

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,  
Infektions- und Seuchenmedizin  
der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
(Vorstand: Prof. Dr. O.-R. Kaaden)

Angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. Oskar-Rüger Kaaden

**Untersuchungen zur Struktur und Funktion der UL11- und UL20-Proteine  
des equinen Herpesvirus Typ 1**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen  
Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Von  
Simone Guggemoos  
aus Garmisch-Partenkirchen

München 2004

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

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
1. Referent:	Univ.-Prof. Dr. O.-R. Kaaden
2. Referent:	Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer
1. Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. T. Göbel
2. Korreferent:	Priv.-Doz. Dr. P. Kölle
3. Korreferent:	Prof. Dr. M. El-Matbouli

Tag der Promotion: 23. Juli 2004

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>2. SCHRIFTTUM</b>	<b>2</b>
2.1 Das equine Herpesvirus Typ 1 (EHV-1)	2
2.1.1 Infektionen mit EHV-1	2
2.1.2 Die EHV-1-Stämme RacL (RacL11, RacL22), RacH und KyA	3
2.1.3 Klassifizierung	4
2.1.4 Struktur	4
2.1.5 Genom	5
2.1.6 Virale Proteine	5
2.1.7 Genexpression	6
2.1.8 Replikationszyklus	7
2.1.8.1 Viruseintritt und Replikation	7
2.1.8.2 Zusammenbau der Viruspartikel und Ausschleusung aus der Zelle	8
2.1.8.3 Ausbreitung der Infektion direkt von Zelle zu Zelle	11
2.2 Das UL20-Protein bei HSV-1 und anderen Alphaherpesviren	11
2.3 Multipel hydrophobe Transmembranproteine	15
2.4 Das UL11-Protein bei EHV-1	16
2.5 Lipid Rafts	18
2.6 Das UL49-Protein bei HSV-1 und anderen Alphaherpesviren	19
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>20</b>
3.1 Material	20
3.1.1 Zellen	20
3.1.2 Versuchstiere	20
3.1.3 Bakterien und Plasmide	20
3.1.3.1 Bakterien	20
3.1.3.2 Plasmide	20
3.1.3.3 BACs („bacterial artificial chromosomes“)	21

3.1.4	Antikörper und Antiseren	21
3.1.4.1	Monoklonale Antikörper	21
3.1.4.2	Polyklonale Antikörper	21
3.1.4.3	Mit Peroxidase (POD) konjugierte Antikörper	22
3.1.4.4	Mit ALEXA konjugierte Antikörper	22
3.1.4.5	Mit Alkalischer Phosphatase (AP) konjugierte Antikörper	22
3.1.5	Puffer, Lösungen und Reagenzien	22
3.1.6	Geräte, Laborhilfsmittel und Verbrauchsmaterialien	34
3.2	Methoden	36
3.2.1	Zellen	36
3.2.1.1	Zellkultur	36
3.2.1.2	Kryokonservierung von Zellen	36
3.2.1.3	Herstellung von Zelllysaten für den Western Blot	36
3.2.1.4	Zellfraktionierung	37
3.2.1.5	Transfektion eukaryotischer Zellen mit PerFectin™	38
3.2.1.6	Herstellung rekombinanter Zelllinien	38
3.2.2	Virus	38
3.2.2.1	Verwendete Virusstämme	38
3.2.2.2	Virusvermehrung in Zellkultur	39
3.2.2.3	Virustitration	39
3.2.2.4	Präparation viraler DNS	39
3.2.2.5	Aufreinigung extrazellulärer Virionen	40
3.2.2.6	Trennung gereinigter Virionen in Hülle und Kapsid	41
3.2.2.7	Hemmung der DNS-Synthese mit Phosphonoessigsäure (PAA)	41
3.2.2.8	Hemmung der N-Glykosylierung mit Tunicamycin	41
3.2.3	DNS	42
3.2.3.1	Amplifizierung von DNS mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	42
3.2.3.2	Präparation und Aufreinigung von DNS nach PCR oder Restriktionsenzymverdau	43
3.2.3.3	DNS-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen	43
3.2.3.4	Ligation von DNS-Fragmenten	43
3.2.3.5	DNS-DNS-Hybridisierung (Southern Blot)	44
3.2.3.6	Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNS	45

---

3.2.3.7	Isolierung von Plasmid-DNS aus transformierten Bakterien	46
3.2.3.8	DNS-Konzentrationsbestimmung	47
3.2.3.9	Konservierung von Bakterien mit Plasmid-DNS	47
3.2.4	Herstellung rekombinanter Viren	47
3.2.4.1	BAC-Mutagenese	48
3.2.4.2	Amplifizierung und Aufreinigung linearer Rekombinationssequenzen	49
3.2.4.3	Herstellung elektrokompeter Bakterien für die Elektroporation	50
3.2.4.4	Transformation durch Elektroporation	50
3.2.4.5	Elimination des Kanamycin-Resistenzgens	51
3.2.4.6	Herstellung einer Doppelmutante	51
3.2.4.7	Isolierung von BAC-DNS aus Bakterien	51
3.2.4.8	Elimination der BAC-Sequenz	52
3.2.5	Charakterisierung rekombinanter Viren <i>in vitro</i>	53
3.2.5.1	Einschritt-Wachstumskinetik	53
3.2.5.2	Plauegrößenbestimmung	53
3.2.6	Expression und Aufreinigung des UL20-Proteins von EHV-1 in Bakterien	54
3.2.6.1	Expression	54
3.2.6.2	Aufreinigung	55
3.2.7	Immunisierung von Kaninchen zur Antikörpergewinnung	56
3.2.8	Proteine	56
3.2.8.1	Proteinanalyse mittels Elektrophorese	56
3.2.8.1.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	56
3.2.8.1.2	Färbung von Polyacrylamidgelen mit Coomassie Brilliant Blau	58
3.2.8.1.3	Elektrotransfer und Immundetektion von Proteinen (Western Blot)	59
3.2.8.2	Indirekte Immunfluoreszenz (IIF)	59
3.2.8.3	Assoziation von Proteinen mit Lipid Rafts	60
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>61</b>
4.1	UL20	61
4.1.1	Herstellung rekombinanter Plasmide	61
4.1.2	Herstellung einer UL20-exprimierenden Zelllinie	63
4.1.3	Charakterisierung des UL20-Proteins	63

4.1.3.1	Herstellung eines UL20-spezifischen polyklonalen Antiserums	63
4.1.3.2	Das UL20-Protein im Western Blot	64
4.1.3.2.1	Identifizierung des UL20-Proteins	64
4.1.3.2.2	Das UL20-Protein wird ab 6 h p.i. exprimiert	65
4.1.3.2.3	Das UL20-Protein gehört zur Klasse der $\gamma_1$ -Proteine	65
4.1.3.2.4	Das UL20-Protein ist nicht glykosyliert	68
4.1.3.2.5	Das UL20-Protein ist membranassoziiert	69
4.1.3.2.6	Das UL20-Protein ist Bestandteil der Hülle extrazellulärer Virionen	70
4.1.3.3	Das UL20-Protein in der indirekten Immunfluoreszenz	72
4.1.4	Deletionsmutanten	73
4.1.4.1	Konstruktion UL20-negativer Mutanten der Stämme RacL11 und RacH (L11 $\Delta$ 20 und H $\Delta$ 20)	73
4.1.4.2	Konstruktion UL20-positiver Revertanten (L11 $\Delta$ 20Rev und H $\Delta$ 20Rev)	73
4.1.4.3	Charakterisierung des Genotyps der Mutanten und Revertanten	75
4.1.4.4	Darstellung der Mutanten und Revertanten im Western Blot	76
4.1.4.5	Charakterisierung von L11 $\Delta$ 20, H $\Delta$ 20, L11 $\Delta$ 20Rev und H $\Delta$ 20Rev in Zellkultur	78
4.1.4.5.1	Einschritt-Wachstumskinetik	78
4.1.4.5.2	Plauephänotyp	78
4.2	UL11	81
4.2.1	Untersuchung der Myristylierung des UL11-Proteins	81
4.2.2	Funktion des UL11-Proteins im „viral egress“ und „cell-to-cell-spread“	85
4.2.2.1	UL11-Deletionsmutanten der Stämme RacL11 und KyA (L11 $\Delta$ 11 und KyA $\Delta$ 11)	85
4.2.2.1.1	Konstruktion	85
4.2.2.1.2	Charakterisierung des Genotyps	87
4.2.2.2	UL49-Deletionsmutante des Stammes RacL11 (L11 $\Delta$ 49)	89
4.2.2.2.1	Konstruktion	89
4.2.2.2.2	Charakterisierung des Genotyps	90
4.2.2.3	UL11- und UL49-negative Mutante des Stammes RacL11 (L11 $\Delta$ 49 $\Delta$ 11)	91
4.2.2.3.1	Konstruktion	91
4.2.2.3.2	Charakterisierung des Genotyps	92
4.2.2.4	Darstellung der UL11-deletierten Viren im Western Blot	92

4.2.2.5	Charakterisierung der rekombinanten Viren L22 $\Delta$ 11, L11 $\Delta$ 11, KyA $\Delta$ 11 und L11 $\Delta$ 49 $\Delta$ 11 in Zellkultur	93
4.2.2.5.1	Einschritt-Wachstumskinetik	93
4.2.2.5.2	Plauephänotyp	97
4.3	Untersuchung der Assoziation von EHV-1-Proteinen mit Lipid Rafts	99
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>101</b>
5.1	Das UL20-Protein bei EHV-1	101
5.2	Das UL11-Protein bei EHV-1	107
5.3	Assoziation von EHV-1-Proteinen mit Lipid Rafts	112
<b>6.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY</b>	<b>115</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>119</b>
<b>8.</b>	<b>ANHANG</b>	<b>135</b>

## 1. EINLEITUNG

Das equine Herpesvirus Typ 1 (EHV-1) ist in der Pferdepopulation weit verbreitet. Es verursacht respiratorische Erkrankungen, seuchenhaft auftretende Spätaborte und kann in selteneren Fällen zu neurologischen Ausfallserscheinungen führen.

Das Virus ist in seiner Vermehrung auf eukaryotische Zellen angewiesen. Für eine Vielzahl von Vorgängen während des viralen Replikationszyklus nutzt es zelluläre Strukturen. Beim Eintritt reagiert es mit Rezeptoren der Zellmembran, seine DNS wird durch eine zelluläre Polymerase transkribiert und seine Proteine im Endoplasmatischen Retikulum synthetisiert. Für den Weg aus der infizierten Zelle stehen EHV-1 zwei Möglichkeiten zur Verfügung: Beim sog. „viral egress“, der Freisetzung infektiöser Virionen in den Extrazellulärraum, nutzt es zelluläre Membranen für seine Umhüllung und Golgi-Vesikel für seinen Transport zur Zelloberfläche. Die zellulären Strukturen, die beim sog. „cell-to-cell-spread“, der für die Pathogenese von EHV-1 essentiellen Ausbreitung des Virus direkt von Zelle zu Zelle, eine Rolle spielen, sind noch weitgehend unbekannt. Es ist wichtig, virale Proteine den einzelnen zellulären Strukturen zuordnen zu können, denn nur so können Rückschlüsse auf ihre Funktion gezogen und eventuell später gezielte Manipulationen im Rahmen von Prophylaxe und Therapie unternommen werden.

Theorie dieser Arbeit ist ein Zusammenspiel der EHV-1-Proteine pUL20 und pUL11 in späten Stadien des Replikationszyklus. Diese Theorie beruht auf der Annahme, dass beide Proteine mit bestimmten Bereichen zellulärer Membranen, sog. Lipid Rafts, assoziieren und dadurch gemeinsam den „cell-to-cell-spread“ ermöglichen. Lipid Rafts sind definierte, stabile Membrandomänen, die in anderen Virussystemen für Zusammenbau und Umhüllung genutzt werden. Das UL20-Protein musste zunächst initial charakterisiert werden. Es sollte durch vergleichende Untersuchungen mit dem virulenten EHV-1-Isolat RacL11 und dem Impfstamm RacH in Zellkultur identifiziert und in der infizierten Zelle lokalisiert werden. Anhand von Deletionsmutanten sollte die Funktion des Proteins in Zellkultur geklärt werden. Für das UL11-Protein liegen bereits strukturelle und funktionelle Untersuchungen vor, die auf eine Beteiligung am „cell-to-cell-spread“ hinweisen. Um diese Funktion näher zu definieren, sollten UL11-Deletionsmutanten verschiedener EHV-1-Isolate (RacL11), -Stämme (KyA) und -Mutanten (L11Δ49) hergestellt und deren Replikationseigenschaften in Zellkultur miteinander verglichen werden.



## **2.           SCHRIFTTUM**

### **2.1           Das equine Herpesvirus Typ 1 (EHV-1)**

#### **2.1.1        Infektionen mit EHV-1**

Von den fünf bisher bekannten Herpesviren der Pferde haben die equinen Herpesviren Typ 1 und Typ 4 (EHV-1 und -4) die größte Bedeutung. Sie sind in der Pferdepopulation endemisch verbreitet und können mit dem Virusabort der Stuten, neurologischen Ausfällen und respiratorischen Erscheinungen (Rhinopneumonitis) in Verbindung gebracht werden. Infektionen mit dem equinen Herpesvirus Typ 4 bleiben jedoch meistens auf den Respirationstrakt beschränkt (ALLEN und BRYANS, 1986; FREY, 2003).

Während ältere Pferde nach einer Infektion mit EHV-1 oder EHV-4 selten respiratorische Symptome zeigen, können infizierte Fohlen und Jährlinge akut erkranken und neben Fieber, Anorexie und Nasenausfluss eine schwere Pneumonie aufweisen. Die Tiere erholen sich jedoch in der Regel vollständig. Bei trächtigen Stuten kann es nach Infektion mit EHV-1 infolge systemischer Virusvermehrung zu in der Regel komplikationslosen Aborten in den letzten vier Monaten der Trächtigkeit, sog. Spätaborten, kommen. Die Symptome einer durch EHV-1 verursachten Myeloenzephalitis reichen von einer leichten Ataxie bis zum Festliegen mit Todesfolge (MURPHY et al., 1999; FREY, 2003).

Die Übertragung von Herpesviren erfolgt meist durch Tröpfcheninfektion oder direkten Kontakt. Nach einer initialen Vermehrung des Erregers in den Schleimhäuten und regionalen Lymphknoten des Respirationstraktes kann es zu einer Leukozyten-assoziierten Virämie kommen, in deren Verlauf endotheliotrope EHV-1-Stämme unter anderem in das Endothel der Blutgefäße des Endometriums gelangen können. Die dort hervorgerufenen Entzündungsreaktionen mit thrombo-ischämischen Infarkten und Nekrosen führen zur Ablösung der Plazenta und dadurch zum Tod des Fetus und Ausstoßen der Frucht (ALLEN et al., 1999; FREY, 2003). Als Ursache für die sporadisch oder epidemisch auftretenden Myeloenzephalitiden wird eine Vaskulitis infolge Infektion von Endothelzellen im Gehirn diskutiert (EDINGTON et al., 1986).

Die Fähigkeit der Herpesviren, latente Infektionen zu etablieren, stellt ein epidemiologisches Problem dar. Während der Latenz liegt die virale DNS reaktionslos als extrachromosomales Episom im Karyoplasma von Neuronen oder Leukozyten vor. Betroffene Tiere sind klinisch

unauffällig und virologisch negativ, können jedoch jederzeit wieder infektiöses Virus ausscheiden, wenn dieses durch Immunsuppression reaktiviert wird (GIBSON et al., 1992; WELCH et al., 1992). Latent mit EHV-1 infizierte Stuten können die Ursache verheerender, sog. „Abortstürme“ sein. Dabei kann eine Großzahl nicht immuner, trächtiger Kontaktstuten durch reaktiviertes Virus infiziert werden (MURPHY et al., 1999).

### **2.1.2 Die EHV-1-Stämme RacL (RacL11, RacL22), RacH und KyA**

Der EHV-1-Stamm RacH wurde 1958 aus einem abortierten Pferdefetus über Infektion von syrischen Hamstern isoliert und in Zellkulturen aus primären Schweinenierenzellen (ENS) passagiert (MAYR et al., 1965). RacL11 und RacL22 sind Plaquesolate der 12. Passage mit hoher Virulenz für Pferde und Labortiere. Durch fortlaufende Passagen wurde das Virus attenuiert und hatte nach 256 Passagen sowohl im Hamstermodell als auch im natürlichen Wirt seine Pathogenität bei vollständig erhaltener Immunogenität verloren. Dieses apathogene Isolat wurde als RacH bezeichnet (MAYR et al., 1968) und wird zur Zeit in Deutschland als Lebendvakzine oder inaktivierter Impfstoff eingesetzt.

Mit Hilfe von Restriktionsenzymanalysen wurden Unterschiede in den Genomen von RacL11, RacL22 und RacH festgestellt (MEYER et al., 1987; SCHWEND, 1988; HÜBERT et al., 1996). Diese ermöglichen die Differenzierung von Impfvirus und virulenten Isolaten mittels Polymerase-Kettenreaktion (OSTERRIEDER et al., 1994).

Der aufgetretene Virulenzverlust von RacH wurde auf eine Deletion des IR6-Gens zurückgeführt (BIRKENMAIER, 1991; HÜBERT et al., 1996; OSTERRIEDER et al., 1996b). Das Produkt dieses Gens spielt eine Rolle bei der Ausschleusung der Nachkommenviren aus der infizierten Zelle, dem sog. „viral egress“ (OSTERRIEDER et al., 1998b).

Neben dem Virulenzunterschied zeigen die Isolate einen unterschiedlichen Phänotyp in der Zellkultur. RacH verhält sich, im Gegensatz zu RacL11 und RacL22, in Zellkultur synzytial, das heißt RacH-infizierte Zellen verschmelzen miteinander und es kommt zur Bildung von Polykaryozyten. Dieser Phänotyp wurde bei HSV-1 unter anderem auf Mutationen im carboxyterminalen Bereich des Glykoproteins B (gB) zurückgeführt (GOODMAN et al., 1989; BAGHIAN et al., 1991; GAGE et al., 1993). Auch die offenen Leserahmen UL20 und UL53 sind sog. „syn loci“. Bestimmte Mutationen dieser Gene führen in Zellkultur ebenfalls zu einem synzytialen Phänotyp mit Polykaryozyten-Bildung (RAJCANI und VOJVODOVA, 1998).

Der EHV-1-Stamm KyA (Kentucky A) wurde unter Verwendung von syrischen Hamstern isoliert und zur Adaptierung auf Mäuse-Fibroblasten passagiert. Wiederholte Passagen führten zum Verlust der Pathogenität (MATSUMURA et al., 1996) und zu Veränderungen in der viralen DNS. Das Genom von KyA unterscheidet sich vor allem in der „unique short“ (US)-Region von dem anderer EHV-1-Stämme. Neben einem Defekt in dem für das Glykoprotein gp2 kodierenden Gen 71 weist es eine Deletion auf, die die Gene 73 bis 75, darunter die für die Glykoproteine E und I (gE und gI) kodierenden Gene, betrifft. (COLLE et al., 1996; RUDOLPH et al., 2002).

### **2.1.3 Klassifizierung**

Das zur Familie der *Herpesviridae* gehörende equine Herpesvirus Typ 1 wird der Subfamilie der *Alphaherpesvirinae* zugeordnet (VAN REGENMORTEL et al., 2000). Diese zeichnen sich durch ein variables Wirtsspektrum und einen relativ kurzen Replikationszyklus aus. Die Ausbreitung in Zellkultur erfolgt rasch und infizierte Zellen werden effizient zerstört. Innerhalb der Subfamilie der Alphaherpesviren wird EHV-1, wie auch EHV-4 und das Pseudorabies Virus (PrV), in das Genus *Varizellovirus* eingeordnet (ROIZMAN und PELLETT, 2001).

### **2.1.4 Struktur**

Das Virion von EHV-1 zeigt den für alle Herpesviren typischen Aufbau aus Core, Kapsid, Tegument und Hülle. Das Core enthält die doppelsträngige virale DNS in Form eines Torus und wird von dem aus 162 Kapsomeren bestehenden icosahedralen Kapsid mit einem Durchmesser von ca. 100 nm umschlossen. Eine als Tegument bezeichnete amorphe Proteinmasse, die sich im Elektronenmikroskop ungleichmäßig verteilt darstellt, verbindet das Kapsid mit der Virushülle. Diese besteht aus modifizierten zellulären Membranen, in die unter anderem Glykoproteine eingelagert sind (ROIZMAN und PELLETT, 2001).

### 2.1.5 Genom

Herpesviren werden aufgrund der Struktur ihrer Genome in die Gruppen A-F unterteilt. Dabei ist vor allem die Anordnung reiterativer Sequenzen von Bedeutung. EHV-1 wird, wie auch EHV-4, PrV und das humanpathogene Varizella Zoster Virus (VZV), der Gruppe D zugeordnet und besitzt eine für das Genus *Varizellovirus* charakteristische Struktur. Singuläre UL („unique-long“)- und US („unique short“)-Regionen des 150 kbp großen Genoms werden durch eine IR („inverted repeat“)-Region getrennt. Diese reiterative Sequenz wiederholt sich am Ende des Genoms in umgekehrter Orientierung und ermöglicht die Umkehrung der US-Region relativ zu der festgesetzten UL-Region. Dadurch können zwei biologisch nicht unterscheidbare, isomere Genomformen auftreten (HENRY et al., 1981; WHALLEY et al., 1981; ROIZMAN und PELLETT, 2001).

Der Genomaufbau des zum Genus *Simplexvirus* und zur Gruppe E gehörenden Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1) unterscheidet sich von dem des Genus *Varizellovirus* durch die Anzahl und Anordnung der IR-Regionen. Dennoch werden die Gene anderer Alphaherpesviren als Homologe zu den entsprechenden offenen Leserahmen bei HSV-1 beschrieben, die durch Nummerierung innerhalb der UL- und US-Regionen bezeichnet werden (ROIZMAN und PELLETT, 2001). Den offenen Leserahmen UL11, UL20 und UL49 von HSV-1 entsprechen bei EHV-1 die Gene 51, 41 und 11 (TELFORD et al., 1992). Diese werden jedoch im weiteren, zur leichteren Vergleichbarkeit, als UL11, UL20 und UL49 angesprochen.

### 2.1.6 Virale Proteine

Nach Transkription der herpesviralen DNS im Zellkern erfolgt die Synthese der Proteine im Zytoplasma der infizierten Zelle. Als Strukturproteine werden Proteine bezeichnet, die im Verlauf der Infektion in das Virion eingebaut werden. Nichtstrukturproteine werden ebenfalls während der Infektion exprimiert, besitzen aber vor allem regulatorische Funktionen im viralen Replikationszyklus. Im Genom von HSV-1 finden sich 90 offene Leserahmen, von denen mindestens 84 für Proteine kodieren. Die Zahl der Strukturproteine wird mit 30 bis 40 angegeben. In die Virushülle sind mindestens 11 Glykoproteine (gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gK, gL, gM und gN) und zwei nicht glykosylierte, integrale Membranproteine (pUL20, pUS9) eingelagert. Die restlichen Strukturproteine werden dem Kapsid und dem Tegument zugeordnet (ROIZMAN und KNIPE, 2001). Fast die Hälfte der 84 Proteine von HSV-1 sind in

Zellkultur nicht essentiell, das heißt nicht notwendig für die Replikation des. Einige dieser Proteine erwiesen sich jedoch im Tiermodell als essentiell für die virale Replikation oder die Etablierung von Latenz (ROIZMAN und PELLETT, 2001).

Das 150 kbp große Genom von EHV-1 kodiert für mindestens 76 Proteine. Davon wurden bis jetzt die Glykoproteine B, C, D, M und gp2 in der Virushülle und die Proteine pUL47 und pUL11 im Tegument nachgewiesen (TELFORD et al., 1992; OSTERRIEDER et al., 1998a; SCHIMMER und NEUBAUER, 2003).

### **2.1.7 Genexpression**

Die Proteinexpression der Alphaherpesviren verläuft kaskadenartig, wird durch zahlreiche positive und negative Rückkopplungsmechanismen reguliert und kann in drei Klassen unterteilt werden (ROIZMAN und SEARS, 1996). Für die Einteilung in diese Klassen ist entscheidend, wann und unter welchen Voraussetzungen das für das entsprechende Protein kodierende Gen exprimiert wird. Es werden  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Gene unterschieden, wobei die Klasse der  $\gamma$ -Gene in die Subklassen  $\gamma_1$  und  $\gamma_2$  unterteilt wird. Die  $\alpha$ - oder IE („immediate early“-)Gene werden, unabhängig von der Synthese anderer viraler Proteine, als erstes exprimiert und kodieren vor allem für Proteine mit regulatorischen Funktionen bei der Transkription späterer Gene. Für die Expression der  $\beta$ - oder E („early“-)Gene, deren Produkte im viralen DNS-Metabolismus eine Rolle spielen, wird ein Teil der  $\alpha$ -Proteine, nicht aber die Synthese viraler DNS benötigt. Die Expression der für virale Strukturproteine kodierenden  $\gamma$ -Gene ist in unterschiedlichem Ausmaß abhängig von der viralen DNS-Synthese.  $\gamma_1$  („early-late“-)Gene werden durch die Synthese viraler DNS verstärkt exprimiert,  $\gamma_2$  („true-late“-)Gene werden bei Blockierung der DNS-Synthese nicht mehr gebildet (CAUGHMAN et al., 1985; ROIZMAN und KNIPE, 2001; ROIZMAN und PELLETT, 2001).

## 2.1.8 Replikationszyklus

Der Replikationszyklus aller Alphaherpesviren läuft nach einem ähnlichen Schema ab und kann in verschiedene Stadien unterteilt werden.

### 2.1.8.1 Viruseintritt und Replikation

Beim Eintritt des Virus in die Wirtszelle werden drei Schritte unterschieden.

Die initiale Adsorption erfolgt durch Interaktion des viralen Hüllglykoproteins C (gC) mit Glykosaminoglykanen, vor allem Heparansulfat der Zelloberfläche. Neben gC spielt das Glykoprotein B eine Rolle bei der Anheftung des Virus. Jedoch können auch gC-deletierte Viren adsorbieren und Zellen, die kein Heparansulfat auf der Oberfläche exprimieren, infiziert werden (HEROLD et al., 1991; SHIEH et al., 1992; ROIZMAN und KNIPE, 2001).

In einem zweiten Schritt interagiert das virale Glykoprotein D mit zellulären Rezeptoren. Zu diesen Rezeptoren gehören nectin-1 $\alpha$  (HveC, *herpesvirus entry mediator*) und nectin-1 $\beta$  (HIgR, *herpesvirus immunoglobulin-like receptor*), zwei Proteine der Immunglobulin-Superfamilie (ROIZMAN und KNIPE, 2001). Elektronenmikroskopisch können die beiden Adsorptionsphasen durch den Abstand der Virionen zur Plasmamembran unterschieden werden (GRANZOW et al., 1997).

Die Fusion der Virushülle mit der Plasmamembran stellt den letzten Schritt des Eintritts des Virus in die Zelle, die Penetration, dar. Sie wird bei HSV-1 durch gD, gB und das Heterodimer gH-gL vermittelt. Die genaue Funktion dieser Proteine bei der Penetration ist nicht bekannt. Es wird vermutet, dass die Bindung von gD an zelluläre Rezeptoren eine Konformationsänderung von viralen Proteinen bewirkt, so dass gB und/oder gH-gL die Fusion ermöglichen (ROIZMAN und KNIPE, 2001). Auch das Glykoprotein K spielt eine Rolle beim Viruseintritt in die Zelle (FOSTER et al., 2001). Bei EHV-1 wurde eine Beteiligung von gB, gC, gD, gM und gp2 an den Penetrationsvorgängen nachgewiesen (OSTERRIEDER et al., 1996a; SUN et al., 1996; NEUBAUER et al., 1997; OSTERRIEDER, 1999; CSELLNER et al., 2000). Durch die Fusion der Virushülle mit der Plasmamembran der Zelle wird das Kapsid zusammen mit dem Tegument in das Zytoplasma freigesetzt. Ein Teil der Tegumentproteine, z.B. das UL41 („vhs“, *virion host shutoff*)-Protein, das günstige Voraussetzungen für die Virusreplikation schafft und die Synthese zellulärer Proteine durch Degradation von m-RNS blockiert, löst sich vom Kapsid und verbleibt im Zytoplasma. Der andere Teil der

Tegumentproteine wird entweder allein (pUL48) oder zusammen mit dem Kapsid (z.B. pUL36) entlang von Mikrotubuli zum Zellkern transportiert. Die Nukleokapside akkumulieren an der Kernmembran und entlassen die virale DNS durch die Kernporen in das Karyoplasma, ein Vorgang an dem das Tegumentprotein pUL36 (VP1/2) beteiligt ist (ROIZMAN und KNIPE, 2001).

Nach Eintritt in den Zellkern zirkularisiert die virale DNS und wird durch die zelluläre RNA-Polymerase II transkribiert. Das Tegumentprotein pUL48 (VP16,  $\alpha$ -TIF,  *$\alpha$ -gene transactivating factor*) induziert die Expression der  $\alpha$ -Gene. Die Genprodukte, sechs Proteine, die als ICP0, ICP4, ICP22, ICP27 (pUL54), ICP47 (pUS12) und pUS1.5 bezeichnet werden, besitzen regulatorische Funktionen und aktivieren unter anderem die Transkription von „early“-Genen. Diese  $\beta$ -Gene kodieren vor allem für virale Enzyme und am Nukleinsäuremetabolismus beteiligte Nichtstrukturproteine und werden nach dem Zeitpunkt ihrer Expression in die Gruppen  $\beta$ 1 und  $\beta$ 2 unterteilt. Die  $\beta$ 1-Proteine ICP6 (pUL39) und ICP8 (pUL29) werden unmittelbar nach oder zeitgleich mit den  $\alpha$ -Proteinen exprimiert, die  $\beta$ 2-Proteine weisen einen größeren zeitlichen Abstand auf. Das Auftreten von  $\beta$ -Proteinen im Replikationszyklus signalisiert den Beginn der Synthese der viralen DNS. Neben zellulären Faktoren sind die viralen Proteine *DNA polymerase* (pUL30), *accessory protein* (pUL42), *origin-binding protein* (pUL9), *single-stranded DNA-binding protein* (pUL29) und der *helicase-primase complex* (pUL5, pUL8, pUL52) für die DNS-Replikation essentiell. Die virale DNS wird zunächst in Form einer Theta-Replikation, dann nach dem Prinzip eines „rolling-circle“-Mechanismus vermehrt. Dieser führt zur Entstehung langer Konkatemere viraler DNS (ROIZMAN und KNIPE, 2001).

### **2.1.8.2 Zusammenbau der Viruspartikel und Ausschleusung aus der Zelle**

Das freie Ende der replizierten, viralen DNS wird in präformierte Kapside eingefädelt und an einer Signalsequenz in eine Genomeinheit geschnitten. Die DNS verdrängt dabei die Proteine pUL26 und pUL26.5, die das „scaffold“, die Gerüststruktur des Kapsids, bilden. An der Verpackung der viralen DNS in die Kapside sind unter anderem die Genprodukte der offenen Leserahmen UL6, UL15, UL25, UL28, UL32, UL33, UL36 und UL37 beteiligt, der genaue Mechanismus ist jedoch nicht bekannt (ROIZMAN und KNIPE, 2001).

Der als „viral egress“ bezeichnete Weg der Nachkommenviren aus der infizierten Zelle war lange Zeit Gegenstand von Diskussionen und wurde erst vor Kurzem zum Teil geklärt. Die im Kern gebildeten Nukleokapside müssen, um aus der Zelle zu gelangen, zunächst die innere und äußere Kernmembran und den dazwischen liegenden perinukleären Raum überwinden. Dazu „buddet“ sie an der inneren Kernmembran und schnüren sich als behüllte Kapside in den Perinukleärraum ab. An diesem ersten Schritt des „Kern-Egress“ sind die Produkte der Gene UL31 und UL34 beteiligt. Die beiden Proteine, die in HSV-1- oder PrV-infizierten Zellen physikalisch interagieren und in der Kernmembran verankert sind, ermöglichen einen effizienten „egress“ der Kapside aus dem Kern. Eine Deletion des UL31- oder UL34-Leserahmens bei HSV-1 oder PrV führt zu einer drastischen Reduktion des ersten Umhüllungsschrittes und zur Akkumulation unbehüllter Kapside im Zellkern (METTENLEITER, 2002). Bei HSV-1 erhöht auch das UL11-Protein die Effizienz dieses Umhüllungsschrittes (BAINES und ROIZMAN, 1992).

Die Virionen im perinukleären Raum unterscheiden sich elektronenmikroskopisch von reifen, extrazellulären Viruspartikeln. Bei PrV sind sowohl das UL31- als auch das UL34-Protein nur in primär umhüllten Virionen nachzuweisen. Dabei stellt pUL31 ein primäres Tegumentprotein und pUL34 einen Bestandteil der Hülle dar. Im Gegensatz dazu finden sich die Haupttegumentproteine pUL49 und pUL46 nur in intrazytoplasmatischen und extrazellulären Viruspartikeln, nicht aber in unreifen Virionen. Die primäre Hülle unterscheidet sich in ihrer Phospholipidzusammensetzung von der Hülle reifer Viruspartikel. Sie weist außerdem noch keine, für die glykoproteinreiche Hülle reifer Viruspartikel typische, Protrusionen („spikes“) auf (GRANZOW et al., 1997).

Diese Unterschiede indizieren, dass die Hülle der Partikel im perinukleären Raum nicht die endgültige Virushülle darstellt und unterstützen die Theorie des „de-envelopment“. Dabei fusioniert die Hülle mit der äußeren Kernmembran bzw. mit deren Fortsetzung, der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER), und führt zur Freisetzung unbehüllter Kapside in das Zytoplasma (BROWNE et al., 1996; SKEPPER et al., 2001; METTENLEITER, 2002). Die molekularen Mechanismen und Proteine, die hierbei eine Rolle spielen, sind größtenteils unbekannt. Nur die Bedeutung des US3-Proteins wurde besser untersucht. Das Protein besitzt Kinase-Aktivität und soll bei HSV-1 die Funktion des UL34-Proteins durch Phosphorylierung modulieren. Nach Deletion des entsprechenden Leserahmens bei HSV-1 und PrV fanden sich vermehrt umhüllte Virionen zwischen innerer und äußerer Kernmembran



(METTENLEITER, 2002). UL20-Deletionsmutanten von HSV-1 führten ebenfalls zur Akkumulation umhüllter Viruspartikel im perinukleären Raum (BAINES et al., 1991).

Im Zytoplasma der infizierten Zelle erfolgt die weitere Anlagerung von Tegumentproteinen an das Kapsid. Die innere, icosahedrale Tegumentschicht wird durch Interaktion des UL36-Proteins mit dem Hauptkapsidprotein pUL19 gebildet. Die zweite Schicht des Teguments besteht aus dem Produkt des UL37-Gens, das bei PrV physikalisch mit dem UL36-Protein interagiert. In HSV-1-Deletionsmutanten mit fehlenden UL36- und UL37-Leserahmen wird die Virusreifung drastisch vermindert. Die folgenden Schritte der Tegumentation sind weitgehend ungeklärt, die größte Auswirkung auf die Bildung von Virionen hat jedoch die Deletion des UL48-Gens. Dieses Gen kodiert für ein Protein, das neben seiner regulatorischen Funktion während der Transkription einen Hauptbestandteil des Teguments von HSV-1 darstellt. Es interagiert mit den Tegumentproteinen pUL49 und pUL41 und seine Aktivität wird durch die von den offenen Leserahmen UL46 und UL47 kodierten Proteine, die auch Bestandteile des Teguments sind, beeinflusst (METTENLEITER, 2002).

Die Virionen erhalten ihre endgültige Hülle, indem sie in Vesikel im Bereich des *trans*-Golgi-Netzwerks (TGN) „budden“ (METTENLEITER, 2002). Während ihrer Prozessierung im ER und im Golgi-Apparat gelangen die reifen, viralen Glykoproteine in die Membranen des TGN (WHEALY et al., 1991; BROWNE et al., 1996; WHITELEY et al., 1999; SKEPPER et al., 2001) und können über ihre zytoplasmatischen Anteile mit Tegumentproteinen interagieren. An diesem zweiten Umhüllungsschritt („re-envelopment“) sind gE, gI (gE/gI), gM und das Tegumentprotein pUL49 beteiligt. Eine gleichzeitige Deletion von gE/gI und gM führt bei PrV zur Bildung intrazytoplasmatischer Aggregate bestehend aus Kapsiden, die von elektronendichtem, proteinähnlichem Material umgeben sind (METTENLEITER, 2002). Auch das Produkt des Leserahmens UL3.5, der im Genom von HSV-1 nicht vorhanden ist, spielt eine wichtige Rolle (FUCHS et al., 1997). Bei HSV-1 wird dem Glykoprotein K eine Funktion bei der zweiten Umhüllung der Virionen im TGN zugewiesen (HUTCHINSON und JOHNSON, 1995). Nach ihrer zweiten, endgültigen Umhüllung sammeln sich die Virionen in Prälysosomen, die durch die Fusion mehrerer TGN-Vesikel entstehen (HARLEY et al., 2001), und werden zur Plasmamembran der infizierten Zelle transportiert. Die Hülle dieser virushaltigen zytoplasmatischen Vakuolen fusioniert mit der Zellmembran und führt zur Freisetzung der Viruspartikel in den extrazellulären Raum. An diesem letzten Schritt des „viral egress“ ist bei PrV das UL20-Protein beteiligt (FUCHS et al., 1997). Die Deletion des

entsprechenden Leserahmens führt zur Akkumulation umhüllter Virionen in riesigen intrazytoplasmatischen Vakuolen (METTENLEITER, 2002).

### **2.1.8.3 Ausbreitung der Infektion direkt von Zelle zu Zelle**

Herpesviren können sich nicht nur über den Extrazellulärraum, sondern auch direkt von Zelle zu Zelle ausbreiten. An diesem als „cell-to-cell-spread“ bezeichneten Vorgang, der auch in Anwesenheit neutralisierender Antikörper abläuft (HUTCHINSON et al., 1995), sind bei HSV-1 gB, gD, gH-gL und vor allem gE/gI beteiligt. Der Komplex aus den Glykoproteinen E und I fördert die Ausbreitung des Virus zwischen polarisierten Zellen, wie z.B. epithelialen Zellen, Fibroblasten oder Neuronen. Diese stehen miteinander durch sog. „tight junctions“ in Verbindung und zeichnen sich durch eine apikale und basolaterale Plasmamembran aus. Zu Beginn der Infektion mit HSV-1 lokalisieren gE/gI im Bereich des TGN und sind an der Umhüllung von Nukleokapsiden beteiligt. Im weiteren Verlauf der Infektion sind die Glykoproteine gE und gI an den Zell-Zell-Verbindungen der lateralen Zelloberfläche zu finden. Es wird vermutet, dass sie dort mit zellulären Komponenten der „junctions“ interagieren und dadurch entstehende Virionen aus zytoplasmatischen Vesikeln zur lateralen Plasmamembran epithelialer Zellen leiten. Für den „cell-to-cell-spread“ sind die zytoplasmatischen Anteile von gE und gI essentiell (COLLINS und JOHNSON, 2003; DINGWELL und JOHNSON, 1998; MCMILLAN und JOHNSON, 2001).

Bei EHV-1 wurde den Glykoproteinen D und M und dem Tegumentprotein UL11 eine Funktion beim „cell-to-cell-spread“ zugeschrieben (OSTERRIEDER et al., 1996; CSELLNER et al., 2000; SCHIMMER und NEUBAUER, 2003).

## **2.2 Das UL20-Protein bei HSV-1 und anderen Alphaherpesviren**

Als „UL20“ wird der zwanzigste Leserahmen innerhalb der UL („unique long“-)Region des Genoms von HSV-1 bezeichnet. Entsprechende Gene, die für UL20-homologe Proteine kodieren, finden sich auch bei anderen Alphaherpesviren. Neben den equinen Herpesviren Typ 1 und Typ 4 weisen unter anderem das Pseudorabies Virus (PrV), das Bovine Herpesvirus Typ 1 (BHV-1), das Virus der Marek'schen Krankheit Serotyp 2 (MDV), das Infektiöse Laryngotracheitis Virus (ILTV) und das humanpathogene Varizella Zoster Virus (VZV) entsprechende Leserahmen auf (HATAMA et al., 1999; FUCHS et al., 1997; FUCHS und

METTENLEITER, 1999; KLUPP et al., 1992; TELFORD et al., 1992; TELFORD et al., 1998; VLCEK et al., 1995). Über die Identifizierung dieser Leserahmen hinausgehende Untersuchungen liegen bis jetzt jedoch nur von HSV-1 und PrV vor.

### HSV-1

Das UL20-Protein von HSV-1 besteht aus 222 Aminosäuren (MCLEAN et al., 1991) und ist ein multipel hydrophobes, integrales Membranprotein (WARD et al., 1994), das aufgrund seiner vorhergesagten Aminosäuresequenz in der Lage sein soll, die Membran mehrmals zu durchziehen (MCGEOCH et al., 1988). Es besitzt keine Konsensussequenz für eine N-Glykosylierung und ist auch nicht durch O-Glykosylierung modifiziert. Der für das Protein kodierende Leserahmen wird in die Klasse der  $\gamma_1$ -Gene eingeordnet. Ein in Kaninchen generiertes anti-UL20-Serum zeigt in Western Blot-Analysen eine Reaktion in Form einer Bande mit apparentem Molekulargewicht von ca. 24 kDa. In Lysaten HSV-1-infizierter Zellen ist der Nachweis des membranassoziierten Proteins ab 6 h post infectionem (p.i.) möglich (BAINES et al., 1991; WARD et al., 1994). Mittels indirekter Immunfluoreszenz wurde das Protein in Kernmembranen und verschiedenen zytoplasmatischen Strukturen, nicht jedoch in Plasmamembranen infizierter Zellen detektiert. Ein Teil der zytoplasmatischen Fluoreszenz kolokalisiert mit  $\beta$ -COP, einem Protein, das mit Transportvesikeln des Golgi-Apparates assoziiert ist. Das UL20-Protein ist Bestandteil extrazellulärer, aufgereinigter Virionen (WARD et al., 1994).

Die Deletion des UL20-Leserahmens hat je nach infizierter Zellart unterschiedliche Auswirkungen auf das Viruswachstum *in vitro*. Während die Mutante auf Vero-Zellen keine Plaquebildung zeigt, werden auf 143 *tk*-Zellen kleine Plaques beobachtet. In Einschnitt-Wachstumskinetiken führt das UL20-negative Virus auf beiden Zelllinien zu 10- bis 100fach geringeren Titern als das Wildtyp-Virus (BAINES et al., 1991). Elektronenmikroskopische Aufnahmen von mit dem rekombinanten Virus infizierten Vero-Zellen zeigen eine Akkumulation umhüllter Virionen zwischen innerer und äußerer Kernmembran. Nur selten werden Virionen in zytoplasmatischen Vesikeln oder im Extrazellulärraum gefunden. Die viralen Hüllglykoproteine C und D der UL20-deletierten Virionen des perinukleären Raums sind unreif. Im Gegensatz dazu sind die viralen, mit zellulären Membranen assoziierten Glykoproteine voll prozessiert bis zur Addition von Sialinsäure, einer *trans*-Golgi-Funktion. Die Anzahl der Glykoproteine C und D auf der Plasmamembran von mit der

Deletionsmutante infizierten Vero-Zellen ist im Vergleich zu der Wildtyp-infizierter Zellen signifikant erniedrigt. Bei infizierten 143 *tk*<sup>-</sup>-Zellen findet sich keine Akkumulation von Virionen zwischen innerer und äußerer Kernmembran. Infektiöse Partikel werden zur Plasmamembran transportiert und freigesetzt. Die Anzahl viraler Glykoproteine auf der Plasmamembran UL20-negativ- und Wildtyp-infizierter Zellen ist fast identisch (AVITABILE et al., 1994).

Die Schlussfolgerungen der Autoren aus den Beobachtungen bei mit der UL20-Deletionsmutante infizierten Vero-Zellen können wie folgt zusammengefasst werden: Der virale Replikationszyklus ist an zwei Stellen des „viral egress“ blockiert. Die erste Blockade betrifft die Fusion behüllter Virionen im perinukleären Raum mit der äußeren Kernmembran, ein sehr frühes Ereignis auf dem Weg der Nachkommenviren aus der infizierten Zelle. Eine zweite Blockade tritt später im „egress“, bei der Exozytose viraler, mit zellulären Membranen assoziierter Glykoproteine auf. Da diese Glykoproteine durch Golgi-Enzyme voll prozessiert sind, muss ihr Transport jenseits des Golgi-Apparates herabgesetzt sein. Die beiden Blockaden an verschiedenen Stellen der Exozytose indizieren das Vorhandensein von zwei Exozytose-Systeme in infizierten Zellen, eines für behüllte Virionen und eines für virale, zellmembranassoziierte Glykoproteine (AVITABILE et al., 1994).

Der entscheidende Unterschied zwischen infizierten Vero- und 143 *tk*<sup>-</sup>-Zellen betrifft den Golgi-Apparat. Während der Golgi-Apparat in infizierten 143 *tk*<sup>-</sup>-Zellen intakt bleibt, wird er in Vero-Zellen während der Infektion mit HSV-1 fragmentiert und über das Zytoplasma verteilt. Dabei werden die typischen Golgi-Stapel durch ausgedehnte Vakuolen ersetzt (AVITABILE et al., 1994; AVITABILE et al., 1995).

Als Funktion des UL20-Proteins wurde vorgeschlagen, in Zellen, in denen der Golgi-Apparat während der Infektion fragmentiert wird, für fehlende zelluläre Funktionen zu komplementieren. Es könnte trotz defekter Golgi-Organellen jenes Transport-Netzwerk aufrechterhalten, das für die Exozytose von Virionen zum fragmentierten Golgi-Apparat und für die Exozytose von viralen Membranglykoproteinen zur Plasmamembran notwendig ist (AVITABILE et al., 1994). Die Bedeutung des UL20-Proteins im Transport viraler Glykoproteine vom TGN zur Plasmamembran wurde spezifisch für das HSV-1-Glykoprotein K gezeigt (FOSTER et al., 2003). Alternativ besteht aber auch die Möglichkeit, dass die Fragmentation des Golgi-Apparates und die Blockierung der Exozytose UL20-negativer Viren Folgen von voneinander unabhängigen Ereignissen in der infizierten Zelle sind. So vermuteten AVITABILE et al. 1995, dass das Fehlen zellspezifischer Faktoren und nicht allein

die Fragmentation des Golgi-Apparates Ursache für das Unvermögen UL20-negativer Viren, aus Vero-Zellen zu exozytieren, sein könnte. Auf jeden Fall ist das UL20-Protein ein Bestandteil des viralen Exozytose-Mechanismus und in einigen Zellen (z.B. 143 *tk*-Zellen) scheint es diesem Protein funktionell entsprechende zelluläre Proteine zu geben, in anderen (z.B. Vero-Zellen) nicht (AVITABILE et al., 1995). Das Vorkommen unreifer Formen von gC und gD in behüllten Virionen könnte eine Funktion des UL20-Genproduktes bei der Prozessierung viraler Glykoproteine indizieren (AVITABILE et al., 1994).

