

**Untersuchungen zur regulierbaren Genexpression und
Herstellung einer Zelllinie zur induzierbaren Expression
des Herpes Simplex Virus Typ-1 (HSV-1) Immediate Early
(IE) 3 Gens.**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat)

der

Mathematischen-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen-Friedrich-Wilhelms- Universität Bonn

vorgelegt von

Thomas Heister

aus

Bonn-Bad Godesberg

Bonn 2000

Angefertigt mit der Genehmigung der Mathematischen-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Priv. Doz. Dr. Jan Mous

2. Referent: Prof. Dr. Karl-Heinz Scheidtmann

Tag der Promotion:

Für meinen Großvater Georg Hausmann,
der stets an mich geglaubt und mich unterstützt hat.

“ Die Wissenschaft braucht Zusammenarbeit, in der sich
das Wissen des einen durch die Entdeckung des anderen
bereichert.”

(José Ortega y Gasset)

Verzeichnis der Abkürzungen

Ac	Acetat
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosintriphosphat
ATCC	American Tissue Culture Collection
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
CMC	Carboxymethylcellulose
CMV	Cytomegalovirus
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DAB	3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E-Gene	Early-Gene
EBV	Epstein-Baar Virus
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Dinatriummethyldiamintetraacetat
et.al.	et alii (lat.: und andere)
FKS	fötales Kälberserum
G418	Geneticin® 418
GC-Gehalt	Guanosin Cytosin Gehalt
HSV	Herpes Simplex Virus
ICP	infected cell polypeptide
ICTV	International Committee for the Taxonomy of Viruses
IE-Gene	Immediate Early-Gene
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -galactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
L-Gene	Late-Gene
LAT	Latency associated transcript
M.O.I.	multiplicity of infection
Min.	Minute
neo	Neomycin
OBP	Origin binding protein
OD	Optische Dichte
ori	Replikationsursprung
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaktion
Pen.	Penicillin
PFA	Paraformaldehyd
PFU	Plaque forming units
RLU	relative light units
RT	Raumtemperatur
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek.	Sekunde
Std.	Stunde
Strep.	Streptomycin
TEMED	N, N, N', N',-Tetramethyldiamin
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminoethan
U	Unit
Vol.	Volumen

wt
X-Gal
ZNS
ZPE

Wildtyp
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
zentrales Nervensystem
zytophatischer Effekt

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung	1
1.1. Geschichte und Taxonomie der Herpes Simplex Viren	1
1.2. Morphologie und Struktur des HSV-1 Virions	4
1.3. Das HSV-1 Genom	4
1.4. Neurotropismus von HSV-1	6
1.5. Lytische HSV-1 Replikation	6
1.6. Latenz von HSV-1	7
1.7. Das HSV-1 immediated early (IE) 3 Gen	9
1.8. Das <i>IE3</i> Genprodukt “ Infected Cell Peptide 4 “ (ICP 4)	10
1.9. Virale Vektorsysteme für den Gentransfer	12
1.10. HSV-1 Vektoren für den Gentransfer	14
1.11. Rekombinante und defekte Herpes Simplex Virus Vektoren	16
1.12. Die Entwicklung von Verpackungssystemen für defekte HSV-1 oder HSV-1 Amplikon Vektoren	19
1.13. Ziel der Arbeit	22
2. Material	24
2.1. Geräte für das Arbeiten mit DNA, Proteinen und Bakterien	24
2.2. Geräte für das Arbeiten mit eukaryontischen Zellen	24
2.3. Verbrauchsmaterialien zum Arbeiten mit Bakterien, Proteinen und eukaryontischen Zellen	25
2.4. Verbrauchsmaterialien für Western-Blots	25
2.5. Kits zur Bearbeitung von DNA und Proteinen	25
2.6. Chemikalien	26
2.7. Enzyme, Standards und Antibiotika	27
2.8. Medien, Medienzusätze und gepufferte Salzlösungen	27
2.9. Stamm- und Standardlösungen	28
2.10. Medien	29

2.10.1. Medien zur Aufzucht von Bakterien	29
2.10.2. Medien zur Kultivierung eukaryontischer Zellen	29
2.11. Antikörper und Antiseren	30
2.11.1. Antikörper	30
2.11.2. Antiseren	30
2.12. Klonierungsvektoren, Expressionsvektoren und HSV-1 Amplikon Vektoren	30
2.12.1. Klonierungsvektoren	30
2.12.2. Expressionsvektoren	30
2.12.3. HSV-1 Amplikon Vektoren	31
2.13. Verwendete Bakterienstämme	31
2.14. Zelllinien und HSV-1 Viren	32
2.14.1. Zelllinien	32
2.14.2. HSV-1 Viren	32
2.15. EDV	32
3. Methoden	33
3.1. Molekulargenetische Methoden	33
3.1.1. Allgemeine Methoden zum Arbeiten mit DNA und RNA	33
3.1.1.1. Konzentrationsbestimmung von DNA in Lösung	33
3.1.1.2. Extraktion von DNA und RNA mit Phenol, Phenol/Chloroform und Chloroform	33
3.1.1.3. DNA/RNA-Präzipitation mit Ethanol	33
3.1.1.4. Reinigung von DNA-Fragmenten mit QIAquick-Säulen	34
3.1.1.5. Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen	34
3.1.1.6. Agarose Gelelektrophorese	34
3.1.2. Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	35
3.1.2.1. Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> – Zellen	35
3.1.2.2. Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	35
3.1.3. Isolierung von DNA	36

3.1.3.1. Mini-Präparation von Plasmid – DNA	36
3.1.3.2. Maxi-Präparation von Plasmid – DNA	36
3.1.4. DNA Sequenzanalyse	36
3.1.5. Ligation von DNA	37
3.1.6. Auffüllen von 3' DNA Überhängen bzw. Beseitigen von 5' DNA Überhängen	37
3.1.7. Dephosphoylierung von DNA Enden	37
3.1.8. DNA-Amplifikation mit der Pfu DNA-Polymerase (PCR)	38
3.2. Biochemische und Zellbiologische Methoden	39
3.2.1. Methoden zur Arbeit mit eukaryontischen Zellen	39
3.2.1.1. Immunzytochemische Färbung	39
3.2.1.2. Trypsinieren von Zellen	40
3.2.1.3. Einfrieren von Zellen	40
3.2.1.4. Auftauen und Revitalisieren von Zellen	40
3.2.1.5. Transiente Transfektion von eukaryontischen Zellen mit DNA	41
3.2.1.6. Stabile Transfektion von eukaryontischen Zellen mit DNA	41
3.2.1.7. Subklonierung stabiler Klone	41
3.2.1.8. Fixieren von Zellen und X-Galfärbung	42
3.2.2. Allgemeine Methoden zur Arbeiten mit Proteinen	42
3.2.2.1. SDS-Polyacrylamid-Gele zur Auftrennung von Proteinen	42
3.2.2.2 Westernblot-Analyse	43
3.2.2.3. Expression der <i>IE3</i> / Hexa-Histidin Polypeptide in <i>E.coli</i> und Aufreinigung der Polypeptide	43
3.2.2.4. Bestimmung der <i>IE3</i> /Hexa-Histidin Polypeptid Konzentrationen	44
3.2.2.5. Luciferase Assay	44
3.3. Arbeiten mit Herpes Simplex Virus-1 (HSV-1)	45
3.3.1. Infektion von Zellen mit HSV-1	45
3.3.2. Vorbereitung von HSV-1 <i>dI20</i> bzw. HSV-1 <i>5dl1.2</i> Helfer-Virusstock	45
3.3.3. Herstellung und Präparation von Helfer-Virusstock	46
3.3.4. HSV-1 <i>dI20</i> Komplementations-Assay in stabilen VERO-Ctet. <i>IE3</i> und VERO-Ntet. <i>IE3</i> Zelllinien	46

3.3.5. Plaquetitration von HSV-1 (<i>wt</i>) und HSV-1 Mutanten	46
3.3.6. Verpackung von pHSV-tet. <i>IE3</i> /LacZ Amplikon DNA in VERO-tet.TA Zellen mit HSV-1 <i>dI20</i> Helfervirus	47
3.3.7. Verpackung von pHGCXnCre Amplikon DNA in VERO- <i>IE3</i> Zellen mit HSV-1 <i>dI20</i> Helfervirus	48
3.3.8. Titration von HSV-1 Amplikon Vektor DNA	50
3.3.9. Helfervirus-freie Verpackung von HSV-1 Amplikon Vektor	50
3.3.9.1. Präparation des HSV-1 Cosmid Sets	51
3.3.9.2. Verpackung von HSV-1 Amplikon DNA in 2-2 Zellen mit dem Cosmid Set	51
4. Ergebnisse	52
4.1 Herstellung von ICP4 Kaninchen Antiseren	52
4.1.1. Amplifikation verschiedener <i>IE3</i> DNA Sequenzabschnitte mittels PCR und Klonierung in pET32 Expressionsvektor	52
4.1.2. Das pET-System	53
4.1.3. Expression und Nachweis der <i>IE3</i> Polypeptide nach Transformation in BL21 (DE3) pLysS kompetente <i>E.coli</i>	54
4.1.4. Aufreinigung der <i>IE3</i> Polypeptide und Protein-Konzentrationsbestimmung	55
4.1.5. Immunisierung von Kaninchen mit den drei hergestellten <i>IE3</i> Sub-Thioredoxin Polypeptiden und Testen der Antiseren	56
4.2. Tetrazyklin induzierte <i>IE3</i> Genexpression	57
4.2.1. Genregulation	57
4.2.2. Das Tet.off-System	58
4.2.3. PCR-Amplifikation, Klonierung und Sequenzierung der kodierenden <i>IE3</i> Gensequenz	59
4.2.4. Tet.-Kombi-Konstrukte	60
4.2.4.1. Konstruktion von pCtet.-Combi- <i>IE3</i>	60
4.2.4.2. Konstruktion von pNtet.-Combi- <i>IE3</i>	61
4.2.5. Nachweis der <i>IE3</i> Genexpression nach transienter Transfektion von pCtet.Combi- <i>IE3</i> bzw. pNtet.Combi- <i>IE3</i> in CHO-Zellen	61
4.2.6. Regulierbarkeit der <i>IE3</i> Genexpression über den Effektor Tetrazyklin	63

4.2.7. Komplementation von <i>dI20</i> HSV - 1 bei induzierter und nicht-induzierter <i>IE3</i> Genexpression	64
4.2.8. Stabile Transfektion von pCtet.-Combi- <i>IE3</i> bzw. pNtet.-Combi- <i>IE3</i> in VERO-Zellen für die Herstellung einer stabilen, über Tetrazyklin regulierbaren <i>IE3</i> VERO-Zelllinie	65
4.2.9. Untersuchung der stabilen pCtet.-Combi- <i>IE3</i> bzw. pNtet.-Combi- <i>IE3</i> Klone auf <i>IE3</i> Genexpression mittels immunzytochemischer Färbung	66
4.2.10. Subklonierung stabiler pCtet.-Combi- <i>IE3</i> bzw. pNtet.-Combi- <i>IE3</i> Klone	67
4.2.11. Charakterisierung der stabilen VERO-Ctet. <i>IE3</i> bzw. VERO-Ntet. <i>IE3</i> -Zelllinien	68
4.2.11.1. Komplementationseigenschaften der stabilen VERO-Ctet. <i>IE3</i> -bzw. VERO-Ntet. <i>IE3</i> -Zelllinien für <i>dI20</i> HSV-1	68
4.2.11.2. <i>IE3</i> Genexpression in An- oder Abwesenheit von Tetrazyklin in stabilen VERO-tet. <i>IE3</i> Klonen	70
4.2.12. Verlust der <i>IE3</i> Genexpression in stabilen VERO-tet. <i>IE3</i> Zellen	72
4.3. Herstellung einer doppelstabilen VERO-tet.<i>IE3</i> Zelllinie	73
4.3.1. Konstruktion von ptet.- <i>IE3</i>	73
4.3.2. Herstellung stabiler VERO.tet.TA Zellen (1.Transfektion)	74
4.3.3. Untersuchung der stabilen Klone auf tet.TA Expression	74
4.3.4. Subklonierung der tet.TA exprimierenden VERO-tet.TA Klone	75
4.3.5. Charakterisierung der <i>IE3</i> Genregulation in stabilen VERO-tet.TA Zellen	76
4.4. Tetrazyklin regulierbares Repressions-System	78
4.4.1. Tetrazyklin regulierte <i>IE3</i> Genrepression	79
4.4.2. Der Einfluss von ICP4 auf das Tetrazyklin Expressionssystem	81
4.4.3. ICP4 vermittelte Transaktivierung des tet.Ox7-CMVminimal-Promoters	82
4.5. Tetrazyklin regulierte <i>IE3</i> Expression von pHSV-tet.-<i>IE3</i>/LacZ Amplikon Vektor	83
4.5.1. Konstruktion von pHSV.tet. <i>IE3</i> /LacZ	83
4.5.2. Tetrazyklin regulierte <i>IE3</i> Expression nach Transfektion von pHSV-tet. <i>IE3</i> /LacZ in VERO-Zellen	84
4.5.3. Verpackung von pHSV.tet. <i>IE3</i> /LacZ Amplikon DNA in VERO-Zellen mittels HSV-1 <i>dI20</i> Helfervirus in An- oder Abwesenheit von Tetrazyklin	85

4.6. Cre Rekombinase induzierte Genexpression	87
4.6.1. Das Cre/LoxP Rekombinationssystem	87
4.6.2. Konstruktion verschiedener LoxP/Stop/LoxP Kasette Reporterkonstrukte	89
4.6.3. Repression und Cre Rekombinase induzierte GFP-Fluoreszenz in VERO-Zellen	90
4.6.4. Nachweis der Cre Rekombinase induzierten GFP Expression mittels Westernblot - Analyse	91
4.6.5. Nachweis der konstitutiven β -Galaktosidase Expression und der Cre Rekombinase induzierten GFP Expression nach transienter Transfektion von pLoxLacZCa-GFP in VERO-Zellen	93
4.6.6. Vergleich der basalen Genexpression im Tet.-System und Cre / LoxP-System	94
4.6.7. Kinetik der Cre Rekombinase induzierten Genexpression	95
4.6.8. Herstellung stabiler VERO-Zelllinien mit Cre induzierbaren Reporter genen	96
4.6.9. Untersuchung stabiler VERO-Zelllinien auf Cre-vermittelte Induktion der Reporter gen Expression	96
4.6.10. Nachweis der Rekombinase induzierten GFP Expression in stabilen pLoxCa-GFP VERO-Zelllinien durch Westernblot-Analyse	98
4.6.11. Herstellung stabiler VERO-Zelllinien, die nach Cre-vermittelter Induktion zwei verschiedene Reporter gene exprimieren	99
4.6.12. Nachweis der gleichzeitigen Cre Rekombinase induzierten GFP und β -Galaktosidase Expression in doppelstabilen pLoxCa-GFP/pLoxCa-LacZ VERO-Zelllinien	100
4.6.13. Nachweis der zeitgleichen Cre Rekombinase induzierten GFP und β -Galaktosidase Expression in doppelstabilen VERO-Zelllinien mittels Westernblot-Analyse	102
4.7. Cre-Rekombinase induzierte Expression des HSV-1 IE Gens	103
4.7.1. Konstruktion von pCLOxCA-IE3 und pNLoxCa-IE3	103
4.7.1.1. Konstruktion von pCLOxCA-IE3	103
4.7.1.2. Konstruktion von pNLoxCa-IE3	104
4.7.2. Nachweis der Cre-Rekombinase induzierten IE3 Genexpression in transfizierten VERO-Zellen mittels Westernblot-Analyse	104
4.7.3. Stabile Transfektion von pCLOxCa-IE3 und pNLoxCa-IE3 in VERO-Zellen zur Herstellung einer stabilen IE3 induzierbaren VERO-Zelllinie	106

4.7.4. Untersuchung der stabilen VERO- <i>IE3</i> Klone	106
4.7.5. Repression der <i>IE3</i> Expression in stabilen VERO- <i>IE3</i> Klonen	108
4.7.6. Nachweis der Verpackung von pHGCX _n CRE Amplikon DNA in VERO- <i>IE3</i> Zelllinien mittels HSV-1 <i>d120</i> Helfervirus	109
4.7.7. Nachweis Cre Rekombinase induzierter HSV-1 <i>d120</i> Plaques auf VERO- <i>IE3</i> Klonen	110
4.7.8. Titration von <i>d120</i> HSV-1 auf <i>IE3</i> induzierten stabilen VERO- <i>IE3</i> Klonen und E5-Zellen	111
4.7.9. Nachweis von ICP4-Protein in VERO- <i>IE3</i> Zellen nach Cre Rekombinase induzierter <i>IE3</i> Genexpression mittels immunzytochemischer Färbung	113
5. Diskussion	115
6. Schlussfolgerung	122
7. Zusammenfassung	124
8. Anhang	127
8.1. Kodierende <i>IE3</i> DNA Sequenz und Aminosäuresequenz	127
8.2. Primer für die Amplifikation der kodierenden <i>IE3</i> DNA Sequenz	129
8.3. Primer für die Amplifikation der <i>IE3</i> DNA Subfragmente	129
8.4. <i>IE3</i> DNA Sequenzierprimer	130
9. Literaturverzeichnis	131

1. Einleitung

1.1 Geschichte und Taxonomie der Herpes Simplex Viren

Die Bezeichnung "Herpes" ist von dem griechischen Wort "herpein" abgeleitet, was übersetzt "kriechen" bedeutet. Die Herpes Simplex Viren waren die ersten menschlichen Herpesviren, die entdeckt wurden und zählen heute zu den best-untersuchtesten von allen Viren. Die ersten Beschreibungen einer Herpesinfektion lassen sich bis 100 v. Chr. auf Beobachtungen des römischen Arztes Herodotus zurückführen. In den früheren Jahrhunderten sammelte sich eine Vielzahl von ganz unterschiedlichen Beobachtungen und Berichten von Ärzten an, die man heute unter dem Begriff "Klinisches Bild der Herpes Simplex Infektion" zusammenfasst. In Schönleins (1837) "Allgemeiner und Spezieller Pathologie und Therapie" wurden viele Hautkrankheiten unter dem Begriff "Herpes" zusammengefasst. Dennoch wurden hier schon einige spezielle Formen des Herpes aufgezählt, wobei der sog. "Herpes circinatus" (kreisförmige Flechte) nach Symptomatik und Lokalisation dem heutigen Herpes labialis am nächsten kommt. Ebenso wurden auch andere Herpesformen, wie z. B. die genitale Lokalisation, die bei Schönlein die Bezeichnung "Herpes-Pseudosyphilitis seu paraputialis" erhielt, sehr ausführlich beschrieben. Vidal beschrieb 1873 den "Herpes febrilis" und wies sogar schon auf seine Ansteckungsfähigkeit hin. Ab 1920, als Grüter von den ersten erfolgreichen Virusübertragungsversuchen berichtete, nahmen die Darstellungen über die verschiedenen Erscheinungsformen und Lokalisationen des Herpes Simplex Virus in den zwanziger und dreissiger Jahren zu. Levaditi und Doerr wiesen erstmals auf die Beteiligung des zentralen Nervensystems (ZNS) bei Herpes Simplex Virusinfektionen und insbesondere auf die Herpesenzephalitis hin. Das histopathologisch charakteristische Zeichen einer Herpesvirusinfektion, das intranukleare Einschlusskörperchen, wurde 1921 von Lipschütz beobachtet. Nach der Einführung der Plaquetchnik von Dulbecco und Vogt entdeckte man, dass bestimmte HSV-Stämme unterschiedliche Plaquegrößen verursachten (Munk & Donner, 1963). Munk und Donner fanden noch eine weitere Korrelation, nämlich die zwischen Plaquemorphologie, Synzytienbildung und klinischer Lokalisation. HSV-Stämme, die grosse Plaques und Synzytien produzierten, stammten aus genitalen Infektionen, wohingegen Stämme von oralen und kornealen Infektionen Zellabrundungen und kleine Plaques hervorbrachten. Aufgrund dieser biologischen Marker wurden die HSV-Typen voneinander unterschieden. Später gelang es Schneweis, die Typeinteilung nach serologischen Methoden festzulegen. Hiermit wurde schliesslich die Einteilung der oralen HSV-Stämme als HSV-Typ1 und die Stämme genitaler Lokalisation als HSV-Typ2 eingeführt (Schneweis, 1962). Auf DNA-Ebene findet man zwischen HSV-1 und HSV-2 50% Homologie (Ludwig *et. al.*, 1972). Es gibt Hinweise darauf, dass sich HSV-2 aus dem ursprünglich vorhandenen HSV-1 entwickelt hat. Infektionen mit Herpesviren sind wahrscheinlich die häufigsten Virusinfektionen überhaupt. Dabei sind die Infektionen mit dem HSV-1 besonders weit verbreitet, was zu einem Durchseuchungsgrad von 90% und mehr führt. Alle seropositiven Personen tragen das Virus in sich, auch wenn sehr oft keine klinischen Symptome bei diesen Personen in Erscheinung treten. Die durch eine HSV-Infektion hervorgerufenen Symptome sind sehr vielfältig und unterscheiden sich erheblich in ihrem Krankheitswert. Der Herpes labialis zählt in der Regel zu den harmloseren und unkomplizierteren Herpesformen, wobei auch hier aggressivere Formen auftreten können. Herpes labialis ist durch das Auftreten von eitrigen Bläschen im Mund-Lippen-Bereich gekennzeichnet. Der Herpes gehört zu einer Geschlechtskrankheit, die in unterschiedlicher Schwere auftritt. Die Herpeskeratitis ist eine Infektion der Hornhaut (Keratitis) mit HSV-1, die zur Erblindung führen kann. Im Gegensatz dazu sind andere durch HSV-1 hervorgerufene Krankheitsbilder, wie die generalisierte HSV-Infektion, der Herpes neonatorum und die Herpesenzephalitis lebensbedrohend. Bis heute sind nahezu 100 verschiedene Herpesvirus Arten isoliert worden und von jeder Art sind mehrere Stämme bekannt.

Das Herpes Simplex Virus gehört zu der Familie der *Herpesviridae* und gilt als Prototypvirus dieser Gruppe von Viren mit relativ grossem DNA Genom (Roizman, 1982). Unter den mehr als 60 Virusfamilien, die dem Internationalen Komitee für die Taxonomy von Viren (ICTV) bekannt sind, ist die Familie der *Herpesviridae* eine der grössten. Ihre Genome bestehen aus grossen, linearen Doppelstrang-DNA Molekülen. Aufgrund der verschiedenen biologischen Eigenschaften, wie Dauer des Replikationszyklus, Wirtsbereich, Zytopathologie und den Besonderheiten bei der jeweils beobachteten Form der Latenz, wurden die Mitglieder der Familie der *Herpesviridae* von dem ICTV in drei Subfamilien eingeteilt (Roizman *et. al.*, 1981). Man unterscheidet deshalb zwischen den Subfamilien *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* und *Gammaherpesvirinae*. *Alphaherpesvirinae* sind schnell wachsende, zytolytische Viren mit einem relativ breiten Wirtsbereich für *in vitro* kultivierte Zellen. Zu dieser Subfamilie zählen auch das HSV-1 und HSV-2. *Betaherpesvirinae* besitzen einen relativ engen Wirtsbereich *in vivo* und *in vitro*. Aufgrund des längeren Replikationszyklus sind sie deutlich von *Alphaherpesvirinae* zu unterscheiden. Zu dieser Subfamilie zählt das Zytomegalievirus (CMV). *Gammaherpesvirinae* besitzt einen noch engeren Wirtsbereich mit der Präferenz für differenzierte Zellen wie lymphoblastoide Zellen. Ein bekannter Vertreter dieser Subfamilie ist das Epstein-Barr-Virus (EBV). Die Klassifizierung der Herpesviren in Genera reflektiert die phylogenetische Verwandtschaft der Viren auf der Basis der Genomstruktur, Serologie und der Sequenzhomologie. Der Genus Simplexvirus in der Subfamilie der *Alphaherpesvirinae* bezieht sich z. B. auf die Arten HSV-1, HSV-2 und das Rinder Herpesvirus Typ-2 (BHV), die ähnliche Genomstrukturen (Buchman & Roizman, 1978a; Buchman & Roizman, 1978b) und eine relative Homologie in ihrer Serologie und Nukleotidsequenz besitzen (Sterz *et. al.*, 1974). Aufgrund der medizinischen Bedeutung der menschlichen Herpesviren zählen HSV-1 und HSV-2 neben Varizella-Zoster-Virus (VZV), EBV, Humanes Zytomegalievirus (HCMV), Humanes Herpesvirus 6-8 (HHV-6, HHV-7 und HHV-8) zu den am besten untersuchten Viren.

Subfamilie	Virusart
<p><i>Alphaherpesvirinae</i> <u>Wirtsbereich:</u> <i>In vivo</i> variabel von sehr weit bis sehr eng; <i>in vitro</i> ebenso variabel. <u>Dauer des Replikationszyklus:</u> Kurz <u>Zytopathologie:</u> Die sehr schnelle Ausbreitung der Infektion in Zellkultur führt zu einem massiven Absterben in suszeptiblen Zellen. Träger-Zellkulturen mit nicht defekten Genomen sind sehr schwer zu erhalten. <u>Latente Infektion:</u> Häufig, jedoch nicht immer, in Ganglien.</p>	<p>Herpes Simplex Virus Typ-1 Herpes Simplex Virus Typ-2 Varizella Zoster Virus Rinder Herpesvirus 1 Rinder Herpesvirus 2 Pferde Herpesvirus 1</p>
<p><i>Betaherpesvirinae</i> <u>Wirtsbereich:</u> <i>In vivo</i> sehr eng, sehr häufig auf bestimmte Zelltypen begrenzt.; <i>in vitro</i> ist die Replikation am besten in Fibroblasten, obwohl Ausnahmen existieren. <u>Dauer des Replikationszyklus:</u> Relativ lang. <u>Zytopathologie:</u> Langsames Fortschreiten lytischer Foci in Zellkultur. Die infizierten Zellen werden häufig vergrößert, sowohl <i>in vitro</i> als auch <i>in vivo</i>. Einschlusskörperchen mit DNA treten oft im Zellkern und im Zytoplasma auf. Trägerkulturen sind leicht zu erhalten. <u>Latente Infektion:</u> Möglich in sekretorischen Drüsenzellen, lymphoretikuläre Zellen, Nierenzellen und anderen Geweben.</p>	<p>Humanes Herpesvirus 5 Humanes Zytomegalievirus Schweine Herpesvirus 2 Maus Herpesvirus 1</p>
<p><i>Gammaherpesvirinae</i> <u>Wirtsbereich:</u> <i>In vivo</i> gewöhnlich auf die natürliche Wirtszelle begrenzt. <i>In vitro</i> replizieren alle Mitglieder dieser Subfamilie in Lymphoblasten, einige verursachen eine lytische Infektion in Fibroblasten und verschiedenen epithelialen Zellen. Die Viren dieser Gruppe sind entweder für B-Lymphozyten oder T-Lymphozyten spezifisch. In den Lymphozyten wird die Infektion oft in einem vorlytischen Zustand mit einer Persistenz und minimaler Expression des viralen Genoms oder in einem lytischen Zustand abgebrochen, wodurch die Zelle stirbt, bevor die kompletten Virionen hergestellt wurden. <u>Dauer des Replikationszyklus:</u> Variabel <u>Zytopathologie:</u> Variabel <u>Latente Infektion:</u> Latentes Virus konnte häufig in lymphoiden Geweben nachgewiesen werden.</p>	<p>Humanes Herpesvirus 4 Epstein Barr Virus Hühner Herpesvirus 2</p>

Tabelle 1.1. Unterteilung der Familie der *Herpesviridae* in drei Subfamilien entsprechend der biologischen Eigenschaften.

1. 2. Morphologie und Struktur des HSV-1 Virions

Der Aufbau des HSV-1 Virions ist in Abbildung 1.2. dargestellt. Das HSV-1 Virion hat einen Durchmesser von ca. 300 nm und setzt sich aus den folgenden vier Strukturkomponenten zusammen: 1. Lipidmembranhülle, 2. Tegument, 3. Kapsid und 4. Kern, der das Virusgenom enthält (Roizman *et. al.*, 1973). Der Kern stellt die innerste Struktur dar, die konzentrisch von den drei anderen Strukturelementen umgeben ist. Die doppelsträngige virale DNA ist in regelmässigen Abständen in konzentrischen Schichten im Inneren des Kapsids angeordnet (Zhou *et. al.*, 1999). Das Kapsid hat einen Durchmesser von 88-110 nm (Schrag *et. al.*, 1989) und besteht aus 162 Kapsomeren (150 Hexons und 12 Pentons), die zu einer ikosaedrischen Struktur zusammengelagert sind. Das Tegument umgibt das Kapsid und besteht aus einem elektronendichten Material, das verschiedene Proteine einschliesslich des Host shut-off (VHS) Proteins und des α -Gen transinduzierenden Faktors (α -TIF) enthält. Der Grossteil des Teguments ist nicht ikosaedrisch angeordnet. Ein gewisser Anteil erscheint als filamentöse Struktur entlang der Pentons, die stark mit dem Kapsid interagiert. Die Lokalisation und die Interaktion der Tegumentproteine mit zellulären Transportproteinen lässt eine bedeutende Rolle, dieser Proteine, bei dem Transport der DNA in den Zellkern vermuten (Zhou *et. al.*, 1999). Die äussere Virushülle besteht aus einer Lipiddoppelmembran, die verschiedene Glykoproteine auf ihrer Oberfläche (Stannard *et. al.*, 1987), sowie nicht-glykolyierte virale Proteine, Lipide und Polyamine enthält.

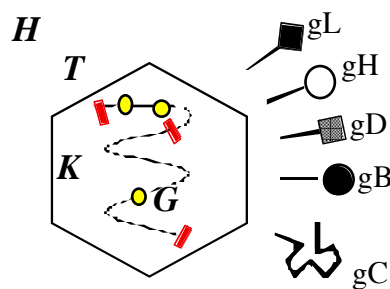


Abb. 1.2. Aufbau des HSV-1 Virions. Das HSV-1 Virion hat einen Durchmesser von ca. 300 nm und besteht aus einer Hülle (**H**), dem Tegument (**T**), dem Kapsid (**K**) und dem im Kapsid enthaltenen Genom (**G**). Das Kapsid hat einen Durchmesser von ca. 100 nm und ist von den Tegumentproteinen umgeben. Die Hülle besteht aus einer Lipidmembran und enthält mehrere verschiedene Glykoproteine (**gL**, **gH**, **gD**, **gB**, **gC**) auf ihrer Oberfläche.

1. 3. Das HSV-1 Genom

Das HSV-1 Genom ist ein lineares doppelsträngiges DNA-Molekül von etwa 100×10^6 Dalton Molekulargewicht, was einer Grösse von ca. 152 kb entspricht (Becker *et. al.*, 1968). Der molare Guanosin- und Zytosingehalt der viralen DNA liegt für HSV-1 bei 67% und bei HSV-2 bei 69% (Wadsworth *et. al.*, 1975). Das Genom enthält die genetische Information für ca. 80 Virusgene (Roizman & Sears, 1996). Ungefähr die Hälfte dieser Gene ist für die Virusreplikation in Zellkulturen notwendig. Die andere Hälfte kodiert für zusätzliche Funktionen, die dem Virus die Existenz in spezifischen Geweben oder Zelltypen (wie z. B. postmitotischen Neuronen) des Wirts ermöglichen (McGeoch *et. al.*, 1985; McGeoch *et. al.*, 1988). Das HSV-1 Genom besteht aus zwei kovalent verbundenen Segmenten, die als L-Region (L für *long*) und S-Region (S für *short*) bezeichnet werden. Die beiden Regionen sind von invertierten, jeweils zueinander homologen Sequenzen flankiert, was dem Genom einen partiell diploiden Charakter verleiht. Die invertierten Sequenzwiederholungen der L-Region werden mit

ab und $b'a'$ bezeichnet die der S-Region mit $a'c'$ und ac (Wadsworth *et. al.*, 1975). Die Anzahl der a -Sequenzwiederholungen an der L-S Verbindungsstelle und an dem Ende der L-Region ist variabel. Die Sequenzfolge auf dem HSV-1 Standardgenom kann somit mit der Buchstabenfolge

$a_L a_n b-H_L-b' a'_m c'-H_S-c a_S$

dargestellt werden, wobei H_L und H_S für den haploiden Bereich der L- und S-Region stehen. Die terminalen a_L und a_S Sequenzen liegen jeweils ein einziges Mal in einer unvollständigen Form vor, die bei der Zirkularisierung des Genoms eine vollständige a -Sequenz bilden. Die mit a_n und a_m bezeichneten Abschnitte sind terminale a -Sequenzen, die sich null bis mehrere Male wiederholen (n), oder in ein bis vielen Kopien (m) vorliegen (Wagner *et. al.*, 1978; Roizman, 1979; Locker *et. al.*, 1979). Die Struktur der a -Sequenz ist sehr stark konserviert, besteht jedoch aus einer variablen Anzahl von Wiederholungselementen. Aufgrund der diploiden Sequenzbereiche im HSV-1 Genom sind Rekombinationsvorgänge möglich, die zu isomeren Genomformen führen. Aus der jeweiligen Invertierbarkeit der L- und S-Region zueinander können vier verschiedene lineare Isomere gebildet werden. Die Isomerenformen werden als Prototyp (P), als invertierte S-Region (I_S), als invertierte L-Region (I_L) und als invertierte S- und L-Region ($I_S I_L$) bezeichnet (Hayward *et. al.*, 1975; Morse *et. al.*, 1977; Morse *et. al.*, 1978). Das HSV-1 Genom besitzt zwei verschiedene Replikationsursprünge (Origins), ori_L (Gray & Kaerner, 1984) und ori_S (Stow, 1982), wobei keiner der beiden ori -Typen alleine notwendig für die virale DNA Replikation ist. ori_L ermöglicht die bidirektionale DNA-Synthese, wohingegen ori_S die unidirektionale DNA Synthese initiiert. Der ori_L ist in der Mitte der L-Region lokalisiert und wird von zwei transkriptionellen Startstellen zweier E Gene flankiert, die für das Einzelstrang-DNA-Bindungsprotein (H_L29) und die DNA-Polymerase (H_L30) kodieren (Weller *et. al.*, 1985). ori_S ist auf dem HSV-1 Genom zweimal vorhanden, da dieser in den invertierten Sequenzwiederholungen, die die S-Region flankieren, lokalisiert ist. Die ori_S -Sequenz liegt zwischen den Promotern des $IE3$ und des $IE4/5$ Gens (Stow & McMonagle, 1983). Die Kernkomponente von ori_S beinhaltet drei Bindungsstellen für die viralen " origin binding proteins " (OBP und OBPC), die teilweise mit der Bindungsstelle für einen zellulären Faktor (OF-1) überlappen (Elias *et. al.*, 1990; Baradaran *et. al.*, 1996; Dabrowski *et. al.*, 1994). Die Sequenzen zwischen dem ori_S Kern und des $IE3$, sowie des $IE4/5$ Promoter enthalten eine Vielzahl von Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, die für die Expression der beiden Gene eine entscheidende Rolle spielen (Jones & Tjian, 1985; Nguyen-Huynh & Schaffer, 1998). Die Interaktion von zellulären und viralen Transkriptionsfaktoren mit den benachbarten ori_S -Sequenzen kann sowohl die Effizienz der Replikationsursprung-abhängigen DNA-Replikation, als auch die Transkription der flankierenden Gene direkt beeinflussen (Wong & Schaffer, 1991). Das Ausschneide- und Verpackungssignal (pac) ist ein weiteres essentielles *cis*-wirkendes Element auf dem HSV-1 Genom, welches für das Zurechtschneiden der Konkatemeren-DNA auf eine entsprechende HSV-1 Genomeinheitlänge und für die Verpackung der viralen DNA in die Kapside notwendig ist (Deiss & Frenkel, 1986). Die pac Signale sind in den a -Sequenzen enthalten, welche zwischen der L-S Verbindungsstelle, sowie an den beiden Enden des linearen Genoms lokalisiert sind. Die Struktur des HSV-1 Genoms ist in Abb. 1.3. dargestellt.



Abb. 1.3. Struktur des HSV-1 Genoms. Das Virusgenom ist ein lineares, doppelsträngiges DNA Molekül von ca. 150kb, das für mehr als 80 Gene kodiert. Das Genom besteht aus einer haploiden " long unit " (H_L) und einer haploiden " short unit " (H_S). Die beiden haploiden Bereiche des Genoms sind von sogenannten " inverted repeats (a) flankiert. In den a-Sequenzen des Genoms liegen die Reifungs- und Verpackungssignale (pac). In den a-Sequenzen, die die " short unit " flankieren, liegen die beiden Replikationsursprünge " ori_s " und ori_L liegt innerhalb der " long unit " .

1. 4. Neurotropismus von HSV-1

Das HSV-1 ist ein neurotropes Virus, das in den neuronalen Zellen über die gesamte Lebenszeit des Wirts in einem latenten Zustand existieren kann. Der ausgesprochene Neurotropismus von HSV-1 zeigt sich auch in seiner starken Neurovirulenz, die bei der tödlich verlaufenden Herpesenzephalitis zum Vorschein kommt. Zwar kann das Virus eine Vielzahl von anderen Zellen infizieren, jedoch wird seine Latenz ausschliesslich in Neuronen beobachtet werden (Baringer & Swoveland, 1974). Man vermutet, dass das HSV-1 Genom in seinem latenten Zustand in mehreren Kopien als ein zirkuläres Episom in den Zellkernen der Neuronen vorliegt (Rock & Fraser, 1983). In diesem Zustand können keine viralen Funktionen in den Zellen nachgewiesen werden (Stevens, 1978), und die neuronale Physiologie bleibt von dem latenten Virus unbeeinflusst. Nach einer Primärinfektion wird das Virus über die Nervenendigungen aufgenommen und durch einen schnellen retrograden Transport über lange Distanzen in den Zellkernen der Neuronen freigesetzt. Desweiteren kann sich das Virus über die Synapsen im gesamten Nervensystem ausbreiten.

1. 5. Lytische HSV-1 Replikation

Die Vermehrung von HSV-1 findet, wie bei allen Viren, nach Infektion in geeigneten Wirtszellen statt. Die Infektion wird durch die Adsorption von HSV-1 an der Oberfläche der Wirtszelle eingeleitet. Die Virus Adsorption verläuft über die Interaktion bestimmter Glykoproteine (gD und gE) in der Virushülle mit Oberflächenproteinen auf der Wirtszellmembran (Tognon *et. al.*, 1981). Die Behandlung der Virionen mit der Protease Trypsin führt zum Verlust der Infektiosität, wohingegen die gleiche Behandlung der Wirtszellen keine Veränderungen in ihrer Suszeptibilität für HSV-1 zur Folge hat. Auch die nachfolgende Penetration, bei der die Virushülle mit der Oberflächenmembran der Wirtszelle fusioniert, wird von Glykoproteinen (gB u.a.) initiiert (Little & Schaffer, 1981). Durch die Fusion der beiden Membranen werden Kapsid und Tegumentproteine in das Zytoplasma der Zelle freigesetzt. Eines der Tegumentproteine, das sog. Virus " host shut off " (VHS) Protein, bewirkt die Dissoziation der Wirtspolyribosomen und blockiert somit die Wirtszell-Proteinsynthese (Fenwick & Walker, 1978). Das Kapsid wird zum Zellkern transportiert, wo es an

den Kernporen das virale Genom in das Nukleoplasma entlässt und es der Transkription durch die zelluläre RNA-Polymerase II zugänglich macht (Batterson *et. al.*, 1983). Die virale Proteinsynthese findet in einer zeitlich gestaffelten Reihenfolge statt, wobei man drei Hauptgruppen viraler Gene (α / IE-Gene = unmittelbar frühe Gene oder immediate early Gene, β / E-Gene = frühe Gene oder early Gene und γ / L-Gene = späte Gene oder late Gene) unterscheiden kann (Fenwick & Walker, 1978; Honess & Roizman, 1975; Honess & Roizman, 1974). Ein weiteres Virionprotein, der sog. α -Gen transinduzierende Faktor (α -TIF), induziert im Zellkern die Transkription der fünf viralen α - oder immediate early (IE) Gene. Hierdurch ist die Expression der IE Gene unabhängig von der vorherigen viralen Proteinsynthese (Pellet *et. al.*, 1985; Batterson & Roizman, 1983). Mit Ausnahme von ICP47 sind die fünf α -Proteine, einschliesslich ICP0, ICP4, ICP22 und ICP27 Transkriptionsfaktoren, die für die Synthese der nachfolgenden Proteingruppen erforderlich sind (Dixon & Schaffer, 1980; Sacks *et. al.*, 1985). Nach dem Vorliegen ausreichender Mengen funktioneller α -Proteine erfolgt die Expression der β - oder early (E) Gene, deren Genprodukte zum Teil am DNA-Metabolismus beteiligt sind. Zu diesen Enzymen gehört eine DNA-Polymerase, ein DNA-Bindungsprotein, eine Thymidinkinase, eine Ribonukleotidreduktase und eine alkalische Exonuklease, die nach ihrer Synthese das Signal für den Beginn der DNA-Replikation geben. Einige β -Gene kodieren Proteine, die am Aufbau des Virions beteiligt sind, andere kodieren Tegumentproteine oder Glykoproteine für die Virushülle. Die Expression der γ - oder late (L) Gene ist sowohl von dem Vorhandensein funktioneller α -Proteine und β -Proteine, als auch von der viralen DNA-Synthese abhängig. Zu den γ -Proteinen gehören vorwiegend Strukturelemente des Virus, Komponenten des Nukleokapsids, des Teguments und die Glykoproteine der Membranhülle. Die HSV-1 DNA wird nach dem "rolling circle" Mechanismus repliziert, bei dem an einer zirkularen Matrize virale Tochter-DNA synthetisiert wird (Ben-Porat & Tokazewski, 1977. Hierdurch entstehen sog. DNA-Konkatemere (Jacob *et. al.*, 1979). Die DNA-Replikation startet an definierten Punkten auf dem HSV-1 Genom, einem Startpunkt in der Mitte der L-Region, ori_L (Gray & Kaerner, 1984) und einem Startpunkt in den reiterierten c- bzw. c'-Sequenzen der S-Region, ori_S (Stow, 1982). Für die Verpackung der viralen DNA in die vorgeformten Kapside werden die HSV-1-DNA- Einheitslängen aus den Konkatemeren herausgeschnitten und in die im Zellkern zusammengebauten Kapside verpackt (Roizman, 1979). DNA enthaltene Kapside werden an der Kernmembran, die die viralen Glykoproteine inseriert enthalten, mit Teilen dieser Membran umhüllt. Die mit Membran umhüllten Kapside werden über das Zisternensystem des endoplasmatischen Retikulums an die Zelloberfläche transportiert und gelangen über den Vorgang der Exozytose in den extrazellulären Raum. In Abb. 1.2. ist der Lebenszyklus von HSV-1 schematisch dargestellt. Bei der HSV-1 Replikation werden etwa 30 000 bis 50 000 Tochter-DNA-Moleküle in den infizierten Zellen synthetisiert. Ein grosser Anteil viraler Tochter-DNA wird Bestandteil eines Nukleokapsids, von denen etwa 3 000 bis 5 000 als Teil eines reifen Viruspartikels aus einer infizierten Zelle ausgeschleust werden. Von diesen sind wiederum nur 300 bis 500 im Zellkulturexperiment infektiös, d. h. sie induzieren auf konfluenten Zellrasen Plaques. Die lytische und latente HSV-1 Infektion ist in Abb. 1.5. schematisch dargestellt.

1. 6. Latenz von HSV-1

Die Fähigkeit von HSV-1 in seinem menschlichen Wirt über die gesamte Lebenszeit in einem latenten Zustand zu verbleiben, ist einzigartig und Gegenstand intensiver Forschungen. Im latenten Zustand werden, mit Ausnahme von einigen latent-assoziierten Transkripten (LAT), keine viralen Funktionen vom HSV-1 Genom transkribiert (Doerig *et. al.*, 1991). Nach einer Primärinfektion mit HSV-1 gelangt das Virus über Epithelzellen und dem retrograden, axonalen Transport in die sensorischen Neuronen. Das latente virale Genom liegt im Zellkern der Neuronen als zirkuläres, extrachromosomales Element vor (Mellerick & Fraser, 1987). In den peripheren Ganglien kann das latent vorliegende Virus als Reaktion auf verschiedene

Stimulationen, die von Stevens et. al. (1989) zusammengefasst wurden, aus dem Zustand der Latenz reaktiviert werden. Nach der Reaktivierung werden die viralen Partikel häufig zurück an die Stelle der Primärinfektion transportiert, wo sie dann eine Sekundärinfektion mit den entsprechenden Läsionen auslösen. Im Vergleich zu der lytischen Infektion sind die Aktivitäten im latenten HSV-1 stark reduziert. Die Transkription ist auf Gene, die innerhalb der Wiederholungssequenzen, die das U_L-Segment des Genoms flankieren, begrenzt. Diese LATs werden von dem Gegenstrang des ICPO kodierenden Strangs transkribiert (Stevens, 1987). Obwohl mehrere " open reading frames " (ORFs) innerhalb der LATs vorhanden sind, konnte bis heute kein LAT-kodiertes Protein in latent infizierten Neuronen *in vivo* nachgewiesen werden. Die Funktion der LATs bleibt weiterhin unbekannt, wobei sie weder für die virale Replikation, dem Erlangen, noch der Erhaltung der latenten Infektion notwendig sind (Fraser et. al., 1992).

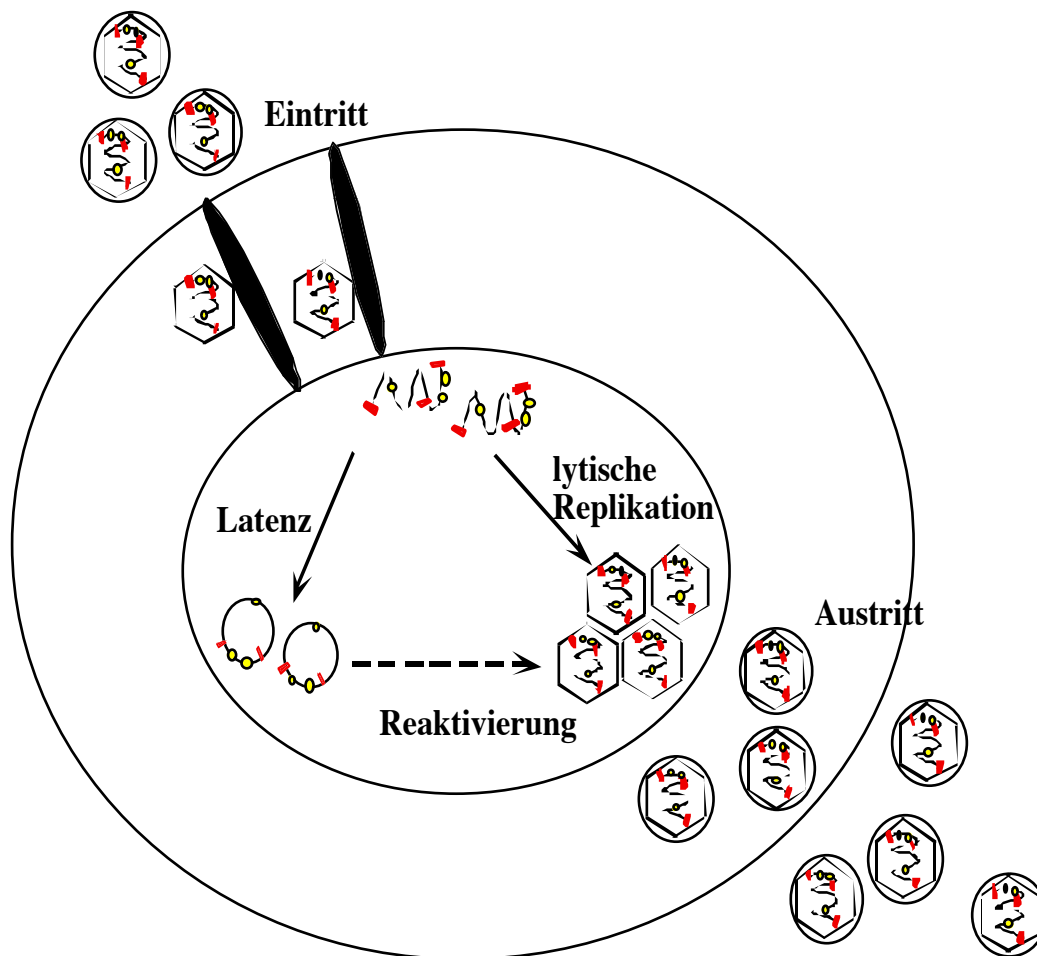


Abb. 1.7. Lytische und latente HSV-1 Infektion. Der lytische HSV-1 Replikationszyklus dauert ca. 18 Stunden und schliesst folgende Schritte ein: 1. " Attachment " des Virus an Heparansulfate und Oberflächenrezeptoren der Wirtszelle; 2. Fusion der Virushülle und Plasmamembran; 3. Freisetzung des Kapsids in das Zytoplasma; 4. Aktiver Transport des Kapsids entlang von Mikrotubulis zum Zellkern; 5. Freisetzung des Genoms in den Zellkern; 6. Induktion der *IE* Gene durch α -TIF; 7. Transkription von IE u. E Genen; 8. Virale DNA-Synthese; 9. Transkription von L Genen; 10. Zusammensetzung der Kapside; 11. Verpackung der DNA in die vorgeformten Kapside; 12. Umhüllung der Kapside mit Zellmembran; 13. Virion Austritt. 14. In Neuronen nimmt das Virus einen latenten Zustand ein, in dem das Genom inaktiv ist. 15. Durch verschiedene Faktoren kann das Genom jedoch reaktiviert werden und nimmt die lytische Replikation wieder auf.

1. 7. Das HSV-1 immediate early (IE) 3 Gen

Das *IE3* Gen ist eines der insgesamt fünf α -Gene, die nach der Freisetzung der viralen DNA in den Zellkern der Wirtszelle von α -TIF Protein induziert werden. Das Gen umfasst, definiert anhand der 5'- und 3'-Enden seiner mRNA, 4259 Basenpaare. Die für die Aminosäuren des Proteins kodierende Sequenz umfasst 3897 Basenpaare. Aufgrund des hohen Guanin-Zytosin-Gehalts von > 80% in der *IE3* Sequenz ist die Anwendung verschiedener molekularbiologischer Methoden wie die DNA-Sequenzierung und die Amplifikation mit der PCR-Technologie erschwert (Murchie und McGeoch, 1982; McGeoch *et. al.*, 1986). Das *IE3* Gen ist in den flankierenden α -Sequenzen der S-Region lokalisiert und liegt deshalb zweimal auf dem HSV-1 Genom vor. Von den fünf IE Genen zählt das *IE3*- und das *IE2* Gen zu den essentiellen Genen. Die Deletion der beiden *IE3* Genkopien oder des *IE2* Gens führt zu replikationsinkompetenten Viren, die nur auf Zellen wachsen, die den Defekt des Virus komplementieren (DeLuca *et. al.*, 1985; McCarthy *et. al.*, 1989; Smith *et. al.*, 1992; DeLuca & Schaffer, 1987). In den DNA Sequenzen, die dem *IE3* Gen vorgeschaltet sind, findet man verschiedene spezifische Signale, die die Expression des Gens regulieren (Rixon *et. al.*, 1982; Bzik & Preston, 1986). Diese Sequenzen umfassen neben der als TATA-Box (Breathnach & Chambon, 1981) dienenden Sequenz TATATGA weitere für die Genregulation wesentliche Sequenzelemente. In der 5' nichtkodierenden Domäne des *IE3* Gens fand man einen Sequenzabschnitt, der sich von der sog. " Cap site " bis zu Nukleotid -110 erstreckt und der die effiziente Transkription eines Reportergens in Abwesenheit von viralen trans-aktivierenden Faktoren bewirkte (Post *et. al.*, 1981). In den Sequenzen stromabwärts von Nukleotid -110 findet man eine G+C- reiche Region mit der Sequenzfolge CCGCCC und ihr invertiertes Komplement GGGCCG. In dieser Region liegen mehrere Bindungsstellen für den zellulären Transkriptionsfaktor SP1, der die Transkription des Gens stimuliert (Kristie & Roizman, 1984; Macken & Roizman, 1982; Jones *et. al.*, 1985). Obwohl man diese G+C-reichen Regionen auch in anderen IE Genen gefunden hat, wurden SP1 Bindungsstellen in anderen IE Genen nicht gefunden. Ein anderes mehrfach auftretendes Sequenzelement ist A+T-reich und hat die Konsensussequenz TAATGARATTC (R steht für eine beliebige Purinbase). Die Konsensussequenz findet man mit geringen Abweichungen bei allen IE Genen in der Promoterregion vor (Macken & Roizman, 1982; Preston *et. al.*, 1984). Sie interagiert mit dem α -Gene transinduzierenden Faktor (α -TIF), wodurch die Transkription der IE Gene aktiviert wird (Campbell *et. al.*, 1984). Die Konsensussequenzen der fünf IE Gene für α -TIF sind in Tabelle 1.7. dargestellt. Desweiteren findet man in den Promotersequenz des *IE3* Gens, sowie des *IE1* Gens und an der Transkription Initiationsstelle des *IE3* Gens ICP4 Bindungsstellen, die in den restlichen IE Genen nicht vorhanden sind (Roizman *et. al.*, 1988; Muller, 1987; Kristie & Roizman 1986; Faber & Wilcox, 1986). Das ATG (bzw. AUG) Startkodon liegt auf der mRNA bei Position + 300 und entspricht mit seinen angrenzenden Basen (GCGATGG) der Kozaksequenz für effiziente Initiation der Translation (Kozak, 1983). Das Terminationskodon für die Translation liegt bei Position + 4192. In kurzem Abstand von 43 Basenpaaren schliesst sich das AATAAA Polyadenylierungssignal (Proudfoot & Brownlee, 1976) an, gefolgt von der Polyadenylierungsstelle.

IE Gen	Konsensussequenz		
Konsensus*		5' TAATGARATTC 3'	
ICPO	-304	TAATGAG <u>IT</u> TTC	-294
	-222	TAATGGGG <u>T</u> TTC	-212
	-160	TAATGAT <u>A</u> TTC	-50
ICP4	-262	TAATGAGAT <u>G</u> C	-252
	-113	TAATGG <u>AA</u> TTC	-103
ICP22/47	-391	TA <u>AC</u> GAGG <u>AA</u> C	-381
	-337	TAATGAGATAC	-327
	-172	T <u>AAA</u> GAAG <u>TG</u>	-162
ICP27	-152	TAAT <u>TAA</u> ATAC	-142
	+164	TAAT <u>TGAC</u> CTC	174

Tabelle 1.7. Konsensussequenz in der Promotor Region der IE Gene, über die die Transkriptionsaktivierung durch α -TIF erfolgt. Abweichungen von der oben gezeigten Konsensussequenz (Mackem & Roizman, 1982) sind unterstrichen. (*) Der Buchstabe R steht für Guanisin oder Adenosin.

1. 8. Das *IE3* Genprodukt “ Infected cell polypeptide 4 “ (ICP4)

Das Produkt des *IE3* Gens wird als “ infected cell polypeptide 4 “ (ICP4) bezeichnet. Die Charakterisierung von Temperatur-sensitiven (*ts*) Mutanten und Deletionsmutanten der fünf IE Gene hat gezeigt, dass nur ICP4 und ICP27 für die produktive Infektion in Zellkultur essentiell sind (DeLuca *et. al.*, 1985; Dixon & Schaffer, 1980; Post & Roizman, 1981; Preston, 1979; Sacks *et. al.*, 1985; Smith & Schaffer, 1986). ICP4 ist ein relativ grosses, nukleares Phosphoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 175 000 Dalton (Campbell *et. al.*, 1984; Courtney & Benyesh-Melnick, 1974). Das primäre Translationsprodukt wird aufgrund seiner DNA-Sequenz mit einem Molekulargewicht von 132.835 Dalton vorausgesagt. Die Unterschiede in den beiden angegebenen Molekulargewichten resultieren aus der atypischen Aminosäure-Zusammensetzung (Mc Geoch *et. al.*, 1986) und aus der posttranslationalen Modifikation des Proteins (Pereira *et. al.*, 1977; Wilcox *et. al.*, 1980). Da ICP4 ein Phosphoprotein ist, kann es in verschiedenen Phosphorylierungszuständen auftreten, so dass im SDS-Polyacrylamidgel mehrere dicht beieinanderliegende Proteinbanden sichtbar werden (Pereira *et. al.*, 1977; Wilcox *et. al.*, 1980). ICP4 ist ein multifunktionelles, regulatorisches Protein, das sowohl als Transaktivator (Everett, 1984; O'Hare & Hayward, 1985; Post *et. al.*, 1981), als auch als Transrepressor auf die Expression verschiedener viraler Gene wirkt (DeLuca & Schaffer, 1985; O'Hare & Hayward, 1985; Batchelor & O'Hare, 1990; Bohenzky *et. al.*, 1993; Yeh & Schaffer, 1993). Die Transkription der viralen Gene erfolgt durch die zelluläre RNA Polymerase II (Alwine *et. al.*, 1974; Constanzo *et. al.*, 1977) als individuelle Transkriptionseinheiten, wodurch vorwiegend ungespleisst mRNA Moleküle entstehen (Wagner, 1985). Die Frequenz, mit der ein Gen transkribiert wird, wird von den Promotor-assoziierten Signalen, den viralen *trans*-wirkenden Proteinen und den zellulären *trans*-wirkenden Proteinen bestimmt. Zusammen bewirken diese Elemente das zeitliche Expressionmuster, das man bei einer HSV-1 Infektion beobachten kann (Clements *et. al.*, 1977; Honess & Roizman, 1974). ICP4 ist eines der wichtigsten regulatorischen Proteine von HSV-1, das für das charakteristische Expressionsmuster bei HSV-1 verantwortlich ist. Ein funktionelles ICP4 ist für die effiziente Geninduktion der frühen (E) und späten (L) Gene erforderlich (Everett, 1984; Gelman & Silverstein, 1985; Godowski & Knipe, 1986; Quinlan & Knipe, 1985) und wirkt auf seine eigene Expression als Repressor (DeLuca & Schaffer, 1985; O'Hare &

Hayward, 1985). Eine negative Regulation von ICP4 konnte auch für den Promoter des latency-associated transcript (LAT) (Batchelor & O'Hare, 1990) und den Promoter des L/ST beobachtet werden (Yeh & Schaffer, 1993; Bohenzky *et. al.*, 1993). Ebenso wie bei anderen Transkriptionsfaktoren findet man bei ICP4 verschiedene funktionelle Domänen, über die das Protein seine aktivierenden, bzw. reprimierenden Eigenschaften vermittelt. Man unterscheidet zwischen einer DNA-Bindungsregion, einer Kern-Lokalisierungsregion und einer Transaktivierungsregion, sowie einer Autoregulationsregion (DeLuca & Schaffer, 1988; Paterson & Everett, 1988; Paterson & Everett, 1990; Shepard *et. al.*, 1989). Für die Ermittlung der einzelnen funktionellen Domänen von ICP4 wurden verschiedene Nonsense- und Deletionsmutationen in das *IE3* Gen eingeführt. Die Experimente mit den entsprechenden Peptiden ergaben, dass die DNA Bindungsregion, die Transkriptionsaktivierungsregion, die Autoregulationsregion, sowie die Kernlokalisierungsregion und die Phosphorylierungsstellen in einem Peptid, das die 774 aminoterminalen Aminosäuren von dem 1.298 Aminosäure umfassenden ICP4, enthalten sind (DeLuca & Schaffer, 1988). Mit der Herstellung weiterer Insertionsmutanten und Deletionsmutanten konnten die funktionellen Regionen deutlicher voneinander abgegrenzt werden. Insertionsmutationen in den Aminosäureresten 443-487 und 263-338 zeigten den Verlust, bzw. eine stark geschwächte Bindungsaktivität, wodurch diese beiden Regionen eine grosse Bedeutung für die DNA-Bindung von ICP4 haben. Die Deletion von den Aminosäuren 143-210 führte zum Verlust der Transkriptionsaktivierung, die Deletionsmutante war jedoch zur DNA Bindung und zur Autoregulation befähigt. Die verschiedenen funktionellen Domänen des ICP4 sind in Abb. 1.8. dargestellt. Es gibt verschiedene Hinweise dafür, dass ICP4 für die Transkriptionsaktivierung an bestimmte Sequenzmotive bindet (Kristie & Roizman, 1986; Faber & Wilcox, 1986). Aus einer statistischen Analyse von verschiedenen potentiellen ICP4 Bindungsstellen hat man die folgende Konsensussequenz RTCGTCNNYNYSG abgeleitet, in der R für eine Purinbase, Y für eine Pyrimidinbase, S für Cytosin oder Guanin und N für eine beliebige Base steht (DiDonato *et. al.*, 1991). Andere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass ICP4 an sehr unterschiedliche DNA Sequenzen bindet, die keine Ähnlichkeit mit den postulierten ICP4 Bindungsstellen aufweisen (Smiley *et. al.*, 1992; Inostroza *et. al.*, 1992). Scheinbar erfordert die ICP4 vermittelte Transkriptionsaktivierung keine spezifischen DNA Interaktionen. Ein Promoter, der nur aus einer TATA-Box bestand, konnte ebenfalls durch ICP4 aktiviert werden (Gu & DeLuca, 1994). Anders ist es dagegen bei der ICP4 vermittelten Repression, hier konnte in den entsprechenden Promoterregionen ein einheitliches Sequenzmotiv ermittelt werden. Die Konsensussequenz liegt hierbei in unmittelbarer Nähe der Transkriptionsinitiationsstelle und hat die Konsensussequenz 5' CGCCCCGATCGTC 3' (Muller, 1987). Für die Ausführung seines regulatorischen Effekts muss ICP4 sowohl mit der DNA, als auch mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren der zellulären Transkriptions-Maschinerie interagieren (Beard *et. al.*, 1986; Cook *et. al.*, 1995; Gu & DeLuca, 1995; Gu *et. al.*, 1993; Smith *et. al.*, 1993). Für die Initiation der Transkription interagiert ICP4 mit verschiedenen zellulären basalen Transkriptionsfaktoren, wie Transkriptionsfaktor IID (TFIID) (Cook *et. al.*, 1995), dem TATA-Box Bindungsprotein (TBP) (Gu & DeLuca, 1994) und dem TATA-Box assoziierten Faktor 250 (TAF250) (Carozza & DeLuca, 1996). Die Repression wird durch die Bindung von ICP4 an definierte ICP4 Bindungsstellen im Promoterbereich und die Interaktion mit TBP und TFIIB hervorgerufen (Kuddus *et. al.*, 1995). Bisher kennt man noch nicht die Details über die verschiedenen Wechselwirkungen, mit denen ICP4 mit den unterschiedlichsten DNA Sequenzen interagiert. Man vermutet, dass durch die Phosphorylierung verschiedener Aminosäurereste, sowohl die DNA Bindungsaffinitäten und dadurch auch die transaktivierenden Wirkungen des Proteins vielfältig verändert werden können. Die Beobachtung, dass ICP4 mit diversen zellulären basalen Transkriptionsfaktoren interagiert und sogar in der Lage ist, zelluläre Transkriptionsfaktoren wie SP1 zu ersetzen, spricht für die Vielfältigkeit von ICP4 in der Regulation viraler, sowie zellulärer Gene.

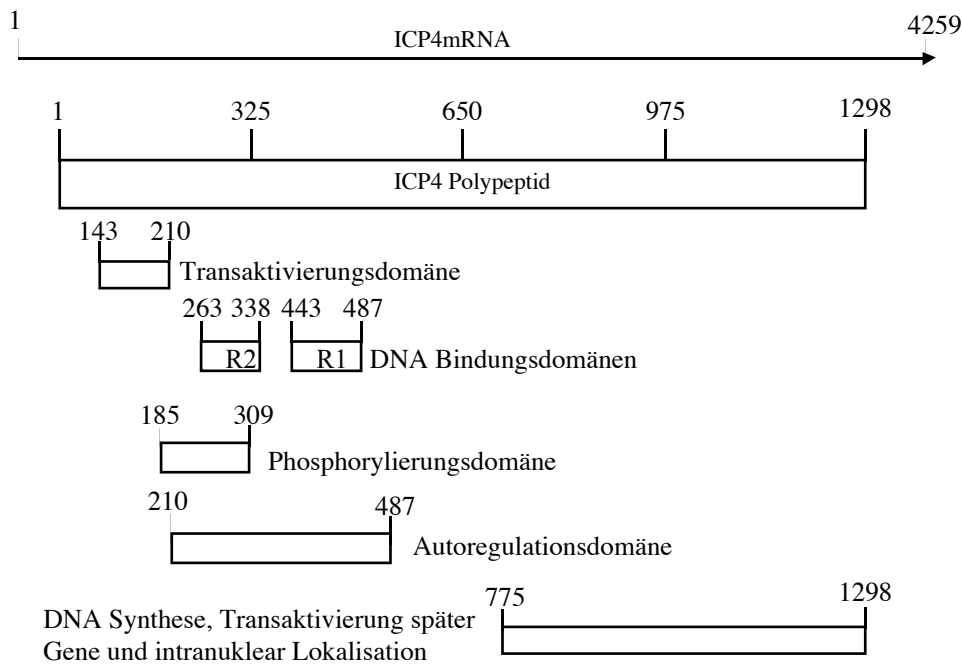


Abb. 1.8. Physikalische und funktionelle Domänen von ICP4. Die Abbildung zeigt die mRNA von ICP4, die 4259 Basen umfasst. Darunter ist die ICP4 Polypeptidsequenz von links nach rechts vom aminoterminalen Ende (Aminosäure 1) zum carboxyterminalen Ende (Aminosäure 1298) dargestellt. Die funktionell wichtigen Regionen des Polypeptids sind separat mit Angabe der relativen Aminosäurepositionen unter dem ICP4 Polypeptid aufgeführt.

1.9. Virale Vektorsysteme für den Gentransfer

Die gezielte genetische Manipulation von Zellen und Tieren ist ein wichtiges Werkzeug der molekularbiologischen und molekularmedizinischen Forschung, die der Aufdeckung molekularbiologischer, biochemischer sowie physiologischer Prozesse und der Entwicklung spezifisch wirkender Medikamente dient (Gordon *et. al.*, 1980; Constantini *et. al.*, 1981). Durch die Einführung der DNA Transfektionstechnik und der Mikroinjektion konnten grundlegende Informationen über die verschiedensten Prozesse in der Zelle und im Tiermodell gewonnen werden (Windle *et. al.*, 1990; Stacey *et. al.*, 1988). Obwohl diese Techniken sehr wertvolle und wichtige Informationen liefern, sind sie doch sehr zeitaufwendig und führen zur genetischen Veränderung jeder Zelle in dem daraus gebildeten Tier. Aufgrund der Komplexität des Säuger-Nervensystems begannen verschiedene Neurobiologen mit der Suche nach Gentransfer-Methoden, die eine schnelle und selektive genetische Manipulation bestimmter Zellpopulationen ermöglicht. Die Suche wurde dann durch die Forscher intensiviert, die den Wunsch hatten die Gentherapie auf die Behandlung neuronaler Fehlfunktionen auszuweiten. Der direkte Transfer eines Gens oder mehrerer Gene in bestimmte Zellen des komplett entwickelten Organismus bietet nicht nur die Möglichkeit, verschiedene Erbkrankheiten (wie z. B. Hypercholesterinämie, Duchenne'sche-Muskel-Dystrophie, Hämophilie, zystische Fibrose usw.) zu behandeln, sondern ermöglicht die therapeutische Behandlung von erworbenen Krankheiten (wie z. B. Krebs, Parkinson, Alzheimer, Entwicklungsanomalien, AIDS usw.) und vielleicht auch die Regeneration zerstörter Gewebe. Bei der Einführung eines normalen oder funktionell adäquaten Allels von dem mutierten Kerngen spricht man von der sog. Gen-Austausch-Therapie, die vorwiegend bei monogenetischen, rezessiv vererbten Krankheiten anwendbar ist. Für die dominant vererbten Krankheiten, bei denen das mutierte Protein verschiedene

Effekte verursacht, erfordert andere gentherapeutische Strategien. Die Anwendung der Gentherapie ist bei fast allen Krankheiten denkbar, auch bei Krankheiten, bei denen man noch keine genauen Erkenntnisse über die beteiligten Gene und Proteine zur Verfügung hat. So könnten beispielsweise Gene, die für Neuroprotektive Proteine kodieren in betroffene Zellen eingebracht werden und somit deren Zerstörung verhindert oder vermindert werden (Karpati *et. al.*, 1996). Diese Art der Gentherapie hätte einen besonderen Stellenwert für die Behandlung der degenerativen Enzephalopathien, wie Alzheimer und Parkinson. Bei dieser Suche wurden die viralen Vektoren zum Vehikel der Wahl für die genetische Manipulation des erwachsenen Nervensystems. Die Wahl beruhte unter anderem auf den dem Virus innewohnenden Eigenschaften als evolutionäre Gentransfer Agentien zu wirken (Bishop, 1985). Die Identifikation von zellulären Homologen zu den viralen Onkogenen ist ein Beispiel für den Einfluss des Virus-vermittelten Gentransfers in der Entwicklung der höheren eukaryontischen Organismen (Bishop, 1985; Stehelin *et. al.*, 1976). Viren sind obligatorische Parasiten, die für ihr Überleben die Funktionen des Wirts benötigen. Ihr genetisches Material ist entweder DNA oder RNA, das sie bei der Infektion in die Wirtszelle einschleusen. Unter lytischen Bedingungen wird die virale DNA repliziert, die viralen Strukturproteine synthetisiert und Nachkommenvirus produziert, wobei die Zelle normalerweise zerstört wird. In einigen Fällen führt die Insertion des viralen, genetischen Materials in ein Chromosom der Wirtszelle zu permanenten Veränderungen der Physiologie der Zelle (Anderson, 1992). Die meisten Viren und besonders die humanpathogenen Viren sind sehr gut erforscht, was die Herstellung verschiedener viraler Vektorsysteme erleichtert. Um die Viren für den Gentransfer und die Heilung von Krankheiten durch Gentherapie nutzen zu können, müssen an dem viralen Genom verschiedene Modifikationen durchgeführt werden. Eine der ersten Modifikationen am viralen Genom betraf die Replikationsfähigkeit des Virus (DeLuca *et. al.*, 1985). Durch die Deletion bestimmter Gene wurde das Wildtyp-Virus in eine Replikationsinkompetente Virusmutante verwandelt. Hierdurch behielt das Virus seinen infektiösen Charakter für den Gentransfer, verlor dagegen jedoch seine Replikationsfähigkeit (DeLuca *et. al.*, 1985; Sauer *et. al.*, 1987; Gage *et. al.*, 1992; Dobson *et. al.*, 1990; Chiocca *et. al.*, 1990). Die meisten dieser Vektoren sind dennoch für die Zellen zytotoxisch (Johnson *et. al.*, 1992). Dies führte dazu, weitere Gene aus dem Virus zu deletieren, um die zytotoxischen Effekte zu minimieren (Wu *et. al.*, 1996; Samaniego *et. al.*, 1998). Für die Expression des über das Virus eingeschleusten Gens wurden sowohl zelluläre, als auch virale Promoter verwendet (Breakfield & DeLuca, 1991; Glorioso *et. al.*, 1994). Bis heute sind verschiedene virale Vektorsysteme für den Gentransfer in verschiedene Zelltypen entwickelt und getestet worden (Kaplitt & Loewy, 1995). Für den Gentransfer in neuronale Zellen haben sich hierbei besonders auf Retroviren (RV) (Miller *et. al.*, 1990; Ghirnikar *et. al.*, 1994), Replikationsinkompetente Adenoviren (AV) (Neve, 1993; Akli *et. al.*, 1993; Davidson *et. al.*, 1993), Adeno-assoziiertes Virus (AA) (Kaplitt *et. al.*, 1994) und auf Replikationsinkompetente HSV-1 (Glorioso *et. al.*, 1994; Glorioso *et. al.*, 1994; Kennedy & Steiner, 1993) basierende Vektorsysteme als geeignet erwiesen. Alle diese Vektorsysteme besitzen für die Anwendung in der Gentherapie mehr oder weniger gute Voraussetzungen. Die charakteristischen Eigenschaften der verschiedenen viralen Vektorsysteme sind in Tabelle 1.9. zusammengefasst. Retroviren benötigen für die Genexpression die Integration ihres Genoms in das Wirtsgenom (Miller & Buttimore, 1986). Die Integration erfolgt jedoch ausschliesslich in mitotischen Zellen, wodurch ihr Anwendungsbereich begrenzt ist (Grossman *et. al.*, 1994). Adeno-assoziiertes Virus hat eine geringe Aufnahmekapazität für Fremd-DNA (ca. 5kbp), so dass nur kleine Gene von diesen Vektoren transferiert werden können (Kaplitt *et. al.*, 1994; Halbert *et. al.*, 1985). Replikationsinkompetente Adenoviren lösen nach der Infektion und dem Gentransfer eine starke Immunreaktion im Organismus aus, wodurch der Nutzen der Rekombinanten-Genexpression verloren geht (Zsengeller *et. al.*, 1995; Yei *et. al.*, 1994). Replikationsinkompetentes HSV-1 exprimiert eine Vielzahl zytotoxischer Gene und löst ebenfalls nach Infektion Immunreaktionen aus (Ho *et. al.*, 1995; Johnson *et. al.*, 1992; Johnson *et. al.*, 1992), die eine instabile rekombinante Genexpression zur Folge hat (During *et. al.*, 1994; Ho *et. al.*, 1993). Bis das gesamte Potential der

viralen Vektorsysteme für die effiziente Anwendung in der Gentherapie genutzt werden kann, müssen die gegenwärtigen Probleme gelöst und die bestehenden Vektorsysteme weiter entwickelt werden. Deshalb werden die bestehenden Vektorsysteme zur Zeit intensiver für die Studien biologischer Mechanismen und Systeme, sowie der Regulation bei der Entwicklung und Ausbildung neuroanatomischer Strukturen verwendet als für die eigentliche Gentherapie (Geller *et. al.*, 1991; Ridoux *et. al.*, 1994)

Eigenschaften	Retrovirus	Adenovirus	Adeno-assoziertes Virus	Herpes Simplex Virus
Maximale Insertgrösse	6.5 kbp	8 kbp	5 kbp	36 kbp / *150kbp
Maximale Titer	niedrig	hoch	niedrig	niedrig
Virusproduktion	Helfer-frei	Helfer-frei	Helfervirus	Helfer-frei / Helfervirus
Infektiosität	postmitotische u. mitotische Zellen	breiter Wirtsbereich	breiter Wirtsbereich	breiter Wirtsbereich
Integration	Chromosomal Integration (zufällig)	Episomal	Chromosomal Integration (nicht zufällig)	Episomal
Virale Gen-Persistenz in der Wirtszelle	Nein	Ja	Nein	Ja
<i>In vivo</i> Risiken	Mutagenese, Tumorbildung	Immunreaktion, Toxizität	nicht bekannt	Zytopathogenität, Immunreaktion
Latenz in der Wirtszelle	Ja	Nein	Ja	Ja
Gefahr einer Wildtyp Infektion im Menschen	gering	gering	gering	hoch / gering

Tabelle 1.9. Charakteristische Eigenschaften verschiedener, in der Gentherapie anwendbarer, viraler Vektoren. Der bei Herpes Simplex Virus angegebene maximale Wert für die Insertgrösse (*150kbp) bezieht sich auf HSV-1 Amplikon Vektoren, die im Vergleich zu den rekombinanten HSV-1 Vektoren (36 kbp) wesentlich mehr Fremd-DNA aufnehmen können.

1.10. HSV-1 Vektoren für den Gentransfer

Von denen in Abschnitt 1.9. genannten viralen Vektorsystemen erscheinen die auf HSV-1 basierenden Vektoren für den Gentransfer in das Zentrale-Nervensystem am geeignetsten. Die Anwendung von retroviralen Vektoren ist auf die mitotischen Zellen des Nervensystems begrenzt und finden hierbei ihren Hauptanwendungsbereich in der Behandlung von Gehirntumoren (Ram *et. al.*, 1993b; Tamiya *et. al.*, 1995). Im Gegensatz zu den retroviralen Vektoren integrieren Vektoren des Adeno-assozierten Virus sowohl in mitotische als auch in postmitotische Zellen, wobei die

Integrations-effizienz in postmitotischen Zellen vergleichsweise gering ist und erst in der S-Phase des Zellzyklus stattfindet (Wong *et. al.*, 1993; Russell *et. al.*, 1994). Adenovirus (Akli *et. al.*, 1993; Davidson *et. al.*, 1993; Le Gal La Salle *et. al.*, 1993) und HSV-1 Vektoren (Fink *et. al.*, 1992; Chiocca *et. al.*, 1990; Glorioso *et. al.*, 1994) besitzen dagegen einen sehr weiten Wirtszellbereich und eine sehr hohe Infektionseffizienz postmitotischer Zellen. Mit beiden Vektortypen konnte die rekombinante Genexpression von einem Fremdgen im Gehirn gezeigt werden (Boviatsis *et. al.*, 1994a; Bajocchi *et. al.*, 1993). Trotz der vielversprechenden Eigenschaften der Adenovirus Vektoren, besitzen die HSV-1 Vektoren charakteristische Eigenschaften, die sie für den Gentransfer in neuronale Zellen präferieren. Hierzu zählt unter anderem der natürliche Neurotropismus von HSV-1 und seine Latenz in neuronalen Zellen, in der das Virus ohne physiologische Veränderungen oder Schädigungen und ohne das Auslösen von Immunreaktionen über die gesamte Lebenszeit des Wirts existieren kann. HSV-1 infiziert mit einer hohen Effizienz verschiedene Zelltypen des zentralen Nervensystems, einschliesslich Neuronen, neuronale Vorläuferzellen und Glia-Zellen. Etwa die Hälfte der viralen HSV-1 Gene ist für die produktive Replikation nicht notwendig (Roizman & Sears, 1996; McGeoch *et. al.*, 1985; McGeoch *et. al.*, 1988), woraus sich eine grosse Kapazität für die Aufnahme von Fremd-DNA ergibt. Die Entwicklung von sog. HSV-1 Amplikon Vektoren ermöglicht theoretisch die Aufnahme und den Transfer von bis zu 150 kbp Fremd-DNA. Einige HSV-1 Mutanten besitzen nach der Deletion gewisser Gene, die für die Replikation in postmitotischen Zellen erforderlich sind, die Fähigkeit sich nur in teilenden Zellen zu replizieren (Miyatake *et. al.*, 1997). Diese rekombinanten Vektoren sind von besonderer Bedeutung für die Therapie von Tumoren. Durch den retrograden, axonalen Transport von HSV-1 in den Neuronen ist die Überbrückung der Blut-Hirn-Schranke für das Virus möglich. *In vitro* konnten mit verschiedenen rekombinanten HSV-1 Mutanten funktionelle Transgene in eine Vielzahl von kultivierten Neuronen, einschliesslich solche aus dem Spinal Cord, Cerebellum, Basal Ganglien, Thalamus, Hippocampus und Neocortex der Ratte, eingeschleust werden (Geller & Freese, 1990). Ständig werden neu entwickelte Vektoren auf ihre Sicherheit, Stabilität der Genexpression, die Wirkung des therapeutischen Gens und die Zytotoxizität in vorklinischen Studien getestet. In Tabelle 1.10. sind einige Beispiele für vorklinische Studien mit HSV-1 zusammengefasst. Die bisherigen Ergebnisse sprechen dabei eindeutig für die Verwendung von HSV-1 Vektoren für die Genterapie des Nervensystems, doch bevor die Anwendung der Genterapie den erhofften Nutzen bringt, sind noch viele Entwicklungsschritte erforderlich.

Gene	Zellen/Gewebe	Krankheit	Referenz
Nerven-Wachstumsfaktor	PC12 Zellen oder Neuronen	Alzheimer	Geschwind <i>et. al.</i> , 1994
Nerven Wachstumsfaktor	deinervierte superior cervikales Ganglion der Ratte	Dysautonomia	Federoff <i>et. al.</i> , 1992
Tyrosinhydroylase	teilweise deinerviertes Ratten striatum	Parkinson	During <i>et. al.</i> , 1994
Tyrosinhydroylase	kultivierte Neuronen	Parkinson	Horellou <i>et. al.</i> , 1994
Hypoxanthin-Guaninphosphoribosyl-Transferase	Unspez. Regionen des Maus Gehirns	Lesch-Nyhan Syndrom	Pallela <i>et. al.</i> , 1989

Tabelle 1.10. Beispiele für den vorklinischen, therapeutischen Gentransfer mit HSV-1 Vektoren in Zellen des Nervensystems *in vitro* und *in vivo*.

