

Biochemische Charakterisierung des Mikrotubuli-vermittelten Kapsidtransportes von Herpes-Simplex-Virus Typ 1

Von der naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Ing. Andre Wolfstein

geboren am 15. September 1971
in Rehren, jetzt Auetal A/O

März 2006

Referentin: HD PD Dr. Beate Sodeik
Korreferent: Prof. Dr. Ernst J. Ungewickell

Tag der Promotion: 14. März 2006

Pigmaei gigantum humeris impositi plusquam ipsi gigantes vident.

Auf die Schultern von Riesen gestellte Pygmäen sehen mehr als die Riesen selbst.

Lucan (Marcus Annaeus Lucanus, A.D. 39 - A.D. 65)

Didacus Stella

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt H.-Doz. Dr. Beate Sodeik für das Anvertrauen dieses anspruchsvollen und mich faszinierenden Projektes, für die exzellente Betreuung und wissenschaftliche Ausbildung, für die Schulung meiner Teamfähigkeit und Sozialkompetenz und für die menschliche und fachliche Unterstützung in den schwierigen Phasen meiner Doktorarbeit. Ferner danke ich ihr für die Übernahme des Referats dieser Arbeit.

Ich danke Prof. Dr. Ernst Ungewickell für die Übernahme des Korreferates.

Prof. Dr. Ernst Ungewickell, Prof. Dr. Helmut Holtmann und H.-Doz. Dr. Beate Sodeik danke ich, dass sie sich als Prüfer für meine Disputation zur Verfügung stellen.

Claus-Henning Nagel, Kerstin Radtke, Jessica Janus, Julia Schipke, Kathrin Rode, Kristina Theusner, Nadine Müther und Lars Hinrichsen und besonders Katinka Döhner danke ich für das Korrekturlesen.

Dr. Viki Allan (Univ. of Manchester, Großbritannien) danke ich herzlich für die Möglichkeit in ihrem Labor die hohe Kunst der *in vitro* assays zu erlernen und für ihre kompetente fachliche Unterstützung.

Katinka Döhner danke ich herzlich für die sehr gute Zusammenarbeit bei den *in vivo* Experimenten und die vielen Diskussionen und wichtigen Anregungen.

Ein besonderer Dank geht an Claus-Henning Nagel für die Hilfe bei der Präparation und Charakterisierung der Kapside, für viele Diskussionen und wichtige Anregungen und die Durchführung der Plaque-Assays.

Kerstin Radtke danke ich herzlich für die ambitionierte Bereitschaft mein Projekt weiterzuführen, für die vielen anregenden Diskussionen und die Zusammenarbeit bei den anfänglichen elektronenmikroskopischen Experimenten.

Ich danke Dr. Rudi Bauerfeind neben vielen Diskussionen und wichtigen Anregungen für die hilfreiche Unterstützung bei der Mikroskopie und der Proteinanalytik.

Ute Prank danke ich herzlich für die Aufrechterhaltung der Laborroutine und die gewissenhafte Führung der Zellkultur, die eine wichtige Basis meiner Arbeit war.

Falk Büttner danke ich für die Auswertung des Parikeltransportes in lebenden Zellen und für hilfreiche Diskussionen.

Stefan Borsutzky und Sandra Graß danke ich für die anfänglichen Experimente zur Mutantencharakterisierung und Analytik der Kapside und Jutta Milzer für die Hilfe bei der elektronenmikroskopischen Quantifizierung

Für die Unterstützung bei der Computertechnik danke Carsten Heidrich, Roger Ritter und ganz besonders Achim Steinkopf.

Ich bedanke mich bei Helge Ewers (ETH Zürich) für interessante Anregungen zur Analyse der Partikeldynamik.

Dr. Päivi Ojala (Univ. of Helsinki, Finland) möchte ich für die anfängliche Unterstützung bei den Kapsidpräparationen und Dr. Thomas Binz für seine hilfreiche Unterstützung bei den Experimenten zum Proteaseverdau der Kapside danken.

Ferner danke ich Prashant Desai (Johns Hopkins U, Philadelphia) für die HSV1- Δ VP26 und HSV1-GFPVP26 Virusstämme und Didier Job (U Grenoble) und Tony Hyman (MPI Dresden) für die Tubulin-Spenden genauso wie Thomas Surrey und Thorsten Wittmann (EMBL Heidelberg) für das rekombinante Dynamitin. Patrick Keller danke ich für die YFP-Tubulin-PtK₂-Zellen (MPI Dresden).

Für die verwendeten Antikörper bedanke ich mich bei Ari Helenius (ETH Zürich), Dan Tenney (Bristol-Myers-Squib, CT), David Meredith (U Leeds), Edouard Cantin (Nat Med Centre, Duarte, CA), Frank Jenkins (U Pittsburgh), Gary Cohen (UPenn, Philadelphia), Gillian Elliott (Marie Curie Institute, Surrey), Isabelle Vernos (EMBL Heidelberg), Jay Brown (U Virginia, Charlottesville), Jeff Ross (McArdle Lab, Madison), Joel Baines (Cornell, Ithaca), Richard Roller (U Iowa), and Roselyn Eisenberg (UPenn, Philadelphia).

Prof. Dr. Thomas F. Schulz und allen Mitarbeitern im Institut für Virologie danke ich für die hervorragenden Arbeitsbedingungen.

Ich danke allen Mitgliedern des Sodeik-Labors für das sehr gute Arbeitsklima und die vielen amüsanten Partys und Laborstammtische.

Diese Arbeit ist meinen Eltern gewidmet, die mich immer in allen Lebenslagen unterstützt haben.

1	Abkürzungen	IV
2	Zusammenfassung	VI
3	Einleitung	1
3.1	Der Mikrotubuli-vermittelte Transport von Viren	1
3.2	Mikrotubuli	1
3.3	Mikrotubuli-Motoren	2
3.3.1	Cytoplasmatisches Dynein und Dynactin	2
3.3.2	Kinesine	5
3.4	Das humane Herpes-Simplex-Virus Typ 1	6
3.4.1	Struktur des Herpes-Simpex-Virus Typ 1	8
3.4.2	Infektionszyklus des Herpes-Simpex-Virus Typ 1	10
3.5	Intrazellulärer Transport des Herpes-Simpex-Virus Typ 1	14
3.5.1	Herpesviren und Mikrotubuli	14
3.5.2	Intrazellulärer Transport GFP-markierter HSV1-Partikel	16
3.5.3	Potentielle HSV1-Rezeptoren für MT-Motoren	17
3.6	Biochemische Untersuchung des MT-Transportes	18
3.7	Aufgabenstellung	21
4	Materialien und Methoden	23
4.1	Materialien	23
4.1.1	Allgemeine Laborgeräte	23
4.1.2	Mikroskope	23
4.1.3	Materialien	24
4.1.4	Virusstämme	24
4.1.5	Zelllinien	25
4.1.6	Zellkulturmedien	25
4.1.7	Verwendete Antikörper	26
4.1.8	Proteine	27
4.1.9	Weitere Chemikalien	27
4.1.10	Software	29
4.1.11	Pufferlösungen und Stammlösungen	29
4.2	Methoden	29
4.2.1	Virus-Präparation	29
4.2.1.1	Virusamplifikation	29
4.2.1.2	Virustitration	30
4.2.2	Motilität von HSV1-Partikeln in lebenden Zellen	31
4.2.3	Transport von HSV1-GFPVP26 Kapsiden <i>in vitro</i>	31
4.2.3.1	Kapsid-Präparationen	31
4.2.3.2	Proteolytischer Verdau von Kapsiden	34
4.2.3.3	Fluoreszenz-Markierung von Tubulin	34

4.2.3.4	Herstellung cytosolischer Extrakte.....	37
4.2.3.4.1	Cytosolpräparation aus Froscheiern	37
4.2.3.4.2	Cytosolpräparation aus Rattenorganen.....	40
4.2.3.5	Nachweis von unmarkiertem Tubulin und Aktin.....	41
4.2.3.6	HSV1-Kapsidtransport <i>in vitro</i>	42
4.2.3.7	Digitale Zeitverlaufs-Fluoreszenzmikroskopie und Bildanalyse.....	43
4.2.4	Kapsidbindung an Mikrotubuli	44
4.2.5	Bestimmung der Mikrotubulilänge	45
4.2.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	46
4.2.6.1	Immunoblot.....	46
4.2.6.2	Fluorographie von ³⁵ S-markierten Proteinen	48
4.2.7	Bindung cytosolischer Proteine an Kapside	48
4.2.8	Elektronenmikroskopie	48
5	Ergebnisse	50
5.1	HSV1-Präparation und Charakterisierung	50
5.2	Transport von HSV1 entlang von MT <i>in vivo</i>	50
5.3	Entwicklung eines Testsystems für HSV1-Transport entlang von MT	52
5.3.1	Präparation von Cy3-Mikrotubuli	53
5.3.2	Stationäre und photostabile fluoreszierende Mikrotubuli.....	53
5.3.3	Cytosol	58
5.3.4	Kapsid-Präparation und Charakterisierung	61
5.3.4.1	Sedimentationsverhalten der nukleären Kapside	61
5.3.4.2	Elektronenmikroskopie	62
5.3.4.3	Nukleäre und virale Kapside unterschiedlicher Proteinzusammensetzung	65
5.3.4.4	Fluoreszenz der HSV1-GFPVP26-Kapside	73
5.3.5	Zeitverlaufs-Fluoreszenzmikroskopie des <i>in vitro</i> Testsystems	75
5.4	Anwendung der <i>in vitro</i> Testsysteme.....	87
5.4.1	Dynactin-abhängiger Kapsidtransport.....	87
5.4.2	<i>In vitro</i> Bindungs-Testsysteme	88
5.4.3	<i>In vitro</i> Transport unterschiedlicher Kapside	92
6	Diskussion.....	94
6.1	Ein <i>in vitro</i> Testsystem für HSV1-Transport entlang von MT	95
6.1.1	Herstellung immobilisierter MT	95
6.1.2	Cytosolische Transportfaktoren.....	96
6.1.3	Herstellung unterschiedlicher Kapside	97
6.1.4	Charakterisierung des Kapsidtransportes <i>in vitro</i>	98
6.2	Anwendung des <i>in vitro</i> Testsystems	99
6.2.1	Dynactin-Abhängigkeit des Kapsidtransportes <i>in vitro</i>	99
6.2.2	<i>In vitro</i> Bindungsexperimente	99
6.2.3	Das innere Tegument vermittelt den Kapsidtransport <i>in vitro</i>	101

6.2.4	HSV1-Transport in lebenden Zellen	105
6.3	Ausblick.....	106
7	Literatur	108
8	Anhang	118
8.1	Filme	118
8.2	Ergänzende Tabellen.....	126
8.3	Programme	127
8.4	Lebenslauf	130
8.5	Wissenschaftliche Beiträge.....	130

1 Abkürzungen

A. bidest.	<i>Aqua bidestillata</i>
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈
ATCC	American Type Culture Collection
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
AP	Alkalische Phosphatase
BHK	<i>Baby Hamster Kidney</i> , Baby-Hamster-Nierenzellen
BCA	<i>Bicinchonic acid</i> , Bicinchonsäure
BCIP	5-Bromo-4-chloro-indolyl-3-phosphat
BP	Bandpassfilter
BSA	Bovines Serumalbumin
BRB80/100	<i>Brinkley reassembly buffer</i> mit 80 /100 mM PIPES
CCD	<i>charge coupled device</i>
Cy3	Indocarbocyanin 3,5,5'-disulfo-1,1'-di(γ-carbopentynyl)-3,3,3',3'-tetramethylinolocarboxyanin oder Cyanin 3.18
DEAE-Dextran	Diethylaminoethyl-Dextran
DABCO	1,4-Diazobicyclo[2,2,2]octan
DIC	<i>Dynein Intermediate Chain</i> , Dynein intermediäre Kette
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4 Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
EGTA	Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N,'N'-tetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskopie
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> , Fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Erdbeschleunigung
gX	Glykoprotein X
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> , grün-fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
HRP	<i>Horse-radish peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
HSV1/2	Herpes-Simplex-Virus Typ 1/2
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LP	Langpassfilter
LRSC	Lissamin-Rhodamin-Sulfonylchlorid
M	Molar (mol/l)
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
MEM	Minimum-Essential-Medium
mM	Millimolar (mmol/l)
MOI	<i>multiplicity of infection</i> , Anzahl der infektiösen Partikel
MT	Mikrotubuli
MTOC	Mikrotubuli-organisierendes Zentrum
NBT	Nitroblue-Tetrazolium-Salz
OSS	<i>oxygen scavenging system</i> , Sauerstofffänger-System
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung

PFA	Paraformaldehyd
PFU	<i>plaque forming units</i> , Plaque-bildende Einheiten
pH	Potentia Hydrogenii, $\text{pH} = -\lg[\text{H}_3\text{O}^+]$
PI	Proteaseinhibitoren
p.i.	<i>post infection</i> , nach der Infektion
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)
Ponceau S	3-Hydroxy-4-(2-sulfo-4-[sulfophenylazol]-phenyl-azo)- 2,7-naphthalendisulfonsäure
PrV	Pseudorabiesvirus
UpM	Umdrehungen pro Minute
Rh	Rhodamin
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SP	<i>short pass filter</i> , Kurzpassfilter
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TAME	N α -p-Tosyl-L-argininmethylester
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSM	Tris/Natriumchlorid/Magnesiumchlorid
UL	<i>Unique Long</i>
US	<i>Unique Short</i>
UV	Ultraviolett
Vgl. Kap.	vergleiche Kapitel
VP	Virales Protein
v/v	<i>volume/volume</i> , Volumen/Volumen
wt	Wildtyp
w/v	<i>weight/volume</i> , Gewicht/Volumen
w/w	<i>weight/weight</i> , Gewicht/Gewicht
YFP	<i>Yellow Fluorescent Protein</i> , gelb-fluoreszierendes Protein

2 Zusammenfassung

Nach der Fusion der Virusmembran des neurotrophen Herpes-Simplex-Virus Typ 1 (HSV1) mit einer zellulären Membran werden das Kapsid sowie assoziierte Tegumentproteine entlang von Mikrotubuli (MT) zu den Kernporen transportiert, wo das virale Genom in den Zellkern injiziert wird. Dort finden Transkription, virale Replikation und Kapsid-Zusammenbau statt. Nach Verlassen des Kerns werden neu synthetisierte cytosolische Kapside zu zellulären Organellen transportiert und erhalten dort ihre Virusmembran, oder sie werden für die weitere Virusausbreitung zu den Axonenden transportiert. Der Langstreckentransport der Viruspartikel erfolgt sowohl während des Zelleintritts als auch bei der Virusausschleusung durch MT-abhängige molekulare Motorkomplexe, wie cytoplasmatische Dyneine oder Kinesine.

In dieser Arbeit wurde erstmals der Zelleintritt von *Green Fluorescent Protein* (GFP)-markierten HSV1-Partikeln in lebenden Zellen mit digitaler Zeitverlaufs-Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Die Viruspartikel bewegten sich dabei sowohl zum Zellzentrum in Richtung Zellkern als auch zur Zellperipherie.

Um den Kapsidtransport in Abwesenheit von zellulären Membranen biochemisch untersuchen zu können, wurde dieser mit GFP-markierten Kapsiden, Cy3-markierten Mikrotubuli und Cytosol *in vitro* rekonstruiert. Die Cy3-MT wurden stabil an die Glasoberfläche einer mikroskopischen Beobachtungskammer angeheftet. Als Quelle für Motor-Komplexe wurde Cytosol aus Eiern von *Xenopus laevis* gewonnen. Bis zu 32% der Kapside in der Fokusebene wurden ATP-abhängig *in vitro* transportiert. Sie bewegten sich auf linearen oder gekrümmten Bahnen entlang von MT und legten bis zu 30 μm mit einer Durchschnittsgeschwindigkeit von 0,1 $\mu\text{m/s}$ zurück. Dieser *in vitro* Kapsidtransport wurde nur in Anwesenheit von Cytosol beobachtet, aber eine sehr hohe Proteinkonzentration reduzierte die mittleren Bahnlängen der transportierten Kapside. Die Zugabe von Dynamitin, die zu einer Dissoziation des Dynactin-Komplexes, eines Kofaktors von Dynein und Kinesin-2, führt, reduzierte den *in vitro* Kapsidtransport. Wenn die äußeren, aber nicht die inneren Tegumentproteine der Kapside durch eine Salzextraktion entfernt worden waren, zeigten die Kapside eine höhere Motilität und eine bessere Bindung an Dynein und Dynactin als ohne Salzextraktion. Im Gegensatz dazu waren nukleäre Kapside, die weder innere noch äußere Tegumentproteine enthielten, nicht in der Lage Dynein oder Dynactin zu binden und mit MT zu interagieren.

Diese Daten führten zu der Hypothese, dass die innere Tegumentschicht von Herpes-Simplex-Virus Typ 1 virale Rezeptoren für MT-Motoren enthält.

Schlagerworte: Herpes-Simplex-Virus, Mikrotubuli-vermittelter Transport *in vitro*, cytoplasmatisches Dynein

Abstract

After fusion of the envelope of the neurotropic Herpes simplex virus Typ 1 (HSV1) with a cellular membrane, capsids and associated tegument proteins are transported along microtubules (MT) to the nuclear pores, where the viral genome is injected into the nucleus, in which transcription, viral replication and capsid assembly take place. After egress from the nucleus, newly synthesized cytosolic capsids are transported to host membranes for secondary envelopment or to the axon terminal for further viral spread. Long distance transport of viral particles is catalyzed during entry and egress by MT-dependent molecular motor complexes like cytoplasmic dyneins or kinesins.

In this thesis the entry of green fluorescent protein (GFP)-tagged HSV1-particles was observed for the first time in living cells with digital time-lapse microscopy. The viral particles moved in both directions towards the cell center as well as to the periphery.

In order to analyze capsid transport in the absence of cellular membranes, it was reconstituted *in vitro* with GFP-tagged capsids, Cy3-marked MT and cytosol. The Cy3-MT were firmly attached. The cytosol that supplied MT-motor complexes was extracted from *Xenopus laevis* eggs. Up to 32% of the capsids present in the focal plane were transported if ATP was provided. They moved over distances of up to 30 μm along linear or curvilinear tracks with a mean velocity of 0.1 $\mu\text{m/s}$. Capsid transport was only observed in the presence of cytosol but very high protein concentrations reduced the mean track length of the transported capsids.

The addition of dynamitin, which leads to dissociation of the dynactin complex, a cofactor of dynein and kinesin-2, reduced capsid transport along MT. Removing the outer, but not the inner tegument proteins from capsids by salt extraction increased *in vitro* motility and improved binding of dynein and dynactin. In contrast, nuclear capsids that were devoid of inner as well as outer tegument proteins were not able to bind dynein or its cofactor dynactin and to interact with MT.

These data suggested that the inner tegument of herpes simplex virus typ 1 contains viral receptors for MT motors.

Key words: herpes simplex virus, *in vitro* microtubuli transport, cytoplasmic dynein

3 Einleitung

3.1 Der Mikrotubuli-vermittelte Transport von Viren

Viren oder Virusbestandteile durchqueren nach ihrem Eintritt in die Zelle das Cytoplasma, um die Orte ihrer Replikation zu erreichen. Insbesondere neurotrope Viren, wie z.B. Herpes-Simplex-Virus Typ 1 (HSV1), müssen, um von der synaptischen Eintrittsstelle über das Axon zum Nukleus zu gelangen, mehrere Zentimeter an Wegstrecke überwinden. Solch eine Ortsveränderung lässt sich in einem biologisch sinnvollen Zeitrahmen nicht durch Diffusion bewerkstelligen. HSV1-Kapside mit einem Durchmesser von 125 nm würden durch Diffusion in wässriger Lösung in 169 Tagen nur um 1 cm transportiert werden (Sodeik, 2000). Im Cytoplasma mit einem aufgrund sterischer Behinderungen und hoher Proteinkonzentration 500fach kleineren Diffusionskoeffizienten (Luby-Phelps, 2000) bräuchten sie hierfür 231 Jahre (Sodeik, 2000). Diese Strecke wird aber von HSV1 in Neuronen innerhalb von 2 bis 3 Stunden zurückgelegt (Lycke et al., 1984). Selbst das kleine Poliovirus mit einem Kapsid-Durchmesser von 33 nm bräuchte für eine eindimensionale Diffusion von 1 cm im Cytosol immer noch 61 Jahre (Sodeik, 2000), während diese Strecke in Neuronen tatsächlich in 1,5 Stunden zurückgelegt wird (Ohka et al., 1998). Solch eine gegenüber der Diffusion eines Partikels im Cytoplasma beschleunigte Bewegung lässt sich nur durch einen aktiven, gerichteten Transport erklären.

Zellen verwenden für ihre intrazellulären Langsteckentransporte molekulare Motoren und Mikrotubuli (MT). Diese Transportmaschinerie nutzen viele Viren für ihren zellabhängigen Replikationszyklus aus. Dabei werden sie entweder in zellulären Vesikeln transportiert, oder sie interagieren direkt mit MT-abhängigen Motoren (Sodeik, 2000). Herpesviren z.B. werden über lange Strecken in Dendriten und Axonen aktiv zum weit entfernten Zellkern transportiert, wo sie ihr Genom entpacken und in den Zellkern injizieren (Enquist et al., 1998).

Für viele Viren wurde eine Wechselwirkung mit dem Cytoskelett gezeigt (Übersichten in Döhner et al., 2005; Döhner & Sodeik, 2004; Ploubidou & Way, 2001; Radtke et al., 2006; Smith & Enquist, 2002; Smith et al., 2003). Vacciniaviren interagieren z. B. während des intrazellulären Transportes mit MT und beim Übergang in die Nachbarzelle mit Aktin-Filamenten (Smith et al., 2003). Ferner sind die Virusausbeuten infizierter Zellen reduziert, wenn die MT depolymerisiert sind (Döhner & Sodeik, 2004).

3.2 Mikrotubuli

Mikrotubuli (MT) sind hohle, zylindrische Proteinfilamente mit einem Durchmesser von etwa 25 nm, an die MT-assoziierte Proteine (MAPs) gebunden sind. Sie bilden zusammen mit F-Aktin und den Intermediärfilamenten das Cytoskelett (Carraway & Carraway, 1989;

Jefferson et al., 2004; Kodama et al., 2004; Rodriguez et al., 2003). MT polymerisieren aus heterodimeren α -/ β -Tubulin in Anwesenheit von GTP. Die Tubulinuntereinheiten bilden in Zellen einen Hohlzylinder aus 13 Protofilamenten und sind in einer „Kopf-zu-Schwanz“ Orientierung angeordnet, wodurch die MT eine intrinsische Polarität erhalten. Die beiden Enden der MT zeigen eine unterschiedliche Kinetik der Bindung und Dissoziation von Tubulinuntereinheiten (Desai & Mitchison, 1997; Nogales, 2000). In unpolarisierten Zellen ist das so genannte Minus-Ende in der Nachbarschaft des Kerns lokalisiert und mit dem Mikrotubuli-organisierenden Zentrum (MTOC) verbunden. Das schneller wachsende Plus-Ende befindet sich hingegen in der Peripherie der Zelle. In den meisten Axonen und distalen Abschnitten der Dendriten von Neuronen sind die MT einheitlich mit dem Plus-Ende zur Synapse und mit dem Minus-Ende zum Zellkörper hin orientiert. Im proximalen Teil der Dendriten gibt es keine einheitliche Orientierung der MT (Baas et al., 1988; Heidemann et al., 1981).

3.3 Mikrotubuli-Motoren

Die ATP-hydrolysierenden Motoren, die sich entlang der MT bewegen, sind die Dyneine und Kinesine. Jeder Motor kann jeweils nur in eine Richtung der polaren MT laufen (Vale, 2003).

3.3.1 Cytoplasmatisches Dynein und Dynactin

Cytoplasmatisches Dynein ist ein Proteinkomplex von 20 S mit einer geschätzten Molmasse von 1,2 MDa, der in vielen Fällen zusammen mit dem Kofaktor Dynactin – einem weiteren Multi-Protein-Komplex - mechanochemische Bewegung zum Minus-Ende der MT katalysiert (Schroer, 2004; Vale, 2003; Vallee et al., 2004). Es vermittelt sowohl den Transport von Membranvesikeln als auch von Partikeln ohne Membran, wie z. B. NuMA, einem Kernprotein, welches bei der Mitose an die Spindelpole transportiert wird (Merdes et al., 2000), Aggresomen (Garcia-Mata et al., 1999), viralen Kapsiden (Döhner et al., 2002; Leopold et al., 2000 ; McDonald et al., 2002; Suikkanen et al., 2003; Suomalainen et al., 1999), Neurofilamenten (Shah et al., 2000; Wagner et al., 2004) und Pericentrin (Young et al., 2000).

Cytoplasmatisches Dynein besteht aus zwei schweren Proteinketten (DHC, *Dynein Heavy Chain*) mit 530 kDa, zwei intermediären Ketten (DIC, *Dynein Intermediate Chain*) mit 70 bis 80 kDa, zwei leichten intermediären Ketten (DLIC, *Dynein Light Intermediate Chain*) mit 50 bis 60 kDa und drei Familien von leichten Ketten (DLC, *Dynein Light Chain*) mit 7 bis 14 kDa Größe (Abb. 3.1; Vallee et al., 2004). Die DHCs gehören zu den ATPasen der AAA-Superfamilie (*ATPases Associated with a wide range of cellular Activities*), die mit verschiedenen zellulären Aktivitäten assoziiert sind (Sakato & King, 2004). Die DHCs binden

an MT und erzeugen mechanische Kraft durch ATP-Hydrolyse. Die DHC besteht aus sechs AAA-Modulen, die zusammen mit einer C-terminalen Domäne einen Torus bilden, wobei nur das N-terminale AAA-Modul [1] ATP zu ADP hydrolysiert. Mindestens eine weitere Domäne ([3] oder [4]) ist in der Lage, möglicherweise zur Regulation der Motoraktivität, Nukleotide zu binden (Oiwa & Sakakibara, 2005). Die MT-bindende Domäne ist zwischen Modulen [4] und [5] lokalisiert (Gee et al., 1997; King, 2000; King, 2003; Vale, 2000; Abb. 3.1).

Die DICs gehören zu der Proteinfamilie mit WD-Wiederholungsequenzen und sind am basalen Stamm des Dyneins lokalisiert (Steffen et al., 1996). Die DLICs, DICs und DLCs spielen eine Rolle in der Motorregulation und Cargobindung. Die Untereinheiten unterscheiden sich dabei in ihrer subzellulären Lokalisation und Gewebeexpression. Die DLCs lassen sich entsprechend ihrer Sequenzhomologie in die Familien LC7/Roadblock, LC8/PIN und Tctex/rp3 unterteilen. Es ist denkbar, dass cytoplasmatische Dyneine in verschiedenen Isoformen mit einer jeweils individuellen Zusammensetzung der Untereinheiten vorliegen, sodass unterschiedliche Frachten gebunden werden können (King et al., 2002; Susalka et al., 2000; Tai et al., 2001; Tynan et al., 2000).

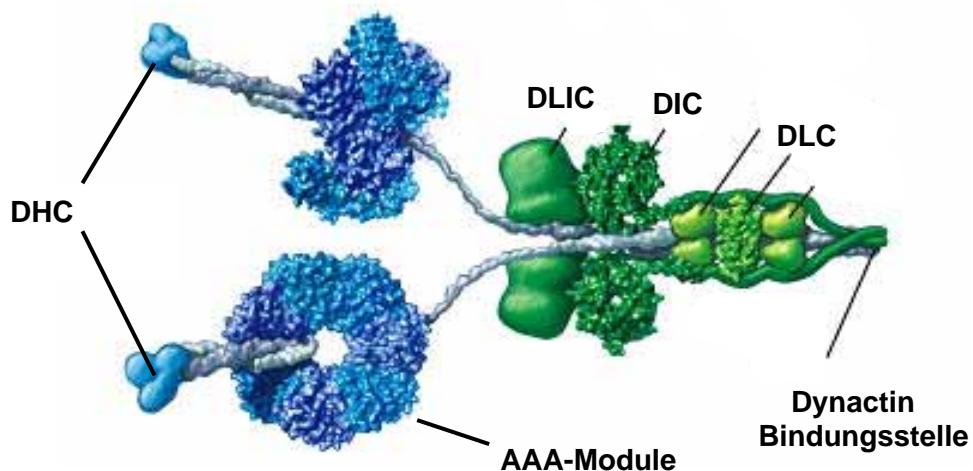


Abb. 3.1: Aufbau des Cytoplasmatischen Dyneins. Cytoplasmatisches Dynein besteht aus zwei schweren Ketten (DHC), zwei intermediären Ketten (DIC), zwei leichten intermediären Ketten (DLIC) und mehreren leichten Ketten (DLC). Die intermediären Ketten haben eine Dynactin-Bindungsstelle. Abbildung aus Vale (2003)

Der Dynein-Kofaktor Dynactin hat selbst keine bekannte enzymatische Aktivität, erleichtert aber die Bindung von Dynein an zelluläre Membranen und erhöht die Prozessivität, also die zurückgelegte Wegstrecke von Dynein (King & Schroer, 2000; Roghi & Allan, 1999; Schroer, 2004). Dynactin ist ebenfalls ein Proteinkomplex von 20 S mit einer geschätzten Molmasse von 1,2 MDa, der aus 11 Untereinheiten besteht. Davon sind 8 – 9 Moleküle Arp1, ein Aktin-ähnliches Protein (*Actin-related Protein*) mit einer Molmasse von 45 kDa, die ein 37 nm langes F-Aktin-artiges Filament bilden (Schafer et al., 1994). Dieses

bindet an zwei p150/p135^{Glued} Untereinheiten, deren α -Helices einen 24 nm langen *coiled-coil* Seitenarm bilden. An diesen Seitenarm bindet die DIC des cytoplasmatischen Dyneins (Karki & Holzbaur, 1995; Vaughan & Vallee, 1995). Der Seitenarm endet in den N-Termini, die zwei globuläre MT-bindende Domänen ausbilden (Waterman-Storer et al., 1995). Das p24/p22-Dimer bindet an Dynamitin (p50) und ist wahrscheinlich auch mit dem C-terminalen Teil von p150/p135^{Glued} assoziiert (Eckley et al., 1999; Karki et al., 1998). An der Bindungsstelle zwischen dem Seitenarm und/oder dem Arp1-Rückgrat ist das 50 kDa große Dynamitin (p50) in vier Kopien lokalisiert. Sein Überschuss führt zur Dissoziation des p150^{Glued} vom Arp1-Filament (Burkhardt et al., 1997; Echeverri et al., 1996; Eckley et al., 1999; Wittmann & Hyman, 1999). Das Plus-Ende des Arp1-Filaments ist mit dem *Actin-capping* Protein CapZ verbunden. Am gegenüberliegenden Ende bildet Arp11, ein anderes *Actin-related Protein*, zusammen mit p62, p25 und p27 den heterotetrameren Minus-End-Komplex. Ferner ist es möglich, dass im oder am Arp1-Filament auch ein Molekül konventionelles monomeres Aktin mit unbekannter Lokalisation und Funktion gebunden ist (Schafer et al., 1994; Schroer, 2004; Abb. 3.2).

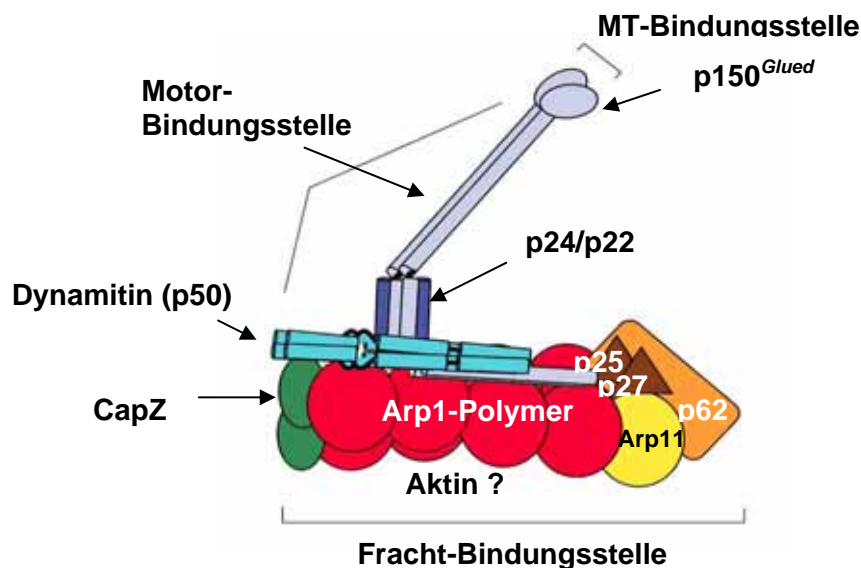


Abb. 3.2: Die Untereinheiten des Dynactins. Dynactin besteht aus Arp1 (*actin-related protein*), Arp11, CapZ (Aktin-bindendes Protein), p62, p25, p27, p150^{Glued}, Dynamitin (p50) und dem p24/p22 Dimer. Abbildung aus Schroer, 2004.

Die Bindung des Dynactin Komplexes an die Fracht wird vermutlich über das Arp1 Filament vermittelt (Holleran et al., 2001). Der flexible Seitenarm lässt hier mehrere Orientierungen zu. Eine stabile Bindung des p150^{Glued} an den MT würde die Bewegung des Dyneins vermutlich behindern. Daher ist eine dynamische Interaktion mit den MT zu erwarten. Die Bindung von p150^{Glued} an MT könnte durch Phosphorylierung reguliert werden (Vaughan et al., 2002).

3.3.2 Kinesine

Kinesine sind Motoren mit einer 320 Aminosäuren großen MT-bindenden Motordomäne, welche eine den Myosinen und G-Proteinen ähnliche dreidimensionale Faltung aufweist. Diese Domäne ist mit strukturellen und regulatorischen Domänen verbunden, die an Kofaktoren und Adapterproteine binden (Hirokawa & Takemura, 2005).

Die Kinesine werden entsprechend der Position der Motordomäne in drei Gruppen und entsprechend ihrer Homologien in 14 Klassen eingeteilt (Lawrence et al., 2004). N-Typ bzw. C-Typ Kinesine haben ihre Motordomäne am N- bzw. C-Terminus und M-Typ Kinesine in der Mitte der schweren Kette. N-Typ Kinesine bewegen sich zum Plus-Ende der MT. Kinesin-1 ist ein Heterodimer aus zwei schweren Ketten (KHC, *Kinesin Heavy Chain*), wobei jede eine Motordomäne enthält. Die Ketten sind über eine α -helikale Stiel-domäne dimerisiert und über eine Schwanzdomäne mit zwei leichten Ketten verbunden (KLC, *Kinesin Light Chain*). Die KLC oder die Schwanzdomäne koppelt dabei das Kinesin über einen Rezeptor an die Fracht (Abb. 3.3; Hirokawa & Takemura, 2005).

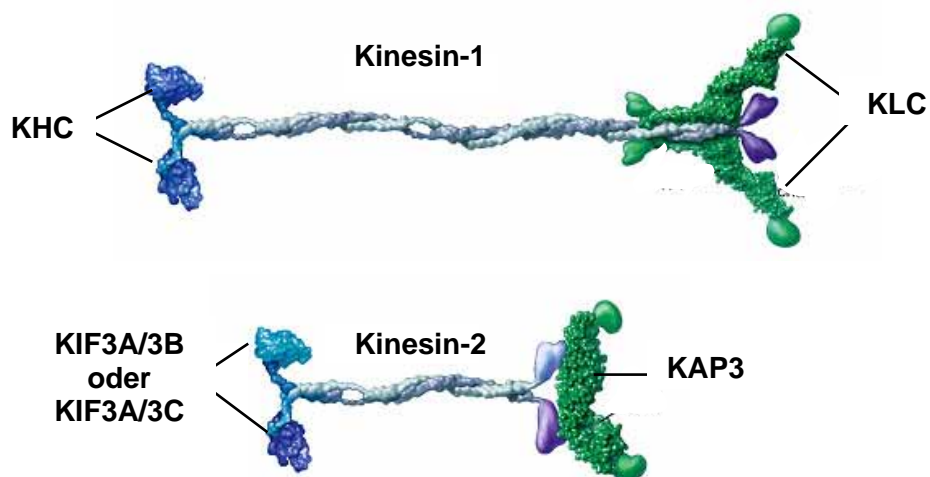


Abb. 3.3: Aufbau von Kinesin-1 und Kinesin-2. Kinesin-1 wird aus zwei schweren (KHC, blau) und zwei leichten Ketten (KLC, grün) gebildet. Kinesin-2 besteht aus zwei unterschiedlichen schweren Ketten; entweder KIF3A/3B oder KIF3A/3C (blau), die mit KAP3 (grün) ein Heterotrimer bilden. Die Fracht-Bindungsstellen der schweren Ketten sind in violett dargestellt. Abbildung aus Vale, 2003.

Kinesin-1 transportiert z.B. axonale Vesikel, Mitochondrien, Lysosomen, endocytotische Vesikel, Tubulinoligomere, Intermediärfilamentproteine oder mRNA-Komplexe (Hirokawa & Takemura, 2005). Die Frachtgüter für die N-Typ Kinesine KIF1A und KIF1B, die der Kinesin-3 Familie zugeordnet werden, sind synaptische Vesikel und Mitochondrien. Kinesin-2 wird aus den unterschiedlichen schweren Ketten KIF3A/3B oder KIF3A/3C gebildet, die zusammen mit dem KAP3 (KAP3, *kinesin-associated protein*) ein Heterotrimer bilden (Abb. 3.3; Cole et al., 1992; Cole et al., 1993), wobei XKAP3 aus *Xenopus laevis* eine Rolle bei der Dynactin-Bindung spielt. Durch die Zerstörung des

Dynactin-Komplexes kann auch der Kinesin-2-vermittelte Transport von Melanosomen in *Xenopus* Melanophoren gehemmt werden (Deacon et al., 2003).

Kinesine des Typs C bewegen sich zum MT-Minus-Ende. Die meisten C-Typ Kinesine sind während der Mitose aktiv, aber einige sind auch am Membrantransport beteiligt (Bananis et al., 2003; Noda et al., 2001; Xu et al., 2002). M-Typ Kinesine fungieren wahrscheinlich nicht als Motoren, sondern destabilisieren die MT bzw. regulieren die MT Dynamik während des Zellzykluses (Ovechkina & Wordeman, 2003).

3.4 Das humane Herpes-Simplex-Virus Typ 1

Das Herpes-Simplex-Virus Typ 1 (HSV1) bzw. humane Herpesvirus 1 (HHV1) ist ein neurotropes Virus, welches wie das humane Herpes-Simplex-Virus Typ 2 (HSV2) und das Varizella-Zoster-Virus (VZV bzw. HHV3) zur Unterfamilie der α -Herpesvirinae innerhalb der Familie der Herpesviridae gehört (Cleator & Klapper, 2004; Roizman & Pellet, 2001). Nahe verwandte tierpathogene Herpesviren sind das bovine (BHV-1), das equine (EHV-1) und das porcine Herpesvirus, welches auch als Pseudorabies-Virus (PrV) bezeichnet wird und bei Schweinen zu der Aujeszky'schen Krankheit führt (Mettenleiter, 2000).

α -Herpesvirinae zeichnen sich durch einen relativ kurzen Reproduktionszyklus, der zu einer Zelllyse führt, und eine schnelle Ausbreitung in kultivierten Zellen aus. HSV1 infiziert die Keratinocyten und Epithelzellen der oralen und perioralen Haut und Schleimhaut (Jerome & Ashley, 2003; Whitley et al., 1998). Das vermehrte Virus tritt dann in die Nervenenden sensorischer und autonomer Nervenzellen ein.

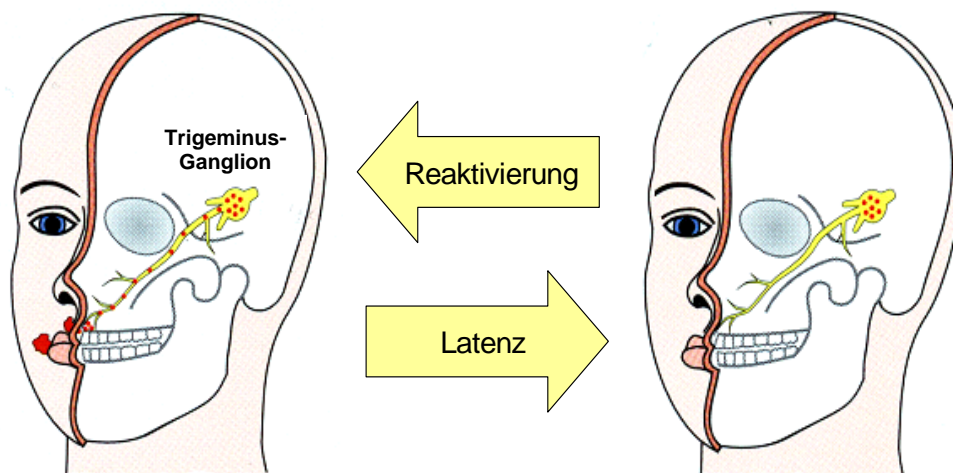


Abb. 3.4: Infektionszyklus von Herpes-Simplex-Virus Typ 1. Epithelzellen der Mundhöhle und der umgebenen Haut können nach intimen Kontakt mit einer HSV1 sezernierenden Person infiziert werden. Nach Replikation und Amplifikation gelangen die Viren in die sensorischen Neuronen, welche die betroffenen Regionen innervieren. Dort werden sie retrograd zu den Zellkernen der *Cranial-Ganglien* transportiert. Während der Latenz können nur virale Genome, aber keine viralen Partikel detektiert werden. Durch psychischen oder physischen Stress, Immunsuppression oder UV-Licht können die latenten Genome reaktiviert werden. Die neu gebildeten Viruspartikel werden anterograd zum Ort der Primärinfektion transportiert, wo es zu einem lytischen Vermehrungszyklus kommt. Hier können juckende und brennende Lippenbläschen entstehen, die als *Herpes labialis* bezeichnet werden und im Allgemeinen einen gutartigen Verlauf nehmen. Abbildung aus *Immunobiology – The Immune System in Health and Disease* by C. A. Janeway & P. Travers, Garland Publishing Inc. 2003.

Die vermutlich unbehüllten Kapside des Virus wandern zu den Zellkörpern, die in den Kopf-Ganglien des peripheren Nervenzentrums lokalisiert sind (Abb. 3.4; Enquist et al., 1998; Lycke et al., 1984; Tomishima et al., 2001; Vrabec & Alford, 2004). Das Genom wird über die Kernporen in das Nukleoplasma injiziert (Batterson et al., 1983; Ojala et al., 2000), wo es im Wirt eine lebenslange, latente Infektion hervorruft (Steiner, 1996). Unter Einfluss von psychischem oder physischem Stress, wie z.B. UV-Strahlung oder Fieber, werden Virusproteine synthetisiert und neue Kapside im Kern zusammengebaut. Diese werden dann unbehüllt oder möglicherweise auch in Form von in Transportvesikeln verpackten Virionen zurück zu den synaptischen Nervenendigungen der oralen und perioralen Haut transportiert (Abb. 3.4; Jerome & Ashley, 2003). Die austretenden reifen Viren infizieren die benachbarten Epithelzellen und rufen so den typischen juckenden und brennenden Bläschenausschlag hervor. In seltenen Fällen verursacht HSV1 nach Transport in das Gehirn eine lebensbedrohliche Enzephalitis (Jerome & Ashley, 2003).

3.4.1 Struktur des Herpes-Simpex-Virus Typ 1

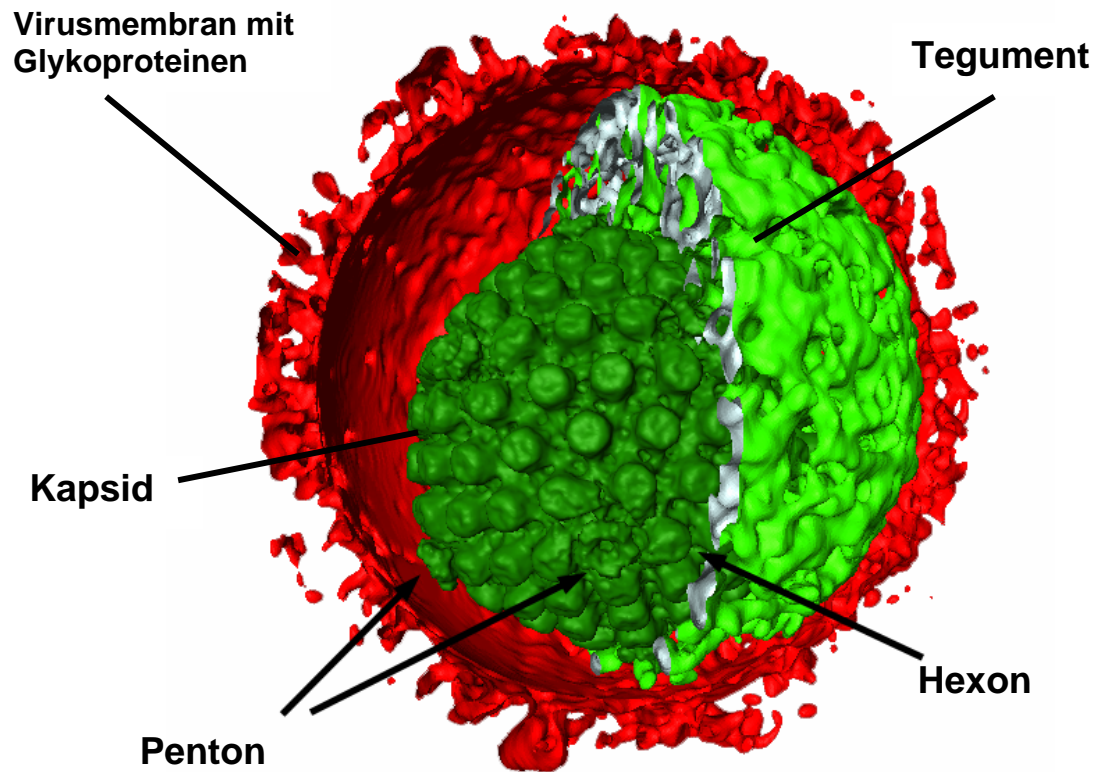


Abb. 3.5: Kryo-EM-Tomogramm von HSV1. 3D-Abbildung eines HSV1-Virions. Das Hauptkapsid-Protein VP5 bildet aus 150 Hexonen und 11 Pentonen einen Icosaeder (125 nm Durchmesser) (dunkelgrün), der von einer asymmetrisch verteilten Tegumentschicht (hellgrün) umgeben ist. Die zwölfte Ecke des Icosaeders wird vermutlich durch einen Komplex aus UL6 und UL25 gebildet. Eine Membran (rot) mit viralen Glykoproteinen bildet die äußere Hülle des infektiösen Partikels (etwa 225 nm Durchmesser). Die Abbildung wurde freundlicherweise von Dr. Kay Grünewald (MPI für Biochemie, Martinsried) zur Verfügung gestellt (Grünewald et al., 2003).

Ein HSV1-Virion ist aus einem ikosaedrischen Kapsid, das mit einer 152 kbp großen, linearen, doppelsträngigen DNA gefüllt ist, einer Membranhülle und einer zwischen dem Kapsid und der Hülle lokalisierten Proteinschicht, dem sogenannten Tegument, aufgebaut (Abb. 3.5). Die DNA kodiert für etwa 80 offene Leserahmen, von denen ca. die Hälfte für strukturelle Proteine kodiert (Roizman & Knipe, 2001). Die strukturellen Proteine werden entweder nach dem Gen, das auf dem langen Abschnitt (*unique long*, UL1, UL2 etc.) oder dem kurzen Abschnitt (*unique short*, US1, US2 etc.) der codierenden Region lokalisiert ist, benannt. Ferner werden sie auch in aufsteigender Reihenfolge nach dem apparenten Molekulargewicht (VP1, VP2 etc.) oder nach ihrer Funktion (z.B. *vhs* – *virus host shut off protein*, UL41) gekennzeichnet.

Das Kapsid mit einem Durchmesser von etwa 125 nm besteht unter anderem aus dem Hauptkapsidprotein VP5. VP5 bildet als Pentamere, die als Pentone bezeichnet werden, die Ecken und in Form von 150 Hexameren, die Hexone genannt werden, die Kanten und Flächen des Icosaeders (Abb. 3.5; Steven & Spear, 1997). An der Innenseite des Kapsids ist

VP5 mit den strukturellen Proteinen VP19c und VP23 assoziiert, die einen heterotrimeren Komplex bilden (Zhou et al., 1999). Auf der Außenseite bindet das kleine, basische 12 kDa-Kapsidprotein VP26 in Form von Hexameren an die VP5 Hexone aber nicht an die VP5-Pentone (Booy et al., 1994; Trus et al., 1995; Wingfield et al., 1997; Zhou et al., 1995). Obwohl VP26 für die Virusreplikation nicht essentiell ist, ist die Vermehrung einer Mutante ohne VP26 in Neuronen und Zellkulturzellen reduziert (Desai et al., 1998).

Eine der 12 Ecken des Ikosaeders enthält vermutlich anstelle eines VP5-Pentons ein Dodekamer aus UL6, das wahrscheinlich beim Kapsidzusammenbau als Pore zum Verpacken der Virus-DNA dient (Newcomb et al., 2001; Trus et al., 2004). UL25 verschließt vermutlich dieses Portal, so dass die DNA nicht wieder austreten kann (Ogasawara et al., 2001; Sheaffer et al., 2001). Zwischen der viralen Membran und dem Kapsid befindet sich das einschließlich der Kapsid-assoziierten Proteine aus etwa 20 Proteinen bestehende, weitgehend amorphe Tegument. Ein kleiner Teil der inneren Tegumentschicht zeigt um die Pentone herum eine filamentöse Struktur (Zhou et al., 1999). Die kryoelektronenmikroskopische Tomographie individueller Virionen enthüllt eine asymmetrische Verteilung des Teguments und eine dezentrale Lokalisation des Kapsids (Grünwald et al., 2003; Zhou et al., 1999). Die Interaktion zwischen Kapsid und Tegument scheint sich dabei auf die Pentone und die benachbarten Hexone zu beschränken. Der Durchmesser der Virushülle ohne Protein variiert zwischen 170 und 200 nm und beträgt im Mittel 186 nm, wobei der Gesamtdurchmesser mit den Membranproteinen der Hülle im Mittel bei 225 nm liegt (Abb. 3.5; Grünwald et al., 2003).

Der genaue molekulare Aufbau des Teguments von α -Herpesviren ist unbekannt. Einige Tegumentproteine assoziieren während der Virusbildung früher mit dem Kapsid als andere. Daher wird zwischen einer inneren und äußeren Tegumentschicht unterschieden (Abb. 3.7; Mettenleiter, 2004; Vittone et al., 2005; Wolfstein et al., 2006). Das Tegumentprotein VP1-3 (UL36) mit einem aus der DNA-Sequenz errechneten Molekulargewicht von 335,8 kDa (McGeoch et al., 1988) interagiert mit VP5 (McNabb & Courtney, 1992) und liegt in einer Kopienzahl von 110-150/Virion (Heine et al., 1974) im Tegument vor. Es hat eine mögliche Funktion bei der Freisetzung der viralen DNA an der Kernpore (Batterson & Roizman, 1983; Ojala et al., 2000). Die Tegument-Zusammensetzung beim Zelleintritt spielt eine wichtige Rolle zur Klärung der Frage, ob und welche Tegumentproteine mit dem für den Transport wichtigen Motorkomplex interagieren können. Ein Teil des Teguments verbleibt nach dem Eintritt in die Zelle an der Plasmamembran (Sodeik et al., 1997). Einige Tegumentproteine wie z.B. VP1-3 und UL25 bleiben aber während des Transports mit dem Kapsid assoziiert und sind deshalb mögliche Kandidaten für eine Interaktion mit Motorproteinen (Sodeik & Szmak persönliche Mitteilung, Rode et al., Manuskript in Vorbereitung; Granzow et al., 2005; Luxton et al., 2005).

Die HSV1-Hülle enthält etwa 12 Membranproteine, die die Bindung und den Eintritt in die Wirtszelle vermitteln. Desweiteren beeinflussen sie die Immunantwort des Wirtes und die Verbreitung des Virus von Zelle zu Zelle. Beim Zusammenbau neuer Viren regulieren sie die Rekrutierung von Tegumentproteinen und die Umhüllung der Kapside mit der vorläufigen oder entgültigen Virusmembran (Mettenleiter, 2002; Mettenleiter, 2003; Mettenleiter, 2004; Roizman & Knipe, 2001; Spear, 2004).

3.4.2 Infektionszyklus des Herpes-Simpex-Virus Typ 1

Der Zelleintritt von HSV1 beginnt mit der Bindung der Virushülle über die viralen Glykoproteine gB und gC an zelluläre Glykosaminoglykane der Plasmamembran. Das virale Glykoprotein gD bindet dann an den zellulären Rezeptor Nectin-1 (HveC, *herpesvirus entry receptor C*, Herpesvirus-Eintrittsrezeptor C; Nagafuchi, 2001), wodurch der Eintritt in die Zelle initiiert wird. Andere Rezeptoren für gD sind HveA und Heparan-Sulfat mit 3-O-Sulfatgruppen (Spear, 2004). Des weiteren gibt es ein an der Zelloberfläche lokalisiertes Membranprotein mit der Bezeichnung B5, das in verschiedenen menschlichen Gewebetypen exprimiert wird und eine neue Klasse für einen Rezeptor oder Korezeptor bei der HSV1-Infektion repräsentieren könnte (Perez et al., 2005; Perez-Romero & Fuller, 2005).