### PrV

Der UL20-Leserahmen von PrV ist kleiner als sein Homolog bei HSV-1 und kodiert für 161 Aminosäuren. Trotz einer Homologie von nur 33 % der UL20-ORFs von PrV und HSV-1, finden sich auch im UL20-Protein von PrV Anhäufungen hydrophober Aminosäuren, und es besitzt damit ebenfalls Eigenschaften eines integralen Membranproteins.

Der *in vitro*-Phänotyp eines UL20-deletierten, rekombinanten Virus variiert je nach infizierter Zellart. Die geringsten Unterschiede in den Plaquegrößen von Wildtyp- und UL20-negativem Virus ergeben sich auf 143 *tk*-Zellen. Auf Vero-Zellen erreichen die von dem rekombinanten Virus gebildeten Plaques nur 11 % des Durchmessers der Wildtyp-induzierten Plaques. Es ist ein deutlich reduzierter „cell-to-cell-spread“ zu beobachten.

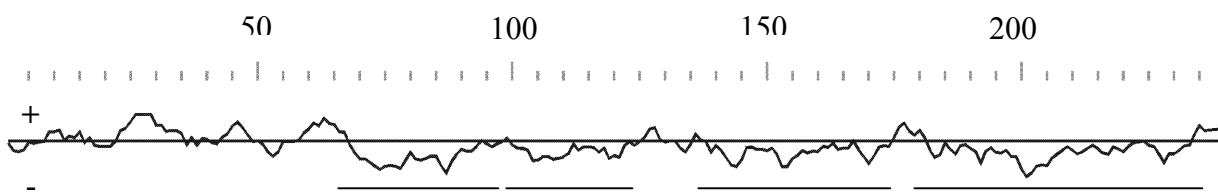
In Einschnitt-Wachstumskinetiken auf Vero-Zellen führt das UL20-negative Virus zu 10fach bzw. 100fach geringeren intra- bzw. extrazellulären Titern als das Wildtyp-Virus. Elektronenmikroskopische Untersuchungen von mit der Deletionsmutante infizierten Vero-Zellen zeigen, im Gegensatz zu den Beobachtungen bei HSV-1, eine Akkumulation behüllter Virionen in zytoplasmatischen Vakuolen und Vesikeln des Golgi-Apparates. Nur vereinzelt werden extrazelluläre Viruspartikel detektiert. Die Aufnahmen lassen vermuten, dass in Abwesenheit des UL20-Proteins ein sehr später Schritt des „viral egress“, wahrscheinlich der Transport sekundär behüllter Virionen zur Zelloberfläche, beeinträchtigt ist (FUCHS et al., 1997).

Die beobachteten Unterschiede im intrazellulären Phänotyp der UL20-Deletionsmutanten von PrV und HSV-1 könnten durch unterschiedliche Funktionen der beiden UL20-Proteine erklärt werden. Für diese Möglichkeit spricht der geringe Grad der Aminosäure-Konservierung des UL20-Leserahmens. Eine alternative Ursache wären grundsätzlich verschiedene „egress“-Wege dieser beiden Alphaherpesviren.

Als Gemeinsamkeit der UL20-Proteine von HSV-1 und PrV ist auf jeden Fall ihre Rolle im transzellulären Transport behüllter Virionen hervorzuheben. Sie agieren scheinbar nur in unterschiedlichen Kompartimenten der infizierten Zelle (FUCHS et al., 1997). Weitere Untersuchungen des UL20-Proteins von PrV, vor allem im Hinblick auf seine Rolle bei der Reifung viraler Membranglykoproteine, ergaben, dass das Protein spezifisch die Prozessierung von gK beeinflusst. Da es sich bei dem Glykoprotein K auch um ein hydrophobes, integrales Membranprotein handelt, ist eine physikalische Interaktion dieser beiden Polypeptide denkbar (DIETZ et al., 2000).

### 2.3 Multipel hydrophobe Transmembranproteine

Eine mögliche Membranassoziation eines Proteins wird aufgrund der Hydrophobizität seiner Aminosäuresequenz vorhergesagt. In sog. „Hydrophilizitätsplots“ werden hydrophile und hydrophobe Bereiche eines Polypeptids dargestellt (Abb. 1).



**Abbildung 1:** Hydrophilizitätsplot des UL20-Proteins von EHV-1: Die vier potenziellen Transmembrandomänen des Proteins sind unterstrichen. Hydrophile Bereiche der Sequenz sind als positiver, hydrophobe Abschnitte als negativer Wert angegeben.

Im Genom von HSV-1 finden sich vier offene Leserahmen (UL10, UL20, UL43 und UL53), die für multipel hydrophobe Proteine mit dem Potenzial, Membranen mehrmals zu durchziehen, kodieren. Bei den Genprodukten von UL10 und UL53 handelt es sich um die Glykoproteine M und K, über das Produkt des UL43-Leserahmens ist noch sehr wenig bekannt (MCLEAN et al., 1991).

Transmembranproteine zeichnen sich durch ihre Amphipathie aus: Sie besitzen einerseits eine oder mehrere hydrophobe Transmembrandomänen, die in Form von  $\alpha$ -Helices in die Lipiddoppelschicht der Membran eingelagert sind und andererseits hydrophile Bereiche, die in das wässrige Milieu auf beiden Seiten der Membran ragen. Durch eine kovalent an den

zytoplasmatischen Teil der Lipiddoppelschicht gebundene Fettsäure werden die hydrophoben Eigenschaften mancher Transmembranproteine verstärkt (ALBERTS et al., 1990). Je nach Position und Anzahl der Transmembrandomänen lassen sich drei Klassen von Transmembranproteinen unterscheiden. Proteine der Klasse I besitzen eine Transmembrandomäne und einen in den luminalen Raum des ER ragenden Amino-Terminus. Sie sind häufiger als Proteine der Klasse II, deren N-Terminus dem Zytoplasma zugewandt ist und die somit eine umgekehrte Orientierung aufweisen (LEWIN, 1998; FLINT et al., 2000). Die dritte Klasse der Transmembranproteine umfasst Proteine mit mehreren Transmembrandomänen (AUSTEN und WESTWOOD, 1991).

Die Synthese viraler Transmembranproteine in der Zelle entspricht der zellulärer Membranproteine und folgt dem hoch konservierten, sog. „secretory pathway“:

Nach Bildung der mRNA im Kern der Wirtszelle werden die Membranproteine an Polyribosomen im Zytoplasma translatiert. Eine bestimmte Signalsequenz des entstehenden Proteins führt zur Assoziation der Ribosomen mit dem ER. Dort wird die Translation fortgesetzt und die wachsende, ungefaltete Polypeptidkette durch die Membran des ER transferiert. Ein hydrophobes Signal innerhalb der Sequenz der Peptidkette terminiert den Transfer und induziert die stabile Verankerung des Proteins in der Membran. Die dabei festgelegte Orientierung des Proteins wird im weiteren Verlauf des „secretory pathway“ nicht mehr verändert. Im endoplasmatischen Retikulum finden auch die initiale posttranslationale Prozessierung durch Glykosylierung und die Faltung der Proteine statt. Die korrekt prozessierten und gefalteten Proteine werden vom ER zum Golgi-Apparat und von dort zu ihrem jeweiligen Bestimmungsort transportiert, wobei der Transport in Transportvesikeln durch Budding- und Fusionsprozesse erfolgt. Herpesvirale Membranproteine können in allen Membranstrukturen der infizierten Zelle, einschließlich der Plasmamembran, zu finden sein (FLINT et al., 2000).

#### **2.4 Das UL11-Protein bei EHV-1**

Das UL11-homologe Protein von EHV-1 wurde mit Hilfe eines in Kaninchen generierten, polyklonalen Antiserums identifiziert. Das Serum detektiert in Western Blot-Analysen von Lysaten RacL22- und RacH-infizierter Zellen ab 5 h p.i. fünf Polypeptide mit apparenten Molekulargewichten zwischen 7 und 12 kDa, wobei die stärkste Reaktion mit einem 11 kDa großen Protein zu beobachten ist. Das Protein besitzt eine Konsensussequenz für eine

Myristylierung und die Differenz zu dem aufgrund der vorhergesagten Aminosäuresequenz errechneten Molekulargewicht von 8,4 kDa wird durch eine Modifikation des nicht glykosylierten UL11-Proteins durch einen Myristinsäurerest erklärt. Versuche mit Phosphonoessigsäure (PAA) klassifizieren den für das UL11-Protein kodierenden Leserahmen als  $\gamma_1$ -Gen. Das Genprodukt kann in aus dem Extrazellulärraum aufgereinigten Virionen detektiert und dem Tegument zugeordnet werden. Die Trennung infizierter Zellen in eine Membran-, Zytoplasma- und Kernfraktion zeigt eine Membranassoziation des UL11-Polypeptids. Sowohl in infizierten als auch in transfizierten Zellen lokalisiert das Protein vor allem im Bereich des Golgi-Apparates.

Das UL11-Protein ist für die Virusreplikation in Zellkultur nicht essentiell. Deletionsmutanten zeigen jedoch im Vergleich zu den Wildtyp-Viren Wachstumsdefekte auf nicht komplementierenden Zellen. In Einschnitt-Wachstumskinetiken führen die UL11-negativen Viren zu einer maximal 100fach geringeren extrazellulären Infektiosität als die Elternviren und konstruierte Revertanten. Die intrazellulären Titer sind etwa um das 10fache erniedrigt. Bei Untersuchungen des Plaquephänotyps wurde eine deutliche Reduktion der Plaquegröße der UL11-negativen Viren festgestellt.

Diese Beobachtung deutet auf eine Funktion des Proteins beim „cell-to-cell-spread“ hin. Als Bestandteil des Teguments von Virionen wird aber auch eine Rolle des UL11-Polypeptids bei der Verbindung des Teguments mit der Virushülle diskutiert. Die Hauptlokalisation im Bereich des Golgi-Apparates infizierter Zellen indiziert eine Aufgabe des Proteins bei der sekundären Umhüllung von Kapsiden. Eine Modifikation durch eine N-terminale Myristylierung könnte dabei die Interaktion mit Membranen des TGN ermöglichen. Myristylierte Proteine werden vermehrt in sog. Lipid Rafts (s. 2.5) gefunden. In diesem Zusammenhang wurde für das UL11-Protein vorgeschlagen, virale Hüll- und Tegumentproteine zu Lipid Rafts im TGN zu rekrutieren, um dort die Umhüllung von Kapsiden zu vermitteln. Den Lipid Rafts werden auch Funktionen bei der Sortierung von Proteinen zur apikalen Zellmembran polarisierter Zellen zugesprochen (PALADINO et al., 2002) und es ist durchaus denkbar, dass das UL11-Genprodukt eine Rolle bei der gerichteten Ausschleusung von Virionen spielt (SCHIMMER, 2002; SCHIMMER und NEUBAUER, 2003).



## 2.5 Lipid Rafts

Lipid Rafts sind stabile Mikrodomänen zellulärer Membranen, die sich durch einen hohen Gehalt an Sphingolipiden und Cholesterol auszeichnen. Die Fettsäure-Seitenketten der in Lipid Rafts vorhandenen Glycerophospholipide sind gesättigter als die der umgebenden Phospholipide. Der Großteil der Sphingolipide weist ebenfalls gesättigte Fettsäuren auf. Diese Fettsäuren der Sphingolipide und Glycerophospholipide ermöglichen durch ihre regelmäßige Zick-Zack-Struktur ein dichteres Packen dieser Membranbereiche im Vergleich zu den angrenzenden, flüssigeren Domänen, deren Phospholipide reich an mehrfach ungesättigten Fettsäuren sind. Cholesterol füllt die Lücken zwischen benachbarten Sphingolipiden und erhöht den Grad der Interaktionen. Neben ihrem hohen Gehalt an Sphingolipiden und Cholesterol werden Lipid Rafts über ihre geringe Dichte und ihre Unlöslichkeit in kaltem 1 %igem Triton X-100 definiert und dementsprechend unter anderem auch als „detergent-resistant membranes“ (DRM) bezeichnet (BROWN und LONDON, 2000; PIKE, 2003).

Mit Lipid Rafts assoziieren zahlreiche zelluläre Proteine, unter anderem das integrale Membranprotein Caveolin, das aufgrund seiner Fähigkeit, Cholesterol und Sphingomyelin zu binden, in Lipid Rafts angereichert zu sein scheint (CAMPBELL et al., 2001; PIKE, 2003). Andere Proteine interagieren über Modifikationen mit den geordneten Lipid-Domänen. Zu diesen Modifikationen gehören GPI (Glykosyl-Phosphatidylinositol)-Anker und die gesättigten Fettsäuren Myristinsäure und Palmitinsäure (BROWN und LONDON, 2000). Auch das in Lipid Rafts angereicherte Protein Flotillin-2, das keine Transmembrandomäne besitzt, ist myristyliert und multipel palmityliert (NEUMANN-GIESEN et al., 2003).

Lipid Rafts spielen eine Rolle bei der Signaltransduktion in der Zelle. Sie rekrutieren bestimmte Proteine und erleichtern dadurch Interaktionen (TRIANTAFILOU und TRIANTAFILOU, 2003). Außerdem dienen Lipid Rafts als Andockstellen für Pathogene und Toxine (CAMPBELL et al., 2001). Eine Funktion bei der Sortierung neu gebildeter Proteine im TGN zur apikalen Membran polarisierter Zellen wurde ebenfalls nachgewiesen (PALADINO et al., 2002). Die geordneten Membranbereiche sind auch bevorzugte Stellen des Zusammenbaus und der Umhüllung von Virionen. Diese Funktion wurde für HIV-1 und Influenza-Viren gezeigt, die selektiv durch Lipid Rafts „budden“ (NGUYEN und HILDRETH, 2000; SUOMALAINEN, 2002). Bei HSV-1 ist eine Subpopulation des Tegumentproteins pUL41 („vhs“) mit Lipid Rafts assoziiert. Das Protein destabilisiert die Wirtszelle und spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese der HSV-1-Infektion (LEE et al., 2003).

## 2.6 Das UL49-Protein bei HSV-1 und anderen Alphaherpesviren

Der offene Leserahmen UL49 ist unter den Alphaherpesviren konserviert und kodiert für ein als VP22 bezeichnetes, phosphoryliertes Tegumentprotein.

Das UL49-Protein von HSV-1 besteht aus 301 Aminosäuren und weist eine Größe von 38 kDa auf (MARTIN et al., 2002; BRIGNATI et al., 2003). In transfizierten Zellen lokalisiert das Protein zunächst im Zytoplasma. Dort interagiert es mit zellulären Mikrotubuli und führt zu deren Bündelung und Stabilisation. Bei Eintritt der VP22-exprimierenden Zelle in die Mitose, transloziert das zytoplasmatische VP22 in den Kern und assoziiert mit dem kondensierenden, zellulären Chromatin. Dieser intrazelluläre Transport des UL49-Genproduktes findet auch in infizierten Zellen, in denen das Protein ab 4 h p.i. exprimiert wird, statt (GEISS et al., 2001). Weitere Untersuchungen transfizierter Zellen ergaben eine interzelluläre Ausbreitung des Proteins mit Translokation vom Zytoplasma VP22-exprimierender Zellen zu den Kernen nicht exprimierender Zellen (ELLIOTT und HARE, 1998; ELLIOTT und HARE, 2000; MARTIN et al., 2002). Ein generiertes, rekombinantes Virus, das nur einen Teil des Proteins exprimiert, führt in Einschnitt-Wachstumskinetiken auf Vero-Zellen zu identischen Titern wie das Wildtyp-Virus. Die Funktion des UL49-Proteins ist nicht bekannt. Auf eine Funktion beim „cell-to-cell-spread“ deutet jedoch die um 40 % reduzierte Plaquegröße des deletierten Virus hin. In Abwesenheit anderer viraler Proteine wurde eine Membranassoziation des VP22 nachgewiesen. Unter der Voraussetzung, dass diese Membranen die des *trans*-Golgi-Netzwerkes (TGN) mit einschließen, wird eine Funktion des Proteins bei der Bildung des Teguments oder der finalen Umhüllung von Virionen vermutet (POMERANZ und BLAHO, 2000; BRIGNATI et al., 2003).

Bei PrV ergaben yeast two-hybrid-Analysen eine spezifische Interaktion des 26 kDa großen UL49-Tegumentproteins mit den zytoplasmatischen Domänen der Glykoproteine E und M. Die Deletion des UL49-ORF hat bei PrV nur geringe Auswirkungen auf die Replikation *in vitro*. Auch durch elektronenmikroskopische Untersuchungen kann keine Beeinträchtigung des „viral egress“ oder der Virionenreifung festgestellt werden. Es wird vermutet, dass andere Proteine *in vitro* für das UL49-Genprodukt komplementieren (FUCHS et al., 2002).

Das UL49-Protein des Marek's Disease Virus (MDV), einem streng zellassozierten Alphaherpesvirus, ist essentiell für das Viruswachstum in Zellkultur (DORANGE et al., 2002).

### **3. MATERIAL UND METHODEN**

#### **3.1 Material**

##### **3.1.1 Zellen**

- Rk13 (Kaninchennierenzellen, Zelllinie) ab der 98. Passage
- Edmin337 (equine Hautzellen, Zelllinie; HÜBERT et al., 1996) ab der 40. Passage

##### **3.1.2 Versuchstiere**

- Kaninchen, Chinchilla Bastards (Fa. Charles River, Deutschland)

##### **3.1.3 Bakterien und Plasmide**

###### **3.1.3.1 Bakterien**

- *E. coli*-Stamm: DH5 $\alpha$ F' (Fa. Gibco BRL, Eggenstein)
- *E. coli*-Stamm: TOP10 (LMG194) (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
- *E. coli*-Stamm: BW25141 (DATSENKO und WANNER, 2001)

###### **3.1.3.2 Plasmide**

- pTZ18R (Fa. Pharmacia, Karlsruhe)
- pcDNA1/Amp (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
- psV2-neo; von M. Büttner erhalten
- pBADgIII (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
- pACYC177 (Fa. New England Biolabs, Frankfurt a. M.)
- pTD1-1, pT71H und pT71-KyA (enthalten jeweils das Gen 71 von RacL11, RacH und KyA; VON EINEM et al., 2004)
- pKD13, pKD46 und pCP20 (DATSENKO und WANNER, 2001)

### 3.1.3.3 BACs („bacterial artificial chromosomes“)

- pRacL11, pRacH und pKyA (enthalten jeweils das Genom der EHV-1-Isolate RacL11 und RacH bzw. des EHV-1-Stammes KyA zusammen mit pKD46 im *E. coli*-Stamm BW25141; RUDOLPH und OSTERRIEDER, 2002; RUDOLPH et al., 2002)

### 3.1.4 Antikörper und Antiseren

#### 3.1.4.1 Monoklonale Antikörper

- 3F6 anti-Glykoprotein B (ALLEN und YEARGAN, 1987),  
1:3000 (Western Blot)
- 4B6 anti-Glykoprotein B (MEYER und HÜBERT, 1988),  
1:50 (IIF)
- 20C4 anti-Glykoprotein D (ALLEN und YEARGAN, 1987)  
1:2000 (Western Blot)
- 3B12 anti-Glykoprotein 2 (MEYER und HÜBERT, 1988)  
1:50 (IIF)
- ZB4 anti-Major Capsid Protein (MCP), zur Verfügung gestellt von G. Caughman,  
1:2 (Western Blot)
- anti-c-myc mouse monoclonal Antibody (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim)  
1:100 (Western Blot)
- anti-Flotillin-2 (ESA) (Fa. BD Biosciences, Heidelberg)  
1:1000 (Western Blot)

#### 3.1.4.2 Polyklonale Antikörper

- anti-IR6-Serum (O'CALLAGHAN et al., 1994)  
1:1000 (Western Blot)
- anti-Glykoprotein M-Serum (SEYBOLDT, 2000)  
1:2000 (Western Blot)
- anti-UL11-Serum (SCHIMMER und NEUBAUER, 2003)  
1:100 (Western Blot), 1:400 (IIF)

- anti-UL34-Serum (NEUBAUER et al., 2002)  
1:4000 (Western Blot)
- anti-UL45-Serum (OETTLER et al., 2000)  
1:1000 (Western Blot)

### **3.1.4.3 Mit Peroxidase (POD) konjugierte Antikörper**

- anti-mouse IgG (Fa. Sigma, München)
- anti-rabbit IgG (Fa. Sigma, München)

### **3.1.4.4 Mit ALEXA konjugierte Antikörper**

- anti-rabbit ALEXA 488 nm (Fa. Molecular Probes, Göttingen)
- anti-mouse ALEXA 488 nm (Fa. Molecular Probes, Göttingen)

### **3.1.4.5 Mit Alkalischer Phosphatase (AP) konjugierte Antikörper**

- anti-Digoxigenin-AP (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim)

### **3.1.5 Puffer, Lösungen und Reagenzien**

- Acrylamidstammlösung (Rotiophorese Gel 30):  
gebrauchsfertige, gasstabilisierte, wäßrige 30 %ige Acrylamidstammlösung mit  
0,8 % Bisacrylamid (Fa. Roth, Karlsruhe)
- peqGOLD Universal Agarose (Fa. peqlab, Erlangen)  
0,8 bis 2 % (w/v) in 0,5x Elektrophoresepuffer TAE
- Amper (Ammoniumpersulfat):  
10 % (w/v) in A. dest. (Fa. BioRad, München)
- Antibiotika (als Zusatz zu Bakterienkulturmedien):  
10 mg/ml Ampicillin (1:100) (Fa. Roche, Mannheim)  
25 mg/ml Kanamycin (1:500) (Fa. Applichem, Darmstadt)  
30 mg/ml Chloramphenicol (1:1000) (Fa. Sigma, München)
- Arabinose (Fa. Sigma, München)

- Azeton (Fa. Applichem, Darmstadt)
- **BCA-Proteinbestimmungsreagenz** (Fa. Pierce, Illinois)
- **Blocking-Puffer für die indirekte Immunfluoreszenz:**
  - PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  mit 10 % (v/v) FKS
- **Blocking-Puffer für den Western Blot:**
  - TBS-T mit 10 % (w/v) Magermilchpulver
- **Blockierungslösung für den Southern Blot:**
  - 1x Maleinsäurepuffer
  - + 1 % (w/v) Blocking-Reagenz
- **Blocking-Reagenz für den Southern Blot** (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim)
- **Bromphenolblau** (Fa. Merck, Darmstadt)
- **BSA (Bovines Serumalbumin)** (Fa. New England Biolabs, Frankfurt a. M.)
- **BSE-Puffer 10x:**
  - 0,25 % (w/v) Bromphenolblau (Fa. Sigma, München)
  - 5 % (w/v) SDS
  - 50 % (w/v) Sucrose
  - 70 mM EDTA, pH 8,0
- **CaCl<sub>2</sub>** (Fa. Merck, Darmstadt)
- **Chloroform** (Fa. Merck, Darmstadt)
- **CIP (Calf Intestine Phosphatase)** (Fa. New England Biolabs, Frankfurt a. M.)
- **Coomassie-Färbelösung:**
  - 1,25 g Coomassie Brilliant Blue R-250 (Fa. Sigma, München)
  - 225 ml Methanol
  - 225 ml A. dest.
  - 50 ml Eisessig
- **Coomassie-Entfärber:**
  - 450 ml Methanol
  - 450 ml A. dest.
  - 100 ml Eisessig
- **Detektionspuffer für den Southern Blot:**
  - 0,1 M Tris-HCl
  - 0,1 M NaCl
  - auf pH 9,5 eingestellt

- **DIG-High Prime Kit** (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim)
- **DMF** (Dimethylformamid) (Fa. Sigma, München)
- **DMSO** (Dimethylsulfoxid) (Fa. Sigma, München)
- **dNTP** (Desoxyribonucleotid-5'-Triphosphate) (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim)
- **DNA-Purification Kit** (Fa. Amersham, UK)
- **ECL Chemiluminescence Detection Kit** (Fa. Amersham, UK)
- **EDTA** (Ethylendiamintetraacetat) (Fa. Serva, Heidelberg)
- **Eisessig** (Fa. Roth, Karlsruhe)
- **Elektrophoresepuffer für Agarosegele (TAE 50x):**
  - 2 M Tris
  - 0,25 M Na-Acetat
  - mit Eisessig auf pH 7,8 eingestellt
- **Elektrophoresepuffer für Glycin-PAGE:**
  - 193 mM Glycin
  - 25 mM Tris
  - 0,1 % (w/v) SDS
- **Elektrophoresepuffer für Tricin-PAGE:**
  - 100 mM Tris
  - 100 mM Tricin
  - 0,1 % (w/v) SDS
- **Ethanol absolut** (Fa. Merck, Darmstadt)
- **Ethidiumbromid** (Fa. Sigma, München)
- **FKS** (fetales Kälberserum),  $\gamma$ -bestrahlt (Fa. Seromed, Berlin)
- **Formaldehyd** (Fa. Merck, Darmstadt)
- **Formamid** (Fa. Applichem, Darmstadt)
- **Freund'sches Adjuvans, complete** (Fa. Sigma, München)
- **Freund'sches Adjuvans, incomplete** (Fa. Sigma, München)
- **G-418, Geneticin** (Fa. Calbiochem, Darmstadt)
- **Glycerin** (Fa. Roth, Karlsruhe)
- **Glycin** (Fa. Applichem, Darmstadt)

- **Hank's Modified Eagle's Medium:**
  - 5,3 g/l Hank's Medium (Fa. Gibco BRL, Eggenstein)
  - 4,8 g/l Earle's Medium (Fa. Gibco BRL, Eggenstein)
  - 1,5 g/l NaHCO<sub>3</sub> (Fa. Merck, Darmstadt)
  - 120 mg/l Pyruvic Acid (Fa. Sigma, München)
- **Harnstoff** (Fa. Applichem, Darmstadt)
- **HEPES** (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaciny)ethan-sulfonsäure) (Fa. Sigma, München)
- **HMFM** (Hogness' modified freezing medium):
  - 3,6 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
  - 1,6 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
  - 2 mM Natriumcitrat
  - 1 mM Magnesiumsulfat
  - 4% (v/v) Glycerin
- **Hybridisierungslösung für den Southern Blot:**
  - 20 g Blocking Reagenz
  - 50 ml Formamid
  - 350 µl N-Laurylsarkosin, Na-Salz, 30 % (v/v)
  - 100 µl SDS 20 % (w/v)
  - 25 ml SSC (20x)
  - auf 1000 ml A. dest.
- **IAC:**
  - 1 Teil Isoamylalkohol
  - + 24 Teile Chloroform
- **Imidazol-Puffer:**
  - 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
  - 300 mM NaCl
  - 250 mM Imidazol
  - pH 8,0
- **Isoamylalkohol** (Fa. Merck, Darmstadt)
- **Isopropanol** (Fa. Applichem, Darmstadt)
- **Kaliumacetat** (Fa. Roth, Karlsruhe)
- **K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>** (Fa. Merck, Darmstadt)
- **KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** (Fa. Merck, Darmstadt)



- **KCl** (Fa. Merck, Darmstadt)
- **kb-Leiter** (1 kb und 12 kb) (Fa. New England Biolabs, Frankfurt a. M.)
- **Kodak GBX Entwickler** (Fa. Sigma, München)
- **Kodak GBX Fixierer** (Fa. Sigma, München)
- **Kristallviolett** (Fa. Merck, Darmstadt)
- **Kristallviolett-Färbelösung nach Witte:**
  - 15 g Kristallviolett
  - 85 ml Ethanol absolut
  - 250 ml Formaldehyd
  - mit A. dest. auf 1000 ml
- **LB-Medium (Luria-Bertoni-Medium):**
  - 10 g/l Bacto Trypton (Fa. Difco, Detroit)
  - 5 g/l Bacto Yeast Extract (Fa. Difco, Detroit)
  - 5 g/l NaCl
  - mit 1N NaOH auf pH 7,2 eingestellt
- **LB-Nährbodenplatten:**
  - LB-Medium
  - 1,5 % Bacto Agar (Fa. Difco, Detroit)
- **LB-Amp-Nährbodenplatten:**
  - LB-Medium
  - 100 µg/ml Ampicillin
  - 1,5 % Bacto Agar
- **LB-Amp-X-Gal-IPTG-Nährbodenplatten:**
  - LB-Amp-Nährbodenplatten mit
  - 80 µg/ml X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl-β-D-Galactosid) (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim)
  - 240 µg/ml IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) (Fa. Applichem, Darmstadt)
  - 1,5 % Bacto Agar
- **LB-CAM-Nährbodenplatten:**
  - LB-Medium
  - 30 µg/ml Chloramphenicol
  - 1,5 % Bacto Agar

- **LB-Kana-Nährbodenplatten:**
  - LB-Medium
  - 25 µg/ml Kanamycin
  - 1,5 % Bacto Agar
- **LiCl** (Fa. Merck, Darmstadt)
- **Magermilchpulver** (Fa. Applichem, Darmstadt)
- **Magnesiumsulfat** (Fa. Merck, Darmstadt)
- **Maleinsäurepuffer (2x):**
  - 0,2 M Maleinsäure (Fa. Sigma, München)
  - 0,3 M NaCl
  - mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt
- **Maleinsäure-Waschpuffer:**
  - 1x Maleinsäurepuffer mit 0,3 % Tween 20 (v/v)
- **MBS :**
  - 25 mM MES
  - 150 mM NaCl
  - pH 6,5
- **2-Mercaptoethanol** (Fa. Sigma, München)
- **MES** (Morpholinoethansulfonsäure) (Fa. vwr, München)
- **Methanol absolut** (Fa. Merck, Darmstadt)
- **Methylcellulose:**
  - 25 g Methylcellulose, MC 4000 (Fa. Sigma, München)
  - mit A. dest. auf 1000 ml
- **MgCl<sub>2</sub>** (Fa. Merck, Darmstadt)
- **MgSO<sub>4</sub>** (Fa. Merck, Darmstadt)
- **Molekulargewichtsmarker, vorgefärbt** (Fa. New England Biolabs, Frankfurt a. M.)
- **Molekulargewichtsmarker, Precision Prestained Broad Range** (Fa. BioRad, München)
- **MOPS** (4-Morpholinopropansulfonsäure) 99,5 % (Fa. Sigma, München)
- **MnCl<sub>2</sub>** (Fa. Merck, Darmstadt)
- **Na-Acetat** (Fa. Merck, Darmstadt)
- **Natriumazid, NaN<sub>3</sub>** (Fa. Sigma, München)
- **Na-Citrat** (Fa. Sigma, München)
- **NaCl** (Fa. Merck, Darmstadt)

- Natriumdesoxycholat (Fa. Merck, Darmstadt)
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Fa. Merck, Darmstadt)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Fa. Merck, Darmstadt)
- $\text{Na}_3\text{PO}_4$  (Fa. Merck, Darmstadt)
- N-Laurylsarkosin, Na-Salz (Fa. Sigma, München)
- NP-40 (Nonidet P-40) (Fa. Sigma, München)
- **PBS (Phosphate Buffered Saline):**
  - 8 g NaCl
  - 0,2 g KCl
  - 1,12 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
  - 0,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
  - 0,1 g  $\text{CaCl}_2$
  - 0,1 g  $\text{MgCl}_2$
  - mit A.dest. auf 1000 ml
  - pH 7,4
- **PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ :**
  - wie PBS, ohne  $\text{CaCl}_2$  und  $\text{MgCl}_2$
- PerFectin Transfektionsreagenz (Fa. Gene Therapy Systems, San Diego)
- *Pfu*-DNS-Polymerase (Fa. Stratagene, Heidelberg)
- Phenol, pH 8,0 (Fa. Applichem, Darmstadt)
- PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) (Fa. Sigma, München)
- **Probenpuffer für Glycin-PAGE (4x):**
  - 4 ml SDS, 20 % (w/v)
  - 1 ml Glycerin
  - 0,5 ml Tris-HCl, pH 6,8
  - 0,1 ml Bromphenolblau 5 % (w/v)
  - 0,4 ml 2-Mercaptoethanol
  - 2,5 ml A. dest.
- **Probenpuffer für Tricin-PAGE (2x):**
  - 200 mM Tris-HCl, pH 6,8
  - 40 % (v/v) Glycerol
  - 2 % (w/v) SDS
  - 0,04 % (w/v) Coomassie Blue G 250

- **Probenpuffer ohne 2-Mercaptoethanol (4x):**
  - 80 µl SDS 20 %
  - 1,6 ml Glycerin
  - 2,0 ml Tris-SO<sub>4</sub>, 0,216 M, pH 6,1
  - 0,1 ml Bromphenolblau
  - mit A. dest. auf 10 ml
- **Proteinasehemmer:**
  - 0,1 mg/ml PMSF
  - 0,002 mg/ml Aprotinin (Fa. Applichem, Darmstadt)
  - 0,002 mg/ml Leupeptin (Fa. Applichem, Darmstadt)
  - 0,05 mg/ml TLCK (N-Tosyl-L-Phenylalanin-Chloromethylketon) (Fa. Sigma, München)
  - 0,1 mg/ml TPCK (N-p-Tosyl-L-Lysin-Chloromethylketon) (Fa. Sigma, München)
- **Proteinase K (Fa. Sigma, München):**
  - 10 mg in 1 ml TE-Puffer, pH 8,0
- **Puffer 1 (Resuspension Buffer, Fa. Qiagen, Hilden):**
  - 50 mM Tris-HCl, pH 8,0
  - 10 mM EDTA
  - 100 µg/ml RNase A
- **Puffer 2 (Lysis Buffer, Fa. Qiagen, Hilden):**
  - 200 mM NaOH
  - 1 % SDS (w/v)
- **Puffer 3 (Neutralization Buffer, Fa. Qiagen, Hilden):**
  - 3 mM Kaliumacetat
  - pH 5,5
- **Puffer D (Fa. Qiagen, Hilden):**
  - 8 M Urea
  - 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
  - 0,01 M Tris-Cl
  - pH 5,9

- **Puffer E** (Fa. Qiagen, Hilden):
  - 8 M Urea
  - 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
  - 0,01 M Tris-Cl
  - pH 4,5
- **Qiagen Midi Kit** (Fa. Qiagen, Hilden)
- **QiaEx-Aufreinigungs-Kit** (Fa. Qiagen, Hilden)
- **RbCl<sub>2</sub>** (Fa. Sigma, München)
- **Restriktionsendonukleasen** (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim, Fa. New England Biolabs, Frankfurt a. M.)
- **Ripapuffer**:
  - 150 mM NaCl
  - 50 mM Tris-HCl, pH 8,0
  - 0,1 % (w/v) SDS
  - 0,5 % (w/v) Natriumdesoxycholat
  - 1 % (v/v) NP-40
  - + Proteinasehemmer
- **RNAse A** (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim)
  - 100 mg in 1 ml TE-Puffer, pH 8,0
- **Sarkosylpuffer**:
  - 75 mM Tris-HCl, pH 8,0
  - 25 mM EDTA
  - 10 % (w/v) N-Lauroylsarkosin, Na-Salz
- **SDS** (Natrium-Dodecylsulfat) (Fa. Applichem, Darmstadt):
  - 20 % (w/v) in A. dest.
- **SOB-Medium**:
  - 2 % Bacto Trypton (Fa. Difco, Detroit)
  - 0,5 % Bacto Yeast Extract (Fa. Difco, Detroit)
  - 10 mM NaCl
  - 2,5 mM KCl
  - 10 mM MgCl<sub>2</sub>
  - 10 mM MgSO<sub>4</sub>

- SOG-Medium:
  - SOB-Medium
  - + 1 % Glucose
- SSC (Standard Saline Citrat) (20x):
  - 3 M NaCl
  - 0,3 M Na-Citrat
- STET-Puffer:
  - 0,1 M NaCl
  - 10 mM Tris-HCl, pH 8,0
  - 1 mM EDTA, pH 8,0
  - 0,5 % (v/v) Triton X-100
- STV (Saline-Trypsin-Versene-Lösung):
  - 100 ml Saline:
    - 140 mM NaCl
    - 3 mM KCl
    - 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
    - 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
    - 1 g Glucose
    - 10 ml Phenolrot, 0,1 % (w/v)
    - mit A. dest. auf 100 ml
  - 50 ml Trypsin, 1,25 % (w/v)
  - 25 ml Versene:
    - wie Saline, ohne Glucose und Phenolrot
- Sucrose (Fa. Merck, Darmstadt):
  - 30 % (w/v) in PBS ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>
  - 30 % (w/v) in MES
  - + 0,5 mM EDTA
- TALON-Lysis-Puffer (Urea-Puffer):
  - 8 M Urea
  - 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
  - 10 mM Tris-Cl
  - auf pH 8,0 bzw. pH 7,0 eingestellt
- T4-DNA-Ligase mit 10x Ligasepuffer (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim)

- **TBS-T-Puffer:**
  - 150 mM NaCl
  - 10 mM Tris-HCl, pH 8,0
  - 0,05 % (v/v) Tween 20
- **TE-Puffer, pH 8,0:**
  - 10 mM Tris
  - 1 mM EDTA
- **TEN-Puffer:**
  - 150 mM NaCl
  - 20 mM Tris-HCl, pH 7,4
  - 1 mM EDTA
- **TEMED, Tetramethylethylendiamin (Fa. Sigma, München)**
- **TFB-I-Puffer:**
  - 30 mM Kaliumacetat
  - 50 mM MnCl<sub>2</sub>
  - 100 mM RbCl<sub>2</sub>
  - 10 mM CaCl<sub>2</sub>
  - 15 % (v/v) Glycerin
  - mit NaOH auf pH 5,8 eingestellt
- **TFB-II-Puffer:**
  - 10 mM MOPS, pH 7,0
  - 75 mM CaCl<sub>2</sub>
  - 10 mM RbCl<sub>2</sub>
  - 15 % (v/v) Glycerin
- **Towbin-Puffer, pH 8,3 für Western Blot:**
  - 25 mM Tris
  - 192 mM Glycin
  - 20 % (v/v) Methanol
- **Tricin (Fa. Sigma, München)**
- **Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Fa. Roth, Karlsruhe)**
- **Tris-Puffer, pH 8,8 für das SDS-PAGE Trenngel:**
  - 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8

- **Tris-Puffer, pH 6,8 für das SDS-PAGE Sammelgel:**
  - 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
- **Triton X-100** (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim)
- **Tween 20** (Polyoxyethylensorbitan) (Fa. BioRad, München)
- **Trypsin** (Fa. Serva, Heidelberg)
- **Waschlösung 1 für Southern Blot:**
  - 2x SSC
  - 0,1 % SDS
- **Waschlösung 2 für Southern Blot:**
  - 0,1x SSC
  - 0,1 % SDS
- **X-Gal** (5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl- $\beta$ -D-Galactosid) (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim)
- **Zellfraktionierungspuffer A:**
  - 5 mM Na-Phosphat, pH 7,5 (Fa. Merck, Darmstadt)
  - 2 mM MgCl<sub>2</sub>
  - 0,5 mg CaCl<sub>2</sub>
  - + Proteinasehemmer
- **Zellfraktionierungspuffer B:**
  - 20 mM Tris-HCl, pH 9,0
  - 0,3 M NaCl
  - 10 % (v/v) Glycerin
  - 1 mM CaCl<sub>2</sub>
  - 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>
  - 2 mM EDTA
  - 0,5 % (v/v) NP-40
  - + Proteinasehemmer
- **Zitrat-Puffer:**
  - 40 mM Zitronensäure (Fa. Sigma, München)
  - 10 mM KCl
  - 135 mM NaCl
  - pH 3,0



### 3.1.6 Geräte, Laborhilfsmittel und Verbrauchsmaterialien

- Chromatographiepapier 3 MM (Fa. Whatman, UK)
- Dialyseschläuche Spectra/Por® MWCO 3500 (Fa. Spectrum, US)
- Elektrophoresekammer Mupid-21 (Fa. Cosmo Bio Co, Tokio)
- Elektrophoresekammer für PAGE-Gele: Mini-Protean II (Fa. BioRad, München)
- Elektrophoretische Transferkammer: Mini-Transblot II (Fa. BioRad, München)
- Eppendorf Gefäße (Fa. Eppendorf, Hamburg)
- Gelrockner (Fa. Biorad, München)
- Horizontalelektrophoresekammer (Fa. Gibco BRL, Eggenstein)
- Hyperfilm (Fa. Amersham, UK)
- Kryoröhrchen CryoTube™, 2 ml (Fa. Nunc, Wiesbaden)
- Küvetten Gene-Pulser® (Fa. Biorad, München)
- Messokular (Fa. Zeiss, Jena)
- Mikroskop für IIF: Axiovert 25 (Fa. Zeiss, Jena)
- Mikroskop für IIF: Axioskop 2 (Fa. Zeiss, Jena)
- Nitrocellulose:
  - für pUL11: Hybond-C (Fa. Amersham, UK)
  - für andere Proteine: Schleicher & Schuell (Fa. vwr, München)
- Nylonmembran: Hybond-N+ (Fa. Amersham, UK)
- pH-Meter (Fa. Beckman, Krefeld)
- Photometer: GeneQuant (Fa. Amersham, UK)
- Photometer: Uvikon xs (Fa. Bio-Tek, Bad Friedrichshall)
- Power Supply Power Pac 200 (Fa. Biorad, München)
- Präzisionswaage Navigator™ (Fa. Ohaus, Giessen)
- Rührplattform IKA Combimag RCH (Fa. IKA, Staufen)
- Southern Blot Transfer-Apparatur Biometra Vacu-Blot (Fa. Whatman, UK)
- TALON® Superflow-Kügelchen (Fa. Clontech, Heidelberg)
- Thermocycler Gene Amp PCR-System (Fa. Perkin Elmer, Frankfurt a. M.)
- Thermomixer compact (Fa. Eppendorf, Hamburg)
- Ultrafiltrationsröhrchen Centricon® (Fa. Millipore, Schwalbach)
- Ultraschallwasserbad: Transsonic T310 (Fa. Elma, Singen)
- Vakuum-Blot-Gerät (Fa. Biometra, Göttingen)

- Vortex-Genie (Fa. Scientific Industries, Puchheim)
- Wasserbad: Julabo SW-20 C (Fa. Julabo, Seelbach)
- Zellkulturplastikwaren:
  - Zellkulturflaschen (175 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup>, 25 cm<sup>2</sup>) (Fa. Nunc, Wiesbaden)
  - 6-, 24- und 96-Loch-Platten (Fa. Nunc, Wiesbaden und Fa. Sarstedt, Nürnberg)
- Zentrifugen:
  - Kühlzentrifuge Heraeus Suprafuge 22 (Fa. Heraeus, Hanau)
    - Rotor 12500 (Fa. Heraeus, Hanau)
    - Rotor SS34 (Fa. DuPont Sorvall, Bad Homburg)
  - Kühlzentrifuge Sigma Mk 1-12K (Fa. Sigma, München)
  - Kühlzentrifuge 4K10 (Fa. Sigma, München)
  - Stock-Zentrifuge (Fa. Stock, Heilbronn)
  - Ultrazentrifuge LE-80K (Fa. Beckman, Krefeld)
    - Rotor SW 28
    - Rotor SW 40
  - Tischultrazentrifuge TL 100 (Fa. Beckman, Krefeld)
    - Rotor TLA 100
    - Rotor TLA 45

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Zellen**

#### **3.2.1.1 Zellkultur**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Edmin337- und Rk13-Zelllinien verwendet. Die Zellen wurden in Hank's Modified Eagle's Medium mit 5 bis 10 % fetalem Kälberserum (FKS) kultiviert und in Plastik-Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Eine regelmäßige Passagierung erfolgte durch Ablösen der Zellen mit STV und anschließender Resuspension eines Teils der Zellen in frischem Medium. Die restlichen Zellen wurden entweder verworfen, in weitere Zellkulturflaschen gegeben oder auf Zellplatten ausgesät, die ebenfalls bei 37 °C, jedoch mit einem CO<sub>2</sub>-Anteil von 5 % inkubiert wurden.

#### **3.2.1.2 Kryokonservierung von Zellen**

Zur langfristigen Aufbewahrung von Zellen wurden diese kryokonserviert. Dazu wurden ca.  $1 \times 10^6$  Zellen mit STV abgelöst und 10 min bei 1000 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frischem Medium mit 15 % FKS und 10 % DMSO resuspendiert und in Kryoröhrchen abgefüllt, die zunächst bei 4 °C gelagert wurden. Nach 4 h wurden die Röhrchen bei -70 °C tiefgefroren und zur weiteren Lagerung bei -120 °C aufbewahrt.

#### **3.2.1.3 Herstellung von Zelllysaten für den Western Blot**

Die Zellen wurden mit einer MOI von 2 infiziert und nach bestimmten Zeitpunkten wie folgt geerntet: Zunächst wurde auf den zweimal mit kaltem PBS ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> gewaschenen Zellrasen Ripa-Lysispuffer gegeben. Nach 5 min wurden die Zellen mit einem Zellschaber oder einer Pipettenspitze abgeschabt und die Lysate bei -20 °C gelagert. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Der Proteingehalt der Lysate wurde mit dem BCA-Kit nach Anleitung des Herstellers bestimmt und die Proben auf einen einheitlichen Proteingehalt eingestellt.

### 3.2.1.4 Zellfraktionierung

Mit einer MOI von 2 infizierte Zellen wurden nach 0 h und 14 h einmal mit PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  gewaschen und mit einem Zellschaber in PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  abgelöst. Das nach Zentrifugation (10 min, 800 rpm) gewonnene Pellet wurde in 30fachem Volumen Zellfraktionierungspuffer A resuspendiert und 10 min auf Eis gehalten. Die Zellen wurden erneut pelletiert (5 min, 3000 rpm), der Überstand verworfen und das Pellet in 10fachem Volumen Zellfraktionierungspuffer A aufgenommen. Nach einem Gefriertauzyklus ( $-70\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{RT}$ ) und einer Behandlung mit Ultraschall (dreimal für je 5 sek) wurden die dadurch freigesetzten Zellkerne sowie noch vorhandene intakte Zellen durch Zugabe von Sucrose bis zu einer Endkonzentration von 0,3 M und anschließender Zentrifugation (10 min, 800 rpm) abgetrennt (Kernpellet).

