorhergesagte NLS von UL34 interagiert direkt mit Importin α -Transportfaktoren

Das herpesvirale UL34 ist ein Typ II-Membranprotein mit einer 22 Aminosäure langen Transmembrandomäne am C-Terminus (269), das in Abwesenheit anderer Virusproteine am Endoplasmatischen Retikulum und an der Kernmembran lokalisiert und erst nach Cotransfektion mit UL31 vollständig zur INM transferiert wird (257). Der Transportmechanismus von Membranproteinen zur INM ist generell noch wenig verstanden. So könnte UL34 durch Retention mittels UL31 an der INM angereichert werden. Alternativ dazu könnte die vorhergesagte NLS den Transport von UL34 mit Hilfe von klassischen Transportfaktoren erleichtern. Wie bereits gezeigt wurde, konnten die drei α -Importine

KPNA2, 4 und 5 als Interaktoren für das virale UL34 Δ TM, dem die Transmembrandomäne (TM) fehlte (UL34₁₋₂₄₇; Tab. 14), identifiziert werden. Zur weiteren funktionellen Untersuchung wurde die in UL34 vorhergesagte, klassisch *bipartite* NLS zwischen den Aminosäuren 178 und 194 für eine Mutationsstudie herangezogen. Zur Bestätigung der vorhergesagten NLS wurde zunächst ein sog. *Protein-Mapping* durchgeführt. Dabei wurden 3 C-terminale Deletionsmutanten von UL34 konstruiert (UL34₁₋₂₀₃, UL34₁₋₁₈₀ und UL34₁₋₁₆₈); (Abb. 17A). Das in der Laborkollektion vorhandene Plasmid pDONR207-UL34 Δ TM wurde als Template zur PCR-Amplifizierung der Gen-Fragmente genutzt, die dabei mit Rekombinationssequenzen versehen in pDONR207-Vektoren kloniert wurden. Anschließend wurden die drei verkürzten UL34-Klone in den Y2H-Expressionsvektor pGBKT7-DEST rekombiniert. Die humanen Transportfaktoren KPNA2, 4 und 5 lagen bereits im Y2H-Expressionsvektor pGADT7-DEST vor. So konnten die drei UL34-Deletionsmutanten mittels Y2H auf Bindung mit KPNA2, 4 und 5 untersucht werden. Im Gegensatz zu UL34₁₋₂₀₃, das die komplette vorhergesagte NLS umfasst, besitzt UL34₁₋₁₈₀ nur noch einen kleinen Bereich dieser potentiellen Signalsequenz, wohingegen sie bei UL34₁₋₁₆₈ sogar komplett deletiert war (Abb. 17A). Während UL34₁₋₂₀₃ mit den drei α -Importinen weiterhin eine starke Bindung (bis zu einer 3-AT-Konzentration von 10 mM) eingehen konnte, hatten UL34₁₋₁₈₀ und UL34₁₋₁₆₈ diese Eigenschaft vollständig verloren (Abb. 17B). Dies zeigt, dass der N-terminale Bereich der *bipartiten* NLS allein nicht ausreicht, um mit α -Importinen in Wechselwirkung zu treten.

Mittels zielgerichteter Mutagenese wurden 2 (UL34 Δ TM-Mut-1) bzw. 3 Arginin-Reste (UL34 Δ TM-Mut-2) im C-terminalen Bereich der *bipartiten* NLS gegen Asparagin ausgetauscht (Abb. 17C). Die Auswahl, welche Aminosäuren gegen Asparagin ausgetauscht werden sollten, wurde mittels Literaturrecherche getroffen (260). Mit Hilfe einer erneuten Y2H-Analyse der beiden NLS-Mutanten konnte die vorhergesagte NLS als Bindestelle der zellulären Interaktionspartner bestimmt werden (Abb. 17D). Verglichen mit UL34 Δ TM, das die gesamte potentielle NLS beinhaltet und im Y2H-Assay starke Interaktionen mit den Transportfaktoren eingeht (bis 10 mM 3-AT), binden KPNA2 und 5 nur noch mit geringer Affinität an UL34 Δ TM-Mut-1 (0 mM 3-AT). Die Interaktion zwischen KPNA4 und UL34 Δ TM-Mut-1 bzw. zwischen allen drei Transportfaktoren und UL34 Δ TM-Mut-2 sind sogar vollständig verloren gegangen.

Da die mittels Y2H gewonnenen Interaktionen von UL34 mit den α -Importinen unter Verwendung des LUMIER-Assays nicht validiert werden konnten, wurde ein biochemischer *in vitro* *Pulldown-Assay* durchgeführt (Abb. 17E). Zu diesem Zweck wurde UL34 Δ TM mit einem GST-Tag und das α -Importin KPNA5, das β -Importin KPNB1 sowie RanQ69L mit einem His₆-Tag versehen, in *E. coli* heterolog exprimiert und affinitätsgereinigt. Aufgrund der in Ran eingeführten Mutation verbleibt das Protein im GTP-gebundenen Zustand. Nach Verbindung von GST-UL34 Δ TM bzw. GST [Negativkontrolle, bereitgestellt von Thomas

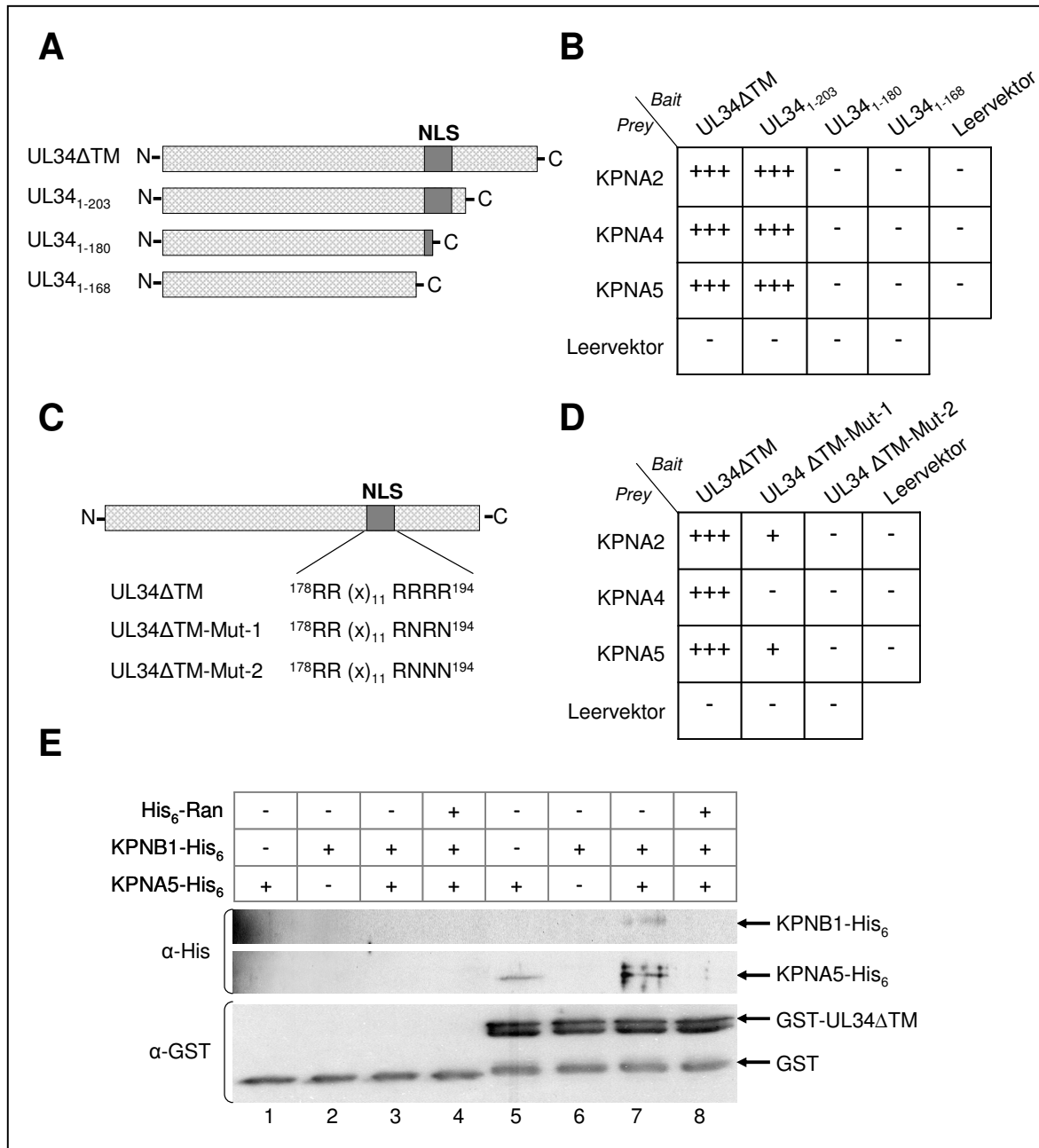


Abb. 17: Funktionelle Interaktionsanalyse zwischen UL34 und den α -Importinen KPNA2, 4 und 5. **A)** Expressionskonstrukte von UL34 ohne Transmembrandomäne (UL34 Δ TM) und C-terminalen UL34-Deletionsmutanten (UL34₁₋₂₀₃, UL34₁₋₁₈₀ und UL34₁₋₁₆₈). **B)** Mapping der Bindestelle zwischen UL34 und den α -Importinen KPNA2, 4 und 5 mittels Y2H. Als Negativkontrollen dienten die entsprechenden Leervektoren. [+++ starke Interaktion (bis 10 mM 3-AT), - keine Interaktion]. **C)** Expressionskonstrukte von UL34 Δ TM mit Wildtyp-NLS bzw. zwei unterschiedlich mutierten NLS (UL34 Δ TM-Mut-1, UL34 Δ TM-Mut-2). Der Austausch von Arginin-Resten in Asparagin-Reste erfolgte mittels zielgerichteter Mutagenese. **D)** Bestimmung der vorhergesagten NLS als Bindestelle der zellulären Transportfaktoren mit Hilfe einer Y2H-Analyse der unter C dargestellten NLS-Mutanten. Als Negativkontrollen dienten die entsprechenden Leervektoren. [+++ starke Interaktion (bis 10 mM 3-AT), + schwache Interaktion (ohne 3-AT), - keine Interaktion]. **E)** Bildung eines funktionalen Import-Komplexes zwischen UL34 Δ TM, KPNA5 und KPNB1. GST-UL34 Δ TM, KPNA5-His₆, KPNB1-His₆ und His₆-Ran wurden heterolog in *E. coli* exprimiert und affinitätsgereinigt. Bereits gereinigtes GST wurde von Thomas Fries (Universität des Saarlandes) bereitgestellt. GST-UL34 Δ TM bzw. GST wurden an GSH-Sepharose vorgebunden und anschließend mit KPNA5-His₆, KPNB1-His₆, KPNA5-His₆/KPNB1-His₆ oder KPNA5-His₆/KPNB1-His₆/His₆-Ran inkubiert. Alle 8 Eluate wurden auf jeweils 2 Western Blots mit Maus-anti-His- bzw. Ziege-anti-GST-Primärantikörpern und entsprechenden Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörpern analysiert.

Fries (Universität des Saarlandes)] an GSH-Sepharose wurden die beiden Ansätze jeweils mit KPNA5-His₆, KPNB1-His₆, KPNA5-His₆/KPNB1-His₆ KPNA5-His₆/KPNB1-His₆/His₆-Ran inkubiert. Um zu überprüfen, ob funktionelle Import-Komplexe gebildet werden, die dissoziierbar sind, wurde die Komplexbildung sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von RanGTP untersucht. Die verschiedenen Eluate wurden anschließend per Western-Blot mit anti-His- bzw. anti-GST-Primärantikörpern und entsprechenden Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper analysiert. Wie in Abb. 17E gezeigt, konnte GST-UL34 Δ TM (55 kDa) mit dem α -Importin KPNA5 (61 kDa) und dem β -Importin KPNB1 (98 kDa) einen funktionalen Komplex bilden (Spur 7), der jedoch in Anwesenheit von RanGTP verhindert wurde (Spur 8). War dagegen nur GST (27 kDa) vorhanden (Negativkontrolle, Spur 1-4), kam es zu keiner Interaktion von KPNA5 und KPNB1. In Spur 5 ist zu erkennen, dass das Adapterprotein KPNA5 auch in Abwesenheit des Transportfaktors KPNB1 in der Lage ist, an sein Substrat zu binden, die Interaktion zwischen KPNA5 und Substrat wurde jedoch in Anwesenheit von KPNB1 aufgrund der kooperativen Bindung deutlich verstärkt. Somit konnte gezeigt werden, dass UL34, KPNA5 und KPNB1 einen trimeren Komplex bilden, der durch RanGTP destabilisiert wird.

4.3.2 Die NLS des UL34 vermittelt den nukleären Import von zytoplasmatisch-lokalisiertem EYFP

Zur weiteren Untersuchung der vorhergesagten NLS von UL34 wurde diese an EYFP (*enhanced yellow fluorescent protein*) fusioniert in Hep2-Zellen exprimiert. 20 h nach Transfektion des entsprechend konstruierten Plasmids (pEYFP-UL34-NLS) wurde die subzelluläre Lokalisation des Fusionsproteins EYFP-UL34-NLS konfokalmikroskopisch untersucht. Als Positivkontrolle diente ein Fusionsprotein aus EYFP und der bekannten SV40-NLS (pEYFP-Nuc), als Negativkontrolle wurde EYFP (pEYFP Δ Nuc) untersucht (Abb. 18). Während EYFP allein erwartungsgemäß eine panzelluläre Lokalisation aufwies, befand sich EYFP-UL34-NLS vergleichbar mit der Positivkontrolle ausschließlich im Nukleus. Da die UL34-NLS in der Lage ist, EYFP vollständig in den Kern zu transportieren, kann eine biologische Relevanz dieser Signalsequenz angenommen werden.

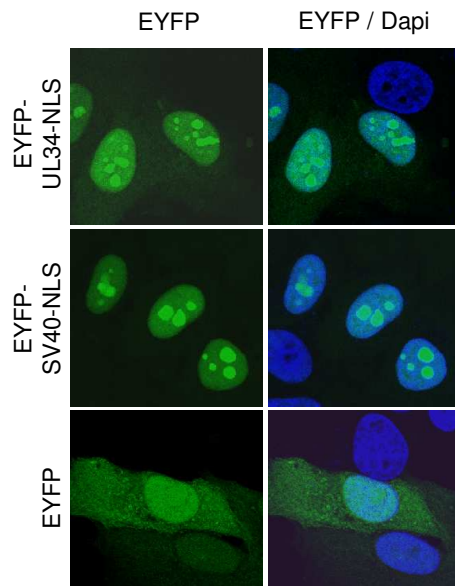


Abb. 18: Transfer der potentiellen UL34-NLS auf EYFP.

20 h nach Transfektion von Hep2-Zellen wurde die subzelluläre Lokalisation von EYFP-UL34-NLS, EYFP-SV40-NLS (Positivkontrolle) und EYFP (Negativkontrolle) im Fluoreszenzmikroskop per Autofluoreszenz von EYFP analysiert. Die Zellkerne wurden mittels Dapi-Färbung visualisiert.

4.3.3 Die nukleäre Lokalisation von UL34 ist unabhängig von dessen vorhergesagter NLS

Um die Relevanz der potentiellen Signalsequenz für den nukleären Import von UL34 zu untersuchen, wurde jeweils eines der C-terminal HA-getaggten Fusionsproteine UL34-Wildtyp (UL34-Wt), UL34 Δ TM oder UL34 Δ TM-Mut-2 in Hep2-Zellen exprimiert (Abb. 19A). 20 h nach Transfektion der entsprechenden Plasmide (pCR3-C-HA-UL34; pCR3-C-HA-UL34 Δ TM oder pCR3-C-HA-UL34 Δ TM-Mut-2) wurde die subzelluläre Lokalisation der Proteine mittels indirekter Immunofluoreszenz konfokalmikroskopisch analysiert. Wie erwartet lokalisierte UL34-Wt im Zytoplasma und an der Kernmembran (Abb. 19B). Allerdings konnte auf der Ebene der Fluoreszenzmikroskopie nicht gezeigt werden, ob sich UL34-Wt an der inneren oder äußeren Kernmembran befindet. Um den nukleären Import von UL34 leichter untersuchen zu können, wurde UL34 ohne dessen Transmembrandomäne (UL34 Δ TM) verwendet. In Abb. 19B ist zu erkennen, dass UL34 in Abwesenheit seiner Transmembrandomäne in den Kern transportiert werden kann. Allerdings konnte in diesem Versuch auch gezeigt werden, dass die identifizierte Signalsequenz nicht allein für die nukleäre Akkumulation von UL34 Δ TM notwendig ist, da die Mutation der vorhergesagten NLS in UL34 Δ TM-Mut-2 keinen Effekt auf die Proteinlokalisierung hatte.

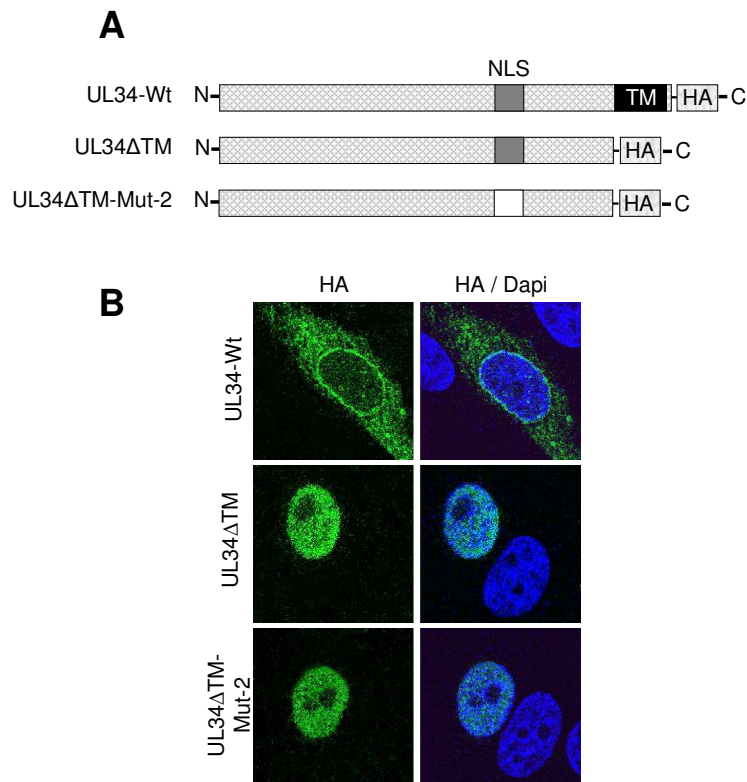


Abb. 19: Die NLS-unabhängige nukleäre Lokalisation von UL34ΔTM. **A)** Schematische Darstellung der C-terminal HA-getaggen Expressionskonstrukte von UL34-Wildtyp (UL34-Wt), UL34 ohne Transmembrandomäne (UL34ΔTM) und der entsprechenden UL34-NLS-Mutante (UL34ΔTM-Mut-2). Die Wildtyp-NLS ist durch einen dunkelgrauen, die mutierte NLS durch einen weißen Balken symbolisiert. **B)** 20 h nach Transfektion von Hep2-Zellen wurde die subzelluläre Lokalisation von UL34-Wt, UL34ΔTM und der UL34ΔTM-Mut-2 mit Hilfe von Maus-anti-HA-Antikörpern und Alexa488-gekoppelten-anti-Maus-Sekundärantikörpern analysiert. Die Zellkerne wurden mittels Dapi-Färbung visualisiert. (TM Transmembrandomäne)

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die vorhergesagte, *bipartite* NLS in UL34 einige Kriterien einer funktionellen NLS erfüllt. Mittels Y2H und Mutationsstudien konnte diese Sequenz als UL34-Bindestelle für die humanen α -Importine KPNA2, 4 und 5 bestimmt werden. Sowohl *in vitro*-Interaktionsstudien in An- und Abwesenheit von RanGTP, die eine funktionale Komplexbildung von UL34 mit KPNA5 und KPNB1 erkennen ließen, als auch der erfolgreiche Transfer der UL34-NLS auf EYFP sprechen für die biologische Relevanz dieser Signalsequenz. Dennoch konnte die Bedeutung der Sequenz für die nukleäre Lokalisation von UL34 mit den bisherigen Untersuchungen nicht gezeigt werden. Ob ein zusätzlicher bzw. alternativer Transportmechanismus für den nukleären Import von UL34 verantwortlich ist, kann nur durch weitere Analysen geklärt werden.

4.3.4 Die vorhergesagte NLS von UL31 interagiert direkt mit Importin α -Transportfaktoren

Sowohl im Y2H-Assay als auch mit Hilfe der LUMIER-Methode konnten die drei α -Importine KPNA2, 4 und 5 als Interaktoren für das virale UL31 identifiziert werden. Da UL31 außerdem im Zellkern lokalisiert (37) und eine vorhergesagte, klassisch *bipartite* NLS zwischen den Aminosäuren 21 und 42 aufweist (Abb. 20A), wurde es für die folgende Mutationsstudie herangezogen. Dabei wurde zunächst die Mutante UL31₄₅₋₃₀₆ konstruiert, bei welcher der N-terminale Bereich mit der vorhergesagten NLS deletiert wurde. Das in der Laborkollektion vorhandene Plasmid pDONR207-UL31 wurde als Template zur PCR-Amplifizierung des Gen-Fragments genutzt, das dabei mit Rekombinationssequenzen versehen in den pDONR207-Vektor kloniert wurde. Anschließend wurde das verkürzte UL31 in den Y2H-Expressionsvektor pGBKT7-DEST rekombiniert. Die humanen Transportfaktoren KPNA2, 4 und 5 lagen bereits im Y2H-Expressionsvektor pGADT7-DEST vor. Anschließend wurden in einer weiteren Mutante mit Hilfe der zielgerichteten Mutagenese 6 Arginin-Reste der Consensus-Sequenz gegen Alanin und Asparagin ausgetauscht (Abb. 20A). Mit Hilfe erneuter Y2H-Analysen beider Mutanten konnte die vorhergesagte NLS als Bindestelle der zellulären Interaktionspartner bestimmt werden. Sowohl das N-terminal verkürzte UL31₄₅₋₃₀₆ als auch die UL31-Mutante hatten die Fähigkeit zur Interaktion mit den humanen Transportfaktoren vollständig verloren (Abb. 20B). Vergleichbare Ergebnisse konnten mittels LUMIER erzielt werden (Abb. 20C). Somit ist die vorhergesagte, *bipartite* NLS für die Interaktion zwischen UL31 und den humanen Transportfaktoren der Importin α -Familie entscheidend.

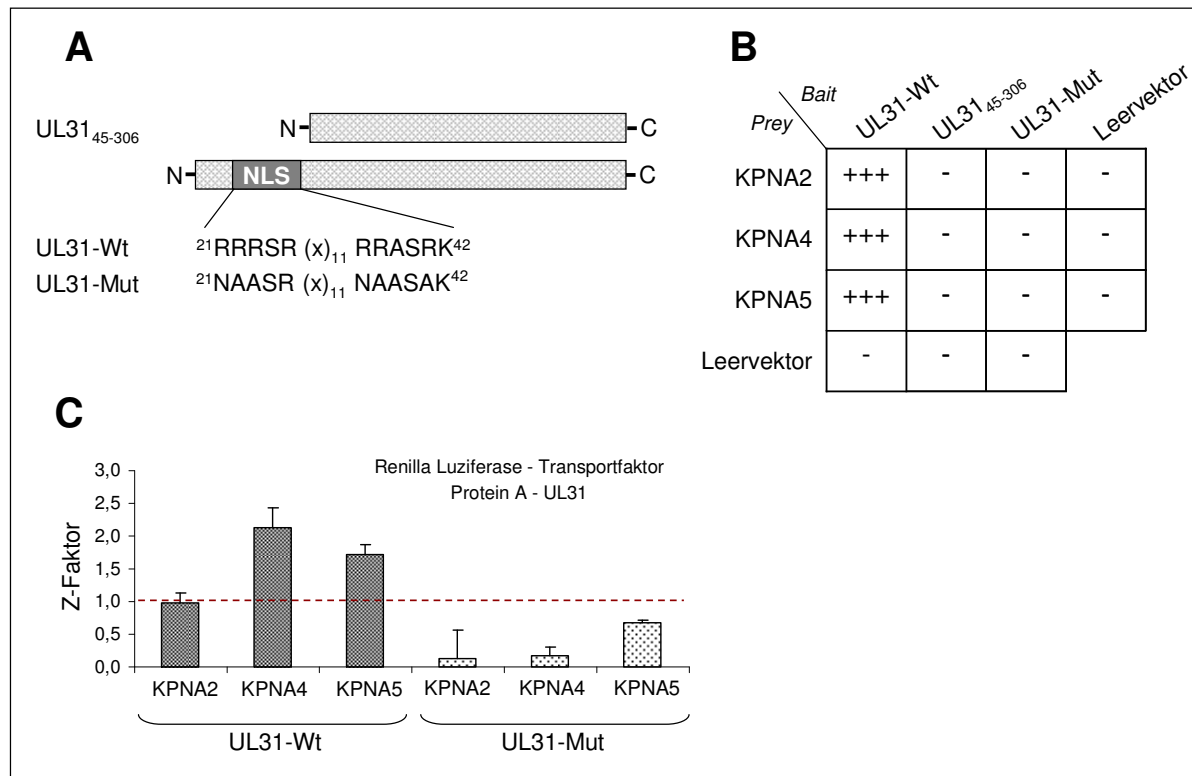


Abb. 20: NLS-vermittelte Interaktion zwischen UL31 und den α -Importinen KPNA2, 4 und 5. **A)** Expressionskonstrukte von UL31₄₅₋₃₀₆, UL31-Wildtyp (UL31-Wt) und der UL31-NLS-Mutante (UL31-Mut). Der Austausch von Arginin-Resten in Alanin- und Asparagin-Reste erfolgte mittels zielgerichteter Mutagenese. **B)** Bestimmung der vorhergesagten NLS als Bindestelle der zellulären Transportfaktoren mit Hilfe einer Y2H-Analyse der unter A) dargestellten Mutanten. Als Negativkontrollen dienten die entsprechenden Leervektoren. [+++ starke Interaktion (bis 10 mM 3-AT), - keine Interaktion] **C)** Validierung der Y2H-Daten des UL31-Wildtyps bzw. der UL31-Mutanten und den 3 α -Importinen mittels LUMIER. Als positiv wurden solche Interaktionen bewertet, die einen Z-Faktor ≥ 1 hatten (rot gestrichelte Linie). Eine ausführliche Beschreibung zur Ermittlung der Daten ist in Abschnitt 3.3.7.2 zu finden.

4.3.5 Die NLS des UL31 vermittelt den nukleären Import von panzellulär-lokalisiertem EYFP

Zur weiteren Untersuchung der vorhergesagten NLS von UL31 wurde diese an EYFP (*enhanced yellow fluorescent protein*) fusioniert und in Hep2-Zellen exprimiert. 20 h nach der Transfektion des entsprechend konstruierten Plasmids (pEYFP-UL31-NLS) wurde die subzelluläre Lokalisation des Fusionsproteins (EYFP-UL31-NLS) konfokalmikroskopisch ermittelt. Als Positivkontrolle diente ein Fusionsprotein aus EYFP und der bekannten SV40-NLS (pEYFP-Nuc), als Negativkontrolle EYFP (pEYFP Δ Nuc); (Abb. 21). Während EYFP allein eine panzelluläre Lokalisation aufweist, lokalisiert EYFP-UL31-NLS vergleichbar mit der Positivkontrolle ausschließlich im Nukleus. Da die UL31-NLS EYFP vollständig in den Kern transportiert, ist eine biologische Funktion dieser Signalsequenz im Virusprotein sehr wahrscheinlich.

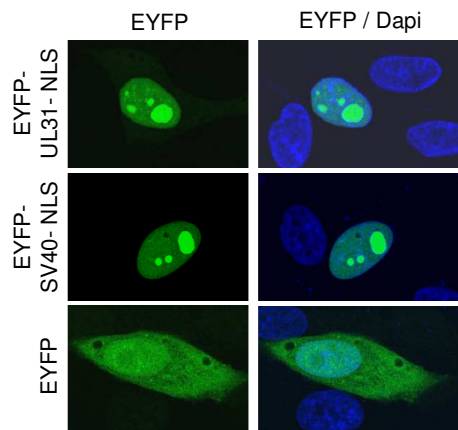


Abb. 21: Transfer der potentiellen UL31-NLS auf EYFP. 20 h nach Transfektion von Hep2-Zellen wurde die subzelluläre Lokalisation von EYFP-UL31-NLS, EYFP-SV40-NLS (Positivkontrolle) und EYFP (Negativkontrolle) direkt im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die Zellkerne wurden mittels Dapi-Färbung visualisiert.

4.3.6 Die nukleäre Lokalisation von UL31 ist abhängig von dessen vorhergesagter NLS

Um die Bedeutung der potentiellen Signalsequenz für den nukleären Import von UL31 zu untersuchen, wurde jeweils eines der N-terminal *myc-getaggten* Fusionsproteine UL31-Wildtyp (UL31-Wt), UL31-NLS-Mutante (UL31-Mut) oder SV40-NLS-UL31-Mut in Hep2-Zellen exprimiert (Abb. 22A). 20 h nach Transfektion der entsprechenden Plasmide (pCR3-N-c-myc-UL31; pCR3-N-c-myc-UL31-Mut oder pCR3-N-c-myc-SV40-NLS-UL31-Mut) wurde die subzelluläre Lokalisation der Proteine mittels indirekter Immunfluoreszenz konfokalmikroskopisch analysiert (Abb. 22B). Im Gegensatz zum UL31-Wildtyp kann die entsprechende NLS-Mutante nicht mehr in den Kern transportiert werden und weist stattdessen eine diffuse zytoplasmatische Lokalisierung auf. Die N-terminale Fusion der bereits gut bekannten SV40-NLS an die NLS-Mutante kann die ursprünglich nukleäre Lokalisation von UL31 wiederherstellen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die identifizierte Signalsequenz für die nukleäre Akkumulation von UL31 in Abwesenheit anderer herpesviraler Proteine notwendig ist.

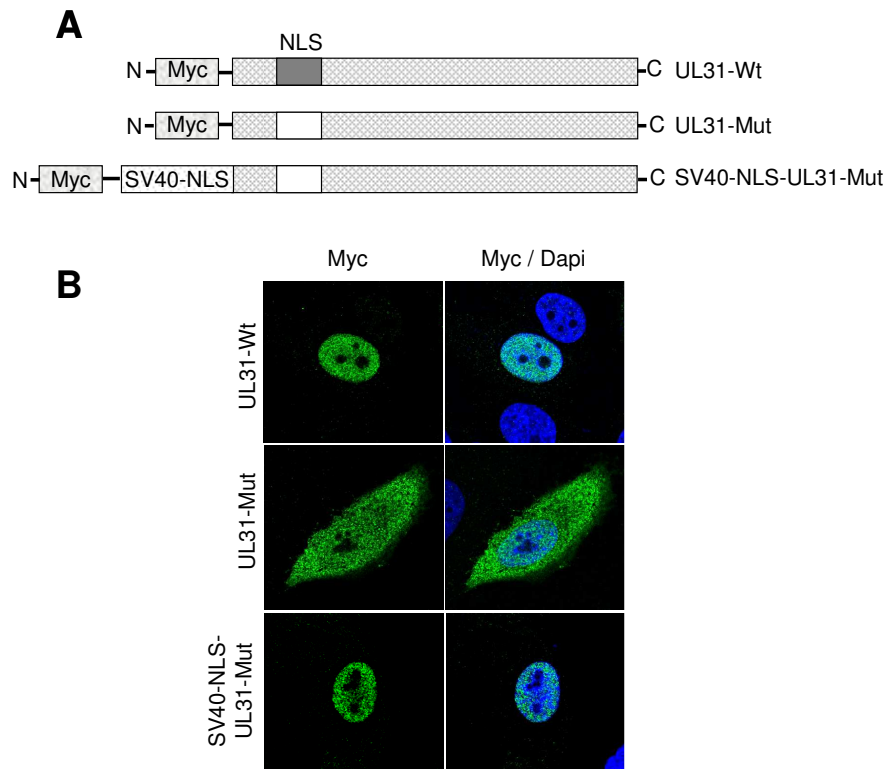


Abb. 22: Die NLS-vermittelte nukleäre Lokalisation von UL31. **A)** Schematische Darstellung der N-terminal *myc-getaggten* Expressionskonstrukte von UL31-Wildtyp (UL31-Wt), der UL31-NLS- Mutante (UL31-Mut) und der UL31-NLS-Mutante fusioniert an die SV40-NLS (SV40-NLS-UL31-Mut). Die Wildtyp-NLS ist durch einen dunkelgrauen, die mutierte NLS durch einen weißen Balken symbolisiert. **B)** 20 h nach Transfektion von Hep2-Zellen wurde die subzelluläre Lokalisation von UL31-Wt, UL31-Mut und SV40-NLS-UL31-Mut mit Hilfe von Maus-anti-myc Antikörpern und Alexa488-gekoppelten-anti-Maus-Sekundärantikörpern analysiert. Die Zellkerne wurden mittels Dapi-Färbung visualisiert.

Mit Hilfe dieser Analysen konnte eine funktionelle bipartite NLS in der variablen Region von UL31 identifiziert werden, welche für die nukleäre Lokalisation von UL31 in Abwesenheit anderer Virusproteine sowohl erforderlich als auch ausreichend ist.

4.3.7 Die Interaktion zwischen UL31 und UL34 ist durch die UL31-Mutation nicht beeinträchtigt

Obwohl sich der mutierte Bereich in UL31 außerhalb der UL34-Bindestelle befindet, kann ein Verlust der UL34/UL31-Interaktion aufgrund einer veränderten Proteinfaltung der UL31-Mutanten nicht ausgeschlossen werden. Zudem könnte der an UL31 fusionierte *myc-Tag* oder die SV40-NLS eine Strukturänderung verursachen, die einen negativen Einfluss auf die essentielle UL31/UL34-Interaktion hat. Aus diesen Gründen wurden entsprechende Y2H- und LUMIER-Analysen durchgeführt. Als Kontrolle diente dabei die Interaktion zwischen den beiden Wildtyp-Proteinen. Abb. 23A zeigt, dass UL34 Δ TM im Y2H-Versuch in gleicher Weise (bis 10 mM 3-AT) an alle untersuchten UL31-Varianten bindet. Dies ist ein Hinweis darauf,

dass die UL31-Modifikationen zu keinen großen strukturellen Veränderungen des Proteins geführt haben. Auch der LUMIER-Assay zeigt, dass UL34 mit allen UL31-Varianten interagieren kann, da alle Interaktionen einen Z-Faktor ≥ 1 aufweisen (Abb. 23B). Dennoch muss beachtet werden, dass die coisolierter Luziferase-Aktivität variiert. Im Vergleich zum UL31-Wildtyp ist der Z-Faktor zwischen UL34 Δ TM und der UL31-Mutante um fast 50 % und zwischen UL34 Δ TM und der SV40-NLS-UL31-Mut um etwa 30 % reduziert.