1. 11. Rekombinante und defekte Herpes Simplex Virus Vektoren

Man unterscheidet prinzipiell zwei Arten von HSV-1 Vektoren, die für die Gentherapie entwickelt wurden.

1. Rekombinante HSV-1 Vektoren sind nahezu Wildtyp Viren, die aufgrund der Deletion eines oder mehrerer essentieller Gene die Fähigkeit zur selbstständigen Replikation verloren haben (Replikationsinkompetente HSV-1 Vektoren) und deshalb eine reduzierte Neuropathogenität besitzen. Die Propagation derartiger Virusmutanten benötigt spezielle Zellen, die den Defekt des Virus komplementieren (DeLuca *et. al.*, 1985). Die ersten rekombinanten Herpes Simplex Viren wurden für die Vakzinierung gegen HSV-1 und HSV-2 und für Funktionsstudien der Virusgene hergestellt. Erst später, im Zuge der Suche nach neuen Gentransfer Methoden, betrachtete man sie als brauchbare Gentransfer Vehikel. Protokolle für die genetische Manipulation von Virusgenome wurden erstmals von Post und Roizman vorgestellt (Post & Roizman, 1981). Mit der Technik der gezielten genetischen Manipulation viraler DNA begannen die ersten Expressionstudien verschiedener eukaryontischer Gene unter der Kontrolle von HSV-1 Promotern und die Herstellung verschiedener Virusmutanten. Die produzierten Virusmutanten wurden wiederum in weiteren Experimenten auf ihre gentherapeutische Anwendung geprüft. Die grössten Probleme bei der Verwendung rekombinanter HSV-1 Vektoren für die Gentherapie sind dabei die viral induzierte Zytotoxizität, einschliesslich der lytischen Replikation, sowie die kurz anhaltenden und niedrigen Expressionslevel des therapeutischen Gens. Ein für die Anforderungen der Gentherapie geeigneter Vektor sollte folgende Kriterien erfüllen: A. In dem Vektor sollte jegliche Toxizität eliminiert sein. B. Das Erlangen der Latenz des Vektors sollte vorprogrammiert sein. C. Die Reaktivierung des Vektors sollte nicht möglich sein. D. Die Expression des therapeutischen Gens sollte stabil und regulierbar sein. Mit der gezielten genetischen Manipulation viraler Genome (Deletion verschiedener Gene, Insertionsmutationen, Nonsens-Mutationen), versucht man heute die rekombinanten HSV-1 Vektoren diesen Anforderungen näher zu bringen und verschiedene Erfolge konnten bereits verzeichnet werden. Die Deletion mehrerer IE Gene (ICP0, ICP4 und ICP27) verminderte die virale Genexpression und führte zu einer reduzierten Zytotoxizität des Virus (Samaniego *et. al.*, 1997). Die Mutation von α -TIF und die spezifische Regulation der ICP0 Expression eliminierte die ansonsten in Zellkultur zu beobachtende Zytotoxizität des Virus (Preston *et. al.*, 1997). Die Herstellung von rekombinanten HSV-1 ohne jegliche IE Genexpression zeigte ebenfalls nach Infektion in VERO-Zellen und in menschlichen embryonalen Lungen (HEL) Zellen keine Toxizität. Die genetischen Veränderungen des Virus, die für die Elimination der Toxizität und der Persistenz des Genoms für eine lange Zeit in der Zelle notwendig waren, reduzierten jedoch gleichzeitig die Expression des Transgens (Samaniego *et. al.*, 1998). Für die Regulation des mittels rekombinanter HSV-1 Vektoren transferierten therapeutischen Gens wurden bereits verschiedene Expressionsregulationssysteme in Verbindung mit Reportergenen (LacZ und GFP) erfolgreich getestet (Warden & Weir, 1996; Oligino *et. al.*, 1998). Bei der intensiven Suche nach geeigneten rekombinanten HSV-1 Vektoren wurde ein zweiter Typ der rekombinanten HSV-1 Vektoren geschaffen, der sich in seinen Replikationseigenschaften von den bisherigen replikationsinkompetenten HSV-1 Vektoren unterscheidet. Diese Vektoren tragen die Bezeichnung konditional-replikationsinkompetente HSV-1 Vektoren und sind durch Mutationen in Genen, wie z. B. im Thymidinkinasegen oder Ribonukleotidreduktasegen, die für den Nukleinsäure Metabolismus in postmitotischen Zellen notwendig sind, charakterisiert (Goldstein & Weller, 1988). In postmitotischen Zellen replizieren diese Viren nicht, während sie in schnell proliferierenden Zellen ebenso gut wie Wildtypvirus replizieren (Coffin *et. al.*, 1996). Aufgrund dieser Eigenschaften sind diese Viren für die selektive Gehirntumor-Therapie von Bedeutung, da sie die Fähigkeit besitzen, Tumorzellen direkt abzutöten und die benachbarten neuronalen Gewebe zu erhalten (McKie *et. al.*, 1996). Die Untersuchung von HSV-1 RL1 Deletionsmutante 1716 (McLean *et. al.*, 1991) hat gezeigt, dass die Replikation sowohl Zelltyp als auch Zellzyklus abhängig ist und eine

latente Infektion in Neuronen *in vivo* hervorrufen kann (Valyi-Nagy *et. al.*, 1994). Die Verwendung von Zell- oder Gewebe-spezifischen Promotern in den konditional-Replikations-inkompeten HSV-1 Viren soll die Expression der therapeutischen Gene auf die Zielzellen, bzw. Zielgewebe begrenzen (Brenner, 1994; McKie *et. al.*, 1998) oder die Replikation nur in spezifischen Zellen und Geweben erlauben (Chung *et. al.*, 1999). Andere Gruppen versuchen das Ziel der Zelltyp- spezifischen Infektion über die Herstellung chimärer Oberflächenproteine zu erreichen. Hierbei werden sog. Fusionsgene vom Virusgenom exprimiert, die dann in die Hülle des Virus eingebaut werden. Ein Beispiel hierfür ist ein chimäres Protein, das aus einer mutierten Form des HSV-1 Glykoproteins C (gC) und dem Erythropoietin Hormon besteht, wodurch HSV-1 an den Erythropoietin Oberflächenrezeptor bindet (Laquerre *et. al.*, 1998), sowie ein mit dem His-tag modifizierten gC, das für die spezifische Infektion von Tumorzellen mit HSV-1 dient (Spear *et. al.*, 1999).

2. Defekte HSV-1 Vektoren oder HSV-1 Amplikon Vektoren sind von bakteriellen Plasmiden abgeleitet und enthalten nur ca. 1% des 150kbp HSV-1 Genoms. Die genetischen Elemente eines typischen HSV-1 Amplikon Vektors sind in Abb. 1. 11. dargestellt. Die Entstehung der Amplikon Vektoren ist auf die Beobachtung sog. Defektvarianten von HSV-1 zurückzuführen (Huang, 1977; Frenkel *et. al.*, 1976). Defektvarianten akkumulieren bei serieller *In-vitro*-Passage von Viren mit einer hohen Multiplizität der Infektion (MOI). Sie sind in ihrer Partikelstruktur nicht verschieden von infektiösem Wildtypvirus und können daher nicht voneinander getrennt werden (Frenkel, 1981). Die weitere Untersuchung der Defektvarianten zeigte, dass sie ein Genom von HSV-1 Einheitslänge enthalten, auf dem bestimmte virale Sequenzen mehrfach wiederholt vorliegen. Aufgrund der zu 95% fehlenden HSV-1 Sequenzen im defekten Genom sind die Defektvarianten nicht zur eigenständigen Replikation fähig. Da sie aber dennoch in Gegenwart des “ Helfervirus “ repliziert und verpackt wurden, konnte man daraus schliessen, dass in den Wiederholungssequenzen der DNA Replikationsursprung (ori), sowie das Reifungs- und Verpackungssignal (pac) enthalten sein müssen (Frenkel *et. al.*, 1976; Locker & Frenkel, 1979; Locker *et. al.*, 1982). Basierend auf dieser Beobachtung entwickelten Spaete und Frenkel (1982) bakterielle Plasmide, die den HSV-1 DNA Replikationsursprung (ori_s) und das HSV-1 Reifungs- und Verpackungssignal (pac) tragen. In der Gegenwart von HSV-1 Helferfunktionen konnten sie dann die Replikation und Verpackung des Plasmids in Säuger-Zellen nachweisen. Die Genome der hierbei gebildeten Partikel bestanden aus amplifzierten Kopf-an-Schwanz verknüpften Konkatemeren des verwendeten Plasmids, weshalb das Plasmid die Bezeichnung “ Amplikon “ erhielt (Kwong & Frenkel, 1985; Spaete & Frenkel, 1982). Der Aufbau eines defekten HSV-1- bzw. HSV-1 Amplikon Vektors ist in Abb. 1.11. dargestellt. 1988 wurde dann der Prototyp der defekten HSV-1 Vektoren pHSVlac von Geller und Breakfield entwickelt. Die genetischen Elemente, die auf einem Amplikon Vektor enthalten sind, ist ein DNA Replikationsursprung (colE1ori) aus *Escherichia coli*, ein Resistenzmarkergen (amp^r) ein DNA Replikationsursprung aus HSV-1 (ori_s), ein HSV-1 Reifungs- und Verpackungssignal (pac), und ein Reporter gen (lacZ oder GFP) unter der Kontrolle eines HSV-1 immediate-early (IE) Promoters. Die bakteriellen DNA Sequenzen erlauben die selektive Amplifikation des Vektors in Bakterienzellen und die viralen DNA Sequenzen ermöglichen die Replikation und Verpackung des Amplikon Vektors in HSV-1 Partikel in eukaryontischen Zellen in der Gegenwart eines sog. Helfervirus (Geller & Freese, 1990; Geller *et. al.*, 1990). Dabei liefert das Helfervirus alle für die Replikation und Verpackung in HSV-1 Partikel notwendigen viralen Funktionen. Ebenso wie die rekombinanten HSV-1 Vektoren, besitzen die defekten HSV-1 Vektoren verschiedene Eigenschaften, die sie zu vielversprechenden Kandidaten für den Gentransfer machen. A. Da die defekten HSV-1 Vektoren für die Replikation und Verpackung in HSV-1 Partikel nur etwa 1% der HSV-1 Sequenz tragen und keine viralen Proteine exprimieren, besitzt der Vektor eine grosse Aufnahmekapazität für Fremd-DNA (theoretisch bis zu 152 kbp). B. Abhängig von der Grösse des verwendeten Vektors können mehrere Kopien des Transgens in einen einzigen Vektorpartikel verpackt werden. C. HSV-1 kann die meisten Säuger-Zelltypen,

einschliesslich postmitotischer Zellen des Nervensystems infizieren. D. Das HSV-1 Virion ist relativ untoxisch für die Zellen. Der Hauptnachteil bei der Verwendung defekter HSV-1 Vektoren ist die Notwendigkeit von Helferviren und die Entstehung von Revertanten mit Wildtyp HSV-1 Phänotyp. (During *et. al.*, 1994; Lim *et. al.*, 1996; Pechan *et. al.*, 1996). In den vergangenen Jahren wurden die Verpackungssysteme für defekte HSV-1 Vektoren jedoch wesentlich verbessert, wodurch die Zytotoxizität drastisch reduziert werden konnte. Die Entwicklung der Verpackungssysteme ist in Abschnitt 1.12. beschrieben. Die Infektion von neuronalen Zellen in Gewebekultur mit defekten HSV-1 Vektoren führt zu einer stabilen Expression des Fremdgens unter der Kontrolle von einer Vielzahl von viralen Promotern (Geller & Breakfield, 1988; Palella *et. al.*, 1988; Geller *et. al.*, 1993; Bahr *et. al.*, 1994; Smith *et. al.*, 1993; Geller *et. al.*, 1995). Desweiteren zeigten Tierversuche, dass die defekten HSV-1 Vektoren für die Expression verschiedener Transgene *in vivo* im zentralen Nervensystem genutzt werden können (Kaplitt *et. al.*, 1991; Fink *et. al.*, 1992; Huang *et. al.*, 1992; Wolfe *et. al.*, 1992). Ebenso wurden die Vektoren für den Transfer funktionell aktiver Gene eingesetzt, um die Physiologie der Neuronen zu verändern (Federoff *et. al.*, 1992; Bergold *et. al.*, 1993; Lawrence *et. al.*, 1995; Kesari *et. al.*, 1995). Aufgrund dieser Erfolge wurden auch die defekten HSV-1 Vektoren sehr schnell für vorklinische Studien in Tiermodellen verwendet (During *et. al.*, 1992). Im allgemeinen war die Dauer der *in vivo* Genexpression, die von viralen Promotern reguliert wurde, nur von kurzer Zeit (Kaplitt *et. al.*, 1991; Glorioso *et. al.*, 1995; Friedmann, 1994) und nicht Zelltyp-spezifisch (Wood *et. al.*, 1994; Huang *et. al.*, 1992; Wolfe *et. al.*, 1992) im Nervensystem. Die Expression des Fremdgens konnte man in Neuronen und Gliazellen beobachten. Eine länger anhaltende und Zelltyp-spezifische Fremdgen Expression wurde im Rattengehirn durch die Verwendung des neuronalen Promoters Preproenkephalin (PPE) erzielt. Dies liess vermuten, dass die Verwendung von Zelltyp-spezifischen Promotern sowohl die Dauer als auch die Selektion der Genexpression steigert (Kaplitt *et. al.*, 1994). Die genannten Beispiele geben einen Eindruck über die vielfältigen Möglichkeiten und das schnelle Fortschreiten bei der Entwicklung rekombinanter HSV-1 und defekter HSV-1 Vektoren. Es ist scheinbar nur eine Frage der Zeit, bis die ersten rekombinanten HSV-1 Vektoren für die routinemässige Anwendung in der Genterapie zur Verfügung stehen.

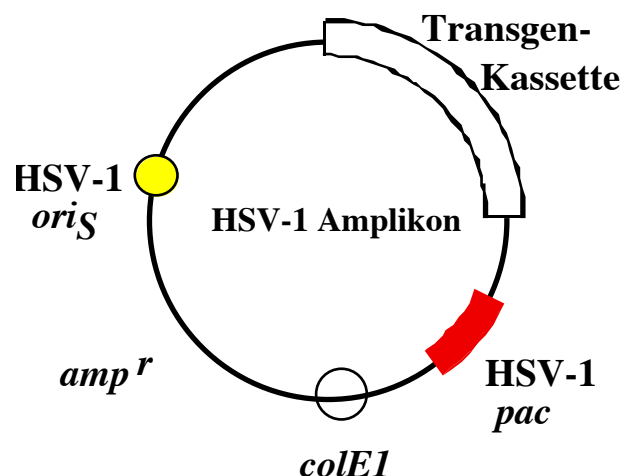


Abb. 1.11. Der Aufbau eines HSV-1 Amplikon Vektors. Der HSV-1 Amplikon Vektor enthält ein antibiotisches Resistenzgen (**amp^r**) und einen bakteriellen Replikationsursprung (**colE1**) zur selektiven Amplifikation in Bakterien. Für die Vermehrung mit einem HSV-1 Helfervirus in eukaryontischen Zellen trägt der HSV-1 Amplikon Vektor einen der drei HSV-1 Replikationsursprünge (**HSV-1 ori_S**) und für die Verpackung in HSV-1 Partikel die Verpackungssignale (**HSV-1 pac**). Für den Gentransfer in verschiedene Zellen, bzw. Gewebe trägt der Amplikon Vektor eine Transgen-Kassette mit einem oder mehreren Fremdgenen.

1. 12. Die Entwicklung von Verpackungssystemen für defekte HSV-1 oder HSV-1 Amplikon Vektoren

Die verschiedenen Verpackungssysteme für defekte HSV-1 Vektoren oder HSV-1 Amplikon Vektoren sind in Abb. 1.12. dargestellt. Wie bereits in Abschnitt 1.11. beschrieben, benötigen die defekten HSV-1 Vektoren für ihre Replikation und Verpackung in infektiöse HSV-1 Partikel ein sogenanntes Helfervirus. Das Helfervirus liefert dabei die dem defekten HSV-1 Vektor fehlenden viralen Funktionen, die für die DNA-Replikation und die Verpackung gebraucht werden. Da sowohl das Helfervirus, als auch der defekte HSV-1 Vektor in HSV-1 Partikel verpackt werden, ist der resultierende Virusstock ein Gemisch aus Helfervirus und defekten HSV-1 Vektoren. Die Infektion mit derartigen Virusstocks löst in den Zellen starke zytotoxische Effekte aus, wodurch die Anwendung der Vektoren stark eingeschränkt ist. Die Entwicklung von immer besseren Verpackungssystemen für die defekten HSV-1 Vektoren führte dazu, dass die am Anfang durch Helfervirus und möglichen Revertanten mit HSV-1 Wildtyp Phenotyp ausgelösten zytotoxischen Effekte grösstenteils eliminiert wurden. Die verbesserten Verpackungssysteme erbrachten jedoch nicht die erhofften Verbesserungen in der Fremdgen Expression und hatten nur einen minimalen Effekt auf die Ausweitung der Stabilität der defekten HSV-1 Vektor-vermittelten Transgen Expression. Anfangs wurde eine Temperatur-sensitive (*ts*) Mutante, HSV-1 *tsK* (Preston, 1979) als Helfervirus für die Verpackung von defekten HSV-1 Vektoren verwendet (Geller & Breakfield, 1988). HSV-1 *tsK* trägt eine Missense Mutation in dem essentiellen *IE3* Gen, das für eine *ts* Form von ICP4 kodiert und somit die Virusreplikation nur bei einer Temperatur von 31°C erlaubt und bei 37°C nicht. Für die Präparation von Vektorstocks wurden die bei 31°C kultivierten Zellen mit dem defekten HSV-1 Vektor transfiziert und im Anschluss daran mit *tsK* Helfervirus infiziert. Die geernteten Vektorstocks enthalten sowohl das verpackte Helfervirus als auch den verpackten defekten HSV-1 Vektor. Obwohl die Replikation des Helfervirus in Zellen, die bei 37°C kultiviert werden inhibiert ist, exprimiert HSV-1 *tsK* weiterhin viele toxische Gene. Desweiteren ereignet sich die Rückbildung von *ts* ICP4 zum *wt* Phenotyp mit einer relativ hohen Rate. Dies führte zur weiteren Entwicklung des Verpackungssystems mit den Zielen, 1. die Häufigkeit der *wt* HSV-1 Rückbildung zu reduzieren, 2. die Toxizität des Helfervirus zu reduzieren und 3. das Verhältnis von Vektor zu Helfervirus zu steigern. Um die Häufigkeit der Rückbildung zum *wt* Phänotyp zu reduzieren, wurde HSV-1 *tsK* durch eine *IE3* HSV-1 Deletionsmutante, D30EBA, ersetzt (Paterson & Everett, 1990). Die Verpackung wurde hierbei auf einer *IE3* komplementierenden Zelllinie, M64, durchgeführt (Davidson & Stow, 1985; Geller *et al.*, 1990). Die Rückbildungsfrequenz konnte durch den Austausch von M64 Zellen gegen RR1 Zellen, die ein kleineres *IE3* DNA Fragment enthielten als M64 Zellen, weiterhin reduziert werden (Johnson *et al.*, 1992). Durch diesen Austausch wurden die homologen Sequenzabschnitte von Helfervirus und komplementierender Zelllinie minimiert. HSV-1 Mutanten, die eine Deletion im *IE3* oder *IE2* Gen tragen sind brauchbare Helferviren, da die Virusreplikation von diesen Deletionsmutanten in nicht-permissiven Zellen bereits in einem sehr frühen Stadium blockiert ist. Von den insgesamt fünf *IE* Genen sind nur *IE2* (ICP27) und *IE3* (ICP4) für die Virusreplikation essentiell. Lim *et al.* entwickelte ein Verpackungssystem mit einer *IE2* Deletionsmutante als Helfervirus, HSV-1 *5dl1.2* (McCarthy *et al.*, 1989), das eine *IE2* exprimierende Zelllinie, 2-2 Zellen (Smith *et al.*, 1992) verwendet. Mit diesem System wurden Vektorstocks mit relativ hohen defekten HSV-1 Vektor Titern (10^6 bis 10^7 Transduzierende Einheiten (t.u.) pro Milliliter (ml)), ein Vektor zu Helfervirus Verhältnis von bis zu 1 und eine sehr geringe Frequenz von Revertanten mit *wt* HSV-1 Phenotyp erzielt (Lim *et al.*, 1996). Mit der Herstellung des sog. "Huckepack-Systems" (Original "piggyback-system") konnte zu einer weiteren Steigerung des Verhältnisses von Vektor zu Helfervirus beigetragen werden (Pechan *et al.*, 1996; Pechan *et al.*, 1999; Berthomme *et al.*, 1996). In diesem System trägt der defekte HSV-1 Vektor das komplementierende *IE3* Gen, wodurch die Verpackung in jeder HSV-1 suszeptiblen Zelllinie durchgeführt werden kann und die Replikation und Verpackung von Vektor und Helfervirus voneinander abhängig ist. Obwohl die

Ausbeute der defekten HSV-1 Vektoren und die Sicherheit der Verpackungssysteme zunehmend gesteigert wurde, blieben die mit dem Helfervirus verbundenen Probleme weiterhin bestehen. Diese Probleme betrafen: 1. Akute zytophatische Effekte und verstärkte Immunreaktionen, die durch die Genexpression vom Helfervirus ausgelöst wurden; 2. Rückbildung des HelferVirus zum *wt* HSV-1 Phenotyp; 3. Mögliche Interaktionen mit endogenen Viren, wie Reaktivierung und Rekombination und 4. Stabilität der Transgen Expression. Die meisten dieser Probleme konnten durch die Entwicklung der sog. Helfervirus-freien Verpackungssysteme gelöst werden. Die Helfervirus-freien Verpackungssysteme verwenden replikationsfähige, jedoch verpackungsdefekte HSV-1 Genome, die die notwendigen Funktionen für die Replikation und die Verpackung von cotransfizierten defekten HSV-1 Vektoren liefern. Die Verpackung der HSV-1 Helfer DNA wird hierbei durch die Deletion des Reifungs- und Verpackungssignals (*pac*), das für die Verpackung der viralen DNA in die Kapside essentiell ist, verhindert. In dem ersten Helfervirus-freien Verpackungssystem wurden die Helferfunktionen von einem überlappenden Cosmid Set, welches zusammen das gesamte HSV-1 Genom enthält, bereit gestellt (Cunningham & Davison, 1993). Das Cosmid Set besteht aus insgesamt fünf Cosmiden, die jeweils ein DNA Fragment von dem HSV-1 Genom enthalten. In den Cosmiden, die die HSV-1 DNA Fragmente mit den Reifungs- und Verpackungssignalen (*pac*) tragen, wurden die *pac* Signale deletiert (Fraefel *et. al.*, 1996). Nach Transfektion der in den Cosmiden enthaltenen, überlappenden HSV-1 DNA Fragmente bildet sich über den Mechanismus der Homologen Rekombination zwischen den einzelnen DNA Fragmenten das komplette und funktionstüchtige HSV-1 Genom in den Zellen aus. Aufgrund der bereitgestellten Helferfunktionen wird der cotransfizierte defekte HSV-1 Vektor in den Zellen repliziert und in HSV-1 Partikel verpackt, während das rekombinierte HSV-1 Genom zwar repliziert, jedoch nicht in HSV-1 Partikel verpackt wird. Die resultierenden Vektorstocks haben einen defekten HSV-1 Vektor Titer von 10^6 bis 10^7 t.u. / ml und enthalten weniger als 1 Helfervirus auf 10^7 defekte HSV-1 Vektoren. Die Helfervirus -freien, defekten HSV-1 Vektoren transduzieren sehr effizient viele verschiedene Zelltypen, einschliesslich Neuronen und verursachen nur minimale bis keine zytophatischen Effekte bei einer $MOI \leq 50$ (Aboody-Guterman *et. al.*, 1997; Fraefel *et. al.*, 1997; Fraefel *et. al.*, 1998; Johnston *et. al.*, 1997). Um dieses Verpackungssystem zu vereinfachen und zu stabilisieren, wurde das gesamte HSV-1 Genom mit deletierten *pac* Signalen in ein F-Plasmid basierendes bakterielles, künstliches Chromosom in *E. coli* kloniert (fHSV Δ *pac*) (Saeki *et. al.*, 1998; Saeki & Fraefel, 1999; Stavropoulos & Strthdee, 1998). Eine weitere Vereinfachung des derzeit neuesten Verpackungssystems wäre die Herstellung einer Verpackungszelllinie für defekte HSV-1 Vektoren. Eine Verpackungszelllinie würde die Kosten der derzeitigen Vektorproduktion senken und die schnelle und unkomplizierte Bereitstellung grosser Mengen in HSV-1 Partikel verpackter defekter HSV-1 Vektoren ermöglichen.

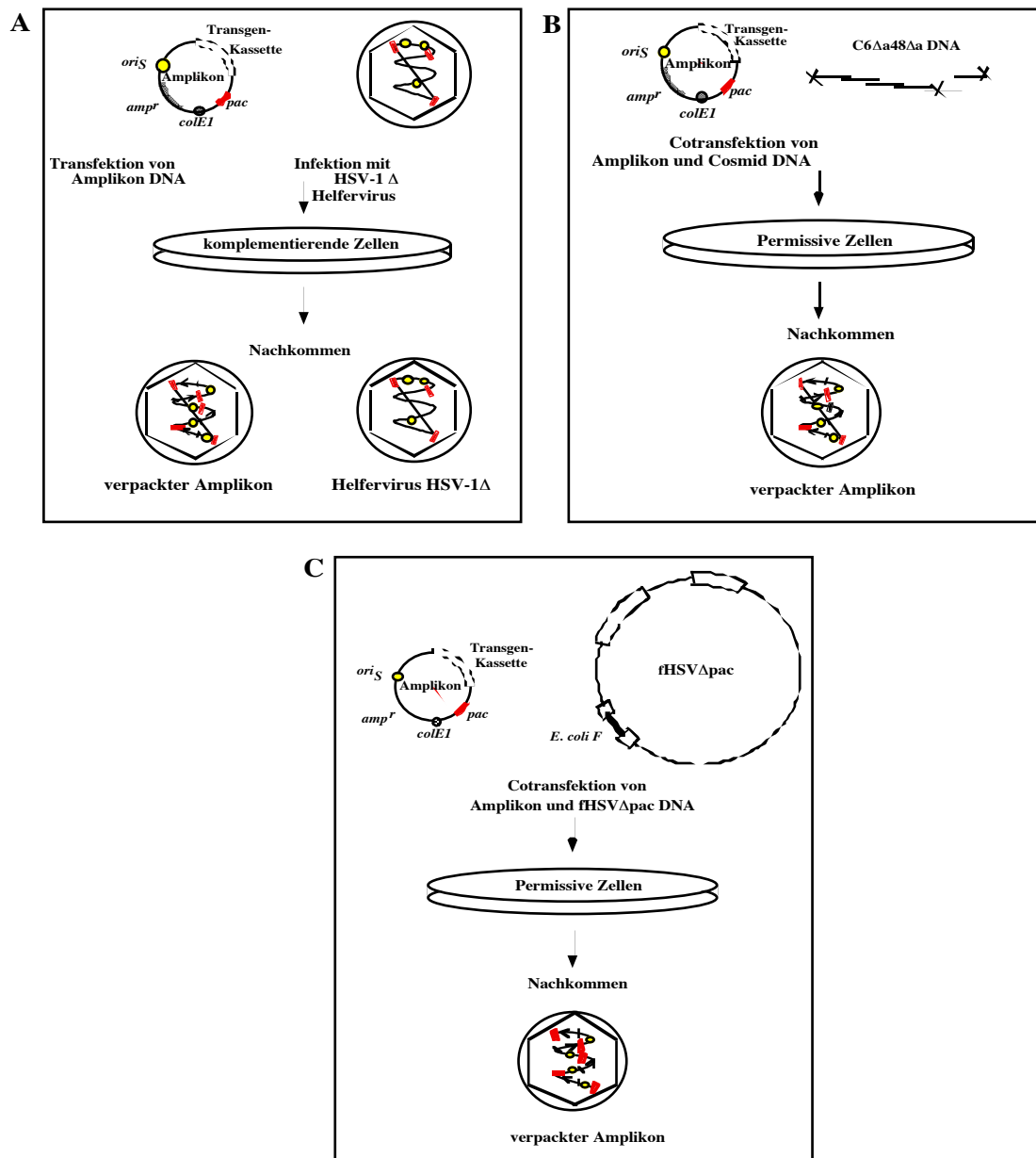


Abb. 1.12. Verpackungssysteme für HSV-1 Amplikon Vektoren. **A.** Die Helfervirus abhängige Verpackung nutzt eine Replikations-inkompetente HSV-1 Mutante zur Verpackung des HSV-1 Amplikon Vektors. Die Zelllinie komplementiert den Defekt des Helfervirus, so dass der in die Zellen transfizierte HSV-1 Amplikon Vektor nach Infektion mit Helfervirus repliziert und in HSV-1 Partikel verpackt wird. Der resultierende Vektorstock enthält sowohl den verpackten HSV-1 Amplikon Vektor als das Helfervirus. **B.** Cosmid-basierendes, Helfervirus-freies Verpackungssystem. Permissive Zellen werden mit HSV-1 Amplikon DNA und dem Cosmid-Set cotransfiziert. Durch die Rekombination der Cosmide wird das vollständige HSV-1 Genom regeneriert und die Replikation und Verpackung der HSV-1 Amplikon DNA ermöglicht. Das regenerierte HSV-1 Genom wird aufgrund der fehlenden Verpackungssignale (Δpac) nicht verpackt. Der resultierende Vektorstock ist frei von Helfervirus. **C.** F-Plasmid-basierendes Helfervirus-freies Verpackungssystem. Durch die Cotransfektion von HSV-1 Amplikon DNA und fHSV Δ pac Plasmid DNA wird die Amplikon DNA repliziert und verpackt. Die fHSV Δ pac Helfer-DNA kann durch die fehlenden Verpackungssignale (Δpac) nicht verpackt werden.

1. 13. Ziel der Arbeit

Das Herpes Simplex Virus Typ-1 (HSV-1) immediate early (IE) 3 Gen ist, neben dem IE2 Gen, essentiell für die Virusreplikation von HSV-1. Ohne ein funktionelles *IE3* Genprodukt (ICP4) wird der Replikationszyklus bereits in einer sehr frühen Phase blockiert. ICP4 ist ein multifunktionelles Phosphoprotein, das bei der zeitlichen Regulation der HSV-1 Genexpression eine Schlüsselrolle einnimmt. Das in *trans*-wirkende Protein interagiert mit verschiedenen viralen und zellulären Proteinen. Es ist für die Transkription der frühen und späten Gene, sowie für die Repression der Transkription von verschiedenen sehr frühen Genen, einschliesslich seiner eigenen notwendig. Aufgrund dessen ist die Expression der frühen und späten Gene in *IE3* Deletionmutanten drastisch reduziert, während die verbleibenden IE Gene in der Abwesenheit von ICP4 überexprimiert werden. Die verbleibenden IE Gene kodieren für ICP0, ICP22, ICP27 und ICP47. Mit der Ausnahme von ICP47 besitzen die IE Proteine regulatorische Funktionen, die die koordinierte Expression des HSV-1 Genoms beeinflussen. ICP27 ist das zweite für die Virusreplikation essentielle Protein. Es reguliert die Prozessierung von viraler, sowie zellulärer mRNA und verändert die Aktivitäten von ICP4 und ICP0. Desweiteren trägt es durch seine kombinatorischen Aktivitäten zur Induktion der frühen und späten Gene bei. ICP0 ist ein starker Transaktivator von viralen und zellulären Promotern. Es sorgt für die effiziente virale Genexpression, sowie effizientes Wachstum und interagiert mit Komponenten der Transkriptions-, Translations-, Zellzyklus- und Proteolyse Maschinerie der Zelle. Hierdurch kann ICP0 verschiedene Aspekte des Wirtszell Metabolismus beeinflussen. ICP22 und ICP47 nehmen keinen bedeutenden Einfluss auf das Wachstum und die Vitalität des Virus in den meisten Zellen. Eine weitere virale Komponente, die den Metabolismus der Wirtszelle direkt nach Freisetzung des Kapsids ins Zytoplasma der Zelle wesentlich beeinflusst, ist das "virion host shutoff" (VHS) Protein. Das VHS Protein besitzt eine ribonukleolytische Aktivität und ist für die Destabilisierung, sowie der Degradation der Wirtszell mRNA verantwortlich. In HSV-1 infizierten Zellen nimmt die Wirtszell Proteinsynthese und die mRNA Mengen innerhalb von 3 Std. um 90% ab, wodurch die Zelle sehr stark geschädigt wird. Die soeben beschriebenen Proteine sind für die Herstellung einer Helfervirus freien Verpackungszelllinie für defekte HSV-1 Vektoren von entscheidender Bedeutung. Eine Helfervirus-freie Verpackungszelllinie müsste alle für die Replikation und Verpackung des defekten HSV-1 Vektors in HSV-1 Partikel notwendigen Funktionen besitzen. Daher muss das komplette HSV-1 Genom als episomale DNA in einem inaktiven, jedoch induzierbaren Zustand in dieser Zelllinie vorliegen. Um diesen inaktiven Zustand zu erreichen, müssen mehrere regulatorische Gene (ICP0, ICP4, ICP27) im HSV-1 Genom deletiert werden. Hierdurch wäre die Transkription der verbleibenden viralen Gene reprimiert und die Zelle würde nicht durch die zytotoxischen viralen Genprodukte geschädigt. Die episomale Existenz des HSV-1 Genoms in den Zellen kann durch die Insertion von genetischen Epstein-Barr-Virus Elementen (ori P und EBNA P1) erzielt werden. Damit das modifizierte HSV-1 Genom nach Induktion der viralen Genexpression nicht in HSV-1 Partikel verpackt werden kann, müssen die Reifungs- und Verpackungssignale ebenfalls deletiert werden. Das derart modifizierte HSV-1 Genom könnte episomal und ohne jegliche zytotoxische Effekte in den Zellen vorliegen. Aufgrund der Epstein-Barr-Virus Elemente würde das HSV-1 Genom ebenso wie die chromosomale DNA an die Tochterzellen weitergegeben werden. Für die Replikation und Verpackung des defekten HSV-1 Vektors muss das HSV-1 Genom jedoch in den aktiven Zustand versetzt werden, da ansonsten keine Helferfunktionen in der Zelle exprimiert werden könnten. Hierzu werden die im modifizierten HSV-1 Genom deletierten viralen Gene stabil und regulierbar in das Genom der Wirtszelle integriert. Auf diesem Weg kann die virale Genexpression nach Transfektion des zu verpackenden defekten HSV-1 Vektors induziert werden und alle notwendigen Helferfunktionen von der Zelle bereitgestellt werden. Ein wesentlicher Schritt bei der Konstruktion einer Verpackungszelllinie ist die Regulierbarkeit viraler IE Gene. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Konstruktion einer regulierbaren Zelllinie für das zytotoxische HSV-1 *IE3* Gen. Die für HSV-1 *IE3*

regulierbare Zelllinie soll zeigen, dass die lytische Replikation einer *IE3* Deletionmutante im nicht induzierten Zustand reprimiert und im induzierten Zustand aktiviert werden kann. In weiteren Experimenten soll die induzierte Replikation und Verpackung von defekten HSV-1 Vektoren mit Helfervirus in der Zelllinie nachgewiesen werden. Daneben soll eine regulierbare Reporter-gen Zelllinie, sowie eine regulierbare doppelstabile Reporter-gen-Zelllinie konstruiert werden, an denen die Effizienz und die Kinetik der induzierbaren Genexpression studiert werden kann. Die Zelllinie soll somit die notwendigen Grundlagen für die Regulation von HSV-1 Genen liefern. Da ICP4 eine bedeutende Rolle bei Regulation der HSV-1 Genexpression hat, sollten bei erfolgreicher Regulierbarkeit der *IE3* Genexpression die wesentlichen Voraussetzungen für die Konstruktion der Helfervirus-freien Verpackungszelllinie für defekte HSV-1 Vektoren geschaffen sein. Die Grundlage für diese Arbeit bildet die beschriebene Vorstellung der Helfervirus-freien Verpackungszelllinie für defekte HSV-1 Viren, die sich auf die Charakterisierung verschiedener HSV-1 Mutanten, sowie die Charakterisierung und Beschreibung der verschiedenen viralen Gene, bzw. Genprodukte stützt.

2. Material

2. 1. Geräte für das Arbeiten mit DNA, Proteinen und Bakterien

Brutschrank Typ 2771	Köttermann, Hänigsen
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
Elektrophoresekammer, vertikal M.A.K. I	Bächler Feintech, Basel
Elektrophoresekammer, horizontal V1	Bächler Feintech, Basel
Elektrophorese Power Supply (EPS 500V/400mA)	Roche, Basel
Filmentwicklungsmaschine Gevomatic 60	Agfa-Gevaert, Leverkusen
Heizblock 5320	Eppendorf, Hamburg
Jet 1- Automatic Vacuum System, Tom	Schütt, Göttingen
Magnetrührer Ika-Combimag Ret	Janke & Kunkel, Staufen
Mikrowellenherd	Bosch, Stuttgart
Multipipette, Combitips	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter CG 820	Schott, Göttingen
Scanner, LKB	Intas, Göttingen
Schüttelinkubator G25	New Brunswick Sc., Edison
Semi-Dry-Blot-System	cti GmbH, Idstein
Sequenzierer ABI 373A	Applied Biosys., Foster City
Spannungsgeräte	Biometra, Göttingen
Spektrophotometer, Uvikon 932	Kontron Instruments
Sterilbank, Typ A/B3	Baker Co. Inc., Stanford
Thermo-Cycler Gene Amp PCR 9600 u. 2400	Perkin-Elmer Cetus, Norwalk
Transilluminator IL-400-M	Bachofer, Reutlingen
Vakuum-Konzentrator	Bachofer, Reutlingen
Vortex Genie 2	Bender & Hobein, Zürich
Waagen	Sartorius, Göttingen
Zentrifugen:	
Biofuge A	Heraeus, Zürich
Minifuge	Neolab, Heidelberg
Eppendorf 5414 und 5415	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge J-21 C	Beckman, München
Megafuge 1.0	Heraeus, Zürich
Ultrazentrifuge L8-70M	Beckman, München
Rotoren für die Kühlzentrifuge und UZ:	
JA-10 Rotor, bis 17.680x g	Beckman, München
JA-20 Rotor, bis 48.300x g	Beckman, München
Ti-45 Rotor, bis 286.500x g	Beckman, München
Trio Thermoblock	
Biometra, Göttingen/Germany	
Wasserbäder, Julabo U3, 5A und 7A	Bender & Hobein, Zürich

2. 2. Geräte für das Arbeiten mit eukaryontischen Zellen

Inkubator, wasserummantelt, geregelt	Heraeus, Zürich
CO ₂ -Atmosphäre, Heraeus 6000	
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 405M	Zeiss, Oberkochen
Lichtmikroskop ID03	Zeiss, Zürich
Sterilbank, Lamina Air HLB 2448	Heraeus, Zürich
Minifuge RF	Heraeus, Zürich
Automatische Sarpette	Sarstedt, Braunschweig
Wasserbad	Bender & Hobein, Zürich
Stickstofftank Biosafe Chronos	Messer, Griesheim

2. 3. Verbrauchsmaterialien zum Arbeiten mit Bakterien, Proteinen und eukaryontischen Zellen

Anzuchtkolben 100ml, 250ml, 1000ml	Schott, Mainz
Kryoröhrchen für Zellen	Greiner, Nürtingen
Gewebekulturschalen	Greiner, Nürtingen
Glas-Pipetten	Schütt, Göttingen
Plastikröhrchen, klein (10ml) u. gross (50ml)	Greiner, Nürtingen
Plastikpipetten, steril (1, 2, 5, 10, 25 u. 50ml)	Greiner, Nürtingen
Reaktionsgefäße (0.2, 0.5, 1.5 u. 2ml)	Sarstedt, Braunschweig
1ml Spritze, steril	Sherwood, Ballymoney
Sterile 6-, 12-, 24-, 48- u. 96- Loch Platten für Zellkultur	Greiner, Nürtingen
Sterilfilter Minisart NML, 0.45µm; 0.2µm	Sartorius AG, Göttingen
Sterilfilter Minisart RC15, 0.2µm	Sartorius AG, Göttingen
Zentrifugenbecher: JA-10 Polypropylen	SCI, München/Germany
JA-20 Polypropylen	SCI, München/Germany
JA-41 Polypropylen	Beckman, München
Film, Ektachrome 320T, 5-EPJ 135-36	Kodak, Stuttgart

2. 4. Verbrauchsmaterialien für Western-Blots

Immobilon™-P (Transfer Membran)	Millipore, Bedford/USA
Nitrocellulose Membran	Schleicher & Schüll, Dassel
Whatman 3MM Papier	Whatman, Kent/UK
Magermilchpulver	Migros, Lörrach
Röntgenfilm Biomax MR	Kodak, Stuttgart
Lumi-Light Western Blotting Substrate	Boehringer Mannheim

2. 5. Kits zur Bearbeitung von DNA und Proteinen

Dye Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Foster City
Qiaquick Gel Extraktion	Qiagen, Hilden
Qiaquick PCR Purification	Qiagen, Hilden
Qiaspin-Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
QiaEndofree-Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Vectastain® Elite ABC Kit	Vector Laboratories, Burlingame
Biotrap BT 1000 Starter Kit	Schleicher & Schüll, Dassel
pCR2.1-Cloning Kit	Invitrogene, Heidelberg

2. 6. Chemikalien

Acrylamid/Bis	Bio-Rad
Agarose	Sigma
Albumin aus Rinderserum (BSA)	Serva
Ammoniumperoxodisulfat	Merk
Ammoniumsulfat	Merk
Bromphenolblau	Bio-Rad
Calciumchlorid (CaCl_2)	Merk
Cäsiumchlorid (CsCl_2)	Biomol
Carboxymethylcellulose	Merk
Chloroform	Merk
Dextransulfat	Pharmacia
Diethyl Pyrocarbonat (DEPC)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merk
Dithiothreitol (DTT)	Serva
EDTA- $\text{Na}_2 \times \text{H}_2\text{O}$	Merk
Ethanol	Merk
Essigsäure (Ac)	Merk
Ethidiumbromid	Serva
Ferrichlorid (FeCl_3)	Sigma
Formaldehyd	Merk
Glukose	Merk
Glycerin	Merk
Guanidiniumthiocyanat	Fluka
Harnstoff	Merk
Isopropanol	Merk
Hämatoxylin	Sigma
Kaliumacetat (KAc)	Merk
Kaliumchlorid (KCl)	Merk
Kaliumferrocyanid ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$)	Sigma
Kaliumpermanganat (KMnO_4)	Merk
Kupferchlorid (CuCl_2)	Merk
Kupfersulfat (CuSO_4)	Merk
Kristallviolett	Sigma
Magnesiumsulfat (MgSO_4)	Merk
Manganchlorid (MnCl_2)	Merk
2-Mercaptoethanol (2-MSH)	Sigma
Methanol	Merk
Natriumacetat (NaAc)	Merk
Natriumacid (NaN_3)	Sigma
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Merk
Natrium-Citrat	Merk
Natriumchlorid (NaCl)	Merk
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma
Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merk
Natriumhydroxid (NaOH)	Merk
Paraformaldehyd	Sigma
Phenol	Merk
Polyethylenglykol (PEG)	Merk
Polyvinylpyrrolidon	Serva
PCR-Oel	Sigma
Sephadex G-50	Pharmacia
Schwefelsäure (HCl)	Merk
TEME	BioRad
Triton-100	Merk
Tris-Base (Tris)	Merk
Tween 20	Merk

Alle Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad *pro analysi* und wurden von den Firmen Gibco BRL, Eggenstein/Germany; Merk, Darmstadt/Germany; Serva, Heidelberg/Germany; Pharmacia, Freiburg/Germany; Bio-Rad, München/Germany; Sigma, München/Germany und Fluka AG, Buchs/Schweiz bezogen.

2. 7. Enzyme, Standards und Antibiotika

SmartLadder	Eurogentec, Seraing
DNA-Molekulargewichtsmarker I-III	Boehringer Mannheim
Rainbow™, "coloured protein" MG Standard	Amersham, Braunschweig
Prestained Protein Marker	Biolabs, Heidelberg
Prestained Protein Marker	Gibco BRL, Eggenstein
Klenow-Fragment	Boehringer Mannheim
T4-DNA Ligase	Biolabs, Heidelberg
T4-DNA Polymerase	Boehringer Mannheim
Pfu-DNA Polymerase	Stratagene, Heidelberg
Restriktionsendonukleasen	Boehringer Mannheim
	Biolabs, Heidelberg und
	Pharmacia, Freiburg
Proteinase K	Boehringer Mannheim
Ampicillin	Serva, Heidelberg
Kanamycin	Serva, Heidelberg
Chloramphenicol	Serva, Heidelberg
Tetrazyklin	Merk, Darmstadt
Geneticin® (G418)	Gibco BRL, Eggenstein
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL, Eggenstein

2. 8. Medien, Medienzusätze und gepufferte Salzlösungen

Bacto-Trypton		Difco
Bacto-Hefe-Extrakt		Difco
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	1x, steril	Gibco BRL
Medium 199 (Modified Earle's salts)	1x, steril	Gibco BRL
Optimem I	1x, steril	Gibco BRL
Fötale Kälberserum (FKS)		Gibco BRL
L-Glutamin	200mM, steril	Gibco BRL
Penicillin/Streptomycin	10000U/ml-10000UG/ml, steril	Gibco BRL
Trypsin/EDTA	0.5g/l	Gibco BRL
Trypsin	0.25%	Gibco BRL
Lipofectamin	1mg/ml	Gibco BRL
G418 (Neomycin)	5g, steril	Gibco BRL
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	7.5%	Gibco BRL
Natrium-Pyruvat	100mM, steril	Gibco BRL
Phosphat-gepufferte Saline (PBS)	1x, steril	Gibco BRL

2. 9. Stamm- und Standardlösungen

50x TAE:	2M Tris-Base 100mM EDTA wurden mit Eisessig auf pH 8.0 eingestellt
20% SDS:	20g Natriumdodecylsulfat wurden in 100ml H ₂ O bidest. bei 65°C gelöst und sterilfiltriert.
0.5M EDTA:	181.1g Dinatriumethylendiamintetraacetat x 2 H ₂ O wurden in 800 ml H ₂ O bidest. gelöst, der pH-Wert mit NaOH auf pH 8.0 eingestellt und das Volumen auf 1l aufgefüllt und autoklaviert.
10xTE:	100mM Tris/HCl (pH 7.6) 10mM EDTA
1M Tris/HCl:	121.1g Tris wurden in 800 ml H ₂ O bidest. gelöst, der pH- Wert mit konzentrierter HCl auf den gewünschten Wert zwischen 7.2 und 9.0 eingestellt, das Volumen auf 1l aufgefüllt und autoklaviert.
3M Na-Acetat:	408.1g Natriumacetat x 3 H ₂ O wurden in 800ml H ₂ O bidest. gelöst, der pH- Wert mit Eisessig auf 4.8 eingestellt und das Volumen auf 1l aufgefüllt.
1x TBS:	10ml einer 1M Tris-Lösung pH 7.5 und 9g NaCl wurden mit H ₂ O bidest. auf 1l aufgefüllt und autoklaviert.
1x TTBS:	500µl Tween-20 wurden zu 1000ml TBS gegeben und gemischt.
2% CMC:	20g Carboxymethylcellulose wurden in 1000ml H ₂ O bidest. gelöst und autoklaviert.
Kristallviolett-Lösung:	5g Kristallviolett und 2g Natriumacetat wurden in 800ml H ₂ O bidest. gelöst, der pH-Wert wurde mit Eisessig auf pH 3.6 eingestellt. Die Lösung wurde mit H ₂ O bidest. auf 1000ml aufgefüllt und durch 1MM Whatman Papier filtriert.
4% PFA:	20g Paraformaldehyd wurden in 300ml H ₂ O bidest. bei 55-60°C gelöst, dann wurde tropfenweise 1M NaOH dazugegeben bis die Lösung klar wurde. Die Lösung wurde auf RT abgekühlt und der pH- Wert mit NaOH auf 7.0 eingestellt. Danach wurden 100ml 0.5M Natriumphosphat Puffer, pH 7.0 dazugegeben und mit H ₂ O bidest. auf 500ml aufgefüllt.

10x PBS: 1g KH_2PO_4 , 10.8g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 1g KCl, 40g NaCl wurden in 400ml H_2O bidest. gelöst, der pH-Wert wurde HCl auf 7.0 eingestellt, die Lösung mit H_2O auf 500ml aufgefüllt und autoklaviert.

2. 10. Medien

2. 10. 1. Medien zur Aufzucht von Bakterien

LB-Medium:

10g	Bacto-Trytton
5g	Bacto-Hefe-Extrakt
5g	NaCl

wurden in 800ml H_2O bidest. gelöst, auf pH 7.5 eingestellt und schliesslich mit H_2O bidest. auf 1000ml aufgefüllt und autoklaviert. Das LB-Medium wurde bei 4°C im Kühlraum gelagert. Zur Herstellung von LB-Agarplatten wurde dem LB-Medium vor dem Autoklavieren 15g Agar pro 1000ml zugesetzt. Die LB- Agarlösung wurde in der Mikrowelle aufgeköcht und nach dem Abkühlen auf >60°C wurde das Antibiotikum (Ampicillin oder Kanamycin) dazugegeben. Dann wurde die LB-Agarlösung in Petrischalen gegossen und nach dem Erstarren der Lösung bei 4°C im Kühlraum gelagert.

SOC-Medium:

10g	Bacto-Trytton
5g	Bacto-Hefe-Extrakt
5g	NaCl

wurden in 950ml H_2O bidest. gelöst. Danach wurden 10ml 250mM KCl Lösung dazugegeben, der pH Wert mit 5M NaOH Lösung auf pH 7.0 eingestellt, die Lösung mit H_2O bidest. auf 1000ml aufgefüllt und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurde das Medium auf >60°C abgekühlt und 20ml einer sterilen 1M Glukose Lösung dazugegeben. Kurz vor dem Gebrauch der Lösung wurden 5ml einer sterilen 2M MgCl_2 Lösung zugefügt.

2.10.2. Medien zur Kultivierung eukaryontischer Zellen

DMEM-Medium:

	DMEM (4.500mg/l Glukose)
10 %	FKS
2mM	L-Glutamin
100 U/ml	Pen/Strep

DMEM wurde mit den angegebenen Substanzen aus Stammlösungen komplementiert. Für verschiedene Anwendungen (z.B. Infektion von Zellen mit HSV-1) wurden unterschiedliche Prozentmengen an FKS dem Medium zugefügt.

Medium 199:

	Medium 199 (Gibco BRL)
10 %	FKS
100 U/ml	Pen/Strep

Dieses Medium wurde besonders für die Selektion stabiler Zellklone und die Subklonierung der stabilen Klone mit Konzentrationen von 500µg / ml -1.5mg / ml Neomycin (G418, Gibco BRL) verwendet.

CMC-Medium:

	DMEM (4.500mg/l Glukose)
1%	Carboxymethylcellulose (CMC)
5%	FKS
100 U/ml	Pen/Strep

Dieses Medium wurde für die Durchführung von Plaquetitrationen verwendet.

2. 11. Antikörper und Antiseren

2. 11. 1. Antikörper

Anti-ICP4 Maus Antikörper, monoklonal	ABI, Maryland
Anti-GFP Maus Antikörper, monoklonal	Boehringer Mannheim
Anti-Actin Maus Antikörper, monoklonal	Boehringer Mannheim
Anti-beta-Galaktosidase Maus Antikörper, monoklonal	Boehringer Mannheim
Anti-Maus Ig-Rhodamin, F(ab') ₂ -Fragment Ziegen Antikörper, monoklonal	Boehringer Mannheim
Anti-Maus IgG, (H+L), Peroxidase gekoppelter Ziegen Antikörper, aus Antiserum isoliert	Pierce, Illinois
Anti-Kaninchen IgG, (H+L), Peroxidase gekoppelter Ziegen Antikörper, aus Antiserum isoliert.	Pierce, Illinois

2. 11. 2. Antiseren

Anti-IE3-52/53 Kaninchen Antiserum	In dieser Arbeit
Anti-IE3-54/55 Kaninchen Antiserum	In dieser Arbeit

2. 12. Klonierungsvektoren, Expressionsvektoren und HSV-1 Amplikon Vektoren

2. 12. 1. Klonierungsvektoren

pCR2.1	Invitrogene
pUC18	Biolabs
pBSK+	Stratagene
pCR2.1-IE3	In dieser Arbeit
pUC-IE3	In dieser Arbeit
pBSK-IE3	In dieser Arbeit
pBS302	Gibco BRL
p175	Dr. Filip Lim

2. 12. 2. Expressionsvektoren

pcDNA3	Invitrogene
pCMV-beta	Clontech
pEGFP-N3	Clontech
pET32b	Novagen
pSV2neo	Southern & Berg,
1982	

pA81	Dr. Uli Deutsche
pCMV-tet.R-KRAB	Deutsche <i>et. al.</i> , 1995
pUC-Combi-CMV	Dr. Uli Certa
pUHD 10-3	Gossen & Bujard, 1992
pUDP1	Dr. Maria Fotaki
pMC-Cre	Dr. Anja Köster
pET32-IE3/52-53	In dieser Arbeit
pET32-IE3/54-55	In dieser Arbeit
pET32-IE3/56-57	In dieser Arbeit
ptet.-IE3	In dieser Arbeit
ptet.-GFP	In dieser Arbeit
pCtet.-Combi-IE3	In dieser Arbeit
pNtet.-Combi-IE3	In dieser Arbeit
pLoxCa-GFP	In dieser Arbeit
pLoxCa-LacZ	In dieser Arbeit
pcDNA3-IE3	In dieser Arbeit
pLoxLacZCa-GFP1	In dieser Arbeit
pLoxLacZCa-GFP2	In dieser Arbeit
pcDNA3-LoxStopCa (EcoRI/EcoRV-XmnI)	In dieser Arbeit
pcDNA3-LoxStopCa (NotI)	In dieser Arbeit
pNLoxCa-IE3	In dieser Arbeit
pCLoxCa-IE3	In dieser Arbeit

2. 12. 3. HSV-1 Amplikon Vektoren

pHSVpuc	Geller <i>et. al.</i> , 1993
pHGcXnCRE	Dr. Cornel Freafel
pHSV-GFP	Aboody-Guterman <i>et. al.</i> , 1997
pHSV-tet.IE3/LacZ	In dieser Arbeit

2. 13. Verwendete Bakterienstämme:

Stamm	Genotyp
GM2163:	F- <i>ara-14 leuB6 thi-1 fhuA31 lacY1 tsx-78 galK2 galT22 supE44 hisG4 rpsL136</i> (Str ^r) <i>xyl-5 mtl-1 dam13::Tn9</i> (Cam ^r) <i>dcm-6 mcrB1 hsdR2</i> (r _k ⁻ m _k ⁺) <i>mcrA</i> (Biolabs Inc.)
DH5α:	F- / <i>endA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ m _k ⁺) <i>supE44 thi-1 recA1gyrA</i> (NaI ^r) <i>relA1 Δ(lacIZYA-argF) UI69 deoR</i> (φ80 <i>dlacΔ(lacZ)</i>) M15 (Woodcock <i>et. al.</i> , 1989)
BL21 (DE3):	F- <i>dcm ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal λ(cl ts857 ind1Sam7 min5 lac UV5-T7 gene)</i> (Studier & Moffat, 1986; Studier <i>et. al.</i> , 1990)

XL-1 blue: $F^- :: Tn 10 \text{ proA}^+B^+ \text{ lacI}^\Delta(\text{lacZ})M15$
 $\text{recA1endA1 gyrA96(Nal}^r) \text{ thi hsdR17}$
 $(r_k^- m_k^+) \text{ supE44 relA1 lac}$ (Bullock *et. al.*, 1987)

2. 14. Zelllinien und HSV-1 Viren

2. 14. 1. Zelllinien

VERO-Zellen (Affennierenzellen)	ATCC
CHO-Zellen (Ovarialzellen chinesischer Hamster)	Ashley Heyes
HeLA-tet.R-KRAB (Stabile Zervixkarzinomzellen mit integriertem pCMV-tet.R-KRAB Plasmid)	Deuschle <i>et. al.</i> , 1995
E5-Zellen (Stabile VERO-Zelllinie mit integriertem <i>IE3</i> Gen)	DeLuca <i>et. al.</i> , 1985
2-2 Zellen (Stabile VERO-Zelllinie mit integriertem <i>IE2</i> Gen)	Smith <i>et al.</i> , 1992
VERO-tet. <i>IE3</i> Zellen (Stabile VERO-Zelllinie mit integriertem pNtet.-Combi- <i>IE3</i> Plasmid)	In dieser Arbeit
VERO-tet.TA Zellen (Stabile VERO-Zelllinie mit integriertem tet.Transaktivator)	In dieser Arbeit
VERO- <i>IE3</i> Zellen (Stabile VERO-Zelllinie mit integriertem pCLoxCa- <i>IE3</i> Plasmid)	In dieser Arbeit
VERO-GFP Zellen (Stabile VERO-Zelllinie mit integriertem pLoxCa-GFP Plasmid)	In dieser Arbeit
VERO-LacZ Zellen (Stabile VERO-Zelllinie mit integriertem pLoxCa-LacZ Plasmid)	In dieser Arbeit
VERO-LacZ/GFP (Stabile VERO-Zelllinie mit integrierten pLoxCa-LacZ u. pLoxCa-GFP Plasmiden)	In dieser Arbeit
VERO-GFP/CMV-LacZ (Stabile VERO-Zelllinie mit integriertem pLoxLacZCa-GFP1 Plasmid)	In dieser Arbeit

2. 14. 2. HSV-1 Viren

HSV-1 <i>d120</i> (<i>IE3</i> Deletionsmutante)	DeLuca <i>et al.</i> , 1985
HSV-1 <i>5dl1.2</i> (<i>IE2</i> Deletionsmutante)	McCarthy <i>et. al.</i> , 1989
<i>wt</i> HSV-1 (Stamm 17 ⁺)	Brown <i>et. al.</i> , 1973

2. 15. EDV

Hardware: Power Macintosh 7500 / 100
 PowerBook 5300, Macintosh
 PC; Kayak XA 266mHz, Hewlett Packard
 DeskWriter 550C, Hewlett Packard
 Mustek MFS 8000 SP Scanner

Software: Microsoft Windows NT Workstation 4.0
 Word 97 SR-2 (Microsoft)
 Excel 97 SR-2 (Microsoft)
 Power Point 97 SR-2 (Microsoft)
 DNA Strider 1.1
 GeneJockey II
 Gene Construction Kit 2
 Plasmid Artist 1.13
 Adobe Photoshop 2.0.1

3. Methoden

3. 1. Molekulargenetische Methoden

3. 1. 1. Allgemeine Methoden zum Arbeiten mit DNA und RNA

Alle folgenden Methoden und Vorschriften wurden, soweit nicht anders angegeben, dem Laborhandbuch "Molecular Cloning" von SAMBROOK et al. (1989) entnommen.

3. 1. 1. 1. Konzentrationsbestimmung von DNA in Lösung

Photometrische Analyse

Die photometrische Messung von DNA erfolgte bei einer Wellenlänge von 260nm gegen TE oder H₂O in einer Quarzküvette. Eine OD₂₆₀ = 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA.

Ethidiumbromid-Fluoreszenzmessung im Agarose-Gel

Diese Methode ist für die Konzentrationsbestimmung von sehr kleinen DNA-Mengen geeignet. Hierzu wurde in einem 1%-igen Agarosegel (0,5 µg Ethidiumbromid pro ml) ein Aliquot der zu quantifizierenden DNA-Probe und in einer benachbarten Spur ein DNA-Standard mit verschiedenen Fragmentgrößen aufgetrennt. Nach UV-Bestrahlung auf einem UV-Transilluminator konnten die verschiedenen Fluoreszenz-Intensitäten des DNA-Standards mit denen der Probe verglichen werden und die DNA-Konzentration der Probe abgeschätzt werden.

3. 1. 1. 2. Extraktion von DNA und RNA mit Phenol, Phenol / Chloroform und Chloroform

Die Extraktion mit Phenol, Phenol/Chloroform und Chloroform ist eine Methode die zur Entfernung von Proteinen aus DNA oder RNA Präparationen dient. Nach Behandlung der DNA oder RNA mit einem Enzym, wurde die DNA bzw. RNA Lösung mit einem Volumenteil Phenol versetzt, gemischt und für 1 Min. zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein frisches Eppendorf- Gefäß überführt und mit einem Volumenteil Phenol/Chloroform versetzt, gemischt und 1 Min. zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein frisches Gefäß überführt und mit einem Volumenteil Chloroform versetzt, gemischt und für 1 Min. zentrifugiert. Die obere wässrige Phase enthält die proteinfreie Nukleinsäure.

3. 1. 1. 3. DNA / RNA-Präzipitation mit Ethanol

Das Volumen der DNA-Lösung wurde bestimmt und 0,1 Volumenteil 3M Na-Acetat (pH5.2) dazugegeben. Die DNA-Probe wurde mit 2 Volumenteilen reinen Alkohol versetzt und gut gemischt. Die Präzipitation der DNA erfolgte 30 Min. bei -70°C oder über Nacht bei -20°C. Danach wurde die DNA 30 Min. mit 13000rpm in der Tischzentrifuge pelletiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und erneut 20 Min. bei 13000rpm durch Zentrifugation pelletiert. Das DNA-Pellet wurde für 10 min. an der Luft getrocknet und in einem geeigneten Volumen TE-Puffer oder H₂O bidest. resuspendiert. RNA-Pellets wurden in DEPC behandeltem H₂O bidest. resuspendiert. Ansonsten wurde die RNA wie DNA behandelt.

3. 1. 1. 4. Reinigung von DNA-Fragmenten mit QIAquick-Säulen (QIAquick Spin Handbook, 07/97)

Hierzu wurde das DNA-Fragment nach elektrophoretischer Auftrennung auf einem Agarosegel mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten. Der Agarose-Streifen wurde mit einem 3-fachen Volumen Puffer QX versetzt und für 10 Min. bei 50°C inkubiert. Durch das Erhitzen löst sich die Agarose auf und die DNA wird freigesetzt. Zu dieser Lösung wurde 1 Gelvolumen Isopropanol zugegeben, gemischt und auf die QIAquick-Säule aufgetragen. Die Säule wurde für 60 Sek. mit 12.000 rpm zentrifugiert. Danach wurde die Säule mit 750 µl Puffer PE gewaschen (12.000 rpm, 60 Sek.) und einmal trocken zentrifugiert. Schliesslich wurde die DNA mit 50 µl Puffer EB von der Säule eluiert. DNA Aufreinigungen von PCR-Proben erfolgte ebenfalls mit QIAquick-Säulen. Die PCR-Probe wurde hierbei mit einem 5-fachen Volumen Puffer PB gemischt, auf die QIAquick-Säule aufgetragen und 60 Sek. mit 12.000 rpm zentrifugiert. Die weitere Prozessierung erfolgte wie oben beschrieben.

3. 1. 1. 5. Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen (LEHRACH et al., 1982)

Die Aktivität von Restriktionsendonukleasen wird in Units (U) angegeben. 1 Unit entspricht der Menge an Restriktionsenzym, die in einer Stunde 1µg Lambda-DNA vollständig verdaut. Für die Gewährleistung einer quantitativen Verdauung der DNA, wurden in den Restriktionsansätzen höhere Enzymmengen und längere Inkubationszeiten verwendet.

Restriktionsansatz:	x µg	DNA
	3 µl	10x Restriktionspuffer
	2 U	Restriktionsendonuklease
	ad 30 µl	H ₂ O

Der Ansatz wurde für ca. 2 Std. bei 37°C inkubiert und im Anschluss im Agarosegel analysiert. Bei präparativen Verdauungen wurden grössere Volumina und entsprechend grössere Enzymmengen eingesetzt.

3. 1. 1. 6. Agarose Gelelektrophorese

Die Wanderungsgeschwindigkeit von DNA in Agarosegelen ist proportional zum Logarithmus ihrer Grösse. Aufgrund dieser Eigenschaften dienen Agarosegele zur Auftrennung von DNA-Fragmenten zwischen 500-20.000 bp. Die Auftrennung kleiner Fragmente wird mit steigender Agarosegelkonzentration begünstigt.

Agarosekonzentration (%)	Trennbereich (kb)
0,6	20-1
0,9	7-0,5
1,2	6-0,4
1,5	4-0,2
2,0	3-0,1

Die angelegte Spannung und die Temperatur beeinflussen ebenfalls die Laufstrecke der DNA im Agarosegel pro Zeiteinheit. Eine entsprechende Agarosemenge wird in der Mikrowelle mit 1 x TBE unter Kochen gelöst und nach Zugabe von Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5 µg / ml) in spezielle Gelkammern gegossen. Zur Ausbildung von Probetaschen wird ein PVC-Kamm eingehängt. Nach dem Erstarren der Agarose

und Entfernen des PVC-Kammes füllt man die Gelkammer mit Gelpuffer (1 x TBE) auf. Die DNA-Proben werden mit Farbpuffer (50% Glycerin, 50mM EDTA, 0,005% (w/w) BPB) versetzt und in die Probetaschen geladen. Durch das Anlegen einer Spannung (60-80 Volt) läuft die DNA aufgrund ihres negativ geladenen Zucker-Phosphat-Rückgrats von der Kathode zur Anode der Gelkammer. Das im Agarosegel enthaltene Ethidiumbromid interkaliert in die doppelsträngige DNA und emittiert nach Anregung mit UV-Licht (260 nm) sichtbares Licht. Mit einer Videokamera oder einer Polaroidkamera wird das Gel photographiert und somit die Auftrennung der DNA in den Agarosegelen dokumentiert. Bei präparativen Agarosegelen verwendet man ausschliesslich UV-Licht mit 366 nm Wellenlänge, da ansonsten Veränderungen in der DNA auftreten könnten. Die gewünschte DNA-Bande kann mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und zur Weiterverarbeitung eluiert werden. Die gleichzeitige Auftrennung von Grössenmarkern bekannter Länge (1 kb Längnenmarker, Gibco) ermöglicht die Bestimmung der DNA-Fragmentgrösse.

3. 1. 2. Transformation von *E. coli* mit Plasmid - DNA

3. 1. 2. 1. Herstellung kompetenter *E. coli* - Zellen (HANAHAN, 1985)

Unter bestimmten physiologischen Bedingungen können *E. coli*-Bakterienzellen innerhalb verschiedener Wachstumsphasen bei einem hohen Überschuss an Kalziumionen „nackte“ DNA mit hoher Effizienz aufnehmen. Den Vorgang bezeichnet man als „Transformation“. Die zu transformierenden Bakterienzellen werden durch die Vorbehandlung mit einer CaCl_2 Lösung für die Aufnahme von „nackter“ DNA vorbereitet; man spricht dann von „kompetenten“ Bakterienzellen. Aufgrund eines bestimmten Anteils von Glycerin in den jeweiligen Lösungen und durch direktes Einfrieren in flüssigem Stickstoff können die kompetenten Zellen für bis zu 12 Monaten bei -70°C gelagert werden. Mit der CaCl_2 -Transformation können Transformationsraten von bis zu 1×10^9 Bakterienkolonien pro μg DNA erzielt werden. 10ml LB-Medium mit 10mM MgSO_4 wurden mit einer Kolonie *E.coli* DH-5 α angeimpft. Diese Kultur wurde über Nacht bei 225 rpm und 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 500ml LB-Medium, welches 7,5ml 1M MgCl_2 enthielt, mit der Vorkultur angeimpft und bei 225 rpm und 37°C inkubiert. Nach Erreichen einer OD_{600} zwischen 0,4-0,6, wurden die Bakterienzellen 10 Minuten bei 6000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 150ml Lösung A (50mM $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 50mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 100mM MES pH 6.3) resuspendiert und für 20 Minuten auf Eis gestellt. Vor dem Gebrauch wurde die Lösung A sterilfiltriert und auf 0°C abgekühlt. Schliesslich wurden die Zellen erneut 10 Minuten bei 6000 rpm abzentrifugiert und das Pellet in 25ml Lösung A, die 5ml Glycerin 90% enthielt, resuspendiert. Je 500 μl der Bakteriensuspension wurde dann in vorgekühlte Eppendorf Röhren aliquotiert. Diese Aliquots wurden bis zum Gebrauch bei -70°C gelagert.

3. 1. 2. 2. Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

100 μl kompetente *E.coli* XL - 1 blue (Stratagene) wurden auf Eis aufgetaut. Zu den aufgetauten Zellen wurden dann 1ng supercoiled Plasmid DNA (oder 10 μl einer Ligationsreaktion) gegeben und für 30 Min. auf Eis inkubiert. Anschliessend hieran erfolgte ein Hitzeschock der Zellen bei 42°C für 2 Min. Nach weiteren 2 Min. Inkubation auf Eis wurden 500 μl LB-Medium zugegeben und für 45-60 Min. bei 37°C und 235 rpm inkubiert. Zuletzt wurden 50-300 μl der Transformationsansätze zur Selektion auf LB-Agarplatten, die 50 μg / ml Ampicillin enthielten ausgestrichen. Da einige Plasmide anstelle des Ampicillin-Resistenzgens das Kanamycin-Resistenzgen enthielten, wurden diese zur Selektion auf LB-Agarplatten mit 25 μg / ml Kanamycin ausgestrichen.

3. 1. 3. Isolierung von DNA

3. 1. 3. 1. Mini-Präparation von Plasmid-DNA (QIAGEN-Plasmid Handbook, 3/96)

3ml LB-Medium mit 50 µg / ml Ampicillin (oder 25 µg / ml Kanamycin) wurden mit einer Bakterienkolonie angeimpft und für 16 Std. bei 37°C und 235 rpm im Schüttler inkubiert. 1,5 ml dieser Bakteriensuspension wurden für 3 Min. bei 12000 rpm in der Eppendorf-Tischzentrifuge abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 250 µl Puffer P1 resuspendiert und die Bakterienzellen durch Zugabe von 250 µl Puffer P2 und kurzes Mischen lysiert. Nach Zugabe von P2 wurden die Proben 5 Min. bei RT inkubiert (Denaturierung der DNA). Danach wurden 350 µl Puffer N3 hinzugefügt, die Lösung kurz gemischt und 10 Min. bei 12000 rpm in der Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Plasmid-DNA aus dem Überstand wurde auf die Qiaquick-Säulen gegeben und zur Bindung an diese bei 12000 rpm zentrifugiert. Im Anschluss hieran wurden die Säulen mit 750 µl Puffer PE gewaschen. Zur Elution der Plasmid- DNA wurden 50 µl Puffer EB auf die Säulen gegeben und erneut für 30 Sek. bei 12000 rpm in der Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Zur Entfernung des Rückständigen Ethanols wurden die Proben für 10-15 Min. getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde durch Restriktionsverdauung verifiziert.

3. 1. 3. 2 . Maxi-Präparation von Plasmid-DNA (Qiafilter-Plasmid Handbook, 3/96)

250 ml LB-Medium mit 50 µg / ml Ampicillin (oder 25 µg / ml Kanamycin) wurden mit 100 µl einer Vorkultur angeimpft und für 16 Std. bei 37°C und 235 rpm im Schüttler inkubiert. Die Kultur wurde bei 8000 rpm für 10 Min. abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml Puffer P1 resuspendiert und direkt hieran mit Puffer P2 versetzt. Nach mehrfachem Schwenken der Röhrchen wurden die Proben für 5 Min. bei RT inkubiert. Dann wurden 10 ml Puffer P3 zu den Proben gegeben, kurz mehrere Male geschwenkt und die Lösung direkt auf die Qiafilter-Säulen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 10 Min. wurde die Lösung durch die Qiafilter-Säule auf die Qiaquick-Säule gegeben. Die Qiaquick-Säule wurde zuvor mit Puffer QBT äquilibriert. Die an die Qiaquick-Säule gebundene DNA wurde durch zweimaliges Durchlaufen von Puffer QC gewaschen. Die Plasmid-DNA wurde mit 15ml Puffer QF von der Säule eluiert. Zur Präzipitation der DNA wurde das Eluat mit 10,5 ml Isopropanol versetzt, gut gemischt und in der Zentrifuge für 30 Min. bei 12000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 5 ml 70-%igem Ethanol für 30 Min. bei 12000 rpm und 4°C in der Zentrifuge gewaschen. Die gereinigte DNA wurde für ca. 10 Min. an der Luft getrocknet und dann in 150 µl H₂O resuspendiert. Ein Aliquot dieser DNA Lösung wurde im Photometer gemessen um die DNA Konzentration zu bestimmen. Zur Verifizierung des Plasmids wurde die DNA mit entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut. Für weitere Anwendungen wurde die DNA bei -20°C gelagert.

3. 1. 4. DNA-Sequenzanalyse (Sanger *et. al.*, 1977)

Die Sequenzierung von Plasmid DNA (1.6-2µg) erfolgte mit spezifischen Sequenzierprimern (je 10pmol) und fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden auf der Sequenz-Apparatur der Firma Applied Biosystems, Pfungstadt, Modell A373 und A377. Die Sequenzierung des *IE3* Gens erwies sich aufgrund des hohen GC-Gehalts (> 80%) als sehr schwierig und konnte nur durch Zugabe von 10% DMSO durchgeführt werden. Die verwendeten Sequenzierprimer sind im Anhang aufgelistet.

3. 1. 5. Ligation von DNA

Mit Hilfe von Restriktionsenzymen werden DNA Sequenzen an spezifischen Sequenzmotiven gespaltet. Durch das Enzym T4-DNA Ligase können verschiedene DNA Fragmente wieder miteinander verknüpft werden, falls die bei der Spaltung entstehenden Enden zueinander kompatibel sind. Ansonsten müssen in einer weiteren biochemischen Reaktion die zu ligierenden Enden zueinander kompatibel gemacht werden (siehe 3.2.6.). Die T4-DNA Ligase katalysiert in Anwesenheit von Mg^{2+} Ionen die Verbindung der 3' OH-Gruppe mit der 5' PO^4 -Gruppe unter Abspaltung von OH^- , wodurch einzelne DNA Fragment verknüpft werden.

Ligationsansatz:

x	μ l DNA 1
y	μ l DNA 2
	2 μ l T4-DNA Ligase Puffer
	1 μ l T4-DNA Ligase Enzym (2 Units)
ad	20 μ l H ₂ O bidest.

Der Ligationsansatz wurde in der Regel über Nacht bei 16°C im Wasserbad inkubiert.

3. 1. 6. Auffüllen von 3' DNA Überhängen bzw. beseitigen von 5' DNA Überhängen

Für die Ligation nicht kompatibler DNA Enden müssen die Enden zunächst in einer enzymatischen Reaktion kompatibel gemacht werden. Durch die Restriktion der DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen können zwei Typen von nicht kompatiblen Enden entstehen. Einige Restriktionsenzyme bilden sog. 5' DNA Überhänge, andere bilden dagegen sog. 3' DNA Überhänge aus. 5' DNA Überhänge wurden mit dem Enzym T4 - DNA Polymerase beseitigt. T4 -DNA Polymerase verfügt über eine 3'-5' Exonuklease Funktion mit der 3' DNA Überhänge entfernt werden. Das hierdurch gebildete DNA Ende ist blunt und kann mit anderen blunt DNA Enden ligiert werden. 5' DNA Überhänge wurden mit Klenow-Enzym aufgefüllt. Dem Klenow-Enzym fehlt eine 5'-3' Exonuklease Funktion, besitzt jedoch die 5'-3' Polymerase Funktion. Durch Zugabe von dNTPs und Klenow-Enzym werden somit die 5' DNA Überhänge aufgefüllt. Das resultierende DNA Ende ist ebenfalls blunt und kann mit jedem beliebigen anderen blunt DNA Ende ligiert werden.

3. 1. 7. Dephosphorylierung von DNA Enden

Für die Ligation von DNA Fragmenten in einen Plasmid Vektor ist die Dephosphorylierung von besonderer Bedeutung, da hierdurch eine Religation des Plasmid Vektors verhindert wird. Ohne die Dephosphorylierung der DNA Enden, würde in Anwesenheit von T4 - DNA Ligase die Plasmid DNA religieren und die Insertion des DNA Fragmentes ausbleiben bzw. mit einer sehr geringen Wahrscheinlichkeit stattfinden. Die Religation der Plasmid DNA kann nach Dephosphorylierung nur durch die gleichzeitige Insertion des DNA Fragmentes erfolgen. Die Dephosphorylierung der DNA Enden erfolgte durch die Zugabe von Shrimp Alkaline Phosphatase und einer Inkubation von 30 Min. bei 37°C im Wasserbad. Die Dephosphorylierung der Plasmid DNA wurde nach Ligation ohne DNA Fragment und Transformation in kompetente Bakterienzellen überprüft. Bei erfolgreicher Dephosphorylierung wuchsen nur wenige Bakterienklone auf den Platten und bei fehlender Dephosphorylierung wuchs ein Bakterienrasen auf den Platten.

3. 1. 8. DNA-Amplifikation mit der Pfu DNA-Polymerase (PCR) (Saiki et al., 1986; Saiki et al., 1988)

Mit der PCR - Methode (Polymerase Chain Reaction) können geringste Mengen DNA mit zwei spezifischen Primern von dem Enzym Pfu DNA -Polymerase vervielfältigt werden. Die direkte Klonierung von DNA Fragmenten ist oft durch das Fehlen geeigneter Restriktionsschnittstellen begrenzt, so dass zusätzliche Schnittstellen an das 5' und 3' Ende des zu klonierenden DNA Fragmentes eingeführt werden müssen. Die zusätzlichen Restriktionsschnittstellen werden mit der PCR-Methode über die zwei spezifischen Primer an die beiden Enden des zu amplifizierenden DNA Fragments eingeführt. Die Primer enthalten einen zu den beiden Enden der DNA 100% komplementären Sequenzabschnitt, mit dem sie an die zu amplifizierende DNA hybridisieren. An die 3'OH Gruppen der Primer werden von der Pfu DNA-Polymerase die zum Matrizenstrang komplementären Nukleotide nacheinander angehängt. Aufgrund der im Primer enthaltenen Restriktionsschnittstellen, entstehen hierbei Kopien der DNA Sequenz mit zusätzlichen Restriktionsschnittstellen an den 5' und 3' Enden. Nach Verdau der amplifizierten DNA mit den entsprechenden Restriktionsenzymen kann das DNA Fragment in einen beliebigen Vektor kloniert werden. Das *IE3* Gen (4 kb) wurde für die Klonierung in pUC-Combi-CMV, sowie pCR2.1 Plasmid DNA mit den Primern P48-5' GATCGTTTAAACGCCGCCACCATGGCGTCGGAGAA CAAGCA 3' und P51-5' GATCGTTTAAACTTACAGCACCCCGTCCCCCT 3' mittels PCR amplifiziert. Für die Herstellung von *IE3* Polypeptiden für die Immunisierung von Kaninchen, wurden drei Sequenzbereiche aus dem *IE3* Gen amplifiziert. Das *IE3/52-53* DNA Fragment (384 bp) wurde mit den Primern P52-5' GATCGAATTCGGCGTC GGAGAACAAGCAGCGC 3' und P53-5' GATTCTCGAGGGGCGGCGTCGGCTG CGTCGTC 3' amplifiziert. Das *IE3/54-55* DNA Fragment (639 bp) wurde mit den Primern P54-5' GATCGAATTCGCGGGGCGCG AACGGGAGGCC 3' und P55-5' GATTCTCGAGGCGTCGCGCCTCCTCCGCTC 3' amplifiziert. Das *IE3/56-57* DNA Fragment (885 bp) wurde mit den Primern P56-5' GATCGA ATTCGGCCAG CGCACCGGACGCCGCC 3' und P57-5' GATTCTCGAGCAGCAGCACGCCCTG TGCGCC 3' ampifiziert.