Der Überstand wurde für 10 min bei 1000 rpm von Kernresten gereinigt und durch Ultrazentrifugation (1 h, 100000 rpm) in eine Membranfraktion (Pellet) und eine zytoplasmatische Fraktion (Überstand) getrennt. Der die zytoplasmatischen Komponenten enthaltende Überstand wurde vorsichtig abgenommen und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Das Pellet wurde in Zellfraktionierungspuffer B resuspendiert, dreimal für je 15 sek mit Ultraschall behandelt und 15 min bei 1500 rpm zentrifugiert, um nicht lysierte Bestandteile abzutrennen. Der Überstand (Membranfraktion) wurde bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert, das Pellet verworfen.

Das die Kerne und Zellreste enthaltende Pellet (Kernpellet) wurde in 10fachem Volumen Zellfraktionierungspuffer A mit 0,3 M Sucrose aufgenommen und vorsichtig auf ein Kissen aus 1,62 M Sucrose in Zellfraktionierungspuffer A geschichtet. Durch 15minütige Zentrifugation bei 2100 rpm wurden die Kerne pelletiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt und das so erhaltene Pellet in 20fachem Volumen Zellfraktionierungspuffer A mit 0,5 % Triton X-100 resuspendiert und für 15 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das gewonnene Pellet wurde in Zellfraktionierungspuffer B aufgenommen, dreimal für je 15 sek mit Ultraschall behandelt und erneut zentrifugiert (15 min, 1500 rpm). Der die Kernfraktion darstellende Überstand wurde abgenommen und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt, das Pellet verworfen.

### **3.2.1.5 Transfektion eukaryotischer Zellen mit PerFectin™**

Mit Hilfe von PerFectin™ können eukaryotische Zellen mit Plasmid-DNS transfiziert werden. Dazu wurde der nach Herstelleranleitung vorbereitete Transfektionsansatz auf zu 50 bis 80 % konfluente Zellen in einer 6-Loch-Platte gegeben. Die Inkubation der transfizierten Zellen erfolgte unter CO<sub>2</sub>-Atmosphäre bei 37 °C.

### **3.2.1.6 Herstellung rekombinanter Zelllinien**

Um eine stabile Expression von Fremdgenen durch eukaryotische Zellen zu erreichen, ist eine Integration der Fremd-DNS in das Genom der Wirtszelle erforderlich. Dazu wurde das, das gewünschte Gen tragende, Plasmid mit dem Plasmid pSV2-neo im Verhältnis 10:1 kotransfiziert. Letzteres Plasmid kodiert für eine Aminoglykosid-3'-Phosphotransferase, die Aminoglykosid-Antibiotika, wie Geniticin G-418 durch Dephosphorylierung inaktiviert und dadurch die Selektion auf stabil transfizierte Zellen ermöglicht. Nach 48 h wurde der Transfektionsüberstand durch ein Gemisch aus 50 % 2 Tage altem Zellkulturüberstand, 50 % frischem Medium mit 10 % FKS und 600 µg/ml G-418 ersetzt. Um den Selektionsdruck aufrecht zu erhalten, wurde dieses Medium alle 48 h erneuert. Nach etwa zwei Wochen traten kleine Zellinseln auf, die mit STV abgelöst und auf 96-Loch-Platten ausgesät wurden. Die Fremdgenexpression der Zellklone wurde mittels Western-Blot und indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen. Um den Verlust des Fremdgens zu vermeiden, wurden der etablierten Zelllinie bei jeder fünften Passage 600 µg G-418/ml Medium zugesetzt.

## **3.2.2 Virus**

### **3.2.2.1 Verwendete Virusstämme**

Für die beschriebenen Arbeiten wurden Plaqueisolate des auf embryonalen Schweinenierenzellen (ENS) passagierten EHV-1-Stammes RacH (MAYR et al., 1968) verwendet. Die Plaqueisolate der 12. Passage, RacL11 und RacL22, sind sowohl für den natürlichen Wirt als auch für Labortiere virulent. Der nach 256 Passagen attenuierte Stamm RacH ist in beiden Fällen avirulent (MAYR et al., 1968; HÜBERT et al., 1996). Für die funktionelle Untersuchung des UL11-Proteins wurde der für Pferde und Labortiere avirulente

EHV-1-Stamm KyA (Kentucky A) herangezogen. Dieser Stamm wurde unter Verwendung von syrischen Hamstern isoliert und zur Adaptierung auf Mäuse-Fibroblasten passagiert (COLLE et al., 1996; RUDOLPH et al., 2002).

### **3.2.2.2 Virusvermehrung in Zellkultur**

Die Ausgangsviren RacL11 und RacL22 wurden auf Edmin-Zellen, die Stämme RacH und KyA auf Rk13-Zellen vermehrt.

Dazu wurden zu 80 bis 90 % konfluente, frisch geteilte Zellen mit einer MOI von 0,1 infiziert. Dem Medium wurde nach 1 h Inkubation bei 37 °C FKS in einer Konzentration von 2 % zugesetzt. Nach Auftreten eines zytopathischen Effektes (zpE) bei mehr als 80 % der Zellen, wurden die Zellkulturflaschen zur Freisetzung intrazellulärer Virionen zweimal gefriergetaut. Die Virussuspension wurde zur Reinigung von zellulären Bestandteilen 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert, der Überstand portioniert und bei -70 °C gelagert.

### **3.2.2.3 Virustitration**

Zur Bestimmung der Zahl der Plaque-bildenden Einheiten pro ml Virussuspension (PbE/ml) wurden diese in einer 10er logarithmischen Verdünnungsreihe titriert. Dazu wurde die Virussuspension in Zellkulturmedium von  $10^{-1}$  bis  $10^{-7}$  verdünnt und diese Verdünnungen in Doppelansätzen von je 1 ml/Loch auf zu 90 bis 100 % konfluente Zellen in einer 24-Loch-Platte gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 37 °C wurde die Suspension durch Methylzellulose ersetzt, um eine Ausbreitung der Nachkommen-Viren über das Medium zu verhindern. 3 bis 4 Tage post infectionem (p.i.) konnte die Anzahl der Plaques pro Verdünnungsstufe unter dem Mikroskop bestimmt und der Titer der Virussuspension errechnet werden.

### **3.2.2.4 Präparation viraler DNS**

Mit einer MOI von 0,1 infizierte Zellen wurden nach Auftreten eines 100 %igen zytopathischen Effektes dreimal gefriergetaut (-70 °C/RT), um intrazelluläre Virionen freizusetzen. Die Virus-Zell-Suspension wurde anschließend durch 3stündige Zentrifugation bei 28000 rpm pelletiert und das Pellet in 900 µl TEN resuspendiert. Nach Zugabe von 450 µl

Sarkosylpuffer und 15minütiger Inkubation bei 65 °C, wurden 3 µl RNase A (100 mg/ml) zugesetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Zur Zerstörung sowohl zellulärer als auch viraler Proteine wurden 100 µl Proteinase K (10 mg/ml) zugegeben und der Ansatz bis zum Entstehen einer klaren Lösung (über Nacht) bei 56 °C inkubiert. Durch Phenolextraktion konnte die virale DNS von Protein- und Lipidkomponenten befreit werden. Dazu wurde der Ansatz mit der gleichen Menge Phenol versetzt und, um eine homogene Vermischung der Komponenten zu erreichen, 100mal geschwenkt. Zur Phasentrennung wurde die Probe zunächst 20 min auf Eis stehen gelassen und anschließend 10 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Der DNS-haltige Überstand wurde mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze vorsichtig abgenommen und der Vorgang wiederholt. Um den Überstand von Phenolresten zu reinigen, wurde dieser zweimal mit IAC im Verhältnis 1:1 ausgeschüttelt. Die virale DNS wurde durch Zugabe des doppelten Volumens eiskalten absoluten Ethanol und 1/10 des Volumens 4 M LiCl über Nacht bei -20 °C ausgefällt. Am nächsten Tag wurde die gefällte DNS für 30 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen des DNS-Pellets mit eiskaltem, 70 %igem Ethanol wurde die getrocknete DNS in A. dest. aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

### **3.2.2.5 Aufreinigung extrazellulärer Virionen**

Von mit einer MOI von 2 infizierten Zellen wurde 16 h p.i. der virushaltige Überstand abgenommen und für 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der dadurch von Zellen gereinigte Überstand wurde auf 30 %ige Sucrose in PBS ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> geschichtet und die Virionen durch Ultrazentrifugation (3 h, 23000 rpm) pelletiert. Das Pellet wurde in 0,5 ml Medium mit 5 % FKS resuspendiert, zweimal für je 15 min mit Ultraschall behandelt und 90 min bei 28000 rpm erneut durch ein 30 %iges Sucrosekissen zentrifugiert. Zum Entzuckern des erhaltenen Pellets wurde dieses in 1 ml PBS ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> aufgenommen und ein letztes Mal unter oben genannten Bedingungen ultrageschallt und zentrifugiert. Die gereinigten Virionen wurden in PBS ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> bei -20 °C gelagert.

### **3.2.2.6 Trennung gereinigter Virionen in Hülle und Kapsid**

Um die Verteilung von Proteinen innerhalb der Virionen zu untersuchen, wurden diese in eine Hüll- und Kapsidfraktion zerlegt. Dazu wurde die Suspension aufgereinigter Virionen mit der gleichen Menge PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  mit 2 % Triton X-100 versetzt und 20 min bei 45 °C inkubiert. Die Trennung in den die Hüllfraktion enthaltenden Überstand und die pelletierten Kapside erfolgte durch 30minütige Zentrifugation bei 32000 rpm. Der Überstand wurde bei -20 °C weggefroren, das Kapsidpellet in PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  resuspendiert und, um Verunreinigungen mit Hüllproteinen zu entfernen, zweimal für je 15 min mit Ultraschall behandelt. Die abschließende Zentrifugation erfolgte für 90 min bei 28000 rpm. Das erhaltene Pellet wurde in PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

### **3.2.2.7 Hemmung der DNS-Synthese in virusinfizierten Zellen mit Phosphonoessigsäure (PAA)**

Um die Abhängigkeit der Expression viraler Proteine von der Synthese viraler DNS zu untersuchen, wurden infizierte Zellen unter Zusatz des DNS-Synthese-Hemmers Phosphonoessigsäure (PAA) inkubiert. Dazu wurden vier kleine Zellkulturflaschen Rk13-Zellen mit einer MOI von 2 (RacL11) infiziert. Eine fünfte Flasche blieb uninfiziert. Nach 1 h wurde das Zellkulturmedium unter Zusatz von 2 % FKS erneuert. Drei Flaschen wurde mit dem frischen Medium PAA in Konzentrationen von 0,1, 0,5 und 1,0 mg/ml zugesetzt. Die vierte Flasche diente als Infektionskontrolle. Nach 14 h wurden die Zellen lysiert und die Lysate im Western Blot analysiert.

### **3.2.2.8 Hemmung der N-Glykosylierung mit Tunicamycin**

Zur Untersuchung der Glykosylierung viraler Proteine wurden infizierte Zellen unter Zusatz von Tunicamycin, das die N-Glykosylierung von Proteinen im Endoplasmatischen Retikulum (ER) hemmt, inkubiert. Rk13-Zellen drei kleiner Zellkulturflaschen wurden mit einer MOI von 2 (RacL11) infiziert. Eine vierte Flasche blieb uninfiziert und diente als Negativkontrolle. Nach 1 h wurde das Zellkulturmedium gewechselt. Zwei Flaschen wurde mit dem frischen Medium Tunicamycin in Konzentrationen von 5,0 und 20,0 mg/ml



zugesetzt. Die dritte Flasche diente als Infektionskontrolle. 14 h p.i. wurden die Zellen lysiert und die Lysate im Western Blot untersucht.

### 3.2.3 DNS

#### 3.2.3.1 Amplifizierung von DNS mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifizierung von DNS-Abschnitten erfolgte mittels PCR. Dazu wurden zunächst zwei zu je einem Strang der Matrize komplementäre Oligonukleotide (Primer) synthetisiert (Fa. MWG Biotech, Ebersberg). Diese dienen einer thermostabilen DNS-Polymerase als Startpunkte für die Synthese eines neuen Gegenstranges in 5'-3'-Richtung.

Die hier verwendete Standard-PCR (SAIKI *et al.*, 1988) wird in drei Phasen unterteilt. Durch Erhitzen des Ansatzes auf 95 °C wird die als Matrize dienende doppelsträngige DNS in Einzelstränge zerlegt. Bei einer Temperatur, die der spezifischen Schmelztemperatur der Primer entspricht, lagern sich die Oligonukleotide an die entstandenen Einzelstränge an. Anschließend wird die Temperatur auf die optimale Temperatur für die Aktivität der DNS-Polymerase angehoben. Diese beträgt bei der *Pfu*-Polymerase 74 °C, bei der *Taq*-Polymerase 72 °C. Die DNS-Polymerase synthetisiert ausgehend von den Primern einen zu dem jeweiligen Einzelstrang komplementären Gegenstrang. In einem Thermocycler werden diese Temperaturstufen bis zu 30mal wiederholt. Der Reaktionsansatz für die PCR bestand aus der DNS-Matrize (Template), dNTP's, MgCl<sub>2</sub>, DMSO, der Polymerase mit ihrem mitgelieferten Reaktionspuffer und A. dest. Die Sequenzen und Schmelztemperaturen der verwendeten Primer sind aus Tabelle 1 ersichtlich.

**Tabelle 1:** Darstellung der verwendeten Primer

Primer	Sequenz	Schmelztemperatur T <sub>m</sub>
UL20up	5'-ata <u>gaa ttc</u> atg cca cag gta tta atg-3'*	58,9 °C
UL20low	5'-atg <u>gat cca</u> agc tac gct taa cgg ag-3'*	64,8 °C
UL20tlow	5'-ata <u>tct aga</u> tgg gca gaa aat gat ggg-3'*	61,9 °C

\* Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen

### **3.2.3.2 Präparation und Aufreinigung von DNS nach PCR oder Restriktionsenzymverdau**

Der Reaktionsansatz der PCR wurde je nach erwarteter Größe des amplifizierten DNS-Fragmentes in 0,8 bis 2 %ige Agarosegele eingesetzt und bei einer Gleichspannung von 50 oder 100 V elektrophoretisch aufgetrennt. Eine zusätzlich mitgeführte kb-Leiter ermöglichte die Größenbestimmung der Fragmente. Um die DNS unmittelbar nach Auftrennung unter UV-Licht sichtbar machen zu können, enthielten die Gele Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,0005 %. Mit einem Skalpell wurde die gewünschte Bande ausgeschnitten und die darin enthaltene DNS unter Verwendung des DNA-Purification-Kits nach Herstelleranleitung aufgereinigt. Die DNS wurde mit 40 µl 10 mM Tris, pH 8,0 eluiert und bei -20 °C gelagert.

### **3.2.3.3 DNS-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen**

Zur Spaltung von Plasmid-, BAC- oder viraler DNS, wurden die Restriktionsenzyme in Konzentrationen von 5 bis 10 Units pro µg DNS zusammen mit dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer eingesetzt. Plasmid-DNS wurde für 1 h, virale DNS für 3 h bei 37 °C verdaut. Durch Zugabe von 1/10 des Volumens BSE-Puffer wurde die enzymatische Reaktion gestoppt. Die Auftrennung der entstandenen Fragmente erfolgte elektrophoretisch in 0,8 bis 2 %igen Agarosegelen bei angelegten Gleichspannungen von 100 V (Plasmid-DNS) oder 50 V (BAC- und virale DNS). Durch Färbung der Gele mit Ethidiumbromid konnten die Fragmente unter UV-Licht (302 nm) sichtbar gemacht und dokumentiert werden. Alternativ enthielten die Gele bereits Ethidiumbromid und die DNS-Fragmente wurden wie unter 3.2.3.2 beschrieben präpariert und aufgereinigt.

### **3.2.3.4 Ligation von DNS-Fragmenten**

Die Insertion eines DNS-Fragmentes in einen Vektor erfordert das Vorhandensein zueinander passender Enden. Dazu wurden Vektor und Insert mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten. Um eine Religation linearisierter Vektoren zu verhindern, wurden dem inaktivierten Restriktionsenzymverdau 10 U einer Alkalischen Phosphatase (CIP) zugesetzt. Diese entfernt die zur Ligation nötigen Phosphatgruppen am 5'-Ende. Nach 1 h Inkubation

bei 37 °C wurde die Reaktion durch Hitzeinaktivierung des Enzyms für 10 min bei 65 °C gestoppt. Zur Ligation wurde eine T4-DNS-Ligase (SAMBROOK und RUSSEL, 2001) verwendet, die unter ATP-Verbrauch komplementäre 5'-Phosphat und 3'-OH-Enden linearer DNS-Fragmente verbindet. Vektor und Insert wurden im Verhältnis 1:4 eingesetzt und mit 10000 U T4-Ligase pro µg DNS im mitgelieferten Puffer über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Hitzeinaktivierung des Enzyms für 10 min bei 65 °C gestoppt und der Ansatz bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### **3.2.3.5 DNS-DNS-Hybridisierung (Southern Blot)**

#### Markierung von DNS mit Digoxigenin

Für die Markierung bestimmter DNS-Fragmente wurde das Prinzip des "random primed labeling" (FEINBERG und VOGELSTEIN, 1983) angewandt. Oligonukleotide mit einer Zufallssequenz lagern sich dabei an die zu markierende, denaturierte DNS an und dienen als Primer für eine DNS-abhängige DNS-Polymerase. Diese synthetisiert auf diese Weise unterschiedlich lange, zum Elternstrang komplementäre Tochterstränge, in die durch Verwendung des DIG-High-Prime™ Kits Digoxigenin-markierte dUTP's eingebaut werden. Die nach Herstelleranleitung hergestellte DNS-Sonde wurde für 10 min gekocht, in 15 ml Hybridisierungslösung aufgenommen und bis zum Gebrauch bei 4 °C aufbewahrt.

#### Transfer von DNS durch Southern Blot

Durch Restriktionsenzyme gespaltene BAC- oder virale DNS wurde durch Elektrophorese in einem 0,8 %igen Agarosegel in die entstandenen Fragmente aufgetrennt und nach Färbung mit Ethidiumbromid zur Dokumentation fotografiert. Um den Transfer hochmolekularer Fragmente zu erleichtern, wurde das Gel 5 min einer Bestrahlung mit UV-Licht (302 nm), das zu Einzelstrangbrüchen in DNS-Molekülen führt, ausgesetzt. Unter Verwendung eines Vakuum-Blot-Gerätes wurde die DNS auf eine Nylonmembran überführt. Dazu wurden nacheinander ein Whatmanfilter, die Nylonmembran und das Agarosegel auf einen porösen Träger gelegt. Eine Vakuumpumpe erzeugte einen Unterdruck von 100 bis 150 mbar. Das Agarosegel wurde zur Denaturierung der DNS und ihrer Fixierung auf der Membran mit 0,4 M Natronlauge bedeckt. Der Unterdruck wurde für 1 h aufrechterhalten, anschließend wurde die Nylonmembran für 2 h bei 80 °C getrocknet.

### DNS-DNS-Hybridisierung

Die getrocknete Membran wurde 1 bis 3 h bei 45 °C in einer Hybridisierungslösung unter Schütteln prähybridisiert. Anschließend wurde die Hybridisierungslösung durch die für 10 min auf 68 °C erhitzte Sonde ersetzt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 45 °C unter Schütteln. Am nächsten Tag wurde die Sonde abgenommen und zur Wiederverwendung bei 4 °C aufbewahrt. Um Reste der Sonde zu entfernen, wurde die Membran zweimal 5 min mit Waschlösung 1 bei Raumtemperatur und zweimal 15 min mit Waschlösung 2 bei 68 °C gewaschen.

### Immundetektion

Die Detektion der DIG-markierten DNS erfolgte mittels eines mit Alkalischer Phosphatase (AP) markierten anti-Digoxigenin Antikörpers, die Sichtbarmachung der Reaktion durch Chemilumineszenz.

Nach kurzem Äquilibrieren der Nylonmembran in Maleinsäure-Waschpuffer wurden unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation in Blockierungslösung geblockt. Der anti-DIG Antikörper wurde nach 1 h in einer Verdünnung von 1:5000 für weitere 60 min zugegeben. Anschließend wurde die Membran zweimal 15 min in Maleinsäure-Waschpuffer gewaschen, kurz in Detektionspuffer äquilibriert und mit 3 ml des Chemilumineszenz-Substrates (25 mM in Detektionspuffer) in Folie eingeschweißt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei Raumtemperatur wurde das Substrat wieder entfernt, die noch feuchte Membran erneut eingeschweißt und für 5 bis 15 min bei 37 °C vorinkubiert. Die Chemilumineszenz wurde durch einen Röntgenfilm sichtbar gemacht, der auf die Membran gelegt und nach 10 min Belichtungszeit entwickelt wurde.

### **3.2.3.6 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNS**

#### Herstellung kompetenter Bakterien

Von einer frischen Übernachtskultur der Stämme DH5 $\alpha$ F' oder TOP 10 wurde 1 ml in 100 ml LB-Medium verdünnt und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 bis 0,5 bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Nach 15minütigem Abkühlen auf Eis wurden die Bakterien für 5 min bei 3000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 30 ml eiskaltem TFB-I resuspendiert und für 10 min auf Eis gelagert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (s.o.) wurde das Pellet in 4 ml TFB-II aufgenommen und in Aliquots zu je 60  $\mu$ l bei -70 °C aufbewahrt.

### Transformation

Die kompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und vorsichtig mit der Hälfte des Ligationsansatzes vermischt. Nach 20minütiger Inkubation auf Eis wurde die Plasmid-DNS durch Hitzeschock (2 min bei 42 °C) und sofortiges Abkühlen auf Eis in die Bakterien eingeschleust. Anschließend wurden 198 µl SOB-Medium und 2 µl 40 %ige Glukose zugegeben und der Ansatz bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Um auf transformierte Bakterien zu selektieren, wurde die Suspension nach 1 h auf LB-Nährbodenplatten mit Antibiotikazusätzen (Ampicillin, Kanamycin oder Chloramphenicol) ausgestrichen. Die Wahl des Antibiotikums richtete sich nach dem Resistenzgen des Vektors. Enthielt der zur Klonierung benutzte Vektor ein für  $\beta$ -Galaktosidase kodierendes Gen (z.B. pTZ18R), das bei Insertion von DNS in die „multiple cloning site“ unterbrochen wird, wurden LB-Agarplatten mit Zusatz von Ampicillin, X-Gal und IPTG verwendet. Diese Platten bieten die Möglichkeit, Bakterienklone durch „blue-white-screening“ zu selektieren. Ist ein „Insert“ im Vektor vorhanden, kann das Substrat X-Gal aufgrund fehlender  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität nicht in eine blaue Substanz umgewandelt werden und die Kolonien sind an ihrer Weißfärbung zu erkennen. Die Platten wurden für 12 bis 16 h bei 37 °C bebrütet. Gewachsene Kolonien wurden mit einer Pipettenspitze gepickt und in 2 ml LB-Medium mit Antibiotikazusatz über Nacht bei 37 °C geschüttelt.

#### **3.2.3.7 Isolierung von Plasmid-DNS aus transformierten Bakterien**

##### Schnellpräparation bakterieller Plasmid-DNS

Die in 2 ml LB-Medium über Nacht vermehrten Bakterien wurden für 5 min bei 8000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 300 µl STET-Puffer mit Lysozym resuspendiert. Nach kräftigem Vortexen und 5minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Suspension für 45 sek gekocht. Die dadurch lysierten Bakterien und denaturierten Bakterienproteine wurden 10 min bei 12000 rpm pelletiert und entfernt. Durch Zugabe von 400 µl Isopropanol und 25 µl 4 M LiCl wurde die im Überstand enthaltene Plasmid-DNS gefällt und für mindestens 20 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Das DNS-Pellet wurde getrocknet und in 20 µl TE 10/1 mit RNase A aufgenommen. Zur Überprüfung der Größe und Orientierung des Inserts in der erhaltenen Plasmid-DNS wurde diese mit Restriktionsenzymen gespalten.

### Präparation größerer Mengen Plasmid-DNS

Zur Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNS wurde der Qiagen Midi Kit nach Anleitung des Herstellers verwendet.

#### **3.2.3.8 DNS-Konzentrationsbestimmung**

Die Konzentration von in A. dest. gelöster DNS wurde durch photometrische Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt.

#### **3.2.3.9 Konservierung von Bakterien mit Plasmid-DNS**

Bakterien mit dem gewünschten Plasmid wurden über Nacht in 2 ml LB-Medium unter Antibiotikazusatz selektiv vermehrt. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 3000 rpm wurde das Pellet in 1 ml des Gefriermediums HMFM resuspendiert und bei -70 °C gelagert.

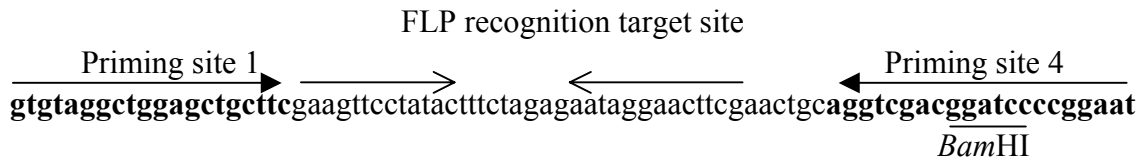
#### **3.2.4 Herstellung rekombinanter Viren**

Zur Herstellung rekombinanter Viren bedient man sich des Prinzips der homologen Rekombination, bei der die zu deletierenden Sequenzen des viralen Genoms durch heterologe DNS-Sequenzen, die von homologen Bereichen flankiert sind, ersetzt werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die rekombinanten Viren über BAC („bacterial artificial chromosome“)-Mutagenese hergestellt. Dabei findet die homologe Rekombination in *E. coli* statt und ist somit von dem Wachstum der Viren in eukaryotischen Zellen unabhängig.

### 3.2.4.1 BAC-Mutagenese

Für die BAC-Mutagenese müssen die viralen, zu mutagenisierenden Genome zirkulär und extrachromosomal als sog. „BAC-Plasmide“ in *E. coli* vorliegen. Bei dem hier verwendeten BAC-Mutagenese-System enthalten die Bakterien neben dem jeweiligen BAC der verschiedenen EHV-1-Isolate und -Stämme das temperatursensitive und ampicillinresistente Plasmid pKD46 („RED helper plasmid“), das für die Gene *gam*, *bet* und *exo* und für die Rekombinase des Bakteriophagen  $\lambda$  kodiert. Diese Rekombinase („RED recombinase“) vermittelt die homologe Rekombination zwischen einem linearen DNS-Fragment und dem viralen Genom. Als lineares DNS-Fragment dient das Kanamycin (*kan*)-Resistenzgen aus den Vektoren pKD13 bzw. pACYC177, das mittels PCR amplifiziert und über die Primer mit viralen, flankierenden Sequenzen versehen wird. Nach Aufreinigung des PCR-Produktes (s. 3.2.4.2) wird dieses durch Elektroporation in die Bakterien transformiert (s. 3.2.4.4). Im Vektor pKD13 ist das *kan*-Gen von „FRT-Sites“ („FLP-recognition target-Sites“) flankiert und wird zusammen mit diesen amplifiziert. Nach der Transformation können Bakterien mit mutagenisiertem BAC aufgrund der erworbenen Kanamycin-Resistenz selektiert werden. Die Selektion geschieht zunächst bei 30 °C, anschließend wird die Temperatur auf 37 °C erhöht, um das Rekombinationsplasmid pKD46 zu eliminieren. Im Gegensatz zu anderen BAC-Mutagenese-Systemen können bei dem hier verwendeten „RED System“ die Kanamycin-Sequenzen wieder entfernt werden. Dazu werden die Bakterien mit dem ebenfalls temperatursensitiven und ampicillinresistenten Plasmid pCP20 („FLP expression plasmid“) erneut transformiert. Dieses Plasmid kodiert für eine Hefe-Rekombinase, die spezifisch mit den FRT-Sequenzen interagiert und dadurch zum Verlust des Resistenzgens führt (s. 3.2.4.5). Der Verlust dieses Gens eröffnet die Möglichkeit, das Genom erneut zu mutagenisieren und Doppelmutanten herzustellen (s. 3.2.4.6). In Abbildung 2 ist die nach Elimination des Kanamycin-Resistenzgens verbleibende Fremdsequenz mit einer Länge von 82 bp gezeigt. Die transformierten Bakterien werden bei 30 °C auf Ampicillin-Resistenz selektiert und nach Temperaturerhöhung auf 37 °C auf den Verlust aller Antibiotikaresistenzen getestet. Der *E. coli*-Stamm BW25141 mit den jeweils als BAC vorliegenden, viralen Genomen der EHV-1-Stämme RacL11, RacH und KyA (pRacL11, pRacH und pKyA) und dem Plasmid pKD46 wurden von N. Osterrieder und J. Rudolph zur Verfügung gestellt (RUDOLPH und OSTERRIEDER, 2002; RUDOLPH et al., 2002).



**Abbildung 2:** Verbleibende Fremdsequenz nach FLP-mediierter Exzision des Kanamycin-Resistenzgens

### 3.2.4.2 Amplifizierung und Aufreinigung linearer Rekombinationssequenzen

Als Selektionsmarker in den linearen Rekombinationssequenzen diente das Kanamycin-Resistenzgen aus den Vektoren pKD13 (UL20- und UL11-negative Viren) bzw. pACYC177 (UL49-negative Viren). Im Vektor pKD13 wird das Kanamycin-Resistenzgen von „FRT-Sites“ flankiert. Diese wurden zusammen mit dem *kan*-Gen mittels Standard-PCR amplifiziert. Die dabei verwendeten Primer, die zusätzlich virale Sequenzen für die folgende homologe Rekombination zwischen dem viralen BAC-Genom und dem PCR-Produkt in *E. coli* enthielten, sind Tabelle 2 zu entnehmen. Die PCR-Produkte wurden wie unter 3.2.3.2 beschrieben aufgereinigt. Nach Elution der DNS mit 40 µl Tris, pH 8,0 wurde diese über Nacht bei -20 °C mit Ethanol ausgefällt. Dazu wurde der Ansatz mit A. dest. auf 100 µl aufgestockt und mit der doppelten Menge absolutem Ethanol und 10 % Natriumacetat versetzt. Am nächsten Tag wurde die DNS für mindestens 20 min bei 13000 rpm abzentrifugiert und zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Das getrocknete DNS-Pellet wurde in A. dest. aufgenommen.

**Tabelle 2:** Für die BAC-Mutagenese verwendete Primer

Primer	Sequenz	Schmelztemperatur $T_m$
UL20p1	5'-gac tag tcc ata ccc tgc acc gct cgc agg ctg cca gaa ata ttt ctc tcc gaa ttt ttg agg ggt gga ggt gta ggc tgg agc tgc ttc-3'*	> 75 °C
UL20p4	5'-tct ctt ctc acg ttt tat act gtc agt cgg ccg cta ccc cag tgg tgc ctc cca cgg agg cac ccc taa ttc cgg gga tcc gtc gac ct-3'*	> 75 °C



UL11delredup	5'-ata tgg gac agc gac tct cct gcg gat gtt tca gaa ccg acc agc tcg taa ctc act ctg gcg aag <b>tgt agg ctg gag ctg ctt c-3'</b> *	> 75 °C
UL11delredlow	5'-acg cta cca cgc act act ata gaa aaa ata aaa cac ctg ata cgt tta tat gcg ttt aca gtc att tta ttt aat <b>aat tcc ggg gat ccg tgc acc-3'</b> *	> 75 °C
UL49delup	5'-att agt gct gaa ggt tcc ttt cgg ggt tta cag cgc tag tat tag agt ttt gta aga gtt tat tat tag caa gtg aat cga ttt att caa caa agc cac g-3'	> 75 °C
UL49dellow	5'-aca aat aag gta aag aaa tat gta aga ggc aca ttt tat tga ggg cac agt gtt atg aat tta tgc aaa taa gcg gcc agt gtt aca acc aat taa cc-3'	> 75 °C

\* Sequenzen der „FRT-Sites“ sind hervorgehoben.

### 3.2.4.3 Herstellung elektrokompetenter Bakterien für die Elektroporation

2 ml einer frischen Übernachtskultur des *E. coli*-Stammes BW25141 mit den jeweiligen BACs und dem Plasmid pKD46 wurden in 100 ml LB-Medium mit Ampicillin-Zusatz verdünnt und bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6 bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,2 wurde Arabinose in einer Konzentration von 0,1 % zugegeben. Durch die Arabinose wird die Expression der, von dem Plasmid pKD46 kodierten, Rekombinase induziert. Die Suspension wurde für 15 min auf Eis stehen gelassen und anschließend für 10 min bei 3500 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit A. bidest. resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen des Bakterienpellets mit A. bidest. mit 10 % Glycerin wurde der Überstand abgekippt und das Pellet in dem übrigbleibenden Tropfen resuspendiert. Die Lagerung erfolgte in Aliquots zu je 50 µl bei -70 °C. Alle verwendeten Materialien und Flüssigkeiten waren vorgekühlt.

### 3.2.4.4 Transformation durch Elektroporation

Die elektrokompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und vorsichtig mit ca. 100 ng des aufgereinigten PCR-Produktes vermengt. Der Ansatz wurde luftblasenfrei in eine eiskalte Küvette gegeben und Hochspannungsimpulsen mit einer Spannung von 2,5 kV bei einem

Widerstand von 400  $\Omega$  und einer Kapazität von 250  $\mu\text{F}$ d ausgesetzt. Anschließend wurde die Suspension mit 600  $\mu\text{l}$  vorgewärmtem SOG-Medium aus der Küvette entfernt und bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Nach 1 h wurden die Bakterien auf LB-Nährbodenplatten unter Zusatz von Kanamycin ausgestrichen und bei 30 °C inkubiert. Gewachsene Kolonien wurden nach 20 h mit einer Pipettenspitze gepickt, in 2 ml LB-Bouillon mit Kanamycin gegeben und über Nacht bei 37 °C vermehrt.

#### **3.2.4.5 Elimination des Kanamycin-Resistenzgens**

Zur Elimination des Kanamycin-Resistenzgens aus dem BAC-Genom wurden die selektierten Bakterien erneut elektrokompent gemacht und mit dem Plasmid pCP20 transformiert. Dieses ebenfalls ampicillinresistente und temperatursensitive Plasmid kodiert für eine Hefe-Rekombinase, die spezifisch mit den FRT-Sequenzen interagiert und somit den Verlust des *kan*-Gens verursacht. Die transformierten Bakterien wurden bei 30 °C auf LB-Nährbodenplatten mit Ampicillin-Zusatz selektiert. Gewachsene Kolonien wurden gepickt und nach Vermehrung bei 37 °C auf den Verlust der Kanamycin- und Ampicillin-Resistenz getestet.

#### **3.2.4.6 Herstellung einer Doppelmutante**

Für die Herstellung einer Doppelmutante wurden die Bakterien mit dem einfach mutagenisierten, viralen BAC-Genom elektrokompent gemacht und zunächst mit dem Rekombinationsplasmid pKD46 transformiert. Positiv auf Ampicillin-Resistenz getestete Bakterien wurden erneut elektrokompent gemacht und mit einem weiteren, mittels PCR aus dem Vektor pACYC177 amplifizierten und von Rekombinationssequenzen flankierten, aufgereinigten Kanamycin-Resistenzgen transformiert. Die Bakterien wurden bei 30 °C auf Kanamycin-Resistenz selektiert und das Resistenzgen nicht mehr eliminiert.

#### **3.2.4.7 Isolierung von BAC-DNS aus Bakterien**

Die Bakterien wurden über Nacht in 10 ml LB-Medium vermehrt und am nächsten Tag für 10 min bei 3500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 200  $\mu\text{l}$  Puffer 1 resuspendiert. Die Lysis der Bakterien erfolgte durch Zugabe von 400  $\mu\text{l}$  Puffer 2

und 5minütiger Inkubation auf Eis. Der Ansatz wurde mit 300 µl Puffer 3 neutralisiert und nach kurzer Inkubation auf Eis für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis und unter Verwendung abgeschnittener Spitzen. Der DNS-haltige Überstand wurde in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und mit dem gleichen Volumen (900 µl) Phenol/Chloroform 1:1 versetzt. Phenol dient der Abtrennung der Protein- und Lipidfraktion, Chloroform sorgt für eine scharfe Phasentrennung. Nach intensivem Schwenken des Ansatzes wurde dieser für 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Der Überstand wurde abgenommen, die DNS durch Zugabe von 900 µl Isopropanol gefällt und für mindestens 20 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Das DNS-Pellet wurde einmal mit 70 %igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 30 µl TE 10/1 mit RNase A aufgenommen. Zur Isolierung größerer Mengen BAC-DNS wurde das Protokoll für low-copy-Plasmide des Qiagen Plasmid Midi Kits verwendet.

Die Überprüfung der BAC-DNS auf ihre Mutation erfolgte durch Restriktionsenzymverdau und Southern Blot.

#### **3.2.4.8 Elimination der BAC-Sequenz**

Die BAC-spezifischen Sequenzen, die unter anderem eine *GFP*-Kassette (kodiert für das „green fluorescent protein“) enthalten, sind bei den EHV-1-Stämmen RacL11, RacH und KyA anstelle des für das Glykoprotein gp2 kodierenden Gen 71 eingefügt. Zur Reinsertion dieses Gens wurden Rk13-Zellen mit der jeweiligen, mutagenisierten BAC-DNS (pRacL11Δ20, pRacL11Δ11, pRacL11Δ49, pRacL11Δ49Δ11, pRacHΔ20 und pKyAΔ11) und den Plasmiden pTD1-1 (RacL11), pt71H (RacH) bzw. pt71-KyA (KyA) kotransfiziert. Diese Plasmide enthalten jeweils den vollständigen Leserahmen des Gen 71 der verschiedenen EHV-1-Stämme mit flankierenden homologen Sequenzen. Für die Kotransfektion wurde PerFectin™ nach Anleitung des Herstellers verwendet und je 2 µg der zu transfizierenden DNS eingesetzt. Die Zellen wurden bei 37 °C mit einem CO<sub>2</sub>-Anteil von 5 % inkubiert und nach 5 Tagen zur Freisetzung intrazellulärer Virionen zweimal gefriergetaut (-70 °C/RT). Mit dem verdünnten, virushaltigen Überstand wurden anschließend zu 90 bis 100 % konfluente Zellen infiziert. Nach 1 h wurde das Medium durch Methylzellulose ersetzt und die Platten bis zur Ausbildung gut sichtbarer Plaques (3 bis 4 Tage) bei 37 °C im CO<sub>2</sub>-Brutschrank kultiviert. Entstandene Plaques wurden unter dem Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet. Die Plaques von Viren, die die BAC-Sequenzen

einschließlich des *GFP*-Gens verloren hatten, fluoreszierten nicht mehr und wurden isoliert. Eine phänotypisch *GFP*-negative Viruspopulation wurde über eine dreistufige Einzelplaqueisolierung erreicht.

Die korrekte Reinsertion des Gen 71 in das Genom der über BAC-Mutagenese hergestellten rekombinanten Viren RacL11Δ20, RacHΔ20, RacL11Δ11, RacL11Δ49 und RacL11Δ49Δ11 wurde durch Überprüfung der Expression des Glykoproteins gp2 durch eine IIF mit dem MAk anti-gp2 bestätigt.

### **3.2.5 Charakterisierung rekombinanter Viren *in vitro***

#### **3.2.5.1 Einschnitt-Wachstumskinetik**

Die Untersuchung der Wachstumseigenschaften der rekombinanten Viren erfolgte auf konfluenten Rk13-Zellen in 6-Loch-Platten. Die Platten wurden für 30 min bei 4 °C vorgekühlt und die Zellen anschließend mit den entsprechenden Viren mit einer MOI von 5 infiziert. Zur Adsorption der Viren wurden die Platten für 1 h bei 4 °C inkubiert. Der Zellrasen wurde zweimal mit PBS ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> gewaschen und die Penetrationsphase durch Zugabe von 37 °C warmem Zellkulturmedium eingeleitet. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 37 °C wurden nicht penetrierte Viren durch Zugabe von Zitratpuffer (pH 3,0) inaktiviert. Der Zitratpuffer wurde nach 2 min wieder abgenommen und Reste durch dreimaliges Waschen mit Medium entfernt. Die weitere Bebrütung der infizierten Zellen erfolgte unter Medium mit 5 % FKS bei 37 °C. Zu verschiedenen Zeitpunkten (0 , 4 , 8 , 12 und 24 h p.i.) wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und die Zellrasen in 1 ml frisches Medium geschabt. Die in Überstand und Zellen enthaltene Infektiosität wurde nach Lagerung bei -70 °C mittels Virustitration auf Rk13-Zellen bestimmt.

#### **3.2.5.2 Plaquegrößenbestimmung**

Zur Bestimmung der Plaquegrößen der rekombinanten Viren wurden konfluente Rk13-Zellen in 6-Loch-Platten mit 50 PBE pro Loch infiziert. Nach 1 h Inkubation bei 37 °C wurde das Zellkulturmedium durch einen Overlay aus Methylzellulose ersetzt. Die Platten wurden bis zur Ausbildung gut sichtbarer Plaques bei 37 °C unter CO<sub>2</sub>-Atmosphäre bebrütet. Die Methylzellulose wurde abgenommen und die Zellen mit einer Kristallviolettlösung fixiert und

gefärbt. Der größte Durchmesser der entstandenen Plaques wurde mit einem Messokular bestimmt und aus je 100 Plaques ein Mittelwert errechnet.

### **3.2.6 Expression und Aufreinigung des UL20-Proteins von EHV-1 in Bakterien**

#### **3.2.6.1 Expression**

Für die Expression des UL20-Homologs wurde das pBAD/gIII-System der Firma Invitrogen verwendet. Der C-terminale Teil des UL20-Leserahmens wurde mittels PCR aus viraler DNS amplifiziert und, wie unter 3.2.3.4 beschrieben, in den Vektor pBAD/gIII kloniert. In diesem Vektor steht das UL20-Gen unter der Kontrolle eines mit Arabinose induzierbaren Promotors. Am aminoterminalen Ende wird das Insert mit Sequenzen versehen, die für einen sog. *myc*-tag und für einen sog. *His*-tag kodieren. Der *myc*-tag besteht aus 10 Aminosäureresten (Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu) und ermöglicht die Detektion des Fusionsproteins mit dem anti-c-myc-Antikörper; der aus 6 Histidinresten bestehende *His*-tag dient der Aufreinigung des Proteins. Das Plasmid wurde in Bakterien (TOP 10) transformiert (siehe 3.2.3.8) und die Expression des rekombinanten Proteins durch Zugabe von Arabinose induziert. Dazu wurde eine frische Übernachtskultur der transformierten Bakterien 1:10 in LB-Medium mit Ampicillinzusatz verdünnt und bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,4 bis 0,6 bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Es folgten die Zugabe von Arabinose in einer Konzentration von 0,02 % und weitere 6 h Inkubation bei 37 °C. Durch 10minütige Zentrifugation bei 6000 rpm wurden die Bakterien pelletiert und bei -20 °C weggefroren. Zur Expressionskontrolle wurde vor und 6 h nach Zugabe der Arabinose je 1 ml der Bakteriensuspension entnommen und für 2 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 µl 8M Urea resuspendiert und bei -20 °C gelagert. Aliquots wurden im Western Blot unter Verwendung des anti-c-myc-Antikörpers auf die Expression des rekombinanten Proteins untersucht.

### 3.2.6.2 Aufreinigung

#### Affinitätschromatographie

Größere Mengen des rekombinanten Proteins wurden über Affinitätschromatographie aufgereinigt. Das aus einem Liter induzierter Bakteriensuspension gewonnene, bei -20 °C aufbewahrte Pellet wurde in Eiswasser aufgetaut und in 4 ml TALON-Lysis-Puffer (Urea-Puffer), pH 8,0 resuspendiert. Nach drei Gefriertauzyklen in flüssigem Stickstoff und Eiswasser zur Freisetzung des Proteins aus den Bakterien wurden weitere 16 ml TALON-Lysis-Puffer, pH 8,0 und PMSF in einer Konzentration von 1:100 zugesetzt. Die Suspension wurde unter Schütteln für 0,5 h auf Eis belassen und anschließend für 30 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde auf TALON Superflow-Kügelchen gegeben und über Nacht bei 4°C unter Schaukeln inkubiert. Die Kügelchen, die zuvor einmal mit 10 ml A. dest. und zweimal mit je 5 ml TALON-Lysis-Puffer, pH 8,0 gewaschen worden waren, besitzen an ihrer Oberfläche als Chelatkomplex gebundene Kobalt-Ionen, die mit dem negativ geladenen Polyhistidinrest des rekombinanten Proteins interagieren. Am nächsten Tag wurde die Suspension für 10 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Kügelchen für je 30 min bei 4 °C zweimal mit Urea-Puffer, pH 8,0 und zweimal mit Urea-Puffer, pH 7,0 gewaschen. Die Elution des gebundenen rekombinanten Proteins erfolgte in vier Stufen mit je 0,5 ml der folgenden Puffer: Puffer D, Puffer E, Imidazol-Puffer und 0,1 M EDTA. Diese wurden für je 10 min bei 4 °C und unter Schaukeln zu den Kügelchen gegeben, die anschließend für 10 min bei 2000 rpm wieder abzentrifugiert wurden. Die vier, das Fusionsprotein enthaltenden, Elutionsüberstände wurden vereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt. Ein Aliquot der Eluate wurde in der SDS-PAGE analysiert.

#### Dialyse

Zur Renaturierung des Proteins wurden die vereinigten Elutionsüberstände aufgetaut und in Dialyse-Schläuche eingefüllt, deren Porengröße so gewählt wurde, dass Proteine mit einem Molekulargewicht von über 3500 Da nicht diffundieren können. Die Schläuche wurden bei 4 °C in einen Kolben gehängt, der 5 Liter PBS mit  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  enthielt. Nach 24 h wurde PBS mit  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  durch PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  ersetzt und eine weitere Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Dialyse-Schläuche wurden entleert und ihr Inhalt für 20 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Die Bodensätze und Überstände wurden jeweils vereinigt und sowohl

unverdünnt als auch in Verdünnungen von 1:10 und 1:100 in ein Polyacrylamidgel eingesetzt. Durch Färbung des Gels mit Coomassie Brilliant Blau konnte die Menge des aufgereinigten Proteins abgeschätzt und dessen Reinheit bestimmt werden. Die Detektion des Fusionsproteins im Western Blot erfolgte mit dem anti-c-myc-Antikörper.