Die endgültige Fusion der Virushülle mit der Plasmamembran, oder in einigen Zelltypen mit einer endosomalen Membran (Nicola et al., 2003; Nicola & Straus, 2004; Nicola et al., 2005), wird über gB und den gH/gL-Komplex vermittelt. Das Kapsid wird dabei ins Cytosol freigesetzt (Roizman & Knipe, 2001; Sodeik et al., 1997; Spear, 2004). Nach Passage des Aktinkortex werden die Kapside entlang der Mikrotubuli zum MT-organisierenden Zentrum (MTOC) transportiert (Kristensson et al., 1986; Mabit et al., 2002; Sodeik et al., 1997; Topp et al., 1996). Von dort gelangen sie durch einen noch ungeklärten Mechanismus zu den Kernporen, interagieren mit ihnen über Importin β und injizieren ihre DNA für die virale Transkription und Replikation in das Nukleoplasma (Abb. 3.6; Batterson et al., 1983; Ojala et al., 2000). Das Tegumentprotein VP16 transaktiviert zusammen mit dem Transkriptionsfaktor Oct1 und dem zellulären Proliferationsfaktor HCF-1 des Wirtes die Expression der fünf sehr frühen (*immediate early*) HSV1-Gene (Wysocka & Herr, 2003). Die Genprodukte der sehr frühen Gene regulieren die Expression der frühen HSV1-Gene, die an der HSV1-DNA-Replikation beteiligt sind. Die meisten der mehr als 35 HSV1-Genprodukte mit einer späten Kinetik bilden die strukturellen Komponenten des Virions (Roizman & Knipe, 2001).

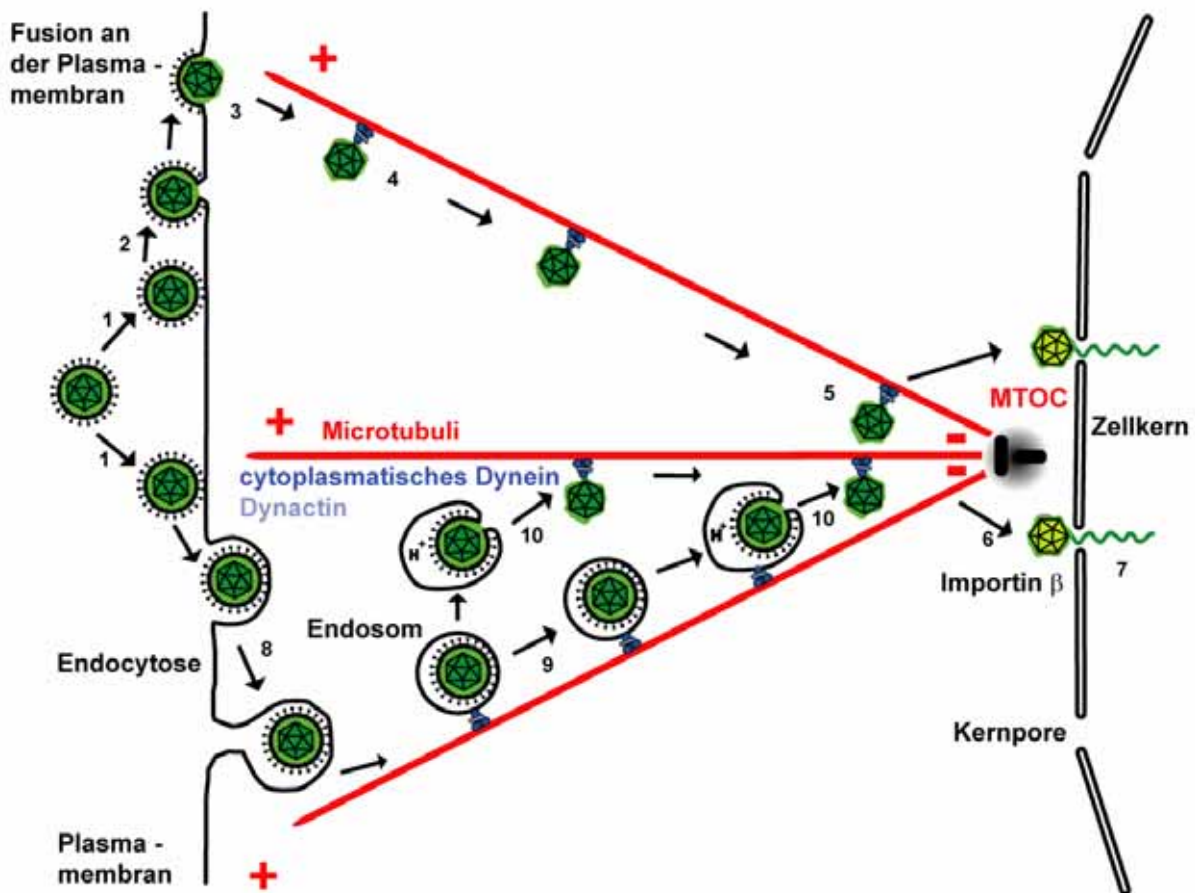


Abb. 3.6: Mikrotubuli-Transport beim HSV1-Zelleintritt. Das Herpes-Simplex-Virus Typ 1 (HSV1) bindet mit seinen Glykoproteinen an die Plasmamembran der Wirtszellen (1). Es tritt in viele Zellen durch Fusion der Virusmembran mit der Plasmamembran ein (2), wobei das Kapsid (dunkelgrün) und das Tegument (grün) in das Cytoplasma gelangen (3). Das Kapsid wird mit einigen Tegumentproteinen entlang der Mikrotubuli (MT, rot, 4) zum MT-organisierenden Zentrum (MTOC, 5) transportiert, das in vielen Zelltypen in der Nähe des Zellkerns liegt. Dieser Transport wird durch den zum Minus-Ende gerichteten MT-Motor cytoplasmatisches Dynein (dunkelblau) und seinen Kofaktor Dynactin (hellblau) katalysiert. Von dort gelangt das Kapsid zur Kernmembran (6). Importin β wird für die Kapsidbindung an der Kernpore benötigt. An der Kernpore wird das virale Genom in das Nukleoplasma entlassen (7), wo die virale Transkription und Replikation stattfinden. In einigen Zellen kommt es nach Eintritt durch Endocytose zur produktiven Infektion (8). Die Endosomen, die HSV1 enthalten, werden vermutlich auch entlang von MT transportiert (9). Die Freisetzung aus den Endosomen könnte schon in der Zellperipherie oder erst in der perinukleären Region stattfinden (10). Um eine Infektion auszulösen, injizieren die aus den Endosomen freigesetzten Kapside ebenfalls ihr Genom in das Nukleoplasma (7). Das Schema wurde freundlicherweise von K. Döhner & B. Sodeik (Institut für Virologie, MHH) zur Verfügung gestellt.

Die viralen Proteine werden im Cytoplasma synthetisiert und die Kapsidproteine in den Zellkern importiert. Dort entstehen über die Stufe des Prokapsids neue Kapside, die zunächst anstelle der DNA mit einem sogenannten Gerüstprotein, dem VP22a, gefüllt sind. Solche Kapside werden als B-Kapside bezeichnet. Die C-Kapside, die Bestandteile von infektiösen Virionen sind, entstehen durch Austausch von VP22a gegen DNA (Newcomb et al., 2001; Trus et al., 2004). Dabei dient vermutlich ein Portal, das von UL6 gebildet wird, als Portal für die DNA (Newcomb et al., 2001; Trus et al., 2004). Durch das Zusammenspiel

von UL6, UL15, UL17, UL25, UL28, UL32 und UL33 wird die virale DNA geschnitten, in Kapside verpackt und in diesen festgehalten (Baines et al., 1994; Koslowski et al., 1999; Lamberti & Weller, 1998; Newcomb et al., 2001; Reynolds et al., 2000; Salmon et al., 1998; White et al., 2003). Leere Kapside, die weder DNA noch VP22a enthalten, werden als A-Kapside bezeichnet. (Homa & Brown, 1997; Newcomb & Brown, 1991; Perdue et al., 1975).

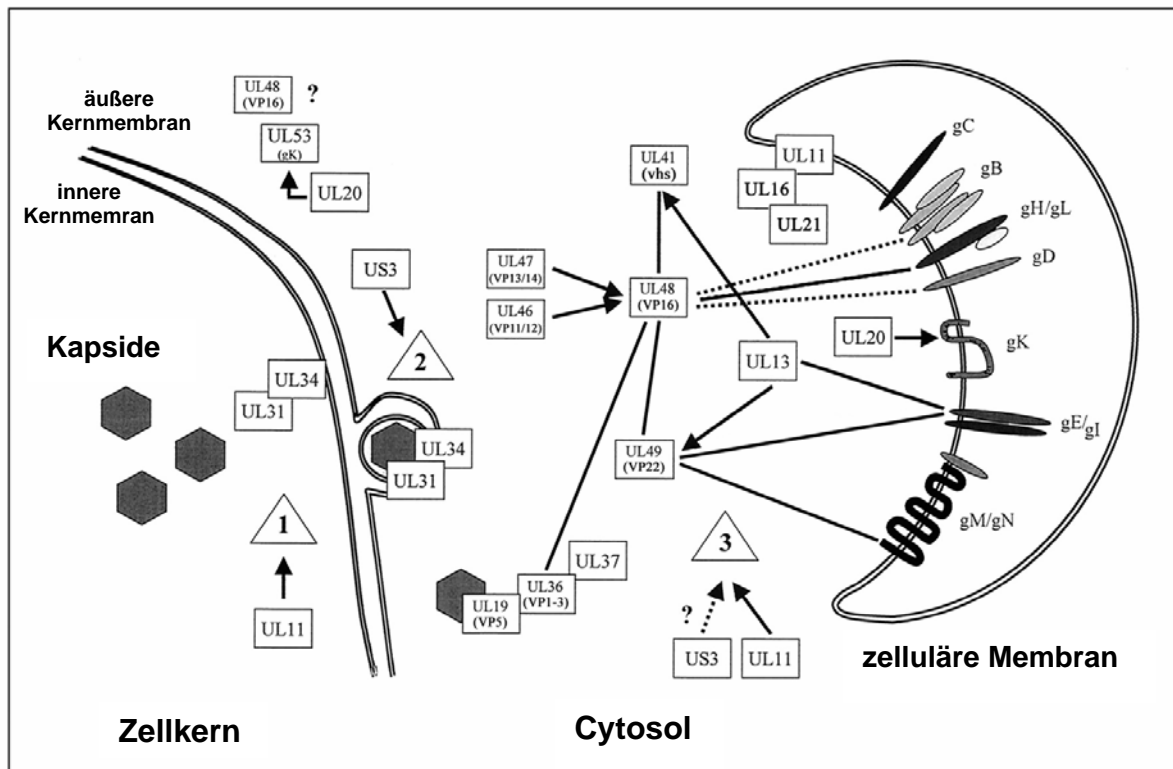


Abb. 3.7: Diagramm nachgewiesener Interaktionen der Genprodukte von HSV1 oder Pseudorabies-Virus, einem porcinen α -Herpesvirus, bei der Virion-Bildung. Durchgezogene Linien oder direkte Kontakte zwischen den Rechtecken stellen physikalische Interaktionen dar. Pfeile zeigen funktionale Effekte an. Gestrichelte Linien weisen auf vermutete Interaktionen hin. Die Dreiecke stehen für (1) primäre Behüllung, (2) Verlust der primären Virushülle und (3) endgültige bzw. sekundäre Behüllung. Modifiziert nach Mettenleiter, 2002; Mettenleiter, 2004; Vittone et al., 2005.

Die neu synthetisierten Kapside im Zellkern enthalten vermutlich, im Gegensatz zu den extrazellulären Viren nahezu keine Tegumentproteine. Sie knospen zunächst in den Spalt zwischen der inneren und äußeren Kernmembran unter Beteiligung der Genprodukte von UL31, UL34 und US3 (Abb. 3.7; Fuchs et al., 2002c; Granzow et al., 2004; Reynolds et al., 2002). Dabei entsteht eine primäre Virushülle, die sich aber von der Hülle der reifen Virionen unterscheidet. Nur die Protein-Kinase US3 wird sowohl am primären Kapsid als auch an den extrazellulären reifen Virionen gefunden (Granzow et al., 2004; Reynolds et al., 2002).

Die primäre Virushülle fusioniert mit der äußeren Kernmembran oder einer ER-Membran, und die Kapside werden ins Cytosol abgegeben, in dem die endgültige Tegumentisierung und Behüllung der Kapside in oder an cytoplasmatischen Kompartimenten

stattfinden (Mettenleiter, 2002). Die cytoplasmatischen und extrazellulären Virionen enthalten kein UL31 oder UL34 (Abb. 3.7; Reynolds et al., 2002).

Tabelle 3.1: Interaktionen von α -Herpesvirus-Proteinen (übernommen aus Mettenleiter, 2002).

α – Herpesvirinae		Nachweismethode	Referenz
UL31	UL34	IF, Immuno-EM	Reynolds et al., 2002* Fuchs et al., 2002c**
Kapsid – inneres Tegument			
UL19 (VP5)	UL36 (VP1-3)	Ko-IP	McNabb & Courtney, 1992 *
UL36 (VP1-3)	UL37	H2H, Ko-IP	Klupp et al., 2002** Vittone et al., 2005 *
inneres – äußeres Tegument			
UL36 (VP1-3)	UL48 (VP16)	H2H	Vittone et al., 2005 *
äußeres Tegument – äußeres Tegument			
UL13	UL41 (<i>vhs</i>)	genetisch	Overton et al., 1994 *
UL13	UL49 (VP22)	genetisch	Coulter et al., 1993 *
UL21	UL16	Ko-IP	Klupp et al., 2005 ** Mettenleiter, 2004
UL41 (<i>vhs</i>)	UL48 (VP16)	Ko-IP, H2H	Smibert et al., 1994 *
UL46 (VP11/12)	UL48 (VP16)	IF, GST-Fällung, H2H	Kato et al., 2000 * Vittone et al., 2005
UL47 (VP13/14)	UL48 (VP16)	H2H	Vittone et al., 2005 *
UL49 (VP22)	UL48 (VP16)	IF, Ko-IP	Elliott et al., 1995 *
äußeres Tegument – virale Membranproteine			
UL13	UL8 (gE)	Ko-IP	Ng et al., 1998 *
UL16	UL11	GST-Fällung, H2H	Loomis et al., 2003 * Vittone et al., 2005 *
UL20	UL53 (gK)	genetisch	Dietz et al., 2000 **
UL48 (VP16)	UL22 (gH)	GST-Fällung, Ko-IP	Gross et al., 2003 *
UL49 (VP22)	UL8/US8 (gE/gI)	H2H	Fuchs et al., 2002b **
UL49 (VP22)	UL10/UL49.5 (gM/gN)	H2H	Fuchs et al., 2002b **

* gezeigt für HSV

** gezeigt für Pseudorabies-Virus

GST-Fällung: Bindung von Glutathion-S-Transferase gekoppelter Proteine an Glutathion

IF: Immunfluoreszenzmikroskopie

Immuno-EM: Immunoelktronenmikroskopie

H2H: Hefe-zwei-Hybrid

Ko-IP: Koimmunopräzipitation

In den frühen Schritten der Tegument-Bildung bindet VP1-3 (UL36) an VP5 (UL19) und UL37 (Desai et al., 2001; Desai, 2000; Klupp et al., 2002; Vittone et al., 2005). Sowohl VP1-3 als auch UL37 sind für die Bildung behüllter HSV1 Virionen essentiell (Desai et al., 2001; Desai, 2000). Die in größter Kopienzahl vorhandenen Proteine des äußeren Teguments sind

VP11/12, VP13/14, VP16 und VP22 (Mettenleiter, 2004). VP16 (UL48) - auch α -TIF genannt – ist ein Transkriptionsfaktor, der mit Hilfe eines Wirtsproteins in den Zellkern transportiert wird, und die Transkription der unmittelbar frühen viralen Gene bewirkt (Roizman & Knipe, 2001; Wysocka & Herr, 2003). VP16 spielt darüber hinaus eine wichtige Rolle bei der Anordnung des Teguments (Fuchs et al., 2002a; Hafezi et al., 2005; Mossman et al., 2000; Zhang & McKnight, 1993; Zhang et al., 1991) und interagiert im Hefe-zwei-Hybrid System mit VP22 (UL49; Vittone et al., 2005) und dem *virus host shutoff factor (vhs)*, der mRNA degradiert und somit die zelluläre Proteinbiosynthese ausschaltet (Kwong & Frenkel, 1989; Smibert et al., 1992). Des Weiteren wird die Aktivität von VP16 durch VP11/12 (UL46) und VP13/14 (UL47; Zhang et al., 1991) beeinflusst. Im Hefe-zwei-Hybrid System wurden Interaktionen von VP16 mit VP11/12 und VP1-3 nachgewiesen (Vittone et al., 2005). Das deutet auf eine mögliche physikalische Verbindung zwischen der äußeren und inneren Tegumentschicht über VP16 hin (Abb. 3.7, Tabelle 3.1).

Die Lipidzusammensetzung der Virushülle ist eine andere als die der Kernmembran (van Genderen et al., 1994). Um ihre endgültige Membran zu erhalten, knospen die Kapside in trans-Golgi-Vesikel oder in Endosomen in deren Membran die viralen Glykoproteine enthalten sind (Alconada et al., 1999; Brunetti et al., 1998; Granzow et al., 2001; Harley et al., 2001; McMillan & Johnson, 2001; Turcotte et al., 2005; Wisner & Johnson, 2004). Dabei interagieren die cytosolischen Domänen der viralen Glykoproteine mit den Tegumentproteinen, so dass der Knospungsprozess forciert wird. Beispielsweise wird für die Glykoproteine gE und gM eine Interaktion mit dem Tegument-Protein VP22 angenommen (Abb. 3.7). Die reifen Viren verlassen dann über den Sekretionsweg die Zelle (Mettenleiter, 2002).

Für HSV1 werden auch virale Partikel aus Virushülle und Tegument ohne Kapside, sogenannte L-Partikel (*light particles*), beobachtet. Somit sind Kapside für die Bildung von Virushüllen mit Tegument nicht notwendig (McLauchlan et al., 1992; McLauchlan & Rixon, 1992).

3.5 Intrazellulärer Transport des Herpes-Simpex-Virus Typ 1

3.5.1 Herpesviren und Mikrotubuli

Die eingetretenden Viren werden entlang von MT zu den Kernporen transportiert (Granzow et al., 1997; Hammonds et al., 1996; Kristensson et al., 1986; Lycke et al., 1988; Mabit et al., 2002; Marozin et al., 2004; Sodeik et al., 1997). Im Gegensatz zu kultivierten Epithelzellen sind die MT in den langgestreckten Neuronen für den Transport zum Zellkern essentiell (Kristensson et al., 1986). Der zum Minus-Ende der MT gerichtete Motor Dynein und sein Kofaktor Dynactin vermitteln den Transport der Kapside zum MTOC, welches sich oft in der Nähe des Kerns befindet (Bearer et al., 2000; Döhner et al., 2002; Kristensson et

al., 1986; Lycke et al., 1988; Mabit et al., 2002; Marozin et al., 2004; Sodeik et al., 1997; Topp et al., 1996; Topp et al., 1994).

Ein Überschuß der Dynactin-Untereinheit Dynamitin führt zur Dissoziation des Dynactin-Komplexes (Echeverri et al., 1996; Eckley et al., 1999; Wittmann & Hyman, 1999). Die Überexpression von Dynamitin reduziert den Kapsidtransport zum Zellkern und damit auch die Genexpression der sehr frühen Gene von HSV1 (Döhner et al., 2002). Die Bindung an die Plasmamembran und die Internalisierung sind davon nicht betroffen. Bei einem Überschuß an Dynamitin sind die Kapside nicht, wie sonst zu frühen Zeitpunkten der Infektion, zufällig im Cytoplasma verteilt (Sodeik et al., 1997), sondern akkumulieren in der Peripherie der Zelle (Döhner et al., 2002). Da dies nur in Anwesenheit intakter MT zu geschieht, ist während des Eintritts neben cytoplasmatischem Dynein und Dynactin wahrscheinlich auch ein plus-gerichteter MT Motor, d. h. ein Kinesin, am Kapsidtransport beteiligt (Döhner et al., 2002; Janus, 2005; Janus et al., Manuskript in Vorbereitung). Dieser anterograde Transport konnte auch zu frühen Zeitpunkten in lebenden Zellen mit Fluoreszenz-markiertem HSV1 beobachtet werden, wobei der Nettotransport zum Zellkern gerichtet war (Döhner, Büttner, Wolfstein, Prank, Ewers und Sodeik; Manuskript in Vorbereitung).

Wenn die Kapside das MTOC erreicht haben, gelangen sie mittels eines noch unbekanntes Mechanismus zur Kernmembran (diskutiert in Döhner et al., 2005; Sodeik, 2002) und verteilen sich dann von der dem MTOC zugewandten Seite des Kerns über die gesamte Kernmembran (Döhner et al., 2002; Everett et al., 2004; Sodeik et al., 1997). In verletzten Axonen kann Dynein mit dem Kernimportrezeptor Importin α interagieren und eine Fracht, die an Importin β gebunden ist, für den nukleären Import rekrutieren (Hanz et al., 2003). Sowohl Importine als auch Kinesine könnten demnach bei dem Transport vom MTOC zur Kernpore eine Rolle spielen (diskutiert in Döhner et al., 2005; Sodeik, 2002).

Beim Virusaustritt werden nach einem Modell die neu synthetisierten HSV1-Proteine der Virushülle und die Kapside im Axon getrennt transportiert. Der endgültige Zusammenbau fände dann in der Präsynapse statt. (Diefenbach et al., 2002; Holland et al., 1999; Miranda-Saksena et al., 2000; Ohara et al., 2000; Penfold et al., 1994; Tomishima & Enquist, 2001; Tomishima & Enquist, 2002; Tomishima et al., 2001). Um in Neuronen die Nervenendigungen zu erreichen, müssen die viralen Partikel dann von einem zum MT-Plus-Ende gerichteten Kinesin transportiert werden. Neuere Ergebnisse mit PrV sprechen dafür, dass die Kapside beim Austritt zusammen mit dem äußeren Tegument und der Virushülle anterograd im Axon transportiert werden (Ch'ng & Enquist, 2005; del Rio et al., 2005).

3.5.2 Intrazellulärer Transport GFP-markierter HSV1-Partikel

Proteine lassen sich lichtmikroskopisch visualisieren, indem man sie als Fusionsprotein mit einem fluoreszierenden Protein exprimiert. Hierzu werden unter Anderem GFP aus der grün biolumineszierenden Qualle *Aequorea victoria* und seine Derivate verwendet (Tsien, 1998). GFP hat ein Molekulargewicht von 27 kDa und besteht aus 238 Aminosäuren. Diese bilden einen Hohlzylinder aus 11 β -Faltblättern, durch den sich eine α -Helix windet, die ein Chromophor aus zyklisierten Aminosäuren enthält (Ormo et al., 1996; Tsien, 1998). Die maximale Absorption des GFP liegt bei einer Wellenlänge von 395 nm (blau), wobei die grüne Fluoreszenz von ca. 509 nm hier sehr schnell ausbleicht. Regt man allerdings bei einem etwas schwächeren Maximum bei 470–475 nm an, so ist die grüne Fluoreszenz relativ stabil (Cubitt et al., 1995; Stearns, 1995). Zum Markieren von Proteinen ist heute das sogenannte *enhanced* GFP (EGFP) weit verbreitet, das eine 35fach höhere Intensität als das Wildtyp-GFP aufweist (Cormack et al., 1996; Yang et al., 1996).

Um HSV1-Kapside durch Fluoreszenz sichtbar zu machen, wurden einige Strukturproteine durch EGFP-Fusionsproteine ausgetauscht. Beispiele hierfür sind VP26 (Desai & Person, 1998), VP22 (Elliott & O'Hare, 1999), VP11/12 (Willard, 2002), VP13/14 (Donnelly & Elliott, 2001) und VP16 (Bearer et al., 2000). Beim Kapsidprotein VP26 wurde das EGFP N-terminal in den ORF von UL35 inseriert, um ein 39 kD großes GFPVP26 Fusionsprotein zu erzeugen (Desai & Person, 1998), wobei die Anzahl der VP26 Proteine in der Mutante pro VP5 Hexon nicht mehr 900 Kopien VP26 sondern etwa 300-450 Kopien GFPVP26 pro Kapsid beträgt (Prashant Desai, Johns Hopkins University, persönliche Mitteilung). VP26 ist nicht essentiell für die Virusreplikation und GFPVP26 interferiert nicht mit ihr (Desai et al., 1998; Desai & Person, 1998). Ferner wird VP26 nicht für den MT-vermittelten Transport zum Zellkern benötigt, und GFPVP26 beeinflusst weder den MT-vermittelten Transport noch die frühe virale Genexpression (Döhner, Schmidt, Radtke und Sodeik; Manuskript eingereicht).

Um den intrazellulären Transport von α -Herpesvirinae zu untersuchen, wurden HSV1 Kapside in Tintenfischaxone injiziert (Bearer et al., 2000), kultivierte Neuronen mit Pseudorabies-Viren (Luxton et al., 2005; Smith et al., 2001; Smith et al., 2004) oder YFP-Tubulin exprimierende Epithelzellen (PtK₂-Zellen; Pelkmans et al., 2001) mit HSV1-GFPVP26 inokuliert (Döhner, Büttner, Wolfstein, Prank, Ewers und Sodeik; Manuskript in Vorbereitung).

Im Tintenfischaxon bewegen sich alle injizierten GFPVP16 Partikel kontinuierlich retrograd. Die Geschwindigkeit dieser Partikel ist mit etwa 2 μ m/s vergleichbar mit der Geschwindigkeit von HSV1 in kultivierten Dorsalwurzel-Ganglien (Bearer et al., 2000; Lycke et al., 1984). Auch beim Eintritt des Pseudorabies-Virus-GFPVP26 in kultivierte Neuronen dominiert der retrograde Transport der GFP-Partikel (Smith et al., 2004). Sie bewegen sich

im Mittel mit einer Geschwindigkeit von 1,2 $\mu\text{m/s}$. Die in Intervallen vorkommende anterograde Bewegung zur Präsynapse ist hingegen beim Zelleintritt mit 0,6 $\mu\text{m/s}$ deutlich langsamer und kürzer als der retrograde Transport.

Neu synthetisierte Pseudorabies-Virus-GFPVP26-Partikel bewegen sich bidirektional (Smith et al., 2001). Der 2 $\mu\text{m/s}$ schnelle, anterograde Transport wird nur durch kurze retrograde Bewegungen von 1,3 $\mu\text{m/s}$ unterbrochen. Diese Beobachtung wird durch die Regulation eines zum Plus-Ende gerichteten Motors erklärt (Smith et al., 2004). Nach diesem Modell ist ein minus-gerichteter Motor sowohl beim Eintritt als auch beim Austritt neuer Kapside immer mit gleicher Stärke aktiv ($\sim 1,2 \mu\text{m/s}$). Ein ebenfalls an den Kapsiden bindender plus-gerichteter Motor ist an den austretenden Kapsiden aktiver als der minus-gerichtete Motor und bewirkt so einen anterograden Transport (Smith et al., 2001; Smith et al., 2004).

3.5.3 Potentielle HSV1-Rezeptoren für MT-Motoren

Ein spezifischer intrazellulärer Transport von HSV1 erfordert Rezeptoren für Dynein, Dynactin oder Kinesine. Für den HSV1-Kapsidtransport kommen prinzipiell alle Tegumentproteine und die an der Kapsidoberfläche lokalisierten Proteine in Frage. Nach der Fusion von α -Herpesviren mit einer zellulären Membran beim Eintritt oder vor der zweiten Knospung beim Austritt sind die Tegumentproteine den cytosolischen Motorproteinen frei zugänglich (Granzow et al., 2005; Luxton et al., 2005).

Das Tegumentprotein US11 von HSV1 ist eine mögliche Komponente eines Kinesin-Rezeptors. Es interagiert mit der schweren Kette von Kinesin-1, und die neu gebildeten Kapside infizierter Neuronen kolokalisieren mit Kinesin-1 im Zellkörper und Axon während des anterograden Transportes zur Synapse (Diefenbach et al., 2002). Eine HSV1-Mutante ohne US11 zeigte wie der Wildtyp während des Zelleintritts bidirektionalen Transport entlang von MT zum Zellkern und zur Zellperipherie. Ferner kolokalisiert während des Zelleintritts Kinesin-2, und nicht Kinesin-1, unabhängig von US11 mit den internalisierten Viren (Janus, 2005). Ein US11-vermittelter Transport spielt deshalb vermutlich zu frühen Zeitpunkten im Infektionszyklus, z.B. für den Weitertransport vom MTOC zum Zellkern, keine Rolle.

Als mögliche Rezeptor-Komponente für den minus-gerichteten MT-Motor Dynein wird das äußere Kapsid-Protein VP26 in Betracht gezogen. Mit einem Hefe-zwei-Hybrid System wurde eine Interaktion zwischen HSV1-VP26 und den DLCs Tctex-1 und rp3 gefunden (Douglas et al., 2004). Hingegen wurde eine HSV1- Δ VP26 Mutante ähnlich wie der Wildtyp mittels MT und dem Dynein-Kofaktor Dynactin zum Zellkern transportiert (Döhner, Schmidt, Radtke und Sodeik; Manuskript eingereicht). Dies legte nahe, dass neben VP26 auch andere Kapsid- und/oder Tegumentproteine als Rezeptoren für Dynein/Dynactin fungieren können.

Mit Virusstämmen des Pseudorabies-Virus, deren Tegumentproteine mit fluoreszierenden Proteinen markiert waren, wurde gezeigt, dass nach Eintritt der Viren in Neuronen die inneren Tegumentproteine VP1-3 (UL36) und UL37 beim Transport zum Kern mit den Kapsiden assoziiert bleiben (Luxton et al., 2005). Die äußeren Tegumentproteine VP16, VP13/14 und VP22 (Abb. 3.7) hingegen findet man nur beim Austritt an neusynthetisierten Kapsiden (Luxton et al., 2005). Würde es sich beim Zelleintritt um cytosolische Kapside handeln, so könnten demnach VP1-3 und UL37 eine Rolle bei der Motorbindung beim Zelleintritt spielen, während die äußeren Tegumentproteine einen Motorkomplex für den anterograden Transport der viralen Kapside binden könnten.

3.6 Biochemische Untersuchung des MT-Transportes

Bei *in vivo* Motilitäts-Testsystemen wird die Dynamik von zellulären Bestandteilen oder Infektionserregern in einer lebenden Zelle untersucht. *In vitro* erfolgt eine Rekonstruktion der zellulären Transporte außerhalb der Zelle mit zum Teil gereinigten Komponenten (Paschal & Vallee, 1993). Die Bewegungen in diesen Testsystemen werden dabei mit Dunkelfeld (Sale et al., 1993), Differenz-Interferenz-Kontrast (Allan, 1993; Cohn et al., 1993; Paschal & Vallee, 1993) oder durch Fluoreszenz (Howard & Hyman, 1993) sichtbar gemacht. Die Aufzeichnung erfolgt durch Videomikroskopie (Allan, 1993; Cohn et al., 1993; Paschal & Vallee, 1993), konfokale Laser-Mikroskopie (Bearer et al., 2000) oder Zeitverlaufsmikroskopie mit digitalen CCD-(*Charge-coupled device*)-Kameras (Murray et al., 2000; Wolfstein et al., 2006).

Solche *in vitro*-Testsysteme ermöglichen die funktionelle Untersuchung einer Motor-Transportgut-Interaktion. Gegenüber der Analyse von Transportphänomenen in intakten Zellen bieten *in vitro*-Testsysteme die Vorteile, selektiv einzelne zelluläre Komponenten des Transportsystems für die Rekonstruktion der Motilität zu verwenden, und durch die Manipulation der Komponenten ein detailliertes Verständnis des intrazellulären Transports zu erlangen. Allerdings wird hier immer nur ein Ausschnitt eines vernetzten Systems untersucht, so dass der rekonstruierte Transport in der Regel nicht vollständig der *in vivo* Situation entspricht.

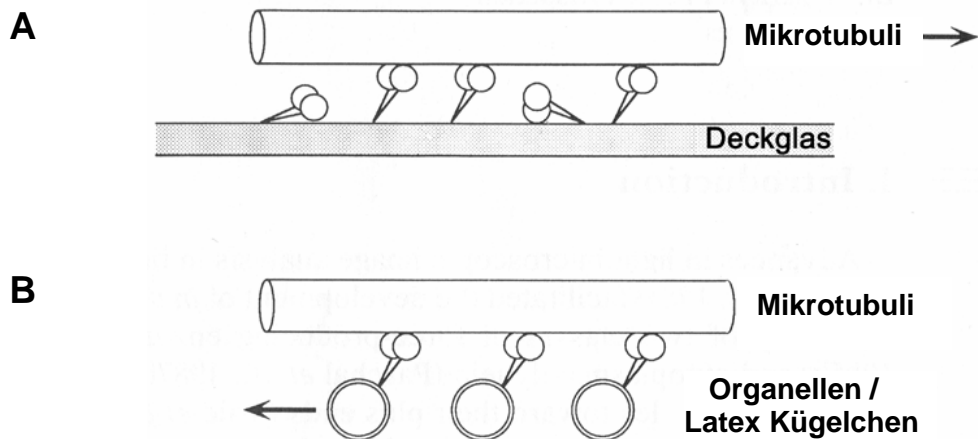


Abb. 3.8: *In vitro* Motilitäts-Testsysteme für den MT-, Organell- und Latexkugelchentransport. (A) Bei dem Testsystem für das MT-Gleiten interagiert eine geeignet orientierte Teilmenge der am Glas angehefteten Motoren mit der MT Oberfläche. Die durch zyklisches Binden und Dissoziieren der Motoren erzeugte Kraft lässt die MT über die Deckglasoberfläche in eine vom Oberflächengitter der MT vorgegebene Richtung gleiten. (B) Latexkugelchen und Organellen bewegen sich im Vergleich zu den gleitenden MT in die entgegengesetzte Richtung. Abbildung übernommen aus Paschal & Vallee (1993).

Prinzipiell gibt es zwei verschiedene Typen von Motilitäts-Testsystemen für die *in vitro* Rekonstruktion der funktionellen Aktivität von MT-abhängigen Motoren. Bei dem einen wird die Deckglasoberfläche mit Motorproteinen beschichtet, wobei ein Teil der Motoren eine geeignete Orientierung aufweist, um z.B. die MT zu bewegen (Abb. 3.8 A; Allen et al., 1985; Lye et al., 1987; Paschal et al., 1987; Paschal & Vallee, 1987). In dem anderen System sind die MT an einer Deckglasoberfläche immobilisiert. Die Bewegungen der mit einem Motorprotein beschichteten Latexkugelchen oder Organellen werden dabei entlang der MT verfolgt (Abb. 3.8 B; Vale et al., 1985c).

Objekte mit einem Durchmesser von 25 nm wie z.B. MT sind mit ihrer Dimension unterhalb der Auflösung eines Lichtmikroskops. Die MT und die mobilen Partikel können aber mit Hilfe von Video-verstärkter Differenz-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie visualisiert werden (Allen et al., 1981). Mit solchen biochemischen, funktionellen Testsystemen konnten Kinesin-1 und cytoplasmatisches Dynein aus dem Tintenfisch-Axoplasma als MT-abhängige Motorproteine identifiziert werden (Allen et al., 1985; Lye et al., 1987; Paschal et al., 1987; Paschal & Vallee, 1987; Vale et al., 1985a; Vale et al., 1985b).

MT können durch die Markierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff sichtbar gemacht werden. Für die kovalente Kopplung des Farbstoffs an das Protein wird häufig ein Succinimidyl-Ester des Fluorochroms eingesetzt (Hyman, 1991; Mitchison, 1989). Um die MT in den *in vitro* Systemen auch bei Temperaturen unter 37°C zu stabilisieren, wird das neutrale Diterpen Taxol verwendet (Paschal & Vallee, 1993; Schiff et al., 1979). Es verhindert die schnelle Depolymerisation der Mikrotubuli (Derry et al., 1995; Schiff et al., 1979; Wilson & Jordan, 1995). Die Taxol-Bindungsstelle im MT ist dabei auf der β -Tubulin

Untereinheit nahe der inneren Wand und der lateralen Kontaktfläche zwischen den Protofilamenten lokalisiert (Nogales et al., 1995). In Anwesenheit von Taxol bestehen die MT im Durchschnitt aus 12 Protofilamenten (Meurer-Grob et al., 2001; Nogales et al., 1999; Nogales et al., 1997; Nogales et al., 1998; Nogales et al., 1995).

Die Funktion und Regulation von Motorproteinkomplexen und ihren Kofaktoren kann mit artifiziellen Transportgütern wie Glasoberflächen in MT-Gleit-Testsystemen und anionischen carboxylierten Latex- oder Polystyrolkügelchen untersucht werden (Abb 3.8). So wurde z.B. *in vitro* mit Polystyrolkügelchen gezeigt, dass Dynactin die Prozessivität von cytoplasmatischem Dynein erhöht (King & Schroer, 2000). In solchen Experimenten binden die Motoren unspezifisch an die Oberfläche des zu transportierenden Partikels. Die funktionelle Orientierung eines bestimmten Motortyps wird hier nicht durch eine biologische Wechselwirkung bestimmt.

Viren werden auch in zellulären Membranen transportiert (Döhner et al., 2005; Döhner & Sodeik, 2004; Smith & Enquist, 2002; Sodeik, 2000). Einige Zelltypen werden produktiv nach dem HSV1-Eintritt durch Endocytose infiziert; z.B. CHO-Zellen, die mit Nectin1 oder HVEM stabil transfiziert wurden, HeLa-Zellen oder Keratinocyten (Gianni et al., 2004; Nicola et al., 2005; Nicola et al., 2003; Nicola & Straus, 2004). Der Zelleintritt durch Endocytose wurde mit Elektronenmikroskopie, mit pharmakologischen Inhibitoren der Endocytose (Nicola et al., 2003; Nicola & Straus, 2004) oder mit Substanzen, welche die endosomale Ansäuerung verhindern (Gianni et al., 2004; Nicola et al., 2005), nachgewiesen. Ein niedriger pH-Wert ist aber nicht unbedingt notwendig, da HSV1 auch bei neutralem pH-Wert, wie es beim Eintritt über die Plasmamembran der Fall ist, mit der Endosomen-Membran fusionieren könnte. Daher kann auch bei einer Unempfindlichkeit gegenüber Reagenzien, welche die Ansäuerung endocytotischer Organellen verhindert, eine Infektion über endocytotische Organellen nicht ausgeschlossen werden (Milne et al., 2005).

Über Rezeptor-vermittelte Endocytose erzeugte Endosomen zeigen *in vitro* eine bidirektionale Bewegung (Murray et al., 2000). Dabei können Endosomen durch Transport in die entgegengesetzte Richtung auseinandergezogen werden und sich in zwei separate Vesikel spalten. Durch regulative Faktoren kann im Zusammenspiel mit der MT-Matrix eine Sortierung der zellulären Membranen erfolgen. Für den Dynein-vermittelten Transport wurde mit Hilfe von Liposomen gezeigt, dass der Dynein-Dynactin Komplex über Spectrin spezifisch an die Lipidmembran gekoppelt wird (Muresan et al., 2001). Dabei bindet die Pleckstrin-homologe Domäne des Spectrins an saure Phospholipide.

Aber auch neu gebildete Viren können sich in einer zellulären Membran befinden (Alconada et al., 1999; Brunetti et al., 1998; Granzow et al., 2001; Harley et al., 2001; McMillan & Johnson, 2001; Turcotte et al., 2005; Wisner & Johnson, 2004) und über den

Membrantransport zur Plasmamembran gelangen, wo sie sezerniert werden (Mettenleiter, 2004).

In den hier beschriebenen biochemischen Testsystemen für den Kapsidtransport für HSV1 wurden cytosolische Extrakte aus *Xenopus leavis* Eiern verwendet. In den ursprünglichen Testsystemen für Membrantransport wurde die Motoraktivität in Abhängigkeit vom Zellzyklus untersucht (Allan, 1993). Hierzu wird das Cytosol aus *Xenopus leavis* Eiern extrahiert, die sich in einem definierten Stadium des Zellzyklus befinden. Gibt man zelluläre Membranen aus der Inter- oder Metaphase zu den Cytosolen, so kann man Vesikeltransport, Membranröhrenbildung und MT-Gleiten beobachten. Dieser Membrantransport wird dabei hauptsächlich vom Cytosol aus der Interphase unterstützt (Allan, 1993).



Abb. 3.9: Unterschiedlicher Transport von HSV1-GFPVP26-Partikeln. Kapsidtransport ohne zelluläre Membranen (A). Transport von HSV1 in Endosomen (B). Bindung von Kapsiden an transportierten Membranen (B).

Mit membranfreien Extrakten lässt sich der Transport von Kapsiden entlang von MT direkt untersuchen (Abb. 3.9 A). Im Gegensatz zu den Experimenten mit intakten Zellen lässt sich hier ein Transport von Viren im Lumen von cytoplasmatischen Organellen (Abb. 3.9 B) oder von Kapsiden, die an eine cytosolische Oberfläche von Organellen assoziiert sind (Abb. 3.9 B), eindeutig ausschließen.

3.7 Aufgabenstellung

Um die molekulare Basis von Transportprozessen genauer verstehen zu können, ist die Identifizierung der minimalen Anzahl an beteiligten Komponenten notwendig. Hierzu wurden zellfreie Testsysteme entwickelt, die nur aus einzelnen zellulären Bestandteilen, wie den Filamenten, dem davon abhängigen Motor und seinem Transportgut bestehen. Ausgehend von solchen Testsystemen sollte hier der Mikrotubuli-vermittelte Kapsidtransport von HSV1 biochemisch charakterisiert werden.

Bei vielen zellulären Transportgütern ist die genaue Proteinzusammensetzung unbekannt. Im Gegensatz dazu hat HSV1 eine definierte und bekannte Proteinzusammensetzung. Die HSV1-Kapside werden beim Zelleintritt letztlich zum Minus-Ende und beim Austritt zum Plus-Ende der MT transportiert. Sie eignen sich deshalb als Modell für den MT-Motor vermittelten Transport und die Regulation seiner Richtung.

Obwohl viele Strukturproteine von HSV1 in unterschiedlichen *in vitro* Testsystemen mit MT-Motoruntereinheiten interagieren können, ist bisher kein für den cytosolischen Transport notwendiges Virusprotein identifiziert worden. Um die Anzahl möglicher Kandidaten für eine funktionelle MT-Motorbindung einzugrenzen, und um den Transport von Virionen in zellulären Membranen ausschließen zu können, sollte ein zellfreies *in vitro* Testsystem für den MT-vermittelten Transport von HSV1-Kapsiden entwickelt werden. Dazu sollte zuerst eine stationäre MT-Matrix aus fluorochromiertem Tubulin in einer Perfusionskammer erzeugt werden, um darin die MT-vermittelten Bewegungen von GFP-markierten HSV1-Kapsiden aufzuzeichnen. Als Quelle für die Motilitätsfaktoren sollten cytosolische Extrakte aus homogenisierten Säugerorganen und *Xenopus* Eiern verwendet werden. Die mit Hilfe digitaler Zeitverlaufs-Fluoreszenzmikroskopie aufgezeichneten Bewegungen sollten hinsichtlich ihrer Dynamik und Abhängigkeit von ATP und cytosolischen Faktoren charakterisiert werden. Dabei sollte die *in vivo* beobachtete Abhängigkeit des Kapsidtransports vom Motorkofaktor Dynactin (Döhner et al., 2002) mittels der *in vitro* rekonstruierten Translokation weiter charakterisiert werden. Anschließend sollten an der Beweglichkeit der Kapside beteiligte Tegument- oder Kapsidproteine identifiziert oder eingegrenzt werden. Hierzu wurden Kapsidpopulationen mit unterschiedlicher Tegumentzusammensetzung präpariert und charakterisiert. Die Fähigkeit dieser Kapside, einen funktionellen Transportkomplex zu bilden, wurde im Transport-Testsystem untersucht. Die Spezifität der Dynein-Motorbindung an die verschiedenen Kapsidtypen sollte mit Hilfe eines *in vitro* Bindungs-Testsystems gezeigt werden. In einem MT-Bindungs-Testsystem sollte die Spezifität bei der Kolokalisation von Kapsiden mit MT durch Immunfluoreszenz untersucht werden.

4 Materialien und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Allgemeine Laborgeräte

Elektrophoresekammer SE250 und Gießstand für 6 x 8 cm Proteingele	Amersham, Buckinghamshire, Großbritannien
Feinwaage OL-110A	Omnilab, Gehrden, Deutschland
<i>Gradient Master™</i> , Gradientenmischer	Model 106, Biocomp, Fredericton, Kanada
Inkubatoren für Säugerzelllinien	Kendro, Rodenbach, Deutschland
Kühlthermostate für Gelelektrophorese	Biometra KH3 und HAAKE, Karlsruhe
Kühlzentrifugen	Sorvall RC5B/C und J-21C Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Mikrowellenofen R-330A	Sharp, Hamburg, Deutschland
Netzgeräte EPS600 und EPS300	Amersham, Buckinghamshire, Großbritannien
Neubauer-Zählkammer	Omnilab, Gehrden, Deutschland
Peristaltische Pumpe	Amersham, Buckinghamshire, Großbritannien
Photometer LKB Ultraspec III	Amersham, Buckinghamshire, Großbritannien
Sterilwerkbenke Heraeus Herassafe	Kendro, Rodenbach, Deutschland
Tankblot-Apparatur für 6 x 8 cm Proteingele	Amersham, Buckinghamshire, Großbritannien
Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischultrazentrifuge TL-100	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Ultraschallbad	Branson 2200, Branson Sonic Power Company, Danbury, USA
Ultraschallspitze	B-12; Branson Sonic Power Company, Danbury, USA
Ultrazentrifugen	LB-70 und L8-70M Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Wippschüttler	Biometra, Göttingen, Deutschland
Zellkulturzentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

4.1.2 Mikroskope

Leica DM IBRE System	Leica, Wetzlar, Deutschland
<u>Objektive</u>	
PA 40x, NA 1.4 (Ölimmersion); PA 100x, NA 1.25 (Ölimmersion)	
<u>Lichtquellen</u>	
50 W Quecksilberdampf Lampe	
<u>Filterblöcke</u>	
1: <i>Anregung</i> : BP 450-490 nm, <i>Dichroischer Spiegel</i> : 510 nm, <i>Emission</i> : LP 515 nm	
2: <i>Anregung</i> : BP 515-560 nm, <i>Dichroischer Spiegel</i> : 580 nm, <i>Emission</i> : LP 590 nm	
<u>Kamera</u>	
CCD MicroMax-5MHz-782Y, 782 x 582 Pixel ~ 0,5 MPixel	Princeton Instruments
Pixelgröße: 8,3 µm x 8,3 µm,	Inc., Monmouth Junction,
Graustufen: 16 bit, Scan Rate: 5 MHz	USA
<u>Shutter</u> UniBlitz, Model D122	Vincent Associates, Rochester, New York

Zeiss Axiovert 200 System (in einem Experiment Olympus XI70 System)	Zeiss, Göttingen, Deutschland (Olympus, Hamburg, Deutschland)
<u>Objektive</u>	
PA 63x, NA 1.4 (Ölimersion); PA 100x, NA 1.25 (Ölimersion)	
<u>Lichtquelle</u>	
Polychrom IV	T.I.L.L. Photonics GmbH, Gräfelfing, Deutschland
150 W Xenon-Lampe mit regelbarer Wellenlänge	
Bandbreite: 9,5-12,5 nm, Bereich maximaler Intensität: 400-500 nm	Chroma Technology Corp, Rockingham, USA
<u>Filterblöcke</u>	
1: GFP-Filtersatz	
Anregung: SP 510 nm, <i>Dichroischer Spiegel</i> : LP 490 nm	
Emission: BP 500 – 550 nm	
2: Rhodamin-Filtersatz	
Anregung: SP 540 nm, <i>Dichroischer Spiegel</i> : LP 565 nm	
Emission: BP 573 – 647 nm	
3: Dualband-Filtersatz für Cy3 und FITC	
Anregung: BP 480 – 490 nm und BP 556 – 574 nm	
<i>Dichroischer Spiegel</i> : BP 500 – 540 nm und LP 597 nm	
Emission: BP 594 – 673 nm	
<u>Kamera</u>	
TILL Imago CCD Kamera, 1376 x 1040 Pixel ~ 1,4 MPixel	T.I.L.L. Photonics GmbH, Gräfelfing, Deutschland
Pixelgröße: 6,45 µm x 6,45 µm, Graustufen: 12 bit	
Scan Rate: 16 MHz	
(in Verbindung mit dem Olympus XI70:	
TILL Imago CCD Kamera mit 640 x 480 Pixel,	
Pixelgröße: 9,9 µm x 9,9 µm)	
Elektronenmikroskope	
EM 201 S40/78	Philips, Kassel, Deutschland
EM 901	Zeiss, Göttingen, Deutschland

4.1.3 Materialien

Blottingpapier	Schleicher & Schüll, Dassel, Deutschland
Deckgläschen, 20 mm x 20 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Nr.1: 0,13 – 0,16 mm Dicke	
ECLplus Detection Kit	Amersham Pharmacia Biotec, Buckinghamshire, Großbritannien
ECL Detection Film	Amersham Pharmacia Biotec, Buckinghamshire, Großbritannien
EM Kupfer Grids	Ringsdorf-Werke GmbH., Bonn-Bad Godesberg, Deutschland
FluoSpheres, F-8803	Molecular Probes, Oregon, USA
0,11 µm Durchmesser	
Kammerdeckgläschen Lab-Tak™II	Nalge Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Nitrozellulose-Membran, Protran	Schleicher & Schüll, Dassel, Deutschland
Röntgenfilm, Hyperfilm™ MP	Amersham Pharmacia Biotec, Buckinghamshire, Großbritannien

4.1.4 Virusstämme

HSV1-Wildtyp Stamm F	HSV-1, ATCC-Nr.: VR-733; (Ejercito et al., 1968)
HSV1-ΔVP26 Stamm KOS	HSV1-KΔ26Z (Desai et al., 1998)
HSV1-GFPVP26 Stamm KOS	HSV1-K26GFP (Desai & Person, 1998)

4.1.5 Zelllinien

BHK-21-Zellen	ATCC-Nr.: CCL-10 Neonatale Nierenfibroblasten aus <i>Mesocricetus auratus</i>
PtK ₂ -Zellen	ATCC-Nr.: CCL-56 Adulte unpolarisierte Nierenepithelzellen aus <i>Potorous tridactylus</i>
Vero-Zellen	ATCC-Nr.: CCL-81 Adulte unpolarisierte Nierenepithelzellen aus <i>Cercopithecus aethiops</i>
YFP-Tubulin-PtK ₂ -Zellen	Mit YFP-Tubulin stabil transfizierte PtK ₂ -Zellen (Pelkmans et al., 2001)

4.1.6 Zellkulturmedien

MEM Eagle	CytoGen, Sinn, Deutschland
RPMI 1640	Gibco™ Invitrogen GmbH, Frankfurt, Deutschland
CO ₂ unabhängiges Medium	Gibco™ Invitrogen GmbH, Frankfurt, Deutschland
BHK-Medium / Vero-Medium 10% (v/v) FCS / 7,5% (v/v) FCS in MEM	Seromed Biochrom, Berlin, Deutschland
YFP-PtK₂-Medium 10% (v/v) FCS in MEM mit 500 µg/ml G418 (Geneticin)	Gibco™ Invitrogen GmbH, Frankfurt, Deutschland
³⁵S-Markierungs-Mix 7 mCi (259 MBq) TRAN ³⁵ S-LABEL™ Cystein und Methionin freies MEM Nicht essentielle Aminosäuren 10 000 U/ml Penicillin 10 mg/ml Streptomycin 10% (v/v) BHK-Medium	ICN, Biomedicals GmbH, Deutschland PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland Gibco™ Invitrogen GmbH, Frankfurt, Deutschland