Reaktionsansatz:	0.5µl DNA Template (250ng)
	10µl 10x PCR Puffer ohne MgCl ₂
	10µl DMSO 100%
	20µl Glycerin 50%
	10µl 2mM dNTP-Mix
	6.0µl 25mM MgCl ₂
	2.0µl 100pmol Primer I
	2.0µl 100pmol Primer II
	1.5µl Pfu DNA-Polymerase (2U/µl)
	38µl H ₂ O bidest.

25 Reaktionszyklen wurden unter folgenden Bedingungen im Trio Thermoblock (Biometra) durchgeführt.

30 Sek.	Denaturierung	93°C
30 Sek.	Hybridisierung	55°C
5 Min.	Extension	75°C

Nach Beendigung der PCR wurde ein Aliquot der Amplifikationsprodukte auf einem 1%-igen Agarosegel analysiert.

3. 2. Biochemische und Zellbiologische Methoden

3. 2. 1. Methoden zur Arbeit mit eukaryontischen Zellen

Die Zellen wurden in wassergesättigter Atmosphäre unter 5% CO₂ bei 37°C kultiviert. Medien und Lösungen wurden auf 37°C vorgewärmt, wenn nicht anders angegeben.

3. 2. 1. 1. Immunzytochemische Färbung

Die Methode der immunzytochemischen Färbung dient dem spezifischen Nachweis von Proteinen in Zellpräparaten. Die Methode basiert auf spezifischen Antikörpern, die das entsprechende Protein (Antigen) erkennen und in einer Antigen-Antikörper-Reaktion binden. Der bei der Antigen-Antikörper-Reaktion im Präparat entstandene Komplex kann mit verschiedenen Nachweismethoden sichtbar gemacht werden. Der Nachweis kann direkt oder indirekt erfolgen. Beim direkten Nachweis ist der spezifische Antikörper mit einer fluoreszierenden Verbindung, mit einem Enzym (Peroxidase) oder mit einer elektronendichten Verbindung (kolloidales Gold) markiert. Beim indirekten Nachweis erfolgt das Sichtbarmachen des Antigen-Antikörper-Komplexes mit einem zweiten, markierten Antikörper, der den ersten Antikörper erkennt und bindet. Der indirekte Nachweis kann durch Verwendung weiterer Substanzen (Avidin und Biotin) verstärkt werden. In der vorliegenden Arbeit erfolgte der Nachweis des exprimierten Proteins über das indirekte Verfahren. Zum Nachweis der Proteinexpression wurden 10⁶ Zellen mit dem jeweiligen Expressionsvektor (2µl DNA) und 7µl Lipofectamin (Gibco BRL) transfiziert. Die Zellen wurden bis zur Expression des Proteins bei 5% CO₂ und 37°C im Inkubator inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd für 20 Min. bei RT fixiert. Im Anschluss an die Fixierung wurden die Zellen 3x mit PBS gewaschen und für einige Sekunden mit Triton X100 (10% in PBS) behandelt. Hierdurch wird die Membran der Zelle perforiert und für den Antikörper zugänglich gemacht. Um unspezifische Bindungsstellen für den Antikörper abzusättigen, wurden die Zellen mit NGS (Normal Goat Serum) 1,5% in PBS für 30 Min. bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und der erste spezifische monoklonale Antikörper (Maus Anti-ICP4 Antikörper oder Maus Anti-β Galaktosidase Antikörper) in PBS + 1,5% NGS auf die Zellen gegeben. Der Antikörper wurde 30-60 Min. auf den Zellen inkubiert. Dann wurden die Zellen erneut 2x mit PBS gewaschen. Der zweite spezifische, markierte Antikörper (Goat Anti-Maus biotinylierter Antikörper) wurde ebenfalls für 30-60 Min. in PBS + 1,5% NGS auf die Zellen gegeben. Bevor der eigentliche Nachweis dieses gebildeten Antigen-Antikörper-Antikörper Komplexes erfolgte, wurden die Zellen wiederum 2x mit PBS gewaschen. Der Nachweis erfolgte durch Zugabe von Vectastain *Elite* ABC Reagent (Vector Laboratories, Inc.) für 5 Min. bei RT. Das Vectastain *Elite* ABC Reagent ist ein Gemisch aus Avidin DH und biotinylierter Horseradish Peroxidase H in PBS. Aufgrund des Avidin/ Biotin Systems wird das Signal des markierten Proteins um ein Vielfaches verstärkt. Die Reaktion läuft folgendermassen ab: Avidin besitzt vier Bindungsstellen für das Vitamin Biotin, wodurch Avidin mehrere Bindungen mit dem biotinylierten Antikörper einerseits und mehrere Bindungen mit der biotinylierten Horseradish Peroxidase andererseits eingehen kann. Das Substrat 3,3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride wird durch das Enzym Horseradish Peroxidase in einen dunkelbraunen Niederschlag umgesetzt, der in den Zellen das nachzuweisende Protein unter dem Mikroskop sichtbar macht. Das β-Galaktosidase Protein wurde mit einem Goat-Anti Maus- Rhodamin markierten zweiten Antikörper in den Zellen nachgewiesen. Der Rhodamin markierte Antikörper fluoresziert nach Anregung mit UV-Licht im Fluoreszenzmikroskop in den Zellen.

3. 2. 1. 2. Trypsinieren von Zellen

Adhärierende Zellen müssen für verschiedene Anwendungen wieder von der Oberfläche abgelöst werden. Die Haftung der Zellen an die Oberfläche einer Kulturflasche, sowie an benachbarte Zellen, wird über bestimmte Proteine der Zelloberfläche bewirkt. Die Adhärenz der Zellen zu einer bestimmten Oberfläche ist von Zelllinie zu Zelllinie unterschiedlich stark. In den meisten Fällen ist sie jedoch relativ stark, so dass die Zellen weder durch leichtes Klopfen noch durch kräftiges Schütteln von der Oberfläche abgelöst werden können. Proteolytische Enzyme wie Trypsin spalten Proteine innerhalb bestimmter Aminosäurereste im Polypeptid. Die proteolytische Spaltung der Zelloberflächenproteine durch Trypsin führt zur Aufhebung der Bindungen, wodurch sich die Zellen von der Oberfläche lösen. EDTA ist ein Chelatbildner, das heisst, EDTA bindet zweiwertige Kationen wie z. B. Ca^{2+} . Viele Proteine (wie z. B. die Klasse der Cadherine), die Zell-Zell Verbindungen herstellen benötigen für den Aufbau der Bindung Ca^{2+} Ionen. Werden die Ca^{2+} Ionen an EDTA gebunden stehen sie den Proteinen nicht mehr zur Verfügung und die Zell-Zell Verbindungen werden aufgehoben. Um die Zellen von der Oberfläche ablösen zu können, wurde das Medium aus der Flasche abgesaugt und die Zellen 1x mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen ca. 5-10 Min. mit einem entsprechenden Volumen Trypsin / EDTA-Lösung (Gibco BRL) bei 37°C inkubiert. Nach einiger Zeit lösen sich die Zellen von der Oberfläche ab. Sind alle Zellen abgelöst, wurde die proteolytische Spaltung durch Trypsin und das Abfangen der zweiwertigen Kationen durch Zugabe von serumhaltigem Medium gestoppt. Die Zellzahl pro ml wurde in der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

3. 2. 1. 3. Einfrieren von Zellen

Das Arbeiten mit eukaryontischen Zellen erfordert das Anlegen von Gefrierstocks, auf die man immer wieder zurückgreifen kann. Für die Lagerung von Zellen über einen Zeitraum von mehreren Jahren, werden die Zellen in flüssigem Stickstoff (-196°C) konserviert. Hierzu wurden die Zellen trypsinisiert, in Medium aufgenommen und in der Laborfuge bei 1200 rpm für 5 Min. pelletiert. Das Medium wurde mit einer Vakuumpumpe abgesaugt und das Zellpellet in 1-4 ml Gefrierlösung (Medium 199, 10% FCS, 5% DMSO) resuspendiert. Die in Gefrierlösung resuspendierten Zellen wurden auf Kryoröhrchen aliquotiert und 30-60 Min. bei RT inkubiert. Danach wurden die Röhrchen über Nacht bei -70°C inkubiert, bevor sie schliesslich im flüssigem Stickstoff gelagert wurden.

3. 2. 1.4. Auftauen und Revitalisieren von Zellen

Um nach mehreren Passagen in Kultur auf frische Zellen zurückgreifen zu können, müssen diese nach Lagerung im flüssigem Stickstoff aufgetaut und revitalisiert werden. Hierzu wurde das Kryoröhrchen aus dem Stickstoff-Tank entnommen und bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Die Zellsuspension (ca. 1ml) wurde zu 10ml Medium199 + 10% FCS in ein 14ml Falconröhrchen gegeben und 5 Min. bei 1200 rpm in der Laborfuge zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Vakuumpumpe abgesaugt und das Zellpellet in frischem Medium 199, 10% FCS, 10% P/S resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden in eine 75cm² Zellkulturflasche überführt. Nachdem die Zellen an der Oberfläche der Kulturflasche hafteten (ca.2 Stunden später), wurde das Medium erneut gewechselt, um das restliche DMSO zu entfernen. Am nächsten Tag wurde das Medium erneut gewechselt.

3. 2. 1. 5. Transiente Transfektion von eukaryontischen Zellen mit DNA

1×10^5 VERO- oder CHO-Zellen wurden in einer 6- Loch Platte ausgesät und über Nacht im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 750µl Optimem I (Gibco-BRL) auf die Zellen gegeben. Für die Herstellung der Transfektionslösung wurden 2µg DNA mit 100µl Optimem I und 7µl Lipofectamine (Gibco-BRL) mit 100µl Optimem I gemischt. Die beiden Lösungen wurden zusammengegeben und zur Ausbildung der DNA-Lipid Komplexe für 45 Min. bei RT inkubiert. Mit einer Pipette wurde die Transfektionslösung tropfenweise auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden mit der Transfektionslösung für 4-6 Std. im Inkubator inkubiert. Dann wurde die Transfektionslösung von den Zellen abgesaugt und die Zellen 3x mit PBS gewaschen. Für die Synthese des Proteins wurden die Zellen 1-2 Tage im Inkubator inkubiert. Die Zellen wurden danach entweder für die Herstellung von totalen Zellysaten geerntet oder für die Durchführung einer immunzyto-chemischen Färbung mit 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert. In einigen Experimenten wurden die transient transfizierten Zellen 5-48 Std. nach der Transfektion mit HSV-1 *d120* infiziert.

3. 2. 1. 6. Stabile Transfektion von eukaryontischen Zellen mit DNA

Die Durchführung einer stabilen Transfektion unterscheidet sich in den ersten Arbeitsschritten nicht von der transienten Transfektion. Nach dem Absaugen der Transfektionslösung und waschen der Zellen mit PBS, wurden die Zellen über Nacht im Inkubator inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit Trypsin / EDTA von der Platte abgelöst und in Selektionsmedium (Medium 199, 10% FCS, 100U/ml Penicillin / Streptomycin, 1.5mg/ml Neomycin) verdünnt. Die Zellen aus einem Loch der 6-Loch Platte (ca. 1×10^6 Zellen) wurden in 300ml Selektionsmedium verdünnt und auf 30 x 10cm Schalen verteilt. Stabile Transfektanden haben das Plasmid in ihrem Genom integriert und exprimieren das auf dem Plasmid liegende Neomycin Gen konstitutiv, so dass nur diese Zellen über einen längeren Zeitraum in dem Selektionsmedium überleben. Die einzelnen Platten wurden für weitere 2-3 Wochen im Inkubator inkubiert, bis die ersten Klone auf den Platten sichtbar wurden. Die Einzelklone wurden mit Trypsin / EDTA von den Schalen gelöst und in 48- Loch Platten überführt. Von jeder 48- Loch Platte, die die gepickten primär Klone enthielt, wurden Replikaplaten angelegt. Die Replikaplaten wurden bei -80°C eingefroren, um später schnell auf die einzelnen Klone zurückgreifen zu können. Die stabilen Klone wurden dann sukzessiv über eine 24- und 12- Loch Platte, sowie eine 25cm², 75cm² und 175cm² Zellkulturflasche hochgezogen. Von den 12- Loch Platten wurden erneut Replikaplaten gemacht, die für den Nachweis der stabilen rekombinanten Proteinexpression verwendet wurden. Die positiven Klone wurden wie oben beschrieben expandiert. Stickstoffkulturen wurden von jedem positiven Klon angelegt. In weiterführenden Experimenten wurden die Eigenschaften der positiven Klone charakterisiert.

3. 2. 1. 7. Subklonierung stabiler Klone

Die mit dem unter 3.2.1.6. beschriebenen Verfahren hergestellten stabilen Klone, zeigen in der Regel kein homogenes rekombinantes Expressionsmuster. Die Expressionslevel können innerhalb eines Klons stark voneinander abweichen. Die Kreuzung von 2, 3 oder mehr stabilen Primärklonen kann nicht ausgeschlossen werden, deshalb ist eine Subklonierung der Primärklone unerlässlich. Für die Subklonierung wurden die einzelnen Primärklone auf eine Zellzahl von 5 Zellen/ml verdünnt. 10ml dieser Verdünnung wurden auf eine 96- Loch Platte mit 100µl / Loch verteilt und erneut für 2-3 Wochen in Selektionsmedium im Inkubator inkubiert. Statistisch erhält somit jedes zweite Loch der 96- Loch Platte eine einzige Zelle, aus der sich der Subklon bilden kann. Die Subklone wurden schliesslich expandiert und auf das rekombinante Expressionsmuster untersucht.

3. 2. 1. 8. Fixieren von Zellen und X-Gal-Färbung

Für die Durchführung verschiedener zytologischer Untersuchungen ist die Fixierung von Zellen erforderlich. Bei dem Nachweis von beta-Galaktosidase oder dem immunologischen Nachweis von ICP4 wurden die Zellen fixiert. Hierzu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen 2x mit PBS gewaschen. Für die Fixierung wurde 4%-ige Paraformaldehyd (PFA) Lösung auf die Zellen gegeben und 20 Min. bei RT inkubiert. Dann wurde die PFA Lösung abgesaugt und die Zellen 3x mit PBS gewaschen. Danach wurde die X-Gal Lösung (1mg/ml X-Gal, 0.1mM Ferricyanid, 0.1mM Ferrocyanid, 100mM MgCl₂ in 1x PBS) auf die Zellen gegeben und für 3-5 Std. oder über Nacht bei 37°C inkubiert. Zellen die das beta-Galaktosidase Gen nach transienter Transfektion bzw. in stabilen Zellen nach Cre Rekombinase vermittelter Deletion der loxP/ Stop/loxP Kasette exprimieren, lassen sich mit der X-Gal Lösung blau anfärben. Das X-Gal Substrat wird von beta-Galaktosidase in einen nicht löslichen blauen Indigofarbstoff umgewandelt. Die X-Gal Lösung wurde entfernt, die Zellen 2x mit PBS gewaschen und unter dem Lichtmikroskop die blau gefärbten Zellen gezählt. Die Anzahl der blauen Zellen wurden für die Berechnung des HSV-1 Amplikon Titors mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert.

3. 2. 2. Allgemeine Methoden zur Arbeit mit Proteinen

3. 2. 2. 1. SDS-Polyacrylamid-Gele zur Auftrennung von Proteinen (Laemmli, 1970)

In der Zelle wird eine Vielzahl von Proteinen synthetisiert, die verschiedene Merkmale aufweisen. Eines dieser Merkmale ist die Proteingröße, die in der Einheit Dalton (Da) angegeben wird. Um ein Protein aufgrund seiner Größe nachzuweisen, muss die Vielzahl der Proteine der Größe nach aufgetrennt werden. Hierzu gibt es mehrere Methoden, eine dieser Methoden ist die gelelektrophoretische Auftrennung von totalen Zellysaten bzw. Proteinextrakten. Im SDS-Gel werden die Proteine unter denaturierenden Bedingungen der Größe nach aufgetrennt. Die Proteine erhalten durch die Anlagerung von Glycin eine negative Gesamtladung und können somit im elektrischen Feld wandern. Die negativ geladenen Proteine wandern vom Minus- zum Pluspol. Die Laufstrecke und die Dichte des Gels bestimmt hierbei die Auflösung der Proteine. Kleinere Proteine diffundieren durch das Gel schneller als grössere Proteine, die von dem dichteren Netzwerk des Gels stärker zurückgehalten werden. Für die Auftrennung kleinerer Protein (wie z.B. GFP 26kDa) werden hochprozentige Gele (12%) verwendet und für die Auftrennung grösserer Proteine (wie z.B. ICP4 175 kDa) werden niedrigprozentige Gele (8%) verwendet. Das Gel besteht aus einem oberen Sammelgel und einem unteren Trenngel. Im Sammelgel werden die Proteine konzentriert, um später im Trenngel gleichmässig aufgetrennt zu werden. Die totalen Zellysate wurden vor dem Auftragen auf das Gel für 10 Min. bei 75°C erhitzt. Die Elektrophorese wurde zunächst mit 40 mA für die Konzentration der Proteine im Sammelgel gestartet und danach für die Auftrennung der Proteine im Trenngel bei 50 mA fortgesetzt.

Laufpuffer:	30g	Tris
	144g	Glycin
	0.1%	SDS
add	5l	H ₂ O bidest.

4%-iges Sammelgel:	1,3ml	0.8% Bisacrylamid/30% Acrylamid
	2.5ml	1.5 M Tris/HCl pH 8.8/0.4% SDS
	100µl	gesättigtes Ammoniumperoxodisulfat
	10µl	TEMED
add	10ml	H ₂ O

8%-iges Trenngel:	8.4ml	0.8% Bisacrylamid/30% Arcylamid
	6.0ml	1.5 M Tris/HCl pH 6.8/0.4% SDS
	300µl	gesättigtes Ammoniumperoxodisulfat
	30µl	TEMED
add	30ml	H ₂ O

3.2.2.2. Westernblot-Analyse

Die Zellen wurden mit Trypsin / EDTA von den Platten abgelöst in Medium aufgenommen und in Eppendorf Röhrchen überführt. Die Zellen wurden 5 Min. bei 1200rpm pelletiert, der Überstand dekantiert und das Zellpellet in 150µl Probenpuffer (200 mM Tris pH 8.8, 10% Glykose, 5 mM EDTA, 0.1 % Bromphenolblau, 3% SDS und 0.3 M Beta-Mercapto-Ethanol) resuspendiert. Zur Degradation der genomischen DNA wurden die totalen Zellysate 10 Min. im Ultraschallbad inkubiert. Vor dem Auftragen eines Aliquots der totalen Zellysate auf das Polyacrylamidgel, wurden die Proben 10 Min. bei 75°C erhitzt und auf Eis abgekühlt. Das restliche Zellysate wurde bei -20°C gelagert. Die SDS-Gele wurde nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine mittels Semidry Elektroblothing auf eine Nitrozellulose Membran, Immobilon-P Transfer Membranen (Millipore, Bedford), transferiert. Nach dem Transfer wurden die Membranen in TBS mit 5% fettfreiem Milchpulver 1 Std. bei RT blockiert. Im Anschluss daran wurde die Membran 2 x für 5 Min. in TTBS gewaschen. Der erste Antikörper wurde in TBS mit 1% Milchpulver in der Regel 1:1000 verdünnt und für 1 Std. bei RT auf die Membran gegeben. Die Membran wurde erneut 2 x für 5 Min. mit TTBS gewaschen, bevor der zweite Antikörper für 1 Std. bei RT auf die Membran gegeben wurde. Der zweite Antikörper wurde in TBS mit 1% Milchpulver in der Regel 1:20000 verdünnt. Vor der Zugabe des Substrats wurde die Membran 2 x 5 Min. mit TTBS, 1 x 10 Min. mit TBS gewaschen und mit H₂O bidest. abgespült. Danach wurde die Membran für 5-10 Min. mit dem Substrat Lumi Light (Boehringer Mannheim) inkubiert. Dann wurde die Membran mehrere Male mit H₂O bidest. abgespült und in einer Röntgenkassette ein Biomax MR Röntgenfilm (Kodak) auf die Membran aufgelegt.

3. 2. 2. 3. Expression der *IE3*/ Hexa-Histidin Polypeptide in *E. coli* und Aufreinigung der Polypeptide

Für die Expression der *IE3*/Hexa-Histidin Polypeptide, wurden die Plasmide pET32-*IE3*Sub in den *E.coli* Stamm BL21 (DE3) pLysS transformiert. Nach der Transformation wurden von jeder Platte mehrere Kolonien gepickt und 2ml Kulturen für die Durchführung einer Plasmid Minipräparation angeimpft. Die aus den Kulturen isolierte Plasmid DNA wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen analysiert. Bakterienklone mit dem richtigem Plasmid wurden erneut über Nacht in 10ml LB Medium mit Ampicillin/Kanamycin wachsen gelassen und am nächsten Tag Glycerinkulturen von jedem Klon angelegt. Je 500ml LB Medium mit 100µg / ml Ampicillin und 25µg / ml Kanamycin wurden mit einem der Klone (5ml der über Nachtkultur) angeimpft und für die Expression der *IE3*/Hexa-Histidin Polypeptide bis zu einer OD₆₀₀ 0.7-0.9 auf dem Schüttler bei 235rpm und 37°C inkubiert. Die Expression der *IE3*/Hexa-Histidin Polypeptide wurde durch Zugabe von 2mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Nach der Zugabe von IPTG wurden die Kulturen für weitere 3-5 Std. bei 37°C und 253rpm auf dem Schüttler inkubiert. Dann wurden die Bakterien geerntet und durch Zentrifugation 10 Min. bei 8000rpm pelletiert. Die Bakterienzellen wurde mit 6M Guanidinium-HCl, 0.3 M NaCl, 0.1 M Natriumacetat, pH 6.4 lysiert. Die Lysate wurden mit 2ml Ni²⁺ nitrilo-tri-acetic acid (NTA) Agarose gemischt und für 2 Std. inkubiert. Die Säule wurde 10x mit 6M Guanidinium-HCl, 0.1M Na Phosphat, 0.01M Tris/HCl, pH 8.0, 5x mit 8M Harnstoff, 0.1M Na Phosphat, 0.01M Tris/HCl, pH 8.0 und 2x mit 8M Harnstoff, 0.1M Na Phosphat, 0.01M Tris/HCl, pH 6.3 gewaschen. Die an die Ni²⁺ NTA Säule

gebundenen Proteine wurden mit einer zunehmenden Imidazol Konzentration (100mM, 150mM, 200mM und 250mM) in 8M Harnstoff, 0.1M Na Phosphat, 0.01M Tris/HCl, pH 6.3 eluiert. Die einzelnen Fraktionen wurden in einem SDS Gel analysiert. Die Proteinfractionen mit dem höchsten Proteinanteil wurden gegen 6M Harnstoff dialysiert. Die Proteinlösungen wurden mit Probenpuffer (200mM Tris pH 8.8, 10% Glukose , 5mM EDTA, 0.1% Bromphenolblau, 3% SDS und 0.3M beta-Mercaptoethanol) versetzt und die Proteine auf einem präparativem SDS Gel aufgetrennt. Das Gel wurde 10 Min. mit Coomassie-blau gefärbt und 20 Min. mit Wasser entfärbt. Die Proteinbanden wurden aus dem Gel herausgeschnitten und in einer Elektroelutionskammer (Schleicher und Schuell, Dassel, Germany) für 24 Std. mit 200 Volt aus dem Gel eluiert. Die eluierten Proteine wurden bei -20°C gelagert.

3. 2. 2. 4. Bestimmung der *IE3*/Hexa-Histidin Polypeptid Konzentrationen

Für die spätere Immunisierung der Kaninchen mit den *IE3*/Hexa-Histidin Polypeptiden ist eine genauere Konzentrationsangabe notwendig, da zu hohe Polypeptid Konzentrationen für das Tier nicht ungefährlich sein könnten. Die Konzentration der *IE3*/Hexa-Histidin Polypeptide wurde durch Vergleich mit einer BSA Standard Verdünnungsreihe ermittelt. Hierzu wurde eine Verdünnungsreihe von 5, 10, 15, 20, 25 und 50µg BSA Protein hergestellt und in einem 12%igen SDS-Gel zusammen mit einem Aliquot der *IE3*/Hexa-Histidin Polypeptide aufgetrennt. Das Gel wurde mit Coomassie-Blau angefärbt, wodurch die Proteinbanden im Gel sichtbar wurden. Die Dicke der blau gefärbten Proteinbanden ist proportional der Proteinkonzentration, d. h. 50µg BSA Protein zeigen eine doppelt so dicke Bande im Gel als 25µg BSA Protein. Anhand der gefärbten Proteinbanden wurde die Konzentration der Polypeptide durch Vergleich mit den bekannten BSA Konzentrationen abgeschätzt. Die Konzentrationen betragen 2mg/ml für *IE3*/52-53 Polypeptid, 1.5mg/ml für *IE3*/54-55 Polypeptid und 2.5mg/ml für *IE3*/56-57 Polypeptid.

3. 2. 2. 5. Luciferase Assay

Mit dem Luciferase Assay wird die Luciferase Aktivität in “ relative light units “ (RLU) gemessen. Die Luciferase ist ein monomeres Protein von 61 kDa, das keine posttranslationale Prozessierung für die Ausführung seiner enzymatischen Aktivität erfordert. Deshalb kann es als genetischer Reporter direkt nach der Translation verwendet werden. Das Luciferase Enzym katalysiert die Oxidation von D-Luciferin, wobei gleichzeitig ein Photon als Nebenprodukt entsteht. Die Reaktion wird als Chemilumineszenz Reaktion bezeichnet und die freigesetzten Photonen können in Lichteinheiten gemessen werden. Die Luciferase Aktivität steigt proportional mit der Luciferase Proteinkonzentration an, hierdurch kann der Luciferase Assay für die quantitative Messung von Promoteraktivitäten herangezogen werden. Die Induktion der Luciferase Expression über den tet. Transaktivator wurde nach Transfektion von pA81 Plasmid DNA in VERO-tet.TA Zellen in Anwesenheit oder Abwesenheit von Tetrazyklin gemessen. Das pA81 Plasmid trägt das Luciferase Gen unter der Kontrolle des tet.Ox7 CMV minimal-Promoters, der durch die Bindung des tet.Transaktivators an die tet.Ox7 Sequenzen induziert wird. In Anwesenheit von Tetrazyklin kann der tet. Transaktivator aufgrund einer Konformationsänderung nicht an die tet.Ox7 Sequenzen binden und die Expression des Luciferase Gens bleibt aus. 24 Std. nach der Transfektion von pA81 Plasmid DNA wurden die Zellen mit 1x PBS und in Lysispuffer (0.6% NP-40, 0.15M NaCl, 10mM Tris pH 7.9 und 1mM EDTA) aufgenommen. Die Zelltrümmer wurden für 30 Sek. bei 13000rpm in der Eppendorf Tischzentrifuge abzentrifugiert und die Proben bis zur Messung der Luciferase Aktivität auf Eis inkubiert. Für die Messung wurden in ein Röhrchen 350µl Glycyl-Glycin Puffer (25mM Glycyl-Glycin, 5mM ATP und 50mM MgCl₂, pH 7.0) und 25µl der Zellysate gemischt. Das Röhrchen wurde in das Luminometer gesteckt und das Substrat

D-Luciferin (0.5mM D-Luciferin in 100mM Phosphatpuffer pH 7.0-8.0) wurde automatisch in das Röhrchen eingespritzt. Die Luciferase Aktivität der einzelnen Proben wurden von dem Messgerät in RLUs angegeben.

3. 3. Arbeiten mit Herpes Simplex Virus Typ-1 (HSV-1)

3. 3. 1. Infektion von Zellen mit HSV-1

Es gibt nur wenige Zellen die gegen eine HSV-1 Infektion resistent sind (z.B. CHO-Zellen). Für die Infektion mit HSV-1 wurden die Zellen 1 Tag vor der Infektion mit Medium 199 (Gibco BRL), 10% FCS und 100 U/ml Penicillin-Streptomycin in Gewebekultur Platten oder Schalen ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium von den Zellen entfernt, die Zellen 2x mit PBS gewaschen und die Viruslösung mit Medium 199, welches 2% FCS und 100 U/ml Penicillin-Streptomycin enthielt auf die Zellen gegeben. Die Viruslösung wurde für 1-3 Std. bei 37°C und 5% CO₂ auf den Zellen inkubiert. Danach wurde die Viruslösung von den Zellen entfernt und die Zellen 3-5x mit PBS gewaschen. Dann wurde frisches Medium 199 mit 10% FCS und 100 U/ml Penicillin-Streptomycin zu den Zellen gegeben und die Zellen für 1-5 Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Schliesslich wurden die Zellen entweder für die Viruspräparation geerntet oder für die Plaquefärbung fixiert.

3. 3. 2. Vorbereitung von HSV-1 *d120* bzw. HSV-15*d11.2* Helfer-Virusstock

E5 Zellen bzw. 2-2 Zellen wurden in einer 6- Loch Platte in 2ml Medium 199 (Gibco BRL) mit 10% FCS pro Loch ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und die Zellen 1x mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit einer Virus-Menge von HSV-1 *d120* bzw. HSV-1 *5d11.2* infiziert, die zur Ausbildung gut getrennter Plaques führt (ca. 50 PFU pro Loch) . Die Viruslösung wurde für 1-3 Stunden bei 37°C auf den Zellen inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde die Viruslösung von den Zellen entfernt, 1x mit PBS gewaschen und 2ml CMC-Medium pro Loch auf die Zellen gegeben. Die infizierten Zellen wurden für weitere 2 bis 3 Tage inkubiert, bis die einzelnen Plaques im Mikroskop deutlich sichtbar waren. Mit einer sterilen Pasteurpipette wurden mehrere Plaques gepickt und auf die entsprechenden Zellen einer frischen 6- Loch Platte pipettiert. Es ist ratsam mehrere Plaques zu picken, um sicherzustellen das zumindest eines der Isolate den gewünschten Phänotyp des Virus besitzt. Nach 1 bis 2 Tagen (abhängig von der Virus-Menge, die man von einem Plaque erhalten hat) zeigten die Zellen zytopathische Effekte (ZPE). Die Zellen waren abgerundet, hafteten aber dennoch an der Platte fest. Die Zellen wurden geerntet und das Virus präpariert. Die Plaque gereinigten Virusstocks wurden bei -70°C gelagert und nur für die Herstellung von grösseren Virusstock-Präparationen verwendet.

3. 3. 3. Herstellung und Präparation von Helfer-Virusstock

E5 Zellen oder 2-2 Zellen wurden in einer 150cm² Kulturflasche mit 20ml Medium 199 (Gibco BRL) mit 10 % FCS bis zu einer Konfluenz von 90% bei 37°C wachsen gelassen. Dann wurde das alte Medium gegen Medium 199 mit 5% FCS ausgetauscht und 100µl des Plaque gereinigten Virusstocks zu den Zellen gegeben. Die Zellen sollten mit einer MOI von 0.1 oder einer geringeren MOI infiziert werden. Bei einer höheren MOI können spontan defekte Viren entstehen, die mit der Replikation des Virus interferieren und somit den Titer (PFU/ml) reduzieren. Die Zellen wurden geerntet als sie sich abgerundet hatten, jedoch zum grössten Teil noch am Boden der Kulturflasche hafteten. Hierzu wurden die Zellen durch mehrmaliges auf- und abpipettieren gelöst und in das Medium aufgenommen. Die Suspension wurde in ein 50ml Falcon Röhrchen

überführt. Durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen der Suspension wurden die Zellen aufgebrochen und das Virus in den Zellen freigesetzt. Im Anschluss wurde die Lösung 10 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Hierdurch wird das Zellmembran-assoziierte Virus von den Membranfragmenten freigesetzt. Die Zelltrümmer wurden bei 13000rpm für 10 Minuten abzentrifugiert und das im Überstand befindliche Virus in ein frisches 50ml Falcon Röhrchen überführt. Für die Lagerung bei -70°C wurde der Virusstock in 1ml Kryoröhrchen aliquotiert und für die Ermittlung des Virustiters eine Plaquetitration durchgeführt (siehe Methode 3.3.5.).

3. 3. 4. HSV-1 *dI20* Komplementations-Assay in stabilen VERO-Ctet.*IE3* und VERO-Ntet.*IE3* Zelllinien

Die *IE3* Deletionsmutante HSV-1 *dI20* wächst nur auf Zellen, die das *IE3* Gen exprimieren. VERO-tet.*IE3* Zellen exprimieren das *IE3* Gen unter der Kontrolle des tet.Ox7-CMV minimal-Promoters. In Abwesenheit von Tetrazyklin wird die Transkription von *IE3* über den tet. Transaktivator induziert, in Anwesenheit von Tetrazyklin bleibt die Induktion der *IE3* Transkription über den tet.Transaktivator aus. Das Prinzip der Komplementation von HSV-1 *dI20* in VERO-tet.*IE3* Zellen ist in Abb. 3.4.3. schematisch dargestellt. 5×10^5 VERO-Ctet.*IE3* bzw. VERO-Ntet.*IE3* Zellen wurden in einer 6- Loch Platte ausgesät und 24 Std. in Abwesenheit bzw. in Anwesenheit von $1\text{-}4\mu\text{g} / \text{ml}$ Tetrazyklin im Medium inkubiert. Nach 24 Std. wurde das Medium abgesaugt und die Zellen 2x mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden 1-2 Std. mit HSV-1 *dI20* (MOI=0.1) bei 37°C und 5% CO_2 infiziert. Danach wurde die Viruslösung von den Zellen entfernt und die Zellen 5x mit PBS gewaschen. Dann wurden die infizierten Zellen für 3 Tage in Medium ohne und Medium mit $1\text{-}4\mu\text{g} / \text{ml}$ Tetrazyklin inkubiert. Nach den 3 Tagen wurde die Zellen geerntet und das Virus präpariert (siehe 3.3.3.). Die präparierten Virusstocks wurden wie in Abschnitt 3.4.5. beschrieben auf E5-Zellen titriert.

3. 3. 5. Plaquetitration von Wildtyp (*wt*) HSV-1 und HSV-1 Mutanten

Am 1. Tag wurden von einer konfluenten Zellkulturflasche (150 cm^2) vier 6- Loch Platten mit Zellen besät. Am nächsten Tag hat sich ein dichter Zellrasen in den Lochplatten ausgebildet. Das Medium wurde von den Zellen abgesaugt und die Zellen 1x mit PBS gewaschen. Mit diesem Waschschrift wurde das restliche FCS von den Zellen gespült. Nach dem Waschen wurden 500ml Medium ohne FCS auf die Zellen gegeben. Von dem zu titrierenden Virusstock wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt und jeweils $100\mu\text{l}$ jeder Verdünnungsstufe auf die Zellen gegeben. Für die Infektion der Zellen wurden die Platten 1-2 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Am Ende der Infektion wurde die Viruslösung wieder abgesaugt und die Zellen 3x mit PBS gewaschen. Die Ausbildung der Plaques wurde durch die Zugabe von 2ml CMC-Medium (Carboxymethylcellulose) auf die Zellen gewährleistet. Hierbei handelt es sich um ein Gemisch aus 2% Carboxymethylcellulose und 2x DMEM mit 10% FCS (1:1 v/v). Dieses Gemisch ist relativ zähflüssig und verhindert die Ausbreitung des Virus über den gesamten Zellrasen. Bis zur Ausbildung von Plaques wurden die Platten in der Regel 3 Tage im Inkubator bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Sind die Plaques zu klein sollten die Platten für einen weiteren Tag im Inkubator inkubiert werden. Die Bildung eines Plaques kann im Lichtmikroskop im Verlauf von 3 Tage gut beobachtet werden. Am dritten Tag wurde das CMC-Medium von den Zellen abgesaugt und die Zellen 1x mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 4% Paraformaldehyd fixiert und mit Kristallviolett für 5 Minuten bei RT angefärbt. Im Anschluss wurde die restliche Kristallviolett Lösung von den Zellen entfernt und die Zellkultur mehrmals mit klarem Wasser abgespült bis die einzelnen Plaques gut sichtbar wurden (siehe Abb. 3.3.5.). Die Plaques verschiedenener Verdünnungsstufen wurden ausgezählt und mit dem Verdünnungsfaktor des Virusstocks der Titer in Plaque bildenden Einheiten pro ml Viruslösung berechnet.

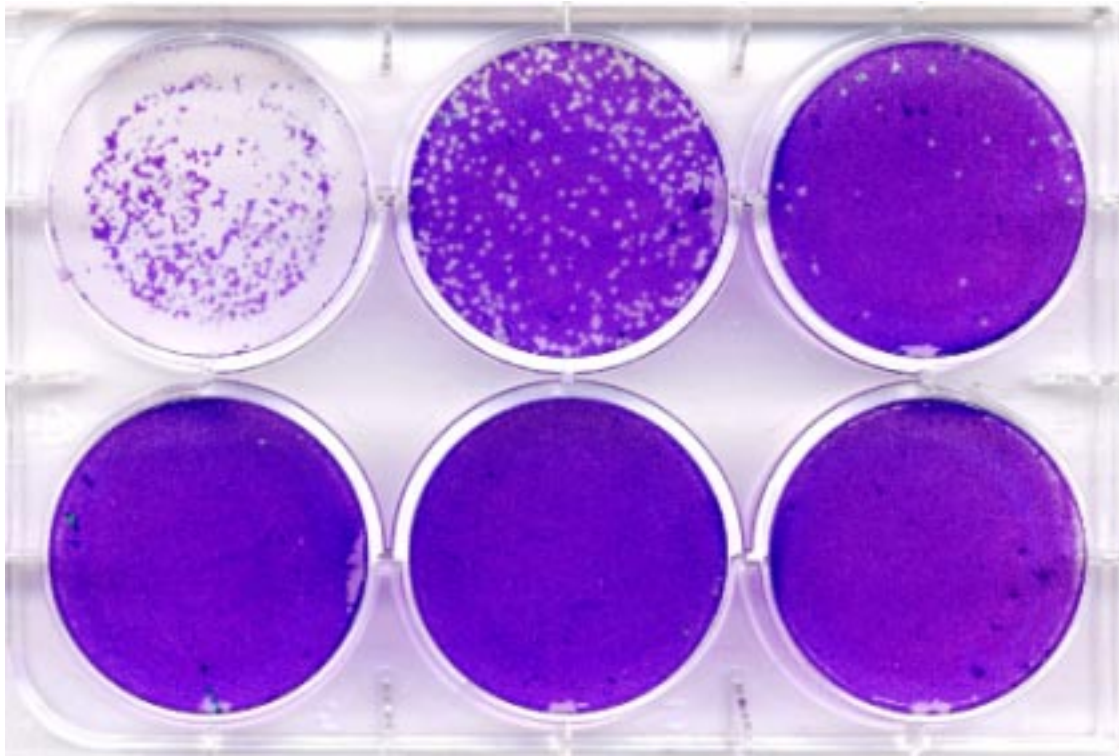


Abb. 3.3.5. Plaques von HSV-1 *d120* auf komplementierenden E5-Zellen. Die weissen Punkte in dem violett gefärbten Zellrasen sind Plaques von HSV-1 *d120* (*IE3* Deletionsmutante). Nach der Infektion mit HSV-1 *d120* lösen sich die Zellen nach einigen Tagen vom Untergrund ab und es entstehen Plaques (Löcher) im Zellrasen. Gezeigt ist die Infektion mit einer abnehmenden Viruskonzentration von links oben nach rechts unten.

3. 3. 6. Verpackung von pHSV-tet.*IE3*/LacZ Amplikon DNA in VERO-tet.TA Zellen mit HSV-1 *d120* Helfervirus

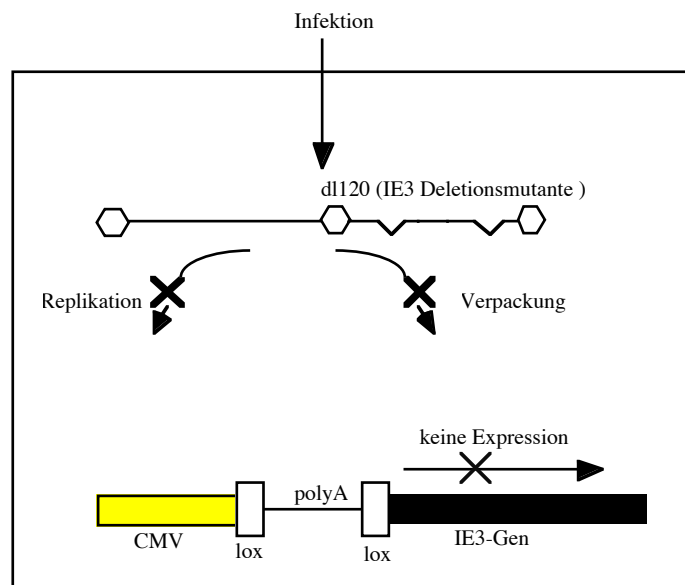
Im pHSV-tet.*IE3*/LacZ Amplikon Vektor wird das *IE3* Gen über den tet.Ox7-CMV minimal-Promoter reguliert. In Abwesenheit von Tetrazyklin bindet der tet. Transaktivator, der in den VERO-tet.TA Zellen konstitutiv exprimiert wird, an die tet.Ox7 Sequenzen und aktiviert die Transkription von *IE3* über den CMV minimal-Promoter. In Anwesenheit von Tetrazyklin bindet der Transaktivator nicht an die tet.Ox7 Sequenzen, wodurch die Transkription von *IE3* nicht aktiviert wird. Die HSV-1 *d120 IE3* Deletionsmutante kann sich nur in Zellen vermehren, die das *IE3* Gen exprimieren und somit den Defekt der Mutante komplementieren. Gleichzeitig kann der Amplikon Vektor nur in den Zellen in HSV-1 Partikel verpackt werden, in denen das Helfervirus repliziert. Sowohl das Helfervirus als auch der Amplikon Vektor sind in ihrer Vermehrung voneinander abhängig (Pechan *et. al.*, 1996). Jeweils 2 μ g pHSV-tet.*IE3*/LacZ Amplikon DNA wurde mit 7 μ l Lipofectamin (Gibco BRL) in 1x 10⁵ VERO-tet.TA Zellen transfiziert. 4-5 Std. nach der Transfektion wurde die Transfektions-lösung abgesaugt und die Zellen 2x mit PBS gewaschen. Ein Ansatz erhielt frisches Medium ohne Tetrazyklin und ein zweiter Ansatz erhielt frisches Medium mit 6 μ l / ml Tetrazyklin. Nach 20-24 Std. wurde das Medium wieder abgesaugt und die Zellen 2x mit PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen mit HSV-1 *d120* Helfervirus (MOI=2) für 1-2 Std. bei 37°C und 5% CO₂ infiziert. Die Viruslösung wurde von den Zellen entfernt und die Zellen 3-5x mit PBS gewaschen. Wie zuvor erhielt ein Ansatz frisches Medium ohne Tetrazyklin und der andere Ansatz

frisches Medium mit 6µl / ml Tetrazyklin. Die infizierten Zellen wurden für die Verpackung der Amplikon DNA weitere 3 Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am dritten Tag wurden die Zellen geerntet und das Virus präpariert (siehe Abschnitt 3.3.3.).

3. 3. 7. Verpackung von pHGCXnCRE Amplikon DNA in VERO-IE3 Zellen mit HSV-1 d120 Helfervirus

In den VERO-IE3 Zellen ist die IE3 Expression durch die loxP/Stop/loxP-Kassette, die zwischen CMV IE1 Enhancer / Promoter und kodierender Sequenz des IE3 Gens liegt, auf transkriptionaler, sowie translationaler Ebene reprimiert. Durch die Cre Rekombinase wird die loxP/Stop/loxP-Kassette deletiert und die Repression der IE3 Expression aufgehoben. Der pHGCXnCRE Amplikon Vektor trägt das Cre Rekombinase Gen unter der Kontrolle des CMV IE1 Enhancer / Promoters und das GFP Reportergen unter der Kontrolle des HSV-1 IE 4/5 Promoters. Zellen die den Amplikon Vektor nach Transfektion erhielten, exprimieren das GFP Gen und das Cre Rekombinase Gen. Werden diese Zellen mit HSV-1 d120 infiziert, so wird die IE3 Deletionsmutante aufgrund der Cre Rekombinase induzierten IE3 Expression komplementiert. Gleichzeitig wird durch die Replikation von HSV-1 d120 der pHGCXnCRE Amplikon Vektor in HSV-1 Partikel verpackt. Die aus diesen Zellen resultierenden Virus-Nachkommen sind ein Gemisch aus HSV-1 d120 und HSV-1 pHGCXnCRE Amplikon Vektor, die weitere Zellen infizieren. Die auf diese Weise induzierte Verpackung des Amplikon Vektors setzt sich solange fort, wie die Zelle sowohl den Amplikon Vektor als auch die HSV-1 IE3 Deletionsmutante in sich trägt (siehe Abb. 3. 3. 7.). Die Verpackung der pHGCXnCRE Amplikon DNA in HSV-1 Partikel kann anhand der zunehmenden Anzahl grün leuchtender Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden. 1x 10⁵ VERO-IE3 Zellen wurden mit 2µg pHGCXnCRE Amplikon DNA und 7µl Lipofectamin (Gibco BRL) transfiziert. 24 Std. nach der Transfektion wurde die Transfektionseffizienz anhand der GFP Expression in den Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop abgeschätzt. 15-25% der Zellen leuchteten nach 24 Std. im Fluoreszenzmikroskop grün. Danach wurden die Zellen mit HSV-1 d120 (MOI= 2) für 1-2 Std. bei 37°C und 5% CO₂ infiziert. Dann wurde die Viruslösung von den Zellen entfernt, 5x mit PBS gewaschen, frisches Medium dazu gegeben und die Zellen für 3 Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 3 Tagen wurden die Zellen geerntet und das Virus aus den Zellen präpariert (siehe 3.3.3.). Das Prinzip der Cre-induzierten IE3 Genexpression und die Verpackung von HSV-1 pHGCXnCRE Amplikon Vektor mit HSV-1 d120 Helfervirus ist in Abb. 3.3.7. dargestellt.

A.



B.

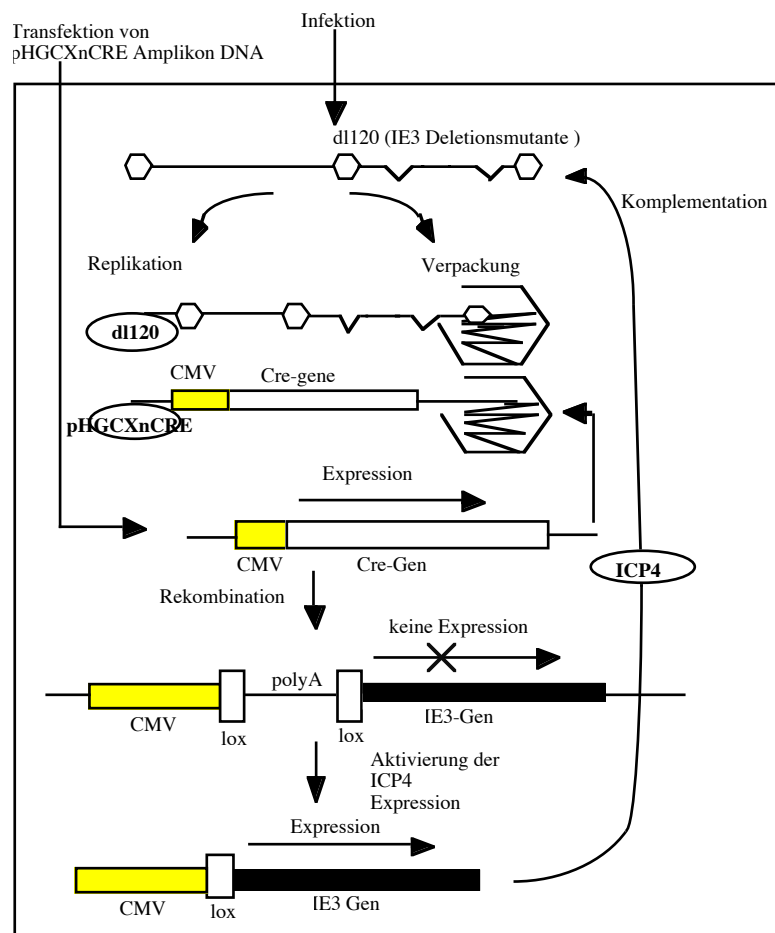


Abb. 3. 3. 7. Prinzip der Cre Rekombinase induzierten IE3 Genexpression und Verpackung von pHGCXnCRE HSV-1 Amplikon DNA. A. Der Defekt des Helfervirus wird nicht komplementiert, da kein IE3 in den Zellen exprimiert wird. B. Nach Transfektion der pHGCXnCRE HSV-1 Amplikon DNA wird die IE3 Genexpression durch Cre Rekombinase induziert, das Helfervirus komplementiert und die Amplikon DNA repliziert und in HSV-1 Partikel verpackt.

3. 3. 8. Titration von HSV-1 Amplikon Vektor

Die beiden mit HSV-1 *d120* Helfervirus verpackten Amplikon Vektoren (*pHSV-tet.IE3/LacZ* und *pHGcXnCRE*) tragen beide ein Reporter Gen, über die der Amplikon Vektor in den Zellen nachgewiesen werden kann. Da es sich bei den hergestellten Virusstocks um ein Gemisch aus HSV-1 *d120* Helfervirus und HSV-1 Amplikon Vektor handelt, wurde die Titration der in HSV-1 Partikel verpackten Amplikon DNA auf VERO-Zellen durchgeführt. Auf diesen Zellen kann das Helfervirus nicht wachsen, so dass der tatsächliche Titer des HSV-1 Amplikon Stocks bestimmt werden kann. Anstelle von VERO-Zellen können auch andere Zellen, die das Helfervirus nicht komplementieren, für die HSV-1 Amplikon Titration verwendet werden (z.B. HeLa-Zellen oder PC12-Zellen u.a.). 1×10^6 VERO-Zellen wurden in je 1 Loch einer 6- Loch Platte ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt und die Zellen 2x mit PBS_S gewaschen. Dann wurden die Zellen mit einer Verdünnungsreihe des Virusstocks für 1-2 Std. bei 37°C und 5% CO₂ infiziert. Danach wurde die Viruslösung von den Zellen entfernt und 5x mit PBS_S gewaschen. Nach Zugabe von frischem Medium wurden die Zellen für 24 Std. im Inkubator inkubiert. 24 Std. nach der Infektion wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd (PFA) in 0.1M Phosphatpuffer pH 7.0 für 25 Min. bei RT fixiert. Im Anschluss an die Fixierung wurden die Zellen 3x mit PBS_S gewaschen. Der Titer von HSV-1 *pHGcXnCRE* Amplikon infizierten Zellen konnten aufgrund des GFP Reportergens direkt unter dem Fluoreszenzmikroskop bestimmt werden, indem die grün leuchtenden Zellen der einzelnen Verdünnungsstufen gezählt und mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert wurden. Der Titer von HSV-1 *pHSV-tet.IE3/LacZ* Amplikon wurde durch die Zugabe von X-Gal Lösung (1mg / ml X-Gal, 0.1mM Ferricyanid, 0.1mM Ferrocyanid, 100mM MgCl₂ in 1x PBS_S) zu den Zellen bestimmt. Die beta-Galaktosidase wandelt das Substrat X-Gal in einen nicht wasserlöslichen blauen Indigofarbstoff um. Die Zellen, die mit dem Amplikon Virus infiziert wurden exprimieren das LacZ Gen konstitutiv und werden durch das Genprodukt beta-Galaktosidase nach Zugabe von X-Gal blau gefärbt. Die X-Gal Lösung wurde für 3-5 Std. oder über Nacht auf den Zellen inkubiert. Danach wurde die X-Gal Lösung entfernt, die Zellen 2x mit PBS_S gewaschen und unter dem Lichtmikroskop die blau gefärbten Zellen gezählt. Die Anzahl der blauen Zellen wurde für die Berechnung des HSV-1 Amplikon Titors mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert. Die Titer des HSV-1 Amplikon Vektors wird in der Einheit " Transducing Units " (TU) pro ml angegeben.

3. 3. 9. Helfervirus-freie Verpackung von HSV-1 Amplikon Vektor

Die Methode der Helfervirus-freien Verpackung von Amplikon Vektor DNA beruht auf einem Cosmid Set (*cos6Δa*, *cos14*, *cos28*, *cos48Δa* und *cos56*), in dem die gesamte HSV-1 Sequenz als überlappende DNA Fragmente enthalten ist und die Verpackungssequenzen (*pac*) deletiert sind (*cos6Δa* und *cos48Δa*). Nach Transfektion der überlappenden HSV-1 Sequenzen (ohne Deletion der Verpackungssequenzen) bildet sich in den Zellen über den Mechanismus der homologen Rekombination ein zirkuläres und replikationsfähiges HSV-1 Genom, aus dem infektiöse HSV-1 Nachkommen entstehen. Durch die Deletion der Verpackungssequenzen (*pac*) sind die rekombinierten Virusgenome nicht mehr verpackbar, liefern jedoch alle notwendigen Helferfunktionen für die Verpackung von einer cotransfizierten HSV-1 Amplikon DNA (Fraefel *et. al.*, 1996).

3. 3. 9. 1. Präparation des HSV-1 Cosmid Sets

Die Cosmide wurden nach Transformation in Bakterien amplifiziert und mit dem Qiagen Plasmid Maxipräparations Kit aus den Bakterien isoliert. Für die Charakterisierung der Cosmide wurde die Konzentration der Cosmid-DNA im UV-Spektrophotometer bestimmt und ein Aliquot mit den Restriktionsenzymen *DraI* und *KpnI* verdaut. Die verdaute Cosmid DNA wurde in einem 0.4%-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und das Restriktionsmuster überprüft. Danach wurden von jedem der 5 Cosmide DNA Präparationen 10µg zusammen gegeben und mit dem Restriktionsenzym *PacI* verdaut. Die HSV-1 Sequenzfragmente sind in den Cosmiden von singulären *PacI* Restriktionsschnittstellen flankiert. Der Verdau der Cosmide mit *PacI* trennt die HSV-1 Fragmente von den restlichen Cosmid Sequenzen, wodurch die homologe Rekombination der überlappenden HSV-1 Sequenzen nach der Transfektion erleichtert wird. Nach dem *PacI* Verdau wurde ein Aliquot in einem 0.4%-igen Agarosegel aufgetrennt, um den vollständigen Verdau der Cosmid DNA zu überprüfen. Die vollständig verdaute Cosmid DNA wurde mit 1 Volumen Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (25:24:1; v / v) und 1 Volumen Chloroform / Isoamylalkohol (24:1; v / v) aus dem Restriktionsansatz extrahiert und mit 2.5 Volumen Ethanol 100% und 0.1 Volumen 3M Natriumacetat, pH 5.5 über Nacht bei -20°C präzipitiert. Am nächsten Tag wurde die DNA 10 Min. bei 13000rpm in der Eppendorf Tischzentrifuge pelletiert. Das DNA Pellet wurde in Ethanol 70% resuspendiert und erneut 10 Min. bei 13000rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde dann an der Luft getrocknet und schliesslich in 50µl TE Puffer, pH 7.5 aufgenommen und resuspendiert. Die DNA Konzentration wurde im UV-Spektrophotometer gemessen und Aliquots von jeweils 10µg DNA bei -20°C eingefroren.

3. 3. 9. 2. Verpackung von HSV-1 Amplikon DNA in 2-2 Zellen mit dem Cosmid Set

Für die Verpackung von HSV-1 Amplikon Vektoren wurde die *PacI*-verdaute Cosmid DNA mit der Amplikon DNA mit Lipofectamin (Gibco BRL) in 2-2 Zellen cotransfiziert. 2-2 Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ in DMEM mit 10% FCS und 500µg / ml G418 inkubiert. Die Zellen wurden zweimal in der Woche 1: 5, in frischem Medium (20ml), in eine neue 75cm² Gewebekultur Flasche gesplittet. Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen trypsiniert, in einem Hemozytometer gezählt und in einer Dichte von 1.2 x 10⁶ Zellen pro 60 mm Gewebekultur Schale in 3ml DMEM welches 10% FCS enthielt ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt und die Zellen 1x mit Optimem I gewaschen. Für die Transfektion wurden 2µg des *PacI* verdauten Cosmid DNA Mixes (0.4µg von jedem der 5 Cosmide) und 0.6µg der Amplikon DNA in ein 15 ml Falcon Röhrchen mit 100µl Optimem I pro 60 mm Gewebekultur Schale gegeben. In ein zweites 15 ml Falcon Röhrchen wurden 12µl Lipofectamin mit 100µl Optimem I gegeben. Die DNA Lösung in Röhrchen 1. wurde mit der Lipofectamin Lösung in Röhrchen 2. gemischt und für 45 Min. bei RT inkubiert. Danach wurden 1.1ml Optimem I zu der Transfektionslösung gegeben, das Optimem I von den Zellen entfernt und die Transfektionslösung auf die Zellen pipettiert. Die Zellen wurden 5-6 Std. bei 37°C und 5%CO₂ mit dem DNA-Lipofectamin Mix inkubiert. Dann wurde die Transfektionslösung von den Zellen abgesaugt, die Zellen 3x mit Optimem I gewaschen, frisches DMEM Medium mit 6% FCS auf die Zellen gegeben und die Kulturen für 2-3 Tage bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Die Verwendung von einem Amplikon Vektor, der das Grün fluoreszierende Protein (GFP) exprimiert, ermöglicht die Verfolgung des Verpackungsprozesses unter dem Fluoreszenzmikroskop. Nach 2-3 Tagen wurden die Zellen geerntet und der in HSV-1 Partikel verpackte Amplikon Vektor präpariert (siehe 3.3.3.). Die präparierten HSV-1 Amplikon Stocks wurden bei -80°C gelagert und ein Aliquot wurde auf VERO-Zellen titriert (siehe 3.3.8.).

4. Ergebnisse

4.1. Herstellung von ICP4 Kaninchen Antiseren

Die Detektion von Proteinen in Gewebepreparaten, Zellpreparaten oder Proteinextrakten erfolgt mit spezifischen Antikörpern. Fremde Proteine werden vom Organismus durch das Immunsystem aufgespürt und eliminiert. Das Immunsystem ist ein komplexes System, das den Organismus vor Schädigung von aussen schützt und auch Fehlfunktionen des Organismus selbst beseitigt. Eine wichtige Aufgabe übernehmen hierbei die sog. Antikörper, die von bestimmten Zellen des Immunsystems als Reaktion auf Fremdeinwirkungen oder Fehlfunktionen des Organismus gebildet werden. Man unterscheidet verschiedene Typen von Antikörpern, die das Fremdprotein (in der Fachsprache als Antigen bezeichnet) erkennen und in Zusammenarbeit mit weiteren Zellen des Immunsystems das Antigen beseitigen. Der Antikörper wird vom Immunsystem gebildet und gelangt über den Blutkreislauf an die Stelle im Körper, an dem sich das Antigen befindet. Mit einer spezifischen Erkennungssequenz (dem Epitop) bindet der Antikörper an das Antigen und bildet den Antigen-Antikörper-Komplex. Makrophagen erkennen wiederum den Antigen-Antikörper-Komplex und zerlegen den Antigen-Antikörper-Komplex nach Phagozytose in die einzelnen Aminosäuren. Auf diesem Weg werden Schädigungen, die durch das Fremdprotein im Organismus verursacht werden begrenzt bzw. vorgebeugt. Die Eigenschaften der Antikörper ein bestimmtes Protein in einer Vielzahl von verschiedenen Proteinen spezifisch zu erkennen, machte man sich in der Medizin und Forschung zu nutze. Durch die Entwicklung von Verfahren zu Herstellung spezifischer Antikörpern wurde die Forschung und die Medizin revolutioniert. Man unterscheidet zwei Verfahren bei der Herstellung von Antikörpern. 1. Die Herstellung sog. monoklonaler Antikörper, die zur Produktion eines einzigen spezifischen Antikörpers führt. Diese Methode ist sehr aufwendig und erfordert mehrere Reinigungsschritte. 2. Die Herstellung sog. polyklonaler Antikörper, die in einem Organismus (Kaninchen, Maus und Ziege usw.) produziert werden. Hierbei wird den Tieren das Antigen injiziert, man spricht hierbei von Immunisierung der Tiere. Durch die Aufnahme des Antigens in den Körper des Tieres wird die Produktion spezifischer Antikörper gegen das Antigen im Immunsystem stimuliert.

4.1.1. Amplifikation verschiedener *IE3* DNA Sequenzabschnitte mittels PCR und Klonierung in pET32 Expressionsvektor

Die Immunisierung der Tiere wird durch die Injektion des jeweiligen Antigens durchgeführt und der letztlich hergestellte Antikörper erkennt das Antigen aufgrund einer spezifischen Erkennungsstelle (dem Epitop). Gegen welche Region der Antikörper im Antigen gerichtet ist kann nur experimentell bestimmt werden, da eine Vielzahl von Epitopen denkbar ist. Für die Durchführung von Westernblot-Analysen werden die Proteine in der Regel im SDS-Gel denaturiert und die Tertiärstruktur der Proteine zerstört. Hierdurch können die Bindungseigenschaften des Antikörpers, abhängig vom jeweiligem Epitop des Antikörpers, sehr stark verändert werden und die Ausbildung des Antigen-Antikörper-Komplexes ausbleiben. Um diesem Problem vorzubeugen, wurden verschiedene hydrophobe Polypeptidsequenzen aus dem ICP4 Protein synthetisiert und für die Immunisierung von Kaninchen verwendet. In hydrophilem Medium sind die nach aussen gerichteten hydrophoben Regionen des Proteins für den Antikörper besser zugänglich und somit die Ausbildung des Antigen-Antikörper-Komplexes begünstigt. Für die Herstellung der hydrophoben *IE3* Polypeptide wurden die dafür kodierenden *IE3* DNA Sequenzabschnitte mit spezifischen Primern mittels PCR amplifiziert. Insgesamt wurden drei *IE3* DNA Fragmente mit unterschiedlicher Grösse amplifiziert. Mit dem Primer 52- 5' GAT CGAATTCGGCGTCGGAGAACAAGCAGCGC 3' und Primer 53- 5' GATTC

TCGAGGGCGGGCGTTCGGCTGCGTCGTC 3' wurde ein 384 Basenpaar DNA Fragment amplifiziert, das für die Aminosäuren 2-130 von ICP4 kodiert. Mit dem Primer 54- 5' GATCGAATTCGCGGGGCCGCGAACGGGAGGCC 3' und Primer 55- 5' GATTCTCGAGGCGTTCGCGCCTCCTCCGCTC 3' wurde ein 639 Basenpaar DNA Fragment amplifiziert, das für die Aminosäuren 137-350 von ICP4 kodiert. Mit dem Primer 56- 5' GATCGAATTCGGCCAGCGCACCGGACGCCGCC 3' und dem Primer 57- 5' GATTCTCGAGCAGCAGCACGCCCTGTGCGCC 3' wurde ein 885 Basenpaar DNA Fragment amplifiziert, das für die Aminosäuren 705-1000 von ICP4 kodiert. Alle drei Primerpaare enthalten Restriktionsschnittstellen, die für die gerichtete Klonierung der *IE3* DNA Subfragmente in den pET32 Expressionsvektor dienen. Die "sense"-Primer enthalten eine EcoRI Schnittstelle und die "antisense"-Primer enthalten eine XhoI Schnittstelle. Die PCR wurde mit dem nativen Enzym Pfu DNA-Polymerase (3 Units, Stratagene), 2pmol Primer , 200µM dNTPs, 250ng Matrizen-DNA, 10% DMSO, 10% Glycerol, PCR-Puffer ohne MgCl₂ (Boehringer Mannheim) und 1.5mM MgCl₂ in 100µl Endvolumen durchgeführt. Im Thermoblock (Biometra) wurde die DNA zunächst bei 93°C für 3 Minuten denaturiert, in insgesamt 25 Zyklen wurde jeweils 30 Sekunden bei 93°C denaturiert, 30 Sekunden bei 55°C hybridisiert und 5 Minuten bei 75°C amplifiziert (Charyl et al., 1993). Die *IE3* DNA Subfragmente wurden mit dem PCR Reinigungskit der Firma Qiagen gereinigt, mit den Restriktionsenzymen EcoRI und XhoI verdaut und in einem 1%-igen Gel gereinigt und isoliert. Die so behandelten *IE3* Subfragmente wurden in den mit EcoRI und XhoI linearisierten pET32 Expressionsvektor (Novagen) kloniert. Mittels Rückspaltung und verschiedenen innerhalb der *IE3* Subfragmente schneidenden Restriktionsenzymen wurde die Integration der *IE3* Subfragmente in den pET32 Vektor nachgewiesen.

4.1.2. Das pET-System

Das pET-System ist ein sehr Komplexes Expressionssystem, das durch die Zusammenwirkung verschiedener genetischer Elemente im Expressionsvektor und in der Wirtszelle die induzierbare Genexpression ermöglicht. Im pET32 Expressionsvektor stehen die *IE3* Subfragment unter der Kontrolle des Bakteriophagen T7 Promoters. Die Plasmide können in Bakterienstämmen, die kein T7 RNA Polymerase Gen (λ DE3 lysogen) tragen amplifiziert werden und in Bakterienstämmen, die das T7 RNA Polymerase Gen tragen kann die Expression des inserierten Gens induziert werden. Dies ist besonders für die Expression zytotoxischer Genprodukte von Bedeutung. In der Wirtszelle steht das T7 RNA Polymerase Gen unter der Kontrolle des *T7lac* Promoters, der stromabwärts der 17 Basenpaare Promoter Region eine 25 Basenpaare *lac* Operator Sequenz enthält. Der vom Bakterienstamm oder dem pET32 Expressionsvektor konstitutiv exprimierte *lac* Repressor (*lacI* Gen) bindet an die *lac* Operator Sequenz und reprimiert somit die Expression der T7 RNA Polymerase. Die mit pLys bezeichneten Bakterienstämme besitzen ein Plasmid, das das Gen für T7 Lysozym exprimiert. T7 Lysozym ist ein natürlicher Inhibitor der T7 RNA Polymerase und reduziert dadurch die Transkription der im pET32 Expressionsvektor klonierten Gene im nicht-induziertem Zustand. Durch Zugabe von IPTG wird die Expression der Gene im pET-System induziert. IPTG bindet an den *lac* Repressor, wodurch dieser nicht mehr an die *lac* Operator Sequenzen des *T7lac* Promoters binden kann. Hierdurch wird die Repression der T7 RNA Polymerase Expression aufgehoben. Die T7 RNA Polymerase Konzentration steigt an, so dass eine vollständige Inhibition durch die geringere Menge T7 Lysozym nicht mehr erfolgen kann und die Expression des Gens wird induziert. Für den Nachweis, eine verstärkte Löslichkeit und die spätere Aufreinigung der Proteine oder Polypeptide enthält der pET32 Expressionsvektor sog. Peptid-Tags. Im pET32 Vektor werden die *IE3* Polypeptide in Fusion mit dem Thioredoxin Gen (Trx •Tag), His •Tag und S •Tag exprimiert.

4.1.3. Expression und Nachweis der *IE3* Polypeptide nach Transformation in BL21 (DE3) pLysS kompetente *E.coli*

Für die Expression der *IE3* DNA Subfragmente wurden die pET32-*IE3*Sub Konstrukte in den *E. coli* Stamm BL21 (DE3) pLysS transformiert. 10ml LB-Medium mit 100 μ g / ml Ampicillin, sowie 25 μ g / ml Kanamycin wurden mit einer Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und 235rpm auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden zwei 500 ml Kolben mit vorgewärmtem LB-Medium mit 100 μ g / ml Ampicillin, sowie 25 μ g / ml Kanamycin mit 5 ml der Vorkultur angeimpft. Die Kulturen wurden bei 37°C und 235rpm auf dem Schüttler inkubiert bis die OD₆₀₀ 0.7-0.9 betrug. Danach wurde für die Induktion der Genexpression IPTG mit einer Endkonzentration von 2mM zu einem der beiden Ansätze gegeben und die Kulturen für weitere 3-5 Std. bei 37°C und 235rpm auf dem Schüttler inkubiert. Dann wurden die Zellen geerntet und durch Resuspension in Probenpuffer totale Zellysate hergestellt. Ein Aliquot von 50 μ l wurde in einem 12%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Fusionsproteine (*IE3*Polypeptide+Thioredoxin Protein) wurden mittels Westernblot-Analyse mit einem monoklonalen Maus Anti-Thioredoxin Antikörper, einem sekundären Peroxidase gekoppelten Ziegen Anti-Maus Antikörper und dem Substrat Lumi Light nachgewiesen (siehe Abb. 4.1.4.). Als Kontrolle dienten nicht transformierte BL21 (DE3) pLysS Zellen, sowie mit pET32 Vektor transformierte BL21 (DE3) pLysS Zellen.

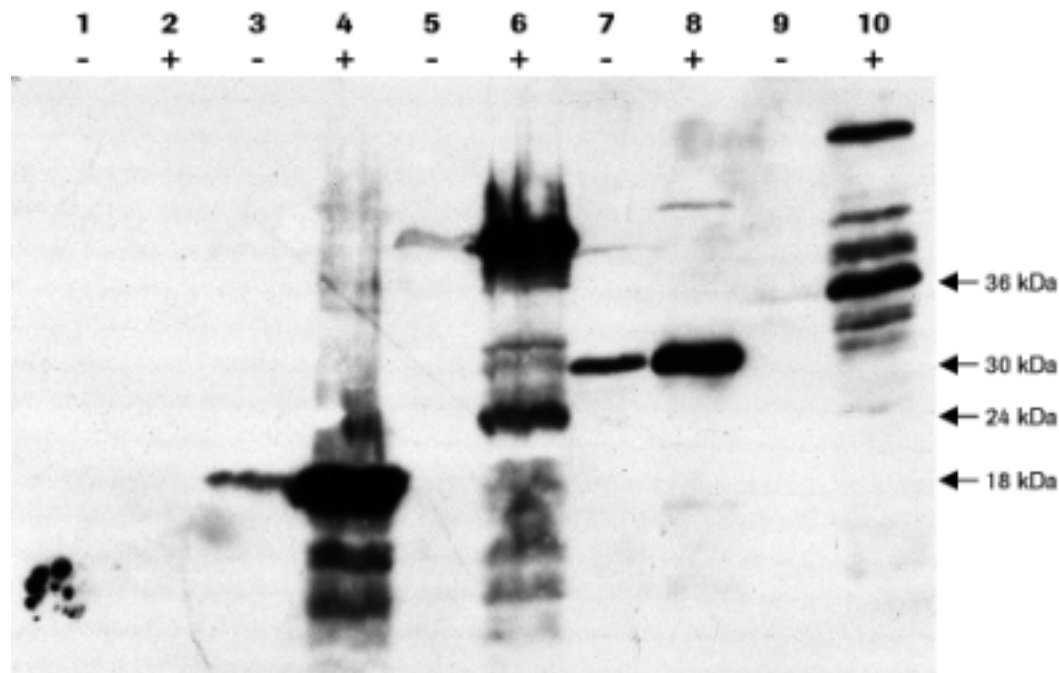


Abb.4.1.4. Nachweis der *IE3*Sub-Thioredoxin Fusionsprodukte nach IPTG induzierter Genexpression in BL21 (DE3) pLysS Zellen. (Spur 1) Nicht-transformierte BL21 (DE3) pLysS Zellen ohne IPTG. (Spur 2) Nicht transformierte BL21 (DE3) pLysS Zellen mit IPTG. (Spur 3) BL21 (DE3) pLysS Zellen transformiert mit pET32 Vektor ohne IPTG. (Spur 4) BL21 (DE3) pLysS Zellen transformiert mit pET32 Vektor mit IPTG. (Spur 5) BL21 (DE3) pLysS Zellen transformiert mit pET32-*IE3*/52-53 Vektor ohne IPTG. (Spur 6) BL21 (DE3) pLysS Zellen transformiert mit pET32-*IE3*/52-53 Vektor mit IPTG. (Spur 7) BL21 (DE3) pLysS Zellen transformiert mit pET32-*IE3*/54-55 Vektor ohne IPTG. (Spur 8) BL21 (DE3) pLysS Zellen transformiert mit pET32-*IE3*/54-55 Vektor mit IPTG. (Spur 9) BL21 (DE3) pLysS Zellen transformiert mit pET32-*IE3*/56-57 Vektor ohne IPTG. (Spur 10) BL21 (DE3) pLysS Zellen transformiert mit pET32-*IE3*/56-57 Vektor mit IPTG. Die Molekulargewichtmarker (kDa) sind rechts eingezeichnet (Gibco-BRL).

Die Westernblot-Analyse zeigt, dass alle drei *IE3* Polypeptide in Fusion mit Thioredoxin in den Zellen exprimiert werden (Spur 6,8 und 10). In den nicht transformierten Zellen fehlt das Thioredoxin Gen, so dass in diesen Lysaten kein Thioredoxin nachgewiesen werden konnte (Spur 1 und 2). Zellen die dagegen mit dem pET32 Vektor transformiert wurden exprimieren das Thioredoxin Gen, und das Thioredoxin Protein kann im Westernblot mit einer Grösse von 18kDa nachgewiesen werden (Spur 4). Auch in der nicht-induzierten Probe (Spur 3) lassen sich geringe Mengen an Thioredoxin detektieren. Die in Spur 3 nachgewiesene Thioredoxin Proteinbande weist daraufhin, dass das System nicht vollkommen dicht ist. Eine reduzierte Genexpression lässt sich auch in Spur 7 beobachten. Die Zusätzlichen Proteinbanden, die in dem Westernblot zum Vorschein kommen, deuten auf Proteinaggregationen und Proteinprozessierungen hin. In den folgenden Schritten werden die *IE3* Polypeptide von den restlichen bakteriellen Proteinen aufgereinigt und für die Immunisierung der Kaninchen vorbereitet.

4.1.4. Aufreinigung der *IE3* Polypeptide und Protein-Konzentrationsbestimmung

Zur Aufreinigung der *IE3*Sub-Thioredoxin Fusionsproteine wurden die einzelnen Zellysate in einem 12%-igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und das Gel zum sichtbar machen der Proteinbanden mit Coomassieblau angefärbt. Die drei *IE3*Sub-Thioredoxin Proteinbanden wurden mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten. Die Gelstücke mit den Fusionsproteinen wurden zerstückelt und mit der Elektroelutionsapparatur " Biotrap BT 1000 " (Schleicher & Schuell) aus dem Gel eluiert. Für die weitere spezifischere Aufreinigung der Proteine wurden die Eluate der drei Fusionsproteine auf eine Ni^{2+} -NTA (nitrilo-tri-acetic acid) Säule gegeben (Hochuli et al., 1987). Die Ni^{2+} -NTA-Agarose ist eine sehr visköse Flüssigkeit, die aus dem Chelatbildner NTA mit den gebundenen Ni^{2+} Ionen und der Agarose gebildet wird. Aufgrund des 6x His-Tags der *IE3*Sub-Thioredoxin Fusionsproteine binden die Proteine an die Ni^{2+} Ionen, die mit NTA als Chelatkomplex gebunden an die Agarose vorliegen (Hochuli et al., 1988). Die *IE3*Sub-Thioredoxin Fusionsproteine werden somit mit ihrem 6x His-Tag von der Säule zurückgehalten, während andere Proteine die Säule durchlaufen. Aufgrund der starken Bindungsaffinität ($K_d=10^{-13}$, pH8.0) des 6x His-Tags können mit stringenten Waschbedingungen andere Proteine (wie z.B. Zing-Finger Proteine), die an die Ni^{2+} -NTA Säule binden, leicht entfernt werden. Die Säulen wurden 10mal mit Puffer A (6M GuHCL, 0.1M Na-Phosphat, 0.01M Tris/HCl, pH 8.0), 5mal mit Puffer B (8M Harnstoff, 0.1M Na-Phosphat, 0.01M Tris / HCl, pH 8.0) und mehrere Male mit Puffer C (8M Harnstoff, 0.1M NA-Phosphat, 0.01M Tris/HCl, pH 6.3) gewaschen. Die an die Ni^{2+} -NTA gebundenen Proteine können auf zwei Arten von der Säule eluiert werden. Die eine Methode beruht auf unterschiedliche pH-Werte, d. h. mit zunehmend sauren pH-Werten (pH 5.9- pH 4.5) werden die Histidinreste protoniert und dissoziieren vom Ni^{2+} -NTA Komplex. Die andere Methode beruht auf Konkurrenz mit Imidazol, das an die Ni^{2+} -NTA Säule bindet und die gebundenen Proteine verdrängt. Mit einer zunehmenden Imidazol Konzentration im Waschpuffer werden die gebundenen Proteine von der Säule eluiert (Janknecht et al., 1991). Der Nachweis der eluierten *IE3*Sub-Thioredoxin Fusionsproteine erfolgt im SDS-Polyacrylamidgel durch Coomassieblau Färbung. Die Protein Konzentration der *IE3*Sub-Thioredoxin Proteine wurde durch Vergleich mit einer definierten Verdünnungsreihe von BSA Protein abgeschätzt. Die Konzentrationen der *IE3*Sub-Thioredoxin Proteine betragen 1 - 2mg/ml.

4.1.5. Immunisierung von Kaninchen mit den drei hergestellten *IE3* Thioredoxin Polypeptiden und Charakterisierung der Antiseren

Die einzelnen Polypeptid Proben wurden für die Immunisierung von Kaninchen an die Firma Eurogentec gesendet. Einige Monate nach der Immunisierung wurde den Kaninchen Blut entnommen und das daraus gewonnene Antiserum im Westernblot getestet. Nach 6-8 Monaten wurden die Tiere getötet und das gesamte Serum aus dem Blut geerntet. Die Seren sollten einen hohen Antikörpertiter gegen das jeweilige *IE3* Polypeptid enthalten. Verschiedene Verdünnungstufen der Antiseren wurden in der Westernblot-Analyse getestet (siehe Abb.4.1.6).

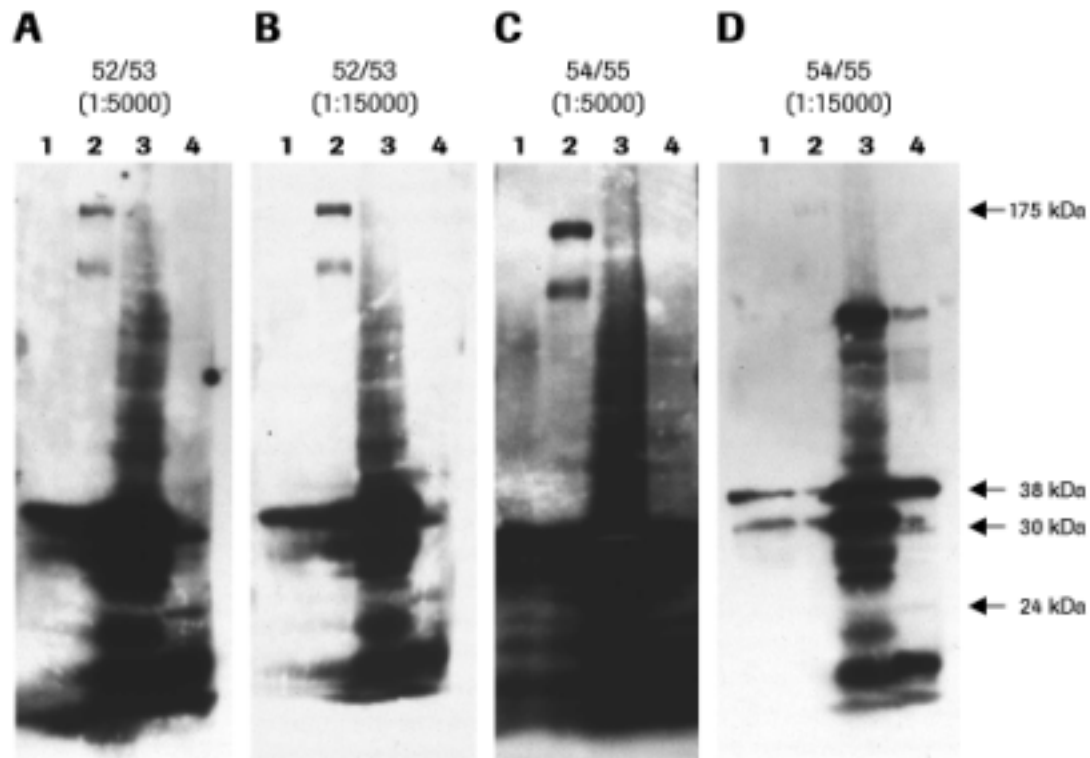


Abb.4.1.6. Charakterisierung der polyklonalen *IE3* Polypeptid Kaninchen Antiseren im Westernblot. A. *IE3*-52/53 Kaninchen Antiserum 1:5000 und B. 1:15000 verdünnt. C. *IE3*-54/55 Kaninchen Antiserum 1:5000 und D. 1:15000 verdünnt. (**Spur 1**) Totale Zellysate von VERO-Zellen. (**Spur 2**) Totale Zellysate von E5-Zellen 5 Std. nach Infektion mit HSV-1 *d120* (MOI=1). (**Spur 3**) Aufgereinigtes *IE3*-52/53 Polypeptid. (**Spur 4**) Aufgereinigtes *IE3*-54/55 Polypeptid.