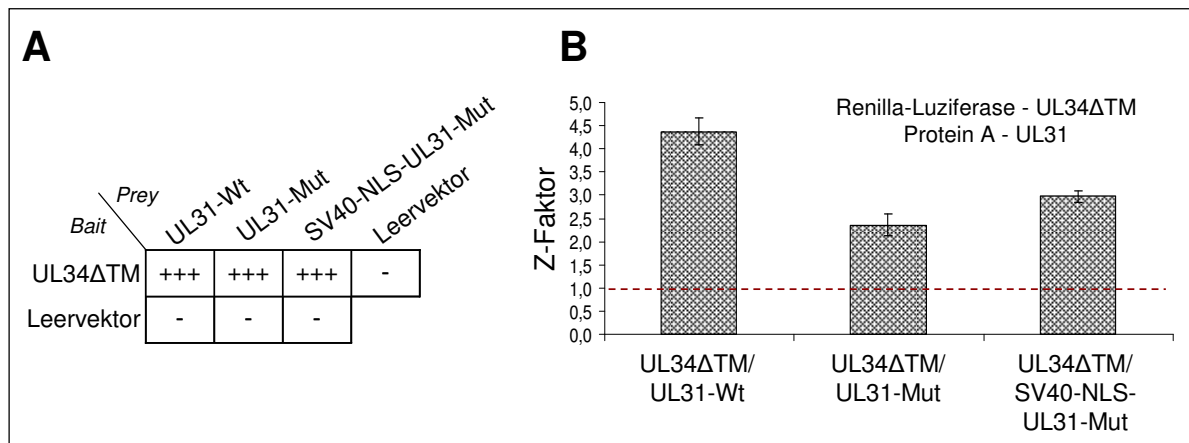


Abb. 23: Bindestudien zwischen UL34 Δ TM und verschiedenen UL31-Varianten. **A)** Y2H-Assay zwischen UL34 Δ TM und UL31-Wildtyp (UL31-Wt), der UL31-Mutante (UL31-Mut) oder der an das SV40-NLS fusionierten UL31-Mutante (SV40-NLS-UL31-Mut). Als Negativkontrollen dienten die entsprechenden Leervektoren. [+++ starke Interaktion (bis 10 mM 3-AT)] **B)** LUMIER-Assay der unter A) analysierten Protein-Kombinationen. Als positiv wurden solche Interaktionen bewertet, die einen Z-Faktor ≥ 1 hatten (rot gestrichelte Linie). Eine ausführliche Beschreibung zur Ermittlung der Daten ist in Abschnitt 3.3.7.2 zu finden.

4.3.8 Die NLS von UL31 ist für die korrekte Lokalisation von UL34 erforderlich

Um die Bedeutung der UL31-NLS für die Lokalisation von UL34 zu untersuchen, wurde UL34-Wildtyp entweder mit UL31-Wildtyp, der UL31-Mutante oder mit der an die SV40-NLS fusionierte UL31-Mutante in Hep2-Zellen koexprimiert. Die Expression der UL31-Fusionsproteine mittels *Gateway*-kompatibler Vektoren war in den vorangegangenen Versuchen relativ gering. Um im folgenden Versuch die Expression der UL31-Fusionsproteine zu verbessern, wurden alle UL31-Konstrukte klassisch über *NheI*- und *BamHI*-Schnittstellen in das Rückgrat von pEYFP-Nuc (Clontech) kloniert und dabei mit N-terminalen *myc*-Tags versehen. UL34 wurde als Fusionsprotein mit einem N-terminalen *Strep*-Tag-II exprimiert. 20 h nach Transfektion der entsprechenden Plasmide (pEXPR-IBA5-UL34 entweder mit SM1767-UL31, SM1767-UL31-Mut, oder SM1767-SV40-NLS-UL31-Mut) erfolgte die Analyse der subzellulären Lokalisation der Proteine mittels indirekter Immunfluoreszenz (Abb. 24).

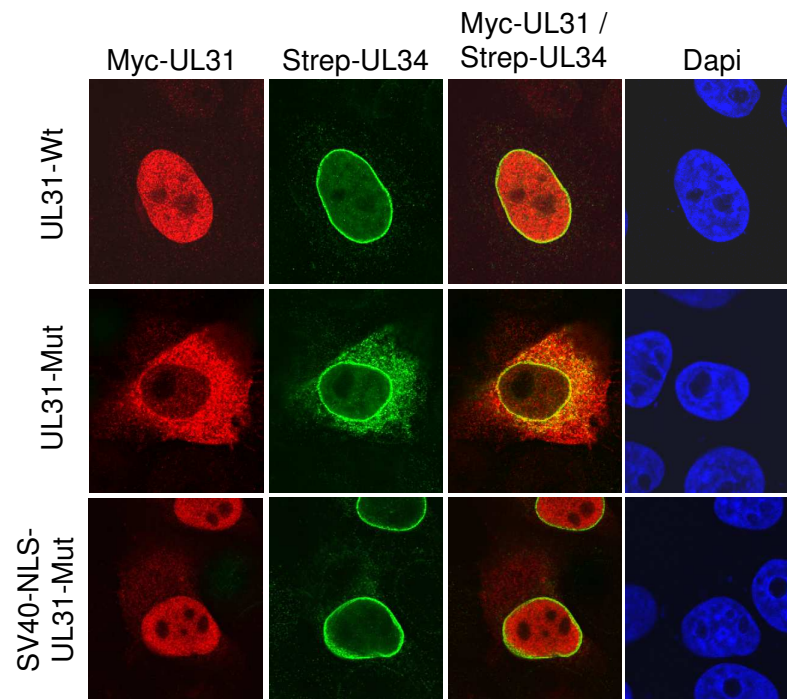


Abb. 24: Die Bedeutung der UL31-NLS für die Lokalisation von UL34. 20 h nach Cotransfektion der entsprechenden Plasmide (pEXPR-IBA5-UL34 entweder mit SM1767-UL31, SM1767-UL31-Mut, oder SM1767-SV40-NLS-UL31-Mut) in Hep2-Zellen wurde die subzelluläre Lokalisation durch indirekte Immunfluoreszenz analysiert. Die Visualisierung der UL31-Fusionsproteine [UL31-Wildtyp (UL31-Wt), UL31-Mutante (UL31-Mut) und die an die SV40-NLS fusionierte UL31-Mutante (SV40-NLS-UL31-Mut)] erfolgte mit Hilfe von Maus-anti-myc-Primärantikörpern und Alexa488-gekoppelten-anti-Maus-Sekundärantikörpern, die Lokalisierung von UL34-Wildtyp (UL34-Wt) mittels Maus-anti-Strep-Antikörpern und Alexa594-gekoppelten-anti-Maus-Sekundärantikörpern. Die Zellkerne wurden mittels Dapi-Färbung visualisiert.

Wie bereits bekannt ist, werden sowohl UL31 als auch UL34 bei gemeinsamer Expression an die INM verlagert, wo sie zusammen den Kern-Export-Komplex ausbilden (257). Entsprechendes ist auch in Abb. 24 zu erkennen. In Anwesenheit von UL31 lokalisiert UL34 ausschließlich an der Kernperipherie. Die Überlagerung beider Signale zeigt eine erkennbare Kolokalisation von UL31-Wt und UL34-Wt. Wie bereits in Abschnitt 4.3.6 gezeigt werden konnte, kann die UL31-Mutante im Gegensatz zum Wildtyp nicht mehr in den Zellkern transportiert werden. In Abb. 24 ist zu sehen, dass die zytoplasmatische Mislokalisierung der UL31-Mutante zudem Auswirkungen auf die korrekte Lokalisation von UL34 zur Kernperipherie hat, so dass sich UL34, genau wie in Abwesenheit von UL31, sowohl im Zytoplasma als auch an der Kernmembran befindet (vergleiche Abb. 19). So verhindert die mutierte UL31-NLS die Rekrutierung von UL34 zur Kernperipherie. Durch die Fusion der SV40-NLS an die UL31-Mutante kann die ursprüngliche Lokalisation von UL34 an der Kernperipherie wieder hergestellt werden (Abb. 24). Folglich kann angenommen werden, dass die NLS von UL31 in Abwesenheit anderer herpesviraler Proteine sowohl für die nukleäre Lokalisation von UL31 selbst, als auch für die von UL34 entscheidend ist.

4.4 Ermittlung der nukleären Export-Aktivität von HSV-1-Proteinen

4.4.1 Der Rapamycin-induzierbare nukleäre Export-Assay

Mit Hilfe der bisherigen Y2H-Untersuchungen konnten trotz vorhergesagter NES (nukleäre Exportsequenz) keine HSV-1-Proteine als Substrate von Exportfaktoren ermittelt werden. Aus diesem Grund sollte eine alternative Methode zum Einsatz kommen. Da die meisten existierenden Methoden jedoch aufgrund der aufwendigen Durchführung nicht für die Untersuchung ganzer Proteome geeignet sind, wurde eine neue, induzierbare *in vivo*-Hochdurchsatz-Methode in Anlehnung an Klemm *et al.* (1997) etabliert (153); (Abb. 25). Diese basiert auf einer Rapamycin-induzierbaren Dimerisierung des Immunophilins FKBP12 (FK506-bindendes Protein-12) und FRB (FKBP12-Rapamycin Bindedomäne von FRAP1). FRAP1 ist eine zelluläre Protein-Kinase, die u. a. das Zellwachstum, die Proteinsynthese und Transkription reguliert. Das aus *Streptomyces hygroscopicus* stammende membranpermeable Rapamycin bindet an FKBP12 (15,16,72,73), woraufhin der gebildete Rapamycin-FKBP12-Komplex eine starke Interaktion mit FRB eingeht (29,41), was zur Inhibierung der Kinase-Aktivität von FRAP1 führt. Zur Etablierung eines Rapamycin-abhängigen Export-Assays wurden Proteine mit potentiellen nukleären Exportsignalen zur direkten Visualisierung an EYFP (*Enhanced Yellow Fluorescent Protein*) und zur Rapamycin induzierbaren Dimerisierung an FRB fusioniert. Um einen konstitutiven nukleären Import der Proteine zu gewährleisten, wurden zusätzlich drei Tandemwiederholungen der SV40-NLS integriert (EYFP-NLS-FRB-Protein X); (Abb. 25A). Die NLS von SV40 besitzt ein starkes Import-Potential und führt mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einem nukleären Gleichgewichtszustand NES-tragender Proteine. Proteine, die trotz dieser NLS im Zytoplasma lokalisieren, können nicht von zytoplasmatisch residenten Proteinen unterschieden und somit nicht in diesem Assay auf eine mögliche Export-Aktivität untersucht werden. Die Tandemwiederholungen der SV40-NLS sollen die Wahrscheinlichkeit erhöhen, dass mindestens eine Signalsequenz für das zelluläre Import-System zugänglich ist. Das zweite Fusionsprotein dieses Assays basiert auf dem HSV-1 kodierten Typ III-Transmembran-Glykoprotein M (gM), welches in Abwesenheit anderer viraler Proteine am trans-Golgi-Netzwerk (TGN) lokalisiert (58,344). versehen mit einem N-terminalen HA-Tag und 3 Tandemwiederholungen von FKBP12 am C-Terminus (HA-gM-3xFKBP) ist das Protein nach Rapamycin-Zugabe in der Lage, exportierte Proteine am TGN zu immobilisieren (Abb. 25B). Da die Topologie des gM den C-Terminus zum Zytoplasma orientiert (300), eignet sich die C-terminale Fusion dazu, FKBP12 zur Dimerisierung ins Zytoplasma zu exponieren. Diese Strategie ist im Zusammenhang des Assays von entscheidender Bedeutung, da es den Transport von im Zytoplasma gebildeten Dimeren

zurück in den Kern verhindert. Darüber hinaus ermöglicht die subzytoplasmatische Bindung des EYFP-*getaggten* Proteins eine Konzentration des Fluoreszenz-Signals und somit eine schnellere und leichtere Auswertung. Ohne Rapamycin wandern Proteine, die zusätzlich zum NLS ein funktionales NES enthalten, kontinuierlich zwischen Zytoplasma und Zellkern hin und her. Erst nach Zugabe von Rapamycin führt die transiente zytoplasmatische Lokalisation zu einer FKBP-FRB Komplex-Bildung am TGN und schließlich zur exklusiven dortigen Lokalisierung, die mittels Fluoreszenz detektiert werden kann (Abb. 25C). Um die Dimerisierung im Zytoplasma neu synthetisierter, also nicht aktiv exportierter Proteine mit HA-gM-3xFKBP am TGN zu verhindern, werden die Zellen vor Rapamycin-Zugabe mit dem Proteinsynthese-Inhibitor Anisomycin behandelt.

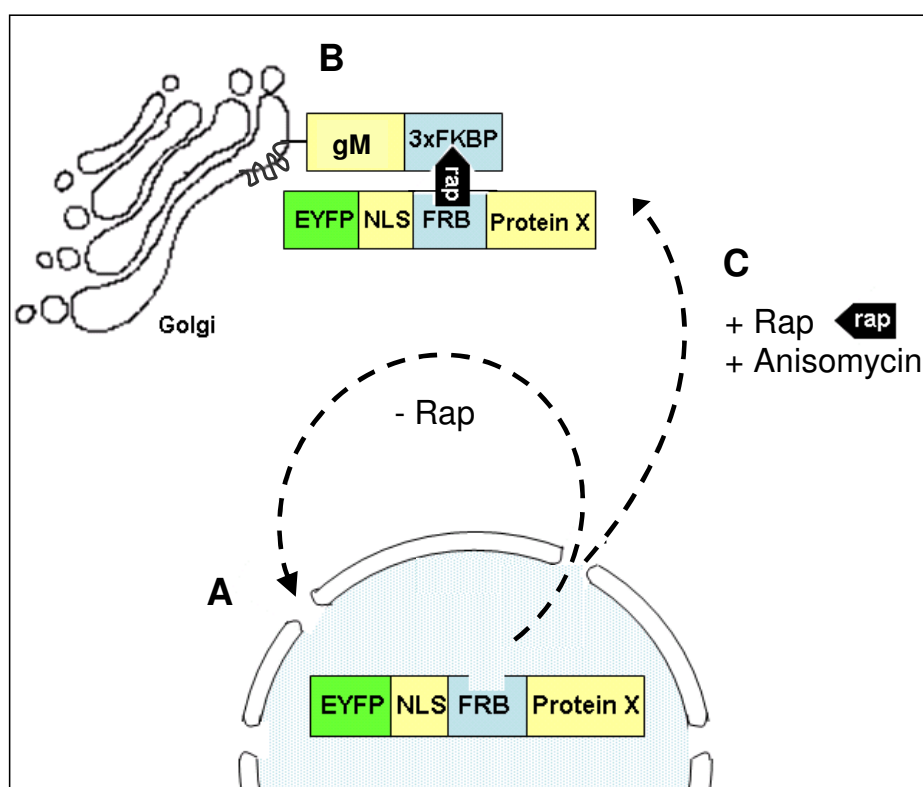


Abb. 25: Schematische Darstellung des Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assays. Dieser Assay basiert auf zwei Fusionsproteinen (HA-gM-3xFKBP, EYFP-NLS-FRB-Protein X), die in HeLa-Zellen koexprimiert werden. **A)** Proteine mit einem funktionalen NES lokalisieren aufgrund der integrierten SV40-NLS im Nukleus, wandern jedoch kontinuierlich zwischen Nukleus und Zytoplasma. **B)** HA-gM-3xFKBP lokalisiert aufgrund des HSV-1-Transmembranproteins gM am TGN. Der C-Terminus von gM ist an 3 Tandemwiederholungen von FKBP fusioniert und zytoplasmatisch exponiert. Das N-terminal an gM gekoppelte HA (hier nicht abgebildet) ist vermutlich wie FKBP ins Zytoplasma orientiert. **C)** Nach Behandlung der Zellen mit Anisomycin, das die Proteinsynthese hemmt, und Rapamycin (Rap), das eine stabile, hochaffine Interaktion zwischen FKBP und der FRB-Domäne vermittelt, werden aktiv exportierte Proteine am TGN immobilisiert und akkumuliert. HA-gM-3xFKBP kann mit Hilfe indirekter Immunfluoreszenz mit anti-HA oder anti-gM-Antikörpern sichtbar gemacht werden. Die Visualisierung von EYFP-NLS-FRB-Protein X erfolgt dagegen mittels direkter Fluoreszenzmikroskopie.

4.4.2 Das Vektor-System für die Hochdurchsatz-Analyse des nukleären Protein-Exports

Für die Hochdurchsatz-Analyse des nukleären Exports wurden mittels klassischer Klonierung zwei Vektoren generiert (Abb. 26), von welchen die beiden Proteine HA-gM-3xFKBP (Abb. 26A) bzw. EYFP-NLS-FRB-Protein X (Abb. 26B) transient exprimiert werden können.

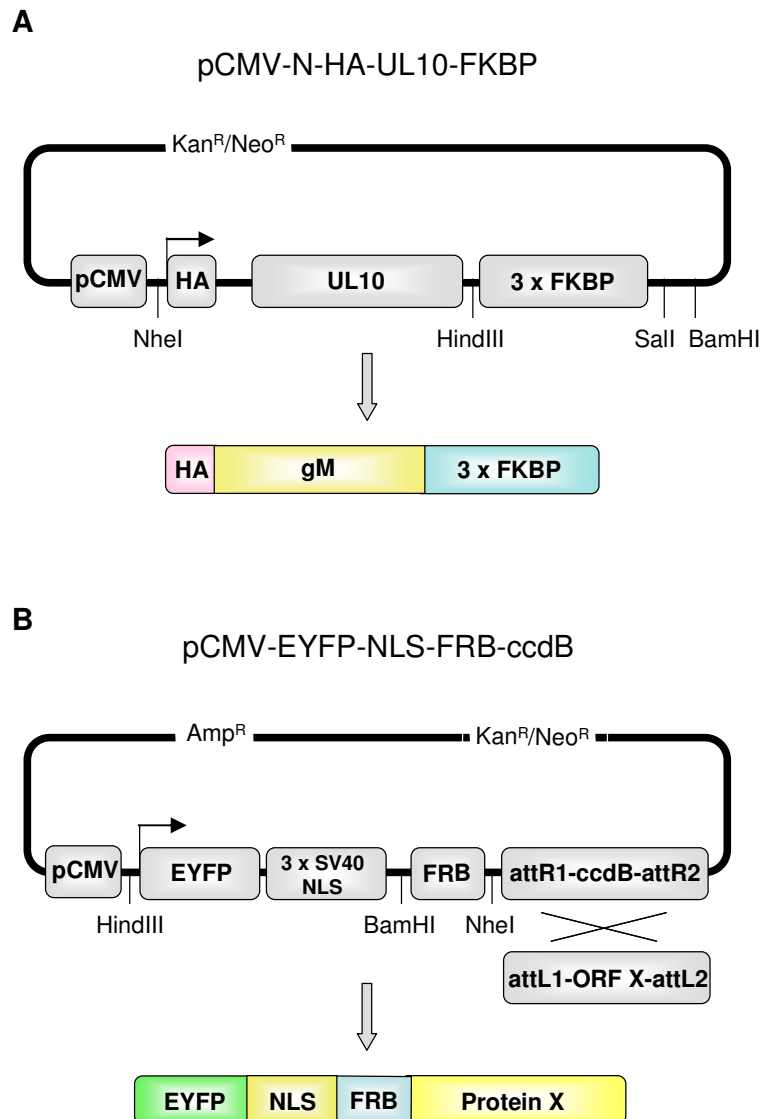


Abb. 26: Für den Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay generierte Vektoren. A) Der pCMV-N-HA-UL10-FKBP-Vektor kodiert das Hybridprotein HA-gM-3xFKBP und steht unter Kontrolle des pCMV-Promotors. Das Rückgrat entspricht dem des pEYFP-Nuc-Vektors (Clontech). **B)** Der pCMV-EYFP-NLS-FRB-ccdB-Vektor enthält die ccdB-Kassette, welche die Hochdurchsatz-Klonierung potentieller Export-Substrat-Sequenzen mit Hilfe des *Gateway*[®]-Systems ermöglicht. Er kodiert das Hybridprotein EYFP-NLS-FRB fusioniert an das zu untersuchende Protein X, das ebenfalls unter Kontrolle des pCMV-Promotors steht. Das Rückgrat entspricht dem des pCR3-Vektors.

Der Expressionsvektor pCMV-N-HA-UL10-FKBP (Abb. 26A) wurde durch Klonierung von UL10-3xFKBP in die NheI- und BamHI-Schnittstellen des pEYFP-Nuc-Vektors (Clontech)

durch Triple-Ligation zweier DNA-Fragmente erzeugt. Das erste Fragment wurde mit Hilfe der beiden Primer NheI-HA-UL10-for und HindIII-UL10-rev sowie UL10-pDONR207 als Matrize amplifiziert. Der ORF UL10 kodiert für das herpesvirale Typ III-Transmembran-Glykoprotein M (gM). Das zweite Fragment, 3xFKBP, wurde mit HindIII und Sall aus pFLAG-CMV-3xFKBP (bereitgestellt von Tomoyuki Ohba, Eric Schirmer, Larry Gerace vom The Scripps Research Institut, La Jolla) ausgeschnitten und in SM1126 (Laborkollektion) kloniert. Dieser Zwischenschritt diente der Erzeugung kompatibler Enden (HindIII, BamHI) für die darauffolgende Triple-Klonierung in pEYFP-Nuc.

Der *Gateway*-kompatible Expressionsvektor pCMV-EYFP-NLS-FRB-ccdB (Abb. 26B) wurde durch Klonierung des EYFP-3xSV40-NLS-FRB-Fragments in die HindIII- und NheI-Schnittstelle des *Gateway*-kompatiblen pCR3-Vektors erzeugt. Mit Hilfe der beiden Primer HindIII-EYFP-for und NheI-FRB-rev wurde EYFP-3xSV40-NLS-FRB von einem zuvor klonierten Plasmid amplifiziert. Letzteres wurde durch Ligation des FRB-Fragments in die BamHI-Schnittstelle von pEYFP-Nuc (Clontech) generiert. Das FRB-Fragment wiederum wurde mit Hilfe der beiden Primer BamHI-FRB-for und BglII-FRB-rev und einer Matrize (bereitgestellt von Tomoyuki Ohba, Eric Schirmer, Larry Gerace vom The Scripps Research Institut, La Jolla) amplifiziert.

Die Expression beider Fusionsproteine steht unter Kontrolle des CMV-Promotors. Zur Selektion der Vektoren kann eine Kan^R/Neo^R-Kassette genutzt werden. Die im pCMV-EYFP-NLS-FRB-ccdB-Vektor integrierte ccdB-Kassette erlaubt die rekombinatorische Hochdurchsatz-Klonierung potentieller Export-Substrat-Sequenzen.

4.4.3 Der Rapamycin-induzierbare nukleäre Export-Assay am Beispiel von UL4

Bevor dieser Assay im Hochdurchsatz eingesetzt werden konnte, sollte dessen Potential in einem Vorversuch getestet werden. Aufgrund der Tatsache, dass über die Funktion des herpesviralen Proteins UL4 kaum etwas bekannt ist und dass mit Hilfe des *Internet-Servers* NetNES (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES>) ein leucinreiches NES im C-terminalen Bereich von UL4 vorhergesagt werden konnte (Abb. 27), wurde es für einen Vorversuch herangezogen.

Der für die Vorhersage verwendete Algorithmus kombiniert 2 verschiedene Modelle [neural network model (NN), hidden Markov model (HMM)] und wurde von La Cour *et al.* (2004) entwickelt (166). Geht der berechnete NES Score (Abb. 27 roter Graph) über den Schwellenwert (Abb. 27 violette Linie) hinaus, sind die entsprechenden Aminosäure-Reste erwartungsgemäß an einem nukleären Export-Signal beteiligt. Der Bereich der vorhergesagten Wildtyp-Signalsequenz (UL4-Wt) ist detailliert dargestellt. Diese befindet sich

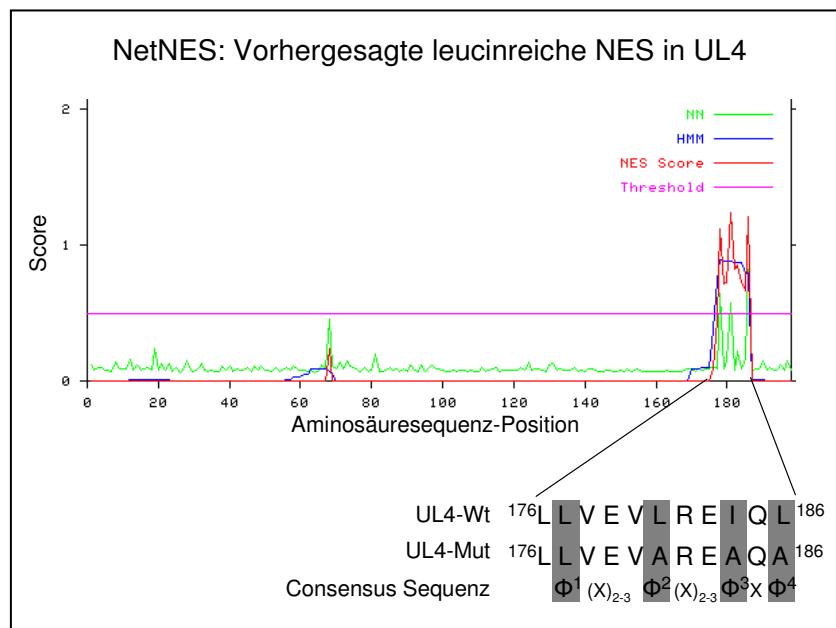


Abb. 27: Vorhersage einer klassischen NES im herpesviralen UL4. Die klassische NES zwischen den Aminosäuren 167-186 von UL4 wurde mit Hilfe des NetNES *Internet Servers* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES>) vorhergesagt. Der dafür verwendete Algorithmus kombiniert 2 verschiedene Modelle [neural network model (NN, grün), hidden Markov model (HMM, blau)] und wurde von La Cour *et al.* (2004) entwickelt (166). Geht der berechnete NES Score (rot) über den Schwellenwert (*Threshold*, violett) hinaus, sind die entsprechenden Aminosäure-Reste erwartungsgemäß Teil eines nukleären Export-Signals. Der Bereich der vorhergesagten Wildtyp-Signalsequenz (UL4-Wt) ist detailliert dargestellt. Diese Sequenz entspricht der Consensus-Sequenz klassischer NES. Die für die Consensus-Sequenz entscheidenden hydrophoben Aminosäure-Reste (Φ^1 - Φ^4) sind mit grauen Balken unterlegt. In der NES-Mutante (UL4-Mut) wurden die letzten drei hydrophoben Reste Leucin, Isoleucin und Leucin (Φ^2 - Φ^4) mittels zielgerichteter Mutagenese durch Alanin ersetzt.

innerhalb der Aminosäuren 176 und 186 von UL4 und entspricht der Consensus-Sequenz klassischer NES (Abb. 27). Um die Funktion dieser potentiellen Signalsequenz im Export-Assay genauer zu untersuchen, wurde eine entsprechende UL4-Mutante konstruiert. Dabei wurden die letzten drei hydrophoben Reste Leucin, Isoleucin und Leucin (Φ^2 - Φ^4) mit Hilfe zielgerichteter Mutagenese durch Alanin ersetzt (Abb. 27). Die Entscheidung zur Mutation dieser Reste erfolgte aufgrund bereits analysierter NES in der Literatur (347).

Vor Versuchsbeginn sollten die für den Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay generierten Vektoren (Abb. 26) auf Expression und Lokalisation der entsprechenden Fusionsproteine überprüft werden. Dazu wurden HeLa-Zellen entweder mit pCR3-N-HA-UL10, pCMV-N-HA-UL10-FKBP, pCR3-N-c-myc-UL4 oder pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL4 transfiziert und 20 h später mittels indirekter Immunfluoreszenz bzw. direkter Fluoreszenz über EYFP analysiert. Wie bereits für HA-gM gezeigt werden konnte (58,344), lokalisiert auch HA-gM fusioniert an 3xFKBP unverändert am TGN. Während myc-UL4 eine zytoplasmatische Lokalisation aufweist, befindet sich das Fusionsprotein EYFP-NLS-UL4, wie erwartet, aufgrund der integrierten NLS im Zellkern (Abb. 28). Folglich konnten alle Voraussetzungen für die Durchführung des Export-Assays geschaffen werden.

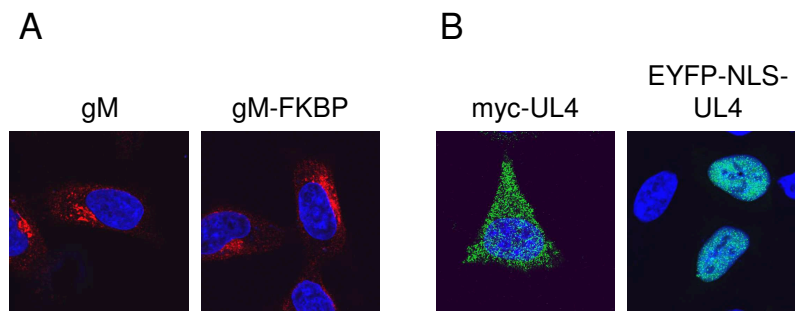


Abb. 28: Vergleich der subzellulären Lokalisation von gM mit gM-FKBP bzw. myc-UL4 mit EYFP-NLS-UL4. **A)** 20 h nach Transfektion von pCR3-N-HA-UL10 bzw. pCMV-N-HA-UL10-FKBP in HeLa-Zellen erfolgte die Detektion von gM bzw. gM-FKBP mit Hilfe von Kaninchen-anti-gM-Primärantikörpern und Alexa594-gekoppelten-anti-Kaninchen-Sekundärantikörpern. **B)** 20 h nach Transfektion von pCR3-N-c-myc-UL4 bzw. pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL4 in HeLa-Zellen erfolgte die Detektion von myc-UL4 mit Hilfe von Maus-anti-myc-Primärantikörpern und Alexa488-gekoppelten-anti-Maus-Sekundärantikörpern bzw. von EYFP-NLS-UL4 mittels direkter Fluoreszenzmikroskopie über EYFP. Die Zellkerne wurden mittels Dapi-Färbung visualisiert.

Im Folgenden sollte nun die Funktionalität des neuen Export-Assays durch den Einsatz von UL4 gezeigt werden. Da UL31 ein gut charakterisiertes nukleäres Protein ist, das weder eine bekannte Export-Aktivität noch eine vorhergesagte NES aufweist, eignete es sich als Negativkontrolle. Infolgedessen wurden die ORFs UL4 und UL31 mittels sequenzspezifischer Rekombination von pDONR207-UL4 und -UL31 in den generierten pCR3-EYFP-NLS-FRB-ccdB DEST-Vektor kloniert. Voraussetzung für die Analyse eines Proteins mit Hilfe des Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assays ist dessen Gleichgewichtszustand im Zellkern. Wie bereits in Abb. 28 gezeigt, besitzt UL4 in seiner Wildtyp-Form eine zytoplasmatische Lokalisation. Der SV40-NLS vermittelte konstitutive Import von UL4 verschiebt in Abwesenheit von Rapamycin das Gleichgewicht hin zu einer exklusiv nukleären Lokalisation. Eine weitere Bedingung für den Assay ist, dass UL4 keine Bindung mit gM eingeht, die unabhängig von der Rapamycin-vermittelten FRB-FKBP-Interaktion ist. Da es sich bei gM um ein herpesvirales Protein handelt, können intravirale Interaktionen nicht ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund wurde das UL4-Hybridprotein (EYFP-NLS-FRB-UL4) zusammen mit HA-gM koexprimiert und als Kontrolle im Export-Assay mitgeführt. In Abb. 29 ist das Ergebnis des Export-Assays für UL4, der entsprechenden NES-Mutante (UL4-Mut) und der Negativkontrolle UL31 dargestellt. Nach Zugabe von Rapamycin ist eine Kolo-kalisation von EYFP-NLS-FRB-UL4 und gM-3xFKBP am TGN erkennbar. Dies legt den Schluss nahe, dass UL4 eine Export-Aktivität besitzt. Infolgedessen und aufgrund der Rapamycin-vermittelten stabilen Interaktion zwischen dem an UL4 gekoppelten FRB und dem an gM gekoppelten FKBP wird UL4 permanent dem Kern entzogen und am TGN akkumuliert. Die Kontrolle mit HA-gM zeigt, dass UL4 nicht mit gM interagiert und somit die Akkumulation von UL4 am TGN ausschließlich auf die Interaktion von FRB und FKBP zurückzuführen ist. Da die UL4-Mutante nach Rapamycin-Zugabe vorwiegend im Kern zu finden ist, kann die Export-Aktivität von UL4 auf die vorhergesagte

Signalsequenz zurückgeführt werden. Erwartungsgemäß besitzt UL31 keine Export-Aktivität. Es zeigt sowohl mit als auch ohne Rapamycin eine exklusiv nukleäre Lokalisation. Diese Ergebnisse zeigen nicht nur, dass UL4 eine Export-Aktivität besitzt, sondern vielmehr, dass der neu etablierte Export-Assay funktioniert.