4.1.7 Verwendete Antikörper

Antigen	Name	Typ	Referenz oder Quelle
Kapsid			
VP5	α -NC-1	polyklonal, Kaninchen	Cohen et al., 1980
VP19c	α -NC-2	polyklonal, Kaninchen	Eisenberg et al., 1985
VP26	α -NC-7	polyklonal, Kaninchen	Cohen et al., 1980
His ₆ -VP26	VP26; A	polyklonal, Kaninchen	A. Helenius & K. Breiner, ETH Zürich, Schweiz
UL6	mAb 1C9	monoklonal, Maus	Newcomb et al., 2003
UL25	α -UL25	polyklonal, Kaninchen	Ali et al., 1996
A-Kapside	α -LC	polyklonal, Kaninchen	Cohen et al., 1980
Tegument			
virale Kapside	Rem V	polyklonal, Kaninchen	Ojala et al., 2000
VP1-3 (UL36; aa 1408-2112)	#147	polyklonal, Kaninchen	A. Helenius & K. Breiner, ETH Zürich, Schweiz
UL37	780	polyklonal, Kaninchen	Schmitz et al., 1995
His ₆ -vhs UL41(vhs)	11.388	polyklonal, Kaninchen	Zelius et al., 1996
VP13/14 (UL47)	R220	polyklonal, Kaninchen	Whittaker et al., 1991
VP16 (UL48; aa 475-488)	SW7	polyklonal, Kaninchen	Weinheimer et al., 1992
GST-VP22 (UL49)	AGV30	polyklonal, Kaninchen	Elliott & O'Hare, 1997
US11	#28	monoklonal, Maus	Roller & Roizman, 1992
Virushülle			
UL11	α -UL11	polyklonal, Kaninchen	Baines et al., 1995
gB	R68	polyklonal, Kaninchen	Eisenberg et al., 1987
gC	R47	polyklonal, Kaninchen	Eisenberg et al., 1987
gD	R45	polyklonal, Kaninchen	Isola et al., 1989
Zelluläre Proteine			
Aktin	MAB1501	monoklonal, Maus	Chemicon International, Inc, Kalifornien, USA
Tubulin	DM1A	monoklonal, Maus	Sigma, Missouri, USA
DIC (<i>X. l.</i> ; aa 0-96)	α -XDIC	polyklonal, Schaf	Lane & Allan, 1999
DIC	L5	polyklonal, Kaninchen	Vaughan & Vallee, 1995
p150 (<i>H. s.</i> ; aa 3-202)	α -p150	monoklonal, Maus	BD Transduction Laboratories, Lexington, Kentucky, USA
Dynamitin (<i>H. s.</i> ; aa 55-196)	α -p50	monoklonal, Maus	BD Transduction Laboratories, Lexington, Kentucky, USA
Sekundäre Antikörper			
AP-konjugiert Ziege anti-Maus	Alkalische Phosphatase Maus IgG (H+L)		Dianova, Hamburg, Deutschland
AP-konjugiert Ziege anti-Kaninchen	Alkalische Phosphatase Kaninchen IgG (H+L)		Dianova, Hamburg, Deutschland
HRP-konjugiert Kaninchen anti-Schaf	Meerrettich Peroxidase Schaf IgG (H+L)		Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA
HRP-konjugiert Ziege anti-Maus	Meerrettich Peroxidase Maus IgG (H+L)		Dianova, Hamburg, Deutschland
LRSC-konjugiert Ziege anti-Maus	Lissamin Rhodamine Maus IgG (H+L)		Dianova, Hamburg, Deutschland
FITC-konjugiert Ziege anti-Maus	Fluoresceinisothiocyanat Maus IgG (H+L)		Dianova, Hamburg, Deutschland
FITC-konjugiert Ziege anti-Kaninchen	Fluoresceinisothiocyanat Kaninchen IgG (H+L)		Dianova, Hamburg, Deutschland

4.1.8 Proteine

Apyrase	Roche, Mannheim, Deutschland
BSA (Bovines Serumalbumin) Fraktion V	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Clostripain (400 U/mg) aus <i>Clostridium histolyticum</i>	C-7403, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Chymotrypsin (51 U/mg, 7,8; 25°C)	C-4129, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Cytosolische Extrakte aus <i>Xenopus leavis</i> Oocyten (Interphase)	Viki J. Allan, University of Manchester, UK
DNase II	Roth GmbH, Karlsruhe, Germany
Dynamitin	Torsten Wittmann und Tom Surrey, EMBL, Heidelberg, Deutschland
Endopeptidase Glu-C (V8) (470 U/ml, pH 7,8; 37°C) aus <i>Staphylococcus aureus</i>	Fluka Chemie AG, Buchs, Deutschland
Glucoseoxidase	G-6641, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Hexokinase	Roche, Mannheim, Deutschland
Kallikrein (48 U/mg, pH 8,7; 25°C)	K-3627 Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Katalase	C-100, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Rhodamin-Tubulin	Didier Job (University of Grenoble)
RNase, 70 U/mg, durch Chromatographie gereinigt, Salz- und Protease-frei	Bestellnummer 7164; Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Thrombin 20 U, 48 mg Lyophilisat (pH 8,2 – 9,0, 25°C)	Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland
Trypsin (11600 U/mg, pH 7,6, 25°C)	T-1426, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tubulin	Didier Job (University of Grenoble)

4.1.9 Weitere Chemikalien

30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid (Verhältnis 37,5:1)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Amorpher Kohlenstoff	Ringsdorf-Werke GmbH., Bonn-Bad
Spektralkohlen – höchste Reinheit	Godesberg, Deutschland
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
APS (Ammoniumperoxosulfat)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Aqua ad iniectiones	Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
BCIP (5-Bromo-4-chloro-indolyl-3-phosphat)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bestatin	ICN, Biomedicals GmbH, Deutschland
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Calciumchlorid, Dihydrat, kristallin, reinst	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Coomassie Brilliant Blue G250	Serva, Heidelberg, Deutschland
Coomassie Brilliant Blue R250	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Cy TM 3 monofunktionaler reaktiver Farbstoff (Q 13108 Charge 160532)	Amersham Pharmacia Biotech, Großbritannien
DABCO (1,4-Diazabicyclo[2.2.2.]oktan)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
DEAE-Dextran	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dil (Vybrant [®])	Molecular Probes, Eugene, USA
3H-Indolinum, 2-[3-(1,3-dihydro-3,3-dimethyl-1-octadecyl-2H-indol-2-ylidene)-1-propenyl]-3,3-dimethyl-1-octadecyl-, Perchlorat	
Dinatriumhydrogenphosphat, Dihydrat	Riedel-de-Haën, Seelze, Deutschland
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Merck, Darmstadt, Deutschland
E-64	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Essigsäure	Baker, Deventer, Holland
Ethanol	Baker, Deventer, Holland
Extran AP 12	Merck, Darmstadt, Deutschland
FCS (Fötiales Kälberserum, <i>Fetal Calf Serum</i>)	Gibco BRL, Paisley, Schottland
Glukose	Merck, Darmstadt, Deutschland

Glutamin	Seromed Biochrom, Berlin, Deutschland
Glycerin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N' -2-ethansulfonsäure)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hochvakuumfett, Apiezon M	Apiezon Products, M&I Materials LTD, Manchester, UK
Hoechst 33258 (2-[2-(4-Hydroxyphenyl)-6-benzimid-azolyl]-6-(1-methyl-4-piperazy)benzimidazoltrihydro-chlorid)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kristallviolett	Serva, Heidelberg, Deutschland
Leupeptin	ICN, Biomedicals GmbH, Deutschland
Magermilchpulver	Sucofin, Zentralküche der MHH
Magnesiumchlorid, Hexahydrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
MEM (<i>Minimun-Essential-Medium</i>) Eagle	Seromed Biochrom, Berlin, Deutschland
MES (2-[N-Morpholino]-ethansulfonsäure)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Baker, Deventer, Holland
Mowiol 40-88 (Polyvinylalkohol, teilverseift)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland
NBT (<i>Nitroblue</i> Tetrazolium)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
N,N-Dimethylformamid	Merck, Darmstadt, Deutschland
n-Butanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Nichtessentielle Aminosäuren für Zellkulturmedien	Gibco BRL, Paisley, Schottland
Nocodazol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Paraformaldehyd	Serva, Heidelberg, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Seromed Biochrom, Berlin, Deutschland
Pepstatin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Phalloidin-FITC	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
PIPES Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ponceau S	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese™ Gel 30	Roth, Karlsruhe, Deutschland
RPMI-Medium (Rosewell Park Memorial Institute)	Seromed Biochrom, Berlin, Deutschland
Salzsäure, 37%	Cytogen, Princeton, USA
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Riedel-de-Haën, Seelze, Deutschland
Sulfosalicylsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Taxol (Paclitaxel)	Merck, Darmstadt, Deutschland
TAME (N α -p-Tosyl-L-argininmethylester)	Fluka Chemie AG, Buchs, Deutschland
TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tris (Tris-[hydroxymethyl]-aminomethan)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin/EDTA	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tween™ ₂₀	Seromed Biochrom, Berlin, Deutschland
Uranylacetat (Art. 8473)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
	Merck, Darmstadt, Deutschland

4.1.10 Software

MetaMorph Version 4.0.1 und 5.0.5	Universal Imaging Corporation, Downingtown, USA
TILLvisION Vers. 4.0.1.1	T.I.L.L. Photonics GmbH Gräfelfing, Deutschland
Adobe Photoshop Version 6.0	Pantone Inc.
Microsoft Visual Basic 6.0	Microsoft Inc.

4.1.11 Pufferlösungen und Stammlösungen

BCA Test Reagenz A	Pierce, Rockford, USA
BCA Test Reagenz B	Pierce, Rockford, USA
BRB80-Puffer	80 mM K-PIPES, 2 mM MgCl ₂ , 1 mM EGTA, pH 6,8
BRB100-Puffer	100 mM K-PIPES, 2 mM MgSO ₄ , 1 mM EGTA, pH 6,9
MKT-Puffer	20 mM MES, 100 mM KCl, 30 mM Tris-HCl, pH 7,4
MNT-Puffer	20 mM MES, 100 mM NaCl, 30 mM Tris-HCl, pH 7,4
Lysis-Puffer (2fach Konzentrat)	2% TX-100, 40 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 5 mM DTT, Proteaseinhibitoren, pH 7,4
Laemmlis-Probenpuffer	125 mM Tris-HCl, 4% (v/v) SDS, 20% (v/v) Glycerol, 120 mM β-Mercaptoethanol, Bromphenolblau, pH 6,8
PBS-Puffer	1,5 mM KH ₂ PO ₄ , 8 mM Na ₂ HPO ₄ , 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl
RPMI/HEPES/BSA-Puffer	RPMI 1640, 25 mM HEPES, 0,1% (w/v) BSA
TNE-Puffer	0,5 M NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5
Acetat-Puffer	100 mM K-Acetat, 3 mM Mg-Acetat, 5 mM EGTA, 10 mM HEPES, pH 7,4

Proteaseinhibitoren

AEL (500fache Stammlösung) :	
Aprotinin	1 mg/ml
E-64	1 mg/ml
Leupeptin	1 mg/ml in A. bidest
ABP (500fache Stammlösung) :	
Antipain	5 mg/ml
Bestatin	1 mg/ml
Pepstatin	1 mg/ml in Methanol
PMSF 250fache Stammlösung	40 mg/ml in 2-Propanol

4.2 Methoden

4.2.1 Virus-Präparation

Als Quelle für die Kapside wurden entweder sezerniertes Virus oder mit neu synthetisierten Kapsiden gefüllte Zellkerne aus infizierten Zellen verwendet. Alle Schritte mit infektiösem HSV1 wurden in einem Labor der gentechnischen Sicherheitsstufe S2 für gentechnisch veränderte Organismen mit geringem Risiko nach § 7 des GenTG durchgeführt.

4.2.1.1 Virusamplifikation

Viele Gewebezelllinien sind für die Vermehrung von HSV1 geeignet. Für die Routinepräparationen von HSV1 wurden BHK-21 Zellen verwendet, die hohe Ausbeuten an

extrazellulären, infektiösen Viren liefern (Döhner et al., 2002; Harland & Brown, 1997; Sodeik et al., 1997). Hier wurden adhärenz BHK-21 Zellen entweder mit dem HSV1 Wildtypstamm F, einer HSV1 Mutante bei der das Kapsidprotein VP26 entfernt wurde (Desai et al., 1998a) oder einem HSV1 der anstelle des VP26 ein GFPVP26 Fusionsprotein enthält (Desai & Person, 1998), infiziert.

Die verwendeten Kapside wurden entweder aus extrazellulären Viren oder aus den Zellkernen infizierter Zellen präpariert. Hierzu wurden 40 x 183 cm²-Flaschen mit ca. 10⁷ BHK-21 Zellen pro Flasche (ca. 80%ige Konfluenz) mit einer *Multiplicity of Infection* (MOI) von 0,01 PFU/Zelle des jeweiligen Virus-Stammes in 5 ml/Flasche RPMI/HEPES/BSA-Medium mit dem jeweiligen Virus bei RT auf einem Wippschüttler für 1 h inokuliert und nach Zugabe von 25 ml BHK Medium bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach ca. 4 Tagen beim HSV1-GFPVP26 und ca. 3 Tagen beim Wildtyp löste sich der größte Teil der Zellen nach Abklopfen vom Flaschenboden ab. Dann wurden zuerst die Zellen für 10 min mit 1.800 x g und dann das extrazelluläre Virus, welches sich im Zellkulturmedium befand, für 90 min mit 13.500 x g bei 4°C sedimentiert. Das so erhaltene Mediumsediment wurde 1:1 in MKT-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden mit MNT-Puffer gewaschen und wie das Mediumsediment aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 80°C gelagert (Döhner et al., 2002; Ojala et al., 2000; Sodeik et al., 1997). Die Titer der Mediumsedimente lagen zwischen 1 und 5 x 10⁹ PFU/ml.

Bei einer synchronen Virus-Vermehrung wurde für die Infektion der Zellen eine MOI von 10 PFU/Zelle wie oben beschrieben eingesetzt und für 48 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Für die radioaktive Markierung von Virusproteinen wurde die HSV1-Präparation mit dem Schwefelisotop ³⁵S-markierten Aminosäuren Cystein und Methionin durchgeführt. Hierfür wurde 4 h bzw. 6 h für die Mutanten nach der Infektion das Medium in drei Flaschen mit ca. 1 x 10⁷ Zellen/Flasche durch den ³⁵S-Markierungs-Mix (vgl. Kap. 4.1.6) ersetzt und damit 7 mCi (259 MBq) ³⁵S auf ca. 3 x 10⁷ Zellen verteilt. Das entsprach etwa 0,2 pCi pro Zelle. Die Zellen und das Mediumsediment wurden wie oben beschrieben geerntet und gelagert.

4.2.1.2 Virustitration

Die Infektiosität der Viruspräparationen wurde als Grundlage für die Abschätzung der in den Kapsidpräparationen eingesetzten Partikelzahlen verwendet. Zur Bestimmung der Infektivität von HSV1-Präparationen wurde ein Testsystem mit humanen IgGs und Kristallviolett eingesetzt (Döhner et al., 2002). Dazu wurden in 6-Loch-Platten ausgesäte Vero-Zellen mit 500 µl pro Loch einer definierten Virusverdünnung in RPMI/HEPES/BSA für 1 h inokuliert. Nach Absaugen des Inokulums wurden die Zellen mit 2 ml pro Loch Vero-Medium mit 20 µg/ml humanen IgGs bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die humanen IgGs

enthielten neutralisierende Antikörper gegen HSV1, so dass die Infektion sich nur auf die benachbarten Zellen ausbreiten konnte. Nach 3 Tagen wurden die Zellen mit 9,25 % PFA in PBS für 10 min fixiert, getrocknet und mit 0,025% (w/v) Kristallviolett in 5% (v/v) Ethanol für 10 min gefärbt. Durch die cytopathischen Effekte und die durch die Virusinfektion lysierten Zellen der viralen Infektion bildeten sich Löcher im Zellrasen (Plaques), die zur Bestimmung der Infektivität ausgezählt wurden.

4.2.2 Motilität von HSV1-Partikeln in lebenden Zellen

In Zusammenarbeit mit Katinka Döhner (Institut für Virologie, MHH) wurden, um die Motilität von HSV1-GFPVP26 Partikel in lebenden Zellen zu untersuchen, PtK₂-YFP-Tubulin-Zellen mit HSV1-GFPVP26 inokuliert und die Bewegungen der Partikel mit digitaler Zeitverlaufs-Fluoreszenzmikroskopie aufgezeichnet.

In 2-Kammerdeckgläschen gewachsene PtK₂-YFP-Tubulin-Zellen (vgl. Kap. 4.1.5, S.25) wurden in PtK₂-Medium mit 27,5 µM Nocodazol in DMSO oder nur mit DMSO als Kontrolle bei 37°C für 1 h vorinkubiert und für 20 min in eiskalten RPMI/HEPES/BSA (vgl. Kap. 4.1.11, S. 20) inkubiert. Die Zellen wurden mit Saccharosegradienten-gereinigtem HSV1-GFPVP26 (Döhner, Schmidt, Radtke & Sodeik; Manuskript eingereicht) in RPMI/HEPES/BSA mit einer MOI von 30 PFU/ml für 2 h inokuliert. Nach Entfernen des Inokulums wurden die Zellen dreimal mit kaltem RPMI/HEPES/BSA gewaschen und 2 ml pro Loch PtK₂-Medium mit 0,5 mM Cycloheximid und 27,5 µM Nocodazol oder DMSO als Kontrolle auf die Zellen gegeben. Dann wurde für 2 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und anschließend das Medium durch CO₂ unabhängiges Medium mit dem Sauerstoffradikalfänger (OSS) ausgetauscht. Zum Beobachten der Motilität wurde das Leica DM IBRE System mit einem 100x Objektiv und dem Filterblock 1 verwendet (vgl. Kap. 4.1.2, S.23). Die Belichtung erfolgte mit 1 s und das Intervall zwischen den Bildern betrug 2 s.

4.2.3 Transport von HSV1-GFPVP26 Kapsiden *in vitro*

Für die *in vitro* Testsysteme wurden isolierte HSV1-Kapside, Cytosole und MT benötigt. Dabei sollten für die Untersuchung der Motor-Kapsid-Interaktion Kapside mit unterschiedlicher Tegument-Zusammensetzung generiert werden. Die Cytosole wurden als Quelle für die Motilitätsfaktoren aus Rattenorganen oder Froscheiern präpariert, und die Polymerisation der MT erfolgte mit Tubulin aus Rinder- oder Schweinehirnen, wobei das Tubulin für die Transport-Testsysteme mit einem Fluorochrom markiert worden war.

4.2.3.1 Kapsid-Präparationen

Tegument-haltige Kapside wurden durch Lysis der Membranhülle von extrazellulärem Virus mit einem nicht-ionischen Detergenz erhalten. Nicht-ionische Detergenzien, wie das

verwendete TRITON[®] X-100 mit dem polaren Polyethylenglykol als Kopfgruppe und Isooctylphenylether als hydrophobem Schwanz (Abb. 4.1), lösen hauptsächlich Lipid-Lipid und Lipid-Protein Interaktionen, und von den Protein-Protein Wechselwirkungen nur solche, die eine starke hydrophobe Komponente haben (Helenius et al., 1979; Hjelmeland & Chrambach, 1984; Moller & le Maire, 1993; Neugebauer, 1990). Daher sollte das Lysat intakte Kapside enthalten haben (Ojala et al., 2000).

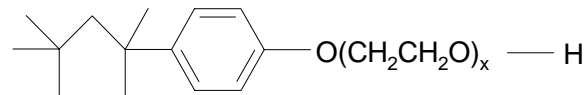


Abb. 4.1 : Strukturformel von TRITON[®] X-100.

Dabei ist x die Anzahl der Ethylenglykolgruppen. $x = 9 - 10$.

Es wurden 50-150 μ l Mediumsediment ($1-2 \times 10^8$ PFU) 1:1 mit Lysis-Puffer verdünnt und für 30 min inkubiert. Der Lysispuffer enthielt neben TX-100 unterschiedliche KCl-Konzentrationen, so dass im Lysisansatz Endkonzentrationen von 0,1, 0,5 oder 1 M KCl eingestellt wurden. Dadurch erhöhte sich die Ionenstärke, welche die elektrostatischen Protein-Protein Wechselwirkungen beeinflusste und so die Tegument-Zusammensetzung der präparierten Kapside veränderte.

Das Lysat wurde mit fünf kurzen Ultraschall-Pulsen von ca. 50 W behandelt, auf 5 ml eines 20%igen Saccharosekissens in MKT-Puffer mit einer dem Lysis-Puffer entsprechend erhöhten KCl Konzentration und 5 mM DTT gegeben und mit 30 kUpM für 30 min im SW50.1 Rotor zentrifugiert. Alternativ wurde bei einer größeren Probenanzahl ein 130–150 μ l Saccharosekissen verwendet und mit 50 kUpM für 10 min im TLA100 Rotor zentrifugiert. Für die Motilitäts- und Bindungs-Tests wurde das resultierende Sediment in 100 μ l BRB80-Puffer (vgl. Kap. 4.1.11, S.29) mit 10 mM DTT resuspendiert. Bei den Bindungs-Tests wurde der Puffer ferner mit 100 μ g/ml DNase II, 100 μ g/ml RNase und 10 mM $MgCl_2$ versetzt, um freie DNA oder RNA abzubauen, welche sonst zur Aggregatbildung der Kapside während der Sedimentation führen könnte. Für die Protein-Analyse wurden die Proteine der Phase über dem Saccharose-Kissen mit einer Mischung aus Chloroform und Methanol gefällt (Wessel & Flügge, 1984) und genauso wie das dazugehörige Sediment in Laemmli-Probenpuffer aufgenommen.

Tegument-freie Kapside wurden aus den Kernen der infizierten Zellen präpariert werden (Newcomb & Brown, 1991; Perdue et al., 1976; Perdue et al., 1974). Dazu wurden die infizierten BHK-21 Zellen (vgl. Kap. 4.2.1.1, S.29) aufgetaut und mit 4.000 UpM ($3220 \times g$) für 10 min in einer Zellkulturzentrifuge (Eppendorf 5810 R) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment im vierfachen seines Volumens mit A. bidest mit Proteaseinhibitoren resuspendiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach dem Auftauen bei 37°C wurden die Zellen fünfmal durch einen Potter-Elvehjem-Homogenisator gepresst. Das Homogenisat wurde mit 4.000 UpM ($3220 \times g$) für 15 min in der

Zellkulturzentrifuge (Eppendorf 5810 R) sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde im 4fachen seines Volumens mit 1% (v/v) TX-100 in A. bidest mit 10 mM DTT und Proteaseinhibitoren resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei 37°C aufgetaut.

Anschließend wurde die Suspension 90 s lang im eisgekühlten Ultraschallbad behandelt etwa 14-18 h bei 4°C inkubiert und 3 mal 90 s im Ultraschallbad mit Eiswasser beschallt. Es folgte eine Zentrifugation im Sorvall SS34 oder Beckman JA-20 Rotor für 50 min mit 8.000 UpM (5000 x g), die Probe wurde resuspendiert und in ein COREX-Glasröhrchen überführt. Der die Kapside enthaltende Überstand wurde auf ein 1 ml 35% (w/v) Saccharose-Kissen in TNE-Puffer (vgl. Kap. 4.1.11, S. 29) mit 10 mM DTT gegeben und im Beckman SW40Ti-Rotor für 75 min mit 20.000 UpM zentrifugiert (50.500 x g). Der Überstand wurde verworfen und das Kapsidsediment in 150 bis 200 µl TNE-Puffer mit 50 mM DTT aufgenommen. Um den Anteil an Kapsid-Aggregaten zu reduzieren, wurde das resuspendierte Sediment mit einer Ultraschallspitze unter ständiger Eiskühlung mit drei 50 W Pulsen und einer Pause von mindestens 5 s zwischen den Pulsen beschallt.

Die Auftrennung in die verschiedenen nukleären Kapsidtypen erfolgte in einem mit dem *Gradient-Master* (Parameter: 2:00 min, 81.5°, 25 UpM) hergestellten linearen 20 bis 50% (w/v) Saccharosegradienten in TNE-Puffer mit 10 mM DTT im SW40 Rotor mit 23.000 UpM für 80 min. Die A-, B-, und C-Banden wurden durch Lichtstreuung sichtbar gemacht, abgesaugt, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Für die Bindungs-Testsysteme und Proteinanalysen wurden die frisch aufgetauten nukleären Kapside 6 bis 7fach in TNE-Puffer verdünnt und in mit 10 mg/ml BSA beschichteten Röhrchen für 16 min im TLA100.2 Rotor bei 50.000 UpM sedimentiert und wie bereits für die viralen Kapside beschrieben in BRB80 Puffer mit RNase und DNase II aufgenommen.

Die präparierten Kapside wurden gewaschen, um das KCl zu entfernen, da eine unphysiologisch hohe Ionenstärke in den *in vitro* Testsystemen den Kapsidtransport und/oder Funktion und die MT-Stabilität beeinflussen könnte (Collins & Vallee, 1987; Dabora & Sheetz, 1988; Olmsted & Borisy, 1975; Vale et al., 1985c).

Die in BRB80 Puffer resuspendierten viralen und nukleären Kapside wurden bis zu 24 h bei 4°C gelagert. Für den DNA- und RNA-Verdau bei den Bindungs-Testsystemen wurden sie 30 min bei 37°C inkubiert und im TLA100 für 5 min oder im TLA100.2 für 8 min bei 50.000 UpM zentrifugiert. Die Sedimente wurden für Proteinanalysen in 40 µl heißen Laemmli-Probenpuffer oder für die Motorbindungs- oder Motilitätsexperimente in 40 µl Cytosol resuspendiert und mit einer Ultraschallspitze behandelt. Hierzu wurden sie unter ständiger Eiskühlung mit 3 - 4 x 50 W Pulsen und einer Pause von mindesten 5 s zwischen den Pulsen beschallt, bis die Proben bei visueller Inspektion homogen waren. Alle Schritte wurden, soweit nicht anders vermerkt, bei 4°C durchgeführt.

4.2.3.2 Proteolytischer Verdau von Kapsiden

Durch spezifische Spaltung von Tegumentproteinen können Rezeptoren für eine Motorbindung freigelegt oder zerstört werden. Hier sollten erste Versuche unternommen werden, neben der Salzextraktion von Tegumentproteinen auch durch die Einwirkung von Proteasen auf Kapside die Tegument-Zusammensetzung zu verändern, ohne die Kapside komplett zu verdauen.

Für den proteolytischen Verdau wurde extrazelluläres Virus (Mediumsediment) verwendet. Es wurde wie bei der unter Kap. 4.2.3.1 (S. 31) beschriebenen Kapsidpräparation verfahren. Der Lysispuffer enthielt hier 100 mM KCl und keine Proteaseinhibitoren.

Tabelle 4.1: Aktivität der verwendeten Proteasen bei 25°C

Protease	Spezifische Aktivität [U/mg]	Konzentration im Lyseansatz [µg/ml]	Aktivität im Lyseansatz [U/ml]	Inkubation [min]
Trypsin	11600	5	58,00	15
Chymotrypsin	51	10	0,51	15
V8	470*	40	18,80*	15
Clostripain	400	10	4,00	15
Thrombin	120	0,4	0,05	5

*) Aktivität bei 37°C bestimmt

Nach 15 min wurden 0,8 µl der entsprechenden Proteaseverdünnung (Tabelle 4.1) zu 40 µl Lysisansatz gegeben. Das hier eingesetzte Mediumsediment hatte einen Titer von $1,7 \times 10^9$ PFU/ml, was bei der verwendeten Menge von 20 µl $3,4 \times 10^7$ PFU entsprach. Nach 5 bis 15 Minuten Inkubation auf Eis wurde die Reaktion mit Proteaseinhibitoren abgestoppt. Die Sedimentation erfolgte durch 160 µl eines 20% (w/v)igen Saccharose-Kissen in MKT-Puffer mit 5 mM DTT im TLA100 mit 50.000 UpM für 10 min. Es wurden 50 µl vom Überstand abgenommen und mit TCA präzipitiert. Sowohl das Kapsidsediment als auch der gefällte Überstand wurden in 30 µl Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und mit SDS-PAGE analysiert.

4.2.3.3 Fluoreszenz-Markierung von Tubulin

Für die Auswahl eines geeigneten Fluoreszenzfarbstoffs sind neben den durch den Versuchsaufbau vorgegebenen Anregungs- und Emissionswellenlängen die Wasserlöslichkeit, Photostabilität und die Fluoreszenzintensität im Verhältnis zur Intensität der Anregungswellenlänge (Fluoreszenzquantenausbeute) wichtig. Ferner ist ein *Linker* sinnvoll, der die fluoreszenzaktive Gruppe mit der reaktiven Kopplungsgruppe verbindet. So wird ein besserer Zugang der reaktiven Gruppe zu den Aminogruppen des nativen Proteins ermöglicht. Indocarbocyanin-Fluorochrome haben eine höhere Fluoreszenzintensität als

Carboxyfluorescein, Tetramethylrhodamin und X-Rhodamin, die auch als Succinimidylester eingesetzt werden (Mitchison, 1989). Bei den Indocarbocyanin-Fluorochromen sind zwei Sulfoindocyanine über konjugierte Doppelbindungen verknüpft, wobei mit zunehmender Anzahl dieser Doppelbindungen die Emissionswellenlänge ansteigt (Mujumdar et al., 1993; Wessendorf & Brelje, 1992). Die Sulfoindocyanine in Cy3 werden durch zwei (Abb. 4.2) und in Cy5 durch drei konjugierte Doppelbindungen voneinander getrennt.

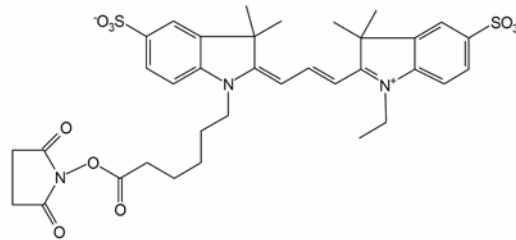


Abb. 4.2: Monofunktionaler reaktiver Indocarbocyanin 3 (Cy3) Fluoreszenzfarbstoff (765,95 kDa), Strukturformel. Maximale Absorption bei 552 nm, maximale Emission bei 570 nm, maximale Extinktion: $150.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ in PBS; Quantenausbeute: 0,04 in PBS (Mujumdar 1993)

Cy3 wird maximal bei 550 nm angeregt und emittiert maximal oranges Licht mit einer Wellenlänge von 562 nm (Abb. 4.3). Bei Cy5 beträgt das Excitationsmaximum 649 nm und das Emissionsmaximum 670 nm (Angaben des Herstellers Amersham).

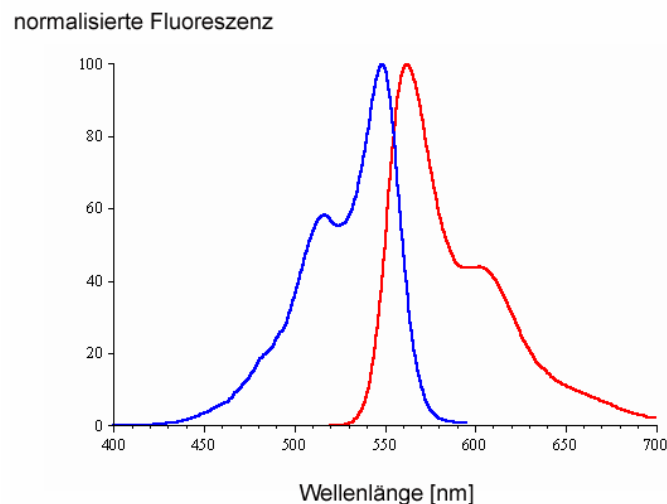


Abb. 4.3: Fluoreszenzspektrum von Cy3, blau: Exitationsspektrum, rot: Emissionsspektrum

Um die MT für die *in vitro* Motilitäts-Experimente zu visualisieren, wurde Tubulin aus Schweinehirnen, die vom örtlichen Schlachthof stammten, aufgereinigt und über die Aminogruppen mit Cy3 kovalent gekoppelt (Hyman, 1991; Mitchison, 1989). Das Tubulin wurde von den MT-assoziierten Proteinen (MAP) durch Phosphocellulose-Chromatographie getrennt (Mitchison & Kirschner, 1984). Erste Markierungen wurden mit MAP-freiem Tubulin, das freundlicherweise von Didier Job (University of Grenoble) zur Verfügung gestellt wurde,

durchgeführt. Für die Fluoreszenzmarkierung wurden 2 ml Tubulin mit einer Konzentration von 14 mg/ml mit 1 ml 1,75 fachen BRB80-Puffer verdünnt, 4 mM $MgCl_2$ und 1 mM GTP dazugegeben und nach 5 min Inkubation auf Eis mit 10% DMSO versetzt.

Nach 40 min Inkubation bei 37°C polymerisierte das Tubulin unter GTP-Bindung und Hydrolyse und wurde dann auf 3 x 2,2 ml pH 8,6-Kissen (0,1 M Na-HEPES, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA, 60% (v/v) Glycerol, pH 8,6) geschichtet und im TLA100.4-Rotor mit 70.000 UpM für 30 min bei 37°C zentrifugiert. Das Kissen wurde abgesaugt, wobei der Meniskus nach etwa der Hälfte mit Markierungspuffer (0,1 M Na-HEPES, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA, 40% (v/v) Glycerol, pH 8,6) gewaschen wurde. Die Resuspension des Sedimentes bis zur Homogenität erfolgte in 37°C-warmem schwach alkalischen Markierungspuffer. Das Gleichgewicht wurde so zu den unprotonierten Aminogruppen hin verschoben, so dass sie mit der Succinimidyl-Gruppe des Fluoreszenzfarbstoffs Indocarbocyanin (Cy3) unter Bildung einer kovalenten Bindung mit den Carbonylgruppen der aktivierten Ester-Gruppe reagieren konnten.

Für die Fluorochromierung der MT wurde 0,8 mg in 40 µl wasserfreiem DMSO gelöstes Cy3 zur Probe gegeben und bei 37°C für 30 min inkubiert. Die Probe wurde dabei etwa alle 3 min geschüttelt. Die Fluorochromierung erfolgte im polymerisierten Zustand des Tubulins, um die für die MT-Bildung wichtigen Aminosäurereste vor einer Fluorochromierung zu schützen.

Die Reaktion wurde mit 0,5 ml 37°C-warmen Quench-Puffer (zweifacher BRB80-Puffer, 100 mM Kaliumglutamat, 40% (v/v) Glycerol) gestoppt. Dabei protonierte der schwach saure physiologische pH-Wert des BRB80-Puffers die freien Aminogruppen des Proteins, sodass die Reaktion stoppte. Zusätzlich reagierte die unprotonierte Form des Kaliumglutamats mit den noch verbliebenen Succinimidyl-Gruppen des Cy3. Die Probe wurde auf 2 x 2,2 ml pH 6,8-Kissen (60% (v/v) Glycerol in BRB80) verteilt und im TLA100.4-Rotor mit 70.700 UpM für 30 min bei 37°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Kissen zweimal mit Wasser gewaschen und entfernt.

Danach wurde das funktionelle Tubulin durch einen weiteren Zyklus von Polymerisation und Depolymerisation gereinigt. Die sedimentierten MT wurden dazu mit 0,5 ml 4°C kalten Glutamat-Puffer (50 mM Kaliumglutamat, 0,5 mM $MgCl_2$, pH 7) je Röhrchen für 30 min depolymerisiert und mit 80.750 UpM bei 0°C für 10 min im TLA100.4-Rotor zentrifugiert. Die vereinigten Überstände wurden für die erneute Polymerisation des funktionellen Tubulins mit 250 µl fünffachem BRB80-Puffer verdünnt, mit 4 mM $MgCl_2$, 1 mM GTP und 1/3 Probenvolumen Glycerol versetzt und für 45 min bei 37°C inkubiert. Die MT wurden dann durch 2 x 1 ml 37°C-warme pH 6,8-Kissen (60% (v/v) Glycerol in BRB80) mit 70.000 UpM für 30 min bei 37°C im TLA100.4-Rotor zentrifugiert. Das Kissen wurde vor dem Absaugen zweimal mit warmem BRB80-Puffer gewaschen. Das Sediment wurde zweimal mit ca. 1 ml

warmen BRB80-Puffer gewaschen, um das Glycerol zu entfernen. Die Cy3-MT wurden auf Eis mit 100 µl BRB80 je Röhrchen für 25 min depolymerisiert und im TLA100 mit 100.000 UpM für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Das Cy3-Tubulin wurde in 5 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Herstellung der MT wurde Tubulin oder Cy3-Tubulin mit einer Konzentration von 2,4 mg/ml durch Zugabe von 1 mM GTP und 20 µM Taxol für 45 min bei 37°C in BRB80-Puffer polymerisiert. Für das Transport-Testsystem wurde es 1:30 in BRB80 mit 20 µM Taxol verdünnt (Mitchison & Kirschner, 1984).

Bei Verwendung des Filterblocks 2 des Leica DM IBRE Systems (vgl. Kap. 4.1.2, S. 23) wurde der Cy3-Fluoreszenzfarbstoff mit dem Bandpassfilter (515–560 nm) ausreichend angeregt (Abb. 4.3). Von der orangefarbenen Cy3-Fluoreszenz mit ihrem Maximum von 570 nm konnte nur der Anteil mit einer Wellenlänge größer als 590 nm den Langpassfilter passieren. Dieser Anteil entsprach ca. 40% der über die Wellenlänge integrierten Gesamtfluoreszenzintensität. Zur Bestimmung der Fluorochromierungsrate wurde der Quotient aus der Cy3-Konzentration des fluorochromierten Tubulins und der Tubulinkonzentration gebildet. Die Tubulinkonzentration wurde aus der Absorption bei 280 nm mit einem Extinktionskoeffizienten von $115.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bestimmt. Wobei die Tubulin-Absorption um die Absorption des Farbstoffs bei 280 nm, die etwa 8% der Absorption des Farbstoffs bei 552 nm entspricht (Produktinformation, Amersham Biosciences), korrigiert wurde. Zur Ermittlung der Cy3-Konzentration wurde $150.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bei 552 nm als Extinktionskoeffizient verwendet. Bei der erzielten Fluorochromierungsrate von 0,2 bis 0,3 Cy3-Fluorochromen pro Tubulin-Dimer konnten die MT bei einer Belichtungszeit von 1 s sehr gut visualisiert werden (Keating et al., 1997).

4.2.3.4 Herstellung cytosolischer Extrakte

Als Quelle für die Motorkomponenten und ihre Kofaktoren dienten cytosolische Extrakte aus Rattenorganen und Froscheiern. Für die funktionellen *in vitro* Tests mit aktiven Motoren wurde ATP hinzu gegeben und der ATP-Spiegel mit einem ATP-regenerierenden System konstant gehalten. Bei der Fluoreszenzmikroskopie entsteht reaktiver Sauerstoff. Das photooxidative Ausbleichen und die eventuelle Schädigung der funktionellen Komponenten des *in vitro* Transport-Testsystems sollten durch enzymatische Umwandlung des reaktiven Sauerstoffs mittels Glukose-Oxidase und Katalase verringert werden.

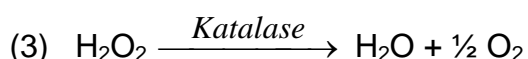
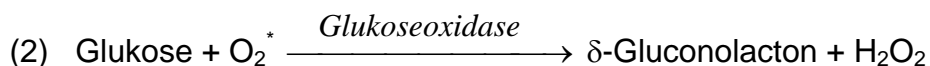
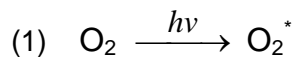
4.2.3.4.1 Cytosolpräparation aus Froscheiern

Cytosolische Extrakte wurden in Zusammenarbeit mit Viktoria J. Allan (University of Manchester, UK) aus *Xenopus laevis* Eiern gewonnen bzw. freundlicherweise zur Verfügung gestellt und in 50 µl Aliquots bei -80°C gelagert. Geschlechtsreife weibliche Frösche wurden

hierzu mit Gonadotropin zur Ovulation stimuliert. Um Interphasen-Extrakte zu erhalten, wurde die Gallertschicht der frisch gelegten, unbefruchteten Eier entfernt und durch einen elektrischen Schock eine vorübergehende Permeabilisierung der Plasmamembran erzeugt. Durch den Eintritt von extrazellulärem Calcium wurde eine Befruchtung simuliert, sodass die unbefruchteten Eier von der Metaphase in die Interphase übergehen, in der sie dann mit 100 µg/ml Cycloheximid fixiert wurden. Zum schonenden Öffnen wurden die Eier mit 10 µg/ml Cytochalasin behandelt und zentrifugiert (Murray, 1991).

Die frisch aufgetauten Aliquots wurden zwei bis dreifach mit Acetat-Puffer (100 mM K-Acetat, 3 mM Mg-Acetat, 5 mM EGTA, 10 mM HEPES, pH 7.4) verdünnt, der 150 mM Saccharose enthält. Der verdünnte Extrakt wurde dann mit 1/20 Volumen E-Mix (150 mM Kreatinphosphat, 20 mM ATP, 20 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, pH 7.7) versetzt und mit 55.000 UpM für 30 min bei 4°C im TLA100-Rotor zentrifugiert. Der Überstand mit den löslichen cytosolischen Faktoren wurde vorsichtig, ohne die Lipide auf der Oberfläche, bis auf 1/3 Volumen abgesaugt, entsprechend der durchgeführten Experimente in Acetat-Puffer mit 150 mM Saccharose verdünnt, und mit 5 mM DTT versetzt. Zur Reduktion der MT Polymerisation wurden 50 µM Nocodazol verwendet (Tabelle 4.2).

Die Fluoreszenzintensität der Fluorochrome, die Stabilität der fluorochromierten MT und die mechanochemische Funktion der Motorproteine kann bei der Fluoreszenzmikroskopie durch photochemisch angeregten Sauerstoff beeinträchtigt werden. Die Zugabe eines so genannten „*oxygen scavenging system*“, das aus Katalase, Glukoseoxidase und Glukose besteht, verringert die durch den sehr reaktiven Singulett-Sauerstoff (O₂^{*}) verursachte Oxidation organischer Doppelbindungen (Bouin et al., 1976; Kishino & Yanagida, 1988; Pollock et al., 1998). Der Singulett-Sauerstoff entsteht durch Lichtanregung von Triplett-Sauerstoff (1). Dieser Vorgang wird durch angeregte Farbstoffmoleküle katalysiert (Holleman et al., 1985). Die Glukose wird durch die Glukoseoxidase zum δ-Gluconolacton bzw. Gluconsäure oxidiert, wobei Wasserstoffperoxid entsteht (2), das durch die Katalase in Wasser und Sauerstoff umgewandelt wird (3). Das führt netto zum Absinken der Sauerstoffkonzentration in der Pufferlösung.



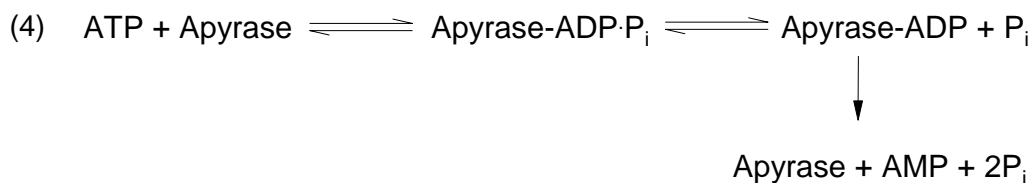
Hierzu wurde eine 50fache Sauerstoffradikalfänger-Stammlösung aus 5 mg/ml Glukoseoxidase, 0,9 mg/ml Katalase und 115 mg/ml Glukose in PBS-Puffer mit 50% Glycerol angesetzt, bei -20°C gelagert (Bouin et al., 1976; Kishino & Yanagida, 1988) und für

die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen der Kapsidbeweglichkeit zu dem Cytosol gegeben (Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2: Zusätze der *Xenopus* Cytosole für die einzelnen Testsysteme

Experiment	Cytosol [mg/ml]	PI	Hexokinase	Apyrase	DNase	RNase	ND	Dynamitin
Motor Bindungs-Testsystem und EM	0.1 – 0.3	+	+	-	+	+	+	-
MT Bindungs-Testsystem	3.1	-	+	-	-	-	-	-
<i>in vitro</i> Transport	2.5	-	-	+/-	-	-	-	+/-

Das cytosolische ATP wurde entweder durch 10 U/ml Apyrase oder durch 20 U/ml Hexokinase in Anwesenheit von 10 mM Glukose hydrolysiert (Tabelle 4.2). Die Apyrase dephosphoryliert das ATP bis zum AMP, wobei es bei dieser Stufe der Dephosphorylierung keine Rückreaktion durch die Apyrase gibt (4; Komoszynski & Wojtczak, 1996). Wenn man von der Aktivität cytosolischer Phosphatasen absieht, sollte sich damit das ATP nahezu quantitativ entfernen lassen.



Alternativ wurde für die *in vitro* Bindungstests auch Hexokinase zur ATP-Hydrolyse eingesetzt. Hier wurde das ATP unter Phosphorylierung der Glukose zum ADP dephosphoryliert.

Die Inaktivierung des Dynactins im Cytosol erfolgte mit 1 mg/ml rekombinantem Dynamitin in MonoQ Elutionspuffer (40 mM Bis-trispropan, pH 7.0, 10% Glycerol, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.01% Tween 20, 200 mM KCl), welches freundlicherweise von Thorsten Wittmann (EMBL Heidelberg, Deutschland, jetzt The Scripps Research Institute, La Jolla, USA) und Tom Surrey (EMBL Heidelberg, Deutschland) zur Verfügung wurde. Dynamitin zerstört im Überschuss den Dynactin-Komplex und inhibiert damit die Dynactin-abhängige Motoraktivität des Dyneins (Echeverri et al., 1996; Eckley et al., 1999; Wittmann & Hyman, 1999). In parallelen Experimenten dienten die Zugabe von 1 mg/ml BSA in MonoQ Elutionspuffer oder 1 mg/ml BSA in Acetat-Puffer mit 150 mM Saccharose als Kontrollen.

Um die Resuspension der Kapside im Cytosol zu erleichtern, wurden in den Bindungsexperimenten noch 100 µg/ml DNase II und/oder 100 µg/ml RNase und 10 mM MgCl₂ hinzugegeben (Tabelle 4.2). Aus den Kapsiden austretende DNA könnte zur Aggregation der Kapside während der Sedimentation und zu einer unspezifischen Kosedimentation der Motoren in den Experimenten zur Motorbindung führen. Auch könnte zelluläre DNA und RNA während der Präparation an die Kapside binden und in den Experimenten stören.

Eventuell in den Extrakten oder Cytosolen vorhandene Membranen wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiIC₁₈ (Abb. 4.4) nachgewiesen.

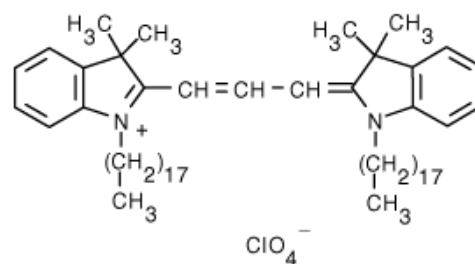


Abb. 4.4: DiIC₁₈ Fluoreszenzfarbstoff (933,88 kDa), Strukturformel. Maximale Absorption bei 549 nm, maximale Emission bei 565 nm

Dabei steigt die Fluoreszenzintensität des in die Membranen interkalierenden Farbstoffs in der unpolaren Umgebung an, so dass die Membranen selektiv visualisiert werden (Cabrini & Verkman, 1986; Guillet & Kimmich, 1981; Sims et al., 1974). Dabei wurden je 1 µM Farbstoff zum *Xenopus* Extrakt gegeben. Das DiIC₁₈ lag dabei in einer 1:100 Stammlösung in DMSO vor und wurde zu dem unverdünnten Extrakt gegeben, um eine ausreichende Interkalation des Fluoreszenzfarbstoffs in die Membranen sicherzustellen. Dann wurde der Extrakt nach 30 min Inkubation bei RT 1:4 in Acetat-Puffer mit 150 µM Saccharose verdünnt, mit E-Mix versetzt und wie oben beschrieben zentrifugiert. Das Sediment wurde in Acetat-Puffer mit 150 mM Saccharose resuspendiert und zusammen mit der oberen Hälfte des Überstandes mit dem Zeiss Axiovert 200 System (vgl. Kap. 4.1.2, S. 23) bei der Anregungswellenlänge von 535 nm auf fluoreszierende Partikel untersucht. Als Negativkontrolle wurde Acetat-Puffer mit 150 mM Saccharose anstatt des *Xenopus* Extrakts verwendet und genauso behandelt. Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden 1,5 µl jeder Probe eingetrocknet und in Mowiol mit DABCO eingebettet. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit dem Zeiss Axiovert 200 System (vgl. Kap. 4.1.2, S. 23) bei 535 nm für 0,5 s.

4.2.3.4.2 Cytosolpräparation aus Rattenorganen

Leber und Hirn wurden ca. 150 g schweren männlichen Wista-Ratten (Zentrales Tierlabor der Medizinischen Hochschule Hannover) entnommen und mit einem Potter-Elvehjem-

Homogenisator in Cytosol-Puffer A bzw. B resuspendiert. Es handelte sich hierbei um eine Tötung zur Organentnahme und war nach §4 des TierSchG kein genehmigungspflichtiger Tierversuch.

Variante A

Cytosol-Puffer A: BRB80-Puffer mit 150 mM Saccharose, 1 mM DTT und Proteaseinhibitoren (4.1.11)

Das Homogenisat wurde mit 10.000 x g für 10 min und der resultierende Überstand mit 100.000 x g für 30 min zentrifugiert. Alle Schritte wurden bei 4°C durchgeführt.

Variante B (Waterman-Storer et al., 1998)

Cytosol-Puffer B: BRB100-Puffer mit 1 mM PMSF, 10 mg/ml Leupeptin, 10 mg/ml Pepstatin A, 10 µg/ml TAME und 0,5 mM MgGTP

Das Homogenisat wurde mit 10.000 x g für 10 min und der resultierende Überstand mit 100.000 x g für 60 min zentrifugiert. Alle Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Der Überstand wurde aliquotiert, schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Die Cytosole wurden für die *in vitro* Motilitätstests mit 1/20 Volumen E-Mix (150 mM Kreatinphosphate, 20 mM ATP, 20 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, pH 7.7) versetzt.

Die Proteinkonzentration in den cytosolischen Extrakten wurde durch die Lichtabsorption eines Bicinchonsäure (BCA)-Kupfer(I)-Komplexes (vgl. 4.1.11, S.29) bei 562 nm photometrisch bestimmt. Dabei reduzierten die Proteine das Kupfer(II) (Reagenz B) zu Kupfer(I), welches dann mit zwei Bicinchonsäure-Molekülen (Reagenz A) komplexierte.

4.2.3.5 Nachweis von unmarkiertem Tubulin und Aktin

Das verwendete *Xenopus* Cytosol enthielt Tubulin und Aktin, welches unter den Bedingungen des *in vitro* Testsystems für den Kapsidtransport polymerisieren könnte. Um die Mengen an unmarkierten MT und filamentösen Aktin zu bestimmen, wurden die Reaktionsgemische in Kammern eines *in vitro*-Transport-Testsystems fixiert und mit Antikörpern gegen Tubulin und Aktin markiert.

Aufgrund der Methanolfixierung der am Deckgläschen gebundenen Strukturen wurde hier kein Hochvakuumfett für die Herstellung der mikroskopischen Perfusionskammer verwendet. Die *Xenopus*-Cytosole mit Proteinkonzentrationen zwischen 1 und 5 mg/ml wurden in verschiedene Kammern perfundiert und für 30 min inkubiert. Als Kontrolle für die F-Aktin Bildung wurde FITC-Phalloidin (1:50 Verdünnung) zum Cytosol gegeben. Phalloidin ist ein toxisches zyklisches Heptapeptid aus dem grünen Knollenblätterpilz (*Amanita phalloides*), welches stärker an filamentösen als an monomeren Aktin bindet und das Gleichgewicht der Aktin-Polymerisation stärker zum F-Aktin hin verschiebt. Die kritische

Konzentration für die F-Aktin Bildung wird dadurch herabgesetzt (Cooper, 1987). Dann erfolgte eine 5minütige Fixierung mit -20°C kaltem Methanol. Danach wurde dreimal bei RT mit PBS gewaschen, und unspezifische Bindungsstellen wurden für 30 min mit Blockierungspuffer (10% (v/v) Ziegen Serum in PBS) blockiert.

Die Mikrotubuli und das F-Aktin wurden mit in Blockierungspuffer (10% Ziegen Serum in PBS) verdünntem DM1A, einem monoklonalen Antikörper gegen Tubulin, und MAB1501, einem monoklonalen Antikörper gegen Aktin, in verschiedenen Kammern markiert (vgl. Kap. 4.1.7, S.26).

Die Antikörper-Verdünnungen wurden hierzu mit 14.000 UpM in einer Tischzentrifuge (Eppendorf 5415C) zentrifugiert und als vorgelegter Tropfen mit den Deckgläschen für 30 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Deckgläschen mit dem sekundären Antikörper für 30 min inkubiert. Hierfür wurde ein Ziege α -Maus FITC-Konjugat für beide primären Antikörper in Blockierungspuffer verdünnt (vgl. Kap. 4.1.7, S.26). Die sekundären Antikörper wurden wie die primären Antikörper zentrifugiert, inkubiert und mit PBS gewaschen. Der letzte Waschschrift erfolgte mit A. bidest. Die Deckgläschen wurden in 30 μ l Mowiol mit 25 mg/ml DABCO eingebettet. Mikroskopiert wurde mit dem Leica DM IBRE System (vgl. Kap. 4.1.2, S. 23). Zum Visualisieren der Cy3 markierten MT wurde dabei der Filterblock 2 und für das Antikörper-markierte Tubulin und Aktin der Filterblock 1 verwendet.