Die Überstände, die nur minimale Mengen des rekombinanten Proteins enthielten, wurden vor der Verwendung zur Immunisierung konzentriert. Dazu wurden sie in Ultrafiltrationsröhrchen mit einer Porengröße von 3500 Da gefüllt und bei 5000 rpm für ca. 5 h zentrifugiert. Das an der Membran zurückgehaltene Protein wurde vorsichtig in soviel PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  resuspendiert, dass sich ein Proteingehalt von ca. 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ergab.

### **3.2.7 Immunisierung von Kaninchen zur Antikörpergewinnung**

Zur Herstellung eines polyklonalen Kaninchenserums mit spezifischen Antikörpern gegen das UL20-homologe Protein von EHV-1, wurden zwei Tiere alle drei Wochen mit je 50 bis 100  $\mu\text{g}$  des bakteriell exprimierten und aufgereinigten Fusionsproteins immunisiert. Dazu wurde die gewonnene Proteinlösung mit Freund'schem Adjuvans (Verhältnis 1:1) bis zur Entstehung einer Emulsion gevortext. Die Applikation erfolgte in die Oberschenkelmuskulatur. Zur Gewinnung des Antiserums wurde den Kaninchen vor der ersten und jeweils 10 bis 14 Tage nach jeder weiteren Immunisierung Blut abgenommen. Dazu wurde die Ohrtrandvene mit einer sterilen Kanüle punktiert und einige ml Blut in einem Glasröhrchen aufgefangen. Das Blut wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend für 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das erhaltene Serum wurde abpipettiert und in Portionen zu je 0,5 ml bei -70 °C gelagert.

### **3.2.8 Proteine**

#### **3.2.8.1 Proteinanalyse mittels Elektrophorese**

##### **3.2.8.1.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

In der SDS-PAGE lagern sich die stark negativ geladenen SDS-Moleküle an die Polypeptidketten der Proteine an und sorgen für deren Denaturierung und negative Ladung. Dadurch wird die Wanderung der Proteine im elektrischen Feld nicht mehr durch ihre

elektrische Ladung bestimmt, sondern erfolgt entsprechend ihres Molekulargewichtes. Die Proteine können ihrer Größe nach aufgetrennt werden.

Die scheinbaren Molekulargewichte des UL11-homologen Proteins liegen zwischen 5 und 12 kDa. Um auch in diesem Bereich eine zufriedenstellende Auftrennung zu erreichen, wurde Tricin anstelle von Glycin als Ladungsträger verwendet. Die Lauffront von Tricin befindet sich, im Gegensatz zu Glycin, nicht im Bandenbereich der gesuchten kleinen Proteine und ermöglicht so eine ungehinderte Auftrennung. Zur Herstellung der Gele und Durchführung der Elektrophorese wurde das Vertikalelektrophorese-System Protean II verwendet.

#### Herstellung der Gele

Die Gele bestehen aus einem Sammel- und einem Trenngel, deren Porengröße und Bereich der optimalen Auftrennung durch die Acrylamidkonzentration variiert werden kann. Für das Tris-Glycin-Puffersystem wurden Trenngele mit einer Acrylamidkonzentration von 12 % verwendet, bei Gelen für das Tris-Tricin-System lag diese bei 16,5 %. Neben Acrylamid enthielten die Gele A. dest., Tris-Puffer, SDS (20 %), Amper 10 % und TEMED (Tab. 3 und Tab. 4). Die Apparatur zum Gießen der Gele wurde gereinigt, mit 70 %igem Alkohol entfettet und nach Herstelleranleitung zusammengesetzt. Das angemischte Trenngel wurde zwischen die Glasplatten gefüllt und zum Aushärten unter Luftabschluß mit A. dest. überschichtet. Auf das polymerisierte Trenngel wurde das Sammelgel gegossen und mit einem Kamm versehen, um Vertiefungen zum Einfüllen der Proben zu schaffen. Nach der Aushärtung des Sammelgels wurde der Kamm entfernt und die Vertiefungen mit Elektrophoresepuffer gereinigt.

#### Vorbereitung der Proben

Die nach 3.2.1.3 hergestellten Zellysate wurden je nach verwendetem Puffersystem mit dem gleichen Volumen (Tris-Tricin) oder 1/3 des Volumens (Tris-Glycin) des entsprechenden Probenpuffers versetzt. Durch Zugabe von 2-Mercaptoethanol zu den Probenpuffern konnten Disulfid-Brücken von Proteinen reduziert werden. Je nach Protein wurden die Proben auf Eis belassen oder für 5 min auf 99 °C erhitzt und anschließend in das Gel eingefüllt. Zur Größenbestimmung der Proteine wurde zusätzlich ein Molekulargewichtsmarker eingesetzt. Die Auftrennung erfolgte im entsprechenden Elektrophoresepuffer bei einer Spannung von 100 V für 2 bis 2,5 h.



**Tabelle 3:** Zusammensetzung der Polyacrylamidgele für Tris-Glycin-Puffer:

<b>Trenngel</b>	<b>12 %</b>	<b>Sammelgel</b>	<b>3 %</b>
A. dest.	2,54 ml	A. dest.	1,85 ml
Tris 1,5 M, pH 8,8	1,90 ml	Tris 0,5 M, pH 6,8	0,75 ml
SDS 20 %	37,5 µl	SDS 20 %	15,0 µl
Acrylamid- stammlösung 30 %	3,03 ml	Acrylamid- stammlösung 30 %	0,40 ml
Amper 10 %	37,5 µl	Amper 10 %	22,5 µl
TEMED	3,75 µl	TEMED	3,75 µl
Gesamtvolumen	7,55 ml	Gesamtvolumen	3,04 ml

**Tabelle 4:** Zusammensetzung der Polyacrylamidgele für Tris-Tricin-Puffer:

<b>Trenngel</b>	<b>16,5 %</b>	<b>Sammelgel</b>	<b>1,8 %</b>
A. dest.	0,61 ml	A. dest.	1,95 ml
Tris/SDS, pH 8,45	2,50 ml	Tris/SDS, pH 8,45	0,78 ml
Glyzerol	0,27 ml	Glyzerol	-
Acrylamid- stammlösung 30 %	4,10 ml	Acrylamid- stammlösung 30 %	0,45 ml
Amper 10 %	25,0 µl	Amper 10 %	20,0 µl
TEMED	5,0 µl	TEMED	5,0 µl
Gesamtvolumen	7,5 ml	Gesamtvolumen	3,2 ml

### 3.2.8.1.2 Färbung von Polyacrylamidgelen mit Coomassie Brilliant Blau

Die Färbung der Proteinbanden mit Coomassie Brilliant Blau diente der Darstellung des bakteriell exprimierten UL20-homologen Proteins und der Abschätzung der Proteinmenge nach dessen Aufreinigung. Dazu wurden die Polyacrylamidgele nach der Elektrophorese für 30 min in Coomassie-Färbelösung und anschließend für mindestens 2 h in Coomassie-Entfärbelösung geschwenkt. Durch das Entfärben löst sich der Farbstoff aus dem Gel, nicht aber aus den im Gel enthaltenen, aufgetrennten Proteinen, die dadurch als blaue Banden sichtbar werden. Vollständig entfärbte Gele wurden zur Konservierung auf Whatman-Filter gelegt, mit Klarsichtfolie abgedeckt und für 2 h bei 80 °C im Geltdrockner getrocknet.

### 3.2.8.1.3 Elektrotransfer und Immundetektion von Proteinen (Western Blot)

Um spezifische Proteinbanden mittels Immundetektion nachweisen zu können, müssen diese zunächst auf einer Nitrozellulose-Membran fixiert werden. Der Elektrotransfer erfolgte im Tankblotverfahren (TOWBIN et al., 1979). Dabei werden die elektrophoretisch aufgetrennten und durch SDS negativ geladenen Proteine durch ein elektrisches Feld aus dem Trenngel auf die Nitrozellulosemembran gezogen.

Sowohl die Membran als auch das Polyacrylamidgel wurden für 10 min in Towbin-Puffer äquilibriert und luftblasenfrei aufeinander gelegt. In Towbin-Puffer angefeuchtete Whatmanfilter und Schwämmchen wurden als Schutz auf beide Seiten gegeben und entsprechend den Herstellervorschriften in eine Mini-Trans-Blot Apparatur eingespannt. An die mit gekühltem Towbin-Puffer gefüllte Kammer wurde für 90 min eine Gleichspannung von 35 V angelegt. Nach dem Transfer der Proteine wurde die Membran zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen für 2 h in TBS-T mit 10 % Magermilchpulver bei Raumtemperatur geschwenkt. Die Nitrozellulosemembran wurde über Nacht bei 4 °C mit dem in TBS-T unter Zusatz von 5 % Magermilchpulver verdünnten Antikörper inkubiert. Um nicht oder unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Membran am nächsten Tag dreimal für je 30 min in TBS-T gewaschen. Das anti-Spezies POD-Konjugat wurde 1:1000 in TBS-T mit 5 % Magermilchpulver verdünnt und die Membran mit dieser Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 1 h wurde überschüssiges Konjugat durch dreimaliges Waschen für je 30 min entfernt und die Membran mit 600 µl nach Herstellervorschrift gemischtem ECL-Reagenz in Folie eingeschweißt. Die Chemilumineszenz wurde durch einen Röntgenfilm sichtbar gemacht, der für 10 min auf die Membran aufgelegt und anschließend entwickelt wurde.

### 3.2.8.2 Indirekte Immunfluoreszenz (IIF)

Die indirekte Immunfluoreszenz wurde angewendet, um virale Proteine in Zellen nachzuweisen bzw. zu lokalisieren. Rk13-Zellen wurden auf Deckgläschen in einer 6-Loch-Platte ausgesät und infiziert oder transfiziert. Die Fixation erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Dazu wurde der Zellrasen einmal mit PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  gewaschen, mit 1 ml eiskaltem 80 %igem Azeton überschichtet und die Platte für 10 min bei -20 °C aufbewahrt. Das Azeton wurde wieder abgenommen und Azetonreste bei Raumtemperatur

unter dem Abzug verdunstet. Die fixierten Zellen wurden für 10 min in PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  rehydriert und anschließend, um unspezifische Bindungsstellen abzublocken, für 1 h in PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  mit 10 % FKS unter Schütteln inkubiert. Das Kaninchenserum bzw. der monoklonale Antikörper wurde in PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  mit 5 % FKS verdünnt und für 1 h auf die Zellen gegeben. Durch dreimaliges Waschen mit PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  für je 30 min wurden Reste des ersten Antikörpers entfernt. Es folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (anti-rabbit ALEXA bzw. anti-mouse ALEXA), der ebenfalls in PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  mit 5 % FKS verdünnt und 1 h auf den Zellen belassen wurde. Nicht gebundenes Konjugat wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  entfernt. Die getrockneten Deckgläschen wurden mit der Zellseite nach unten auf einen Objektträger mit einem Tropfen PBS/Glycerin (1:1) gelegt und die Ränder mit Nagellack versiegelt. Die indirekte Immunfluoreszenz konnte im Fluoreszenz- oder im Confocal-Laser-Scan-Mikroskop ausgewertet werden.

### **3.2.8.3 Assoziation von Proteinen mit Lipid Rafts**

Lipid Rafts sind stabile Domänen zellulärer Membranen, die einen hohen Gehalt an Sphingolipiden und Cholesterol aufweisen. Sie werden über ihre geringe Dichte und ihre Unlöslichkeit in kaltem, 1 %igem Triton X-100 definiert.

Zur Isolierung von Lipid Rafts wurden drei große Zellkulturflaschen Rk13-Zellen mit einer MOI von 2 (RacL11) infiziert. 14 bis 16 h p.i. wurde der Zellrasen zunächst zweimal mit eiskaltem PBS und einmal mit MBS gewaschen und die Zellen anschließend in 2 ml MBS mit 1 % Triton X-100 und Proteinase-Inhibitoren geschabt. Die Lysate beider Zellkulturflaschen wurden vereinigt und für 20 min bei 4 °C inkubiert. Nach zehn Ultraschallimpulsen von je 3 sek zur Freisetzung der Zellkerne, wurden 1,5 ml des Lysates mit 1,5 ml 80 %iger Sucrose in MBS vermischt. Das Gemisch wurde in ein SW 40-Röhrchen gegeben, vorsichtig mit 6 ml 30 %iger und 4 ml 5 %iger Sucrose in MBS überschichtet und für 18 h bei 35000 rpm zentrifugiert. Die milliliterweise Fraktionierung des Sucrosegradienten von oben nach unten und die Resuspension des Pellets in 1 ml MBS führten zum Erhalt von 14 Fraktionen. Diese wurden mit Proteinasehemmern vermengt und bei -20 °C gelagert. Aliquots der Fraktionen wurden im Western Blot analysiert.

## 4. ERGEBNISSE

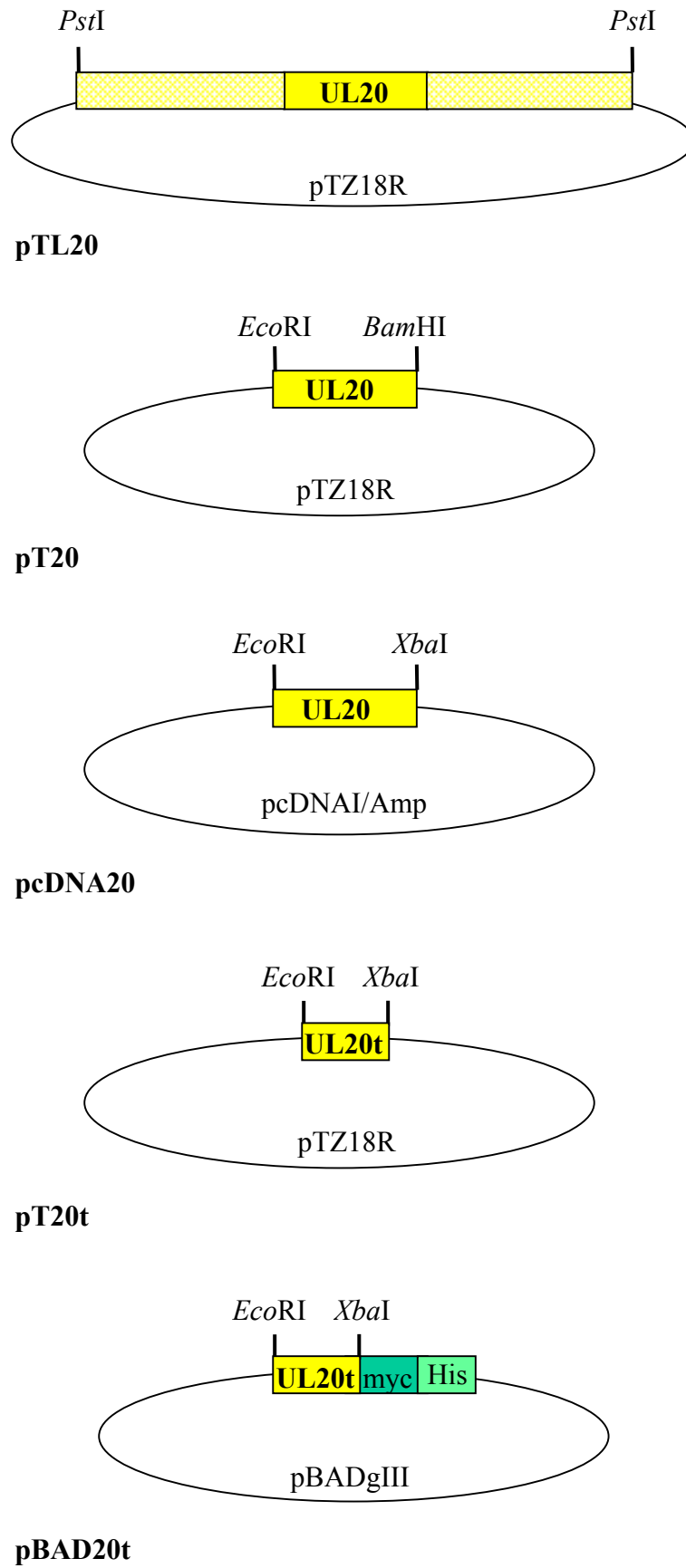
### 4.1 UL20

#### 4.1.1 Herstellung rekombinanter Plasmide

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Plasmide konstruiert, die die gesamte oder einen Teil der DNS-Sequenz des UL20-Leserahmens enthalten. Dazu wurde zunächst die virale DNS der EHV-1-Stämme RacL11 und RacH mit dem Restriktionsenzym *Pst*I geschnitten, und das den UL20-Leserahmen enthaltende 2,8 kb große Fragment, wie unter 3.2.3.5 beschrieben, in den Vektor pTZ18R kloniert. Daraus resultierten die Plasmide pTL20 und pTH20. Mittels PCR wurde aus pTL20 der UL20-Leserahmen (719 bp) ohne das terminale Stop-Codon amplifiziert. Die verwendeten Primer enthielten zusätzlich Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *Eco*RI (3'-terminal) und *Bam*HI (5'-terminal). Für die Amplifikation der Basenpaare 1 bis 208 (UL20t) des UL20-ORFs wurden Primer mit Sequenzen verwendet, die der Erkennung durch die Restriktionsenzyme *Eco*RI (3'-terminal) und *Xba*I (5'-terminal) dienen (Tabelle 1: Primer „UL20up“, „UL20low“ und „UL20tlow“). Die PCR-Produkte wurden über ihre Restriktionsenzymchnittstellen *Eco*RI und *Bam*HI bzw. *Eco*RI und *Xba*I in den Vektor pTZ18R kloniert und führten zum Erhalt der Plasmide pT20 bzw. pT20t. Durch Sequenzierung (Fa. MWG Biotech, Ebersberg) wurde die korrekte Insertion und Amplifikation der PCR-Produkte überprüft.

Der gesamte 719 bp große UL20-Leserahmen wurde über *Eco*RI und *Xba*I aus dem Plasmid pT20 entlassen und in den Vektor pcDNA1/Amp eingefügt (pcDNA20). Dieser Vektor enthält den HCMV-IE-Promotor und dient der Expression des UL20-Protein in eukaryotischen Zellen.

Für die bakterielle Expression des Proteins wurde UL20t über *Eco*RI und *Xba*I aus dem Plasmid pT20t in den Vektor pBADgIII umklontiert. Im entstandenen Plasmid pBAD20t stehen die viralen Sequenzen unter der Kontrolle eines mit Arabinose induzierbaren Promotors und werden nach Transformation in *E. coli* als Fusionsprotein mit einem *myc*-Epitop und einem Polyhistidinrest am C-Terminus exprimiert. Die hergestellten Plasmide sind in Abbildung 3 schematisch dargestellt.



**Abbildung 3:** Darstellung der verwendeten Plasmide

#### 4.1.2 Herstellung einer UL20-exprimierenden Zelllinie

Um die Isolierung der UL20-Deletionsmutanten von EHV-1 zu erleichtern, wurde eine Zelllinie etabliert, die das UL20-Protein stabil exprimiert. Dazu wurden Rk13-Zellen mit den Plasmiden pcDNA20 und pSV2-neo im Verhältnis 10:1 kotransfiziert. Das Plasmid pcDNA20 enthält den gesamten, 719 bp großen, Leserahmen des UL20-Proteins. Der ein Neomycin-Resistenzgen enthaltende Vektor pSV2-neo ermöglichte die Isolierung von Einzelzellklonen durch Selektion auf Resistenz gegen das Aminoglykosid-Antibiotikum Geneticin (s. 3.2.1.6). Die Zellklone wurden in der Immunfluoreszenz und im Western Blot unter Verwendung des anti-UL20-Serums (s. 4.1.3.1) auf die Expression des UL20-Proteins überprüft.

#### 4.1.3 Charakterisierung des UL20-Proteins

##### 4.1.3.1 Herstellung eines UL20-spezifischen polyklonalen Antiserums

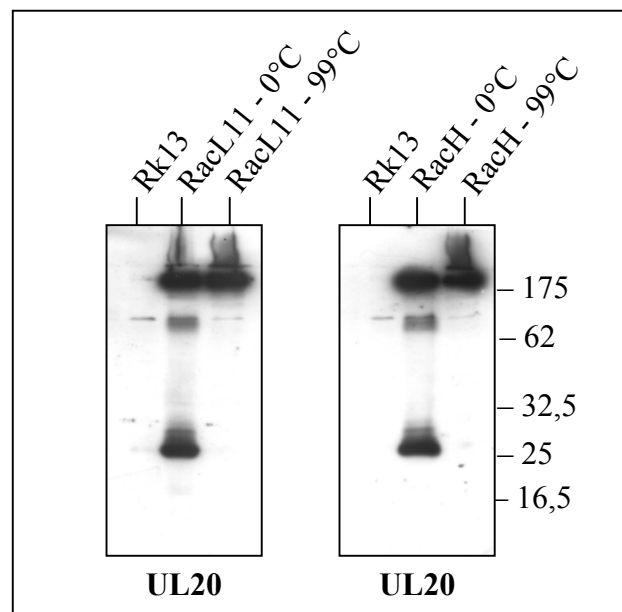
Zur Identifizierung des UL20-Produktes wurde ein spezifisches polyklonales Serum hergestellt. Dazu wurde der C-terminale Teil (208 bp) des UL20-Proteins in *E. coli* exprimiert und nach Aufreinigung zwei Kaninchen zur Immunisierung verabreicht.

Für die bakterielle Expression wurde das pBADgIII-System (Fa. Invitrogen) wie unter 3.2.6.1 beschrieben, verwendet. Dabei wird das trunkierte Protein als Fusionsprotein mit einem *myc*-Epitop und einem Poly-Histidinrest exprimiert. Das *myc*-Epitop ermöglichte die Detektion des rekombinanten Proteins im Western Blot mit dem monoklonalen anti-c-myc-Antikörper. Das UL20t-Fusionsprotein erschien dabei als eine Bande mit einem scheinbaren Molekulargewicht von ca. 36 kDa. Nach einer durch den poly-His-tag vermittelten, affinitätschromatographischen Aufreinigung (s. 3.2.6.2) und Konzentrierung des Proteins wurden zwei Kaninchen immunisiert. Sie erhielten in Abständen von je drei Wochen je 50 bis 100 µg des gewonnenen Proteins.

### 4.1.3.2 Das UL20-Protein im Western Blot

#### 4.1.3.2.1 Identifizierung des UL20-Proteins

Den Kaninchen wurde ab der dritten Immunisierung Blut abgenommen und das Serum im Western Blot auf spezifische Reaktivität untersucht. Als Proben dienten Lysate infizierter (RacL11, 14 h) und nicht infizierter Rk13-Zellen. Die Reaktivität der Seren wurde jeweils mit einem vor der ersten Immunisierung gewonnenen Präimmunsersum verglichen. Das Serum eines Kaninchens zeigte ab der vierten Immunisierung eine Reaktion in Form von drei Banden mit apparenten Molekulargewichten von ca. 25, 75 und 250 kDa. In gekochten Lysaten waren die beiden kleineren Banden nicht zu detektieren. Mit den Lysaten nicht infizierter Rk13-Zellen reagierte das Serum nicht (Abb. 4). Dem Präimmunsersum konnte keine Reaktivität nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Wie weiter unten (4.1.4.4) gezeigt, handelt es sich bei der 250 kDa großen Bande um eine unspezifische Reaktion des Serums mit einem weiteren viralen Protein, auf die deshalb nicht mehr eingegangen wird. Das anti-UL20-Serum wurde in Western Blot-Analysen in einer Verdünnung von 1:4000 eingesetzt.



**Abbildung 4:** Identifizierung des UL20-Proteins im Western Blot: Mit Lysaten RacL11-infizierter Rk13-Zellen reagierte das gewonnene anti-UL20-Serum spezifisch in Form von zwei Banden mit apparenten Molekulargewichten von ca. 25 und 75 kDa. In Lysaten nicht infizierter Zellen konnte keine Reaktion nachgewiesen werden. Der Größenstandard ist in kDa angegeben.

#### 4.1.3.2.2 Das UL20-Protein wird ab 6 h p.i. exprimiert

Zur Untersuchung der Expression des UL20-Proteins im Verlauf der EHV-1-Infektion wurden Rk13-Zellen mit dem Stamm RacL11 mit einer MOI von 4 infiziert. Die Zellen wurden zu bestimmten Zeitpunkten nach der Infektion (0, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 und 24 h) lysiert und im Western Blot unter Verwendung des anti-UL20-Serums analysiert. Als Kontrollantikörper für die Infektion diente das anti-UL34-Serum, das das membranassoziierte EHV-1-Protein pUL34 detektiert.

Wie aus Abbildung 5 hervorgeht, konnte das UL20-Protein erstmals ab 6 h p.i. detektiert werden. Das UL34-Protein war, wie erwartet, ab 5 h p.i. nachzuweisen.

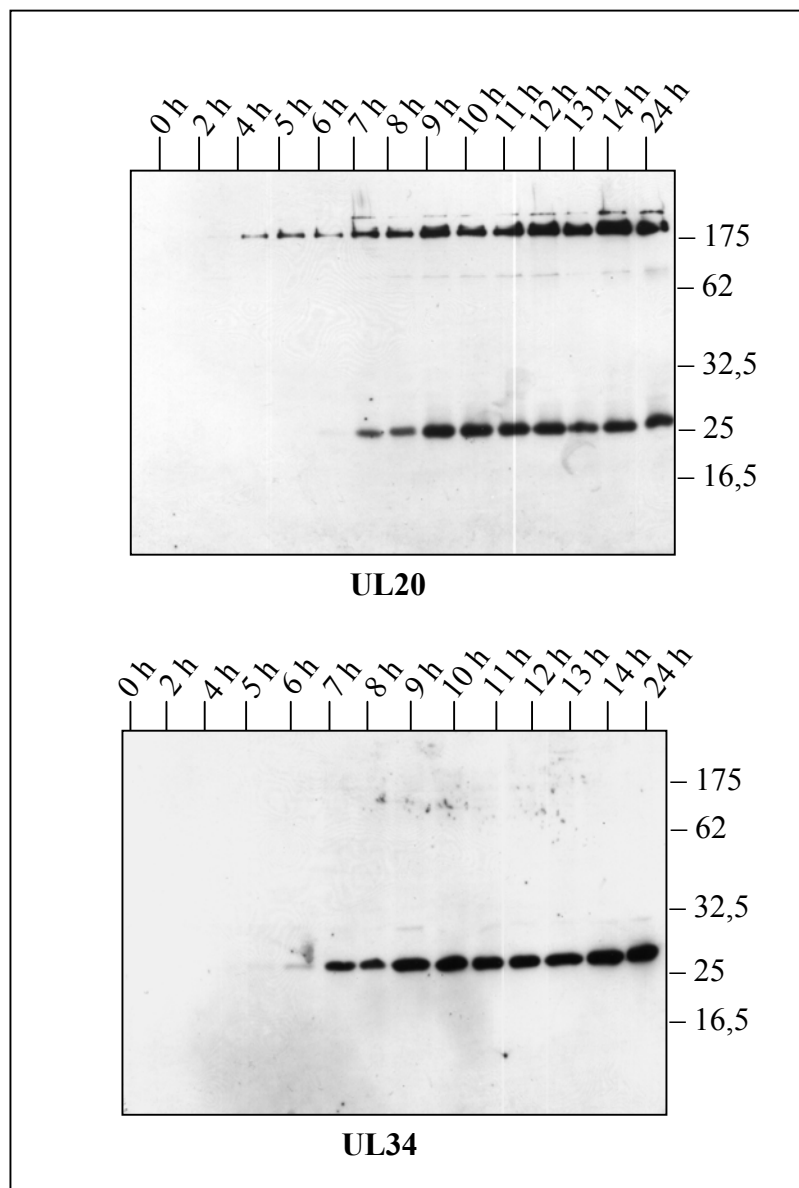
#### 4.1.3.2.3 Das UL20-Protein gehört zur Klasse der $\gamma_1$ -Proteine

Herpesvirale Proteine werden in infizierten Zellen kaskadenartig exprimiert und können in drei Klassen eingeteilt werden. Man unterscheidet  $\alpha$ - („immediate early“, IE),  $\beta$ - („early“, E) und  $\gamma$ - („late“, L) Proteine. Die Klasse der  $\gamma$ -Proteine, deren Expression von der Synthese viraler DNS abhängig ist, wird in die Subklassen  $\gamma_1$  („early late“) und  $\gamma_2$  („true late“) unterteilt.

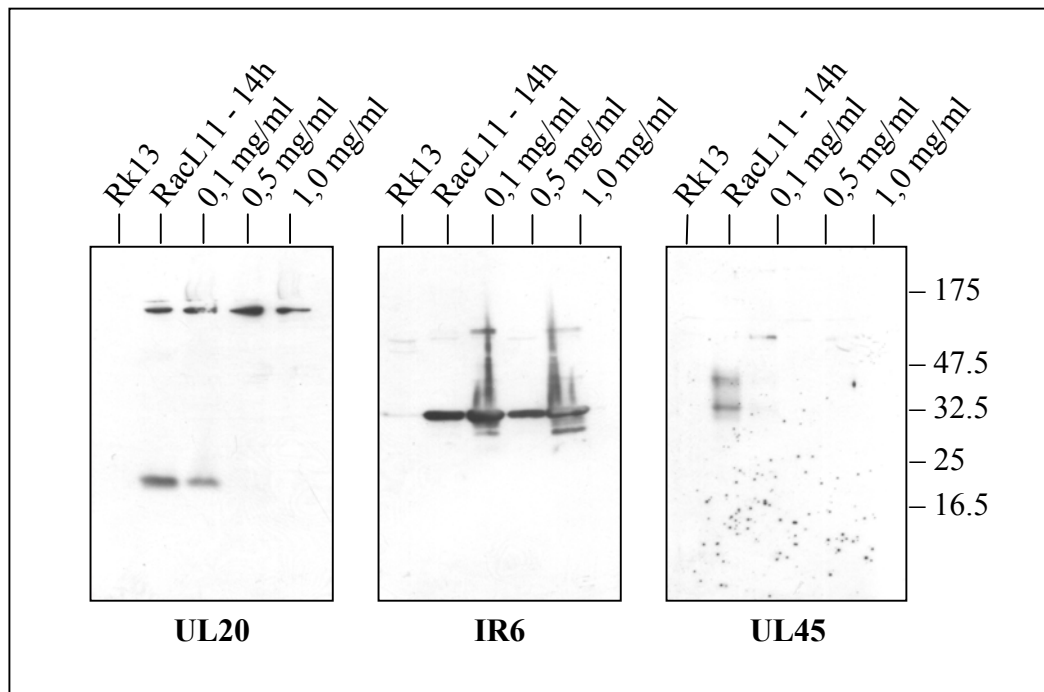
Mit Hilfe des DNS-Synthese-Hemmers Phosphonoessigsäure (PAA) ist eine Zuordnung von Proteinen zu den verschiedenen Klassen möglich. Zur Klassifizierung des UL20-Proteins wurden RacL11-infizierte Rk13-Zellen in Gegenwart steigender Konzentrationen (0,1, 0,5 und 1,0 mg/ml Medium) PAA inkubiert. Nicht infizierte Zellen dienten als Negativkontrolle. Die Zellen wurden 14 h p.i. lysiert und die Lysate im Western Blot untersucht. Die Expression des UL20-Proteins ließ sich durch Zugabe von 0,1 mg PAA/ml Medium reduzieren und konnte ab 0,5 mg PAA/ml Medium vollständig unterdrückt werden.

Zur Kontrolle wurden die Lysate im Western Blot mit dem anti-IR6- und dem anti-UL45-Seren analysiert. Das zur Klasse der  $\beta$ -Proteine gehörende IR6-Protein konnte trotz steigender Konzentrationen an PAA gleichbleibend detektiert werden. Die Expression des  $\gamma_2$ -Proteins pUL45 ließ sich durch die PAA-induzierte Hemmung der DNS-Synthese vollständig unterdrücken (Abb. 6).





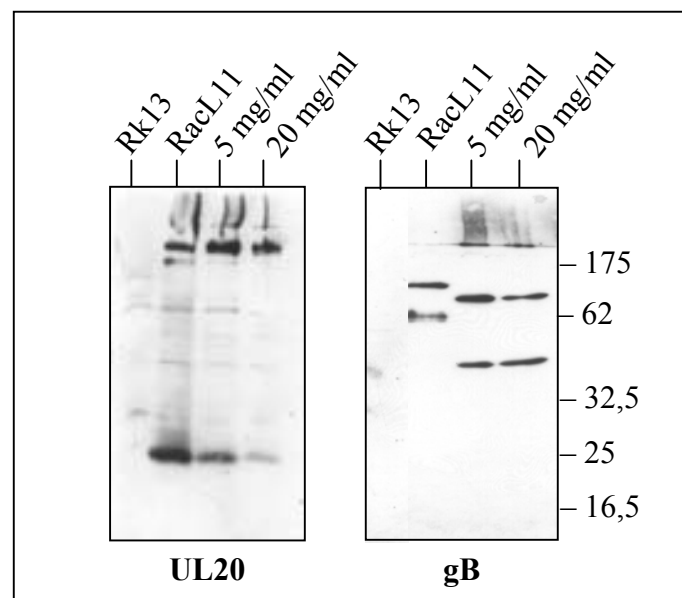
**Abbildung 5:** Expressionskinetik des UL20-Proteins: Zur Darstellung der Expressionskinetik des UL20-Produktes wurden RacL11- infizierte Rk13-Zellen 0, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 und 24 h p.i. lysiert und die Lysate im Western Blot untersucht. Der Nachweis des UL20-Proteins war ab 6 h p.i. möglich, das UL34-Protein erschien erstmals nach 5 h.



**Abbildung 6:** Klassifizierung des UL20-Proteins als  $\gamma_1$ -Protein: Die Expression des UL20-Proteins ließ sich durch steigende Konzentrationen (0,1, 0,5 und 1,0 mg/ml) des DNS-Synthese-Hemmers PAA im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle hemmen. Das IR6-Protein war konstant zu detektieren, die Expression des UL45-Proteins konnte bereits durch 0,1 mg PAA/ml Medium unterdrückt werden.

#### 4.1.3.2.4 Das UL20-Protein ist nicht glykosyliert

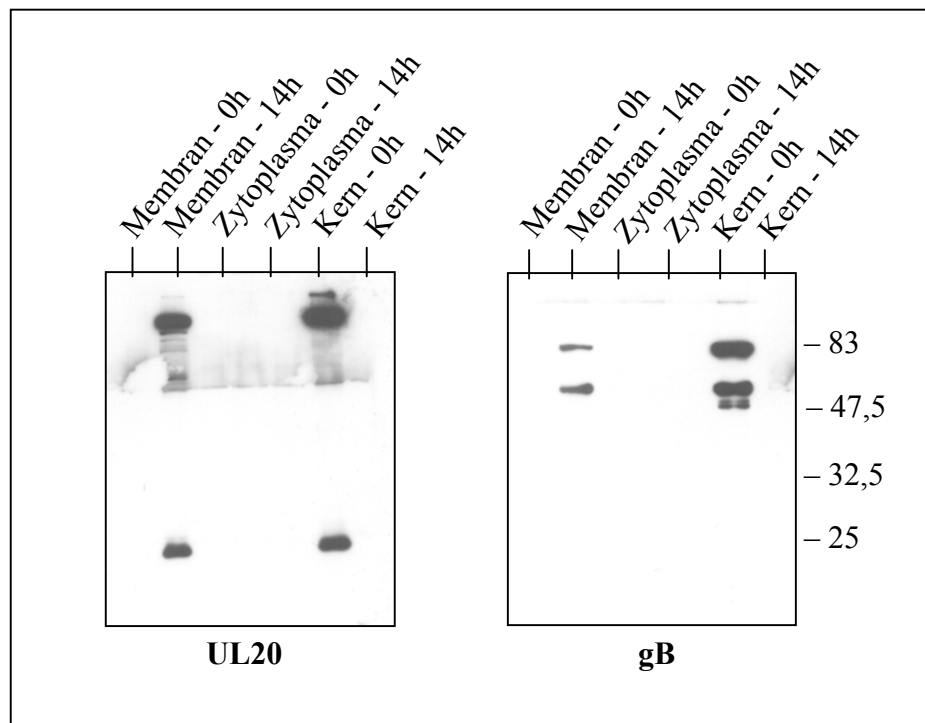
Auf der Nukleotidsequenz basierende Strukturvorhersagen für das UL20-Protein beinhalten auch die Vorhersage von zwei N-Glykosylierungsstellen. Zur Untersuchung einer möglichen Glykosylierung des UL20-Proteins wurden mit einer MOI von 2 (RacL11) infizierte Rk13-Zellen in Gegenwart verschiedener Konzentrationen (5,0 und 20,0 mg/ml Medium) Tunicamycin inkubiert. Tunicamycin hemmt die N-Glykosylierung von Proteinen im Endoplasmatischen Retikulum (ER). Dadurch erreichen die entsprechenden Proteine nicht ihr vollständiges Molekulargewicht und weisen veränderte Laufeigenschaften in der SDS-PAGE auf. Als Kontrollen dienten nicht infizierte Zellen und RacL11-infizierte Zellen ohne Zusatz von Tunicamycin. Die Zellen wurden 14 h p.i. lysiert und die Lysate im Western Blot analysiert. Das UL20-Protein konnte dabei unabhängig von der Tunicamycin-Konzentration mit gleichbleibender Größe detektiert werden. Die Lysate wurden parallel mit dem monoklonalen Antikörper 3F6, der das Glykoprotein B detektiert, untersucht. In diesem Fall war eine deutliche Reduktion des Molekulargewichtes der beiden Banden zu beobachten (Abb. 7).



**Abbildung 7: Glykosylierung des UL20-Proteins:** Die Laufeigenschaften des UL20-Proteins in der SDS-PAGE erfuhren durch Zusatz von Tunicamycin zu RacL11-infizierten Zellen keine Änderung. Der parallel zur Analyse der Lysate eingesetzte MAk 3F6, der das Glykoprotein B detektiert, reagierte hingegen mit zwei Banden mit veränderten Molekulargewichten.

#### 4.1.3.2.5 Das UL20-Protein ist membranassoziiert

Um die subzelluläre Lokalisation des UL20-Proteins zu untersuchen, wurden mit einer MOI von 2 (RacL11, 14 h) infizierte und nicht infizierte Rk13-Zellen wie unter 3.2.1.4 beschrieben in eine Membran-, Zytoplasma- und Kernfraktion zerlegt. Die Fraktionen wurden im Western Blot mit dem anti-UL20-Serum und dem MAk 3F6 analysiert. Wie aus Abbildung 8 hervorgeht, konnte das UL20-Protein, wie auch das integrale Membranglykoprotein B (gB), ausschließlich in der Hüll- und Kernfraktion nachgewiesen werden.

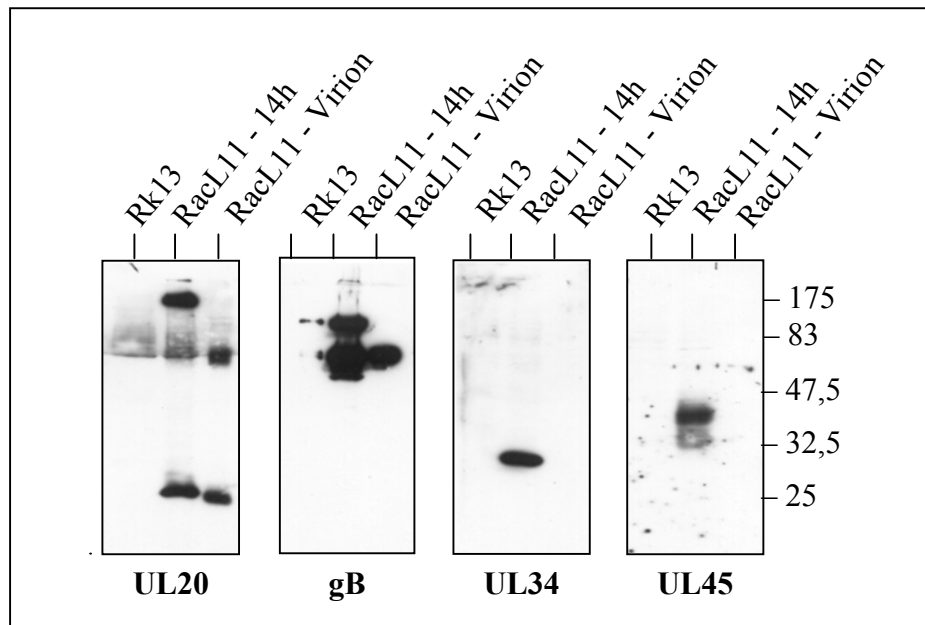


**Abbildung 8:** Membranassoziation des UL20-Proteins: Nach Auftrennung 0 h und 14 h p.i. lysierter Rk13-Zellen in drei Fraktionen, die die Membranen, die löslichen zytoplasmatischen Bestandteile und die Kerne enthielten, erschien das UL20-Protein, wie das Glykoprotein B, ausschließlich in der Membran- und Kernfraktion.

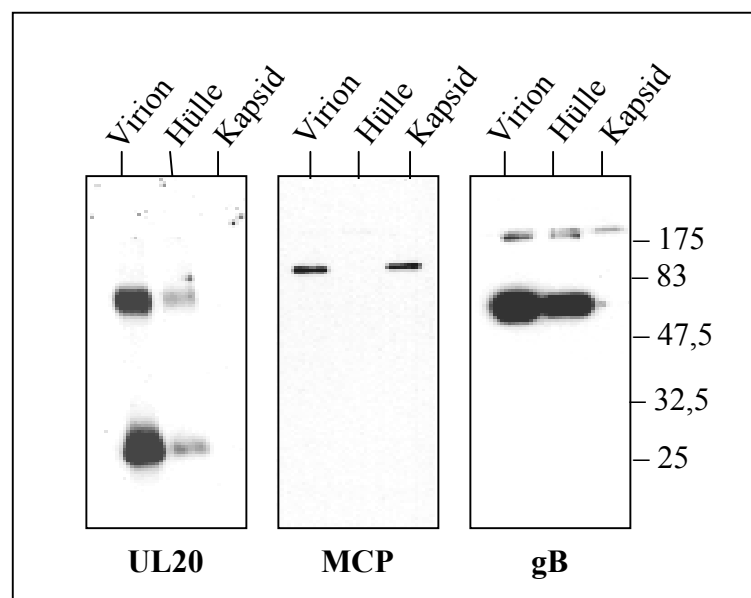
#### **4.1.3.2.6 Das UL20-Protein ist Bestandteil der Hülle extrazellulärer Virionen**

Zum Nachweis des UL20-Proteins in Virionen wurden Viruspartikel aus dem Überstand RacL11-infizierter Zellen aufgereinigt (s. 3.2.2.5) und zusammen mit Lysaten RacL11-infizierter Zellen im Western Blot untersucht. Neben dem anti-UL20-Serum und dem MAk 3F6 wurden die Antiseren der EHV-1-Proteine pUL34 und pUL45 zur Analyse der Lysate verwendet. Diese Proteine werden nicht in Virionen eingebaut und lassen somit einen Rückschluß auf die Reinheit der Virionenpräparation zu. Das UL20-Protein konnte, wie das Glykoprotein B, in den Virionen detektiert werden. Verunreinigungen der extrazellulären Virionen mit intrazellulären, viralen Proteinen konnten aufgrund des negativen Nachweises der Proteine pUL34 und pUL45 ausgeschlossen werden (Abb. 9).

Um die Lokalisation des UL20-Proteins innerhalb der Virionen zu untersuchen, wurden diese mit Hilfe des Detergens Triton X-100 in eine Hüll- und Kapsidfraktion zerlegt (s. 3.2.2.6) und die Fraktionen im Western Blot analysiert. Als Kontrollantikörper dienten der MAk 3F6, der das in der Virionenhülle lokalisierte gB detektiert, und der MAk ZB4, der das Hauptkapsidprotein MCP (Major Capsid Protein) nachweist. Das UL20-Protein wurde als Bestandteil der Virionenhülle identifiziert (Abb. 10).



**Abbildung 9:** Einbau des UL20-Proteins in Virionen: Das UL20-Protein konnte als Bestandteil extrazellulärer Virionen identifiziert werden. Als Kontrollantikörper dienten der MAk 3F6, der das Strukturprotein gB detektiert, und die polyklonalen anti-UL34- und anti-UL45-Seren.

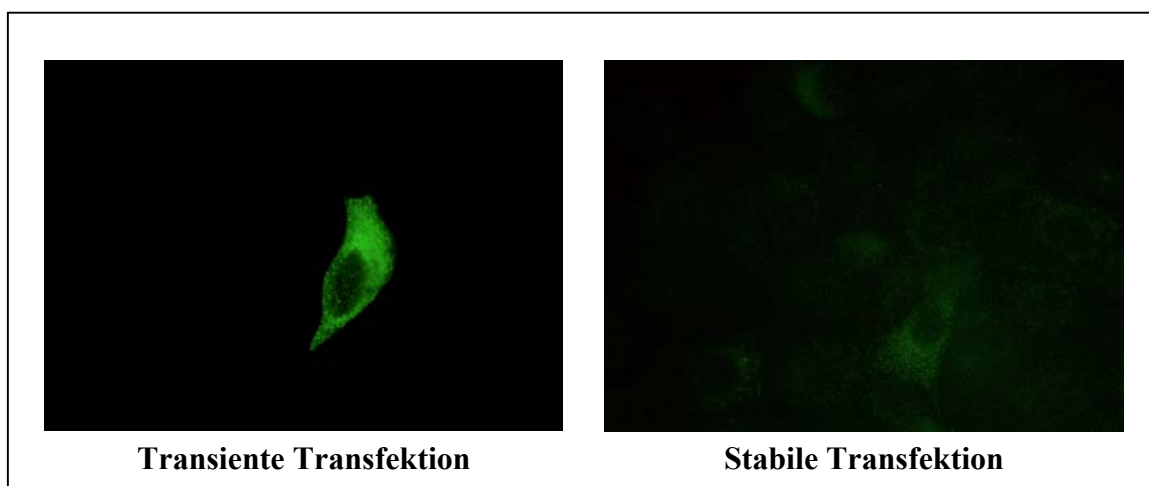


**Abbildung 10:** Lokalisation des UL20-Proteins in der Virionenhülle: Nach Auftrennung der Virionen in Hülle und Kapsid war das UL20-Protein, wie das Hüllglykoprotein B, ausschließlich in der Hüllfraktion zu finden. Das Hauptkapsidprotein MCP konnte nur in der Kapsidfraktion nachgewiesen werden.