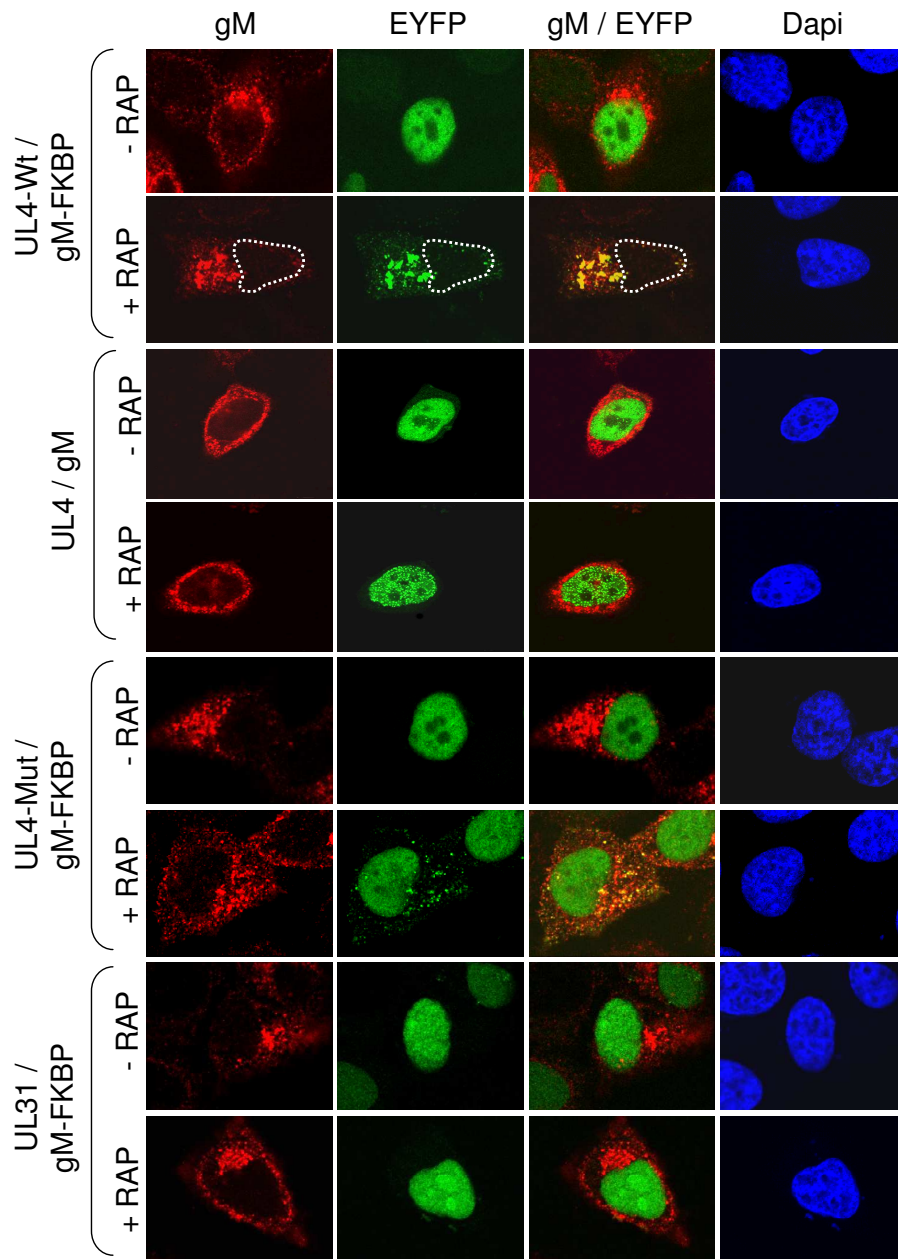


Abb. 29: Analyse der Export-Aktivität der UL4-NES mit Hilfe des Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assays. Zur funktionellen Untersuchung der vorhergesagten, klassischen NES im C-terminalen Bereich von UL4 wurden HeLa-Zellen mit pCMV-N-HA-UL10-FKBP und entweder pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL4 (UL4-Wt), pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL4-Mutante (UL4-Mut) oder pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL31 für 20 h kotransfiziert. UL31 dient als Negativkontrolle. Nach Zugabe des Proteinsynthesehemmers Anisomycin wurden die Zellen ohne bzw. mit Rapamycin (-RAP, +RAP) behandelt. Die Analyse erfolgte mittels indirekter Immunfluoreszenz (Kaninchen-anti-gM-Primärantikörper und Alexa594-gekoppelten-anti-Kaninchen-Sekundärantikörper) bzw. direkter Fluoreszenzmikroskopie (EYFP). Die Zellkerne wurden mittels Dapi-Färbung visualisiert. Aktiv exportierte Proteine wurden durch nukleäre Abwesenheit (durch gestrichelte Linien markiert) und Kolokalisation mit gM am TGN, nicht exportierte Proteine durch nukleäre Anwesenheit bestimmt.

4.4.4 Der Interspezies-Heterokaryon-Assay am Beispiel von UL4

Um die Zuverlässigkeit des neuen Assays zu untersuchen, sollte die ermittelte Export-Aktivität des herpesviralen Proteins UL4 mit einer gut bekannten *in vivo*-Methode, dem sog. Interspezies-Heterokaryon-Assay (185,242) verifiziert werden (Abb. 30). Dabei soll der neu generierte Gateway-kompatible Vektor pCMV-EYFP-NLS-FRB-ccdB aus dem Rapamycin-induzierbaren Export-Assay Verwendung finden. Das aus diesem Vektor resultierende Fusionsprotein EYFP-NLS-FRB-Protein X enthält alle für den Interspezies-Heterokaryon-Assay benötigten Module. Das autofluoreszierende EYFP dient der direkten Visualisierung der Export-Aktivität in den Zellen und das SV40-NLS dem konstitutiven nukleären Import des Fusionsproteins. Dem ebenfalls enthaltenen FRB kommt in diesem Versuch keine Bedeutung zu.

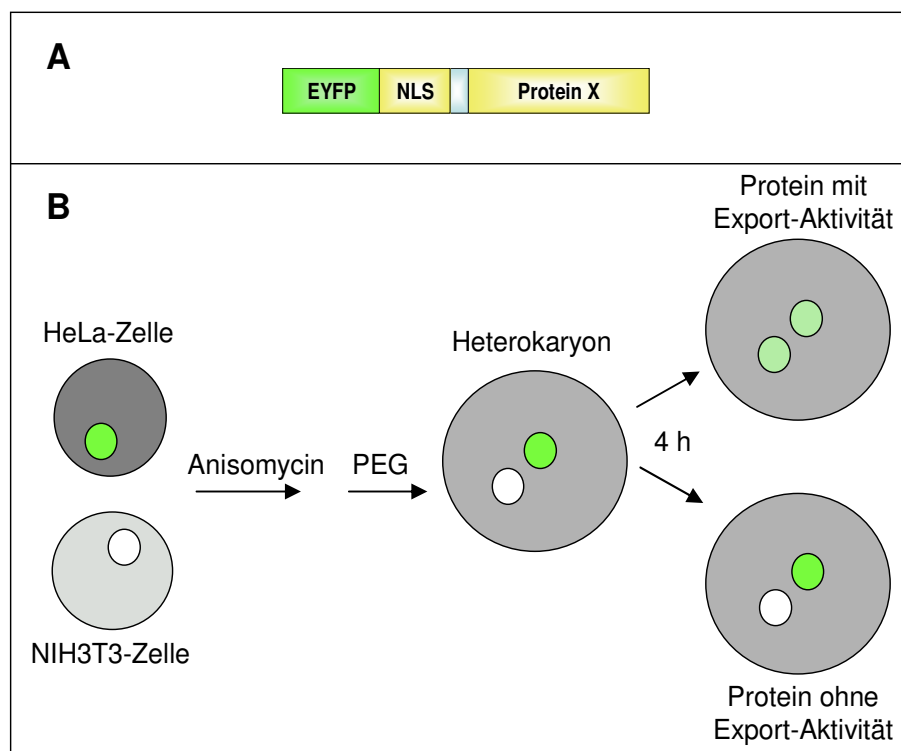


Abb. 30: Schematische Darstellung des Interspezies-Heterokaryon-Assays. Für diesen Assay wurde der bereits für den Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay generierte Expressionsvektor (pCMV-EYFP-NLS-FRB-ORF X) verwendet. **A)** Das in den HeLa-Zellen entsprechend exprimierte Fusionsprotein aus EYFP, dem SV40-NLS und dem zu untersuchenden Protein X ist unter B) grün dargestellt. **B)** Aufgrund der integrierten SV40-NLS wird das Fusionsprotein konstitutiv in den Kern transportiert und besitzt auch bei Anwesenheit einer aktiven NES eine nukleäre Lokalisation. Nach Zugabe von Anisomycin, das eine Proteinneusynthese im Zytoplasma verhindert, werden die HeLa-Zellen mit untransfizierten NIH3T3-Mauszellen durch Zugabe einer Polyethylenglycol-(PEG) Lösung fusioniert. Die entstandenen Heterokaryonen werden 2 h in Anwesenheit von Anisomycin inkubiert, anschließend fixiert und mit Hilfe direkter Fluoreszenzmikroskopie über das autofluoreszierende EYFP analysiert.

Grundlage dieser Methode ist die Verwendung von zwei verschiedenen Zelllinien, deren Zellkerne aufgrund einer unterschiedlichen Chromatinorganisation mittels Dapi-Färbung gut

im Fluoreszenzmikroskop unterschieden werden können. Da NIH3T3-Mauszellen nach Dapi-Färbung des Chromatins ein charakteristisches Punktmuster und HeLa-Zellen eine gleichmäßige Färbung aufweisen (Abb. 31), wurden sie für diese Methode eingesetzt. So wurden HeLa-Zellen, die das zu untersuchende Fusionsprotein mit Hilfe einer integrierten NLS exprimieren und im Kern akkumulieren, mit Hilfe einer Polyethylenglycol- (PEG) Behandlung mit NIH3T3-Mauszellen fusioniert. Die Behandlung mit PEG führt zur Fusion der Plasmamembranen einzelner Zellen und zu multinukleären Synzytien. Da es sich um zwei verschiedene Zelllinien mit unterschiedlichen Kernen handelt, spricht man von Heterokaryen. Um die Proteinneusynthese zu verhindern, wurden die Zellen vor der Fusion und während des gesamten Versuchs mit Anisomycin behandelt. Besitzt das aufgrund des integrierten SV40-NLS konstitutiv importierte Fusionsprotein ein funktionales NES, ist es in der Lage zwischen Zellkern und Zytoplasma kontinuierlich hin- und herzuwandern. Infolgedessen wird es sich nach einer gewissen Zeit in beiden Zellkernen des Heterokaryons anreichern. Die Voraussetzung für den Nachweis eines Proteins mit Export-Aktivität ist somit nicht nur dessen Export aus dem Kern der Donorzelle (HeLa), sondern auch dessen Import in den Kern der Akzeptorzelle (NIH3T3). Da eine zu lange oder extensive Behandlung der Zellen mit PEG zu einer Beschädigung der Kernmembran führen kann, müssen die experimentellen Bedingungen mit Hilfe einer Negativkontrolle kontrolliert werden. Dazu dient in der Regel ein Protein, welches keine Export-Aktivität aufweist.

Die potentielle Export-Aktivität von UL4 und der entsprechenden NES-Mutante sollte im Interspezies-Heterokaryon-Assay untersucht werden. Als Negativkontrolle diente, wie im vorangegangenen Versuch, das Protein UL31. In Abb. 31 ist das Ergebnis des Heterokaryon-Assays für UL4, der entsprechenden NES-Mutante (UL4-Mut) und der Negativkontrolle UL31 dargestellt.

Wie in Abb. 31 zu erkennen ist, erscheint UL4 nach 4 Stunden innerhalb eines Heterokaryons in gleicher Intensität in den NIH3T3- und den HeLa-Zellkernen. Dagegen kann UL4 in nicht fusionierten NIH3T3-Zellen nicht detektiert werden (in Abb. 31 nicht dargestellt). Die entsprechende NES-Mutante (UL4-Mut) lokalisiert vergleichbar mit der Negativkontrolle UL31 ausschließlich in den HeLa-Zellkernen. Diese Ergebnisse zeigen, dass UL4 aus den ursprünglichen HeLa-Kernen ins Zytoplasma der Heterokaryen exportiert und darauffolgend in die NIH3T3-Kerne importiert worden ist. Zusammenfassend heißt das, dass UL4 in der Lage ist, zwischen den beiden Zellkernen des Heterokaryons hin und her zu wandern und dass die daran beteiligte Export-Aktivität von der entsprechend mutierten NES vermittelt wird. Somit bestätigt und validiert der Heterokaryon-Assay den Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay. Letzterer ist folglich für das Hochdurchsatz-Verfahren geeignet.

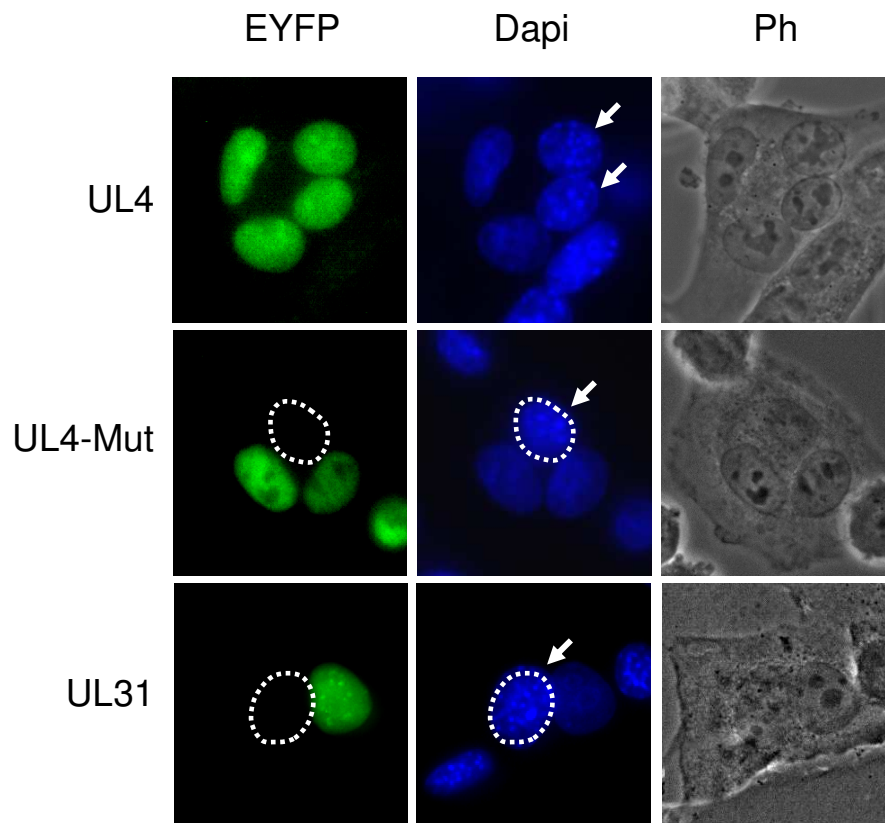


Abb. 31: Heterokaryon-Assay zur Analyse der nukleären Export-Aktivität des HSV-1-Proteins UL4. Die Herstellung der Heterokaryen erfolgte durch Fusion von transfizierten HeLa-Zellen (pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL4, pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL4-Mut oder pCMV-EYFP-NLS-FRB-UL31) mit der äquivalenten Menge an untransfizierten NIH3T3-Mauszellen. Die Proteinsynthese wurde 30 min vor der Zellfusion und während des gesamten Versuchs hinweg mit Anisomycin blockiert. 4 h nach der Fusion erfolgte die Fixierung der Zellen. Die Visualisierung der exprimierten Proteine erfolgte durch direkte Mikroskopie des autofluoreszierenden EYFPs. Nach Dapi-Färbung konnten die Mauszellkerne (mit Pfeilen gekennzeichnet) durch ihr Punktmuster gut von den gleichmäßig gefärbten humanen Zellkernen innerhalb der Heterokaryen unterschieden werden. Der Nachweis der gebildeten Heterokaryen erfolgte durch Phasenkontrast-(Ph) Mikroskopie. Aktiv exportierte Proteine wurden durch deren Anwesenheit, nicht exportierte Proteine durch deren Abwesenheit (durch gestrichelte Linien markiert) in den Mauszellkernen innerhalb der Heterokaryen bestimmt.

4.4.5 Der Export-Assay auf HSV-1-Proteom-Ebene

Wie bereits für UL4 detailliert dargestellt, wurden mit Ausnahme der für Membranproteine kodierenden Gene alle in der Laborkollektion befindlichen HSV-1-ORFs (Tab. 14) mit Hilfe des *Gateway*[®]-Systems in den generierten DEST-Vektor pCMV-EYFP-NLS-FRB-ccdB kloniert und mit Hilfe des neuen Assays analysiert. Die entsprechenden Fluoreszenzbilder sind in Abb. 32 dargestellt. Exportierte Proteine wurden nur dann als positiv im Hinblick auf eine vorhandene Export-Aktivität gewertet, wenn sie aufgrund der Immobilisierung am TGN vollständig dem Kern entzogen wurden. Proteine die nach Rapamycin-Zugabe teilweise am TGN und teilweise im Zellkern lokalisierten, wurden als negativ bewertet, obwohl eine Export-Aktivität trotzdem nicht vollkommen ausgeschlossen werden kann. Eine Zusammenfassung aller Ergebnisse ist in Tab. 20 dargestellt.

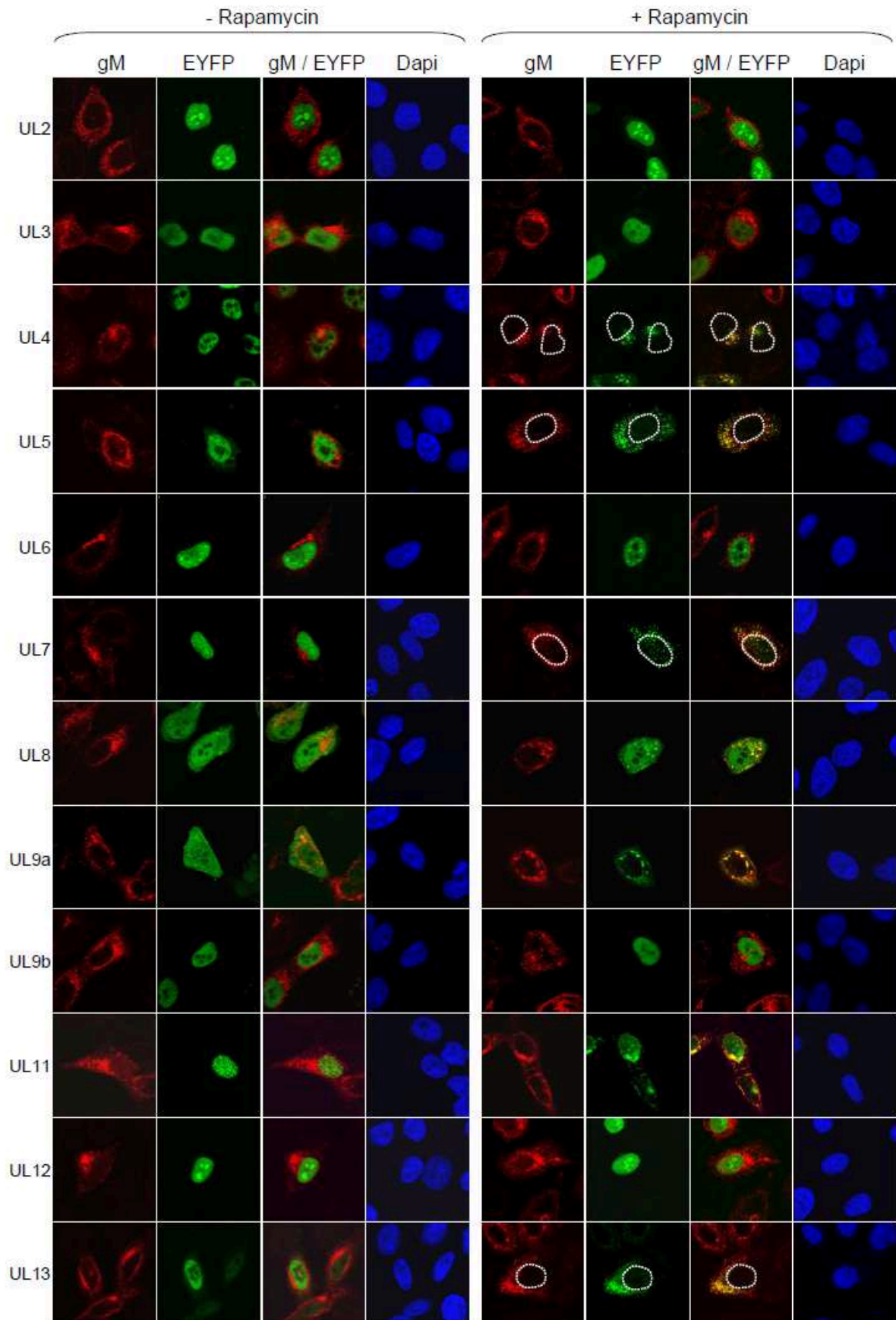


Abb. 32: Ergebnisse des Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assays aller löslichen HSV-1-Proteine.

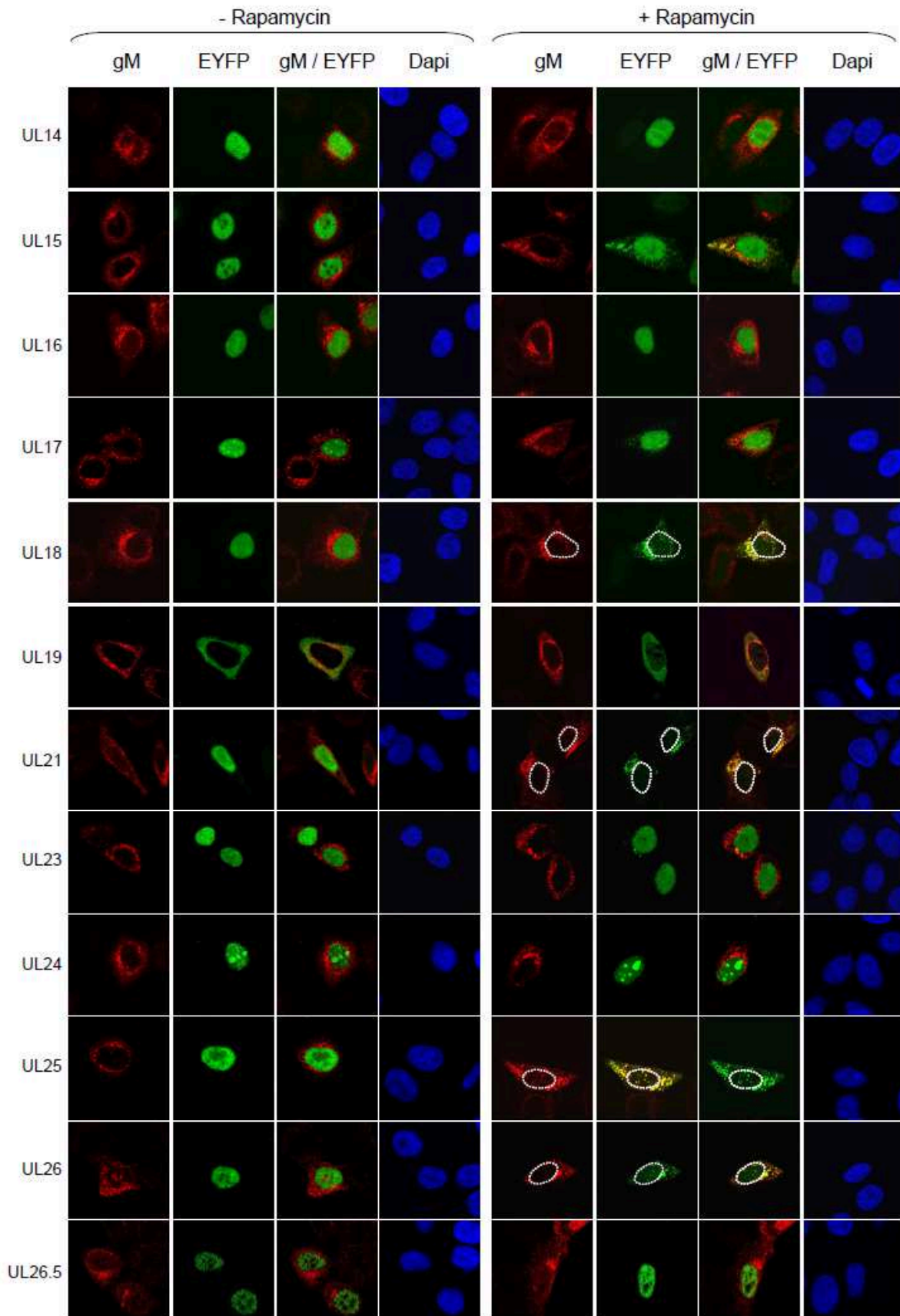


Abb. 32: Ergebnisse des Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assays aller löslichen HSV-1-Proteine.

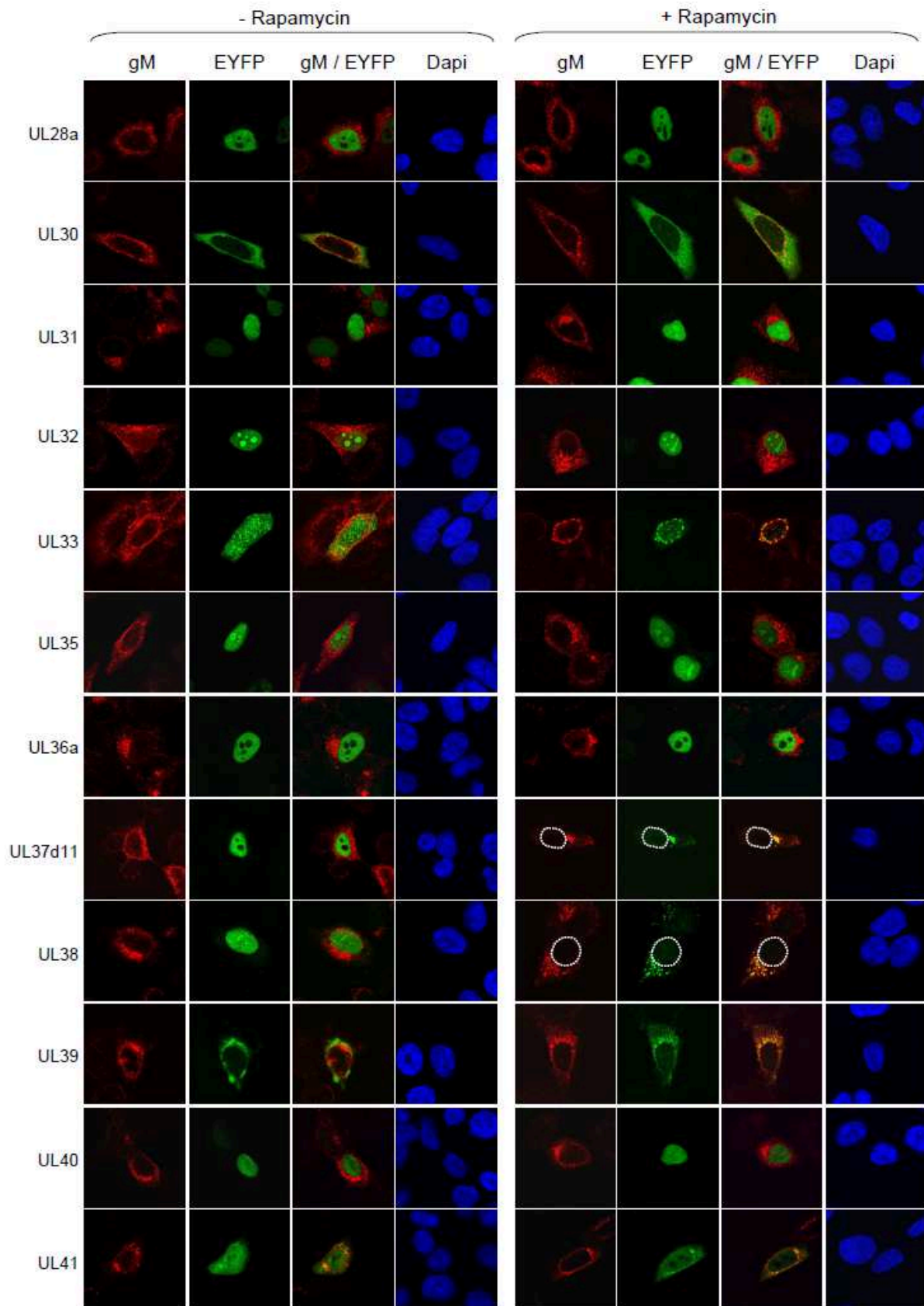


Abb. 32: Ergebnisse des Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assays aller löslichen HSV-1-Proteine.

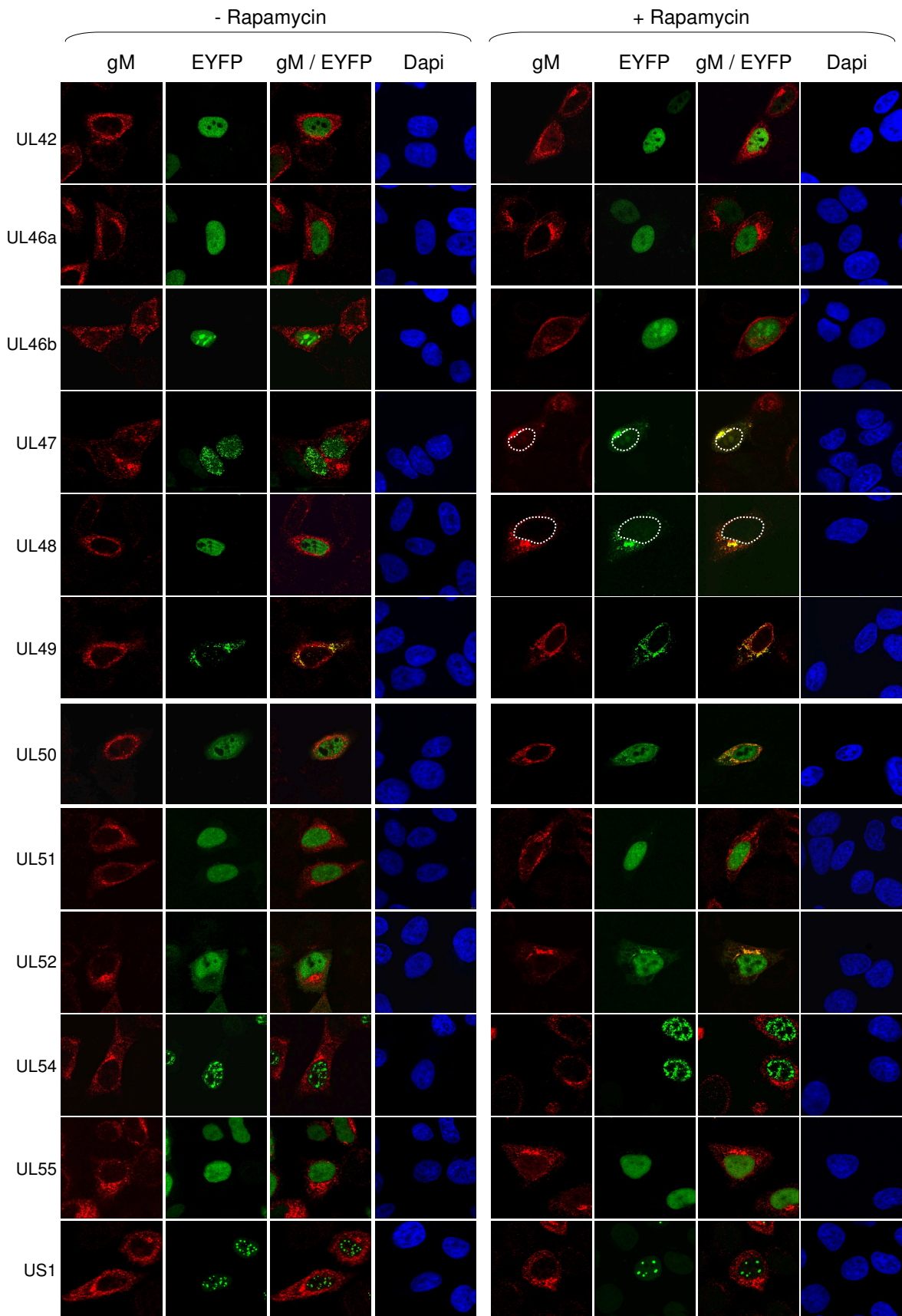


Abb. 32: Ergebnisse des Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assays aller löslichen HSV-1-Proteine.

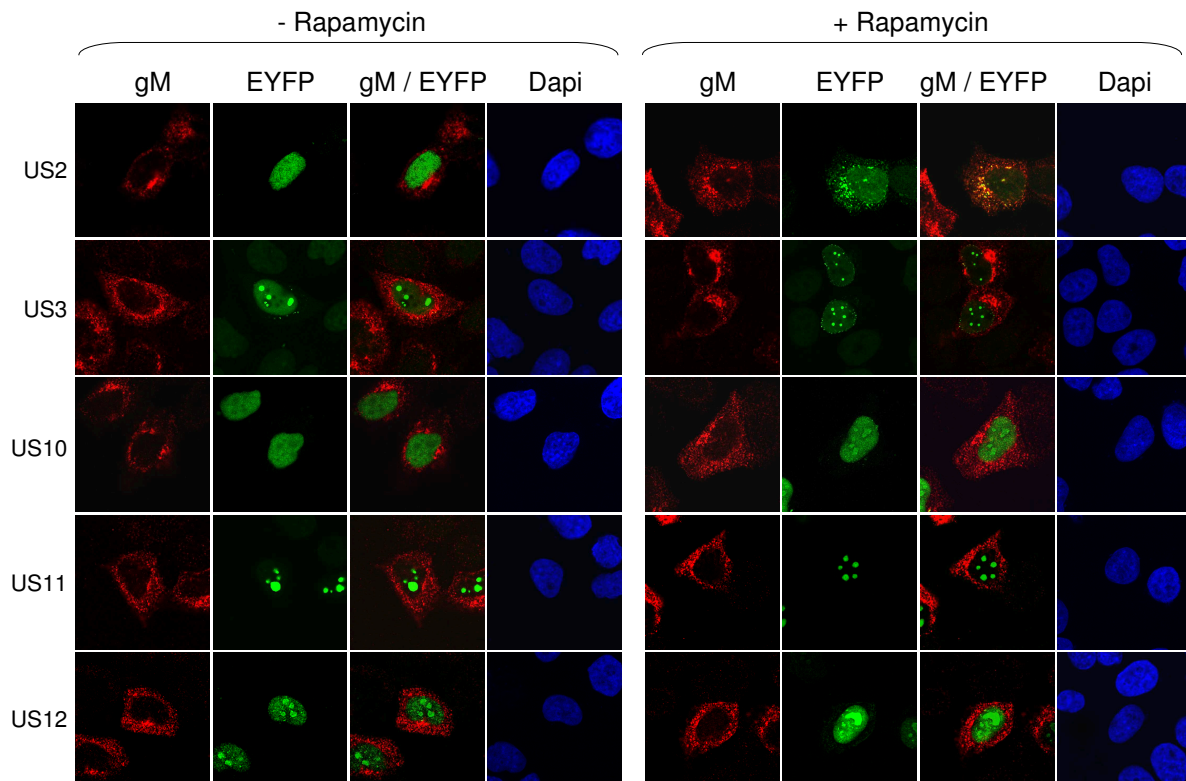


Abb. 32: Ergebnisse des Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assays aller löslichen HSV-1-Proteine. Zur Hochdurchsatz-Analyse wurden HeLa-Zellen mit pCMV-N-HA-UL10/gM-FKBP und dem entsprechenden pCMV-EYFP-NLS-FRB-ORF X für 20 h kotransfiziert. Nach Zugabe des Proteinsynthesehemmers Anisomycin wurden die Zellen ohne bzw. mit Rapamycin behandelt. Die Analyse erfolgte mit Hilfe indirekter Fluoreszenzmikroskopie unter Verwendung von Kaninchen-anti-gM-Primärantikörpern und Alexa594-gekoppelten-anti-Kaninchen-Sekundärantikörpern bzw. direkter Fluoreszenzmikroskopie über EYFP. Die Zellkerne wurden mittels Dapi-Färbung visualisiert. Aktiv exportierte Proteine wurden durch nukleäre Abwesenheit (durch gestrichelte Linien markiert) und Kollokalisierung mit gM am TGN, nicht exportierte Proteine durch nukleäre Anwesenheit bestimmt.