4.2.3.6 HSV1-Kapsidtransport *in vitro*

Die in Zellen beobachtete Motilität von HSV1 Partikeln sollte in einem zellfreien System mit den GFP-markierten Kapsiden rekonstruiert und biochemisch charakterisiert werden.

Zur Untersuchung des MT-vermittelten *in vitro* Kapsidtransports wurden aus Deckgläschen der Dicke 0,13 bis 0,16 mm und der Größe 20 x 20 mm mikroskopische Perfusionskammern hergestellt. Vor ihrer Verwendung wurden sie im Ultraschallbad für je 30 min mit Haushaltsspülmittel, Extran AP 12, A. bidest. und 100%igen Ethanol gereinigt und in 100%igen Ethanol gelagert. Die Deckgläschen wurden durch Zentrifugation (ca. 5 min bei 2000 rpm in der Eppendorfszentrifuge 5810 R) getrocknet und mit zwei ca. 25 mm langen parallelen Streifen Hochvakuumfett auf einem 76 x 26 mm Objektträger befestigt, wobei TESA-Film als Abstandhalter zwischen dem Deckgläschen und dem Objektträger diente. Der Flüssigkeitsaustausch erfolgte durch Perfusion der Lösungen von der einen Seite der ca. 5 μ l großen Kammer und Absaugen der Flüssigkeit mit Filterpapier von der anderen Seite. Vor dem Anheften der MT wurde die Kammer mit 10 mg/ml BSA in BRB80 für 10 min oder mit 2,5 mg/ml DEAE-Dextran in Wasser für 5 min beschichtet. Nach dem Waschen mit 3 x 20 μ l BRB80-Puffer wurden die Cy3-MT (vgl. Kap. 4.2.3.3, S.34) in die Kammer gegeben. Die Kammer wurde nach 20 bis 30 min für die BSA Beschichtung und nach 5 min für die DEAE-Dextran Beschichtung zweimal mit 20 μ l BRB80-Puffer, der 20 μ M Taxol und OSS

aus Glukoseoxidase, Katalase und Glukose enthielt (Kap. 4.2.3.4.1, S.37), gewaschen. Um unspezifische Bindungen der Kapside am Glas zu reduzieren wurde, die Kammer mit 4 mg/ml Casein in BRB80-Puffer beschichtet. Nach der Zugabe der in Cytosol resuspendierten Kapside (vgl. Kap. 4.2.3.1, S.31) wurde die Kammer mit Hochvakuumfett verschlossen und für 15 min bei RT inkubiert.

4.2.3.7 Digitale Zeitverlaufs-Fluoreszenzmikroskopie und Bildanalyse

Für die Aufnahme der Bilder wurde eine CCD-Kamera verwendet. Dabei wurde die Energie schwacher Lichtsignale auf einer Chipoberfläche mit etwa 0,5 Megapixel durch den photoelektrischen Effekt in ein quantitatives elektrisches Signal (Photoelektronen) umgewandelt, wobei die maximale Quantenausbeute (Elektronen pro Lichtquant) von etwa 40% bei einer Wellenlänge von 510 nm erreicht wurde. Dies entsprach der Emissionswellenlänge des für die Kapsidmarkierung verwendeten GFPs.

Um ein schnelles Auslesen des Chips und damit eine hohe zeitliche Auflösung bei maximaler Exposition der einzelnen photosensitiven Bildpunkte zu ermöglichen, sind die Pixel in Reihen angeordnet zu denen Registerreihen als Speichermedium parallel liegen. Nach der Belichtung des Chips wurde das photoelektrische Signal jedes Pixels in das dazugehörige Register der angrenzenden Registerreihe übertragen und zeilenweise mit einer Ausleserate von 5 MHz ausgelesen. Das entsprach einer maximalen Blidausleserate bei dem gesamten Ausschnitt mit 582 Pixel x 782 Pixel von 11 Bildern/s oder etwa 0,1 s/Bild. Dabei fand gleichzeitig eine neue Belichtung der photosensitiven Bildpunkte statt. Desweiteren lassen sich die Pixel durch die direkt angrenzenden Registerreihen schnell auslesen, ohne dass es zu einem Verschmieren des Signals kommt. Um das Signal-Rausch-Verhältnis zu reduzieren wurde die CCD-Chipoberfläche thermoelektrisch auf -15°C gekühlt.

Das vom Chip kommende Signal wurde dann für die digitale Bildverarbeitung über einen Analog-Nach-Digital-Wandler (A/D-Wandler) in ein 12 bit-Signal konvertiert. Dabei wurde das analoge Signal in $2^{12} = 4096$ Graustufen eingeteilt. Die visuelle Darstellung durch einen Monitor war allerdings auf 8 bit bzw. $2^8 = 256$ Graustufen begrenzt, so dass für die Bildanalyse aus den möglichen Graustufen ein geeigneter Bereich von Hand ausgewählt wurde (MicroMAX 5 MHz, Operation manual, Princeton Instruments, inc. Version 2, Revision B, March 8, 1999).

Zur Visualisierung der fluoreszierenden Komponenten war die Kamera mit einem inversen Epifluoreszenzmikroskop (Leica DM IBRE System, vgl. Kap. 4.1.2, S.23) verbunden. Dabei gelangte das Licht über den Anregungsfilter des jeweiligen Filterblocks über ein 40x oder 100x Immersionsöl-Objektiv auf die Probe. Die Aufzeichnung wurde dabei durch das Programm MetamorphTM gesteuert. Beim Transport-Testsystem wurden 3 bis 4 Filme mit 150 bis 200 Einzelbildern und einer Dauer von 4 bis 5 min von zufällig

ausgewählten Bildausschnitten mit einem Filtersatz für GFP-Fluoreszenz (vgl. Kap. 4.1.2, S.23) aufgenommen. Die Bestrahlung der Probe wurde mit einem mechanischen Verschluss (UniBlitz *Shutter*, Vgl. Kap. 4.1.2, S.23), der sich direkt vor der Quecksilberdampfampe befand und von dem Programm MetaMorph™ (vgl. Kap. 4.1.10, S.29) gesteuert wurde, auf Belichtungszeiten von 0,8 bis 1 s begrenzt. Die zeitliche Auflösung betrug 1,4 bis 2 s. Um die Organisation der Cy3-MT zu dokumentieren, wurde am Ende der Aufzeichnung ein Bild mit einem für Cy3 geeigneten Filtersatz gemacht (vgl. Kap. 4.1.2, S.23).

Die xy-Positionen des hellsten Pixels der fluoreszierenden Partikel im Film wurden „von Hand“ mit der MetaMorph™-Funktion „track points“ bestimmt. Wenn sich ein Partikel während der Messzeit um mehr als ein 1 µm vom Startpunkt entfernt hatte, wurde es in die quantitative Auswertung einbezogen. Eine Bewegung wurde detektiert, wenn in zwei aufeinander folgenden Bildern eine Translokation von mehr als einem Pixel erfolgte. Eine ununterbrochene Folge von Translokationen wurde als „Laufstrecke“ und die Gesamtstrecke, die ein Partikel während eines Films zurücklegte, als „Bahn“ bezeichnet (vgl. Kap. 5.3.5, S.78; Abb. 5.17). Aufgrund von Pausen in der Bewegung war die Anzahl der Laufstrecken höher als die Anzahl der mobilen Partikel. Aufgrund unterschiedlicher Aufzeichnungsbedingungen (räumliche und zeitliche Auflösung) konnten nicht alle Experimente direkt miteinander verglichen werden. Allerdings waren die Bedingungen innerhalb eines Experiments für alle Filme mit verschiedenen Parametern identisch.

4.2.4 Kapsidbindung an Mikrotubuli

Anstelle des *in vitro* Transportes wurde in einem schneller auszuwertenden Testsystem die Bindung unterschiedlicher Kapside an immobilisierten MT untersucht. Die Messgröße war dabei das Ausmaß der Kollokalisierung zwischen Kapsiden und MT. Um die Motoren in einen inaktiven aber MT-bindenden Zustand zu überführen, wurde das im Cytosol enthaltene ATP mit Hexokinase in ADP umgewandelt (vgl. Kap. 4.2.3.4.1, S.37).

Im Unterschied zum Kapsidtransport-Testsystem (vgl. Kap. 4.2.3.6, S.42) wurden die Kammern hier mit unmarkierten MT beschichtet und kein Hochvakuumfett für die Herstellung der Perfusionskammer verwendet. Die in Cytosol der Konzentration von 3 mg/ml resuspendierten nukleären oder mit 1 M KCl extrahierten HSV1-GFPVP26-Kapside (vgl. Kap. 4.2.3.1, S. 31) wurden in die Kammer perfundiert und für 30 min inkubiert. Dann erfolgte eine Fixierung mit -20°C kaltem Methanol für 5 Minuten. Danach wurde dreimal bei RT mit PBS gewaschen und unspezifische Bindungsstellen wurden für 30 min blockiert (vgl. Kap. 4.2.3.5, S.41).

Die Immunmarkierung wurde wie bereits in Kap. 4.2.3.5 (S.41) beschrieben durchgeführt. Zur Markierung der Kapside wurde der polyklonale Antikörper α -LC in Blockierungspuffer (vgl. Kap. 4.1.7, S.26 und 4.2.3.5, S.41) verwendet. Die MT wurden mit in

Blockierungspuffer verdünntem DM1A, einem monoklonalen Antikörper gegen Tubulin (vgl. Kap. 4.1.7, S.26), visualisiert. Hierfür wurde ein Ziege α -Kaninchen-Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-Konjugat für die Kapsid Antikörper und ein Ziege α -Maus-Lissamin-Rhodamin-Sulfonylchlorid (LRSC)-Konjugat für die Tubulin Antikörper verwendet, beide in einer 1:400 Verdünnung in Blockierungspuffer.

Mikroskopiert wurde mit dem Zeiss Axiovert 200 System (vgl. Kap. 4.1.2, S. 23). Dabei wurden pro Deckgläschen mit dem jeweiligen Kapsidtyp 5 zufällige Bildausschnitte der Größe 140,9 μm x 106,5 μm mit dem 63x Objektiv und dem dualen Anregungsfilter (vgl. Kap. 4.1.2, Zeiss Axiovert 200 System, Filterblock 3) aufgenommen.

4.2.5 Bestimmung der Mikrotubulilänge

Zur Bestimmung der MT-Länge wurde nach dem Prinzip der Stereologie (Griffiths, 1993) ein digitales quadratisches Gitter mit einem Linienabstand von $D = 55$ Pixel in einer zufälligen Orientierung über den Bildausschnitt gelegt (Abb. 4.6).

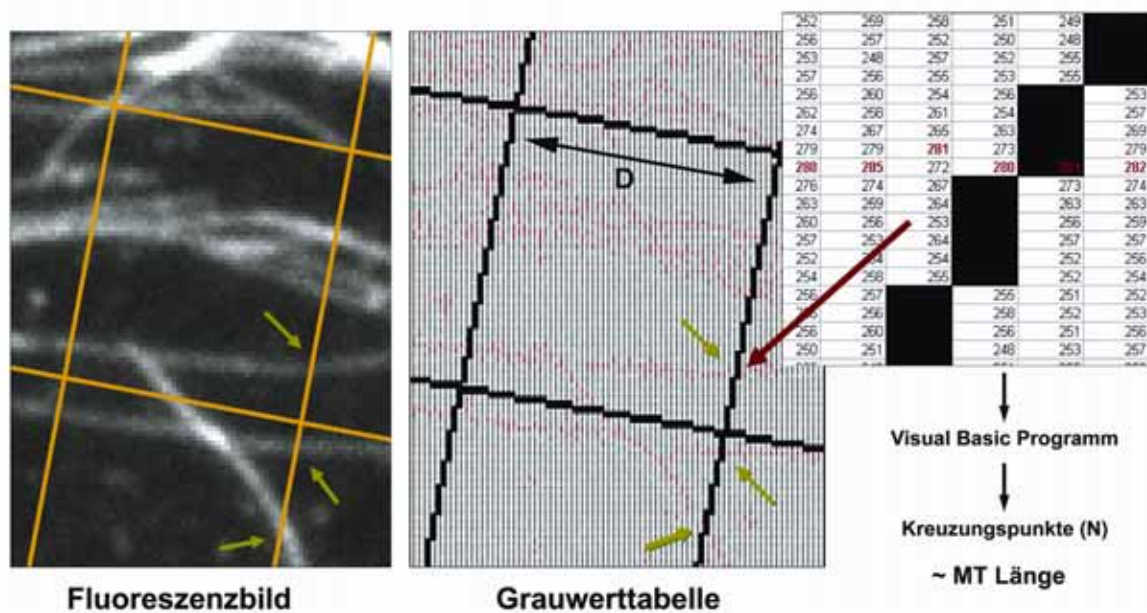


Abb. 4.6 : Stereologische Bestimmung der MT-Länge. Die hellen Filamente im Fluoreszenzbild stellen die MT dar. Die größten Grauwerte der MT sind in der Grauwerttabelle als rote Zahlen angegeben. Als Beispiel sind einige Kreuzungspunkte (N) der MT mit dem quadratischen Stereogitter der Gitterweite (D, gelb bzw. schwarz) durch grüne Pfeile markiert.

Die Anzahl der sich daraus ergebenden Kreuzungspunkte (N) mit den MT ist direkt proportional zur Länge der MT (l).

$$l [\mu\text{m}] = N \times D \times \text{Pixelgröße} \times \text{Vergrößerungsfaktor}$$

Der Vergrößerungsfaktor entspricht in etwa dem Kehrwert der vom Hersteller angegebenen Objektivvergrößerung. Die Pixelgröße ist abhängig vom CCD Sensor und ist für die verwendeten Kameras unter 4.1.2 (S.23) aufgeführt. Die Überlagerung eines Gitters über die MT und das Auszählen der Kreuzungspunkte erfolgte mit einem selbstgeschriebenen in MS Excel eingebundenen Visual Basic Programm. Das Programm ist im Anhang Kap. 8.3, S. 127 beschrieben und die Programmschritte sind in der Datei auf der beiliegenden CD aufgeführt. Dabei wurden mit Hilfe der TILLVison Software die Grauwerte der Bilder in Excel-Tabellen übertragen. Der Zelleninhalt entsprach dabei dem Grauwert des dazugehörigen Pixels. Die Bilder wurden in drei Tabellen mit 256 x 582 Zellen (Bilder der MicroMax Kamera mit 782 x 582 Pixel) oder in 5 Tabellen mit 256 x 520 Zellen (Bilder der TILL Imago Kamera) aufgeteilt. Einige dieser Zellen wurden dem quadratischen Gitter zugeordnet. Das Gitter wurde dabei um drei verschiedene durch eine Visual Basic Zufallsfunktion bestimmte Winkel gedreht. Die Gitterzellen, die mit den höchsten Grauwerten (Abb. 4.6, rote Zahlen) der MT übereinstimmten, wurden als Kreuzungspunkte (N) gezählt.

4.2.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die analytische Auftrennung von Proteinen wurde mit der SDS-PAGE nach Laemmli durchgeführt (Laemmli, 1970). Dafür wurden 9 cm x 6 cm Gele der Dicke von 0,75 mm und einem linearen 7,5-18%igen Polyacrylamidgradienten verwendet. Die Stammlösung bestand aus 30% (w/v) Acrylamid und 0,8% (w/v) Bisacrylamid (Rotiphorese™ Gel 30). Die Auftrennung der Proteine wurde mit einer Stromstärke von 25 mA pro Gel für ca. 1 h unter Wasserkühlung bei ca. 7°C durchgeführt. Als Laufpuffer wurde 25 mM Tris, pH 8,3; 192 mM Glycin; 0,1% (w/v) SDS verwendet.

Coomassie-Färbung:

Superstain	
Coomassie Brilliant Blue G250	1% (w/v)
Coomassie Brilliant Blue R250	1% (w/v)
Essigsäure	10% (v/v)
Methanol	50% (v/v)

Für die Coomassie-Färbung wurde das Gel 1 h in Superstain inkubiert und in kochendem A. bidest. entfärbt.

4.2.6.1 Immunoblot

Der Elektrotransfer der Proteine aus der Polyacrylamid-Matrix auf Nitrocellulose erfolgte für 16 h mit 40 mA oder für 1,5 h mit 400 mA unter Wasserkühlung. Die Gele wurden dazu auf eine Nitrocellulose-Membran zwischen zwei Lagen Whatman-Papier platziert und mit einer Halterung in den mit Transferpuffer (48 mM Tris; 380 mM Glycin; 10% (v/v)

Methanol) gefüllten Tank gehängt. Bis auf die Proteinanalyse bei den Dyneinbindungs-Experimenten mit *Xenopus*-Cytosol und der Proteinanalyse viraler und nukleärer Kapside im Immunoblot enthielt der Transferpuffer 0,1% (w/v) SDS. Der Transfer von VP1-3 erfolgte auch in Gegenwart von 0,1% (w/v) SDS. Die transferierten Proteinbanden wurden durch 20-minütiges Schwenken in einer Ponceau S Färbelösung (0,3% (w/v) Trichloressigsäure, 0,3% (w/v) Sulfosalicylsäure, 0,2% (w/v) Ponceau S) und anschließendem Waschen mit A. bidest. sichtbar gemacht.

Für die Immunmarkierung bestimmter Proteine wurden zunächst unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Nitrocellulose-Membran durch Schwenken für ca. 1 h in Blockierungspuffer (5% (w/v) Magermilchpulver; 0,1% (v/v) Tween 20 in PBS) blockiert. Dann wurde für 1 bis 2 h mit dem in Blockierungspuffer verdünnten primären Antikörper inkubiert und dreimal mit Waschpuffer (0,1 % (v/v) Tween 20 in PBS-Puffer) gewaschen. Der sekundäre Antikörper wurde ebenfalls in Blockierungspuffer verdünnt, auf die Membran gegeben und für 1 h auf dem Wippschüttler geschwenkt. Es wurden dabei anti-Maus und anti-Kaninchen Alkalische-Phosphatase-Konjugate oder anti-Schaf, anti-Kaninchen und anti-Maus Meerrettich-Peroxidase-Konjugate verwendet.

Für die Visualisierung von Proteinbanden erfolgte nach dem Waschen für zweimal 10 min mit Waschpuffer eine Äquilibrierung in TSM-Puffer (100 mM Tris; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; pH 9,5) für 10 min. Die Färbereaktion entstand nach Zugabe der Substratlösung:

Substratlösung der Alkalischen Phosphatase

NBT-Lösung	33 µl
BCIP-Lösung	61 µl
TSM-Puffer	10 ml
Nitroblue Tetrazolium Salz (NBT)	50 mg/ml in 70% (v/v) N,N'-Dimethylformamid
5-Brom-4-chlorindolyl-3-phosphat (BCIP)	50 mg/ml in N,N'-Dimethylformamid

Für den Nachweis der Banden über Chemilumineszenz wurden mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugierte sekundäre Antikörper verwendet. Der Nachweis erfolgte mit dem ECLplus-*Detection Kit*. Die Membran wurde für einmal 15 min und dreimal 5 min in Waschpuffer gewaschen. Nach Absaugen des Puffers von der Membran mit Whatman-Papier erfolgte die Benetzung der Membran mit ca. 0,1 ml/cm² ECLplus-Detektions-Lösung, die aus dem Peroxid-Substrat und Acridan besteht, und einer fünfminütigen Inkubation. Das Acridan wird dabei durch die HRP zum Acridinumester oxidiert, der durch eine weitere Reaktion mit dem Peroxid Chemilumineszenz entwickelt. Die ECL-Lösung wurde danach entfernt und die Membran in einer Klarsichthülle verpackt. Die Lichtsignale konnten nach 5 bis 30 min auf einem für Chemilumineszenz empfindlichen Film nachgewiesen werden.

4.2.6.2 Fluorographie von ³⁵S-markierten Proteinen

³⁵S-markierte Proteine im Polyacrylamidgel wurden durch Szintillation nachgewiesen. Um das Gel für die Szintillatorlösung zu entwässern wurde dreimal für je 20 min in DMSO und dann für 30 min in wasserfreiem frischen DMSO geschwenkt. Danach wurde es für 1 h in Szintillatorlösung (1 M 2,5-Diphenyloxazol in DMSO) imprägniert. Das Ausfällen des PPO erfolgte durch einstündiges Spülen mit Wasser (Bonner & Laskey, 1974). Das Gel wurde getrocknet und ein für Fluorographie empfindlicher Film (vgl. Kap. 4.1.3, S.24) mehrere Tage exponiert.

4.2.7 Bindung cytosolischer Proteine an Kapside

Aus 50 bis 150 µl Mediumsediment mit ca. 2×10^9 PFU/ml wurden virale Kapside wie unter Kap. 4.2.3.1, S. 31 beschrieben präpariert. Von den Gradientenbanden der nukleären Kapside wurden 50 bis 100 µl eingesetzt (vgl. Kap. 4.2.3.1, S.31). Die Probenbereitung erfolgte wie unter 4.2.1.4 beschrieben in *Xenopus* Cytosol mit einer Proteinkonzentration von 0,1 bis 0,3 mg/ml. Die Kapside wurden dabei für 90 min auf Eis inkubiert. Die Behandlung der Sedimente mit Ultraschall erfolgte allerdings erst nach ca. 1 h, um die Resuspension zu erleichtern. Die Proben wurden auf 150 µl eines Kissens aus 30% (w/v) Saccharose in Acetat-Puffer mit 5 mM DTT in mit 10 mg/ml BSA beschichtete Röhrchen gegeben und im TLA100-Rotor mit 50.000 UpM für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Von den Überständen wurden 50 µl abgenommen, der Meniskus mit 50 µl A. bidest gewaschen und beides für die Chloroform/Methanol Fällung vereinigt (Wessel & Flügge, 1984). Die Sedimente wurden durch Resuspension in 100 µl Acetat-Puffer mit 10 mM DTT gewaschen und nach 30minütiger Inkubation im TLA100 Rotor mit 50.000 UpM für 10 min bei 4°C sedimentiert. Sie wurden dann zusammen mit den Überständen in heißem Laemmli-Probenpuffer resuspendiert und mit SDS-PAGE und Immunoblot analysiert. Das hier verwendete Cytosol enthielt 100 µg/ml DNase II (vgl. Kap. 4.1.8, S.27), um eventuell vorhandene aus der Virus-Präparation stammende DNA, welche zur unspezifischen Bindung cytosolischer Komponenten und zur Kapsid-Aggregation führen könnte, abzubauen.

4.2.8 Elektronenmikroskopie

Als Träger der Probe wurden Kupfer-Grids verwendet, die mit amorphem Kohlenstoff bedampft waren. Die in *Xenopus* Cytosol resuspendierten Kapside (vgl. Kap. 4.2.3.1, S. 31) wurden auf Parafilm getropft, und ein Kohlenstoff-beschichtetes Grid wurde auf den Tropfen gelegt. Nach mindestens 30 s Inkubation wurde das Grid durch 5 Tropfen Aqua ad iniectabilia gezogen wurde. Zur Negativkontrastierung wurde es dann in eine 1-2%ige Uranylacetat-Lösung getaucht, die überschüssige Flüssigkeit wurde mit einem Filterpapier abgesaugt und getrocknet. Zur Quantifizierung bzw. Normalisierung der in der Probe

vorhandenen Kapsidtypen wurden 110 nm große Polystyrol-Mikrosphären in einer 1:1000 Verdünnung, was einer Konzentration von $2,7 \times 10^{10}$ Partikel/ml entsprach, dazugegeben. Um die Aggregation der Mikrosphären zu reduzieren, wurden sie in einer 1:100 Vorverdünnung in Acetat-Puffer mit 150 mM Saccharose mit 10 mg/ml BSA beschichtet und mit einer Ultraschallspitze behandelt. Die Aufnahmen wurden mit dem Elektronenmikroskop bei 40.000facher Vergrößerung gemacht. Die Elektronenmikroskopie wurde in Zusammenarbeit mit Jutta Milzer (Institut für Virologie, MHH) durchgeführt.

5 Ergebnisse

Zuerst wurde die Bewegung von GFPVP26-markierten HSV1-Partikeln in lebenden Zellen untersucht. Für die genaue biochemische Charakterisierung des MT-abhängigen Kapsidtransportes wurde ein zellfreies System aus cytosolischen Extrakten, stationären MT und isolierten HSV1-GFPVP26- Kapsiden entwickelt. Die subzelluläre Lokalisation von HSV1 und den MT wurden fluoreszenzmikroskopisch bei unterschiedlichen Wellenlängen mit Zeitverlaufs-Mikroskopie aufgezeichnet. Die aktive ATP- und cytosolabhängige Motilität der Kapside wurde dann zusammen mit Motorbindungstests zur Charakterisierung der für den MT-abhängigen Transport notwendigen zellulären und viralen Proteine verwendet.

5.1 HSV1-Präparation und Charakterisierung

Für die Amplifikation und Herstellung von HSV1-Suspensionen wurden BHK-Zellen mit einer MOI von etwa 0,01 PFU pro Zelle infiziert. Nach etwa 1 bis 2 Tagen bildeten sich Plaques, die durch eine zentrale zellfreie Stelle und eine abgerundete Morphologie der umliegenden Zellen zu erkennen waren. Nach etwa 4 Tagen wiesen alle Zellen eine abgerundete Morphologie auf. Die Trübung des Mediums stieg dabei durch abgelöste Zellen an. Wenn die noch angehefteten Zellen sich durch Klopfen ablösen ließen, wurden sequentiell die Zellen und das extrazelluläre Virus sedimentiert. Bezieht man die geernteten PFU auf die Anzahl der eingesetzten Flaschen (183 cm²) mit BHK-Zellen, so lagen die Titer im Mittel für HSV1-GFPVP26 bei $2,2 \pm 2,0 \times 10^8$ PFU/Flasche (n=8). Im Vergleich dazu lagen die Titer für HSV1(F)-Wildtyp bei $4,3 \pm 2,7 \times 10^8$ PFU/Flasche (n=2) und für HSV1- Δ VP26 bei $2,5 \pm 1,9 \times 10^8$ PFU/Flasche (n=2).

5.2 Transport von HSV1 entlang von MT *in vivo*

Es wurde bereits in Vero-Zellen gezeigt, dass HSV1-Kapside MT-abhängig zum Kern transportiert werden (Sodeik et al., 1997). Dazu wurden die Positionen von in die Zelle eintretenden Kapsiden bestimmt, die zu den unterschiedlichen Zeiten nach der Inokulation fixiert und durch Immunfluoreszenz analysiert wurden. Zum Nachweis der MT-Abhängigkeit für die effiziente Genexpression von HSV1 wurde Nocodazol verwendet (Marozin et al., 2004; Döhner et al., 2002; Mabit et al., 2002; Sodeik et al., 1997).

In dem hier beschriebenen Experiment wurden PtK₂-Zellen, die mit YFP-Tubulin stabil transfiziert worden waren, mit HSV1-GFPVP26 infiziert. HSV1-GFPVP26 hat ein GFP-markiertes Kapsid, dessen VP26 durch GFPVP26 ersetzt ist (Desai & Person, 1998). VP26 ist in Zellkultur nicht essentiell (Desai et al., 1998) und eine effiziente Infektion von PtK₂-Zellen braucht wie beim HSV1-Wildtyp einen MT-vermittelten Transport der Kapside zum Zellkern (Döhner, Schmidt, Radtke und Sodeik; Manuskript eingereicht). PtK₂-Zellen haben

ein relativ großes Volumen und adhären über eine große Fläche an Deckgläschen. Der Abstand von der Plasmamembran in der Zellperipherie zum Zellkern beträgt etwa 10 bis 15 μm .

Die verwendete Zelllinie war mit YFP-Tubulin stabil transfiziert (Pelkmans et al., 2001), so dass die MT gleichzeitig mit den eintretenden HSV1-GFPVP26-Partikeln bei Anregung der GFP-Fluoreszenz (vgl. Kap. 4.1.2, S. 23, Leica DM IBRE System, Filterblock 1) untersucht werden konnten. Die Lage des Zellkerns und des MTOC war durch die das Cytoplasma zum größten Teil ausfüllende MT-Matrix erkennbar (vgl. Kap 8.1, S. 118; Film 1). Die Lokalisation der Viruspartikel wurde im Sekundenbereich mit Zeitverlaufs-Fluoreszenzmikroskopie aufgenommen. Mit diesem System sollte die Dynamik eintretender Viruspartikel zu frühen Zeitpunkten in Abhängigkeit von den MT untersucht werden. Die Experimente mit lebenden Zellen wurden in Zusammenarbeit mit Katinka Döhner und Falk Büttner (Institut für Virologie, MHH) durchgeführt.

Tabelle 5.1: HSV1-GFPVP26-Kapsid-Dynamik beim Eintritt in lebende PtK₂-Zellen. Das Experiment wurde mit einer zeitlichen Auflösung von 1,6 s pro Bild mit dem 100 x Objektiv aufgenommen (Leica DM IBRE System). Die Bahnlänge ist die Gesamtbewegung eines Partikels innerhalb eines Films und die Laufstrecke die Ortsveränderung eines Partikels zwischen zwei Pausen. Angegeben ist der Standardfehler. Die Daten wurden von Falk Büttner (Institut für Virologie, MHH) zur Verfügung gestellt und mit einem in dieser Doktorarbeit entwickelten Visual Basic Programm (vgl. Kap. 8.3, S. 127) ausgewertet.

	mobile Partikel	Bahnlänge [μm]	Geschwindigkeit [$\mu\text{m/s}$]	Laufstrecken [μm]
in Richtung Zellkern (zum Minusende der MT)	114	27,91 \pm 3,30	0,18 \pm 0,00 (n = 11171)	0,91 \pm 0,08 (n = 3489)
in Richtung Plasmamembran (zum Plusende der MT)	70	21,30 \pm 2,58	0,15 \pm 0,00 (n = 6134)	0,67 \pm 0,06 (n = 2224)

2 h nach Ende der Inokulation waren GFP-Partikel erkennbar, die sich mit einer mittleren Geschwindigkeit von etwa 0,18 $\mu\text{m/s}$ retrograd zum MTOC oder mit 0,15 $\mu\text{m/s}$ etwas langsamer anterograd auf einer Strecke von bis zu 21 μm bzw. 28 μm für den retrograden Transport entlang der MT bewegten (Tabelle 5.1, Abb. 5.1, Anhang Film 1). Einige GFP-Partikel waren am Kern und dem MTOC stationär akkumuliert, während andere innerhalb eines Radius von etwa 2 bis 3 μm im Cytoplasma oszillierten (Anhang Film 1, gelber Pfeil; Döhner, Büttner, Wolfstein, Prank, Ewers und Sodeik; Manuskript in Vorbereitung). Die GFP-Partikel bewegten sich 2 h p.i. in beide Richtungen entlang der YFP-MT, was auf die Aktivität zum MT-Plus-Ende und MT-Minus-Ende gerichteter Motoren wie cytoplasmatisches Dynein und Kinesine schließen lässt. Ob es sich bei den hier beobachteten GFP-Partikeln um endocytisierte Viren oder cytosolische Kapside handelte, ließ sich in diesem Experiment nicht klären.

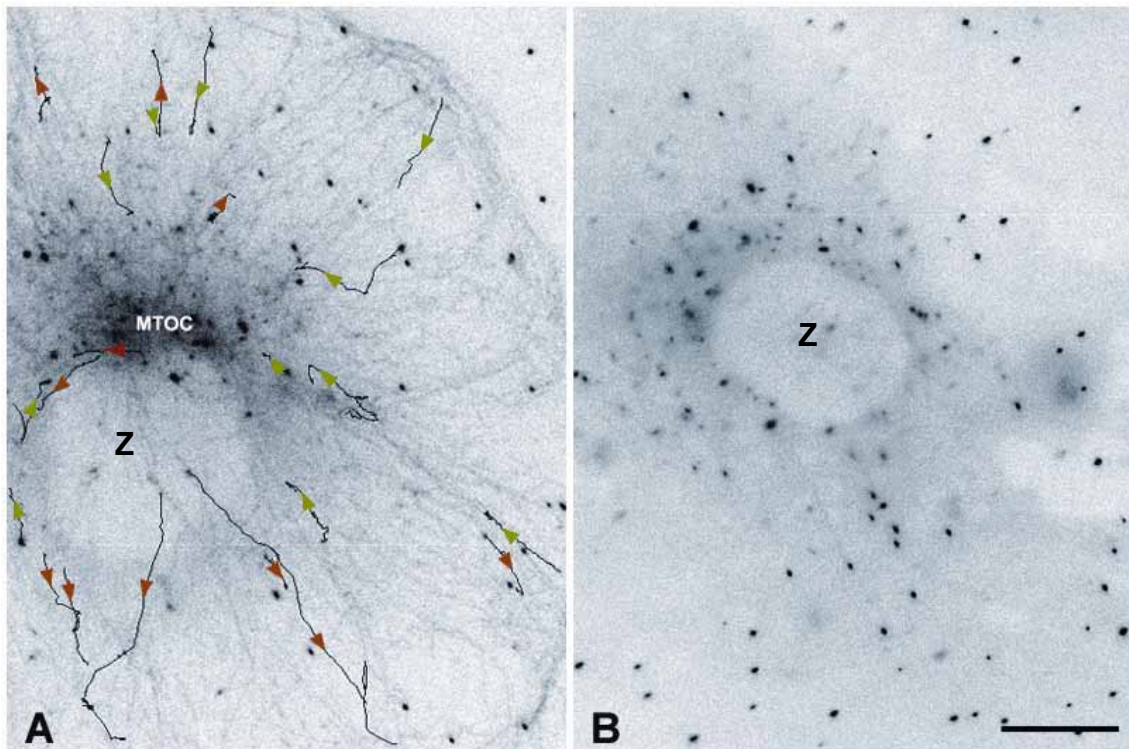


Abb. 5.1: Eintretende HSV1-GFPVP26 Partikel benötigen für ihren Transport ein intaktes MT-Netzwerk. Mit YFP-Tubulin stabil transfizierte PtK₂-Zellen wurden mit HSV1-GFPVP26 für 2 h bei 4°C inkubiert und 2 h bei 37°C inkubiert, um nach der Bindung des Virus an die Plasmamembran den Zelleintritt zu starten. Die Aufnahmen erfolgten bei RT. Der Zellkern ist mit Z markiert.

(A) Die einzelnen GFP-Partikel (schwarze Flecken) bewegten sich entlang linearer Bahnen zum MTOC hin (grüne Pfeilspitzen) oder vom MTOC weg (rote Pfeilspitzen). Die Bahnen der Partikel korrelierten dabei mit den MT (graue Linien).

(B) Nocodazol-Inkubation der Zellen depolymerisiert die YFP-MT und führt zum Verlust der Langstreckentransporte von GFP-Partikeln (schwarze Flecken). Die PtK₂-Zellen wurden dabei mit 27,5 µM Nocodazol bei 37°C für 1h präinkubiert und in Anwesenheit von Nocodazol inkubiert.

Skalierungsbalken: 10 µm

Die Zugabe von Nocodazol führte zur Depolymerisation der YFP-MT und zum Verlust der Langstreckentransporte von GFP-Partikeln (Abb. 5.1 B).

5.3 Entwicklung eines Testsystems für HSV1-Transport entlang von MT

In einem zellfreien System wurde der MT-abhängige Transport *in vitro* präparierter HSV1-Kapside mit motorhaltigem Cytosol ohne Membranvesikel rekonstruiert. So ließ sich ein Membran-assoziiertes Transport ausschließen und mögliche direkte Interaktionen zwischen den zellulären Motorkomplexen und Kapsid bzw. Tegumentproteinen analysieren.

Dazu wurden zunächst fluoreszenz-markierte Mikrotubuli (MT) präpariert und auf einer Glasoberfläche in einer mikroskopischen Perfusionskammer immobilisiert (Abb. 5.2). Die GFP-markierten Kapside wurden dann zusammen mit dem MT-motorhaltigen cytosolischen Extrakt und einem ATP-regenerierenden System dazugegeben. Mit Kapsiden präpariert aus extrazellulären Viren und Cytosol aus *Xenopus laevis* Eiern konnte ein aktiver Kapsidtransport mit digitaler Zeitverlaufs-Fluoreszenzmikroskopie aufgezeichnet werden.

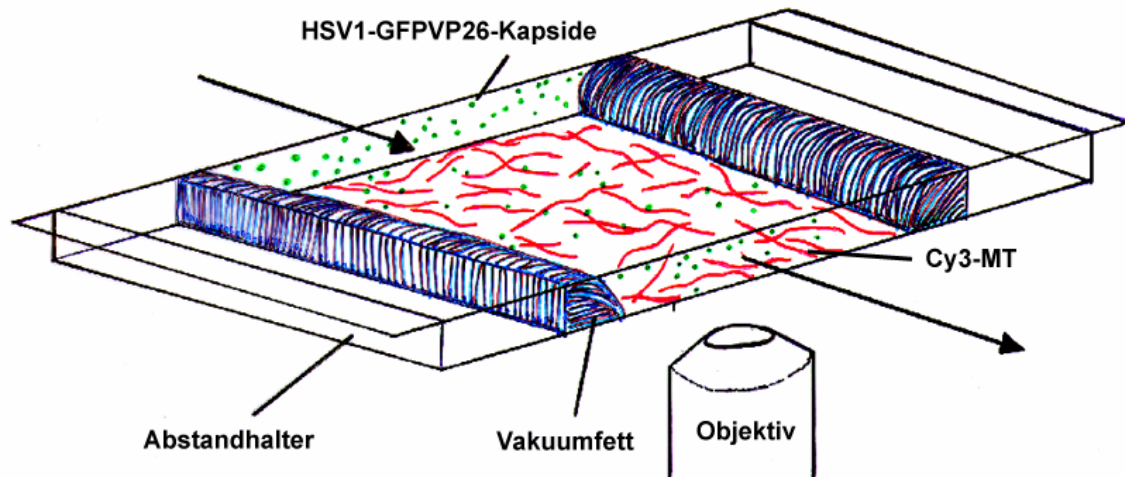


Abb. 5.2: Mikroskopische Perfusionskammer. Zur Untersuchung des MT-vermittelten *in vitro* Kapsidtransportes wurden aus Deckgläschen Perfusionskammern hergestellt. Die Deckgläschen wurden mit zwei parallelen Streifen Hochvakuumfett auf einem Objektträger befestigt, wobei TESA-Film als Abstandshalter zwischen dem Deckgläschen und dem Objektträger diente. Der Flüssigkeitsaustausch erfolgte durch Perfusion der Lösungen von der einen Seite der Kammer und Absaugen der Flüssigkeit von der anderen Seite.

5.3.1 Präparation von Cy3-Mikrotubuli

Zur Herstellung Cy3-markierter MT wurde Tubulin aus cytosolischen Schweinehirn-Extrakten durch wiederholtes Polymerisieren und Depolymerisieren angereichert (Hyman, 1991). Der letzte Reinigungsschritt erfolgte über eine Phosphocellulose-Säule, wodurch die basischen Mikrotubuli-assoziierten Proteine (MAP) entfernt wurden. Bevor Cy3-Tubulin zur Verfügung stand, wurden erste Experimente zur Stabilität fluorochromierter MT mit Rhodamin (Rh) durchgeführt, das wie das Cy3 über Aminogruppen an das Tubulin gekoppelt war (freundlicherweise von Didier Job, Universität Grenoble zur Verfügung gestellt).

Um die MT im *in vitro* Testsystem zu visualisieren, wurde das Fluorochrom Indocarbocyanin 3 (Cy3, Kap. 4.2.3.3, S.34; Abb. 4.2, S.34) kovalent an das Tubulin der MT gebunden. Die trotz Cy3-Kopplung polymerisationskompetenten Tubulindimere wurden nach Depolymerisation der MT durch Repolymerisation des Cy3-Tubulins erhalten. Dabei wurde ein Fluorochromierungsgrad von 0,2 bis 0,3 Cy3-Fluorochromen pro Tubulindimer bei einer Ausbeute von bis zu 30% vom Ausgangsmaterial erzielt.

Für das *in vitro* Kapsidtransport-Testsystem erfolgte eine Polymerisation bei 37°C in Anwesenheit von GTP und 20 µM Taxol, um die MT für die Experimente bei RT zu stabilisieren. Sie konnten mit einer Belichtungszeit von mindestens 1 s für die zunächst durchgeführten Anheftungsstudien sehr gut visualisiert werden.

5.3.2 Stationäre und photostabile fluoreszierende Mikrotubuli

Für die Messung der Dynamik der Kapside waren stationäre MT notwendig, die nicht durch Bestrahlung mit Fluoreszenzlicht zerbrachen. Die fluorochromierten MT wurden mit Licht der Wellenlänge im Anregungsbereich von Cy3 (Bandpassfilter: 515–560 nm,

Filterblock 2 des Leica DM IBRE Systems; vgl. Kap. 4.1.2, S.23) oder mit dem Licht bestrahlt, das durch den GFP-Filter (Bandpassfilter: BP 450-490 nm, Filterblock 1 des Leica DM IBRE Systems; vgl. Kap. 4.1.2, S.23) gelangte.

Das führte sowohl zum Ausbleichen des Farbstoffs durch Zerstörung konjugierter Doppelbindungen als auch zum Zerbrechen der fluoreszenzmarkierten MT. Hierbei depolymerisierten die fluoreszierenden MT speziell bei der Anregungswellenlänge des mit dem Tubulin verbundenen Fluorochroms. Möglicherweise übertrug sich die Radikalbildung im Fluorochrom auf die MT, was zu einer lokalen Destabilisierung und zum Brechen der MT durch thermische Bewegung führte (Leslie et al., 1984; Vigers et al., 1988). Dieser Effekt nahm mit dem Fluorochromierungsgrad des Tubulins zu.

Die Zugabe eines Sauerstoffradikalfängersystems „*oxygen scavenging system*“ (OSS) (Bouin et al., 1976; Kishino & Yanagida, 1988), welches aus Katalase, Glukoseoxidase und Glukose bestand, sollte die durch reaktiven Singulett-Sauerstoff, dessen Bildung durch angeregte Fluorochrome verursacht wurde, hervorgerufene Oxidation von C-C Doppelbindungen reduzieren. Um die Wirkung des OSS auf fluorochromierte MT zu untersuchen, wurden zunächst für erste Experimente Rhodamin-markierte MT an die unbeschichtete Kammeroberfläche geheftet und in An- oder Abwesenheit von OSS und verdünntem Rattenhirncytosol (ca. 4 mg/ml) mit blauem (Filterblock 1, Leica DM IBRE System) oder grünem (Filterblock 2, Leica DM IBRE System) Licht angeregt. Zur Dokumentation der Organisation der MT während der Bestrahlung mit blauem Licht wurde kurz – etwa 1 bis 2 s – in den grünen Kanal geschaltet, um die rote Fluoreszenz des Rhodamins aufzuzeichnen.

Tabelle 5.2 : Auswirkungen der Lichtanregung auf Rh-MT in An- und Abwesenheit von Cytosol und des Sauerstoffradikalfängersystems, „oxygen scavenging system“ (OSS).

	Anregung: 450 – 490 nm (blau)	Anregung: 515 – 560 nm (grün)
- OSS - Cytosol	Ausbleichen der MT innerhalb von 2 min. Nach 80 s keine intakten MT mehr.	Ausbleichen der MT innerhalb von 50 s. Beginn des Zerfalls nach 20 s
- OSS + Cytosol	Nach 4 min keine MT mehr.	Ausbleichen der MT innerhalb von 60 s.
+ OSS - Cytosol	Nach 10 min leichtes Ausbleichen der MT. Kein Zerfallen der MT	MT verschwinden erst nach 3 min durch Ausbleichen.
+ OSS + Cytosol	Nach 15 min leichtes Ausbleichen der MT. Kein Zerfallen der MT	Nach 5 min Ausbleichen der MT. Nach 10 min werden die MT unsichtbar. Kein Zerfallen der MT

Bei der kurzwelligen Bestrahlung, wie sie für die Anregung der GFP-Partikel verwendet wurde, waren die **Rh-MT** in Anwesenheit von OSS für mindestens 10 min sichtbar. In Anwesenheit von Cytosol waren die Rh-MT etwa 15 min sichtbar. Regte man die Rhodaminfluoreszenz an, so begann das Bleichen in Anwesenheit von OSS ohne Cytosol schon nach 3 min, während die MT in Anwesenheit von Cytosol für mindestens 10 min stabil blieben. In Abwesenheit von Cytosol und OSS zerfielen die Rh-MT durch Lichtbestrahlung sowohl mit blauem als auch grünem Licht nach einigen Sekunden. Die Anwesenheit von Cytosol reduzierte den Licht-induzierten Zerfall der Rh-MT, aber um das Ausbleichen zu verringern, war auch OSS notwendig (Tabelle 5-2). Cytosol enthält MT-assoziierte Proteine (MAP), die vermutlich an die MAP-freien MT binden und sie dadurch stabilisierten.

Bei der Untersuchung des *in vitro* Kapsidtransportes (vgl. Kap 4.2.3.7, S.43) wurden die verwendeten **Cy3-MT** am Anfang und am Ende der Messung einige Sekunden mit dem grünen Anregungslicht (515–560 nm) bestrahlt. Während der Aufzeichnung des Kapsidtransportes wurde die Probe bei den Experimenten mit einer hohen Anzahl von beweglichen Partikeln (5–20 mobile Partikel/10.000 $\mu\text{m}^2/\text{min}$) für 0,8 s pro Bild mit dem blauen Licht (450–490 nm) zur Anregung der GFP-Fluoreszenz belichtet. Bei 150 bis 200 Einzelbildern während einer Messung wurde die Probe damit insgesamt für bis zu 280 s mit etwa 0,5 s Intervallen zwischen den Expositionen bestrahlt. Wie bei den Vortests mit den Rh-MT blieben die Cy3-MT in Anwesenheit von Cytosol und OSS intakt und blichen nicht aus. Die quantitative Analyse der Grauwerte der Cy3-MT vor und nach der Aufzeichnung von 8 Ausschnitten in drei verschiedenen mikroskopischen Perfusionskammern ergab keine signifikante Abnahme des Signal-Rauschverhältnisses (Daten nicht gezeigt).

Durch das Radikalfängersystem aus Oxidase und Katalase in Anwesenheit von Cytosol wurden somit sowohl das Zerschneiden der mit Rhodamin als auch der mit Cy3 fluorochromierten MT und das Ausbleichen der Fluorochrome stark reduziert.

Will man die Bewegung einer Fracht entlang von MT untersuchen, so ist es in vielen Fällen sinnvoll, die MT an der Oberfläche des Deckgläschens zu immobilisieren. MT zeigen in Lösung durch die Brown'sche Molekularbewegung hervorgerufene Schwingungen und in Anwesenheit von an der Glasoberfläche gebundenen richtig orientierten aktiven Motoren auch ein Gleiten (Kap. 3.6, S.19, Abb. 3.8 A, Film 2; Allen et al., 1985; Lye et al., 1987; Paschal et al., 1987; Paschal & Vallee, 1987). Wenn man die Bewegung der MT und des Transportgutes gleichzeitig aufzeichnen kann, lässt sich die MT-abhängige Bewegung der Fracht auch auf mobilen MT untersuchen. Die Eigenbewegung der MT erschwert aber eine genaue Bestimmung der Geschwindigkeit.

Bei der hier angewendeten Zeitverlaufs-Fluoreszenzmikroskopie konnte mit dem hier zur Verfügung stehenden Versuchsaufbau die Dynamik der MT nicht parallel zu den Kapsidbewegungen aufgezeichnet werden, so dass zunächst Anheftungsbedingungen etabliert werden mussten, die auch in Anwesenheit von aktiven molekularen Motoren stationäre MT garantierten.

Für die Anheftung von MT an eine mikroskopische Versuchskammer (Abb. 5.1) aus Glas nutzt man die negativ geladenen Carboxyl-Gruppen auf der Oberfläche der MT (Downing, 2000; Luduena, 1998; Nogales, 2000). Hierzu wurde das Deckgläschen mit einer Substanz beschichtet, die positiv geladene Aminogruppen enthält, wie z.B. Diethylaminoethyl-Dextran (DEAE-Dextran) (Murray et al., 2000; Rogers et al., 1997), α -Aminopropyltriethoxysilan (Rogers et al., 1997), Poly-D-Lysin (RD Vale 1985) oder Poly-L-Ornithin (Blocker et al., 1997; Blocker et al., 1996; Urrutia et al., 1991; Urrutia et al., 1993). In einigen Testsystemen werden die exogenen MT auch direkt an die unbeschichtete Glasoberfläche geheftet (Burkhardt et al., 1993; Gilbert & Sloboda, 1986; Gilbert & Sloboda, 1989) oder über Casein adsorbiert (Nangaku et al., 1994).

Die Kammern wurden hier für die Anheftung von Cy3-MT mit 2,5 bis 5 mg/ml DEAE-Dextran oder alternativ mit 10 mg/ml BSA beschichtet. Dann wurden sowohl die Flächendichte als auch die Beweglichkeit der Cy3-MT untersucht. Die Quantifizierung der MT-Länge und damit auch der Flächendichte der MT erfolgte nach Methoden der Stereologie durch ein quadratisches Gitter, welches über die MT Bilder gelegt wurde, wobei die Anzahl der Kreuzungspunkte zwischen dem Gitter und den MT direkt proportional zur Länge der MT war (vgl. Kap. 4.2.5, S.45; Abb. 4.6). Die Positionen und die Grauwerte der Cy3-Signale wurden hierzu in Microsoft-Excel-Tabellen übertragen und mit Hilfe eines selbst geschriebenen *Visual Basic* Programms (vgl. Kap. 8.3, S. 127) ausgewertet.

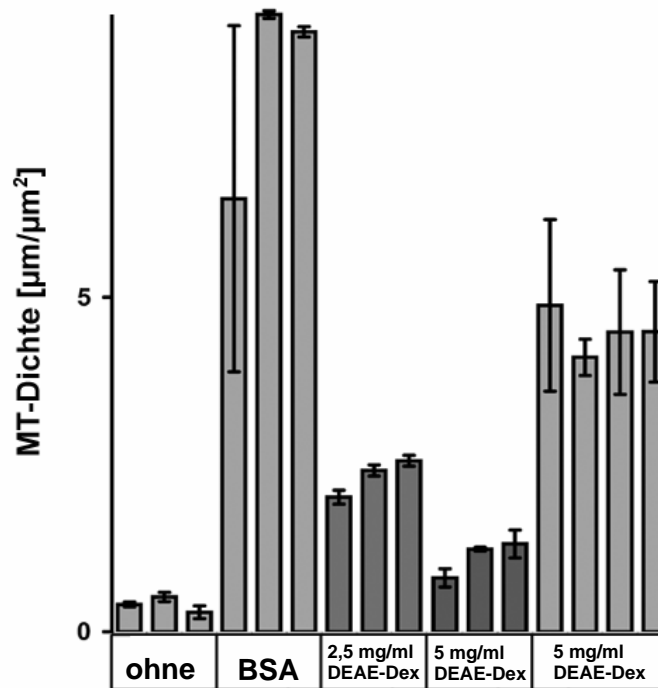


Abb. 5.3: Dichte Cy3-markierter MT in 3 bis 4 mikroskopischen Beobachtungskammern pro Anheftungsmethode der MT. Die MT Dichte schwankte dabei von Experiment zu Experiment, war aber in den einzelnen Perfusionskammern innerhalb eines Experiments vergleichbar. Die Länge der MT wurde stereologisch mit einem quadratischen Gitter der Seitenlänge von 55 Pixel wie unter 4.2.9 beschrieben bestimmt.

ohne: Die Cy3-MT wurden nicht vor der Messung angeheftet sondern direkt zum Cytosol gegeben. MT-Dichte aus 4 Feldern der Größe 582 x 782 Pixel (40x Objektiv, Leica DM IBRE System) gemittelt.

BSA: MT-Dichte aus 3 Feldern mit 640 x 480 Pixel (100x Objektiv, Olympus XI70-System) gemittelt.

DEAE-Dextran: MT-Dichte aus 3 Feldern der Größe 582x 782 Pixel (100x Objektiv, Leica DM IBRE System) gemittelt.

Die Dichte der MT schwankte bei den beschichteten Kammern in den verschiedenen Experimenten zwischen 1 bis 9 $\mu\text{m MT pro } \mu\text{m}^2$ (Abb. 5.3). Bei den Cy3-MT, die nicht angeheftet wurden, sondern im perfundierten Cytosol resuspendiert worden waren, stellte sich nur eine Dichte kleiner als 1 $\mu\text{m MT pro } \mu\text{m}^2$ ein (Abb. 5.3). Obwohl die MT-Dichte zwischen den einzelnen Experimenten schwankte, da die MT-Polymerisation aufgrund der hohen Empfindlichkeit gegenüber Scherkräften nur schwer standardisiert werden konnte, war sie zwischen den Perfusionskammern innerhalb eines Experiments vergleichbar (Abb. 5.3).

Die Dynamik der MT wurde in Gegenwart von *Xenopus* Cytosol (1,5 mg/ml) aufgezeichnet. Nach der BSA-Beschichtung war ein Schwingen der MT zu beobachten (Film 2 A), während die DEAE-Dextran angehefteten MT weitgehend stationär blieben (Film 2 B). DEAE-Dextran führte zum Teil zu einer Bündelung der MT, welche mit der Anheftungszeit der MT zunahm (Abb. 5.4, Film 2 B).