#### 4.1.3.3 Das UL20-Protein in der indirekten Immunfluoreszenz

Die Lokalisation des UL20-Proteins in EHV-1-infizierten Zellen konnte nicht untersucht werden, da auch in mit der UL20-Deletionsmutante infizierten Rk13-Zellen mit dem gewonnenen anti-UL20-Serum eine spezifische Fluoreszenz zu beobachten war (nicht gezeigt). Wie aus Western Blot-Analysen ersichtlich, reagiert das Serum mit einem weiteren viralen Protein mit einer Größe von ca. 250 kDa.

In der Immunfluoreszenz transfizierter Zellen, in denen das UL20-Protein unabhängig von anderen viralen Proteinen exprimiert wird, konnte das Serum eingesetzt werden. Zur Untersuchung der zellulären Verteilung des Proteins nach transienter Transfektion wurden Rk13-Zellen mit dem Konstrukt pcDNA20 (Abb. 3) transfiziert. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mit Azeton fixiert und das UL20-Protein mit dem hergestellten anti-UL20-Serum detektiert. Dabei konnte eine punktförmige Fluoreszenz im gesamten Zytoplasma beobachtet werden, die eine Assoziation des Proteins mit zellulären Membranen belegt. Dasselbe Fluoreszenzmuster wurde nach Immunfluoreszenzfärbung der etablierten Zelllinie SC20, die das UL20-Protein stabil exprimiert, gefunden (Abb. 11).



**Abbildung 11:** Darstellung des UL20-Proteins in der indirekten Immunfluoreszenz: Nach Immunfluoreszenzfärbung sowohl transient als auch stabil transfizierter Rk13-Zellen konnte das UL20-Protein in Assoziation mit zellulären Membranen detektiert werden (anti-UL20-Serum 1:8000;  $\alpha$ -rabbit ALEXA 488 1:5000).

#### 4.1.4 Deletionsmutanten

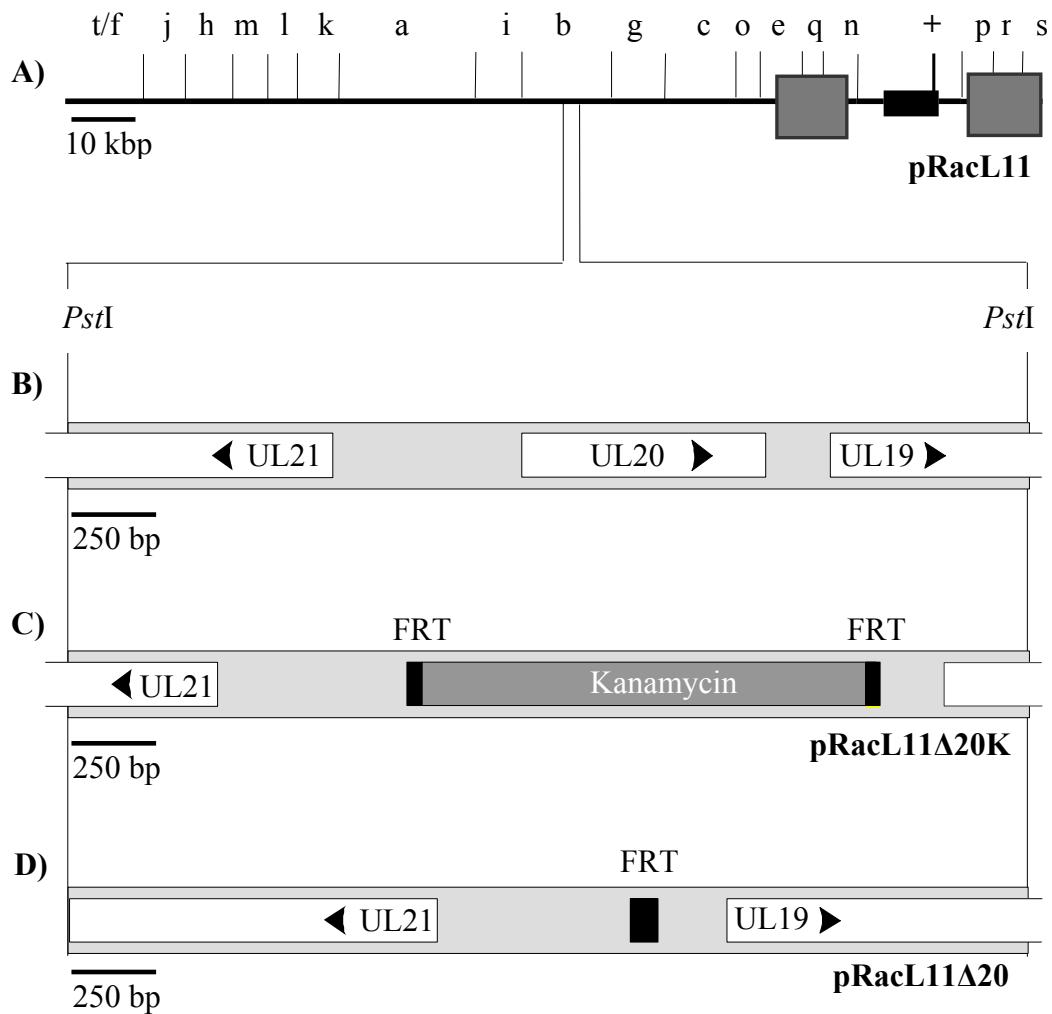
##### 4.1.4.1 Konstruktion UL20-negativer Mutanten der Stämme RacL11 und RacH (L11 $\Delta$ 20 und H $\Delta$ 20)

Zur funktionellen Charakterisierung des UL20-Proteins von EHV-1 wurden rekombinante Viren der Stämme RacL11 und RacH hergestellt. Der gesamte UL20-Leserahmen wurde dabei nach dem Prinzip der homologen Rekombination über BAC-Mutagenese deletiert (s. 3.2.4). Die entstandenen UL20-negativen Viren tragen die Bezeichnungen L11 $\Delta$ 20 und H $\Delta$ 20. In Abbildung 12 sind die einzelnen Schritte der Mutagenisierung des RacL11-Genoms in *E. coli* schematisch dargestellt.

##### 4.1.4.2 Konstruktion UL20-positiver Revertanten (L11 $\Delta$ 20Rev und H $\Delta$ 20Rev)

Um sicherzustellen, dass der bei den rekombinanten Viren L11 $\Delta$ 20 und H $\Delta$ 20 beobachtete Phänotyp nur auf die Deletion des UL20-Leserahmens und nicht auf andere, während der Mutagenese aufgetretene Veränderungen im Virusgenom, zurückzuführen ist, wurde die gesetzte Deletion wieder rückgängig gemacht und sog. „Revertanten“ hergestellt. Revertanten sind genetisch nicht von den Ausgangsviren zu unterscheiden und entstehen, wie auch rekombinante Viren, durch homologe Rekombination. Zur Herstellung der Revertanten L11 $\Delta$ 20Rev und H $\Delta$ 20Rev wurden Rk13-Zellen zunächst mit den Plasmiden pTL20 bzw. pTH20, die den jeweiligen UL20-Leserahmen mit flankierenden homologen Sequenzen enthalten, transfiziert. Die Überinfektion der transfizierten Zellen erfolgte mit den entsprechenden UL20-negativen Viren (L11 $\Delta$ 20 bzw. H $\Delta$ 20). Durch eine dreistufige Einzelplaqueisolierung, bei der auf „große“ Plaques selektiert wurde, wurden homogene Viruspopulationen erreicht.





**Abbildung 12:** Konstruktion der UL20-Deletionsmutanten über BAC-Mutagenese: (A) zeigt die *Bam*HI-Restriktionsfragmentkarte des RacL11-BACs. Die zusätzliche *Bam*HI-Schnittstelle in den eingefügten BAC-Sequenzen ist mit + gekennzeichnet. In (B) ist die Lage des UL20-ORFs und seiner benachbarten Leserahmen innerhalb des *Bam*HI-Fragmentes b dargestellt. (C) zeigt die Deletion des UL20-ORFs und die Insertion des Kanamycin-Resistenzgens und (D) den Genomabschnitt nach Elimination des Resistenzgens.

#### 4.1.4.3 Charakterisierung des Genotyps der Mutanten und Revertanten

Die Deletion der UL20-Leserahmen bzw. die korrekte Reinsertion der Sequenzen in die Genome der EHV-1-Stämme RacL11 und RacH wurde mittels Southern Blot überprüft. Der Genotyp der Deletionsmutanten L11 $\Delta$ 20 bzw. H $\Delta$ 20 und der Revertanten L11 $\Delta$ 20Rev bzw. H $\Delta$ 20Rev wurde dabei mit dem Genotyp der Ausgangsviren RacL11 und RacH verglichen. Dazu wurde die DNS der entsprechenden Viren isoliert und mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI, *Hind*III und *Sph*I gespalten. Die Fragmente wurden in einem 0,8 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und die DNS anhand des Gelbildes (Abb. 13, für RacL11 gezeigt) auf Mutationen überprüft. Spezifische Sequenzen wurden durch Hybridisierung der DNS mit einer Digoxigenin-markierten „UL20“-Sonde (Abb. 13, für RacL11 gezeigt) detektiert. Diese Sonde detektiert einen 2,8 kb großen Bereich um den UL20-Leserahmen und entspricht dem *Pst*I-Fragment aus dem Plasmid pTL20 (Abb. 3 und 12).

##### *Bam*HI

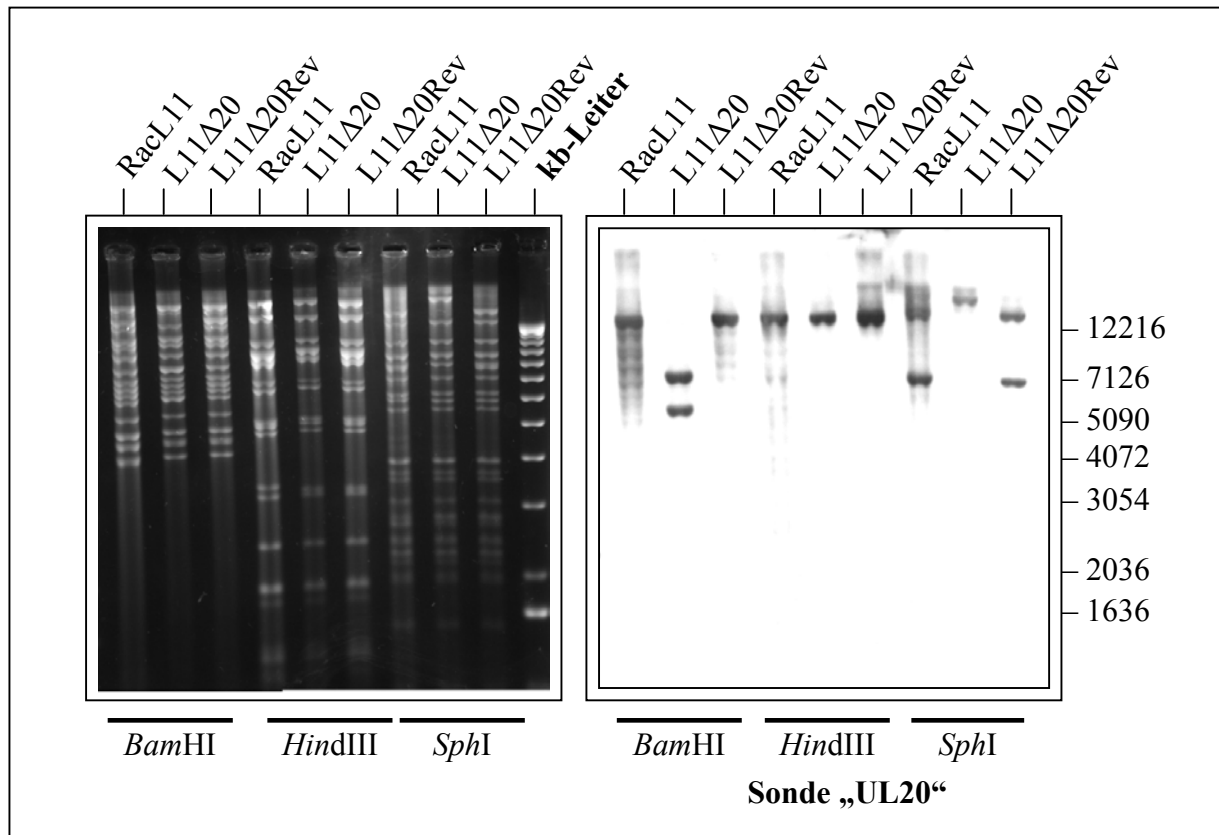
Im Fall der Ausgangsviren und Revertanten entstand nach *Bam*HI-Spaltung der viralen DNS ein 14998 bp großes Fragment, das mit der „UL20“-Sonde detektiert werden konnte. Da die nach FLP-vermittelter Exzision des Kanamycin-Resistenzgens verbleibenden Sequenzen (s. 3.2.4) eine zusätzliche *Bam*HI-Schnittstelle enthalten, hybridisierte die Sonde bei den Deletionsmutanten L11 $\Delta$ 20 bzw. H $\Delta$ 20 mit zwei Fragmenten mit Größen von 8048 bp und 6313 bp.

##### *Hind*III

Nach *Hind*III-Spaltung der viralen DNS der Ausgangsviren und Revertanten hybridisierte die Sonde mit einem, den UL20-Leserahmen enthaltenden, Fragment von 14788 bp Länge. Da die verbleibenden Sequenzen nach Deletion des UL20-ORFs eine Größe von 82 bp aufweisen, ist das bei den Deletionsmutanten L11 $\Delta$ 20 bzw. H $\Delta$ 20 detektierte Fragment um 637 bp kleiner, im Southern Blot aber nicht von dem der Elternviren und Revertanten zu unterscheiden

##### *Sph*I

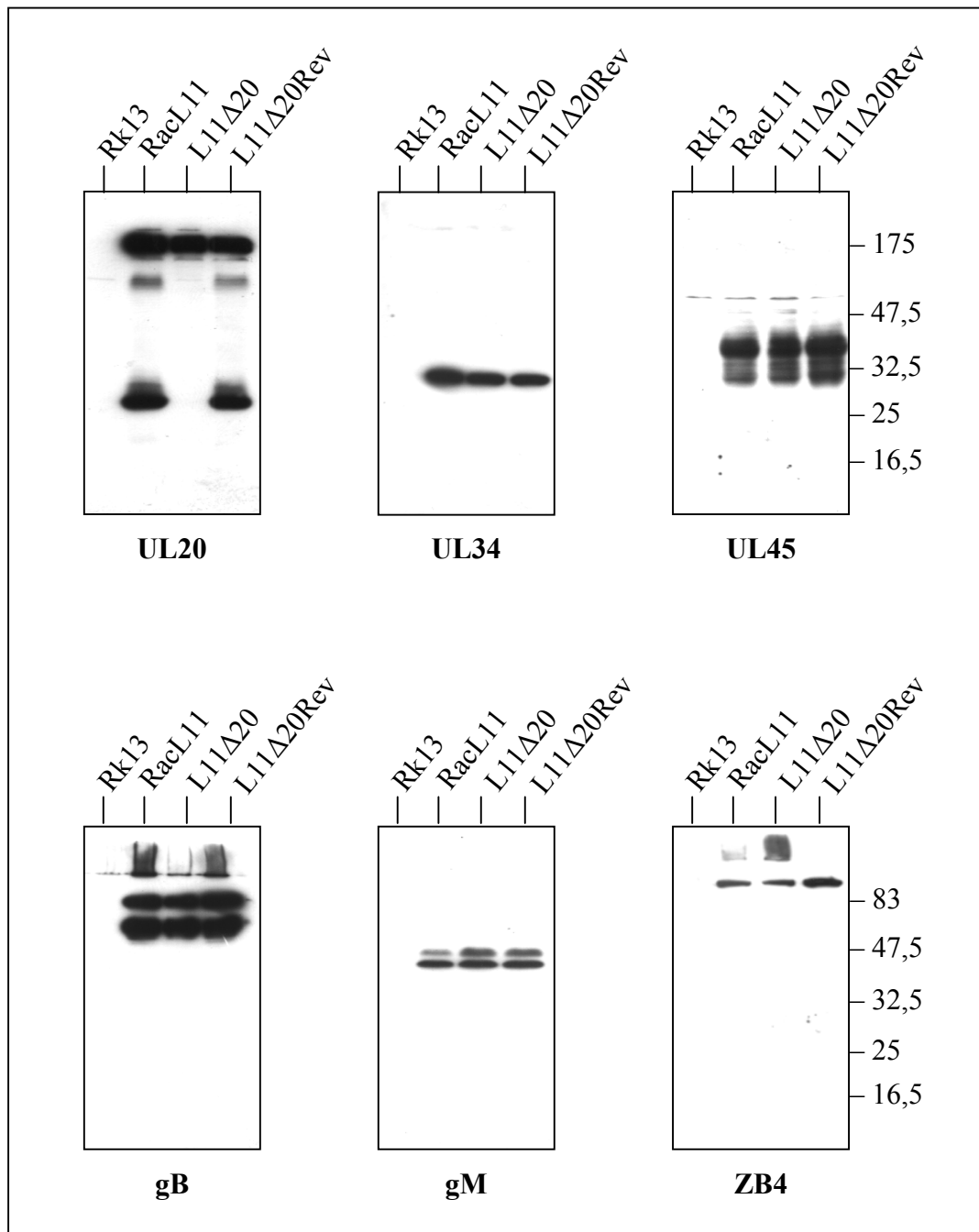
Der UL20-Leserahmen enthält eine *Sph*I-Schnittstelle. Dementsprechend konnten mit der „UL20“-Sonde im Fall der Ausgangsviren und Revertanten zwei Fragmente von 15949 bp und 7767 bp Länge detektiert werden. Bei den Deletionsmutanten entfällt diese Schnittstelle und die Sonde hybridisierte mit nur einem 23716 bp großen Fragment.



**Abbildung 13:** Agarosegel- und Southern Blot-Analyse der DNS der UL20-Deletionsmutante und -Revertante des EHV-1-Stammes RacL11: Zum Nachweis der korrekten Deletion und Reinsertion der Sequenzen des UL20-Leserahmens wurden die Genotypen der Deletionsmutanten und Revertanten im Agarosegel und Southern Blot analysiert. Die Untersuchung erfolgte nach Verdau der viralen DNS mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI, *Hind*III und *Sph*I unter Verwendung der „UL20“-Sonde. Der Größenstandard ist in bp angegeben.

#### 4.1.4.4 Darstellung der Mutanten und Revertanten im Western Blot

Die fehlende Expression des UL20-Proteins in den Deletionsmutanten bzw. die Restaurierung der Expression in den Revertanten wurde im Western Blot nachgewiesen. Dazu wurden mit den Elternviren (RacL11 und RacH), Mutanten (L11 $\Delta$ 20 und H $\Delta$ 20) und Revertanten (L11 $\Delta$ 20Rev und H $\Delta$ 20Rev) infizierte Rk13-Zellen 14 h p.i. lysiert und mit dem anti-UL20-Serum analysiert. Um zu zeigen, dass die Deletion des UL20-Leserahmens keinen Einfluss auf die Expression anderer später viraler Proteine hat, wurden die Lysate parallel auf die Expression der EHV-1-Proteine gB, gM, UL34, UL45 und MCP, dem Produkt des dem UL20-Leserahmen benachbarten UL19-Gens, untersucht (Abb. 14, für RacL11 gezeigt).



**Abbildung 14:** Western Blot-Analyse der UL20-Deletionsmutanten und -Revertanten: Um die Proteinexpression in den Deletionsmutanten und Revertanten im Vergleich zu den Ausgangsviren darzustellen, wurden Lysate infizierter Rk13-Zellen im Western Blot analysiert. Zur Untersuchung der Lysate dienten das anti-UL20-Serum, die monoklonalen Antikörper gegen das virale Glykoprotein B und das Hauptkapsidprotein MCP und die Antiseren gegen die EHV-1-Proteine pUL34-, pUL45 und gM.

#### 4.1.4.5 Charakterisierung von L11 $\Delta$ 20, H $\Delta$ 20, L11 $\Delta$ 20Rev und H $\Delta$ 20Rev in Zellkultur

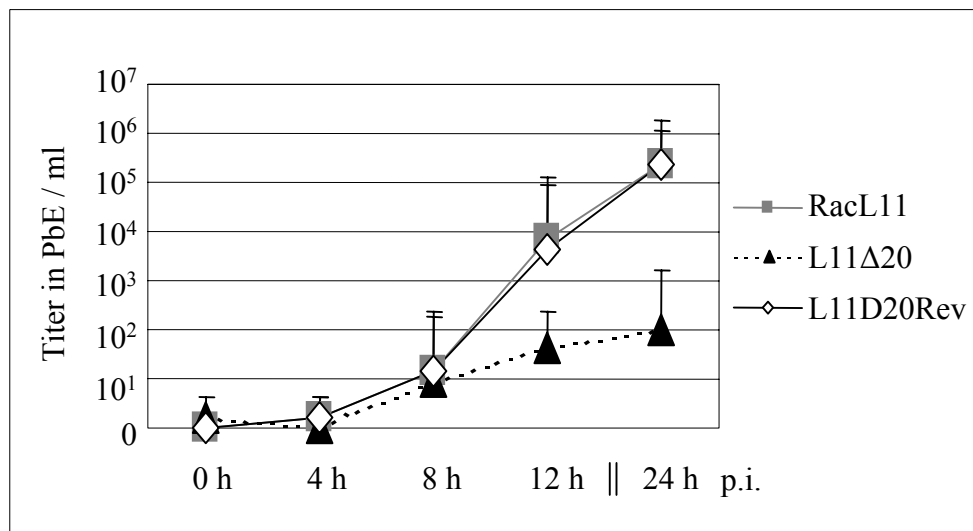
##### 4.1.4.5.1 Einschnitt-Wachstumskinetik

Zur Untersuchung der Replikationseigenschaften des rekombinanten Virus L11 $\Delta$ 20 wurden Einschnitt-Wachstumskinetiken (s. 3.2.5.1) durchgeführt. Dabei wurde die Replikationseffizienz der Deletionsmutante und der konstruierten Revertante L11 $\Delta$ 20Rev mit der des Ausgangsvirus RacL11 verglichen. Konfluente Rk13-Zellen wurden mit den zu untersuchenden Viren infiziert und die in den Überständen und Zellen enthaltene Infektiosität 0, 4, 8, 12 und 24 h p.i. getrennt bestimmt.

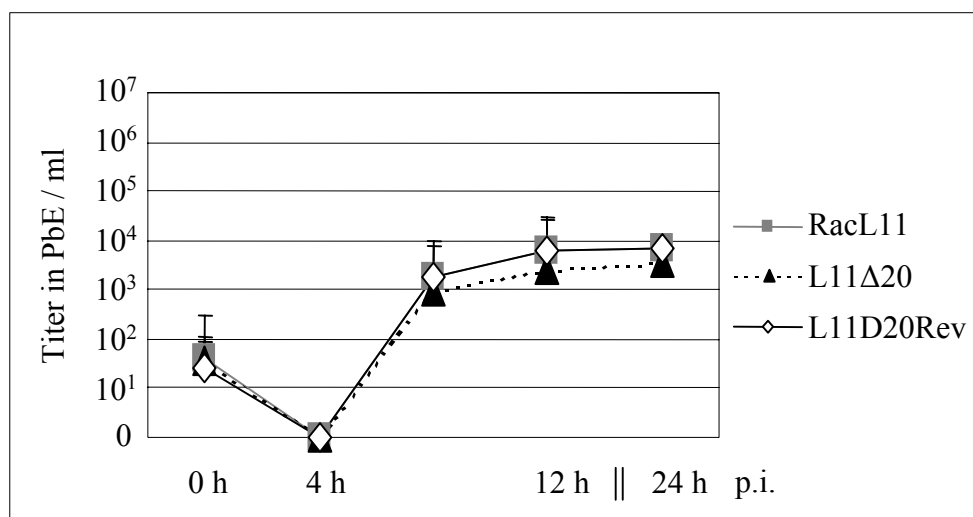
Bis 8 h p.i. führte die Deletionsmutante sowohl extra- als auch intrazellulär zu nahezu identischen Titern wie das Ausgangsvirus und die Revertante. Während intrazellulär ab 8 h p.i. nur um etwa das 3fache reduzierte Titer des UL20-deletierten Virus L11 $\Delta$ 20 festzustellen waren, waren die extrazellulären Titer der Deletionsmutante 12 h p.i. etwa um das 100fache und 24 h p.i. um das 1000fache erniedrigt. Die Titer von Revertante und Ausgangsvirus waren über den gesamten Zeitraum sowohl extra- als auch intrazellulär nicht zu unterscheiden (Abb. 15).

##### 4.1.4.5.2 Plaquephänotyp

Um einen möglichen Einfluss der Deletion des UL20-ORFs auf die Virus-Plaquesgröße in Zellkultur zu untersuchen, wurden Rk13-Zellen mit den Deletionsmutanten sowie den entsprechenden Ausgangsviren und Revertanten mit 50 PbE/Loch einer 6-Loch-Platte infiziert. Die Zellen wurden für 3 Tage unter Methylzellulose gehalten und der Plaquephänotyp der verschiedenen Viren anschließend ausgewertet. Da die rekombinanten Viren L11 $\Delta$ 20 und H $\Delta$ 20 nur zu sehr kleinen, aus wenigen infizierten Zellen bestehenden Plaques führten (Abb. 16), wurde auf eine Messung der Plaquesgrößen wie unter 3.2.5.2 beschrieben, verzichtet. Die Dokumentation des Plaquephänotyps erfolgte nach Immunfluoreszenzfärbung mit dem MAk 4B6. Wie aus Abbildung 16 hervorgeht, waren die von den Revertanten L11 $\Delta$ 20Rev und H $\Delta$ 20Rev gebildeten Plaques phänotypisch nicht von denen der entsprechenden Ausgangsviren zu unterscheiden.

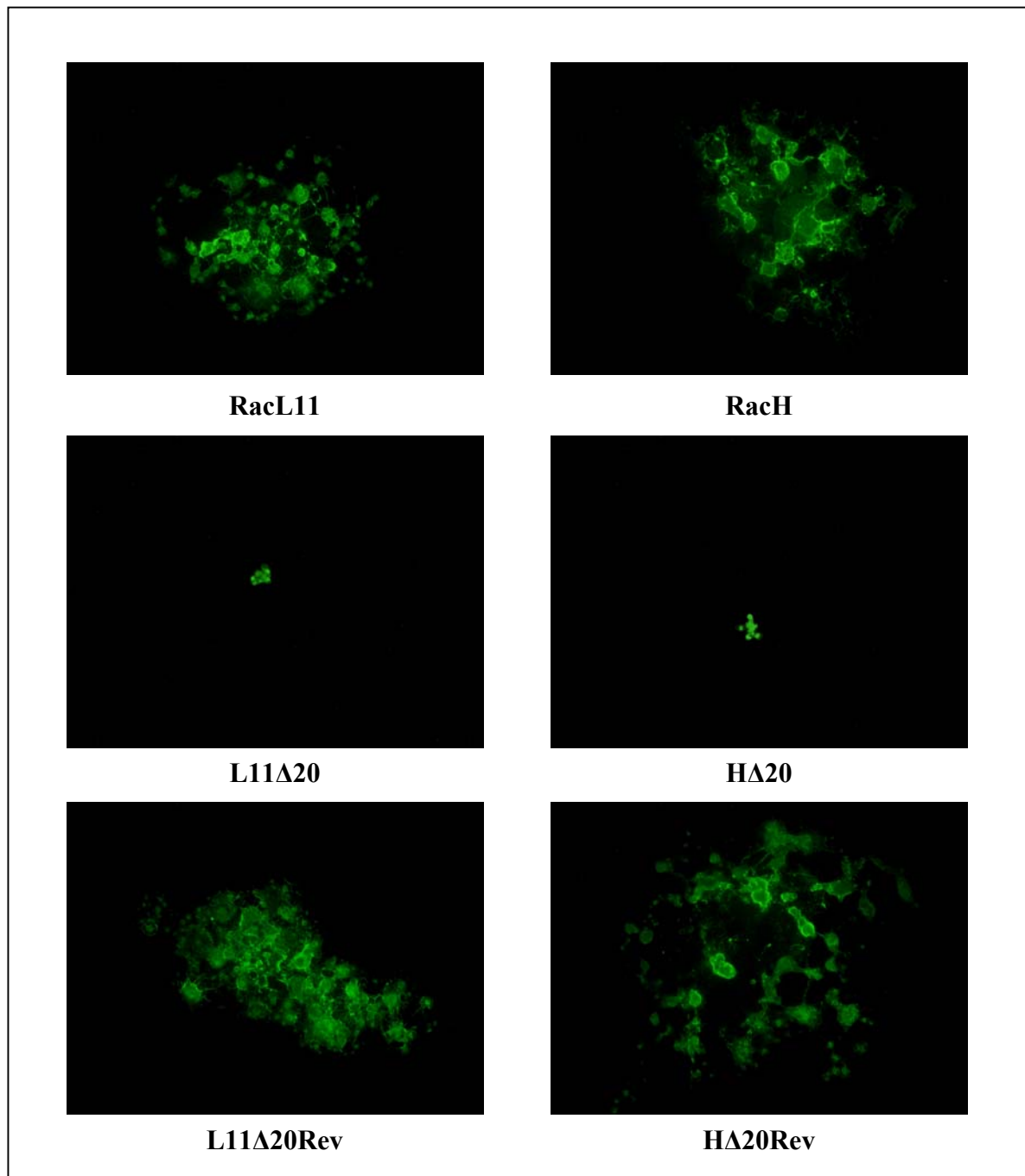


### Extrazelluläre Infektiosität



### Intrazelluläre Infektiosität

**Abbildung 15:** Replikation der Deletionsmutante L11Δ20 in Rk13-Zellen: Um einen möglichen Einfluss der Deletion des UL20-Leserahmens auf die Replikationseigenschaften von EHV-1 zu untersuchen, wurden Einschnitt-Wachstumskinetiken durchgeführt. Die UL20-Deletionsmutante des Stammes RacL11 führte dabei intrazellulär zu nahezu identischen Titern wie das Ausgangsvirus und die Revertante. Extrazellulär waren die Titer jedoch bis zu 1000fach erniedrigt. Die Titer der Revertante waren über den gesamten Zeitraum nicht von denen des Ausgangsvirus zu unterscheiden. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt.



**Abbildung 16:** Plauephänotyp der UL20-Deletionsmutanten im Vergleich zu den Ausgangsviren und Revertanten: Der Plauephänotyp der Deletionsmutanten L11Δ20 und HΔ20 im Vergleich zu den Ausgangsviren RacL11 und RacH und den Revertanten L11Δ20Rev und HΔ20Rev konnte nach Immunfluoreszenzfärbung mit dem MAk 4B6, der das virale Glykoprotein B detektiert, dargestellt werden (Axiovert: 100fache Vergrößerung, MAk 4B6 1:50,  $\alpha$ -mouse ALEXA 488 1:2000).

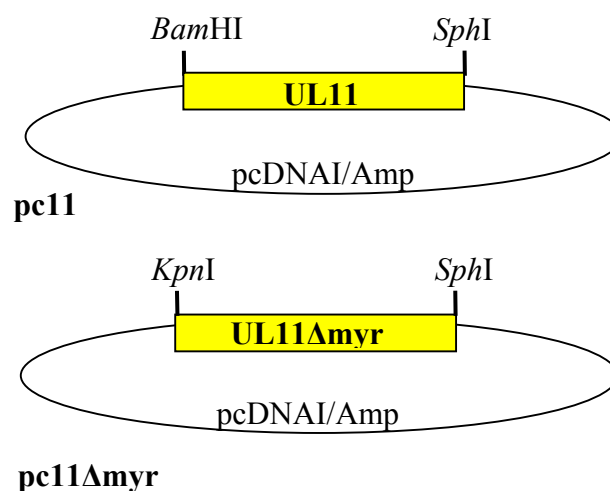
## 4.2 UL11

### 4.2.1 Untersuchung der Myristylierung des UL11-Proteins

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Bedeutung der Myristylierung für die Funktion des UL11-Proteins geklärt werden. Bei dieser Modifikation wird die gesättigte Fettsäure Myristinsäure kotranslational über eine Amidbindung an einen auf die initiale Aminosäure Methionin folgenden Glycinrest (Glycin 2) gehängt. Die Myristylierung musste zunächst nachgewiesen werden. Zur strukturellen und funktionellen Untersuchung der Myristylierung wurden die Plasmide pc11 und pc11 $\Delta$ myr (Abb. 17) verwendet.

Das Plasmid pc11 enthält den gesamten, 225 bp großen, UL11-Leserahmen unter Kontrolle eines CMV-Promotors und dient der Expression des UL11-Proteins nach Transfektion eukaryotischer Zellen. Es entstand durch Einfügen der UL11-spezifischen Sequenzen in den Vektor pcDNA1/Amp über die Restriktionsenzymchnittstellen *Bam*HI und *Sph*I.

Für die Herstellung des Konstruktes pc11 $\Delta$ myr, das nach Transfektion eukaryotischer Zellen ein nicht-myristyliertes UL11-Protein exprimiert, wurde die Myristylierungssequenz des UL11-ORFs mittels PCR deletiert (Glycin 2 zu Alanin) und das PCR-Produkt über die Restriktionsenzymchnittstellen *Kpn*I und *Sph*I in den Vektor pcDNA1/Amp eingefügt. Die korrekte Mutation in der Basensequenz wurde durch Sequenzierung (Fa. MWG Biotech, Ebersberg) überprüft.



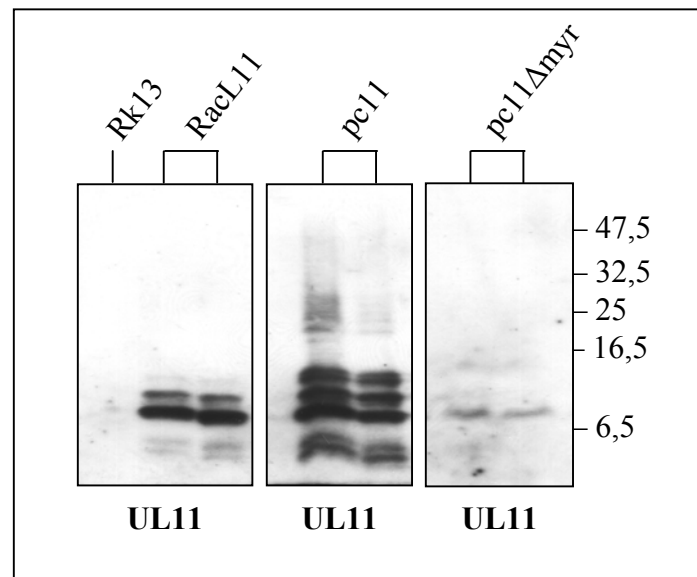
**Abbildung 17:** Darstellung der verwendeten Plasmide



## Western Blot

Das UL11-Protein von EHV-1 kann im Western Blot mittels eines in Kaninchen hergestellten Antiserums detektiert werden. Dieses polyklonale anti-UL11-Serum reagiert dabei mit Lysaten infizierter Rk13-Zellen in Form von 5 Banden mit apparenten Molekulargewichten zwischen 7 und 12 kDa, wobei die stärkste Reaktion mit einem ca. 11 kDa großen Protein zu beobachten ist (SCHIMMER und NEUBAUER, 2003). Nach der Sequenz ist für das aus 75 Aminosäuren bestehende UL11-Protein ein Molekulargewicht von 8,4 kDa zu erwarten. Die Abweichung in den Laufeigenschaften könnte durch eine Modifikation des Proteins durch Myristylierung erklärt werden (SCHIMMER, 2002).

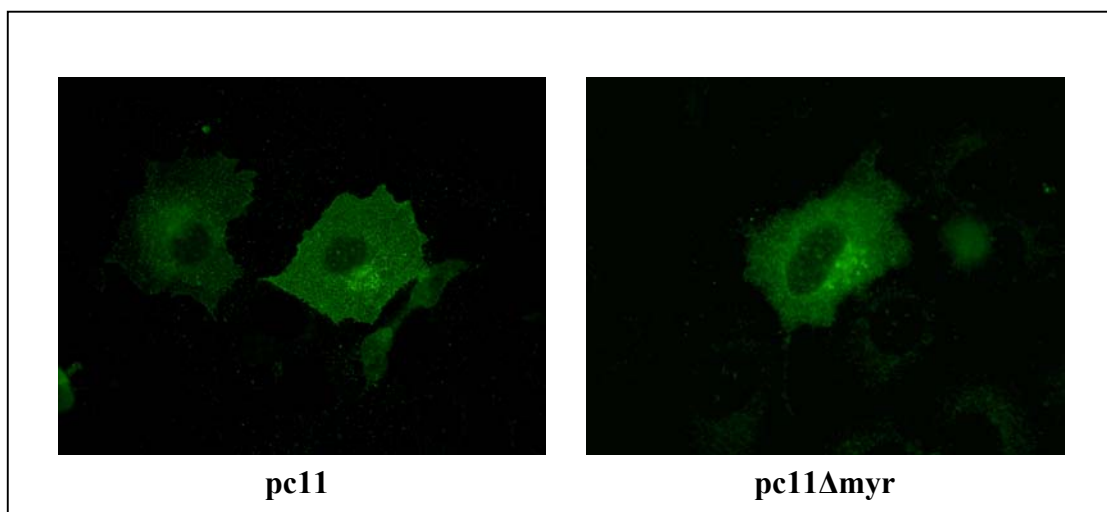
Zunächst sollte untersucht werden, ob das Serum in Lysaten transfizierter Zellen dieselben 5 Proteinbanden detektiert wie in Lysaten infizierter Zellen. Dazu wurden Rk13-Zellen parallel mit RacL11 infiziert bzw. mit dem Plasmid pc11 transfiziert. Die Zellen wurden nach 14 Stunden bzw. 3 Tagen lysiert und die Lysate im Western Blot analysiert. Wie aus Abbildung 18 ersichtlich, waren keine Abweichungen im Bandenmuster festzustellen. Die Bande des größten der fünf Polypeptide war im Fall der transfizierten Zellen jedoch stärker. Um zu untersuchen, ob es sich bei einer der 5 Banden im Western Blot um eine myristylierte Form des UL11-Proteins handelt, wurden Rk13-Zellen mit dem Konstrukt pc11 $\Delta$ myr transfiziert, lysiert und die Lysate unter Verwendung des anti-UL11-Serums im Western Blot analysiert. Dabei reagierte das Serum nur in Form einer schwachen Bande mit apparentem Molekulargewicht von 11 kDa (Abb. 18). Die Expression war jedoch um ein Vielfaches schwächer, so dass weitere Banden im Gel nicht ausgeschlossen werden konnten.



**Abbildung 18:** Western Blot-Analyse der Myristylierung des UL11-Proteins: Zum Vergleich der durch das anti-UL11-Serum im Western Blot detektierten Proteinbanden wurden Lysate RacL11-infizierter bzw. mit den Konstrukten pc11 und pc11Δmyr transfizierter Rk13-Zellen untersucht. Im Fall der infizierten und pc11-transfizierten Zellen reagierte das Serum in Form von fünf Banden mit apparenten Molekulargewichten zwischen 7 und 12 kDa. In den Lysaten pc11Δmyr-transfizierter Zellen konnte dagegen nur ein ca. 11 kDa großes Protein detektiert werden. Die Expression des nicht-myristylierten Proteins war jedoch um ein Vielfaches schwächer.

### Indirekte Immunfluoreszenz

Hypothese dieser Arbeit war, dass die Myristylierung für die Membranbindung des UL11-Proteins von Bedeutung ist. Die gesättigte C14-Kohlenwasserstoffkette der Myristinsäure soll dabei eine Interaktion des Proteins mit den geordneten Lipid-Domänen von Lipid Rafts ermöglichen. In diesem Zusammenhang schien es interessant, die zelluläre Verteilung von myristylierten und nicht-myristylierten UL11-Proteinen zu vergleichen. Dazu wurden Rk13-Zellen mit den Konstrukten pc11 bzw. pc11 $\Delta$ myr transfiziert und 72 h nach der Transfektion mit Azeton fixiert. Nach Immunfluoreszenzfärbung der Zellen mit dem anti-UL11-Serum konnten keine Unterschiede in der Lokalisation des UL11-Proteins festgestellt werden. In beiden Fällen war das Protein im Bereich des Golgi-Apparates und in zellulären Membranen zu finden (Abb. 19).



**Abbildung 19:** Immunfluoreszenz-Analyse der Myristylierung des UL11-Proteins: Um die zelluläre Verteilung myristylierter und nicht-myristylierter UL11-Proteine zu vergleichen, wurden Rk13-Zellen mit den Plasmiden pc11 bzw. pc11 $\Delta$ myr transfiziert. Nach Immunfluoreszenzfärbung der Zellen konnte kein abweichendes Fluoreszenzmuster festgestellt werden. Die Fluoreszenz deutete auf eine zellmembran-assoziierte Lokalisation der UL11-Proteine vor allem im Bereich des Golgi-Apparates hin (anti-UL11-Serum 1:400,  $\alpha$ -rabbit ALEXA 488 1:3000).

## 4.2.2 Funktion des UL11-Proteins im „viral egress“ und „cell-to-cell-spread“

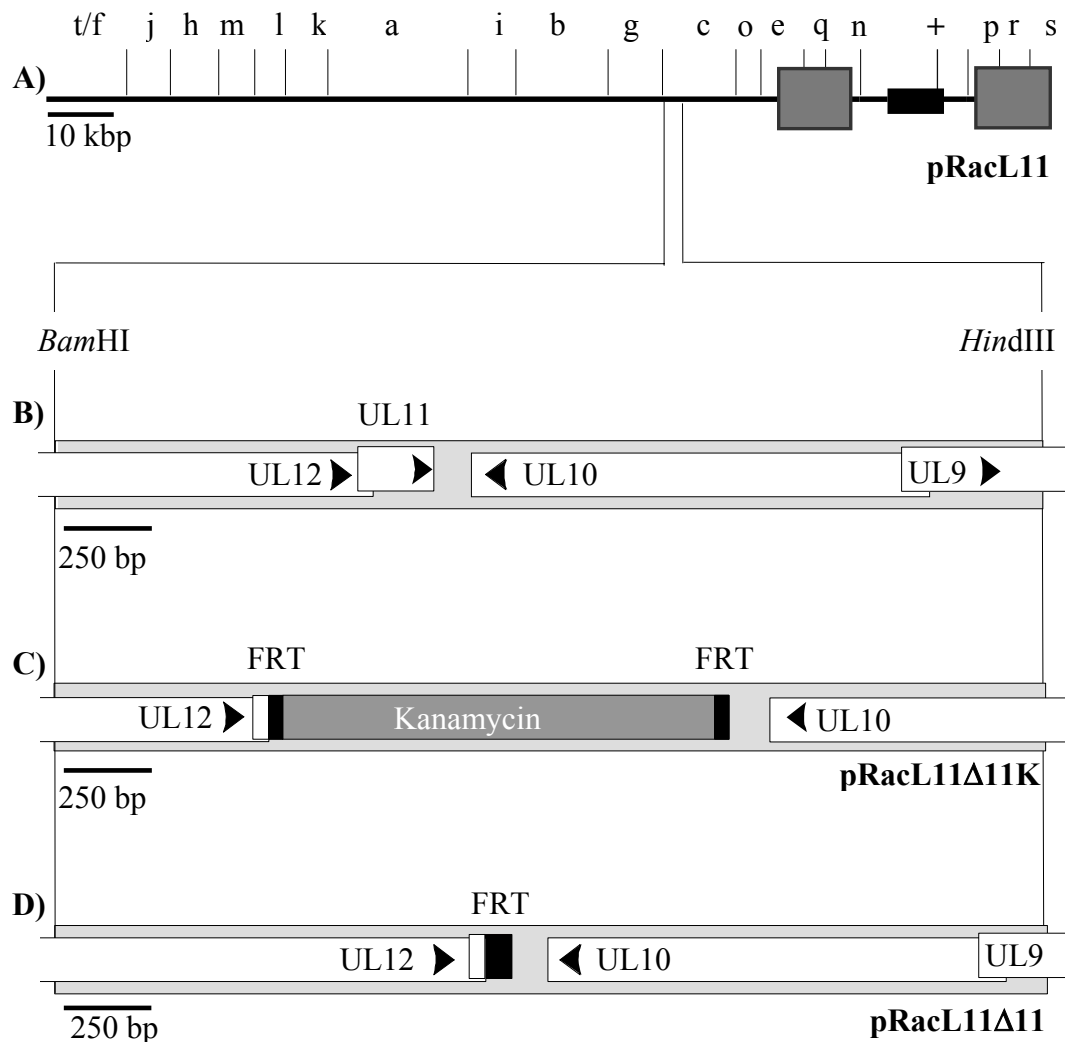
Erste Untersuchungen zur Bedeutung des UL11-Proteins im Replikationszyklus von EHV-1 wurden mit einer Deletionsmutante des Stammes RacL22 (L22 $\Delta$ 11) durchgeführt und weisen auf eine Funktion beim Weg der Nachkommenviren aus der infizierten Zelle („viral egress“) und insbesondere bei der Ausbreitung der Infektion direkt von Zelle zu Zelle („cell-to-cell-spread“) hin (SCHIMMER und NEUBAUER, 2003). Um die Rolle des UL11-Proteins besser einordnen zu können, sollten die Auswirkungen der Deletion der UL11-spezifischen Sequenzen vor dem genetischen Hintergrund verschiedener EHV-1-Isolate bzw. -Stämme untersucht werden. Dazu wurden UL11-negative Viren der EHV-1-Stämme RacL11 und KyA hergestellt. Der Stamm KyA weist in seinem Genom unter anderem Defekte in den für gE und gI kodierenden Genen auf. Diese Glykoproteine spielen eine wichtige Rolle beim „cell-to-cell-spread“ (s. 2.1.8.3). Eine UL11- und UL49-deletierte Doppelmutante des Stammes RacL11 wurde hergestellt, um auf eine mögliche Interaktion des UL11-Proteins mit dem Tegumentprotein UL49, für das auch eine Funktion beim „cell-to-cell-spread“ angenommen wurde, Rückschlüsse ziehen zu können.