Tab. 20: Zusammenfassung der Ergebnisse des Rapamycin-induzierbaren Export-Assays für 54 HSV-1-Proteine und Proteinfragmente.

Export-Aktivität	Tegument-Proteine	Capsid-Proteine	Proteine anderer oder unbekannter Funktion
+	UL7, UL13, UL21, UL37, UL47, UL48	UL18, UL25, UL26, UL38	UL4, UL5
-	UL11, UL14, UL16, UL17, UL31, UL36a, UL41, UL46a, UL46b, UL51, US10, US11	UL6, UL26.5, UL35	UL2, UL3, UL8, UL9b, UL12, UL15, UL23, UL24, UL28a, UL32, UL40, UL42, UL50, UL52, UL54, UL55, US1, US2, US3, US12
Nicht auswertbar	UL36b, UL49	UL19	UL9a, UL30, UL33, UL39

Für 12 der insgesamt 54 löslichen HSV-1-Proteine konnte eine Export-Aktivität nachgewiesen werden. Von diesen gehören 6 zur Gruppe der Tegumentproteine und 4 zur Gruppe der Capsid-Proteine. 2 weitere Proteine mit Export-Aktivität sind UL4 und UL5. UL4 besitzt eine weitgehend unbekannte Funktion und UL5 eine enzymatische Funktion im

Helikase/Primase-Komplex. Dagegen zeigten 35 Proteine keine Export-Funktion und 7 konnten nicht analysiert werden. Letztere umfassen Proteine, die nicht exprimiert werden konnten, unabhängig von Rapamycin mit gM interagierten oder schon vor Rapamycin-Zugabe eine zytoplasmatische Lokalisation aufwiesen. Da das Proteinfragment UL36b nicht exprimiert werden konnte, fehlen in Abb. 32 entsprechende Fluoreszenzbilder. Auch UL49 konnte im Export-Assay nicht ausgewertet werden, da es schon vor Rapamycin-Zugabe mit gM am TGN kolokalisierte. Dies steht im Einklang mit Ergebnissen aus einem intraviralen Y2H-Screen, mit dessen Hilfe eine Interaktion zwischen UL49 und gM gezeigt werden konnte (300). Bei UL9a, UL19, UL30, UL33, und UL39 handelt es sich um Proteine, die schon vor Rapamycin-Zugabe eine zytoplasmatische Lokalisation aufwiesen und somit ebenfalls nicht analysiert werden konnten. Aufgrund der Tatsache, dass die Rapamycin-vermittelte Dimerisierung von FRB und FKBP auf der zytoplasmatischen Seite des TGN erfolgt, war die Kolokalisation von UL9a, UL33 und UL39 mit gM am TGN nach Rapamycin-Zugabe somit nicht unerwartet. Dagegen kam es bei UL19 und UL30 auch bei Anwesenheit von Rapamycin zu keiner Kolokalisation mit gM am TGN, was auf eine Bindung und daraus resultierende Immobilisierung dieser Proteine an zytoplasmatische Strukturen hindeutet (Abb. 32). Proteine wie UL11, UL15 und US2, die nach Rapamycin-Zugabe sowohl im Kern, als auch am TGN lokalisierten, wurden als negativ bewertet (Abb. 32), da eine sichtbare Akkumulation am TGN schon durch eine geringe Menge an zytoplasmatischem Protein hervorgerufen werden kann.

Abb. 33 zeigt eine vergleichende Analyse der 12 identifizierten *Shuttling*-Proteine mit Proteinen, die eine vorhergesagte NES und/oder eine nukleäre Lokalisation bzw. Funktion aufwiesen. Insgesamt konnten für 31 HSV-1-Proteine leucinreiche NES vorhergesagt werden. Die Vorhersage wurde mittels bioinformatischer Methoden [<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES> ; Vorhersage nach (22)] von Dr. C. Friedel (LMU München) durchgeführt. Dabei handelt es sich um 23 lösliche Proteine, die in Abb. 33 dargestellt sind, und 7 integrale Membranproteine (UL10, UL34, UL43, UL44, UL53, US8 und US5), die aufgrund ihrer leucinreichen Transmembranregionen mit hoher Wahrscheinlichkeit falsch prognostiziert wurden. Infolgedessen wurden diese 7 Proteine vor der vergleichenden Analyse entfernt. Für RS1 konnte ebenfalls eine klassische NES vorhergesagt werden. Da jedoch das entsprechende Gen in der laboreigenen Kollektion nicht verfügbar war, konnte es im Export-Assay nicht analysiert werden und fehlt in Abb. 33. Für 10 der 12 im Export-Assay ermittelten *Shuttling*-Proteine konnten klassische Exportsignale vorhergesagt werden (Abb. 33). Da Proteine zuerst in den Zellkern gelangen müssen, um exportiert werden zu können, macht auch ein Vergleich mit HSV-1-Proteinen Sinn, die eine nukleäre Lokalisation bzw. Funktion besitzen. Von 44 herpesviralen Proteinen mit nukleärer Lokalisation oder Funktion, wurde für 20 zwar eine *Shuttling*-Aktivität vorhergesagt, die aber nur für 7 auch experimentell

bestätigt werden konnte. Die Ermittlung herpesviraler Proteine mit nukleären Funktionen stammen aus Literaturrecherchen (Quellen sind Tab. 2 zu entnehmen). Daten zur nukleären Lokalisation stammen aus indirekten Immunfluoreszenz-Untersuchungen dieser Arbeit (Abb. 13) und Salsman *et al.*, 2008 (272). Dabei wurden Proteine mit pan-zellulärer, pan-nukleärer und sub-nukleärer Lokalisation betrachtet.

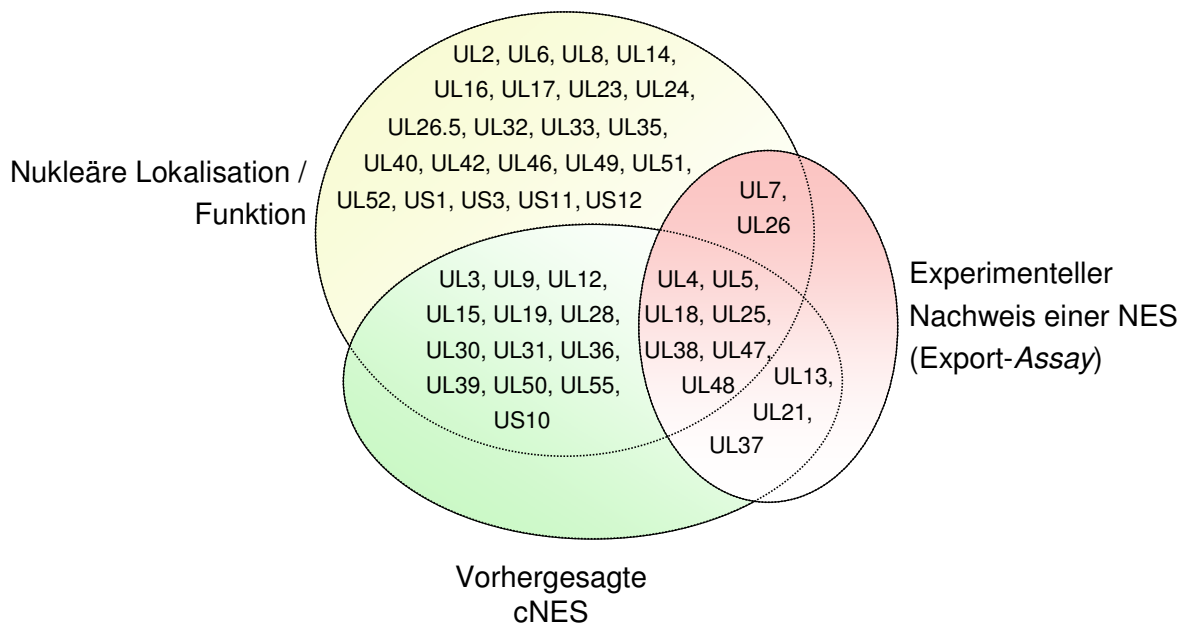


Abb. 33: Vergleichende Analyse der identifizierten HSV-1-Proteine mit nukleärer Export-Aktivität. Dargestellt sind die Schnittmengen der HSV-1-Proteine, die eine nukleäre Export-Aktivität (rot), eine vorhergesagte cNES (grün) oder eine nukleäre Lokalisation (pan-zellulär, pan-nukleär, sub-nukleär) bzw. Funktion (gelb) aufweisen. Daten zur nukleären Lokalisation stammen von Salsman *et al.*, 2008 (272) und indirekten Immunfluoreszenz-Untersuchungen dieser Arbeit (Abb. 13). Quellen zu nukleären Protein-Funktionen sind Tab. 2 zu entnehmen. cNES in HSV-1-Proteinen wurden mittels bioinformatischer Methoden vorhergesagt (Dr. C. Friedel; LMU München). Membranproteine und für den Export-Assay nicht verfügbare Proteine wurden nicht berücksichtigt.

Wie bei UL4 wurde die Funktionalität vorhergesagter NES in allen weiteren Proteinen mit Export-Aktivität durch zielgerichtete Mutagenese untersucht. Dabei handelte es sich um die HSV-1-Proteine UL5, UL13, UL18, UL21, UL25, UL37, UL38, UL47 und UL48 (Abb. 34A).

Eine Besonderheit stellte jedoch das in allen Herpesviren konservierte Protein UL26 dar. Die Tatsache, dass UL26 ohne vorhergesagtes NES im Export-Assay positiv war, UL26.5 dagegen nicht, erhöhte die Motivation zur Suche nach der verantwortlichen NES. Mit Hilfe alternativer Transkriptionsstartpunkte kodiert der UL26 ORF für zwei verschiedene Proteine UL26 und UL26.5 (189). Während beide Proteine einen identischen C-Terminus aufweisen, besitzt UL26 zusätzliche 306 Aminosäuren am N-Terminus (Abb. 34B). In diesem Bereich konnte mittels bioinformatischer Methoden in verschiedenen UL26-Orthologen eine klassische NES vorhergesagt werden (Dr. C. Friedel; LMU München). Ein anschließender Vergleich der entsprechenden Sequenzen ermöglichte die Identifizierung einer potentiellen

NES in UL26 von HSV-1, die der Consensus-Sequenz klassischer NES entspricht (Abb. 34C). Infolgedessen wurde UL26 ebenfalls für eine weitere Analyse herangezogen.

A

HSV-1-Protein	Vorhergesagte NES (Wildtyp-Sequenz)	Mutierte NES
UL5	²¹² L _{x2} L _{x3} LxL ²²¹	²¹² L _{x2} A _{x3} AxA ²²¹
UL13	⁴⁹² L _{x3} L _{x3} LxL ⁵⁰²	⁴⁹² L _{x3} A _{x3} AxA ⁵⁰²
UL18	¹³⁰ L _{x2} L _{x3} LxF ¹³⁹	¹³⁰ L _{x2} A _{x3} AxA ¹³⁹
UL21	⁴⁸² L _{x2} V _{x2} LxL ⁴⁹⁰	⁴⁸² L _{x2} A _{x2} AxA ⁴⁹⁰
UL25	⁴⁶³ L _{x3} L _{x2} LxL ⁴⁷²	⁴⁶³ L _{x3} A _{x2} AxA ⁴⁷²
UL26*	¹²¹ I _{x3} L _{x2} VxL ¹³⁰	¹²¹ I _{x3} A _{x2} AxA ¹³⁰
UL37	²⁵² L _{x3} L _{x2} LxL ²⁶¹	²⁵² L _{x3} A _{x2} AxA ²⁶¹
UL38 (1)	³⁴² L _{x2} L _{x3} LxI ³⁵¹	³⁴² L _{x2} A _{x3} AxA ³⁵¹
UL38 (2) *	²⁹² F _{x2} L _{x3} LxL ³⁰¹	²⁹² F _{x2} A _{x3} AxA ³⁰¹
UL47	²⁸⁷ L _{x3} V _{x2} LxI ²⁹⁶	²⁸⁷ L _{x3} A _{x2} AxA ²⁹⁶
UL48	²²² L _{x3} L _{x3} LxL ²³²	²²² L _{x3} A _{x3} AxA ²³²
Consensus-Sequenz: $\Phi^1(x)_{2-3}\Phi^2(x)_{2-3}\Phi^3x\Phi^4$		

* Vorhersage erfolgte nicht bioinformatisch

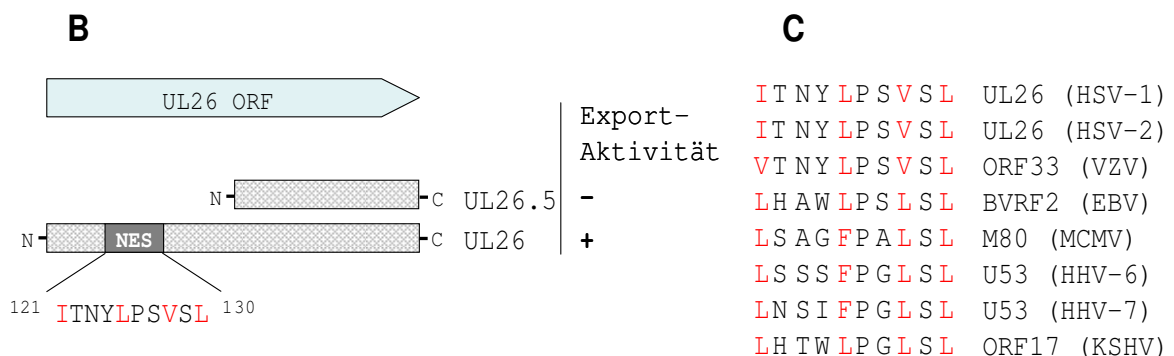


Abb. 34: Weiterführende Analyse potentieller NES der im Export-Assay identifizierten Proteine. **A)** Mittels bioinformatischer Methoden vorhergesagte, klassische NES [http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES (166); Vorhersage nach (22), durchgeführt von Dr. C. Friedel (LMU München)] der im Export-Assay identifizierten Proteine. Die Vorhersage der zweiten potentiellen NES von UL38 [UL38 (2)*] und der von UL26 erfolgte nicht mittels bioinformatischer Methoden, sondern wurde per Auge ermittelt. Durch zielgerichtete Mutagenese wurden jeweils die letzten drei hydrophoben Reste (Φ^2 - Φ^4) durch Alanin ersetzt. **B)** Der UL26 ORF kodiert zwei verschiedene Proteine, UL26 und UL26.5. Das im Vergleich zu UL26.5 aktiv exportierte UL26 besitzt zwischen den Aminosäuren 121-130 eine typisch klassische NES, **C)** die in orthologen Proteinen anderer Herpesvirus-Vertreter konserviert ist. Auch für UL26 wurden mittels zielgerichteter Mutagenese die letzten drei hydrophoben Reste durch Alanin ersetzt.

Anschließend wurden alle 11 NES-Mutanten erneut im Export-Assay mit und ohne Rapamycin analysiert. Die entsprechenden Wildtyp-Proteine wurden zur Kontrolle parallel mitgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 35 dargestellt.

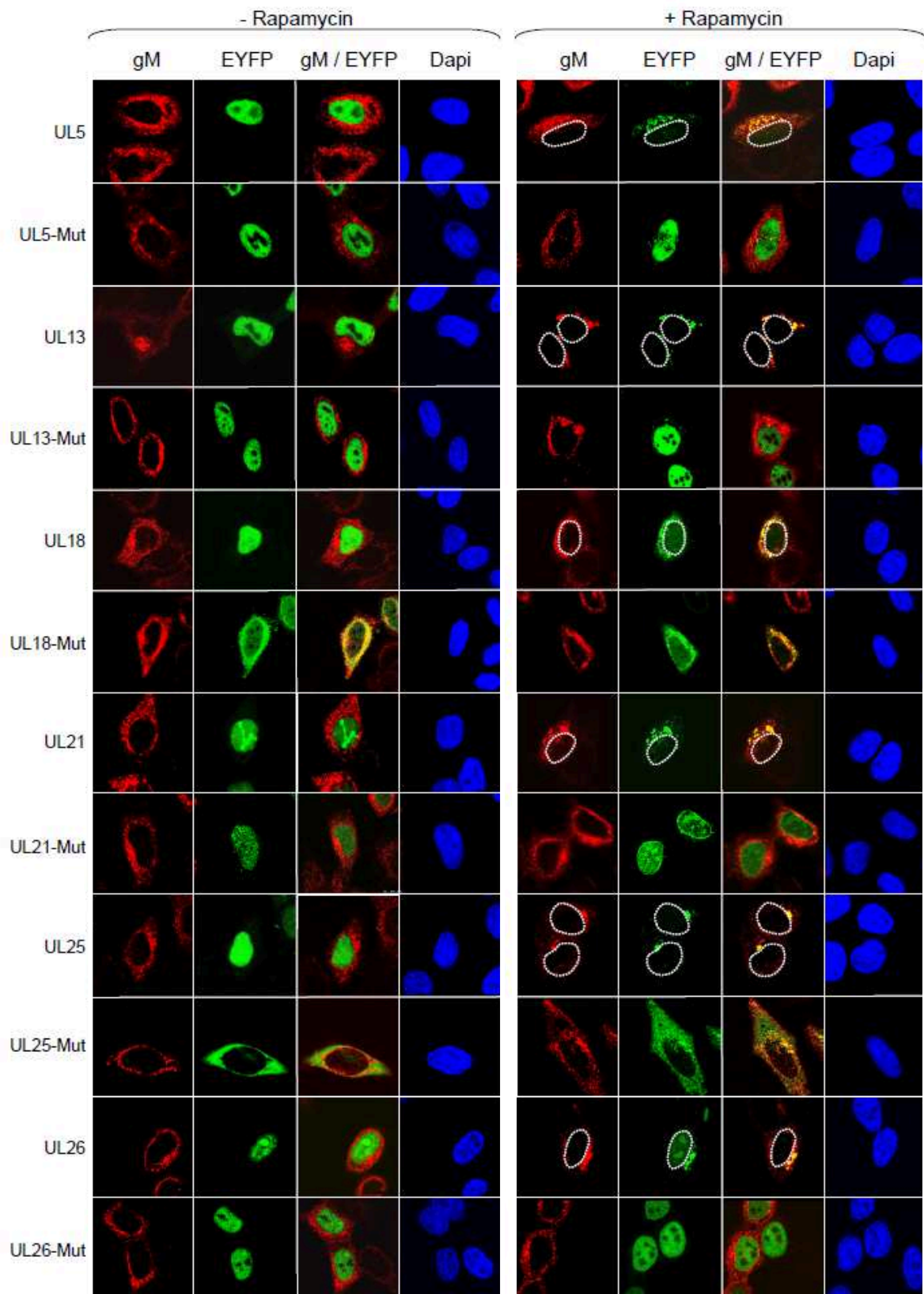


Abb. 35: *Shuttling*-Proteine und entsprechende NES-Mutanten im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay.

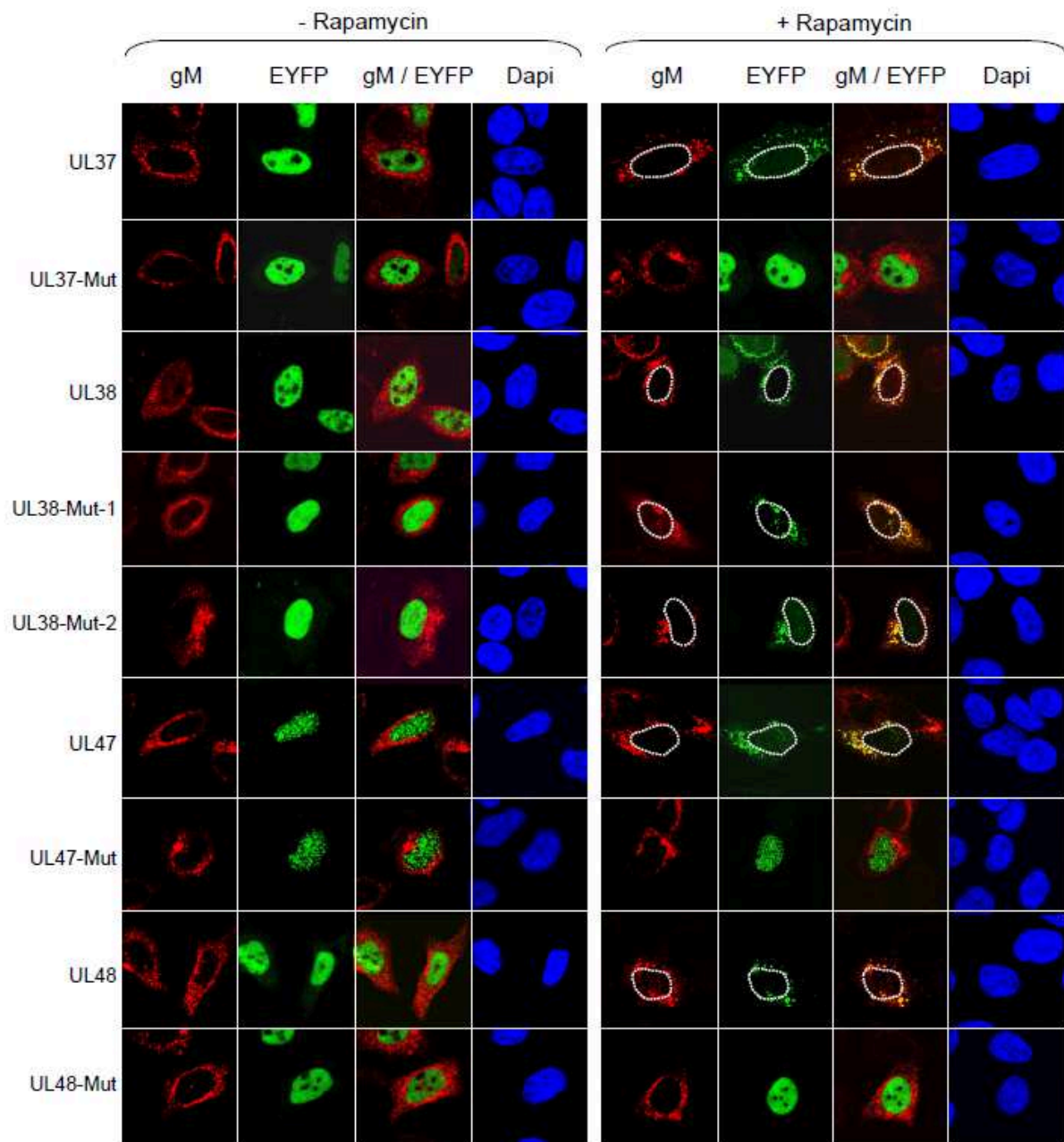


Abb. 35: Shuttling-Proteine und entsprechende NES-Mutanten im Rapamycin-induzierbaren nukleären Export-Assay. HeLa-Zellen wurden mit pCMV-N-HA-UL10/gM-FKBP und dem entsprechenden pCMV-EYFP-NLS-FRB-ORF X für 20 h kotransfiziert. Nach Zugabe des Protein-synthesehemmers Anisomycin wurden die Zellen ohne bzw. mit Rapamycin behandelt. Die Analyse erfolgte mit Hilfe indirekter Fluoreszenzmikroskopie unter Verwendung von Kaninchen-anti-gM-Primärantikörpern und Alexa594-gekoppelten-anti-Kaninchen-Sekundärantikörpern bzw. direkter Fluoreszenzmikroskopie über EYFP. Die Zellkerne wurden mittels Dapi-Färbung visualisiert. Aktiv exportierte Proteine wurden durch nukleäre Abwesenheit (durch gestrichelte Linien markiert) und Kolokalisation mit gM am TGN, nicht exportierte Proteine durch nukleäre Anwesenheit bestimmt.

Von insgesamt 10 untersuchten Shuttling-Proteinen konnte die Export-Aktivität für 7 Proteine mit spezifischen Signalsequenzen in Verbindung gebracht werden. Dabei handelte es sich um die HSV-1-Proteine UL5, UL13, UL21, UL26, UL37, UL47 und UL48. Während die Wildtyp-Proteine nach Rapamycin-Zugabe mit gM-FKBP am TGN kolokalisierten, wurden die jeweiligen NES-Mutanten im Zellkern zurückgehalten. Letztere hatten durch den Verlust ihrer funktionellen NES die Fähigkeit zum nukleären Export verloren (Abb. 35). Ob die potentiellen NES von UL18 und UL25 für die nukleäre Export-Aktivität der beiden Proteine verantwortlich sind, konnte angesichts der bereits vor Rapamycin-Zugabe bestehenden zytoplasmatischen Lokalisation der entsprechenden NES-Mutanten nicht gezeigt werden. Die Mutagenese der bioinformatisch vorhergesagten NES in UL38 (UL38-Mut-1) hatte keinen Einfluss auf die Export-Aktivität des Proteins. Sowohl UL38 als auch die UL38-Mut-1 wurden nach Rapamycin-Zugabe vollständig dem Zellkern entzogen und kolokalisierten mit gM-FKBP am TGN. Aus diesem Grund wurde die DNA-Sequenz von UL38 nach einer weiteren potentiellen NES ohne bioinformatische Methoden per Auge durchsucht. Dabei wurde eine NES ermittelt, die der Consensus-Sequenz klassischer NES entspricht [Abb. 34, UL38 (2)*]. Wie jedoch in Abb. 35 zu erkennen ist, führte auch die zielgerichtete Mutagenese dieser Sequenz zu keinem Verlust der Export-Aktivität von UL38 (UL38-Mut-2). Für den Fall, dass beide potentiellen NES in UL38 funktionell sind, könnte ihre Redundanz nur durch gleichzeitige Mutagenese beider NES unterbunden werden. Eine andere Möglichkeit wäre, dass eine weitere, nicht vorhersagbare NES für die Shuttling-Aktivität von UL38 verantwortlich ist. Aufgrund des neuen Hochdurchsatz-Assays konnte von insgesamt 12 ermittelten *Shuttling*-Proteinen in HSV-1 die Export-Aktivität für 8 Proteine auf spezifische Signalsequenzen zurückgeführt werden.

5 Diskussion

Entscheidende Vorgänge des HSV-1-Lebenszyklus finden im Zellkern statt, für die eine Vielzahl an herpesviralen Proteinen zwischen Kern und Zytoplasma transportiert werden müssen. Dazu bedient sich das Virus des nukleo-zytoplasmatischen Transport-Systems der Wirtszelle. Man kennt die Transportfaktoren bzw. Transportsignale, die den nukleo-zytoplasmatischen Transport vermitteln, jedoch nur für eine geringe Zahl von HSV-1-Proteinen, zu denen z. B. das in den Kern importierte ICP22 (US1); (292) und das zwischen Kern und Zytoplasma aktiv transportierte UL47 (70) gehören. Außerdem ist die räumlich-zeitliche Verteilung der herpesviralen Proteine in den 3 unterschiedlichen Replikationsphasen noch weitgehend unbekannt. Infolgedessen war die Grundlage dieser Arbeit eine genomweite Y2H-Analyse zwischen allen herpesviralen Proteinen und humanen Transportfaktoren der Importin α - und β -Familien. Die daraus resultierenden Ergebnisse wurden anschließend durch weitere Hochdurchsatz-Methoden sowohl validiert als auch ergänzt und mit Hilfe einiger Beispiele detaillierter untersucht.

5.1 Die Identifizierung von Interaktionen zwischen humanen Transportfaktoren und HSV-1-Proteinen mittels Y2H und LUMIER

5.1.1 Kritische Betrachtung des Hefe-2-Hybrid (Y2H)-Systems

Das Y2H-System bietet einige Vorteile gegenüber anderen Methoden zur Identifikation von Protein-Protein-Interaktionen. Da es kostengünstig, relativ einfach und schnell durchführbar ist, ist das System leicht automatisierbar und somit als Hochdurchsatz-Methode geeignet. Zudem erlaubt es die Analyse von Protein-Protein-Interaktionen in *in vivo*-ähnlichen Verhältnissen. So können Proteine in Hefezellen, wie auch in anderen eukaryontischen Zellen, u. a. durch Glykosylierung, Palmitoylierung oder Phosphorylierung posttranslational modifiziert und mit Hilfe von Chaperonen korrekt gefaltet werden. In Anbetracht klassischer biochemischer Untersuchungen, wie der Affinitätsreinigung (z. B. TAP tandem affinity purification) mit anschließender Massenspektrometrie, bei welchen Proteine innerhalb ganzer Komplexe detektiert werden, die folglich nicht notwendigerweise direkt in Wechselwirkung treten müssen, können mit Hilfe des Y2H-Assays meist direkte (binäre) Interaktionen identifiziert werden. Während bei der Affinitätsreinigung nur biochemisch stabile und häufig auftretende Protein-Protein-Interaktionen gezeigt werden können, ist das Y2H-System in der Lage, sowohl schwache als auch transiente Interaktionen zu detektieren

(9,317,343). Letzteres ist im Zusammenhang mit dieser Arbeit von Bedeutung, da der im Zytoplasma gebildete Importin/Substrat-Komplex nach Transfer in den Zellkern zerfällt, wo erst der eigentliche Nachweis der Protein-Protein-Interaktion stattfindet.

Neben seinen Vorteilen weist das Y2H-System wie jedes andere artifizielle Testsystem einige Nachteile auf. Aufgrund der eingeführten Modifikationen können sowohl falsch negative als auch falsch positive Interaktionen auftreten, die meist durch eine veränderte Proteinfaltung der zu untersuchenden Proteine herbeigeführt werden. Dafür kann es mehrere Ursachen geben. Da die Interaktion der zu untersuchenden Proteine im Zellkern stattfinden muss, ist es möglich, dass sich Proteine in diesem Milieu anders falten als im Bereich der Zelle, in dem sie normalerweise vorkommen. Zudem können die zur Reporteraktivierung N-terminal fusionierten Tags oder posttranslationale Modifikationen der Proteine in den Hefezellen, die stark von denen humaner Zellen abweichen, zu veränderten Bindeeigenschaften beitragen. Ein Grund für das Auftreten falsch negativer Interaktionen ist, dass zu analysierende Proteine in Wechselwirkung treten können, die in ihrer natürlichen Zellumgebung räumlich und/oder zeitlich nicht nebeneinander auftreten würden, da sie im Y2H-Assay koexprimiert und mit Hilfe integrierter nukleärer Lokalisationssignale in den Kern importiert werden. Ein weiterer Grund, der zu falsch negativen Befunden im Y2H-System führen kann, ist eine fehlende Expression der Fusionsproteine. Da Untersuchungen zur Expression einzelner Proteine im Falle einer Hochdurchsatz-Analyse jedoch zu aufwendig und somit nicht durchführbar sind, gibt es keine Gewähr für die erfolgreiche Proteinsynthese. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Y2H-Analyse zwischen 23 Transportfaktoren der Importin α - und β -Familien und 91 HSV-1-Proteinen bzw. Proteinfragmenten lieferte insgesamt nur 24 Interaktionen. Dabei waren lediglich 6 verschiedene Transportfaktoren und 9 verschiedene virale Proteine beteiligt. Bei den bisher in der Literatur beschriebenen HSV-1-Proteinen mit nukleären Lokalisationssignalen handelt es sich um RL1, UL9, UL15, UL23, UL30, UL36, UL38, UL42, UL47, UL54 und US1 (1,2,4,43,65,70,117,192,201,212,292,338). Von diesen konnten lediglich UL15, UL38 und US1 in dieser Studie identifiziert werden. Aufgrund der Tatsache, dass essentielle Prozesse des herpesviralen Lebenszyklus im Zellkern der Wirtszelle stattfinden, muss ein ständiger Austausch von Virusproteinen zwischen Zytoplasma und Zellkern gewährleistet sein. Infolgedessen muss davon ausgegangen werden, dass die Anzahl der identifizierten herpesviralen Interaktoren mittels Y2H nicht alle physiologisch vorkommenden Interaktionen abdeckt.

Abgesehen von den allgemeinen Ursachen für falsch negative Interaktionen müssen einige Aspekte im Zusammenhang dieser Arbeit gesondert betrachtet werden. Neben Volllänge-HSV-1-Proteinen wurden auch Proteinfragmente eingesetzt, da exponierte Transmembrandomänen wegen ihrer starken Hydrophobizität oder zu große Fusionsproteine Interaktionen im Y2H stören können. Diese artifizielle Fragmentierung kann zu veränderten

Proteinstrukturen und somit zu veränderten Bindeeigenschaften führen. Dagegen wurden die Transportfaktoren, trotz ihrer meist auffallenden Größe, in voller Länge eingesetzt. Um zumindest weitreichende Konformationsänderungen der Transportfaktoren ausschließen zu können, wurden diese zunächst in einem Y2H-Vorversuch auf Agarplatten auf Interaktion mit der kleinen GTPase Ran untersucht, da die Wechselwirkung mit Ran ein gemeinsames charakteristisches Merkmal aller Vertreter der Importin β -ähnlichen Transportfaktoren ist. Hierbei konnten für alle Rezeptoren Interaktionen mit Ran gezeigt werden. Dies spricht zwar für eine weitgehend physiologische Funktionalität der in den Hefezellen exprimierten und N-terminal *getaggt* Rezeptoren, kann jedoch nicht zweifellos eine vollständig korrekte Proteinfaltung garantieren. Ein weiterer Grund für falsch negative Ergebnisse könnte auf der Tatsache beruhen, dass der im Zytoplasma gebildete Importin/Substrat-Komplex unmittelbar nach Transfer in den Zellkern dissoziiert, in dem erst der eigentliche Nachweis der Protein-Protein-Interaktion stattfindet. Da mittels Y2H auch transiente Interaktionen nachweisbar sind, sollte es auch für dieses Projekt geeignet gewesen sein. In einem Vorversuch konnte u. a. die Interaktion zwischen dem bekannten zellulären Import-Substrat RpS7 (ribosomales Protein S7) und den Importinen IPO5, IPO7, KPNB1 und TNPO1 mittels Y2H bestätigt werden. Trotzdem kann im Einzelfall nicht ausgeschlossen werden, dass die nur kurzfristig bestehende Interaktion des Importin/Substrat-Komplexes im Zellkern die Detektion mittels Y2H verhindert. Für die geringe Anzahl identifizierter Interaktionen müssen auch noch weitere Aspekte betrachtet werden. Aufgrund hoher Autoaktivität konnten 7 Transportfaktoren (KPNA1-KPNA6 und IPO13) im Y2H nur als Prey eingesetzt werden, da ihre autoaktivierenden Eigenschaften als Baits auch mit 10 mM 3-AT nicht unterdrückt werden konnten. Dies kann damit erklärt werden, dass die Gal4-Aktivierungsdomäne, die vom pGADT7-DEST Vektor kodiert wird, an eine klassische nukleäre Lokalisationssequenz (cNLS) fusioniert ist. Obwohl auch die Gal4-DNA-Bindedomäne eine cNLS besitzt, konnte keine Wechselwirkung mit den α -Importinen festgestellt werden. Wahrscheinlich lassen die sterischen Gegebenheiten der beiden Fusionsproteine in diesem Kontext keine Interaktionen zu. Weiterhin können zelluläre Transportfaktoren der Hefe mit den heterogen exprimierten Transportfaktoren um die Bindung mit den herpesviralen Cargos konkurrieren, wodurch eine Interaktion im Y2H möglicherweise nicht detektiert werden kann. Außerdem können heterogen exprimierte Proteine für Hefen toxisch wirken, was unter Umständen ebenfalls zu nicht detektierbaren Interaktionen führen kann. Bei jedem Versuch mitgeführte Wachstumskontrollen können dies weitgehend ausschließen.