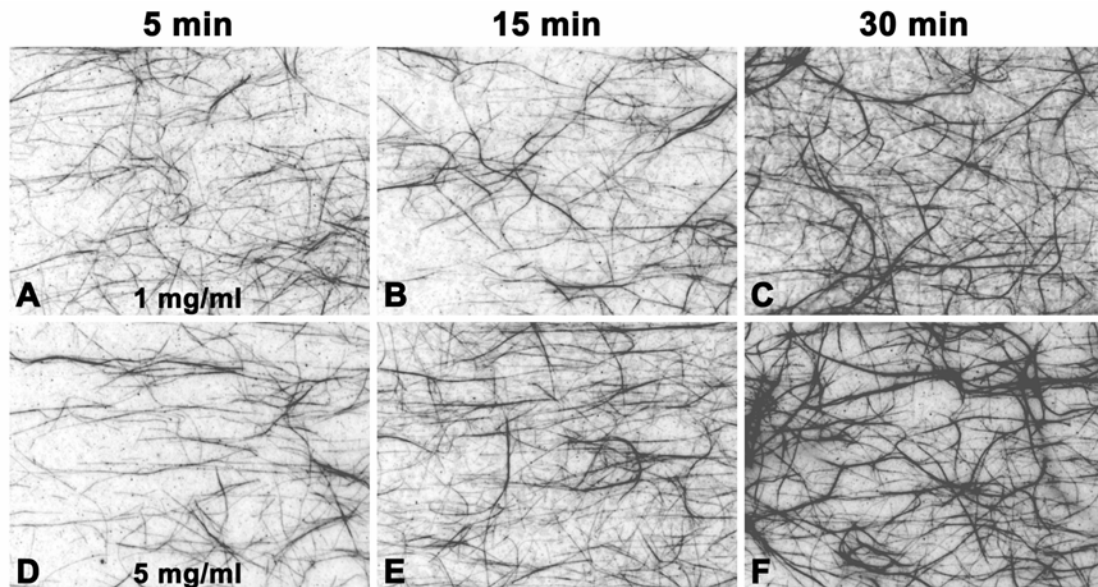


Abb. 5.4: MT-Dichte auf der Glasoberfläche einer Perfusionskammer in Abhängigkeit der DEAE-Dextran Beschichtung. Bei den Abbildungen A, B und C wurde mit 1 mg/ml und bei den Abbildungen D, E und F wurde mit 5 mg/ml DEAE-Dextran beschichtet. Die Inkubation betrug bei A und D 5 min, bei B und E 15 min und bei C und F 30 min. Die Dichte und die Bündelung der MT wurde weniger durch die DEAE-Dextran Konzentration als durch die Anheftungszeit bestimmt.

5.3.3 Cytosol

Als Quelle für die Motorproteine und ihre Cofaktoren wurden Cytosole aus Rattenhirn, Rattenleber oder aus *Xenopus laevis* Eiern eingesetzt. Letzteres ist ein etabliertes System für den Dynein-vermittelten Membrantransport (Allan, 1993). Die cytosolischen Extrakte aus den Säugerorganen und den Froscheiern wurden, um Membranen zu entfernen, mit 100.000 bzw. 120.000 x g zentrifugiert. Die Gesamtproteinkonzentration variierte für die *Xenopus* Cytosole je nach Charge zwischen 1,5 und 10,4 mg/ml. Die Gesamtprotein-Konzentration lag bei Rattenhirn-Cytosolen um 10 mg/ml und den Rattenleber-Cytosolen um 50 mg/ml (vgl. Kap 4.2.3.4.2, S. 41). Die *Xenopus* Extrakte wurden vor ihrer 120.000 x g Zentrifugation mit dem ATP-regenerierenden System versetzt (vgl. Kap. 4.2.3.4.1, S. 37).

Um zu bestimmen, ob das Cytosol zelluläre Membranen enthielt, wurde ein Membranfarbstoff zu dem Cytosol gegeben und fluoreszenzmikroskopisch nach angefärbten Membranen gesucht. Dabei wurde der lipophile Carbocyanin-Fluoreszenzfarbstoff Vybrant™ Dil zu dem *Xenopus* Extrakt gegeben, welcher bei RT in die fluiden Membranen interkalierte und sie so durch die selektiv in lipophiler Umgebung anregbare Fluoreszenz detektierbar machte (Cabrini & Verkman, 1986; Guillet & Kimmich, 1981; Sims et al., 1974). In der Fraktion mit den sedimentierten Bestandteilen wurden im Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovert 200 System; vgl. Kap. 4.1.2, S. 23) schon bei kurzen Belichtungszeiten von 10 ms viele unterschiedlich große Partikel sichtbar (Abb. 5.5 A).

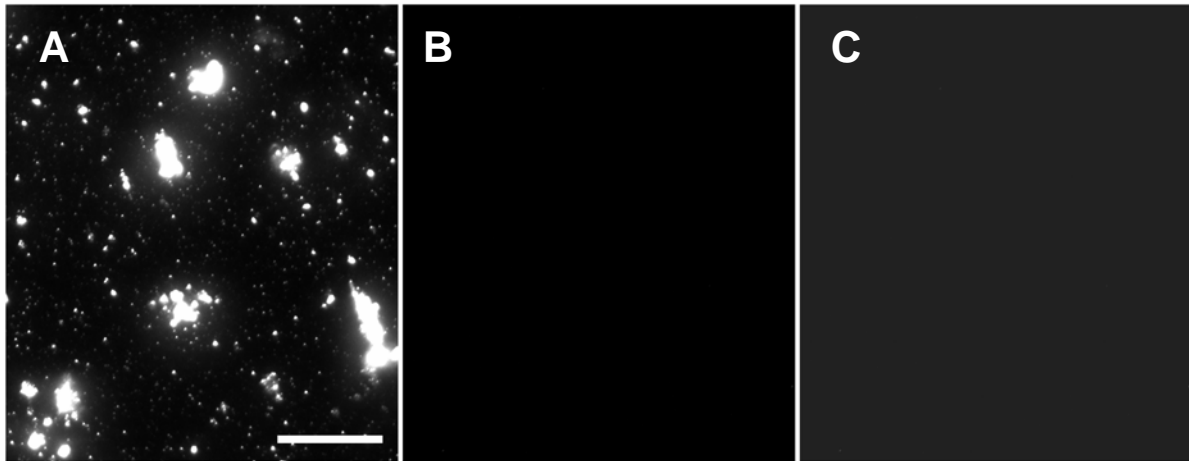


Abb. 5.5: Das präparierte Cytosol enthält keine Membranen. Um zu testen, ob das Cytosol, das aus *Xenopus* Eier Extrakten durch Zentrifugation erhalten wurde, Membranen enthielt, wurde es vor der Zentrifugation mit dem Fluoreszenzfarbstoff Dil (1 μM) inkubiert. Das erhaltene Sediment (A; Skalierungsbalken: 20 μm) wurde in Puffer resuspendiert und zusammen mit dem cytosolischen Überstand (B) durch Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Als Kontrolle wurde der Puffer mit Dil inkubiert (C). Im Gegensatz zum Sediment enthielt der cytosolische Überstand keine Dil markierten Membranen.

Im cytosolischen Überstand war keine Fluoreszenz erkennbar (Abb. 5.5 B). Erst nach 0,5 s Belichtungszeit und Signalverstärkung durch die MetaMorphTM-Software (vgl. Kap. 4.1.10, S. 29) konnten sehr schwach fluoreszierende Partikel erkannt werden, die in der Negativkontrolle mit Puffer nicht zu sehen waren (Abb. 5.5 C). Alle Membranbestandteile im Extrakt sedimentierten bei der Cytosolherstellung. Bei den sehr schwach fluoreszierenden Partikeln im Überstand könnte es sich um Lipide gehandelt haben, die nicht sedimentierten und sich auf der Oberfläche des Überstandes befanden und so in die Cytosolfraktion gelangten.

Das im Cytosol enthaltene Tubulin polymerisierte möglicherweise spontan. Deshalb sollte untersucht werden, ob auch unmarkierte MT in diesem Versuchsaufbau enthalten waren. Dazu wurden die mit DEAE-Dextran angehefteten Cy3-MT nach der Cytosol-Perfusion und Inkubation mit Methanol fixiert und alle anwesenden MT über Immunfluoreszenz markiert. Hier waren wenige unfluorochromierte MT zu erkennen, die von den Cy3-MT ausgingen und wahrscheinlich aus dem im *Xenopus* Cytosol vorhandenen Tubulin polymerisiert waren (Abb. 5.6 A-C).

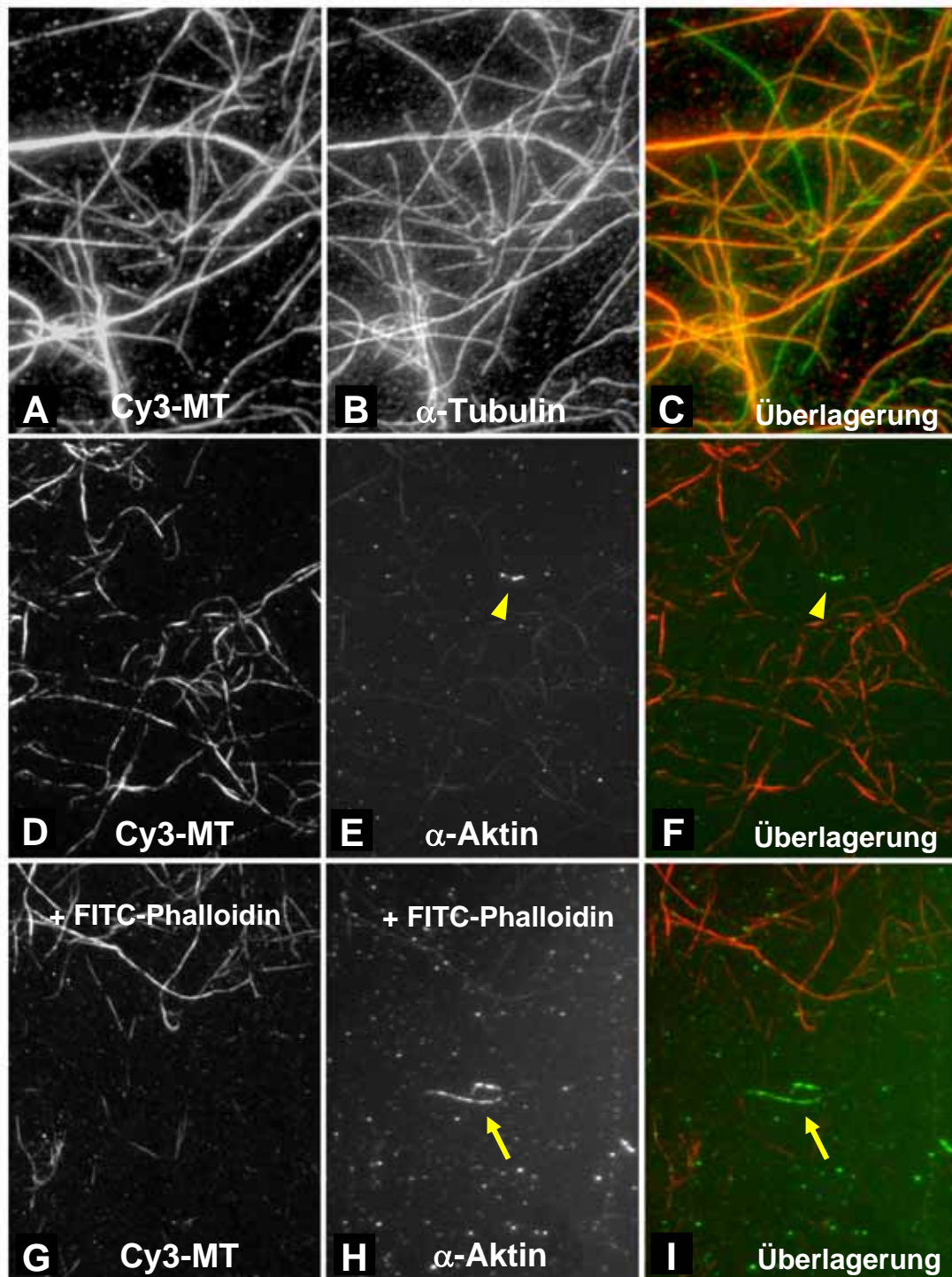


Abb. 5.6: Die mikroskopischen Perfusionskammern enthalten neben Cy3-MT auch unmarkierte MT aber keine Aktin-Filamente. Nach 30 min Inkubation von mit Cy3-MT (A, D und G) beschichteten Perfusionskammern mit *Xenopus laevis* Cytosol mit einer Cytosolkonzentration von 2,5 mg/ml wurden sie mit Methanol fixiert und alle anwesenden MT mit α -Tubulin (B) und das F-Aktin mit α -Aktin (E, H) Antikörpern markiert. Die Cy3-MT sind in den Überlagerungen in rot dargestellt (C, F und I) und die nicht mit Cy3 markierten MT sind in (C) als grüne Filamente zu erkennen. Das *Xenopus laevis* Tubulin polymerisierte dabei ausgehend von den Cy3-markierten MT (A und C, rot).

Als Positiv-Kontrolle für eine Aktin-Polymerisation wurde FITC-Phalloidin zum Cytosol gegeben (G-I). Hier waren einige punktförmige und filamentöse Strukturen (gelbe Pfeile in H und I, grün) erkennbar, die in Abwesenheit von Phalloidin nur sehr selten beobachtet wurden (gelbe Pfeispitzen in E und F, grün).

Die Herstellung von cytosolischen Extrakten aus *Xenopus* Eiern erfolgte in Gegenwart von Cytochalasin D, das an die Plus-Enden von F-Aktin bindet und die Polymerisation inhibiert (Flanagan & Lin, 1980). Dennoch wurde die Methanol-fixierte Motilitätskammer auch durch Immunfluoreszenz auf Aktin-Filamente untersucht. Als Positivkontrolle wurde das verwendete Cytosol (5 mg/ml) mit FITC-Phalloidin versetzt, um F-Aktin zu bilden (Cooper, 1987). Hier konnten Bildausschnitte gefunden werden, wo bis zu zwei gepunktete und auf einer Linie angeordnete Strukturen zu sehen waren (Abb. 5.6 H und I, gelbe Pfeile). Ohne Phalloidin konnte bei drei verschiedenen Cytosolverdünnungen (5 mg/ml, 2,5 mg/ml und 1 mg/ml) nur ein kurzes derartiges Filament entdeckt werden (Abb 5.6 E und F). Wenn man davon ausgeht, dass es sich bei diesen Strukturen um F-Aktin handelte, war in den auf *Xenopus* Cytosol basierenden *in vitro* Transport-Testsystemen wahrscheinlich kein F-Aktin-vermittelter Transport zu erwarten.

5.3.4 Kapsid-Präparation und Charakterisierung

Um Transportgüter mit unterschiedlicher Proteinzusammensetzung herzustellen, wurden HSV1-GFPVP26- und HSV1-Wildtyp-Kapside aus im Kulturüberstand enthaltenen sezernierten Viren oder den Kernen infizierter Zellen präpariert. B- und C-Kapside wurden aus den Zellkernen nach einem etablierten Protokoll gereinigt (Newcomb & Brown, 1994). B-Kapside enthalten das Gerüstprotein VP22a und keine virale DNA, wohingegen C-Kapside kein VP22a aber DNA und A-Kapside weder DNA noch VP22a enthalten (Homa & Brown, 1997). Ferner wurde eine Methode entwickelt, um monodisperse virale Kapside unterschiedlicher Proteinzusammensetzung aus extrazellulären Virionen durch Lyse mit 1% Triton X-100 und verschiedenen KCl-Konzentrationen (0,1; 0,5 und 1 M) zu isolieren.

5.3.4.1 Sedimentationsverhalten der nukleären Kapside

Nukleäre Kapside wurden aus infizierten Zellen präpariert. Nach Öffnen der Zellen und der mit Kapsiden gefüllten Kerne und Reinigung über ein Saccharosekissen wurden die Kapside über einen linearen Saccharosegradienten aufgetrennt. Die drei unter Lichtstreuung sichtbaren Banden wurden den A-, B- und C-Kapside zugeordnet (Newcomb & Brown, 1991; vgl. Kap. 8.2, S.126).

Tabelle 5.3: Verteilung der Radioaktivität ^{35}S -markierter, nukleärer HSV1-Wildtyp-, HSV1- ΔVP26 - und HSV1-GFPVP26-Kapside in den einzelnen aus den linearen 20-50%igen Saccharosegradienten geernteten Fraktionen. Die Prozentangaben beziehen sich auf die auf einen Gradienten aufgetragene cpm der ^{35}S -Radioaktivität. Die Kapside wurden vor der Zentrifugation mit Ultraschall und DTT behandelt. Die nicht geerntete Radioaktivität war über den gesamten Gradienten verteilt.

B-Kapside enthalten etwa 1153 Kopien VP22a und damit etwa 13% mehr ^{35}S als die A und C-Kapside. Auf ^{35}S -Gehalt des jeweiligen Kapsidtyps normalisierte Werte in Klammern (vgl. Kap. 8.2, Anhang Tabelle 2)

Kapside	HSV1-wt	HSV1- ΔVP26	HSV1-GFPVP26	
A [%]	8,8	5,1	6,1	4,5
B [%]	5,7 (5,0)	5,8 (5,0)	5,5 (4,8)	5,0 (4,4)
C [%]	2,1	5,6	3,9	1,8
nukleäre monodisperse Kapside	16,6 (15,9)	16,5 (15,7)	15,5 (14,8)	11,4 (10,8)
Überstand [%]	6,7	5,3	2,9	22,9
Sediment [%]	1,5	14,5	10,6	0,02
DTT	50 mM	0 mM	0 mM	50 mM
Ultraschall	2 x 35 W	ohne	ohne	5 x 40 W

Die Ausbeute und die genaue Verteilung der einzelnen Kapsidtypen wurde ferner durch ^{35}S -Cystein/Methionin Markierung der Virusproteine bestimmt. Ohne Ultraschallbehandlung und DTT sedimentierten in den hier dargestellten Präparationen bis zu 15% der eingesetzten Radioaktivität (Tabelle 5.3). Bei der HSV1-GFPVP26-Kapsidpräparation blieben nach einer zu starken Ultraschallbehandlung 23% der Radioaktivität im Überstand, weil wahrscheinlich viele Kapside zerstört wurden.

Die Quantifizierung der einzelnen Banden im 20–50%igen Saccharosegradienten war über die ^{35}S -Markierung möglich. Hierfür war eine Normalisierung der Radioaktivität notwendig, denn die B-Kapside enthalten VP22a (Newcomb et al., 1993) und damit etwa 13% mehr ^{35}S als die A- und C-Kapside (vgl. Kap. 8.2, Tabelle 8.2).

Für die unterschiedlichen Kapsidtypen bei den hier dargestellten Präparationen lag der Anteil der monodispersen Kapside zwischen 11 und 17% der auf den Gradienten aufgetragenen Gesamtradioaktivität (Tabelle 5.3). Der Anteil der C-Kapside war mit Ausnahme der HSV1- ΔVP26 -Mutante am geringsten. Die in den Experimenten eingesetzten Kapsidmengen konnten hiernach abgeschätzt werden. Die Normalisierung der Kapsidmenge erfolgte in den Bindungsexperimenten über VP5 im Immunoblot.

5.3.4.2 Elektronenmikroskopie

Isolierte und in *Xenopus* Cytosol (0,1 mg/ml, mit DNase und RNase) resuspendierte Kapside wurden hier durch Negativkontrastierung mit Uranylacetat elektronenmikroskopisch untersucht. Hier waren hauptsächlich monodisperse Kapside zu erkennen. Allerdings waren gelegentlich auch größere Ansammlungen von elektronendichtem Material zu sehen,

welches möglicherweise auch Kapsidaggregate enthielt bzw. aus ihnen bestand. Solche Aggregate traten in allen Kapsidpräparationen, aber bei keinem Kapsidtyp gehäuft, auf.

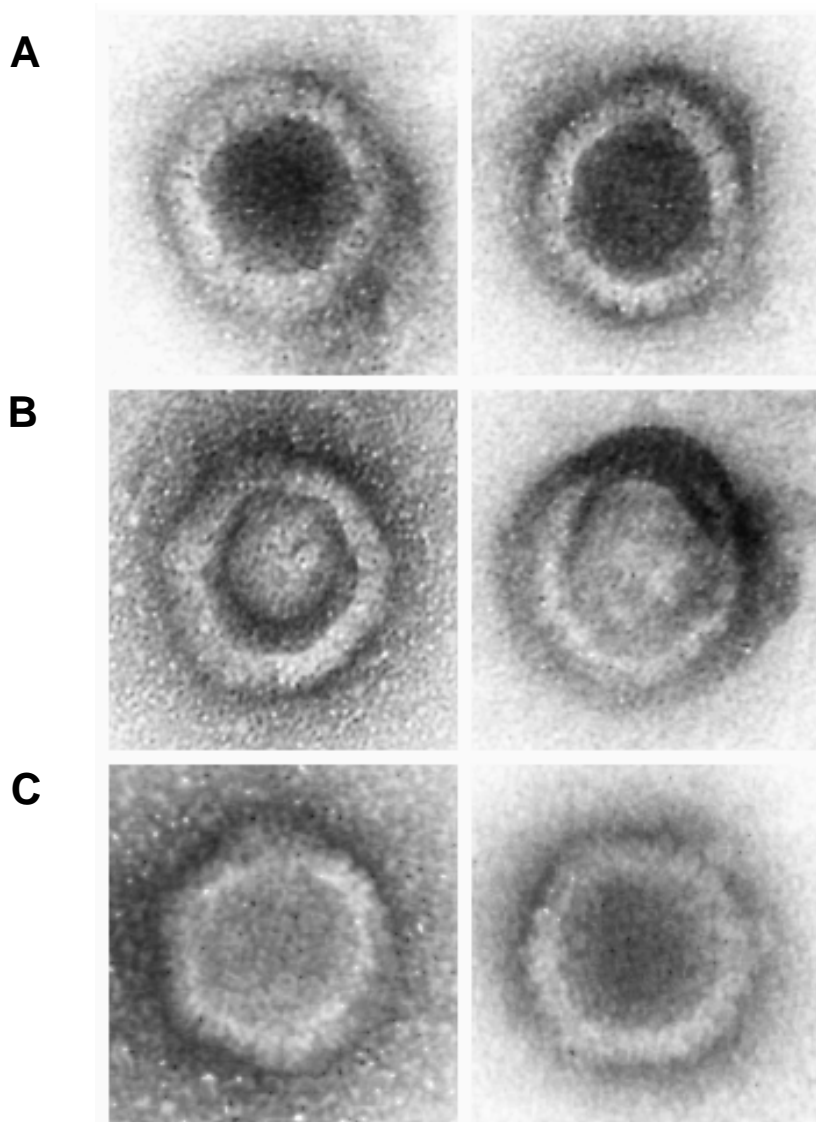


Abb. 5.7: Elektronenmikroskopische Bilder von negativkontrastierten HSV1-GFPVP26-Kapsiden. Extrazelluläre Viren wurden mit 1% (v/v) Triton X-100 in Anwesenheit von 1 M KCl lysiert und in *Xenopus* Cytosol (0,1 mg/ml), das DNase und RNase enthielt, mit Ultraschall resuspendiert. Die Visualisierung erfolgte nach Negativkontrastierung mit Uranylacetat im Elektronenmikroskop. Die Kapside zeigen eine hexagonale Morphologie.

(A) A-Kapside: Kapside in die keine DNA verpackt wurde oder die ihre DNA verloren haben.

(B) Nicht intakte C- oder B-Kapside mit DNA oder VP22a

(C) Intakte C- oder B-Kapside

Die im Elektronenmikroskop (EM) als Kapside identifizierten ikosaedrischen Partikel wurden anhand ihrer Morphologie in drei Klassen unterteilt. Leere Kapside waren vollständig mit dem Kontrastmittel Uranylacetat gefüllt (Abb. 5.7 A) und wurden als A-Kapside klassifiziert. Einige Kapside enthielten helles Material in ihrem Inneren, obwohl sie nicht intakt waren, was daran zu erkennen war, dass Uranylacetat ins Kapsidinnere eingedrungen

war (Abb. 5.7 B). Vermutlich handelte es sich bei dem hellen Material im Inneren um VP22a oder DNA. Intakte Kapside, die ein lückenloses Muster aus Hexonen und Pentonen aufwiesen (Abb. 5.7 C), waren entweder mit VP22a oder mit DNA gefüllt und wurden als intakte B- oder C-Kapside klassifiziert.

Tabelle 5.4: Verteilung der drei Kapsidtypen in unterschiedlichen HSV1-GFPVP26-Kapsid Präparationen nach Resuspension in *Xenopus* Cytosol (0,1 mg/ml) und Ultraschallbehandlung.

(A) A-Kapside: Kapside in die keine DNA verpackt wurde oder die ihre DNA verloren haben.
 (B) Nicht intakte B- oder C-Kapside, mit VP22a oder DNA
 (C) B- oder C-Kapside
 (vgl. Abb. 5.7)

	aus dem Medium sedimentierte virale Kapside			nukleäre Kapside	
	0,1 M Kapside	0,5 M Kapside	1 M Kapside	B-Kapsid-Bande	C-Kapsid-Bande
(A) [%]	46,8 (n=155)	98,0 (n=2078)	84,5 (n=1400)	54,2 (n=160)	37,0 (n=17)
(B) [%]	2,1 (n=7)	1,2 (n=25)	11,6 (n=193)	32,9 (n=97)	52,2 (n=24)
(C) [%]	51,1 (n=169)	0,8 (n=17)	3,9 (n=64)	12,9 (n=38)	10,9 (n=5)

Die intakten C- oder B-Kapside waren hauptsächlich bei den 0,1 M-Kapsiden und tendenziell bei den nukleären Kapsiden zu finden. Die bei 0,1 M KCl intakten Kapside wurden anscheinend durch die hohe Salzbehandlung von 0,5 M oder 1 M KCl in A-Kapside umgewandelt (Tabelle 5.4). Die Salzextraktion destabilisierte möglicherweise die Kapside, sodass die DNA austrat. Allerdings blieben die allgemeine Kapsidmorphologie und damit die Kapsidoberfläche erhalten.

A-Kapside waren auch zu einem großen Anteil in den Banden der nukleären B- und C-Kapside zu finden (Tabelle 5.4). Möglicherweise war bei der Bandenernte „von Hand“ Material verschleppt worden, da die leeren A-Kapside im Gradienten nicht an dieselbe Stelle wie die B- und C-Kapside sedimentieren, aber trotzdem hier nachgewiesen wurden. Um reine Kapsidpopulationen zu erhalten, war die hier angewandte Methode der Bandenernte über den Meniskus nicht optimal.

5.3.4.3 Nukleäre und virale Kapside unterschiedlicher Proteinzusammensetzung

Als nächstes wurden die Proteinzusammensetzungen nukleärer und viraler Kapside durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Coomassiefärbung oder ^{35}S -Markierung analysiert. Die genaue Zusammensetzung des Teguments der nukleären und viralen Kapside nach unterschiedlicher KCl-Behandlung wurde mittels Immunoblot bestimmt.

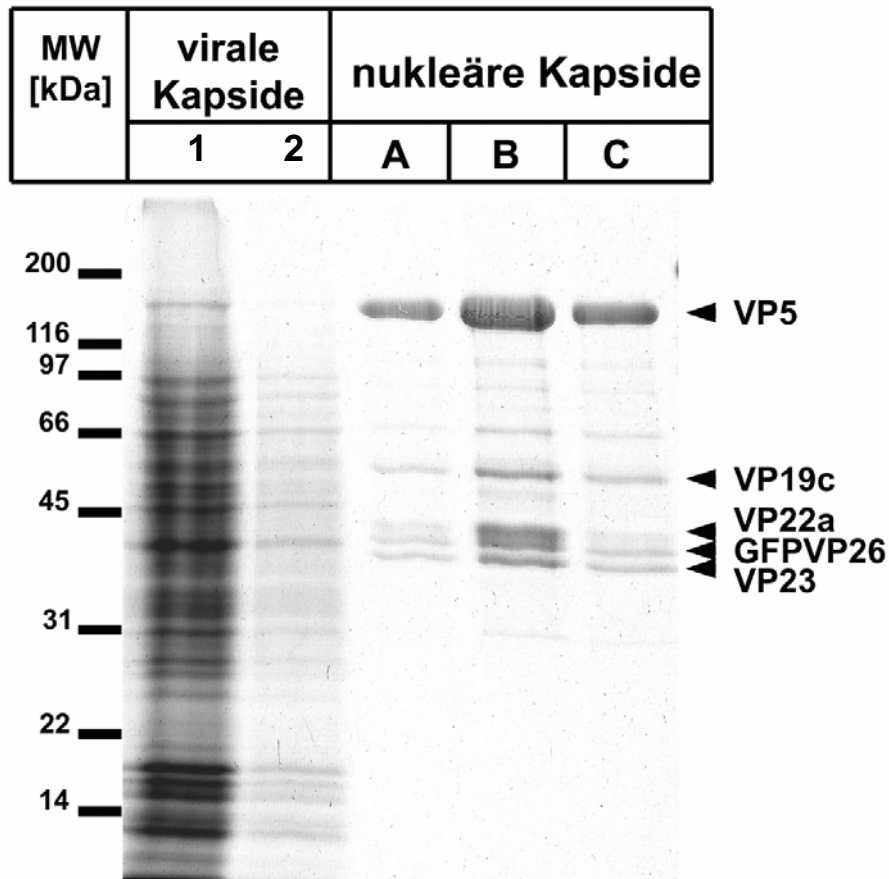


Abb. 5.8: SDS-Gelelektrophorese von HSV1-GFPVP26 Kapsiden. Virale Kapside aus der Virus-Lyse von $1,3 \times 10^7$ PFU (1) und $2,6 \times 10^6$ PFU (2) mit 1% Triton X-100 in Anwesenheit von 1,0 M KCl wurden durch ein Saccharosekissen sedimentiert und durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Von den nukleären Kapsiden wurden 25 μl der A-Bande, 80 μl der B-Bande und 50 μl der C-Bande aus einer synchronen Virusamplifizierung (MOI = 5 PFU/Zelle) aufgetragen. Die nukleären Kapside wurden mit Chloroform/Methanol gefällt.

Färbte man die aufgetrennten HSV1-GFPVP26-Kapside aus dem Virus und dem Nucleus mit Coomassie (Abb. 5.8), so war die VP5-Bande bei den nukleären Kapsiden deutlich zu erkennen. VP22a war hauptsächlich in der Fraktion der B-Kapside zu sehen. Zwei weitere Banden konnten hier aufgrund ihres Molekulargewichtes den Kapsidproteinen VP19c und VP23 zugeordnet werden. Das innere Tegumentprotein VP1-3 (apparent 270 kDa, berechnet 335,86 kDa) war nicht nachweisbar. Das Kapsidprotein VP26 (berechnet

12,1 kDa) war erwartungsgemäß aufgrund der Molekulargewichtszunahme durch das angehängte GFP (27 kDa, berechnet) in den Bereich um 40 kDa verschoben. Eine Wildtyp-VP26-Bande in der Nähe des 14 kDa Markers war nicht vorhanden (Abb. 5.8).

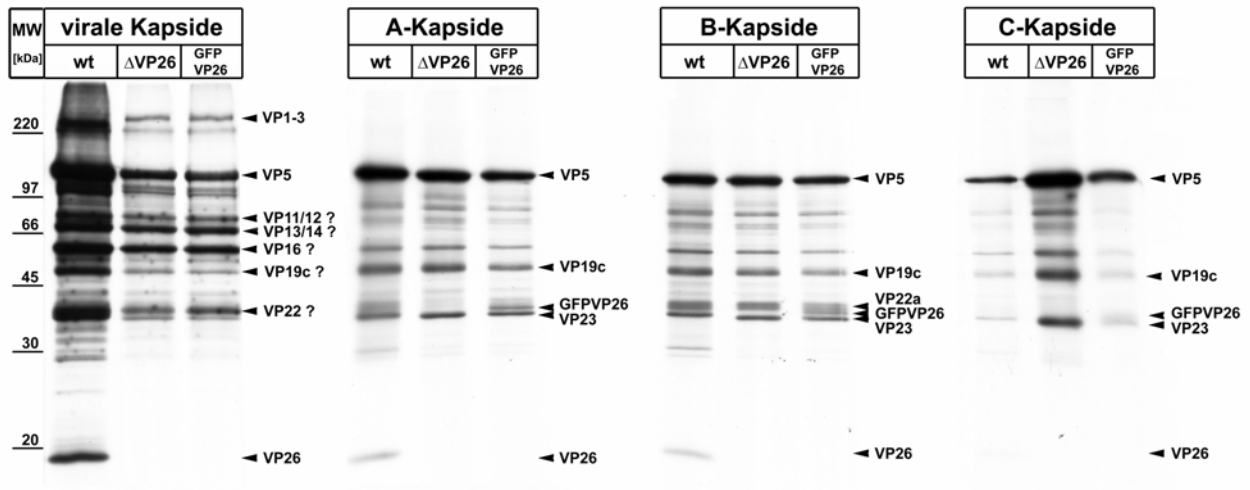


Abb. 5.9: Auftrennung von ^{35}S -Methionin/Cystein markierten HSV1-Wildtyp, HSV1- ΔVP26 und HSV1-GFPVP26 Proteinen durch SDS-PAGE und Visualisierung über Fluorographie. Dabei wurden $1,0 \times 10^7$ PFU vom HSV1-Wildtyp, $6,3 \times 10^6$ PFU von der HSV1- ΔVP26 -Mutante und $1,0 \times 10^7$ PFU vom HSV1-GFPVP26 aus einer synchronen Virusamplifizierung (MOI = 10 PFU/Zelle) mit 1 M KCl haltigem Lysepuffer lysiert und nach Sedimentation durch ein Saccharosekissen aufgetragen. Von den nukleären Kapsiden wurden pro A-, B- und C-Bande etwa 19 μl sedimentiert und aufgetragen (Tabelle 5.5).

Tabelle 5.5: In Abb. 5.9 aufgetragene ^{35}S -Radioaktivität

	virale Kapside	A Kapside [cpm]	B Kapside [cpm]	C Kapside [cpm]
HSV1-wt	52835	15025	11714	3650
HSV1- ΔVP26	23333	15911	20552	13419
HSV1-GFPVP26	15677	10776	10607	6632

Verglich man das HSV1-GFPVP26 mit HSV1-Wildtyp oder der HSV1- ΔVP26 -Mutante, indem man die Proteine mit ^{35}S -Cystein/Methionin markierte und über Fluorographie nachwies, so war eine VP26-Bande erwartungsgemäß nur beim HSV1-Wildtyp sichtbar (Abb. 5.10). Bei der Auftrennung der B-Kapside des GFP-Virus war die GFPVP26-Bande zwischen VP22a, welches nur in den B-Kapsiden vorkommt, und VP23 lokalisiert. Bei den Kapsiden, die aus der Lyse und 1 M KCl-Extraktion von extrazellulärem Virus stammten, zeigten Tegumentproteine wie z.B. VP1-3, VP11/12, VP13/14, VP16 und VP22, stärkere Signale als bei den nukleären Kapsiden (Abb. 5.9). Hier waren einige Banden zwischen der VP5 und der VP19c-Bande, die nicht den Kapsidproteinen zugeordnet werden konnten, zu sehen. Dies könnten Tegumentproteine gewesen sein (Abb. 5.9).

In den *in vitro* Testsystemen für die MT-Motorbindung und den Kapsidtransport sollten Kapside mit unterschiedlicher Proteinzusammensetzung eingesetzt werden. Eine mögliche Methode, um Tegumentproteine sukzessive zu entfernen oder abzubauen war der limitierte,

proteolytische Verdau von viralen Kapsiden. Für die biochemische Charakterisierung der HSV1-Kapsidbindung an den Kernporenkomplex wurden Kapside durch limitierte Proteolyse verdaut (Ojala et al., 2000). Dabei werden die Tegumentprotein VP1-3, VP13/14 und VP22 komplett und VP16 zum größten Teil entfernt. Die Kapsidproteine VP5 und VP19c gehen dabei nicht verloren. Die *in vitro*-Bindung dieser Kapside an den Kernporen ist stark reduziert (Ojala et al., 2000).

Um Kapside für die biochemische Charakterisierung des HSV1-Kapsidtransportes zu erhalten, wurden als Ausgangsmaterial für einen proteolytischen Verdau Kapside, die durch Detergenz-Lyse in Gegenwart von 0,1 M KCl aus extrazellulärem Virus gewonnen wurden und noch die äußeren Tegumentproteine VP13/14, VP22, vhs und US11 enthielten, verwendet.

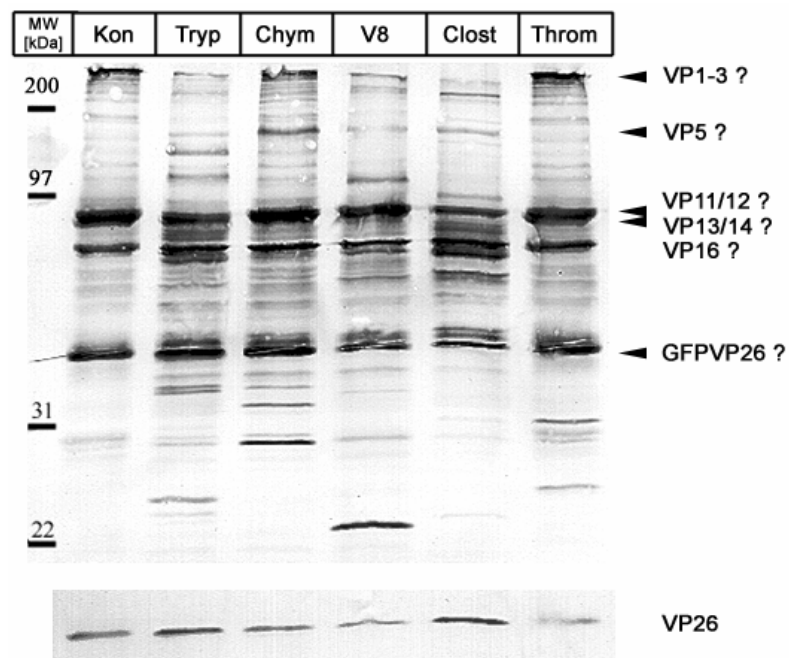


Abb. 5.10: Modulierung der Tegumentprotein-Zusammensetzung der Kapside durch limitierte Proteolyse. Hier wurde durch die Art und die Reaktionsdauer verschiedener Proteasen eine Spezifität erzielt. Die Proteasen wurden nach 15 min in den Lysepuffer mit 0,1 M KCl gegeben und mit den Kapsiden für 5 bis 15 min auf Eis inkubiert (vgl. Kap. 4.2.3.2, Tabelle 4.1).

Die eingesetzte Kapsidmenge wurde aus einer Lyse von $1,7 \times 10^7$ PFU gewonnen. Die Proteine von jedem Proteaseverdau und der Kontrolle wurden durch ein 10 bis 16%iges Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und durch Immunoblotting mit Antikörper gegen virale Kapside und His₆-VP26 analysiert. Ein Abbau des äußeren Kapsidproteins VP26 wurde hier als Indikator für eine mögliche Proteolyse des eigentlichen Kapsids verwendet. Beim Trypsin und Clostripain-Verdau war die VP26-Bandenstärke mit der Kontrolle vergleichbar.

Abkürzungen: Kon: Kontrolle; Tryp: Trypsin, Chym: Chymotrypsin, V8: Endopeptidase Glu-C (V8), Clost: Clostripain, Throm: Thrombin.

Die Kapsidproteine sollten dabei nicht verdaut werden, da für die Testsysteme für Motorbindung und Kapsidtransport intakte Kapside benötigt wurden. Das Ausmaß des proteolytischen Verdau wurde anhand des äußeren Kapsidproteins VP26 beurteilt. Dazu wurde VP26 nach den limitierten Proteolysen der Kapside mit einem spezifischen Antikörper

(A. Helenius & K. Breiner, ETH Zürich, Schweiz, vgl. Kap 4.1.7, S.26) im Immunoblot untersucht. Zur Analyse der Proteaseeinwirkung wurden die Kapsid- und Tegumentproteine mit einem Antiserum gegen HSV1-Proteine (Rem V; Ojala et al., 2000) markiert (vgl. Kap 4.1.7, S.26).

Die Bande des Hauptkapsidproteins VP5 konnte hier schwer nachgewiesen bzw. zugeordnet werden. Nahm man VP26 als Indikator für einen möglichen Kapsidabbau, so zeigte sich bei Chymotrypsin, Endopeptidase Glu-C (V8) und Thrombin unter den entsprechenden Reaktionsbedingungen eine beginnende Zersetzung der Kapside. Bei einem Verdau mit den Proteasen Trypsin und Clostripain war das nicht der Fall (Abb. 5.10). Bei allen Proteaseverdauen wurde ein charakteristisches Muster aus fokussierten Banden beobachtet, wobei im Vergleich zur Kontrolle viele neue Banden vor allem im Bereich unterhalb von 40 kDa erschienen. Möglicherweise handelt es sich hierbei um Spaltprodukte der Tegumentproteine, die aber mit den Kapsiden während der Sedimentation durch ein Saccharosekissen assoziiert blieben (Abb. 5.10).

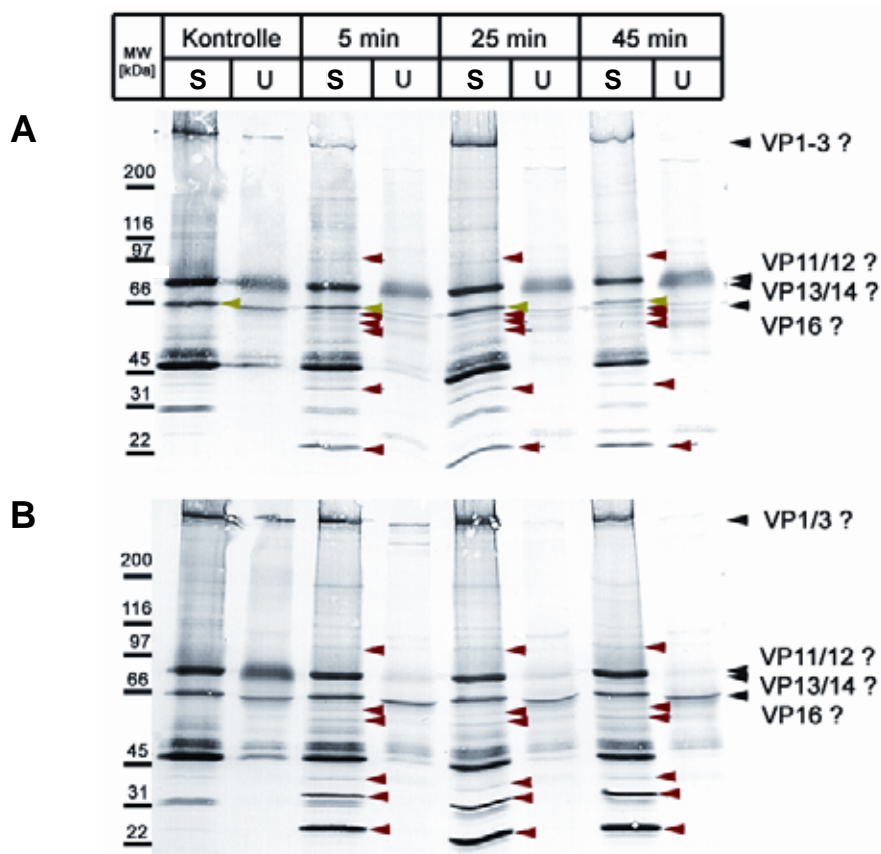


Abb. 5.11: Kinetik der limitierten Proteolyse von Kapsiden durch Endopeptidase Glu-C (V8) (A) und Thrombin (B). Die Proteasen wurden nach 15 min in den Lysepuffer mit 0,1 M KCl geben und mit den Kapsiden für 5 bis 45 min auf Eis inkubiert (vgl. Kap. 4.2.3.2, Tabelle 4.1). Nach Sedimentation der Kapside durch ein Saccharosekissen wurden die Proteine von $1,7 \times 10^7$ bei der Lyse eingesetzten PFU von jedem Proteaseverdau und der Kontrolle durch SDS-PAGE in einem 10 bis 16 %igen Gel aufgetrennt und durch Immunoblotting mit einem Antikörper gegen virale Kapside analysiert. Die roten Pfeilspitzen deuten auf Proteinfragmente, die durch die Zugabe der Proteasen entstanden waren. Abkürzungen: S: Sediment, U: Überstand.

Bei der Kinetik des Tegumentverbaus durch die Endopeptidase Glu-C (V8) (A) erschienen zwischen dem 116 kD und dem 22 kDa Proteinmarker etwa 6 neue Banden (Abb. 5.11 A, rote Pfeilspitzen). Eine relativ starke Bande lag im Molmassenbereich des Tegumentproteins VP13/14 (Abb. 5.11 A). Sie verlor über den Zeitraum von 5 bis zu 45 min kaum an Intensität. Eine andere etwas tiefer liegende Bande, die nach dem Molekulargewicht VP16 repräsentieren könnte, schien hingegen durch die Proteaseeinwirkung etwas abzunehmen (Abb. 5.11 A, grüne Pfeilspitze). Dieser Effekt war beim Verdau durch Thrombin kaum zu beobachten. Hier waren allerdings im Bereich zwischen dem 31 und 22 kD Marker zwei relativ starke Banden zu sehen (Abb. 5.11 B, rote Pfeilspitzen).

Unter dem Einsatz von verschiedenen Proteasen war es möglich, Tegumentproteine proteolytisch zu spalten, ohne die Kapside zu zerstören. Die Identifizierung der Spaltprodukte durch Massenspektroskopie und Sequenzierung könnte in Verbindung mit den entwickelten Bindungs- und Motilitätstests die für die funktionelle Motorbindung wichtigen Proteinabschnitte enthüllen.

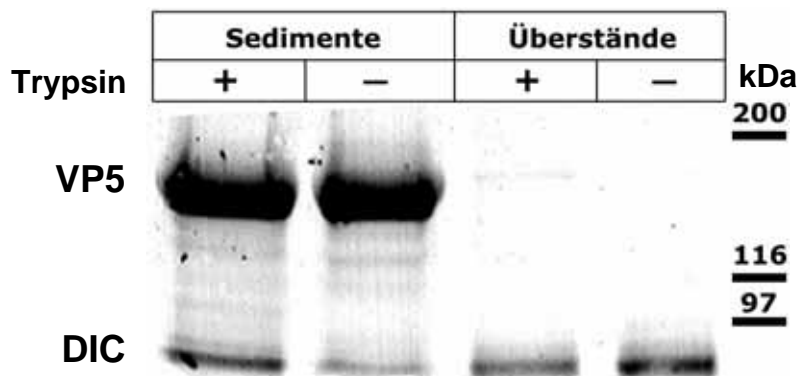


Abb. 5.12: Dyneinbindung viraler Kapside nach limitierter Proteolyse mit Trypsin. Viruslyse mit 1% Triton X-100 in Anwesenheit von 0,5 M KCl und Sedimentation durch ein Saccharosekissen. Behandlung der Kapside mit 20 ng/ml Trypsin für 5 min auf Eis und Abstoppen mit 200 ng/ml Trypsininhibitor für 15 min oder mit MKT-Puffer als Kontrolle. Inkubation in Rattenhirncytosol (5 mg/ml, vgl. Kap. 4, Variante A) für 60 min bei RT und Sedimentation durch ein Saccharosekissen. Die Proteine der Kapsidsedimente und Überstände wurden über ein 10%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch einen Immunoblot analysiert. Die Mengen an Hauptkapsidprotein VP5 wurden bestimmt, um die relative Häufigkeit der Kapside in den verschiedenen Reaktionen abzuschätzen. Die Menge des sedimentierten Dyneins wurde durch den Nachweis von DIC (*Xenopus* Dynein intermediäre Kette) bestimmt (DIC L5, vgl. Kap. 4.1.7). Die mit Trypsin-behandelten Kapside banden mehr Dynein als die unbehandelten Kapside. Diese Daten wurden freundlicherweise von Dr. Jasmin Paul (Institut für Biochemie, MHH) zur Verfügung gestellt.

Bei ersten Motorbindungsexperimenten mit Trypsin-behandelten Kapsiden zeigten diese bei ihrer Resuspension in Rattenhirncytosol im Vergleich zu unbehandelten Kapsiden eine erhöhte Dyneinbindung (Abb. 5.12). Da die genaue Identifizierung der Proteinfragmente eine aufwendige massenspektroskopische Analyse erforderte, wurden hier die Kapside wegen der leichteren Charakterisierbarkeit im Weiteren durch Salzextraktion modifiziert. Mit zunehmender Ionenstärke des Lysepuffers wurden die Tegumentproteine im steigenden

Maße solubilisiert und ihre Verteilung in der Kapsid-assoziierten und der löslichen Fraktion untersucht. Die Unterschiede in der Proteinzusammensetzung der verschiedenen Kapsidpräparationen wurden nach Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE im Immunoblot mit spezifischen Antikörpern (vgl. Kap 4.1.7, S.26) analysiert.

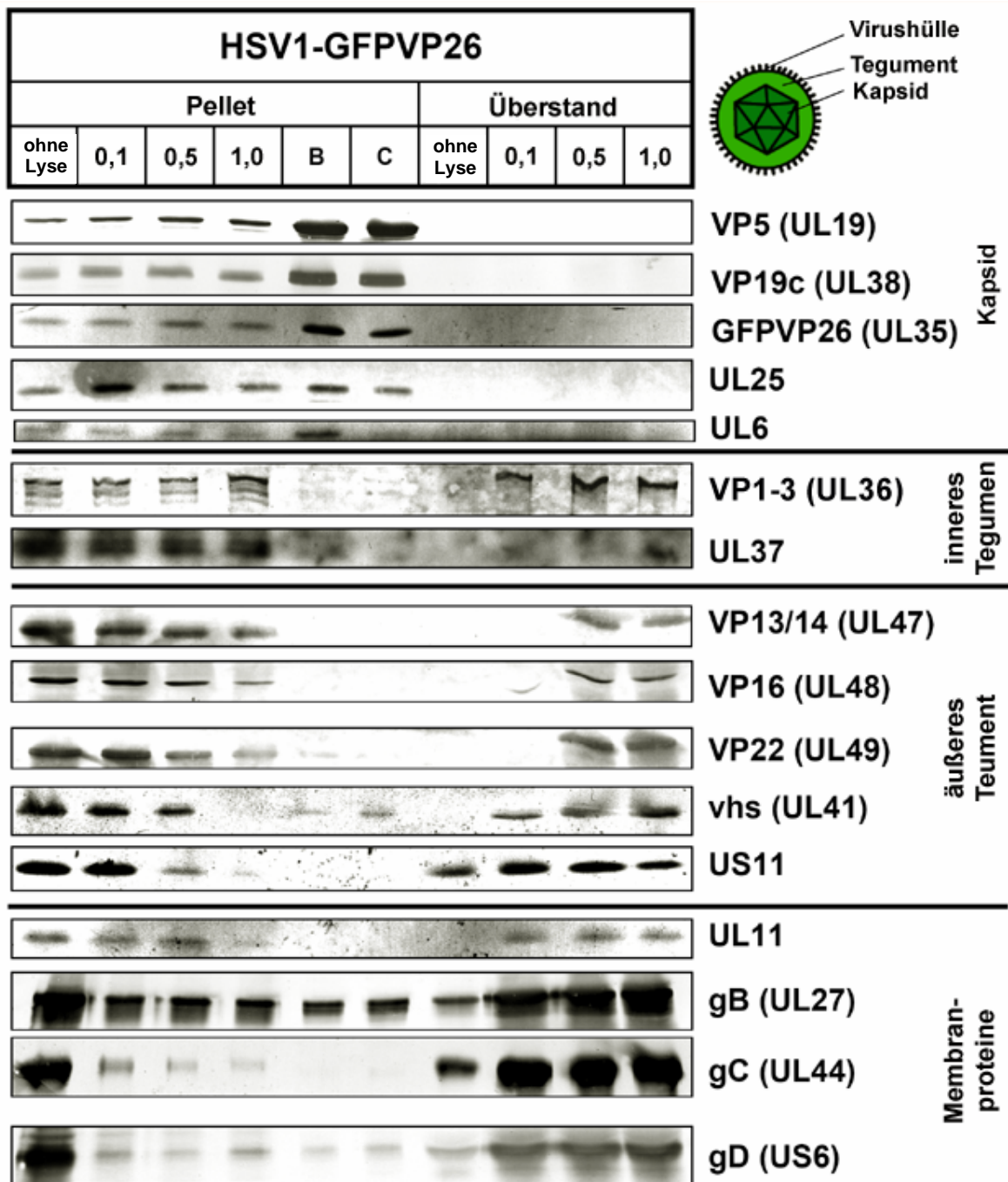


Abb. 5.13: Virale und nukleäre Kapside unterscheiden sich in ihrer Tegumentprotein-zusammensetzung. Extrazelluläre HSV1-GFPVP26-Virionen aus dem Medium infizierter Zellen wurden entweder nicht behandelt (ohne Lyse) oder mit 1% (v/v) Triton X-100 in Anwesenheit verschiedener KCl-Konzentrationen (0,1; 0,5 oder 1 M) lysiert, um Kapside mit unterschiedlicher Proteinzusammensetzung zu erhalten. Die Virus-Lysate wurden durch Zentrifugation durch ein 20%iges Saccharosekissen fraktioniert. Die nukleären B- und C-Kapside wurden aus infizierten Zellkernen isoliert. Die intakten Virionen (ohne Lyse), die Sedimente aus den fraktionierten Virionen (0,1; 0,5; 1), die nukleären Kapside (B, C) und die Überstände (0,1; 0,5; 1) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, und die Proteine durch Immunoblotting analysiert (Informationen zu den Antikörpern vgl. Kap. 4.1.7, S. 26, VP26 wurde mit α -NC-7 (Cohen et al., 1980) nachgewiesen). Eine ähnliche Analyse wurde mit HSV1-Wildtyp durchgeführt (Abb. 5.14). Im Vergleich zu den anderen Proben wurden die nukleären Kapside in einer höheren Konzentration eingesetzt, welche sich in der Bandenstärke der Kapsidproteine VP5, VP19c und VP26 widerspiegelt. Diese Daten wurden freundlicherweise von Claus-Henning Nagel (Institut für Virologie, MHH) zur Verfügung gestellt; aus Wolfstein et al. 2006.