Das rekombinante, nicht über BAC-Mutagenese hergestellte Virus L22 $\Delta$ 11, das anstelle der UL11-Sequenzen eine *LacZ*-Kassette enthält (nicht gezeigt) wurde von C. Schimmer zur Verfügung gestellt. Die Vermehrung der UL11-negativen Viren erfolgte auf der für das Protein komplementierenden, bereits etablierten, Zelllinie 51D3.

### 4.2.2.1 UL11-Deletionsmutanten der Stämme RacL11 und KyA (L11 $\Delta$ 11 und KyA $\Delta$ 11)

#### 4.2.2.1.1 Konstruktion

Um die Funktion des UL11-Proteins im „viral egress“ und „cell-to-cell-spread“ von EHV-1 näher zu definieren, wurden Deletionsmutanten der Stämme RacL11 und KyA, wie unter 3.2.4 beschrieben, über pKD46-vermittelte homologe Rekombination in *E. coli* hergestellt. Dabei wurde, um die Transkriptionseinheit des mit dem UL11-ORF überlappenden UL12-Gens zu wahren, nicht der komplette UL11-Leserahmen deletiert. Die entstandenen rekombinanten Viren werden im weiteren als L11 $\Delta$ 11 und KyA $\Delta$ 11 bezeichnet. Abbildung 20 zeigt die BAC-Mutagenese am Beispiel von RacL11.



**Abbildung 20:** Konstruktion der UL11-Deletionsmutanten über BAC-Mutagenese: In (A) ist die *Bam*HI-Restriktionsfragmentkarte des pRacL11 dargestellt. Die in den BAC-Sequenzen enthaltene *Bam*HI-Schnittstelle ist mit + gekennzeichnet. Das durch *Hind*III verkürzte *Bam*HI-Fragment c umfasst die offenen Leserahmen UL11 und UL10, sowie Teile der ORFs UL12 und UL9 (B). (C) zeigt den Genomabschnitt nach Deletion des Großteils der UL11-spezifischen Sequenzen und Insertion des Kanamycin-Resistenzgens. Aus (D) ist die Position der nach Exzision des Resistenzgens verbleibenden Fremdsequenz ersichtlich.

#### 4.2.2.1.2 Charakterisierung des Genotyps

Zum Nachweis der korrekten Deletion des Großteils der UL11-Sequenzen wurden Southern Blot-Analysen durchgeführt. Dazu wurde die DNS der Deletionsmutanten und entsprechenden Elternviren isoliert, mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III und *Bg*III gespalten und die entstandenen Fragmente im Agarosegel aufgetrennt. Die DNS wurde anhand des Gelbildes (Abb. 21, für *Rac*L11 gezeigt) auf Mutationen überprüft. Spezifische Sequenzen wurden durch Hybridisierung der DNS mit der Sonde „pXuBaxBH“, die mit DNS-Fragmenten eines ca. 2,8 kb großen Bereiches um den UL11-Leserahmen hybridisiert, detektiert.

Abbildung 21 zeigt den Genotyp des rekombinanten Virus L11 $\Delta$ 11 im Vergleich zu dem Ausgangsvirus *Rac*L11. Die Charakterisierung der Deletionsmutante *KyA* $\Delta$ 11 mittels Southern Blot führte zu analogen Ergebnissen und ist deshalb nicht dargestellt.

##### *Bam*HI

Nach *Bam*HI-Spaltung der viralen DNS konnte im Fall der Ausgangsviren ein 11166 bp großes Fragment detektiert werden. Bei den Deletionsmutanten L11 $\Delta$ 11 und *KyA* $\Delta$ 11 hybridisierte die „pXuBaxBH“-Sonde aufgrund einer zusätzlichen *Bam*HI-Schnittstelle in den, nach Exzision des Kanamycin-Resistenzgens, verbleibenden Sequenzen mit zwei Fragmenten von 10062 bp und 961 bp Länge. Die stärkere Reaktion der Sonde mit dem kleineren Fragment ist durch den größeren Anteil des hybridisierten Bereiches zu erklären.

##### *Eco*RI

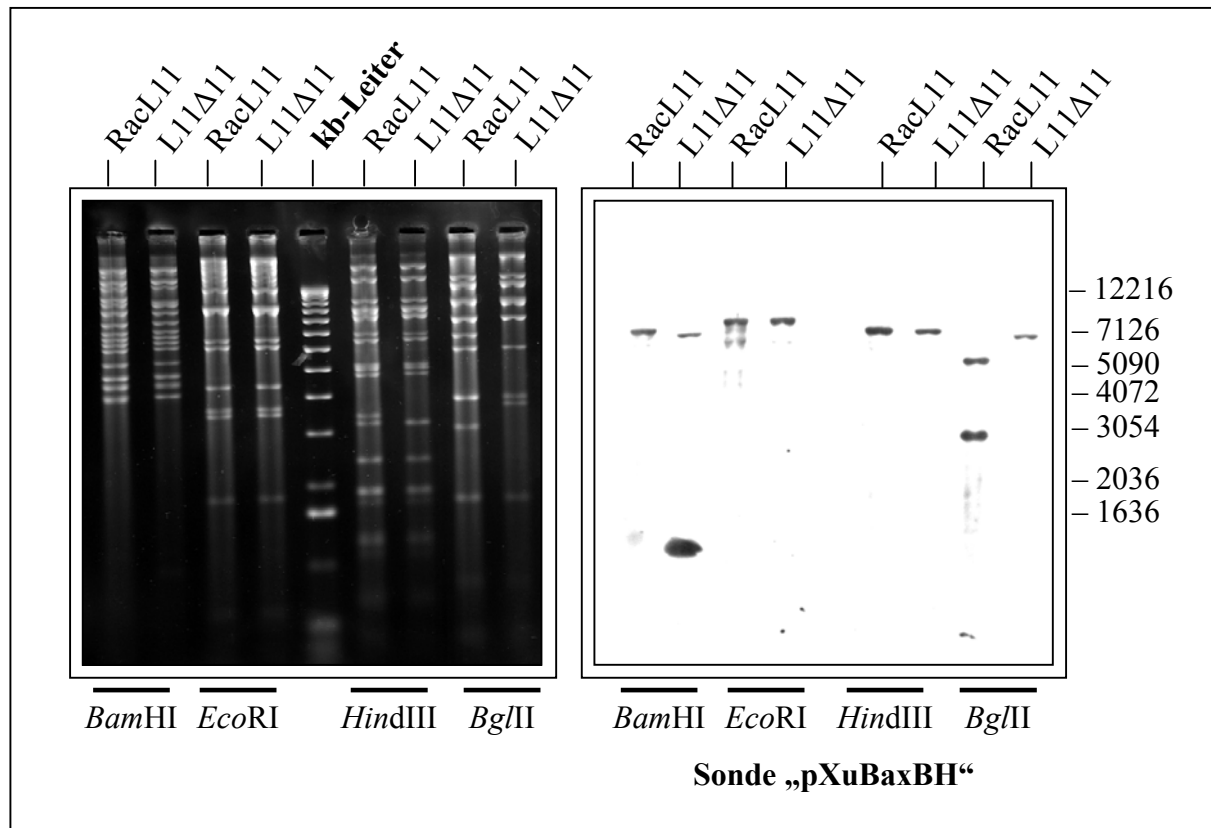
Bei den Elternviren *Rac*L11 und *KyA* konnte nach *Eco*RI-Verdau der DNS ein Fragment mit 12680 bp detektiert werden. Im Fall der Deletionsmutanten ist dieses Fragment um 80 bp kleiner.

##### *Hind*III

Auch nach *Hind*III-Spaltung der viralen DNS der Ausgangsviren und Deletionsmutanten waren die mit der Sonde hybridisierten Bereiche im Southern Blot nicht zu unterscheiden. Die Fragmente wiesen eine Größe von 10199 bp bzw. 10119 bp auf.

##### *Bg*III

Da die UL11-spezifischen Sequenzen eine *Bg*III-Schnittstelle enthalten, hybridisierte die „pXuBaxBH“-Sonde im Fall der Elternviren mit zwei Fragmenten mit Größen von 6734 bp und 3072 bp. Bei den Deletionsmutanten entfällt diese Schnittstelle und die Sonde detektierte nur ein 9806 bp großes Fragment.

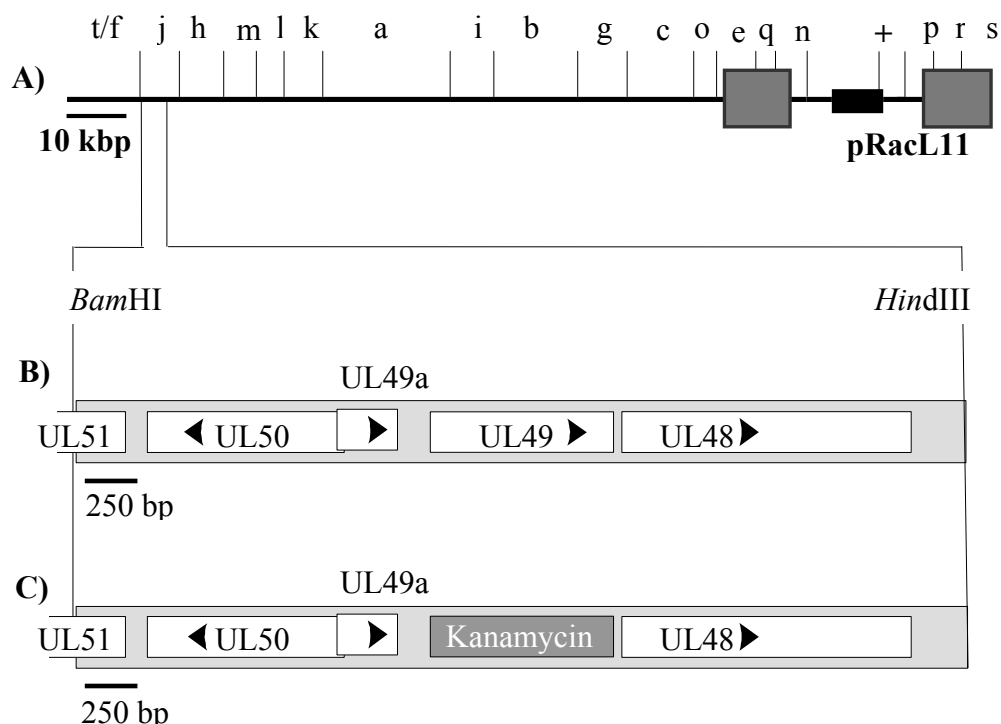


**Abbildung 21:** Agarosegel- und Southern Blot-Analyse des Genotyps der UL11-Deletionsmutante des EHV-1-Stammes *RacL11*: Die korrekte Deletion der UL11-spezifischen Sequenzen wurde im Gelbild beurteilt und mittels Southern Blot überprüft. Nach Spaltung der viralen DNS mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III und *Bg*II wurde der Genotyp durch Hybridisierung mit der “*pXuBaxBH*”-Sonde analysiert.

## 4.2.2.2 UL49-Deletionsmutante des Stammes RacL11 (L11Δ49)

### 4.2.2.2.1 Konstruktion

Das UL49-negative Virus des EHV-1-Stammes RacL11 wurde generiert, um den Phänotyp der Doppelmutante RacL11Δ49Δ11 interpretieren zu können. Die Herstellung der Deletionsmutante erfolgte ebenfalls über BAC-Mutagenese (s. 3.2.4), wobei der gesamte UL49-Leserahmen deletiert wurde. Das als Selektionsmarker dienende Kanamycin-Resistenzgen wurde in diesem Fall jedoch aus dem Vektor pACYC177 amplifiziert und konnte dementsprechend nicht wieder eliminiert werden. Das entstandene UL49-negative Virus trägt die Bezeichnung L11Δ49. In Abbildung 22 ist die Mutagenisierung des Genoms in *E. coli* dargestellt.



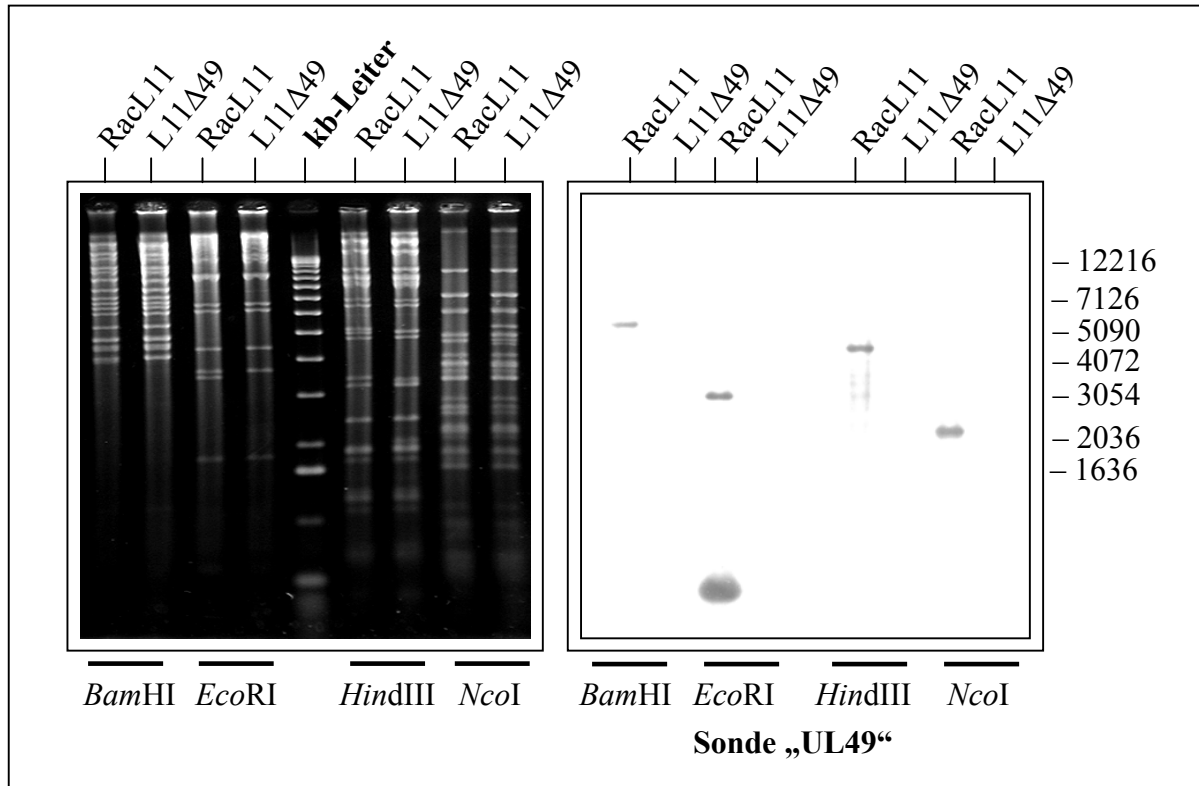
**Abbildung 22:** Schematische Darstellung der Konstruktion der UL49-Deletionsmutante: (A) zeigt die *Bam*HI-Restriktionsfragmentkarte des EHV-1-BACs pRacL11. Die zusätzliche *Bam*HI-Schnittstelle in den eingefügten BAC-Sequenzen ist mit + gekennzeichnet. In (B) ist die Lage des offenen Leserahmens UL49 innerhalb des *Bam*HI-Fragmentes j dargestellt. (C) zeigt den Genomausschnitt nach Deletion des UL49-ORFs und Insertion des Kanamycin-Resistenzgens.



#### 4.2.2.2 Charakterisierung des Genotyps

Die korrekte Deletion des UL49-Leserahmens wurde im Southern Blot überprüft. Der Genotyp der Deletionsmutante wurde dabei mit dem Genotyp des Ausgangsvirus RacL11 verglichen. Nach Isolierung der DNS der entsprechenden Viren wurden diese mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III und *Nco*I verdaut und die entstandenen Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Überprüfung der DNS anhand des Bandenmusters im Gelbild wurden spezifische Sequenzen mit einer Digoxigenin-markierten „UL49“-Sonde detektiert. Diese hybridisiert mit dem UL49-Leserahmen (Abb. 23).

Wie erwartet, konnte der Sonde im Fall der Deletionsmutante keine Reaktivität nachgewiesen werden. Bei dem Ausgangsvirus ergaben sich je nach verwendetem Restriktionsenzym verschiedene Fragmente. Der Verdau der viralen DNS mit *Bam*HI führte zum Erhalt eines 6629 bp großen Fragmentes, nach *Eco*RI-Spaltung hybridisierte die „UL49“-Sonde mit drei Fragmenten von 9518 bp, 3502 bp und 617 bp Länge, wobei das größte Fragment aufgrund eines hybridisierten Bereiches von nur 10 bp im Southern Blot nicht sichtbar ist. Bei Verwendung der Endonuklease *Hind*III detektierte die Sonde ein 5159 bp großes Fragment. Der UL49-Leserahmen enthält eine *Nco*I-Schnittstelle. Dementsprechend konnten mit der Sonde nach *Nco*I-Verdau der viralen DNS zwei Fragmente mit einer Größe von 2618 bp und 2511 bp detektiert werden.



**Abbildung 23:** Agarosegel- und Southern Blot-Analyse des Genotyps des UL49-deletierten *RacL11*: Zum Nachweis der Deletion des UL49-Leserahmens wurde der Genotyp des rekombinanten Virus im Gelbild und im Southern Blot analysiert. Die virale DNS wurde mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III und *Nco*I gespalten, elektrophoretisch aufgetrennt und mittels der „UL49“-Sonde untersucht.

#### 4.2.2.3 UL11- und UL49-negative Mutante des Stammes *RacL11* (*L11Δ49Δ11*)

##### 4.2.2.3.1 Konstruktion

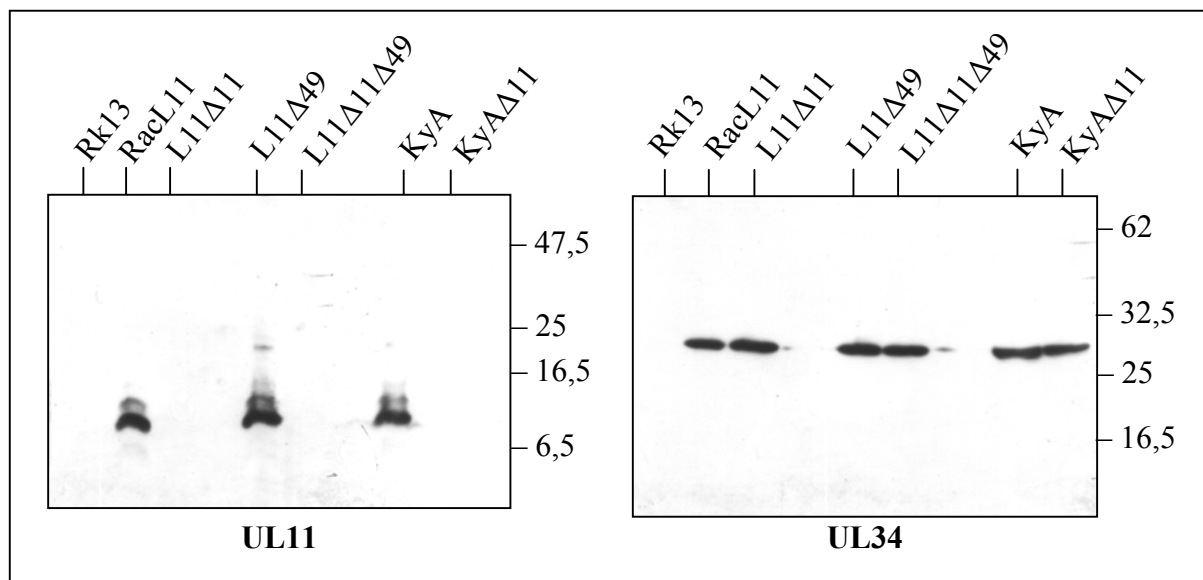
Das UL11- und UL49-deletierte Virus des EHV-1-Stammes *RacL11* wurde hergestellt, um einen möglichen Einfluss des Tegumentproteins UL49 auf die Funktion des UL11-Proteins zu untersuchen. Zur Herstellung der Doppelmutante wurde das als BAC in *E. coli* vorliegende UL11-deletierte Genom *pRacL11Δ11* (s. 4.2.4.1.1) erneut mutagenisiert. Der UL49-ORF wurde wie bei der Einfachmutante *L11Δ49* (s. 4.2.4.2.1) vollständig deletiert und das eingefügte Kanamycin-Resistenzgen nicht wieder eliminiert. Das rekombinante Virus trägt die Bezeichnung *L11Δ49Δ11*.

#### 4.2.2.3.2 Charakterisierung des Genotyps

Der Nachweis der korrekten Deletion der UL11-spezifischen Sequenzen und des offenen Leserahmens UL49 erfolgte mittels Gelbild-Analyse und Southern Blot analog der Charakterisierung der entsprechenden Einzelmutanten und ist nicht gezeigt.

#### 4.2.2.4 Darstellung der UL11-deletierten Viren im Western Blot

Zum Nachweis der fehlenden Expression des UL11-Proteins in den Deletionsmutanten L11 $\Delta$ 11, KyA $\Delta$ 11 und L11 $\Delta$ 49 $\Delta$ 11 wurden Western Blot-Analysen durchgeführt. Mit den Ausgangsviren und Mutanten infizierte Rk13-Zellen wurden 14 h p.i. lysiert und unter Verwendung des anti-UL11-Serums analysiert. Zur Überprüfung der Qualität der Lysate und der korrekten Expression eines weiteren „early-late“-Proteins von EHV-1 wurden die Lysate parallel mit dem anti-UL34-Serum untersucht. Wie aus Abbildung 24 hervorgeht, konnte die fehlende UL11-Expression bei unveränderter Expression des UL34-Proteins bestätigt werden.



**Abbildung 24:** Western Blot-Analyse der UL11-Deletionsmutanten von EHV-1: Die fehlende Expression des UL11-Proteins in den rekombinanten Viren L11 $\Delta$ 11, KyA $\Delta$ 11 und L11 $\Delta$ 49 $\Delta$ 11 konnte mit dem anti-UL11-Serum bestätigt werden. Das UL34-Protein wurde in seiner Expression nicht durch die Deletion des UL11-ORFs beeinflusst.

#### 4.2.2.5 Charakterisierung der rekombinanten Viren L22 $\Delta$ 11, L11 $\Delta$ 11, KyA $\Delta$ 11 und L11 $\Delta$ 49 $\Delta$ 11 in Zellkultur

##### 4.2.2.5.1 Einschnitt-Wachstumskinetik

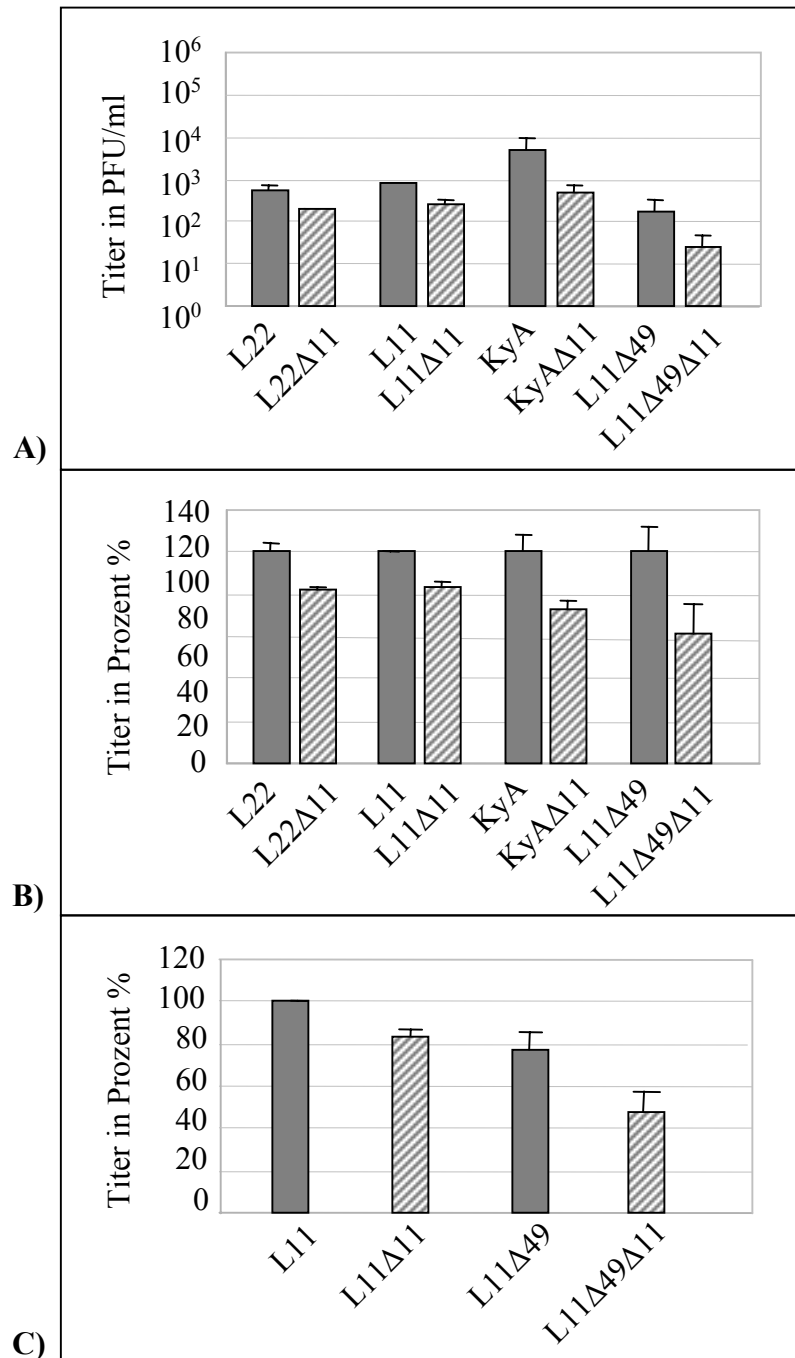
Um die Auswirkungen der Deletion der UL11-spezifischen Sequenzen in den verschiedenen EHV-1-Isolaten bzw. -Stämmen darzustellen, wurden Einschnitt-Wachstumswerte erstellt. Dabei wurden die Replikationseigenschaften der UL11-deletierten Viren L22 $\Delta$ 11, L11 $\Delta$ 11, KyA $\Delta$ 11 und L11 $\Delta$ 49 $\Delta$ 11 mit denen der Ausgangsviren RacL22, RacL11, KyA bzw. der Ausgangsmutante L11 $\Delta$ 49 verglichen. Zur Durchführung wurden konfluente Rk13-Zellen mit einer MOI von 3 mit den entsprechenden Viren infiziert und die extra- und intrazellulären Titer 12 h nach der Infektion getrennt bestimmt. Der Zeitpunkt von 12 h p.i. wurde gewählt, da das rekombinante Virus L22 $\Delta$ 11 zu diesem Zeitpunkt die größten Titerunterschiede im Vergleich zum Ausgangsvirus RacL22 aufwies (SCHIMMER und NEUBAUER, 2003). Die Ergebnisse sind aus Abbildung 25 (extrazelluläre Titer) und Abbildung 26 (intrazelluläre Titer) ersichtlich.

**(A)** Zunächst wurden die absoluten Titer der Ausgangsviren bzw. der entsprechenden UL11-Deletionsmutanten betrachtet. Dabei führte sowohl extra- als auch intrazellulär der Stamm KyA bzw. KyA $\Delta$ 11, bezogen auf die UL11-deletierten Viren, zu den höchsten Titern. Aus der Infektion der Zellen mit der Mutante L11 $\Delta$ 49 bzw. der UL11-UL49-Doppelmutante L11 $\Delta$ 49 $\Delta$ 11 resultierte jeweils die geringste Infektiosität. Die Werte der Titer der Wildtyp-Isolate RacL22 und RacL11 bzw. ihrer rekombinanten Derivate L22 $\Delta$ 11 und L11 $\Delta$ 11, die jeweils nur geringe Unterschiede aufwiesen, lagen dazwischen.

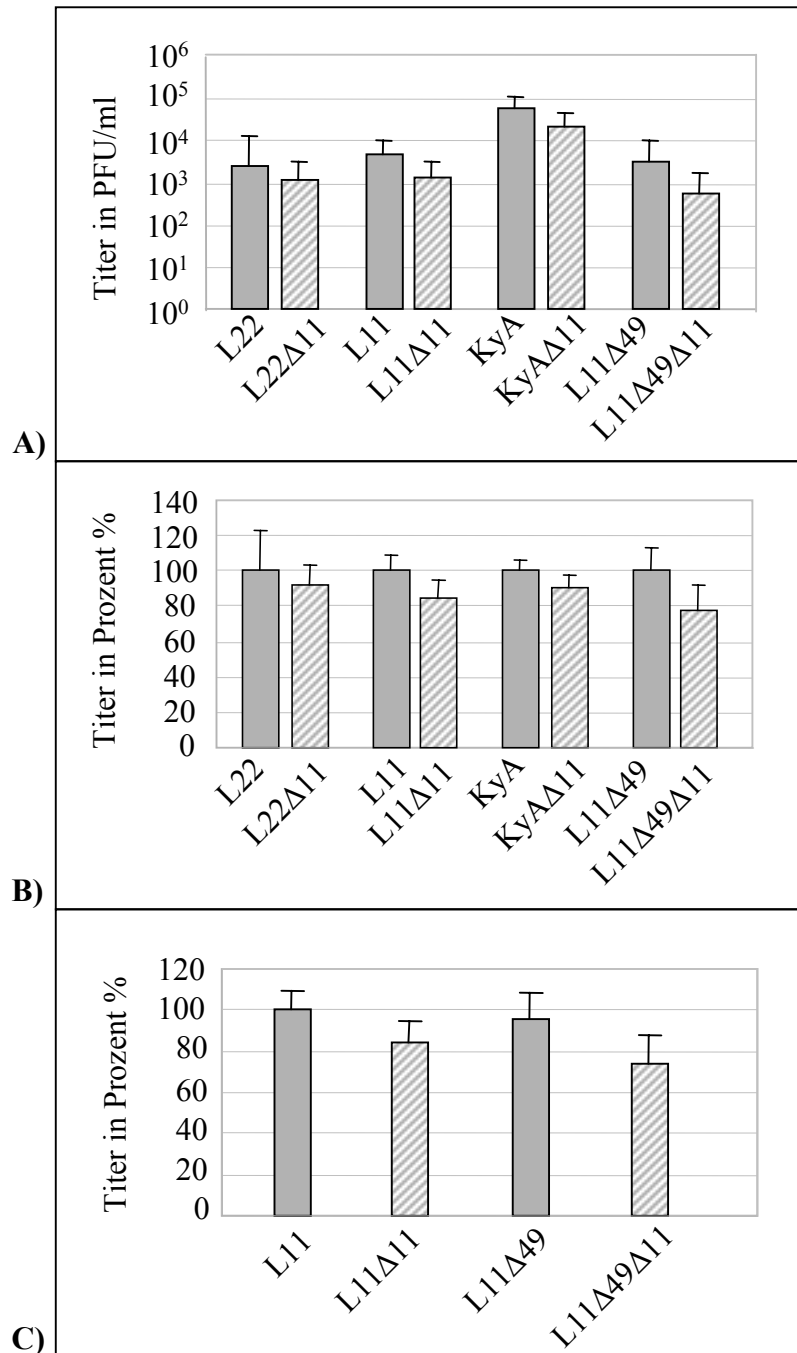
**(B)** Um die Auswirkungen der Deletion der UL11-spezifischen Sequenzen in den verschiedenen EHV-1-Isolaten, -Stämmen und -Mutanten besser beurteilen zu können, wurden die von den UL11-negativen Viren erreichten Titer jeweils in Relation zu den Titern der entsprechenden Ausgangsviren (-mutanten) gesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Deletion des Großteils des UL11-ORFs im Stamm KyA und in der Mutante L11 $\Delta$ 49 stärker auswirkte als in den Isolaten RacL22 und RacL11. Die extrazellulären Titer der Wildtyp-Isolate RacL22 und RacL11 waren durch die Deletion der UL11-spezifischen Sequenzen um jeweils ca. 20 % reduziert. Im Fall von KyA führte die fehlende Expression

des UL11-Proteins zu einer um ca. 30 % erniedrigten extrazellulären Infektiosität, die Doppelmutante L11Δ49Δ11 wies im Vergleich zu ihrer Ausgangsmutante L11Δ49 sogar einen um 40 % reduzierten, extrazellulären Titer auf. Intrazellulär wirkte sich die UL11-Deletion nur bei der Mutante L11Δ49 stärker aus als bei RacL22 und RacL11. Während die intrazellulären Titer von RacL22Δ11, RacL11Δ11 und KyAΔ11 um 10 bis 15 % reduziert waren, wies die Doppelmutante eine um 23 % erniedrigte, intrazelluläre Infektiosität auf.

**(C)** Zur besseren Interpretation der Beobachtungen bei der Doppelmutante L11Δ49Δ11 wurden die extra- und intrazellulären Titer von L11Δ11, L11Δ49 und L11Δ49Δ11 schließlich in Relation zu den Titern von RacL11 gesetzt. Dabei wurde festgestellt, dass das UL11-UL49-negative Virus L11Δ49Δ11 extrazellulär zu einer um 53 % reduzierten Infektiosität führte. Diese Titerreduktion überstieg die Summe der Titerreduktionen der entsprechenden Einzelmutanten. Der Titer der Mutante L11Δ11 war um 17 % erniedrigt, die Einzelmutante L11Δ49 wies einen um 23 % reduzierten Titer auf. Intrazellulär erreichte die Doppelmutante 75 % der Infektiosität von RacL11, die entsprechenden Einzelmutanten L11Δ11 bzw. L11Δ49 Titer von 85 % bzw. 96 %.



**Abbildung 25:** Darstellung der extrazellulären Titer der UL11-Deletionsmutanten und ihrer entsprechenden Ausgangsviren (-mutanten): Um den Einfluss der Deletion der UL11-spezifischen Sequenzen in verschiedenen EHV-1-Isolaten (RacL22, RacL11), -Stämmen (KyA) und -Mutanten (L11Δ49) zu untersuchen, wurden Wachstumswerte der Viren 12 h p.i. bestimmt und miteinander verglichen. (A) zeigt die absoluten extrazellulären Titer, in (B) und (C) sind die Titer der UL11-negativen Viren jeweils in Relation zu ihren Ausgangsviren (B) bzw. zu RacL11 (C) gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt.

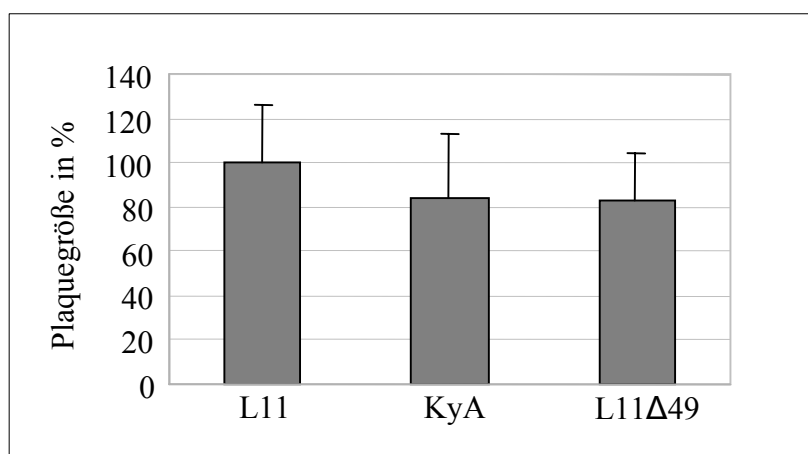


**Abbildung 26:** Darstellung der intrazellulären Titer der UL11-Deletionsmutanten und ihrer entsprechenden Ausgangsviren (-mutanten): Zur Untersuchung der Auswirkung der Deletion des Großteils des UL11-ORFs vor dem Hintergrund verschiedener EHV-1-Genome (RacL22, RacL11, KyA, L11Δ49), wurden Rk13-Zellen mit einer MOI von 3 der entsprechenden Viren infiziert und die resultierende Infektiosität nach 12 h bestimmt. In (A) sind die absoluten intrazellulären Titer dargestellt, (B) bzw. (C) geben die Titer als prozentuale Werte bezogen auf ihre Ausgangsviren bzw. auf RacL11 wieder. Gezeigt sind die Mittelwerte aus zwei Experimenten, die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt.

#### 4.2.2.5.2 Plauephänotyp

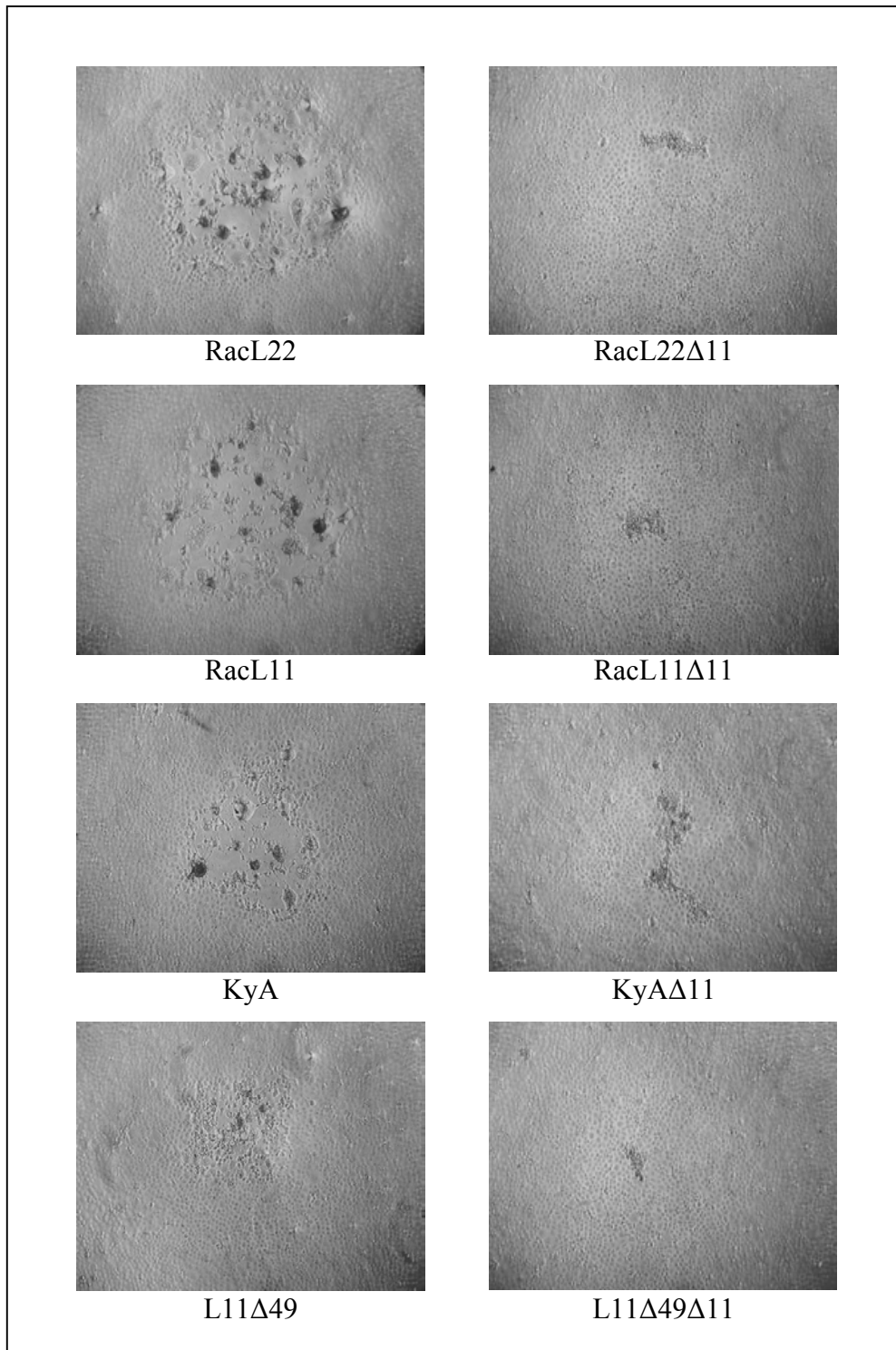
Der Plauephänotyp gibt Aufschluss über die Fähigkeit des Virus zum „cell-to-cell-spread“. Um mögliche Unterschiede in den Plauegrößen der UL11-deletierten Viren im Vergleich zu RacL22, RacL11, KyA und L11 $\Delta$ 49 aufzuzeigen, wurden Rk13-Zellen mit den Mutanten und parallel mit den entsprechenden Ausgangsviren bzw. der entsprechenden Ausgangsmutante mit 50 PbE/Loch einer 6-Loch-Platte infiziert. Die Zellen wurde für vier Tage unter Methylzellulose gehalten und der Plauephänotyp anschließend ausgewertet. Da nur bei den Wildtyp-Isolaten sowie dem Stamm KyA und der Mutante L11 $\Delta$ 49 deutliche Plaues zu beobachten waren, wurden nur deren Plauegrößen wie unter 3.2.5.2 beschrieben, gemessen. Es konnte festgestellt werden, dass der Stamm KyA und das UL49-deletierte Virus zu kleineren Plaues führten als RacL22 und RacL11, deren Plauegrößen nahezu identisch waren. Bezogen auf die Plauegröße von RacL11 waren die Plauedurchmesser von KyA und der Einzelmutante L11 $\Delta$ 49 jeweils um ca. 20 % kleiner (Abb. 27).

Die Plaues der UL11-deletierten Viren L22 $\Delta$ 11, L11 $\Delta$ 11, KyA $\Delta$ 11 und L11 $\Delta$ 49 $\Delta$ 11 waren so klein, dass Unterschiede in ihrer Größe kaum feststellbar waren. Um Ungenauigkeiten zu vermeiden, wurden die Plauegrößen der Deletionsmutanten nicht gemessen und in Relation zu denen der Ausgangsviren (-mutante) gesetzt. Zur Dokumentation wurde der Zellrasen fixiert und die Plaues digital fotografiert (Abb. 28).



**Abbildung 27:** Plauegrößenvergleich von RacL11, KyA und L11 $\Delta$ 49: Rk13-Zellen wurden mit 50 PbE/Loch einer 6-Loch-Platte der entsprechenden Viren infiziert und nach vier Tagen fixiert. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte aus je 100 ausgemessenen Plauedurchmessern. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt.





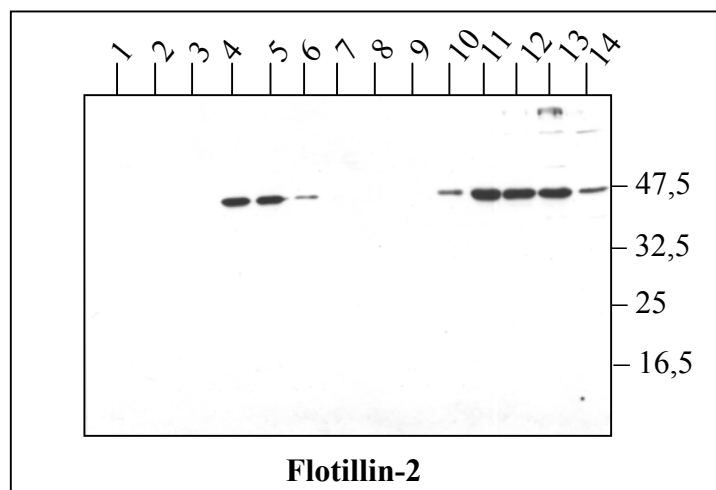
**Abbildung 28:** Plaquephänotyp der UL11-Deletionsmutanten im Vergleich zu ihren Ausgangsviren (-mutante): Zur Darstellung des Plaquephänotyp der UL11-negativen Viren L22Δ11, L11Δ11, KyAΔ11 und L11Δ49Δ11 im Vergleich zu RacL22, RacL11, KyA und L11Δ49 wurden Rk13-Zellen mit 50 PbE/Loch einer 6-Loch-Platte infiziert und unter Methylzellulose gehalten. Nach 4 Tagen wurde der Zellrasen fixiert und die Plaques digital fotografiert (Axioskop: 100fache Vergrößerung).

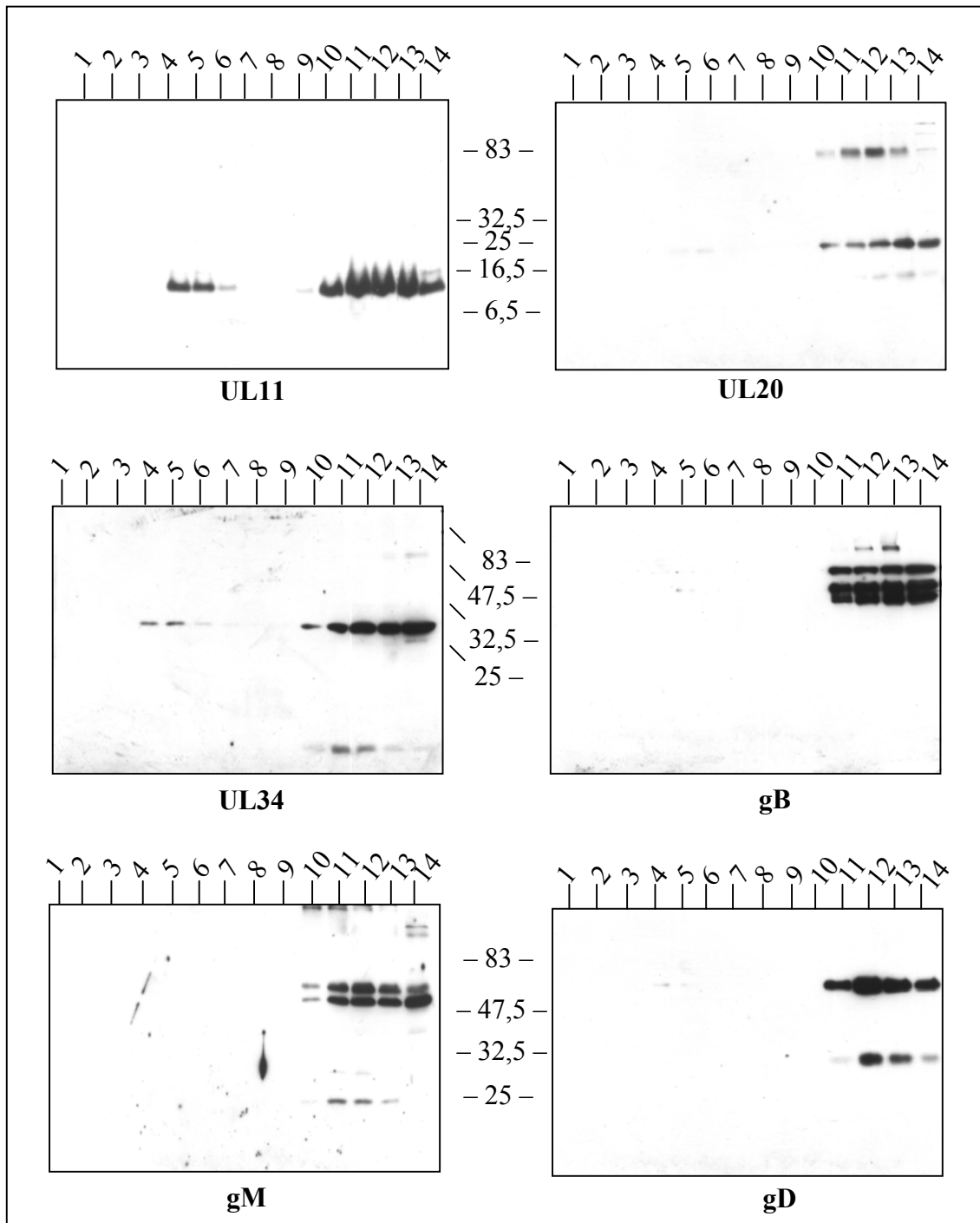
### 4.3 Untersuchung der Assoziation von EHV-1-Proteinen mit Lipid Rafts

Lipid Rafts sind stabile Domänen zellulärer Membranen, die in anderen Virussystemen als bevorzugte Stellen des Zusammenbaus und der Umhüllung von Virionen identifiziert wurden. Auch bei der Sortierung von Proteinen zur apikalen Membran polarisierter Zellen wurde ihnen eine Funktion nachgewiesen.