Obwohl im Y2H-Assay nur sehr wenige Interaktionen ermittelt werden konnten, darf die Möglichkeit falsch positiver Interaktionen nicht außer Acht gelassen werden. Autoaktive Proteine können im Y2H-Assay zu falsch positiven Ergebnissen beitragen, wenn die zu untersuchenden Proteine unabhängig voneinander die Transkription des Reportergens

induzieren können. Mit Hilfe entsprechender Vortests aller 23 Transportfaktoren und HSV-1-Proteinen mit den entsprechenden Leervektoren konnten falsch positive Ergebnisse aufgrund von Autoaktivität weitgehend ausgeschlossen werden. Trotzdem müssen die positiven Interaktionen in Bezug auf ihre Qualität mit einer weiteren Methode verifiziert werden.

5.1.2 Verifizierungsmöglichkeiten

Zur Verifizierung der mittels Y2H neu identifizierten Protein-Protein-Interaktionen wurde der LUMIER-Assay angewendet. Diese Methode ist der häufig verwendeten Co-Immunopräzipitation (Co-IP) sehr ähnlich. Dabei werden zwei potentielle Interaktionspartner, fusioniert an zwei verschiedene *Tags*, in Säugerzellen koexprimiert und anschließend durch die Antikörper-vermittelte Bindung eines der beiden Interaktionspartner an eine Matrix aus dem Lysat gereinigt. Ein Vorteil des LUMIER-Assays gegenüber dem Y2H-Assay ist, dass die beiden Proteine in ihrem natürlichen Milieu, d. h. sowohl in Säugerzellen als auch im entsprechenden Zell-Kompartiment in Wechselwirkung treten können. Im Gegensatz zur Co-IP eignet sich der LUMIER-Assay für Hochdurchsatz-Analysen, da der Nachweis der Interaktion nicht mittels Western Blot, sondern über die Messung des copräzipitierten *Renilla reniformis* Luziferase-Fusionsproteins stattfindet. Da diese Messung extrem sensitiv ist, reichen geringe Mengen exprimierter Luziferase aus, so dass die Methode problemlos im Flüssigmedium und 96-*well*-Format durchgeführt werden kann. Anders als im Y2H-Assay werden nur biochemisch stabile Interaktionen nachgewiesen. Wie im Y2H ist auch im LUMIER-Assay der Einsatz N-terminaler *Tags* notwendig, die eine veränderte Proteinfaltung hervorrufen können. Daraus folgende falsch negative Ergebnisse können mit Hilfe der bidirektionalen Analyse der beteiligten Proteine teilweise verringert werden. So wurden in dieser Studie alle Protein-Protein-Interaktionen mit beiden *Tags* an beiden Proteinen kreuzweise getestet. Dies gilt sowohl für den Y2H- als auch für den LUMIER-Assay. Wie die Ergebnisse des Y2H-Assays zeigen, interagierten die Proteine nur in einer der beiden getesteten Richtungen. Offensichtlich verändern sich die Proteine aufgrund der verschiedenen *Tags* in ihrem Interaktionsverhalten. Eine weitere Möglichkeit, die Anzahl falsch negativer Ergebnisse zu verringern, könnte somit darin bestehen, die Proteine zusätzlich mit C-terminal fusionierten *Tags* bidirektional zu untersuchen.

Die größte Sorge in Hochdurchsatz-Y2H-Analysen betrifft die geringe Überlappung identifizierter Interaktionen in vergleichenden Analysen. In einer Gegenüberstellung verschiedener Validierungsmöglichkeiten konnten nur 25 bis 30 % der Y2H-Interaktionen bestätigt werden (9,60). Studien von Hochdurchsatz-Analysen zeigten jedoch, dass die geringe Überlappung der Daten eher das Ergebnis geringer Sensitivität als das geringer

Spezifität ist (9,317,343). Alle Hochdurchsatz-Methoden besitzen technische Grenzen, da die Bedingungen für einzelne Proteine nicht optimiert werden können. Eine gute technische Optimierung und eine Kombination mit anderen Testmethoden kann die niedrige Übereinstimmung enorm verringern (9). In dieser Arbeit konnten von 22 Interaktionen, die mit Hilfe des Y2H-Assays identifiziert wurden, 18 mittels LUMIER bestätigt werden. Dies ergibt eine Verifizierungsrate von 82 %, die weit über dem gezeigten Bestätigungsbereich von 25 und 30 % liegt. Außerdem wurden alle Analysen mehrfach wiederholt und positive Interaktionen neben dem Hochdurchsatz-Assay in Flüssigmedium zusätzlich noch einzeln auf Agarplatten untersucht. Nur Interaktionen, die eine Aktivität beider Reporter Gene (*HIS3*, *MEL1*) auslösten, wurden als positiv bewertet. Diese Gründe könnten u. a. für die hohe Verifizierungsrate der Interaktionen in dieser Studie verantwortlich sein.

Der Einsatz alternativer Methoden zur Verifizierung ermittelter Protein-Protein-Interaktionen führt zu einer zuverlässigeren Datenlage. Neben dem LUMIER-Assay gibt es noch weitere Methoden wie z. B. der BRET-Assay (*Bioluminescence resonance energy transfer*) und der sog. PCA (*protein fragment complementation assay*). Beide Methoden basieren auf der räumlichen Nähe zweier potentieller Interaktionspartner. Der Nachweis einer Protein-Protein-Interaktion erfolgt beim BRET-Assay durch strahlungsfreie Energieübertragung von einem *Tag* auf den anderen, wodurch eine spezifische Emission gemessen werden kann, beim PCA geschieht dies durch Rekonstitution eines Reporterproteins, wie z. B. GFP oder YFP (*green, yellow fluorescent protein*).

Daneben können die ermittelten Interaktionen auch mit Hilfe bereits vorhandener Informationen aus der Literatur hinsichtlich ihrer physiologischen Relevanz bewertet werden. Zudem können bioinformatische Analysen, der fluoreszenzmikroskopische Nachweis der Kolo-kalisierung, Mutationsstudien oder der Vergleich mit orthologen Proteinen dazu beitragen, physiologisch sinnvolle Interaktionen zu bestätigen, wodurch die gewonnenen Daten in einen besseren Zusammenhang gebracht werden können.

5.1.3 Protein-Protein-Interaktionen zwischen zellulären Transportfaktoren und HSV-1-Proteinen

Abgesehen von UL49 (VP22) wurden alle im Y2H positiven herpesviralen Proteine von Transportfaktoren der α -Importin-Familie gebunden, die ihre Substrate über klassische NLS binden und anschließend in den Kern transportieren. Infolgedessen war die Auswahl der Kriterien, mit denen die erworbenen Daten einer vergleichenden Analyse unterzogen werden sollten, relativ einfach, da schon vorab bestimmte Eigenschaften der Interaktoren erwartet wurden. So geht man davon aus, dass ein Protein, das mit einem α -Importin eine

Wechselwirkung eingeht, eine bioinformatisch vorhergesagte, klassische NLS und eine nukleäre Funktion bzw. Lokalisation aufweist. Aus diesem Grund wurde mit den erworbenen Daten des Y2H-Assays eine vergleichende Analyse mit den oben genannten Kriterien angestellt. Während sechs (UL15, UL31, UL34, UL38, UL56 und US1) der insgesamt acht herpesviralen Proteine, die im Y2H-Assay mit α -Importinen in Wechselwirkung traten, im Kern lokalisieren, besitzen nur vier (UL15, UL31, UL34 und US1) zusätzlich noch eine bioinformatisch vorhergesagte, klassische NLS. Bei sechs von insgesamt zehn Proteinen konnte die bioinformatisch vorhergesagte cNLS nicht im Y2H-Assay gezeigt werden. Dafür kann es mehrere Gründe geben. Eine vorhergesagte NLS muss nicht notwendigerweise auch eine physiologische Relevanz besitzen. So kann es sich auch um eine zufällige Sequenz handeln, die der allgemeinen Consensus-Sequenz entspricht. Die bioinformatische Vorhersage basiert allein auf der Primärstruktur, also auf der Aminosäuresequenz eines Proteins und berücksichtigt nicht dessen räumliche Struktur. So kann die vorhergesagte Sequenz in der Tertiärstruktur im Inneren des Proteins verborgen und nicht für einen Transportfaktor zugänglich sein. Zudem kann die Zugänglichkeit einer vorhergesagten NLS durch Protein-Protein-Interaktionen verhindert werden, was auch ein zeitlich begrenzter, regulatorischer Prozess sein kann. So wird z. B. auf ein externes Signal die schnelle Induzierbarkeit des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch dessen subzelluläre Lokalisation reguliert, die keine zeitraubende Proteinsynthese erfordert. NF- κ B besitzt eine NLS, das in unstimuliertem Zustand durch die Bindung inhibitorischer κ B-Proteine (I κ B-Proteine) maskiert wird. Auf ein Signal hin kommt es zum Abbau von I κ B und zur Freisetzung der NLS, was zum nukleären Import von NF- κ B führt, wo es seine Aufgabe als Transkriptionsfaktor ausüben kann (8). Obwohl die herpesviralen Proteine UL7, UL16, UL38 und UL56 im Y2H-Assay mit α -Importinen interagierten, konnten für diese keine cNLS mit Hilfe bioinformatischer Methoden vorhergesagt werden. Ein Grund dafür könnte sein, dass deren NLS nicht durch den verwendeten Algorithmus abgedeckt wird. Zudem ist bekannt, dass α -Importine auch mit unterschiedlichen NLS interagieren können, die nicht der Consensus-Sequenz klassischer NLS entsprechen (49,50,91,92). Eine falsch positive Interaktion kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Auch konnten nicht alle Proteine, die eine bekannte nukleäre Lokalisation aufweisen, als Substrate für zelluläre Transportfaktoren identifiziert werden. Der aktive Transport mit Hilfe von Transportfaktoren ist nur eine von mehreren Möglichkeiten, wie Proteine die Kernporen passieren und das Innere des Zellkerns erreichen können. So können sie im Komplex mit anderen signaltragenden Proteinen auf indirekte Weise in den Kern importiert werden. Andere Proteine dagegen sind aufgrund ihrer geringen Größe in der Lage, den Kern durch passive Diffusion zu erreichen. Durch Interaktion mit nukleär residierenden Proteinen können diese kleinen Proteine allmählich im Zellkern akkumuliert werden und so eine deutlich nukleäre Lokalisation aufweisen. Beim hier

beschriebenen Vergleich sind zudem virale Proteine ausgeschlossen, die mit Hilfe nicht klassischer Signalsequenzen oder noch unbekanntem Rezeptoren bzw. Mechanismen in den Kern gelangen. Infolgedessen würde nur der räumliche Gleichgewichtszustand der Proteine zu einem bestimmten Zeitpunkt deren subzelluläre Lokalisation definieren.

5.2 Die Rolle von Cse1L für die HSV-1-Replikation

Die Importin α -Genfamilie wird in drei phylogenetisch verschiedene Gruppen eingeteilt, $\alpha 1$, $\alpha 2$, und $\alpha 3$. Importin $\alpha 1$ -Gene sind in allen Eukaryoten zu finden, wohingegen Importin $\alpha 2$ - und $\alpha 3$ -Gene nur in Metazoa vertreten sind. Wahrscheinlich sind letztere während der Evolution vielzelliger Tiere entstanden, um zell- und gewebespezifische Rollen in der Entwicklung und Differenzierung einzunehmen. Die zeitliche und räumliche Expression der unterschiedlichen Importin α -Proteine ist entwicklungsabhängig und variiert in unterschiedlichen Geweben und Zelltypen. Alle Mitglieder dieser Familie vermitteln den Import cNLS-tragender Substrate und zeigen eine breite funktionelle Redundanz (102). Dementsprechend konnte in diesem Projekt gezeigt werden, dass auch der klassische Transport einiger herpesviraler Proteine redundant erfolgt, da diese von mehreren α -Importinen gleichermaßen gebunden werden können. So interagieren UL16, UL31, UL34, UL38, UL56 und US1 sowohl mit KPNA2, als auch mit KPNA4 und KPNA5. KPNA2 gehört zur $\alpha 2$ -Gruppe, KPNA4 zur $\alpha 3$ -Gruppe und KPNA5 zur $\alpha 1$ -Gruppe. Diese Redundanz gewährt, unabhängig vom Mengenverhältnis der unterschiedlichen Importin α -Proteine in der Wirtszelle, eine effiziente nukleäre Lokalisation der entsprechenden herpesviralen Proteine. Die funktionelle Analyse einzelner α -Importine mittels RNAi (RNA-Interferenz) lässt aufgrund dieser genetischen Redundanz kein aussagekräftiges Ergebnis erwarten. Stattdessen wurde versucht, mittels RNAi eines übergeordneten Regulators aller α -Importine, dem Importin- α -Exporter Cse1L, diese Limitierung zu umgehen. Um *off target*-Effekte zu verhindern, wurden in dieser Arbeit insgesamt vier siRNA-Oligomere mit unterschiedlichen Sequenzen gegen die Cse1L-mRNA eingesetzt. Zur Kontrolle der möglichen Transfektionseffekte auf das Zellwachstum sowie die Virusreplikation wurde eine siRNA mitgeführt, die keine komplementäre Zielsequenz im HeLa-Zellgenom besitzt.

Bei der Untersuchung der HSV-1-Replikation auf Cse1L-siRNA-transfizierten Zellen konnte eine starke Reduktion der freigesetzten Viren beobachtet werden. Die im Vergleich zur Kontroll-siRNA hundertfach verringerte Virusfreisetzung war zwar enorm, führte jedoch nicht zum totalen Verlust der viralen Replikation. Dafür kann es mehrere Gründe geben. Zum einen handelt es sich nicht um einen totalen Verlust von Cse1L, sondern nur um einen *Knockdown*, wodurch immer noch eine gewisse Menge an Cse1L exprimiert werden kann. Zum anderen werden bei einer siRNA-Transfektion nie alle Zellen erfasst, wodurch ein Teil

der Viren auch in nicht veränderten Zellen replizieren kann. Obwohl die in den Kern importierten α -Importine in Abwesenheit von Cse1L nicht mehr ins Zytoplasma exportiert werden können, bleibt aufgrund der im Zytoplasma neusynthetisierten α -Importine ein gewisser nukleärer Import der herpesviralen Proteine bestehen. Auch kann die Existenz eines noch unbekanntes Importin- α -Exporters nicht ausgeschlossen werden.

Es gibt jedoch auch Aspekte, die in Bezug auf den RNAi-Versuch kritisch betrachtet werden müssen. Obwohl bereits gezeigt werden konnte, dass die RNAi von Cse1L keine Auswirkung auf das Zellwachstum von humanen Kolonkarzinom-Zellen hat (147), konnte in dieser Arbeit bei einem Vitalitätstest eine minimale Beeinträchtigung im Wachstum Cse1L-siRNA-transfizierter Zellen im Vergleich zu Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen beobachtet werden. Dieser wenn auch geringe Effekt auf das Zellwachstum könnte sich akkumulierend auf die exponentielle Virusreplikation auswirken. Demzufolge könnte das geringere Zellwachstum für die extrem starke Reduktion der Virenfreisetzung verantwortlich sein. Außerdem könnte der *Knockdown* von Cse1L zu unerwarteten indirekten Nebeneffekten bei der Virusreplikation führen, die nicht notwendigerweise mit dem nukleären Import der herpesviralen Proteine in Zusammenhang stehen. So könnte z. B. der verringerte Import eines zellulären Proteins, das eine wichtige Rolle während der Virusreplikation spielt, zu der reduzierten Freisetzung infektiöser HSV-1-Partikel führen. Zudem muss erwähnt werden, dass Cse1L neben seiner Funktion als Importin- α -Exporter noch andere zelluläre Mechanismen steuert. So spielt es sowohl in der Apoptose als auch bei der Zell-Proliferation eine entscheidende Rolle, zwei gegensätzliche zelluläre Mechanismen, die jedoch stark miteinander verknüpft sind (14,27). Zudem fungiert Cse1L auch indirekt als nukleärer Importer für Zell-Zyklus-regulierende Proteine wie z. B. p53 (217).

Aufgrund der in dieser Studie erhaltenen Daten kann angenommen werden, dass das klassische Importsystem mit α -Importinen für den Transport von HSV-1-Proteinen entscheidend ist. Eine Erklärung für die Dominanz des klassischen Transportsystems für Herpesviren könnte in einer gemeinsamen Coevolution mit deren Wirten zu finden sein. Herpesviren sind phylogenetisch sehr alt und in der Natur ubiquitär verbreitet. Bisher sind mehr als 200 verschiedene Herpesviren bekannt, die eine ganze Reihe unterschiedlicher Wirbeltierarten infizieren. Parallel dazu ist unter der Familie der Karyopherine der Importin α/β /Cse1-Apparat am weitesten in der Natur verbreitet und auch die meisten bekannten, in den Zellkern importierten Proteine sind Substrate des klassischen Transportsystems. Infolgedessen nimmt man auch an, dass es sich bei dem Importin α/β /Cse1-Apparat um das älteste Karyopherin-abhängige Transportsystem handelt (202,250).

5.3 Der Transport von UL34 an die innere Kernmembran

Der Import-Mechanismus löslicher Proteine in den Zellkern ist weitgehend bekannt, wie jedoch Membranproteine die innere Kernmembran (INM *inner nuclear membrane*) erreichen und welche Signale dafür verantwortlich sind, konnte noch nicht im Detail aufgeklärt werden. Da viele, vor allem Lamin-assoziierte Membranproteine mit verschiedenen genetischen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden können (33,225), ist der allgemeine Mechanismus für den Transport von Membranproteinen zur INM von großem Interesse. Infolgedessen wurde der nukleäre Import des in dieser Studie identifizierten herpesviralen UL34 genauer untersucht. Wie andere INM-Proteine wandert auch das herpesvirale Typ II-Membranprotein UL34 nach der Membraninsertion durch laterale Diffusion in der Membran des ER und der äußeren Kernmembran (ONM *outer nuclear membrane*); (74,276). Mit welchem Mechanismus UL34 jedoch die Haarnadelkurve durch den gewaltigen Multiproteinkomplex der Kernpore bewältigt, um in das Kerninnere zu gelangen, ist noch unbekannt. King *et al.* (2006) konnten zeigen, dass in Hefe der klassische Karyopherin-vermittelte Transport-Mechanismus am Transport von Membranproteinen zur INM beteiligt ist. Da klassische NLS auch in vielen INM-Proteinen in Säugerzellen vorhergesagt werden konnten (150), könnte der klassische Transport-Mechanismus für INM-Proteine auch in anderen Organismen konserviert sein.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die vorhergesagte NLS von UL34 einige Kriterien eines klassischen Kernlokalisierungssignals erfüllt. Mittels Y2H und Mutationsstudien konnte diese Sequenz als UL34-Bindestelle für die humanen α -Importine KPNA2, 4 und 5 bestimmt werden. Sowohl *in vitro*-Interaktionsstudien in An- und Abwesenheit von RanGTP, die eine funktionale Komplexbildung von UL34 mit KPNA5 und KPNB1 erkennen ließen, als auch der erfolgreiche Transfer der UL34-NLS auf ein nicht verwandtes zytoplasmatisches Protein, sprechen für die biologische Relevanz dieser Signalsequenz. Da jedoch die Bedeutung der vorhergesagten NLS für die nukleäre Lokalisation von UL34 Δ TM in Abwesenheit anderer Virusproteine mit den bisherigen Untersuchungen nicht gezeigt werden konnte, muss noch ein anderer Mechanismus maßgeblich am nukleären Import von UL34 Δ TM beteiligt sein. Diese Vermutung konnte auch durch eine Analyse im viralen Kontext gestützt werden. Ein von Melanie Ott (Doktorandin der Arbeitsgruppe Jürgen Haas) konstruiertes HSV-1-BAC (*bacterial artificial chromosome*) zeigte, dass die Mutation der NLS von UL34 im Vergleich zum Wildtyp keinen nennenswerten Defekt in der viralen Replikation zeigte (236). Obwohl die vorhergesagte NLS von UL34 einige Kriterien einer klassischen Kernlokalisationssequenz erfüllt, konnte keine essentielle Bedeutung der Signalsequenz für den nukleären Import von UL34 gezeigt werden. Infolgedessen muss dem Transport von UL34 zur INM ein alternativer oder redundanter Mechanismus zukommen.

Die einfachste Erklärung für den Transport zur INM ist das Diffusions-Retentions-Modell. UL34 könnte folglich durch Diffusion und anschließender Interaktion mit UL31 oder anderen viralen bzw. zellulären Proteinen seine Lokalisation an der INM erlangen (283,287,288). Membranproteine mit einer nukleoplasmatischen Domäne bis ungefähr 25 kDa sollten die Kernporen mittels passiver Diffusion durchqueren können, wobei natürlich auch deren Sekundärstruktur ein wesentliches Kriterium darstellt (197). So könnte UL34, dessen extraluminale Domäne mit ca. 28 kDa zwar im oberen Limit liegt, alleine durch passiven Transport durch die Kernporen wandern. Für das Diffusions-Retentionsmodell von UL34 spricht, dass UL34 erst bei Anwesenheit seines Interaktionspartners UL31 an der INM akkumuliert (257). Für die mögliche Retention könnten jedoch auch andere sowohl zelluläre als auch virale Proteine in Betracht gezogen werden. Ob der nukleären Lokalisation von UL34 überhaupt das Diffusions-Retentionsmodell zu Grunde liegt, könnte mittels Fusion eines großen Tags, wie z. B. MBP, GST oder EYFP an UL34 gezeigt werden. Würde UL34 ausschließlich durch passive Diffusion in den Kern gelangen, wäre dies für das entsprechende Hybridprotein aufgrund seiner Größe nicht mehr möglich.

Da in dieser Arbeit für den bekannten UL34-Interaktionspartner UL31 eine klassische NLS nachgewiesen werden konnte, kann auch der indirekte Transport von UL34 über die Interaktion mit UL31 nicht ausgeschlossen werden. Im Zuge dieser Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass bei Cotransfektion allein die UL31-NLS für die Akkumulation von UL34 an der INM verantwortlich ist. Allerdings ist bisher unbekannt, in welchem Kompartiment die beiden Proteine UL31 und UL34 erstmals ihre Wechselwirkung eingehen.

Vielleicht trägt die hier untersuchte NLS von UL34 ausschließlich zu einem erleichterten bzw. effizienteren nukleären Import von UL34 bei und verändert dadurch die Import-Dynamik des Proteins. Um dies herausfinden zu können, müsste eine Transport-Kinetik von UL34 in lebenden Zellen durchgeführt werden. Es wäre jedoch auch möglich, dass die NLS in UL34 nur unter bestimmten Umständen eine essentielle Rolle spielt, die im Zusammenhang mit den in Kultur verwendeten Vero-Zellen nicht ersichtlich wird. Beispielsweise könnte der NLS von UL34 in infizierten Neuronen eine größere Bedeutung zukommen.

5.4 Der NLS-vermittelte nukleäre Import von UL31

Ein Sequenzvergleich von 36 UL31-Orthologen aus verschiedenen Herpesviren ergab eine N-terminale variable Region und vier konservierte Regionen (CR1-4) in den letzten zwei Dritteln des C-terminalen Bereichs (194). Mit Hilfe von Y2H, LUMIER, Mutationsstudien und funktionellen Analysen konnte in dieser Arbeit eine funktionelle *bipartite* NLS in der variablen Region von UL31 bestimmt werden. Als Signalsequenz für drei verschiedene α -Importine ist die NLS für den nukleären Import von UL31 in Abwesenheit anderer Virusproteine sowohl

ausreichend als auch erforderlich. Der Verlust der NLS durch zielgerichtete Mutation führt zu einer Unterbindung des nukleären Imports von UL31, der durch eine heterologe NLS kompensiert werden konnte. Zudem konnte gezeigt werden, dass die identifizierte NLS von UL31 für die korrekte Lokalisierung von UL34 notwendig ist. UL31 und UL34 bilden einen Komplex (NEC nuclear egress complex) an der INM infizierter Zellen und sind essentiell für die Freisetzung von Capsiden aus dem Wirtszellkern. Mit Hilfe von Deletionsstudien (M53 Δ 16-106, UL31M Δ 1/110) konnten bereits für mCMV und HSV-2 nukleäre Lokalisationssequenzen in den N-terminalen variablen Regionen der entsprechenden UL31-Orthologen M53 und UL31 gezeigt werden (194,335). Da es sich hierbei jedoch nur um systematische Deletionsstudien zur Funktionsanalyse verschiedener Proteindomänen handelte, wurden keine weiteren Untersuchungen im viralen Kontext der identifizierten NLS angestellt. Ein von Melanie Ott (Doktorandin der Arbeitsgruppe Jürgen Haas) konstruiertes HSV-1-BAC (bacterial artificial chromosome) zeigte, dass die UL31-NLS-Mutante im Vergleich zum Wildtyp trotz ICP0-positiver Zellen nicht in der Lage war zu replizieren. Um den Wachstumsdefekt der Mutante allein auf den gestörten Import zurückzuführen, wurde ein HSV-1-BAC hergestellt, bei dem die UL31-NLS-Mutante an die bekannte SV40-NLS gekoppelt war. Jedoch konnte mit Hilfe dieser Sequenz keine wildtypähnliche Situation hergestellt werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass weder die NEC-Bildung noch die korrekte Lokalisation beider Proteine gestört ist (236). Infolgedessen muss angenommen werden, dass für UL31 während der Infektion ein redundanter Importmechanismus vorliegt und dass der untersuchten Sequenz eine weitere Funktion in der Virusreplikation zukommt. So könnte sowohl der bekannte Interaktor UL34 als auch ein noch unbekannter Bindepartner von UL31 für dessen indirekten nukleären Import verantwortlich sein. In einer kürzlich von Roberts und Baines (2011) erschienenen Veröffentlichung wurde berichtet, dass das bisher als spät exprimiertes Protein definiertes UL31 auch in geringen Mengen schon 2 Stunden nach Infektion detektiert werden kann (262). Vermutlich besitzt UL31, neben dessen Rolle bei der nukleären Capsidauswanderung, eine zusätzliche Funktion in der frühen Replikationsphase. Es wäre also denkbar, dass die in dieser Arbeit identifizierte NLS in UL31 nur in der frühen Infektionsphase eine essentielle Bedeutung hat, wenn das potentielle Protein, das für den indirekten Transport von UL31 verantwortlich ist, noch nicht synthetisiert ist. Durch Cotransfektion und anschließende Lokalisationsstudien der UL31-NLS-Mutante mit anderen früh synthetisierten HSV-1-Proteinen könnte der für den indirekten nukleären Import verantwortliche Interaktor für UL31 gefunden werden.

Mit Hilfe zielgerichteter Mutation der potentiellen NLS von UL31 sind positiv geladene Arginin-Reste gegen unpolare Alanin-Reste ausgetauscht worden. Geladene Aminosäure-Cluster sind nicht nur Bindestellen für Transportfaktoren, sondern können auch bei anderen Protein-Wechselwirkungen eine wichtige Rolle spielen (19,59,328). Da man annimmt, dass

UL31 verschiedene Rollen während der Virusreplikation spielt, kann auch eine Vielzahl von möglichen Interaktoren in Betracht gezogen werden. Hinweise für potentielle Funktionen lieferte eine UL31-Deletionsmutante. Diese führte nicht nur zu einer stark reduzierten Produktion extranukleärer Partikel, sondern auch zu einer verringerten Menge viraler DNA und einer Reduktion des Verhältnisses von monomerer zu konkatamerer DNA. So ist UL31 nicht nur an der nukleären Capsidwanderung beteiligt, sondern spielt wahrscheinlich auch eine Rolle bei der Replikation, Prozessierung und Verpackung der viralen DNA (38,257). Zudem konnte gezeigt werden, dass UL31 genau wie UL34 während der Infektion die Umstrukturierung von Chromatin und der nukleären Lamina beeinflusst (256,277). Kürzlich wurde berichtet, dass die UL31-Expression für die effiziente NF κ B-Aktivierung und optimale virale Protein-Expression erforderlich ist (262). Letzteres könnte die Rolle von UL31 bei der DNA-Verpackung, die auf späte virale Genprodukte angewiesen ist, erklären. Die in UL31 eingeführte Mutation könnte eine bisher unbekannt Funktion stören, die letztendlich in dem beobachteten Wachstumsdefekt der Mutante resultiert.

Eine weitere Erklärung für den Phänotyp der hier untersuchten UL31-Mutante könnte auch in einem kürzlich von Roller *et al.* (2010) veröffentlichten Modell zur Membrankrümmung um Capside an der INM zu finden sein (267). Dieses basiert auf der regulierten Interaktion zwischen N-terminalen Sequenzen von UL34 mit einer C-terminalen Domäne von UL31. Dabei wird angenommen, dass erst das Andocken der Capside die zur Membrankrümmung führende Interaktion auslöst, die bis zu diesem Zeitpunkt von einer Sequenz im N-Terminus von UL31 blockiert wird. Der für diese Maskierung verantwortliche Sequenzbereich ist jedoch nicht bekannt. So könnte die in dieser Arbeit untersuchte Sequenz von UL31 diesen Prozess unterstützen und die entsprechende Mutante die kontrollierte Abfolge bei der Vesikelabschnürung erheblich stören.

Die N-terminale, variable Region von UL31, die ca. 50 Aminosäuren umfasst, besitzt im Gegenteil zum hydrophoben restlichen Bereich des Proteins einen stark hydrophilen Charakter und eine hohe Anzahl geladener Reste. So ist diese Sequenz reich an Arginin- und Serin-Resten, die an Phosphorylierungsmotive der US3 Serin/Threonin-Kinase erinnert (248). Mou *et al.* (2009) konnten zeigen, dass sechs definierte Serin-Reste in diesem Bereich von der US3-Kinase phosphoryliert werden können (224). Dabei handelt es sich um Serine, die sich angrenzend oder innerhalb der mutierten NLS-Sequenz befinden. So zerstört der in dieser Arbeit durchgeführte Austausch der Arginin-Reste zu Alanin das Consensus-Motiv der US3-Kinase und verhindert so die gezielte Phosphorylierung der entsprechenden Serin-Reste. Der Austausch dieser Serine zu Alanin führt zur Anhäufung umhüllter Virionen innerhalb des perinukleären Raums, zu einer Mislokalisierung des UL31/UL34-Komplexes und zu einer verspäteten Produktion infektiöser Viren, also zu einem Phänotyp, welcher mit der einer US3-Deletionsmutante vergleichbar ist. Da jedoch weder die

Anwesenheit der viralen US3-Kinase, noch die Phosphorylierung der sechs Serin-Reste für die HSV-1-Infektion essentiell ist, kann das allein den Replikationsdefekt der in dieser Arbeit untersuchten UL31-NLS-Mutante nicht erklären.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es sich bei der UL31-NLS um einen für das Protein wichtigen Sequenzabschnitt handelt, der eine essentielle Rolle während der Virusreplikation einnimmt. Aufgrund bisher fehlender Strukturdaten von UL31 ist die weitere Funktionsanalyse jedoch erheblich erschwert. Wichtige Schritte hin zur funktionellen Aufklärung dieser Sequenz stellen sowohl die Ermittlung der Kristallstrukturen von UL31 und des UL31-UL34-Komplexes, als auch die elektronenmikroskopische (EM) Analyse der UL31-NLS-Mutante dar.

5.5 VP22 als potentielles Import-und Export-Substrat

Das einzige HSV-1-Protein, das im Y2H-Assay mit einem Exportin interagierte, war VP22 (UL49). Bei dem entsprechenden nukleären Export-Rezeptor handelte es sich um XPO6, der für den Transport von Profilin/Aktin-Komplexen bekannt ist (303). Eine weitere Besonderheit von VP22 war, dass es als einziges Protein mit einem β -Importin interagierte. Dabei handelte es sich um TNPO3, das über phosphorylierte RS-(Arginin/Serin) Domänen an entsprechende Substrate bindet (139,167). Vier solcher RS-Domänen sind auch in VP22 vorhanden, wobei nicht bekannt ist, welche dieser Domänen tatsächlich phosphoryliert werden können. VP22 ist ein Hauptbestandteil des viralen Teguments und innerhalb der α -Herpesviren konserviert. Zudem ist es stark basisch, reich an Prolin-Resten und in infizierten Zellen stark phosphoryliert (79,80). Während der Infektion wird VP22 bei der sekundären Umhüllung durch Interaktion mit viralen Glykoproteinen wie gE oder gD an den TGN rekrutiert (44,230). Die genaue Funktion des Proteins ist jedoch noch unbekannt. Da für VP22 weder ein NES noch eine NLS vorhergesagt werden konnte, wurde versucht, mit Hilfe von verschiedenen N- und C-terminalen Deletionsmutanten und anschließenden Y2H- und Immunfluoreszenz-Analysen potentielle Signalsequenzen zu identifizieren. Doch weder die Protein-Interaktionsstudie noch die subzelluläre Lokalisation der verschiedenen VP22-Fragmente konnte einen Hinweis auf die Lage möglicher Signalsequenzen geben (Daten im Ergebnisteil nicht dargestellt). Dafür könnten verschiedene Gründe verantwortlich sein. So handelt es sich bei VP22 um ein sehr dynamisches Protein. In Abwesenheit einer Virusinfektion weist es abhängig vom Proteinlevel und dem Zellzyklus verschiedene subzelluläre Lokalisationsmuster auf. So lokalisiert es sowohl im Zytoplasma, an Mikrotubuli und aufgrund der Retention an Chromatin im Nukleus (76-78). Martin et al. (2002) konnten zeigen, dass die Lokalisation verschiedener VP22-Fragmente von pan-zellulär über pan-nukleär, pan-zytoplasmatisch, sub-nukleär bis hin zu sub-zytoplasmatisch reicht (203).

Infolgedessen war auch die Untersuchung der subzellulären Lokalisation der VP22-Fragmente in dieser Arbeit äußerst kompliziert und nicht auf das Vorhandensein von Signalsequenzen zurückzuführen. Es ist auch möglich, dass VP22 auf Verkürzungen mit artifiziellen Proteinfaltungen reagiert, die zu veränderten Eigenschaften in der Protein-Protein-Interaktion und der Lokalisation führen können. Zudem muss erwähnt werden, dass VP22 mit 38 kDa klein genug ist, um die Kernporen mittels passiver Diffusion zu passieren d. h., dass potentielle Signalsequenzen nicht unbedingt notwendig sind oder nur zu einem erleichterten Transport beitragen würden. So konnten mit Hilfe weiterführender Analysen, die im Y2H-Assay ermittelten Interaktionen zwischen VP22 und XPO6 bzw. TNPO3 auf keine Signalsequenzen zurückgeführt werden.