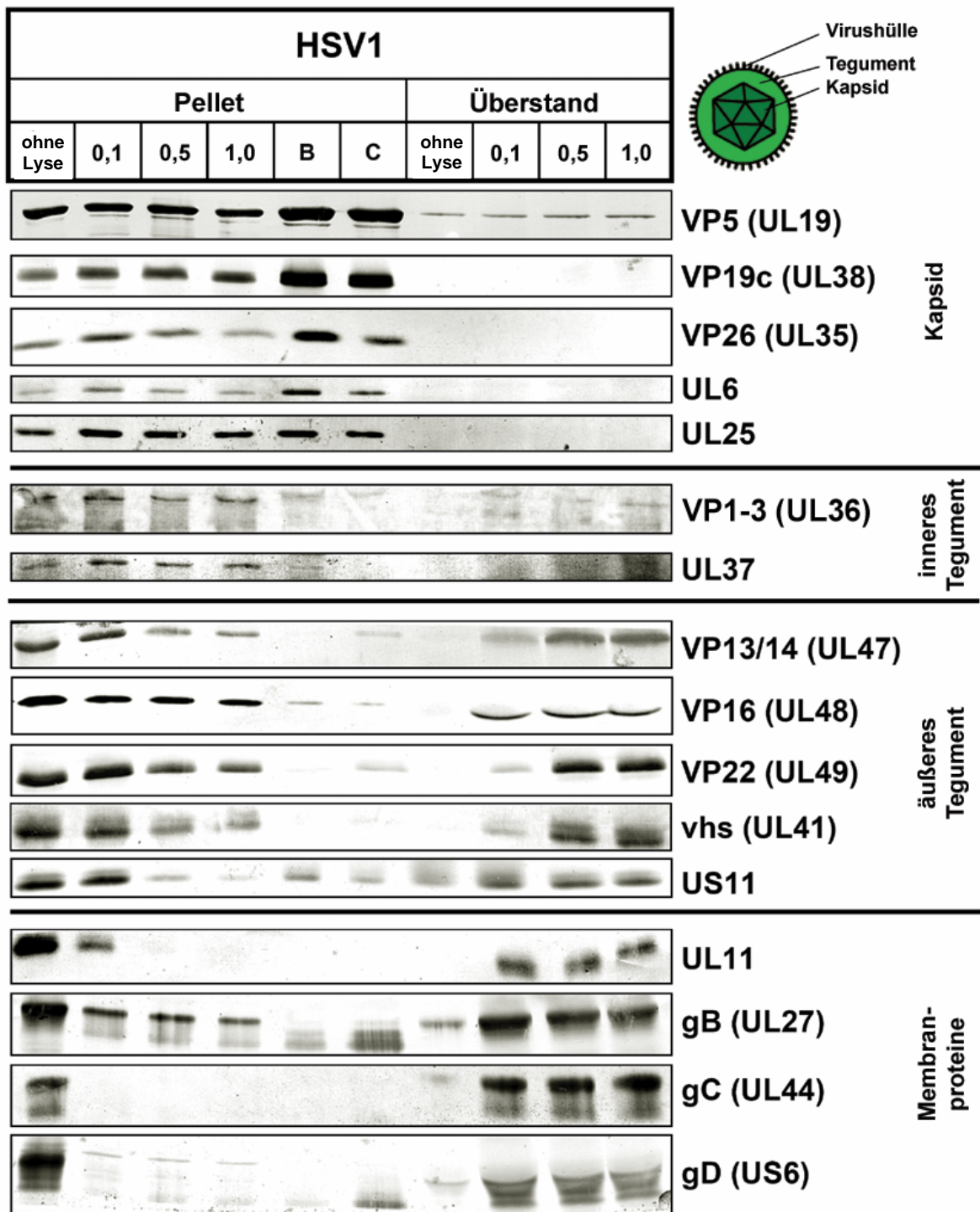


Abb. 5.14: Virale und nukleäre Kapside unterscheiden sich in ihrer Tegumentprotein-zusammensetzung. Extrazelluläre HSV1-Virionen aus dem Medium infizierter Zellen wurden entweder nicht behandelt (ohne Lyse) oder mit 1% (v/v) Triton X-100 in Anwesenheit verschiedener KCl-Konzentrationen (0,1; 0,5 oder 1 M) lysiert, um Kapside mit unterschiedlicher Proteinzusammensetzung zu erhalten. Die Virus-Lysate wurden durch Zentrifugation durch ein 20%iges Saccharosekissen fraktioniert. Die nukleären B- und C-Kapside wurden aus infizierten Zellkernen isoliert. Die intakten Virionen (ohne Lyse), die Sedimente aus den fraktionierten Virionen (0,1; 0,5; 1), die nukleären Kapside (B, C) und die Überstände (0,1; 0,5; 1) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, und die Proteine durch Immunoblotting analysiert (Informationen zu den Antikörpern vgl. Kap. 4.1.7, S. 26, VP26 wurde mit α -NC-7 (Cohen et al., 1980) nachgewiesen). Im Vergleich zu den anderen Proben wurden die nukleären Kapside in einer höheren Konzentration eingesetzt, welche sich in der Bandenstärke der Kapsidproteine VP5, VP19c und VP26 widerspiegelt. Diese Daten wurden freundlicherweise von Claus-Henning Nagel (Institut für Virologie, MHH) zur Verfügung gestellt; aus Wolfstein et al. (2006).

Die nukleären und viralen Kapside enthielten das Hauptkapsidprotein VP5, VP19c und GFPVP26 (Abb. 5.13) oder VP26 (Abb. 5.14), die während der Salzextraktion an den viralen Kapsiden verblieben. Das schwache VP5-Signal in den Überständen, das auch ohne Lyse auftrat, weist auf eine geringe Menge an fehlerhaften Kapsidbruchstücken im Medium infizierter Zellen hin. Die Kapside aller Präparationen enthielten auch die Kapsid-assoziierten Proteine UL6 und UL25, die an der Verpackung der DNA in das Kapsid beteiligt sind.

Die Glykoproteine gC und gD und das myristylierte Membran-assoziierte Protein UL11 wurden nur in verschwindend geringen Mengen an den nukleären Kapsiden nachgewiesen und mit Triton X-100 leicht von den viralen Kapsiden gelöst. Sie waren aber auch in Spuren im Überstand unlysierter Viren nachzuweisen, welches von nicht sedimentierten defekten viralen Partikeln oder zellulären Membranen infizierter Zellen herrühren könnte. Während gC und gD quantitativ vom Kapsid entfernt wurden, kosedimentierte eine signifikante Fraktion von gB mit allen viralen Kapsiden. Bezogen auf die VP5-Menge enthielten die nukleären Kapside die wenigsten viralen Membranproteine.

Die Proteine VP1-3 und UL37, für die eine Lokalisation in der inneren Tegumentschicht postuliert wird, waren nur in viralen aber nicht in nukleären Kapsiden enthalten. Ein Teil der VP1-3 Moleküle wurde allerdings unabhängig von der KCl Konzentration von den Kapsiden extrahiert. VP13/14, VP22, vhs und US11 der sogenannten äußeren Tegumentschicht wurden von den viralen Kapsiden entfernt. Bei 0,1 M KCl wurde sehr viel weniger dieser Proteine extrahiert als bei hoher Salzkonzentration. Ein signifikanter Anteil von VP16 wurde unabhängig von der KCl-Konzentration entfernt. Nukleäre Kapside enthielten verglichen mit 1 M KCl extrahierten viralen Kapsiden nur Spuren von Tegument.

Durch Detergenz-Lyse von HSV1 konnten somit in Anwesenheit einer steigenden KCl-Konzentration virale Kapside mit einer unterschiedlichen Tegumentprotein-Zusammensetzung hergestellt werden. VP13/14, VP22, vhs und US11 wurden von den viralen Kapsiden mit 0,5 oder 1 M KCl extrahiert, wohingegen sie bei 0,1 M KCl am Kapsid gebunden blieben. Im Gegensatz dazu blieben die inneren Tegument Proteine VP1-3 und UL37 auch bei höherer Ionenstärke am Kapsid gebunden. Wie beschrieben (Homa & Brown, 1997; Newcomb & Brown, 1994) beinhalten nukleäre Kapside nur Kapsidproteine und Kapsid-assoziierte Proteine, wie z.B. UL6 und UL25, aber nahezu keine Proteine des inneren oder äußeren Teguments (Abb. 5.13 und 5.14).

5.3.4.4 Fluoreszenz der HSV1-GFPVP26-Kapside

In dem *in vitro* Testsystem für den HSV1-GFPVP26 Kapsidtransport wurden die 300 bis 450 GFP-Moleküle pro Kapsid (P. Desai, Johns Hopkins University, Philadelphia, persönliche Mitteilung) mit blauem Licht der Wellenlänge 450–490 nm angeregt und das

grüne Fluoreszenzsignal von 515 nm mit einer digitalen CCD-Kamera aufgezeichnet. Die Intensität der Lichtsignale variierte dabei.

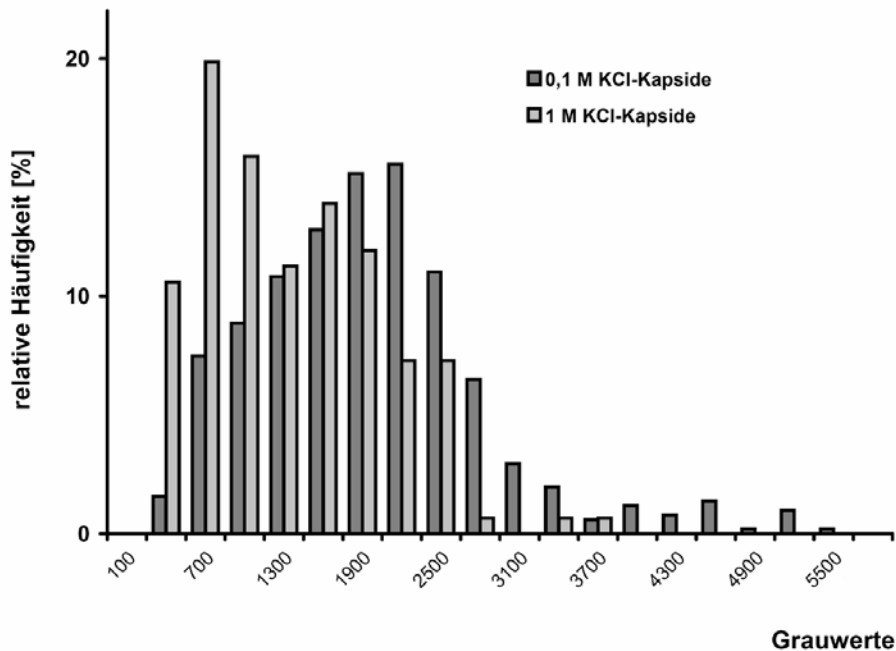


Abb. 5.15: Histogramm der relativen Häufigkeit der Fluoreszenzintensität (Grauwerte) von *in vitro* präparierten HSV1-GFPVP26-Kapsiden aus extrazellulärem Virus. Die Grauwerte wurden in einem Radius von 7 Pixel um das Zentrum des Partikels summiert, und der Hintergrund des aufgenommenen Bildausschnittes abgezogen (MetaMorph-Programm, Version 5.05). Die HSV1-GFPVP26-Kapside wurden aus extrazellulären Virionen nach Extraktion mit 1% Triton X-100 und 0,1 M oder 1 M KCl gewonnen. Sie wurden in Cytosol der Proteinkonzentration von 2,5 mg/ml resuspendiert und in eine mikroskopische Beobachtungskammer gegeben (vgl. Abb. 5.2, S. 53). Für jeden Kapsidtyp wurden die Grauwerte der Fluoreszenzintensität aus drei Filmen mit 508 Partikeln für 0,1 M KCl Extraktion und 151 Partikeln für die 1 M KCl Extraktion bestimmt und ihre relative Häufigkeit in einem Histogramm aufgetragen.

Eine Auftragung der gemessenen Grauwerte in einem Histogramm zeigte eine Normalverteilung der GFP-Intensitäten, wobei das Maximum der mit 1 M KCl extrahierten Kapside im Vergleich zu den 0,1 M-KCl-Kapsiden zu einer geringeren Intensität hin verschoben war (Abb. 5.15). Individuelle Virionen des HSV1-GFPVP26 waren möglicherweise beim Zusammenbau der Kapside mit unterschiedlichen Mengen an GFPVP26 bestückt worden. Die Verschiebung des Maximums zu kleineren Grauwerten bei der Erhöhung der Ionenstärke deutet auf eine Extraktion von GFPVP26 während der Kapsidpräparation hin (Abb. 5.15). Eine solche Extraktion war allerdings in einer Immunoblot-Analyse mit anti-VP26 nicht nachzuweisen (Abb. 5.13). Das photoelektrische Messverfahren bei der Bestimmung der GFP-Intensitäten ist aber quantitativer als die Abschätzung der Bandenstärken in einem Immunoblot. Auffällige Spitzen bzw. Häufungen von deutlich höheren GFP-Intensitäten, die auf Kapsid-Aggregate hingewiesen hätten, waren im Histogramm nicht zu erkennen (Abb. 5.15).

Das emittierte Licht wurde laut Abbildungslegende 5.16 über einen Durchmesser von 5 bis 6 Pixel bzw. 415 bis 498 nm auf dem CCD-Chip abgebildet. Dies entspricht dem 3 bis 4fachen des physikalischen Kapsiddurchmessers (Abb. 5.16).

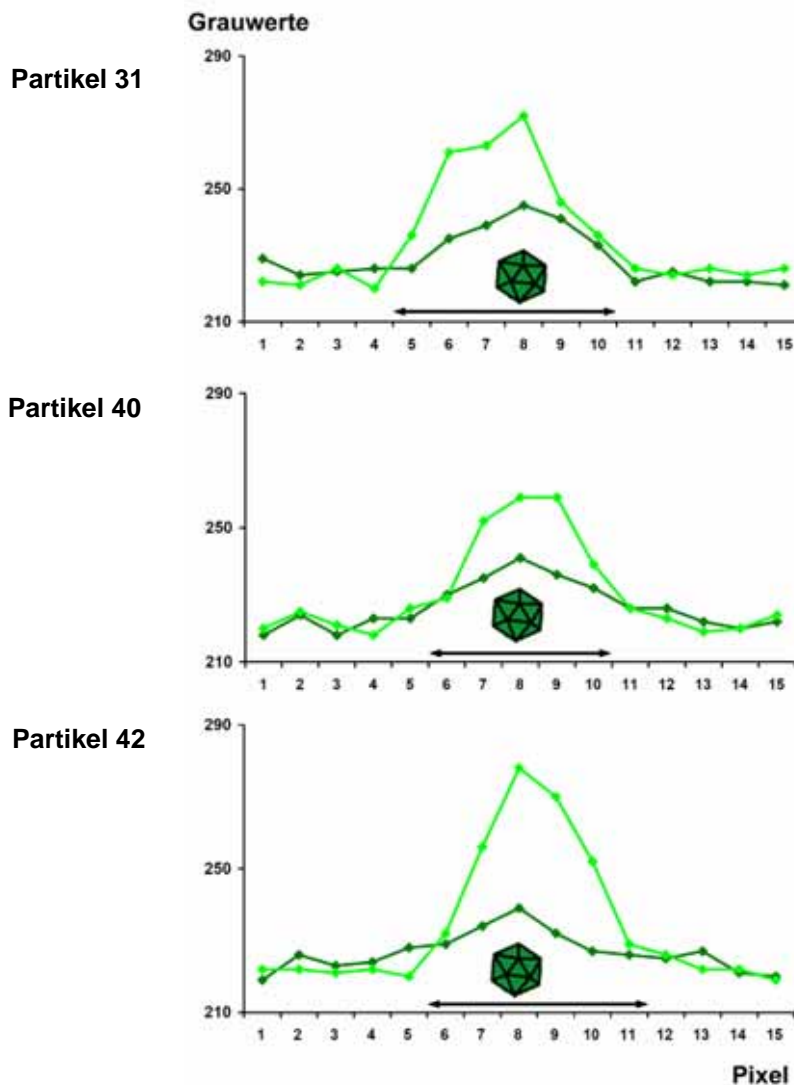


Abb. 5.16: Die Helligkeit der beweglichen HSV1-GFPVP26-Kapside verändert sich ungleichmäßig. In der Abbildung sind drei exemplarische Helligkeitsprofile der Partikel 31, 40 und 42 aus Abb. 5.17 (S.78) dargestellt. Dabei wurden die Grauwerte entlang des Querschnitts des Lichtflecks bestimmt, wobei das hellste Pixel im Zentrum des Lichtflecks lag. Die Helligkeiten des hellsten Pixels wurden während der Bewegung verfolgt und das Helligkeitsprofil des Lichtflecks für die größte (hellgrün) und die kleinste Intensität (dunkelgrün) des hellsten Pixels angegeben. Bei dem verwendeten Versuchsaufbau (Leica DM IBRE System, 100x Objektiv, vgl. Kap. 4.) war die räumliche Auflösung 1 Pixel/83 nm. Ein HSV1-Kapsid mit einem Durchmesser von 125 nm entsprach 1,5 Pixel, wobei es hier als Lichtfleck mit einem Durchmesser von 5 bis 6 Pixel erschien. Die Pixel und das Kapsid sind in der Abbildung maßstabsgetreu dargestellt.

5.3.5 Zeitverlaufs-Fluoreszenzmikroskopie des *in vitro* Testsystems

Um den cytosolischen HSV1 Kapsidtransport zu charakterisieren, wurde ein biochemisches *in vitro* Testsystem entwickelt, welches aus immobilisierten MT, Cytosol und Kapsiden mit unterschiedlicher Proteinzusammensetzung bestand. Cy3-markierte MT

wurden dazu mit BSA oder über die positiv geladenen Aminogruppen von DEAE-Dextran an die Glasoberfläche einer mikroskopischen Perfusionskammer angeheftet (Abb. 5.2, S. 53).

Da in einem Transport-Testsystem mit Organellen aus Tintenfischaxonen durch Caseinbeschichtung (5 mg/ml) die Bindung der Partikel an die Glasoberfläche reduziert und damit die Beweglichkeit stark erhöht werden konnte (Schroer et al., 1988), wurde hier nach Anheftung der MT die mikroskopische Perfusionskammer mit Casein beschichtet.

Zur Aufrechterhaltung des ATP-Spiegels und damit der Motoraktivität während des Experimentes wurden ATP-regenerierende Systeme eingesetzt. Dabei wird ADP durch Kreatinphosphokinase mit Kreatinphosphat zu ATP phosphoryliert (Blocker et al., 1997; Blocker et al., 1996; Murray et al., 2000). In verschiedenen *in vitro* MT-Transport-Experimenten wurden von 1 mM bis zu 4 mM ATP (Murray et al., 2000) eingesetzt. Die Senkung der ADP Konzentration durch ein ATP-regenerierendes System ist ein positiver Nebeneffekt, da ADP die Motoraktivität hemmt (Moss et al., 1992).

Bei anfänglichen Versuchen mit cytosolischen Extrakten aus Rattenhirn der Proteinkonzentration von etwa 6 mg/ml wurden Geschwindigkeiten von 2 bis 3 $\mu\text{m/s}$ und eine mittlere Bahnlänge von etwa 2,5 μm gemessen (vgl. Kap. 4.2.3.4.2, S. 41, Variante A). Da die Partikel in diesem Versuchsaufbau nur kurze Strecken in der Fokusebene mit den MT zurücklegten und dann dissoziierten, war eine klare Abgrenzung zur Diffusion schwierig. Aus Rattenleber präpariertes Cytosol hatte eine etwa 10fach höhere Proteinkonzentration im Vergleich zum Rattenhirncytosol. Hier wurde bei einer zeitlichen Auflösung von 10 s pro Bild eine extrem langsame Bewegung der Kapside sowohl bei den 0,1 M KCl als auch bei den 1 M KCl extrahierten Kapsiden von etwa **5 nm/s** entlang der Cy3-MT beobachtet (vgl. Kap. 4.2.3.4.2, S.41; Variante B; Film 3). Diese Werte waren im Vergleich zu den bisher in der Literatur beschriebenen Geschwindigkeiten in *in vitro* MT-Testsystemen ungewöhnlich klein (Allan, 1995; Muresan et al., 2001; Murray et al., 2000; Pollock et al., 1998; Robertson & Allan, 2000). Ferner sind frachtspezifische Motorbindungen bei hohen Proteinkonzentrationen schlecht zu identifizieren. Deshalb wurden für die weiteren Experimente verdünntere Cytosole verwendet.

Das in vielen Dynein-Transportsystemen etablierte *Xenopus*-Cytosol ergab hier *in vitro* Transportstrecken der HSV1-GFPVP26-Kapside von bis zu 30 μm (Allan, 1995; Allan & Vale, 1991; Robertson & Allan, 2000; vgl. Kap. 8.1, S.123, Film 6). Die mittleren Geschwindigkeiten lagen zwischen 0,09 und 0,15 $\mu\text{m/s}$ wobei maximale Geschwindigkeiten von bis zu 2,5 $\mu\text{m/s}$ erreicht wurden (vgl. Tabellen 5.6, S. 82 und 5.7, S. 83). In allen im Weiteren hier beschriebenen Experimenten wurde *Xenopus* Cytosol verwendet.

Die GFPVP26-Kapside wurden zuerst aus sezernierten Virionen in Gegenwart einer hohen Ionenstärke von 1 M KCl präpariert, weil Kapside bei physiologischer Salzkonzentration zur Aggregation neigen (Newcomb & Brown, 1994; Ojala et al., 2000). Da

der MT-vermittelte Transport durch eine hohe Ionenstärke inhibiert wird, wurden die Kapside direkt in salzfreiem Cytosol resuspendiert (Wang & Sheetz, 2000). Eine elektronenmikroskopische Untersuchung der Kapside nach Negativkontrastierung zeigte in allen Präparationen vorwiegend einzelne Kapside mit einigen, wenigen Aggregaten. Nach 10 bis 30 min wurde die Cytosol-Kapsid-Mischung zu den angehefteten MT in die Perfusionskammer gegeben. Die GFPVP26-Kapsid-Motilität wurde mit Hilfe der digitalen Zeitverlaufs-Fluoreszenzmikroskopie aufgezeichnet, indem die Translokation der einzelnen fluoreszierenden Partikel in einzelnen abgespeicherten Bildern untersucht wurde (Abb. 5.17; Kap. 8.1, S.121; Film 4 und Abb. 5.18).

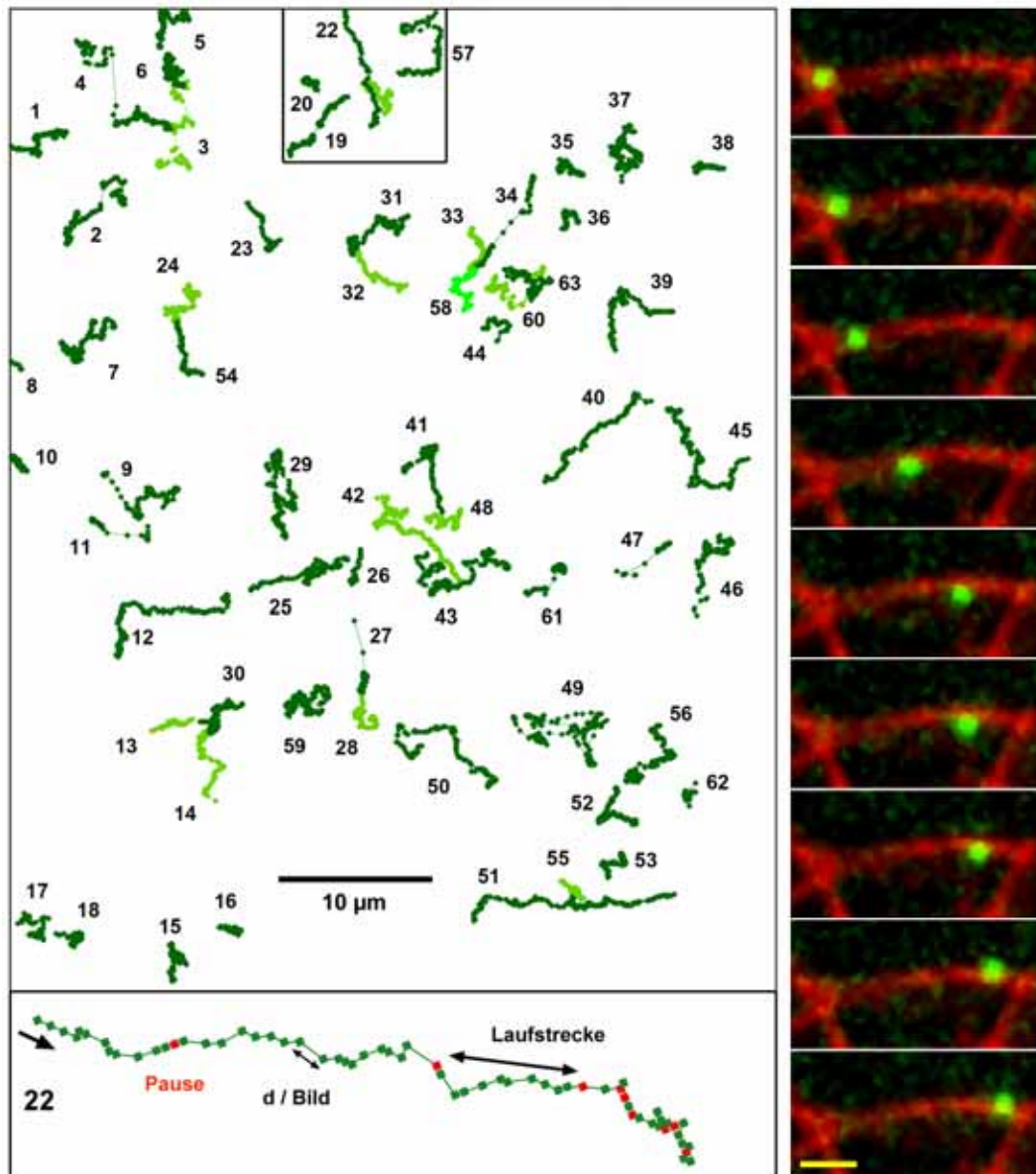


Abb. 5.17: Darstellung der Bewegung von 63 beweglichen HSV1-GFPVP26-Kapsiden eines Films der Länge von 320 s in einem Kameraausschnitt von $48 \mu\text{m} \times 65 \mu\text{m}$ entlang von MT *in vitro* mit digitaler Zeitverlaufs-Fluoreszenzmikroskopie (Leica DM IBRE System) und einer zeitlichen Auflösung von 1,6 s pro Bild und einem 100x Objektiv. Die viralen HSV1-GFPVP26-Kapside wurden aus extrazellulären Virionen nach Lyse mit 1% Triton X-100 und 1 M KCl gereinigt, in *Xenopus* Cytosol der Konzentration 2,5 mg/ml resuspendiert und in eine Cy3-MT beschichtete Kammer perfundiert. Die Ortsveränderungen aller GFPVP26-markierten HSV1-Kapside wurden in diesem Film als grüne Quadrate dargestellt. Sie wurden durch grüne Linien verbunden, um ihre Bahnen darzustellen und nummeriert. Zur Unterscheidung benachbarter Bahnen wurden verschiedene Grüntöne verwendet. Der Film der Partikelbahnen 19 – 22 und 57 (oberer Rahmen) ist im Kap. 8.1 beschrieben (Film 4). Im unteren Ausschnitt ist die Bahn des Partikels 22 vergrößert abgebildet. Jede Partikelbahn bestand aus mehreren Messpunkten, welche die Partikelpositionen zu verschiedenen Zeitpunkten darstellen und damit die Partikelbewegung repräsentieren (d; grüne Quadrate). Der Abstand der Partikelpositionen in zwei aufeinander folgenden Bildern (d/Bild) wurde von allen Partikeln in allen Filmen bestimmt. Eine Partikelbahn bestand häufig aus aufeinander folgenden Läufen, die durch Pausen mit unterschiedlicher Dauer unterbrochen wurden (rote Quadrate). Die Laufstrecken wurden durch Summieren aller einzelnen Ortsveränderungen (d) zwischen den Pausen bestimmt. Die Bahnlänge bestand aus der Summe aller Laufstrecken. In diesem Film waren die mittlere Bahnlänge $12,78 \pm 0,86 \mu\text{m}$ und die mittlere Laufstrecke $0,47 \pm 0,02 \mu\text{m}$. Nur Bahnen von über $1 \mu\text{m}$ sind hier dargestellt und wurden in die Analyse einbezogen. Der rechte Teil der Abbildung zeigt die Bewegung eines Kapsids (grün) entlang eines MT (rot) in einer Bilderfolge, wobei jedes 24. Bild dargestellt ist. Skalierungsbalken: $2 \mu\text{m}$. Aus Wolfstein et al. (2006).

Die Kapside zeigten dabei drei verschiedene Verhaltensweisen: Freie Diffusion oberhalb der MT-Ebene, eine stabile Bindung an den MT während der Messzeit (* in Film 5, vgl. Kap. 8.1, S. 122) und eine Bewegung auf gekrümmten Bahnen in der MT-Ebene, die in vielen Fällen entlang der mit Cy3-markierten MT verlief (vgl. Kap. 8.1, S. 121-125, Filme 4 bis 8). Die Partikel in der letzten Gruppe zeigten sehr heterogene Bewegungsmuster. Viele Kapside bewegten sich auf gekrümmten oder linearen Bahnen über viele Mikrometer (Film 6), wechselten teilweise von einem MT zum anderen (Film 7), pausierten gelegentlich (Film 7 und Film 8) oder änderten ihre Richtung (Film 7). Ferner wurden Phasen von unregelmäßiger Oszillation beobachtet, als ob die Partikelbewegung auf eine Region beschränkt war. Viele der Richtungsänderungen der sich bewegenden Partikel spiegelten die Architektur der angehefteten MT wider (Film 7). In solchen Fällen verblieben die Kapside ohne irgendeinen Langstreckentransport in derselben Region der Kammer (vergrößerte Ausschnitte in Abb. 5.18).

Für jedes mobile Partikel wurde die gesamte Bahnlänge durch das Summieren aller gemessenen Ortsveränderungen zwischen aufeinander folgenden Bildern des digitalen Films (vgl. Abb. 5.17, unterer Kasten) bestimmt. Viele Bahnen bestanden aus vielen einzelnen Läufen, die durch Pausen unterbrochen wurden (Abb. 5.17, rote Quadrate im unteren Kasten). Die absolute Anzahl der Partikel, durchschnittliche Bahnlänge, Laufstreckenlänge, Pausenlänge oder Geschwindigkeit (Tabelle 5.7, S.83) variierten wegen der verschiedenen Aufzeichnungsbedingungen wie Cytosol-Charge, zeitliche und räumliche Auflösung, Filmlänge oder MT-Konzentration. Die durchschnittlichen MT-Längen der Perfusionskammer eines Experiments waren vergleichbar, variierten aber zwischen den verschiedenen Versuchstagen. In den einzelnen Experimenten wurden insgesamt 600 Partikelbahnen analysiert, die bis zu 30 μm lang sein konnten (Film 6).

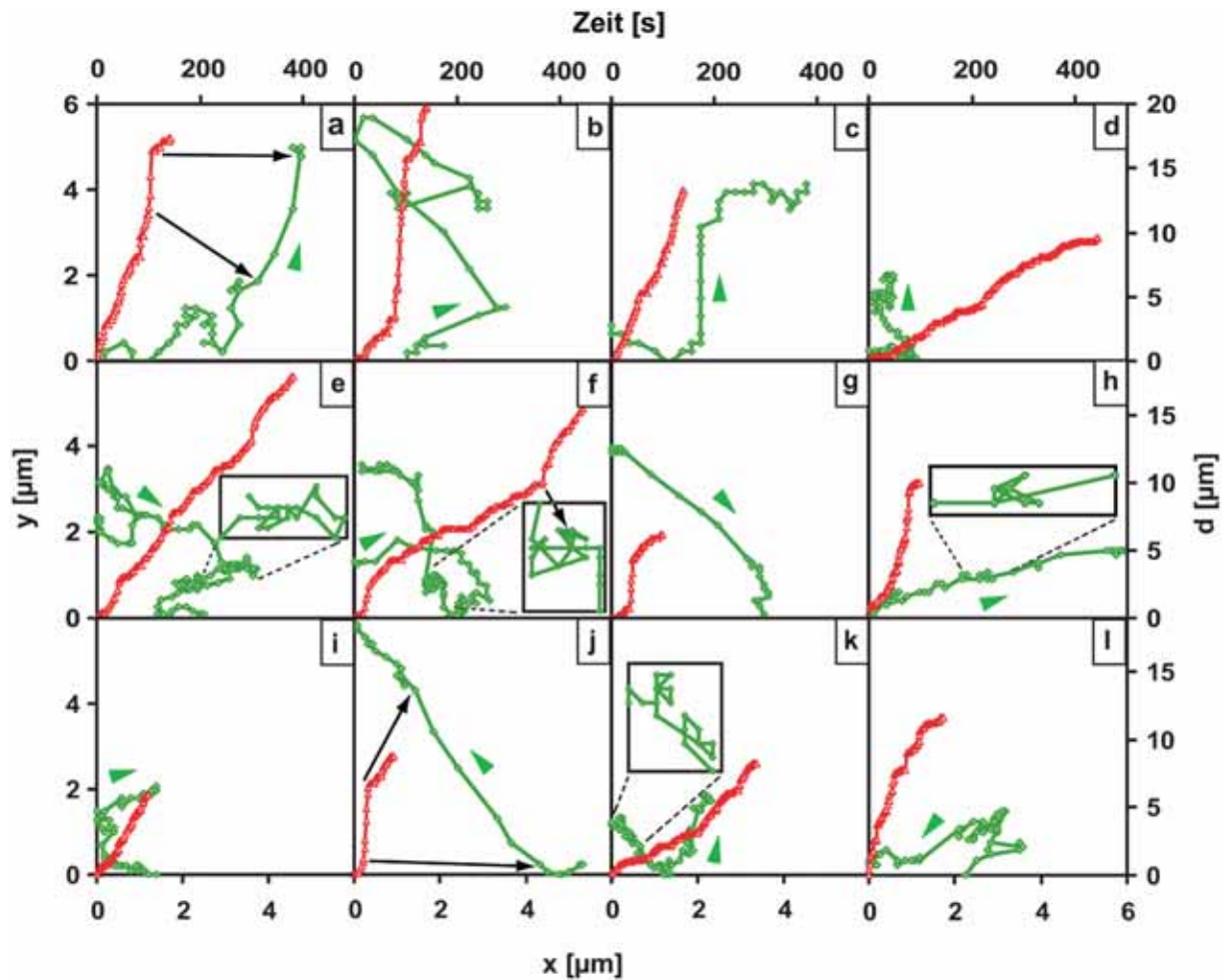


Abb. 5.18: Detaillierte Analysen von 12 repräsentativen Partikelbahnen der HSV1-GFPVP26-Kapside *in vitro*. Die Positionen der sich in Anwesenheit von Cytosol und ATP (vgl. Kap. 4.2.6 und 4.2.7) bewegend fluoreszierenden Partikel wurden in x/y Diagrammen eingezeichnet (a-l, grüne Spuren, die Richtungen wurden mit grünen Pfeilen markiert). Die Gestalt der individuellen Bahnen kann in lineare und gekrümmte mehrere Mikrometer lange Abschnitte unterteilt werden, die durch Pausen, Richtungsänderungen und kleine Bereiche mit oszillierenden Bewegungen unterbrochen wurden (eingefügte Kästen in höherer Vergrößerung).

Die zurückgelegte Strecke (d) während der Beobachtungszeit wurde in d/t Diagrammen dargestellt (rote Linien). Die zurückgelegten Strecken (rote Linien) wurden mit den Partikelpositionen (grüne Linien) durch schwarze Pfeile korreliert. Die Langstreckenbewegungen in eine Richtung korrespondierten mit hohen Geschwindigkeiten während die oszillierenden Bewegungen eher langsam waren.

Hier wurde die Bewegung von 1 M KCl extrahierten GFPVP26-markierten Kapsiden mit Zeitverlaufs-Fluoreszenzmikroskopie in Anwesenheit von *Xenopus* Cytosol, ATP und stationären taxolstabilisierten Cy3-MT aufgezeichnet. Die Partikelbahnen a-c wurden mit einer zeitlichen Auflösung von 1,4 s pro Bild, d-f mit 3 s pro Bild, g-i mit 1 s pro Bild und j-l mit 1,2 s pro Bild aufgezeichnet. Die Partikelbahnen a-c wurden mit einem 40x Objektiv und die Tracks d-l mit einem 100x Objektiv aufgezeichnet. Aus Wolfstein et al. (2006).

Trug man die Laufstrecke d gegen die Zeit t auf (Abb. 5.18, d-t-Kurven in rot), so wurde offensichtlich, dass solche ungerichteten Bewegungen durch eine geringe Geschwindigkeit charakterisiert waren, wohingegen ein Langstreckentransport in eine Richtung mit hohen Geschwindigkeiten korrelierte (Abb. 5.18 a, j). Da keine Aktin-Filamente in diesem Testsystem nachzuweisen waren (Abb. 5.6 D-F) fanden vermutlich alle schnellen

Langstreckenbewegungen entlang von MT statt, die nicht immer mit Cy3 markiert waren (Abb. 5.6 A-C, S.60).

In den für den HSV1-Kapsidtransport verwendeten *in vivo* Systemen konnte bisher nicht geklärt werden, ob der MT-abhängige Transport nicht über eine Membranassoziation der Kapside erfolgte. In dem hier beschriebenen *in vitro* Testsystem war der Transport der Viren in einer zellulären Membran oder an der cytosolischen Oberfläche einer Membran *per se* ausgeschlossen, da das verwendete Cytosol keine Membranen enthielt (vgl. Kap. 5.3.3, S. 58; Abb. 5.5).

In die Quantifizierungen wurden nur Kapside mit einer Ortsveränderung von mehr als 1 μm in der MT-Ebene einbezogen. Für jede experimentelle Bedingung wurden 1 bis 3 Filme von 3 bis 7,5 Minuten Länge von zufällig ausgewählten Ausschnitten der mikroskopischen Perfusionskammer aufgenommen. Neben der MT-Dichte wurden die absolute Anzahl aller in der Fokusebene sichtbaren Kapside und der prozentuale Anteil der beweglichen Kapside bestimmt. Die Bahnlänge eines Partikels ergab sich aus der Gesamtbewegung während der Beobachtungszeit. Wenn eine Ortsveränderung des Partikels kleiner als die Pixelauflösung war, konnte keine Translokation beobachtet werden. Dies wurde als Pause definiert. Die Ortsveränderungen zwischen zwei Pausen wurden als Laufstrecken bezeichnet. Die Anzahl der über die einzelnen Filme gemittelten beweglichen Partikel in einem Experiment lag zwischen 4 bis 20 in einem $10.000 \mu\text{m}^2$ Bildausschnitt pro Minute (Tabelle 5.6). In einem Film waren sogar über 40 bewegliche Partikel/ $10.000 \mu\text{m}^2/\text{min}$ identifiziert worden (Abb. 5.17). Die Daten der statistischen Analyse der Experimente mit unterschiedlich präparierten Kapsiden und die Auswirkung der Zugabe von Dynamitin sind in Tabelle 5.7 zusammengefasst.

Tabelle 5.6: Dynamik 1 M KCl-extrahierter GFPVP26-Kapside. Die Aufzeichnung der Bewegung *in vitro* erfolgte mit der CCD Kamera des Leica DM IBRE Systems (siehe 4.1.2) von einem Ausschnitt der Größe 48 μm x 65 μm mit dem 100x Objektiv (82 nm/Pixel). Das Zeitintervall zwischen den Bildern lag im Bereich von 1,4 bis 1,6 s.

In den Experimenten (1), (2), (5) und (7) bis (10) wurde die Motilität in drei, in den Experimenten (3) und (6) in einem und in dem Experiment (5) in vier verschiedenen Ausschnitten aufgezeichnet. Die Aufzeichnungszeit lag in den Experimenten (1), (7), (8) und (10) bei 4 min, in den Experimenten (2) bis (6) bei 4 min 44 s und im Experiment (9) bei 5 min 20 s. Die mittleren Geschwindigkeiten lagen dabei zwischen 0,09 und 0,15 $\mu\text{m/s}$. Geschwindigkeiten von weniger als 1 Pixel/s bzw. 0,06 $\mu\text{m/s}$ wurden dabei als 0 $\mu\text{m/s}$ definiert. Angegeben ist der Standardfehler.

	Cytosol [mg/ml]	mobile Partikel	mobile Partikel [10000 μm^2 /min]	Bahnlänge [μm]	Geschwindigkeit [$\mu\text{m/s}$]	Laufstrecken [μm]
1	2,5	71	18,78	6,18 \pm 0,50	0,11 \pm 0,00 (n = 2453)	0,40 \pm 0,02 (n = 1101)
2	2,5	46	10,28	6,12 \pm 0,66	0,13 \pm 0,00 (n = 1457)	0,40 \pm 0,04 (n = 712)
3	2,5	11	6,71	4,35 \pm 0,69	0,11 \pm 0,00 (n = 316)	0,26 \pm 0,02 (n = 184)
4	2,5	24	4,02	6,33 \pm 0,59	0,09 \pm 0,00 (n = 1123)	0,29 \pm 0,02 (n = 523)
5	2,5	103	23,03	13,11 \pm 0,71	0,09 \pm 0,00 (n = 8923)	0,52 \pm 0,02 (n = 2611)
6	5,0	10	7,38	7,14 \pm 1,80	0,13 \pm 0,01 (n = 387)	0,54 \pm 0,06 (n = 133)
7	5,0	22	5,82	8,38 \pm 1,53	0,15 \pm 0,01 (n = 741)	0,57 \pm 0,10 (n = 324)
8	5,2	40	10,58	10,76 \pm 0,83	0,09 \pm 0,00 (n = 2816)	0,60 \pm 0,04 (n = 719)
9	10,4	52	10,32	11,95 \pm 1,01	0,11 \pm 0,00 (n = 3360)	0,74 \pm 0,04 (n = 838)
10	10,4	21	5,56	6,31 \pm 0,88	0,09 \pm 0,00 (n = 946)	0,29 \pm 0,03 (n = 460)

Die Experimente 2,3,6,8 und 10 sind auch in Tabelle 5.7 dargestellt.

Tabelle 5.7: Statistische Analyse des HSV1-GFPVP26-Kapsidtransportes entlang von MT.

Cytosol [mg/ml]	MT-Dichte [$\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$]	Alle Partikel [1]	mobile Partikel	Bahnlänge [μm]	Laufstrecke [μm]	Läufe/Bahn	Pausenlänge [s]	d / Bild [μm]	Geschwindigkeit [$\mu\text{m}/\text{s}$]
10	5,71 ± 1,56	183,5 ± 0,5	11%	6,31 ± 0,88 (21)	0,29 ± 0,03 (460)	21,8	5,05 ± 0,29 (462)	0,14 ± 0,00 (946)	0,09 ± 0,00
5	7,72 ± 0,12	190,0 ± 3,0	21%	10,76 ± 0,83 (40)	0,60 ± (719)	17,9	3,18 ± 0,14 (702)	0,15 ± 0,00 (2816)	0,09 ± 0,00
P-Wert				**5,78·10 ⁻⁴	**1,43·10 ⁻¹¹		**9,01·10 ⁻⁹	*1,03·10 ⁻²	n.b.
Kapsid (1 M KCl); 1,6 s/Bild; 240 s, 3 Filme/Bedingung									
5	1,62 ± 0,00	380,5 ± 6,5	3%	7,14 ± 1,71 (10)	0,54 ± 0,06 (133)	13,2	4,30 ± 0,39 (134)	0,18 ± 0,01 (387)	0,13 ± 0,01
2,5	2,72 ± 0,00	242,0 ± 10,5	5%	4,35 ± 0,66 (11)	0,26 ± 0,02 (184)	16,7	6,33 ± 0,89 (189)	0,15 ± 0,01 (316)	0,11 ± 0,00
P-Wert				0,17	**2,74·10 ⁻⁵		*3,90·10 ⁻²	**4,25·10 ⁻³	**4,19·10 ⁻³
Kapsid (1 M KCl); 1,4 s/Bild; 280 s, 1 Film/Bedingung									
	MT-Dichte [$\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$]	Alle Partikel [1]	mobile Partikel	Bahnlänge [μm]	Laufstrecke [μm]	Läufe/Bahn	Pausenlänge [s]	d / Bild [μm]	Geschwindigkeit [$\mu\text{m}/\text{s}$]
1. BSA	4,97 ± 1,31	135,5 ± 2,5	19%	7,23 ± 0,86 (26)	0,69 ± 0,06 (274)	10,5	3,66 ± 0,23 (257)	0,19 ± 0,01 (997)	0,09 ± 0,00
2. BSA (MonoQ)	4,57 ± 0,77	233,0 ± 4,0	11%	4,42 ± 0,48 (25)	0,44 ± 0,06 (250)	10,1	11,32 ± 1,53 (253)	0,19 ± 0,01 (569)	0,10 ± 0,01
3. Dynamitin (MonoQ)	4,18 ± 0,28	369,0 ± 4,2	2%	6,64 ± 1,27 (7)	0,37 ± 0,04 (127)	18,0	4,58 ± 0,36 (127)	0,14 ± 0,01 (327)	0,07 ± 0,00
P-Wert (1 vs. 2)				**7,85·10 ⁻³	**3·10 ⁻³		**1,28·10 ⁻⁶	0,69	0,64
P-Wert (2 vs. 3)				0,17	0,28		**2,46·10 ⁻⁵	**2,61·10 ⁻⁴	**3,04·10 ⁻⁴
Kapsid (0,5 M KCl); Cytosol (1,5 mg/ml); 3 s/Bild, 450 s, 3 Filme/Bedingung									
Kapsid [M KCl]	MT-Dichte [$\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$]	Alle Partikel [1]	mobile Partikel	Bahnlänge [μm]	Laufstrecke [μm]	Läufe/Bahn	Pausenlänge [s]	d / Bild [μm]	Geschwindigkeit [$\mu\text{m}/\text{s}$]
0,1	2,05 ± 0,11	693,5 ± 9,5	3%	4,66 ± 0,52 (20)	0,32 ± 0,03 (287)	14,6	5,11 ± 0,41 (288)	0,16 ± 0,01 (585)	0,11 ± 0,00
1	2,60 ± 0,08	145,5 ± 9,5	32%	6,12 ± 0,66 (46)	0,40 ± 0,04 (712)	15,3	4,62 ± 0,24 (709)	0,19 ± 0,00 (1457)	0,13 ± 0,00
P-Wert				0,09	0,15		0,31	**6,84·10 ⁻⁵	**2,37·10 ⁻⁴
Cytosol (2,5 mg/ml); 1,4 s/Bild; 280 s, 3 Filme/Bedingung									

Tabelle 5.7: Statistische Analyse des HSV1-GFPVP26-Kapsidtransportes entlang von MT. Von oben nach unten: Einfluss der Cytosolkonzentration (vgl. Abb. 5.19, S.85), Dynamitin-Zugabe (vgl. Abb. 5.20, S.87) und Tegumentprotein-Zusammensetzung (vgl. Kap. 5.4.3, S.92; Abb. 5.24) auf den Kapsidtransport. Für jedes Experiment sind die Bahnlänge (zurückgelegte Strecke vom Anfang bis zum Ende der Aufzeichnung, Abb. 5-16 untere Box), die Laufstrecke (zurückgelegte Strecke zwischen zwei Pausen), Anzahl der Läufe pro Bahn, Länge einer Pause, Ortsveränderung zwischen zwei aufeinander folgenden Bildern (d/Bild) und die Geschwindigkeit mit den dazugehörigen Standardfehlern aufgelistet. Die Anzahl der Ereignisse (n) für jeden Parameter ist in Klammern angegeben. Die Prüfgröße P wurde durch einen zweiseitigen Students t-Test für ungleiche Varianzen ermittelt. Signifikante P-Werte wurden mit einem roten Stern und hochsignifikante P-Werte mit zwei roten Sternen gekennzeichnet. Die Experimente wurden mit dem Leica DM IBRE System (vgl. Kap. 4.1.2, S.23) und einem 100x Objektiv durchgeführt.

„*Alle Partikel*“ ist die durchschnittliche Anzahl aller Partikel in der Fokusebene im ersten und letzten Bild eines Films. Die relative Anzahl aller beweglichen Partikel bezieht sich auf alle Partikel. Die MT-Dichte wurde wie in Material und Methoden (vgl. Kap. 4.2.5, S. 45) beschrieben bestimmt. Aus Wolfstein et al. (2006).

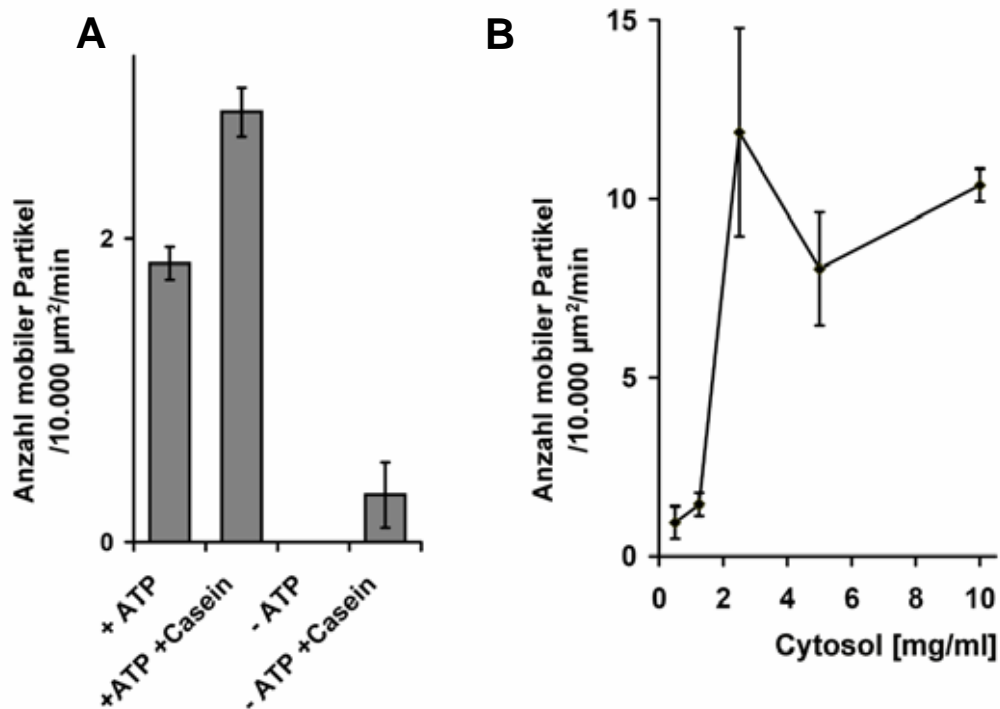


Abb. 5.19: Der *in vitro* HSV1-GFPVP26-Kapsidtransport entlang von MT benötigt ATP und cytosolische Faktoren.

(A) Die Anzahl der HSV1-GFPVP26-Kapside (n), die mit 0,5 M KCl präpariert wurden und eine Bahnlänge von über 1 μm hatten, wurde in Anwesenheit ($n = 24$) oder Abwesenheit ($n = 0$) von ATP bestimmt. Das Diagramm zeigt die mittlere Anzahl der mobilen Partikel aus zwei Filmen von 200 s Länge, die auf die aufgenommene Fläche und Zeit normalisiert wurde (Anzahl mobiler Partikel/10.000 $\mu\text{m}^2/\text{min}$). Um den endogenen ATP-Spiegel zu senken, wurde das Cytosol einer Proteinkonzentration von 2,5 mg/ml mit 10 U/ml Apyrase behandelt. Die Zugabe von 3 mg/ml Casein erhöhte die Anzahl der transportierten Partikel von 24 auf 37, und eine Verringerung der ATP-Konzentration reduzierte den Kapsidtransport in Anwesenheit von Casein auf 4 mobile Partikel.