Die Westernblot-Analyse zeigt, dass beide *IE3* Kaninchen Antiseren das ICP4 Protein in HSV-1 *d120* infizierten E5 Zellysaten erkennen (Spur 2 in A,B,C und D). Das mit Polypeptid *IE3*-52/53 hergestellte Antiserum reagierte jedoch mit Proteinen aus dem aufgereinigtem *IE3*-54/55 Polypeptid (Spur 4 in A und B) und umgekehrt, das mit Polypeptid *IE3*-54/55 hergestellte Antiserum mit Proteinen aus dem aufgereinigtem *IE3*-52/53 Polypeptid (Spur 3 in C und D). Diese Eigenschaft der Antiseren könnte durch Thioredoxin Antikörper oder andere Antikörper in den Antiseren hervorgerufen werden. Der Nachweis einer eindeutigen *IE3* Polypeptidbande ist aufgrund der starken Kreuzreaktionen in den aufgereinigten *IE3* Polypeptid Proben nicht möglich. Auch in der negativen Kontrolle (Spur 1) treten Kreuzreaktionen der Antiseren mit kleineren Proteinen der Zellysate auf.

4.2. Tetrazyklin induzierte *IE3* Genexpression.

4.2.1. Genregulation

In den verschiedensten Anwendungen der Gentechnologie und molekularen Medizin spielt die gezielte Regulation von Genen eine bedeutende Rolle. Knock-out Experimente an Mäusen haben deutlich gemacht, dass eine ausreichende Studie der Gene nicht nur nach dem "Alles oder Nichts-Prinzip" durchzuführen sind. Das Ausschalten (Knock-out) eines Gens kann den Tod eines Embryos bereits in einer sehr frühen Entwicklungsphase verursachen. Weiterreichende Studien über die Relevanz derartiger Gene, im Hinblick auf ein späteres Entwicklungsstadium oder im ausgewachsenen Tier, sind dieser Methode nicht mehr zugänglich. Bei der exogenen Genexpression handelt es sich um den umgekehrten Fall, hierbei wird das Gen von aussen in die Zellen eines Organs eingeführt. Ist das Gen für die Zelle oder den Organismus toxisch oder kann nur bis zu einem gewissen Grad toleriert werden, so hat die konstitutive Expression des Gens auch hier das Absterben der Zelle oder des Organismus zur Folge. Ebenso wichtig ist gerichtete Genregulation bei der klinischen Anwendung, wie z.B. in der Gentherapie, wo die Expression des therapeutischen Gens genauestens auf den Bedarf des Patienten abgestimmt sein muss. Diese Erkenntnisse führten zur Entwicklung verschiedener Genregulationstechniken, die eine umfassendere Analyse der Gene ermöglichen sollten. Ein ideales System sollte die folgenden Anforderungen erfüllen:

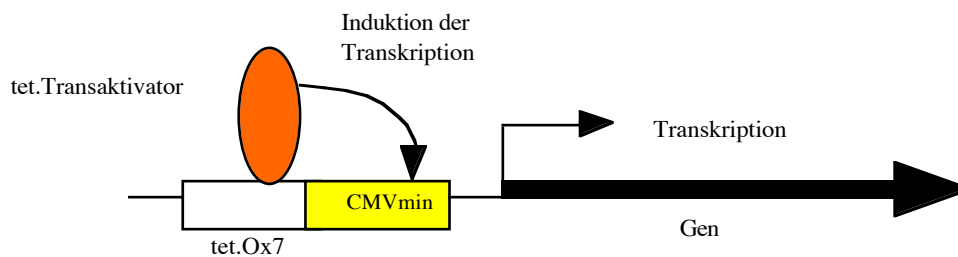
1. Spezifität - Die Komponenten des Systems sollten sich deutlich von den endogenen Faktoren unterscheiden und ausschliesslich durch einen exogenen, nicht-toxischen Wirkstoff aktiviert werden.
2. Interferenz- Die Komponenten des Systems sollten nicht mit den zellulären Stoffwechselwegen interagieren.
3. Induzierbarkeit - Im nicht-induzierten Zustand sollte die basale Expression des therapeutischen Gens minimal sein, während es im aktiven Zustand zu einer schnellen und starken Induktion der Genexpression kommen sollte.
4. Applikation des Wirkstoffes - Das Effektormolekül sollte schnell für alle Gewebe zugänglich sein, sowie die Plazenta und die Blut-Hirn-Schranke passieren können.
5. Reversibilität - Das Effektormolekül sollte schnell aus allen Geweben ausgewaschen werden können, um das System ebenso schnell wieder in den inaktiven Zustand versetzen zu können.
6. Dosis-Abhängigkeit - Die Reaktion des Systems sollte proportional zu der Konzentration des Effektormoleküls sein, so dass eine Feinregulation des Systems möglich ist.

Zu den neueren Genregulationssystemen, die die oben aufgeführten Kriterien mehr oder weniger gut erfüllen, zählen das Tet.-System (Gatz et al., 1988; Gatz et al., 1991; und Gossen & Bujard, 1992), das Ecdyson-System (No et al., 1996) und das Glucocorticoid-System (Mangelsdorf et al., 1995).

4.2.2. Das Tet.off-System

Gossen und Bujard (1992) haben in HeLa-Zellen gezeigt, dass das Tet.-off System abhängig von der Konzentration (0-1 μ g) des Antibiotikums Tetrazyklin eine Regulation der Luciferase Aktivität über mehrere Grössenordnungen ermöglicht. Darüberhinaus bietet das System einen reversiblen An-/Aus-Zustand für verschiedene Gene in Säugerzellen. Das Tet.-off System basiert auf dem regulatorischen DNA-Element aus dem Tetrazyklin Resistenz Operon des bakteriellen Transposon Tn10 (Hillen & Wissmann, 1989). Die Transkription der Tetrazyklin Resistenzgene wird hierbei über den sog. Tetrazyklin Repressor (tet.R) negativ reguliert. In Gegenwart von Tetrazyklin bindet der Tetrazyklin Repressor nicht an den Operator innerhalb der Promotorregion, wodurch die Transkription der Tetrazyklin Resistenzgene abläuft (Takahashi et al., 1986). In der Abwesenheit von Tetrazyklin bindet der Tetrazyklin Repressor an die Operator Sequenzen und reprimiert somit die Expression der Tetrazyklin Resistenzgene. Die zweite Komponente des Tet.-off Systems ist ein Fusionsprotein, das aus dem Tetrazyklin Repressor (tet.R) und der C-terminalen Domäne von VP16 von HSV-1 besteht. VP16 ist essentiell für die Transkription der HSV-1 Immediate Early-Gene (IE) Gene (Triezenberg et al., 1988). Das aus dem tet.R und der C-terminalen Domäne von VP16 bestehende Fusionsprotein bildet den sog. Tetrazyklin Transaktivator (tet.TA). Wird eine multimerere Tetrazyklin Operator Sequenz (tet. O) vor einen minimalen Promotor geschaltet, so kann dieser über den Tetrazyklin Transaktivator (tet.TA) stimuliert werden. In der Abwesenheit von Tetrazyklin aktiviert der tet. Transaktivator die Genexpression durch das Binden an die multimeren tet. Operator Sequenzen (Abb. 4.2.2. A). In der Gegenwart von Tetrazyklin verändert sich die Konformation des tet. Transaktivators, wodurch die Bindung an die tet. O Sequenzen verhindert wird und die Genexpression ausbleibt (Abb.4.2.2. B). Bereits bei geringen Tetrazyklin Konzentrationen zeigt sich keine offensichtliche Promotoraktivität (Gossen & Bujard, 1992). Das Tetrazyklin Expressionssystem ermöglicht somit die gezielte Kontrolle der Genexpression (Gossen & Bujard, 1992 und Gossen et al., 1995). Das System wurde in retroviralen Vektoren (Paulus et al., 1996; Hofmann et al., 1996; Hwang et al., 1996), in rekombinanten Herpes Simplex Viren (Ho et al., 1996) und in HSV-1 Amplikon Vektoren (Fotaki et al., 1997; Heister, diese Arbeit Abschnitt 4.6.) erfolgreich angewendet. Auch Transgene Tiere mit Reportergenen unter der Kontrolle des Tetrazyklin Expressionssystems wurden hergestellt. Sie zeigten ein regulierbares Expressionsmuster in verschiedenen Geweben, einschliesslich des Gehirns (Shockett et al., 1995; Schultze et al., 1996). Dies bestätigte auch, dass Tetrazyklin die Blut-Hirn Schranke passiert (Corti et al., 1996). Die einfache, reversible und schnelle Regulierbarkeit mittels des Tetrazyklin Expressionssystems sollte in dieser Arbeit für die Herstellung einer induzierbaren *IE3* VERO-Zelllinie genutzt werden.

A. In Abwesenheit von Tetrazyklin



B. In Anwesenheit von Tetrazyklin

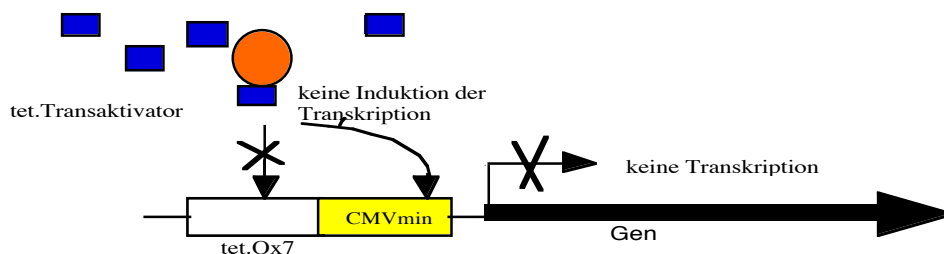


Abb. 4.2.2. Das Tet.-off System. (A) In der Abwesenheit von Tetrazyklin bindet der tet. Transaktivator an die tet.Ox7 Sequenzen und induziert hierdurch die Transkription des Gens über den CMV minimal Promotor. (B) In der Anwesenheit von Tetrazyklin bindet Tetrazyklin an den tet. Transaktivator, wodurch dieser seine Konformation verändert. Hierdurch wird die Bindung an die tet.Ox7 Sequenzen verhindert und Induktion der Transkription bleibt aus.

4.2. 3. PCR-Amplifikation, Klonierung und Sequenzierung der kodierenden IE3 Gensequenz

Das IE-3 Gen liegt auf dem HSV-1 Genom in zwei Kopien vor. Der hohe GC-Gehalt von > 80% erschwert deutlich die Bestimmung der Basensequenz, sowie die Amplifikation mittels PCR (Murchie & McGeoch, 1982; McGeoch et al., 1986). Definiert anhand der 5' und 3' Enden der transkribierten mRNA besteht das IE-3 Gen aus 4259 Basenpaaren. Die für Aminosäuren kodierende Sequenz umfasst 3897 Basen (Bzik & Preston, 1986). Für die Klonierung des IE-3 Gens in einen Expressionsvektor musste der kodierende Sequenzbereich des IE-3 Gens zunächst mittels PCR amplifiziert werden. Als Matrize hierzu diente das Plasmid p175 (Dr. F.Lim), welches das IE-3 Gen auf einem genomischen DNA Fragment von 5900bp aus HSV-1 enthält. Die Amplifikation des kodierenden Abschnitts erfolgte mit einem 5' (P48-5'GATCGTTTAAA CGCCGCCACCATGGCGTCGGAGAACAAGCA 3') und 3' (P51-5'GATCGTTTAAA CTTACAGCACCCCGTCCCCCT 3') Primer. Beide Primer enthalten jeweils eine PmeI Restriktionsschnittstelle. Primer P48 enthält zusätzlich eine Kozak-Sequenz (Kozak, 1983) für effiziente Initiation der Translation. Die PCR wurde mit der nativen Pfu DNA-Polymerase (3 Units)(Stratagene), 2pmol

Primer P48/P51, 200µM dNTPs, 250ng Matrizen-DNA, 10% DMSO, 10% Glycerol, PCR-Puffer ohne MgCl₂ (Boehringer Mannheim) und 1.5mM MgCl₂ in 100µl Endvolumen durchgeführt. Im Thermoblock wurde die DNA zunächst bei 93°C für 3 Minuten denaturiert, in insgesamt 28 Zyklen wurde jeweils 60 Sekunden bei 93°C denaturiert, 60 Sekunden bei 45°C hybridisiert und 5 Minuten bei 58°C amplifiziert (Charyl et al., 1993). Die amplifizierte IE-3 DNA wurde für die folgenden Subklonierungen und Sequenzierung in den pCR2.1 Klonierungsvektor (Invitrogene) über die Adenosinüberhänge, nach Taq- DNA-Polymerase Behandlung, einkloniert, wodurch pCR2.1-IE3 gebildet wurde. Die Sequenzierung erwies sich gemäss den Erwartungen als äusserst schwierig, so dass mehrere Primer getestet werden mussten. Die für die Sequenzierung verwendeten Primer sind im Anhang aufgelistet. Zur Kontrolle wurde das IE3 Gen des Ausgangsplasmids p175 mit den gleichen Primern sequenziert. Die beiden Sequenzen stimmen überein. Ein Vergleich mit einer IE3 Gensequenz aus der EMBL Sequenz-Datenbank zeigt jedoch drei bzw. vier Basenaustausche an den Positionen 1895, 3400-3401 und 3952. Die erste Substitution betrifft Nukleotid 1895 und ist eine Transversion von G zu A. Die zweite Mutation ist eine doppelte Transition der Nukleotide 3400 und 3401 von GC zu CG. Die dritte Substitution ist wiederum eine Transition bei Nukleotid 3952 von G zu T. Alle genannten Substitutionen in der IE3 kodierenden Sequenz führen zu einem Austausch der Aminosäuren. Die Substitution von Nukleotid 1895 führt zum Austausch von Arginin gegen Lysin, die Substitution der Nukleotide 3400 und 3401 führt zum Austausch von Alanin gegen Arginin und die Substitution von Nukleotid 3952 führt zum Austausch von Glycin gegen Tryptophan. Wie die funktionellen Experimente mit dem klonierten IE3 Gen gezeigt haben, konnten keine Veränderungen in der Funktionalität des Genprodukts ICP4 beobachtet werden.

4.2.4. Tet.-Kombi-Konstrukte

Das herkömmliche Tetrazyklin Expressionssystem basiert auf zwei unabhängigen Vektoren, wobei ein Vektor den tet. Transaktivator und ein zweiter Vektor das sog. Target Gen trägt (Gossen & Bujard, 1992). Die Herstellung stabiler Systeme erfordert deshalb die aufeinanderfolgende Transfektion von tet.TA Plasmid und Target Gen Plasmid, sowie mehrere zeitaufwendige Selektionsschritte. Mit der Konstruktion der Kombi-Konstrukte, die sowohl den tet.TA als auch das Target Gen auf einem Plasmid kombiniert enthalten, konnte dieser Prozess vereinfacht werden (Schultz et al., 1996). Ein weiterer Vorteil bei der Verwendung der Kombi-Konstrukte liegt in der gleichen Kopienzahl von tet.TA Gen und Target Gen, denn hierdurch wird die Induzierbarkeit deutlich gesteigert.

4.2.4.1. Konstruktion von pCtet.-Combi-IE3

Um die Expression des HSV-1 IE 3 Gens unter die Kontrolle des Tetrazyklin Expressionssystems zu stellen, wurde das IE3 Gen in den pUC-Combi-CMV Expressionsvektor (von Uli Certa) einkloniert. Hierzu wurde die kodierende Sequenz des IE3 Gens mit dem Restriktionsenzym *PmeI* aus dem Klonierungsvektor pCR2.1-IE3 (Invitrogen) herausgeschnitten und in die singuläre *PmeI* Schnittstelle von pUC-Combi-CMV direkt vor den tet.Ox7 CMV minimal Promotor einkloniert. Da es sich dabei um eine ungerichtete Klonierung handelte, wurde die Orientierung des IE3 Gens in pUC-Combi-CMV mit verschiedenen Restriktionsverdau bestimmt. Es wurden Restriktionsenzyme gewählt, die das IE3 Gen nur einmal entweder am 5'-Ende; am 3'-Ende oder in der Mitte schneiden und den Expressionsvektor ebenfalls nur einmal schneiden. Hierdurch entstehen schliesslich zwei DNA-Fragment unterschiedlicher Grösse. Aufgrund der bekannten Positionen der jeweiligen Restriktionsschnittstellen im IE3 Gen bzw. im pUC-Combi-CMV, konnte somit die Orientierung des IE3 Gens in pCtet.-Combi-IE3 anhand der gebildeten DNA Fragmente nach Agarosegelelektrophorese ermittelt werden.

4.2.4.2. Konstruktion von pNtet.-Combi-IE3

Die Herstellung von pNtet.-Combi-IE3 erforderte einen weiteren Klonierungsschritt, da hier zunächst pUC-Combi-NSE konstruiert werden musste. Für die Konstruktion von pUC-Combi-NSE wurde das 1597bp blunt gemachte *SacI* / *PvuII* DNA-Fragment aus dem Plasmid pUHD 10-3 (Gossen & Bujard, 1992) in die singuläre, blunt gemachte *HindIII* Schnittstelle von pUDP1 (von Uli Deutsche) einkloniert. Das Plasmid pUDP1 enthält den Tetrazyklin-Transaktivator unter der Kontrolle des NSE-Promotors (Neuronen spezifischer Enolase Promotor). Das *SacIII* / *PvuII* DNA-Fragment aus dem Plasmid pUHD 10-3 enthält den tet.Ox7-CMV minimal-Promoter mit einer davorliegenden multiplen-Klonierungsstelle und einen darauffolgenden SV40 Polyadenylierungssignal. Das *IE3* Gen wurde mit dem Restriktionsenzym *PmeI* aus pCR2.1-*IE3* isoliert und in die blunt gemachte *SacII* Schnittstelle der multiplen Klonierungsstelle von pUC-Combi-NSE einkloniert. Die Orientierung des *IE3* Gens wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen und anschliessender Agarosegelelektrophorese bestimmt.

4.2.5. Nachweis der *IE3* Genexpression nach transienter Transfektion von pCtet.Combi-IE3 bzw. pNtet.Combi-IE3 in CHO-Zellen

Um die Expression des *IE3* Gens beider Kombi-Konstrukte nachweisen zu können, wurden 1×10^6 CHO-Zellen mit je $2 \mu\text{g}$ pCtet.-Combi-*IE3* bzw. pNtet.-Combi-*IE3* Plasmid DNA transient transfiziert. 32 Stunden nach der Transfektion wurden totale Zellextrakte der Zellen hergestellt und in einem 8%-igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Als positive Kontrolle wurden E5-Zellen mit HSV-1 *dI20* infiziert und 8 Stunden später totale Zellextrakte der infizierten Zellen hergestellt. Als negative Kontrollen wurden totale Zellextrakte von nicht-infizierten E5-Zellen, nicht-transfizierten CHO-Zellen und VERO-Zellen verwendet. Da mit diesem Experiment lediglich die Expression des *IE3* Gens bzw. die Synthese des *IE3* Genproduktes ICP4 nachgewiesen werden sollte, wurde kein Tetrazyklin in das Medium gegeben. In der Abwesenheit von Tetrazyklin bindet der tet.TA an die tet.Ox7 Sequenzen, wodurch die Expression des *IE3* Gens über den CMV minimal Promotor bzw. den NSE Promotor induziert wird. Der Nachweis von ICP4 Protein erfolgte auf einer Nitrocellulose Membran mit einem monoklonalen Maus Anti-ICP4 Antikörper (ABI).

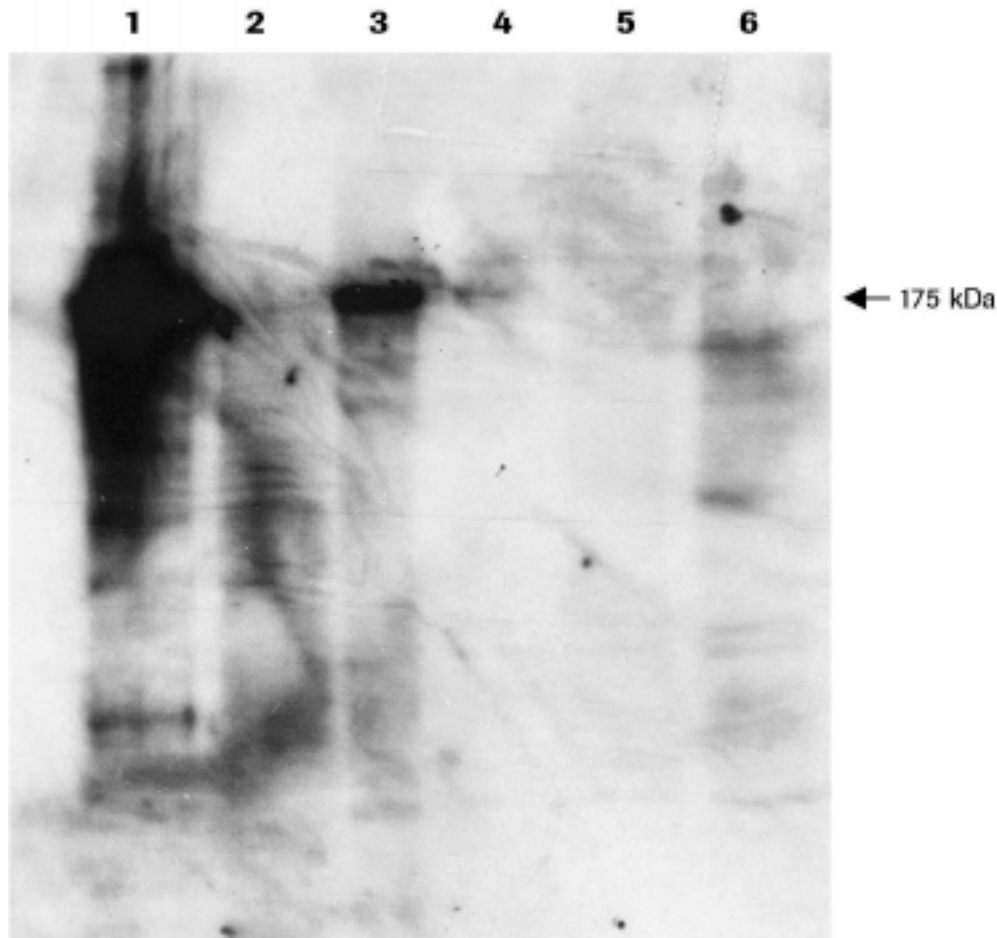


Abb. 4.2.5. Nachweis von ICP4 Protein nach Transfektion von pCtet.-Combi-IE3 bzw. pNtet.-Combi-IE3 in CHO-Zellen mittels Westernblot-Analyse. 1×10^6 CHO-Zellen wurden mit $2 \mu\text{g}$ pCtet.-Combi-IE3 Plasmid DNA (**Spur 3**) bzw. $2 \mu\text{g}$ pNtet.-Combi-IE3 Plasmid DNA transfiziert (**Spur 4**). 32 Stunden nach der Transfektion wurden totale Zellextrakte der transfizierten Zellen hergestellt und gleiche Mengen in einem 8%-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Als positive Kontrolle wurden 8 Stunden nach der Infektion totale Zellextrakte von HSV-1 *d120* infizierten E5-Zellen verwendet (**Spur 1**). Als negative Kontrollen dienten unbehandelte E5-Zellen (**Spur 2**), CHO-Zellen (**Spur 5**) und VERO-Zellen (**Spur 6**). Die 175 kDa Marker-Bande ist eingezeichnet (Prestained Molekulargewichtsmarker, Gibco BRL).

Die Westernblot-Analyse zeigt, dass das *IE3* Gen in beiden Konstrukten nach Transfektion in CHO-Zellen exprimiert wird (Spur 3 u. 4). Durch die Infektion mit HSV-1 *d120* wird in den E5-Zellen die Expression des stabil integrierten *IE3* Gens über den eigenen viralen Promotor stark stimuliert, so dass bereits 8 Stunden nach Infektion grosse Mengen an ICP4 Protein in den Zellen vorliegt (Spur 1). Die mit dem monoklonalen Maus Anti-ICP4 Antikörper detektierte Proteinbande läuft im 8%-igen Polyacrylamidgel auf der Höhe von 175kDa. Diese Grösse entspricht dem ICP4 Protein nach posttranslationaler Modifikation. In unbehandelten CHO-Zellen und VERO-Zellen lässt sich die ICP4 Proteinbande nicht nachweisen (Spur 5 u. 6). Die nicht-infizierten E5-Zellen zeigen dagegen eine sehr schwache Bande in Höhe der 175kDa Markerbande (Spur 2). Die unterschiedlichen ICP4 Proteinmengen der beiden Kombi-Konstrukte lässt vermuten, dass der NSE Promotor im Vergleich zu dem CMV Promotor in CHO-Zellen eine geringere Aktivität hat. Denn die Stärke der Induktion der *IE3* Genexpression ist proportional der Konzentration von tet. TA, über den die *IE3* Genexpression in den Kombi-Konstrukten in Abwesenheit von Tetracyclin induziert wird.

4.2.6. Regulierbarkeit der *IE3* Genexpression über den Effektor Tetrazyklin

Um die Regulierbarkeit der *IE3* Genexpression in den Kombi-Konstrukten untersuchen zu können, wurden VERO-Zellen vor und nach der Transfektion mit pCtet.-Combi-*IE3* bzw. pNtet.-Combi-*IE3* in Medium mit 1µg/ml Tetrazyklin, sowie in Medium ohne Tetrazyklin inkubiert. 48 Std. nach Transfektion wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert und nach kurzer Behandlung mit 0.1% TritonX-100 in PBS eine immunzyto-chemische Färbung zum Nachweis des ICP4 Proteins in den Zellen durchgeführt. Der Nachweis des ICP4 Proteins erfolgte mit einem monoklonalen Maus Anti-ICP4 Antikörper, einem biotinylierten Ziegen Anti-Maus Antikörper und einem Biotin/Avidin-Peroxidase gekoppelten Komplex. Durch Zugabe von 3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB), wird das DAB Substrat von der Peroxidase zu einem braunen Niederschlag in den Zellen umgewandelt. Diese Reaktion ist jedoch nur in den Zellen möglich, in denen das ICP4 Protein vorliegt und vom ICP4 Antikörper detektiert wird. Als positive Kontrolle dienten VERO-Zellen, die mit HSV-1 *5dl1.2* infiziert wurden und als negative Kontrolle dienten unbehandelte VERO-Zellen. HSV-1 *5dl1.2* ist eine IE2 (ICP27) Deletionsmutante von Wildtyp (wt) HSV-1, die beide Kopien des *IE3* Gens trägt und in den ersten Stunden nach Infektion das *IE3* Gen in den Zellen exprimiert.

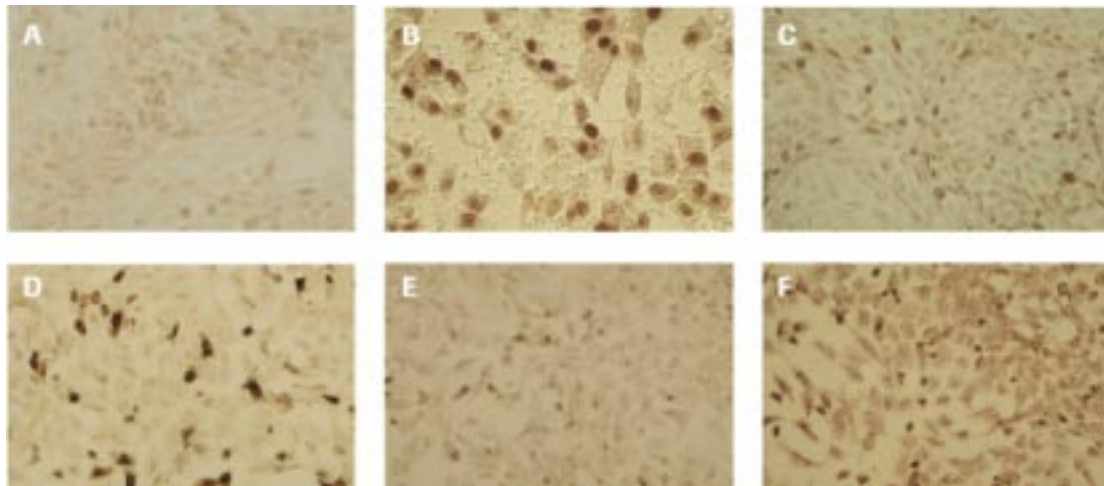


Abb. 4.2.6. Regulierbarkeit der *IE3* Genexpression in den Kombi-Konstrukten über den Effektor Tetrazyklin. (A) VERO-Zellen ohne *IE3* Expression. (B) HSV-1 *5dl1.2* infizierte VERO-Zellen (C) VERO-Zellen 48 Std. nach Transfektion mit pCtet.-Combi-*IE3* in Anwesenheit von Tetrazyklin im Medium (1µg/ml). (D) VERO-Zellen 48 Std. nach Transfektion mit pCtet.-Combi-*IE3* ohne Tetrazyklin im Medium. (E) VERO-Zellen 48 Std. nach Transfektion mit pNtet.-Combi-*IE3* in Anwesenheit von Tetrazyklin im Medium (1µg/ml). (F) VERO-Zellen 48 Std. nach Transfektion mit pCtet.-Combi-*IE3* ohne Tetrazyklin im Medium.

Die in Abb. 4.2.6. gezeigte immunzytochemische Färbung zeigt, dass das ICP4 Protein sowohl nach Infektion mit HSV-1 *5dl1.2* (B), als auch nach Transfektion von pCtet-Combi-*IE3* (D) und pNtet.-Combi-*IE3* (F) in Abwesenheit von Tetrazyklin in den Kernen der Zellen vorliegt. Die Zugabe von Tetrazyklin (1µg / ml) zu den mit den Kombi-Konstrukten transfizierten Zellen (C u. E) zeigt eine deutlich schwächere Braunfärbung der Zellkerne. Die schwächere Braunfärbung der Zellkerne bedeutet eine geringere Menge von ICP4 Protein in diesen Zellen. Induzierter (ohne Tetrazyklin) und nicht-induzierter Zustand der *IE3* Genexpression unterscheiden sich in diesem Experiment schätzungsweise um den Faktor 10. Dieser Faktor ist relativ gering und für die Herstellung von stabilen Zellen, welche Gene enthalten die für toxische Proteine kodieren, nicht ausreichend. Da es sich jedoch um eine transiente Transfektion handelt, muss man davon ausgehen, dass sich das System in einer stabilen Zelle anders verhält.

Die hier deutlich nachgewiesene basale Expression des *IE3* Gens könnte in einem stabilen System vermutlich ganz verhindert werden, so dass das System in diesem Zusammenhang die Voraussetzungen für die induzierbare Synthese von toxischen Proteinen erfüllt.

4.2.7. Komplementation von HSV-1 *d120* bei induzierter und nicht-induzierter *IE3* Genexpression

Die für *IE3* induzierbare Zelllinie sollte im nicht-induzierten Zustand keine Replikation einer HSV-1 *IE3* Deletionsmutante ermöglichen und im induzierten Zustand dagegen eine normale Replikation der gleichen Mutante erlauben. HSV-1 *d120* ist eine Deletionsmutante, der beide *IE3* Genkopien fehlen. Zelllinien, die das *IE3* Gen stabil in ihrem Genom integriert haben und nach Infektion mit HSV-1 exprimieren, komplementieren den Defekt in HSV-1 *d120*. Die E5-Zelllinie hat das *IE3* Gen unter der Kontrolle des natürlichen, viralen *IE3* Promotors stabil im Genom integriert. E5-Zellen exprimieren das *IE3* Gen erst nach Infektion mit HSV-1, da für die Stimulation des natürlichen, viralen *IE3* Promotors weitere virale Proteine wie z. B. VP16 und andere IE Genprodukte notwendig sind. In Abwesenheit dieser viralen Proteine ist der Promotor inaktiv, so dass kein ICP4 Protein in E5-Zellen nachgewiesen werden kann. Biologische Systeme basieren in der Regel auf Gleichgewichtsreaktionen, d. h. kleinste Störungen bestimmter Gleichgewichte im biologischen System können zu gravierenden Veränderungen im Verhalten führen. Wird die natürlich vorliegende Menge eines Proteins z. B. auf das 10fache reduziert, so können dadurch ganze Prozess zum Erliegen kommen. Um den Einfluss der verminderten *IE3* Genexpression auf die Virusreplikation untersuchen zu können, wurden VERO-Zellen in An- oder Abwesenheit von Tetrazyklin zunächst mit pCtet.-Combi-*IE3* bzw. pNtet.-Combi-*IE3* transfiziert. 1 Tag nach Transfektion wurden die Zellen mit HSV-1 *d120* (MOI=2) infiziert und für 2 weitere Tage mit bzw. ohne Tetrazyklin inkubiert. Als negative Kontrolle wurden VERO-Zellen mit HSV-1 *d120* (MOI=2) infiziert und in An- und Abwesenheit von Tetrazyklin 2 Tage inkubiert. Als positive Kontrolle wurden VERO-Zellen mit pcDNA3-*IE3* transfiziert, mit HSV-1 *d120* (MOI=2) infiziert und ebenfalls in An- bzw. Abwesenheit von Tetrazyklin 2 Tage inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden Zellen und Medium geerntet und das Virus aus den Überständen präpariert. Für den Nachweis der Replikation von HSV-1 *d120*, bei induzierter und nicht-induzierter *IE3* Genexpression, wurden die einzelnen Überstände auf E5-Zellen titiert. Das in der Tabelle 4.2.7. zusammengefasste Ergebnis der Titration zeigt, dass alle Konstrukte nach Transfektion in VERO-Zellen das *IE3* Gen exprimieren und den Defekt der konditionalen Lethalmutante HSV-1 *d120* komplementieren. VERO-Zellen, die kein *IE3* Gen besitzen, können den Defekt nicht komplementieren und ein Wachstum von HSV-1 *d120* ist nicht möglich. Die *IE3* Genexpression von pcDNA3-*IE3* ist unabhängig von Tetrazyklin, da der starke CMV-Promotor/Enhancer für die Transkription des *IE3* Gens keinen tet. Transaktivator benötigt. Der Promotor ist nach Transfektion in eukaryontischen Zellen konstitutiv aktiv und bewirkt dadurch die permanente Synthese von ICP4 Protein. Die in An- und Abwesenheit von Tetrazyklin erhaltenen Virustiter lassen keinen Einfluss von Tetrazyklin auf die *IE3* Genexpression nach Transfektion von pcDNA3-*IE3* erkennen. Anders ist es dagegen bei den Kombi-Konstrukten, hier wird bei beiden Konstrukten ein Unterschied zwischen Viruswachstum in An- und Abwesenheit von Tetrazyklin deutlich sichtbar. Wie in Abb. 4.2.6. gezeigt, ist die *IE3* Genexpression in Gegenwart von Tetrazyklin (1 µg / ml) um das ca. 10fache reduziert verglichen mit der *IE3* Genexpression in Abwesenheit von Tetrazyklin. Die reduzierte *IE3* Genexpression in Gegenwart von Tetrazyklin zeigt Auswirkungen auf das Wachstum von HSV-1 *d120*. Die Zugabe von 1 µg / ml Tetrazyklin bewirkt eine Reduktion des Viruswachstums um ca. 72% bei der Verwendung beider Kombi-Konstrukte. In Abwesenheit von Tetrazyklin sind die erzielten Virustiter mit pCtet.-Combi-*IE3* und pNtet.-Combi-*IE3* vergleichbar mit denen bei Verwendung von pcDNA3-*IE3*.

Transfektion in VERO-Zellen (DNA)	Tetrazyklin ($\mu\text{g/ml}$)	HSV-1 <i>d120</i> Titer (pfu/ml)
keine DNA	1	0
keine DNA	0	0
pcDNA3- <i>IE3</i>	1	8.2×10^4
pcDNA3- <i>IE3</i>	0	7.9×10^4
pCtet.-Combi- <i>IE3</i>	1	2.7×10^4
pCtet.-Combi- <i>IE3</i>	0	9.6×10^4
pNtet.-Combi- <i>IE3</i>	1	5.6×10^3
pNtet.-Combi- <i>IE3</i>	0	2.0×10^4

Tabelle 4. 2.7. Wachstum von HSV-1 *d120* bei induzierter und nicht-induzierter *IE3* Genexpression nach Transfektion von pCtet.-Combi-*IE3* bzw. pNtet.-Combi-*IE3* in VERO-Zellen. Die Tabelle zeigt die Titer von HSV-1 *d120* in der An- bzw. Abwesenheit von Tetrazyklin nach Wachstum auf VERO-Zellen, die mit verschiedenen Plasmid DNAs transfiziert wurden. In den beiden Kombi-Konstrukten steht die *IE3* Genexpression unter der Kontrolle des tet. Transaktivators, der die *IE3* Genexpression in Abwesenheit von Tetrazyklin stimuliert und in Anwesenheit von Tetrazyklin nicht stimuliert. Zellen die mit pcDNA3-*IE3* transfiziert wurden, sollten das *IE3* Gen, unabhängig von Tetrazyklin, konstitutiv exprimieren. In diesem Konstrukt wird die *IE3* Genexpression über den starken CMV-Promotor/Enhancer reguliert. VERO-Zellen besitzen kein *IE3* Gen, so dass das Wachstum von HSV-1 *d120* nur durch die *IE3* Genexpression von den einzelnen Konstrukte komplementiert werden kann.

4.2.8. Stabile Transfektion von pCtet.-Combi-*IE3* bzw. pNtet.-Combi-*IE3* in VERO-Zellen für die Herstellung einer stabilen, über Tetrazyklin regulierbaren *IE3* VERO-Zelllinie

In den zuvor dokumentierten Experimenten wurde gezeigt, dass beide Kombi-Konstrukte das *IE3* Gen nach Transfektion in CHO-Zellen und VERO-Zellen exprimieren. Das ICP4 Protein wird in den Zellen in seiner natürlich vorkommenden Grösse synthetisiert (siehe Abb. 4.2.5.) und ist im Zellkern lokalisiert (siehe Abb. 4.2.6.). Durch die Komplementation von HSV-1 *d120* nach Transfektion der Kombi-Konstrukte in VERO-Zellen, wurde die funktionelle Aktivität von ICP4 demonstriert (Tabelle 4.2.7). Die Regulierbarkeit der *IE3* Expression mittels Tetrazyklin wurde mittels immunzyto-chemischer Färbung, sowie anhand der Komplementation von HSV-1 *d120* dargestellt. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die stabile Transfektion beider Kombi-Konstrukte in VERO-Zellen durchgeführt, um eine Tetrazyklin regulierbare *IE3* VERO-Zelllinie herzustellen. Wie bereits erwähnt, sollte man in einem stabilen System eine bessere Regulierbarkeit erzielen können, die die Bedingungen an eine induzierbare *IE3* Zelllinie erfüllt. 1×10^6 VERO-Zellen wurden mit pSV-2neo Plasmid DNA und pCtet.-Combi-*IE3* bzw. pNtet.-Combi-*IE3* Plasmid DNA im Verhältnis 1:5 cotransfiziert. 1 Tag nach der Transfektion wurden die Zellen in Selektionsmedium (Medium199, 10% FCS, 10% P/S, $2 \mu\text{g} / \text{ml}$ Tetrazyklin, $1.5 \text{mg} / \text{ml}$ G418) überführt und in einem Volumen von 90ml verdünnt. Die in Selektionsmedium verdünnten Zellen wurden auf sechs 10cm Zellkulturschalen verteilt und für 2-3 Wochen inkubiert. Alle 3-4 Tage wurde dem Medium frisches Tetrazyklin in einer Endkonzentration von $2 \mu\text{g} / \text{ml}$ zugegeben. Nach ca. 2 Wochen waren die ersten stabilen Klone auf den Platten makroskopisch sichtbar. Die einzelnen Klone wurden mit Trypsin / EDTA von den Schalen abgelöst und mit einer Pipette in eine 48-Loch Platte überführt. Danach wurden die einzelnen Klone sukzessiv über eine 24- und 12-Loch Platte bis zu einer 25cm^2 Kulturflasche hochgezogen. Die Charakterisierung der stabilen Klone wurde in einer 24- Loch Platte durchgeführt. Aus 4 unabhängigen stabilen Transfektionen wurden insgesamt 665 stabile pNtet.-Combi-*IE3* Klone gepickt und auf

die Expression des *IE3* Gens untersucht. Aus der stabilen Transfektion von pCtet.-Combi-*IE3* gingen nur 38 stabile Klone hervor.

4.2.9. Untersuchung der stabilen pCtet.-Combi-*IE3* bzw. pNtet.-Combi-*IE3* Klone auf *IE3* Genexpression mittels immunzytochemischer Färbung

Da die stabile Transfektion mit einem zweiten, den Selektionsmarker tragenden Plasmid (pSV-2neo) durchgeführt wurde, können die im Selektionsmedium überlebenden Zellen entweder nur das pSV-2neo Plasmid oder das pSV-2neo und das Kombi-Konstrukt in ihrem Genom integriert haben. Desweiteren besteht die Möglichkeit, dass Klone mit beiden Plasmiden zwar im Selektionsmedium überleben, jedoch aufgrund der Integriationsstelle im Genom das *IE3* Gen nicht exprimieren. Um diese Klone voneinander unterscheiden zu können, wurden die Klone mittels immunzytochemischer Färbung untersucht. Für die Untersuchung der einzelnen Klone auf *IE3* Genexpression, wurden von den 24-Loch Platten sog. Replikaplatten angelegt und dem Medium kein Tetrazyklin zugefügt. Durch die Abwesenheit von Tetrazyklin im Medium wird die *IE3* Genexpression über den tet.Transaktivator stimuliert. Positive Klone sollten demzufolge *IE3* exprimieren und das ICP4 Protein in den Zellen synthetisieren. Mit der immunzytochemischen Färbung wird das ICP4 Protein indirekt über einen monoklonalen Maus Anti-ICP4 Antikörper, einen zweiten biotinylierten Ziegen Anti-Maus Antikörper, einen Biotin/Avidin-Peroxidase gekoppelten Komplex und Zugabe von DAB Substrat in den Zellen nachgewiesen. Von den insgesamt 665 untersuchten stabilen pNtet.-Combi-*IE3* Klonen waren nur 13 Klone ICP4 positiv und von den 38 untersuchten pCtet.-Combi-*IE3* Klonen waren nur 2 Klone ICP4 positiv. Die Zellen, die das ICP4 Protein synthetisieren weisen eine starke Akkumulation des viralen Proteins im Zellkern auf. Um einen homogenen Klon zu erhalten wurden die Klone subkloniert. Wie man anhand der Abb. 4.2.9. (C u. D) erkennen kann sind die beiden Klone nicht homogen in ihrer *IE3* Genexpression.

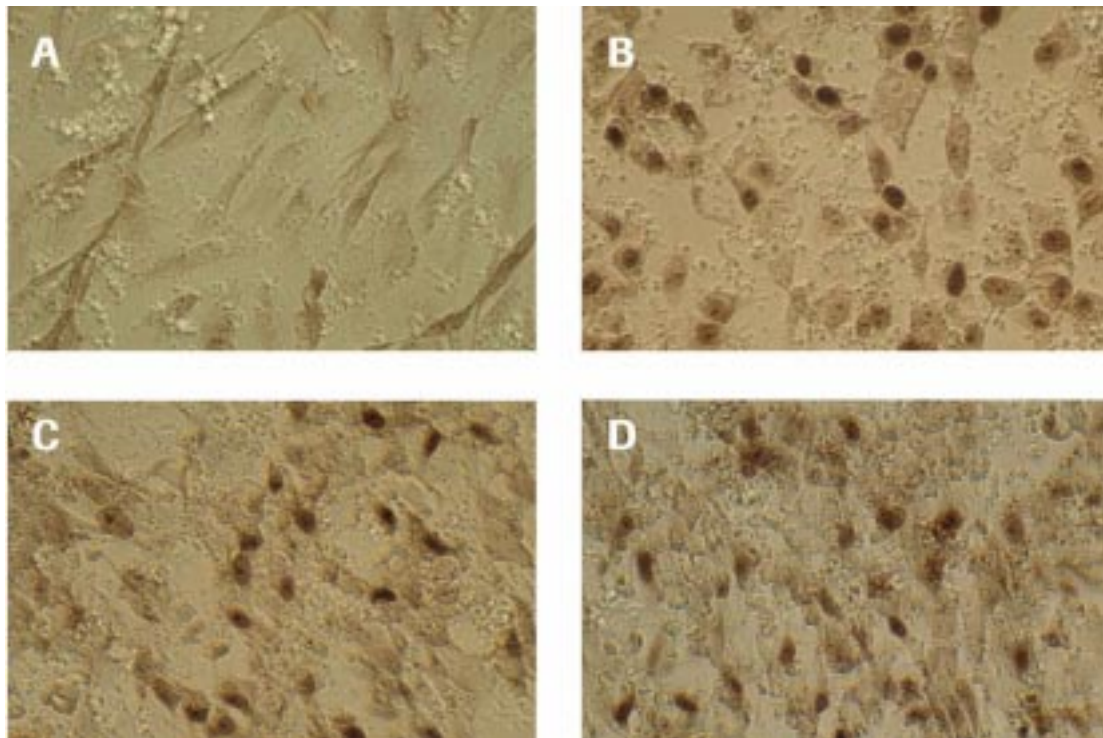


Abb. 4.2.9. Untersuchung stabiler pCtet.-Combi-IE3 bzw. pNtet.-Combi-IE3 Klone auf IE3 Genexpression in Abwesenheit von Tetrazyklin mittels immunzytochemischer Färbung. Die einzelnen Klone wurden für 2 Tage in Medium ohne Tetrazyklin inkubiert und dann mit 4% PFA fixiert. Der Nachweis des ICP4 Proteins in den Zellen erfolgte indirekt mit einem monoklonalen Maus Anti-ICP4 Antikörper (ABI) mittels immunzytochemischer Färbung. Durch die Zugabe von DAB Substrat wird der ICP4 Protein-Antikörper-Komplex in den Zellen braun gefärbt. (A) Unbehandelte VERO-Zellen. (B) VERO-Zellen 5 Std. nach Infektion mit HSV-1 *ddl1.2*. (C) Stabiler pNtet.-Combi-IE3 Klon 1 in Abwesenheit von Tetrazyklin. (D) Stabiler pCtet.-Combi-IE3 Klon 4 in Abwesenheit von Tetrazyklin.

4.2.10. Subklonierung stabiler pCtet.-Combi-IE3 bzw. pNtet.-Combi-IE3 Klone

Um einen homogen exprimierenden, stabilen Klon zu erhalten, wurden die mittels immunzytochemischer Färbung als positiv identifizierten Klone subkloniert. Für die Subklonierung wurde die Zellzahl in der Neubauer Zählkammer bestimmt. Danach wurden die Zellen auf eine Zellzahl von 2-3 Zelle/ml verdünnt und auf 48-Loch Platten verteilt. Nach einigen Tagen liessen sich in einigen Löchern der 48-Loch Platten Einzelklone im Lichtmikroskop erkennen. Wie zuvor beschrieben wurden die Klone über eine 24-, 12- Loch Platte und dann eine 25 cm² Kulturflasche sukzessiv hochgezogen. Während der Inkubationszeit wurde alle 3 bis 4 Tage frisches Tetrazyklin (Endkonzentration 2µg / ml) ins Medium gegeben. Insgesamt wurden 24 pCtet.-Combi-IE3 Subklone und 24 pNtet.-Combi-IE3 Subklone ausgewählt. Die Untersuchung der Subklone auf IE3 Genexpression erfolgte wie unter Abschnitt 4.2.9. beschrieben mittels immunzytochemischer Färbung. In Abb. 4.2.10 ist die IE3 Genexpression exemplarisch von 2 der insgesamt 10 positiven Subklone dargestellt. 9 von den 10 positiven Klonen enthalten das Kombi-Konstrukt pNtet.-Combi-IE3 und nur 1 Klon enthält das pCtet.-Combi-IE3 Konstrukt. Um die Klone besser voneinander unterscheiden und beschreiben zu können, wurden die stabilen Klone mit dem Konstrukt pCtet.-Combi-IE3 als VERO-Ctet.IE3 und die stabilen Klone mit pNtet.-Combi-IE3 als VERO-Ntet.IE3 bezeichnet.

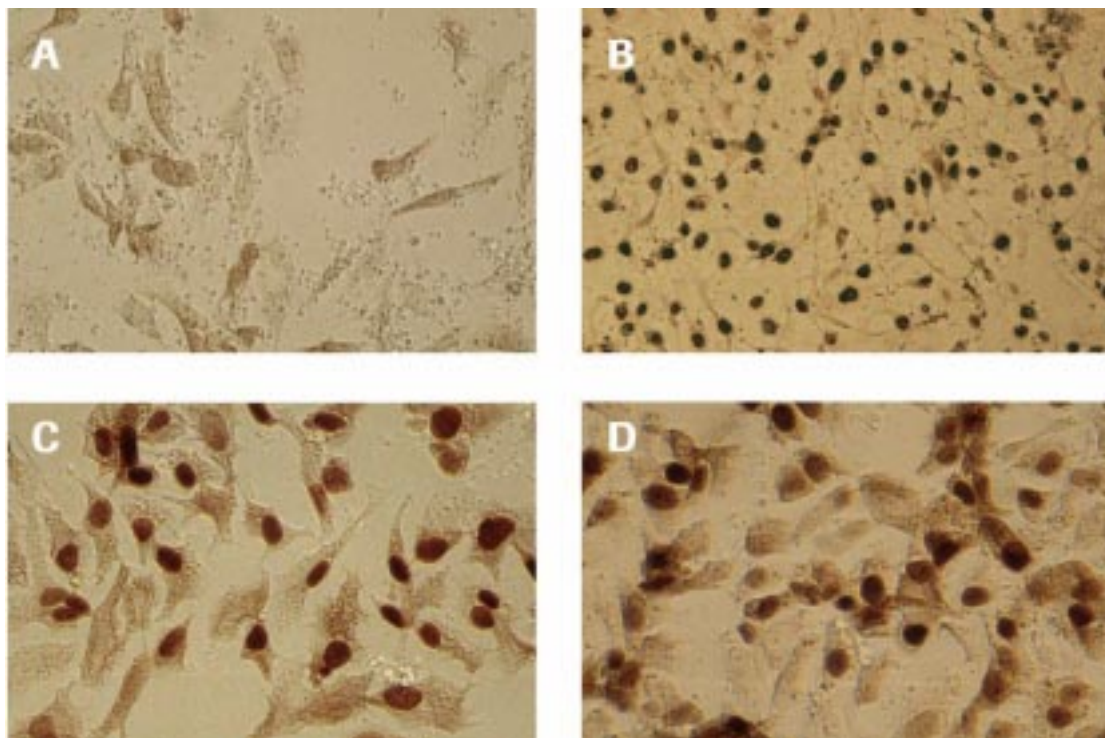


Abb. 4.2.10. Untersuchung der *IE3* Genexpression mittels immunzytochemischer Färbung nach Subklonierung der ICP4 positiven stabilen Klone. Für die Induktion der *IE3* Genexpression wurden die Zellen 2 Tage vor der Fixierung mit 4% PFA und Durchführung der immunzytochemischen Färbung in Medium ohne Tetrazyklin inkubiert. (**A**) Unbehandelte VERO-Zellen. (**B**) VERO-Zellen 5 Std. nach Infektion mit HSV-1 *5dl1.2*. (**C**) Subklon VERO-Ntet.*IE3* Nr.17, 2 Tage in Abwesenheit von Tetrazyklin im Medium. (**D**) Subklon VERO-Ctet.*IE3* Nr.4, 2 Tage in Abwesenheit von Tetrazyklin im Medium.

Wie man der Abb. 4.2.10 entnehmen kann, ist das *IE3* Expressionsmuster in den Subklonen wesentlich homogener als in den primär Klonen. Nur sehr wenige Zellen lassen noch Unterschiede in der Intensität der Färbung erkennen. Diese Unterschiede sind wahrscheinlich natürlicher Art, da die Zellen innerhalb einer Population nicht in ihrem Zellzyklus synchronisiert sind. Das bedeutet, dass sich die Zellen zum Zeitpunkt der Fixierung in unterschiedlichen Stadien des Zellzyklus befinden und dementsprechend verschiedene Genexpressionsmuster aufweisen. Eine minimale Heterogenität innerhalb eines Klons kann hierdurch nicht ausgeschlossen werden. Die positiven Subklone wurden expandiert und nach einigen Passagen in Zellkultur in flüssigen Stickstoff eingefroren. In den folgenden Experimenten wurden die Eigenschaften der einzelnen Klone charakterisiert.

4.2.11 Charakterisierung der stabilen VERO-Ctet.*IE3*- bzw. VERO-Ntet.*IE3*-Zelllinien

Mit der Methode der immunzytochemischen Färbung wurden die Klone identifiziert, die in Abwesenheit von Tetrazyklin die *IE3* Genexpression induzieren und das Genprodukt ICP4 in den Zellen synthetisieren. Das Ziel dieser Arbeit ist jedoch die Herstellung einer Zelllinie, die im nicht-induzierten Zustand kein Wachstum der konditionalen Lethalmutante HSV-1 *d120* erlaubt und im induzierten Zustand das Wachstum von HSV-1 *d120* stimuliert. Die einzelnen stabilen Klone wurden in den folgenden Experimenten auf die Regulierbarkeit der *IE3* Genexpression und auf die Komplementationseigenschaften für HSV-1 *d120* charakterisiert.

4.2.11.1. Komplementationseigenschaften der stabilen VERO-Ctet.*IE3*- bzw. VERO-Ntet.*IE3*-Zelllinien für HSV-1 *d120*

Um die Komplementationseigenschaften der einzelnen Klone für die konditionale *IE3* Lethalmutante HSV-1 *d120* untersuchen zu können, wurden die stabilen Klone in Anwesenheit von Tetrazyklin (1 - 4 μ g / ml) und Abwesenheit von Tetrazyklin mit HSV-1 *d120* (MOI=0.1) infiziert. 3 Tage nach der Infektion wurde das Virus geerntet und auf E5-Zellen titriert. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in den Tabellen 4.2.10.1 A, B, und C zusammengefasst.

A.

Stabile VERO-tet. <i>IE3</i> Klone	Tetrazyklin (μ g/ml)	Titer von HSV-1 <i>d120</i> (pfu/ml)
VERO-Ntet. <i>IE3</i> /K1	1	2.2x10 ⁵
VERO-Ntet. <i>IE3</i> /K1	0	6.1x10 ⁵
VERO-Ntet. <i>IE3</i> /K6	1	8.3x10 ⁴
VERO-Ntet. <i>IE3</i> /K6	0	1.3x10 ⁵
VERO-Ntet. <i>IE3</i> /K17	11	4.1x10 ⁴
VERO-Ntet. <i>IE3</i> /K17	0	1.8x10 ⁵
VERO-Ctet. <i>IE3</i> /K4	1	2.4x10 ⁵
VERO-Ctet. <i>IE3</i> /K4	0	4.8x10 ⁵

B.

Stabile VERO-tet. <i>IE3</i> Klone	Tetrazyklin ($\mu\text{g/ml}$)	Titer von HSV-1 <i>dI20</i> (pfu/ml)
VERO-Ntet. <i>IE3</i> /K1	2.5	1.4×10^5
VERO-Ntet. <i>IE3</i> /K1	0	5.3×10^5
VERO-Ntet. <i>IE3</i> /K6	2.5	1.3×10^5
VERO-Ntet. <i>IE3</i> /K6	0	2×10^5
VERO-Ntet. <i>IE3</i> /K17	2.5	1.8×10^4
VERO-Ntet. <i>IE3</i> /K17	0	1.1×10^5
VERO-Ctet. <i>IE3</i> /K4	2.5	2.8×10^5
VERO-Ctet. <i>IE3</i> /K4	0	6.1×10^5

C.

Stabile VERO-tet. <i>IE3</i> Klone	Tetrazyklin ($\mu\text{g/ml}$)	Titer von HSV-1 <i>dI20</i> (pfu/ml)
VERO-Ntet. <i>IE3</i> /K1	4	9.8×10^4
VERO-Ntet. <i>IE3</i> /K1	0	5.9×10^5
VERO-Ntet. <i>IE3</i> /K6	4	9.2×10^4
VERO-Ntet. <i>IE3</i> /K6	0	1.9×10^5
VERO-Ntet. <i>IE3</i> /K17	4	1.2×10^4
VERO-Ntet. <i>IE3</i> /K17	0	1.3×10^5
VERO-Ctet. <i>IE3</i> /K4	4	2.2×10^5
VERO-Ctet. <i>IE3</i> /K4	0	5.1×10^5

Tabelle 4.2.11.1. Komplementationseigenschaften der stabilen VERO-tet.*IE3* Klone für HSV-1 *dI20* in An- oder in Abwesenheit von Tetrazyklin (1-4 $\mu\text{g} / \text{ml}$). 1×10^6 Zellen der stabilen Klone wurden in je ein Loch einer 6-Loch Platte ausgesät und über Nacht mit Tetrazyklin (**A = 1 $\mu\text{g} / \text{ml}$, B = 2.5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ und C = 4 $\mu\text{g} / \text{ml}$**) bzw. ohne Tetrazyklin im Medium inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit HSV-1 *dI20* (MOI = 1) für 1 Std. bei 37°C und 5% CO₂ in Medium ohne FCS und ohne Tetrazyklin infiziert. Nach der Infektion wurde die Viruslösung abgesaugt und die Zellen 3x mit PBS gewaschen. Die jeweiligen Klone wurden dann sowohl mit Tetrazyklin im Medium als auch ohne Tetrazyklin im Medium für 3 Tage inkubiert. Danach wurden das Virus geerntet und auf E5-Zellen titiert.

Wie man anhand der in Tabelle 4.2.11.1 A, B und C aufgelisteten HSV-1 *dI20* Titer der einzelnen Klone in Ab- und Anwesenheit von Tetrazyklin sehen kann, ist eine totale Repression des Viruswachstums nicht erreicht worden. Alle Klone komplementieren HSV-1 *dI20* sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von Tetrazyklin (1-4 $\mu\text{g} / \text{ml}$). Ebenso wie bei den in Abschnitt 4.2.7. dokumentierten transienten Experimenten, ist eine Reduktion des Viruswachstums auf den stabilen Klonen in Anwesenheit von Tetrazyklin zu beobachten. In Tabelle A. beobachtet man die deutlichste Reduktion im Viruswachstum bei Klon VERO-Ntet.*IE3*/K17 mit einem Wert von 77.2%. Klon VERO-Ntet.*IE3*/K6 zeigt mit 36.2% die geringste Wachstumsreduktion. Mit zunehmender Tetrazyklin Konzentration im Medium (siehe Tabelle B und C) nimmt die HSV-1 *dI20* Wachstumsrate auf den einzelnen Klonen proportional ab. Während die Wachstumsrate von HSV-1 *dI20* auf VERO-Ntet.*IE3*/K17 bei einer Tetrazyklin Konzentration von 1 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 22.8 % betrug, sinkt sie bei einer Tetrazyklin Konzentration von 2.5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ auf 16.4% und bei 4 $\mu\text{g} / \text{ml}$ auf einen Wert von 9.3%. Das vorliegende Ergebnis lässt eine deutliche Wirkung von Tetrazyklin bei dem Wachstum von HSV-1 *dI20* auf den stabilen VERO-tet.*IE3* Klonen erkennen. Keine der hergestellten VERO-tet.*IE3*-Zelllinien bewirkt jedoch die absolute Repression der HSV-1 *dI20* Replikation.

4.2.11.2. *IE3* Genexpression in An- oder Abwesenheit von Tetrazyklin in stabilen VERO-tet.*IE3* Klonen.

Um einen Eindruck von der *IE3* Genexpressionsstärke der stabilen VERO-tet.*IE3* Klone in An- und Abwesenheit von Tetrazyklin zu bekommen, wurden immunzytochemische Färbungen der Klone (Abb. 4.2.11.2 A.) und Westernblot-Analysen mit totalen Zellextrakten der einzelnen Klone (Abb. 4.2.11.2. B.) durchgeführt. Hierfür wurden die einzelnen Klone in 6-Loch Platten ausgesät und 3 Tage ohne bzw. mit Tetrazyklin ($2\mu\text{g} / \text{ml}$) im Medium inkubiert. Für die immunzytochemische Färbung wurden die Zellen mit 4% PFA fixiert und das ICP4 Protein indirekt mit einem monoklonalen Maus Anti-ICP4 Antikörper in den Zellen nachgewiesen. Für die Westernblot-Analyse wurden die Zellen trypsiniert, in Medium aufgenommen, abzentrifugiert und das Zellpellet in Probenpuffer (200 mM Tris pH 8.8, 10 % Glukose, % mM EDTA, 0.1 % Bromphenolblau, 3 % SDS und 0.3 M β -Mercapto-Ethanol) resuspendiert. Gleiche Volumina der einzelnen Lysate wurden in einem 8%-igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und danach auf eine Immobilon-P Membran (Millipore, Bedford) transferiert. Das ICP4 Protein wurde mit einem monoklonalen Maus Anti-ICP4 Antikörper (ABI), einem sekundären Ziegen Anti-Maus IgG, (H+L) Peroxidase gekoppelten Antikörper (Pierce, Illinois) und dem Substrat Lumi-Light (Boehringer Mannheim) auf einem Biomax-Röntgenfilm (Kodak) nachgewiesen.

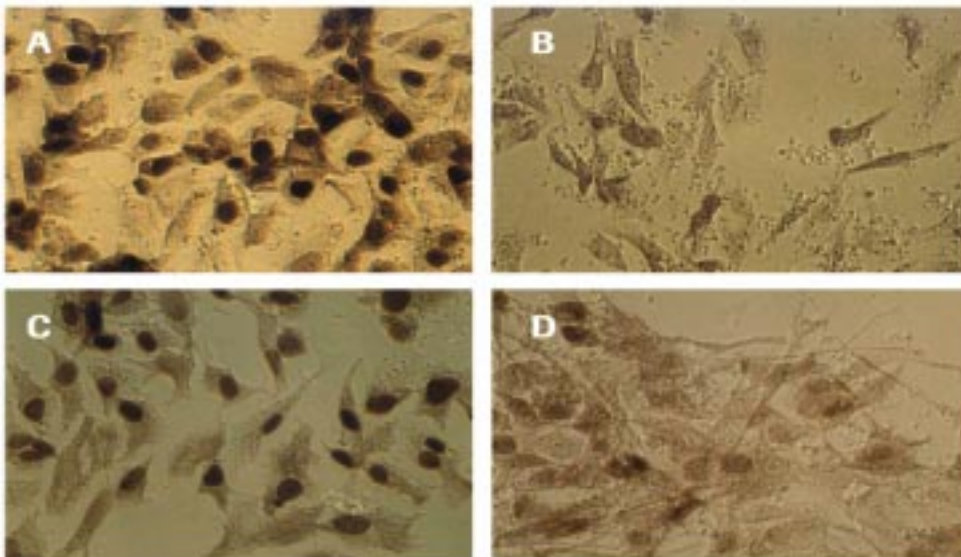


Abb.4.2.11.2. A. Nachweis der *IE3* Genexpression in An- und Abwesenheit von Tetrazyklin in stabilen VERO-tet.*IE3* Klonen mittels immunzytochemischer Färbung. (A) VERO-Zellen 5 Std. nach Infektion mit HSV-1 5dl1.2 (MOI=1). (B) Unbehandelte VERO-Zellen. (C) VERO-tet.*IE3*/ K17 Zellen in Abwesenheit von $2\mu\text{g}$ Tetrazyklin. (D) VERO-tet.*IE3*/K17 Zellen in Anwesenheit von $2\mu\text{g}$ Tetrazyklin.

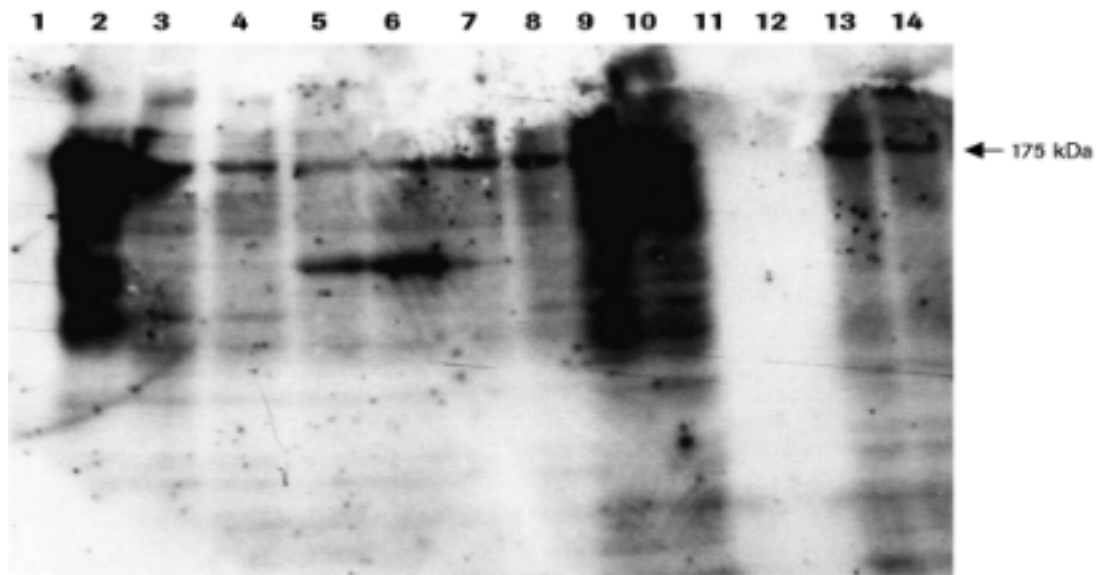


Abb.4.2.11.2.B. Nachweis der *IE3* Genexpression in Ab- und Anwesenheit von Tetrazyklin in stabilen VERO-tet.*IE3* Klonen mittels Westernblot-Analyse. (**Spur 1**) Unbehandelt VERO-Zellen. (**Spur 2**) VERO-Zellen 5 Std. nach Infektion mit HSV-1 *5dl1.2* (MOI=1). (**Spur 3**) VERO-Ntet.*IE3*/K23 ohne Tetrazyklin. (**Spur 4**) VERO-Ntet.*IE3*/K23 mit Tetrazyklin. (**Spur 5**) VERO-Ntet.*IE3*/K17 ohne Tetrazyklin. (**Spur 6**) VERO-Ntet.*IE3*/K17 mit Tetrazyklin. (**Spur 7**) VERO-Ntet.*IE3*/K6 ohne Tetrazyklin. (**Spur 8**) VERO-Ntet.*IE3*/K6 mit Tetrazyklin. (**Spur 9**) VERO-Ctet.*IE3*/K4 ohne Tetrazyklin. (**Spur 10**) VERO-Ctet.*IE3*/K4 mit Tetrazyklin. (**Spur 11**) VERO-Ctet.*IE3*/K8 ohne Tetrazyklin. (**Spur 12**) VERO-Ctet.*IE3*/K8 mit Tetrazyklin. (**Spur 13**) VERO-Ntet.*IE3*/K7 ohne Tetrazyklin. (**Spur 14**) VERO-Ntet.*IE3*/K7 mit Tetrazyklin. Die 175kDa Proteinbande des Prestained Molekulargewichtsmarker (Gibco-BRL) ist links eingezeichnet.

Das Ergebnis der immunzytochemischen Färbung (Abb. 4.2.11.2..A.) zeigt einen minimalen Unterschied in der *IE3* Expression der stabilen VERO-tet.*IE3* Zellen in der Anwesenheit von 2 μ g/ml Tetrazyklin. Die induzierte *IE3* Expression ist in den stabilen Zellen sehr stark, und der Expressionslevel entspricht dem von HSV-1 *5dl1.2* infizierten VERO-Zellen. Eine wirkliche basale *IE3* Expression liegt in den Zellen scheinbar nicht vor bzw. kann in den Zellen durch die Zugabe von Tetrazyklin nicht erreicht werden. Das Ergebnis der Westernblot-Analyse macht dies noch deutlicher, da hier keine Unterschiede in der *IE3* Expression zwischen induziertem und nicht-induziertem Zustand erkennbar werden (Abb.4.2.11.2.B.). Ein Vergleich der *IE3* Expressionsstärken der stabilen Klone untereinander lässt erkennen, dass der VERO-Ctet.*IE3* Klon 4 (Spur 9 u. 10) eine wesentlich stärkere *IE3* Expression hat als die restlichen VERO-Ntet.*IE3* Klone. Die unterschiedliche *IE3* Expression beider Kombi-Konstrukte konnte bereits zuvor in transient transfizierten CHO-Zellen beobachtet werden (siehe Abb. 4.2.5.). In den totalen Zellextrakten von Klon 8 VERO-Ctet.*IE3* konnte dagegen kein ICP4 Protein in der Westernblot-Analyse detektiert werden (Spur 11 u. 12). Das *IE3* Gen wird in diesen Zellen vermutlich nicht mehr exprimiert.

4.2.12. Verlust der *IE3* Genexpression in stabilen VERO-tet.*IE3* Zellen.

Nach einigen Wochen in Zellkultur zeigten die stabilen VERO-tet.*IE3* Klone die zuvor beobachtete Komplementation von HSV-1 *dI20* (*IE3* Deletionsmutante) nicht mehr. Auch in wiederholten Westernblot-Analysen und immunzytochemischen Färbungen konnte das ICP4 Protein in den Zellen nicht mehr nachgewiesen werden. Die revitalisierten Stickstoffkulturen der einzelnen Klone zeigten ebenfalls keine *IE3* Expression. Wie bereits bei Klon 4 VERO-Ctet.*IE3* in der Westernblot-Analyse zu beobachten war (Abb. 4.2.11.2.B.), schalten die stabilen VERO-tet.*IE3* Zellen die *IE3* Expression vermutlich nach einiger Zeit in Kultur irreversibel ab. Um diese Vermutung zu untersuchen, wurde die genomische DNA aus einigen VERO-tet.*IE3* Klonen isoliert und mittels PCR ein Teilstück von ca. 384 bp des *IE3* Gens mit dem Primerpaar P52 / P53 amplifiziert. Das Ergebnis der PCR-Analyse an genomischer DNA stabiler VERO-tet.*IE3* Klone ist in Abb. 4.2.12. dargestellt. Als Kontrollen dienten pUC-Combi-CMV Plasmid DNA, genomische DNA aus VERO-Zellen, genomische DNA aus E5-Zellen, sowie pCtet.-*IE3* Plasmid DNA.

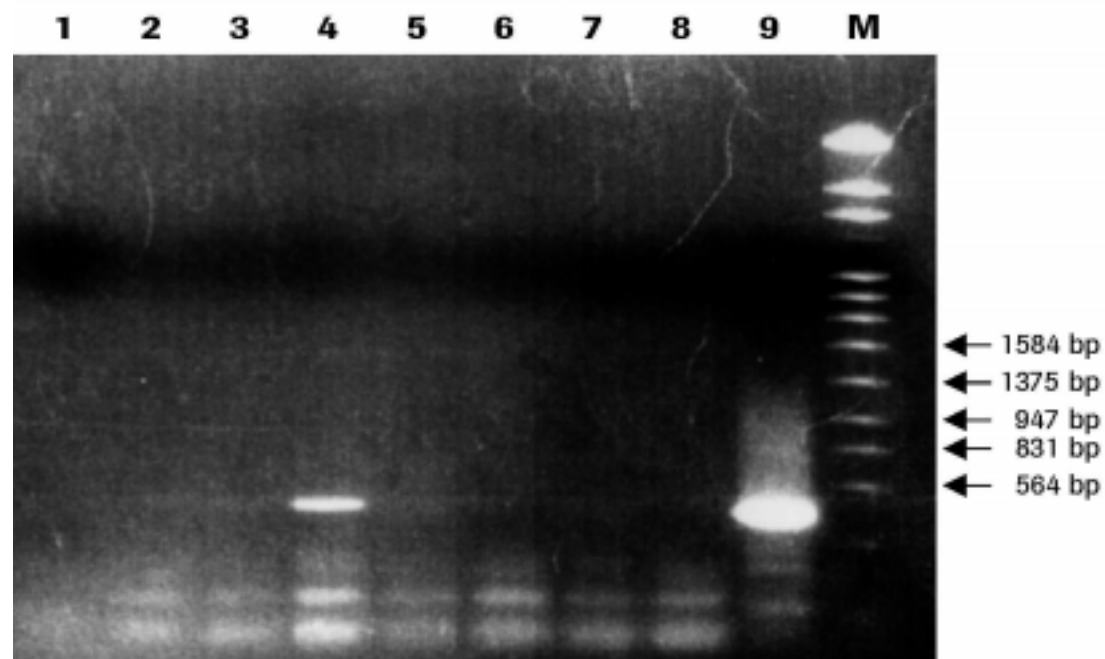


Abb. 4.2.12. Nachweis des *IE3* Gens in genomischer DNA aus stabilen VERO-tet.*IE3* Klonen mittels PCR-Analyse. (Spur 1) Genomische DNA aus VERO-Zellen. (Spur 2) Genomische DNA aus E5-Zellen. (Spur 3 – Spur 7) Genomische DNA aus den Klonen: VERO-Ntet.*IE3* Nr.6, VERO-Ntet.*IE3*/K7, VERO-Ntet.*IE3*/K17, VERO-Ntet.*IE3*/K23 und VERO-Ctet.*IE3*/K4. (Spur 8) pUC-Combi-CMV Plasmid DNA. (Spur 9) pCtet.-*IE3* Plasmid DNA. (M) Molekulargewichtsmarkerbanden in Basenpaaren (bp), Marker III, Boehringer Mannheim.

Die PCR-Analyse zeigt, dass an der genomischen DNA von 4 (Spur 3 bis 6) der 5 VERO-tet.*IE3* Klone mit den spezifischen, internen *IE3* Primern ein DNA Fragment mit der erwarteten Grösse amplifiziert wurde. An der genomischen DNA aus VERO-Zellen (Spur 1) und an pUC-Combi-CMV Plasmid DNA (Spur 8) konnte mit den gleichen Primern kein DNA Fragment amplifiziert werden, während an pCtet.-*IE3* Plasmid DNA (Spur 9) das gleiche DNA Fragment, wie an der genomischen DNA der stabilen VERO-tet.*IE3* Klone, amplifiziert wurde. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass das *IE3* Gen weiterhin in dem Genom der Zellen vorliegt, jedoch transkriptionell inaktiviert wurde.

4.3. Herstellung einer doppelstabilen VERO-tet.*IE3* Zelllinie

Die mit den beiden Kombi-Konstrukten gewonnenen Ergebnisse lassen deutlich erkennen, dass eine vollständige Regulierbarkeit der *IE3* Expression über Tetrazyklin weder in transienten- noch im stabilen System möglich ist. Der *IE3* Expressionslevel ist im nicht-induziertem Zustand, d. h. in Anwesenheit von 1-4 µg / ml Tetrazyklin, sehr hoch, so dass eine totale Repression im Wachstum von HSV-1 *d120* nicht erzielt werden konnte. Auf der anderen Seite zeigen die Ergebnisse, dass eine minimale Reduktion von ICP4 Protein eine deutliche Abnahme des Virustiters bewirkt. Aufgrund der permanenten *IE3* Expression in den stabilen VERO-tet.*IE3* Zellen akkumuliert ICP4 Protein im Zellkern. ICP4 Protein ist für die Zelle toxisch, wodurch die *IE3* Genexpression vermutlich nach einiger Zeit von den Zellen aktiv abgeschaltet wird. Auffällig sind auch die Unterschiede im Expressionslevel, die man zwischen beiden Kombi-Konstrukten beobachten kann. VERO-Ctet.*IE3* Klone zeigten eine deutlich stärkere *IE3* Expression als VERO-Ntet.*IE3* Klone. Vermutlich schalten diese Klone daher die *IE3* Expression vergleichsweise schneller ab. Dieser Unterschied würde ebenfalls erklären, weshalb vielmehr VERO-Ntet.*IE3* Klone im Selektionsmedium herangewachsen sind als VERO-Ctet.*IE3* Klone. Doch was ist der Grund für die starke *IE3* Expression im nicht-induzierten Zustand? Im Kombi-Konstrukt liegen die beiden Expressionseinheiten nur wenige Basenpaare voneinander entfernt, so dass Kreuzaktivierungen über den starken CMV IE1 Enhancer / Promoter bzw. den NSE Promoter nicht ausgeschlossen werden können. Diese Hypothese würde mit den experimentellen Befunden gut in Einklang stehen. Um mögliche Kreuzaktivierungen innerhalb des Kombi-Konstruktes ausschließen zu können, wurde in einem zweiten Ansatz die Herstellung einer doppelstabilen VERO-tet.*IE3* Zelllinie geplant. Für die Herstellung einer doppelstabilen VERO-tet.*IE3* Zelllinie werden die beiden genetischen Elemente (CMV IE1 Enhancer / Promoter tet.TA und CMVminimal-Promoter tet.Ox7 *IE3*), die zuvor gemeinsam auf dem Kombi-Konstrukt vorlagen, auf zwei unabhängige Plasmide voneinander getrennt. Ein Plasmid trägt somit die CMV IE1 Enhancer / Promoter tet. Transaktivator Sequenzen und das andere die Sequenzen für den tet.Ox7-CMV minimal-Promoter, sowie das *IE3* Gen. Beide Plasmide werden später nacheinander in die gleichen Zellen stabil transfiziert und die Zellen anhand der verschiedenen Selektionsmarkern der Plasmide selektioniert. Da ein Plasmid mit dem CMV IE1 Enhancer / Promoter, tet. Transaktivator bereits zur Verfügung stand (Uli Deutsche), musste nur noch das *IE3* Gen unter die Kontrolle des tet.Ox7-CMV minimal-Promoters gebracht werden.

4.3.1. Konstruktion von ptet.-*IE3*

Um das *IE3* Gen unter die Kontrolle des tet.Ox7-CMV minimal-Promoters zu bringen, wurde das *IE3* Gen mit den flankierenden *EcoRI* Schnittstellen aus pCR2.1-*IE3* herausgeschnitten und in die *EcoRI* Schnittstelle von pN721 (Dr. U. Deutsche) kloniert (Abb.4.3.1.). Die richtige Orientierung des *IE3* Gens wurde mit verschiedenen Restriktionsverdau ermittelt. Dieses Plasmid trägt im Gegensatz zu den Kombi-Konstrukten keine tet.Transaktivator Transkriptionseinheit.

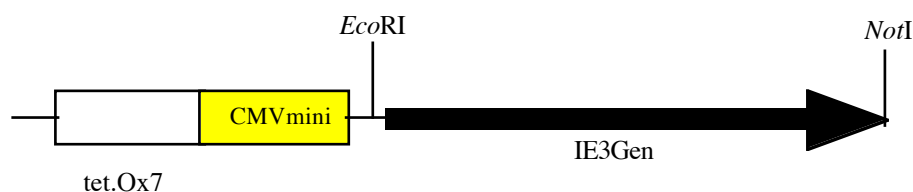


Abb. 4.3.2. *IE3* Expressionskassette in Plasmid ptet.-*IE3*. Durch die Klonierung des *IE3* Gens in die *EcoRI* Schnittstelle von Plasmid pN721 steht das *IE3* Gen unter der Kontrolle des CMV minimal-Promoters.