Zur Untersuchung einer möglichen Lipid Raft-Assoziation des UL20- und UL11-Proteins und anderer EHV-1-Proteine, wurden Lipid Rafts, wie unter 3.2.8.3 beschrieben, aus RacL11-infizierten Rk13-Zellen isoliert. Die aus der Isolierung resultierenden 14 Fraktionen wurden unter Verwendung der Antiseren gegen pUL11, pUL20, pUL34 und gM sowie der Antikörper gegen gB und gD im Western Blot analysiert. Als Kontrollantikörper zur Detektion der Lipid Raft-Fraktionen diente der MAk anti-Flotillin-2, der mit dem zellulären, mit Lipid Rafts assoziierten Protein Flotillin-2 reagiert.

Alle Antiseren bzw. -körper reagierten mit den Fraktionen 10 bis 14, die die löslichen Proteine enthielten. Die in Triton X-100 unlöslichen, mit Lipid Rafts assoziierten Proteine waren, wie die Detektion des zellulären Raft-Proteins Flotillin-2 zeigte, vor allem in den Fraktionen 4 und 5 zu finden. In diesen beiden Fraktionen konnte nur das UL11-Protein in Form einer starken, 11 kDa großen Bande detektiert werden. Die anderen Antiseren- und körper zeigten zwar auch Reaktionen mit diesen Fraktionen, diese waren aber sehr schwach und wurden daher nicht als spezifische Anreicherung in den Lipid Rafts interpretiert. Im Fall des UL34-Proteins reagierte das Antiserum jedoch etwas stärker mit den Fraktionen 4 und 5, so dass eine spezifische Raft-Assoziation nicht ausgeschlossen werden konnte (Abb. 29).





**Abbildung 29:** Lipid Raft-Assoziation von EHV-1-Proteinen: Nach Isolierung von Lipid Rafts aus RacL11-infizierten Rk13-Zellen und Analyse der Fraktionen im Western Blot konnte das UL11-Protein deutlich in den gleichen Fraktionen wie der Lipid Raft-Marker Flotillin-2 nachgewiesen werden. Die Antiseren bzw. -körper gegen die Proteine pUL20, pUL34, gM, gB und gD reagierten ebenfalls mit den Raft-Fraktionen. Im Fall von pUL20, gM, gB und gD waren diese Reaktionen sehr schwach, das UL34-Protein konnte hingegen in Form einer etwas stärkeren Bande detektiert werden.

## 5. DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Arbeit war die strukturelle und funktionelle Charakterisierung des UL20-Genproduktes des equinen Herpesvirus Typ 1 (EHV-1) und seine Einordnung in das Infektionsgeschehen. Das Protein wurde in infizierten und transfizierten Zellen identifiziert und hinsichtlich seiner zellulären Verteilung untersucht. Durch die Herstellung und Charakterisierung UL20-negativer Virusmutanten konnte die Funktion des Proteins im Replikationszyklus von EHV-1 beurteilt werden. Dabei wurde vor allem auf die Beteiligung des UL20-Proteins an den Vorgängen des „viral egress“ und des „cell-to-cell-spread“ eingegangen.

Dem UL11-Protein von EHV-1 war bereits eine Funktion bei diesen beiden Wegen der Ausbreitung der Infektiosität nachgewiesen worden. Um diese Funktion näher definieren zu können, wurden UL11-Deletionsmutanten verschiedener EHV-1-Isolate bzw. -Stämme und eine UL11-UL49-Doppelmutante hergestellt und deren Replikationseigenschaften in Zellkultur miteinander verglichen. Der offene Leserahmen UL11 von EHV-1 besitzt eine Konsensussequenz für eine N-terminale Myristylierung. Bisher sind nur wenig myristylierte, herpesvirale Proteine bekannt, und die Bedeutung dieser möglichen Myristylierung für die Funktion des UL11-Protein sollte geklärt werden.

Schließlich sollte in dieser Arbeit der Hypothese eines funktionellen Zusammenhanges zwischen dem UL20- und dem UL11-Protein nachgegangen werden. Eine mögliche Assoziation des multipel hydrophoben UL20-Proteins und des potenziell durch eine Myristylierung modifizierten Tegumentproteins pUL11 mit Lipid Rafts und eine daraus resultierende gemeinsame Funktion im „cell-to-cell-spread“ sollte untersucht werden.

### 5.1 Das UL20-Protein bei EHV-1

#### Struktur des UL20-Proteins

Das UL20-Protein von EHV-1 wurde mittels eines in Kaninchen hergestellten, polyklonalen Antiserums in Lysaten RacL11- und RacH-infizierter Zellen identifiziert. In Western Blot-Analysen detektierte das Serum spezifisch zwei Proteine mit apparenten Molekulargewichten von ca. 25 und 75 kDa. Nach der Aminosäuresequenz war ein Molekulargewicht von ca. 25 kDa zu erwarten. Bei der größeren Bande, die nicht immer nachweisbar war, könnte es sich

um eine homo- oder heterooligomere Form des UL20-Proteins handeln. Eine Komplexbildung des Proteins über Disulfidbrücken kann ausgeschlossen werden, da dem Probenpuffer für die Lysate 2-Mercaptoethanol, das Disulfidbrücken reduziert, zugesetzt worden war. Gegen ein Trimer spricht das Fehlen einer Bande, deren Größe der Zwischenstufe eines Dimers entsprechen würde. Es ist aber durchaus denkbar, dass es sich bei dem möglichen Dimer um ein so instabiles Zwischenprodukt handelt, dass es in infizierten Zellen nicht nachgewiesen werden kann. Alternativ könnte auch nur eine trimere Form des Proteins stabil sein und eine dimere Form nicht gebildet werden.

Die Sequenz des UL20-Proteins von EHV-1 weist zwei N-Glykosylierungsstellen auf. Diese befinden sich im hydrophilen Bereich (Aminosäuren 1 bis 60) des Proteins. Da jedoch nach Hemmung einer N-Glykosylierung mit Tunicamycin keine Veränderung in den Laufeigenschaften des Proteins in der SDS-PAGE zu beobachten war, kann eine Modifikation durch N-Glykosylierung ausgeschlossen werden. Das indiziert entweder, dass das multipel hydrophobe Protein pUL20 im Rahmen seiner Synthese so in das Endoplasmatische Retikulum (ER) eingelagert wird, dass sich die Glykosylierungssequenzen nicht in dessen Lumen befinden oder, dass das Protein so gefaltet wird, dass die Sequenzen nicht zugänglich sind.

In Western Blot-Analysen gekochter Zelllysate waren keine UL20-spezifischen Banden im Trenngel zu detektieren. Das bestätigt die Hydrophobizität des UL20-Proteins. Hydrophobe Proteine aggregieren beim Kochen und können in der SDS-PAGE nicht aufgetrennt werden. Sie bleiben am Übergang Sammelgel-Trenngel hängen.

Alphaherpesvirale Proteine werden entsprechend ihrer Expressionskinetik in die Klassen der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Proteine eingeteilt. Die Expression der  $\gamma$ -Proteine ist teilweise ( $\gamma_1$ ) bzw. vollständig ( $\gamma_2$ ) abhängig von der Synthese viraler DNS. Das UL20-Protein wurde der Klasse der  $\gamma_1$  („early-late“-)Proteine zugeordnet, da seine Expression durch Hemmung der DNS-Synthese nur teilweise unterdrückt werden konnte. Im Western Blot war das Protein ab 6 h p.i. zu detektieren. Mit der Klassifizierung des UL20-Genproduktes als „early-late“-Protein korreliert die Tatsache, dass das Protein als Strukturprotein in extrazellulären, gereinigten Virionen identifiziert werden konnte. Dabei detektierte das anti-UL20-Serum ebenfalls zwei Proteine mit apparenten Molekulargewichten von ca. 25 und 75 kDa.

Nach Auftrennung gereinigter Virionen in eine Hüll- und Kapsidfraktion, war das UL20-Protein ausschließlich in der Hülle zu finden. Es ist damit eines der wenigen nicht glykosylierten Membranproteine von EHV-1.

Zur Untersuchung der zellulären Verteilung des UL20-Proteins wurden infizierte Zellen fraktioniert. Nach Auftrennung der Zellen in eine Membran-, eine Zytoplasma- und eine Kernfraktion, konnte pUL20 sowohl in der Membran-, als auch in der Kernfraktion nachgewiesen und somit als Membranprotein identifiziert werden. Das UL20-Produkt von EHV-1 besitzt vier potenzielle Transmembrandomänen. Diese hydrophoben Sequenzen sind in den vorhergesagten 239 Aminosäuren (AS) von pUL20 in folgenden Bereichen zu finden: AS 70 bis 100, AS 100 bis 125, AS 140 bis 175 und AS 180 bis 230. Proteine mit mehreren Transmembrandomänen werden der Klasse III der Membranproteine zugeordnet.

In der indirekten Immunfluoreszenz (IIF) infizierter Zellen konnte das hergestellte anti-UL20-Serum nicht eingesetzt werden, da es mit einem weiteren viralen Protein (250 kDa große Bande im Western Blot) reagiert und sowohl in Wildtyp- als auch in mit der UL20-Deletionsmutante infizierten Zellen eine spezifisch erscheinende Fluoreszenz zu beobachten war. Die zelluläre Lokalisation von pUL20 konnte jedoch in der IIF transfizierter Zellen, in denen das UL20-Protein unabhängig von anderen viralen Protein exprimiert wird, untersucht werden. Dabei wurde eine punktförmige Fluoreszenz im gesamten Zytoplasma festgestellt. Diese Verteilung der Fluoreszenz belegt die Assoziation des Proteins mit zellulären Membranen. Dasselbe Fluoreszenzmuster konnte nach Immunfluoreszenzfärbung der etablierten Zelllinie SC20, die das UL20-Protein stabil exprimiert, detektiert werden.

### Funktion des UL20-Proteins

Um die Bedeutung des UL20-Proteins von EHV-1 für die Virusreplikation in Zellkultur zu untersuchen, wurden UL20-negative Virusmutanten konstruiert. Dazu wurde der komplette UL20-Leserahmen der Stämme RacL11 und RacH über BAC-Mutagenese deletiert und durch eine Fremdsequenz von 82 bp Länge ersetzt. Die für das UL20-Protein komplementierende Zelllinie SC20 diente dabei der Isolierung und Vermehrung der Deletionsmutanten L11 $\Delta$ 20 und H $\Delta$ 20. Um sicherzustellen, dass der beobachtete Phänotyp der rekombinanten Viren nur auf die Deletion des UL20-ORFs und nicht auf andere, während der Mutagenese aufgetretene,

Veränderungen im viralen Genom zurückzuführen ist, wurden die Revertanten L11 $\Delta$ 20Rev und HA20Rev durch Reinsertion der UL20-Sequenzen hergestellt. Die Replikationseigenschaften der Viren wurden auf nicht komplementierenden Rk13-Zellen untersucht. Dabei waren die Deletionsmutanten so stark in ihrer Vermehrung beeinträchtigt, dass das UL20-Protein zwar nicht als essentiell, aber als sehr wichtig für die Replikation von EHV-1 in Zellkultur eingestuft wurde. Bei der funktionellen Charakterisierung des UL20-Proteins wurde vor allem auf seine Bedeutung in späten Stadien des Replikationszyklus Wert gelegt. Es sind aber durchaus auch Funktionen von pUL20 in anderen Abschnitten der Infektion vorstellbar.

Als Bestandteil der Virionenhülle könnte das UL20-Protein eine Rolle beim Eintritt des Virus in die Wirtszelle spielen. Nach bisherigen Erkenntnissen wird die Adsorption und Penetration durch die Interaktion integraler Membranproteine der Virushülle mit Rezeptoren der Zelloberfläche vermittelt. Das UL20-Produkt könnte dabei spezifisch mit zellulären Membranproteinen interagieren. Alternativ wäre vorstellbar, dass das UL20-Protein die Funktion viraler, an der Penetration beteiligter, Membran-Glykoproteine, wie gB, gC, gD, gM und gp2 (OSTERRIEDER et al., 1996a; SUN et al., 1996; NEUBAUER et al., 1997; OSTERRIEDER, 1999; CSELLNER et al., 2000) beeinflusst und dadurch den Fusionprozess der beiden Membranen ermöglicht. Eine Beteiligung von pUL20 an den Vorgängen der Penetration kann durch Untersuchung der Penetrationsgeschwindigkeit der Deletionsmutanten im Vergleich zum Penetrationsverhalten der Elternviren und Revertanten geklärt werden.

Das durch die Fusion der Virushülle mit der Plasmamembran freigesetzte Kapsid wird anschließend zusammen mit dem Tegument zum Zellkern transportiert. Eine Beteiligung des UL20-Proteins an diesem Transport erscheint unwahrscheinlich. Nach Trennung aufgereinigter Virionen konnte das UL20-Produkt nicht in der Kapsidfraktion detektiert werden und es ist anzunehmen, dass es nach dem Membranfusionsprozess im Rahmen der Penetration in der Membran der infizierten Wirtszelle verbleibt. Das UL20-Protein wurde als  $\gamma_1$ - und Strukturprotein identifiziert. Damit können regulatorische Funktionen bei der Expression anderer Gene und eine Bedeutung im Nukleinsäuremetabolismus ausgeschlossen werden.

Zur Untersuchung einer Beteiligung des UL20-Proteins am „viral egress“, also an der Ausschleusung der Nachkommenviren aus der infizierten Zelle, wurden Einschnitt-Wachstumskurven erstellt. Dabei wurden die Replikationseigenschaften der Elternviren, Deletionsmutanten und Revertanten in Zellkultur miteinander verglichen. Die Auswirkungen der Deletion des UL20-Leserahmens auf die Replikationseffizienz von EHV-1 zeigten sich vor allem nach Bestimmung der extrazellulären Infektiosität. Während die intrazellulären Titer des UL20-negativen Virus bis 8 h p.i. nicht und zwischen 8 h und 24 p.i. maximal um das 3fache erniedrigt waren, ergab sich extrazellulär 12 h p.i. eine Titerreduktion um das 100fache. 24 h p.i. führte das rekombinante Virus zu 1000fach niedrigeren Titern als das Elternvirus und die Revertante.

Um Vermutungen über die Funktion des UL20-Proteins im „viral egress“ anstellen zu können, müssen die einzelnen Schritte der Ausschleusung der Viren betrachtet werden. Die Ausschleusung der Virionen aus der infizierten Wirtszelle beginnt mit der ersten Umhüllung der Kapside an der inneren Kernmembran. Nach dem „de-envelopment“ durch Fusion mit der äußeren Kernmembran sind unbehüllte Kapside im Zytoplasma zu finden. Diese erhalten ihre endgültige Hülle im *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) und sammeln sich in Prälysosomen, die durch die Fusion mehrerer Golgi-Vesikel entstehen. Die Hülle dieser virushaltigen zytoplasmatischen Vakuolen fusioniert mit der Zellmembran und führt zur Freisetzung der Viruspartikel in den extrazellulären Raum. Die Titerverläufe in den erstellten Wachstumskurven ermöglichen eine genauere Einordnung des UL20-Proteins in die Vorgänge des Virus-Egress. Dabei ist von entscheidender Bedeutung, dass nur Virionen mit ausgereifter Hülle infektiös sind, d.h. nur diese Viren sind in der Lage, weitere Zellen zu infizieren. Da die intrazellulären Titer des rekombinanten Virus kaum von denen des Elternvirus und der Revertante abweichen, kann eine Funktion des UL20-Proteins bei sehr frühen Schritten des Egress, wie der Umhüllung der Kapside durch die innere Kernmembran oder der Fusion der behüllten Kapside mit der äußeren Kernmembran, ausgeschlossen werden. Wären diese Vorgänge beeinträchtigt, wären auch die intrazellulären Titer zu frühen Zeitpunkten deutlich erniedrigt, da die weitere Reifung der Virionen zu infektiösen Partikeln in der Zelle nur noch beschränkt möglich wäre. Bei HSV-1 zeigen elektronenmikroskopische Aufnahmen von mit einem UL20-deletierten Virus infizierten Vero-Zellen jedoch eine Akkumulation umhüllter Virionen zwischen innerer und äußerer Kernmembran (AVITABILE et al., 1994). Eine Beteiligung an der Umhüllung von Kapsiden an der inneren Kernmembran wird auch für das UL11-Protein von HSV-1 angenommen (BAINES und ROIZMAN, 1992).



Auch im Falle einer Funktion des UL20-Proteins bei der zweiten, endgültigen Umhüllung von Kapsiden im TGN wäre eine stärkere intrazelluläre Titerreduktion zu erwarten, da weniger Virionen mit einer reifen, infektiösen Hülle gebildet werden würden. Möglicherweise spielt das UL20-Protein eine Rolle beim Transport der in Golgi-Vesikel verpackten, reifen Virionen zur Zelloberfläche oder bei der Fusion der Transportvesikel mit der Plasmamembran der infizierten Zelle. Gegen eine Funktion des Proteins bei diesen sehr späten Egress-Schritten könnte sprechen, dass keine akkumulierende, die Titer der Elternviren übersteigende intrazelluläre Infektiosität zu beobachten ist. Es ist aber durchaus vorstellbar, dass die im Falle einer Akkumulation in der Zelle vorliegenden reifen Viruspartikel zumindest teilweise ihre Infektiosität verlieren. Auch bei PrV wird trotz 10fach erniedrigter intrazellulärer Titer einer UL20-Deletionsmutante eine Funktion des UL20-Proteins beim Transport sekundär behüllter Virionen zur Zelloberfläche vermutet. Darauf lassen elektronenmikroskopische Aufnahmen von mit der Deletionsmutante infizierten Vero-Zellen schließen, die eine Akkumulation behüllter Virionen in riesigen zytoplasmatischen Vakuolen und Vesikeln des Golgi-Apparates zeigen (FUCHS et al., 1997). Die deutlich reduzierten extrazellulären Titer, zu denen das rekombinante Virus von EHV-1 führt, könnten eine Beeinträchtigung der Freisetzung der Virionen bestätigen. Es besteht allerdings auch die Möglichkeit, dass reife Viruspartikel ungehindert aus der infizierten Zelle entlassen werden können, die Hülle dieser Virionen jedoch unmittelbar nach Freisetzung wieder mit der Plasmamembran der Zelle fusioniert und die Kapside wieder ins Zytoplasma translozieren. Überraschend war, dass sich die Titer der UL20-Deletionsmutante 8 h p.i. nicht von denen des Ausgangsvirus und der Revertante unterscheiden. Ein Replikationszyklus von EHV-1 dauert etwa 6 Stunden und müsste 8 h p.i. auf jeden Fall abgeschlossen sein. Es wäre vorstellbar, dass das UL20-Produkt erst durch ein bestimmtes Ereignis in der infizierten Zelle an Bedeutung für die Replikation des Virus gewinnt. Bei HSV-1 wurde ein Zusammenhang zwischen der Fragmentation des Golgi-Apparates in infizierten Zellen und der Funktion des UL20-Proteins vermutet (AVITABILE et al., 1994). Das UL20-Produkt könnte für zelluläre Proteine, die ab 8 h nach der Infektion mit EHV-1 ihre Funktion nicht mehr ausüben können, komplementieren. Es muss jedoch auch bedacht werden, dass es sich bei den 8 h p.i. beobachteten extrazellulären Titern um Größenordnungen von 10 infektiösen Einheiten pro ml handelt und sich geringste Unterschiede in der Plaquezahl enorm auf den Titer auswirken. Zum besseren Verständnis der Funktion des UL20-Proteins beim Virus-Egress muss die Struktur des Proteins mit einbezogen werden. Das UL20-Produkt wurde als ein nicht glykosyliertes Strukturprotein, das

in allen zellulären Membranen detektiert werden konnte, identifiziert. Die Assoziation des Proteins mit Membranen könnte eine Beteiligung an Membranfusionsprozessen indizieren. Bei HSV-1 ist der UL20-Leserahmen ein sog. „syn locus“. Bestimmte Mutationen dieses Gens führen zum Verschmelzen infizierter Zellen mit Polykaryozyten-Bildung und synzytialen Phänotyp (RAJCANI und VOJVODOVA, 1998).

Um zu untersuchen, ob das UL20-Protein auch beim „cell-to-cell-spread“ eine Rolle spielt, wurden die Plaquegrößen der Deletionsmutanten mit denen der Elternviren und Revertanten verglichen. Die Morphologie der Plaques, der sog. Plaquephänotyp kann als Ausdruck der Fähigkeit eines Virus zum „cell-to-cell-spread“ gewertet werden. Die Plaques der UL20-negativen Viren waren sehr klein und bestanden nur aus wenigen infizierten, abgerundeten Zellen. Zusammen mit der Tatsache, dass die frühen Schritte des Virus-Egress anscheinend nicht beeinträchtigt sind, kann aus den Beobachtungen des Plaquephänotyps geschlossen werden, dass das UL20-Protein auch beim „cell-to-cell-spread“ von Bedeutung ist. Bei PrV scheint das UL20-Produkt ebenfalls an den Vorgängen des „cell-to-cell-spread“ beteiligt zu sein. Die Plaquegrößen der von der Deletionsmutante gebildeten Plaques erreichten jedoch 11 % des Durchmessers der Wildtyp-induzierten Plaques (FUCHS et al. 1997).

Eine genauere Einordnung der Funktion des UL20-Proteins bei diesen Vorgängen ist nicht möglich, da die molekularen Mechanismen des „cell-to-cell-spread“ noch weitgehend ungeklärt sind. Aber auch hier wäre eine Beteiligung des Proteins an der Fusion von Membranen denkbar. Eine übergeordnete Funktion von pUL20 bei Fusionsprozessen würde auch erklären, warum das Protein bei zwei vollkommen voneinander unabhängigen Wegen der Infektionsausbreitung eine Rolle zu spielen scheint.

## **5.2 Das UL11-Protein bei EHV-1**

### Bedeutung der Myristylierung für die Funktion des UL11-Proteins

Der offene Leserahmen UL11 von EHV-1 besitzt eine Konsensussequenz für eine N-terminale Myristylierung, so dass davon auszugehen ist, dass das UL11-Produkt durch einen Myristinsäurerest modifiziert ist. Für eine Myristylierung des Tegumentproteins pUL11 spricht auch dessen subzelluläre Lokalisation. Nach Auftrennung infizierter Zellen in drei Fraktionen, die die Membranen, die löslichen zytoplasmatischen Bestandteile und die Kerne

enthielten, wurde das UL11-Protein vor allem in der Membran- und Kernfraktion nachgewiesen. Da das Protein keine Domäne aus hydrophoben Aminosäuren aufweist, die eine Membranbindung ermöglichen könnte, kommt für die Verankerung in Membranen nur der Myristinsäurerest in Betracht (SCHIMMER, 2002).

Um die Bedeutung der Myristylierung für die Funktion des UL11-Proteins in Zellkultur zu klären, wurden Plasmide (pc11 und pc11 $\Delta$ myr) konstruiert, die nach Transfektion eukaryotischer Zellen ein myristiliertes bzw. ein nicht-myristyliertes UL11-Produkt exprimieren. In Western Blot-Analysen detektierte das anti-UL11-Serum im Fall der pc11-transfizierten Zellen fünf Proteine mit apparenten Molekulargewichten zwischen 7 und 12 kDa, wobei die stärkste Reaktion mit einem 11 kDa großen Protein zu beobachten war. Mit den Lysaten der pc11 $\Delta$ myr-transfizierten Zellen reagierte das Serum nur in Form einer Bande mit apparentem Molekulargewicht von 11 kDa. Die Reaktion war jedoch so schwach, dass das Vorhandensein weiterer Proteinbanden im Gel nicht ausgeschlossen werden konnte. Eine Erklärung für die schwächere Expression des nicht-myristylierten UL11-Proteins im Vergleich zu dem myristylierten Protein könnte sein, dass die transfizierten Zellen das nicht myristylierte Protein als fehlgefaltetes Protein aussortieren. Die fehlende Myristylierung könnte auch zu einer veränderten Sekundär- und Tertiärstruktur des UL11-Proteins führen, so dass das Epitop, das durch das anti-UL11-Serum erkannt wird, nur noch beschränkt zugänglich ist. Dagegen spricht jedoch, dass die Proteine bei der Analyse mittels Western Blot denaturiert werden und sämtliche lineare Epitope für das Antiserum zugänglich sein müssten.

Nach Immunfluoreszenzfärbung der transfizierten Zellen konnten keine abweichenden Fluoreszenzmuster festgestellt werden. Sowohl in UL11- als auch in UL11 $\Delta$ myr-exprimierenden Zellen war das Protein im Bereich des Golgi-Apparates und in zellulären Membranen zu finden. Das widerlegt die Hypothese dieser Arbeit, dass die Myristylierung für eine Membranbindung des UL11-Proteins verantwortlich ist. Es scheint weitere Mechanismen der Membranverankerung des Tegumentproteins pUL11 zu geben. Eine Modifikation des Proteins durch Palmitoylierung wäre dabei durchaus denkbar. Bei der Palmitoylierung eines Proteins wird die gesättigte Fettsäure Palmitinsäure posttranslational auf einen Cysteinrest übertragen. Auch das UL11-Produkt von HSV-1 ist myristyliert und palmitoyliert (LOOMIS et al., 2001).

---

Funktion des UL11-Proteins im „viral egress“ und „cell-to-cell-spread“

Dem UL11-Protein von EHV-1 wurde bereits eine Funktion beim „viral egress“ und vor allem beim „cell-to-cell-spread“ nachgewiesen (SCHIMMER und NEUBAUER, 2003). Um diese Funktion besser einordnen zu können, wurden die UL11-spezifischen Sequenzen vor dem genetischen Hintergrund verschiedener EHV-1-Isolate (RacL22, RacL11) und -Stämme (KyA) deletiert. In dem Genom des Stammes KyA sind unter anderem Deletionen in den für die Glykoproteine E und I kodierenden Genen zu finden. Diese beiden Glykoproteine, die beim „cell-to-cell-spread“ von Bedeutung sind, werden dadurch nicht mehr exprimiert. Eine UL11- und UL49-deletierte Doppelmutante wurde hergestellt, um auf eine mögliche Interaktion des UL11-Produktes mit dem Tegumentprotein pUL49, für das auch eine Funktion bei der Ausbreitung von EHV-1 direkt von Zelle zu Zelle angenommen wurde, rückschließen zu können. Bei dem UL11-negativen Virus L22 $\Delta$ 11 wurde der Großteil des UL11-ORFs durch eine *LacZ*-Kassette ersetzt, bei den UL11-deletierten Viren L11 $\Delta$ 11, KyA $\Delta$ 11 und L11 $\Delta$ 49 $\Delta$ 11 durch eine 82 bp große Fremdsequenz. Um die Auswirkungen der Deletion der UL11-spezifischen Sequenzen in der Doppelmutante L11 $\Delta$ 49 $\Delta$ 11 beurteilen zu können, wurde ein UL49-negatives Virus konstruiert. Der offene Leserahmen UL49 wurde dabei komplett deletiert und durch ein Kanamycin-Resistenzgen ersetzt. Die Replikationseigenschaften der rekombinanten Viren wurden auf Rk13-Zellen, die nicht für das UL11-Protein komplementieren, untersucht.

Dabei waren auch die mehrfach deletierten Viren KyA $\Delta$ 11 und L11 $\Delta$ 49 $\Delta$ 11 vermehrungsfähig. Anscheinend führt weder die Dreifach- noch die Doppeldeletion zur vollständigen Blockierung eines Replikationsschrittes.

Zur Untersuchung der Bedeutung des UL11-Proteins für den Virus-Egress in den entsprechenden Viren wurden die Einschnitt-Wachstumswerte 12 h p.i. verglichen. Der EHV-1-Stamm KyA führte dabei sowohl extra- als auch intrazellulär zu höheren Titern als die Wildtyp-Isolate RacL22 und RacL11. Dieser Wachstumsvorteil des avirulenten KyA könnte auf dessen bessere Zellkultur-Adaptierung aufgrund wiederholter Passagierung zurückzuführen sein. Die Titerunterschiede der beiden EHV-1-Isolate RacL22 und RacL11 waren so gering, dass von einer gleichen Vermehrungsfähigkeit in Zellkultur ausgegangen werden kann. Das rekombinante Virus L11 $\Delta$ 49 wies extrazellulär geringere Titer als RacL22 und RacL11 auf. Diese Beobachtung könnte als erster Hinweis auf eine Funktion des Tegumentproteins pUL49 von EHV-1 beim „viral egress“ gewertet werden. Eine genauere

Einordnung der Bedeutung des Proteins in diesem Zusammenhang ist jedoch aufgrund fehlender struktureller und weiterer funktioneller Untersuchungen noch nicht möglich, war aber auch nicht Gegenstand dieser Arbeit. Bei HSV-1 scheint das Protein keine Rolle bei der Ausschleusung von Virionen aus der Zelle zu spielen (POMERANZ und BLAHO, 2000).

Um die Auswirkungen der Deletion der UL11-spezifischen Sequenzen in den jeweiligen Ausgangsviren besser beurteilen zu können, wurden die von den UL11-deletierten Viren erbrachten Titer in Relation zu den Titern ihrer Ausgangsviren gesetzt. Dabei wurde festgestellt, dass sich die fehlende Expression des UL11-Proteins bei allen untersuchten Viren auf die Replikation auswirkte. Die deutlichste Titerreduktion ergab sich bei der Doppelmutante L11 $\Delta$ 49 $\Delta$ 11. Während sich die Deletion des Großteils des UL11-ORFs bei den Wildtyp-Isolaten RacL11 und RacL22 in einer Reduktion der extrazellulären Titer um etwa 20 % auswirkte, war die extrazelluläre Infektiosität der UL11-UL49-Doppelmutante bezogen auf ihre Ausgangsmutante L11 $\Delta$ 49 um ca. 40 % erniedrigt. Diese Beobachtung könnte auf eine funktionelle Interaktion der UL11- und UL49-Proteine beim Virus-Egress hindeuten. Auch bezogen auf die Titer von RacL11 ergaben sich Hinweise auf ein Zusammenspiel dieser beiden Tegumentproteine. Der extrazelluläre Titer der Doppelmutante war dabei um 52 % reduziert, die entsprechenden Titer der jeweiligen Einzelmutanten jedoch nur um 17 % (L11 $\Delta$ 11) bzw. 23 % (L11 $\Delta$ 49). Die beiden Proteine pUL11 und pUL49 könnten sowohl physikalisch als auch funktionell miteinander interagieren. Für das UL11-Protein von EHV-1 wurde aufgrund seiner Lokalisation im Bereich des Golgi-Apparates eine Funktion bei der sekundären Umhüllung von Virionen vorgeschlagen. Es wurde vermutet, dass das Protein durch einen Myristinsäurerest in Membranen des TGN verankert ist und dadurch eine Verbindung der Virushülle mit dem Tegument herstellt (SCHIMMER, 2002). Bei dem Protein pUL49 könnte es sich, in Analogie zu HSV-1, um einen Bestandteil der mittleren Tegumentschicht handeln. In diesem Fall wäre es durchaus vorstellbar, dass das UL49-Protein einerseits mit pUL11 interagiert und andererseits die Verbindung zu weiteren Tegumentproteinen oder dem Kapsid von EHV-1 ermöglicht. Es ist jedoch auch denkbar, dass das Tegumentprotein pUL49, wie für das UL11-Protein vermutet, direkt mit Membranen interagiert. Das UL49-Protein von HSV-1 ist phosphoryliert und aufgrund der Konservierung des UL49-ORFs unter den Alphaherpesviren, kann für das Produkt von EHV-1 durchaus eine Modifikation durch Phosphorylierung angenommen werden. Die Bedeutung einer Phosphorylierung für die Golgi-Lokalisation einiger Membranproteine bei HSV-1 wurde gezeigt (LOOMIS et al., 2001). Daher könnte eine Interaktion der Proteine pUL11 und pUL49

auch durch ihre gemeinsame Lokalisation im Bereich des Golgi-Apparates erklärt werden. Gegen eine essentielle Funktion dieser Proteine bei der Strukturhaltung reifer Virionen spricht jedoch, dass das rekombinante Virus L11Δ49Δ11 trotz Deletion beider ORFs vermehrungsfähig war. Es scheint zumindest in Zellkultur weitere Faktoren zu geben, die einen Zusammenbau infektiöser Viruspartikel ermöglichen. Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass die beiden Proteine in der Zelle vollständig unabhängig voneinander agieren und nur ein additiver Einfluss durch die Doppelmutation auf die Replikation beobachtet wurde. Die 12 h p.i. beobachteten extra- und intrazellulären Titer waren insgesamt sehr niedrig, und bei geringen Titern wirken sich kleine Abweichungen in der Bestimmung der Plaquezahl zur Erfassung der Infektiosität relativ stark auf die Titer aus. In dem gE/gI-deletierten Stamm KyA schien sich die Deletion der UL11-spezifischen Sequenzen ebenfalls stärker auszuwirken als in den Isolaten RacL22 und RacL11. Eine Interaktion des UL11-Proteins mit den Glykoproteinen E und I kann dementsprechend nicht ausgeschlossen werden. Bei HSV-1 wurde für gE und gI eine Lokalisation im *trans*-Golgi-Netzwerk und eine Funktion bei der Umhüllung von Nukleokapsiden gezeigt (MCMILLAN und JOHNSON, 2001). Es könnte sein, dass das UL11-Produkt bei der zweiten Umhüllung der Virionen nicht über einen Myristinsäurerest, sondern durch Interaktion mit den zytoplasmatischen Anteilen von gE und/oder gI in den Membranen des TGN verankert ist. Dem UL49-Protein von PrV wurde eine spezifische Interaktion mit dem Glykoprotein E nachgewiesen (FUCHS et al., 2002). Dagegen spricht jedoch, dass die Assoziation des UL11-Proteins mit zellulären Membranen auch in transfizierten Zellen, also in Abwesenheit anderer viraler Proteine, beobachtet werden konnte.

Ein Zusammenhang zwischen den EHV-1-Proteinen gE, gI und UL11 wurde insbesondere bei den Vorgängen des „cell-to-cell-spread“ vermutet. Zur Klärung dieser Hypothese und einer möglichen Interaktion von pUL11 und pUL49 bei der Ausbreitung der Infektion direkt von Zelle zu Zelle, wurde der Plaquephänotyp der konstruierten Viren untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass sich die Deletion der UL11-spezifischen Sequenzen sowohl bei den EHV-1-Isolaten RacL22 und RacL11 als auch bei dem Stamm KyA und der Mutante L11Δ49 erheblich auf die Plaquegröße auswirkte. Eine Funktion des UL11-Proteins beim „cell-to-cell-spread“ konnte damit bestätigt werden. Die Plaques der UL11-deletierten Viren waren jedoch so klein, dass Unterschiede in der Größe kaum festzustellen waren und daher nicht in Relation zur Plaquegröße der Ausgangsviren gesetzt werden konnten. Dadurch konnten hier keine

Rückschlüsse auf mögliche Interaktionen des UL11-Proteins mit den viralen Glykoproteinen E und I oder dem Tegumentprotein pUL49 gezogen werden. Da jedoch sämtliche UL11-deletierte Viren zur Plaquebildung fähig waren, ist das UL11-Protein weder in Kombination mit der fehlenden Expression der Glykoproteine E und I noch zusammen mit dem Fehlen des UL49-Proteins als absolut essentiell für die Ausbreitung von EHV-1 direkt von Zelle zu Zelle anzusehen.

Die Plaquegrößen von RacL22, RacL11, KyA und L11 $\Delta$ 49 wurden ermittelt. Dabei zeigte sich, dass die Plaques des EHV-1-Stammes KyA nur 80 % der Plaquegröße von RacL11 erreichten. Diese sichtbare Beeinträchtigung im „cell-to-cell-spread“ könnte auf das Fehlen der für gE und gI kodierenden Gene zurückzuführen sein. Das UL49-Protein von EHV-1 scheint ebenfalls an den Vorgängen des „cell-to-cell-spread“ beteiligt zu sein. Die Plaques der UL49-Deletionsmutante waren im direkten Plaquevergleich mit RacL11 ebenfalls um ca. 20 % kleiner. Diese Beobachtung ist interessant, denn bis jetzt gibt es noch keine Funktionsvorschläge für das UL49-Protein von EHV-1. Das UL49-Protein könnte also durchaus, wie auch pUL20 und pUL11 in späten Stadien des Replikationszyklus von Bedeutung sein. Bei HSV-1 liegen Hinweise auf eine Funktion von pUL49 beim „cell-to-cell-spread“ vor (POMERANZ und BLAHO, 2000).

### 5.3 Assoziation von EHV-1-Proteinen mit Lipid Rafts

Lipid Rafts sind Domänen zellulärer Membranen, die unter anderem als bevorzugte Stellen des Zusammenbaus und der Umhüllung von HIV-1 und Influenza-Viren identifiziert wurden (NGUYEN und HILDRETH, 2000; SUOMALAINEN, 2002). Auch eine Funktion bei der Sortierung von neu gebildeten Proteinen vom *trans*-Golgi-Netzwerk zur apikalen Zellmembran polarisierter Zellen wurde ihnen nachgewiesen (PALADINO et al., 2002). Polarisierter Zellen spielen *in vivo* eine wichtige Rolle bei der Ausbreitung der EHV-1-Infektion. Im polarisierten Epithel des Respirationstraktes breiten sich die Viren durch „cell-to-cell-spread“ ohne die Zwischenstufe extrazellulärer Virionen aus. Da dem UL20-Protein von HSV-1 bereits eine Funktion im „cell-to-cell-spread“ nachgewiesen worden war, wurde zu Beginn dieser Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass das UL20-Protein von EHV-1 ebenfalls eine Rolle bei diesen Vorgängen spielen könnte. Eine Bedeutung von pUL20 von EHV-1 bei den Vorgängen des „cell-to-cell-spread“ konnte auch gezeigt werden. Das UL20-Protein von EHV-1 ist ein multipel hydrophobes Transmembranprotein und damit ein typisches „Raft-Protein“. Es war

daher durchaus vorstellbar, dass es mit Lipid Rafts assoziieren und bei der Sortierung von Proteinen eine Rolle spielen könnte. Für das UL11-Protein von EHV-1, dem ebenfalls eine Rolle beim „cell-to-cell-spread“ nachgewiesen worden war, wurde eine mögliche Assoziation mit Lipid Rafts bereits aufgrund dessen Konsensussequenz für eine N-Myristylierung diskutiert (SCHIMMER, 2002). Myristylierte Proteine können sich über die gesättigte Kohlenwasserstoffkette der Myristinsäure stabiler in die geordnete Lipid-Umgebung der Lipid Rafts einlagern als in die übrigen Membranbereiche.

Nach Isolierung von Lipid Rafts aus infizierten Rk13-Zellen wurde das UL11-Protein in Western Blot-Analysen eindeutig in Form einer starken Bande in den gleichen Fraktionen wie das zelluläre, mit Lipid Rafts assoziierte Protein Flotillin-2 gefunden. Dieses Ergebnis legt eine tatsächliche Raft-Assoziation von pUL11 nahe. Das Protein könnte dabei entweder über einen Myristinsäurerest mit den geordneten Lipid-Domänen interagieren oder auch über eine Modifikation durch Palmylierung, bei der die gesättigte Fettsäure Palmitinsäure angehängt wird. Bei HSV-1 wurde die Bedeutung einer Palmylierung des UL11-Proteins für dessen Golgi-Lokalisation und feste Membranverankerung gezeigt (LOOMIS et al., 2001). Das UL11-Protein von EHV-1, für das eine Lokalisation im Bereich des Golgi-Apparates ebenfalls gezeigt worden war, könnte also durchaus eine Rolle bei der Sortierung von Proteinen zur apikalen Zellmembran polarisierter Zellen spielen. Im Falle einer bevorzugten Virusumhüllung im Bereich von Lipid Rafts könnte das UL11-Protein eine Funktion in der Rekrutierung von Tegument- oder viralen Membranproteinen haben. Es ist vorstellbar, dass das UL11-Protein einerseits mit Tegumentproteinen interagiert und andererseits die Verbindung zur Virushülle herstellt.

Dem anti-UL20-Serum konnte auch eine Reaktivität mit den Lipid Raft-Fraktionen nachgewiesen werden. Diese war jedoch um ein Vielfaches schwächer als im Fall der Detektion des UL11-Proteins. Es ist nicht auszuschließen, dass es sich dabei um eine Verunreinigung der Raft-Fraktionen, die aufgrund ihrer Unlöslichkeit in kaltem, 1 %igem Triton X-100 isoliert worden waren, mit löslichen Proteinen handelt. Dafür spricht, dass auch andere Membranproteine von EHV-1, wie gM, gB und gD in den Lipid Raft-Fraktionen gefunden wurden. Im Fall einer spezifischen Affinität dieser viralen Membranproteine zu den geordneten Lipid-Domänen wären stärkere Reaktionen der Antiseren bzw. -körper zu erwarten gewesen. Die Virushülle von EHV-1 besteht aus modifizierten zellulären Membranen, in die virale Proteine eingelagert sind. Es wäre daher auch möglich, dass die viralen Strukturproteine pUL20, gM, gB und gD in den Raft-Fraktionen detektiert werden



konnten, da sie allgemein mit zellulären Membranen assoziieren, unabhängig davon, ob es sich um geordnete oder ungeordnete Membranbereiche handelt. Interessanterweise reagierte das UL34-Serum, das das Membranprotein pUL34 detektiert, im Western Blot stärker als die Antiseren und -körper der Proteine pUL20, gM, gB und gD mit den Lipid Raft-Fractionen. Für das UL34-Protein von EHV-1 wurde eine Lokalisation im Bereich der Kernmembranen und eine Funktion in frühen Stadien des „viral egress“ gezeigt (NEUBAUER et al., 2002). Bei HSV-1 und PrV führt die Deletion des UL34-ORFs zu einer drastischen Reduktion des ersten Umhüllungsschrittes und zur Akkumulation unbehüllter Kapside im Zellkern (METTENLEITER, 2002). Eine mögliche Assoziation des Proteins pUL34 mit Lipid Rafts könnte darauf hindeuten, dass diese geordneten Lipid-Domänen auch bei der Virusumhüllung von EHV-1 von Bedeutung sind. Vorausgesetzt, dass Lipid Rafts auch in Kernmembranen zu finden sind, könnten sie dort die erste Umhüllung von Kapsiden unterstützen.

Eine Assoziation des UL20-Proteins mit Lipid Rafts konnte zwar gezeigt werden, die Selektivität dieser Assoziation ist jedoch zu gering, um, anders als bei pUL11, auf einen spezifischen Mechanismus rückschließen zu können. Eine Basis für eine gemeinsame Funktion der EHV-1-Proteine pUL11 und pUL20 bei den Vorgängen des „cell-to-cell-spread“ konnte daher nicht gefunden werden. Es muss jedoch betont werden, dass im Rahmen dieser Arbeit mit nicht polarisierten Zellen gearbeitet wurde, die die Verhältnisse *in vivo* nicht korrekt wiedergeben. Es kann durchaus sein, dass die beiden Proteine unter anderen Bedingungen miteinander interagieren und in gleichen Strukturen der Zelle nachweisbar wären. Um das zu untersuchen, soll in Zukunft mit polarisierten Zellen gearbeitet werden.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY

### Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der UL11- und UL20-Homologe des equinen Herpesvirus Typ 1 (EHV-1). Dabei sollte vor allem auf deren Funktionen in späten Stadien des Replikationszyklus und auf ein mögliches Zusammenspiel dieser beiden Proteine eingegangen werden.