(B) Titration der für einen Kapsidtransport benötigten Cytosolkonzentration. Die mittlere Anzahl der mobilen mit 1 M KCl extrahierten viralen Kapside wurde auf die aufgezeichnete Fläche und Zeit normalisiert (Anzahl mobiler Partikel/10.000 $\mu\text{m}^2/\text{min}$). Die Daten wurden aus Filmen verschiedener Experimente, die Messwerte mit unterschiedlichen Cytosolkonzentrationen beinhalteten, zusammen gezogen.

Die Anzahl der mobilen Partikel war 6 in 3 Experimenten mit 0,5 mg/ml, 9 in 3 Experimenten mit 1,3 mg/ml, 230 in 6 Experimenten mit 2,5 mg/ml, 69 in 3 Experimenten mit 5,0 mg/ml und 67 in 2 Experimenten mit 10 mg/ml.

Die Balken repräsentieren den Standardfehler. Teilweise aus Wolfstein et al. (2006).

Wenn der ATP-Spiegel im Cytosol durch Apyrase reduziert worden war, nahm die Anzahl der beweglichen Partikel in einem Experiment auf 0 ab (Abb. 5.19 A). In einem parallelen Experiment wurde Casein zum Cytosol gegeben, um unspezifische Proteinbindungen zu reduzieren. Die Konzentration an aktiven Motoren im Cytosol kann z.B. durch ihre Bindung an der Glasoberfläche der Perfusionskammer reduziert werden, welches durch Absättigung der Oberfläche mit Casein verringert würde. Tatsächlich wurden in Anwesenheit von Casein mehr bewegliche Partikel beobachtet ($n = 37$). In Anwesenheit von Apyrase und Casein reduzierte sich die Motilität auf 4 motile Partikel. Casein reduzierte außerdem die mittlere Laufstrecke von $2,32 \pm 0,48$ ($n = 67$) auf $1,36 \pm 0,17$ μm ($n = 199$; $P = 0,064$), die mittlere elementare Schrittweite von $0,65 \pm 0,04$ ($n = 239$) auf $0,49 \pm 0,02$ μm

($n = 556$; $P = 9 \times 10^{-3}$) und die mittleren elementaren Geschwindigkeiten von $0,32 \pm 0,02$ ($n = 239$) auf $0,24 \pm 0,01$ $\mu\text{m/s}$ ($n = 556$; $P = 6 \times 10^{-4}$; Abb. 5.19 A). Während Casein die Anzahl der mobilen Partikel erhöhte, vermutlich weil es die Bindung der Partikel oder der Motoren an die Glasoberfläche reduzierte (Schroer et al., 1988), verringerte es die Transport-Prozessivität und die Geschwindigkeit und wurde deshalb in den folgenden Experimenten (Tabellen 5.6, S.82 und 5.7, S.83) nicht mehr verwendet.

Die größeren mittleren Laufstrecken und Geschwindigkeiten im Vergleich zu den in Tabelle 5.7 dargestellten Werten erklären sich aus der Verwendung eines 40x Objektivs mit einer räumlichen Auflösung von 207 nm/Pixel im Vergleich zu dem 100x Objektiv mit 83 nm/Pixel (Leica DM IBRE System, vgl. Kap. 4.1.2, S.23). Die Positionen der Kapside werden durch die Mittelpunkte der quadratischen Pixel angenähert. Die kleinsten Einheiten der Ortsveränderungen werden durch die Seitenlänge (d) oder die Diagonale ($\sqrt{2} \times d$) der apparenten quadratischen Pixel begrenzt. Jede Ortsveränderung über n Pixel bzw. n' Pixel für diagonale Bewegungen kann somit durch $n \times d + n' \times \sqrt{2} \cdot d$ dargestellt werden. Jede Ortsveränderung in einem gegebenen Zeitintervall, die kleiner war als d bzw. $\sqrt{2} \cdot d$ wurde nicht detektiert und ging damit nicht in die Datenanalyse für die Geschwindigkeiten ein. So waren die mittleren Geschwindigkeiten, die mit dem 40x Objektiv bestimmt wurden, gegenüber den mittleren Geschwindigkeiten, die mit einer höheren räumlichen Auflösung gemessen wurden, höher.

Ein *in vitro* Kapsidtransport wurde reproduzierbar mit Cytosol in einer Proteinkonzentration von 2,5 mg/ml und höher beobachtet (Abb. 5.19 B). Reduzierte man die Cytosolkonzentration von 5 mg/ml auf 2,5 mg/ml, so änderte sich die Anzahl der mobilen Partikel nicht signifikant, aber die mittlere Laufstrecke verkürzte sich von 0,54 auf 0,26 μm ($P = 2,74 \times 10^{-5}$) und die Durchschnittsgeschwindigkeit von 0,13 auf 0,11 $\mu\text{m/s}$ ($P = 4,19 \times 10^{-3}$), wobei die Anzahl der beweglichen Partikel in etwa konstant blieb. Eine Erhöhung der Cytosolkonzentration von 5 auf 10 mg/ml veränderte die Anzahl der beweglichen Partikel nicht, verringerte aber signifikant die mittlere Bahn- und Laufstreckenlänge, wobei sich die Pausenlänge erhöhte (Tabelle 5.7). Möglicherweise wurde ab einer bestimmten MAP-Dichte auf der MT-Oberfläche der Motor-vermittelte Transport reduziert.

Bei einer weiteren Verdünnung des Cytosols auf eine Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml wurden nur noch sehr wenige motile Partikel nachgewiesen (Abb. 5.19 B). Der beobachtete *in vitro* Kapsidtransport benötigte folglich cytosolische Faktoren.

5.4 Anwendung der *in vitro* Testsysteme

Mit Hilfe der *in vitro* Testsysteme sollten cytosolische und virale Faktoren identifiziert werden, die am Kapsidtransport beteiligt waren.

5.4.1 Dynactin-abhängiger Kapsidtransport

Weil Dynein und Dynactin am HSV1-Kapsidtransport beteiligt sind (Döhner et al., 2002; Sodeik et al., 1997), wurde der Kapsidtransport in Gegenwart von rekombinantem Dynamitin untersucht. Große Mengen Dynamitin zerstören den Dynactin-Komplex im *Xenopus* Cytosol (Wittmann & Hyman, 1999). Eine Überexpression von Dynamitin in transfizierten Zellen reduziert den MT-abhängigen HSV1-Kapsidtransport zum Zellkern (Döhner et al., 2002). Da das Dynamitin in MonoQ-Säulen Elutionspuffer gelöst war, der somit die Ionenstärke des Testsystems um 20 mM KCl erhöhte, wurde als Kontrolle in diesem Puffer gelöstes BSA zum Testsystem gegeben.

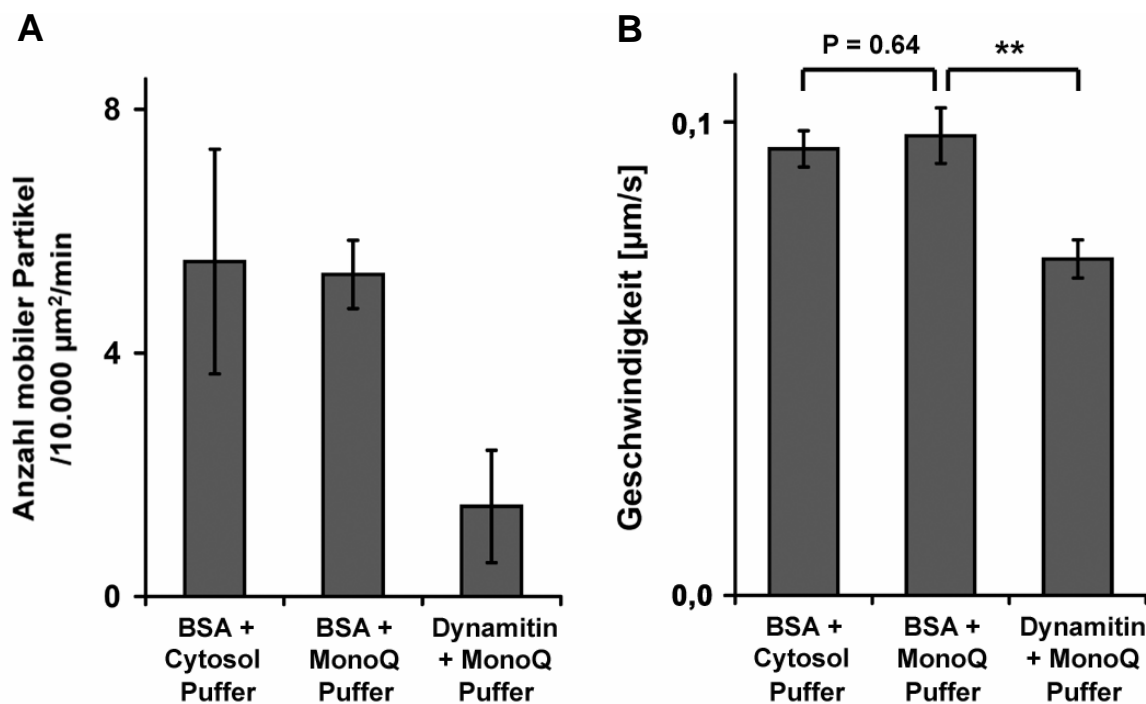


Abb. 5.20: Der *in vitro* HSV1-GFPVP26-Kapsidtransport entlang von MT wird durch rekombinantes Dynamitin gehemmt.

(A) Die Zugabe von 1 mg/ml rekombinantem Dynamitin in MonoQ-Puffer zum Cytosol reduzierte die Anzahl der mobilen Partikel (n) von 0,5 M KCl extrahierten viralen Kapsiden von $n = 25$ im Vergleich zu der Zugabe von 1 mg/ml BSA in MonoQ-Puffer auf $n = 7$. Für jeden experimentellen Parameter wurde die Anzahl der mobilen Partikel auf die aufgenommene Fläche und Zeit aus drei Filmen normalisiert.

(B) Dynamitin in MonoQ-Puffer reduzierte die mittlere Geschwindigkeit im Vergleich zum BSA in MonoQ-Puffer. Die Zugabe von MonoQ-Puffer allein zum Cytosolpuffer beeinflusste die mittlere Geschwindigkeit nicht. Die mittleren Kapsidgeschwindigkeiten wurden aus n Kapsidtranslokationen von allen mobilen Kapsiden zwischen allen aufeinander folgenden Bildern (d/Bild, Abb. 5.17, S.78) berechnet. Die Balken repräsentieren den Standardfehler. Hochsignifikante p -Werte wurden mit (**) markiert. Aus Wolfstein et al. (2006).

Die Zugabe von rekombinantem Dynamitin zum *in vitro* Kapsidtransport-Testsystem reduzierte die Anzahl der mobilen Partikel im Vergleich zu BSA in MonoQ-Puffer (Abb. 5.20 A, Tabelle 5.7, S.83). Die mittleren Geschwindigkeiten verringerten sich durch die Anwesenheit des Dynamitins von 0,10 auf 0,07 $\mu\text{m/s}$ ($P = 3,04 \times 10^{-4}$, Abb. 5.20 B), wobei die alleinige Zugabe von MonoQ-Puffer keinen Effekt hatte. Die mittleren Geschwindigkeiten wurden kaum durch die Ionenstärke beeinflusst (Abb. 5.20 B). Die Partikel, welche nach Dynamitin Zugabe noch beweglich waren, hatten verglichen zur BSA-Kontrolle in MonoQ-Puffer ähnliche Bahnlängen und Laufstrecken. Eine Zugabe von MonoQ-Puffer reduzierte aber die Bahnlängen von 7,23 auf 4,42 μm ($P = 7,85 \times 10^{-3}$) und die Laufstrecken von 0,69 auf 0,44 μm ($P = 3,00 \times 10^{-3}$). Die Dauer der Pausen wurde durch den MonoQ-Puffer von 3,66 auf 11,32 s ($P = 1,3 \times 10^{-6}$) erhöht (Tabelle 5.7).

Dieses Experiment zeigt, dass der Kapsidtransport *in vitro* durch einen Dynactin-stimulierten MT-Motor katalysiert wurde.

5.4.2 *In vitro* Bindungs-Testsysteme

Als nächstes wurden die verschiedenen viralen Transportgüter bezüglich ihrer Interaktion mit MT-Motoren untersucht. Dazu wurden die isolierten Kapside direkt in Cytosol resuspendiert und nach 30 min Inkubation durch ein Saccharosekissen sedimentiert. Das resultierende Kapsidsediment wurde mittels Immunoblot analysiert. Das Cytosol wurde mit 50 μM Nocodazol (ND) versetzt, um eine Bildung von MT, die möglicherweise zusammen mit den Motorproteinen sedimentieren würden, zu verhindern.

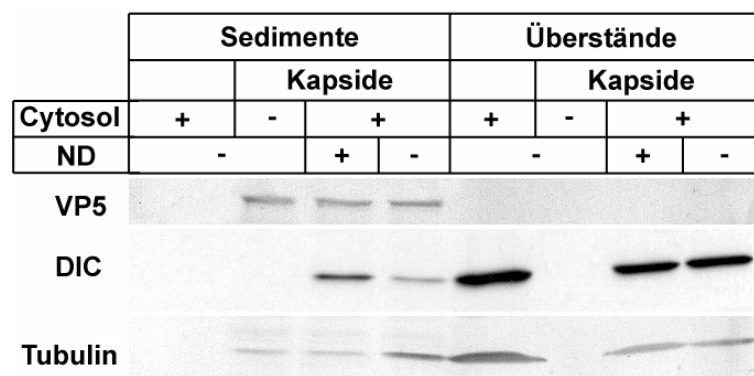


Abb. 5.21: *In vitro* präparierte HSV1-GFPVP26-Kapside binden Dynein. Virale Kapside aus Virus-Lyse von $8,4 \times 10^5$ PFU mit 1% Triton X-100 in Anwesenheit von 1,0 M KCl wurden für etwa 60 min in *Xenopus* Cytosol (0,8 mg/ml Proteinkonzentration) inkubiert und durch ein Saccharosekissen sedimentiert. Die Kapsidsedimente und möglicherweise assoziierte Wirtsproteine und die Überstände wurden durch SDS-PAGE und Immunoblot analysiert. Die Mengen an Hauptkapsidprotein VP5 wurden bestimmt, um die relative Häufigkeit der Kapside in den verschiedenen Reaktionen abzuschätzen. Die Menge des sedimentierten Dyneins wurde durch den Nachweis von DIC (*Xenopus* Dynein intermediäre Kette), die Menge an Tubulin bzw. MT durch Nachweis von α -Tubulin bestimmt. Um die MT zu depolymerisieren, wurde 50 μM Nocodazol (ND) eingesetzt. In Anwesenheit von ND war die Kosedimentation von Dynein höher als in Abwesenheit von ND. Hier wurde aber mehr Tubulin sedimentiert. Auch Kapside ohne Zugabe von Cytosol waren mit geringen Mengen an Tubulin assoziiert.

Die an den sedimentierten HSV1-GFPVP26-Kapsiden gebundene Menge an Dynein war in Anwesenheit von Nocodazol erhöht (Abb. 5.21). Vermutlich konkurrierten die Kapside mit den MT um das Dynein, wobei hauptsächlich das mit den Kapsiden assoziierte Dynein im Bindungs-Testsystem nachgewiesen wurde. Die eingesetzte Kapsidmenge wurde durch einen Immunoblot mit anti-VP5 bestimmt (Abb. 5.21).

Als Dynactin-abhängige Motoren kommen Dynein und heterotrimeres Kinesin in Frage (Deacon et al., 2003; King & Schroer, 2000; Schroer & Sheetz, 1991). Ein möglicher Nachweis von heterotrimerem Kinesin mit einem polyklonalen Antikörper gegen die C-terminale Domäne von *Xenopus* Kinesin-2 oder einem monoklonalen Antikörper gegen die 85 kD und 95 kD Untereinheiten von Seeigel-Kinesin-2 erwies sich als schwierig, da beide für diese Arbeit zur Verfügung stehenden Antikörper Kreuzreaktionen mit HSV1-Kapsidproteinen zeigten (Daten nicht gezeigt).

Dynein hingegen konnte gut mit einem anti-*Xenopus* DIC Antikörper und Dynactin mit einem Antikörper gegen humanes Dynamitin oder p150 aus der Ratte detektiert werden.

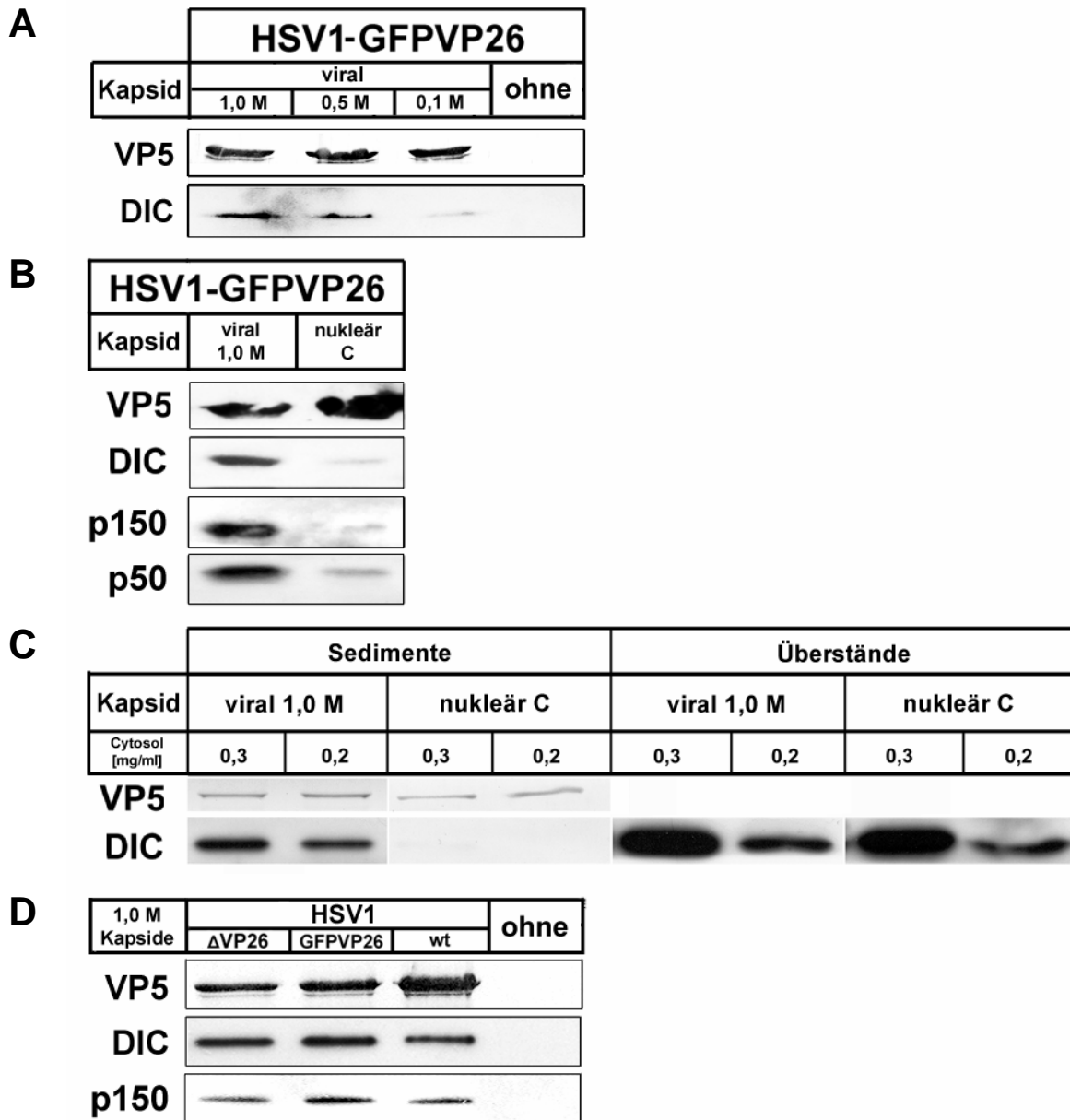


Abb. 5.22: Virale aber nicht nukleäre Kapside binden MT-Motoren. Virale Kapside mit unterschiedlicher Tegument-Zusammensetzung aus Virus-Lyse mit 1% Triton X-100 in Anwesenheit von verschiedenen KCl-Konzentrationen (1,0; 0,5 oder 0,1 M) oder nukleären C-Kapsiden wurden für 30 min in *Xenopus* Cytosol (0,1 mg/ml Proteinkonzentration) inkubiert und durch ein Saccharosekissen sedimentiert. Die Kapsidsedimente und möglicherweise assoziierte Wirtsproteine und die Überstände wurden durch SDS-PAGE und Immunoblot analysiert. Die Mengen an Hauptkapsidprotein VP5 wurden bestimmt, um die relative Häufigkeit der Kapside in den verschiedenen Reaktionen abzuschätzen. Die Menge des sedimentierten Dyneins wurde durch den Nachweis von DIC (*Xenopus* Dynein intermediäre Kette), die Menge an Dynactin durch Nachweis der großen Untereinheit p150 oder p50 bestimmt.

(A) Dynein band an viralen Kapsiden, die in Anwesenheit von 0,1; 0,5 oder 1 M KCl präpariert worden waren.

(B) Dynein und Dynactin banden an virale Kapside (1 M KCl), aber nicht an nukleäre C-Kapside. Die Daten für Abbildung B wurden freundlicherweise von Kerstin Radtke (Institut für Virologie, MHH) zur Verfügung gestellt.

(C) Auch bei geringeren Kapsidmengen und höheren Cytosolkonzentrationen konnte Dynein an viralen Kapsiden (1 M KCl) aber nicht an nukleären Kapsiden nachgewiesen werden.

(D) Dynein und Dynactin banden an viralen Kapside, die aus extrazellulären Virionen von HSV1-Wildtyp (wt), HSV1- Δ VP26 oder HSV1-GFPVP26 mit 1% Triton X-100 und 1 M KCl präpariert wurden. Teilweise aus Wolfstein et al. (2006).

Virale Kapside, die mit 0,1 M KCl extrahiert worden waren, rekrutierten weniger Dynein als mit 1 M KCl extrahierte Kapside (Abb. 5.22 A), bei denen viele äußere Tegumentproteine entfernt worden waren. Nukleäre Kapside, die kein Tegument enthielten, banden hingegen im Vergleich zu den viralen Kapsiden kein Dynein (DIC) oder Dynactin (p150; p50; Abb. 5.22 B). Dieser Effekt war auch zu beobachten, wenn man weniger Kapside aber mehr Dynein einsetzte. Eine Verdünnung des Cytosols von 0,3 mg/ml auf 0,2 mg/ml bewirkte im Vergleich zu den Überständen nur eine geringfügige Reduktion des an den Kapsiden gebundenen Dyneins (Abb. 5.22 C). Wahrscheinlich lag hier die Dyneinbindung in der Nähe der Sättigung.

Das im *Xenopus* Cytosol enthaltene Dynein und Dynactin sedimentierte nicht, wenn das Reaktionsgemisch keine Kapside enthielt („ohne“ in Abb. 5.22 A, D). HSV1- Δ VP26-Kapside und HSV1-GFPVP26-Kapside binden Dynein und Dynactin aus den cytosolischen Extrakten (Abb. 5.22 D). Somit war die Bindung von Dynein und Dynactin unabhängig von VP26 und wurde nicht durch die Fusion von GFP an VP26 gehemmt.

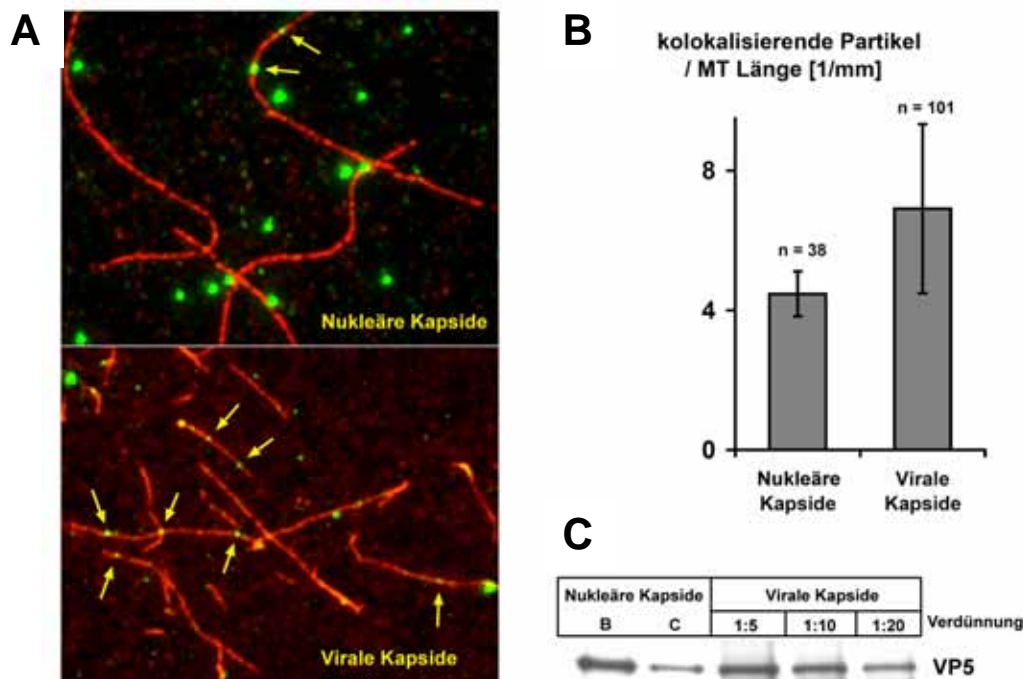


Abb. 5.23: In Cytosol resuspendierte Kapside binden an immobilisierte MT. Nukleäre und virale HSV1-GFPVP26-Kapside wurden in *Xenopus*-Cytosol mit einer Proteinkonzentration von 2,5 mg/ml resuspendiert und in einer mit MT beschichteten mikroskopischen Perfusionskammer für 30 min inkubiert. Für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie wurden die MT und HSV1-GFPVP26-Kapside mit Methanol fixiert und markiert.

(A) Die MT erschienen hier als rote Linien und die grünen Objekte repräsentierten die Kapside. Ihre Kolokalisation mit den MT wurde in fünf verschiedenen Ausschnitten der Größe 123 μ m x 162 μ m für die viralen und nukleären Kapside gezählt und auf die MT Länge normalisiert.

(B) In diesem Experiment kolokalisierten etwa 1,5mal so viele virale Kapside (6,9 Partikel/mm MT) mit den MT wie nukleäre Kapside (4,5 Partikel/mm MT).

(C) Fluorographie der 35 S-markierten HSV1-GFPVP26-Kapside. Die Normalisierung der Kapsidmenge erfolgte über VP5. Für das Bindungsexperiment wurden B-Kapside und die 1:10 Verdünnung der viralen Kapside eingesetzt.

In einem weiteren Experiment wurde getestet, ob in Cytosol resuspendierte Kapside in einer Perfusionskammer an immobilisierte MT binden können. Dabei wurden sowohl die Kapside als auch die MT durch Immunfluoreszenz visualisiert. Es wurden 38 mit den MT kolokalisierende Partikel bei den nukleären Kapsiden und 101 Kolokalisierungen bei den viralen Kapsiden in je 5 Feldern gezählt (Abb. 5.23 A).

5.4.3 *In vitro* Transport unterschiedlicher Kapside

Da unterschiedliche Kapside in unterschiedlichem Maße MT-Motoren banden, wurden sie im Transport-Testsystem untersucht, um festzustellen, ob diese Unterschiede auch funktionelle Auswirkungen auf den Kapsid Transport hatten.

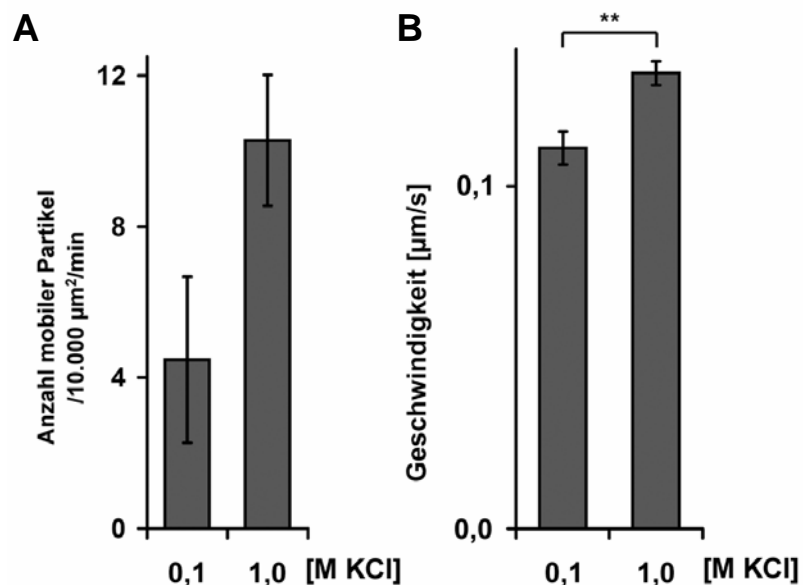


Abb. 5.24: Die Effizienz der HSV1-GFPVP26-Kapsid-Motilität *in vitro* entlang von MT hängt von der Tegument-Zusammensetzung ab. Virale HSV1-GFPVP26-Kapside wurden durch Lyse mit 1% TX-100 in Gegenwart unterschiedlicher KCl Konzentrationen präpariert, in Cytosol (2,5 mg/ml) resuspendiert und auf Motilität getestet.

(A) Die Anzahl der mobilen Partikel (n) bezogen auf die aufgenommene Fläche und Zeit war für 1 M KCl-Kapside, die hauptsächlich innere Tegumentproteine enthielten (n = 46) höher als für Kapside mit äußeren und inneren Tegumentproteinen aus der Behandlung mit 0,1 M KCl (n = 20).

(B) Die mittlere Geschwindigkeit der mit 1 M KCl extrahierten Kapside war signifikant höher als die mit 0,1 M KCl behandelten Kapside. Für jede experimentelle Bedingung wurden drei Filme von 280 s Länge mit einer zeitlichen Auflösung von 1,4 s pro Bild aufgenommen.

Die Balken repräsentieren den Standardfehler. Hochsignifikante p-Werte wurden mit (**) markiert. Aus Wolfstein et al. (2006)

Die Entfernung der äußeren Tegumentproteine viraler Kapside durch eine 1,0 M KCl-Extraktion erhöhte die Anzahl an beweglichen Partikeln und verlängerte die Bahnstrecken (Abb. 5.24 A; Tabelle 5.7, S.83). Ferner erhöhte sich die mittlere Geschwindigkeit signifikant von 0,11 μm/s für Kapside, die mit 0,1 M KCl präpariert wurden, auf 0,13 μm/s für Kapside, die mit 1 M KCl extrahiert wurden ($P = 2,37 \times 10^{-4}$, Abb. 5.24 B, Tabelle 5.7, S.83). Bei den

nukleären Kapsiden, die kein Tegument enthielten, wurde sehr wenig *in vitro* Transport entlang von MT gefunden. So zeigen die Daten, dass die Bindung des MT-Motors und der Kapsidtransport eines oder mehrere Proteine der inneren Tegumentschicht erforderten, welche durch die Anwesenheit von Proteinen des äußeren Teguments schlecht zugänglich waren. Nukleäre Kapside enthalten möglicherweise keinen Rezeptor für MT-Motoren.

6 Diskussion

Der intrazelluläre Transport spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese von neurotrophen α -Herpesvirinae, die in den Axonen infizierter Neuronen weite Strecken zurücklegen (Döhner et al., 2005; Döhner & Sodeik, 2004; Enquist et al., 1998; Pomeranz et al., 2005; Smith & Enquist, 2002). Für HSV1 wurde MT-abhängiger Transport von cytosolischen Kapsiden zum Zellkern nachgewiesen (Sodeik et al., 1997). Für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen des Kapsidtransportes wurde der gentechnisch modifizierte Stamm HSV1-GFPVP26 genutzt (Desai & Person, 1998), der wie der Wildtyp MT und Dynein für den effizienten Transport zum Zellkern verwendet (Döhner, Schmidt, Radtke und Sodeik; Manuskript eingereicht). In lebenden Zellen ist eine Unterscheidung zwischen endocytierten Viren, membran-assoziierten Viren und cytosolischen Kapsiden schwierig, so dass die molekulare Zusammensetzung des viralen, GFP-markierten Transportgutes häufig unklar bleibt.

Um die molekularen Voraussetzungen für einen Transport cytosolischer HSV1-Kapside unabhängig von zellulären Membranen untersuchen zu können, wurde deshalb hier erstmalig ein zellfreies Testsystem für einen MT-abhängigen Virustransport entwickelt (Wolfstein et al., 2006). Hierzu wurden GFPVP26 markierte HSV1-Kapside isoliert und mit künstlich hergestellten MT in Anwesenheit von cytosolischen Faktoren inkubiert. Durch die Herstellung von Kapsiden unterschiedlicher Proteinzusammensetzung wurde gezeigt, dass Proteine aus der inneren Tegumentschicht für die Rekrutierung von Dynein sowie Dynactin und den Transport entlang von Mikrotubuli notwendig sind. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6.1 zusammengefasst.

Tabelle 6.1: Zusammenfassung der in den *in vitro* Testsystemen ermittelten Ergebnisse für den MT-vermittelten HSV1-GFPVP26-Kapsidtransport.

n.b. = nicht bestimmt

Fracht	nukleäre Kapside	virale Kapside 0,1 M	virale Kapside 0,5 M	virale Kapside 1 M
Tegument Zusammensetzung	-	+++	+	+
Dynein und Dynactin Binding	-	+	++	+++
MT-Bindung	-	n.b.	n.b.	++
MT-Transport	-	+	++	+++

6.1 Ein *in vitro* Testsystem für HSV1-Transport entlang von MT

6.1.1 Herstellung immobilisierter MT

In anderen Testsystemen für einen MT-abhängigen Transport von Membranen lassen sich die MT und die Fracht durch kontrastverstärkte-Videomikroskopie im *Difference Interference Contrast (DIC)* gleichzeitig darstellen (Allan, 1993). Aufgrund ihres geringen Kontrastes lassen sich aber die HSV1-Kapside schlecht von anderen partikulären Bestandteilen des Cytosols unterscheiden. Dieses Problem wurde hier durch die Verwendung unterschiedlich fluoreszenzmarkierter Komponenten umgangen. Dazu wurden GFPVP26-markierte HSV1-Kapside und Cy3-fluorochromierte, Taxol-stabilisierte MT verwendet. Ihre Visualisierung erfolgte durch Fluoreszenzmikroskopie mit unterschiedlichen Anregungs- und Emissionsfiltern.

Weil beim hier verwendeten Versuchsaufbau kein automatisierter, schneller Filterwechsel möglich war, wurde zuerst ein Standbild von den MT aufgenommen und anschließend der Kapsidtransport aufgezeichnet. Durch am Glas bindende MT-Motoren wäre MT-Gleiten möglich, und die MT könnten auch durch Brown'sche Molekularbewegung oder Konvektionsströmungen zum Schwingen angeregt werden. Daher war eine effektive Anheftung der MT notwendig, um eine Ortsveränderung der MT während der Aufzeichnung des Kapsidtransportes ausschließen zu können.

Nach einer BSA-Beschichtung war die Bindung der MT an die Glasoberfläche deutlich schlechter aber auch die MT-Bündelung geringer als bei DEAE-Dextran. Die positiv geladene tertiäre Aminogruppe des Diethylaminoethyls (DEAE) ging wahrscheinlich eine stärkere Bindung mit der sauren MT-Oberfläche ein als das BSA. Die durch das DEAE-Dextran hervorgerufene teilweise auftretende Bündelung der MT könnte einen Einfluss auf die Bewegungsmuster der Kapside gehabt haben. MT, die während der Aufzeichnung der Kapside ihre Position ändern, würden die Analyse des Kapsidtransportes erschweren, so dass hier trotz der induzierten MT-Bündelung DEAE-Dextran zur Immobilisierung der MT verwendet wurde.

Über DEAE-Dextran (Murray et al., 2000; Rogers et al., 1997) konnten die MT über die Bindung ihrer sauren Oberfläche (Downing, 2000; Luduena, 1998; Nogales, 2000) an die Aminogruppen des Diethylaminoethyls und der Bindung der Hydroxylgruppen des Dextrans an die Glasoberfläche stabil angeheftet werden. Eine Bündelung der MT war möglicherweise auf freies DEAE-Dextran zurückzuführen, das durch Aggregation der Glukosereste die MT über die positiven Aminogruppen vernetzt haben könnte. Sie nahm eher mit der Anheftungszeit als mit Erhöhung der DEAE-Dextran-Konzentration zu.

Problematisch bei der Fluoreszenzmikroskopie von fluorochromierten MT können das Ausbleichen des Fluorochroms und das Zerfallen der MT bei der Fluoreszenzanregung sein. Die Bestrahlung der Cy3-MT mit der Anregungswellenlänge von Cy3 beschränkte sich hier

auf das Einstellen der Fokusebene für die Aufzeichnung der GFPVP26-Kapside. In Anwesenheit des Radikalfängersystems (OSS) und des Cytosols, das Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAP) enthielt, welche die MT wahrscheinlich stabilisierten, waren die Cy3-MT nach der Zeitverlaufs-Fluoreszenzmikroskopie der GFP-Partikel hinsichtlich ihrer Länge und Fluoreszenzintensität unverändert. Damit waren intakte Cy3-MT für einen MT-Motor-vermittelten Transport gegeben.

6.1.2 Cytosolische Transportfaktoren

Da die Messung bei Raumtemperatur in Gegenwart von Cytosol durchgeführt wurde, war eine Bildung von Cytoskelett-Filamenten aus monomeren cytosolischen Proteinen nicht auszuschließen. Bei der Präparation der cytosolischen Extrakte aus *Xenopus*-Eiern wurden Aktinfilamente durch Cytochalasin D depolymerisiert, und im eingesetzten Cytosol waren unter den Bedingungen des Testsystems für den Kapsidtransport keine Aktinfilamente nachzuweisen.

Das Cytosol enthielt ferner dimeres Tubulin, welches in Abwesenheit von Taxol bei Raumtemperatur spontan polymerisiert (Allan, 1993). Bei Konzentrationen, wie sie im Testsystem vorlagen, wurden einige wenige unmarkierte MT nachgewiesen. Sie hatten ihren Ursprung an den Enden der Cy3-MT, welche als Polymerisationskeime für das *Xenopus* Tubulin dienten. Da sie mit den DEAE-Dextran-fixierten Cy3-MT verbunden waren, sollten diese auch stationär gewesen sein.

Damit waren in dem Testsystem neben den Taxol-stabilisierten und damit relativ undynamischen Cy3-MT auch unmarkierte *Xenopus*-MT vorhanden. Wenn man eventuelle kleine Mengen Taxol im Cytosol, das aus den Taxol-stabilisierten MT stammen könnte, vernachlässigt, so waren diese MT dynamisch. Weniger dynamische Taxol-stabilisierte MT verbessern aber den MT-Transport von Adenoviren in Zellen (Giannakakou et al., 2002). So könnte auch ein *in vitro* Transport bevorzugt auf den Taxol-stabilisierten MT stattfinden.

Hingegen könnten die kovalent an das Tubulin gebundenen Cy3-Gruppen die MT-Motoraktivität sterisch behindern, sodass der für den Kapsidtransport verantwortliche MT-Motor unmarkierte MT bevorzugen könnte. Eine Herabsetzung der Fluorochrome pro Tubulin könnte daher die Anzahl der Partikel vergrößern, die sich entlang der Cy3-markierten MT bewegen. Ob sich Kapside, die auf markierten bzw. unmarkierten MT laufen in ihrer Transportdynamik unterscheiden, wurde nicht untersucht. Dieser systematische Fehler war aber für alle MT- beschichteten mikroskopischen Perfusionskammern gleich.

Zur Fluoreszenzmarkierung von MT könnte man alternativ fluoreszierende Taxolderivate einsetzen, die mit dem Taxol um die MT-Bindungsstelle konkurrieren (Evangelio et al., 1998).

6.1.3 Herstellung unterschiedlicher Kapside

Um den Transport cytosolischer HSV1-Kapside zu rekonstruieren, wären Kapside aus dem Cytosol infizierter Zellen optimal. Leider konnte bisher kein Reinigungsprotokoll entwickelt werden, um cytosolische Kapside in der hier benötigten Menge zu isolieren. Eintretende Kapside binden vermutlich während der Homogenisation infizierter Zellen an die Kernporen, und gelangen deshalb bei einer Zellfraktionierung in die Kernfraktion (B. Sodeik & P. Ojala, unveröffentlichte Daten; Ojala et al., 2000). Daher wurde in dieser Arbeit ein Protokoll für eine Isolierung von Kapsiden aus extrazellulären Viren durch Detergenz-Lyse in Anwesenheit von KCl etabliert. Die Tegumentzusammensetzung wurde durch die Ionenstärke bei der Präparation moduliert, um Kapside unterschiedlicher Tegumentzusammensetzung herstellen zu können.

Die von der Ionenstärke abhängige Dissoziation des äußeren Teguments nach der Solubilisierung der Virushülle ließ auf eine nicht-kovalente, ionische Assoziation innerhalb des Teguments schließen. Die einzelnen Proteine der viralen und nukleären HSV1-GFPVP26 Kapside wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie- oder ³⁵S-Markierung und Immunoblot analysiert. Die viralen Kapside enthielten im Gegensatz zu den nukleären Kapsiden viele Tegumentproteine. Tegumentfreie nukleäre Kapside wurden nach einer etablierten Methode aus den Zellkernen infizierter Zellen isoliert und über einen linearen Saccharosegradienten gereinigt (Newcomb & Brown, 1991; Perdue et al., 1974).

Die *in vitro* präparierten Kapside wurden in Cytosol resuspendiert und durch Ultraschall homogenisiert. Die elektronenmikroskopische Untersuchung der Kapside ergab, dass einige C-Kapside keine DNA mehr enthielten. Solch ein Verlust von DNA bei *in vitro* präparierten Kapsiden wurde durch eine DNA-Markierung durch ³H-Thymidin bestätigt (Nagel, 2002). Die DNA steht im HSV1-Kapsid unter hohem Druck und tritt bei einer Entfernung der Pentone durch Guanidinium-Hydrochlorid aus dem Kapsid aus (Newcomb & Brown, 1991).

Einige Kapside enthielten noch elektronendichtes Material, obwohl eine Öffnung vorhanden war, durch die Uranylacetat in das Kapsid Lumen eingetreten war. Wenn es sich hierbei um das Gerüstprotein VP22a handelte, so würde es hauptsächlich bei den nukleären B-Kapsiden zu erwarten sein. Aber auch bei den nukleären C-Kapsiden und den viralen Kapsiden war eine derartige Füllung, bei der es sich wahrscheinlich um DNA, die in den beschädigten Kapsiden blieb, handelte, in relativ vielen Kapsiden beobachtet worden. Für die Rekonstruktion des Kapsidtransportes war nur die Oberfläche der Partikel von Bedeutung. Eventuell durch die ausgetretene DNA vernetzte Kapside (Newcomb & Brown, 1994) wurden durch die Behandlung mit Ultraschall und DNase dispergiert.

6.1.4 Charakterisierung des Kapsidtransportes *in vitro*

Da mikroskopische Partikel in einer Flüssigkeit einer Zufallsbewegung (*random walk*) unterliegen (Berg, 1993), sollte hier zunächst untersucht werden, ob unter den gewählten Bedingungen ein aktiver Transport rekonstruiert worden war.

Die GFP-Partikel änderten über mehrere Mikrometer nicht die Richtung ihrer Nettobewegung, wobei sie zum Teil mit den markierten MT kolokalisierten. Zudem war diese Bewegung von ATP und cytosolischen Faktoren abhängig. Somit war ein aktiver Transport von HSV1-GFPVP26-Kapsiden entlang von MT *in vitro* rekonstruiert worden. Darüber hinaus zeigten erste Untersuchungen zur Partikeldynamik (Ewers et al., 2005) in Zusammenarbeit mit Helge Ewers (ETH Zürich) ein nicht diffusionstypisches Verhalten der Kapside. Dabei wurde von den mittleren Abstandsquadraten eines Teilchens in Lösung ausgegangen, die bei einer Zufallsbewegung proportional mit der Zeit wachsen (Ewers et al., 2005; Ferrari et al., 2001). Ein gerichteter Transport ist durch einen überproportionalen Anstieg zu erkennen. Dies war auch bei den analysierten Beispielen für Kapsidtransporte der Fall.

Die hohen Standardabweichungen bei den Ortsveränderungen eines Partikels erklären sich aus der geringen räumlichen und zeitlichen Auflösung. Die Pixelgröße des CCD-Chips begrenzte dabei die räumliche Auflösung und die Belichtungsdauer zur Visualisierung der GFP-Kapside die zeitliche Auflösung. Für detaillierte Untersuchungen der mechanochemischen Aktivität molekularer Motoren wie z.B. der Schrittweite eines Motors sind solche Auflösungen unzureichend, aber der Kapsidtransport über Stecken im Mikrometerbereich als Folge der Motor-Fracht-Interaktion ließ sich mit diesem Versuchsaufbau analysieren.

Ferner behinderten kreuzende MT und sich überlagernde MT entgegengesetzter Richtung möglicherweise den Kapsidtransport. Er konnte dabei entweder durch eine sterische Behinderung oder durch einen Richtungswechsel beim Umsteigen auf einen anderen MT beeinflusst worden sein. Darüber hinaus könnte die Eigenbewegung schlecht angehefteter MT einen potentiellen Kapsidtransport überlagern. Solche möglichen systematischen Fehler variierten unter Umständen zwischen Experimenten an verschiedenen Tagen, waren aber innerhalb eines Experimentes immer gleich.

Es stellte sich die Frage, wieviel MT-Motoren für den beobachteten *in vitro* Transport von etwa 0,1 $\mu\text{m/s}$ eines Kapsides in einem wässrigen Medium der Viskosität von etwa 1 mPas notwendig waren. Die zu überwindende Reibungskraft hängt vom Durchmesser und der Geschwindigkeit eines Partikels ab. Da Polystyrolkugeln mit einem Durchmesser von 210 nm durch einzelne Dynein- oder Kinesin-Motoren *in vitro* mit 0,7 $\mu\text{m/s}$ bzw. 1 $\mu\text{m/s}$ transportiert werden können (King & Schroer, 2000), sollte auch für den Transport der HSV1-Kapside mit einem Durchmesser von 125 nm ein einzelner MT-Motor eine ausreichende Kraft aufbringen können.

6.2 Anwendung des *in vitro* Testsystems

6.2.1 Dynactin-Abhängigkeit des Kapsidtransportes *in vitro*

Ein wichtiger Hinweis auf die Rekonstruktion eines Dynein-vermittelten Transports ist die Dynactin-Abhängigkeit der Motilität. Der *in vitro* Transport von Polystyrolkugelchen und Liposomen zeigte, dass Dynactin die Prozessivität von Dynein erhöht (King & Schroer, 2000; Muresan et al., 2001). Außerdem ist Dynactin an der Transportgut-Bindung beteiligt (Roghi & Allan, 1999). Ferner dient Dynactin als Kofaktor des zum MT Plus-Ende gerichteten Kinesin-2 vermittelten Transportes (Deacon et al., 2003; Schroer, 2004).

Durch Überexpression von Dynamitin (p50) in Zellen wird der MT-abhängige HSV1 Kapsidtransport reduziert (Döhner et al., 2002). Ein intakter Dynactin-Komplex lässt sich z.B. über das Sedimentationsverhalten der Dynactin Untereinheit p150^{Glued} nachweisen (Echeverri et al., 1996; Eckley et al., 1999). Ein Überschuss von Dynamitin z.B. durch Zugabe von rekombinantem Dynamitin in cytosolische Extrakte, führt zu einer Dissoziation von Dynactin in zwei Unterkomplexe, und p150^{Glued} sedimentiert dann langsamer. Dieser Effekt tritt bei *Xenopus* Cytosol schon bei einer Zugabe von 0,05 mg/ml rekombinantem Dynamitin auf (Wittmann & Hyman, 1999). Im Gegensatz zum Sedimentationsexperiment wird die auf der Dynein-Dynactin-Interaktion beruhende Spindelpol-Bildung erst bei einer 10mal höheren Dynamitin-Konzentration gestört (Wittmann & Hyman, 1999). Hier waren 1 mg/ml Dynamitin für eine deutliche Reduktion des HSV1-GFPVP26-Kapsidtransportes notwendig.

Da hohe Dynamitin-Konzentrationen die Bewegung von HSV1-Kapsiden *in vitro* hemmten, war vermutlich ein funktioneller Dynactin-Komplex erforderlich. Dies deutet auf eine Beteiligung von Dynein und/oder Kinesin-2 am Kapsidtransport hin und ist konsistent mit Experimenten *in vivo*, die ebenfalls zeigen, dass Dynein und Dynactin am Transport eintretender Kapside zum Zellkern beteiligt sind (Döhner et al., 2002; Kristensson et al., 1986; Sodeik et al., 1997). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Kinesin-2 mit eintretenden HSV1-Kapsiden kolokalisiert (Janus, 2005). Funktionsblockierende Kinesin-2-Antikörper, Immundepletierung von Kinesin-2 oder die Zugabe von funktionsblockierenden rekombinanten Kinesin-2-Fragmenten zu dem *in vitro* Testsystem für den HSV1-Kapsidtransport könnten dazu beitragen, eine mögliche Rolle von Kinesin-2 am HSV1-Kapsidtransport zu charakterisieren.

6.2.2 *In vitro* Bindungsexperimente

Um die Spezifität der MT-Motorbindung zu testen wurden nukleäre und virale Kapside unterschiedlicher Tegumentzusammensetzung mit Cytosol inkubiert und auf gebundenes Dynein und Dynactin untersucht. Die Kapsidzahl wurde über die im Immunoblot nachgewiesene VP5 Menge abgeschätzt. Ausgehend von der Annahme, dass eine

spezifische Bindung des Dynein-Motorkomplexes eine höhere Affinität zu den Kapsiden hat als eine unspezifische, sollten in verdünnten Cytosolen unterschiedliche Motoraffinitäten zu den unterschiedlichen Kapsidtypen nachweisbar sein. Hierfür wurden Proteinkonzentrationen verwendet, die um den Faktor 30 geringer waren als die für die Rekonstruktion des Transportes notwendige Konzentration.

Die Kapside sedimentierten mehr Dynein aus cytosolischen Extrakten, in denen möglicherweise vorhandene MT durch Nocodazol (ND) depolymerisiert worden waren. MT könnten MT-Dynein- und MT-Dynein-Kapsid-Komplexe bilden, die zusammen mit den Dynein bindenden Kapsiden sedimentieren (Abb. 6.1). Ohne Kapside wurde mit und ohne ND kein Dynein nachgewiesen.

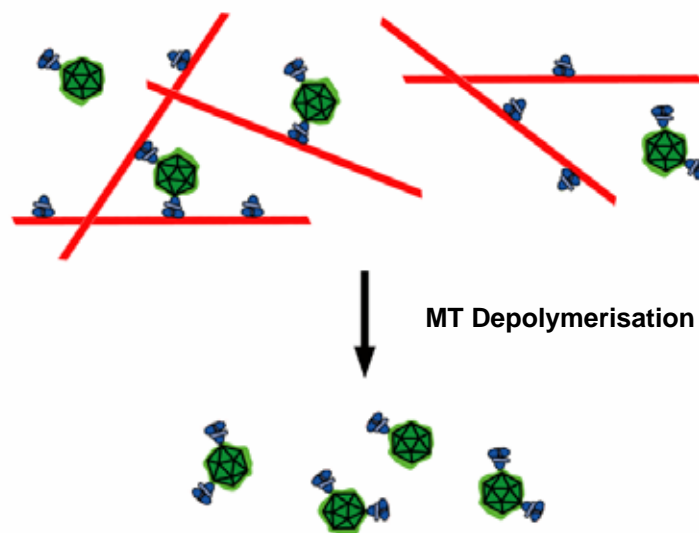


Abb. 6.1: MT-Dynein- und MT-Dynein-Kapsid-Komplexe. Die Kapside sind grün, die MT rot und der Dynein/Dynactin-Komplex blau dargestellt. Wenn die MT durch die Resuspension der Sedimente in kalter Pufferlösung resuspendiert wurden, depolymerisierten die MT und die an den MT gebundenen Motoren gehen in Lösung. Die an den Kapsiden gebundenen Motoren blieben hingegen im Sediment.

Wahrscheinlich wurden die MT über den Motor mit den Kapsiden vernetzt. Beim Waschen des Sediments wurden die MT durch den kalten Puffer und die Verdünnung des dissoziierenden Tubulins depolymerisiert (Abb. 6.1). So könnte das an den MT gebundene Dynein in Lösung gehen, sodass nur das an den Kapsiden gebundene Dynein im Sediment nachgewiesen wurde. Die stärkere Kosedimentation von Dynein mit den Kapsiden in Abwesenheit von MT lässt sich dadurch erklären, dass die Kapside nicht mit den MT um das Dynein konkurrieren mussten.