4.3.2. Herstellung stabiler VERO-tet.TA Zellen (1. Transfektion)

Für die Herstellung einer doppelstabilen VERO-tet.*IE3* Zelllinie wurden zunächst stabile VERO-tet.TA Zellen hergestellt. Hierzu wurden 1×10^6 VERO-Zellen mit $2 \mu\text{g}$ pCMV-tet.TA und $0.4 \mu\text{g}$ pSV-2neo cotransfiziert. 1 Tag nach der Transfektion wurden die Zellen in Selektionsmedium (Medium 199, 10% FCS, 10% Penicillin / Streptomycin, $1.5 \text{mg} / \text{ml}$ G418) verdünnt und auf mehrere 10cm Zellkulturschalen verteilt. Die Schalen wurden in regelmässigen Abständen unter dem Lichtmikroskop betrachtet und nach 1-2 Wochen konnten die ersten stabilen Klone beobachtet werden. Nach ca. 2-3 Wochen waren die stabilen Klone makroskopisch sichtbar und wurden mit Trypsin / EDTA von den Schalen abgelöst und in 24-Loch Platten überführt. Es wurden insgesamt 48 stabile Klone gepickt und von jeder Platte sogenannte Replikaplaten angelegt. Eine Platte wurde bei -80°C eingefroren und die zweite Platte wurde für weitere Experimente verwendet. Für die Untersuchung der einzelnen stabilen Klone auf tet.TA Expression wurde eine zweite Replikaplatte angelegt. Da der CMV *IE1* Enhancer / Promoter in der Zelle konstitutiv aktiv ist, wird das tet. Transaktivatorprotein permanent in den Zellen synthetisiert.

4.3.3. Untersuchung der stabilen Klone auf tet.TA Expression

Die im Selektionsmedium herangewachsenen Klone enthalten entweder nur das pSV-2neo Plasmid, welches die Resistenz gegen Neomycin verleiht, oder das pSV-2neo Plasmid und das pCMV-tet.TA Plasmid. Zellen, die nur das pCMV-tet.TA Plasmid enthalten, können im Selektionsmedium ohne das Resistenzgen nicht überleben und sterben nach einigen Tagen ab. Um die stabilen Transfektanten mit tet. TA Expression von denen ohne tet. TA Expression unterscheiden zu können, wurden die stabilen Transfektanten in der Abwesenheit bzw. Anwesenheit von Tetrazyklin ($1 \mu\text{g} / \text{ml}$) mit je $2 \mu\text{g}$ pA81 Plasmid DNA transfiziert. Das pA81 Plasmid enthält das Luciferase Reportergen unter der Kontrolle des tet.Ox7-CMV minimal-Promoter Elements. Die Luciferase-Aktivität ist proportional der Menge des Luciferase-Proteins und kann somit in einer biochemischen Reaktion gemessen werden. Stabile Transfektanten, die tet. TA konstitutiv exprimieren, induzieren die Luciferase Expression in Abwesenheit von Tetrazyklin durch die Bindung des tet. TAs an die tet.Ox7-CMV minimal-Promoter Sequenz. Lysate dieser Zellen zeigen eine hohe Luciferase Aktivität. In Anwesenheit von Tetrazyklin bindet tet. TA nicht an die tet.Ox7-CMV minimal Promoter Sequenzen, wodurch die Luciferase Expression nicht stimuliert werden kann. Lysate dieser Zellen sollten eine geringe Luciferase Aktivität aufweisen. 24 Std. nach der Transfektion von pA81 Plasmid DNA wurden die Zellen in Lysispuffer (0.6% NP-40, 0.15M NaCl, 10mM Tris pH 7.9 und 1mM EDTA) aufgenommen und 30 Sek. in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Von den einzelnen Lysaten wurden $20 \mu\text{l}$ zu je $350 \mu\text{l}$ Glycyl-Glycinpuffer (25mM Glycyl-Glycin, 5mM ATP und 50mM MgCl_2) pipettiert. Die Lösung wurde gut gemischt und nach Zugabe von D-Luciferin (0.5mM D-Luciferin in 100mM Phosphatpuffer pH 7.0-8.0) die Luciferase-Aktivität in dem Messgerät als RLUs (relative light units) gemessen. Die hierbei ermittelten Messwerte der einzelnen stabilen Transfektanten sind in der Abb. 4.3.3. dargestellt. Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigt, dass 6 der insgesamt 20 stabilen Klone eine deutliche Induktion der Luciferase-Aktivität in Abwesenheit von Tetrazyklin im Verhältnis zur gemessenen Luciferase-Aktivität in Anwesenheit von $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ Tetrazyklin aufweisen. Die stärkste Induktion der Luciferase-Aktivität wurde bei Klon 2 (156-fache Induktion) und bei Klon 5 (75-fache Induktion) gemessen. Die Sechs positiven Klone wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und in einem weiteren Schritt subkloniert.

Proben	Gemessene RLU (+ Tetrazyklin)	Gemessene RLU (- Tetrazyklin)
1. Lysispuffer	19760	19866
2. VERO-Zellen	20244	20624
3. VERO-tet.TA/K1	22195	1383226
4. VERO-tet.TA/K2	20995	3281206
5. VERO-tet.TA/K3	20633	23142
6. VERO-tet.TA/K4	20761	25589
7. VERO-tet.TA/K5	22187	1667122
8. VERO-tet.TA/K6	20946	28878
9. VERO-tet.TA/K7	20462	1445187
10. VERO-tet.TA/K8	20760	24907
11. VERO-tet.TA/K9	20002	28974
12. VERO-tet.TA/K10	20030	45870
13. VERO-tet.TA/K11	23057	37734
14. VERO-tet.TA/K12	24080	586291
15. VERO-tet.TA/K13	20419	903244
16. VERO-tet.TA/K14	20196	25640
17. VERO-tet.TA/K15	22064	38188
18. VERO-tet.TA/K16	21622	709460
19. VERO-tet.TA/K17	23152	54389
20. VERO-tet.TA/K18	21876	43786
21. VERO-tet.TA/K19	23541	32564
22. VERO-tet.TA/K20	26342	22137
23. VERO-tet.TA/K21	24442	68099
24. VERO-tet.TA/K22	20897	32986

Abb. 4.3.3. Nachweis der tet.TA Expression in stabilen VERO-Klonen anhand der Luciferase Aktivität. In der Tabelle sind die gemessenen Luciferase Werte der mit pA81 transfizierten, stabilen VERO-tet.TA Klone (K) in Anwesenheit und Abwesenheit von Tetrazyklin (1µg / ml) aufgeführt. (**Wert 1**) ist der Referenzwert (Lysispuffer mit Glycyl-Glucinpuffer und D-Luciferin). (**Wert 2**) ist die negative Kontrolle (VERO-Zellen transfiziert mit pA81). (**Wert 3 - Wert 24**) Luciferase-Aktivitäten verschiedener stabiler Klone nach transienter Transfektion von pA81, in Anwesenheit (+ **Tet.**) oder Abwesenheit (- **Tet.**) von 1µg / ml Tetrazyklin.

4.3.4. Subklonierung der tet.TA exprimierenden VERO-tet.TA Klone

Für die Subklonierung der positiven VERO-tet.TA Klone wurden die Zellen auf eine Zellzahl von 100 Zellen pro 20ml verdünnt und je 100µl dieser Verdünnung auf die Löcher einer 98-Loch Platte verteilt. Statistisch sollte somit jedes zweite Loch der 98-Loch Platten eine einzige Zelle erhalten. Nach ca. 1-2 Wochen sind in einigen Löchern Klone herangewachsen, die dann sukzessiv über eine 48-Loch Platte, 24-Loch Platte und eine 25cm² Zellkulturflasche hochgezogen wurden. Insgesamt wurden 10 Subklone pepickt, die erneut nach Transfektion von pA81 Plasmid DNA in Abwesenheit und Anwesenheit von Tetrazyklin im Medium auf ihre Luciferase-Aktivität untersucht wurden (Abb. 4.3.4.).

Proben	Gemessene RLU (+ Tetrazyklin)	Gemessene RLU (- Tetrazyklin)
1. Lysispuffer	19462	19407
2. VERO-Zellen	23142	23187
3. VERO-tet.TA/SK1	28195	789410
4. VERO-tet.TA/SK2	25995	1265877
5. VERO-tet.TA/SK3	25761	3457612
6. VERO-tet.TA/SK4	20761	2875221
7. VERO-tet.TA/SK5	36187	986498
8. VERO-tet.TA/SK6	27244	3012565
9. VERO-tet.TA/SK7	24946	1754446
10. VERO-tet.TA/SK8	33057	2105756
11. VERO-tet.TA/SK9	25640	884789
12. VERO-tet.TA/SK10	38188	2347672

Abb. 4.3.4. Nachweis der tet.TA Expression in VERO-tet.TA Subklonen anhand der Luciferase-Aktivität. In der Tabelle sind die gemessenen Luciferase Werte der mit pA81 transfizierten, stabilen VERO-tet.TA Subklone (SK) in Anwesenheit und Abwesenheit von Tetrazyklin (1µg / ml) aufgeführt. (**Wert 1**) Referenzwert (Lysispuffer mit Glycyl-Glucinpuffer und D-Luciferin). (**Wert 2**) Negative Kontrolle, VERO-Zellen transfiziert mit pA81. (**Wert 3 - Wert 12**) Luciferase-Aktivitäten verschiedener stabiler Subklone nach transienter Transfektion von pA81, in Anwesenheit (+ **Tet.**) oder Abwesenheit (- **Tet.**) von 1µg / ml Tetrazyklin.

Von den Subklonen zeigt Subklon 3. eine Induktion der Luciferase-Aktivität in Abwesenheit von Tetrazyklin um das 134-fache. In Anwesenheit von 1 µg / ml Tetrazyklin liegen die gemessenen Luciferase-Aktivitäten bei den meisten Subklonen im Bereich der negativen Kontrolle. Subklon 10. zeigt im Vergleich zu den anderen Subklonen eine fast doppelt so grosse Luciferase-Aktivität in Abwesenheit von 1µg / ml Tetrazyklin. Dieser Unterschied zeigt, dass die Regulierbarkeit der endogenen Genexpression von der jeweiligen Integrationsstelle beeinflusst wird. Die niedrigste Induktion wurde bei Subklon 5., mit einer 27-fachen Steigerung der Luciferase-Aktivität, in Abwesenheit von Tetrazyklin gemessen.

4.3.5. Charakterisierung der *IE3* Genregulation in stabilen VERO-tet.TA Zellen

Wie die Ergebnisse der in Abschnitt 4.3.3. und 4.3.4. beschriebenen Experimente zeigen, ist nach Transfektion von pA81 Plasmid DNA in stabile VERO-tet.TA Zellen eine deutliche Regulierbarkeit der Luciferase Expression zu beobachten (siehe Abb.4.3.3. und 4.3.4.). In Anwesenheit von 1µl / ml Tetrazyklin im Medium von VERO-tet.TA Zellen liegt die gemessene Luciferase-Aktivität in allen stabilen Klonen im Bereich der negativen Kontrolle (Abb. 4.3.3. Messwert 4) bzw. im Bereich der Referenzwerte (Abb. 4.3.4. Messwert 1 u. 2). Diese Messwerte zeigen an, dass keine Luciferase Expression in diesen Zellen vorliegt bzw. die Expression des Luciferase Gens reprimiert ist. Ist kein Tetrazyklin im Medium der VERO-tet.TA Zellen, so konnten 24 Std. nach Transfektion von pA81 Plasmid DNA sehr hohe Messwerte für die Luciferase-Aktivität gemessen werden (siehe Abb. 4.3.3. Messwerte 8, 14 u. 18). Diese Messwerte zeigen eine starke Induktion der Luciferase Expression durch den konstitutiv exprimierten tet.TA an; der in Abwesenheit von Tetrazyklin an die tet.Ox7-CMV minimal-Promoter Sequenzen bindet und die Transkription des Luciferase Gens stimuliert. Eine mögliche Kreuzaktivierung durch den CMV *IE1* Enhancer / Promoter

des stabil integrierten pCMV-tet.TA Plasmids kann aufgrund der vorliegenden Ergebnisse ausgeschlossen werden. Um die Regulierbarkeit der *IE3* Expression in VERO-tet.TA Zellen zu charakterisieren, wurden VERO-tet.TA Zellen in Anwesenheit von 1 µg / ml Tetrazyklin im Medium und in Abwesenheit von Tetrazyklin im Medium mit 2 µg ptet.-*IE3* Plasmid DNA transfiziert. Der empfindlichste Test, der bereits geringe Mengen an ICP4 Protein anzeigt, ist der Komplementations-Test mit HSV-1 *d120*. Wachstum dieser *IE3* Deletionsmutante ist nur in Gegenwart von ICP4 Protein möglich. Eine minimale Repression der *IE3* Expression führt bereits zu einer starken Abnahme im Virustiter dieser Mutante (siehe Abschnitt 4.2.6.). Deshalb wurden die VERO-tet.TA Zellen 24 Std. nach Transfektion von ptet.-*IE3* Plasmid DNA mit HSV-1 *d120* (MOI=2) infiziert und für weitere 3 Tage in Anwesenheit von Tetrazyklin bzw. Abwesenheit von Tetrazyklin im Medium inkubiert. Danach wurde das Virus von den Zellen geerntet und auf E5-Zellen bzw. VERO-Zellen titriert (siehe Tabelle 4.3.5.). Für den direkten Nachweis der Tetrazyklin regulierbaren *IE3* Expression, wurden von den VERO-tet.TA Zellen 24 Std. nach Transfektion von ptet.-*IE3* Plasmid DNA totale Zelllysate hergestellt. Gleiche Volumina der einzelnen Zelllysate wurden mittels Westernblot-Analyse mit einem monoklonalen Maus Anti-ICP4 Antikörper auf ICP4 untersucht (siehe Abb.4.3.5.). Der Komplementations Test mit HSV-1 *d120*, sowie die Westernblot-Analyse totaler Zelllysate zeigen, dass eine mit der Luciferase Expression vergleichbare Regulierbarkeit der *IE3* Expression nicht erzielt wurde. Obwohl die Konstrukte pA81 und ptet.-*IE3* die gleichen tet.Ox7-CMVminimal-Promoter Sequenzen enthalten, wird die Luciferase Expression über das tet.-System reguliert und die *IE3* Expression offensichtlich nicht. Wie man der Abb. 4.3.5. entnehmen kann, lässt sich zwischen induzierten (Spur 6) und nicht-induzierten Zustand (Spur 5) kein Unterschied in der ICP4 Protein Menge erkennen. Ein Vergleich der Expressionsstärken von ptet.-*IE3* (Spur 5 u. 6) mit denen von pcDNA3-*IE3* (Spur 3 u. 4) weist darauf hin, dass die *IE3* Expression in Anwesenheit von Tetrazyklin bereits sehr stark ist und weit über dem Level einer minimalen Expression liegt. Um einen An- / Aus-Zustand der *IE3* Expression mit diesem System erzielen zu können, müsste demnach die starke minimale *IE3* Expression anstatt induziert reprimiert werden.

Plasmid DNA in VERO-tet.TA	Tetrazyklin (µg / ml)	Titer HSV-1 <i>d120</i> (pfu/ml)
pcDNA3	0	0
pcDNA3	1	0
pcDNA3- <i>IE3</i>	0	1.2x10 ⁵
pcDNA3- <i>IE3</i>	1	9.8x10 ⁴
ptet.- <i>IE3</i>	0	8.8x10 ⁴
ptet.- <i>IE3</i>	1	2.1x10 ⁴

Tabelle 4.3.5. Komplementation von HSV-1 *d120* in An- oder Abwesenheit von 1 µg/ml Tetrazyklin in VERO-tet.TA Zellen nach Transfektion von ptet.-*IE3* Plasmid DNA. VEROtet. TA Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von 1 µg/ml Tetrazyklin mit 2 µg ptet.-*IE3* Plasmid DNA transfiziert. 24 Std. nach der Transfektion wurden die Zellen mit HSV-1 *d120* (MOI=2) infiziert und für weitere 3 Tage in An- oder Abwesenheit von Tetrazyklin inkubiert. Das geerntete Virus wurde auf E5-Zellen titiert.

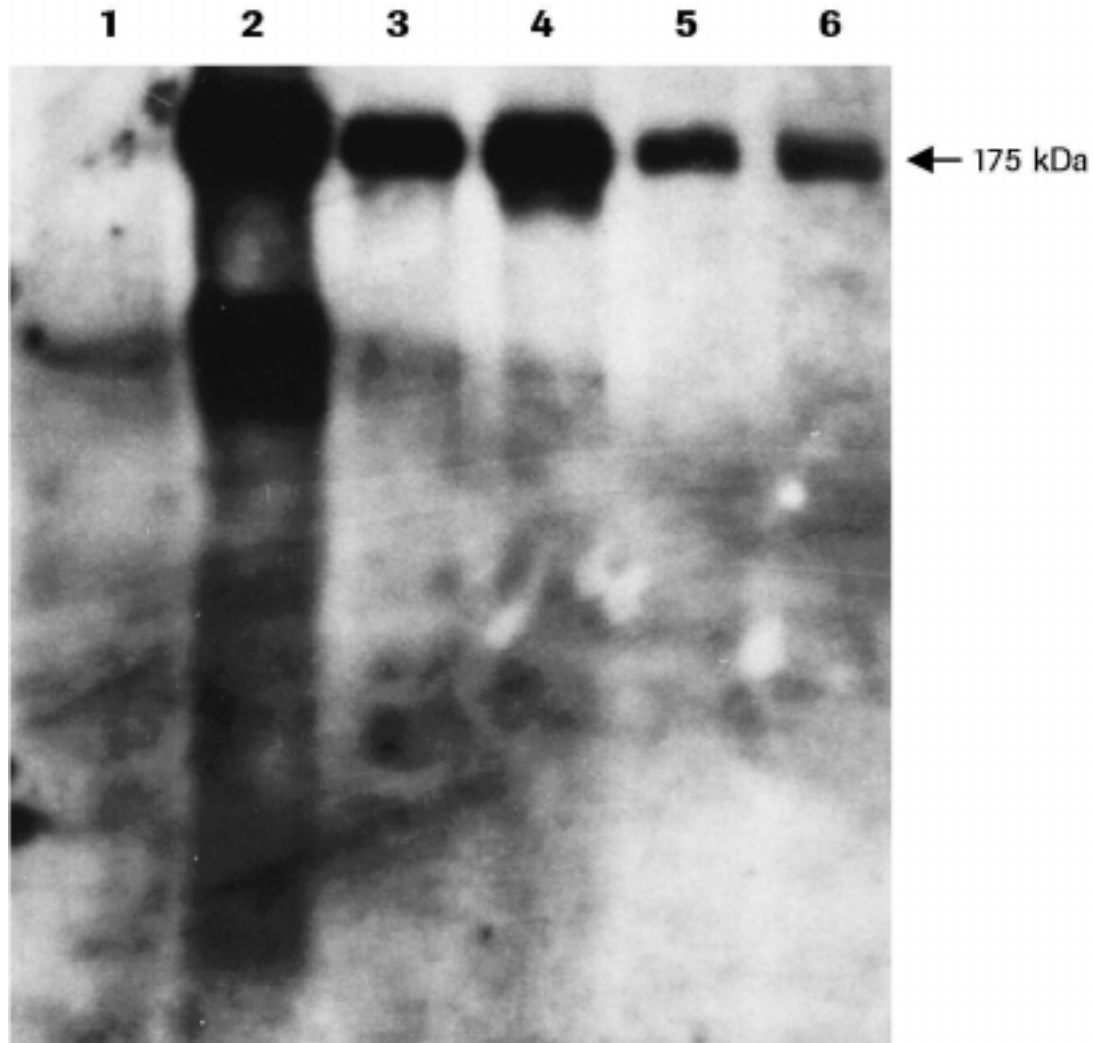


Abb. 4.3.5. Direkter Nachweis der Tetrazyklin regulierten *IE3* Expression nach Transfektion von *ptet.-IE3* in VERO-tet.TA Zellen mittels Westernblot-Analyse. 1×10^6 VERO-tet.TA Zellen wurden mit $2 \mu\text{g}$ *ptet.-IE3* Plasmid DNA in Ab- (**Spur 6**) und Anwesenheit von $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ Tetrazyklin (**Spur 5**) transfiziert und inkubiert. 24 Std. nach der Transfektion wurden totale Zelllysate hergestellt und gleiche Volumina in einem 8%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Als Kontrollen dienten VERO-tet.TA Zellen, die mit pcDNA3 Plasmid DNA (**Spur 1**), mit pcDNA3-*IE3* Plasmid DNA in Abwesenheit von Tetrazyklin (**Spur 3**) und in Anwesenheit von $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ Tetrazyklin (**Spur 4**) transfiziert wurden. Als zusätzliche positive Kontrolle dienten VERO-tet.TA Zellen, die für 5 Std. mit HSV-1 *5dl1.2* infiziert wurden (**Spur 2**). Die Molekulargewichtsbande von 175 kDa ist links eingezeichnet (Prestained Molekulargewichtsmarker, Gibco-BRL).

4.4. Tetrazyklin regulierbares Repressions-System

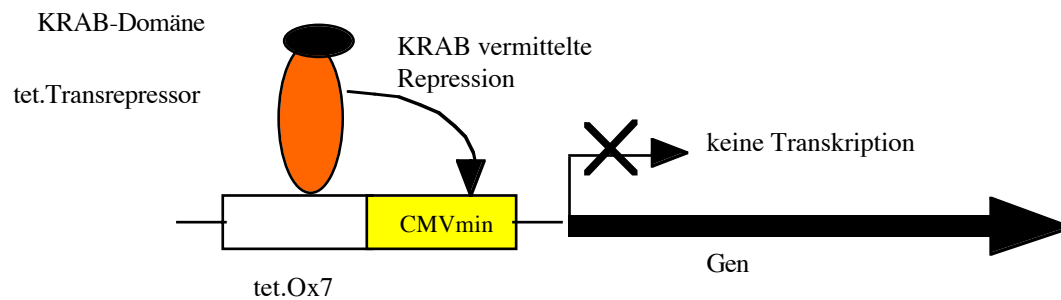
Anhand der bisherigen Ergebnisse lässt sich erkennen, dass die Verwendung des tet. Transaktivators für die Regulierbarkeit der *IE3* Expression nicht geeignet ist. In Anwesenheit von $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ Tetrazyklin ist die *IE3* Expression nach Transfektion von *ptet.-IE3* ebenso stark wie in Abwesenheit von Tetrazyklin. Offensichtlich ist die minimale Expression so stark, so dass eine Aktivierung über den tet. TA keine weitere Steigerung bewirkt. Um den Expressionslevel des *IE3* Gens zu reduzieren muss die *IE3* Expression gezielt reprimiert werden. Vermutlich lässt sich auf diesem Weg ein tatsächlicher An- / Aus-Zustand der *IE3* Genexpression mit dem tet.-System erreichen.

Ebenso wie der tet. Transaktivator, der die Genexpression in Abwesenheit von Tetrazyklin stimulieren kann, reprimiert ein Tetrazyklin sensibler Transrepressor (tet. TR) die Genexpression in Abwesenheit von Tetrazyklin (Abb. 4.4.). Der tet. TR ist ein Hybridprotein, das durch die Fusion der sog. KRAB-Domäne und der tet. Repressor DNA Bindungsdomäne aus dem Transposon 10 (*Tn10*) von *Escherichia coli* gebildet wurde. Die KRAB-Domäne ist eine konservierte Sequenz, die am N-Terminus der Zinkfinger Proteine des sog. Krüppel Typs (C2H2 Zinkfinger) enthalten ist (Bellefroid et al., 1991). Gelangt die KRAB-Domäne in die unmittelbare Nähe der DNA, so wird die transkriptionelle Aktivität eukaryontischer Promoter effizient reprimiert. Durch die Fusion der KRAB-Domäne mit dem tet. Repressor (tet.TR-KRAB), steht die KRAB vermittelte Repression des Hybridproteins unter der Kontrolle von Tetrazyklin. In transienten Transfektionen zeigte Deutsche et al. anhand eines Luciferase Reporterkonstruktes, das die Luciferase Expression durch die Bindung des tet.TR-KRAB Hybridproteins an die tet.Operator (tet.O) Sequenzen stromaufwärts vom CMV IE1 Enhancer / Promoter reprimiert wird. In doppelstabilen HeLa-Zellen, die konstitutiv tet.TR-KRAB exprimieren und ein chromosomal integriertes p_{tet}.Ox7-CMV-Luciferase Reporterkonstrukt tragen, wurde eine 50-fache Zunahme der Luciferase Expression (über den basalen Expressionslevel) in der Gegenwart von Tetrazyklin gemessen (Deutsche et al., 1995).

4.4.1. Tetrazyklin regulierte *IE3* Genrepression

Um die Tetrazyklin abhängigen Repressionseigenschaften von dem tet. TR auf die *IE3* Expression zu testen, wurden stabile HeLa-tet.TR-KRAB Zellen (von Dr. U. Deutsche) mit 2 µg p_{tet}.-*IE3* Plasmid DNA transfiziert und in Ab- bzw. Anwesenheit von 1 µg / ml Tetrazyklin inkubiert. 48 Std. nach der Transfektion wurden die Zellen für die Herstellung totaler Zelllysate geerntet oder 24 Std. nach der Transfektion mit HSV-1 *d120* (MOI=2) infiziert. 3 Tage nach der Infektion mit HSV-1 *d120* wurden die Viren geerntet und auf E5-Zellen bzw. VERO-Zellen titriert (Tabelle 4.4.1.). Von den totalen Zelllysaten wurden gleiche Volumina für die Durchführung einer Westernblot-Analyse zum Nachweis des ICP4 Proteins in einem 8%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der Nachweis von ICP4 erfolgte mit einem monoklonalen Maus Anti-ICP4 Antikörper (Abb.4.4.1.). Die Ergebnisse der beiden Experimente zeigen, dass die Verwendung des tet. TR eine minimale Verbesserung der *IE3* Regulierbarkeit im Vergleich zum tet. TA-System bewirkt. Der Virustiter von HSV-1 *d120* konnte durch die KRAB-Domäne vermittelte Repression der *IE3* Expression in HeLa-tet.-KRAB Zellen bis zu 95% reduziert werden (siehe Tabelle 4.4.1.). Dieses und die vorherigen Resultate (siehe Abschnitt 4.3.) bestätigen die Korrelation zwischen *IE3* Expressionslevel und Viruswachstum. Eine Abnahme im *IE3* Expressionslevel führt zu einem reduzierten Viruswachstum bzw. Virustiter (siehe Tabelle 4.4.1. u. Abb. 4.4.1.). Eine stärkere Repression der *IE3* Expression würde demzufolge das Viruswachstum vollständig blockieren und nach Aufhebung der Repression das Viruswachstum induzieren. Im tet.-System liegt der *IE3* Expressionslevel jedoch weit über diesem Wert, so dass eine vollständige Repression des Viruswachstums mit diesem System ausgeschlossen werden kann. Auf der anderen Seite wurde gezeigt, dass mit einem Luciferase Reporterkonstrukt ein An- / Aus-Zustand der Luciferase Expression erreicht wurde und eine 37-fache Induktion innerhalb von 24 Std. gemessen werden konnte (siehe Abb. 4.3.3.). Die geringfügigen Unterschiede im *IE3* Expressionslevel zwischen induzierten und nicht-induzierten Zustand im Vergleich dazu lassen vermuten, dass die Expression nur teilweise über das tet.-System reguliert wird.

A) Abwesenheit von Tetrazyklin



B) Anwesenheit von Tetrazyklin

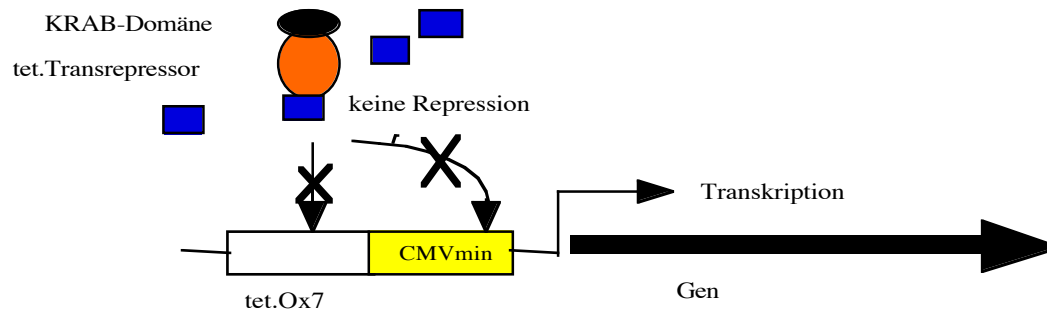


Abb. 4.4. Tetrazyklin regulierbares Transrepressions- System. (A) In der Abwesenheit von Tetrazyklin bindet der tet. Transrepressor an die tet.Ox7 Sequenzen und reprimiert über die KRAB-Domäne die Transkription des Gens vom CMV minimal-Promotor. (B) In der Anwesenheit von Tetrazyklin bindet Tetrazyklin an den tet. Transrepressor, wodurch dieser seine Konformation verändert. Hierdurch wird die Bindung an die tet.Ox7 Sequenzen verhindert und die KRAB vermittelte Repression der Transkription aufgehoben.

Tetrazyklin ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	Plasmid DNA in HeLa- tet.TR-KRAB	Titer HSV-1 <i>d120</i> (pfu/ml)
0	pcDNA3	0
1	pcDNA3	0
0	pcDNA3- <i>IE3</i>	7.8×10^4
1	pcDNA3- <i>IE3</i>	9.0×10^4
0	ptet.- <i>IE3</i>	3.2×10^4
1	ptet.- <i>IE3</i>	1.2×10^3

Tabelle 4.4.1. Komplementation von HSV-1 *d120* in An- oder Abwesenheit von $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ Tetrazyklin in HeLa-tet.TR-KRAB Zellen nach Transfektion von ptet.-*IE3* Plasmid DNA. HeLa-tet.TR-KRAB Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ Tetrazyklin mit $2 \mu\text{g}$ ptet.-*IE3* Plasmid DNA transfiziert. 24 Std. nach der Transfektion wurden die Zellen mit HSV-1 *d120* (MOI=2) infiziert und für weitere 3 Tage in An- oder Abwesenheit von Tetrazyklin inkubiert. Das geerntete Virus wurde auf E5-Zellen titiert.

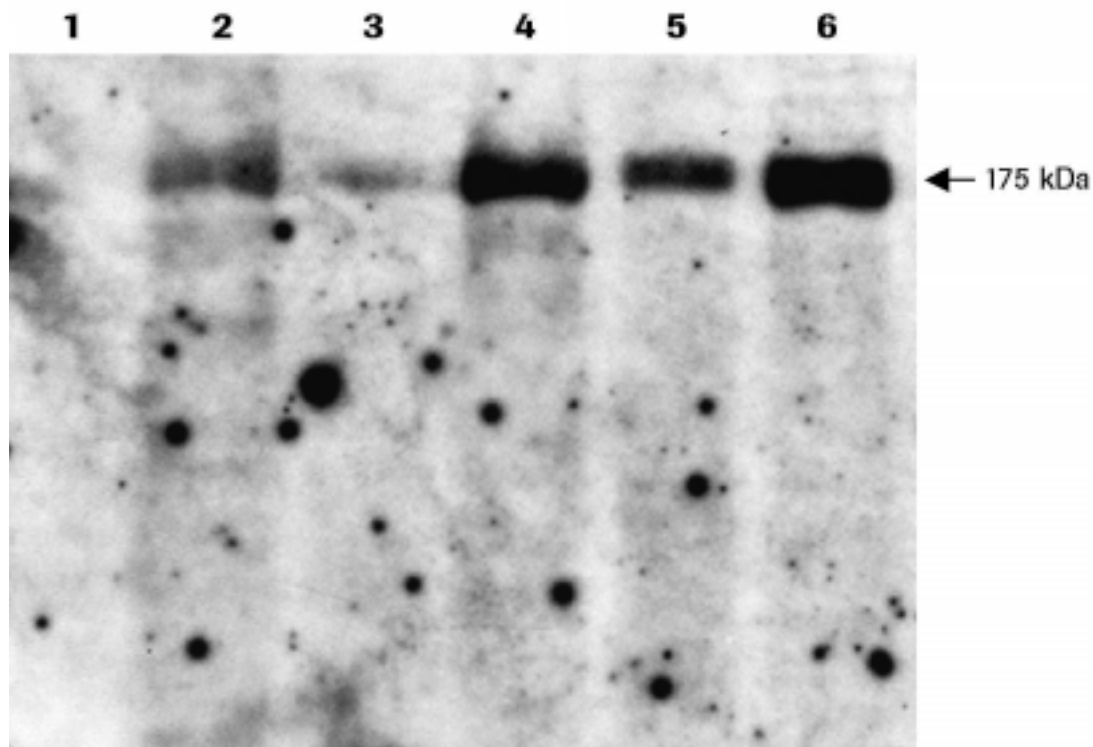


Abb.4.4.1. Nachweis der Tetrazyklin regulierten *IE3* Genexpression in stabilen HeLa-tet.TR-KRAB Zellen mittels Westernblot-Analyse. (**Spur 1**) HeLa-tet.TR-KRAB Zellen transfiziert mit pcDNA3. (**Spur 2**) HeLa-tet.TR-KRAB Zellen transfiziert mit ptet.-*IE3*, in Anwesenheit von 1 μ g / ml Tetrazyklin. (**Spur 3**) HeLa-tet.TR-KRAB Zellen transfiziert mit ptet.-*IE3*, in Abwesenheit von Tetrazyklin. (**Spur 4**) HeLa-tet.TR-KRAB Zellen transfiziert mit pcDNA3-*IE3*, in Anwesenheit von 1 μ g / ml Tetrazyklin. (**Spur 5**) HeLa-tet.TR-KRAB Zellen transfiziert mit pcDNA3-*IE3*, in Abwesenheit von Tetrazyklin. (**Spur 6**) HeLa-tet.TR-KRAB Zellen 5 Std. nach Infektion mit HSV-1 *5dl1.2* (MOI=1).

4.4.2. Der Einfluss von ICP4 auf das Tetrazyklin Expressionssystem

Die widersprüchlichen Ergebnisse, die mit dem Tetrazyklin Expressionssystem bei der Regulierung des Luciferase Gens bzw. des *IE3* Gens erhalten wurden, weisen daraufhin, dass die Unterschiede in der Regulierbarkeit auf das zu regulierende Gen zurückzuführen sind. Während die Luciferase Expression über das tet. System reguliert werden kann, zeigt das *IE3* Gen nur eine minimale Regulierbarkeit im tet. System. Eine Autoregulation über das *IE3* Genprodukt ICP4 wäre hierbei denkbar, da ICP4 selbst ein Transkriptionsfaktor ist und zur Aktivierung verschiedenster Promoter befähigt ist. Gu und DeLuca (1994) konnte in ihren Experimenten zeigen, dass ICP4 selbst minimal- Promoter, die nur aus einer TATA-Box bestehen, deutlich stimulieren kann. Eine genauere Analyse der tet.Ox7- CMV minimal-Promoter Sequenz ergab, dass neben mehreren Bindungsstellen für verschiedene basale Transkriptionsfaktoren (wie z.B. Sp1, TIFII und TBP) ebenso zwei mögliche Bindungsstellen für ICP4 in der Sequenz enthalten sind. Die Sequenzen der möglichen ICP4 Bindungsstellen stimmen mit Ausnahme von einigen Nukleotiden mit der von Faber und Wilcox (1986) beschriebenen ICP4 Bindungssequenz überein. Die mutmasslichen ICP4 Bindungsstellen liegen in ptet.-*IE3* einige Nukleotide stromabwärts von der TATA-Box im CMV minimal-Promoter, sowie wenige Nukleotide stromaufwärts vom Translationsstart der *IE3* Sequenz. Die zweite mutmassliche ICP4 Bindungsstelle ist durch die Klonierung des *IE3* Gens in pN721 entstanden und liegt somit nur in Plasmid

ptet.-*IE3* vor. In Plasmid pA81 ist die zweite mutmassliche ICP4 Bindungsstelle nicht vorhanden. Das Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass die verstärkte minimale *IE3* Expression durch die Interaktion von ICP4 mit verschiedenen basalen Transkriptionsfaktoren und die dadurch hervorgerufene Aktivierung des CMV minimal-Promoters verursacht wird. In den folgenden Experimenten wurde die mögliche Transaktivierung des tet.Ox7 CMV minimal-Promoters durch ICP4 untersucht.

4.4.3. ICP4 vermittelte Transaktivierung des tet.Ox7-CMV minimal-Promoters

Um die in Abschnitt 4.4.2. aufgestellte Hypothesen zu überprüfen, wurden das Luciferase Reporterkonstrukt pA81 (tet.Ox7-CMV minimal-Promoter-Luciferase Gen) und ein *IE3* exprimierendes Konstrukt (pcDNA3-*IE3*) in VERO-Zellen cotransfiziert (Abb.4.4.3.). Sollte ICP4 tatsächlich an den tet.Ox7-CMV minimal-Promoter binden und durch Interaktionen mit basalen Transkriptionsfaktoren die Transkription vom tet.Ox7-CMV minimal-Promoter stimulieren, so sollte ICP4 die gleiche stimulierende Wirkung unabhängig von Tetrazyklin in *trans* auf das Luciferase Reporterkonstrukt ausüben. Findet dagegen keine ICP4 vermittelte Stimulation der Luciferase Expression nach Cotransfektion beider Plasmide statt, so muss man weiterhin vermuten, dass ICP4 die *IE3* Transkription in ptet.-*IE3* über die zweite mutmassliche ICP4 Bindungsstellen aktiviert. 1 μ g pA81 Plasmid DNA und 1 μ g pcDNA3-*IE3* Plasmid DNA oder 1 μ g pA81 Plasmid DNA und 1 μ g ptet.-*IE3* Plasmid DNA wurden in An- oder Abwesenheit von 1 μ g / ml Tetrazyklin in VERO-Zellen cotransfiziert. 24 Std. nach der Transfektion wurden die Zellen in Lysispuffer lysiert und die Luciferase Aktivität in den Proben gemessen. Als Kontrollen dienten VERO-Zellen, die entweder nur mit 2 μ g pA81 Plasmid DNA, oder mit 1 μ g pA81 Plasmid DNA und 1 μ g pUC-Combi-CMV Plasmid DNA, das den tet.TA exprimiert, sowie mit 1 μ g pA81 Plasmid DNA und 1 μ g pCMV-tet.R-KRAB Plasmid DNA, das den TetR-KRAB exprimiert, und mit 2 μ g pCMV-beta plasmid DNA in An- oder Abwesenheit von 1 μ g / ml Tetrazyklin transfiziert bzw. cotransfiziert wurden.

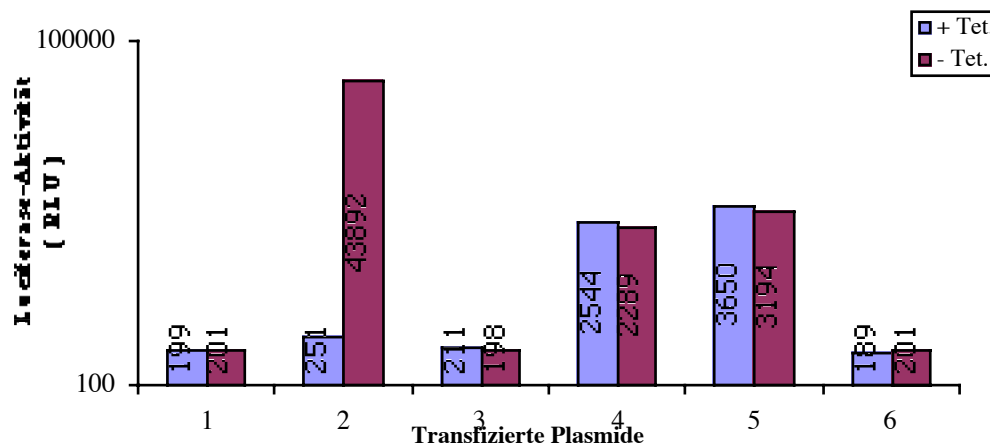


Abb. 4.4.3. ICP4 vermittelte Transaktivierung der tet.Ox7-CMV minimal-Promotor Sequenz. Die Grafik zeigt die gemessenen Luciferase Aktivitäten 24 Std. nach Transfektion. (1) VERO-Zellen transfiziert mit pA81. (2) VERO-Zellen cotransfiziert mit pA81 und pUC-Combi-CMV (tet. TA). (3) VERO-Zellen cotransfiziert mit pA81 und pCMV-tet.R-KRAB (tet.TR). (4) VERO-Zellen cotransfiziert mit pA81 und ptet.-*IE3*. (5) VERO-Zellen cotransfiziert mit pA81 und pcDNA3-*IE3*. (6) VERO-Zellen transfiziert mit pCMV-beta. (+ Tet.) In Anwesenheit von 1 μ g / ml Tetrazyklin und (- Tet.) Anwesenheit von Tetrazyklin. Die angegebenen Messwerte entsprechen den Durchschnittswerten von drei unabhängig durchgeführten Transfektionen und Messungen.

Wie die gemessenen Luciferase Werte erkennen lassen, funktioniert die Induktion der Luciferase Expression über den tet.TA. Bei Abwesenheit von Tetrazyklin im Medium steigt die Luciferase Aktivität innerhalb von 24 Std. auf das 174.5-fache des gemessenen Wertes in Anwesenheit von 1µg / ml Tetrazyklin im Medium an. Auch die gemessenen Werte für die Cotransfektion von pA81 und tet.TR exprimierendem Plasmid weisen darauf hin, dass keine bzw. eine absolut minimale Luciferase Expression bei ausbleibender Stimulation des tet.Ox7-CMV minimal-Promoter Elements vorliegt. Dagegen wurde bei Cotransfektion von pA81 und ptet.*IE3*, sowie pA81 und pcDNA3-*IE3* eine höhere Luciferase Aktivität gemessen. Die vorliegenden Messwerte zeigen deutlich eine transaktivierende Wirkung von ICP4 auf den tet.Ox7-CMV minimal-Promoter, dennoch ist die gemessene Transaktivierung durch ICP4 im Vergleich zum tet. TA relativ gering. Vermutlich spielt die zweite ICP4 Bindungsstelle im *IE3* Gen eine zusätzliche Rolle bei der Aktivierung, so dass hierdurch eine stärkere Induktion der *IE3* Expression erreicht werden kann. Das Ergebnis zeigt jedoch, dass eine ausreichende Regulierbarkeit des *IE3* Gens mit dem tet.System nicht möglich ist.

4.5. Tetrazyklin regulierte *IE3* Expression von pHSV-tet.-*IE3/lacZ* Amplikon Vektor

Die Genregulation von HSV-1 ist eng an den Replikationszyklus des Virus in der Wirtszelle gekoppelt (Preston, 1979; Watson & Clements, 1978; Dixon & Schaffer, 1980). In neuronalen Zellen werden die meisten Gene reprimiert und das Virus geht in den sog. Latenten Zustand über. Mit Ausnahme der “ Latency Associated Transcripts “ (LATs) lassen sich in den neuronalen Zellen keine weitere virale Transkripte nachweisen. Durch verschiedene äussere Einflüsse schaltet das Virus vom latenten auf den lytischen Zustand um und beginnt mit der viralen Genexpression. Die zeitliche Abfolge der einzelnen Genklassen ist genaustens mit dem Replikationszyklus des Virus verknüpft. Während die Immediate Early(IE) Gene in den ersten 6-8 Stunden stark exprimiert werden, sinkt die Expression dieser Genklasse bei zunehmendem Anstieg der early (E) und late (L) Gene wieder ab. Mit der viralen DNA Replikation nimmt die Zahl der einzelnen viralen Genkopien in der Wirtszelle stetig zu, wodurch die Menge an Genprodukt ebenfalls ansteigt. In einer komplementierenden Zelllinie, liegt das virale Gen dagegen in einer begrenzten Kopienzahl integriert im Genom der Zelle vor, so dass sich seine Kopienzahl während der Virusreplikation nicht mehr verändert. In diesem Fall ist die Genexpression nicht an die Virusreplikation gekoppelt und findet unabhängig von dieser statt. Wird das komplementierende Gen dagegen von einem Amplikon HSV-1 Vektor bereitgestellt, so ist bei Superinfektion mit einem Helfervirus die Genexpression wieder an den Replikationszyklus gekoppelt. Um die Tetrazyklin abhängige *IE3* Genexpression von einem HSV-1 Amplikon Vektor untersuchen zu können, wurde die tet. Ox7 CMV minimal-Promoter-*IE3* Expressionskassette aus pCtet.-Combi-*IE3* in den pHSVPrPUC HSV-1 Amplikon Vektor (Geller *et. al.*, 1993) kloniert.

4.5.1. Konstruktion von pHSV-tet.*IE3/lacZ*

Für die Konstruktion von pHSV-tet.*IE3/lacZ* wurde die tet.Ox7-CMV minimal-Promoter / *IE3* Sequenz mit *HindIII* aus pCtet.-Combi-*IE3* herausgeschnitten und in die *HindIII* Schnittstelle von pHSVPrPUC (Geller *et al.*, 1993) kloniert, wodurch der Amplikon Vektor pHSV-tet.*IE3* entstand. Die Orientierung der tet.Ox7-CMV minimal-Promoter / *IE3* Sequenz wurde mit verschiedenen Restriktionsverdauern ermittelt. In einem zweiten Klonierungsschritt wurde die CMV-*lacZ* Expressionskassette mit *EcoRI* / *Sal I* aus dem Plasmid pCMV-beta (Clontech) isoliert und in die *EcoRI/SalI* Schnittstelle von pHSV-tet.*IE3* kloniert, wodurch schliesslich das Konstrukt pHSV-tet.*IE3/lacZ* gebildet wurde. Der Amplikon Vektor enthält desweiteren die sog. “ a - Sequenz “ (Verpackungssignal) von HSV-1; den Replikationsursprung *ori_s* für die Replikation der Amplikon DNA in HSV-1 infizierten Zellen; den HSV-1 *IE4/5*

Promoter am 3'Ende des *IE3* Gens, sowie den ColE1 ori und das Ampicillin Resistenzgen für die Amplifikation und Selektion in Bakterien. Die konstitutive Expression des *lacZ*-Reportergens wurde nach transients Transfektion in VERO-Zellen mittels X-Galfärbung überprüft.

4.5.2. Tetrazyklin regulierte *IE3* Expression nach Transfektion von pHSV-tet.*IE3/lacZ* in VERO-Zellen.

Um die Tetrazyklin regulierte *IE3* Expression im Amplikon Vektor zu studieren, wurden VERO-tet.TA Zellen mit 2 μ g pHSV-tet.*IE3/lacZ* Amplikon DNA in einer 6-Loch Platte transfiziert. 6 Std. nach der Transfektion wurden die Zellen trypsiniert, homogenisiert und in zwei Ansätze geteilt. Die einen Ansätze erhielten verschiedene Konzentrationen Tetrazyklin ins Medium, die anderen Ansätze nicht. Nach weiteren 24 Std. wurden die Zellen beider Ansätze geerntet und totale Zelllysate hergestellt. Gleiche Volumina der einzelnen Zelllysate wurden in einem 8%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und das ICP4 Protein mit einem monoklonalen Maus Anti-ICP4 Antikörper (ABI) im Westernblot nachgewiesen (Abb.4.5.2.). Der HSV-1 IE4/5 Promoter enthält ICP4 Bindungsstellen, wodurch ICP4 Protein für eine Stimulation des tet.Ox7-CMV minimal-Promoters reduziert werden kann. Ausserdem führt eine vom HSV-1 IE4/5 Promoter initiierte Transkription zur Bildung von Antisense RNA, wodurch die Translation der *IE3* mRNA blockiert werden könnte. Aufgrund dieser beiden Eigenschaften könnte eine bessere Regulation der *IE3* Expression mit pHSV-tet.*IE3/lacZ* erreicht werden.

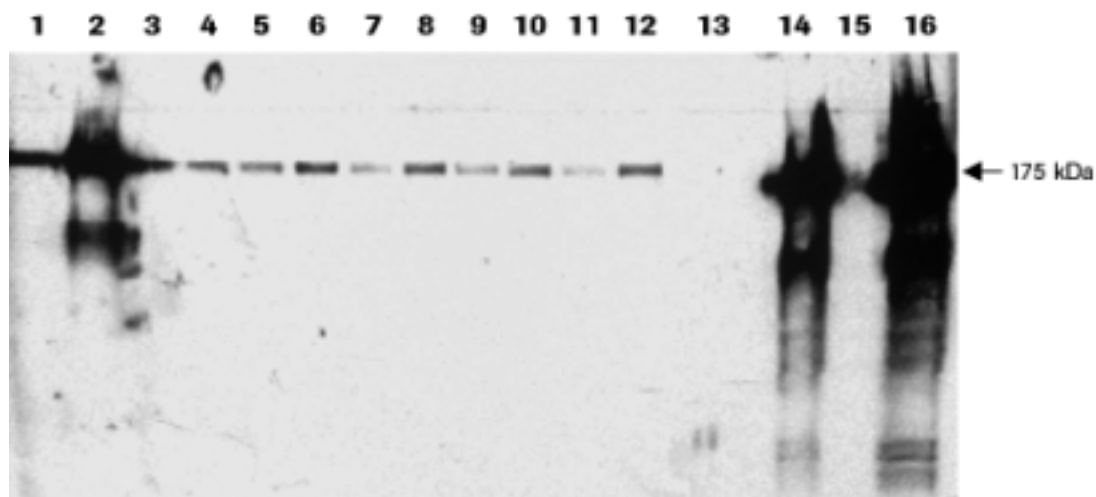


Abb. 4.5.2. Nachweis der Tetrazyklin regulierten *IE3* Expression nach Transfektion von pHSV-tet.*IE3/lacZ* in VERO-Zellen mittels Westernblot-Analyse. (Spur 1) VERO-tet.TA Zellen 5Std. nach Infektion mit HSV-1 *5dl1.2* (MOI=1). (Spur 2,14 und 16) VERO-tet.TA Zellen 5 Std. nach Infektion mit *wt* HSV-1 (MOI=1). (Spur 3,5,7,9, und 11) VERO-tet.TA Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Tetrazyklin im Medium (0.4 μ g/ml, 0.8 μ g/ml, 1,5 μ g/ml, 3 μ g/ml und 6 μ g/ml), 30 Std. nach Transfektion von pHSV-tet.*IE3/lacZ*. (Spur 4,6,8,10 und 12) VERO-tet.TA Zellen in Abwesenheit von Tetrazyklin im Medium, 30 Std. nach Transfektion von pHSV-tet.*IE3/lacZ*. (Spur 13) VERO-tet.TA Zellen in Abwesenheit von Tetrazyklin, nach Transfektion mit pHSVPrUC. (Spur 15) Nicht transfizierte VERO-tet.TA Zellen in Abwesenheit von Tetrazyklin. Die Molekulargewichtsmarker-größen sind an der linken Seite eingezeichnet (Gibco-BRL).

Die in Abb. 4.5.2. dargestellte Westernblot-Analyse zeigt, dass die *IE3* Expression im pHSV-tet.*IE3/lacZ* Amplikon Vektor besser regulierbar ist als vergleichsweise im pCtet.-*IE3* Combi Konstrukt (siehe Abschnitt 4.2.) oder im ptet.-*IE3* Konstrukt (siehe Abschnitt 4.3.). Die Intensitäts-Messung der einzelnen Banden auf dem Röntgenfilm, mit dem NIH-Image Software Programm, zeigen eine stetige Abnahme an ICP4 Protein mit zunehmender Tetrazyklin Konzentration im Medium (Spur 3,5,7,9,und 11) (siehe Abb. 4.5.2.1.). Der stärkste Effekt von Tetrazyklin wurde bei einer Konzentration von 6 µg / ml gemessen mit einer Intensität von 326 (Spur 11). Die in Abwesenheit von Tetrazyklin inkubierten Zellen zeigen alle, 30 Std. nach Transfektion mit pHSV-tet.*IE3/lacZ*, eine ICP4 Bande mit einer Intensität von 1450 ± 50 (Spur 4,6,8,10 und 12). Die *IE3* Expression konnte somit bei einer Enkonzentration von 6 µg / ml Tetrazyklin im Medium der mit pHSV-tet.*IE3/lacZ* transfizierten VERO-tet.TA Zellen um das 4.5-fache reduziert werden. Reicht eine 4.5-fache Reduktion der *IE3* Expression für die Repression der *IE3* Deletionsmutante HSV-1 *d120* aus? Diese Frage wurde mit dem folgenden Experiment beantwortet.

4.5.3. Verpackung von pHSV-tet.*IE3/lacZ* Amplikon DNA in VERO-Zellen mittels HSV-1 *d120* Helfervirus in An- oder Abwesenheit von Tetrazyklin

Um den Einfluss der reduzierten *IE3* Expression von pHSV-tet.*IE3/lacZ* in Anwesenheit von 6 µg / ml Tetrazyklin auf die Virusreplikation bzw. das Viruswachstum zu untersuchen, wurden VERO-Zellen mit pHSV-tet.*IE3/lacZ* Amplikon DNA transfiziert und in An- oder Abwesenheit von Tetrazyklin (6 µg / ml) inkubiert. 24 Std. nach der Transfektion wurden die Zellen mit HSV-1 *d120* (MOI=2) infiziert und für weitere 3 Tage in An- oder Abwesenheit von Tetrazyklin (6 µg / ml) inkubiert. Als Kontrolle wurden E5-Zellen mit pHSV-lacZ Amplikon DNA und pHSV-tet.*IE3/lacZ* Amplikon DNA transfiziert und 24 Std. nach der Transfektion mit HSV-1 *d120* (MOI=2) infiziert. Am dritten Tag wurden die Zellen geerntet und das Virus präpariert. Die einzelnen Virusstocks wurden auf E5-Zellen für die Titration von HSV-1 *d120*, und auf VERO-Zellen für die Titration von pHSV-tet.*IE3/lacZ* und die Bestimmung von Revertanten mit Wildtyp Phenotyp titriert. Der in infektiöse HSV-1 Partikel verpackte Amplikon Vektor kann aufgrund der konstitutiven Expression von beta-Galaktosidase nach Infektion von VERO-Zellen mit der X-Galfärbung in den Zellen nachgewiesen werden. Die nach Zugabe von X-Gal Lösung blau gefärbten Zellen wurden unter dem Lichtmikroskop ausgezählt und durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor der Amplikon Titer als " Transducing Unit " (TU) bestimmt (Tabelle 4.5.3.).

Virusstock	Tetrazyklin ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	Amplikon (TU)	Helfervirus (pfu)	Ratio (A / H)	Revertanten (pfu)
E5/pHSV- <i>lacZ</i>	6	1.5×10^5	1×10^6	0.0015	1×10^2
E5/pHSV- <i>lacZ</i>	0	1.2×10^3	9×10^5	0.0013	1.3×10^2
E5/pHSVtet. <i>IE3/lacZ</i>	6	3.6×10^3	2.7×10^5	0.015	1.4×10^3
E5/pHSVtet. <i>IE3/lacZ</i>	0	8.3×10^3	6.1×10^5	1.7.	1.6×10^3
VERO-tet.TA	6	7.5×10^4	9×10^5	0.08	5.2×10^3
pHSVtet. <i>IE3/lacZ</i>	0	2×10^5	4×10^4	5	1×10^4
pHSVtet. <i>IE3/lacZ</i>	6	9.1×10^3	6×10^5	0.013	1.2×10^3
pHSVtet. <i>IE3/lacZ</i>	0	2.2×10^4	1.3×10^4	0.014	6.2×10^3

Tabelle 4.5.3. Verpackung von pHSV-tet.*IE3/lacZ* Amplikon DNA in VERO-Zellen mittels HSV-1 *dI20* Helfervirus in An- oder Abwesenheit von Tetrazyklin. Die Virusstocks wurden durch Transfektion von HSV-1 Amplikon DNA in VERO-tet.TA Zellen bzw. E5-Zellen und 24 Std. später durch Infektion mit HSV-1 *dI20* Helfervirus hergestellt. Der Amplikon Titer wurde mittels X-Gal Färbung 16 Std. nach Infektion in VERO-Zellen ermittelt. Revertanten mit Wildtyp Phenotyp wurden mittels Plaquetitration auf VERO-Zellen detektiert. HSV-1 *dI20* Helfervirus wurde ebenfalls durch Plaquetitration auf E5-Zellen titriert. Die Ratio (A / H) ist der Amplikon Titer dividiert durch den Helfervirus Titer.

Eine 100%ige Repression der HSV-1 *dI20* Mutante wurde nicht erreicht. Die Tetrazyklin regulierte *IE3* Expression ist auch im pHSV-tet.*IE3/lacZ* Amplikon zu stark um das Wachstum der *IE3* Virus Mutante vollständig zu reprimieren. Die Repression von HSV-1 *dI20* beträgt in Anwesenheit von Tetrazyklin ($6 \mu\text{g} / \text{ml}$) 98%. Bezieht man den verpackten Amplikon Vektor in die Rechnung mit ein, so beträgt die absolute Repressionsstärke 94%. Diese Repressionsstärke von HSV-1 *dI20* Wachstum liegt in den gleichen Größenordnungen, die bereits bei Anwesenheit von $4 \mu\text{g} / \text{ml}$ Tetrazyklin im Medium von stabilen VEROtet.-*IE3* Zellen gemessenen wurden (siehe Abschnitt 4.2.). Dennoch ist der auf diesem Weg produzierte Amplikontiter sehr hoch. Pechan et al. (1996) berichteten von einem ähnlichem System (dem sog. “ Piggyback “ Verpackungssystem), bei dem die *IE3* Expression im Amplikon Vektor unter der Kontrolle verschiedener Promoter (wie P-SV40, P-JCV und P-CMV) steht und nach Transfektion sowie anschliessender Infektion mit HSV-1 *dI20* in der ersten Replikationsrunde (P0) geringere Amplikontiter produzierte wurden. Das hier vorgestellte Tetrazyklin regulierte Amplikon Verpackungssystem bietet die Möglichkeit zur Produktion hoher Amplikontiter in der ersten Replikationsrunde.

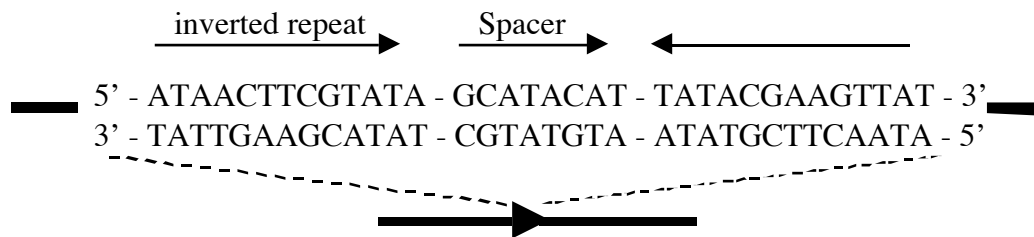
4.6. Cre Rekombinase induzierte Genexpression

Die mit dem Tet.-System erzielten Ergebnisse lassen klar erkennen, dass dieses System für die Regulierbarkeit der *IE3* Genexpression nicht geeignet ist. Der Grund hierfür ist die starke, basale Expression des *IE3* Gens im nicht-induzierten Zustand, die eine An / Aus Regulation der *IE3* Genexpression nicht erlaubt. Hierdurch wird in den Zellen ausreichend ICP4 Protein synthetisiert, das durch die Interaktion mit verschiedenen basalen Transkriptionsfaktoren den CMV minimal-Promoter aktiviert und das Tet.-System von der Regulierbarkeit über Tetrazyklin entkoppelt. Andere regulierbare Expressionssysteme, die auf ähnlichen Komponenten aufgebaut sind, zeigen ebenfalls eine basale Genexpression im nicht-induzierten Zustand, so dass auch diese System für die Regulation der *IE3* Genexpression ausgeschlossen werden können. Für die Regulation der *IE3* Genexpression ist eine 100%-ige Repression der Genexpression im nicht-induzierten Zustand erforderlich, da ansonsten die im Tet.-System beschriebenen Probleme bei der Regulation auftreten können. Das Cre/loxP Rekombinationssystem unterscheidet sich in seinen Komponenten deutlich von denen regulatorischer Expressionssysteme und bietet die Möglichkeit der 100%-igen Repression der Genexpression, sowie die spezifische Induktion der Genexpression. Aufgrund dieser Eigenschaften wurde das Cre/loxP Rekombinationssystem für die Regulation der *IE3* Genexpression ausgewählt und zunächst durch die Verwendung von Reportergenen auf seine Effizienz getestet.

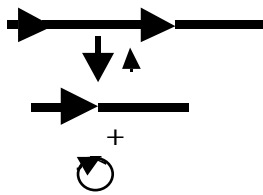
4.6.1. Das Cre/loxP Rekombinationssystem

Das Cre/loxP Rekombinationssystem (Sternberg *et al.* , 1978a und 1978b) basiert auf einer spezifischen DNA Rekombinase, die eine spezifische DNA-Sequenz erkennt. Derartige Enzyme und DNA-Sequenzen findet man in Bakterien und Hefen. Die sog. Cre Rekombinase (causes recombination) ist ein 38kDa Protein aus dem Bakteriophagen P1 (Sternberg *et al.*, 1986). Cre Rekombinase katalysiert die Rekombination zwischen zwei identische, spezifischen DNA-Sequenzen von jeweils 34 Basenpaaren, die man als loxP (locus of crossing over (x)) bezeichnet (Sternberg & Hamilton, 1981). Die von Cre Rekombinase katalysierte Rekombination zwischen zwei loxP-Sequenzen benötigt keine weiteren Cofaktoren. Aufgrund dieser Eigenschaften ist das Cre/loxP Rekombinationssystem ein nützliches Werkzeug für die Gentechnik (Kilby *et al.*, 1993). Eine loxP-Sequenz besteht aus zwei invertierten Sequenzwiederholungen von jeweils 13 Basenpaaren, die eine asymmetrische Kernregion von 8 Basenpaaren flankieren. Die asymmetrische Kernregion definiert die Orientierung der jeweiligen loxP-Sequenz. Die Rekombination zwischen zwei loxP-Sequenzen erfolgt durch das Binden von zwei Cre Rekombinase Untereinheiten an die invertierten Sequenzwiederholungen einer jeden loxP-Sequenz und die darauffolgende Spaltung der DNA in der Kernregion (Mack *et al.*, 1992). Die von Cre Rekombinase katalysierte Rekombination ist reversibel und das Ausmass der Rekombination ist proportional der Menge an exprimierter Rekombinase. Die Orientierung der loxP-Sequenzen zueinander ermöglicht verschiedene DNA Rearrangements, diese sind in der Abbildung 4.6.1. zusammengefasst.

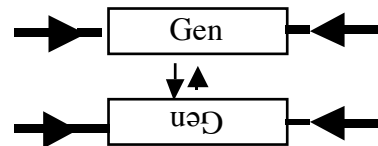
A. Aufbau der loxP-Sequenz



B. Cre-vermittelte Deletion



C. Cre-vermittelte Inversion



D. Cre-vermittelte Translokation

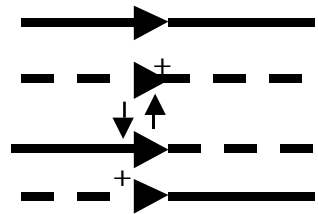


Abb.4.6.1. Aufbau des loxP Signals (A) und Cre-Rekombinase vermittelte DNA Rekombinationen (B-D).

Das in Abbildung 4.7.1. unter B. dargestellte Rekombinationsereignis führt zur Deletion der DNA zwischen zwei loxP-Sequenzen mit gleicher Orientierung. Diese Art des DNA Rearrangements bietet die Möglichkeit zur induzierbaren Genexpression durch das Cre/loxP Rekombinationssystem. Die Induzierbarkeit wird dadurch erreicht, dass zwischen die beiden loxP-Sequenzen eine sogenannte Stop Kassette eingebaut wird, die starke transcriptionelle (polyA) und translationelle (Stop-Kodon) Stop Elemente enthält. Die so aufgebaute loxP/Stop/loxP-Kassette wird zur Repression der Genexpression zwischen einen konstitutiv aktiven Promotor und die Protein-kodierende Sequenz des Gens von Interesse inkliniert. Aufgrund der starken transkriptionellen Stop Signale wird die Synthese der entsprechenden mRNA blockiert. Da die Repression der mRNA Synthese durch die polyA-Signale nicht zu 100% gewährleistet ist, wird auf Translationsebene eine weitere Blockade, durch die in der Stop Kassette enthaltenen translationellen Stop Kodons, der Proteinbiosynthese erzielt. Die Synthese des entsprechenden Genproduktes kann somit vollständig unterbunden werden. Die gerichtete Induktion der Genexpression und somit die Synthese des entsprechenden Genproduktes erfolgt durch die von Cre Rekombinase vermittelte Rekombination der beiden loxP-Sequenzen und der daraus resultierenden Deletion der Stop Kassette. Hierdurch gelangt das Gen von Interesse direkt unter die transkriptionelle Kontrolle des konstruierten Promoters. Anhand der oben genannten Charakteristiken des Cre/loxP Rekombinationssystem bietet das System bessere Voraussetzungen als das Tet.-System für die Repression und Induktion der Genexpression des zytotoxischen Herpes Simplex Virus Typ 1 *IE3* Gens.

4.6.2. Konstruktion verschiedener loxP/Stop/loxP Kasette Reporterkonstrukte

Das Tet.-System bietet die Möglichkeit zur Induktion einer starken Genexpression, wobei die basale Genexpression nicht reprimierbar ist. Hierdurch liegt das Genprodukt bereits im nicht-induziertem Zustand in relativ hohen Mengen in den Zellen vor. Wie die Ergebnisse mit dem Tet.-System gezeigt haben (siehe Abschnitt 4.2. bis 4.5.), sind bereits geringe Mengen des zytotoxischen Proteins ICP4 über einen kurzen Zeitraum für die Zelle lethal. Desweiteren sind, vermutlich, sehr geringe intrazelluläre ICP4 Konzentrationen für die Replikation einer HSV-1 *IE3* Deletionsmutante ausreichend. Aus diesem Grund ist die Induktion der Genexpression zunächst zweitrangig. Wichtig ist dagegen die absolute Repression der *IE3* Genexpression, denn nur so ist die Propagation einer stabilen *IE3* Zelllinie gewährleistet und nur unter diesen Bedingungen ist es möglich die Virusreplikation der HSV-1 *IE3* Deletionsmutante vollständig zu reprimieren. Um heraus zu finden ob das Cre/loxP Rekombinationssystem diese Bedingungen erfüllt, wurden verschiedene loxP/Stop/loxP Kasette Reporterkonstrukte (*lacZ*-Gen, GFP-Gen) konstruiert. Diese Konstrukte sollten nach transients Transfektion in VERO-Zellen einen Anhaltspunkt geben ob die Stop-Kasette für die Repression der Genexpression ausreichend ist. Durch die Klonierung der CMV *lacZ* Expressionskasette in die loxP-Polyadenylierungssignale-loxP Kasette sollte untersucht werden, ob die vermittelte Repression hierdurch verstärkt werden kann. Neben einen verstärkenden, reprimierenden Effekt, bietet die Klonierung der CMV *lacZ* Expressionskasette in die Stop-Kasette die Möglichkeit für eine schnelle und einfache Untersuchung stabiler Klone durch Zugabe von X-Gal Lösung. Die verschiedenen loxP/Stop/loxP Kasette Reporterkonstrukte sind in den Abbildungen 4.6.2.1.-4.6.2.3. schematisch dargestellt und beschreiben.

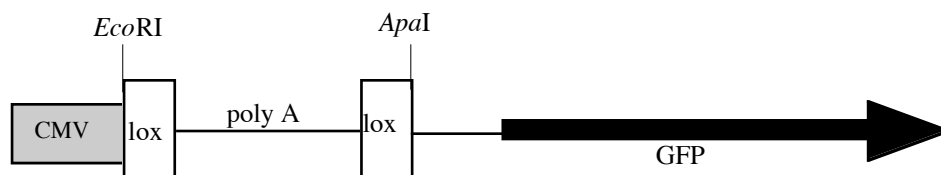


Abb. 4.6.2.1. Konstruktion von Plasmid pLoxCa-GFP. Für die Konstruktion von pLoxCa-GFP wurde die loxP/Stop/loxP Kasette aus pC-LoxCa2 mit *EcoRI*/*ApaI* herausgeschnitten und in die *EcoRI*/*ApaI* Schnittstelle von pEGFP-N3 (Clontech) kloniert. Das resultierende Plasmid, pLoxCa-GFP, enthält somit den Zytomegalovirus (CMV) IE1 Enhancer/ Promoter, der durch eine loxP-Polyadenylierungs-signal-loxP Kasette von der kodierenden Region des GFP Gens getrennt ist.

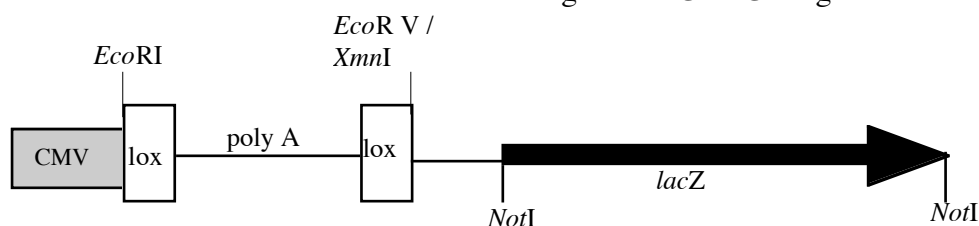


Abb. 4.6.2.2. Konstruktion von Plasmid pLoxCa-lacZ. Für die Konstruktion von pLoxCa-lacZ wurde das *lacZ* Gen mit *NotI* aus pCMV- β (Clontech) in die *NotI* Schnittstelle von pC-LoxCa1 einkloniert. Das resultierende Plasmid, pLoxCa-lacZ, enthält somit den (CMV) IE1 Enhancer / Promoter, der durch eine loxP Polyadenylierungs-signale-loxP Kasette von der kodierenden Region des *lacZ* Gens getrennt ist.

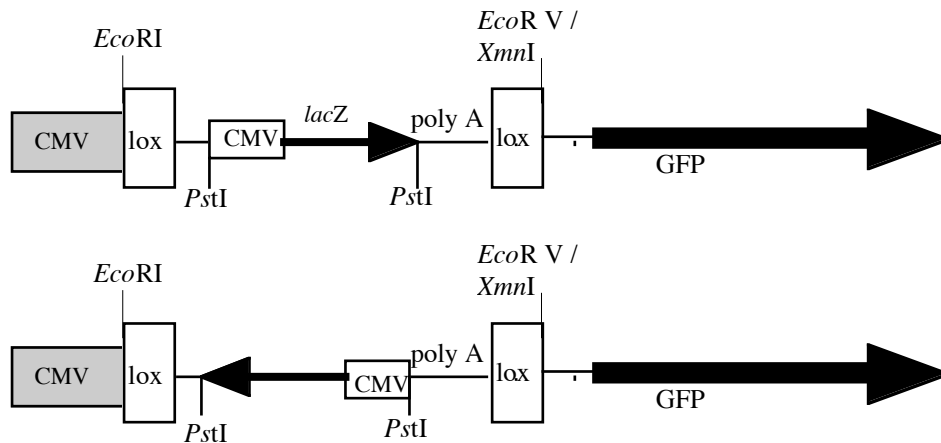


Abb. 4.6.2.3. Konstruktion der Plasmide pLoxlacZCa-GFP1 und 2. Das CMV/*lacZ*- Gen wurde aus pCMV- β mit *Pst*I herausgeschnitten und in die *Pst*I Schnittstelle der Stop-Sequenzen von pLoxCa-GFP einkloniert. Mit diesem Konstrukt sollte die Repression der Stop-Kassette verstärkt und eine schnelle Untersuchung stabiler Transfektanden ermöglicht werden. Durch die Klonierung entstanden Klonen mit beiden Orientierungen der CMV *lacZ* Expressionskassette. Die beiden Plasmide enthalten den CMV Enhancer / Promoter, der durch eine loxP-CMV *lacZ*-Polyadenylierungssignale-loxP Kasette von der kodierenden Region des GFP Gens getrennt ist.

4.6.3. Repression und Cre Rekombinase induzierte GFP-Fluoreszenz in VERO-Zellen

Eine Vielzahl von Arbeitsgruppen hat in den vergangenen Jahren die Bedeutung des Cre / loxP - Rekombinationssystem für die gerichtete Geninaktivierung und Genaktivierung in Zellkultur und Tieren gezeigt (Sauer & Henderson, 1988; 1989; Federoff *et. al.*, 1990). Die experimentellen Befunde zeigen deutlich, dass die Verwendung einer loxP / Stop / loxP Kasette zur vollständigen Repression der Genexpression ausreicht und die durch Cre Rekombinase vermittelte Deletion dieser Stop Kasette zur Induktion der Genexpression führt (Utomo *et al.*, 1999; Anton & Graham, 1995; Kellendonk *et al.*, 1999; Rohlmann *et al.*, 1998). Um die Stärke der Geninaktivierung durch die loxP/Stop/loxP Kasette, sowie die Genaktivierung nach Cre Rekombinase induzierter Deletion der loxP/Stop/loxP Kasette beurteilen zu können, wurde nach transienter Transfektion von pLoxCa-GFP (Abb.4.6.3. B u. C) bzw. Cotransfektion von pLoxCa-GFP und pMC-Cre (Abb. 4.6.3. D) die GFP Expression in VERO-Zellen untersucht. Als positive Kontrolle wurde pEGFP-N3 (Clontech) in VERO-Zellen transient transfiziert (A).

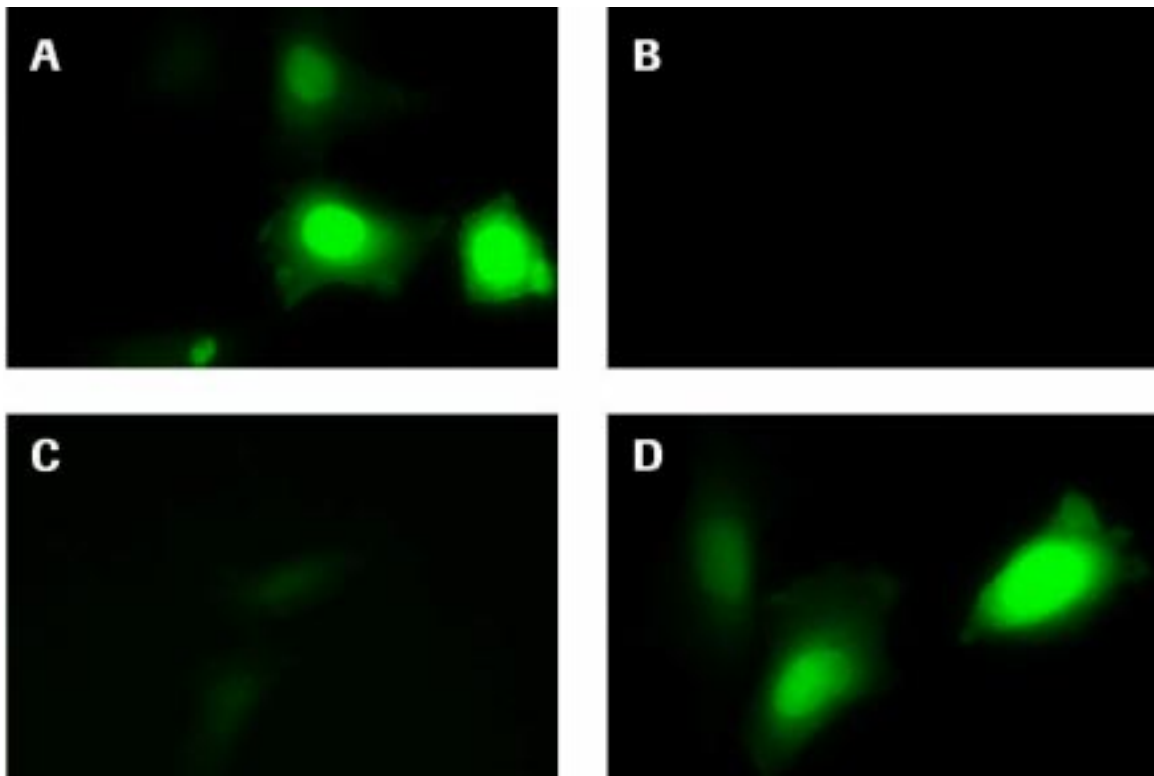


Abb. 4.6.3. Repression und Cre Rekombinase induzierte GFP-Fuoreszenz nach transienter Transfektion in VERO-Zellen. VERO-Zellen wurden mit $2\mu\text{g}$ pEGFP-N3 (**A**) und pLoxCa-GFP (**B** u. **C**), sowie $1,5\mu\text{g}$ pLoxCa-GFP mit $0,5\mu\text{g}$ pMC-Cre (**D**) transfiziert bzw. cotransfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd fixiert und im Fluoreszenzmikroskop die GFP Expression detektiert. 40 x Vergrößerung, Belichtungszeit in **A**, **B** und **D**. 0.48 Sekunden und **C**. 9 Sekunden.

Die aufgrund der loxP / Stop / loxP Kasette bewirkte Geninaktivierung ist sehr stringent. Bei einer Belichtungszeit von 0.48 Sekunden lässt sich keine GFP Fluoreszenz in den Zellen nachweisen (Abb. 4.6.3. **B**). Erst bei einer Erhöhung der Belichtungszeit um das 18.75 Fache (Abb. 4.6.3. **C**) wird eine sehr schwache GFP Fluoreszenz sichtbar. Die nach Zugabe von Cre Rekombinase induzierten GFP Expression ist ebenfalls sehr effizient (Abb. 4.6.3. **D**). Ein Vergleich von Bild **A**. und **D**. lässt erkennen, dass die Intensität der Fluoreszenz nach Transfektion von pEGFP-N3 und von pMC-Cre mit pLoxCa-GFP vergleichbar sind.

4.6.4. Nachweis der Cre Rekombinase induzierten GFP Expression mittels Westernblot - Analyse

Um die gesamte Akkumulation von GFP nach transienter Transfektion in den Zellen erfassen zu können, wurde totales Zellprotein von transfizierten VERO-Zellen 48 Stunden nach der Transfektion hergestellt. Gleiche Volumina der einzelnen Zelllysate wurden in einem 12%-igen SDS - Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Transfer (Western-Blotting) der Proteine auf eine Immobilon-P Membran (Millipore, Bedford), wurde das GFP-Protein mit einem Gemisch aus zwei Anti-GFP monoklonalen Maus Antikörpern (Boehringer Mannheim), einem sekundären Ziegen Anti-Maus IgG, (H+L) Peroxidase gekoppelten Antikörper (Pierce, Illinois) und dem Substrat Lumi-Light (Boehringer Mannheim) nach Exposition eines Röntgenfilms (Kodak) detektiert. Das Ergebnis der Westernblot - Analyse (Abb.4.6.4.) bestätigt den experimentellen Befund der Abbildung 4.6.3..