5.6 Der nukleäre Kernexport

5.6.1 Methoden zur Identifizierung von Proteinen mit nukleärer Export-Aktivität

Da mittels Y2H nahezu keine herpesviralen Interaktoren für humane Exportine ermittelt werden konnten, sollte eine alternative Methode zur Identifizierung von Proteinen mit nukleärer Export-Aktivität zum Einsatz kommen. Wie jedoch allgemein bekannt, ist die Untersuchung des nukleären Protein-Exports eine äußerst schwierige Aufgabe. Es steht außer Frage, dass ein Protein zuerst in den Kern importiert werden muss, bevor es exportiert werden kann. Dieser Import kann durch passive Diffusion oder aktiven Transport erfolgen. Ist ein Protein in der Lage, zwischen Zytoplasma und Zellkern hin- und herzuwandern (sog. *Shuttling*-Protein), kann es seinen Gleichgewichtszustand im Kern oder im Zytoplasma erreichen. Proteine, die vorwiegend im Nukleus sind, können nicht von importierten, nukleär residenten Proteinen unterschieden werden. Genauso kann ein *Shuttling*-Protein mit einem zytoplasmatischen Gleichgewichtszustand nicht von einem neusynthetisierten Protein oder einem zytoplasmatisch residenten Protein unterschieden werden. Die subzelluläre Lokalisation eines Proteins lässt folglich keinen Schluss auf das Fehlen oder Vorhandensein einer aktiven NES zu.

Dazu kommt, dass die bioinformatische Vorhersage nukleärer Exportsequenzen eine enorme Herausforderung darstellt. Bisher konnte nur für leucinreiche NES, die vom Exportfaktor CRM1 erkannt werden, eine Consensus-Sequenz ermittelt werden. Dagegen sind für andere bekannte Exportfaktoren aufgrund der geringen Anzahl identifizierter Substrate und der vermutet hohen Komplexität der NES keine Consensus-Sequenzen verfügbar. Kürzliche Strukturanalysen der Interaktion zwischen leucinreichen NES und deren Transportfaktor CRM1 führten zu einer Erweiterung der NES Consensus-Sequenz, zeigten

jedoch zugleich eine größere Varietät der von CRM1-erkannten Sequenzen als zuvor erwartet (111,207). Darüber hinaus ähneln NES amphipatischen α -Helices, die auch in Transmembrandomänen oder hydrophoben Bereichen vieler Proteine vorkommen. Aus diesen Gründen bleibt die bioinformatische Vorhersage nukleärer Exportsignale noch immer eine schwierige Aufgabe.

Experimentelle Ansätze zur Identifizierung von Proteinen mit Export-Aktivität bringen gewisse Vor- und Nachteile mit sich. Ein einfacher *in vivo*-Nachweis für ein *Shuttling*-Protein ist die Behandlung mit dem spezifischen Export-Inhibitor Leptomycin B. Dafür muss das Protein jedoch im natürlichen Gleichgewichtszustand vor allem im Zytoplasma lokalisiert sein, um die nukleäre Akkumulation des Proteins nach Zugabe von Leptomycin B verfolgen zu können. Allerdings hemmt Leptomycin B nur den Export von Proteinen mit klassischen NES. Proteine, die mit Hilfe anderer Transportfaktoren exportiert werden oder vor allem im Zellkern lokalisieren, können damit nicht erfasst werden. Weitere bisher bekannte Methoden zur Untersuchung der nukleären Export-Aktivität von Proteinen sind meist sehr aufwendig, nicht für den Hochdurchsatz geeignet und werden in der Regel nur für detaillierte Charakterisierungen eingesetzt (21,291,324).

Zur Identifikation herpesviraler Proteine mit potentieller nukleärer Export-Aktivität wurde eine neue, induzierbare *in vivo*-Hochdurchsatz-Methode in Anlehnung an Klemm *et al.* (1997) entwickelt (153). Bei dieser Methode werden Proteine, die konstitutiv in den Zellkern importiert werden, aber *shutteln*, nach Zugabe von Rapamycin im Zytoplasma immobilisiert. Diese neu entwickelte *in vivo*-Methode bietet einige Vorteile gegenüber herkömmlichen Untersuchungen zur Export-Aktivität von Proteinen. Aufgrund des *Gateway*-kompatiblen Vektors kann sie als Hochdurchsatz-Methode für ganze Proteine oder Protein-Fragmente angewendet werden. Darüber hinaus kann das potentiell exportierte Substrat durch das N-terminal fusionierte EYFP direkt sichtbar gemacht werden und somit in kinetischen und Lebendzellstudien eingesetzt werden. Die Identifizierung zahlreicher neuer Export-Substrate wird zu einer Verbesserung und Erweiterung existierender Consensus-Sequenzen führen, was wiederum eine zuverlässigere bioinformatische Vorhersage neuer Substrate erlauben wird. Desweiteren ist diese Methode unabhängig von der Exportsequenz und der Import-Aktivität des zu analysierenden Proteins und lässt eine Identifikation von Export-Substraten in ihrem *in vivo*-Faltungszustand zu. Außerdem besitzt der in dieser Arbeit etablierte Export-Assay einen großen Stellenwert für die Systembiologie. So können die mit Hilfe dieses Hochdurchsatz-Verfahrens gewonnenen Daten mit anderen experimentellen und bioinformatischen Ansätzen vereint werden, um biologische Prozesse besser zu verstehen und Vorhersagen zu ermöglichen. Der nukleäre Protein-Export hat bei diversen zellulären Prozessen eine entscheidende Bedeutung. Kürzliche Studien konnten zeigen, dass die zytoplasmatische Mislokalisierung von HDAC1 (*histone deacetylase 1*), ein an der

Transkriptionsregulation beteiligtes nukleäres Enzym, für die Entstehung degenerierter Axone bei Multipler Sklerose (MS) verantwortlich ist (148,149). Außerdem sind zahlreiche Viren auf den Export sowohl ihrer Proteine als auch ihres Genoms aus dem Wirtszellkern angewiesen. Beispielsweise agiert das Rev-Protein von HIV-1 als Adapter zwischen CRM1 und der viralen RNA und ermöglicht somit den Export teilgespleißter und ungespleißter Transkripte aus dem Zellkern. Bei HSV-1 und allen Vertretern der Herpesvirusfamilie erfolgt der mRNA-Export aus dem Zellkern durch direkte Interaktion des viralen UL54 mit dem zellulären Exportfaktor REF (Abschnitt 2.2.5); (316). So kann die in dieser Arbeit etablierte *in vivo*-Hochdurchsatz-Methode die Suche nach Inhibitoren für solche krankheitsverursachende Prozesse erleichtern und neue therapeutische Ansätze liefern.

Für das im Vorversuch exemplarisch eingesetzte HSV-1-Protein UL4 konnte mit Hilfe des Export-Assays eine NES gezeigt werden. Zudem konnte mit Hilfe der sog. Heterokaryon-Methode, einer Alternative zum Nachweis von Proteinen mit nukleärer Export-Aktivität, die neu etablierte Methode am Beispiel von UL4 validiert werden. Obwohl alle α -Herpesviren UL4-Homologe aufweisen, ist über deren Funktion immer noch sehr wenig bekannt. Bei HSV-1 spielt das Nicht-Strukturprotein keine essentielle Rolle während der viralen Replikation (136). Die hier gewonnenen Daten können jedoch dazu beitragen, neue Funktionen für das Protein zu postulieren. Eine der entscheidenden weiterführenden Untersuchungen zur Relevanz der ermittelten Signalsequenzen ist deren Funktion im viralen Kontext, wozu in der Regel die BAC-Mutagenese eingesetzt wird.

5.6.2 HSV-1-Proteine mit nukleärer Export-Aktivität

Mit Hilfe der in dieser Arbeit etablierten Methode konnten 12 HSV-1-Proteine mit nukleärer Export-Aktivität ermittelt werden. Diese Proteine wurden einer vergleichenden Analyse unterzogen. Die dafür verwendeten Kriterien waren einerseits das Vorhandensein einer vorhergesagten cNES, andererseits eine nukleäre Lokalisation bzw. Funktion, da ein Protein zuerst in den Kern importiert werden muss, bevor es exportiert werden kann. Während UL7 und UL26 ausschließlich eine nukleäre Lokalisation bzw. Funktion und UL13, UL21 und UL37 lediglich eine cNES aufwiesen, erfüllten alle anderen ermittelten Proteine beide Kriterien (UL4, UL5, UL18, UL25, UL38, UL47 und UL48). Von insgesamt 23 Proteinen mit bioinformatisch vorhergesagten cNES konnten 13 nicht im Export-Assay bestätigt werden. Ein Grund dafür könnte sein, dass eine vorhergesagte NES nicht notwendigerweise eine physiologische Relevanz besitzen muss. So kann es sich auch um eine zufällige Sequenz handeln, die der allgemeinen Consensus-Sequenz entspricht. Oft findet man solche Sequenzen in Bereichen amphipatischer α -Helices, die in Transmembrandomänen oder hydrophoben Bereichen vieler Proteine vorkommen. Während für das herpesvirale Protein

UL26 eine nicht vorhersagbare NES mittels Mutagenesestudien identifiziert werden konnte, war dies für UL7 nicht möglich. Möglicherweise wird UL7 mit Hilfe einer Protein-Protein-Interaktion über indirekten Weg aus dem Kern exportiert. Auch eine unbekannte, noch nicht vorhersagbare NES kann nicht ausgeschlossen werden. Für die Proteine UL13, UL21 und UL37 konnte bisher keine nukleäre Lokalisation bzw. Funktion gezeigt werden. Aufgrund der ermittelten Export-Aktivität dieser Proteine kann eine noch unbekannte Funktion im Zellkern postuliert werden. Die Export-Aktivität von sieben (UL4, UL5, UL21, UL26, UL37, UL47, UL48) der 12 identifizierten Proteine konnte mit spezifischen Sequenzbereichen in Verbindung gebracht werden. Bei diesen ermittelten Sequenzen handelte es sich mit Ausnahme der von UL26 um vorhergesagte NES, die somit mit hoher Wahrscheinlichkeit vom humanen Export-Rezeptor XPO1 erkannt werden können. Von den bisher vier in der Literatur beschriebenen HSV-1-Proteinen mit definierten NES (UL37, UL47, UL54 und US11); (70,286,322,327,332) konnten zwei, nämlich UL37 und UL47 mit dieser Hochdurchsatz-Analyse bestätigt werden, was für die Funktionalität dieser Methode spricht.

Die Hälfte der hier identifizierten viralen *Shuttling*-Proteine gehört zur Gruppe der Tegumentproteine. Im Allgemeinen sind diese neben ihrer strukturgebenden Funktion auch an diversen regulatorischen Prozessen während der Virusreplikation beteiligt. Zu diesen gehören u. a. die Regulation der Transkription und Translation, die DNA-Replikation und der nukleäre Capsidaustritt (142). Infolgedessen muss der Transport des jeweiligen Tegumentproteins zu dessen Funktionsorten gewährleistet sein. Befinden sich diese sowohl im Kern als auch im Zytoplasma, muss das Protein in der Lage sein, zwischen den beiden Kompartimenten hin- und herzuwandern. Dies ist beispielsweise der Fall bei Tegumentproteinen, die sowohl an der viralen Transkription als auch an der sekundären Umhüllung am TGN beteiligt sind, wie UL37, UL47 und UL48. Da die Gen-Expression in Herpesviren zeitlich genau koordiniert ist, könnte es außerdem wichtig sein, dass diese Proteine zur Beendigung ihrer nukleären Aktivität z. B. mit Hilfe einer NES aus dem Kern exportiert werden. Dieser Export würde gleichzeitig zu einer ausreichenden Menge des Proteins im Zytoplasma führen, was z. B. für die sekundäre Umhüllung am TGN von essentieller Bedeutung ist. Auf diese oder ähnliche Weise könnte auch die Relevanz der Export-Aktivität anderer in dieser Arbeit identifizierter Proteine abgeleitet werden.

Die Export-Aktivität der vier identifizierten Capsid-Proteine UL18, UL25, UL26 und UL38 war dagegen nicht zu erwarten, da die Reifung der Capside ausschließlich im Nukleus stattfindet. Die zielgerichtete Mutagenese der vorhergesagten NES von UL18 und UL25 verhinderte den Kernimport der entsprechenden Mutante, so dass die Export-Aktivität nicht überprüft werden konnte. Eine mögliche Erklärung für UL25 liefert eine Veröffentlichung von Bowman *et al.* (2006). Dabei zeigte die Strukturanalyse einer N-terminal-deletierten Form ($\Delta 1-133$) von UL25 eine einzigartige, elastische Architektur mit einer Vielzahl flexibler Schleifen, die von

einem stabilen Proteinkern ausgehen (25). Wahrscheinlich spielen insgesamt 24 vollständig konservierte Reste im Inneren des Proteins eine wichtige Rolle bei der strukturellen Integrität (25). Da sich 3 dieser insgesamt 24 hochkonservierten Reste innerhalb der UL25-NES befinden (grau hervorgehoben: Φ^1 - $(x)_3$ - Φ^2 - $(x)_2$ - Φ^3 - x - Φ^4), könnte die Einführung der Mutationen in die UL25-NES und somit in einer für die Proteinstruktur äußerst empfindlichen Position zu einer umfassenden Strukturänderung des zudem sehr flexiblen Proteins geführt haben. Eine daraus resultierende Maskierung der an UL25 fusionierten SV40-NLS könnte eine Erklärung für die plötzliche zytoplasmatische Lokalisation des UL25-Fusionsproteins sein. Da sich diese hochkonservierten Reste vor allem im Inneren des Proteins befinden, stellt sich die Frage, ob diese Signalsequenz für Transportfaktoren überhaupt zugänglich ist. Aufgrund der Tatsache, dass im Export-Assay dennoch eine deutliche *Shuttling*-Aktivität von UL25 gezeigt werden konnte, muss die vorhergesagte NES genauer betrachtet werden. Im Bestreben, neue funktionelle Domänen von UL25 zu identifizieren, wurde von Bowman *et al.* (2006) zusätzlich eine ET-Analyse (*evolutionary trace analysis*) basierend auf einem multiplen Sequenzvergleich UL25-homologer Proteine durchgeführt (25). Unter Verwendung dieser Methode können mit Hilfe eines phylogenetischen Stammbaums homologer Proteine funktionell wichtige Reste identifiziert werden (182). Auf diese Weise konnten vier verschiedene potentielle Bindedomänen auf der Oberfläche von UL25 identifiziert werden, wovon eine den ersten hydrophoben Rest Φ^1 der NES-Consensus-Sequenz enthält (25). Demzufolge könnte diese identifizierte NES tatsächlich an der Oberfläche von UL25 exponiert sein. UL25 wird in der späten Phase der DNA-Verpackung auf der Oberfläche viraler Capside angefügt. Man nimmt an, dass es an der Versiegelung und Stabilisierung DNA-verpackter Capside beteiligt ist (211,299) und dass die vollständige Besetzung reifer Capside mit UL25-Molekülen als Checkpoint zur nukleären Auswanderung reifer Capside fungiert. Dafür ist eine bestimmte Anzahl an UL25-Molekülen auf der Capsid-Oberfläche erforderlich, die mit abgeschlossener DNA-Verpackung ein Maximum erreicht. Das erklärt, warum Capside ohne vollständiges Genom selektiv im Nukleus zurückgehalten werden (299). Wie bereits bekannt, kann freies UL25 mit dem nukleären Egress-Komplex in Wechselwirkung treten (337). Infolgedessen könnte freies UL25 ohne aktiven Export vorzeitig am NEC binden, dadurch mit reifen bzw. UL25-beladenen Capsiden konkurrieren und so deren Zugang zur INM verhindern. Gleichzeitig könnte am NEC gebundenes UL25 die Bindung von unreifen Capsiden, deren DNA-Packaging unvollständig ist, ermöglichen. Damit würde die präventionelle Bindung von reifen Capsiden gestört und die Checkpoint-Funktion unterbunden werden.

Obwohl die meisten Hinweise dafür sprechen, dass die Kernauswanderung reifer Capside durch Knospung an der INM in den perinukleären Raum und einer darauffolgenden Membranfusion mit der ONM erfolgt, gibt es noch ein weiteres Modell, nämlich der nukleäre

Capsidaustritt durch die Kernporen. Dieses wird sehr kontrovers diskutiert, da es sich allein auf die Beobachtung stützt, dass in mit Bovinem Herpes-Virus-1 infizierten Zellen die Kernporen extrem vergrößert sind (326). Auf Capsiden exponierte NES könnten also mit löslichen Exportfaktoren in Wechselwirkung treten und dadurch die Capsidauswanderung durch die Kernpore vermitteln.

Ein weiteres interessantes Capsidprotein stellt UL26 dar. Im Zellkern infizierter Zellen werden HSV-1-Capside anfänglich mit einem inneren Protein-Gerüst aufgebaut (144,247,263,311). Die Verpackung der viralen DNA in diese Vorläufer-Capside erfordert die Prozessierung dieser Gerüst-Proteine durch die Gerüst-assoziierte Protease und die Freisetzung dieser Proteine aus dem Capsid. Dieses Gerüst besteht aus den beiden Proteinen UL26 und UL26.5, die von zwei im Leseraster überlappenden Transkripten kodiert werden (189) und in allen bisher bekannten Herpesviren konserviert sind. UL26 und UL26.5 kodieren Proteine mit identischen C-terminalen Oligomerisierungs- (67) und VP5-Bindungsdomänen (120,233). Dagegen kodiert nur der N-Terminus von UL26 eine Serin-Protease-Domäne (186-188) gefolgt von einer 59 Aminosäure langen Linker-Region, welche die Protease-Domäne mit der Oligomerisierungsdomäne verbindet. Während der Capsid-Reifung prozessiert sich die UL26-kodierte Protease selbst, wodurch die N-terminale Protease-Domäne (VP24) freigesetzt wird. Die mittels Export-Assay in UL26 identifizierte und innerhalb der humanen Herpesviren konservierte NES befindet sich nach Autoprozessierung in VP24, also in dem Protein, welches die Protease-Aktivität besitzt. Interessant ist, dass VP24 im Gegensatz zu den anderen UL26/UL26.5-Produkten sowohl in allen Capsidformen als auch in reifen Virionen detektiert werden kann (100,193,275,294). Es ist somit denkbar, dass VP24 nach Freisetzung des Capsid-Gerüsts und Verpackung der viralen DNA ins Zytoplasma exportiert wird, um als sekundäres Tegument in reife Virionen verpackt zu werden. Alternativ könnte ein Überschuss an proteolytischer Aktivität im Zellkern negative Auswirkungen auf die Virusreplikation haben. Die NES wäre folglich ein Schutzmechanismus gegen unspezifischen Abbau diverser Proteine im Nukleus.

5.7 Ausblick

Zukünftig sollen die so gesammelten Informationen mit früheren Y2H-Daten, Transkriptom-Analysen und Protein-Lokalisationsstudien aus der Literatur bzw. dieser Arbeit bioinformatisch vereint werden, um ein dynamisches Modell der räumlich-zeitlichen Verteilung der herpesviralen Proteine während der Virusinfektion zu erstellen. Diese systembiologische Grundlagenforschung trägt nicht nur maßgeblich zum Verständnis der Herpesvirus-Biologie und Pathogenität bei, sondern soll auch neue Angriffspunkte zur antiviralen Intervention liefern.

6 Literaturverzeichnis

1. **Abaitua, F. and P. O'Hare.** 2008. Identification of a highly conserved, functional nuclear localization signal within the N-terminal region of herpes simplex virus type 1 VP1-2 tegument protein. *J. Virol.* **82**:5234-5244.
2. **Adamson, W. E., D. McNab, V. G. Preston, and F. J. Rixon.** 2006. Mutational analysis of the herpes simplex virus triplex protein VP19C. *J. Virol.* **80**:1537-1548.
3. **Allen, T. D., J. M. Cronshaw, S. Bagley, E. Kiseleva, and M. W. Goldberg.** 2000. The nuclear pore complex: mediator of translocation between nucleus and cytoplasm. *J. Cell Sci.* **113 (Pt 10)**:1651-1659.
4. **Alvisi, G., S. Avanzi, D. Musiani, D. Camozzi, V. Leoni, J. D. Ly-Huynh, and A. Ripalti.** 2008. Nuclear import of HSV-1 DNA polymerase processivity factor UL42 is mediated by a C-terminally located bipartite nuclear localization signal. *Biochemistry* **47**:13764-13777.
5. **Arts, G. J., M. Fornerod, and I. W. Mattaj.** 1998. Identification of a nuclear export receptor for tRNA. *Curr. Biol.* **8**:305-314.
6. **Arts, G. J., S. Kuersten, P. Romby, B. Ehresmann, and I. W. Mattaj.** 1998. The role of exportin-t in selective nuclear export of mature tRNAs. *EMBO J.* **17**:7430-7441.
7. **Bachi, A., I. C. Braun, J. P. Rodrigues, N. Pante, K. Ribbeck, K. C. von, U. Kutay, M. Wilm, D. Gorlich, M. Carmo-Fonseca, and E. Izaurralde.** 2000. The C-terminal domain of TAP interacts with the nuclear pore complex and promotes export of specific CTE-bearing RNA substrates. *RNA.* **6**:136-158.
8. **Baeuerle, P. A. and D. Baltimore.** 1988. I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science* **242**:540-546.
9. **Bailer, S. M. and J. Haas.** 2009. Connecting viral with cellular interactomes. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**:453-459.
10. **Baradaran, K., C. E. Dabrowski, and P. A. Schaffer.** 1994. Transcriptional analysis of the region of the herpes simplex virus type 1 genome containing the UL8, UL9, and UL10 genes and identification of a novel delayed-early gene product, OBPC. *J. Virol.* **68**:4251-4261.
11. **Barrios-Rodiles, M., K. R. Brown, B. Ozdamar, R. Bose, Z. Liu, R. S. Donovan, F. Shinjo, Y. Liu, J. Dembowy, I. W. Taylor, V. Luga, N. Przulj, M. Robinson, H. Suzuki, Y. Hayashizaki, I. Jurisica, and J. L. Wrana.** 2005. High-throughput mapping of a dynamic signaling network in mammalian cells. *Science* **307**:1621-1625.
12. **Batterson, W. and B. Roizman.** 1983. Characterization of the herpes simplex virion-associated factor responsible for the induction of alpha genes. *J. Virol.* **46**:371-377.
13. **Becker, J., F. Melchior, V. Gerke, F. R. Bischoff, H. Ponstingl, and A. Wittinghofer.** 1995. RNA1 encodes a GTPase-activating protein specific for Gsp1p, the Ran/TC4 homologue of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **270**:11860-11865.
14. **Behrens, P., U. Brinkmann, and A. Wellmann.** 2003. CSE1L/CAS: its role in proliferation and apoptosis. *Apoptosis.* **8**:39-44.
15. **Bierer, B. E., P. S. Mattila, R. F. Standaert, L. A. Herzenberg, S. J. Burakoff, G. Crabtree, and S. L. Schreiber.** 1990. Two distinct signal transmission pathways in T lymphocytes are

- inhibited by complexes formed between an immunophilin and either FK506 or rapamycin. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **87**:9231-9235.
16. **Bierer, B. E., P. K. Somers, T. J. Wandless, S. J. Burakoff, and S. L. Schreiber.** 1990. Probing immunosuppressant action with a nonnatural immunophilin ligand. *Science* **250**:556-559.
 17. **Bischoff, F. R. and H. Ponstingl.** 1991. Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1. *Nature* **354**:80-82.
 18. **Bischoff, F. R. and H. Ponstingl.** 1991. Mitotic regulator protein RCC1 is complexed with a nuclear ras-related polypeptide. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **88**:10830-10834.
 19. **Bjerke, S. L., J. M. Cowan, J. K. Kerr, A. E. Reynolds, J. D. Baines, and R. J. Roller.** 2003. Effects of charged cluster mutations on the function of herpes simplex virus type 1 UL34 protein. *J. Virol.* **77**:7601-7610.
 20. **Bjerke, S. L. and R. J. Roller.** 2006. Roles for herpes simplex virus type 1 UL34 and US3 proteins in disrupting the nuclear lamina during herpes simplex virus type 1 egress. *Virology* **347**:261-276.
 21. **Bogerd, H. P., R. E. Benson, R. Truant, A. Herold, M. Phingbodhipakkiya, and B. R. Cullen.** 1999. Definition of a consensus transportin-specific nucleocytoplasmic transport signal. *J. Biol. Chem.* **274**:9771-9777.
 22. **Bogerd, H. P., R. A. Fridell, R. E. Benson, J. Hua, and B. R. Cullen.** 1996. Protein sequence requirements for function of the human T-cell leukemia virus type 1 Rex nuclear export signal delineated by a novel in vivo randomization-selection assay. *Mol. Cell Biol.* **16**:4207-4214.
 23. **Bohnsack, M. T., K. Czaplinski, and D. Gorlich.** 2004. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA.* **10**:185-191.
 24. **Bonifaci, N., J. Moroianu, A. Radu, and G. Blobel.** 1997. Karyopherin beta2 mediates nuclear import of a mRNA binding protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **94**:5055-5060.
 25. **Bowman, B. R., R. L. Welschhans, H. Jayaram, N. D. Stow, V. G. Preston, and F. A. Quioco.** 2006. Structural characterization of the UL25 DNA-packaging protein from herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* **80**:2309-2317.
 26. **Brideau, A. D., B. W. Banfield, and L. W. Enquist.** 1998. The Us9 gene product of pseudorabies virus, an alphaherpesvirus, is a phosphorylated, tail-anchored type II membrane protein. *J. Virol.* **72**:4560-4570.
 27. **Brinkmann, U.** 1998. CAS, the human homologue of the yeast chromosome-segregation gene CSE1, in proliferation, apoptosis, and cancer. *Am. J. Hum. Genet.* **62**:509-513.
 28. **Bronstein, J. C., S. K. Weller, and P. C. Weber.** 1997. The product of the UL12.5 gene of herpes simplex virus type 1 is a capsid-associated nuclease. *J. Virol.* **71**:3039-3047.
 29. **Brown, E. J., M. W. Albers, T. B. Shin, K. Ichikawa, C. T. Keith, W. S. Lane, and S. L. Schreiber.** 1994. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* **369**:756-758.
 30. **Brownawell, A. M. and I. G. Macara.** 2002. Exportin-5, a novel karyopherin, mediates nuclear export of double-stranded RNA binding proteins. *J. Cell Biol.* **156**:53-64.
 31. **Browne, H., S. Bell, T. Minson, and D. W. Wilson.** 1996. An endoplasmic reticulum-retained herpes simplex virus glycoprotein H is absent from secreted virions: evidence for reenvelopment during egress. *J. Virol.* **70**:4311-4316.

32. **Brunet, A., F. Kanai, J. Stehn, J. Xu, D. Sarbassova, J. V. Frangioni, S. N. Dalal, J. A. DeCaprio, M. E. Greenberg, and M. B. Yaffe.** 2002. 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. *J. Cell Biol.* **156**:817-828.
33. **Burke, B. and C. L. Stewart.** 2006. The laminopathies: the functional architecture of the nucleus and its contribution to disease. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **7**:369-405.
34. **Calado, A., N. Treichel, E. C. Muller, A. Otto, and U. Kutay.** 2002. Exportin-5-mediated nuclear export of eukaryotic elongation factor 1A and tRNA. *EMBO J.* **21**:6216-6224.
35. **Campbell, E. M. and T. J. Hope.** 2003. Role of the cytoskeleton in nuclear import. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **55**:761-771.
36. **Chachami, G., E. Paraskeva, J. M. Mingot, G. G. Braliou, D. Gorlich, and G. Simos.** 2009. Transport of hypoxia-inducible factor HIF-1alpha into the nucleus involves importins 4 and 7. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **390**:235-240.
37. **Chang, Y. E. and B. Roizman.** 1993. The product of the UL31 gene of herpes simplex virus 1 is a nuclear phosphoprotein which partitions with the nuclear matrix. *J. Virol.* **67**:6348-6356.
38. **Chang, Y. E., S. C. Van, P. W. Krug, A. E. Sears, and B. Roizman.** 1997. The null mutant of the U(L)31 gene of herpes simplex virus 1: construction and phenotype in infected cells. *J. Virol.* **71**:8307-8315.
39. **Chelsky, D., R. Ralph, and G. Jonak.** 1989. Sequence requirements for synthetic peptide-mediated translocation to the nucleus. *Mol. Cell Biol.* **9**:2487-2492.
40. **Chen, I. H., K. S. Sciabica, and R. M. Sandri-Goldin.** 2002. ICP27 interacts with the RNA export factor Aly/REF to direct herpes simplex virus type 1 intronless mRNAs to the TAP export pathway. *J. Virol.* **76**:12877-12889.
41. **Chen, J., X. F. Zheng, E. J. Brown, and S. L. Schreiber.** 1995. Identification of an 11-kDa FKBP12-rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycin-associated protein and characterization of a critical serine residue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**:4947-4951.
42. **Chen, T., A. M. Brownawell, and I. G. Macara.** 2004. Nucleocytoplasmic shuttling of JAZ, a new cargo protein for exportin-5. *Mol. Cell Biol.* **24**:6608-6619.
43. **Cheng, G., M. E. Brett, and B. He.** 2002. Signals that dictate nuclear, nucleolar, and cytoplasmic shuttling of the gamma(1)34.5 protein of herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* **76**:9434-9445.
44. **Chi, J. H., C. A. Harley, A. Mukhopadhyay, and D. W. Wilson.** 2005. The cytoplasmic tail of herpes simplex virus envelope glycoprotein D binds to the tegument protein VP22 and to capsids. *J. Gen. Virol.* **86**:253-261.
45. **Chi, N. C., E. J. Adam, and S. A. Adam.** 1995. Sequence and characterization of cytoplasmic nuclear protein import factor p97. *J. Cell Biol.* **130**:265-274.
46. **Cingolani, G., C. Petosa, K. Weis, and C. W. Muller.** 1999. Structure of importin-beta bound to the IBB domain of importin-alpha. *Nature* **399**:221-229.
47. **Coller, K. E., J. I. Lee, A. Ueda, and G. A. Smith.** 2007. The capsid and tegument of the alphaherpesviruses are linked by an interaction between the UL25 and VP1/2 proteins. *J. Virol.* **81**:11790-11797.
48. **Conti, E. and E. Izaurralde.** 2001. Nucleocytoplasmic transport enters the atomic age. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**:310-319.
49. **Conti, E. and J. Kuriyan.** 2000. Crystallographic analysis of the specific yet versatile recognition of distinct nuclear localization signals by karyopherin alpha. *Structure.* **8**:329-338.

50. **Conti, E., M. Uy, L. Leighton, G. Blobel, and J. Kuriyan.** 1998. Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha. *Cell* **94**:193-204.
51. **Cook, A. G. and E. Conti.** 2010. Nuclear export complexes in the frame. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **20**:247-252.
52. **Cook, A. G., N. Fukuhara, M. Jinek, and E. Conti.** 2009. Structures of the tRNA export factor in the nuclear and cytosolic states. *Nature* **461**:60-65.
53. **Copeland, A. M., W. W. Newcomb, and J. C. Brown.** 2009. Herpes simplex virus replication: roles of viral proteins and nucleoporins in capsid-nucleus attachment. *J. Virol.* **83**:1660-1668.
54. **Corbett, A. H., D. M. Koepp, G. Schlenstedt, M. S. Lee, A. K. Hopper, and P. A. Silver.** 1995. Rna1p, a Ran/TC4 GTPase activating protein, is required for nuclear import. *J. Cell Biol.* **130**:1017-1026.
55. **Costanzo, F., G. Campadelli-Fiume, L. Foa-Tomasi, and E. Cassai.** 1977. Evidence that herpes simplex virus DNA is transcribed by cellular RNA polymerase B. *J. Virol.* **21**:996-1001.
56. **Craig, E., Z. K. Zhang, K. P. Davies, and G. V. Kalpana.** 2002. A masked NES in INI1/hSNF5 mediates hCRM1-dependent nuclear export: implications for tumorigenesis. *EMBO J.* **21**:31-42.
57. **Cronshaw, J. M., A. N. Krutchinsky, W. Zhang, B. T. Chait, and M. J. Matunis.** 2002. Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* **158**:915-927.
58. **Crump, C. M., B. Bruun, S. Bell, L. E. Pomeranz, T. Minson, and H. M. Browne.** 2004. Alphaherpesvirus glycoprotein M causes the relocalization of plasma membrane proteins. *J. Gen. Virol.* **85**:3517-3527.
59. **Cunningham, B. C. and J. A. Wells.** 1989. High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis. *Science* **244**:1081-1085.
60. **Cusick, M. E., H. Yu, A. Smolyar, K. Venkatesan, A. R. Carvunis, N. Simonis, J. F. Rual, H. Borick, P. Braun, M. Dreze, J. Vandenhoute, M. Galli, J. Yazaki, D. E. Hill, J. R. Ecker, F. P. Roth, and M. Vidal.** 2009. Literature-curated protein interaction datasets. *Nat. Methods* **6**:39-46.
61. **Damelin, M., P. A. Silver, and A. H. Corbett.** 2002. Nuclear protein transport. *Methods Enzymol.* **351**:587-607.
62. **Dang, C. V. and W. M. Lee.** 1988. Identification of the human c-myc protein nuclear translocation signal. *Mol. Cell Biol.* **8**:4048-4054.
63. **Davison, A. J., R. Eberle, B. Ehlers, G. S. Hayward, D. J. McGeoch, A. C. Minson, P. E. Pellett, B. Roizman, M. J. Studdert, and E. Thiry.** 2009. The order Herpesvirales. *Arch. Virol.* **154**:171-177.
64. **Dean, K. A., A. O. von, D. Gorlich, and H. M. Fried.** 2001. Signal recognition particle protein 19 is imported into the nucleus by importin 8 (RanBP8) and transportin. *J. Cell Sci.* **114**:3479-3485.
65. **Degreve, B., M. Johansson, C. E. De, A. Karlsson, and J. Balzarini.** 1998. Differential intracellular compartmentalization of herpetic thymidine kinases (TKs) in TK gene-transfected tumor cells: molecular characterization of the nuclear localization signal of herpes simplex virus type 1 TK. *J. Virol.* **72**:9535-9543.
66. **Deiss, L. P., J. Chou, and N. Frenkel.** 1986. Functional domains within the alpha sequence involved in the cleavage-packaging of herpes simplex virus DNA. *J. Virol.* **59**:605-618.