Zunächst wurde das UL20-Protein von EHV-1 identifiziert und sowohl strukturell als auch funktionell charakterisiert. Ein in Kaninchen hergestelltes Antiserum reagierte in Western Blot-Analysen spezifisch mit zwei Proteinen mit apparenten Molekulargewichten von 25 und 75 kDa, und trotz zweier Konsensussequenzen im offenen Leserahmen UL20 führte eine Hemmung der N-Glykosylierung des Proteins durch Tunicamycin zu keiner Veränderung dieser Laufeigenschaften. Das Protein, das ab 6 h p.i. in Zellen nachweisbar war, wurde der Klasse der  $\gamma_1$  („early-late“-)Proteine zugeordnet und als Bestandteil der Virushülle identifiziert. Eine Assoziation des UL20-Proteins mit zellulären Membranen zeigte sich nach Fraktionierung infizierter Zellen und nach Immunfluoreszenzfärbung UL20-exprimierender Zellen. Die beobachtete Fluoreszenz erstreckte sich dabei punktförmig über das gesamte Zytoplasma. UL20-Deletionsmutanten der EHV-1-Stämme RacL11 und RacH wurden über BAC-Mutagenese hergestellt. Die negativen Viren führten in Einschnitt-Wachstumskinetiken zu bis zu 1000fach geringeren extrazellulären Titern als die entsprechenden Wildtyp-Viren. Die intrazelluläre Infektiosität war dagegen nur um das 3fache erniedrigt. Diese Ergebnisse wiesen auf eine Funktion von pUL20 beim späten „viral egress“ hin. Eine Bedeutung des Proteins im „cell-to-cell-spread“, der Ausbreitung der Infektion direkt von Zelle zu Zelle, wurde durch Untersuchung des Plaquephänotyps gezeigt. Während die Ausgangsviren und Revertanten zu phänotypisch nicht unterscheidbaren, deutlichen Plaques führten, waren die Plaques der Deletionsmutanten sehr klein und bestanden aus nur wenigen infizierten Zellen. Eine initiale Charakterisierung des UL11-Proteins von EHV-1 liegt bereits vor. Das Tegumentprotein, das eine Konsensussequenz für eine N-Myristylierung aufweist, assoziiert in infizierten Zellen mit Membranen und spielt eine Rolle im „viral egress“ und vor allem im „cell-to-cell-spread“ (SCHIMMER, 2002; SCHIMMER und NEUBAUER, 2003). Zur genaueren Einordnung dieser Funktionen wurden die Auswirkungen der Deletion des Großteils der UL11-spezifischen Sequenzen auf die Replikation von EHV-1 in Zellkultur vor dem

genetischen Hintergrund verschiedener EHV-1-Isolate (RacL22, RacL11), -Stämme (KyA) und -Mutanten (L11 $\Delta$ 49) untersucht. Sämtliche rekombinante Viren waren auf nicht komplementierenden Zelllinien vermehrungsfähig. Das UL11-Protein ist daher auch in Verbindung mit der Deletion der für die Glykoproteine E und I kodierenden Gene (KyA) bzw. der fehlenden Expression des UL49-Proteins für die Replikation von EHV-1 in Zellkultur als nicht essentiell anzusehen. Die Bestimmung eines Wachstumswertes der Deletionsmutanten und Ausgangsviren ergab jedoch Hinweise auf eine mögliche funktionelle Interaktion von pUL11 mit den Glykoproteinen E und I bzw. dem Tegumentprotein pUL49, das ebenfalls eine Rolle im „viral egress“ zu spielen scheint. Die Funktion des UL11-Proteins im „cell-to-cell-spread“ konnte durch Untersuchungen des Plauephänotyps, bei dem die UL11-deletierten Viren zu deutlich kleineren Plaques als die Ausgangsviren führten, bestätigt, jedoch nicht genauer definiert werden. Untersuchungen eines in seiner Myristylierungs-Sequenz mutierten UL11-Proteins ergaben weder eine Verschiebung der Laufeigenschaften im Western Blot, noch eine veränderte Verteilung in der transfizierten Zelle. Für diese Parameter scheint die Myristylierung nicht von Bedeutung zu sein. Allerdings konnte eine Assoziation von pUL11 mit Lipid Rafts gezeigt werden. Diese muss über eine Modifikation des Proteins durch Myristylierung oder Palmytylierung vermittelt sein. Das UL20-Protein dagegen war nicht spezifisch in den Lipid Rafts angereichert. Von einem Zusammenspiel der beiden Proteine in diesen Membranbereichen in ihrer Funktion beim „cell-to-cell-spread“ ist daher nicht auszugehen.

## Summary

### **Identification and characterization of the equine herpesvirus type 1 proteins pUL11 and pUL20**

The aim of this study was to analyze the UL11 and UL20 homologs of the equine herpesvirus type 1 (EHV-1). Above all their functions in late events of the viral replication cycle and possible interactions were addressed.

First, the UL20 protein of EHV-1 was identified and characterized structurally and functionally. An antiserum raised in rabbits reacted in Western Blot analyses specifically with two proteins at  $M_r$ s of 25,000 and 75,000 and despite two N-glycosylation sites within UL20-sequences, inhibition of N-glycosylation with Tunicamycin revealed no apparent changes. The UL20 product that was detectable as early as 6 h p.i. in cells was classified as a  $\gamma_1$  (early-late)-protein and found to be part of the viral envelope. An association of pUL20 with cellular membranes was shown after fractionation of infected cells as well as after immunofluorescence staining of UL20 expressing cells. The UL20 specific fluorescence was noted throughout the cytoplasm in a fine granular pattern. UL20 sequences were deleted of EHV-1 strains RacL11 and RacH using BAC-mutagenesis. In one-step growth kinetics up to 1000fold reduced levels in extracellular infectivity of the UL20-negative viruses compared to those of parental or UL20-repaired viruses could be demonstrated. In contrast, intracellular titers were only reduced slightly. Taken together, these results indicated a function of pUL20 in late events of the viral egress. Performing plaquephenotype assays the protein was suggested to be important in cell-to-cell-spread as in comparison to wildtype and UL20 repaired viruses, the plaques of the deletion mutants were very small and consisted of few infected cells only.

The UL11 homolog of EHV-1 has been previously characterized. The tegument protein that carries a myristoylation consensus site within its ORF associates with cellular membranes and is important for viral egress and in particular for cell-to-cell-spread (SCHIMMER, 2002; SCHIMMER and NEUBAUER, 2003). To further define these functions the effects of the deletion of UL11 specific sequences were analyzed against the genomic background of different EHV-1 isolates (RacL22, RacL11), strains (KyA) and mutants (L11 $\Delta$ 49). All recombinant viruses replicated on non complementing cell lines. Therefore, the UL11 protein was shown to be nonessentiell for replication of EHV-1 *in vitro* even when deleted in combination with

the genes encoding for the glycoproteins E and I (KyA) or the UL49 protein, VP22. Performing one-step replication assays of the parental viruses and their recombinant derivatives a possible functional interaction of pUL11 with the glycoproteins E and I and especially pUL49 was still suggested. In addition, the UL49 protein was shown to be involved in viral egress. Plaquephenotype assays in which the UL11 deleted viruses resulted in markedly smaller plaques than parental viruses enabled confirmation but no further definition of the function of pUL11 in cell-to-cell-spread. Analysis of an UL11 protein that was mutated in its myristoylation site did neither reveal any changes in the electrophoretic mobility in Western Blot analyses nor a modification of the distribution of fluorescence in transfected cells. It was thus concluded that for these parameters myristoylation of pUL11 is not important. Nevertheless, an association of pUL11 with lipid rafts that has to be mediated by a modification of the protein by either myristoylation or palmitoylation was shown. In contrast, the multiple hydrophobic pUL20 was not specifically enriched in lipid rafts. Therefore, an interaction of these proteins at rafts to mediate a common function in cell-to-cell-spread can be excluded.

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

**ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. und WATSON, J.D.** 1990. Molekularbiologie der Zelle. 2. Auflage. VCH Verlagsgesellschaft mbH

**ALLEN, G.P. und BRYANS, J.T.** 1986. Molecular Epizootology, Pathogenesis and Prophylaxis of Equine Herpesvirus-1 Infection, in: Progresses in Veterinary Microbiology and Immunology, Vol. 2. Karger, Basel, Switzerland. pp. 78-144

**ALLEN, G.P., KYDD, J.H., SLATER, J.D. und SMITH, K.C.** 1999. Advances in Understanding of the Pathogenesis, Epidemiology and Immunological Control of Equine Herpesvirus Abortion, in: Equine Infectious Diseases VIII. Proceedings of the Eighth International Conference. Dubai, 23<sup>rd</sup>–26<sup>th</sup> March 1998. R&W Publications (Newmarket) Limited

**ALLEN, G.P. und YEARGAN, M.R.** 1987. Use of  $\lambda$ gt11 and Monoclonal Antibodies to Map the Genes for the Six Major Glycoproteins of Equine Herpesvirus 1. *J. Virol.* 61, 2454-2461

**AUSTEN, B.M. und WESTWOOD, O.M.R.** 1991. Protein Targeting and Secretion. IRL Press at Oxford University Press. Oxford, New York, Tokyo.

**AVITABILE, E., WARD, P.L., LAZZARO DI, C., TORRISI, M.R., ROIZMAN, B. und CAMPADELLI-FIUME, G.** 1994. The Herpes Simplex Virus UL20 Protein Compensates for the Differential Disruption of Exocytosis of Virions and Viral Membrane Glycoproteins Associated with Fragmentation of the Golgi Apparatus. *J. Virol.* 68, 7397-7405

**AVITABILE, E., GAETA DI, S., TORRISI, M.R., WARD, P.L., ROIZMAN, B. und CAMPADELLI-FIUME, G.** 1995. Redistribution of Microtubules and Golgi Apparatus in Herpes Simplex Virus-Infected Cells and Their Role in Viral Exocytosis. *J. Virol.* 69, 7472-7482

**BAGHIAN, A., HUANG, L., NEWMAN, S., JAYACHANDRA, S. und KOUSOULAS, B.** 1991. Truncation of the Carboxy-Terminal 28 Amino Acids of Glycoprotein gB Specified by Herpes Simplex Virus Type 1 Mutant Amb 1511-7 Causes Extensive Cell Fusion. *J. Virol.* 67, 2396-2401

**BAINES, J.D., WARD, P.L.; CAMPADELLI-FIUME, G. und ROIZMAN, B.** 1991. The UL20 Gene of Herpes Simplex Virus 1 Encodes a Function Necessary for Viral Egress. *J. Virol.* 65, 6414-76424

**BAINES, J.D. und ROIZMAN, B.** 1992. The UL11 Gene of Herpes Simplex Virus 1 Encodes a Function That Facilitates Nucleocapside Envelopment and Egress from Cells. *J. Virol.* 66, 5168-5174

**BAINES, J.D., JACOB, R. J., SIMMERMAN, L. und ROIZMAN, B.** 1995. The Herpes Simplex Virus 1 UL11 Proteins Are Associated with Cytoplasmic and Nuclear Membranes and with Nuclear bodies of Infected Cells. *J. Virol.* 69, 825-833

**BIRKENMAIER, S.** 1991. Charakterisierung der Inverted Repeat-Regionen im Genom verschiedener Zellkulturpassagen des equinen Herpesvirus 1 Stammes RacH. *Vet. med. Diss.*, München

**BOWZARD, J.B., VISALLI, R.J., WILSON, C.B., LOOMIS, F.S., CALLAHAN, E.M., COURTNEY, R. J. und WILLS, J.W.** 2000. Membrane Targeting Properties of a Herpesvirus Tegument Protein-Retrovirus Gag Chimera. *J. Virol.* 74, 8692-8699

**BRIGGS, J.A., WILK, T. und FULLER, S.D.** 2003. Review. Do Lipid Rafts Mediate Virus Assembly and Pseudotyping? *J. Gen. Virol.* 84,757-768

**BRIGNATI, M.J., LOOMIS, J.S., WILLS, J.W. und COURTNEY, R.J.** 2003. Membrane Association of VP22, a Herpes Simplex Virus Type 1 Tegument Protein. *J. Virol.* 77, 4888-4898

- BROWN, D.A. und LONDON, E.** 2000. Minireview. Structure and Function of Sphingolipid- and Cholesterol-Rich Membrane Rafts. *J. Biol. Chem.* 275, 17221-17224
- BROWNE, H., BELL, S., MINSON, T. und WILSON, D.W.** 1996. An Endoplasmic Reticulum-Retained Herpes Simplex Virus Glycoprotein H Is Absent from Secreted Virions: Evidence for Reenvelopment during Egress. *J. Virol.* 70, 4311-4316
- CAMPBELL, S.M., CROWE, S.M. und MAK, J.** 2001. Lipid Rafts and HIV-1: From Viral Entry to Assembly of Progeny Virions. *J. Clin. Virol.* 22, 217-227. Review
- CAUGHMAN, G.B., STACZEK, J. und O'CALLAGHAN, D.J.** 1985. Equine Herpesvirus Type 1 Infected Cell Polypeptides: Evidence for Immediate Early / Early / Late Regulation of Viral Gene Expression. *Virology* 145, 49-61
- COLLE, C.F. 3RD, TARBET, E.B., GRAFTON, W.D., JENNINGS, S.R und O'CALLAGHAN, D.J.** 1996. Equine Herpesvirus-1 Strain KyA, a Candidate Vaccine Strain, Reduces Viral Titers in Mice Challenged with a Pathogenic Strain, RacL. *Virus Res.* 43, 111-124
- COLLINS, W.J. und JOHNSON, D.C.** 2003. Herpes Simplex Virus gE/gI Expressed in Epithelial Cells Interferes with Cell-to-Cell-Spread. *J. Virol.* 77, 2686-2695
- CSELLNER, H., WALKER, C., WELLINGTON, J.E., MCLURE, L.E. und WHALLEY, J.M.** 2000. EHV-1 Glycoprotein D (EHV-1 gD) Is Required for Virus Entry and Cell-Cell Fusion, and an EHV-1 gD Deletion Mutant Induces a Protective Immune Response in Mice. *Arch. Virol.* 145, 2371-2385
- DATSENKO, K.A. und WANNER, B.L.** 2000. One-Step Inactivation of Chromosomal Genes in *Escherichia coli* K-12 Using PCR Products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 6640-6645
- DAVISON, A.J. und SCOTT, J.E.** 1986. The Complete DNA Sequence of Varizella-Zoster Virus. *J. Gen. Virol.* 67, 1759-1816



**DIETZ, P., KLUPP, B.G., FUCHS, W., KÖLLNER, B., WEILAND, E. und METTENLEITER, T.C.** 2000. Pseudorabies Virus Glycoprotein K Requires the UL20 Gene Product for Processing. *J. Virol.* 74, 5083-5090

**DIJKSTRA, J.M., FUCHS, W., METTENLEITER, T.C. und KLUPP, B.G.** 1997. Identification and Transcriptional Analysis of Pseudorabies Virus UL6 to UL12 Genes. *Arch. Virol.* 142, 17-35

**DINGWELL, K.S. und JOHNSON, D.C.** 1998. The Herpes Simplex Virus gE-gI Complex Facilitates Cell-to-Cell-Spread and Binds to Components of Cell Junctions. *J. Virol.* 72, 8933-8942

**DOLAN, A., JAMIESON, F.E., CUNNINGHAM, C., BARNETT, B.C. und MCGEOCH, D.J.** 1998. The Genome Sequence of Herpes Simplex Virus Type 2. *J. Virol.* 72, 2010-2021

**DORANGE, F., TISCHER, B.K., VAUTHEROT, J.F. und OSTERRIEDER, N.** 2002. Characterization of Marek's Disease Virus Serotype 1 (MDV-1) Deletion Mutants That Lack UL46 to UL49 Genes: MDV-1 UL49, Encoding VP22, is Indispensable for Virus Growth. *J. Virol.* 76, 1959-1970

**EDINGTON, N., BRIDGES, C.G. und HUCKLE, A.** 1985. Experimental Reactivation of Equid Herpesvirus-1 (EHV-1) Following the Administration of Corticosteroids. *Equine Vet. J.* 17, 369-372

**EDINGTON, N., BRIDGES, C.G. und PATEL, J.R.** 1986. Endothelial Cell Infection and Thrombosis in Paralysis Caused by Equid Herpesvirus-1: Equines Stroke. *Arch. Virol.* 90, 111-124

**VON EINEM, J., WELLINGTON, J., WHALLEY, J.M., OSTERRIEDER, K., O'CALLAGHAN, D.J., und OSTERRIEDER, N.** 2002. The Truncated Form of Glycoprotein gp2 of Equine Herpesvirus 1 (EHV-1) Vaccine Strain KyA is not Functionally Equivalent to Full-Length gp2 Encoded by EHV-1 Wild-Type Strain RacL11. *J. Virol.* 78, 3003-3013

**ELLIOTT, G. und O'HARE, P.** 1998. Herpes Simplex Virus Type 1 Tegument Protein VP22 Induces the Stabilization and Hyperacetylation of Microtubules. *J. Virol.* 72, 6448-6455

**ELLIOTT, G. und O'HARE, P.** 2000. Cytoplasm-to-Nucleus Translocation of a Herpesvirus Tegument Protein During Cell Division. *J. Virol.* 74, 2131-2141

**FEINBERG, A.P. und VOGELSTEIN, B.** 1983. A Technique for Radiolabeling DNA Restriction Endonuclease Fragments to High Specific Activity. *Anal. Biochem.* 132, 6-13

**FLINT, S.J., ENQUIST, L.W., KRUG, R.M., RACANIELLO, V.R. und SKALKA, A.M.** 2000. Principles of Virology. Molecular Biology, Pathogenesis, and Control. ASM Press. Washington, D.C.

**FOSTER, T.P., ALVAREZ, X. und KOUSOULAS, K.G.** 2003. Plasma Membrane Topology of Syncytial Domains of Herpes Simplex Virus Type 1 Glycoprotein K (gK): the UL20 Protein Enables Cell Surface Localization of gK but Not gK-Mediated Cell-to-Cell Fusion. *J. Virol.* 77, 499-510

**FOSTER, T.P., RYBACHUK, G.V., ALVAREZ, X., BORKHSENIUS, O. und KOUSOULAS, K.G.** 2004. Overexpression of gK in gK-Transformed Cells Collapses the Golgi Apparatus into the Endoplasmic Reticulum Inhibiting Virion Egress, Glycoprotein Transport, and Virus-Induced Cell Fusion. *Virology* 317, 237-252

**FOSTER, T.P., RYBACHUK, G.V. und KOUSOULAS, K.G.** 2001. Glycoprotein K Specified by Herpes Simplex Virus Type 1 Is Expressed on Virions as a Golgi Complex-Dependent Glycosylated Species and Functions in Virion Entry. *J. Virol.* 75, 12431-12438

**FREY, H.-R.** 2003. Virusabort der Stuten in: Liess, B. und Kaaden, O.R. (Hrsg.), Virusinfektionen bei Haus- und Nutztieren. 2. Auflage. Schlütersche GmbH&Co.KG

**FUCHS, W., GRANZOW, H. und METTENLEITER, T.C.** 1997. Functional Complementation of UL3.5-Negative Pseudorabies Virus by the Bovine Herpesvirus 1 UL3.5 Homolog. *J. Virol.* 71, 8886-8892

**FUCHS, W., KLUPP, B.G., GRANZOW, H. und METTENLEITER, T.C.** 1997. The UL20 Gene Product of Pseudorabies Virus Functions in Virus Egress. *J. Virol.* 71, 5639-5646

**FUCHS, W. und METTENLEITER, T.C.** 1999. DNA Sequence of the UL6 to UL20 Genes of Infectious Laryngotracheitis Virus and Characterization of the UL10 Gene Product as a Nonglycosylated and Nonessential Virion Protein. *J. Gen. Virol.* 80, 2173-2182

**FUCHS, W., KLUPP, B.G., GRANZOW, H., HENGARTNER, C., BRACK, A., MUNDT, A., ENQUIST, L.W. und METTENLEITER, T.C.** 2002. Physical Interaction Between Envelope Glycoproteins E and M of Pseudorabies Virus and the Major Tegument Protein UL49. *J. Virol.* 76, 8208-8217

**GAGE, P.J., LEVINE, M. und GLORIOSO, J.C.** 1993. Syncytium-Inducing Mutations Localize to Two Discrete Regions within the Cytoplasmic Domain of Herpes Simplex Virus Type 1 Glycoprotein B. *J. Virol.* 67, 2191-2201

**GEISS, B.J., TAVIS, J.E., METZGER, L.M., LEIB, D.A. und MORRISON, L.A.** 2001. Temporal Regulation of Herpes Simplex Virus Type 2 VP22 Expression and Phosphorylation. *J. Virol.* 75, 10721-10729

**GIBSON, J.S., SLATER, J.D., AWAN, A.R. und FIELD, H.J.** 1992. Pathogenesis of Equine Herpesvirus-1 in Specific Pathogen-Free Foals: Primary and Secondary Infections and Reactivation. *Arch. Virol.* 123, 351-366

**GOODMAN, J.L., COOK, M.L., SEDERATI, F., IZUMI, K. und STEVENS, J.G.** 1989. Identification, Transfer, and Characterization of Cloned Herpes Simplex Virus Invasiveness Regions. *J. Virol.* 63, 1153-1161

**GRAHAM, F.L. und VAN DER EB, A.J.** 1973. A New Technique for the Assay of Infectivity of Human Adenovirus. *Virology* 52, 456-467

**GRANZOW, H., WEILAND, F., JÖNS, A., KLUPP, B.G., KARGER, A. und METTENLEITER, T.C.** 1997. Ultrastructural Analysis of the Replication Cycle of Pseudorabies Virus in Cell Culture: A Reassessment. *J. Virol.* 71, 2072-2082

**GRANZOW, H., KLUPP, B.G., FUCHS, W., VEITS, J., OSTERRIEDER, N. und METTENLEITER, T.C.** 2001. Egress of Alphaherpesviruses: Comparative Ultrastructural Study. *J. Virol.* 75, 3675-3684

**HAMILTON, V.T., STONE, D.M. und CANTOR, G.H.** 2003. Translocation of the B Cell Receptor to Lipid Rafts Is Inhibited in B Cells from BLV-Infected, Persistent Lymphocytosis Cattle. *Virology* 315, 135-147

**HARLEY, C.A., DASGUPTA, A. und WILSON, D.W.** 2001. Characterization of Herpes Simplex Virus-Containing Organelles by Subcellular Fractionation: Role for Organelle Acidification in Assembly of Infectious Particles. *J. Virol.* 75, 1236-1251

**HATAMA, S., JANG, H.K., IZUMIYA, Y., CAI, J.S., TSUSHIMA, Y., KATO, K., MIYAZ, T., KAI, C., TAKAHASHI, E. und MIKAMI, T.** 1999. Identification and DNA Sequence Analysis of the Marek's Disease Virus Serotype 2 Genes Homologous to the Herpes Simplex Virus Type 1 UL20 and UL21. *J. Vet. Med. Sci.* 61, 587-593

**HENRY, B.E., ROBINSON, R.A., DAUENHAUER, S.A., ATHERTON, S.S., HAYWARD, G.S. und O'CALLAGHAN, D.J.** 1981. Structure of the Genome of Equine Herpesvirus Type 1. *Virology* 115, 97-114

**HEROLD, B.C., WUDUNN, D., SOLTYS, M. und SPEAR, P.G.** 1991. Glycoprotein C Independent Binding of Herpes Simplex Virus 1 to Cells Depends on the Presence of Cell Surface Heparan Sulfate and Virion Glycoprotein B. *J. Virol.* 65, 1090-1098

**HÜBERT, P.H., BIRKENMAIER, S., RZIHA, H.J. und OSTERRIEDER, N.** 1996. Alterations in the Equine Herpesvirus Type-1 (EHV-1) Strain RacH during Attenuation. *J. Vet. Med. B* 43, 1-14

**HUTCHINSON, L. und JOHNSON, D.C.** 1995. Herpes Simplex Virus Glycoprotein K Promotes Egress of Virus Particles. *J. Virol.* 69, 5401-5413

**HUTCHINSON, L., ROOP-BEAUCHAMP, C. und JOHNSON, D.C.** 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

**JOHNSON, D.C. und HUBER, M.T.** 2002. Directed Egress of Animal Viruses Promotes Cell-to-Cell-Spread. *J. Virol.* 76, 1-8

**KLUPP, B.G., KERN, H. und METTENLEITER, T.C.** 1992. The Virulence Determining Genomic *Bam*HI Fragment 4 of Pseudorabies Virus Contains Genes Corresponding to the UL15 (Partial), UL18, UL19, UL20, and UL21 Genes of Herpes Simplex Virus and a Putative Origin of Replication. *Virology* 191, 900-908

**KOTSAKIS, A., POMERANZ, L.E., BLOUIN, A. und BLAHO, J.A.** 2001. Microtubule Reorganization During Herpes Simplex Virus Type 1 Infection Facilitates the Nuclear Localization of VP22, a Major Virion Tegument Protein. *J. Virol.* 75, 8697-8711

**LEE, G.E., CHURCH, G.A. und WILSON, D.W.** 2003. A Subpopulation of Tegument Protein vhs Localizes to Detergent-Insoluble Lipid Rafts in Herpes Simplex Virus-Infected Cells. *J. Virol.* 77, 2038-2045

**LEWIN, B.** 1998. Molekularbiologie der Gene. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg. Berlin

**LOOMIS, J.S., BOWZARD, J.B., COURTNEY, R.J. und WILLS, J.W.** 2001. Intracellular Trafficking of the UL11 Tegument Protein of Herpes Simplex Virus Type 1. *J. Virol.* 75, 12209-12219

**MARTIN, A., O'HARE, P., MCCLAUCHLAN, J. und ELLIOTT, G.** 2002. Herpes Simplex Virus Tegument protein VP22 Contains Overlapping Domains for Cytoplasmic Localization, Microtubule Interaction, and Chromatin Binding. *J. Virol.* 76, 4961-4970

**MATSUMARA, T., O'CALLAGHAN, D.J., KONDO, T. und KAMADA, M.** 1996. Lack of Virulence of the Murine Fibroblast Adapted Strain, Kentucky A (KyA), of Equine Herpesvirus Type 1 (EHV-1) in Young Horses. *Vet. Microbiol.* 48, 353-365

**MAYR, A., BÖHM, H.O., BRILL, J. und WOYCIECHOWSKA, S.** 1965. Charakterisierung eines Stutenabortvirus aus Polen und Vergleich mit bekannten Rhinopneumonitisvirus-Stämmen des Pferdes. *Arch. Virol.* 17, 216-229

**MAYR, A., PETTE, J., PETZOLD, K. und WAGENER, K.** 1968. Untersuchungen zur Entwicklung eines Lebendimpfstoffes gegen die Rhinopneumonitis (Stutenabort) der Pferde. *J. Vet. Med. B* 15, 406-418

**MCGEOCH, D.J., DALRYMPLE, M.A., DAVISON, A.J., DOLAN, A., FRAME, M.C., MCNAB, D., PERRY, L.J., SCOTT, J.E. und TAYLOR, P.** 1988. The Complete DNA Sequence of the Long Unique Region in the Genome of Herpes Simplex Virus Type 1. *J. Gen. Virol.* 69, 1531-1574

**MCLEAN, C.A., CLARK, B. und MCGEOCH, D.J.** 1989. Gene UL11 of Herpes Simplex Virus Type 1 Encodes a Virion Protein which Is Myristylated. *J. Gen. Virol.* 70, 3147-3157

**MCLEAN, C.A., EFSTATHIOU, S., ELLIOTT, M.L., JAMIESON, F.E. und MCGEOCH, D.J.** 1991. Investigation of Herpes Simplex Virus Type 1 Genes Encoding Multiply Inserted Membrane Proteins. *J. Gen. Virol.* 72, 897-906

**MCLEAN, C.A., DOLAN, A., JAMIESON, F.E. und MCGEOCH, D.J.** 1992. The Myristylated Virion Proteins of Herpes Simplex Virus Type 1: Investigation of their Role in the Virus Life Cycle. *J. Gen. Virol.* 73, 539-547

**MCMILLAN, T.N. und JOHNSON, D.C.** 2001. Cytoplasmic Domain of Herpes Simplex Virus gE Causes Accumulation in the *trans*-Golgi Network, a Site of Virus Envelopment and Sorting of Virions to Cell Junctions. *J. Virol.* 75, 1928-1940

**MELKONIAN, K.A., OSTERMEYER, A.G., CHEN, J.Z., ROTH, M.G. und BROWN, D.A.** 1999. Role of Lipid Modifications in Targeting Proteins to Detergent-Resistant Membrane Rafts. Many Raft Proteins are Acylated, while Few Are Prenylated. *J. Biol. Chem.* 274, 3910-3917

**METTENLEITER, T.C.** 2002. Herpesvirus Assembly and Egress. *J. Virol.* 76, 1527-1547

**MEYER, H., HÜBERT, P.H. und EICHHORN, W.** 1987. Changes in Restriction Enzyme Pattern of the Equine Herpesvirus Type 1 (EHV-1) Strain RacH During Attenuation. *J. Vet. Med. B* 34, 310-313

**MEYER, H. und HÜBERT, P.H.** 1988. Isolation and Characterization of Monoclonal Antibodies Against an Attenuated Vaccine Strain of Equine Herpesvirus Type 1 (EHV-1). *Vet. Microbiol.* 18, 95-101

**MURPHY, F.A., GIBBS, E.P., HORZINEK, M.C. und STUDDERT, M.J.** 1999. Veterinary Virology. 3<sup>rd</sup> Edition. Academic Press

**NEUBAUER, A., BRAUN, B., BRANDMÜLLER, C., KAADEN, O.-R. und OSTERRIEDER, N.** 1997. Analysis of the Contributions of the Equine Herpesvirus 1 Glycoprotein gB Homolog to Virus Entry and Direct Cell-to-Cell-Spread. *Virology* 227, 281-294

**NEUBAUER, A., RUDOLPH, J., BRANDMÜLLER, C., JUST, F. und OSTERRIEDER, N.** 2002. The Equine Herpesvirus 1 UL34 Gene Product Is Involved in an Early Step in Virus Egress and Can Be Efficiently Replaced by a UL34-GFP Fusion Protein. *Virology* 300, 189-204

**NEUMANN-GIESEN, C., FALKENBACH, B., BEICHT, P., CLAASEN, S., LÜERS, G., STUERMER, C.A.O., HERZOG, V. und TIKKANEN, R.** 2003. Membrane and Rafts Association of Reggie-1/Flotillin-2: Role of Myristoylation, Palmitoylation and Oligomerization. Induction of Filopodia by Overexpression. *Biochem. J.* 378, 509-518

**NGUYEN, D.H. und HILDRETH, J.E.** 2000. Evidence for Budding of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Selectively from Glycolipid-Enriched Membrane Lipid Rafts. *J. Virol.* 74, 3264-3272

**O'CALLAGHAN, D.J., COLLE, C.F. 3RD, FLOWERS, C.C., SMITH, R.H., BENOIT, J.N. und BIGGER, C.A.** 1994. Identification and Initial Characterization of the IR6 Protein of Equine Herpesvirus 1. *J. Virol.* 68, 5351-5364

**OETTLER, D., KAADEN, O.-R. und NEUBAUER, A.** 2001. The Equine Herpesvirus 1 UL45 Homolog Encodes a Glycosylated Type II Transmembrane Protein and Is Involved in Virus Egress. *Virology* 279, 302-312

**OSTERRIEDER, N., HÜBERT, P.H., BRANDMÜLLER, C. und KAADEN, O.-R.** 1994. A Touchdown PCR for the Differentiation of Equine Herpesvirus Type 1 (EHV-1) Field Strains from the Modified Live Vaccine Strain RacH. *J. Virol. Meth.* 50, 129-136

**OSTERRIEDER, N., HOLDEN, V.R., BRANDMÜLLER, C., NEUBAUER, A., KAADEN, O.-R. und O'CALLAGHAN, D.J.** 1996. The Equine Herpesvirus 1 IR6 Protein is Nonessential for Virus Growth in Vitro and Modified by Serial Passage in Cell Culture. *Virology* 217, 442-451

**OSTERRIEDER, N., NEUBAUER, A., BRANDMÜLLER, C., BRAUN, B. KAADEN, O.-R. und BAINES, J.D.** 1996a. The Equine Herpesvirus 1 Glycoprotein gp21/22a, the Herpes Simplex Virus Type 1 gM Homolog, Is Involved in Virus Penetration and Cell-to-Cell-Spread of Virions. *J. Virol.* 70, 4110-4115

**OSTERRIEDER, N., NEUBAUER, A., BRANDMÜLLER, C., KAADEN, O.-R. und BAINES, J.D.** 1996b. The Equine Herpesvirus 1 IR6 Protein Influences Virus Growth at Elevated Temperature and Is a major Determinant of Virulence. *Virology* 226, 243-251

**OSTERRIEDER, N., KAADEN, O.-R. und NEUBAUER, A.** 1998a. Structure and Function of Equine Herpesvirus Glycoproteins - A Review. in: *Equine Infectious Diseases VIII*, 111-118

**OSTERRIEDER, N., NEUBAUER, A., BRANDMÜLLER, C., KAADEN, O.-R. und O'CALLAGHAN, D.J.** 1998b. The Equine Herpesvirus 1 IR6 Protein That Colocalizes with Nuclear Lamins Is Involved in Nucleocapsid Egress and Migrates from Cell to Cell Independently of Virus Infection. *J. Virol.* 72, 9806-9817



**OSTERRIEDER, N.** 1999. Construction and Characterization of an Equine Herpesvirus 1 Glycoprotein C Negative Mutant. *Virus Res.* 59, 165-177

**OSTERRIEDER, N.** 1999. Sequence and Initial Characterization of the UL10 (Glycoprotein M) and UL11 Homologous Genes of Serotype 1 Marek's Disease Virus. *Arch. Virol.* 144, 1853-1863

**OSTERRIEDER, N., SCHUMACHER D., TRAPP, S., BEER, M., VON EINEM J. und TISCHER, K.** 2003. Establishment and Use of Infectious Bacterial Artificial Chromosome (BAC) DNA Clones of Animal Herpesviruses. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 116, 373-380

**PALADINO, S., SARNATARO, D. und ZURZOLO, C.** 2002. Detergent-Resistant Membrane Microdomains and Apical Sorting of GPI-Anchored Proteins in Polarized Epithelial Cells. *Int. J. Med. Microbiol.* 291, 439-445

**PICKL, W.F., PIMENTEL-MUIÑOS, F.X und SEED, B.** 2001. Lipid Rafts and Pseudotyping. *J. Virol.* 75, 7175-7183

**PIKE, L.J.** 2003. Lipid Rafts: Bringing Order to Chaos. *J. Lipid Res.* 44, 655-667

**POMERANZ, L.E. und BLAHO, J.A.** 2000. Assembly of Infectious Herpes Simplex Virus Type 1 Virions in the Absence of Full-Length VP22. *J. Virol.* 74, 10041-10054

**RAJCANI, J. und KUDELOVA, M.** 1999. Glycoprotein K of Herpes Simplex Virus: a Transmembrane Protein Encoded by the UL53 Gene which Regulates Membrane Fusion. *Virus Genes.* 18, 81-90

**RAJCANI, J. und VOJVODOVA, A.** 1998. The Role of Herpes Simplex Virus Glycoproteins in the Virus Replication Cycle. *Acta Virol.* 42, 103-118

**REGENMORTEL VAN, M.H.V., FAUQUET, C.M., BISHOP, D.H.L., CARSTENS, E.V., ESTES, M.K., LEMON, S.M., MANILOFF, J., MAYO, M.A., MCGEOCH, D.J., PRINGLE, C.R. und WICKNER, R.B.** (eds.) 2000. Virus Taxonomy, Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Academic Press, San Diego, San Francisco, New York

**REN, X., HARMS, J.S. und SPLITTER, G.A.** 2001. Bovine Herpesvirus 1 Tegument Protein VP22 Interacts with Histones, and the Carboxyl Terminus of VP22 Is Required for Nuclear Localization. *J. Virol.* 75, 8251-8258

**REN, X., HARMS, J.S. und SPLITTER, G.A.** 2001. Tyrosin Phosphorylation of Bovine Herpesvirus 1 Tegument Protein VP22 Correlates with the Incorporation of VP22 into Virions. *J. Virol.* 75, 9010-9017

**ROIZMAN, B. und KNIPE, D.M.** 2001. Herpes Simplex Viruses and Their Replication, in: Knipe, D.M., Howley, M.D. (eds.) Fields Virology, 4<sup>th</sup> ed., Lipincott Williams & Wilkins, Philadelphia

**ROIZMAN, B. und PELLETT, P.E.** 2001. The Family Herpesviridae: A Brief Introduction, in: Knipe, D.M., Howley, M.D. (eds.): Fields Virology, 4<sup>th</sup> ed., Lipincott Williams & Wilkins, Philadelphia

**ROIZMAN, B. und SEARS, A.E.** 1996. Herpes Simplex Viruses and Their Replication, 11-68, in: B. Roizman, R.J. Whitley und C. Lopez (eds.): The Human Herpesviruses. Raven Press, Ltd., New York

**RUDOLPH, J., O'CALLAGHAN, D.J. und OSTERRIEDER, N.** 2002. Cloning of the Genomes of Equine Herpesvirus Type 1 (EHV-1) Strains KyA and RacL11 as Bacterial Artificial Chromosomes (BAC). *J. Vet. Med. B* 49, 31-36

**RUDOLPH, J. und OSTERRIEDER, N.** 2002. Equine Herpesvirus Type 1 Devoid of gM and gp2 Is Severely Impaired in Virus Egress but not Direct Cell-to-Cell-Spread. *Virology* 293, 356-367

**SAIKI, R.K., GELFAND, G.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B. und EHRLICH, H.A.** 1988. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* 239, 487-491

**SAMBROOK, J. und RUSSEL, D.W.** (eds.) 2001. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3<sup>rd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

**SCHIMMER, C.** 2002. Identifizierung und Charakterisierung des UL11-Homologs des Equinen Herpesvirus Typ 1. *Vet. med. Diss.*, München

**SCHIMMER, C. und NEUBAUER, A.** 2003. The Equine Herpesvirus 1 UL11 Gene Product Localizes to the *Trans*-Golgi Network and Is Involved in Cell-to-Cell-Spread. *Virology* 308, 23-36

**SCHWEND, C.** 1988. Das Genom des Equinen Herpesvirus Typ1 (EHV-1) Stammes RacH und seine Änderung während der Attenuierung, *Vet. med. Diss.*, München

**SEYBOLDT, C.** 2000. Untersuchungen zur Struktur und Funktion des Glykoprotein M des Equinen Herpesvirus 1. *Vet. med. Diss.*, München

**SHIEH, M.-T., WUDUNN, D., MONTGOMERY, R.I., ESKO, J.D. und SPEAR, P.G.** 1992. Cell Surface Receptors for Herpes Simplex Virus Are Heparan Sulfate Proteoglycans. *J. Cell Biol.* 116, 1273-1281

**SKEPPER, N.J., WHITELEY, A., BROWNE, H. und MINSON, A.** 2001. Herpes Simplex Virus Nucleocapsids Mature to Progeny Virions by an Envelopment → Deenvelopment → Reenvelopment Pathway. *J. Virol.* 75, 5697-5702

**SPEAR, P.G.** 1993a. Membrane Fusion Induced by Herpes Simplex Virus, 201-232, in: J. Bentz (ed.): Viral Fusion Mechanisms. CRC Press Inc., Boca Raton, FL

**SPEAR, P.G.** 1993b. Entry of Alphaherpesviruses into Cells. *Sem. in Virology* 4, 167-180

**SUN, Y., MCLEAN, A.R., AITKEN, J.D. und BROWN, S.M.** 1996. The Role of Gene 71 Product in Life Cycle of Equine Herpesvirus 1. *J. Gen. Virol.* 77, 493-500

**SUOMALAINEN M.** 2002. Review. Lipid Rafts and Assembly of Enveloped Viruses. *Traffic.* 3, 705-709

**TELFORD, E.A.R., WATSON, M.S., MCBRIDE, D. und DAVISON, A.J.** 1992. The DNA Sequence of Equine Herpesvirus-1. *Virology* 189, 304-316

**TELFORD, E.A.R., WATSON, M.S., PERRY, J., CULLINANE, A.A. und DAVISON, A.J.** 1998. The DNA Sequence of Equine Herpesvirus-4. *J. Gen. Virol.* 79, 1197-1203

**TISCHER, B.K., SCHUMACHER, D., MESSERLE, M., WAGNER, M. und OSTERRIEDER, N.** 2002. The Products of the UL10 (gM) and the UL49.5 Genes of Marek's Disease Virus Serotype 1 Are Essential for Virus Growth in Cultured Cells. *J. Gen. Virol.* 83, 997-1003

**TOWBIN, H., STAHELIN, T. und GORDON, J.** 1979. Electrophoretic Transfer of Proteins From Polyacrylamid Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedures and Some Applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354

**TRIANTAFILOU, K. und TRIANTAFILOU, M.** 2003. Lipid Raft Microdomains: Key Sites for Coxsackievirus A9 Infectious Cycle. *Virology* 317, 128-135

**VLCEK, C., VENES, V., LU, Z., KUTISH, G.F., PACES, V., ROCK, D., LETCHWORTH, G. und SCHWYZER, M.** 1995. Nucleotide Sequence Analysis of a 30-kb Region of the Bovine Herpesvirus 1 Genome which Exhibits a Colinear Gene Arrangement with the UL21 to UL4 Genes of Herpes Simplex Virus. *Virology* 210, 100-108

**WARD, P.L., CAMPADELLI-FIUME, G., AVITABILE, E. und ROIZMAN, B.** 1994. Localization and Putative Function of the UL20 Membrane Protein in Cells Infected with Herpes Simplex Virus 1. *J. Virol.* 68, 7406-7417

**WELCH, H.M., BRIDGES, C.G., LYON, A.M., GRIFFITHS, L. und EDINGTON, N.** 1992. Latent Equid Herpesvirus Type 1 and 4: Detection and Distinction Using the Polymerase Chain Reaction and Co-Cultivation from Lymphoid Tissues. *J. Gen. Virol.* 73, 261-268

**WHALLEY, J.M., ROBERTSON, G.R. und DAVISON, A.J.** 1981. Analysis of the Genome of Equine Herpesvirus Type 1: Arrangement of Cleavage Sites for Restriction Endonucleases *EcoRI*, *BglII* and *BamHI*. *J. Gen. Virol.* 57, 307-323

**WHEALY, M.E., CARD, J.P., MEADE, R.P., ROBBINS, A.K. und ENQUIST, L.W.** 1991. Effect of Brefeldin A on Alphaherpesvirus Membrane Protein Glycosylation and Virus Egress. *J. Virol.* 65, 1066-1081

**WHITELEY, A., BRUUN, B., MINSON, T. und BROWNE, H.** 1999. Effects of Targeting Herpes Simplex Virus Type 1 gD to the Endoplasmic Reticulum and *Trans*-Golgi-Network. *J. Virol.* 73, 9515-9520

## 8. ANHANG

### Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
A. bidest.	Aqua bidestillata
abs.	absolut
A. dest.	Aqua destillata
Amp.	Ampicillin
Amper	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
Asp	Asparaginsäure
BAC	bacterial artificial chromosome
BHV-1	Bovines Herpesvirus Typ 1
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
°C	Grad Celsius
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CaPO <sub>4</sub>	Calciumphosphat
CIP	alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Da	Dalton
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	Desoxy-Cytosintriphosphat
dGTP	Desoxy-Guanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	3'-desoxy-Ribonukleosid-5'-triphosphat
dTTP	Desoxy-Thymidintriphosphat

---

E	early
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
Edmin 337	equine Hautzelllinie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHV-1	equines Herpesvirus Typ 1
EHV-4	equines Herpesvirus Typ 4
ENS	embryonale Schweinenierenzellen
ER	endoplasmatisches Retikulum
et al.	und andere Autoren
Fa.	Firma
Fd	Farad
FKS	fetales Kälberserum
FRT	FLP-recognition target
g	Gramm
g(p)	Glykoprotein
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat
h	Stunde
HBS	Hepes gepufferte Saline
HCl	Salzsäure
His	Histidin
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HSV-1	Herpes Simplex Virus Typ 1
IAC	Isoamylalkohol-Chloroform-Gemisch
ICP	infected cell protein
IE	immediate early
IIF	indirekte Immunfluoreszenz
Ile	Isoleucin
ILTV	infektiöses Laryngotracheitis Virus
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid
IR	inverted repeat
k	Kilo
kb	Kilobasenpaare

---

kDa	Kilodalton
L	late
l	Liter
LB	Luria Bertoni
Leu	Leucin
LiCl	Lithiumchlorid
Lys	Lysin
m	Milli
μ	Mikro
M	molar
MAk	monoklonaler Antikörper
mbar	Millibar
MBS	MES-gepufferte Salzlösung
MDV	Marek's Disease Virus
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute
mind.	mindestens
MOI	multiplicity of infection
Mr	Molekulargewicht
mRNS	messenger RNS
nm	Nanometer
N	normal
N-	an Stickstoff gebunden
O-	an Sauerstoff gebunden
o.	oben
OD <sub>x</sub>	optische Dichte bei x nm Wellenlänge gemessen
OH-	an Hydroxylgruppe gebunden
ORF	offener Leserahmen (open reading frame)
PAA	Phosphonoessigsäure
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PbE	Plaque-bildende Einheiten
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung



---

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentia hydrogenium
p.i.	post infectionem
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
PrV	Pseudorabies Virus
Rk13	Zelllinie aus Kaninchennierenzellen
RNA	Ribonukleinsäure
RNS	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SDS	Natiumdodecylsulfat
sek	Sekunde
Ser	Serin
STV	Saline-Trypsin-Versene-Lösung
Tab.	Tabelle
TBS-T	Tris-gepufferte Saline mit Tween20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
U	Unit (Einheit)
rpm	Umdrehungen pro Minute
UL	Unique long - Region
US	Unique short - Region
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
VZV	Varizella Zoster Virus
W	Watt
w/v	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl- $\beta$ -D-Galactosid
z.B.	zum Beispiel
zpE	zytopathischer Effekt

## **Danksagung**

Zunächst möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Kaaden bedanken, der mir den Arbeitsplatz bereitstellte, mir die Wahl des Themas überließ und mich jederzeit unterstützte.

Frau Dr. Antonie Neubauer gebührt mein besonderer Dank für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit. Ich möchte ihr für viel Verständnis und Engagement im Umgang mit Doktoranden danken.

Für die geduldige Einführung in die molekularbiologischen Arbeitstechniken danke ich Frau Christine Brandmüller.

Bei allen Mitarbeitern der Isolierstation möchte ich mich für das freundschaftliche und doch professionelle Arbeitsklima bedanken.

Vielen anderen Mitarbeitern des Instituts schulde ich Dank für ihre stete Hilfsbereitschaft.

## Lebenslauf

Name:	Guggemoos	
Vorname:	Simone Irmgard	
Straße:	Heimgartenstraße 6a	
Wohnort:	82441 Ohlstadt	
Geburtsdatum:	18.12.1976	
Geburtsort:	Garmisch-Partenkirchen	
Schulbildung:	1983 bis 1987	Grund- und Teilhauptschule Ohlstadt
	1987 bis 1996	Staffelsee-Gymnasium Murnau
	28.06.1996	Abitur
Studium:	1996 bis 2001	Studium der Tiermedizin an der LMU München, 7. Semester als Auslandssemester an der Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, Frankreich
	18.12.2001	Staatsexamen
Approbation:	15.01.2002	Approbation als Tierärztin
Dissertation:	2002 bis 2004	Dissertationsarbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der Tierärztlichen Fakultät der LMU München