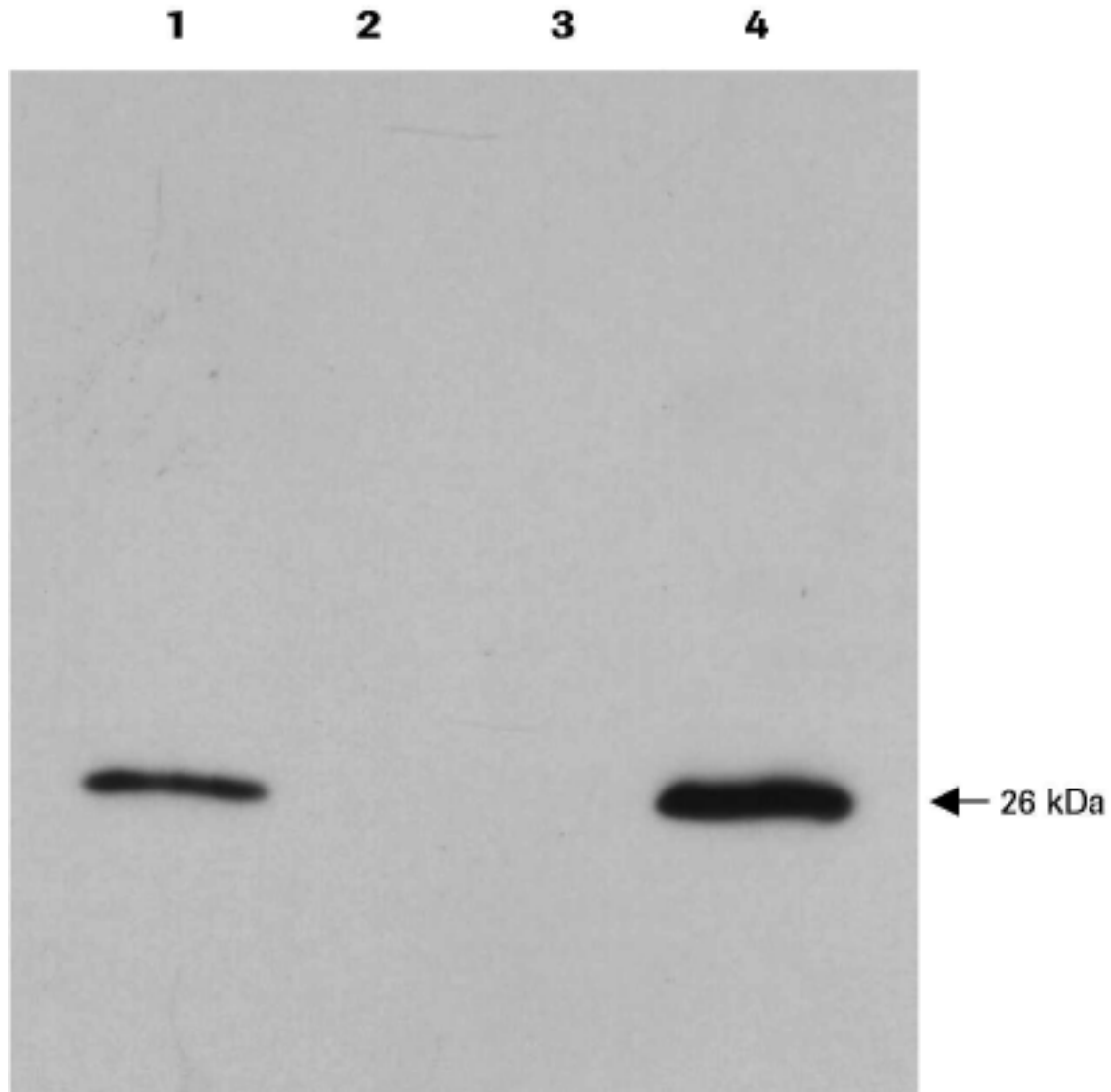


Abb. 4.6.4. Westernblot - Analyse der Cre Rekombinase induzierten GFP Expression nach transienter Transfektion in VERO-Zellen. Westernblot - Analyse mit totalen Zellprotein von 1×10^6 VERO-Zellen mit $2 \mu\text{g}$ pEGFP-N3 (**Spur 4**), $2 \mu\text{g}$ pLoxCa-GFP (**Spur 2**) transfiziert, sowie mit $1.5 \mu\text{g}$ pLoxCa-GFP + $0.5 \mu\text{g}$ pMC-Cre (**Spur 1**) cotransfiziert. Unbehandelte VERO-Zellen (**Spur 3**).

In den totalen Zellproteinen der pLoxCa-GFP transfizierten Zellen lässt nach 48 Stunden keine GFP-Protein nachweisen (Spur 2). 48 Std. nach Cotransfektion von pLoxCa-GFP und pMC-Cre sieht man dagegen eine deutliche Akkumulation von GFP-Protein (Spur 1). Das GFP-Protein läuft im 12%-igen SDS-Polyacrylamidgel bei der 26kDa Markerbande. Die GFP-Proteinmenge in VERO-Zellen, die mit pEGFP-N3 Plasmid DNA transfiziert wurden sind jedoch grösser (Spur 4), als die GFP-Proteinmenge nach Induktion mit Cre Rekombinase (Spur 1). Die Unterschiede in der GFP Konzentration sind vermutlich auf die unterschiedliche Transfektionseffizienz der beiden Konstrukte bzw. die notwendige Cotransfektion für die Induktion der GFP Genexpression zurückzuführen. In nicht - transfizierten VERO-Zellen (Spur 3) wurde wie erwartet kein GFP Protein nachgewiesen.

4.6.5. Nachweis der konstitutiven β -Galaktosidase Expression und der Cre Rekombinase induzierten GFP Expression nach transienter Transfektion von pLoxlacZCa-GFP in VERO-Zellen

Um den reprimierenden Effekt der loxP/Stop/loxP-Kassette auf transkriptioneller- und translationeller Ebene zu verstärken, wurde innerhalb der Stop Sequenzen eine Expressionskassette einkloniert. Die Expressionskassette besteht aus dem CMV IE1 Enhancer / Promoter und dem davor geschalteten *lacZ*-Gen (siehe Abb. 4.6.2.2.). Das *lacZ* Gen wird demzufolge, nach Transfektion, konstitutiv in der Zelle exprimiert. Die Verwendung derartiger Konstrukte ermöglicht nach stabiler Transfektion mittels X-Gal Färbung ein schnelles Verfahren zur Detektion stabiler Klone. Aufgrund der ungerichteten Klonierung wurden Konstrukte mit beiden Orientierungen der CMV/*lacZ* Expressionskassette erhalten (siehe Abb. 4.6.2.3.). Beide Konstrukte wurden nach transienter Transfektion in VERO-Zellen auf Repression der GFP Expression, auf konstitutive β -Galaktosidase Expression und auf Induzierbarkeit der GFP Expression durch Cre Rekombinase getestet (Abb. 4.6.5.).

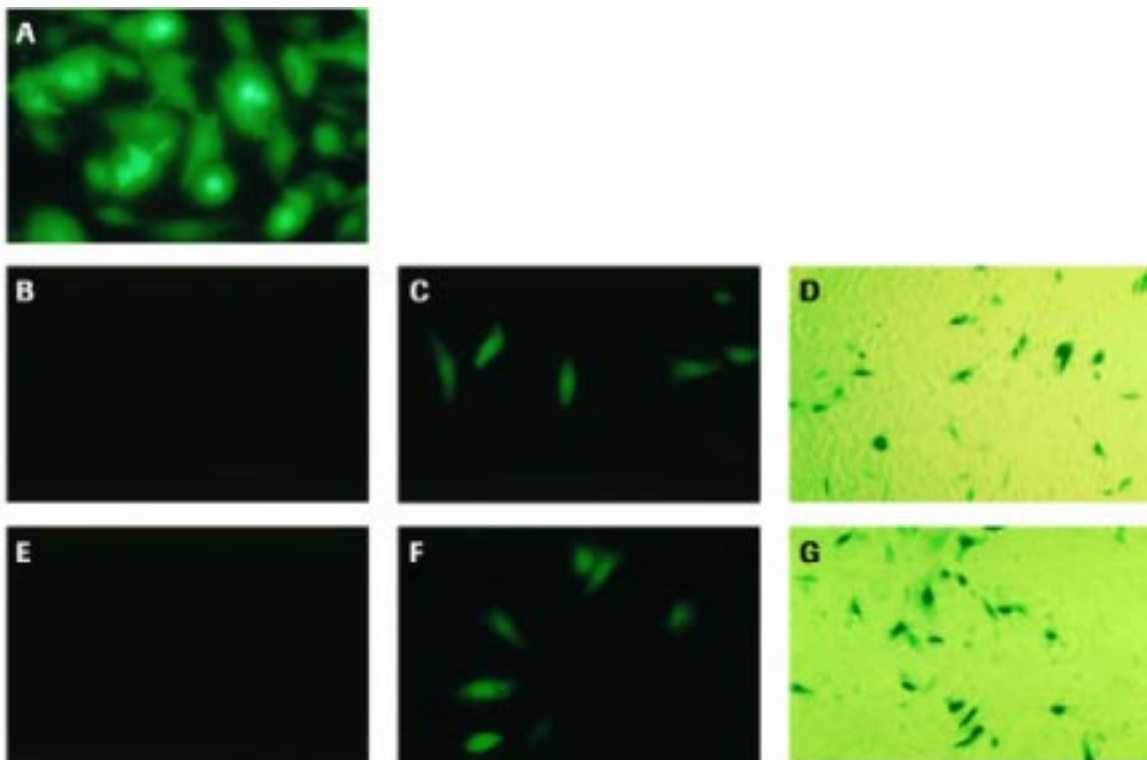


Abb. 4.6.5. Nachweis der Repression der GFP Genexpression, der Expression von β -Galaktosidase und Cre Rekombinase induzierten GFP Expression von pLoxlacZCa-GFP1 und 2 in VERO-Zellen. VERO-Zellen wurden mit $2\mu\text{g}$ pEGFP-N3 (A), pLoxlacZCa-GFP1, 2 (B, E, D, G) oder $1.5\mu\text{g}$ pLoxlacZCa-GFP1, 2 und $0.5\mu\text{g}$ pMC-Cre (C, F) transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit 4% PFA fixiert und mit X-Gal gefärbt (D, G), und im Fluoreszenzmikroskop bei einer Belichtungszeit von 20 Sekunden (A-C, E, F) photographiert.

Wie die Abbildung 4.6.5. zeigt, ist die GFP Expression nach transienter Transfektion von pLoxlacZCa-GFP1(B) und auch pLoxlacZCa-GFP2 (E) in VERO-Zellen gleichermassen stark reprimiert. Der verstärkende, reprimierende Effekt der innerhalb der Stop Sequenzen einklonierten CMV/*lacZ* Expressionskassette ist demnach unabhängig von der jeweiligen Orientierung. Auch die Stärke der induzierten GFP Expression lässt keine Unterschiede zwischen den entgegengesetzten Orientierungen

der CMV/lacZ Expressionskassette erkennen (C, F). Ein Vergleich der GFP Expressionsstärken mit der positiven Kontrolle (A) macht deutlich, dass die Cre Rekombinase induzierte GFP Expression (C,F) leicht abgeschwächt ist. Die X-Gal Färbung der in B und E photographierten Zellen zeigt, dass das lacZ Gen nach Transfektion konstitutiv in den Zellen exprimiert wird (D, G).

4.6.6. Vergleich der basalen Genexpression im Tet.-System und Cre / loxP- System

Um einen Vergleich zwischen dem Tet.-System und dem Cre / loxP - System machen zu können, wurde das GFP Gen unter die Kontrolle des tet.Ox7- CMV minimal Promotors gesetzt. Hierzu wurde das GFP Gen mit *SalI* / *NotI* aus pEGFP-N3 (Clontech) herausgeschnitten und in die *XhoI* / *NotI* Schnittstellen von pN721(Dr. U. Deutsche) kloniert. Das aus dieser Klonierung resultierende Plasmid wurde als ptet.-GFP bezeichnet (Abb. 4.7.6.1).

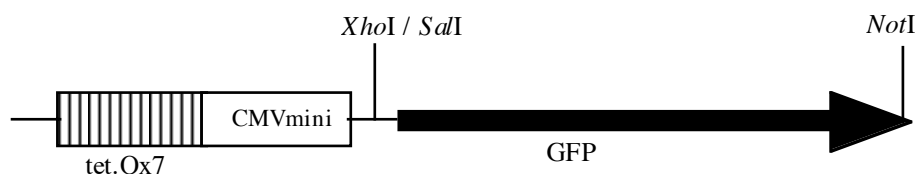


Abb. 4.6.6.1. Expressionskassette in ptet.-GFP.Die Abbildung zeigt das über die *XhoI* / *SalI* und *NotI* Schnittstellen in pN721 einklonierte GFP Gen. Die GFP Expression ist unter der Kontrolle des tet.Ox7 CMV minimal Promotrs, der durch den sog. Tet.-Transaktivator induziert wird (siehe 4.2).

Für den Vergleich der basalen GFP Expression von ptet.-GFP mit den loxP/Stop/loxP Kassette GFP Reporterkonstrukten, wurden die einzelnen Konstrukte mit Lipofectamin (Gibco-BRL) transient in VERO-Zellen transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit 4% PFA fixiert und im Fluoreszenzmikroskop photographiert (Abb. 4.6.6.2.)

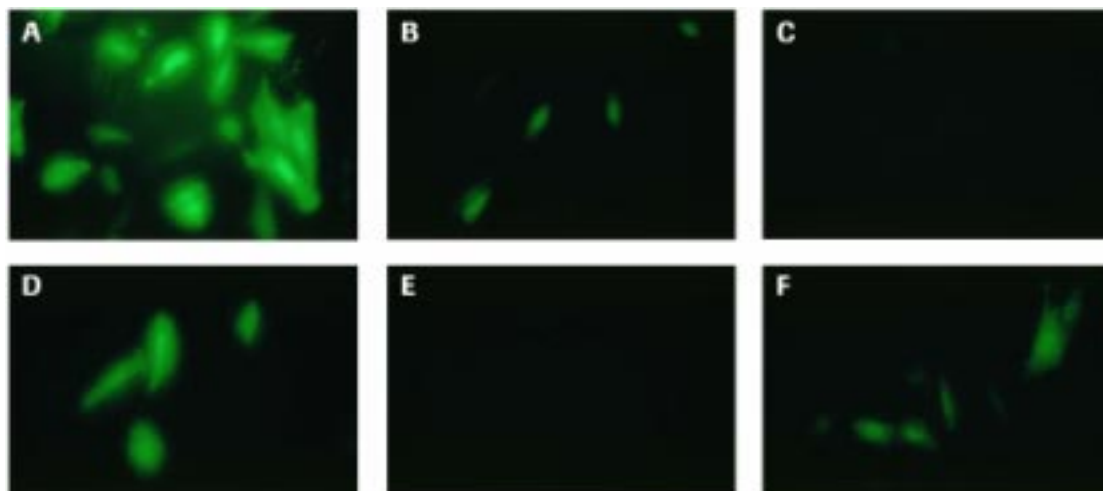


Abb. 4.6.6.2. Vergleich der basalen GFP Expression im Tet.- und Cre / loxP- System. VERO-Zellen wurden mit 2µg pEGFP-N3 (A), ptet.-GFP (B), pLoxCa-GFP (C) oder pLoxlacZCa-GFP1 (E) transfiziert, oder mit 1,5µg pLoxCa-GFP (D), oder pLoxlacZCa- GFP1 (F) und jeweils 0.5µg pMC-Cre cotransfiziert. 48 Std. nach der Transfektion wurden die Zellen mit 4% PFA fixiert und die GFP Fluoreszenz im Fluorezenzmikroskop detektiert. Die Belichtungszeiten beträgt bei allen Aufnahmen (A-F) 20 Sekunden.

Das in Abbildung 4.6.6.2 dargestellte Experiment veranschaulicht sehr deutlich die Unterschiede in der basalen Expression zwischen dem Tet.-System und dem Cre / loxP-System. Während in Zellen, die mit den Konstrukten pLoxCa-GFP (C) oder pLoxlacZCa-GFP1 (E) transfiziert wurden keine GFP Fluoreszenz sichtbar ist, ist in Zellen die mit pTet.-GFP transfiziert wurden eine sehr starke GFP Fluoreszenz zu sehen, obwohl kein Tet. Transaktivatorprotein in den Zellen vorliegt (B), ist die GFP Expressionsstärke vergleichbar mit der Cre Rekombinase induzierten GFP Expression von pLoxlacZCa-GFP1 (F) und pLoxCa-GFP (D).

4.6.7. Kinetik der Cre Rekombinase induzierten Genexpression

Die aufgrund der loxP/Stop/loxP-Kassette reprimierte Genexpression kann nur durch Deletion der Stop-Kassette induziert werden. Die Deletion der Stop-Kassette erfolgt durch das Cre Protein, welches in den bisherigen Experimenten von einem cotransfizierten Plasmid exprimiert wurde. Das heisst, das Cre Protein muss nach Aufnahme der Plasmid DNA in die Zelle zunächst selbst synthetisiert werden, bevor es die Induktion des GFP Gens oder die eines beliebigen Gens bewirken kann. Um die Kinetik dieses Prozesses genauer untersuchen zu können, wurde das in Abbildung 4.6.7. zusammengefasste Experiment durchgeführt. In diesem Experiment wurde das Cre Gen mit einem, in HSV-1 Partikeln verpackten, Amplikon-Vektor mittels Infektion in die Zellen eingeschleust. Der Amplikon Virusstock wurde nach der transienten, helferfreien Verpackungs-Methode von HSV-1 Amplikon-Vektoren nach C. Fraefel et al., 1996 verpackt. VERO-Zellen wurden mit 2 μ g pLoxCa-lacZ (siehe Abb. 4.6.2.) transient transfiziert. Direkt im Anschluss an die Transfektion wurden die Zellen mit dem in HSV-1 Partikeln verpackten pHGCXnCRE Amplikon-Vektor (MOI=0.5) für 1. Stunde bei 37°C infiziert. Das GFP Gen wird in diesem Amplikon-Vektor von dem viralen IE4/5 Promotor reguliert und das Cre Gen von dem starken CMV IE1 Enhancer / Promoter.

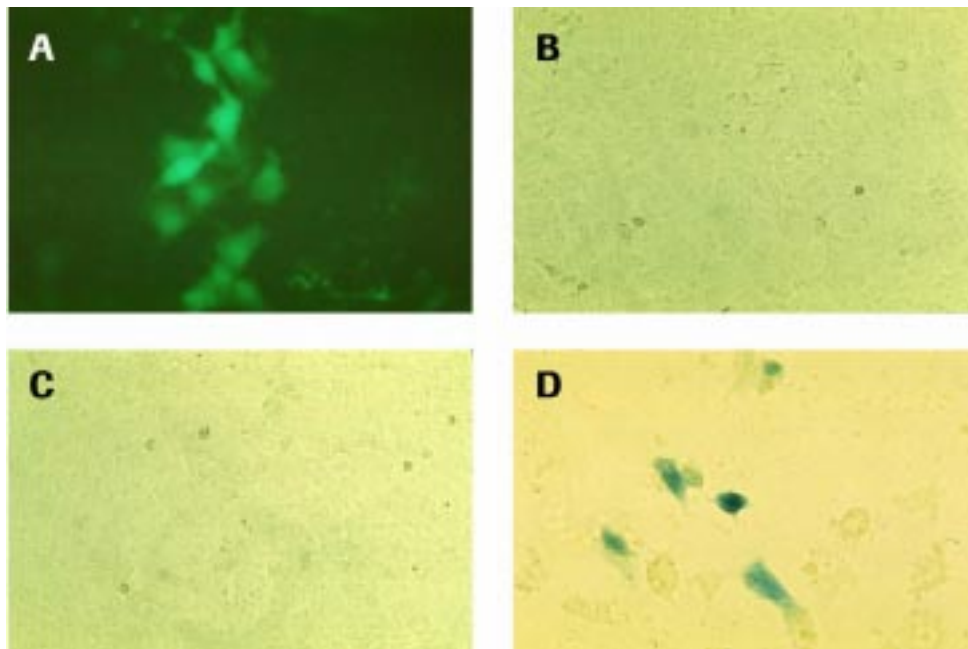


Abb.4.6.7. Kinetik der Cre Rekombinase induzierten Genexpression. VERO-Zellen wurden mit 2 μ g pLoxCa-lacZ (A-D) transient transfiziert. Direkt im Anschluss wurden die Zellen mit pHGCXnCRE Amplikon Vektor (MOI=0.5) infiziert (A-D). 16 Std. nach der Infektion erkennt man bereits GFP Fluoreszenz in den Zellen (A). Die X-Gal Färbung, 16 Std. (B), 20 Std. (C) und 28 Std. (D) nach der Infektion, zeigt die durch Cre Rekombinase induzierte lacZ Genexpression an.

14, 16, 20 und 28 Stunden nach Infektion wurden die Zellen mit 4% PFA fixiert und die GFP Fluoreszenz in den Zellen betrachtet, danach wurden die Zellen mit X-Gal gefärbt (Abb. 4.6.7.). 14 Std. nach der Infektion konnte in den infizierten Zellen eine sehr starke GFP Fluoreszenz beobachtet werden (A). 16 Stunden (B) und 20 Stunden nach der Infektion (C) war die beta- Galaktosidase noch nicht in den Zellen synthetisiert und die Zellen liessen sich durch Zugabe von X-Gal nicht blau anfärben. Erst 28 Stunden nach der Infektion liessen sich nach Zugabe von X-Gal blaugefärbte Zellen im Mikroskop beobachten (D).

4.6.8. Herstellung stabiler VERO-Zelllinien mit Cre-induzierbaren Reportergenen

Anhand der bisherigen Ergebnisse scheint das Cre/loxP Rekombinationssystem für die induzierbare Genexpression des zytotoxischen Herpes Simplex Virus-Typ 1 Immediate Early 3 Gens bestens geeignet zu sein. Ein direkter Vergleich mit dem Tet.-System hat den grossen Unterschied in der basalen Genexpression beider Systeme deutlich hervorgehoben (siehe Abb. 4.6.6.2.) und damit ganz klar gezeigt, dass das Tet.-System für die Regulierbarkeit zytotoxischer Gens (wie z.B. das *IE3* Gen) nicht geeignet ist. In den folgenden Experimenten soll abgeklärt werden, ob das loxP/ polyA/ loxP-System für die Herstellung stabiler Zelllinien mit Cre-induzierbarer Genexpression geeignet ist. Ist die Repression der loxP/Stop/loxP-Kassette genauso dicht in stabil transfizierten Zellen und ist die Induzierbarkeit durch die Cre Rekombinase ebenso effizient ? Neben der Klärung der oben aufgeführten Fragen, finden die stabilen loxP/Stop/loxP-Kassette Reporter VERO-Zelllinien eine praktische Anwendung bei der Titration von HSV-1 Amplikon Vektoren, die das Cre Rekombinase Gen, jedoch kein Reporter gen exprimieren. Die in Abschnitt 4.6.2. beschriebenen loxP/Stop/loxP-Kassette Reporter gen-Konstrukte tragen alle ein Neomycin Resistenzgen, welches zur Selektion von Zellklonen eingesetzt werden kann. 1×10^6 VERO-Zellen wurden mit je 2µg Plasmid DNA (pLoxCa-GFP, pLoxCa-lacZ und pLoxlacZCa-GFP1) und 7µl Lipofectamin (2mg / ml, Gibco-BRL) transfiziert. 1 Tag nach der Transfektion wurden die Zellen in Selektionsmedium (Medium 199, 10% FCS, 10% Penicillin/Streptomycin, 1.5mg / ml G418) überführt. Die Zellen wurden in 90ml Selektionsmedium verdünnt und je 15ml der homogenen Zellsuspension auf sechs 10cm Schalen verteilt. Die Schalen wurden für ca. 2-3 Wochen im Inkubator bei 5% CO₂ und 37°C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit sind makroskopisch sichtbare Zellhaufen in den Schalen herangewachsen. Die einzelnen Zellklone wurden trypsiniert und mit einer Pipette in die einzelnen Löcher einer 24-Loch Platte überführt. Die einzelnen Klone wurden schliesslich sukzessiv über eine 12-Loch Platte bis zur einer 175cm² Zellkulturflasche hochgezogen. Als von den einzelnen Klonen genug Zellmaterial vorhanden war, wurden die Zellen in 6-Loch Platten auf die Cre Rekombinase induzierte GFP bzw. *lacZ* Genexpression untersucht.

4.6.9. Untersuchung stabiler VERO-Zelllinien auf Cre-vermittelte Induktion der Reporter gen Expression

Nach der Selektion und dem Heranziehen der stabilen Klone im Selektionsmedium wurden die Zellen auf die Cre Rekombinase induzierte Genexpression des jeweiligen Reporter gens (GFP oder *lacZ*) getestet. Hierzu wurden die Zellen in 6-Loch Platten ausgesät und mit dem Plasmid pMC-Cre transfiziert. 32 Std. nach der Transfektion wurden die Zellen mit 4 % PFA fixiert und im Fluoreszenzmikroskop auf GFP Fluoreszenz (Abb. 4.6.9.1.), oder nach Zugabe von X-Gal Lösung, auf Blaufärbung der Zellen im Lichtmikroskop (Abb. 4.6.9.2.) oder aber auf GFP Fluoreszenz und Blaufärbung der Zellen (Abb.4.6.9.3.) untersucht.

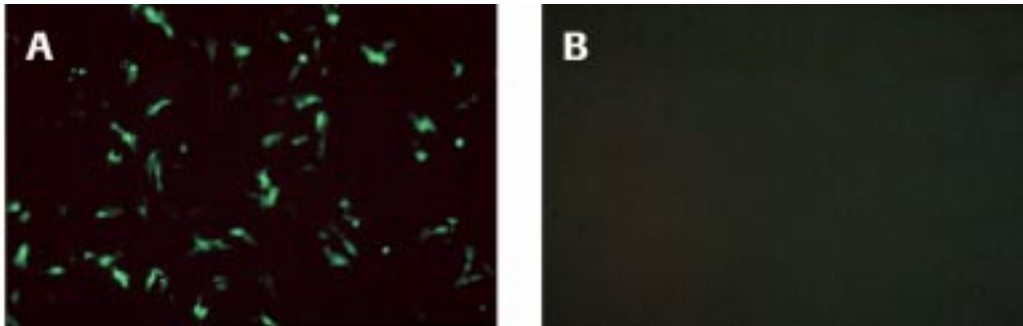


Abb. 4.6.9.1. Untersuchung von stabilen pLoxCa-GFP VERO-Zelllinien. Die Induktion der Cre vermittelten GFP Expression in den stabilen Klonen wurde nach Transfektion von 2 μ g pMC-Cre Plasmid DNA untersucht (**A**). 32 Std. nach der Transfektion wurden die Zellen mit 4 % PFA fixiert und im Fluoreszenzmikroskop untersucht. In Abwesenheit des Cre kodierenden Plasmids wurden keine grün fluoreszierenden Zellen beobachtet (**B**). Die Aufnahmen wurden mit einer Belichtungszeit von 20 Sek. gemacht.

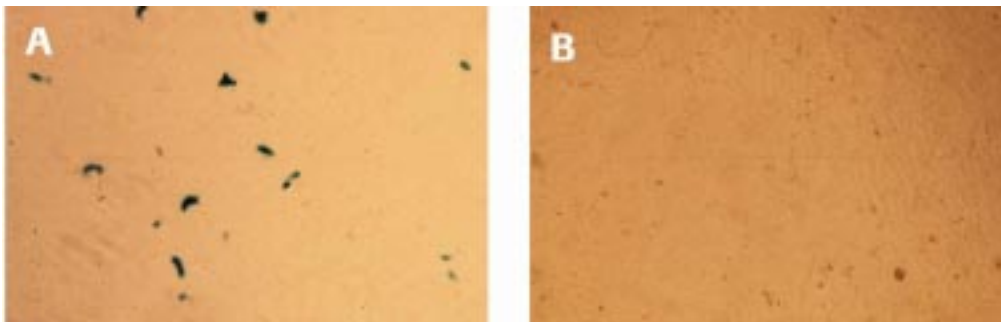


Abb. 4.6.9.2. Untersuchung von stabilen pLoxCa-lacZ VERO-Zelllinien. Die Induktion der Cre vermittelten lacZ Genexpression in diesen stabilen Klonen erfolgte (wie in Abb. 4.7.9.1.) nach Transfektion von 2 μ g pMC-Cre Plasmid DNA (**A**). 32 Std. nach der Transfektion wurden die Zellen mit 4 % PFA fixiert und mit X-Gal Lösung versetzt. Zellen, die nicht mit pMC-Cre transfiziert wurden (gleicher Klon wie in **A**), zeigten keine Blaufärbung (**B**).

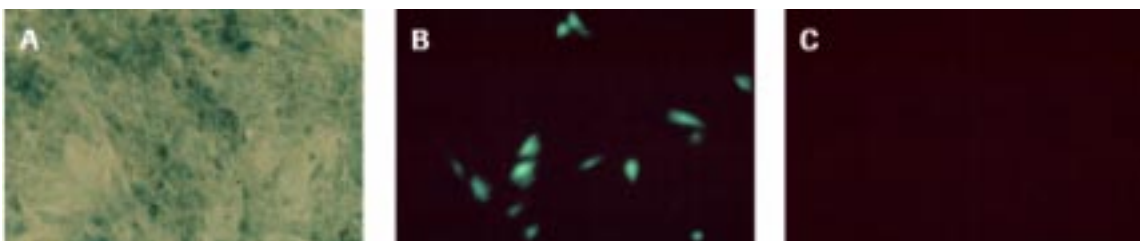


Abb. 4.6.9.3. Screenen von stabilen pLoxlacZCa-GFP VERO-Zelllinien. Aufgrund der konstitutiven Expression des lacZ Gens, konnten diese Klone zunächst mittels X-Gal Färbung identifiziert werden. Positive Klone exprimieren das lacZ Gen und synthetisieren beta-Galaktosidase, wodurch sich die Zellen direkt nach Zugabe von X-Gal blau anfärben lassen (**A**). Werden diese Zellen mit 2 μ g pMC-Cre Plasmid DNA transfiziert, so lässt sich nach 32 Stunden die Cre induzierte GFP Expression im Fluoreszenzmikroskop nachweisen (**B**). Betrachtet man diese Zellen ohne Zugabe von X-Gal und ohne vorherige Transfektion von pMC-Cre Plasmid DNA im Fluoreszenzmikroskop, so lassen sich keine grün leuchtenden Zellen erkennen (**C**).

4.6.10. Nachweis der Cre Rekombinase induzierten GFP Expression in stabilen pLoxCa-GFP VERO-Zelllinien mittels Westernblot-Analyse

Während der fluoreszenzmikroskopische Nachweis der GFP Expression auf eine begrenzte Anzahl der Zellen beschränkt ist, kann mit der Methode der Westernblot-Analyse die Proteinmenge der gesamten Zellpopulation erfasst werden. Hierdurch lassen sich die beiden Zustände der Zellen, nicht-induzierter Zustand und induzierter Zustand, besser charakterisieren. Je 1×10^6 stabile pLoxCa-GFP VERO-Zellen wurden mit $2 \mu\text{g}$ pMC-Cre Plasmid DNA bzw. ohne pMC-Cre Plasmid DNA transfiziert. 38 Stunden nach der Transfektion wurden induzierte und nicht-induzierte Zellen in Probenpuffer (200 mM Tris pH 8,8, 10 % Glukose, 5 mM EDTA, 0,1 % Bromphenolblau, 3 % SDS und 0,3 M β -Mercapto-Ethanol) aufgenommen und totale Zelllysate hergestellt. Gleiche Volumina der einzelnen Lysate wurden in einem 12 % igem SDS-Polyacrylamindgel elektrophoretisch aufgetrennt und im Anschluss auf eine Immobilon-P Membran (Millipore, Bedford) transferiert. Der Nachweis des GFP-Proteins erfolgte mit einem Gemisch aus zwei Anti-GFP monoklonalen Maus Antikörpern (Boehringer Mannheim), einem sekundären Ziegen Anti-Maus IgG, (H+L) Peroxidase gekoppelten Antikörper (Pierce, Illinois) und dem Substrat Lumi-Light (Boehringer Mannheim). Als interne Kontrolle diente ein zweiter primärer Anti-Actin monoklonaler Maus Antikörper. Die Detektion der markierten Proteine erfolgte nach Exposition auf einem Röntgenfilms (Kodak).

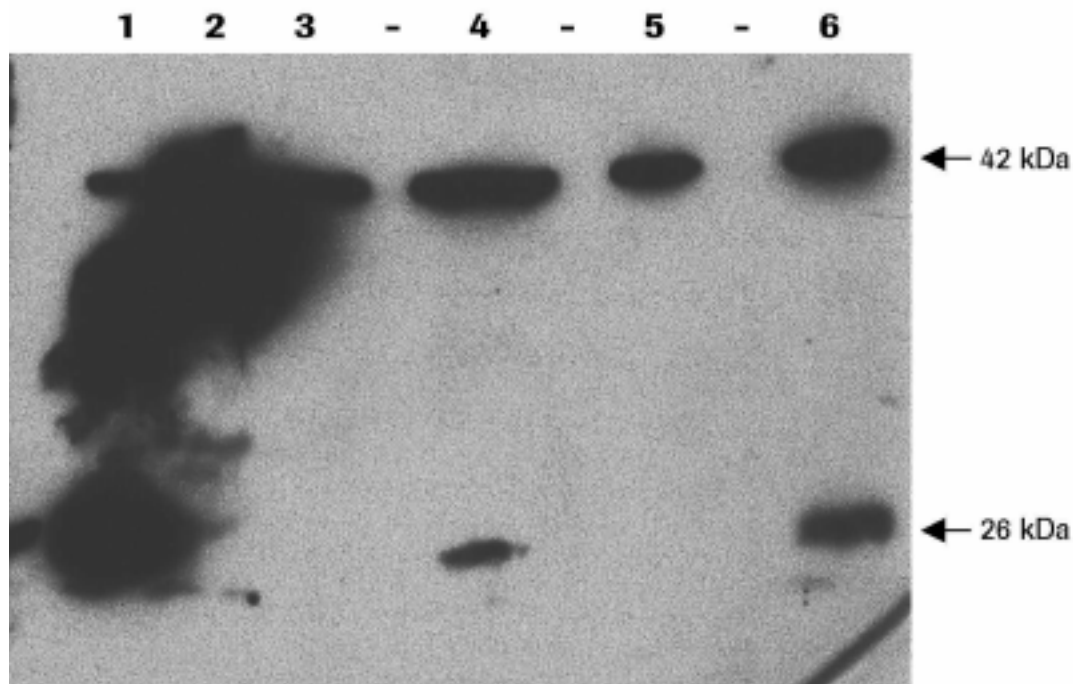


Abb. 4.6.10. Nachweis der Cre Rekombinase induzierten GFP Expression in stabilen pLoxCa-GFP VERO-Zelllinien mittels Westernblot-Analyse. Westernblot-Analyse mit totalen Zelllysaten von 1×10^6 nicht-induzierten oder Cre-induzierten stabilen pLoxCa-GFP VERO-Zellklonen (**Spur 3,4** Klon 8 und **Spur 5,6** Klon 3). Die Induktion der GFP Expression in den stabilen Klonen erfolgte durch Transfektion von $2 \mu\text{g}$ pMC-Cre Plasmid DNA (**Spur 4**, Klon 8 und **Spur 6**, Klon 3). In den Lysaten der nicht-induzierten Zellen (**Spur 3**, Klon 8 und **Spur 5**, Klon 3) ist kein GFP-Protein detektierbar, obwohl die aufgetragenen Lysatmengen (siehe interne Kontrolle, Actin 42kDa) annähernd identisch ist. Als negative Kontrolle dienten nicht transfizierte VERO-Zellen (**Spur 2**); als positive Kontrolle wurden Zelllysate von pEGFP-N3 transfizierten VERO-Zellen verwendet (**Spur 1**).

Die Ergebnisse, die mit den stabilen loxP/Stop/loxP-Kassette Reporter VERO-Zelllinien erhalten wurden zeigen, dass sich das Cre/LoP-System in stabil transfizierten Zellen ebenso verhält wie in transienten transfizierten Zellen zuvor gezeigt werden konnte (Abschnitt 4.6.3. bis 4.6.7.). Sowohl GFP Expression als auch *lacZ* Expression sind im nicht-induzierten Zustand nicht nachweisbar (Abb. 4.6.9.1. B, Abb. 4.6.9.2. B und Abb. 4.6.9.3. C). Auf der anderen Seite, lässt sich in allen stabilen Klonen nach Transfektion von pMC-Cre Plasmid DNA eine deutlich sichtbare Induktion der GFP Expression bzw. der *lacZ* Expression nachweisen (Abb. 4.6.9.1. A, Abb. 4.6.9.2. A u. Abb. 4.6.9.3. B). Die Insertion der CMV/*lacZ* Expressionskassette dient nicht nur zur Verstärkung des reprimierenden Effekts auf die Genexpression des zu induzierenden Gens, sondern bietet darüberhinaus ein schnelles und effektives Untersuchungsverfahren für stabile Klone (Abb. 4.6.9.3. A). Alle Klone, die sich nach Zugabe von X-Gal Lösung blau anfärben liessen und somit das *lacZ* Gen konstitutiv exprimieren, zeigten nach Transfektion von pMC-Cre Plasmid DNA die induzierte GFP Fluoreszenz. Von 24 ausgewählten Klonen waren zwischen 6 und 10 Klone positiv. Zwei der positiven Klone wurden expandiert und in den weiteren Experimenten verwendet. Mit Ausnahme der stabilen pLox*lacZ*Ca-GFP VERO-Zelllinien, konnte über die Homogenität der einzelnen Klone aufgrund der durchgeführten Experimente keine Aussage gemacht werden. Hierzu müssten alle Zellen das Cre Protein synthetisieren, so dass in allen Zellen die Induktion des jeweiligen Reportergens erfolgen kann. Dies könnte durch ein Cre-VP22 Fusionsprotein oder mit einem Cre Rekombinase exprimierenden HSV-1 Amplikon Virusstock erreicht werden.

4.6.11. Herstellung stabiler VERO-Zelllinien, die nach Cre-vermittelter Induktion zwei verschiedene Reportergen exprimieren

Die Herstellung einer helferfreien VerpackungsZelllinie für HSV-1 Amplikon Vektoren erfordert die Induzierbarkeit mehrerer HSV-1 Gene (*IE1*, *IE2*, *IE3* und *VP16*). Aus diesen Anforderungen ergeben sich zwei weitere Fragen bezüglich des Cre/loxP-Rekombinationssystem. 1. Ist die Herstellung einer induzierbaren, doppelstabilen loxP/Stop/loxP-Kassette Reporter Zelllinie überhaupt möglich? Die Herstellung einer doppelstabilen loxP/Stop/loxP-Kassette Reporter Zelllinie beinhaltet das Einführen von zwei getrennten loxP/Stop/loxP-Kassette Reporter Plasmiden in das Genom einer Zelle. Hierdurch sind nach erfolgter Integration der Plasmide mindestens vier loxP Sequenzen im Genom enthalten, die bei vorliegen des Cre-Proteins beliebig miteinander rekombinieren könnten. Ramirez-Solis et al. (1995) konnten nach Integration zweier, in gleicher Orientierung ausgerichteter loxP Sequenzen auf einen Chromosom die Deletion grosser Chromosomenabschnitte (3-4cM) nachweisen. Aufgrund dieser theoretischen Annahme könnten zwei entfernt voneinander liegende loxP Sequenzen durch die Cre Rekombinase miteinander rekombiniert werden und die Deletion grosser Genomabschnitte zur Folge haben. Liegen auf diesem Genomabschnitt lebenswichtige Gene für die Zelle, so stirbt die Zelle nach erfolgter Cre Rekombinase vermittelter Deletion ab. 2. Wie effizient ist die Cre Rekombinase induzierte Genexpression in doppelstabilen Zellen? Es ist bekannt, dass das Ausmass der Cre Rekombinase katalysierten Rekombination proportional zur Menge an exprimierter Rekombinase ist. Doch wie bei den meisten katalytischen Reaktionen wird ab einem bestimmten Wert eine Sättigung erreicht und keine weitere Steigerung erzielt. Sollte dieser Sättigungspunkt bereits bei einer doppelstabilen Zelllinie erreicht werden, so muss die Induzierbarkeit einiger viraler HSV-1 Gene auf einen anderen Weg erzielt werden. Um die oben aufgeführten Fragen beantworten zu können, wurden VERO-Zellen mit den Plasmiden pLoxCa-GFP und pLoxCa-*lacZ* im Verhältnis 1:1 transfiziert. 1 Tag nach der Transfektion wurden die Zellen in Selektionmedium (Medium 199, 10 % FCS, 10% Penicillin/Streptomycin, 1.5 mg/ml G418) überführt, und für 2-3 Wochen bei 5 % CO₂ und 37° C inkubiert. Die makroskopisch sichtbaren Zellklone wurden gepickt und in 24-Loch Platten transferiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen sukzessiv über eine 12-Loch Platte bis zu einer 175cm² Zellkulturflasche hochgezogen.

Für die Untersuchung der gepickten Klone wurde jeder Klon in 3 Löcher einer 24-Loch Platte verteilt. 2 Ansätze wurden mit pMC-Cre Plasmid DNA transfiziert (Abb. 4.6.11. A, C) und 1 Ansatz blieb unbehandelt (Abb. 4.6.11. B, D). 38 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit 4 % PFA fixiert. Die GFP Fluoreszenz der Zellen wurde im Fluoreszenzmikroskop (Abb.4.6.11. A, B) und die lacZ Expression nach Zugabe von X-Gal Lösung im Lichtmikroskop (Abb. 4.6.11. C, D) begutachtet.

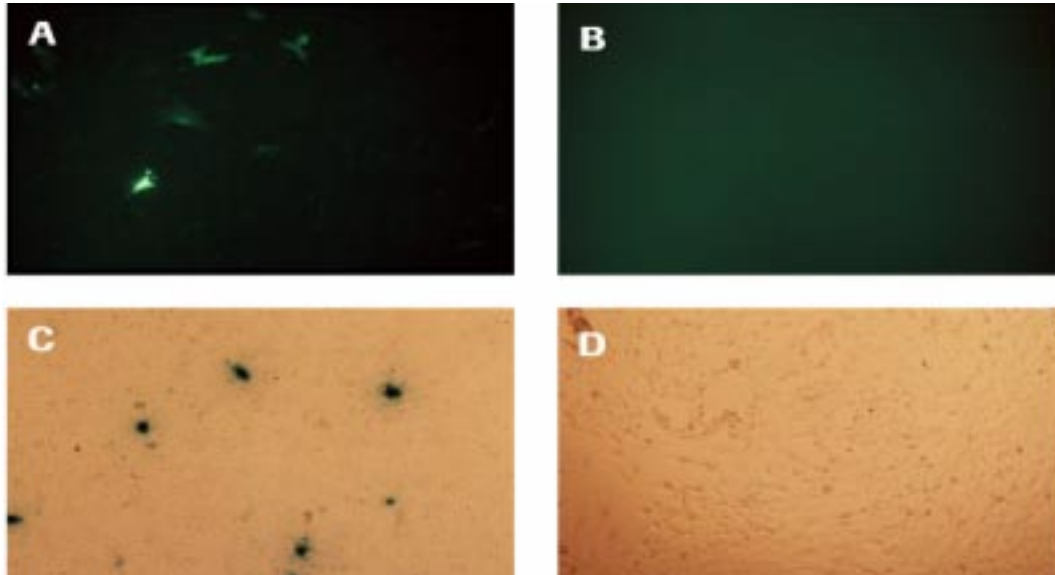


Abb. 4.6.11. Screenen von doppelstabilen pLoxCa-GFP/pLoxCa-lacZ VERO-Zelllinien. 38 Std. nach der Transfektion von pMC-Cre Plasmid DNA in die doppelstabilen Klone konnte die GFP Fluoreszenz in den Zellen nachgewiesen werden (A). Nach Zugabe von X-Gal färbten sich einige der Zellen blau (C). Nicht transfizierte Zellen zeigten weder GFP Fluoreszenz (B) noch X-Gal Färbung (D).

4.6.12. Nachweis der gleichzeitigen Cre Rekombinase-induzierten GFP und β -Galaktosidase Expression in doppelstabilen pLoxCa-GFP/pLoxCa-lacZ VERO-Zelllinien.

Um die gleichzeitige Cre Rekombinase induzierte Expression beider Reportergene in einer Zelle nachweisen zu können, wurden die Zellen 38 Stunden nach der Transfektion mit 4% PFA fixiert. Nach Auflösen der Zellmembranen mit 0.1 % Triton X-100 in PBS wurde das β -Galaktosidase Protein durch Zugabe von einem Rhodamin gekoppelten Anti - beta- Galaktosidase monoklonalen Maus Antikörper in den Zellen detektiert. Im Fluoreszenzmikroskop konnte somit die GFP Fluoreszenz (Abb. 4.6.12. A,B) und die Rhodamin Fluoreszenz (Abb.4.6.12.1. C,D) bei Verwendung verschiedener Filter im UV-Licht nachgewiesen werden. Der gleichzeitige Nachweis beider Proteine nach X-Gal Färbung der Zellen hat sich als schwierig erwiesen, da ein starker blauer Niederschlag in den Zellen die GFP Fluoreszenz im Fluoreszenzmikroskop nicht mehr erkennen lässt. Nur anfänglich schwache blaue Niederschläge lassen die gleichzeitige GFP Fluoreszenz in den Zellen beobachten (Abb.4.6.12.2.). Beide Abbildungen zeigen jedoch deutlich, dass die Herstellung doppelstabiler Zelllinien mit mehr als zwei loxP Sequenzen durchführbar ist und Cre Rekombinase beide Gene mit ausreichender Effizienz induziert. Aufgrund dieses Ergebnisses sollte die zeitgleiche Induzierbarkeit mehrerer Gen über das Cre/loxP-Rekombinationssystem möglich sein.

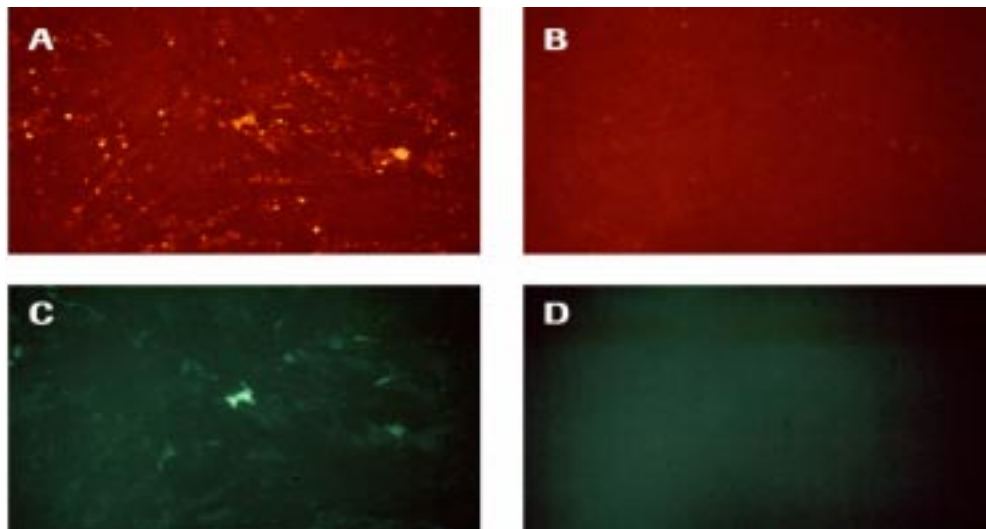


Abb.4.6.12.1. Nachweis der zeitgleichen Cre Rekombinase induzierten GFP und beta-Galaktosidase Expression in doppelstabilen pLoxCa-GFP/pLoxCa-lacZ VERO-Zelllinien mittels Immunfluoreszenz. Nicht-transfizierte (**B,D**) oder mit pMC-Cre transfizierte doppelstabile Zellen (**A,C**) wurden 38 Stunden nach der Transfektion fixiert. Die Cre Rekombinase induzierte *lacZ* Expression wurde mit einem Rhodamin gekoppelten Anti - beta-Galaktosidase monoklonalen Maus Antikörper mit einem Rotfilter im Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen (**A**). Nicht-induzierte Zellen zeigen keine Rhodamin Fluoreszenz (**B**). Bei Betrachtung durch einen GFP-Filter zeigt die gleiche Kultur wie in **A** grün fluoreszierende Zellen (**C**). Die nicht-induzierten Zellen zeigen im GFP-Filter ebenfalls keine GFP Fluoreszenz (**D**).

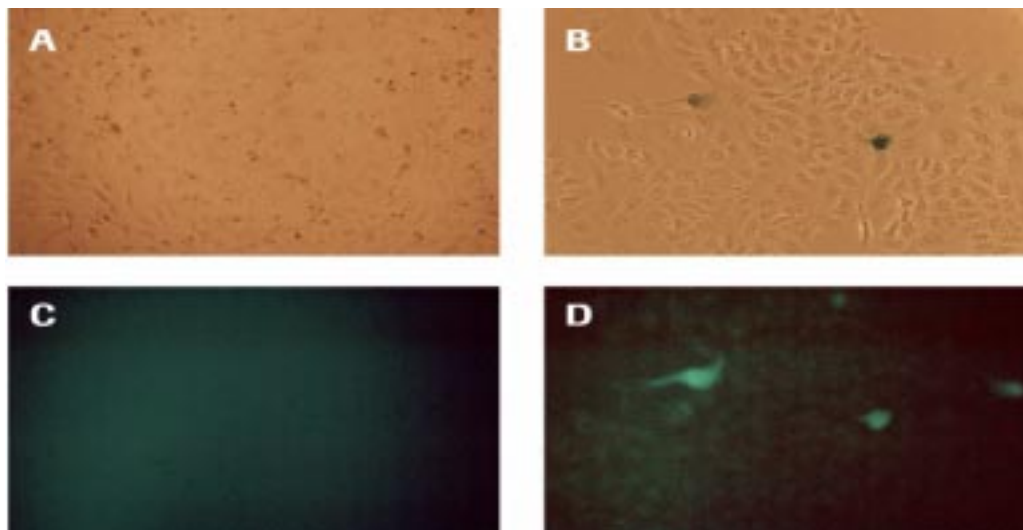


Abb.4.6.12.2. Nachweis der zeitgleichen Cre Rekombinase induzierten GFP und beta-Galaktosidase Expression in doppelstabilen pLoxCa-GFP/pLoxCa-lacZ VERO-Zelllinien mittels X-Gal Färbung. Nicht-transfizierte (**A,C**), oder mit pMC-Cre transfizierte doppelstabile Zellen (**B,D**) wurden 38 Stunden nach der Transfektion fixiert. Die Cre Rekombinase induzierte *lacZ* Expression wurde durch Zugabe von X-Gal Lösung im Lichtmikroskop nachgewiesen (**B**). Nicht-induzierte Zellen zeigen nach Zugabe von X-Gal keine blauen Zellen (**A**), sowie im Fluoreszenzmikroskop keine GFP Fluoreszenz (**C**). Die gleichen Cre Rekombinase induzierten blauen Zellen von **B** zeigen dagegen auch GFP Fluoreszenz im Fluoreszenzmikroskop (**D**).

4.6.13. Nachweis der zeitgleichen Cre Rekombinase induzierten GFP und beta-Galaktosidase Expression in doppelstabilen VERO-Zelllinien mittels Westernblot-Analyse

Um eine genauere Aussage über die Effizienz der Cre Rekombinase induzierten Coexpression in der gesamten Zellpopulation machen zu können, wurden totale Zelllysate der Zellen hergestellt und eine Westernblot-Analyse mit gleichen Volumina der einzelnen Lysate durchgeführt. Ist die Induktion beider Gene vergleichbar stark, so sollte sich dies anhand der Westernblot-Analyse erkennen lassen. Gleiche Volumina von Zelllysaten induzierter und nicht-induzierter Zellen wurden in einem 8%-igen SDS-Polyacrylamidgel für die Detektion von GFP-Protein, und in einem 12%-igen SDS-Polyacrylamidgel für die Detektion von beta-Galaktosidase elektrophoretisch aufgetrennt. Das GFP-Protein wurde mit einem Gemisch aus zwei Anti-GFP monoklonalen Maus Antikörper (Boehringer Mannheim), einem sekundären Ziegen Anti-Maus IgG, (H+L) Peroxidase gekoppelten Antikörper (Pierce, Illinois) und dem Substrat Lumi-Light (Boehringer Mannheim) nachgewiesen. Das beta-Galaktosidase-Protein wurde mit einem Anti-beta-Galaktosidase monoklonalen Maus Antikörper (Boehringer Mannheim) und ansonsten mit dem gleichen sekundären Antikörper, sowie dem gleichen Substrat wie für das GFP-Protein detektiert. Der Nachweis der Proteine erfolgte durch Exposition auf einem Röntgenfilm (Biomax, Kodak).

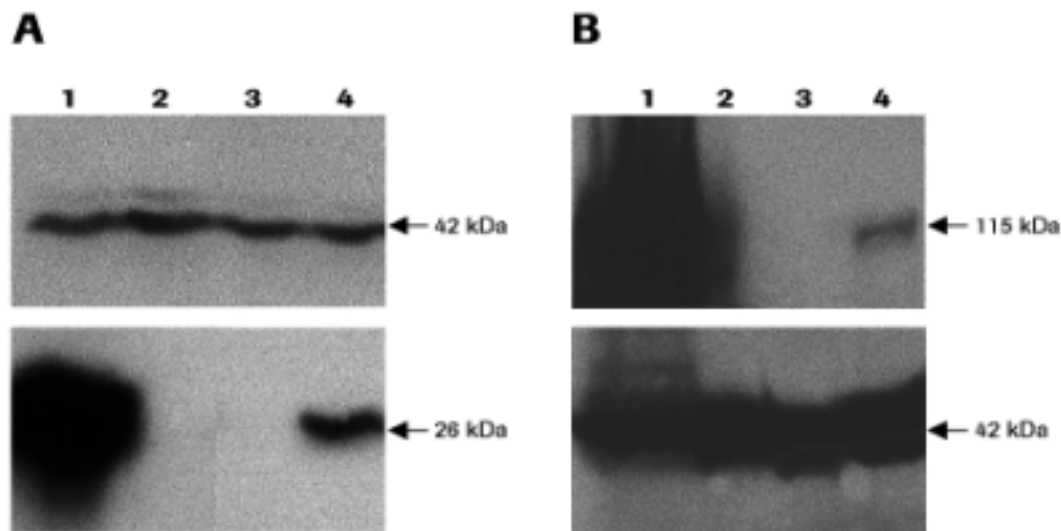


Abb.4.6.13. Nachweis der zeitgleichen Cre Rekombinase induzierten GFP und beta-Galaktosidase Expression in doppelstabilen VERO-Zelllinien mittels Westernblot-Analyse. (**A**) Nachweis des GFP-Proteins in totalen Zelllysaten doppelstabiler VERO-Zelllinien. (**Spur 1**) VERO-Zellen wurden mit 2 μ g pEGFP-N3 Plasmid DNA (Clontech) transfiziert. (**Spur 2**) Nicht-transfizierte VERO-Zellen. (**Spur 3**) Nicht-induzierter doppelstabiler Klon K3/1. (**Spur 4**) Cre Rekombinase induzierter doppelstabiler Klon K3/1. (**B**) Nachweis des beta-Galaktosidase-Proteins in totalen Zelllysaten doppelstabiler VERO-Zelllinien. (**Spur 1**) VERO-Zellen wurden mit 2 μ g pCMV-beta Plasmid DNA (Clontech) transfiziert. (**Spur 2**) Nicht-transfizierte VERO-Zellen. (**Spur 3**) Nicht-induzierter doppelstabiler Klon K3/1. (**Spur 4**) Cre Rekombinase induzierter doppelstabiler Klon K3/1.

4.7. Cre-Rekombinase induzierte Expression des HSV-1 *IE3* Gens

Wie die bisherigen Ergebnisse mit verschiedenen loxP/Stop/loxP-Kassette Reporterkonstrukten und den entsprechenden stabilen VERO-Zelllinien (siehe Ergebnisse 4.6.) gezeigt haben, erfüllt das Cre/Lox Rekombinations-System die Bedingungen für die induzierbare Genexpression zytotoxischer Gene wie z. B. des HSV-1 *IE3* Gens. Westernblot-Analyse, Fluoreszenzmikroskopie und X-Gal Färbung transient- oder stabil transfizierter Zellen zeigten, dass die Stop-Kassette zur Repression der Reporter-gen-expression ausreichend ist. Cotransfektionen der Reporterkonstrukte mit einem Cre exprimierenden Plasmid oder Amplikon Vektor, sowie eine nach posttransfektionelle Infektion mit einem Cre exprimierenden HSV-1 Amplikon Vektor führen zur Deletion der Stop-Kassette und somit zur Induktion der Genexpression. Ein Vergleich der Expressionstärken nach erfolgter Rekombination mit Konstrukten, welche keine Stop-Kassette zwischen Promoter und dem Reporter-gen enthalten, zeigt bei transients Transfektion keine offensichtlichen Unterschiede.

Für die Herstellung einer stabilen, induzierbaren *IE3*-Vero Zelllinie, wurde das *IE3*-Gen in das Plasmid kloniert, so dass die kodierende *IE3* Sequenz durch die loxP/Stop/loxP-Kassette vom CMV IE1 Enhancer / Promoter getrennt ist. In den folgenden Experimenten wurde das System auf die Dichte der *IE3* Genexpression untersucht, denn bereits eine schwache basale *IE3* Expression kann über einen längeren Zeitraum den Zelltod oder das Abschalten der *IE3* Genexpression zur Folge haben (siehe Ergebnisse 4.2.). Da die Herstellung stabiler Zelllinien über einen Zeitraum von mehreren Wochen verläuft und das experimentelle Arbeiten mit einer solchen Zelllinie einen noch grösseren Zeitaufwand erfordert, ist die vollständige Repression des zytotoxischen Gens unabdingbar.

4.7.1. Konstruktion von pCLoxCa-*IE3* und pNLoxCa-*IE3*

4.7.1.1. Konstruktion von PCLoxCa-*IE3*

Für die Konstruktion von pCLoxCa-*IE3* waren mehrere Klonierungsschritte notwendig. Das *IE3* Gen (kodierende Sequenz) wurde mit PmeI aus pCtet-*IE3* (siehe Ergebnisse 4.2.3) herausgeschnitten und in die SmaI Restriktionsstelle von pUC18 inkloniert, wobei pUC-*IE3* gebildet wurde. Die Orientierung des *IE3* Gens wurde mittels Restriktionsverdau bestimmt. Das *IE3* Gen konnte nun mit *EcoRI* und *HindIII* aus pUC-*IE3* ausgeschnitten werden und in richtiger Orientierung zwischen die *EcoRI* und *HindIII* Schnittstellen von pCDNA3 (Invitrogene) inkloniert werden, wodurch pCDNA3-*IE3* (*EcoRI* / *HindIII*) gebildet wurde. In diesem Konstrukt liegt die kodierende Sequenz des *IE3* Gens innerhalb von zwei *XbaI* Schnittstellen, die die Isolierung des *IE3* Gens mit einem *XbaI* Restriktionsverdau ermöglicht. Das Fragment, welches die loxP/Stop/loxP-Kassette enthält wurde mit *EcoRI* und *XmnI* aus pBS302 (Gibco BRL) isoliert und in die *EcoRI* und *EcoRV* Schnittstelle von pCDNA3 (Invitrogene) kloniert, wodurch pCDNA3 LoXStopCa (*EcoRI* / (*EcoRV* / *XmnI*)) entstand. Für die letzte Herstellung von pCLoxCa-*IE3*, wurde die kodierende Region des *IE3* Gens mit *XbaI* aus pCDNA3-*IE3* (*EcoRI* / *HindIII*) herausgeschnitten und die singuläre *XbaI* Schnittstelle hinter die Stop-Kassette in pCDNA3 LoXStopCa (*EcoRI* / (*EcoRV* / *XmnI*)) inkloniert. Mit verschiedenen Restriktionsenzymen wurde die Orientierung des *IE3* Gens in pCLoxCa-*IE3* bestimmt. Der Aufbau des Plasmids pCLoxCa-*IE3* ist in Abb. 4.7.1.1. dargestellt.

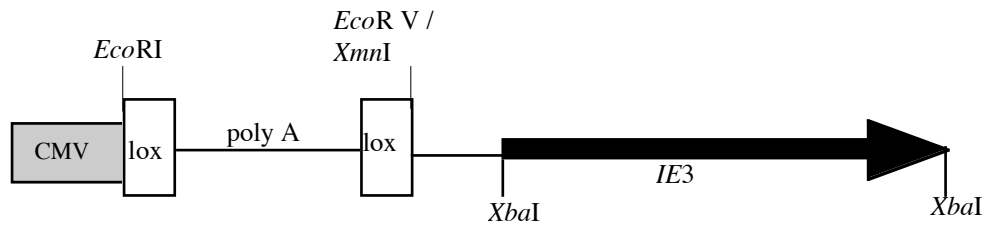


Abb. 4.7.1.1. Aufbau von pCLOxCa-IE3. In pCLOxCa-IE3 ist die kodierende *IE3* DNA Sequenz durch die loxP / polyA / loxP vom CMV IE1 Enhancer / Promoter getrennt. Durch die funktionelle Trennung von *IE3* Gen und Promoter ist die Genexpression reprimiert. Die loxP / polyA / loxP Kasette wurde als *EcoRI* / *XmnI* Fragment und das *IE3* Gen als *XbaI* Fragment in Plasmid pcDNA3 kloniert.

4.7.1.2. Konstruktion von pNLOxCa-IE3

Die Sequenzen der loxP/Stop/loxP-Kasette wurde mit *EcoRI* und *ApaI* aus pcDNA3 LoxStopCa (*EcoRI* / (*EcoRV* / *XmnI*))herausgeschnitten und in die *EcoRI* und *ApaI* Schnittstelle von pEGFP-N3 einkloniert. Hierdurch wurde pLoxCa-GFP gebildet (siehe Ergebnisse 4.7.2.). Die zweite *XbaI* Schnittstelle hinter dem GFP Gen ist in diesem Konstrukt methyliert, wodurch sie vor dem Verdau mit *XbaI* geschützt ist. Aus diesem Grund wurde das Konstrukt in den methylierungsdefizienten *E. coli* Stamm GM2163 (NE-Biolabs) transformiert, wodurch unmethylierte DNA gewonnen werden konnte . Die aus diesem Stamm isolierte pLoxCa-GFP DNA ist nun an beiden *XbaI* Schnittstellen unmethyliert, so dass das GFP-Gen mit einem *XbaI* Verdau aus dem Plasmid herausgeschnitten werden konnte. In die *XbaI* Schnittstelle des verbleibenden pLoxCa Plasmids, wurde in einem weiteren Klonierungsschritt das mit *XbaI* aus pCDNA3-*IE3* (*EcoRI* / *HindIII*) isolierte *IE3* Gen einkloniert, wodurch pNLOxCa-*IE3* entstand. Der Aufbau von pNLOxCa-*IE3* isty in Abb. 4.7.1.2. dargestellt. Da pNLOxCa-*IE3* von Plasmid pEGFP-N3 (Clontech) abgeleitet ist, ermöglicht es im Gegensatz zu pCLOxCa-*IE3*, das von Plasmid pcDNA3 abgeleitet ist, die N-terminale Fusion mit anderen Proteinen (z. B. VP22, Östrogenliganden-Bindungsdomäne u.a.).

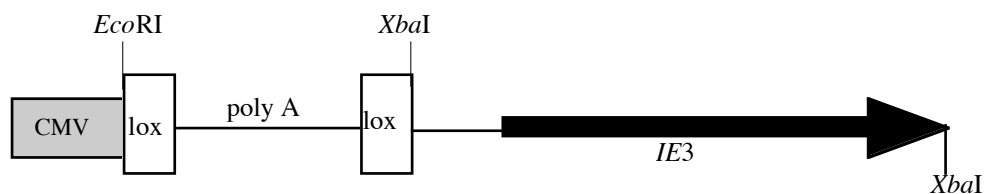


Abb. 4.7.1.2. Aufbau von pNLOxCa-IE3. In pNLOxCa-IE3 ist die kodierende *IE3* DNA Sequenz durch die loxP / polyA / loxP vom CMV IE1 Enhancer / Promoter getrennt. Hierdurch ist die *IE3* Genexpression reprimiert.

4.7.2. Nachweis der Cre-Rekombinase induzierten *IE3* Genexpression in transfizierten VERO-Zellen mittels Westernblot-Analyse

Beide Konstrukte pCLOxCa-*IE3* und pNLOxCa-*IE3*, wurden nach Transfektion in VERO-Zellen auf die Cre Rekombinase induzierte *IE3* Genexpression getestet (Abb. 4.7.2.). Hierzu wurden 1×10^6 VERO-Zellen mit Cre exprimierender HSV-1 Amplikon DNA und pCLOxCa-*IE3* oder pNLOxCa-*IE3* Plasmid DNA cotransfiziert. Das Amplikon Plasmid enthält neben der Transkriptionseinheit für Cre auch eine Transkriptionseinheit für die Synthese von GFP. 48 Stunden nach der Transfektion wurde die Transfektionseffizienz anhand der GFP Fluoreszenz beobachtet

(Transfektionseffizienz ca 15%) und die Zellen anschliessend geerntet. Die Zellen wurden in Probenpuffer lysiert und gleiche Volumina der einzelnen totalen Zellextrakte in einem 12%-igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteine wurden aus dem Gel mit einer Semi-dry Blotting Apparatur auf eine Immobilon-P Membran (Millipore, Bedford) transferiert. Die Detektion des *IE3* Genproduktes (ICP4, 175kDA) erfolgt mit einem monoklonalen Maus Anti-ICP4 Antikörper (ABI) und einem zweiten Peroxidase gekoppelten polyklonalen Ziege Anti-Maus IgG (H+L) Antikörper (Pierce, Illinois). Das ICP4 Protein wurde schliesslich durch Zugabe von Lumi-Light Substratlösung (Boehringer Mannheim) und Exposition eines Röntgenfilms (X-Omat, Kodak) detektiert.

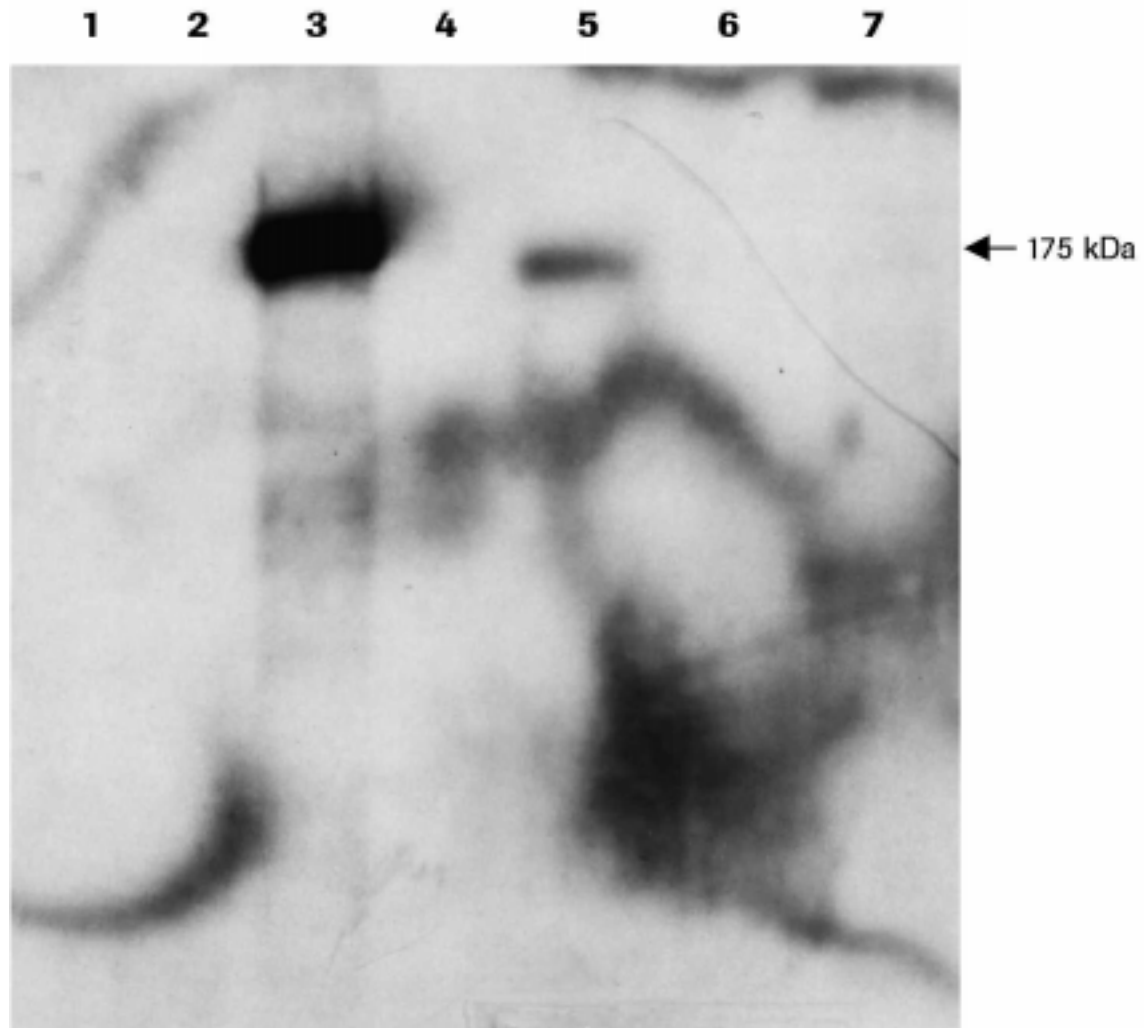


Abb. 4.7.2. Westernblot-Analyse zum Nachweis der Cre-Rekombinase induzierten *IE3* Genexpression in transient transfizierten VERO-Zellen. VERO-Zellen wurden mit pCLOxCa-*IE3*, oder pNloxPCa-*IE3* transfiziert (**Spur 4,6**), oder mit pCLOxCa-*IE3*, oder pNloxCa-*IE3* und pHGCXnCRE cotransfiziert (**Spur 5,7**). 48 Std. nach der Transfektion wurden gleiche Volumina der totalen Zellysate im Westernblot analysiert. (**Spur 1,2**) Nicht-transfizierte VERO-Zellen und pcDNA3 transfizierte VERO-Zellen. (**Spur 3**) VERO-Zellen transfiziert mit pcDNA3-*IE3* (*EcoRI / HindIII*). (**Spur 4**) VERO-Zellen transfiziert mit pCLOxCa-*IE3*. (**Spur 5**) VERO-Zellen cotransfiziert mit pCLOxCa-*IE3* und pHGCXnCRE. (**Spur 6**) VERO-Zellen transfiziert mit pNloxCA-*IE3*. (**Spur 7**) VERO-Zellen cotransfiziert mit pNloxCa-*IE3* und pHGCXnCRE.

Die Westernblot-Analyse zeigt, dass im nicht-induzierten Zustand kein ICP4 Protein in den totalen Zelllysaten nachweisbar ist (Abb.4.7.2. Spur 4,6). Dieses Ergebnis stimmt mit den in Abschnitt 4.6. erhaltenen Resultaten überein. Die in Spur 5 detektierte ICP4-Bande ist relativ schwach, was auf eine verminderte Cre Rekombinase Induktion deutet. Ein Vergleich mit der positiven Kontrolle lässt erkennen, dass die Cre induzierte *IE3* Genexpression einige Grössenordnungen unter dieser liegt. Die Cre Rekombinase induzierte *IE3* Genexpression lässt sich in Spur 7 nicht nachweisen. Hierbei handelt es sich vermutlich um ein technisches Problem; denn die Cre Rekombinase induzierte *IE3* Genexpression erfordert die Aufnahme beider Konstrukte in die Zellen.

4.7.3. Stabile Transfektion von pCLOxCa-*IE3* und pNLOxCa-*IE3* in VERO-Zellen zur Herstellung einer stabilen *IE3* induzierbaren VERO-Zelllinie

Für die Herstellung der stabilen, *IE3* induzierbaren VERO-Zelllinie wurden VERO-Zellen (80% Konfluent) in einer 6-Loch Platte mit 2µg pCLOxCA-*IE3* bzw. pNLOxCa-*IE3* DNA und 7µl Lipofectamine (Gibco-BRL) transfiziert. 1. Tag nach der Transfektion wurden die Zellen mit Trypsin / EDTA (Gibco-BRL) von der Platte gelöst, in 90ml Selektionsmedium(Medium 199, 10% FKS, 100mg / ml Penicillin / Streptomycin, 1.5mg / ml G418) überführt und verdünnt. Je 15ml der der Suspension wurden auf 10cm Zellkulturschalen verteilt und für 3-4 Wochen bei 5% CO₂ und 37°C inkubiert. Das Heranwachsen der einzelnen Klone wurde im Lichtmikroskop beobachtet. Nach ca. 4. Wochen waren die einzelnen Klone mit blossen Auge auf den Schalen gut sichtbar. Die einzelnen Klone wurden mit Typsin /EDTA abgelöst und in je ein Loch einer 24-Loch Platte überführt. Insgesamt wurden aus dieser Transfektion 100 Klone gepickt. Zur Expansion der einzelnen Klone wurden die Klone in 25cm², 75cm² und schliesslich in 175cm² Kulturflaschen nacheinander hochgezogen. Im Vergleich zu den stabilen Transfektionen mit pCtet-*IE3* (siehe 4.2.8), wurden bei der stabilen Transfektion mit pCLOxCa-*IE3* bzw. pNLOxCa-*IE3* ca. 10mal mehr Klone im Selektionsmedium erhalten. Dieses Ergebnis ist vermutlich auf die unterschiedliche Qualität der beiden Regulationssysteme zurückzuführen. Im Tet. off- System ist die basale Expression von *IE3* im reprimierten Zustand deutlich höher als im Cre / loxP System (siehe 4.2.5., 4.6.6.2., 4.7.2.), hierdurch sterben die meisten stabilen Klone möglicherweise während der Selektionsphase oder schalten die *IE3* Genexpression irreversibel ab.

4.7.4. Untersuchung der stabilen VERO-*IE3* Klone

Nicht alle stabilen Klone, die im Selektionsmedium heranwachsen exprimieren das Gen von Interesse. Diese Phänomen lässt mehrere Erklärungen zu: 1. Das Konstrukt integriert in einem Bereich des Genoms der transkriptionell nicht aktiv ist (dies kann jedoch hierbei ausgeschlossen werden, da das Resistenzgen ebenfalls auf dem Plasmid enthalten ist und in diesem Fall auch nicht exprimiert werden würde). 2. Für die Integration ins Genom muss das zirkuläre Plasmid linearisiert werden. Liegt die Bruchstelle im Gen, so wird das Gen hierbei zerstört. 3. Das Gen wird sofort nach Integration ins Genom wieder deletiert. 4. Das Gen wird nach Integration durch Methylierung inaktiviert. Die einzelnen Klone lassen sich jedoch nicht nur in exprimierende und nicht exprimierende Klone unterteilen, sie unterscheiden sich auch bezüglich der Expressionsstärken. Die Untersuchung der stabilen Klone diente zunächst der Identifizierung von Klonen, die das *IE3* Gen exprimieren. In den beiden Konstrukten (pCLOxCa-*IE3* und pNLOxCa-*IE3*) ist die *IE3* Genexpression durch die Stop-Kassette reprimiert, dies erschwert die Untersuchung der stabilen Klone. Das heisst, die *IE3* Genexpression muss zunächst für die Identifizierung der Klone induziert werden. Die Untersuchung der stabilen VERO-*IE3* Klone wurde deshalb wie folgt in zwei Schritten durchgeführt.

Schritt 1. Cre Rekombinase induzierte *IE3* Genexpression und Verpackung von pHGCXnCRE-Amplikon DNA

Die Klone wurden in einer 6- Loch Platte ausgeät und mit pHGCXnCRE HSV-1 Amplikon DNA transfiziert. Zellen die Amplikon DNA aufgenommen haben, sollten durch Cre-Rekombinase vermittelte Deletion der Stop-Kassette die *IE3*-Genexpression induzieren. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die mit Amplikon DNA transfizierten Klone mit HSV-1 *d120* (MOI = 2) infiziert. 3. Tage nach der Infektion mit HSV-1 *d120* wurden die Überstände der einzelnen Klonen geerntet. HSV-1 *d120* enthält eine Deletion im *IE3* Gen und kann deshalb nur in Zellen replizieren, die nach Cre vermittelter Induktion das *IE3* Gen exprimieren. Der Defekt der Virus-Mutante wird bereits durch geringe Mengen von ICP4 Protein komplementiert. Die Replikation von HSV-1 *d120* führt jedoch gleichzeitig zur Replikation und Verpackung des Amplikon Vektors, wobei die Replikation des sog. Helfervirus HSV-1 *d120* im Vergleich zum Amplikon Vektor in der Regel bevorzugt ist. Bei diesem Prozess wird neues HSV-1 *d120* und verpackter pHGCXnCRE Amplikon Vektor gebildet. Hierdurch können schliesslich weitere Zellen sowohl mit Amplikon-Virus als auch mit HSV-1 *d120* infiziert werden, wobei das über das Amplikon Plasmid exprimierte Cre in den neu infizierten Zellen die *IE3* Genexpression induziert und der Prozess von neuem beginnt. Dieser Verpackungsprozess läuft so lange, bis alle Zellen durch die Virusreplikation zerstört sind.

Schritt 2. Titration nach: Amplikon, Helfervirus (HSV-1 *d120*) und Revertanden des unter Schritt 1 beschriebenen Experiments

E5-Zellen sind von VERO-Zellen abgeleitet und enthalten in ihrem Genom das *IE3* Gen unter der Kontrolle seines natürlichen Promoters (DeLuca *et. al.*, 1985). Nach Infektion mit HSV-1 *d120* wird der *IE3* Promoter in den E5-Zellen induziert, wodurch das *IE3* Gen exprimiert wird und der Defekt der *IE3* Deletionsmutante HSV-1 *d120* komplementiert werden kann. Mit einem Aliquot (500 μ l) der Überstände wurden E5-Zellen und VERO-Zellen für 2. Stunden infiziert, danach wurde die Viruslösung von den Zellen entfernt, die Zellen 3mal mit PBS gewaschen und frisches Medium mit 1% Carboxymethylcellulose (CMC) zu den Zellen gegeben. Am nächsten Tag konnte der verpackte HSV-1 Amplikon Vektor in den VERO-Zellen anhand der GFP Fluoreszenz im Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden. Die grün leuchtenden Zellen wurden gezählt und mit der Verdünnungsstufe der Titer des Amplikon Stocks in GFUs (green forming units) bestimmt. Auf den VERO-Zellen können auch mögliche Revertanden nachgewiesen werden, die Plaques auf VERO-Zellen ausbilden würden. Die Entstehung von Revertanden mit Wildtyp Phänotyp ist durch die Rekombination homologer HSV-1 Sequenzen im Genom der E5-Zellen und des Helfervirus möglich (Davidson & Stow, 1985). Der Titer von HSV-1 *d120* Helferviren wurde auf E5-Zellen nach 3. Tagen mittels Plaquesfärbung bestimmt.

Stabile Klone VERO- <i>IE3</i> + pHGcXnCRE+ HSV-1 <i>d120</i>	pHGcXnCRE Amplikon Titer (GFU/ml)	HSV-1 <i>d120</i> Helfervirus Titer (PFU/ml)	Revertanden mit <i>wt</i> Phänotyp (in 500µl)
K6/10	4,0 x 10 ³	2,6 x 10 ³	0
K6/23	8,8 x 10 ¹	3,2 x 10 ²	0
K6/24	8,3 x 10 ³	1,6 x 10 ³	0
K9/5	3,8 x 10 ³	4 x 10 ³	0

Tabelle 4.7.4 Charakterisierung stabiler VERO-*IE3* Klone. In der Tabelle sind die Titer von HSV-1 *d120* Helfervirus, in HSV-1 Partikel verpackter HGcXnCRE Amplikon Vektor und die Titer der Revertanden mit Wildtyp Phänotyp (in 500µl) der vier verschiedenen stabilen VERO-*IE3* Klonen aufgeführt. Die vier stabilen Klone exprimieren nach Cre-Rekombinase vermittelter Deletion der loxP/Stop/loxP-Kassette das *IE3* Gen.

4.7.5. Repression der *IE3* Expression in stabilen VERO-*IE3* Klonen

In dem oben beschriebenen Untersuchungsverfahren konnte gezeigt werden, dass die vier stabilen Klone nach Transfektion von pHGcXnCRE *IE3* exprimieren und somit der HSV-1 Amplikon Vektor nach Infektion mit HSV-1 *d120* repliziert und in Viruspartikel verpackt wird. Ist das System dicht und die Repression der *IE3* Genexpression absolut, so sollte ohne Induktion durch Cre-Rekombinase und nach Infektion mit HSV-1 *d120* keine Virus oder Amplikon Replikation und Verpackung in diesen Klonen stattfinden. Das Experiment hierzu wurde analog dem oben beschriebenen Untersuchungsverfahren, jedoch mit pHSV-GFP (Abody-Guterman *et. al.*, 1997) als Amplikon Vektor durchgeführt. Dieser Vektor enthält kein Cre-Rekombinase Gen, wodurch die *IE3* Genexpression nicht induziert werden kann. Eine mögliche Replikation von HSV-1 *d120*, sowie eine Verpackung von pHSV-GFP, würde deshalb auf eine unvollständige Repression hinweisen. 1 bis 5 Tage nach Infektion der Klone wurden die Überstände geerntet und auf E5-Zellen bzw. VERO-Zellen titriert.