67. **Desai, P. and S. Person.** 1996. Molecular interactions between the HSV-1 capsid proteins as measured by the yeast two-hybrid system. *Virology* **220**:516-521.
68. **Desai, P., G. L. Sexton, E. Huang, and S. Person.** 2008. Localization of herpes simplex virus type 1 UL37 in the Golgi complex requires UL36 but not capsid structures. *J. Virol.* **82**:11354-11361.
69. **Dingwall, C. and R. A. Laskey.** 1991. Nuclear targeting sequences--a consensus? *Trends Biochem. Sci.* **16**:478-481.
70. **Donnelly, M. and G. Elliott.** 2001. Nuclear localization and shuttling of herpes simplex virus tegument protein VP13/14. *J. Virol.* **75**:2566-2574.
71. **Dostie, J., M. Ferraiuolo, A. Pause, S. A. Adam, and N. Sonenberg.** 2000. A novel shuttling protein, 4E-T, mediates the nuclear import of the mRNA 5' cap-binding protein, eIF4E. *EMBO J.* **19**:3142-3156.
72. **Dumont, F. J., M. R. Melino, M. J. Staruch, S. L. Koprak, P. A. Fischer, and N. H. Sigal.** 1990. The immunosuppressive macrolides FK-506 and rapamycin act as reciprocal antagonists in murine T cells. *J. Immunol.* **144**:1418-1424.
73. **Dumont, F. J., M. J. Staruch, S. L. Koprak, M. R. Melino, and N. H. Sigal.** 1990. Distinct mechanisms of suppression of murine T cell activation by the related macrolides FK-506 and rapamycin. *J. Immunol.* **144**:251-258.
74. **Ellenberg, J., E. D. Siggia, J. E. Moreira, C. L. Smith, J. F. Presley, H. J. Worman, and J. Lippincott-Schwartz.** 1997. Nuclear membrane dynamics and reassembly in living cells: targeting of an inner nuclear membrane protein in interphase and mitosis. *J. Cell Biol.* **138**:1193-1206.
75. **Elliott, G., W. Hafezi, A. Whiteley, and E. Bernard.** 2005. Deletion of the herpes simplex virus VP22-encoding gene (UL49) alters the expression, localization, and virion incorporation of ICP0. *J. Virol.* **79**:9735-9745.
76. **Elliott, G. and P. O'Hare.** 1997. Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell* **88**:223-233.
77. **Elliott, G. and P. O'Hare.** 1998. Herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22 induces the stabilization and hyperacetylation of microtubules. *J. Virol.* **72**:6448-6455.
78. **Elliott, G. and P. O'Hare.** 2000. Cytoplasm-to-nucleus translocation of a herpesvirus tegument protein during cell division. *J. Virol.* **74**:2131-2141.
79. **Elliott, G., D. O'Reilly, and P. O'Hare.** 1996. Phosphorylation of the herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22. *Virology* **226**:140-145.
80. **Elliott, G., D. O'Reilly, and P. O'Hare.** 1999. Identification of phosphorylation sites within the herpes simplex virus tegument protein VP22. *J. Virol.* **73**:6203-6206.
81. **Enenkel, C., G. Blobel, and M. Rexach.** 1995. Identification of a yeast karyopherin heterodimer that targets import substrate to mammalian nuclear pore complexes. *J. Biol. Chem.* **270**:16499-16502.
82. **Engel, K., A. Kotlyarov, and M. Gaestel.** 1998. Leptomycin B-sensitive nuclear export of MAPKAP kinase 2 is regulated by phosphorylation. *EMBO J.* **17**:3363-3371.
83. **Fagerlund, R., L. Kinnunen, M. Kohler, I. Julkunen, and K. Melen.** 2005. NF- κ B is transported into the nucleus by importin α 3 and importin α 4. *J. Biol. Chem.* **280**:15942-15951.

84. **Fahrenkrog, B. and U. Aebi.** 2003. The nuclear pore complex: nucleocytoplasmic transport and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**:757-766.
85. **Fan, X. C. and J. A. Steitz.** 1998. Overexpression of HuR, a nuclear-cytoplasmic shuttling protein, increases the in vivo stability of ARE-containing mRNAs. *EMBO J.* **17**:3448-3460.
86. **Fanara, P., M. R. Hodel, A. H. Corbett, and A. E. Hodel.** 2000. Quantitative analysis of nuclear localization signal (NLS)-importin alpha interaction through fluorescence depolarization. Evidence for auto-inhibitory regulation of NLS binding. *J. Biol. Chem.* **275**:21218-21223.
87. **Farnsworth, A., T. W. Wisner, and D. C. Johnson.** 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**:319-331.
88. **Feldherr, C. M. and D. Akin.** 1997. The location of the transport gate in the nuclear pore complex. *J. Cell Sci.* **110 (Pt 24)**:3065-3070.
89. **Fischer, U., J. Huber, W. C. Boelens, I. W. Mattaj, and R. Luhrmann.** 1995. The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell* **82**:475-483.
90. **Floer, M., G. Blobel, and M. Rexach.** 1997. Disassembly of RanGTP-karyopherin beta complex, an intermediate in nuclear protein import. *J. Biol. Chem.* **272**:19538-19546.
91. **Fontes, M. R., T. Teh, D. Jans, R. I. Brinkworth, and B. Kobe.** 2003. Structural basis for the specificity of bipartite nuclear localization sequence binding by importin-alpha. *J. Biol. Chem.* **278**:27981-27987.
92. **Fontes, M. R., T. Teh, and B. Kobe.** 2000. Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin-alpha. *J. Mol. Biol.* **297**:1183-1194.
93. **Fossum, E., C. C. Friedel, S. V. Rajagopala, B. Titz, A. Baiker, T. Schmidt, T. Kraus, T. Stellberger, C. Rutenberg, S. Suthram, S. Bandyopadhyay, D. Rose, B. A. von, M. Uhlmann, C. Zeretzke, Y. A. Dong, H. Boulet, M. Kogel, S. M. Bailer, U. Koszinowski, T. Ideker, P. Uetz, R. Zimmer, and J. Haas.** 2009. Evolutionarily conserved herpesviral protein interaction networks. *PLoS. Pathog.* **5**:e1000570.
94. **Fried, H. and U. Kutay.** 2003. Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory. *Cell Mol. Life Sci.* **60**:1659-1688.
95. **Fritz, J., A. Strehlow, A. Taschner, S. Schopoff, P. Pasierbek, and M. F. Jantsch.** 2009. RNA-regulated interaction of transportin-1 and exportin-5 with the double-stranded RNA-binding domain regulates nucleocytoplasmic shuttling of ADAR1. *Mol. Cell Biol.* **29**:1487-1497.
96. **Fuchs, W., B. G. Klupp, H. Granzow, N. Osterrieder, and T. C. Mettenleiter.** 2002. The interacting UL31 and UL34 gene products of pseudorabies virus are involved in egress from the host-cell nucleus and represent components of primary enveloped but not mature virions. *J. Virol.* **76**:364-378.
97. **Gabriel, G., A. Herwig, and H. D. Klenk.** 2008. Interaction of polymerase subunit PB2 and NP with importin alpha1 is a determinant of host range of influenza A virus. *PLoS. Pathog.* **4**:e11.
98. **Gallouzi, I. E. and J. A. Steitz.** 2001. Delineation of mRNA export pathways by the use of cell-permeable peptides. *Science* **294**:1895-1901.
99. **Giannakakou, P., D. L. Sackett, Y. Ward, K. R. Webster, M. V. Blagosklonny, and T. Fojo.** 2000. p53 is associated with cellular microtubules and is transported to the nucleus by dynein. *Nat. Cell Biol.* **2**:709-717.

100. **Gibson, W. and B. Roizman.** 1972. Proteins specified by herpes simplex virus. 8. Characterization and composition of multiple capsid forms of subtypes 1 and 2. *J. Virol.* **10**:1044-1052.
101. **Gilchrist, D., B. Mykytka, and M. Rexach.** 2002. Accelerating the rate of disassembly of karyopherin.cargo complexes. *J. Biol. Chem.* **277**:18161-18172.
102. **Goldfarb, D. S., A. H. Corbett, D. A. Mason, M. T. Harreman, and S. A. Adam.** 2004. Importin alpha: a multipurpose nuclear-transport receptor. *Trends Cell Biol.* **14**:505-514.
103. **Gontan, C., T. Guttler, E. Engelen, J. Demmers, M. Fornerod, F. G. Grosveld, D. Tibboel, D. Gorlich, R. A. Poot, and R. J. Rottier.** 2009. Exportin 4 mediates a novel nuclear import pathway for Sox family transcription factors. *J. Cell Biol.* **185**:27-34.
104. **Gorlich, D., S. Kostka, R. Kraft, C. Dingwall, R. A. Laskey, E. Hartmann, and S. Prehn.** 1995. Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear localization signals and bind them to the nuclear envelope. *Curr. Biol.* **5**:383-392.
105. **Gorlich, D. and U. Kutay.** 1999. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**:607-660.
106. **Gorlich, D., S. Prehn, R. A. Laskey, and E. Hartmann.** 1994. Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import. *Cell* **79**:767-778.
107. **Granzow, H., B. G. Klupp, W. Fuchs, J. Veits, N. Osterrieder, and T. C. Mettenleiter.** 2001. Egress of alphaherpesviruses: comparative ultrastructural study. *J. Virol.* **75**:3675-3684.
108. **Granzow, H., B. G. Klupp, and T. C. Mettenleiter.** 2004. The pseudorabies virus US3 protein is a component of primary and of mature virions. *J. Virol.* **78**:1314-1323.
109. **Gross, S. T., C. A. Harley, and D. W. Wilson.** 2003. The cytoplasmic tail of Herpes simplex virus glycoprotein H binds to the tegument protein VP16 in vitro and in vivo. *Virology* **317**:1-12.
110. **Guttinger, S., P. Muhlhauser, R. Koller-Eichhorn, J. Brennecke, and U. Kutay.** 2004. Transportin2 functions as importin and mediates nuclear import of HuR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**:2918-2923.
111. **Guttler, T., T. Madl, P. Neumann, D. Deichsel, L. Corsini, T. Monecke, R. Ficner, M. Sattler, and D. Gorlich.** 2010. NES consensus redefined by structures of PKI-type and Rev-type nuclear export signals bound to CRM1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**:1367-1376.
112. **Haanes, E. J., C. M. Nelson, C. L. Soule, and J. L. Goodman.** 1994. The UL45 gene product is required for herpes simplex virus type 1 glycoprotein B-induced fusion. *J. Virol.* **68**:5825-5834.
113. **Haarr, L. and S. Skulstad.** 1994. The herpes simplex virus type 1 particle: structure and molecular functions. Review article. *APMIS* **102**:321-346.
114. **Harel, A. and D. J. Forbes.** 2004. Importin beta: conducting a much larger cellular symphony. *Mol. Cell* **16**:319-330.
115. **Harreman, M. T., P. E. Cohen, M. R. Hodel, G. J. Truscott, A. H. Corbett, and A. E. Hodel.** 2003. Characterization of the auto-inhibitory sequence within the N-terminal domain of importin alpha. *J. Biol. Chem.* **278**:21361-21369.
116. **Heerklotz, D., P. Doring, F. Bonzelius, S. Winkelhaus, and L. Nover.** 2001. The balance of nuclear import and export determines the intracellular distribution and function of tomato heat stress transcription factor HsfA2. *Mol. Cell Biol.* **21**:1759-1768.

117. **Hibbard, M. K. and R. M. Sandri-Goldin.** 1995. Arginine-rich regions succeeding the nuclear localization region of the herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP27 are required for efficient nuclear localization and late gene expression. *J. Virol.* **69**:4656-4667.
118. **Hieda, M., T. Tachibana, F. Yokoya, S. Kose, N. Imamoto, and Y. Yoneda.** 1999. A monoclonal antibody to the COOH-terminal acidic portion of Ran inhibits both the recycling of Ran and nuclear protein import in living cells. *J. Cell Biol.* **144**:645-655.
119. **Honess, R. W. and B. Roizman.** 1974. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *J. Virol.* **14**:8-19.
120. **Hong, Z., M. Beaudet-Miller, J. Durkin, R. Zhang, and A. D. Kwong.** 1996. Identification of a minimal hydrophobic domain in the herpes simplex virus type 1 scaffolding protein which is required for interaction with the major capsid protein. *J. Virol.* **70**:533-540.
121. **Hood, J. K. and P. A. Silver.** 1998. Cse1p is required for export of Srp1p/importin-alpha from the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **273**:35142-35146.
122. **Huang, S. M., S. P. Huang, S. L. Wang, and P. Y. Liu.** 2007. Importin alpha1 is involved in the nuclear localization of Zac1 and the induction of p21WAF1/CIP1 by Zac1. *Biochem. J.* **402**:359-366.
123. **Huber, J., U. Cronshagen, M. Kadokura, C. Marshallsay, T. Wada, M. Sekine, and R. Luhrmann.** 1998. Snurportin1, an m3G-cap-specific nuclear import receptor with a novel domain structure. *EMBO J.* **17**:4114-4126.
124. **Huenniger, K., A. Kramer, M. Soom, I. Chang, M. Kohler, R. Depping, R. H. Kehlenbach, and C. Kaether.** 2010. Notch1 signaling is mediated by importins alpha 3, 4, and 7. *Cell Mol. Life Sci.* **67**:3187-3196.
125. **Hutchinson, L., K. Goldsmith, D. Snoddy, H. Ghosh, F. L. Graham, and D. C. Johnson.** 1992. Identification and characterization of a novel herpes simplex virus glycoprotein, gK, involved in cell fusion. *J. Virol.* **66**:5603-5609.
126. **Hutchinson, L., C. Roop-Beauchamp, and D. C. Johnson.** 1995. Herpes simplex virus glycoprotein K is known to influence fusion of infected cells, yet is not on the cell surface. *J. Virol.* **69**:4556-4563.
127. **Igarashi, K., R. Fawl, R. J. Roller, and B. Roizman.** 1993. Construction and properties of a recombinant herpes simplex virus 1 lacking both S-component origins of DNA synthesis. *J. Virol.* **67**:2123-2132.
128. **Izaurrealde, E., U. Kutay, K. C. von, I. W. Mattaj, and D. Gorlich.** 1997. The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus. *EMBO J.* **16**:6535-6547.
129. **Jakel, S., W. Albig, U. Kutay, F. R. Bischoff, K. Schwamborn, D. Doenecke, and D. Gorlich.** 1999. The importin beta/importin 7 heterodimer is a functional nuclear import receptor for histone H1. *EMBO J.* **18**:2411-2423.
130. **Jakel, S. and D. Gorlich.** 1998. Importin beta, transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells. *EMBO J.* **17**:4491-4502.
131. **Jakel, S., J. M. Mingot, P. Schwarzmaier, E. Hartmann, and D. Gorlich.** 2002. Importins fulfil a dual function as nuclear import receptors and cytoplasmic chaperones for exposed basic domains. *EMBO J.* **21**:377-386.
132. **Jakel, S., J. M. Mingot, P. Schwarzmaier, E. Hartmann, and D. Gorlich.** 2002. Importins fulfil a dual function as nuclear import receptors and cytoplasmic chaperones for exposed basic domains. *EMBO J.* **21**:377-386.

133. **Jakel, S., J. M. Mingot, P. Schwarzmaier, E. Hartmann, and D. Gorlich.** 2002. Importins fulfil a dual function as nuclear import receptors and cytoplasmic chaperones for exposed basic domains. *EMBO J.* **21**:377-386.
134. **Jensen, D. D., K. Sundstrom, and F. W. Flynn.** 2010. Expression of the nuclear transport protein importin α 1 and its association with the neurokinin 3 receptor in the rat hypothalamus following acute hyperosmotic challenge. *Neuroscience* **170**:1020-1027.
135. **Johnson, D. C. and J. D. Baines.** 2011. Herpesviruses remodel host membranes for virus egress. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**:382-394.
136. **Jun, P. Y., L. I. Strelow, R. C. Herman, H. S. Marsden, T. Eide, L. Haarr, and D. A. Leib.** 1998. The UL4 gene of herpes simplex virus type 1 is dispensable for latency, reactivation and pathogenesis in mice. *J. Gen. Virol.* **79 (Pt 7)**:1603-1611.
137. **Kalab, P., K. Weis, and R. Heald.** 2002. Visualization of a Ran-GTP gradient in interphase and mitotic *Xenopus* egg extracts. *Science* **295**:2452-2456.
138. **Kalderon, D., W. D. Richardson, A. F. Markham, and A. E. Smith.** 1984. Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen. *Nature* **311**:33-38.
139. **Kataoka, N., J. L. Bachorik, and G. Dreyfuss.** 1999. Transportin-SR, a nuclear import receptor for SR proteins. *J. Cell Biol.* **145**:1145-1152.
140. **Kato, A., M. Yamamoto, T. Ohno, M. Tanaka, T. Sata, Y. Nishiyama, and Y. Kawaguchi.** 2006. Herpes simplex virus 1-encoded protein kinase UL13 phosphorylates viral Us3 protein kinase and regulates nuclear localization of viral envelopment factors UL34 and UL31. *J. Virol.* **80**:1476-1486.
141. **Kawamura, H., Y. Tomozoe, T. Akagi, D. Kamei, M. Ochiai, and M. Yamada.** 2002. Identification of the nucleocytoplasmic shuttling sequence of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like protein JKTBP and its interaction with mRNA. *J. Biol. Chem.* **277**:2732-2739.
142. **Kelly, B. J., C. Fraefel, A. L. Cunningham, and R. J. Diefenbach.** 2009. Functional roles of the tegument proteins of herpes simplex virus type 1. *Virus Res.* **145**:173-186.
143. **Keminer, O. and R. Peters.** 1999. Permeability of single nuclear pores. *Biophys. J.* **77**:217-228.
144. **Kennard, J., F. J. Rixon, I. M. McDougall, J. D. Tatman, and V. G. Preston.** 1995. The 25 amino acid residues at the carboxy terminus of the herpes simplex virus type 1 UL26.5 protein are required for the formation of the capsid shell around the scaffold. *J. Gen. Virol.* **76 (Pt 7)**:1611-1621.
145. **Kim, A. L., M. Maher, J. B. Hayman, J. Ozer, D. Zerby, J. L. Yates, and P. M. Lieberman.** 1997. An imperfect correlation between DNA replication activity of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 (EBNA1) and binding to the nuclear import receptor, Rch1/importin α . *Virology* **239**:340-351.
146. **Kim, J. D., S. Yu, J. H. Choo, and J. Kim.** 2008. Two evolutionarily conserved sequence elements for Peg3/Usp29 transcription. *BMC. Mol. Biol.* **9**:108.
147. **Kim, J. D., S. Yu, J. H. Choo, and J. Kim.** 2008. Two evolutionarily conserved sequence elements for Peg3/Usp29 transcription. *BMC. Mol. Biol.* **9**:108.
148. **Kim, J. Y. and P. Casaccia.** 2010. HDAC1 in axonal degeneration: A matter of subcellular localization. *Cell Cycle* **9**:3680-3684.

149. **Kim, J. Y., S. Shen, K. Dietz, Y. He, O. Howell, R. Reynolds, and P. Casaccia.** 2010. HDAC1 nuclear export induced by pathological conditions is essential for the onset of axonal damage. *Nat. Neurosci.* **13**:180-189.
150. **King, M. C., C. P. Lusk, and G. Blobel.** 2006. Karyopherin-mediated import of integral inner nuclear membrane proteins. *Nature* **442**:1003-1007.
151. **Klebe, C., F. R. Bischoff, H. Ponstingl, and A. Wittinghofer.** 1995. Interaction of the nuclear GTP-binding protein Ran with its regulatory proteins RCC1 and RanGAP1. *Biochemistry* **34**:639-647.
152. **Klebe, C., H. Prinz, A. Wittinghofer, and R. S. Goody.** 1995. The kinetic mechanism of Ran-nucleotide exchange catalyzed by RCC1. *Biochemistry* **34**:12543-12552.
153. **Klemm, J. D., C. R. Beals, and G. R. Crabtree.** 1997. Rapid targeting of nuclear proteins to the cytoplasm. *Curr. Biol.* **7**:638-644.
154. **Klupp, B. G., H. Granzow, W. Fuchs, G. M. Keil, S. Finke, and T. C. Mettenleiter.** 2007. Vesicle formation from the nuclear membrane is induced by coexpression of two conserved herpesvirus proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104**:7241-7246.
155. **Klupp, B. G., H. Granzow, and T. C. Mettenleiter.** 2001. Effect of the pseudorabies virus US3 protein on nuclear membrane localization of the UL34 protein and virus egress from the nucleus. *J. Gen. Virol.* **82**:2363-2371.
156. **Klupp, B. G., R. Nixdorf, and T. C. Mettenleiter.** 2000. Pseudorabies virus glycoprotein M inhibits membrane fusion. *J. Virol.* **74**:6760-6768.
157. **Kobayashi, T., W. Kamitani, G. Zhang, M. Watanabe, K. Tomonaga, and K. Ikuta.** 2001. Borna disease virus nucleoprotein requires both nuclear localization and export activities for viral nucleocytoplasmic shuttling. *J. Virol.* **75**:3404-3412.
158. **Kobe, B.** 1999. Autoinhibition by an internal nuclear localization signal revealed by the crystal structure of mammalian importin alpha. *Nat. Struct. Biol.* **6**:388-397.
159. **Kosugi, S., M. Hasebe, N. Matsumura, H. Takashima, E. Miyamoto-Sato, M. Tomita, and H. Yanagawa.** 2009. Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin alpha. *J. Biol. Chem.* **284**:478-485.
160. **Koyano, S., E. C. Mar, F. R. Stamey, and N. Inoue.** 2003. Glycoproteins M and N of human herpesvirus 8 form a complex and inhibit cell fusion. *J. Gen. Virol.* **84**:1485-1491.
161. **Kudo, N., N. Matsumori, H. Taoka, D. Fujiwara, E. P. Schreiner, B. Wolff, M. Yoshida, and S. Horinouchi.** 1999. Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**:9112-9117.
162. **Kuge, S., M. Arita, A. Murayama, K. Maeta, S. Izawa, Y. Inoue, and A. Nomoto.** 2001. Regulation of the yeast Yap1p nuclear export signal is mediated by redox signal-induced reversible disulfide bond formation. *Mol. Cell Biol.* **21**:6139-6150.
163. **Kutay, U., F. R. Bischoff, S. Kostka, R. Kraft, and D. Gorlich.** 1997. Export of importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. *Cell* **90**:1061-1071.
164. **Kutay, U., G. Lipowsky, E. Izaurralde, F. R. Bischoff, P. Schwarzmaier, E. Hartmann, and D. Gorlich.** 1998. Identification of a tRNA-specific nuclear export receptor. *Mol. Cell* **1**:359-369.
165. **Kwong, A. D. and N. Frenkel.** 1989. The herpes simplex virus virion host shutoff function. *J. Virol.* **63**:4834-4839.

166. **Ia, C. T., L. Kierner, A. Molgaard, R. Gupta, K. Skriver, and S. Brunak.** 2004. Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng Des Sel* **17**:527-536.
167. **Lai, M. C., R. I. Lin, S. Y. Huang, C. W. Tsai, and W. Y. Tarn.** 2000. A human importin-beta family protein, transportin-SR2, interacts with the phosphorylated RS domain of SR proteins. *J. Biol. Chem.* **275**:7950-7957.
168. **Lam, M. H., L. J. Briggs, W. Hu, T. J. Martin, M. T. Gillespie, and D. A. Jans.** 1999. Importin beta recognizes parathyroid hormone-related protein with high affinity and mediates its nuclear import in the absence of importin alpha. *J. Biol. Chem.* **274**:7391-7398.
169. **Lam, M. H., R. J. Thomas, K. L. Loveland, S. Schilders, M. Gu, T. J. Martin, M. T. Gillespie, and D. A. Jans.** 2002. Nuclear transport of parathyroid hormone (PTH)-related protein is dependent on microtubules. *Mol. Endocrinol.* **16**:390-401.
170. **Lamberti, C. and S. K. Weller.** 1998. The herpes simplex virus type 1 cleavage/packaging protein, UL32, is involved in efficient localization of capsids to replication compartments. *J. Virol.* **72**:2463-2473.
171. **Le, H. H., D. Gatfield, E. Izaurralde, and M. J. Moore.** 2001. The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay. *EMBO J.* **20**:4987-4997.
172. **Le, H. H., E. Izaurralde, L. E. Maquat, and M. J. Moore.** 2000. The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *EMBO J.* **19**:6860-6869.
173. **Leach, N. R. and R. J. Roller.** 2010. Significance of host cell kinases in herpes simplex virus type 1 egress and lamin-associated protein disassembly from the nuclear lamina. *Virology* **406**:127-137.
174. **Lee, B. J., A. E. Cansizoglu, K. E. Suel, T. H. Louis, Z. Zhang, and Y. M. Chook.** 2006. Rules for nuclear localization sequence recognition by karyopherin beta 2. *Cell* **126**:543-558.
175. **Lee, J. H., S. Zhou, and C. M. Smas.** 2010. Identification of RANBP16 and RANBP17 as novel interaction partners for the bHLH transcription factor E12. *J. Cell Biochem.* **111**:195-206.
176. **Lee, S. J., Y. Matsuura, S. M. Liu, and M. Stewart.** 2005. Structural basis for nuclear import complex dissociation by RanGTP. *Nature* **435**:693-696.
177. **Lee, S. J., T. Sekimoto, E. Yamashita, E. Nagoshi, A. Nakagawa, N. Imamoto, M. Yoshimura, H. Sakai, K. T. Chong, T. Tsukihara, and Y. Yoneda.** 2003. The structure of importin-beta bound to SREBP-2: nuclear import of a transcription factor. *Science* **302**:1571-1575.
178. **Leege, T., W. Fuchs, H. Granzow, M. Kopp, B. G. Klupp, and T. C. Mettenleiter.** 2009. Effects of simultaneous deletion of pUL11 and glycoprotein M on virion maturation of herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* **83**:896-907.
179. **Lehman, I. R. and P. E. Boehmer.** 1999. Replication of herpes simplex virus DNA. *J. Biol. Chem.* **274**:28059-28062.
180. **Li, Y., Y. Yamakita, and R. M. Krug.** 1998. Regulation of a nuclear export signal by an adjacent inhibitory sequence: the effector domain of the influenza virus NS1 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**:4864-4869.
181. **Liang, L. and J. D. Baines.** 2005. Identification of an essential domain in the herpes simplex virus 1 UL34 protein that is necessary and sufficient to interact with UL31 protein. *J. Virol.* **79**:3797-3806.

182. **Lichtarge, O. and M. E. Sowa.** 2002. Evolutionary predictions of binding surfaces and interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**:21-27.
183. **Link, M. A. and P. A. Schaffer.** 2007. Herpes simplex virus type 1 C-terminal variants of the origin binding protein (OBP), OBPC-1 and OBPC-2, cooperatively regulate viral DNA levels in vitro, and OBPC-2 affects mortality in mice. *J. Virol.* **81**:10699-10711.
184. **Lipowsky, G., F. R. Bischoff, P. Schwarzmaier, R. Kraft, S. Kostka, E. Hartmann, U. Kutay, and D. Gorlich.** 2000. Exportin 4: a mediator of a novel nuclear export pathway in higher eukaryotes. *EMBO J.* **19**:4362-4371.
185. **Lischka, P., O. Rosorius, E. Trommer, and T. Stamminger.** 2001. A novel transferable nuclear export signal mediates CRM1-independent nucleocytoplasmic shuttling of the human cytomegalovirus transactivator protein pUL69. *EMBO J.* **20**:7271-7283.
186. **Liu, F. and B. Roizman.** 1992. Differentiation of multiple domains in the herpes simplex virus 1 protease encoded by the UL26 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**:2076-2080.
187. **Liu, F. and B. Roizman.** 1993. Characterization of the protease and other products of amino-terminus-proximal cleavage of the herpes simplex virus 1 UL26 protein. *J. Virol.* **67**:1300-1309.
188. **Liu, F. Y. and B. Roizman.** 1991. The herpes simplex virus 1 gene encoding a protease also contains within its coding domain the gene encoding the more abundant substrate. *J. Virol.* **65**:5149-5156.
189. **Liu, F. Y. and B. Roizman.** 1991. The promoter, transcriptional unit, and coding sequence of herpes simplex virus 1 family 35 proteins are contained within and in frame with the UL26 open reading frame. *J. Virol.* **65**:206-212.
190. **Liu, X. and J. E. Mertz.** 1995. HnRNP L binds a cis-acting RNA sequence element that enables intron-dependent gene expression. *Genes Dev.* **9**:1766-1780.
191. **Lo, H. W., M. li-Seyed, Y. Wu, G. Bartholomeusz, S. C. Hsu, and M. C. Hung.** 2006. Nuclear-cytoplasmic transport of EGFR involves receptor endocytosis, importin beta1 and CRM1. *J. Cell Biochem.* **98**:1570-1583.
192. **Loregian, A., E. Piaia, E. Cancellotti, E. Papini, H. S. Marsden, and G. Palu.** 2000. The catalytic subunit of herpes simplex virus type 1 DNA polymerase contains a nuclear localization signal in the UL42-binding region. *Virology* **273**:139-148.
193. **Loret, S., G. Guay, and R. Lippe.** 2008. Comprehensive characterization of extracellular herpes simplex virus type 1 virions. *J. Virol.* **82**:8605-8618.
194. **Lotzerich, M., Z. Ruzsics, and U. H. Koszinowski.** 2006. Functional domains of murine cytomegalovirus nuclear egress protein M53/p38. *J. Virol.* **80**:73-84.
195. **Lund, E., S. Guttinger, A. Calado, J. E. Dahlberg, and U. Kutay.** 2004. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* **303**:95-98.
196. **Luo, M. J. and R. Reed.** 1999. Splicing is required for rapid and efficient mRNA export in metazoans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**:14937-14942.
197. **Lusk, C. P., G. Blobel, and M. C. King.** 2007. Highway to the inner nuclear membrane: rules for the road. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**:414-420.
198. **Lymberopoulos, M. H. and A. Pearson.** 2007. Involvement of UL24 in herpes-simplex-virus-1-induced dispersal of nucleolin. *Virology* **363**:397-409.
199. **Macara, I. G.** 2001. Transport into and out of the nucleus. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**:570-94, table.

200. **Makkerh, J. P., C. Dingwall, and R. A. Laskey.** 1996. Comparative mutagenesis of nuclear localization signals reveals the importance of neutral and acidic amino acids. *Curr. Biol.* **6**:1025-1027.
201. **Malik, A. K., L. Shao, J. D. Shanley, and S. K. Weller.** 1996. Intracellular localization of the herpes simplex virus type-1 origin binding protein, UL9. *Virology* **224**:380-389.
202. **Mans, B. J., V. Anantharaman, L. Aravind, and E. V. Koonin.** 2004. Comparative genomics, evolution and origins of the nuclear envelope and nuclear pore complex. *Cell Cycle* **3**:1612-1637.
203. **Martin, A., P. O'Hare, J. McLauchlan, and G. Elliott.** 2002. Herpes simplex virus tegument protein VP22 contains overlapping domains for cytoplasmic localization, microtubule interaction, and chromatin binding. *J. Virol.* **76**:4961-4970.
204. **Matsuura, Y., A. Lange, M. T. Harreman, A. H. Corbett, and M. Stewart.** 2003. Structural basis for Nup2p function in cargo release and karyopherin recycling in nuclear import. *EMBO J.* **22**:5358-5369.
205. **Matsuura, Y. and M. Stewart.** 2004. Structural basis for the assembly of a nuclear export complex. *Nature* **432**:872-877.
206. **Matsuura, Y. and M. Stewart.** 2005. Nup50/Npap60 function in nuclear protein import complex disassembly and importin recycling. *EMBO J.* **24**:3681-3689.
207. **Mattaj, I. W. and C. W. Muller.** 2010. Solving the NES problem. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**:1288-1289.
208. **McGeoch, D. J. and D. Gatherer.** 2005. Integrating reptilian herpesviruses into the family herpesviridae. *J. Virol.* **79**:725-731.
209. **McGeoch, D. J., F. J. Rixon, and A. J. Davison.** 2006. Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Res.* **117**:90-104.
210. **McKinsey, T. A., C. L. Zhang, and E. N. Olson.** 2001. Identification of a signal-responsive nuclear export sequence in class II histone deacetylases. *Mol. Cell Biol.* **21**:6312-6321.
211. **McNab, A. R., P. Desai, S. Person, L. L. Roof, D. R. Thomsen, W. W. Newcomb, J. C. Brown, and F. L. Homa.** 1998. The product of the herpes simplex virus type 1 UL25 gene is required for encapsidation but not for cleavage of replicated viral DNA. *J. Virol.* **72**:1060-1070.
212. **Mears, W. E., V. Lam, and S. A. Rice.** 1995. Identification of nuclear and nucleolar localization signals in the herpes simplex virus regulatory protein ICP27. *J. Virol.* **69**:935-947.
213. **Meckes, D. G., Jr. and J. W. Wills.** 2007. Dynamic interactions of the UL16 tegument protein with the capsid of herpes simplex virus. *J. Virol.* **81**:13028-13036.
214. **Melen, K., R. Fagerlund, J. Franke, M. Kohler, L. Kinnunen, and I. Julkunen.** 2003. Importin alpha nuclear localization signal binding sites for STAT1, STAT2, and influenza A virus nucleoprotein. *J. Biol. Chem.* **278**:28193-28200.
215. **Mettenleiter, T. C.** 2002. Brief overview on cellular virus receptors. *Virus Res.* **82**:3-8.
216. **Mettenleiter, T. C.** 2004. Budding events in herpesvirus morphogenesis. *Virus Res.* **106**:167-180.
217. **Middeler, G., K. Zerf, S. Jenovai, A. Thulig, M. Tschodrich-Rotter, U. Kubitscheck, and R. Peters.** 1997. The tumor suppressor p53 is subject to both nuclear import and export, and both are fast, energy-dependent and lectin-inhibited. *Oncogene* **14**:1407-1417.