Stabile Klone VERO- <i>IE3</i> + pHSV-GFP+ HSV-1 <i>d120</i>	pHSV-GFP Amplikon Titer (GFU / ml)	HSV-1 <i>d120</i> Helfervirus Titer (PFU / ml)	Revertanden mit <i>wt</i> Phänotyp (in 500µl)
K6/10	0	0	0
K6/23	0	0	0
K6/24	0	0	0
K9/5	0	0	0

Tabelle 4.7.5 Repression der *IE3* Genexpression in stabilen VERO-*IE3* Klonen. In der Tabelle ist die Replikation von HSV-1 *d120*- und Verpackung von pHSV-GFP Amplikon in verschiedenen stabilen VERO-*IE3* Klone im nicht-induzierten Zustand über einen Zeitraum von 5 Tagen zusammengefasst. 5 Tagen nach der Infektion mit HSV-1 *d120* wurden die Überstände geerntet. Der verpackte Amplikon Vektor und mögliches rekombinantes Virus wurden auf VERO-Zellen und repliziertes HSV-1 *d120* Virus auf E5-Zellen nachgewiesen.

Die Daten in den Tabellen 4.7.4. und 4.7.5. zeigen deutlich, dass die *IE3*-Genexpression in den vier verschiedenen Klonen sehr stark reprimiert ist, so dass eine Komplementation der *IE3* Deletionsmutante und die daraus resultierende Verpackung von pHSV-GFP Amplikon-Vektor nicht möglich ist. Eine reduzierte ICP4 Proteinmenge würde zu einem verzögerten Viruswachstum und somit folglich zu einem reduzierten Virustiter führen. Eine Inkubationszeit der infizierten Zellen über 5 Tage zeigt, dass auch eine schwache Replikation des Virus ausgeschlossen werden kann. Die Induzierbarkeit der *IE3* Genexpression zeigt sich anhand der induzierten Replikation von HSV-1 *d120*, sowie der Verpackung von pHGCXnCRE Amplikon DNA.

4.7.6. Nachweis der Verpackung von pHGCXnCRE Amplikon DNA in VERO-*IE3* Zelllinien mittels HSV-1 *d120* Helfervirus

Die Cre Rekombinase induzierte *IE3* Genexpression wurde bereits in dem unter 4.7.4. und 4.7.5. beschriebenen Verfahren anhand der Titration der Virusüberstände nachgewiesen. Durch die Cre Rekombinase von pHGCXnCRE Amplikon DNA wurde die *IE3* Genexpression in den stabilen VERO-*IE3* Klonen induziert und somit das infizierte HSV-1 *d120*, sowie die transfizierte pHGCXnCRE Amplikon DNA repliziert und in HSV-1 Viruspartikel verpackt. Wurde das gleiche Experiment mit pHSV-GFP Amplikon DNA anstelle von pHGCXnCRE Amplikon DNA durchgeführt, so wurde weder die transfizierte HSV-1 Amplikon DNA noch das infizierte HSV-1 *d120* repliziert und in HSV-1 Partikel verpackt. Da beide Amplikon-Vektoren (pHGCXnCRE, pHSV-GFP) das GFP Gen tragen können transfizierte Zellen anhand der GFP Fluoreszenz identifiziert werden. Wird der Amplikon-Vektor in HSV-1 Partikel verpackt, so können die aus den Zelle freigesetzten Amplikon Vektoren weitere Zellen infizieren und ebenfalls durch die GFP Fluoreszenz sichtbar gemacht werden. Aufgrund dieser Gegebenheit, kann der Verpackungsprozess beider Amplikon-Vektoren in den Zellen anhand der Zunahme an GFP fluoreszierenden Zellen nachgewiesen werden. Um den Verpackungsprozess von pHGCXnCRE Amplikon DNA über 3 Tage beobachten und nachweisen zu können, wurden die stabilen VERO-*IE3* Klone mit pHGCXnCRE Amplikon DNA transfiziert und 1 Tag nach der Transfektion mit HSV-1 *d120* (MOI = 0.1) infiziert (Abb. 4.7.6. A-C). Die Verpackung des Amplikon-Vektors wurde über 3 Tage der nach Infektion im Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Als positive Kontrolle wurden E5-Zellen (Abb. 4.7.6. D-F) und als negative Kontrolle VERO-Zellen (Abb. 4.7.6. G-I) ebenfalls mit pHGCXnCRE Amplikon DNA transfiziert und 1 Tag nach der Transfektion mit HSV-1 *d120* (MOI = 0.1) infiziert.

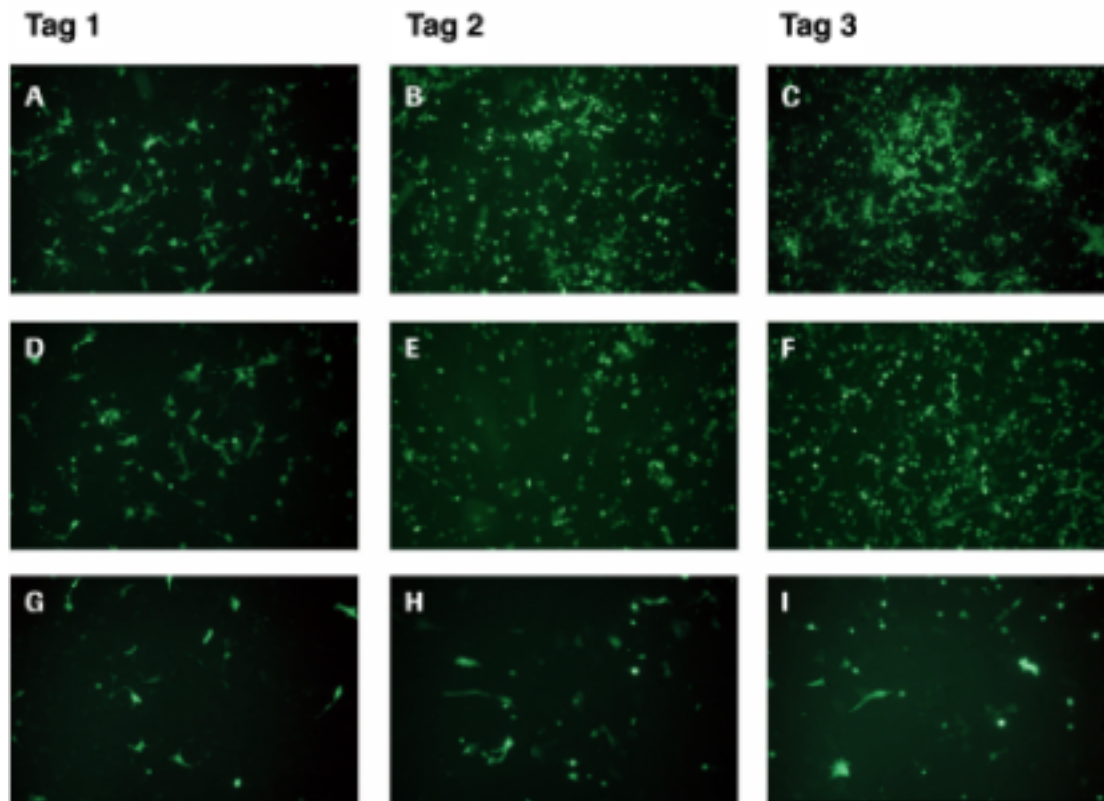


Abb. 4.7.6. Nachweis der Verpackung von pHGCXnCRE Amplicon DNA in stabilen VERO-IE3 Klonen mittels HSV-1 *d120* Helfervirus. Gezeigt ist die Verpackung von pHGCXnCRE Amplicon DNA in VERO-IE3 Zellen, Klon9/5 (A-C), E5-Zellen (D-F) und VERO-Zellen (G-I) mittels HSV-1 *d120* Helfervirus (MOI = 0.1). Die Verpackung des Amplicon-Vektors wurde anhand der Zunahme GFP fluoreszierender Zellen über 3 Tage beobachtet (v. l n. r. Tag 1. bis Tag 3.).

Die Abbildung 4.7.6. zeigt, dass die transfizierte pHGCXnCRE Amplicon DNA nach Infektion mit HSV-1 *d120* Helfervirus in VERO-IE3 Zellen, sowie E5-Zellen repliziert und verpackt wird. Innerhalb von 3 Tagen nach der Infektion nimmt die Anzahl GFP fluoreszierender Zellen deutlich zu. (A-C u. D-F). In VERO-Zellen konnte die Zunahme fluoreszierender Zellen nicht beobachtet werden (G-I). VERO-Zellen besitzen kein *IE3* Gen, wodurch die lethal Mutante HSV-1 *d120* auf diesen Zellen nicht wachsen kann. Aus diesem Grund kann auch die pHGCXnCRE Amplicon DNA nach Transfektion in diesen Zellen nicht in HSV-1 Partikel verpackt werden. Die Virusüberstände derartiger Verpackungsexperimente wurden auf VERO-Zellen und E5-Zellen titriert. Der maximale Amplicon Titer betrug 1×10^5 GFU / ml und ein Verhältnis von Amplicon Virus zu Helfervirus von 5:1.

4.7.7. Nachweis Cre Rekombinase induzierter HSV-1 *d120* Plaques auf VERO-IE3 Klonen.

Ein weiteres Merkmal einer *IE3* komplementierenden Zelllinie, wie z. B. E5-Zellen, ist die Ausbildung von Plaques nach Infektion mit HSV-1 *d120*. E5-Zellen exprimieren das *IE3* Gen nach Infektion mit HSV-1 *d120* und komplementieren den Defekt der konditionalen Lethalmutante. Nach Infektion vermehrt sich das Virus in den Zellen und bildet Nachkommenviren, die wiederum benachbarte Zellen infizieren können. Durch Zugabe von CMC-Medium ist die Diffusion des Virus über den gesamten Zellrasen eingeschränkt. Aufgrund der lokalen Virusvermehrung im Zellrasen werden nach 2-3 Tagen Löcher (Plaques) im Zellrasen mikroskopisch sichtbar. Nach anfärben der Zellen mit Kristallviolett, erscheinen die Plaques als weisse Punkte in dem ansonsten

Violett gefärbten Zellrasen. Infiziert man VERO-Zellen mit HSV-1 *d120* und gibt CMC-Medium auf die Zellen, so bilden sich nach 2-3 Tagen keine Plaques im Zellrasen. Der Defekt der konditionalen Lethalmutante wird nicht komplementiert und eine Virusvermehrung findet nicht statt. VERO-*IE3* Zellen sollten sich im induzierten Zustand wie E5-Zellen verhalten und nach Infektion mit HSV-1 *d120* die Ausbildung von Plaques ermöglichen. Im nicht-induzierten Zustand sollten sich VERO-*IE3* Zellen dagegen wie VERO-Zellen verhalten und die Ausbildung von Plaques nicht ermöglichen. Um diese Eigenschaften zu untersuchen wurden die stabilen VERO-*IE3* Klone mit pHGCXnCRE Amplikon DNA und mit pHSV-GFP Amplikon DNA transfiziert. 1 Tag nach der Transfektion wurden die Zellen mit HSV-1 *d120* (MOI=1) infiziert. Die Zellen wurden mit CMC-Medium versetzt und für 2 Tage inkubiert. Da die Replikation von HSV-1 *d120* nur in Zellen stattfindet, die den Amplikon Vektor enthalten und der Amplikon Vektor in diesem Fall ebenfalls in HSV-1 Partikel verpackt wird (siehe 4.7.4. und Abb. 4.7.6.), können die Plaques im Fluoreszenz-mikroskop anhand der GFP Fluoreszenz sichtbar gemacht werden (Abb. 4.7.7.). Als Kontrollen wurden E5-Zellen und VERO-Zellen ebenfalls mit mit pHGCXnCRE Amplikon DNA transfiziert, sowie mit HSV-1 *d120* infiziert.

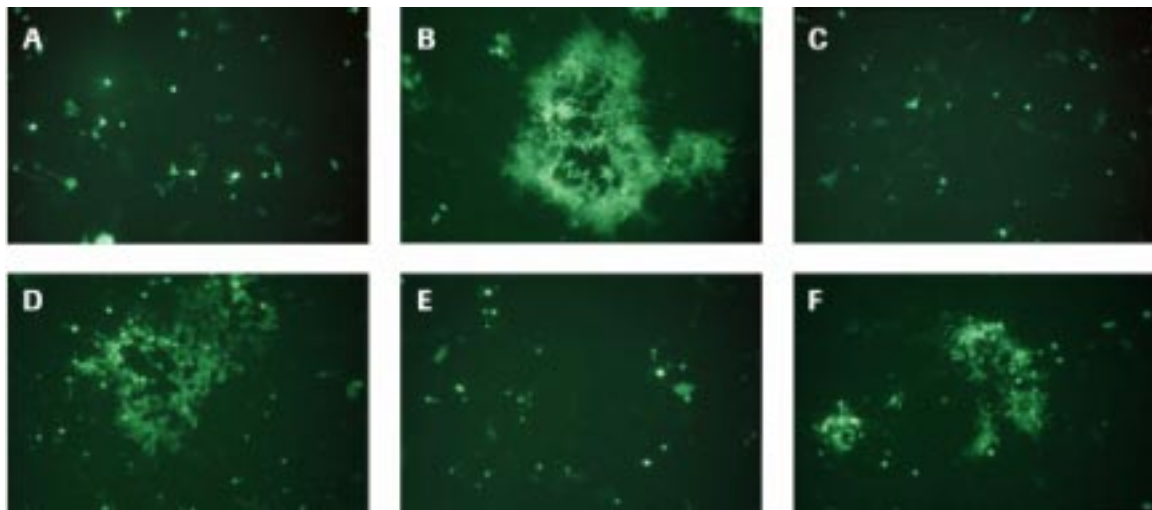


Abb. 4.7.7. Nachweis Cre Rekombinase induzierter HSV-1 *d120* Plaques auf VERO-*IE3* Klonen. VERO-*IE3* Klone wurden mit pHSV-GFP Amplikon DNA (K9/5 = A u K6/10 C) bzw. mit pHGCXnCRE Amplikon DNA (K9/5 = B u K6/10 D) transfiziert und mit HSV-1 *d120* (MOI= 1) infiziert. VERO-Zellen (E) und E5-Zellen (F) wurden als Kontrollen ebenfalls mit pHGCXnCRE Amplikon DNA transfiziert und mit HSV-1 *d120* (MOI= 1) infiziert.

4.7.8. Titration von HSV-1 *d120* auf *IE3* induzierten stabilen VERO-*IE3* Klonen und E5-Zellen

Mit der sog. Plauefärbung infizierter Zellen wird der Titer eines Virusstocks, das heisst, die Anzahl der Viren in einem bestimmten Volumen ermittelt. Der Wachstum eines Virus wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. So replizieren z. B. verschiedene Genotypen eines Virusstammes zu unterschiedlichen Titern in den gleichen Zellen und umgekehrt der selbe Genotyp zu unterschiedlichen Titern in verschiedenen Zellen. Die virale Genexpression ist bei HSV-1 zeitlich genauestens festgelegt (Honess & Roizman, 1974). Kleinste Abweichungen in der Kinetik der viralen Genexpression können zu unterschiedlicher Replikation des Virus führen. Ebenso spielt die Suszeptibilität verschiedener Zelllinien gegenüber HSV-1 für das Viruswachstum eine Rolle, wodurch die Titer des selben Virus auf unterschiedlichen Zelllinien ganz anders sein können. VERO-*IE3* Zellen exprimieren das *IE3* Gen erst nach Cre-Rekombinase vermittelter Rekombination. Eine Komplementation von HSV-1

d120 ist somit nur nach Cre-Rekombinase induzierter *IE3* Genexpression möglich. Das Wachstum der *IE3*-Mutante ist jedoch auch von der *IE3* Expressionstärke abhängig. Eine reduzierte *IE3* Genexpression führt zu einem verzögerten Viruswachstum. Um die Wachstumseigenschaften von HSV-1 *d120* auf induzierten VERO-*IE3* Zellen genauer analysieren zu können, wurden VERO-*IE3* Zellen mit pHGCXnCRE Amplikon Vektor infiziert (MOI=ca. 1) und 1 Tag nach der Infektion mit einer Verdünnungsreihe von HSV-1 *d120* superinfiziert. Für den direkten Vergleich wurden E5-Zellen mit der gleichen Verdünnungsreihe von HSV-1 *d120* infiziert. VERO-Zellen wurden als Kontrolle ebenfalls mit der Verdünnungsreihe infiziert. 3 Tage nach der Infektion mit HSV-1 *d120* wurden die Zellen mit Kristallviolett angefärbt und die Plaques sichtbar gemacht.

Verdünnungsstufe HSV-1 <i>d120</i>	Plaques auf E5	Plaques auf VERO	Plaques auf K6/10	Plaques auf K6/24	Plaques auf K9/5
10 ¹	unzählbar	0	350	600	208
10 ²	270	0	32	89	20
10 ³	25	0	3	7	4
10 ⁴	4	0	1	3	2
10 ⁵	1	0	0	0	0
10 ⁶	0	0	0	0	0

Tabelle 4.7.8. Titration von HSV-1 *d120* auf induzierten VERO-*IE3* Klonen und auf E5-Zellen. VERO-*IE3* Zellen wurden mit pHGCXnCRE Amplikon Virus infiziert (MOI= ca. 1) und 1 Tag nach der Infektion mit einer Verdünnungsreihe von HSV-1 *d120* superinfiziert. E5- und VERO-Zellen wurden ebenfalls mit der Verdünnungsreihe von HSV-1 *d120* infiziert. 3 Tage nach der Infektion wurde die Plaquefärbung mit Kristallviolett durchgeführt.

Plaquemorphologie und Virustiter:

Es lassen sich keine Unterschiede in der Plaquemorphologie zwischen den Plaques auf E5-Zellen und VERO-*IE3* Zellen erkennen. Die Plaques sind 3 Tage nach der Infektion sehr gut sichtbar und haben vergleichbare Durchmesser. Im Zentrum der Plaques sind die Zellen abgelöst und bilden ein klares Loch im Zellrasen. Die Plaques haben eine Kreisform und an den Rändern sind abgerundete Zellen zu beobachten, die sich später ebenfalls ablösen und den Durchmesser des Plaques erweitern. Das Ergebnis zeigt, dass der Titer von HSV-1 *d120* auf VERO-*IE3* Zellen im Vergleich zu den Titern auf E5-Zellen um den Faktor 10 reduziert ist. Der Titer von E5-Zellen liegt bei 1×10^6 PfU/ml und bei VERO-*IE3* Zellen bei 1×10^5 - 3×10^5 Pfu/ml. Dies kann auf Unterschiede in der *IE3* Genexpression zurückzuführen sein, wobei man zwischen Expressionsstärke und Expressionskinetik unterscheiden muss. In E5-Zellen ist die *IE3* Genexpression sehr stark an die Kinetik der gesamten Virusreplikation gekoppelt, da der natürliche, virale *IE3* Promotor weiterhin der viralen Kontrolle unterliegt. In VERO-*IE3* Zellen unterliegt die *IE3* Expression dagegen der Induktion durch Cre-Rekombinase, die zu einer gleichmässigen, konstitutiven *IE3* Genexpression über den gesamten Replikationszyklus führt. Im natürlichem Replikationszyklus von HSV-1 ist die Expression verschiedener Gengruppen in einer zeitlichen Abfolge geschaltet, das heisst, Gene die zunächst stark exprimiert werden, werden kurze Zeit danach wieder reprimiert. Die gleichmässige, konstitutive Expression eines Gens, wie z.B. *IE3*, könnte den gesamten Replikationszyklus negativ beeinflussen und die Titer reduzieren. Ein weiterer Unterschied, ist die Notwendigkeit einer Cre-Rekombinase induzierten *IE3* Genexpression. Mit dem helferfreien pHGCXnCRE Amplikon Vektor lassen sich die Zellen theoretisch zu 100% infizieren und somit auch zu 100% induzieren, dennoch muss man davon ausgehen, dass die tatsächliche Infektionsrate bei 80-90% liegt. Dies könnte ebenfalls die Abweichung im Titer um einen Faktor von 10 erklären.

4.7.9. Nachweis von ICP4 Protein in VERO-IE3 Zellen nach Cre Rekombinase induzierter IE3 Genexpression mittels immunzytochemischer Färbung

Um das *IE3* Genprodukt, das ICP4 Protein, nach Cre Rekombinase induzierter Genexpression in den stabilen VERO-*IE3* Klonen nachweisen zu können, wurden immunzytochemische Färbungen durchgeführt. Das ICP4 Protein wird innerhalb der ersten 6 Stunden nach Infektion mit HSV-1 in den Zellen synthetisiert und ist im Zellkern lokalisiert. Die Methode der immunzytochemischen Färbung ermöglicht den Nachweis des ICP4 Proteins in jeder einzelnen Zelle. Hierdurch kann eine Aussage über die Expressionsstärke der einzelnen Zellen gemacht werden und die Homogenität der einzelnen Klone beurteilt werden. Für den Nachweis des ICP4 Proteins wurden die stabilen VERO-*IE3* Klone mit pHGCXnCRE Amplikon Vektor (MOI= 1), sowie mit pHSV-GFP Amplikon Vektor (MOI= 1) infiziert. Als negative Kontrolle wurden VERO-Zellen ebenfalls mit pHGCXnCRE Amplikon Vektor (MOI= 1) infiziert. Für die positive Kontrolle wurden VERO-Zellen mit HSV-1 *5dl1.2* (MOI = 1) infiziert. HSV-1 *5dl1.2* ist eine ICP27 Deletionsmutante und synthetisiert ICP4 Protein in den ersten 6 Stunden nach Infektion. Die mit HSV-1 *5dl1.2* infizierten VERO-Zellen wurden 5 Stunden nach Infektion mit 4 % PFA fixiert. VERO-*IE3* Klone und VERO-Zellen wurden 48 Stunden nach Infektion mit 4 % PFA fixiert. Die fixierten Zellen wurden für einige Sekunden mit 0.1.% TritonX-100 in PBS behandelt und mit einem Anti-ICP4 monoklonalen Maus Antikörper inkubiert. Der eigentliche Nachweis des ICP4 Proteins erfolgte über einen zweiten biotinylierten Ziegen Anti-Maus Antikörper und einem Biotin/Avidin-Peroxidase gekoppelten Komplex. Durch Zugabe von dem Substrat DAB (3,3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride, Zymed Laboratories) und einer DAB Enhancer Lösung wird das ICP4 Protein anhand einer Braunfärbung in den Zellen nachgewiesen (Abb. 4.7.9.).

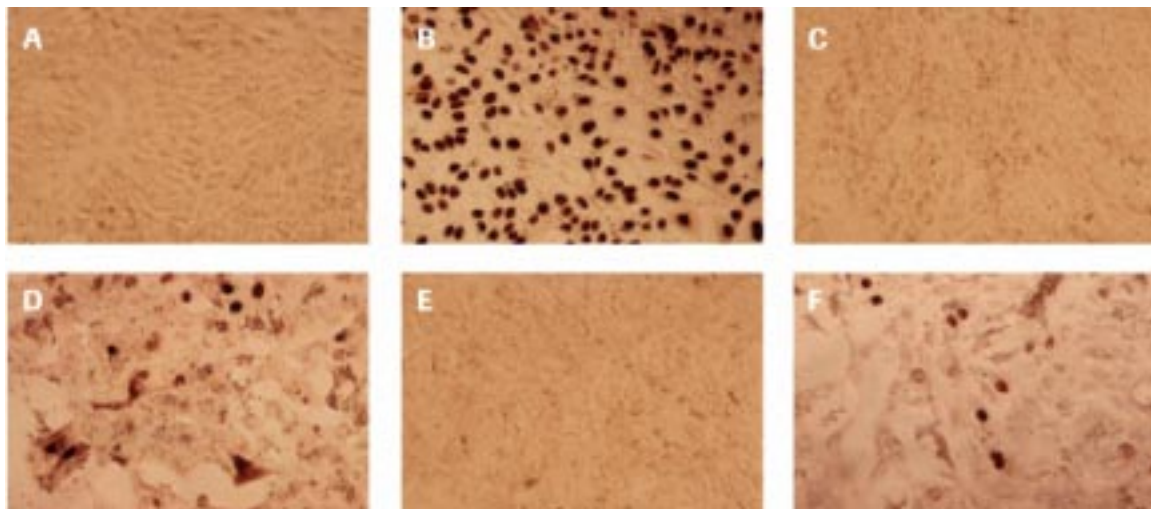


Abb. 4.8.9. Nachweis von ICP4 Protein in VERO-IE3 Zellen nach Cre Rekombinase induzierter IE3 Genexpression mittels immunzytochemischer Färbung. (A) VERO-Zellen 48 Std. nach der Infektion mit pHGCXnCRE Amplikon Vektor (MOI= 1). (B) VERO-Zellen 5 Std. nach Infektion mit HSV-1 *5dl1.2* (MOI = 1). (C) VERO-*IE3* Klon9/5 48 Std. nach der Infektion mit pHSV-GFP Amplikon Vektor (MOI= 1) (D) VERO-*IE3* Klon9/5 48 Std. nach der Infektion mit pHGCXnCRE Amplikon Vektor (MOI= 1). (E) VERO-*IE3* Klon6/10 48 Std. nach der Infektion mit pHSV-GFP Amplikon Vektor (MOI= 1) (F) VERO-*IE3* Klon 6/10 48 Std. nach der Infektion mit pHGCXnCRE Amplikon Vektor (MOI= 1).

Wie die Abb. 4.7.9. zeigt, kann eine hohe intrazelluläre ICP4 Konzentration nur in wenigen Zellen beobachtet werden. Die Mehrheit der Zellen scheint das *IE3* Gen nur relativ schwach zu exprimieren, wie man anhand der hellbraun gefärbten Zellkerne erkennen kann. Die *IE3* Genexpression ist in den stabilen Klonen nicht vollkommen homogen. Dennoch ist die *IE3* Genexpression in den Zellen ausreichend, um eine effiziente Komplementation, sowie Verpackung von HSV-1 *d120* Helfervirus und pHGCXnCRE HSV-1 Amplikon Vektor zu ermöglichen. Um einen stabilen Klon mit einer homogenen Cre Rekombinase induzierten *IE3* Genexpression zu erhalten, muss eine weitere Subklonierung mit den stabilen Klonen durchgeführt werden. Für die Herstellung der stabilen Helfervirus-freien Verpackungszelllinie für HSV-1 Amplikon Vektoren ist eine homogene *IE3* Genexpression in der Zelle von Bedeutung, da unterschiedliche *IE3* Expressionslevel die Amplikon-Vektor-Ausbeuten reduzieren können. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen deutlich, dass durch die Anwendung des Cre / loxP Rekombinationssystems mehrere zytotoxische, virale Gene von HSV-1 in einer Zelle induzierbar exprimiert werden können. Aufgrund der vollständigen Repression der *IE3* Genexpression ist das Überleben und die Propagation dieser Zelllinie und vermutlich die einer Helfervirus-freien Verpackungszelllinie möglich.

5. Diskussion

Defekte HSV-1 Vektoren oder HSV-1 Amplikon Vektoren besitzen viele Eigenschaften, die sie zu erfolgreichen Kandidaten für den allgemeinen Gentransfer in das Zentrale Nervensystem und für die Anwendung in der Genterapie machen. Die zunehmende Anwendung dieser Vektoren in der Molekularbiologie und molekularen Medizin erfordert die Entwicklung vereinfachter, stabiler und effizienter Verpackungssysteme, die die Produktion von defekten HSV-1 Vektoren in grossen Mengen ermöglichen.

Für die Herstellung einer Helfervirus-freien Verpackungszelllinie für defekte HSV-1 Vektoren ist die Regulation verschiedener viraler Gene erforderlich. Das *IE3* Gen ist, neben dem *IE2* Gen essentiell für die lytische Replikation von HSV-1 (McCarthy *et. al.*, 1989; DeLuca *et. al.*, 1985). Das Gen wird unmittelbar nach der Infektion von HSV-1 durch die Stimulation von α -TIF, auch als VP16 bezeichnet, in den Zellen exprimiert. In der zeitlichen Regulation der HSV-1 Genexpression nimmt das *IE3* Genprodukt, ICP4, eine Hauptrolle ein. ICP4 wirkt auf die virale Genexpression als Transaktivator und Repressor (DeLuca & Schaffer, 1985; Everett, 1984; Gelman & Silverstein, 1985; Godowski & Knipe, 1986). Aufgrund dieser Eigenschaften ist das *IE3* Gen eines von den insgesamt fünf *IE* Genen, das in einer Helfervirus-freien Verpackungszelllinie reguliert werden muss. Da das ICP4 nach seiner Expression sowohl die Genexpression der frühen als auch der späten Gene von HSV-1 induziert, könnte das *IE3* Gen als eine Art "Hauptschalter" in der Helfervirus-freien Verpackungszelllinie fungieren. Um die Eigenschaften von *IE3* als regulatorischen "Schalter" für die Verpackungszelllinie zu untersuchen, wurde das *IE3* Gen zunächst, unter die Kontrolle des Tet.off Systems, in die sogenannten Kombi-Konstrukte kloniert (Schultze *et. al.*, 1996). Die 2 verschiedenen Kombi-Konstrukte unterscheiden sich lediglich in dem Promoter, der die Expression des tet.TAs reguliert. In dem Konstrukt pCtet.-Combi-*IE3* steht das tet.TA Gen unter der Kontrolle des CMV *IE1* Enhancer / Promoters und in dem Konstrukt pNtet.-Combi-*IE3* steht das tet. TA Gen unter der Kontrolle des Neuronen-spezifischen Enolase Promoters (NSE). Die Untersuchungen zur Tetrazyklin-abhängigen Regulation der *IE3* Genexpression erfolgte zunächst nach transients Transfektion der Kombi-Konstrukte in CHO-Zellen und VERO-Zellen. Erst später wurden mit beiden Kombi-Konstrukten stabile *IE3* regulierbare Zelllinien hergestellt. In den ersten transienten Transfektionen konnte die Expression des *IE3* Gens von beiden Kombi-Konstrukten in CHO- und VERO-Zellen nachgewiesen werden. Das ICP4 wird in den Zellen ebenso wie das von E5-Zellen exprimierte ICP4 posttranslational modifiziert und läuft im SDS-Polyacrylamidgel bei 175 kDa. Die immunzytochemischen Färbungen zeigten, dass ICP4 im Zellkern lokalisiert ist und in Komplementations-assays mit HSV-1 *d120* konnte die Funktionalität des Produkts nachgewiesen werden. Westernblot-Analysen zeigten, dass die *IE3* Expressionsstärke von pNtet.-Combi-*IE3* im Vergleich zu pCtet.-Combi-*IE3* um das ca 10-fache reduziert ist. Die Unterschiede in der *IE3* Expression werden offensichtlich durch die unterschiedlichen Promoter, die in den Kombi-Konstrukten die Expression des tet. TAs regulieren, hervorgerufen und zeigen den direkten Einfluss des tet. TAs auf die *IE3* Genexpression an. Durch die Zugabe von 1 μ g / ml Tetrazyklin ins Medium der transient transfizierten Zellen konnte nach 48 Stunden eine Reduktion der intrazellulären ICP4 Konzentration um den Faktor 10 beobachtet werden. Auch die nach stabiler Transfektion im Selektionsmedium erhaltenen stabilen Klone liessen nach Zugabe von 2 μ g / ml Tetrazyklin und einer Inkubationszeit von 72 Stunden nur eine Reduktion der intrazellulären ICP4 Konzentration von maximal Faktor 10 erkennen. Die Verwendung höherer Tetrazyklin Konzentrationen im Medium der stabilen Klone hatte keinen weiteren Einfluss auf die *IE3* Genexpression. Ähnliche Ergebnisse wurden nach transienter Transfektion in VERO-Zellen mit dem HSV-1 Amplikon Vektor pHermes-tet.-lacZ erhalten, der das lacZ Reportergen unter der Kontrolle des tet.Ox7 CMV minimal-Promoters und den tet.TA unter der Kontrolle des CMV *IE1* Enhancer / Promoters trägt. (Fotaki *et. al.*, 1996). Mit einem Luciferase Reportergen, das über das gleiche tet. System reguliert wurde, konnten dagegen durch die Zugabe von 1 μ g / ml Tetrazyklin Unterschiede in der Luciferase Aktivität zwischen induziertem bzw.

nicht-induziertem Zustand von mehreren tausend Einheiten gemessen werden. Eine minimale Luciferase Aktivität konnte nur bei Tetrazyklin Konzentrationen, die kleiner als 0.1 µg / ml waren, gemessen werden (Gossen & Bujard, 1992). Mit zunehmender Passage der stabilen VERO-tet.*IE3* Klone in Zellkultur ging zunächst die ohnehin minimale Regulierbarkeit und schliesslich die gesamte *IE3* Genexpression verloren. Der Verlust der *IE3* Genexpression wurde anhand der Komplementations-fähigkeit einer HSV-1 *IE3* Deletionsmutante der einzelnen Klone verifiziert. Auch revitalisierte Stickstoffkulturen der einzelnen Klone waren von dem Verlust der *IE3* Genexpression betroffen. PCR-Analysen mit spezifischen internen *IE3* Primern an genomischer DNA der stabilen Klone, führten in allen untersuchten Klonen zur Amplifikation eines DNA Fragments der entsprechenden Grösse, während an genomischer DNA aus VERO-Zellen kein PCR Produkt amplifiziert werden konnte. Die erzielten Ergebnisse zeigen deutlich, dass eine An / Aus Regulation der *IE3* Genexpression mit den Kombi Konstrukten nicht erreicht werden kann. Die Anwendung von höheren Tetrazyklin Konzentrationen bis zu 6 µg / ml bewirkte keine weitere Reduktion der *IE3* Genexpression in stabilen VERO-tet.*IE3* Klonen. Die geringen Unterschiede in der *IE3* Expressionsstärke zwischen induziertem und nicht-induziertem Zustand verweisen auf eine hohe basalen Expression. Mehrere Arbeitsgruppen haben von hoher Basalexpression des Tet. Systems in verschiedenen Zellen und Tieren berichtet (Hoffmann *et. al.*, 1997; Iida *et. al.*, 1996; Ackland-Berglund & Leib, 1995; Furth *et. al.*, 1994). Dies kann mehrere Ursachen haben: 1. Die Aktivierung der *IE3* Genexpression in Abwesenheit des gebundenen Transaktivators durch andere zelluläre Faktoren. 2. Die Unfähigkeit von Tetrazyklin den tet. TA vollständig an der Bindung an die tet.Ox7 Sequenzen zu hindern. 3. Interferenzen mit den chromosomalen Regionen, in denen das Konstrukt integriert wurde. 4. Mögliche Kreuzaktivierungen über den CMV *IE1* Enhancer / Promoter bzw. den NSE Promoter. Dass die stabilen Klone die *IE3* Genexpression nach mehreren Passagen in Zellkultur abschalten, ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass ICP4 zytotoxisch ist und die Zelle nur bestimmte Mengen des Proteins über einen längeren Zeitraum toleriert. Diese Erklärung würde auch die Ergebnisse der stabilen Transfektion mit pCtet.-Combi-*IE3* erklären. Westernblot-Analysen zeigten für pCtet.-Combi-*IE3* eine 10mal stärkere *IE3* Expression als für pNtet.-Combi-*IE3*. Aus der stabilen Transfektion mit pCtet.-Combi-*IE3* gingen nur wenige stabile Transfektanden hervor, da die meisten der vermutlich stabilen Klone bereits in der 1. Selektionswoche starben. Anders ist es dagegen bei den stabilen Transfektion mit pNtet.-Combi-*IE3*, hier konnte eine Vielzahl von stabilen Transfektanden nach der Selektion erhalten werden. Dennoch konnte ICP4 nur in 13 der insgesamt 665 stabilen Transfektanden nachgewiesen werden. Scheinbar hat der Grossteil der stabilen pNtet.-Combi-*IE3* Transfektanden die *IE3* Genexpression bereits während der Selektionsphase irreversibel abgeschaltet. Das bedeutet zusammengefasst: Ist die *IE3* Genexpression in den stabilen Transfektanden bereits von Anfang an sehr hoch, so sterben die Zellen innerhalb weniger Tage ab. Ist die *IE3* Genexpression in den stabilen Transfektanden dagegen relativ niedrig, so kann die Zelle auf die Akkumulation von ICP4 reagieren und die *IE3* Genexpression vermutlich durch Methylierung irreversibel abschalten. Die Methylierung von CpG Dinukleotiden findet man häufig in Gewebe-spezifischen Promotern, über die die Expression spezifischer Gene in den entsprechenden Zellen aktiv reguliert werden können (Razin & Riggs, 1980; Cedar, 1988; Watt & Molloy, 1988; Edwards, 1990). Ein anderer Grund für das vorzeitige Absterben der stabilen Transfektanden, könnte auch durch einen hohen Expressionslevel des tet.TAs in den Zellen verursacht werden. Denn auch hier muss man davon ausgehen, dass pCtet.Combi-*IE3* im Gegensatz zu pNtet.-Combi-*IE3* einen höheren tet.TA Expressionslevel aufweist. Auf die mögliche Zytotoxizität des tet. TAs wurde bereits bei der Entwicklung des Systems hingewiesen. In den von Gossen und Bujard (1992) verwendeten doppelstabilen HeLa-Zellen konnte das tet. TA Protein nicht direkt nachgewiesen werden, obwohl die Zellen tet.TA exprimieren und auf Tetrazyklin reagieren. Durch die häufige Anwendung des Systems liegen heute mehrere Berichte vor, in denen die Intoleranz von tet. TA in verschiedenen Zelltypen beschrieben ist

(Henninghausen *et. al.*, 1995; Schockett *et. al.*, 1995; Schockett & Schatz, 1996; Howe *et. al.*, 1995). In weiteren Experimenten wurde der Einfluss unterschiedlicher intrazellulärer ICP4 Konzentrationen auf das Viruswachstum der *IE3* Deletionsmutante HSV-1 *d120* untersucht. Reduzierte intrazelluläre ICP4 Konzentrationen sollten einen Einfluss auf das Viruswachstum ausüben, da der lytische Replikationszyklus von HSV-1 ohne ein funktionelles ICP4 nicht möglich ist (Dixon & Schaffer, 1980; DeLuca *et. al.*, 1985). Die genauen Auswirkungen reduzierter ICP4 Konzentrationen auf das Viruswachstum sind bis heute nicht untersucht worden. Es gibt jedoch Hinweise, dass der lytische und der latente Zustand von HSV-1 über die intrazelluläre ICP4 Konzentration reguliert wird (Kosz-Vnenchak *et. al.*, 1993; Rivera-Gonzalez *et. al.*, 1994). Gibt es für beide Zustände des Virus, lytisch und latent, einen ICP4 Schwellenwert, so sollte dieser durch die Regulation der *IE3* Genexpression bestimmt werden können. Komplementationstudien mit der *IE3* Deletionsmutante HSV-1 *d120* in transient transfizierten und stabilen VERO-tet.*IE3* Klonen zeigten mit zunehmender Tetrazyklin Konzentration (1-4 µg / ml) im Medium eine Reduktion des Viruswachstums von 77% (1 µg / ml) auf 90% (4 µg / ml). Die mit dem Tet. System beobachtete minimale Reduktion der intrazellulären ICP4 Konzentration hat eine deutliche Reduktion des Viruswachstums von HSV-1 *d120* zur Folge. Dieses Ergebnis ist der erste konkrete Hinweis dafür, dass geringfügige Reduktionen der ICP4 Konzentrationen einen deutlichen Einfluss auf lytischen Replikationszyklus von HSV-1 haben. Eine weitere Reduktion der intrazellulären ICP4 Konzentration sollte für die gezielte Repression des lytischen Replikationszyklus von HSV-1 ausreichend sein. Die verschiedensten Experimente bestätigen den relativ hohen basalen *IE3* Expressionslevel in den Kombi-Konstrukten, wodurch nur geringfügige Veränderungen in der *IE3* Genexpression über den Effektor Tetrazyklin erreicht werden konnten. Auch eine Steigerung der Tetrazyklin Konzentrationen auf das 6-fache führte zu keinen Veränderungen in der Basalexpression. Vermutlich wird die hohe basale *IE3* Genexpression durch Kreuzaktivierungen über den in den Kombi Konstrukten enthaltenen CMV *IE1* Enhancer / Promoter bzw. über den NSE Promoter hervorgerufen (Dr. U. Deutsche, persönliche Mitteilung). Um etwaige Kreuzaktivierungen der *IE3* Genexpression innerhalb des Combi Konstruktes auszuschließen und die tet. TA Aktivitäten in der Zelle separat untersuchen zu können, wurden in einem zweiten Ansatz eine doppelstabile VERO-tet.*IE3* Zelllinie hergestellt. Mit einem ersten Transfektionsschritt wurden VERO-tet.TA Zellen hergestellt, die zunächst auf ihre tet.TA Aktivitäten und dann auf die Regulierbarkeit der *IE3* Genexpression untersucht wurden. Die transiente Transfektion von Plasmid pA81, in dem das Luciferasegen unter der Kontrolle des tet.Ox7 CMV minimal-Promoters steht, zeigten in Abwesenheit von Tetrazyklin eine 75-fache bis 156-fache Induktion der Luciferase Aktivitäten. In Anwesenheit von 1 µg / ml Tetrazyklin waren die Luciferase Aktivitäten dagegen sehr gering und lagen im Bereich der Negativkontrollen. In doppelstabilen HeLa Klonen konnten in der Gegenwart von 1 µg / ml Tetrazyklin ähnliche Luciferase Aktivitäten mit dem Tet. System gemessen werden (Gossen & Bujard, 1992). Die stabilen VERO-tet.Ta Zellen zeigten ein normales Wachstum und liessen keine zytophatischen Effekte erkennen, wodurch die zuvor vermutete Zytotoxizität des tet. TAs in VERO-Zellen ausgeschlossen werden kann. Aufgrund dieses Ergebnisses kann man davon ausgehen, dass eine Konzentration von 1 µg / ml Tetrazyklin für die vollständige Repression der Genexpression im Tet. System tatsächlich ausreichend sein sollte. Um die Regulierbarkeit der *IE3* Genexpression in VERO-tet.TA Zellen untersuchen zu können, wurde das Plasmid ptet.-*IE3* transient in Zellen transfiziert und diese anschliessend mit HSV-1 *d120* superinfiziert. Die so behandelten VERO-tet. TA Zellen wurden für 3 Tage in Anwesenheit von 1 µg / ml Tetrazyklin oder ohne Tetrazyklin inkubiert. Anhand der resultierenden Virustiter konnten jedoch keine Unterschiede zu den bereits zuvor erzielten Ergebnissen mit den Kombi Konstrukten erreicht werden. Die im Anschluss hieran durchgeführte Westernblot-Analyse zeigte, dass die *IE3* Genexpression in Anwesenheit von 1 µg / ml Tetrazyklin ebenso stark ist wie in Abwesenheit von Tetrazyklin. Da auch hier die basale *IE3* Expression relativ hoch ist, können die zuvor vermuteten Kreuzaktivierungen durch den CMV *IE1* Enhancer/ Promoter bzw. NSE Promoter im

Kombi Konstrukt ebenfalls ausgeschlossen werden. Auffällig ist hierbei jedoch die unterschiedliche Regulierbarkeit von pA81 und *ptet.-IE3* im gleichen System. Die beiden Plasmide unterscheiden sich nur in dem Luciferase- bzw. *IE3* Gen. Möglicherweise übt das basal exprimierte *IE3* bzw. ICP4 einen direkten Einfluss auf das Tet. System aus, so dass die Regulierbarkeit über *tet. TA* verloren geht bzw. minimiert wird. Um diesen hypothetischen Einfluss von ICP4 auf das Tet. System zu eliminieren, muss die *IE3* Expression vollständig reprimiert werden. Deutsche et. al. konstruierte ein weiteres Tetrazyklin-sensitives Hybridprotein, mit dem er eine starke Repression der CMV *IE1* Enhancer/Promoter regulierten Luciferase Expression in HeLa-Zellen zeigen konnte. Das Hybridprotein ist eine Fusion der KRAB Domäne des humanen Kox1 Zinkfingerproteins (Margolin et. al., 1994) und dem Tetrazyklinrepressor Protein (Gossen & Bujard, 1992). In stabilen HeLa A12 Zellen, die das Hybridprotein konstitutiv exprimieren, konnte die reprimierende Wirkung von TetR-KRAB nach Bindung an die *tet.Ox7* Sequenzen auch für den Thymidinkinase (TK) Promoter gezeigt werden (Deutsche et. al., 1995). Ein weiterer Vorteil dieses Systems liegt darin, dass der TetR-KRAB in Abwesenheit von Tetrazyklin an die *tet. Operator* Sequenzen bindet und die Genexpression reprimiert, während er in der Anwesenheit von Tetrazyklin seine Bindungsaktivität für den *tet. Operator* verliert, wodurch die basale Genexpression vom minimal-Promoter induziert wird. Für die Repression potentiell zytotoxischer Gene ist somit die permanente Zugabe von Tetrazyklin, die bei Verwendung des *tet. TAs* erforderlich ist, hier nicht mehr erforderlich. Um den Einfluss von TetR-KRAB auf die Regulierbarkeit der *IE3* Genexpression im Tet. System zu untersuchen, wurden nach transients Transfektion von Plasmid *ptet.-IE3* in die HeLa A12 Zellen (von Dr. U. Deutsche) Komplementationstudien mit HSV-1 *d120* und Westernblot-Analysen durchgeführt. Sowohl aus den Komplementationsstudien als auch aus der Westernblot-Analyse liess sich eine minimale Verbesserung der Regulierbarkeit der *IE3* Genexpression ablesen. Das Viruswachstum wurde zu 96% reprimiert, während die Repression bei Verwendung des *tet.TAs* nur 77% in Anwesenheit von 1µg / ml Tetrazyklin betrug. In der Westernblot-Analyse wurde die *IE3* Genexpression beider Tet. Systeme direkt miteinander verglichen, es zeigte sich ein deutlicher Unterschied in den *IE3* Expressionsstärke. Doch trotz der minimalen Verbesserungen konnte, aufgrund der restlichen basalen *IE3* Expression im nicht-induzierten Zustand, die vollständige Repression der lytischen Replikation von HSV-1 *d120* nicht erreicht werden. Die in diesem, sowie den anderen Tet. Systemen beobachtete hohe basale *IE3* Expression in VERO-Zellen und HeLa-Zellen erhärtet den Verdacht, dass ICP4 im Tet. System einen direkten Einfluss auf den *tet.CMV* minimal-Promoter und somit auf seine eigene Transkription ausübt. Sowohl in VERO-Zellen als auch in HeLa-Zellen konnte mit den gleichen Systemen die Tetrazyklin abhängige Regulation der Luciferase Genexpression gezeigt werden (in diese Arbeit, Gossen & Bujard, 1992; Gossen et. al., 1995; Deutsche et. al., 1995). Aus diesem Grund kann eine direkte Interaktion zellulärer Proteine mit dem Tet. System, die die Regulierbarkeit über Tetrazyklin bzw. *tet. TA* oder TetR-KRAB beeinflussen , in VERO-Zellen und HeLa-Zellen ausgeschlossen werden. Doch wie kann ICP4 seinen Einfluss auf das Tet. System ausüben? Zwei Elemente des Tet. System stammen aus Herpesviren und könnten mit ICP4 interagieren. Die transaktivierende Domäne des *tet.TA* Hybridproteins stammt vom α -TIF Protein aus HSV-1 (Preston et. al., 1988; Post et. al., 1981; Preston et. al., 1997) und der CMV minimal-Promoter (Boshart et. al., 1985) stammt vom Cytomegalovirus, das ebenfalls zur Familie der Herpesviren gehört. Eine mögliche Interaktion von ICP4 mit den Elementen des Tet. Systems, wird auch durch die vielseitigen natürlichen Funktionen von ICP4 bekräftigt. Verschiedene Untersuchungen zur Funktion von ICP4 haben gezeigt, das ICP4 sowohl als Transkriptionsaktivator für die Induktion der frühen- und späten viralen Gene, sowie für die Repression der unmittelbar frühen Gene, einschliesslich seiner eigenen notwendig ist (DeLuc & Schaffer, 1985; Everett, 1984; Mavromara-Nazos et. al., 1986; O'Hare & Hayward, 1985; Dixon & Schaffer, 1980; Preston, 1979). Ebenso wie viel andere Transkriptionsfaktoren besitzt ICP4 verschiedene Domänen, die für die DNA Bindung, die Lokalisation im Zellkern und die Repression bzw. Induktion der Transkription

verantwortlich sind (DeLuca & Schaffer, 1988; Paterson & Everett, 1988; Shepard & DeLuca, 1991). Es konnte gezeigt werden, das ICP4 an spezifische DNA Sequenzen bindet, die in der Nähe des Transkriptionsstartpunktes liegen und hierdurch die Transkription vom Promoter reprimiert (Faber & Wilcox, 1986). Die von Faber und Wilcox entdeckte ICP4 DNA Bindungssequenz lautet ATCGTCnnnnYCGRC (Y= Pyrimidin; R= Purin) und ist in den Promotersequenzen des *IE3*, *IE2* Gens und der Promotersequenz des Latenz-assoziierten Transkriptes (LAT) enthalten (Faber & Wilcox, 1986; Muller, 1987; Batchelor & O'Hare, 1990; Rivera-Gonzalez *et. al.*, 1994). Die von Muller beschriebene ICP4 Bindungssequenz enthält ebenfalls das von Faber und Wilcox beschriebene Hexanukleotid 5' ATCGCT 3'. Doch trotz dieser ICP4 Konsensussequenz, bindet ICP4 ebenso an andere DNA Sequenzen, die keine spezifische ICP4 Bindungssequenz aufweisen (Kristie & Roizman, 1986; Tedder *et. al.*, 1989; Gu & DeLuca, 1994; Eisenberg *et. al.*, 1985; Kattar-Cooley & Wilcox, 1989). Es konnte sogar gezeigt werden, dass ICP4 die Transkription von einem Promoter, der nur eine TATA Box enthält aktiviert (Gu & DeLuca, 1994). ICP4 Interaktionen mit diversen Transkriptionsfaktoren, über die ICP4 an unterschiedliche Promotersequenzen bindet und die Transkription induziert bzw. reprimiert, konnten ebenfalls nachgewiesen werden (Carrozza & DeLuca, 1996; Kuddus *et. al.*, 1995; Cook *et. al.*, 1995; Paterson *et. al.*, 1990). Aufgrund dieser Eigenschaften von ICP4 und den mit allen drei Tet. Systemen erzielten Ergebnissen, ist die Hypothese einer ICP4 vermittelten Aktivierung des tet.Ox7 CMV minimal-Promoters sehr wahrscheinlich. Eine Analyse der tet.Ox7 CMV minimal-Promoter Sequenzen hat mehrere Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren ergeben. Besonders auffällig ist hierbei die TFIID Bindungsstelle. Carrozza hat in seinen Untersuchungen die direkte Interaktion von ICP4 mit TFIID und die daraus resultierende Aktivierung der Transkription zeigen können (Carrozza & DeLuca, 1996). Vermutlich interagiert ICP4 mit einer Reihe weiterer Transkriptionsfaktoren, wodurch es zur Aktivierung vieler verschiedener Promoter befähigt ist. Neben den diversen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren konnten auch ICP4 ähnliche Bindungssequenzen im CMV minimal-Promoter gefunden werden. Eine mögliche ICP4 Bindungssequenz (5' GTCAG ATCGCCTGGAGACGCCA 3') liegt etwa 20 Nukleotide stromabwärts von der TATA Box und ist bis auf eine Base mit dem von Faber und Wilcox als essentiell beschriebenen Hexanukleotid identisch. Durch die Klonierung des *IE3* Gens in pN721, wurden zusätzliche Sequenzen in das daraus resultierende Plasmid p_{tet}-*IE3* eingebracht. Die zusätzlich eingebrachten Sequenzen bilden mit den restlichen Sequenzen eine weitere mögliche ICP4 Bindungsstelle (5' AATTCGGCTTGATCGTT TAAACG3'). Diese zweite mögliche ICP4 Bindungsstelle liegt wenige Nukleotide stromaufwärts vom Translationsstart (ATG) und enthält ebenfalls ein Hexanukleotid, das mit Ausnahme von einem Nukleotid mit dem von Faber und Wilcox beschriebenen identisch ist. Somit unterscheiden sich die beiden Plasmide p_{tet}-*IE3* und pA81 in einer einzigen mutmasslichen ICP4 Bindungsstelle. Da die mutmasslichen ICP4 Bindungsstellen innerhalb der CMV minimal-Promoter Sequenz und nicht in den tet.Ox7 Sequenzen liegen, ist eine direkte Konkurrenz von tet. TA bzw. TetR-KRAB und ICP4 um die DNA Bindungsstellen nicht erforderlich. Wenn ICP4 tatsächlich durch die Interaktion mit TFIID oder anderen basalen Transkriptionsfaktoren die Transkription des CMV minimal-Promoters in p_{tet}-*IE3* über die mutmasslichen ICP4 Bindungsstellen aktiviert, dann sollte diese transaktivierende Wirkung auch auf das Luciferase Konstrukt pA81 übertragen werden. Um den Einfluss von ICP4 auf den tet.Ox7 CMV minimal-Promoter direkt untersuchen zu können, wurden Cotransfektion mit einem ICP4 exprimierenden Plasmid und dem Plasmid pA81, in dem das Luciferasegen unter der Kontrolle des tet.Ox7 CMV minimal-Promoters steht, in VERO-Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse dieses Experiments haben gezeigt, dass die Luciferase Aktivität in Gegenwart von ICP4 um das 18-fache induziert wird. In Abwesenheit von ICP4 konnte keine Induktion der Luciferase Aktivität gemessen werden und die Messwerte entsprechen denen der Negativkontrolle. Die Induktion der Luciferase Aktivität, ist im Vergleich zur Aktivierung durch tet. TA nicht besonders stark, entspricht jedoch den in den Experimenten beobachteten *IE3* Expressionsstärken. Ob die zweite mutmassliche ICP4 Bindungsstelle für eine stärkere Induktion der

Genexpression durch ICP4 erforderlich ist wurde nicht untersucht, kann jedoch aufgrund der relativ schwachen Induktion der Luciferase Aktivität in pA81 angenommen werden. Herrlinger et.al. infizierte VERO-Zellen mit verschiedenen HSV-1 Mutanten nach der Transfektion mit einem Luciferase exprimierenden Plasmid, in dem das Luciferase Gen unter der Kontrolle des tet.Ox7 CMV minimal-Promoters steht. Die verschiedenen HSV-1 Mutanten verursachten alle einen Anstieg in der Luciferase Aktivität. Wurde das gleiche Experiment mit einem Plasmid (pUHC13-3) durchgeführt, in dem die Luciferase Genexpression nur vom CMV minimal-Promoter reguliert wird, konnte die gleiche Erhöhung in der Luciferase Aktivität beobachtet werden. Cotransfektion mit pUHC13-3 und einem ICP4- oder ICP27- exprimierenden Plasmid zeigte, dass ICP4 der stärkere Aktivator der Genexpression vom tet.Ox7 CMV minimal-Promoter ist (Herrlinger *et. al.*, zur Publikation eingereicht). Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse über den Einfluss von ICP4 auf das Tet.System stimmen mit denen von Herrlinger überein. Aufgrund dieser Erkenntnisse ist das Tet.System und auch andere, auf bestimmte Promotersysteme basierende Expressionssysteme, für die Regulierbarkeit der *IE3* Genexpression nicht geeignet. Das Hauptproblem bei der Regulierbarkeit des *IE3* Gens ist die Toxizität des Genprodukts. Die geringste ICP4 Synthese führt, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, durch die Interaktion mit verschiedenen zellulären Transkriptionsfaktoren, zur Entkopplung der gesteuerten Regulation, ICP4 Akkumulation und Tod der Zellen. Aus diesem Grund muss für die induzierbare *IE3* Expression ein System gewählt werden, das im nicht induzierten Zustand zu 100% dicht ist oder im Fall einer Undichte, dem Genprodukt ICP4 keinen Angriffspunkt liefert seine eigene Transkription initiieren zu können. Das Cre/loxP Rekombinationssystem bietet im Vergleich zu den herkömmlichen Regulationssystemen eine ganz andere Art der Regulierbarkeit, die für die Herstellung einer regulierbaren *IE3* Zelllinie und später einmal für die Herstellung einer Helfervirus-freien Verpackungszelllinie gut geeignet sein könnte. Das Cre/loxP Rekombinationssystem besteht aus dem Enzym Cre Rekombinase und einer spezifischen DNA Sequenz, die die Bezeichnung loxP trägt. Die Cre Rekombinase bindet spezifisch an die loxP Sequenzen und führt abhängig von der Orientierung zweier loxP Sequenzen, ganz unterschiedliche DNA Rearrangements durch. Eins dieser Cre Rekombinase vermittelten DNA Rearrangements bietet die Möglichkeit zur Cre vermittelten Induktion der Genexpression (Wagner *et. al.*, 1997; Sauer, 1998; Plück, 1996). Bisher wurde das Cre/loxP Rekombinationssystem vorwiegend in Mäusen zur gezielten Deletion von Gene verwendet, jedoch kamen auch hierbei Konstrukte für die Cre Rekombinase induzierte Reporterexpression zum Einsatz (Wagner *et. al.*, 1997; Akagi *et. al.*, 1997; Kellendonk *et. al.*, 1999). Für die induzierte Genexpression wurde das Reporter gen zunächst von dem Promoter funktionell durch die Insertion von Stop Sequenzen, die von je einer loxP Sequenz flankiert sind getrennt. Die Stop Sequenz enthält sowohl ein transkriptionelles als auch translationelles Stoppsignal, so dass eine Undichte im System auf verschiedenen Ebenen korrigiert werden kann. Mit dem Cre/loxP System kann die *IE3* Genexpression zwar nicht stufenweise reguliert werden, bietet aber eine Möglichkeit zur vollständigen Repression und anschliessend zu einer vollständigen Induktion der Genexpression. Durch die Zugabe von Cre Rekombinase werden die Sequenzen zwischen beiden loxP Signalen deletiert. Hierdurch wird das Stoppsignal zwischen Promoter und Gen eliminiert und die Expression des Gens induziert. Um das Potential des Cre/loxP für die Regulation der *IE3* Genexpression zu testen, wurden zunächst Reporter genkonstrukte (GFP und lacZ) konstruiert. Die transienten Transfektionen der Reporter konstrukte in VERO-Zellen haben gezeigt, dass die Genexpression in Abwesenheit von Cre Rekombinase zu fast 100% reprimiert ist. Nur in einigen Fällen konnten nach Transfektion des GFP Reporter konstruktes bei sehr hohen Belichtungszeiten Spuren von GFP Fluoreszenz beobachtet werden. In Cotransfektionen der Reporter konstrukte mit einem Cre exprimierenden Plasmid konnte die Expression des Reporter gens induziert werden, wobei die Expressionsstärken mit denen des Ausgangs plasmids vergleichbar sind. Wurde kein Cre Rekombinase exprimierendes Plasmid in VERO-Zellen transfiziert, so konnte auch nach einer Inkubationszeit von 4 Tagen keine Reporter genexpression in den transient transfizierten Zellen nachgewiesen werden. Mit

Westernblot-Analysen wurde die durch die Stop-Kassette vermittelte Repression der Reporter-gen Expression, sowie die Cre Rekombinase induzierte Expression der Reporter-gene nach Deletion der Stop-Kassette bestätigt. Mit einem weiteren Experiment wurde die basale Expression der loxP/Stop/loxP-Kassette Reporterkonstrukte mit den basalen Expressionslevel von p_{tet}-GFP, in dem das GFP Gen unter der Kontrolle des tet.Ox7 CMV minimal-Promoters steht, nach Transfektion in VERO-Zellen verglichen. Die Ergebnisse dieses Experiments zeigen die Unterschiede zwischen beiden Systemen sehr deutlich. Während die loxP/Stop/loxP-Kassette Reporterkonstrukte kein basales GFP erkennen lassen, zeigt das p_{tet}-GFP Konstrukt eine deutliche GFP Fluoreszenz in den Zellen. Die effiziente Repression durch die loxP/Stop/loxP-Kassette, sowie die Cre Rekombinase induzierte Genexpression nach Deletion der Kassette konnte auch in stabilen Transfektanden nachgewiesen werden. Kinetische Studien zur Cre vermittelten Deletion der loxP/Stop/loxP-Kassette zeigten die Expression des Reporter-gens innerhalb von 20-28 Stunden. Die Cre Rekombinase induzierte Genexpression ist im Vergleich zum Tet. System langsamer, doch für die Induktion der viralen Gene in einer Helfervirus-freien Verpackungszelllinie ausreichend. Die Cre vermittelte Deletion ist proportional der Cre Rekombinase Konzentration (Plück, 1996), so dass grosse intrazelluläre Cre Rekombinase Konzentrationen erfolgreich mehrere Gene in einer Zelle aktivieren sollten. Um diese Fähigkeit der Cre Rekombinase in den Zellen untersuchen zu können wurden doppelstabile Reporterzelllinien hergestellt, in denen sowohl das GFP Gen als auch das lacZ Gen durch die loxP/Stop/loxP-Kassette vom CMV IE1 Enhancer / Promoter getrennt ist. Mit der transienten Transfektion von einem Cre Rekombinase exprimierenden Plasmid in die doppelstabilen Reporterzelllinie konnte gezeigt werden, dass Cre Rekombinase beide Gene effizient innerhalb von 20-28 Stunden induzieren kann. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde das *IE3* Gen stromabwärts von der Stop Kassette in pNLoxCa kloniert, wodurch das Plasmid pLoxCa-*IE3* entstand. In der anschliessenden Westernblot-Analyse konnte gezeigt werden, dass das *IE3* Gen im nicht-induzierten Zustand vollständig reprimiert ist und im induzierten Zustand relativ stark exprimiert wird. Für den Nachweis der Cre induzierbaren *IE3* Genexpression in stabilen Transfektanden wurden die Zellen mit einem Helfervirus-freien verpackten HSV-1 Amplikon Vektor infiziert, der sowohl GFP als auch Cre Rekombinase nach erfolgter Infektion in den Zellen exprimiert, und mit HSV-1 *d120* superinfiziert. Die nach Cre Rekombinase induzierten, *IE3* exprimierenden Klone konnten anhand der zunehmenden GFP Fluoreszenz der Zellen und später, nach Ernten des Virusstocks, aufgrund des verpackten HSV-1 Amplikon Vektors nachgewiesen werden. Wurden die Zellen dagegen mit einem Helfervirus-freien HSV-1 Amplikon Vektor infiziert, der kein Cre Gen trägt, so konnte keine zunehmende GFP Fluoreszenz nach Superinfektion mit HSV-1 *d120* in den Zellen und auch kein verpackter HSV-1 Amplikon Vektor in den geernteten Virusstocks nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis zeigt eindeutig, dass in den stabilen VERO-*IE3* Klonen *IE3* Genexpression tatsächlich nur nach Cre Rekombinase vermittelter Deletion der Stop-Kassette stattfindet. Durch den Gentransfer mit einem defekten HSV-1 Vektor oder HSV-1 Amplikon Vektor können alle Zellen in Zellkultur infiziert werden und erhalten somit das entsprechende Gen. Herpes Simplex Vektoren, sowie Adenovirus Vektoren wurde bereits für den Gentransfer der Cre vermittelten Deletion von Genen, sowie Induktion von Genen in verschiedenen transgenen Mäusen und in Zellkultur erfolgreich verwendet (Brooks *et. al.*, 1997; Ogasawara *et. al.*, 1999; Anton & Graham, 1995; Hardy *et. al.*, 1997; Akagi *et. al.*, 1997). Die Möglichkeit das Cre Gen über einen Amplikon Vektor in die Zelllinie einzuschleusen ist im Hinblick auf eine Helfervirus-freie Verpackungszelllinie von besonderem Vorteil, denn der zu verpackende Amplikon Vektor muss sowieso in die Verpackungszelllinie transfiziert werden. Desweiteren bietet ein Cre Amplikon die Möglichkeit, die regulierten viralen Gene zeitgleich mit seiner Gegenwart zu induzieren, was für die Titerausbeute nicht unwichtig sein könnte. Die in dieser Arbeit hergestellten Reporterzelllinien könnten für die Titration von verpackten HSV-1 Amplikon Vektoren genutzt werden, so dass das normalerweise dazu verwendete Reportegen im HSV-1 Amplikon Vektor gegen andere Fremd-DNA ausgetauscht werden kann. Die weitere Charakterisierung der stabilen VERO-*IE3* Klone zeigte, dass sie sich im nicht induzierten Zustand wie VERO-Zellen

nach Infektion mit HSV-1 *d120* verhalten. Keine HSV-1 *d120* Viren wurden im nicht induzierten Zustand produziert, ein HSV-1 Amplikon Vektor ohne Cre exprimierendes Gen wurde nicht in HSV-1 Partikel verpackt und es konnten innerhalb von 5 Tagen keine Virus-Plaques beobachtet werden. Im induzierten Zustand verhalten sich die stabilen VERO-*IE3* Klone dagegen wie E5-Zellen. Nach Induktion wurde HSV-1 *d120* produziert, ein Cre Rekombinase exprimierender HSV-1 Amplikon Vektor wurde in HSV-1 Partikel verpackt und Plaques wurden innerhalb von 2 Tagen ausgebildet. In Verpackungsexperimenten von HSV-1 Amplikon Vektoren mit HSV-1 *d120* in VERO-*IE3* Zellen konnten HSV-1 Amplikon Vektor Titer von bis zu 10^5 transduzierend Einheiten pro ml und ein Verhältnis von HSV-1 Amplikon Vektor zu Helfervirus von 5:1 ohne die Ausbildung von Revertanden mit Wildtyp Phenotyp in 0.5ml erzielt werden. Besonders bemerkenswert ist die Beobachtung, dass die mit HSV-1 *d120* (MOI=1) infizierten VERO-*IE3* Zellen nach fünf Tagen kaum zytopathische Effekte zeigen und nach fünf Tagen durch Cre Rekombinase zur lytischen Replikation induziert werden können. Diese Beobachtung könnte darauf hinweisen, dass HSV-1 *d120* in VERO-*IE3* Zellen in einen Latenz-ähnlichen Zustand übergeht. Doch diese, sowie auch andere Vermutungen müssen in zukünftigen Experimenten untersucht werden.

6. Schlussfolgerung

Die hier beschriebene Arbeit hatte das Ziel eine stabile, regulierbare Zelllinie für das potentiell zytotoxische HSV-1 *IE3* Gen herzustellen. Mit der *IE3* regulierbaren Zelllinie sollte die Repression des lytischen Replikationszyklus, sowie die gezielte Induktion des lytischen Replikationszyklus der *IE3* Deletionsmutante HSV-1 *d120* nachgewiesen werden. Ausserdem sollte die Verpackung von HSV-1 Amplikon DNA bei induzierter und nicht-induzierter *IE3* Genexpression in dieser Zelllinie untersucht werden. Daneben sollte in doppelstabilen Reporterzelllinien die effiziente Induktion von zwei verschiedenen Genen gezeigt werden. Das anfänglich für die *IE3* Genregulation verwendete Tet.-System ist für die Regulation von *IE3* nicht geeignet. ICP4 das Genprodukt von *IE3* ist ein multifunktionseller Transaktivator, der mit verschiedenen zellulären Transkriptionsfaktoren interagiert, an verschiedene Promoter bindet und diese letztlich aktiviert. Durch die hohe basale Expression des tet.Ox7 CMV minimal-Promoters wird ausreichend ICP4 in den Zellen synthetisiert, welches dann über die Interaktion mit zellulären Transkriptionsfaktoren vermutlich an den CMV minimal-Promoter bindet und sich somit einer korrekten Regulation durch das Tet.-System entzieht. In Abbildung 6.1. ist ein hypothetisches Modell der ICP4 Interaktion mit dem Tet. System gezeigt. Der direkte Einfluss von ICP4 auf das Tet-System konnte anhand von Cotransfektionen mit einem ICP4 exprimierenden Plasmid und einem Luciferase exprimierenden Plasmid, in dem das Luciferase Gen unter der Kontrolle des tet.Ox7 CMV minimal-Promoters steht, eindeutig nachgewiesen werden. Deshalb sind auch andere Expressionssysteme, die auf einer Interaktion eines spezifischen Hybridproteins mit spezifischen Enhancer Sequenzen und einem minimal-Promoter basieren, für die *IE3* Genregulation ungeeignet. Um das *IE3* Gen effizient regulieren zu können, muss vorausgesetzt werden, dass die Repression der *IE3* Genexpression im nicht-induzierten Zustand 100% beträgt. Die bisher zur Verfügung stehenden Regulationssysteme erfüllen diese Anforderungen jedoch nicht, so dass die Regulation von *IE3*, das heisst, Repression und Induktion der *IE3* Genexpression über einen anderen Weg erzielt werden muss. Durch die Verwendung des Cre/loxP Rekombinationssystems konnte die *IE3* Genexpression induzierbar gemacht werden und die basale *IE3* Genexpression im nicht-induzierten Zustand zu 100% reprimiert werden. Desweiteren hat das Cre/loxP Rekombinationssystem die effiziente Induktion von zwei 100% reprimierten Genen gezeigt, so dass das Cre/loxP Rekombinationssystem für die Regulierbarkeit mehrerer zytotoxischer HSV-1 Gene geeignet sein könnte. Die mit dieser Arbeit erzielten Ergebnisse, liefern somit die Basis für die Herstellung einer Helfervirus-freien Verpackungszelllinie für HSV-1 Amplikon Vektoren. Desweiteren bietet die Insertion von Reportergenen, wie beispielsweise lacZ oder GFP, in die loxP/Stop/loxP-Kassette

die Möglichkeit positive, stabile Transfektanden von negativen, stabilen Transfektanden schnell und unkompliziert bereits während der Selektionsphase unterscheiden zu können.

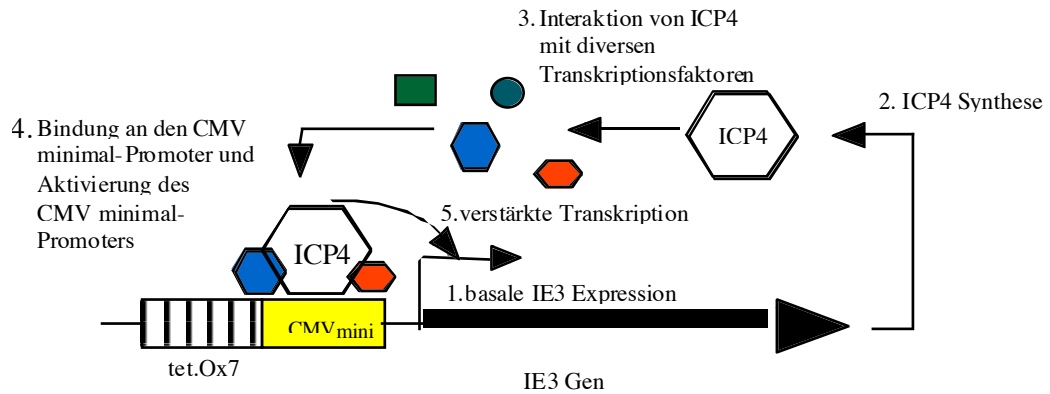


Abb.6.1. Hypothetische Interaktion von ICP4 mit dem tet-System. Dieses Modell basiert auf den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen und den in der Literatur beschriebenen Eigenschaften von ICP4. Im Tet. System ist die Genexpression in Abwesenheit des tet.TAs nicht induziert, dennoch findet eine basale Genexpression statt.

1. Das *IE3* Gen wird basal exprimiert.
2. Das *IE3* Genprodukt (ICP4) wird synthetisiert.
3. ICP4 interagiert mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren.
4. ICP4 bindet mit den Transkriptionsfaktoren an die ICP4 Bindungsstellen im CMV minimal-Promoter.
5. Durch die Bindung an den CMV minimal-Promoter wird die Genexpression von *IE3* stimuliert.

7. Zusammenfassung

Untersuchungen von HSV-1 Deletionsmutanten, denen alle IE Gene fehlen zeigten keine virale Genexpression des HSV-1 Genoms und keine zytotoxischen Effekte (Samaniego *et. al.*, 1998). Die Herstellung einer Helfervirus-freien Verpackungszelllinie für defekte HSV-1 Vektoren oder HSV-1 Amplikon Vektoren erfordert deshalb die Regulierbarkeit verschiedener viraler Gene. Damit die Verpackungszelllinie in Kultur propagierbar ist, muss das HSV-1 Genom zunächst in einer inaktiven Form in den Zellen vorliegen, so dass keine zytotoxischen Genprodukte in der Zelle synthetisiert werden können. Auf der anderen Seite muss die Genexpression des HSV-1 Genoms, für die Verpackung des HSV-1 Amplikon Vektors, aktiviert werden, so dass alle Helferfunktionen, die für die Replikation und Verpackung des HSV-1 Amplikon Vektor benötigt werden, in der Verpackungszelllinie bereitgestellt werden. Das *IE3* Gen ist eins von zwei Immediate Early Genen, die für die lytische Virusreplikation essentiell sind. Genetische und biochemische Analysen des *IE3* Genprodukts (ICP4) haben gezeigt, dass ICP4 ein multifunktionelles Protein ist, und die Transkription von Early und Late Genen aktiviert, sowie die von Immediate Early Genen, einschliesslich seiner eigenen reprimiert. Um den Einfluss unterschiedlicher intrazellulärer ICP4 Konzentrationen auf die lytische Virusreplikation untersuchen zu können, wurden sogenannte Plasmid Kombi-Konstrukte (pCtet.-Combi-*IE3* und pNtet.-Combi-*IE3*) konstruiert, in denen das *IE3* Gen unter der Kontrolle eines Tetrazyklin-sensitiven Promoters (tet.Ox7 CMV minimal-Promoter) gestellt wurde. Der Promoter wird durch die Bindung eines Tetrazyklin-sensitiven Hybridproteins (tet.TA), dessen Gen ebenfalls auf dem Kombi-Konstrukt liegt, aktiviert. Der tet. TA bindet in der Abwesenheit von Tetrazyklin an die tet.Ox7 CMV minimal-Promoter Sequenzen und in der Anwesenheit von Tetrazyklin nicht.

Transiente Transfektionen dieser Kombi-Konstrukte in VERO-Zellen haben die Komplementation der *IE3* Deletionsmutante HSV-1 *d120* gezeigt. Immunzytochemische Färbungen mit pCtet.-Combi-*IE3* oder pNtet.-Combi-*IE3* transient transfizierten VERO-Zellen haben eine Regulierbarkeit der *IE3* Genexpression mittels Tetrazyklin um den Faktor 10 gezeigt. Komplementations-Assays mit der *IE3* Deletionsmutante HSV-1 *d120* zeigten, nach transients Transfektion der Kombi-Konstrukte in VERO-Zellen, ein um 72% reduziertes Viruswachstum in der Anwesenheit von 1µl / ml Tetrazyklin. Nach stabiler Transfektion der Kombi-Konstrukte in VERO-Zellen wurden insgesamt 665 stabile pNtet.-Combi-*IE3* Klone gepickt. Aus der stabilen Transfektion von pCtet.-Combi-*IE3* gingen nur 38 Klone hervor, die für weitere Untersuchungen gepickt wurden. Die immunzytochemische Färbung der für 48 Std. in Abwesenheit von Tetrazyklin inkubierten stabilen Klone ergab, dass von den 665 stabilen pNtet.-Combi-*IE3* Klonen nur 13 Klone und von den 38 stabilen pCtet.-Combi-*IE3* Klonen nur 2 Klone ICP4 exprimieren. Da die *IE3* Genexpression in den stabilen Klonen heterogen war, wurden Subklonierungen durchgeführt, um Klone mit einer homogenen *IE3* Genexpression zu erhalten. Die weitere Charakterisierung der VERO-tet.-*IE3* Subklone zeigte in immunzytochemischen Färbungen eine Regulation der *IE3* Genexpression um den Faktor 10. Komplementationstudien mit HSV-1 *d120* in VERO-tet.*IE3* Klonen zeigten eine zunehmende Reduktion der Virusreplikation mit steigender Tetrazyklin Konzentration, von 77.2% bei 1µg / ml, 83.6% bei 2.5µg / ml und 90.7% bei 4µg / ml Tetrazyklin im Zellkulturmedium. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Virusreplikation mit der *IE3* Genexpression korreliert. Eine totale Repression der Virusreplikation von HSV-1 *d120* konnte jedoch auch bei höheren Tetrazyklin Konzentrationen nicht erreicht werden.

Später durchgeführte Westernblot-Analysen von totalen Zelllysaten stabiler VERO-tet.*IE3* Klone, die für 3 Tage in Anwesenheit von 2µg / ml Tetrazyklin oder in Abwesenheit von Tetrazyklin inkubiert wurden zeigten dagegen keine deutlichen Unterschiede in der *IE3* Genexpression. Nach weiteren Wochen in Zellkultur konnte das ICP4 Protein in den stabilen VERO-tet.*IE3* Klone nicht mehr nachgewiesen werden, auch die vorherige Komplementation von HSV-1 *d120* konnte nicht mehr beobachtet werden. Revitalisierte Stickstoffkulturen der stabilen Klone zeigten ebenfalls keine *IE3*

Genexpression. PCR-Analysen an genomischer DNA stabiler VERO-tet.*IE3* Klonen mit spezifischen, internen *IE3* Primern haben gezeigt, dass die Klone das *IE3* Gen weiterhin in ihrem Genom integriert haben. Dies lässt vermuten, dass die *IE3* Genexpression transkriptionell inaktiviert wurde. Aufgrund der hohen Basalexpression des *IE3* Gens in den stabilen VERO-tet.*IE3* Zellen akkumuliert das ICP4 Protein in den Zellen, so dass sie Zellen entweder absterben oder die *IE3* Genexpression vermutlich durch Methylierung irreversibel abschalten. Um mögliche Kreuzaktivierungen durch den starken CMV *IE1* Enhancer / Promoter bzw. den NSE Promoter in den Kombi-Konstrukten ausschliessen zu können, wurde in einem zweiten Ansatz die Herstellung einer doppelstabilen Zelllinie geplant. Im ersten Transfektionsschritt wurden hierbei VERO-tet.TA Zellen hergestellt. Die Charakterisierung der stabilen VERO-tet.TA Klone mit einem Luciferase Reporterkonstrukt, in dem das Luciferase Gen unter der Kontrolle des tet.Ox7 CMV minimal-Promoters steht, hat eine 156-fache Induktion der Luciferase-Aktivität gezeigt. In der Anwesenheit von 1µg / ml Tetrazyklin lag die gemessene Luciferase-Aktivität im Bereich der Negativkontrolle. Die transiente Transfektion von p tet.-*IE3* Plasmid DNA, in dem das *IE3* Gen unter der Kontrolle des tet.Ox7 CMV minimal-Promoters steht, in VERO-tet.TA zeigte dagegen in der Westernblot-Analyse nur minimale Unterschiede in der ICP4 Expression zwischen induzierten und nicht-induzierten Zustand. Ein Vergleich der ICP4 Expressionstärke von p tet.-*IE3* mit einem transient transfizierten Plasmid, in dem die *IE3* Genexpression unter der Kontrolle des CMV *IE1* Enhancer / Promoters steht zeigte, dass die Basalexpression von p tet.-*IE3* sehr stark ist. Die Virusreplikation von HSV-1 *d120* konnte mit diesem System im Vergleich zu den stabilen VERO-tet.*IE3* Zellen nicht weiter reduziert werden. Aufgrund der starken Basalexpression von *IE3* im p tet.-*IE3* Konstrukt, wurde für das Erreichen einer besseren Regulierbarkeit der *IE3* Genexpression ein Tetrazyklin-sensitives Hybridprotein (TetR-KRAB) verwendet, das im Gegensatz zu tet.TA, die Genexpression vom tet.Ox7 CMV minimal-Promoter in Abwesenheit von Tetrazyklin reprimiert und in Anwesenheit von Tetrazyklin die basale Expression des *IE3* Gens erlaubt. Komplementationstudien mit HSV-1 *d120* zeigten nach transients Transfektion von p tet.-*IE3* Plasmid DNA in stabilen HeLa A12 Zellen, die den tetR-KRAB konstitutiv exprimieren eine Reduktion der Virusreplikation von 95%. Auch die Westernblot-Analyse mit totalen Zelllysaten von HeLa A12 Zellen, nach transients Transfektion mit p tet.-*IE3* Plasmid zeigte eine minimale Verbesserung in der Regulierbarkeit der *IE3* Genexpression. Trotz der minimalen Verbesserungen durch die Verwendung von tetR-KRAB bleibt die *IE3* Basalexpression relativ hoch, so dass ein Aus- und Anschalten der Virusreplikation von HSV-1 *d120* nicht möglich ist. Aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse, die mit einem Luciferase exprimierenden tet.Ox7 CMV minimal-Promoter Konstrukt (pA81) und einem *IE3* exprimierenden tet.Ox7 CMV minimal-Promoter Konstrukt (p tet.-*IE3*) nach Transfektion in VERO-tet.TA Zellen erhalten wurden, lag die Vermutung nahe, dass das IE Genprodukt (ICP4) einen *trans*-aktivierenden Einfluss auf das tet.-System ausübt. Anhand von Cotransfektionen mit pA81 Plasmid DNA und p tet.-*IE3* Plasmid DNA bzw. pA81 Plasmid DNA und pcDNA3-*IE3* Plasmid DNA in VERO-Zellen konnte ein *trans*-aktivierender Effekt von ICP4 auf den tet.Ox7 CMV minimal-Promoter nachgewiesen werden. Bei gleichzeitiger Expression des *IE3* Gens stieg die Luciferase-Aktivität in den Zellen an, während in Zellen, in denen das Luciferase Reporterkonstrukt pA81 ohne ein *IE3* exprimierendes Plasmid transfiziert wurde, kein Anstieg der Luciferase-Aktivität in den Zellen gemessen werden konnte. Aufgrund der *trans*-aktivierenden Eigenschaften von ICP4 muss das System, welches die *IE3* Genexpression reguliert absolut dicht sein. Eine absolute Repression der *IE3* Genexpression im nicht-induzierten Zustand konnte mit dem Tet.-System nicht erreicht werden, so dass das Tet.-System für die Regulierung des *trans*-aktivierenden und zytotoxischen ICP4 Protein nicht geeignet ist. Andere Expressionssysteme, die auf ähnlichen Komponenten aufgebaut sind, zeigen ebenfalls eine basale Genexpression im nicht-induziertem Zustand und können aus diesem Grund für die Regulation der *IE3* Genexpression ausgeschlossen werden. Das Cre/loxP Rekombinationssystem unterscheidet sich in seinen Komponenten deutlich von denen regulatorischer Expressionssysteme und erscheint deshalb für die Regulierbarkeit der *IE3* Genexpression geeignet zu sein. Die

Cre Rekombinase führt in Abhängigkeit der Orientierung zweier loxP Signale verschiedene DNA Rearrangements durch. Eines dieser möglichen DNA Rearrangements führt zur Deletion der DNA Sequenzen, die zwischen zwei loxP Signalen mit gleicher Orientierung liegen. Durch die Verwendung von transkriptionellen und translationellen Stoppsignalen zwischen zwei loxP Signalen mit gleicher Orientierung, wird eine loxP/ Stop / loxP Kasette aufgebaut. Wird diese Kasette zwischen einen Promoter und seiner Transkriptionseinheit kloniert, so kann das Gen durch die dazwischenliegende loxP/ Stop /loxP Kasette nicht mehr exprimiert werden. In Gegenwart von Cre Rekombinase wird die loxP / Stop / loxP Kasette durch die Rekombination der beiden loxP Sequenzen deletiert und die Transkription des Gens induziert. In dieser Arbeit wurden zunächst verschiedene Reporter-gen-Konstrukte hergestellt, in denen die Expression des Reportergens durch die Insertion einer loxP/ Stop / loxP Kasette zwischen Promoter und Gen reprimiert wurde. In transienten Transfektionen und stabilen Transfektionen konnte gezeigt werden, dass die Expression der Reportergene durch die loxP/ Stop /loxP Kasette vollständig reprimiert wird. Bei Cotransfektion der Reporter-genkonstrukte mit einem Cre Rekombinase exprimierenden Plasmid, wurde die Expression der Reportergene innerhalb von 28 Stunden induziert. Ein direkter Vergleich der Basalexpression von den loxP / Stop / loxP Kasette Reporter-genkonstrukten mit einem tet.Ox7 CMV minimal-Promoter Reporter-genkonstrukt machte die Unterschiede zwischen beiden Systeme deutlich. Während die loxP / Stop / loxP Kasette Reporter-genkonstrukte keine basale Genexpression erkennen liessen, konnte in dem tet.Ox7 CMV minimal-Promoter Reporter-genkonstrukt eine relativ starke Basalexpression beobachtet werden. Anhand von doppelstabilen Reporterzelllinien konnte die effiziente Induktion, von zwei loxP / Stop / loxP Kasette reprimierten Reportergenen, durch die Transfektion eines Cre Rekombinase exprimierenden Plasmids gezeigt werden. Um den reprimierenden Effekt der loxP / Stop / loxP Kasette auf die *IE3* Genexpression untersuchen zu können, wurde die loxP / Stop / loxP Kasette zwischen CMV IE1 Enhancer / Promoter und *IE3* Transkriptionseinheit kloniert. Westernblot-Analysen von totalen Zelllysaten transient transfizierter VERO-Zellen zeigten kein ICP4 Protein in Abwesenheit von Cre Rekombinase und eine deutliche Induktion der *IE3* Genexpression in Anwesenheit von Cre Rekombinase. Die in dieser Arbeit hergestellten stabilen VERO-*IE3* Klone zeigen nur nach Transfektion eines Cre Rekombinase exprimierenden Plasmids das ICP4 Protein im Zellkern. Die Virusreplikation der *IE3* Deletionsmutante HSV-1 *d120* wird im nicht-induzierten Zustand von VERO-*IE3* vollständig reprimiert, so dass 5 Tage nach der Infektion mit HSV-1 *d120* keine Nachkommenviren nachgewiesen werden konnten. Erst durch die Cre Rekombinase induzierte *IE3* Genexpression in VERO-*IE3* Zellen wurde die Replikation von HSV-1 *d120* aktiviert. Die Cre Rekombinase induzierte HSV-1 *d120* Replikation konnte auch mit einem Cre Rekombinase und GFP Reportergenen exprimierenden HSV-1 Amplikon Vektor, durch die Verpackung des HSV-1 Amplikon Vektors in den Zellen nachgewiesen werden. Der Verpackungsprozess des Cre/GFP exprimierenden HSV-1 Amplikon Vektors konnte anhand der zunehmenden GFP-fluoreszierenden Zellen beobachtet werden. Ein HSV-1 Amplikon Vektor, der keine Cre Rekombinase exprimiert, konnte dagegen in VERO-*IE3* Zellen mit dem Helfervirus HSV-1 *d120* nicht repliziert und verpackt werden. Die mit dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen, dass das Cre/loxP Rekombinationssystem für die gleichzeitige Regulierbarkeit mehrerer zytotoxischer Genprodukte und Genprodukte, mit *trans*-aktivierender Wirkung, geeignet ist. Deshalb liefern die in dieser Arbeit beschriebenen Resultate die Grundlage für die Herstellung einer Helfervirus-freien Verpackungszelllinie. Das Tet.-System ist dagegen aufgrund einer relativ starken Basalexpression für die Regulation derartiger Genprodukte nicht geeignet.

8. Anhang

8.1. Kodierende IE3 DNA Sequenz und Aminosäuresequenz.

```

1/1
ATG GCG TCG GAG AAC AAG CAG CGC CCC GGC 31/11
M A S E N K Q R P G S P G P T D G P P P
61/21
ACC CCG AGC CCA GAC CGC GAC GAG CGG GGG 91/31
T P S P D R D E R G A L G W G A E T E E
121/41
GGC GGG GAC GAC CCC GAC CAC GAC CCC GAC 151/51
G G D D P D H D P D H P H D L D D A R R
181/61
GAC GGG AGG GCC CCC GCG GCG GGC ACC GAC 211/71
D G R A P A A G T D A G E D A G D A V S
241/81
CCG CGA CAG CTG GCT CTG CTG GCC TCC ATG 271/91
P R Q L A L L A S M V E E A V R T I P T
301/101
CCC GAC CCC GCG GCC TCG CCG CCC CGG ACC 331/111
P D P A A S P P R T P A F R A D D D D G
361/121
GAC GAG TAC GAC GAC GCA GCC GAC GCC GCC 391/131
D E Y D D A A D A A G D R A P A R G R E
421/141
CGG GAG GCC CCG CTA CGC GGC GCG TAT CCG 451/151
R E A P L R G A Y P D P T D R L S P R P
481/161
CCG GCC CAG CCG CCG CGG AGA CGT CGT CAC 511/171
P A Q P P R R R R H G R W R P S A S S T
541/181
TCG TCG GAC TCC GGG TCC TCG TCC TCG TCG 571/191
S S D S G S S S S S S A S S S S S S D
601/201
GAG GAC GAG GAC GAC GAC GGC AAC GAC GCG 631/211
E D E D D D G N D A A D H A R E A R A V
661/221
GGG CGG GGT CCG TCG AGC GCG GCG CCG GCA 691/231
G R G P S S A A P A A P G R T P P P G
721/241
CCA CCC CCC CTC TCC GAG GCC GCG CCC AAG 751/251
P P P L S E A A P K P R A A A R T P A A
781/261
TCC GCG GGC CGC ATC GAG CGC CGC CGG GCC 811/271
S A G R I E R R R A R A A V A G R D A T
841/281
GGC CGC TTC ACG GCC GGG CAG CCC CGG CGG 871/291
G R F T A G Q P R R V E L D A D A T S G
901/301
GCC TTC TAC GCG CGC TAT CGC GAC GGG TAC 931/311
A F Y A R Y R D G Y V S G E P W P G A G
961/321
CCC CCG CCC CCG GGG CGG GTG CTG TAC GGC 991/331
P P P P G R V L Y G G L G D S R P G L W
1021/341
GGG GCG CCC GAG GCG GAG GAG GCG CGA CGC 1051/351
G A P E A E E A R R R F E A S G A P A A
1081/361
GTG TGG GCG CCC GAG CTG GGC GAC GCC GCG 1111/371
V W A P E L G D A A Q Q Y A L I T R L L
1141/381
TAC ACC CCG GAC GCG GAG GCC ATG GGG TGG 1171/391
Y T P D A E A M G W L Q N P R V V P G D
1201/401
GTG GCG CTG GAC CAG GCC TGC TTC CGG ATC 1231/411
V A L D Q A C F R I S G A A R N S S S F
1261/421
ATC ACC GGC AGC GTG GCG CGG GCC GTG CCC 1291/431
I T G S V A R A V P H L G Y A M A A G R
1321/441
TTC GGC TGG GGC CTG GCG CAC GCG GCG GCC 1351/451
F G W G L A H A A A A V A M S R R Y D R
1381/461
GCG CAG AAG GGC TTC CTG CTG ACC AGC CTG 1411/471
A Q K G F L L T S L R R A Y A P L L A R
1441/481
GAG AAC GCG GCG CTG ACG GGG GCC GCG GGG 1471/491
E N A A L T G A A G S P G A G A D D E G
1501/501
GTC GCC GCC GTC GCC GCC GCC GCA CCG GGC 1531/511
V A A V A A A A P G E R A V P A G Y G A
1561/521
1591/531

```

GCG GGG ATC CTC GCC GCC CTG GGG CGG CTG TCC GCC GCG CCC GCC TCC CCC GCG GGG GGC
 A G I L A A L G R L S A A P A S P A G G
 1621/541 1651/551
 GAC GAC CCC GAC GCC GCC CGC CAC GCC GAC GCC GAC GAC GAC GGG CGC CGC GCC CAG
 D D P D A A R H A D A D D D A G R R A Q
 1681/561 1711/571
 GCC GGC CGC GTG GCC GTC GAG TGC CTG GCC GCC TGC CGC GGG ATC CTG GAG GCG CTG GCC
 A G R V A V E C L A A C R G I L E A L A
 1741/581 1771/591
 GAG GGC TTC GAC GGC GAC CTG GCG GCC GTC CCG GGG CTG GCC GGG GCC CGG CCC GCC AGC
 E G F D G D L A A V P G L A G A R P A S
 1801/601 1831/611
 CCC CCG CGG CCG GAG GGA CCC GCG GGC CCC GCT TCC CCG CCG CCG CCG CAC GCC GAC GCG
 P P R P E G P A G P A S P P P P H A D A
 1861/621 1891/631
 CCC CGC CTG CGC GCG TGG CTG CGC GAG CTG CCG TTC GTG CGC GAC GCG CTG GTG CTC ATG
 P R L R A W L R E L R F V R D A L V L M
 1921/641 1951/651
 CGC CTG CGC GGG GAC CTG CGC GTG GCC GGC GGC AGC GAG GCC GCC GTG GCC GCC GTG CGC
 R L R G D L R V A G G S E A A V A A V R
 1981/661 2011/671
 GCC GTG AGC CTG GTC GCC GGG GCC CTG GGC CCC GCG CTG CCG CGG GAC CCG CGC CTG CCG
 A V S L V A G A L G P A L P R D P R L P
 2041/681 2071/691
 AGC TCC GCG GCC GCC GCC GCG GAC CTG CTG TTT GAC AAC CAG AGC CTG CGC CCC CTG
 S S A A A A A A D L L F D N Q S L R P L
 2101/701 2131/711
 CTG GCG GCG GCG GCC AGC GCA CCG GAC GCC GCC GAC GCG CTG GCG GCC GCC GCC GCC TCC
 L A A A A S A P D A A D A L A A A A A S
 2161/721 2191/731
 GCC GCG CCG CGG GAG GGG CGC AAG CGC AAG AGT CCC GGC CCG GCC CGG CCG CCC GGA GGC
 A A P R E G R K R K S P G P A R P P G G
 2221/741 2251/751
 GGC GGC CCG CGA CCC CCG AAG ACG AAG AAG AGC GGC GCG GAC GCC CCC GGC TCG GAC GCC
 G G P R P P K T K K S G A D A P G S D A
 2281/761 2311/771
 CGC GCC CCC CTC CCC GCG CCC GCG CCC CCC TCC ACG CCC CCG GGG CCC GAG CCC GCC CCC
 R A P L P A P A P P S T P P G P E P A P
 2341/781 2371/791
 GCC CAG CCC GCG GCG CCC CGG GCC GCC GCG GCG CAG GCC CGC CCG CGC CCC GTG GCC GTG
 A Q P A A P R A A A A Q A R P R P V A V
 2401/801 2431/811
 TCG CGC CGG CCC GCC GAG GGC CCC GAC CCC CTG GGC GGC TGG CGG CGG CAG CCC CCG GGG
 S R R P A E G P D P L G G W R R Q P P G
 2461/821 2491/831
 CCC AGC CAC ACG GCG GCG CCC GCG GCC GCC GCC CTG GAG GCC TAC TGC TCC CCG CGC GCC
 P S H T A A P A A A A L E A Y C S P R A
 2521/841 2551/851
 GTG GCC GAG CTC ACG GAC CAC CCG CTG TTC CCC GTC CCC TGG CGA CCG GCC CTC ATG TTT
 V A E L T D H P L F P V P W R P A L M F
 2581/861 2611/871
 GAC CCG CGG GCC CTG GCC TCG ATC GCC GCG CCG TGC GCC GGG CCC GCC CCC GCC CAG
 D P R A L A S I A A R C A G P A P A A Q
 2641/881 2671/891
 GCC GCG TGC GGC GGC GGC GAC GAC GAC GAT AAC CCC CAC CCC CAC GGG GCC GCC GGG GGC
 A A C G G G D D D D N P H P H G A A G G
 2701/901 2731/911
 CGC CTC TTT GGC CCC CTG CGC GCC TCG GGC CCG CTG CGC CGC ATG GCG GCC TGG ATG CGC
 R L F G P L R A S G P L R R M A A W M R
 2761/921 2791/931
 CAG ATC CCC GAC CCC GAG GAC GTG CGC GTG GTG GTG CTG TAC TCG CCG CTG CCG GGC GAG
 Q I P D P E D V R V V V L Y S P L P G E
 2821/941 2851/951
 GAC CTG GCC GGC GGC GGG GCC TCG GGG GGG CCG CCG GAG TGG TCC GCC GAG CGC GGC GGG
 D L A G G G A S G G P P E W S A E R G G
 2881/961 2911/971
 CTG TCC TGC CTG CTG GCG GCC CTG GCC AAC CCG CTG TGC GGG CCG GAC ACG GCC GCC TGG
 L S C L L A A L A N R L C G P D T A A W
 2941/981 2971/991
 GCG GGC AAT TGG ACC GGC GCC CCC GAC GTG TCG GCG CTG GGC GCA CAG GGC GTG CTG CTG
 A G N W T G A P D V S A L G A Q G V L L
 3001/1001 3031/1011
 CTG TCC ACG CGG GAC CTG GCC TTC GCC GGG GCC GTG GAG TTT CTG GGG CTG CTC GCC AGC
 L S T R D L A F A G A V E F L G L L A S
 3061/1021 3091/1031
 GCC GGC GAC CGG CGG CTC ATC GTG GTC AAC ACC GTG CGC GCC TGC GAC TGG CCC GCC GAC
 A G D R R L I V V N T V R A C D W P A D
 3121/1041 3151/1051
 GGG CCC GCG GTG TCG CGG CAG CAC GCC TAC CTG GCG TGC GAG CTG CTG CCC GCC GTG CAG
 G P A V S R Q H A Y L A C E L L P A V Q
 3181/1061 3211/1071
 TGC GCC GTG CGC TGG CCG GCG GCG CGG GAC CTG CGC CGC ACG GTG CTG GCC TCG GGC CGC
 C A V R W P A A R D L R R T V L A S G R
 3241/1081 3271/1091
 GTG TTC GGC CCG GGG GTC TTC GCG CGC GTG GAG GCC GCG CAC GCG CGC CTG TAC CCC GAC
 V F G P G V F A R V E A A H A R L Y P D
 3301/1101 3331/1111

```

CGC CCG CCG CTG CGC CTG TGC CGC GGC GGC AAC GTG CGC TAC CGC GTG CGC ACG CGC TTC
A P P L R L C R G G N V R Y R V R T R F
3361/1121 3391/1131
GGC CCG GAC ACG CCG GTG CCC ATG TCC CCG CGC GAG TAC CGC CGG GCC GTG CTG CCG GCG
G P D T P V P M S P R E Y R R A V L P A
3421/1141 3451/1151
CTG GAC GGC CGG GCG GCG GCC TCG GGG ACC ACC GAC GCC ATG GCG CCC GGC GCG CCG GAC
L D G R A A A S G T T D A M A P G A P D
3481/1161 3511/1171
TTC TGC GAG GAG GAG GCC CAC TCG CAC GCC GCC TGC GCG CGC TGG GGC CTG GGC GCG CCG
F C E E E A H S H A A C A R W G L G A P
3541/1181 3571/1191
CTG CCG CCC GTG TAC GTG GCG CTG GGG CGC GAG GCG GTG CGC GCC GGC CCG GCC CCG TGG
L R P V Y V A L G R E A V R A G P A R W
3601/1201 3631/1211
CGC GGG CCG CCG AGG GAC TTT TGC GCC CGC GCC CTG CTG GAG CCC GAC GAC GAC GCC CCC
R G P R R R D F C A R A L L E P D D D A P
3661/1221 3691/1231
CCG CTG GTG CTG CGC GGC GAC GAC GAC GGC CCG GGG GCC CTG CCG CCG GCG CCG CCC GGG
P L V L R R G D D D G P G A L P P A P P G
3721/1241 3751/1251
ATT CGC TGG GCC TCG GCC ACG GGC CGC AGC GGC ACC GTG CTG GCG GCG GCG GGG GCC GTG
I R W A S A T G R S G T V L A A A G A V
3781/1261 3811/1271
GAG GTG CTG GGG GCG GAG GCG GGC TTG GCC ACG CCC CCG CGG CGG GAA GTT GTG GAC TGG
E V L G A E A G L A T P P R R E V V D W
3841/1281 3871/1291
GAA GGC GCC TGG GAC GAA GAC GAC GGC GGC GCG TTC GAG GGG GAC GGG GTG CTG TAA
E G A W D E D D G G A F E G D G V L *

```

Kodierende Nukleotidsequenz des *IE3* Gens. Die kodierende *IE3* DNA Sequenz wurde mit den Primern P48 und P51 aus dem Plasmid p175 von Dr. Filip Lim mittels PCR amplifiziert und über die *PmeI* Schnittstelle in den Primersequenzen in die Kombi-Konstrukte kloniert. Die Aminosäuresequenz ist unter der Nukleotidsequenz im ein Buchstaben Kode angegeben. Die *IE3* DNA Subfragmente wurden mit den Primerpaaren, P52 / P53; P54 / 55 und P56 / 57 ebenfalls aus dem Plasmid p175 mittels PCR amplifiziert.

8.2. Primer für die Amplifikation der kodierenden *IE3* DNA Sequenz

Sense P48-5'GATCGTTTAAACGCCGCCACCATGGCGTCGGAGAACAAGCA 3'
 Antisense P51-5'GATCGTTTAAACTTACAGCACCCCGTCCCCCT 3'

Primer 48 enthält eine *PmeI* Schnittstelle, eine Kozak-Sequenz und hybridisiert an das Startkodon (ATG) des *IE3* Gens. Primer 51 enthält eine *PmeI* Schnittstelle und hybridisiert an das Stopkodon (TAA) des *IE3* Gens.

8.3. Primer für die Amplifikation der *IE3* DNA Subfragmente

Sense P52- 5'GATCGAATTCGGCGTCGGAGAACAAGCAGCGC 3'
 Antisense P53- 5'GATTCTCGAGGGCGGCGTCGGCTGCGTCGTC 3'

Sense P54- 5'GATCGAATTCGCGGGGCCGGAACGGGAGGCC 3'
 Antisense P55- 5'GATTCTCGAGGGCGTCGCGCTCCTCCGCTC 3'

Sense P56- 5'GATCGAATTCGGCCAGCGCACCGGACGCCGCC 3'
 Antisense P57- 5'GATTCTCGAGCAGCAGCACGCCCTGTGCGCC 3'

8.4. *IE3* DNA Sequenzierprimer

Sense Primer	Sequenz	Position
P48	5' GATCGTTTAAACGCCGCCACCATGG CGTCGGAGAACAAGCA 3'	1bp-20bp
P150	5' TATCCGGACCCACGGAC 3'	444bp-462bp
P152	5' GCGGTGGCCGGCCGCGAC 3'	816bp-834bp
P155	5' GCGGCCGGCCGCTTCGGC 3'	1307bp-1325bp
P157	5' GTGGCCGTCGAGTGCCTG 3'	1689bp-1707bp
Antisense Primer	Sequenz	Position
P51	5' GATCGTTTAAACTTACAGCACCCCG TCCCCCT 3'	3897bp-3866bp
P129	5' GTACTCGCGCGGGGACAT 3'	3381bp-3399bp
P130	5' GCGCTCGGCGGACCACTC 3'	2856bp-2874bp

Die Sequenzierung der *IE3* DNA Sequenz ist aufgrund ihres hohen GC-Gehalts (> 80%) erschwert. Deshalb wurde eine Vielzahl verschiedener Primern für die *IE3* DNA Sequenzierung ausprobiert. Mit den in der Tabelle aufgeführten Primern konnte die *IE3* DNA Sequenz sequenziert werden. Pro Primer wurden im Durchschnitt 500 - 800 Nukleotide sequenziert.

9. Literaturverzeichnis

- Aboody-Guterman K. S., Pechan P. A., Rainov N. G., Sena-Esteves M., Jacobs A., Snyder E. Y., Wild P., Schraner E., Tobler K., Breakefield X. O., Fraefel C. (1997): Green fluorescent protein as a reporter for retrovirus and helper virus-free HSV-1 amplicon Vector-mediated gene transfer into neural cells in culture and *in vivo*. *Neuro Report* **8**, 3801-3808
- Ackland-Berglund C.E., Davido D.J., Leib D.A. (1995): The roles of the cAMP-Response Element and TATA Box in Expression of the Herpes Simplex Virus Type 1 Latency-Associated Transcripts. *Virology* **210**, 141-151
- Akagi K., Sandig V., Vooijs M., van der Valk M., Giovannini M., Strauss M., Berns A. (1997): Cre-mediated somatic site-specific recombination in mice. *Nucl. Acids Res.* **25**, 1766-1773
- Akli S., Cailland C., Vigne E., Stratford-Perridaudet L. D., Poenaru L., Perricaudent M. and Peschanski M. R. (1993): Transfer of a foreign gene into the brain using adenovirus vectors. *Nature Genet.* **3**, 224-228
- Alwine J., Stein W. and Hill C. (1974): Transcription of herpes simplex type 1 DNA in nuclei isolated from infected Hep-2 and KB cells. *Virology* **60**, 302-307
- Anderson W. F. (1992) Human gene therapy. *Science* **256**, 808-813
- Anton M., Graham F.L. (1995): Site-Specific Recombination Mediated by an Adenovirus Vector Expressing the Cre Recombinase Protein: a Molecular Switch for Control of Gene Expression. *J. Virol.* **69**, 4600-4606
- Baradaran K., Hardwicke M.A., Dabrowski C.E., Schaffer P.A. (1996): Properties of the novel herpes simplex virus type 1 origin binding protein, OBPC. *J. Virol* **70**, 5673-5679
- Baringer J.R., Swoveland P. (1974): Persistent herpes simplex virus infection in rabbit trigeminal ganglia. *Lab. Invest.* **30**, 230-240
- Batchelor A.H., O'Hare P. (1990): Regulation and cell-type-specific activity of a promoter located upstream of the latency-associated transcript of herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* **64**, 3269-3279
- Batterson W., Roizman B. (1983): Characterization of the herpes simplex virion-associated factor responsible for the induction of α genes. *J. Virol.* **46**, 371-377
- Batterson W., Furlong D., Roizman B. (1983): Molecular genetics of herpes virus. VIII. Further characterization of a temperature-sensitive mutant defective in release of viral DNA and in other stages of the viral reproductive cycle. *J. Virol.* **45**, 397-407
- Bajocchi G., Feldman S. H., Crystal R. G. and Mastrangeli A. (1993): Direct *in vivo* gene transfer to ependymal cells in the central nervous system using recombinant adenovirus vectors. *Nature Genet.* **3**, 229-234
- Beard P., Faber S., Wilcox K.W. and Pizer L.I. (1986): Herpes simplex virus immediate early infected-cell polypeptide 4 binds to DNA and promotes transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 4016-4020

- Becker Y., Dym H., Sarov I. (1968): Herpes simplex virus DNA. *Virology* **36**, 185-192
- Ben-Porat T., Tokazewski S. (1977): Replication of herpesvirus DNA II. Sedimentation characteristics of newly synthesized DNA. *Virology* **79**, 292-301
- Bergold P.J., Casaccia-Bonofil P., Xiu-Liu Z. and Federoff H.J. (1993): Transsynaptic neuronal loss in hippocampal splice cultures by a herpes simplex virus vector expressing the GluR6 subunit of the kainate receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 6165-6169
- Berthomme H., Fournel S., Epstein A. L. (1996): Increased transcomplementation properties of plasmids carrying HSV-1 origin of replication and packaging signals. *Virology* **216**, 437-443
- Bishop J. M. (1985): Viral oncogenes. *Cell* **42**, 23-38
- Brenner M. (1994): Structure and transcriptional regulation of the GFAP gene. *Brain Pathol.* **4**, 245-257
- Bohenzky R.A., Papavassiliou A.G., Gelman I.H., Silverstein S. (1993): Identification of a promoter mapping within the reiterated sequences that flank the herpes simplex virus type 1 U_L region. *J. Virol.* **67**, 632-642
- Boshard M., Weber F., Jahn G., Dorsch- Häsler K., Fleckenstein B., Schaffner W. (1985): A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* **41**, 521-530
- Boviatsis E. J., Chase M., Wei M. X., Tamiya T., Hurford R. K. J., Kowall N. W., Tepper R. I., Breakfield X. O. and Chiocca E. A. (1994): Gene transfer into experimental brain tumors mediated by adenovirus, herpes simplex virus, and retrovirus vectors. *Hum Gene Ther* **5**, 183-191
- Breakfield X. O., and DeLuca N. A. (1991): Herpes simplex virus for gene delivery to neurons. *New Biol.* **3**, 203-218
- Breathnach R., Chambon P. (1981): Organization and expression of eukaryotic split genes coding for proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **50**, 349-383
- Brooks A. I., Mukherjee B., Panahian N., Cory-Slechta D., Federoff H. J. (1997): Nerve growth factor somatic mosaicism produced by herpes virus-directed expression of cre recombinase. *Nat Biotechnol* **15**, 57-62
- Buchman T. G. and Roizman B. (1978a): Anatomy of bovine mammillitis virus DNA. I. Restriction endonuclease maps of four populations of molecules that differ in the relative orientation of their long and short components. *J. Virol.* **25**, 395-407
- Buchman T. G. and Roizman B. (1978b): Anatomy of bovine mammillitis virus DNA. II. Size and arrangements of the deoxynucleotide sequences. *J. Virol.* **27**, 239-254
- Bzik D.J., Preston C.M. (1986): Analysis of DNA sequences which regulate the transcription of herpes simplex virus immediate early gene 3: DNA sequences required for enhancer-like activity and response to trans-activation by a virion polypeptide. *Nucleic. Acids Res.* **14**, 929-943

- Campbell M.E.M., Palfreyman J.J.W., Presto C.M. (1984): Identification of the herpes simplex virus DNA sequences which encodes a trans-acting polypeptide responsible for the stimulation of the immediate early transcription. *J.Mol. Biol.* **180**, 1-19
- Carozza M.J., DeLuca N.A. (1996): Interaction of the viral activator protein ICP4 with TFIID through TAF250. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 3085-3093
- Cedar H. (1988): DNA methylation and gene activity. *Cell* **53**, 3-4
- Chiocca E.A., Choi B.B., Cai W.Z., Deluca N.A., Schaffer P.A., DiFiglia M., Breakefield X.O., Martuza R.L. (1990): Transfer and expression of the lacZ gene in rat brain neurons mediated by herpes simplex virus mutants. *New. Biol.* **2**, 739-746
- Chung R.Y., Saeki Y., Chiocca E.A. (1999): B-myb promoter retargeting of herpes simplex virus' γ 34.5-mediated virulence towards tumor and cycling cells. *J. Virol*, *submitted*
- Clements J.B., Watson R.Y., Wilkie N.M. (1977): Temporal regulation of herpes simplex virus type 1 transcription: location of transcripts in the viral genome. *Cell* **12** 275-285
- Coffin R. S., MacLean A. R., Latchman D. S. and Brown S. M. (1996): Gene delivery to the central and peripheral nervous systems of mice using HSV-1 ICP34.5 deletion mutant vectors. *Gene Ther* **3**, 886-891
- Cook W.J., Lin S.L., DeLuca N.A., Coen D.M. (1995): Initiator Elements and Regulated Expression of the Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase Gene. *J.Virol.* **69**, 7291-7294
- Cook J.W., Gu B., DeLuca N. A., Moynihan E. B., Coen D. M. (1995): Induction of Transcription by a Viral Regulatory Protein Depends on the Relative Strengths of Functional TATA Boxes. *Mol Cell Biol* **15**, 4998-5006
- Courtney R. J. and Benyesh-Melnick M. (1974): Isolation and characterization of a large molecular-weight polypeptide of herpes simplex virus type 1. *Virology* **62**, 539-551
- Constantini F., Lacy E. (1981): Introduction of a rabbit β -globin gene into the mouse germ line. *Nature* **294**, 92-94
- Costanzo F., Campadelli-Fiume G., Foa-Tomas L., Cassai E. (1977): Evidence that herpes simplex virus DNA is transcribed by cellular RNA polymerase II. *J.Virol.* **21**, 996-1001
- Cunningham C., Davison A.J. (1993): A cosmid-based system for constructing mutants of herpes simplex virus type 1. *Virology* **197**, 116-124
- Dabrowski C.E., Carmillo P.J., Schaffer P.A. (1994): Cellu protein interactions with herpes simplex type 1 ori_s. *Mol.Cell.Biol.***14**, 2545-2555
- Davidson I., Stow N. D. (1985): Expression of an immediate early polypeptide and activation of a viral origin of DNA replication in cells containing a fragment of herpes simplex virus DNA. *Virology* **141**, 77-88
- Davidson B. L., Allen E. D., Kozarsky K. F., Wilson J. M., Roessler B. J. (1993): A model system for in vivo gene transfer into the central nervous system using an adenoviral vector. *Nature Genet.* **3**, 219-223

- DeLuca N.A., McCarthy A.M., Schaffer P.A. (1985): Isolation and characterization of deletion mutants of herpes simplex virus type 1 in the gene encoding the immediate-early regulatory protein ICP4 permissive for early gene expression. *J. Virol.* **56**, 558-570
- De Luca N.A., Schaffer P.A. (1985): Activation of immediate-early, early and late promoters by temperature-sensitive and wild-type forms of herpes simplex virus type 1 protein ICP4. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 1997-2008
- DeLuca N.A., Schaffer P.A. (1987): Activities of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) ICP4 genes specifying nonsense peptides. *Nucleic. Acids Res.* **15**, 4491-4511
- DeLuca N.A., Schaffer P.A. (1988): Physical and functional domains of the herpes simplex virus transcriptional regulatory protein ICP4. *J. Virol.* **62**, 732-743
- Deiss L.P., Frenkel N. (1986): Herpes simplex virus amplicon: cleavage of concatemeric DNA is linked to packaging and involves amplification of the terminally reiterated a sequence. *J. Virol.* **57**, 933-941
- Deutschle U., Meyer W. K. H., Thiesen H. J. (1995): Tetracycline-Reversible Silencing of Eukaryotic Promoters. *Mol Cell Biol* **15**, 1907-1914
- DiDonato J. A., Spitzner J. R., Muller M. T. (1991): A predictive model for DNA recognition by herpes simplex virus protein ICP4. *J. Mol. Biol.* **219**, 451-470
- Dixon R.A.F., Schaffer P.A. (1980): Fine-structure mapping and functional analysis of temperature-sensitive mutants in the gene encoding the herpes simplex virus type 1 immediate early protein VP 175. *J. Virol.* **36**, 189-203
- Dobson A.T., Margolis T.P., Sedarati F., Stevens J.G., Feldman L.T. (1990): A latent, nonpathogenic HSV-1-derived vector stably expresses beta-galactosidase in mouse neurons. *Neuron* **5**, 353-360
- Doerig C., Pizer L.I., Wilcox C.L. (1991): Detection of the latency associated transcript in neuronal cultures during the latent infection with herpes simplex type 1. *Virology* **183**, 423-426
- Doerig C., Pizer L.I., Wilcox C.L. (1991): An antigen encoded by the latency associated transcript in neuronal cell cultures latently infected with herpes simplex type 1. *Virology* **65**, 2724-2727
- During M.J., Naegele J.R., O'Malley K.L., Geller A.I. (1994): Long-term behavioral recovery in Parkinsonian rats by an HSV vector expressing tyrosine hydroxylase. *Science* **266**, 1399-1403
- Edwards Y.H. (1990): CPG islands in genes showing tissue-specific expression. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **326**, 207-215
- Eisenberg S. P., Coen D. M., McKnight S. L. (1985): Promoter domains required for expression of plasmid-borne copies of the herpes simplex virus thymidine kinase gene in virus-infected mouse fibroblasts and microinjected frog oocytes. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 1940-1947
- Elias P., Gustafsson C.M., Hammarsten O. (1990): The origin binding protein of herpes simplex virus 1 binds cooperatively to the viral origin of replication Ori_s. *J. Biol. Chem.* **265**, 17167-17173

- Everett R.D. (1984): A detailed analysis of an HSV-1 early promoter: sequences involved in trans-activation by immediate-early gene products are not early-gene specific. *Nucleic Acids Res.* **12**, 3037-3055
- Everett R.D. (1984): Transactivation of transcription by herpes virus products requirement for two HSV-1 immediate-early polypeptides for maximum activity. *EMBO. J.* **3**, 3135-3141
- Faber S.W., Wilcox K.W. (1986): Association of the herpes simplex virus regulatory protein ICP4 with specific nucleotide sequences in DNA. *Nucleic Acids Res.* **14**, 6067-6083
- Federoff H., Geschwind M., Geller A., Kessler J. (1992): Expression of nerve growth factor in vivo, from a defective HSV-1 vector prevents effects of axotomy on sympathetic ganglia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 1636-1640
- Fenwick M.L., Walker M.J. (1978): Suppression of the synthesis of cellular macromolecules by herpes simplex virus. *J. Gen. Virol.* **41**, 37-51
- Fink D.J., Sternberg L.R., Weber P.C., Mata M., Goins W.F., Glorioso J.C. (1992): In vivo expression of beta-galactosidase in hippocampal neurons by HSV-mediated gene transfer. *Hum. Gene Ther.* **3**, 11-19
- Fink D.J., Sternberg L.R., Weber P.C., Mata M., Goins W.F., Glorioso J.C. (1993): In vivo expression of beta-galactosidase in hippocampal neurons by HSV-mediated gene transfer. *Hum. Gene Ther.* **3**, 11-19
- Fraefel C., Song S., Lim F., Lang P., Yu L., Wang Y., Wild P., Geller A. I. (1996): Helper virus-free transfer of herpes simplex virus type 1 plasmid vectors into neural cells. *J. Virol.* **70**, 7190-7197
- Fraefel C., Jacoby D. R., Lage C., Hilderbrand H., Chou J. Y., Alt F. W., Breakefield X.O., Majzoub J. A. (1997): Gene transfer into hepatocytes mediated by helper virus-free HSV/AAV hybrid vectors. *Mol. Med.* **3**, 813-825
- Fraefel C., Breakefield X.O., Jacoby D. R. (1998): HSV-1 Amplicon. *In: Gene Therapy for Neurological Disorders and Brain Tumors.* Chiocca E. A., Breakefield X. O. (Eds.). Humana Press, Totowa, NJ, pp. 63-82
- Fraser N.W., Block T.M., Spivack J.G. (1992): The latency-associated transcripts of herpes simplex virus: RNA in search of function. *Virology* **131**, 171-179
- Frenkel N., Locker H., Batterson W., Hayward G. S., Roizman D. (1976): Anatomy of herpes simplex virus DNA. VI. Defective DNA originates from the S component. *J. Virol.* **20**, 527-531
- Frenkel N., Locker H., Vlazny D. A. (1981): Structure and expression of class I and class II defective interfering HSV genomes. *In "Herpesvirus DNA: Recent studies of the viral genome"*. Nijhoff, The Hague
- Friedmann T. (1994): Gene therapy for neurological disorders. *Trends Genet.* **10**, 210-214
- Furth P. A., St Onge L., Boger H., Gruss P., Gossen M., Kistner A., Bujard H., Henninghausen L. (1994): Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 9302-9306

- Gage P. J., Sauer B., Levine M., Glorioso J. C. (1992): A cell-free recombination system for site-specific integration of multigenic shuttle plasmids into herpes simplex virus type 1 genome. *J. Virol.* **66**, 5509-5515
- Geller A. I., Keyomarsi K., Bryan J., Pardee A. B. (1990): An efficient deletion mutant packaging system for defective herpes simplex virus vectors: potential applications to human gene therapy and neuronal physiology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 8950-8954
- Geller A.I., During M.J., Neve R.L. (1991): Molecular analysis of neuronal physiology by gene transfer into neurons with herpes simplex virus vectors. *TINS* **10**, 428-432
- Geller A.I., During M.J., Haycock J.W., Freese A., Neve R.L. (1993): Long-term increases in neurotransmitter release from neuronal cells expressing a constitutively active adenylate cyclase from a HSV-1 vector. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **90**,7603-7607
- Geller A.I., During M.J., OH Y.J., O'Malley K. (1995): An HSV-1 vector expressing tyrosine hydroxylase causes production and release of L-dopa from cultured rat striatal cells. *J. Neurochem.* **64**, 487-496
- Geller A. I., Breakefield X. O. (1988): A defective HSV-1 vector expresses Escherichia coli beta-galactosidase in cultured peripheral neurons. *Science* **241**, 1667-1669
- Geller A.I., Freese A. (1990): Infection of cultured central nervous system neurons with a defective herpes simplex virus 1 vector resulted in stable expression of Escherichia coli β -galactosidase. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **87**, 1149-1153
- Gelman I.H., Silverstein S. (1985): Identification of immediate early genes from herpes simplex virus that transactivate the virus thymidine kinase gene. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* **82**, 5265-5269
- Geschwind M., Lu B., Federoff H. (1994): Viral transfection of intrinsic cells within the brain. Expression of neurotrophic genes from HSV-1 vectors: modifying neuronal phenotype. In *:Providing pharmacological access to the brain : a volume of methods in neurosciences* Acad.Press 462-482
- Ghirnikar R. S., Yu A. C., Eng L. F. (1994): Astrogliosis in culture: III. Effect of recombinant retrovirus expressing antisense glial fibrillary acidic protein RNA. *J. Neurosci. Res.* **38**, 376-85
- Glorioso J. C., Goins W. F., Fink D. J., (1994): Gene transfer to brain using herpes simplex virus vectors. *Ann. Neurol.* **35**, 28-34
- Glorioso J. C., Goins W. F., Fink D. J., DeLuca N. A. (1994): Herpes simplex virus vectors and gene transfer to brain. *Devel. Biol. Standard* **82**, 79-87
- Glorioso J.C., DeLuca N.A., Fink D.J. (1995): Development and application of HSV-1 vectors for human gene therapy. *Annu.Rev.Microbiol.* **49**, 675-710
- Godowski P.J, Knipe D.M. (1986): Transcriptional control of herpes-virus gene expression: gene functions required for positive and negative regulation. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 256-260

- Goldstein D.J., Weller S.K. (1988): Herpes simplex virus type 1 induced ribonucleotide reductase activity is dispensable for virus growth and DNA synthesis: isolation and characterization of an ICP6 lacZ insertion mutant. *J.Virol.* **62**, 196-205
- Gossen M., Bujard H. (1992): Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Cell Biol.* **89**, 5547-5551
- Gossen M., Freundlieb S., Bender G., Müller G., Hillen W., Bujard H. (1995): Transcriptional Activation by Tetracyclines in Mammalian Cells. *Science* **268**, 1766-1769
- Gordon J. W., Scangos G. A., Plotkin D. J., Barbosa J. A., Ruddle F. H. (1980): Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 7380-7384
- Gray C.P., Kaerner, H.C. (1984): Sequence of the putative origin of replication in the U_L region of herpes simplex virus type 1 ANG DNA. *J. Gen.Virol.* **65**, 2109-2119
- Grossman M., Raper S. E., Kozarsky K., Stein E. A., Engelhardt J. F., Muller D., Lupien P. J., Wilson J. M. (1994): Successful *ex vivo* gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolaemia. *Nature Genet.* **6**, 335-341
- Grüter W. (1920): Experimentelle und klinische Untersuchungen über den sogenannten Herpes corneae. Ber. Versam. Dtsch. Ophth. Ges. **42**, 162-166
- Gu B., DeLuca N. (1994): Requirements for Activation of the Herpes Simplex Virus Glycoprotein C Promoter In Vitro by the Viral Regulatory Protein ICP4. *J.Virol* **68**, 7953-7965
- Gu B., Rivera-Gonzales R., Smith C.A., DeLuca D.A. (1993): Herpes simplex virus infected cell polypeptide 4 preferentially represses Sp1-activated over basal transcription from its own promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 9528-9532
- Halbert D. N., Cutt J. R., Shenk T. (1985): Adenovirus early region 4 encodes functions required for efficient DNA replication, late gene expression, and host cell shutoff. *J. Virol.* **56**, 250-257
- Hanahan D. (1985): Techniques for transformation of E.coli. Glover D.M. (Hrsg.): In, "DNA-Cloning ". IRL Press, Oxford
- Hardy S., Kitamura M., Harris-Stansil T., Dai Y., Phipps M.L. (1997): Construction of Adenovirus Vectors through Cre-lox Recombination. *J.Virol.* **71**, 1842-1849
- Hayward G.S., Frenkel N., Roizman B. (1975): Anatomy of herpes simplex virus DNA: evidence for four populations of molecules that differ in the relative orientations of their long and short segments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 4243-4247
- Henninghausen L., Wall R. J., Tillmann U., Li M., Furth P. A. (1995): Conditional gene expression in secretory tissues and skin of transgenic mice using the MMTV-LTR and the tetracycline responsive system. *J. Cell. Biochem.* **59**, 463-472
- Ho D.Y., Saydam T.C., Fink S.L., Lawrence M.S., Sapolsky R.M. (1995): Defective herpes simplex virus vectors expressing the rat brain glucose transporter protect cultured neurons from necrotic insults. *J. Neurochem.* **65**, 842-850

- Ho D.Y., Mocarski E.S., Sopoliski R.M. (1993): Altering central nervous system physiology with a defective herpes simplex virus vector expressing the glucose transporter gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 3655-3659
- Hoffmann A., Villalba M., Journot L., Spengler D. (1997): A novel tetracycline-dependent expression vector with low basal expression and potent regulatory properties in various mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **25**, 1078-1079
- Honess R.W., Roizman B. (1974): Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *J. Virol.* **14**, 8
- Honess R.W., Roizman B. (1975): Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis: sequential transition of polypeptide synthesis requires functional viral polypeptides. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 1276-1280
- Horellou P., Vigne E., Castel M-N., Barneoud P., Colin P., Perricaudet M., Delaere P., Mallet J. (1994): Direct intracerebral gene transfer of an adenovirus vector expressing tyrosine hydroxylase in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroreport* **6**
- Howe J. R., Skryabin B. V., Belcher S. M., Zerillo C. A., Schmauss C. (1995): The responsiveness of a tetracycline-sensitive expression system differs in different cell lines. *J. Biol. Chem.* **270**, 14168-14174
- Huang A. S., Baltimore D. (1977): Defective interfering animal viruses. In: "Comprehensive Virology" (H. Fraenkel-Conrad and R. R. Wagner, eds.) **10**, 73-116. Plenum, New York
- Huang Q., Vonsattel J.P., Schaffer P.A., Martinza R.L., Breakefield X.O., DiFiglia M. (1992): Introduction of a foreign gene (Escherichia coli lacZ) into rat neostriatal neurons using herpes simplex virus mutants: a light and electron microscopic study. *Exp. Neurol.* **115**, 303-316
- Iida A., Chen S. T., Friedman T., Yee J. K. (1996): Inducible gene expression by retrovirus-mediated transfer of a modified tetracycline-regulated system. *J. Virol.* **70**, 6054-6059
- Inostroza J. A., Mermelstein F. H., Ha I., Lane W. S., Reinberg D. (1992): Dr1, a TATA-binding protein associated phosphoprotein and inhibitor of class II gene transcription. *Cell* **70**, 477-489
- Jacob R.J., Morse L.S., Roizman B. (1979): Anatomy of herpes simplex virus DNA XIII. Accumulation of head to tail concatemers in nuclei of infected cells and their role in the generation of the four isomeric arrangements of viral DNA. *J. Virol.* **9**, 448-457
- Johnson P. A., Miyanojara A., Levine F., Cahill T., Friedmann T. (1992): Cytotoxicity of a replication-defective mutant of herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* **66**, 2952-2965
- Johnson P.A., Wang M.J., Friedmann T. (1992): Improved cell survival by the reduction of immediate-early gene expression in replication-defective mutants of herpes simplex virus type 1 but not by mutation of the virion host shutoff function, *J. Virol.* **68**, 6347-6362
- Johnston K. M., Jacoby D., Pechan P. A., Fraefel C., Borghesani P., Schuback D., Dunn R. J., Smith F. I., Breakefield X. O. (1997): HSV/AAV hybrid amplicon vectors extend transgene expression in human glioma cells. *Hum. Gene Ther.* **8**, 359-370

- Jones K.A., Yamamoto K.R., Tjian R. (1985): Two distinct transcription factors bind to the HSV thymidine kinase promoter in vitro. *Cell* **42**, 559-572
- Jones K.A., Tjian R. (1985): Spl binds to promoter sequences and activates herpes simplex virus "immediate-early" gene transcription in vitro. *Nature* **317**, 179-182
- Kaplitt M. G., Loewy A. D. (1995): "Viral Vectors: Gene therapy and neuroscience applications". Academic Press, Inc., New York
- Kaplitt M. G., Pfaus J. G., Kleopoulos S. P., Hanlon B. A., Rabkin S. D., Pfaff D. W. (1991): Expression of a functional foreign gene in adult mammalian brain following in vivo transfer via a herpes simplex virus type 1 defective viral vector. *Mol. Cell. Neurosci.* **2**, 320-330
- Kaplitt M.G., Tjuvajev J.G., Leib D.A., Berk J., Pettigrew K.D., Posner J.B., Pfaff D.W., Rabkin S.D., Blasberg R.G. (1994): Mutant herpes simplex virus induced regression of tumors growing in immunocompetent rats. *J. Neurooncol.* **19**, 137-147
- Kaplitt M.G., Kwong A.D., Kleopoulos S.P., Mobbs C.V., Rabkin A.D., Pfaff D.W. (1994): Preproenkephalin promoter yields region-specific and long-term expression in adult brain after direct in vivo gene transfer via a defective herpes simplex viral vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 8979-8983
- Karpati G., Lochmüller H., Nalbantoglu J., Durham H. (1996): The principles of gene therapy for the nervous system. *Trends Neurosci.* **19**, 49-54
- Kattar-Cooley P., Wilcox K. W. (1989): Characterization of the DNA binding properties of herpes simplex virus regulatory protein ICP4. *J. Virol.* **63**, 696-704
- Kellendonk C., Tronche F., Casanova E., Anlag K., Opherk C., Schütz G. (1999): Inducible Site-specific Recombination in the Brain. *Science* **285**, 175-182
- Kennedy P. G. E., Steiner I. (1993): The use of herpes simplex virus vectors for gene therapy in neurological disease. *Q. J. Med.* **86**, 697-702
- Kesari S., Randazzo B. P., Valyi-Nagy T., Huang Q. S., Brown S. M., MacLean A. R., Lee V. M., Trojanowski J. Q., Fraser N. W. (1995): Therapy of experimental human brain tumors using a neuroattenuated herpes simplex virus mutant. *Lab. Invest.* **73**, 636-648
- Kosz-Vnenchak M., Jacobson J., Coen D.M., Knipe D.M. (1993): Evidence for a novel regulatory pathway for herpes simplex virus gene expression in trigeminal ganglion neurons. *J. Virol.* **67**, 5383-5393
- Kozak M. (1983): Comparison of initiation of protein synthesis in procaryotes, eukaryotes and organelles. *Microbiol. Rev.* **47**, 1-45
- Kristie T.M., Roizman B. (1984): Separation of sequences defining basal expression from those conferring α gene recognition within the regulatory domains of herpes simplex virus 1 α genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 4065-4069
- Kristie T.M., Roizman B. (1986): $\alpha 4$, the major regulatory protein of herpes simplex virus type 1, is stably and specifically associated with promoter-regulatory domains of α genes and of selected other viral genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 3218-3222

Kuddus R., Gu B., DeLuca N. A. (1995): Relationship between TATA-binding protein and herpes simplex virus type 1 ICP4 DNA-binding sites in complex formation and repression of transcription. *J. Virol.* **69**, 5568-5575

Kwong A. D., Frenkel N. (1985): The herpes simplex virus amplicon. IV. Efficient expression of a chimeric chicken ovalbumin gene amplified within defective virus genomes. *Virology* **142**, 421-425

Laquerre S., Anderson D.B., Stolz D.B., Glorioso J.C. (1998): Recombinant herpes simplex virus type 1 engineered for targeted binding to erythropoietin receptor-bearing cells. *J. Virol.* **72**, 9683-9697

Laemmli U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685

Lawrence M.S., Ho D.Y., Dash R., Sapolsky R.M. (1995): Herpes simplex virus vectors overexpressing the glucose transporter gene protect against seizure-induced neuron loss. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 7247-7251

Le Gal La Salle G., Robert J. J., Berrard S., Ridoux V., Stratford-Perricaudet L. D., Perricaudet M., Mallet J. (1993): An adenovirus vector for gene transfer into neurons and glia in the brain. *Science* **259**, 988-990

Lehrach H., Frischauf A.M. (1982): EMBL-Lab. Manual, Heidelberg

Lim F.D., Hartley D., Starr P., Lang P., Song S., Yu L., Wang Y., Geller A.I. (1996): Generation of High-Titer Defective HSV-1 Vectors Using an IE2 Deletion Mutant and Quantitative Study of Expression in Cultured Cortical Cells. *BioTechniques* **20**, 460-469

Lipschütz B. (1921): Untersuchungen über die Ätiologie der Herpesgruppe, *Arch. Derm. Syph. Wien* **136**, 428

Little S.P., Schaffer P.A. (1981): A virion-Associated glycoprotein essential for infectivity of herpes simplex virus type 1. *Virology* **115**, 149-160

Locker H., Frenkel N. (1979): BamI, KpnI and Sall restriction enzyme maps of the DNAs of herpes simplex virus strains Justin and F: occurrence of heterogeneities in defined regions of the viral DNA. *J. Virol.* **32**, 424-441

Locker H., Frenkel N., Halliburton I. (1982): Structure and expression of class II defective herpes simplex virus genomes encoding infected cell polypeptide number 8. *J. Virol.* **43**, 574-593

Ludwig H.O., Biswal N., Benyesh-Melnick M. (1972): Studies on the relatedness of herpes-viruses through DNA-DNA hybridization. *Virology* **49**, 95-101

Mackem S., Roizman B. (1982): Regulation of α genes of herpes simplex virus: the $\alpha 27$ gene promoter-thymidine kinase chimera is positively regulated in converted L cells. *J. Virol.* **43**, 1015-1023

Mackem S., Roizman B. (1982): Differentiation between α promoter and regulator regions of herpes simplex virus 1: the functional domains and sequence of a movable α regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 4917-4921

Margolin J., Friedman J. R. Meyer W. K. H., Vissing H., Thiesen H. J., Rauscher III F.J. (1994): Krüppel-associated boxes are potent transcriptional repression domains. *Proc. Acad. Sci. USA* **91**, 4509-4513

Mavromara-Nazos P., Silver S., Hubenthal-Voss J., McKnight J. C., Roizman B. (1986): Regulation of herpes simplex virus 1 genes: α gene sequence requirements for transient induction of indicator genes regulated by β or late (γ_2) promoters. *Virology* **149**, 152-164

McCarthy A. M., McMahan L., Schaffer P. A. (1989): Herpes simplex virus type 1 ICP27 deletion mutants exhibit altered patterns of transcription and are DNA deficient. *J. Virol.* **63**, 18-27

McGeoch D.J., Dolan A., Donald S., Rixon F.J. (1985): Sequence determination and genetic content of the short unique region in the genome of herpes simplex virus type I. *J. Mol. Biol.* **181**, 1-13

McGeoch D.J., Davison A.J. (1986): Alpha herpesviruses possess a gene homologous to the protein kinase family of eukaryotes and retroviruses. *Nucleic Acids Res.* **14**, 1765-1777

McGeoch D.J., Dalrymple M.A., Davison A.J., Dolan A., Frame M.C., McNab D., Perry L.J., Scott J.E., Taylor P. (1988): The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *J. Gen. Virol.* **69**, 1531-1574

McGeoch D.J., Dalrymple M.A., Dolan A. (1988): Structures of herpes simplex virus type 1 genes required for replication of virus DNA. *J. Virol.* **62**, 444-453

McKie E.A., McLean A.R., Lewis A.D., Cruickshank G., Rampling R., Barnett S.C., Kennedy P.G., Brown S.M. (1996): Selective in vitro replication of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) ICP34.5 null mutants in primary human CNS tumours - evaluation of a potentially effective clinical therapy. *Br. J. Cancer* **74**, 745-752

McKie E.A., Graham D.I., Brown S.M. (1998): Selective astrocytic transgene expression in vitro and in vivo from the GFAP promoter in a HSV RL1 null mutant vector-potential glioblastoma targeting. *Gene Ther.* **5**, 440-450

McLean A.R., ul-Fareed M., Robertson L., Harland J., Brown S.M. (1991): Herpes simplex virus type 1 deletion variants 1714 and 1716 pinpoint neurovirulence-related sequences in Glasgow strain 17= between immediate early gene 1 and the "a" sequence. *J. Gen. Virol.* **72**, 631-639

Mellerick D.M., Fraser N.W. (1987): Physical state of the latent herpes simplex virus genome in a mouse model system : evidence suggesting an episomal state. *Virology* **158**, 265-275

Miller D. G., Adam M. A., Miller A. D. (1990): Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 4239-4242

Miller A. D., Buttimore C. (1986): Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 2895-2902

Miyatake S., Iyer A., Martuza R.L., Rabkin S.D. (1997): Transcriptional targeting of herpes simplex virus for cell-specific replication. *J. Virol.* **71**, 5124-5132

- Morse L.S., Buchman T.G., Roizman B., Schaffer P.A. (1977): Anatomy of herpes simplex virus DNA IX. Apparent exclusion of some parental DNA arrangements in the generation of intertypic (HSV-1 x HSV-2) recombinants. *J. Virol.* **24**, 231-248
- Morse L.S., Pereira L., Roizman B., Schaffer P.A. (1978): Anatomy of HSV DNA. XI. Mapping of viral genes by analysis of polypeptides and functions specified by HSV-1 x HSV-2 recombinants. *J. Virol.* **26**, 389-410
- Muller M.T. (1987): Binding of the herpes simplex virus immediate-early gene product ICP4 to its own transcription start site. *J. Virol.* **61**, 858-865
- Munk K., Donner D. (1963): Cytopathischer Effekt und Plaquemorphologie verschiedener Herpes simplex Virus-Stämme, *Arch. Ges. Virusforsch.* **13**, 529-540
- Murchie M.J., McGeoch D.J. (1982): DNA sequence analysis of an immediate-early gene region of the herpes simplex virus type 1 genome (map coordinates 0,950-0,978). *J. Gen. Virol.* **62**, 1-15
- Neve R.L., Ivins K.J., Benowitz L.I., During A.J., Geller A.I. (1991): Molecular analysis of the function of the neuronal growth-associated protein GAP - 43 by genetic intervention. *Mol. Neurobiol.* **5**, 131-141
- Nguyen-Huynh A.T., Schaffer P.A. (1998): Cellular transcription factors enhance herpes simplex virus type 1 ori_s-dependent DNA replication. *J. Virol.* **72**, 3635-3645
- Ogasawara Y., Mizukami H., Urabe M., Kume A., Kanegae Y., Saito I., Monahan J., Ozawa K. (1999): Highly regulated expression of adeno-associated virus large Rep proteins in stable 293 cell lines using the Cre/loxP switching system. *J. Gen. Virol.* **80**, 2477-2480
- O'Hare P., Hayward G.S. (1985): Three trans-acting regulatory proteins of herpes simplex virus modulate immediate-early gene expression in a pathway involving positive and negative feedback regulation. *J. Virol.* **56**, 723-733
- Oligino T., Poliani P.L., Wang Y., Tsai S.Y., O'Malley B.W., Fink D.J., Glorioso J.C. (1998): Drug inducible transgene expression in brain using a herpes simplex virus vector. *Gene Ther.* **5**, 491-496
- Parella T. D., Hidaka Y., Silverman L. J., Levine M., Glorioso J. C., Kelley W. N. (1989): Expression of human HPRT mRNA in brains of mice infected with a recombinant herpes simplex virus vector. *Gene* **80**, 137-144
- Parella T. D., Silverman L. J., Schroll C. T., Homa F. L., Levine M., Kelley W. N. (1988): Herpes simplex virus-mediated human hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase gene transfer into neuronal cells. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 457-460
- Paterson T., Everett R.D. (1988): The regions of the herpes simplex virus type 1 immediate early protein Vmw 175 required for site specific DNA binding closely correspond to those involved in transcriptional regulation. *IRL Press Limited Oxford England* 11005 -11025
- Paterson T., Everett R. D. (1990): A prominent serin-rich region in Vmw175, the major transcriptional regulator protein of herpes simplex virus type 1, is not essential for virus growth in tissue culture. *J. Gen. Virol.* **71**, 1775-1783

- Paterson T., Preston V. G., Everett R. D. (1990): A mutant of herpes simplex virus type 1 immediate early polypeptide Vmw175 binds to the cap site of its own promoter in vitro but fails to autoregulate in vivo. *J. Gen. Virol.* **71**, 851-861
- Pechan P. A., Herrlinger U., Aghi M., Jacobs A., Breakefield X. O. (1999): Combined HSV-1 recombinant and amplicon piggyback vectors: replication-competent and defective forms, and therapeutic efficacy for experimental gliomas. *J. Gene. Med.* **1**, 176-185
- Pechan P. A., Fotaki M., Thompson R. L., Dunn R., Chase M., Chiocca E. A., Breakefield X. O. (1996): A novel 'piggyback' packaging system for herpes simplex virus amplicon vectors. *Hum. Gene. Ther.* **7**, 2003-2013
- Pellett P.E., McKnight J.L.C., Jenkins F.J., Roizman B. (1985): Nucleotide sequence and predicted amino acid sequence of a protein encoded in small herpes simplex virus DNA fragment capable of trans-inducing α genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 5870-5874
- Pereira L., Wolff M., Fenwick M., Roizman B. (1977): Regulation of herpesvirus synthesis V. Properties of a polypeptides specified by HSV-1 and HSV-2. *Virology* **77**, 733-749
- Plück A. (1996): Conditional mutagenesis in mice: the Cre/loxP recombination system. *Int. J. Exp. Path.* **77**, 269-278
- Post L.E., Roizman B. (1981): A generalized technique for deletion of specific genes in large genomes: α gene 22 of herpes simplex virus 1 is not essential for growth. *Cell* **25**, 227-232
- Post L.E., Mackem S.A., Roizman B. (1981): Regulation of α genes of herpes simplex virus: expression of chimeric genes produced by fusion of thymidine kinase with α gene promoters. *Cell* **24**, 555-565
- Preston V.G., Palfreyman J.W., Dutia B.M. (1984): Identification of a herpes simplex virus type 1 polypeptide which is a component of the virus-induced ribonucleotide reductase. *J. Gen. Virol.* **65**, 1457-1466
- Preston C.M., Frame M.C., Campbell M.E.M. (1988): A complex formed between cell components and an HSV structural polypeptide binds to a viral immediate early gene regulatory sequence. *Cell* **52**, 425-434
- Preston C.M., Mabbs R., Nicholl M.J. (1997): Construction and characterization of herpes simplex virus type 1 mutants with conditional defects in immediate early gene expression. *Virology* **229**, 228-239
- Preston C. M. (1979): Control of herpes simplex virus type 1 mRNA synthesis in cells infected with wild-type virus or the temperature-sensitive mutant tsK. *J. Virol.* **29**, 275-284
- Proudfoot N., Brownlee G. (1976): 3' noncoding region sequences in eukaryotic mRNA, *Nature (London)* **263**, 211-214
- Quinlan M.P., Knipe D.M. (1985): Stimulation of expression of a herpes simplex virus DNA-binding protein by two viral functions. *Mol. Cell. Biol.* **5** 957-963

- Razin A., Riggs A. (1980): DNA methylation and gene function. *Science, Wash.* **219**, 604-610
- Ram Z., Culver K. W., Walbridge S., Frank J. A., Blaese R. M., Oldfield E. H. (1993b): The effect of thymidine kinase transduction and ganciclovir therapy on tumor vasculature and growth of 9L gliomas in rats. *J. Neurosurg.* **81**, 256-260
- Ridoux V., Roberts J. J., Zhang X., Perricaudet M., Mallet J., Le Gal La Salle G. (1994): The use of adenovirus vectors for intracerebral grafting of transfected nervous cells. *Neuro-Report* **5**, 801-804
- Rivera-Gonzales R., Imbalzano A. N., Gu B., DeLuca N. A. (1994): The Role of ICP4 Repressor Activity in Temporal Expression of the IE-3 and Latency-Associated Transcript Promoters during HSV-1 Infection. *Virology* **202**, 550-564
- Rixon F.J., Clements J.B. (1982): Detailed structural analysis of two spliced HSV-1 immediate-early mRNAs. *Nucleic. Acids Res.* **10**, 2244-2256
- Rock D.L., Fraser N.W. (1983): Detection of HSV-1 genome in central nervous system of latently infected mice. *Nature* **302**, 523-525
- Roizman B., Spear P.G., Kieff E.D. (1973): Herpes Simplex viruses I and II: a biochemical definition. *Perspectives in Virology (M.Pollard, ed.) Vol. VIII, P.129 Academic Press New York*
- Roizman B. (1979): The structure and isomerization of herpes simplex virus genomes. *Cell* **16**, 481-494
- Roizman B., Carmichael L.E., Deinhardt F., de The G., Nahmias A.J., Plowright W., Rapp F., Sheldrick P., Takahasi M., Wolf K. (1981): Herpesviridae: definition, provisional nomenclature and taxonomy. *Intervirology* **16**, 201-217
- Roizman B. (1982): The family herpesviridae: general description, taxonomy and classification. *The Herpesviruses (B. Roizman ed.) Vol.1, p1. Plenum Press New York, London*
- Roizman B., Kristie T., McKnight J.L.C., Michael N., Mavromara-Nazos P., Spector, D (1988): The trans-activation of herpes simplex virus gene expression : comparison of two factors and their cis sites. *Biochimie* **70**, 1031-1043
- Roizman B. u. Sears A.E. (1996): Herpes simplex Viruses and Their Replication. *in Fields Virology B.N.Fields, D.M.Knipe, P.M.Howley, te al.(Eds.)Lippincott, Philadelphia, PA pp. 2231-2295*
- Russell D. W., Miller A. D., Alexander I. E. (1994): Adeno-associated virus vectors preferentially transduce cells in S phase. *Proc.Acad. Sci. USA* **91**, 8915-8919
- Sacks W.R., Greene C.C., Ashman D.P., Schaffer P.A. (1985): Herpes simplex virus type 1 ICP27 is an essential regulatory protein. *J.Virol.* **55**, 796-805
- Saeki Y., Ichikawa T., Saeki A., Chiocca E. A., Tobler K., Ackermann M., Breakefield X. O., Fraefel C. (1998): Herpes simplex virus type 1 DNA amplified as bacterial artificial Chromosom in Escherichia coli: rescue of replication replication-competent virus progeny and packaging of amplicon vectors. *Hum. Gene Ther.* **9**, 2787-2794

- Saeki Y., Fraefel C. (1999): Herpes simplex virus type 1-based amplicon and hybrid amplicon vector system. *In: Viral Vectors: Basic Science and Gene Therapy*. Cid-Arregui A, Garcia A. (Eds.). BioTechniques Books, Natick, in press.
- Saiki R.K., Bugawan T.L., Horn G.T., Mullis K.B., Ehrlich H.A. (1986): Analysis of enzymatically amplified β -globin and HLA-DQ α DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* **324**, 163-166
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Ehrlich H.A. (1988): Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-492
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989): Molecular cloning: a laboratory manual (2. Auflage) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- Samaniego L. A., Wu N., DeLuca N. A. (1997): The herpes simplex virus immediate early protein ICP0 affects transcription from the viral genome and infected-cell survival in the absence of ICP4 and ICP27. *J. Virol.* **71**, 4614-4625
- Samaniego L. A., Neiderhiser L., DeLuca N. A. (1998): Persistence and Expression of the Herpes Simplex Virus Genome in the Absence of Immediate Early Proteins. *J. Virol.* **72**, 3307-3320
- Sauer B. (1998): Inducible Gene Targeting in Mice Using the Cre/lox System. *Acad. Press* 1998 381-392
- Sauer B.M., Whealy M., Robbins A., Enquist L. (1987): Site-specific insertion of DNA into a pseudorabies virus vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 9108-9112
- Schneweis K.E. (1962): Serologische Untersuchungen zur Typhdifferenzierung des Herpesvirus hominis, *Z. Immunnforsch.* **124**, 24-29
- Schockett P. E., Difilippantonio M., Hellman N., Schatz D. G. (1995): A modified tetracycline-regulated system provides autoregulatory inducible gene expression in cultured cells and transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 6522-6526
- Schockett P. E., Schatz D. G. (1996): Divers strategies for tetracycline-regulated inducible gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 5173-5176
- Schönlein J.L. (1837): Allgemeine und spezielle Pathologie und Therapie
- Schrag J.D., Prasad B.V.V., Rixon R.J., Chiu W. (1989): Three dimensional structure of the HSV-1 nucleocapsid. *Cell* **56**, 651-660
- Schultze N., Burki Y., Lang Y., Certa U., Bluethmann H. (1996): Efficient control of gene expression by single step integration of the tetracycline system in transgenic mice. *Nat. Biotechnol.* **14**, 499-503
- Shepard A. A., DeLuca N. A. (1991): A second-site revertant of a defective herpes simplex virus ICP4 protein with restored regulatory activities and impaired DNA-binding properties. *J. Virol.* **65**, 787-795
- Spaete R. R., Frenkel N. (1982): The herpes simplex virus amplicon: a new eukaryotic defective-virus cloning-amplifying vector. *Cell* **30**, 295-304

- Spear M., Schuback D., Sun F., Brandt C.R., Breakefield X.O. (1999): HSV-1 gC modified with his-tag replacing heparan sulfate binding domain is expressed in an HSV-1 amplicon vector targeting system. *ASGT*
- Shepard A.A., Imbalzano A.N., Deluca N.A. (1989): Separation of primary structural components conferring autoregulation, transactivation and DNA-binding properties to the herpes simplex virus transcriptional regulatory protein ICP4. *J. Virol.* **63**, 3714-3728
- Smiley J.R., Johnson D.C., Pizer L.I., Everett R.D. (1992): The ICP4 binding sites in the herpes simplex virus type 1 glycoprotein D (gD) promoter are not essential for efficient gD transcription during virus infection. *J. Virol.* **66**, 623- 631
- Smith C.A., Schaffer P.A. (1986): Mutants defective in herpes simplex virus type 2 ICP4: isolation and preliminary characterization. *J. Virol.* **61**, 1092-1097
- Smith I.L., Bates P., Rivera-Gonzales R., Gu B., DeLuca N.A. (1993): ICP4, the major transcriptional regulatory protein of herpes simplex virus type 1 forms a tripartite complex with TATA-binding protein and TFIIB. *J. Virol.* **67**, 4676-4687
- Smith I. L., Hardwicke M. A., Sandri-Goldin R. M. (1992): Evidence that the herpes simplex virus immediate early protein ICP27 acts post-transcriptionally during infection to regulate gene expression. *Virology* **186**, 74-86
- Stacey A., Bateman J., Choi T., Mascara T., Cole W., Jaenisch R. (1988): Perinatal lethal osteogenesis imperfecta in transgenic mice bearing an engineered mutant pro- α 1 (I) collagen Gene. *Nature* **332**, 131-136
- Stannard L.M., Fuller A.O., Spear P.G. (1987): Herpes simplex virus glycoproteins associated with different morphological entities projecting from the virion envelope. *J. Gen. Virol.* **68**, 715-725
- Stavropoulos T. A., Strathdee C. A. (1998): An enhanced packaging system for helper-dependent herpes simplex virus vectors. *J. Virol.* **72**, 7137-7143
- Stehelin D., Varnus H. E., Bishop J. M., Vogt P.K. (1976): DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* **1** 170-173
- Sterz H., Ludwig H., Rott R. (1974): Immunologic and genetic relationship between herpes simplex virus and bovine herpes mammillitis virus. *Intervirology* **2**, 1-13
- Stevens J. G. (1978): Latent characteristics of selected herpes viruses. *Adv. Cancer Res.* **26**, 227-256
- Stevens J. G., Wagner E. K., Devi-Rao G. B., Cook M. L., Feldman L. (1987): RNA complementary to a herpesvirus alpha gene mRNA is prominent in latently infected neurons. *Science* **235**, 1056-1059
- Stevens J.G. (1989): Human herpesviruses: a consideration of the latent state. *Microbiol.Rev.* **53**, 318-332
- Stevens J.G., Wagner E.K., Devi-Rao G.B.,Cook M.L., Feldman L.T. (1987): RNA complementary to a herpesvirus alpha gene mRNA is prominent in latently infected neurons. *J. Infect. Dis.* **235**, 1056-1059

- Stow N.D. (1982): Localization of an origin of DNA replication within the TR_S/IR_S repeated region of the herpes simplex virus type 1 genome. *EMBO J.* **1**, 863-867
- Stow N.D., McMonagle, E.C. (1983): Characterization of the TR_S/IR_S origin of DNA replication of herpes simplex virus type 1. *Virology* **130**, 427-438
- Tamiya T., Wei M. X., Chase M., Breakefield X. O., Chiocca E. A. (1995): Transgene inheritance and retroviral infection contribute to the efficiency of gene expression in solid tumors inoculated with retroviral vector producer cells. *Gene Ther.* **2**, 345-353
- Tedder D. G., Everett R. D., Wilcox K. W., Beard P., Pizer L.I. (1989): ICP4-binding sites in the promoter and coding regions of herpes simplex virus gD gene contribute to activation of *in vitro* transcription by ICP4. *J. Virol.* **63**, 2510-2520
- Tognon M. et al. (1981): Molecular genetics of herpes simplex virus. V. Characterization of a mutant defective in ability to form plaques at low temperatures and in a viral function which prevents accumulation of coreless capsids at nuclear pores late in infection. *J. Virol.* **40**, 870-880
- Valyi-Nagy T. et al. (1994): The herpes simplex virus type 1 strain 17+ γ 34.5 deletion mutant 1716 is avirulent in SCID mice. *J. Gen. Virol.* **75**, 2059-2063
- Vidal J.B. (1873): *Am. Derm. Syph. Paris* **4**, 350
- Wadsworth S., Jacob R.J., Roizman B. (1975): Anatomy of herpesvirus DNA II. Size, composition and arrangement of inverted terminal repetitions. *J. Virol.* **15**, 1487-1497
- Wagner E.K. (1985): Individual HSV transcripts: characterization of specific genes. *In: Roizman B. ed. The herpesviruses vol.3* New York Plenum Press 45-104
- Wagner M.M., Summers W.C. (1978): Structure of the joint region and termini of the DNA of herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* **27**, 374-387
- Wagner K.U., Wall R.J., St-Onge L., Gruss P., Wynshaw-Boris A., Garrett L., Li M., Furth P.A., Hennighausen L. (1997): Cre-mediated gene deletion in mammary gland. *Nucl. Acids Res.* **25**, 4323-4330
- Warden M. P., Weir J. P. (1996): Inducible gene expression of the human immunodeficiency Virus LTR in a replication-incompetent herpes simplex virus vector. *Virology* **226**, 127-131
- Watt F., Molloy P. (1988): Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes Devel.* **2**, 1136-1143
- Weller S.K., Spadoro A., Schaffer J.E., Murray A.W. Maxam A.M., Schaffer P.A. (1985): Cloning sequencing and functional analysis of oriL, a herpes simplex virus type 1 origin of DNA synthesis. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 930-942
- Wilcox K.W., Kohn A., Sklyanskaya E., Roizman B. (1980): Herpes simplex virus phosphoproteins I. Phosphate cycles on and off some viral polypeptides and can alter their affinity for DNA. *J. Gen. Virol.* **33**, 167-182

- Windle J. J., Albert D. M., O'Brien J. M., Marcus D. M., Disteche C. M., Bernards R., Mellon P. L. (1990): Retinoblastoma in transgenic mice. *Nature* **343**, 665-669
- Wolfe J.H., Deshmane S.L., Fraser N.W. (1992): Herpesvirus vector gene transfer and expression of β -glucuronidase in the central nervous system of MPS VII mice. *Nat.Genet.* **1**, 379-384
- Wong S.W., Schaffer P.A. (1991): Elements in the transcriptional regulatory region flanking herpes simplex virus type 1 ori_s stimulate origin function. *J. Virol.* **65**, 2601-2611
- Wong K. K., Podsakoff G. (1993): High efficiency gene transfer into growth arrested cells utilizing an adeno-associated virus (AAV)- based vector. In " Proceedings, American Society of Hematology," St. Louis, MO
- Wood M.J., Byrnes A.P., Kaplitt M.G., Pfaff D.W., Rabkin S.D., Charlton H.M. (1994): Specific patterns of defective HSV-1 gene transfer in the adult central nervous system: implications for gene targeting. *Exp. Neurol.* **130**, 127-140
- Wu N., Watkins S. C., Schaffer P.A., DeLuca N. A. (1996): Prolonged Gene Expression and Cell Survival after Infektion by a Herpes Simplex Virus Mutant Defektive in the Immediate Early Genes Encoding ICP4, ICP27, and ICP22. *J. Virol.* **70**, 6358-6369
- Yei S., Mittereder N., Tang K., O'Sullivan C., Trapnell B. C. (1994): Adenovirus-mediated gene transfer for cystic fibrosis: quantitative evaluation of repeated *in vivo* vector administration to the lung. *Gene Ther.* **1**, 192-200
- Yeh L., Schaffer P.A. (1993): A novel class of transcripts expressed with late kinetics in the absence of ICP4 spans the junction between the long and short segments of the herpes simplex virus type 1 genome. *J.Virol.* **67**, 7373-7382
- Zhou Z.H., Chen D.H., Jakana J., Rixon F.J., Chiu W. (1999): Visualization of tegument-capsid interactions and DNA in intact herpes simplex virus type 1 virions. *J.Virol.* **73**, 3210-3218
- Zsengeller Z., Wert S., Hull W., Hu X., Yei S., Trapnell B. C., Whitsett J. (1995): Persistence of replication-deficient adenovirus-mediated gene transfer in lungs of immune-deficient (nu/nu) mice. *Hum. Gene Ther.* **6**, 457-467

Danksagungen:

Ich möchte mich bei Herrn Priv. Doz. Dr. Jan Mous und Herrn Dr. Helmut Jacobsen von der Firma Hoffmann-La Roche AG in Basel für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit in ihrer Abteilung (PRP-G) bzw. ihrem Labor und für die interessante und herausfordernde Themenstellung bedanken.

Bei Herrn Prof. Milan Höfer vom botanischen Institut der Universität Bonn möchte ich mich für sein Engagement bedanken, ohne das diese Arbeit nicht hätte durchgeführt werden können.

Bei Herrn Priv. Doz. Dr. Friedhelm Achenbach vom physiologischen Institut der Universität Bonn bedanke ich mich, dass er mir stets mit gutem Rat zur Seite stand.

Bei Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz Scheidtmann vom genetischen Institut der Universität Bonn bedanke ich mich für die Bereiterklärung der Vertretung des Doktorvaters, ohne die die Arbeit nicht erfolgreich hätte beendet werden können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Cornel Fraefel vom Institut für Virologie der Universität Zürich für seine intensive Betreuung, die vielen Diskussionen und Anregungen, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Für die freundliche Unterstützung bei Computerfragen möchte ich mich bei Herrn Dr. Hans-Werner-Lahm und Herrn Michael Ott von der Firma Hoffmann-La Roche AG in Basel bedanken.

Desweiteren möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Abteilung PRP-G und PRP-N der Firma Hoffmann-La Roche AG in Basel für die Hilfsbereitschaft und angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken. Herrn Dieter Reinhardt und Herrn Markus Hänggi danke ich für ihren Rat und ihre Hilfe im Labor.

Herrn Dr. Uli Deutsche von der Firma Hoffmann-La Roche AG in Basel danke ich dafür, dass er mir verschiedene Plasmide und die HeLa A12 Zelllinie zur Verfügung gestellt hat.

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschliesslich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe, und dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat. Ich versichere, dass ich alle Angaben wahrheitsgemäss nach bestem Wissen und Gewissen gemacht habe. Die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit von Juli 1996 bis Januar 2000 in der Abteilung PRPG der Firma Hoffmann-La Roche AG in Basel unter der Leitung von Herrn Priv. Doz. Dr. Jan Mous, Herrn Dr. Helmut Jacobsen und der Betreuung von Herrn Dr. Cornel Fraefel durchgeführt.

Teile, die aus dieser Arbeit veröffentlicht wurden und noch veröffentlicht werden.

1. Thomas Heister, 1998. Propagation of Herpes Simplex Virus Amplicon Vectors by Regulated *IE3* Expression. *23rd International Herpesvirus Workshop, York, U. K.*
2. Thomas Heister and Cornel Fraefel, 2000. Cre Rekombinase Induced Expression of the Cytotoxic Herpes Simplex Virus-Type1 Immediate-Early 3 Gene. *59th Annual Assembly of Swiss Society for Microbiology*
3. Thomas Heister et. al.. A Cre Rekombinase Inducible VERO-*IE3* Cell-Line, which Allows on / off Switch of the *IE3* Deletion Mutant HSV-1 *dI20*. Publikation in Bearbeitung.