218. **Mingot, J. M., S. Kostka, R. Kraft, E. Hartmann, and D. Gorlich.** 2001. Importin 13: a novel mediator of nuclear import and export. *EMBO J.* **20**:3685-3694.
219. **Miyauchi, Y., T. Michigami, N. Sakaguchi, T. Sekimoto, Y. Yoneda, J. W. Pike, M. Yamagata, and K. Ozono.** 2005. Importin 4 is responsible for ligand-independent nuclear translocation of vitamin D receptor. *J. Biol. Chem.* **280**:40901-40908.
220. **Moore, J. D., J. Yang, R. Truant, and S. Kornbluth.** 1999. Nuclear import of Cdk/cyclin complexes: identification of distinct mechanisms for import of Cdk2/cyclin E and Cdc2/cyclin B1. *J. Cell Biol.* **144**:213-224.
221. **Moroianu, J., M. Hijikata, G. Blobel, and A. Radu.** 1995. Mammalian karyopherin alpha 1 beta and alpha 2 beta heterodimers: alpha 1 or alpha 2 subunit binds nuclear localization signal and beta subunit interacts with peptide repeat-containing nucleoporins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**:6532-6536.
222. **Mosammaparast, N. and L. F. Pemberton.** 2004. Karyopherins: from nuclear-transport mediators to nuclear-function regulators. *Trends Cell Biol.* **14**:547-556.
223. **Mou, F., T. Forest, and J. D. Baines.** 2007. US3 of herpes simplex virus type 1 encodes a promiscuous protein kinase that phosphorylates and alters localization of lamin A/C in infected cells. *J. Virol.* **81**:6459-6470.
224. **Mou, F., E. Wills, and J. D. Baines.** 2009. Phosphorylation of the U(L)31 protein of herpes simplex virus 1 by the U(S)3-encoded kinase regulates localization of the nuclear envelopment complex and egress of nucleocapsids. *J. Virol.* **83**:5181-5191.
225. **Mounkes, L., S. Kozlov, B. Burke, and C. L. Stewart.** 2003. The laminopathies: nuclear structure meets disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **13**:223-230.
226. **Nagel, C. H., K. Dohner, M. Fathollahy, T. Strive, E. M. Borst, M. Messerle, and B. Sodeik.** 2008. Nuclear egress and envelopment of herpes simplex virus capsids analyzed with dual-color fluorescence HSV1(17+). *J. Virol.* **82**:3109-3124.
227. **Nalwanga, D., S. Rempel, B. Roizman, and J. D. Baines.** 1996. The UL 16 gene product of herpes simplex virus 1 is a virion protein that colocalizes with intranuclear capsid proteins. *Virology* **226**:236-242.
228. **Nicola, A. V., A. M. McEvoy, and S. E. Straus.** 2003. Roles for endocytosis and low pH in herpes simplex virus entry into HeLa and Chinese hamster ovary cells. *J. Virol.* **77**:5324-5332.
229. **Nozawa, N., Y. Kawaguchi, M. Tanaka, A. Kato, A. Kato, H. Kimura, and Y. Nishiyama.** 2005. Herpes simplex virus type 1 UL51 protein is involved in maturation and egress of virus particles. *J. Virol.* **79**:6947-6956.
230. **O'Regan, K. J., M. A. Bucks, M. A. Murphy, J. W. Wills, and R. J. Courtney.** 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**:192-200.
231. **Ohno, M., A. Segref, A. Bachi, M. Wilm, and I. W. Mattaj.** 2000. PHAX, a mediator of U snRNA nuclear export whose activity is regulated by phosphorylation. *Cell* **101**:187-198.
232. **Ohtsubo, M., H. Okazaki, and T. Nishimoto.** 1989. The RCC1 protein, a regulator for the onset of chromosome condensation locates in the nucleus and binds to DNA. *J. Cell Biol.* **109**:1389-1397.
233. **Oien, N. L., D. R. Thomsen, M. W. Wathen, W. W. Newcomb, J. C. Brown, and F. L. Homa.** 1997. Assembly of herpes simplex virus capsids using the human cytomegalovirus scaffold protein: critical role of the C terminus. *J. Virol.* **71**:1281-1291.

234. **Ojala, P. M., B. Sodeik, M. W. Ebersold, U. Kutay, and A. Helenius.** 2000. Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro. *Mol. Cell Biol.* **20**:4922-4931.
235. **Okada, C., E. Yamashita, S. J. Lee, S. Shibata, J. Katahira, A. Nakagawa, Y. Yoneda, and T. Tsukihara.** 2009. A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery. *Science* **326**:1275-1279.
236. **Ott, M.** 2011. Charakterisierung von Virus- und Wirtsfaktoren mit Funktionen bei der Membranhüllung von Herpes simplex-Virus 1. Dissertation, LMU München.
237. **Palmeri, D. and M. H. Malim.** 1999. Importin beta can mediate the nuclear import of an arginine-rich nuclear localization signal in the absence of importin alpha. *Mol. Cell Biol.* **19**:1218-1225.
238. **Pante, N. and M. Kann.** 2002. Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm. *Mol. Biol. Cell* **13**:425-434.
239. **Paraskeva, E., E. Izaurralde, F. R. Bischoff, J. Huber, U. Kutay, E. Hartmann, R. Luhrmann, and D. Gorlich.** 1999. CRM1-mediated recycling of snurportin 1 to the cytoplasm. *J. Cell Biol.* **145**:255-264.
240. **Park, R. and J. D. Baines.** 2006. Herpes simplex virus type 1 infection induces activation and recruitment of protein kinase C to the nuclear membrane and increased phosphorylation of lamin B. *J. Virol.* **80**:494-504.
241. **Pearson, A. and D. M. Coen.** 2002. Identification, localization, and regulation of expression of the UL24 protein of herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* **76**:10821-10828.
242. **Pinol-Roma, S. and G. Dreyfuss.** 1992. Shuttling of pre-mRNA binding proteins between nucleus and cytoplasm. *Nature* **355**:730-732.
243. **Plafker, S. M. and I. G. Macara.** 2000. Importin-11, a nuclear import receptor for the ubiquitin-conjugating enzyme, UbcM2. *EMBO J.* **19**:5502-5513.
244. **Pollard, V. W., W. M. Michael, S. Nakielnny, M. C. Siomi, F. Wang, and G. Dreyfuss.** 1996. A novel receptor-mediated nuclear protein import pathway. *Cell* **86**:985-994.
245. **Polvino-Bodnar, M., P. K. Orberg, and P. A. Schaffer.** 1987. Herpes simplex virus type 1 oriL is not required for virus replication or for the establishment and reactivation of latent infection in mice. *J. Virol.* **61**:3528-3535.
246. **Pradeepa, M. M., S. Manjunatha, V. Sathish, S. Agrawal, and M. R. Rao.** 2008. Involvement of importin-4 in the transport of transition protein 2 into the spermatid nucleus. *Mol. Cell Biol.* **28**:4331-4341.
247. **Preston, V. G., J. A. Coates, and F. J. Rixon.** 1983. Identification and characterization of a herpes simplex virus gene product required for encapsidation of virus DNA. *J. Virol.* **45**:1056-1064.
248. **Purves, F. C., A. D. Deana, F. Marchiori, D. P. Leader, and L. A. Pinna.** 1986. The substrate specificity of the protein kinase induced in cells infected with herpesviruses: studies with synthetic substrates [corrected] indicate structural requirements distinct from other protein kinases. *Biochim. Biophys. Acta* **889**:208-215.
249. **Purves, F. C., D. Spector, and B. Roizman.** 1992. UL34, the target of the herpes simplex virus U(S)3 protein kinase, is a membrane protein which in its unphosphorylated state associates with novel phosphoproteins. *J. Virol.* **66**:4295-4303.

250. **Quan, Y., Z. L. Ji, X. Wang, A. M. Tartakoff, and T. Tao.** 2008. Evolutionary and transcriptional analysis of karyopherin beta superfamily proteins. *Mol. Cell Proteomics*. **7**:1254-1269.
251. **Quimby, B. B. and M. Dasso.** 2003. The small GTPase Ran: interpreting the signs. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**:338-344.
252. **Radu, A., G. Blobel, and M. S. Moore.** 1995. Identification of a protein complex that is required for nuclear protein import and mediates docking of import substrate to distinct nucleoporins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**:1769-1773.
253. **Rajcani, J., V. Andrea, and R. Ingeborg.** 2004. Peculiarities of herpes simplex virus (HSV) transcription: an overview. *Virus Genes* **28**:293-310.
254. **Rebane, A., A. Aab, and J. A. Steitz.** 2004. Transportins 1 and 2 are redundant nuclear import factors for hnRNP A1 and HuR. *RNA*. **10**:590-599.
255. **Reuven, N. B., S. Antoku, and S. K. Weller.** 2004. The UL12.5 gene product of herpes simplex virus type 1 exhibits nuclease and strand exchange activities but does not localize to the nucleus. *J. Virol.* **78**:4599-4608.
256. **Reynolds, A. E., L. Liang, and J. D. Baines.** 2004. Conformational changes in the nuclear lamina induced by herpes simplex virus type 1 require genes U(L)31 and U(L)34. *J. Virol.* **78**:5564-5575.
257. **Reynolds, A. E., B. J. Ryckman, J. D. Baines, Y. Zhou, L. Liang, and R. J. Roller.** 2001. U(L)31 and U(L)34 proteins of herpes simplex virus type 1 form a complex that accumulates at the nuclear rim and is required for envelopment of nucleocapsids. *J. Virol.* **75**:8803-8817.
258. **Reynolds, A. E., E. G. Wills, R. J. Roller, B. J. Ryckman, and J. D. Baines.** 2002. Ultrastructural localization of the herpes simplex virus type 1 UL31, UL34, and US3 proteins suggests specific roles in primary envelopment and egress of nucleocapsids. *J. Virol.* **76**:8939-8952.
259. **Ribbeck, K. and D. Gorlich.** 2002. The permeability barrier of nuclear pore complexes appears to operate via hydrophobic exclusion. *EMBO J.* **21**:2664-2671.
260. **Robbins, J., S. M. Dilworth, R. A. Laskey, and C. Dingwall.** 1991. Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* **64**:615-623.
261. **Roberts, A. P., F. Abaitua, P. O'Hare, D. McNab, F. J. Rixon, and D. Padeloup.** 2009. Differing roles of inner tegument proteins pUL36 and pUL37 during entry of herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* **83**:105-116.
262. **Roberts, K. L. and J. D. Baines.** 2011. UL31 of herpes simplex virus 1 is necessary for optimal NF-kappaB activation and expression of viral gene products. *J. Virol.* **85**:4947-4953.
263. **Robertson, B. J., P. J. McCann, III, L. Matusick-Kumar, V. G. Preston, and M. Gao.** 1997. Na, an autoproteolytic product of the herpes simplex virus type 1 protease, can functionally substitute for the assembly protein ICP35. *J. Virol.* **71**:1683-1687.
264. **Rodrigues, J. P., M. Rode, D. Gatfield, B. J. Blencowe, M. Carmo-Fonseca, and E. Izaurralde.** 2001. REF proteins mediate the export of spliced and unspliced mRNAs from the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**:1030-1035.
265. **Roizman, B. and J. Baines.** 1991. The diversity and unity of Herpesviridae. *Comp Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **14**:63-79.

266. **Roizman, B. and D. M. Knipe.** (eds. Knipe,D.M. and Howley,P.M). 2001. Herpes simplex viruses and their replication. In *Fundamental virology*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
267. **Roller, R. J., S. L. Bjerke, A. C. Haugo, and S. Hanson.** 2010. Analysis of a charge cluster mutation of herpes simplex virus type 1 UL34 and its extragenic suppressor suggests a novel interaction between pUL34 and pUL31 that is necessary for membrane curvature around capsids. *J. Virol.* **84**:3921-3934.
268. **Roller, R. J. and B. Roizman.** 1991. Herpes simplex virus 1 RNA-binding protein US11 negatively regulates the accumulation of a truncated viral mRNA. *J. Virol.* **65**:5873-5879.
269. **Roller, R. J., Y. Zhou, R. Schnetzer, J. Ferguson, and D. DeSalvo.** 2000. Herpes simplex virus type 1 U(L)34 gene product is required for viral envelopment. *J. Virol.* **74**:117-129.
270. **Rout, M. P., J. D. Aitchison, A. Suprpto, K. Hjertaas, Y. Zhao, and B. T. Chait.** 2000. The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J. Cell Biol.* **148**:635-651.
271. **Ryckman, B. J. and R. J. Roller.** 2004. Herpes simplex virus type 1 primary envelopment: UL34 protein modification and the US3-UL34 catalytic relationship. *J. Virol.* **78**:399-412.
272. **Salsman, J., N. Zimmerman, T. Chen, M. Domagala, and L. Frappier.** 2008. Genome-wide screen of three herpesviruses for protein subcellular localization and alteration of PML nuclear bodies. *PLoS. Pathog.* **4**:e1000100.
273. **Sandri-Goldin, R. M.** 1998. ICP27 mediates HSV RNA export by shuttling through a leucine-rich nuclear export signal and binding viral intronless RNAs through an RGG motif. *Genes Dev.* **12**:868-879.
274. **Seimiya, H., H. Sawada, Y. Muramatsu, M. Shimizu, K. Ohko, K. Yamane, and T. Tsuruo.** 2000. Involvement of 14-3-3 proteins in nuclear localization of telomerase. *EMBO J.* **19**:2652-2661.
275. **Sheaffer, A. K., W. W. Newcomb, J. C. Brown, M. Gao, S. K. Weller, and D. J. Tenney.** 2000. Evidence for controlled incorporation of herpes simplex virus type 1 UL26 protease into capsids. *J. Virol.* **74**:6838-6848.
276. **Shiba, C., T. Daikoku, F. Goshima, H. Takakuwa, Y. Yamauchi, O. Koiwai, and Y. Nishiyama.** 2000. The UL34 gene product of herpes simplex virus type 2 is a tail-anchored type II membrane protein that is significant for virus envelopment. *J. Gen. Virol.* **81**:2397-2405.
277. **Simpson-Holley, M., J. Baines, R. Roller, and D. M. Knipe.** 2004. Herpes simplex virus 1 U(L)31 and U(L)34 gene products promote the late maturation of viral replication compartments to the nuclear periphery. *J. Virol.* **78**:5591-5600.
278. **Siomi, M. C., P. S. Eder, N. Kataoka, L. Wan, Q. Liu, and G. Dreyfuss.** 1997. Transportin-mediated nuclear import of heterogeneous nuclear RNP proteins. *J. Cell Biol.* **138**:1181-1192.
279. **Skaliter, R., A. M. Makhov, J. D. Griffith, and I. R. Lehman.** 1996. Rolling circle DNA replication by extracts of herpes simplex virus type 1-infected human cells. *J. Virol.* **70**:1132-1136.
280. **Skepper, J. N., A. Whiteley, H. Browne, and A. Minson.** 2001. Herpes simplex virus nucleocapsids mature to progeny virions by an envelopment --> deenvelopment --> reenvelopment pathway. *J. Virol.* **75**:5697-5702.
281. **Smith, A., A. Brownawell, and I. G. Macara.** 1998. Nuclear import of Ran is mediated by the transport factor NTF2. *Curr. Biol.* **8**:1403-1406.

282. **Smith, A. E., B. M. Slepchenko, J. C. Schaff, L. M. Loew, and I. G. Macara.** 2002. Systems analysis of Ran transport. *Science* **295**:488-491.
283. **Smith, S. and G. Blobel.** 1993. The first membrane spanning region of the lamin B receptor is sufficient for sorting to the inner nuclear membrane. *J. Cell Biol.* **120**:631-637.
284. **Snyder, A., K. Polcicova, and D. C. Johnson.** 2008. Herpes simplex virus gE/gI and US9 proteins promote transport of both capsids and virion glycoproteins in neuronal axons. *J. Virol.* **82**:10613-10624.
285. **Sodeik, B., M. W. Ebersold, and A. Helenius.** 1997. Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J. Cell Biol.* **136**:1007-1021.
286. **Soliman, T. M. and S. J. Silverstein.** 2000. Identification of an export control sequence and a requirement for the KH domains in ICP27 from herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* **74**:7600-7609.
287. **Soullam, B. and H. J. Worman.** 1993. The amino-terminal domain of the lamin B receptor is a nuclear envelope targeting signal. *J. Cell Biol.* **120**:1093-1100.
288. **Soullam, B. and H. J. Worman.** 1995. Signals and structural features involved in integral membrane protein targeting to the inner nuclear membrane. *J. Cell Biol.* **130**:15-27.
289. **Spear, P. G.** 2004. Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. *Cell Microbiol.* **6**:401-410.
290. **Spear, P. G. and R. Longnecker.** 2003. Herpesvirus entry: an update. *J. Virol.* **77**:10179-10185.
291. **Stauber, R. H.** 2001. Methods and assays to investigate nuclear export. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **259**:119-128.
292. **Stelz, G., E. Rucker, O. Rosorius, G. Meyer, R. H. Stauber, M. Spatz, M. M. Eibl, and J. Hauber.** 2002. Identification of two nuclear import signals in the alpha-gene product ICP22 of herpes simplex virus 1. *Virology* **295**:360-370.
293. **Stern, S., M. Tanaka, and W. Herr.** 1989. The Oct-1 homoeodomain directs formation of a multiprotein-DNA complex with the HSV transactivator VP16. *Nature* **341**:624-630.
294. **Stevenson, A. J., E. E. Morrison, R. Chaudhari, C. C. Yang, and D. M. Meredith.** 1997. Processing and intracellular localization of the herpes simplex virus type 1 proteinase. *J. Gen. Virol.* **78 (Pt 3)**:671-675.
295. **Stewart, M., R. P. Baker, R. Bayliss, L. Clayton, R. P. Grant, T. Littlewood, and Y. Matsuura.** 2001. Molecular mechanism of translocation through nuclear pore complexes during nuclear protein import. *FEBS Lett.* **498**:145-149.
296. **Stingley, S. W., J. J. Ramirez, S. A. Aguilar, K. Simmen, R. M. Sandri-Goldin, P. Ghazal, and E. K. Wagner.** 2000. Global analysis of herpes simplex virus type 1 transcription using an oligonucleotide-based DNA microarray. *J. Virol.* **74**:9916-9927.
297. **Stoffler, D., B. Feja, B. Fahrenkrog, J. Walz, D. Typke, and U. Aebi.** 2003. Cryo-electron tomography provides novel insights into nuclear pore architecture: implications for nucleocytoplasmic transport. *J. Mol. Biol.* **328**:119-130.
298. **Stommel, J. M., N. D. Marchenko, G. S. Jimenez, U. M. Moll, T. J. Hope, and G. M. Wahl.** 1999. A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *EMBO J.* **18**:1660-1672.
299. **Stow, N. D.** 2001. Packaging of genomic and amplicon DNA by the herpes simplex virus type 1 UL25-null mutant KUL25NS. *J. Virol.* **75**:10755-10765.

300. **Striebinger, H.** 2011. Membran-assoziierte Protein-Protein-Interaktionen des Herpes simplex-Virus 1. Dissertation, LMU München.
301. **Strom, A. C. and K. Weis.** 2001. Importin-beta-like nuclear transport receptors. *Genome Biol.* **2**:REVIEWS3008.
302. **Stutz, F., A. Bachi, T. Doerks, I. C. Braun, B. Seraphin, M. Wilm, P. Bork, and E. Izaurralde.** 2000. REF, an evolutionary conserved family of hnRNP-like proteins, interacts with TAP/Mex67p and participates in mRNA nuclear export. *RNA.* **6**:638-650.
303. **Stuven, T., E. Hartmann, and D. Gorlich.** 2003. Exportin 6: a novel nuclear export receptor that is specific for profilin.actin complexes. *EMBO J.* **22**:5928-5940.
304. **Suntharalingam, M. and S. R. Wentz.** 2003. Peering through the pore: nuclear pore complex structure, assembly, and function. *Dev. Cell* **4**:775-789.
305. **Suzuki, M., M. Iijima, A. Nishimura, Y. Tomozoe, D. Kamei, and M. Yamada.** 2005. Two separate regions essential for nuclear import of the hnRNP D nucleocytoplasmic shuttling sequence. *FEBS J.* **272**:3975-3987.
306. **Takakuwa, H., F. Goshima, T. Koshizuka, T. Murata, T. Daikoku, and Y. Nishiyama.** 2001. Herpes simplex virus encodes a virion-associated protein which promotes long cellular processes in over-expressing cells. *Genes Cells* **6**:955-966.
307. **Takizawa, C. G., K. Weis, and D. O. Morgan.** 1999. Ran-independent nuclear import of cyclin B1-Cdc2 by importin beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**:7938-7943.
308. **Tanaka, M., T. Sata, and Y. Kawaguchi.** 2008. The product of the Herpes simplex virus 1 UL7 gene interacts with a mitochondrial protein, adenine nucleotide translocator 2. *Viol. J.* **5**:125.
309. **Tao, T., J. Lan, G. L. Lukacs, R. J. Hache, and F. Kaplan.** 2006. Importin 13 regulates nuclear import of the glucocorticoid receptor in airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **35**:668-680.
310. **Taylor, T. J., M. A. Brockman, E. E. McNamee, and D. M. Knipe.** 2002. Herpes simplex virus. *Front Biosci.* **7**:d752-d764.
311. **Thomsen, D. R., W. W. Newcomb, J. C. Brown, and F. L. Homa.** 1995. Assembly of the herpes simplex virus capsid: requirement for the carboxyl-terminal twenty-five amino acids of the proteins encoded by the UL26 and UL26.5 genes. *J. Virol.* **69**:3690-3703.
312. **Tiganis, T., A. J. Flint, S. A. Adam, and N. K. Tonks.** 1997. Association of the T-cell protein tyrosine phosphatase with nuclear import factor p97. *J. Biol. Chem.* **272**:21548-21557.
313. **Tran, E. J. and S. R. Wentz.** 2006. Dynamic nuclear pore complexes: life on the edge. *Cell* **125**:1041-1053.
314. **Truant, R. and B. R. Cullen.** 1999. The arginine-rich domains present in human immunodeficiency virus type 1 Tat and Rev function as direct importin beta-dependent nuclear localization signals. *Mol. Cell Biol.* **19**:1210-1217.
315. **Truant, R., Y. Kang, and B. R. Cullen.** 1999. The human tap nuclear RNA export factor contains a novel transportin-dependent nuclear localization signal that lacks nuclear export signal function. *J. Biol. Chem.* **274**:32167-32171.
316. **Tunncliffe, R. B., G. M. Hautbergue, P. Kalra, B. R. Jackson, A. Whitehouse, S. A. Wilson, and A. P. Golovanov.** 2011. Structural basis for the recognition of cellular mRNA export factor REF by herpes viral proteins HSV-1 ICP27 and HVS ORF57. *PLoS. Pathog.* **7**:e1001244.

317. **Venkatesan, K., J. F. Rual, A. Vazquez, U. Stelzl, I. Lemmens, T. Hirozane-Kishikawa, T. Hao, M. Zenkner, X. Xin, K. I. Goh, M. A. Yildirim, N. Simonis, K. Heinzmann, F. Gebreab, J. M. Sahalie, S. Cevik, C. Simon, A. S. de Smet, E. Dann, A. Smolyar, A. Vinayagam, H. Yu, D. Szeto, H. Borick, A. Dricot, N. Klitgord, R. R. Murray, C. Lin, M. Lalowski, J. Timm, K. Rau, C. Boone, P. Braun, M. E. Cusick, F. P. Roth, D. E. Hill, J. Tavernier, E. E. Wanker, A. L. Barabasi, and M. Vidal.** 2009. An empirical framework for binary interactome mapping. *Nat. Methods* **6**:83-90.
318. **Vetter, I. R., C. Nowak, T. Nishimoto, J. Kuhlmann, and A. Wittinghofer.** 1999. Structure of a Ran-binding domain complexed with Ran bound to a GTP analogue: implications for nuclear transport. *Nature* **398**:39-46.
319. **Vittone, V., E. Diefenbach, D. Triffett, M. W. Douglas, A. L. Cunningham, and R. J. Diefenbach.** 2005. Determination of interactions between tegument proteins of herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* **79**:9566-9571.
320. **Wadsworth, S., R. J. Jacob, and B. Roizman.** 1975. Anatomy of herpes simplex virus DNA. II. Size, composition, and arrangement of inverted terminal repetitions. *J. Virol.* **15**:1487-1497.
321. **Ward, P. L., B. Taddeo, N. S. Markovitz, and B. Roizman.** 2000. Identification of a novel expressed open reading frame situated between genes U(L)20 and U(L)21 of the herpes simplex virus 1 genome. *Virology* **266**:275-285.
322. **Watanabe, D., Y. Ushijima, F. Goshima, H. Takakuwa, Y. Tomita, and Y. Nishiyama.** 2000. Identification of nuclear export signal in UL37 protein of herpes simplex virus type 2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **276**:1248-1254.
323. **Weis, K.** 2003. Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell* **112**:441-451.
324. **Wen, W., J. L. Meinkoth, R. Y. Tsien, and S. S. Taylor.** 1995. Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. *Cell* **82**:463-473.
325. **Wen, W., S. S. Taylor, and J. L. Meinkoth.** 1995. The expression and intracellular distribution of the heat-stable protein kinase inhibitor is cell cycle regulated. *J. Biol. Chem.* **270**:2041-2046.
326. **Wild, P., M. Engels, C. Senn, K. Tobler, U. Ziegler, E. M. Schraner, E. Loepfe, M. Ackermann, M. Mueller, and P. Walther.** 2005. Impairment of nuclear pores in bovine herpesvirus 1-infected MDBK cells. *J. Virol.* **79**:1071-1083.
327. **Williams, P., J. Verhagen, and G. Elliott.** 2008. Characterization of a CRM1-dependent nuclear export signal in the C terminus of herpes simplex virus type 1 tegument protein UL47. *J. Virol.* **82**:10946-10952.
328. **Wiskerchen, M. and M. A. Muesing.** 1995. Identification and characterization of a temperature-sensitive mutant of human immunodeficiency virus type 1 by alanine scanning mutagenesis of the integrase gene. *J. Virol.* **69**:597-601.
329. **Wolff, B., J. J. Sanglier, and Y. Wang.** 1997. Leptomycin B is an inhibitor of nuclear export: inhibition of nucleocytoplasmic translocation of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Rev protein and Rev-dependent mRNA. *Chem. Biol.* **4**:139-147.
330. **Xiao, Z., X. Liu, and H. F. Lodish.** 2000. Importin beta mediates nuclear translocation of Smad 3. *J. Biol. Chem.* **275**:23425-23428.
331. **Xing, J., S. Wang, F. Lin, W. Pan, C. D. Hu, and C. Zheng.** 2011. Comprehensive characterization of interaction complexes of herpes simplex virus type 1 ICP22, UL3, UL4, and UL20.5. *J. Virol.* **85**:1881-1886.

332. **Xing, J., F. Wu, W. Pan, and C. Zheng.** 2010. Molecular anatomy of subcellular localization of HSV-1 tegument protein US11 in living cells. *Virus Res.* **153**:71-81.
333. **Yamada, H., T. Daikoku, Y. Yamashita, Y. M. Jiang, T. Tsurumi, and Y. Nishiyama.** 1997. The product of the US10 gene of herpes simplex virus type 1 is a capsid/tegument-associated phosphoprotein which copurifies with the nuclear matrix. *J. Gen. Virol.* **78 (Pt 11)**:2923-2931.
334. **Yamada, H., Y. M. Jiang, S. Oshima, T. Daikoku, Y. Yamashita, T. Tsurumi, and Y. Nishiyama.** 1998. Characterization of the UL55 gene product of herpes simplex virus type 2. *J. Gen. Virol.* **79 (Pt 8)**:1989-1995.
335. **Yamauchi, Y., C. Shiba, F. Goshima, A. Nawa, T. Murata, and Y. Nishiyama.** 2001. Herpes simplex virus type 2 UL34 protein requires UL31 protein for its relocation to the internal nuclear membrane in transfected cells. *J. Gen. Virol.* **82**:1423-1428.
336. **Yan, C., L. H. Lee, and L. I. Davis.** 1998. Crm1p mediates regulated nuclear export of a yeast AP-1-like transcription factor. *EMBO J.* **17**:7416-7429.
337. **Yang, K. and J. D. Baines.** 2011. Selection of HSV capsids for envelopment involves interaction between capsid surface components pUL31, pUL17, pUL25. *PNAS J.* **108**:14276-14281
338. **Yang, K., F. Homa, and J. D. Baines.** 2007. Putative terminase subunits of herpes simplex virus 1 form a complex in the cytoplasm and interact with portal protein in the nucleus. *J. Virol.* **81**:6419-6433.
339. **Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing.** 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**:103-119.
340. **Yau, D. M., N. Sethakorn, S. Taurin, S. Kregel, N. Sandbo, B. Camoretti-Mercado, A. I. Sperling, and N. O. Dulin.** 2008. Regulation of Smad-mediated gene transcription by RGS3. *Mol. Pharmacol.* **73**:1356-1361.
341. **Yedowitz, J. C., A. Kotsakis, E. F. Schlegel, and J. A. Blaho.** 2005. Nuclear localizations of the herpes simplex virus type 1 tegument proteins VP13/14, vhs, and VP16 precede VP22-dependent microtubule reorganization and VP22 nuclear import. *J. Virol.* **79**:4730-4743.
342. **Yu, D. and S. K. Weller.** 1998. Genetic analysis of the UL 15 gene locus for the putative terminase of herpes simplex virus type 1. *Virology* **243**:32-44.
343. **Yu, H., P. Braun, M. A. Yildirim, I. Lemmens, K. Venkatesan, J. Sahalie, T. Hirozane-Kishikawa, F. Gebreab, N. Li, N. Simonis, T. Hao, J. F. Rual, A. Dricot, A. Vazquez, R. R. Murray, C. Simon, L. Tardivo, S. Tam, N. Svrzikapa, C. Fan, A. S. de Smet, A. Motyl, M. E. Hudson, J. Park, X. Xin, M. E. Cusick, T. Moore, C. Boone, M. Snyder, F. P. Roth, A. L. Barabasi, J. Tavernier, D. E. Hill, and M. Vidal.** 2008. High-quality binary protein interaction map of the yeast interactome network. *Science* **322**:104-110.
344. **Zhang, J., C. H. Nagel, B. Sodeik, and R. Lippe.** 2009. Early, active, and specific localization of herpes simplex virus type 1 gM to nuclear membranes. *J. Virol.* **83**:12984-12997.
345. **Zhang, Y. and Y. Xiong.** 2001. A p53 amino-terminal nuclear export signal inhibited by DNA damage-induced phosphorylation. *Science* **292**:1910-1915.
346. **Zhou, Z., M. J. Luo, K. Straesser, J. Katahira, E. Hurt, and R. Reed.** 2000. The protein Aly links pre-messenger-RNA splicing to nuclear export in metazoans. *Nature* **407**:401-405.
347. **Zolotukhin, A. S. and B. K. Felber.** 1997. Mutations in the nuclear export signal of human ran-binding protein RanBP1 block the Rev-mediated posttranscriptional regulation of human immunodeficiency virus type 1. *J. Biol. Chem.* **272**:11356-11360.

7 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Verena Raschbichler, geb. Hofer
Geburtsdatum: 26.01.1981
Geburtsort: München
Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: deutsch

Akademische Ausbildung

07/2007 – 10/2011 Promotion am Max von Pettenkofer-Institut der Ludwig-Maximilians-Universität, München, AG Prof. Dr. Jürgen Haas
Thema: „Genomweite Analyse des nukleo-zytoplasmatischen Transports herpesviraler Proteine“

08/2006 - 05/2007 Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität, München, AG Prof. Dr. Kirsten Jung
Thema: „Bedeutung bestimmter Proteine unbekannter Funktion bei der Osmoadaptation in *Escherichia coli*“

10/2003 - 05/2007 Hauptstudium der Biologie in dem Hauptfach Mikrobiologie und den Nebenfächern Biochemie, Genetik und Immunologie an der Ludwig-Maximilians-Universität, München

10/2001 - 09/2003 Grundstudium Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität, München

Schulbildung

1997 - 2001 Theodolinden-Gymnasium München
1993 - 1997 Wilhelm-Busch-Realschule München
1991 - 1993 Hauptschule an der Turnerstraße
1987 - 1991 Grundschule an der Oberföhringer Straße

8 Publikationen und Kongressbeiträge

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Oktober 2007 bis Oktober 2011 am Max von Pettenkofer-Institut der Ludwig-Maximilians-Universität in München angefertigt. Teile dieser Dissertation werden unter folgenden Titel veröffentlicht:

Verena Raschbichler, Susanne M. Bailer „An *in vivo* method for high throughput analysis of nuclear export.“ Eingereicht

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

* geteilte Erstautorenschaft

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

Frederic Lemnitzer, **Verena Raschbichler**, Dominika Kolodziejczak, Lars Israel, Axel Imhof, Susanne Bailer, Ulrich Koszinowski, Zsolt Ruzsics „Mouse cytomegalovirus egress protein pM50 interacts with cellular endophilin-A2.“ Eingereicht

Samantha J. Griffiths, Manfred Koegl, Susanne M. Bailer, Chris Boutell, Helen L. Zenner, Colin Crump, Orland Gonzalez, Caroline C. Friedel, Melanie Ott, **Verena Raschbichler**, Hannah Striebinger, Gabriella Siszler, Frank Schwarz, Gerrald Barry, Kimberley Martin, Marie H. Craigon, Rui Chen, Lakshmi N. Kaza, Even Fossum, John K. Fazakerley, Stacey Efstathiou, Ralf Zimmer, Peter Ghazal, Jürgen Haas „A systematic and integrative analysis of host factors in Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) infection.“ In Vorbereitung

Teile dieser Arbeit wurden auf folgenden Kongressen präsentiert:

Verena Hofer, Jürgen Haas, Susanne M. Bailer „The spatio-temporal distribution of herpesviral proteins in the course of infection.“ Mitarbeiterseminar des Bayerischen Genomforschungsnetzwerkes, München, April 2009 (Vortrag)

Verena Hofer, Melanie Ott, Jürgen Haas, Susanne M. Bailer „Nucleo-cytoplasmic transport of herpesviral proteins – a genome-wide analysis.“ 4th European Congress of Virology, Cernobbio, April 2010 (Posterpräsentation)

Verena Hofer, Melanie Ott, Jürgen Haas, Susanne M. Bailer „Nucleo-cytoplasmic transport of herpesviral proteins – a genome-wide analysis.” Workshop: Cell Biology of Viral Infection, Deidesheim, September 2010 (Vortrag)

Verena Hofer, Caroline C. Friedel, Jürgen Haas, Susanne M. Bailer „Analysis of nuclear export of Herpes simplex virus 1 proteins using a novel *in vivo* high through-put assay.” 21. Jahrestagung der GfV, Freiburg, März 2011 (Posterpräsentation)

Verena Hofer, Susanne M. Bailer „A novel *in vivo* high through-put assay to analyse nuclear export of proteins.” 34. Jahrestagung der DGZ, Bonn, April 2011 (Posterpräsentation)

9 Danksagung

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

Besonders bedanken möchte ich mich bei PD Dr. Susanne M. Bailer für die Bereitstellung des interessanten Themas, sowie für die exzellente Betreuung und Unterstützung, der zahlreichen Anregungen und Ideen zu dieser Arbeit, ihrer Gesprächsbereitschaft, Motivationsfähigkeit und der kritischen Durchsicht dieses Manuskripts. All dies hat entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Außerdem danke ich Prof. Dr. Dr. Jürgen Haas für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe am Max von Pettenkofer-Institut durchführen zu können.

Ich danke auch allen Kooperationspartnern für ihre Zusammenarbeit, speziell Dr. Manfred Kögl und Gabriella Siszler für die Durchführung der LUMIER-Studien, sowie Dr. R. Zimmer, insbesondere Dr. Caroline C. Friedel für die bioinformatische Vorhersage klassisch nukleärer Import- und Exportsequenzen.

Ein großes Dankeschön geht auch an all meine Laborkollegen und Kollegen am Max von Pettenkofer-Institut, vor allem an Hannah, Julia, Melanie und Marcus, und an die Mitglieder der „AG Spaß“ für die ständige Unterstützung und die schönen Momente, ohne die der Laboralltag nur halb so schön gewesen wäre.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, vor allem meinen Eltern und Chris, dass sie immer für mich da sind, mich in jeder Situation unterstützen und mir damit so vieles – wie auch diese Arbeit – erst ermöglicht haben. Vielen Dank für alles!