Um in der Probe vorhandene RNAs abzubauen, wurde RNase eingesetzt. Virale mRNA ist im Tegument von Herpesvirinae verpackt (Bechtel et al., 2005; Bresnahan & Shenk, 2000; Sciortino et al., 2001) und könnte eine Rolle bei der spezifischen Dyneinbindung spielen. Da

die so behandelten Kapside trotzdem Dynein banden, spielte die RNA des Teguments keine Rolle bei der Motorbindung.

Insgesamt banden HSV1-GFPVP26-Kapside mit viel oder keinem Tegument Dynein und Dynactin schlecht bzw. gar nicht. Dagegen konnten HSV1-GFPVP26-Kapside, deren Tegument teilweise entfernt worden war, Dynein und Dynactin gut binden. Eine mögliche Bindung der MT-Plus-End Motoren Kinesin-1 und Kinesin-2 an Kapside konnte bisher mangels ausreichend spezifischer Antikörper nicht getestet werden.

6.2.3 Das innere Tegument vermittelt den Kapsidtransport *in vitro*

In einem anderen Transportsystem für GFPVP16-markierte Kapside wurden, nach einem ähnlichen wie dem hier beschriebenen Protokoll, 1 M KCl extrahierte Kapside in Tintenfischaxone mikroinjiziert. Sie bewegten sich retrograd mit einer kontinuierlichen Geschwindigkeit von 2 $\mu\text{m/s}$ (Bearer et al., 2000). Präparierte Kapside aus extrazellulärem Virus binden ferner in Gegenwart von cytosolischen Komponenten *in vitro* auch spezifisch an die Kernporen und entpacken dort ihr Genom (Ojala et al., 2000). Die genaue Proteinzusammensetzung der viralen Kapside und die mögliche Rolle von Membran Organellen beim HSV1-Eintritt in die Zelle wurden hier im Detail charakterisiert (Wolfstein et al., 2006).

Mit zunehmender Tegument-Extraktion nahm die Transportfähigkeit der Kapside zu. Das passte zu der Beobachtung, dass beim Zelleintritt von α -Herpesviren einen Teil des Teguments an der Plasmamembran zurückblieb (Abb 6.2 ; Granzow et al., 2005; Luxton et al., 2005; Sodeik et al., 1997). Beide Beobachtungen lassen vermuten, dass durch partielle Dissoziation des Teguments „Transportinhibitoren“ entfernt oder „Motorrezeptoren“ auf der Oberfläche exponiert werden, die dann an MT-Motoren binden und den Transport entlang von MT vermitteln können.

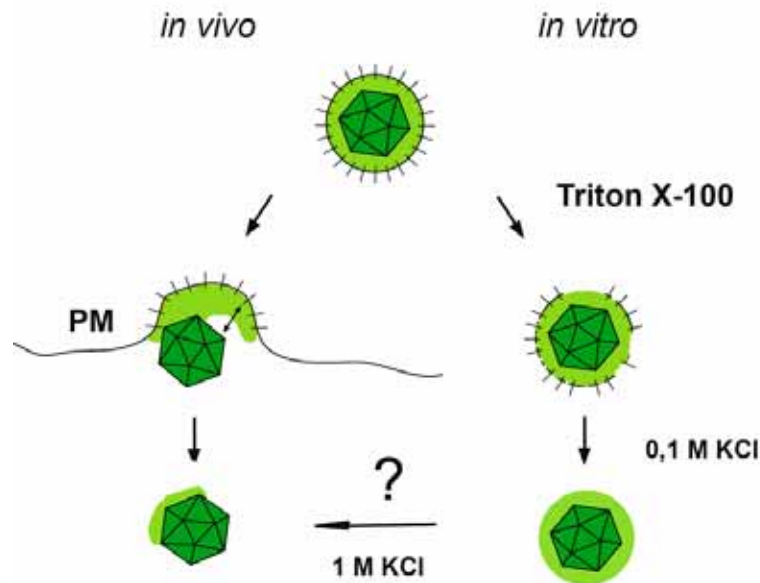


Abb. 6.2: Freisetzung des Kapsids durch Fusion mit der Plasmamembran *in vivo* oder durch Detergenz-Lyse *in vitro*. Nach Fusion mit der Plasmamembran bleiben einige Interaktionen des Teguments mit der Virushülle bzw. dem cytoplasmatischen Teil der viralen Hüllproteine bestehen (Doppelpfeil). Beim Eintritt der Kapside ins Cytosol bleiben wahrscheinlich die äußeren Tegumentproteine wie z.B. VP11/12, VP13/14, VP22 an der Plasmamembran zurück (hellgrüne Fläche). Das Detergenz Triton X-100 solubilisiert die Virusmembran mit den Glykoproteinen, wobei das Tegument mit dem Kapsid (dunkelgrün) assoziiert bleibt. Erst durch die Zunahme der Ionenstärke durch KCl-Zugabe wird das äußere Tegument zunehmend extrahiert.

Nukleäre Kapside, die kein Tegument enthielten, banden kaum Dynein oder Dynactin aus cytosolischen Extrakten. Ihre Oberfläche besteht aus dem kleinen Kapsidprotein VP26 (Chen et al., 2001), welches mit den leichten Dynein-Proteinketten Tctex-1 oder rp3 interagieren kann (Douglas et al., 2004). Es wurde entweder bei der *in vitro* Isolierung nukleärer Kapside denaturiert ohne zu dissoziieren, was unwahrscheinlich war, da die viralen Kapside eine ähnliche Prozedur durchlaufen, oder VP26 spielt für die Dyneinbindung keine entscheidende Rolle (Döhner, Schmidt, Radtke und Sodeik; Manuskript eingereicht). Die viralen Kapside aus dem HSV1-Wildtyp, der HSV1- Δ VP26-Mutante und HSV1-GFPVP26 banden Dynein und Dynactin aus den cytosolischen Extrakten mit ähnlicher Effizienz. Ferner etabliert eine Mutante ohne VP26 genauso wie der Wildtyp nach einer okularen Infektion im Mausmodell eine latente Infektion (Desai et al., 1998). Hierfür ist ein effizienter retrograder Transport zum Zellkern notwendig. Damit erscheint es unwahrscheinlich, dass VP26 allein die funktionelle Bindung eines zum MT-Minus-Ende gerichteten Motors vermitteln kann.

Neben den Oberflächenproteinen VP5 und VP26 sind auch die in kleineren Mengen vorhandenen Kapsid/Tegument Proteine UL6, UL15, UL16, UL17 und UL25, die an der Spaltung der concatameren Virus-DNA und der Verpackung der Genome ins Kapsid beteiligt sind, schon an den neu-gebildeten Kapsiden im Zellkern vorhanden (Homa & Brown, 1997; Thurlow et al., 2005). Deshalb sind auch diese wahrscheinlich nicht an der Motorbindung beteiligt. Ferner war der hier untersuchte *in vitro* Kapsidtransport unabhängig von UL34, von

dem berichtet wurde, dass es mit der intermediären Kette des Dyneins interagiert (Ye et al., 2000). UL34 ist ein Membranprotein der primären Virushülle, die bei der Knospung der nukleären Kapside in das Periplasma zwischen der inneren und äußeren Kernmembran entsteht. Extrazelluläre Viren enthalten vermutlich kein UL34 (Mettenleiter, 2002; Reynolds et al., 2002).

Virale Kapside mit viel Tegument, die aus der *in vitro* Präparationen mit einer geringen Salzkonzentration (0,1 M KCl) entstanden, zeigten im Gegensatz zu den mit hoher Salzkonzentration präparierten Kapsiden (1 M KCl) eine eingeschränkte Beweglichkeit. Die fehlende Motorbindung von nukleären Kapsiden zeigte, dass das innere Tegument für die Motorbindung notwendig war; allerdings reduzierte nach den hier beschriebenen Daten zu viel Tegument auch den MT-vermittelten Kapsidtransport. Es ist denkbar, dass durch die Salzextraktion ein MT-Motorrezeptor, der in Kapsidnähe lokalisiert ist, bzw. zur inneren Tegumentschicht gehört, freigelegt wurde, oder dass ein viraler Transport-Inhibitor entfernt wurde. Diese Hypothesen werden durch *in vivo* Studien unterstützt, die zeigen, dass der größte Teil des Teguments von HSV1 und VP11/12, VP13/14, VP16 und VP22 des Pseudorabies-Virus sich bei der Fusion mit der Membran vom eintretenden Kapsid ablösen und an der Plasmamembran zurückbleiben. VP1-3, UL37 und US3 bleiben hingegen auf dem Weg durch das Cytoplasma mit dem Kapsid verbunden (Granzow et al., 2005; Luxton et al., 2005; Sodeik et al., 1997; Willard, 2002).

Die Kapside, die den häufigsten MT-abhängigen Transport und die beste Dynein- und Dynactin-Bindung zeigten, erhielt man durch Salzextraktion der äußeren Tegumentproteine wie VP13/14, VP22, vhs und US11 von den viralen Kapsiden mit 1 M KCl. Das Fraktionierungsverhalten des häufigen Tegumentproteins VP11/12, der in geringerer Konzentration vorhandenen Tegumentproteine UL14 und US10 und der Tegument-Kinasen US3 und UL13 konnte mangels spezifischer Antikörper nicht untersucht werden. Im Gegensatz zu nukleären Kapsiden enthielten die mit 1 M KCl extrahierten Kapside VP16 und die inneren Tegumentproteine VP1-3 und UL37. Sie enthielten auch die äußeren Tegumentproteine VP13/14 und VP22, allerdings in geringerer Menge als die mit 0,1 M KCl behandelten Kapside.

HSV1-US11 kann mit der Schwanzdomäne der schweren Kette von Kinesin-1 interagieren, und neu-gebildete axonale HSV1-Kapside kolokalisieren mit Kinesin-1 (Diefenbach et al., 2002). US11 ist allerdings im Gegensatz zu vielen anderen Tegumentproteinen unter den α -Herpesviren nicht konserviert (Mettenleiter, 2004). Da die 1,0 M-Kapside weniger US11 als die 0,1 M-Kapside enthielten, schien US11 keine entscheidende Rolle für die *in vitro* Motilität oder die Dynein- und Dynactin-Bindung zu spielen.

Während die äußere Tegument-Schicht amorph ist, könnten die inneren Tegument Proteine eine definierte Anordnung aufweisen (Zhou et al., 1999). Bei einer spezifischen Motorbindung könnte sich diese Struktur in der Anordnung der Motorkomplexe auf der Kapsidoberfläche widerspiegeln. Es wurde vorgeschlagen, dass VP1-3 mit den Pentonen, die die Ecken des Kapsids bilden, assoziiert sein könnte (Zhou et al., 1999), wobei die Verteilung der 150 VP1-3 Kopien auf die 12 Pentone nicht symmetrisch sein muss (Grünewald et al., 2003). Die DNA Verpackung erfolgt durch ein Hauptpenton, das sogenannte Masterpenton aus UL6 (Newcomb et al., 2001; Trus et al., 2004). Somit ist auch für das VP1-3 eine Präferenz für ein bestimmtes Penton denkbar. Da UL37 an VP1-3 bindet (Klupp et al., 2002; Vittone et al., 2005), gelten diese Überlegungen auch für UL37.

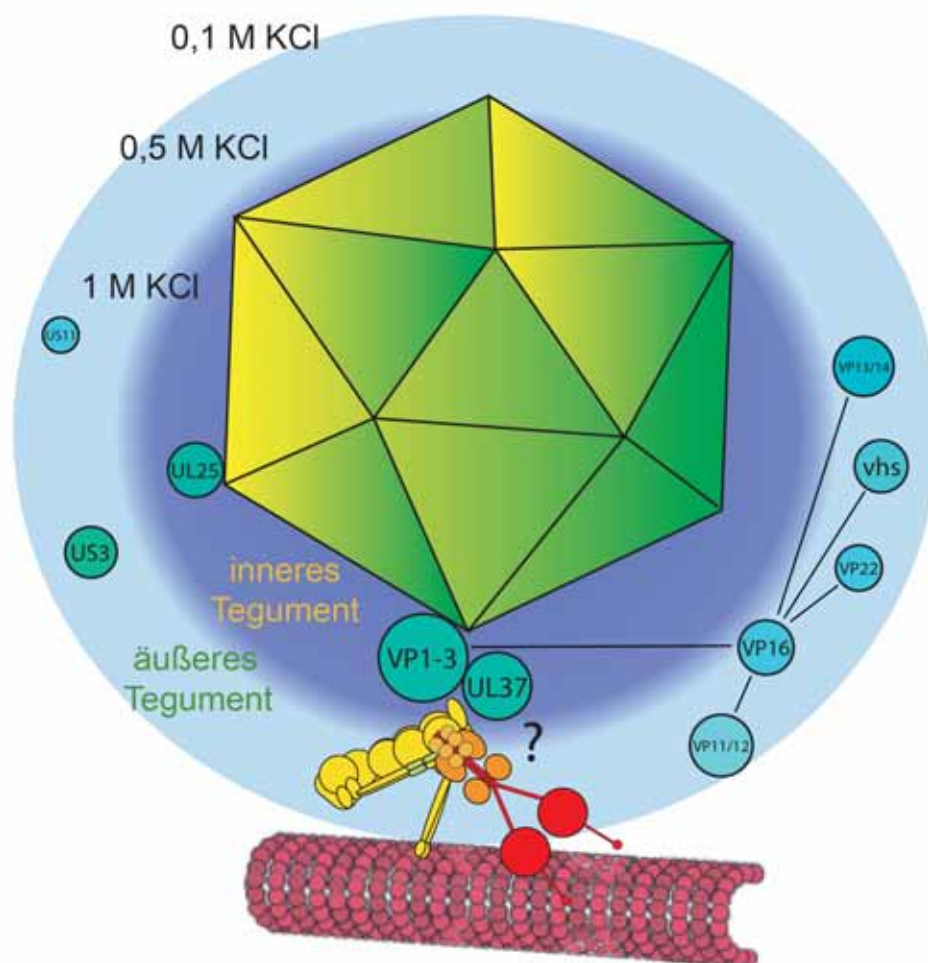


Abb. 6.3: Modell für einen Dynein/Dynactin vermittelten Transport von HSV1-Kapsiden.

Die ikosaedrische Struktur des Kapsids ist in grün dargestellt. Die blauen Kreise symbolisieren einige Tegumentproteine. Sie sind entsprechend ihrer vermuteten Lokalisation in der inneren oder der äußeren Tegumentschicht eingezeichnet. Die Verbindungslinien deuten Interaktionen zwischen den Tegumentproteinen an (Elliott et al., 1995; Mettenleiter, 2002; Mettenleiter, 2004; Vittone et al., 2005). Die Verteilung des Tegumentes ist asymmetrisch (Grünewald et al., 2003). Nach den *in vitro* Daten ist eine funktionelle Interaktion des Dynein (rot und orange) und Dynactin (gelb)-Komplexes mit den inneren Tegumentproteinen VP1-3 und/oder UL37 denkbar.

Tabelle 6.2: Kopienzahl einiger Tegumentproteine im HSV1-Virion

Name	Gen	MW [kDa]*	Kopien/Virion	Literatur
VP1-3	UL36	335,8	110 - 150	Heine et al., 1974
VP6.5**	UL37	120,5	30-40	Heine et al., 1974 Schmitz et al., 1995
VP11/12	UL46	78,2	410 – 600 1097 – 1690 (1270)	Heine et al., 1974 Zhang & McKnight, 1993
VP13/14	UL47	73,8	1400 – 1880 1683 – 2286 (1846)	Heine et al., 1974 Zhang & McKnight, 1993
VP16	UL48	54,3	1000 – 2000 1242 - 2095 (1647)	Heine et al., 1974 Zhang & McKnight, 1993
VP22	UL49	32,3	1240 - 2640	Heine et al., 1974
US11	US11	17,8	600 -1000	Roller & Roizman, 1992

* Davison & Clements (1997), MW errechnet anhand der primären Aminosäuresequenz

** VP6.5 aus Heine et al. (1974) wurde in Schmitz et al. (1995) UL37 zugeordnet.

6.2.4 HSV1-Transport in lebenden Zellen

Bei der Zeitverlaufs-Fluoreszenzmikroskopie von HSV1-GFPVP26-infizierten, lebenden Zellen bewegten sich gut erkennbare GFP-Partikel über viele Mikrometer entlang von YFP-markierten MT (Döhner, Wolfstein, Büttner, Prank, Ewers & Sodeik; Manuskript in Vorbereitung). Da diese Langstreckentransporte *in vivo* nur in Anwesenheit von MT beobachtet werden konnten, wurde die für den HSV1-Wildtyp bereits beschriebene MT-Abhängigkeit (Sodeik et al., 1997) in lebenden Zellen mit einem GFP-markierten HSV1-Stamm bestätigt. Mit diesem System ließ sich die richtungsabhängige Dynamik der viralen Partikel zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion studieren. Obwohl auch Transport zur Peripherie der Zelle beobachtet wurde, war der Nettotransport zum Zellkern gerichtet. Für den retrograden Transport wurde eine mittlere Geschwindigkeit von etwa 0,2 $\mu\text{m/s}$ ermittelt. Die Frage, ob es sich hierbei um einen cytosolischen Kapsidtransport oder um Virionen handelte, die nach Endocytose in Endosomen transportiert wurden (Nicola et al., 2005; Nicola et al., 2003; Nicola & Straus, 2004), ließ sich mit diesem System bisher nicht klären. Auch könnten cytosolische Kapside mit der cytosolischen Seite zellulärer Membranen assoziiert sein, die entlang von MT transportiert werden (Allan, 1993; Sodeik et al., 1997). Diese Fragestellungen könnten nach Anfärbung der viralen Membranen mit einem fluoreszierenden Membranfarbstoff vor der HSV1-Infektion beantwortet werden (Büttner, 2004). Ferner kann die Virusmembran durch ein fluoreszierendes Glykoprotein wie z.B. mRFP-gP oder GFP-gP markiert werden oder die Lokalisation der viralen Partikel durch Koendocytose von fluoreszierenden Partikeln untersucht werden (Potel et al., 2002).

Ein weiterer Ansatz ist der Nachweis von Endosomen, Kapsiden und eventuell assoziierten Motorproteinen durch immunfluoreszenzmikroskopischen oder elektronenmikroskopischen Nachweis der Membranen in fixierten Zellen (Döhner, Büttner, Wolfstein, Prank, Ewers & Sodeik; Manuskript in Vorbereitung). Auch bei der zeitverlaufsmikroskopischen Analyse der Bewegung von Pseudorabies-Viren, einem

porcinen α -Herpesvirus, mit GFP-markierten Kapsiden in Neuronen konnte ein Transport in oder an zellulären Membranen nicht ausgeschlossen werden (Smith et al., 2001; Smith et al., 2004).

Bei den in dieser Doktorarbeit entwickelten *in vitro* Testsystemen konnte man die präparierten Kapside direkt zu den cytosolischen Komponenten geben. Sie konnten sich daher nicht in oder an Membranvesikeln befinden. Eine mögliche Kontamination des Cytosols mit zellulären Membranen, die mit den Kapsiden hätten interagieren können, wurde mit dem Membranfarbstoff Dil analysiert und ausgeschlossen.

6.3 Ausblick

Um das Potential eines zellfreien Testsystems für einen MT-abhängigen Kapsidtransport vollständig zu nutzen, ist die Kenntnis der Transportrichtung wichtig. Das kann z.B. durch eine definierte Orientierung der MT erreicht werden. So kann die *in vitro* Polymerisation des Tubulins von isolierten Centrosomen ausgehen, wobei das MT-Minus-Ende am Centrosom lokalisiert und damit identifizierbar ist. Ferner kann die Zerstörung der Dyneinaktivität durch selektive UV-Spaltung der DHC zeigen, ob der rekonstruierte Dynactin-abhängige *in vitro* Kapsidtransport auch durch Kinesin-2 vermittelt werden könnte. Die Dyneinaktivität lässt sich ferner durch einen funktions-blockierenden Antikörper wie z.B. den monoklonalen anti-Dynein Antikörper 70.1 (Gaglio et al., 1997; Steuer et al., 1990) inhibieren. Damit könnte neben den *in vitro* Bindungs-Testsystem auch mit dem funktionellen Transport-Testsystem die Beteiligung von Dynein nachgewiesen werden. Dies könnte auch in Verbindung mit einer identifizierbaren MT-Polarität geschehen. Ferner kann eine Immunodepletierung einzelner Transportfaktoren die Beteiligung von z.B. Dynein oder Kinesin-2 erweisen.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Testsysteme für MT-Motor-Bindung und MT-Transport können für Cytosol aus Säugetierorganen weiter entwickelt werden. Der Vorteil läge in der größeren evolutionären Nähe zum natürlichen Wirt des humanen HSV1 und der Verfügbarkeit von deutlich mehr Reagenzien als für das *Xenopus*-System. Das Cytosol könnte ferner aus infizierten Zellkulturzellen präpariert werden.

Nach der Identifizierung aller am HSV1-Kapsidtransport beteiligten cytosolischen Komponenten sollte es möglich sein, den Kapsidtransport mit gereinigten Komponenten zu rekonstruieren. Damit könnte man ausgehend von der Verwendung definierter zellulärer Komponenten die funktionellen Motor-Kapsid Interaktion untersuchen.

Der große Vorteil des hier etablierten *in vitro* Motilitätstestsystems gegenüber den Infektionsexperimenten in lebenden Zellen liegt darin, dass das virale Transportgut durch biochemische Methoden wie die Veränderung der Ionenstärke bei der Präparation oder limitierte Proteolyse spezifisch modifiziert werden kann.

Zusätzlich zur Kapsidpräparation aus extrazellulären Viren könnte man Kapside auch aus zellkernfreien Synaptosomen präparieren, die sich aus der synaptischen Plasmamembran bilden und mit HSV1 inokuliert werden (Nagel, Borsutsky, Bauerfeind und Sodeik; Manuskript in Vorbereitung). Da es sich hierbei um eine natürliche Eintrittsstelle von HSV1 in Neuronen handelt, sollten hieraus transport-kompetente Kapside isoliert werden können. Allerdings sind bisher die Ausbeuten noch nicht ausreichend, um Kapside im präparativen Maßstab isolieren zu können.

Zur genauen Identifizierung der für den Transport verantwortlichen viralen Proteine können diese mit Hilfe systematischer zielgerichteter Mutagenese verändert werden. Große virale Genome können mit Hilfe der Bakteriengenetik in künstliche bakterielle Chromosomen (*bacterial artificial chromosome, BAC*) kloniert werden. Transfiziert man virale BACs in eukaryotische Zellen, so kann infektiöses Virus gewonnen werden (Adler et al., 2003; Wagner et al., 2002). Bei der Mutation essentieller viraler Proteine wird das *BAC* in stabil transfizierte komplementierende Zelllinien, die das erforderliche Protein *in trans* liefern, transfiziert. Für das HSV1 Stamm 17⁺, dessen Sequenzinformation verfügbar ist, wurde kürzlich ein BAC hergestellt, bei dem das endogene VP26 durch GFPVP26 ersetzt wurde (Nagel, Fathollahy, Strive, Messerle, Borst und Sodeik; Manuskript in Vorbereitung). Dieses HSV1-BAC exprimiert Viren mit GFPVP26 markierten Kapsiden, die als Basis für die Erzeugung von Mutationen in VP1-3 und UL37 dienen, deren *in vitro* Transport mit dem hier beschriebenen Testsystem untersucht werden kann.

Die Richtung des cytosolischen Kapsid Transports könnte durch eine variable Tegument-Zusammensetzung, die Tegument-Kinasen UL13 und US3, oder eine Regulation der Motoraktivität während einer HSV1 Infektion reguliert werden. Mit dem entwickelten *in vitro* Transport Testsystem können diese Hypothesen nun direkt durch die Verwendung von MT, deren Polarität markiert ist, rekombinante Tegumentprotein Fragmente und GFPVP26 Kapside von Mutantenstämmen getestet werden. Nach den *in vivo* und den *in vitro* Daten für alle untersuchten HSV1 Proteine sind die inneren Tegument Proteine VP1-3 und UL37 und möglicherweise auch VP16 die wahrscheinlichsten Kandidaten für einen MT-Motorrezeptor (Abb. 6.3).

7 Literatur

- Adler, H., Messerle, M. and Koszinowski, U.H. (2003) Cloning of herpesviral genomes as bacterial artificial chromosomes. *Rev Med Virol*, **13**, 111-121.
- Alconada, A., Bauer, U., Sodeik, B. and Hoflack, B. (1999) Intracellular traffic of herpes simplex virus glycoprotein gE: characterization of the sorting signals required for its trans-Golgi network localization. *J Virol*, **73**, 377-387.
- Ali, M.A., Forghani, B. and Cantin, E.M. (1996) Characterization of an essential HSV-1 protein encoded by the UL25 gene reported to be involved in virus penetration and capsid assembly. *Virology*, **216**, 278-283.
- Allan, V. (1995) Protein phosphatase 1 regulates the cytoplasmic dynein-driven formation of endoplasmic reticulum networks in vitro. *J Cell Biol*, **128**, 879-891.
- Allan, V.J. (1993) Assay of membrane motility in interphase and metaphase *Xenopus* extracts. *Methods Cell Biol*, **39**, 203-226.
- Allan, V.J. and Vale, R.D. (1991) Cell cycle control of microtubule-based membrane transport and tubule formation in vitro. *J Cell Biol*, **113**, 347-359.
- Allen, R.D., Allen, N.S. and Travis, J.L. (1981) Video-enhanced contrast, differential interference contrast (AVEC-DIC) microscopy: a new method capable of analyzing microtubule-related motility in the reticulopodial network of *Allogromia laticollaris*. *Cell Motil*, **1**, 291-302.
- Allen, R.D., Weiss, D.G., Hayden, J.H., Brown, D.T., Fujiwake, H. and Simpson, M. (1985) Gliding movement of and bidirectional transport along single native microtubules from squid axoplasm: evidence for an active role of microtubules in cytoplasmic transport. *J Cell Biol*, **100**, 1736-1752.
- Baas, P.W., Deitch, J.S., Black, M.M. and Banker, G.A. (1988) Polarity orientation of microtubules in hippocampal neurons: uniformity in the axon and nonuniformity in the dendrite. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 8335-8339.
- Baines, J.D., Jacob, R.J., Simmerman, L. and Roizman, B. (1995) The herpes simplex virus 1 UL11 proteins are associated with cytoplasmic and nuclear membranes and with nuclear bodies of infected cells. *J Virol*, **69**, 825-833.
- Baines, J.D., Poon, A.P., Rovnak, J. and Roizman, B. (1994) The herpes simplex virus 1 UL15 gene encodes two proteins and is required for cleavage of genomic viral DNA. *J Virol*, **68**, 8118-8124.
- Banani, E., Murray, J.W., Stockert, R.J., Satir, P. and Wolkoff, A.W. (2003) Regulation of early endocytic vesicle motility and fission in a reconstituted system. *J Cell Sci*, **116**, 2749-2761.
- Batterson, W., Furlong, D. and Roizman, B. (1983) Molecular genetics of herpes simplex 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.
- Batterson, W. and Roizman, B. (1983) Characterization of the herpes simplex virion-associated factor responsible for the induction of alpha genes. *J Virol*, **46**, 371-377.
- Bearer, E.L., Breakefield, X.O., Schuback, D., Reese, T.S. and LaVail, J.H. (2000) Retrograde axonal transport of herpes simplex virus: evidence for a single mechanism and a role for tegument. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 8146-8150.
- Bechtel, J., Grundhoff, A. and Ganem, D. (2005) RNAs in the Virion of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus. *J. Virol.*, **79**, 10138-10146.
- Berg, H.C. (1993) *Random Walks in Biology*. Princeton University Press, Princeton.
- Blocker, A., Severin, F.F., Burkhardt, J.K., Bingham, J.B., Yu, H., Olivo, J.C., Schroer, T.A., Hyman, A.A. and Griffiths, G. (1997) Molecular requirements for bi-directional movement of phagosomes along microtubules. *J Cell Biol*, **137**, 113-129.
- Blocker, A., Severin, F.F., Habermann, A., Hyman, A.A., Griffiths, G. and Burkhardt, J.K. (1996) Microtubule-associated protein-dependent binding of phagosomes to microtubules. *J Biol Chem*, **271**, 3803-3811.
- Bonner, W.M. and Laskey, R.A. (1974) A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur. J. Biochem.*, **46**, 83-88.
- Booy, F.P., Trus, B.L., Newcomb, W.W., Brown, J.C., Conway, J.F. and Steven, A.C. (1994) Finding a needle in a haystack: detection of a small protein (the 12- kDa VP26) in a large complex (the 200-MDa capsid of herpes simplex virus). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 5652-5656.
- Bouin, J.C., Atallah, M.T. and Hultin, H.O. (1976) The glucose oxidase--catalase system. *Methods Enzymol*, **44**, 478-488.
- Bresnahan, W.A. and Shenk, T. (2000) A Subset of Viral Transcripts Packaged Within Human Cytomegalovirus Particles. *Science*, **288**, 2373-2376.
- Brunetti, C.R., Dingwell, K.S., Wale, C., Graham, F.L. and Johnson, D.C. (1998) Herpes simplex virus gD and virions accumulate in endosomes by mannose 6-phosphate-dependent and -independent mechanisms. *J Virol*, **72**, 3330-3339.
- Burkhardt, J.K., Echeverri, C.J., Nilsson, T. and Vellie, R.B. (1997) Overexpression of the dynactin (p50) subunit of the dynactin complex disrupts dynein-dependent maintenance of membrane organelle distribution. *J Cell Biol*, **139**, 469-484.
- Burkhardt, J.K., McIlvain, J.M., Jr., Sheetz, M.P. and Argon, Y. (1993) Lytic granules from cytotoxic T cells exhibit kinesin-dependent motility on microtubules in vitro. *J Cell Sci*, **104 (Pt 1)**, 151-162.
- Büttner, F. (2004) Entwicklung neuer Verfahren zur Fluorochromierung des Herpes-Simplex-Virus Typ1. Diplomarbeit. *Institut für Virologie*. Universität Hannover, Hannover, p. 79.
- Cabrini, G. and Verkman, A.S. (1986) Potential-sensitive response mechanism of diS-C3-(5) in biological membranes. *J Membr Biol*, **92**, 171-182.

- Carraway, K.L. and Carraway, C.A. (1989) Membrane-cytoskeleton interactions in animal cells. *Biochim Biophys Acta*, **988**, 147-171.
- Chen, D.H., Jakana, J., McNab, D., Mitchell, J., Zhou, Z.H., Dougherty, M., Chiu, W. and Rixon, F.J. (2001) The pattern of tegument-capsid interaction in the herpes simplex virus type 1 virion is not influenced by the small hexon-associated protein VP26. *J Virol*, **75**, 11863-11867.
- Ch'ng, T.H. and Enquist, L.W. (2005) Efficient axonal localization of alphaherpesvirus structural proteins in cultured sympathetic neurons requires viral glycoprotein E. *J Virol*, **79**, 8835-8846.
- Cleator, G.M. and Klapper, P.E. (2004) The herpesviridae. In Zuckerman, A.J., Banatvala, J.E., Pattison, J.R., Griffiths, P.D. and Schoub, B.D. (eds.), *Principles and Practice of Clinical Virology*. John Wiley & Sons, pp. 23-198.
- Cohen, G.H., Ponce de Leon, M., Diggelmann, H., Lawrence, W.C., Vernon, S.K. and Eisenberg, R.J. (1980) Structural analysis of the capsid polypeptides of herpes simplex virus types 1 and 2. *J Virol*, **34**, 521-531.
- Cohn, S.A., Saxton, W.M., Lye, R.J. and Scholey, J.M. (1993) Analyzing microtubule motors in real time. *Methods Cell Biol*, **39**, 75-88.
- Cole, D.G., Cande, W.Z., Baskin, R.J., Skoufias, D.A., Hogan, C.J. and Scholey, J.M. (1992) Isolation of a sea urchin egg kinesin-related protein using peptide antibodies. *J Cell Sci*, **101 (Pt 2)**, 291-301.
- Cole, D.G., Chinn, S.W., Wedaman, K.P., Hall, K., Vuong, T. and Scholey, J.M. (1993) Novel heterotrimeric kinesin-related protein purified from sea urchin eggs. *Nature*, **366**, 268-270.
- Collins, C.A. and Vallee, R.B. (1987) Temperature-dependent reversible assembly of taxol-treated microtubules. *J Cell Biol*, **105**, 2847-2854.
- Cooper, J.A. (1987) Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol*, **105**, 1473-1478.
- Cormack, B.P., Valdivia, R.H. and Falkow, S. (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, **173**, 33-38.
- Coulter, L.J., Moss, H.W., Lang, J. and McGeoch, D.J. (1993) A mutant of herpes simplex virus type 1 in which the UL13 protein kinase gene is disrupted. *J Gen Virol*, **74**, 387-395.
- Cubitt, A.B., Heim, R., Adams, S.R., Boyd, A.E., Gross, L.A. and Tsien, R.Y. (1995) Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem Sci*, **20**, 448-455.
- Dabora, S.L. and Sheetz, M.P. (1988) Cultured cell extracts support organelle movement on microtubules in vitro. *Cell Motil Cytoskeleton*, **10**, 482-495.
- Davison, A.J. and Clements, J.B. (1997) Herpesviruses: general properties. In Collier, L.H., Balows, A. and Sussmann, M. (eds.), *Topley & Wilson's Microbiology and Microbiol Infections*. Edward Arnold, London, Vol. 1, pp. 309-323.
- Deacon, S.W., Serpinskaya, A.S., Vaughan, P.S., Fanarraga, M.L., Vernos, I., Vaughan, K.T. and Gelfand, V.I. (2003) Dynactin is required for bidirectional organelle transport. *J Cell Biol*, **160**, 297-301.
- del Rio, T., Ch'ng, T.H., Flood, E.A., Gross, S.P. and Enquist, L.W. (2005) Heterogeneity of a fluorescent tegument component in single pseudorabies virus virions and enveloped axonal assemblies. *J Virol*, **79**, 3903-3919.
- Derry, W.B., Wilson, L. and Jordan, M.A. (1995) Substoichiometric binding of taxol suppresses microtubule dynamics. *Biochemistry*, **34**, 2203-2211.
- Desai, A. and Mitchison, T.J. (1997) Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **13**, 83-117.
- Desai, P., DeLuca, N.A. and Person, S. (1998) Herpes simplex virus type 1 VP26 is not essential for replication in cell culture but influences production of infectious virus in the nervous system of infected mice. *Virology*, **247**, 115-124.
- Desai, P. and Person, S. (1998) Incorporation of the green fluorescent protein into the herpes simplex virus type 1 capsid. *J Virol*, **72**, 7563-7568.
- Desai, P., Sexton, G.L., McCaffery, J.M. and Person, S. (2001) A null mutation in the gene encoding the herpes simplex virus type 1 UL37 polypeptide abrogates virus maturation. *J Virol*, **75**, 10259-10271.
- Desai, P.J. (2000) A null mutation in the UL36 gene of herpes simplex virus type 1 results in accumulation of unenveloped DNA-filled capsids in the cytoplasm of infected cells. *J Virol*, **74**, 11608-11618.
- Diefenbach, R.J., Miranda-Saksena, M., Diefenbach, E., Holland, D.J., Boadle, R.A., Armati, P.J. and Cunningham, A.L. (2002) Herpes Simplex Virus Tegument Protein US11 Interacts with Conventional Kinesin Heavy Chain. *J Virol*, **76**, 3282-3291.
- Dietz, P., Klupp, B.G., Fuchs, W., Kollner, B., Weiland, E. and Mettenleiter, T.C. (2000) Pseudorabies virus glycoprotein K requires the UL20 gene product for processing. *J Virol*, **74**, 5083-5090.
- Döhner, K., Nagel, C.H. and Sodeik, B. (2005) Viral stop-and-go along microtubules: taking a ride with dynein and kinesins. *Trends Microbiol*, **13**, 320-327.
- Döhner, K. and Sodeik, B. (2004) The role of the cytoskeleton during viral infection. *Curr Top Microbiol Immunol*, **285**, 67-108.
- Döhner, K., Wolfstein, A., Prank, U., Echeverri, C., Dujardin, D., Vallee, R. and Sodeik, B. (2002) Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport. *Mol Biol Cell*, **13**, 2795-2809.
- Donnelly, M. and Elliott, G. (2001) Nuclear localization and shuttling of herpes simplex virus tegument protein VP13/14. *J Virol*, **75**, 2566-2574.
- Douglas, M.W., Diefenbach, R.J., Homa, F.L., Miranda-Saksena, M., Rixon, F.J., Vittone, V., Byth, K. and Cunningham, A.L. (2004) Herpes simplex virus type 1 capsid protein VP26 interacts with dynein light chains RP3 and Tctex1 and plays a role in retrograde cellular transport. *J Biol Chem*, **279**, 28522-28530.
- Downing, K.H. (2000) Structural basis for the interaction of tubulin with proteins and drugs that affect microtubule dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **16**, 89-111.

- Echeverri, C.J., Paschal, B.M., Vaughan, K.T. and Vallee, R.B. (1996) Molecular characterization of the 50-kD subunit of dynactin reveals function for the complex in chromosome alignment and spindle organization during mitosis. *J Cell Biol*, **132**, 617-633.
- Eckley, D.M., Gill, S.R., Melkonian, K.A., Bingham, J.B., Goodson, H.V., Heuser, J.E. and Schroer, T.A. (1999) Analysis of dynactin subcomplexes reveals a novel actin-related protein associated with the arp1 minifilament pointed end. *J Cell Biol*, **147**, 307-320.
- Eisenberg, R.J., Long, D., Ponce de Leon, M., Matthews, J.T., Spear, P.G., Gibson, M.G., Lasky, L.A., Berman, P., Golub, E. and Cohen, G.H. (1985) Localization of epitopes of herpes simplex virus type 1 glycoprotein D. *J Virol*, **53**, 634-644.
- Eisenberg, R.J., Ponce de Leon, M., Friedman, H.M., Fries, L.F., Frank, M.M., Hastings, J.C. and Cohen, G.H. (1987) Complement component C3b binds directly to purified glycoprotein C of herpes simplex virus types 1 and 2. *Microb Pathog*, **3**, 423-435.
- Ejercito, P.M., Kieff, E.D. and Roizman, B. (1968) Characterization of herpes simplex virus strains differing in their effects on social behaviour of infected cells. *J Gen Virol*, **2**, 357-364.
- Elliott, G., Mouzakis, G. and O'Hare, P. (1995) VP16 interacts via its activation domain with VP22, a tegument protein of herpes simplex virus, and is relocated to a novel macromolecular assembly in coexpressing cells. *J Virol*, **69**, 7932-7941.
- Elliott, G. and O'Hare, P. (1997) Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell*, **88**, 223-233.
- Elliott, G. and O'Hare, P. (1999) Live-cell analysis of a green fluorescent protein-tagged herpes simplex virus infection. *J Virol*, **73**, 4110-4119.
- Enquist, L.W., Husak, P.J., Banfield, B.W. and Smith, G.A. (1998) Infection and spread of alphaherpesviruses in the nervous system. *Adv Virus Res*, **51**, 237-347.
- Evangelio, J.A., Abal, M., Barasoain, I., Souto, A.A., Lillo, M.P., Acuna, A.U., Amat-Guerri, F. and Andreu, J.M. (1998) Fluorescent taxoids as probes of the microtubule cytoskeleton. *Cell Motil Cytoskeleton*, **39**, 73-90.
- Everett, R.D., Sourvinos, G., Leiper, C., Clements, J.B. and Orr, A. (2004) Formation of nuclear foci of the herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP4 at early times of infection: localization, dynamics, recruitment of ICP27, and evidence for the de novo induction of ND10-like complexes. *J Virol*, **78**, 1903-1917.
- Ewers, H., Smith, A.E., Sbalzarini, I.F., Lilie, H., Koumoutsakos, P. and Helenius, A. (2005) Single-particle tracking of murine polyoma virus-like particles on live cells and artificial membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 15110-15115.
- Ferrari, R., Manfroi, A.J. and Young, W.R. (2001) Strongly and weakly self-similar diffusion. *Physica D*, **154**, 111-137.
- Flanagan, M.D. and Lin, S. (1980) Cytochalasins block actin filament elongation by binding to high affinity sites associated with F-actin. *J Biol Chem*, **255**, 835-838.
- Fuchs, W., Granzow, H., Klupp, B.G., Kopp, M. and Mettenleiter, T.C. (2002a) The UL48 tegument protein of pseudorabies virus is critical for intracytoplasmic assembly of infectious virions. *J Virol*, **76**, 6729-6742.
- Fuchs, W., Klupp, B.G., Granzow, H., Hengartner, C., Brack, A., Mundt, A., Enquist, L.W. and Mettenleiter, T.C. (2002b) Physical interaction between envelope glycoproteins E and M of pseudorabies virus and the major tegument protein UL49. *J Virol*, **76**, 8208-8217.
- Fuchs, W., Klupp, B.G., Granzow, H., Osterrieder, N. and Mettenleiter, T.C. (2002c) The interacting UL31 and UL34 gene products of pseudorabies virus are involved in egress from the host-cell nucleus and represent components of primary enveloped but not mature virions. *J Virol*, **76**, 364-378.
- Gaglio, T., Dionne, M.A. and Compton, D.A. (1997) Mitotic spindle poles are organized by structural and motor proteins in addition to centrosomes. *J Cell Biol*, **138**, 1055-1066.
- Garcia-Mata, R., Bebok, Z., Sorscher, E.J. and Sztul, E.S. (1999) Characterization and dynamics of aggresome formation by a cytosolic GFP- chimera. *J Cell Biol*, **146**, 1239-1254.
- Gee, M.A., Heuser, J.E. and Vallee, R.B. (1997) An extended microtubule-binding structure within the dynein motor domain. *Nature*, **390**, 636-639.
- Giannakakou, P., Nakano, M., Nicolaou, K.C., O'Brate, A., Yu, J., Blagosklonny, M.V., Greber, U.F. and Fojo, T. (2002) Enhanced microtubule-dependent trafficking and p53 nuclear accumulation by suppression of microtubule dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 10855-10860.
- Gianni, T., Campadelli-Fiume, G. and Menotti, L. (2004) Entry of herpes simplex virus mediated by chimeric forms of nectin1 retargeted to endosomes or to lipid rafts occurs through acidic endosomes. *J Virol*, **78**, 12268-12276.
- Gilbert, S.P. and Sloboda, R.D. (1986) Identification of a MAP 2-like ATP-binding protein associated with axoplasmic vesicles that translocate on isolated microtubules. *J Cell Biol*, **103**, 947-956.
- Gilbert, S.P. and Sloboda, R.D. (1989) A squid dynein isoform promotes axoplasmic vesicle translocation. *J Cell Biol*, **109**, 2379-2394.
- Granzow, H., Klupp, B.G., Fuchs, W., Veits, J., Osterrieder, N. and Mettenleiter, T.C. (2001) Egress of alphaherpesviruses: comparative ultrastructural study. *J Virol*, **75**, 3675-3684.
- Granzow, H., Klupp, B.G. and Mettenleiter, T.C. (2004) The pseudorabies virus US3 protein is a component of primary and of mature virions. *J Virol*, **78**, 1314-1323.
- Granzow, H., Klupp, B.G. and Mettenleiter, T.C. (2005) Entry of pseudorabies virus: an immunogold-labeling study. *J Virol*, **79**, 3200-3205.
- Granzow, H., Weiland, F., Jons, A., Klupp, B.G., Karger, A. and Mettenleiter, T.C. (1997) Ultrastructural analysis of the replication cycle of pseudorabies virus in cell culture: a reassessment. *J Virol*, **71**, 2072-2082.
- Griffiths, G. (1993) Fine Structure Immunocytochemistry. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, **Unit 11.6**, 413-424.

- Gross, S.T., Harley, C.A. and Wilson, D.W. (2003) The cytoplasmic tail of Herpes simplex virus glycoprotein H binds to the tegument protein VP16 in vitro and in vivo. *Virology*, **317**, 1-12.
- Grünewald, K., Desai, P., Winkler, D.C., Heymann, J.B., Belnap, D.M., Baumeister, W. and Steven, A.C. (2003) Three-dimensional structure of herpes simplex virus from cryo-electron tomography. *Science*, **302**, 1396-1398.
- Guillet, E.G. and Kimmich, G.A. (1981) DiO-C3-(5) and DiS-C3-(5): Interactions with RBC, ghosts and phospholipid vesicles. *J Membr Biol*, **59**, 1-11.
- Hafezi, W., Bernard, E., Cook, R. and Elliott, G. (2005) Herpes Simplex Virus Tegument Protein VP22 Contains an Internal VP16 Interaction Domain and a C-Terminal Domain That Are Both Required for VP22 Assembly into the Virus Particle. *J Virol*, **79**, 13082-13093.
- Hammonds, T.R., Denyer, S.P., Jackson, D.E. and Irving, W.L. (1996) Studies to show that with podophyllotoxin the early replicative stages of herpes simplex virus type 1 depend upon functional cytoplasmic microtubules. *J Med Microbiol*, **45**, 167-172.
- Hanz, S., Perlson, E., Willis, D., Zheng, J.Q., Massarwa, R., Huerta, J.J., Koltzenburg, M., Kohler, M., van-Minnen, J., Twiss, J.L. and Fainzilber, M. (2003) Axoplasmic importins enable retrograde injury signaling in lesioned nerve. *Neuron*, **40**, 1095-1104.
- Harland, J. and Brown, S.M. (1997) HSV Growth, Preparation, and Assay. *Herpes simplex protocols, Methods in Molecular Medicine*, eds. **S. M. Brown and A.R. MacLean**, Unit 1, 1-18.
- Harley, C.A., Dasgupta, A. and Wilson, D.W. (2001) Characterization of herpes simplex virus-containing organelles by subcellular fractionation: role for organelle acidification in assembly of infectious particles. *J Virol*, **75**, 1236-1251.
- Heidemann, S.R., Landers, J.M. and Hamburg, M.A. (1981) Polarity orientation of axonal microtubules. *J Cell Biol*, **91**, 661-665.
- Heine, J.W., Honess, R.W., Cassai, E. and Roizman, B. (1974) Proteins specified by herpes simplex virus. XII. The virion polypeptides of type 1 strains. *J Virol*, **14**, 640-651.
- Helenius, A., McCaslin, D.R., Fries, E. and Tanford, C. (1979) Properties of detergents. *Methods Enzymol*, **56**, 734-749.
- Hirokawa, N. and Takemura, R. (2005) Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. *Nat Rev Neurosci*, **6**, 201-214.
- Hjelmeland, L.M. and Chrambach, A. (1984) Solubilization of functional membrane proteins. *Methods Enzymol*, **104**, 305-318.
- Holland, D.J., Miranda-Saksena, M., Boadle, R.A., Armati, P. and Cunningham, A.L. (1999) Anterograde transport of herpes simplex virus proteins in axons of peripheral human fetal neurons: an immunoelectron microscopy study. *J Virol*, **73**, 8503-8511.
- Holleman, A.F., Wiberg, E. and Wiberg, N. (1985) Lehrbuch der Anorganischen Chemie. *Walter de Gruyter, Berlin, New York*, **91-100. Auflage**, 449-457.
- Holleran, E.A., Ligon, L.A., Tokito, M., Stankewich, M.C., Morrow, J.S. and Holzbaur, E.L. (2001) beta III spectrin binds to the Arp1 subunit of dynactin. *J Biol Chem*, **276**, 36598-36605.
- Homa, F.L. and Brown, J.C. (1997) Capsid assembly and DNA packaging in herpes simplex virus. *Rev Med Virol*, **7**, 107-122.
- Howard, J. and Hyman, A.A. (1993) Preparation of marked microtubules for the assay of the polarity of microtubule-based motors by fluorescence microscopy. *Methods Cell Biol*, **39**, 105-113.
- Hyman, A.A. (1991) Preparation of marked microtubules for the assay of the polarity of microtubule-based motors by fluorescence. *J Cell Sci Suppl*, **14**, 125-127.
- Isola, V.J., Eisenberg, R.J., Siebert, G.R., Heilman, C.J., Wilcox, W.C. and Cohen, G.H. (1989) Fine mapping of antigenic site II of herpes simplex virus glycoprotein D. *J Virol*, **63**, 2325-2334.
- Janus, J. (2005) Bidirektionaler Mikrotubuli-Transport während des Zelleintritts von Herpes-Simplex-Virus Typ 1: Die Rolle von US11 und Kinesinen. Diplomarbeit. *Institut für Virologie*. Universität Hannover, Hannover, p. 123.
- Jefferson, J.J., Leung, C.L. and Liem, R.K. (2004) Plakins: goliaths that link cell junctions and the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 542-553.
- Jerome, K.R. and Ashley, R.L. (2003) Herpes Simplex Virus and Herpes B Virus. *Manual of Clinical Microbiology*, **2**, 1291-1299.
- Karki, S. and Holzbaur, E.L. (1995) Affinity chromatography demonstrates a direct binding between cytoplasmic dynein and the dynactin complex. *J Biol Chem*, **270**, 28806-28811.
- Karki, S., LaMonte, B. and Holzbaur, E.L. (1998) Characterization of the p22 subunit of dynactin reveals the localization of cytoplasmic dynein and dynactin to the midbody of dividing cells. *J Cell Biol*, **142**, 1023-1034.
- Kato, K., Daikoku, T., Goshima, F., Kume, H., Yamaki, K. and Nishiyama, Y. (2000) Synthesis, subcellular localization and VP16 interaction of the herpes simplex virus type 2 UL46 gene product. *Arch Virol*, **145**, 2149-2162.
- Keating, T.J., Peloquin, J.G., Rodionov, V.I., Momcilovic, D. and Borisy, G.G. (1997) Microtubule release from the centrosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 5078-5083.
- King, S.J., Bonilla, M., Rodgers, M.E. and Schroer, T.A. (2002) Subunit organization in cytoplasmic dynein subcomplexes. *Protein Sci*, **11**, 1239-1250.
- King, S.J. and Schroer, T.A. (2000) Dynactin increases the processivity of the cytoplasmic dynein motor. *Nat Cell Biol*, **2**, 20-24.
- King, S.M. (2000) AAA domains and organization of the dynein motor unit. *J Cell Sci*, **113**, 2521-2526.
- King, S.M. (2003) Dynein Motors: Structure, Mechanochemistry and Regulation. In Schliwa, M. (ed.), *Molecular Motors*. Wiley-VCH Verlag GmbH KGaA, Weinheim, pp. 45-78.
- Kishino, A. and Yanagida, T. (1988) Force measurements by micromanipulation of a single actin filament by glass needles. *Nature*, **334**, 74-76.

- Klupp, B.G., Bottcher, S., Granzow, H., Kopp, M. and Mettenleiter, T.C. (2005) Complex formation between the UL16 and UL21 tegument proteins of pseudorabies virus. *J Virol*, **79**, 1510-1522.
- Klupp, B.G., Fuchs, W., Granzow, H., Nixdorf, R. and Mettenleiter, T.C. (2002) Pseudorabies virus UL36 tegument protein physically interacts with the UL37 protein. *J Virol*, **76**, 3065-3071.
- Kodama, A., Lechler, T. and Fuchs, E. (2004) Coordinating cytoskeletal tracks to polarize cellular movements. *J Cell Biol*, **167**, 203-207.
- Komoszynski, M. and Wojtczak, A. (1996) Apyrases (ATP diphosphohydrolases, EC 3.6.1.5): function and relationship to ATPases. *Biochim Biophys Acta*, **1310**, 233-241.
- Koslowski, K.M., Shaver, P.R., Casey, J.T., 2nd, Wilson, T., Yamanaka, G., Sheaffer, A.K., Tenney, D.J. and Pederson, N.E. (1999) Physical and functional interactions between the herpes simplex virus UL15 and UL28 DNA cleavage and packaging proteins. *J Virol*, **73**, 1704-1707.
- Kristensson, K., Lycke, E., Roytta, M., Svennerholm, B. and Vahlne, A. (1986) Neuritic transport of herpes simplex virus in rat sensory neurons in vitro. Effects of substances interacting with microtubular function and axonal flow [nocodazole, taxol and erythro-9-3-(2-hydroxy-nonyl)adenine]. *J Gen Virol*, **67**, 2023-2028.
- Kwong, A.D. and Frenkel, N. (1989) The herpes simplex virus virion host shutoff function. *J Virol*, **63**, 4834-4839.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lamberti, C. and Weller, S.K. (1998) The herpes simplex virus type 1 cleavage/packaging protein, UL32, is involved in efficient localization of capsids to replication compartments. *J Virol*, **72**, 2463-2473.
- Lane, J.D. and Allan, V.J. (1999) Microtubule-based endoplasmic reticulum motility in *Xenopus laevis*: activation of membrane-associated kinesin during development. *Mol Biol Cell*, **10**, 1909-1922.
- Lawrence, C.J., Dawe, R.K., Christie, K.R., Cleveland, D.W., Dawson, S.C., Endow, S.A., Goldstein, L.S., Goodson, H.V., Hirokawa, N., Howard, J., Malmberg, R.L., McIntosh, J.R., Miki, H., Mitchison, T.J., Okada, Y., Reddy, A.S., Saxton, W.M., Schliwa, M., Scholey, J.M., Vale, R.D., Walczak, C.E. and Wordeman, L. (2004) A standardized kinesin nomenclature. *J Cell Biol*, **167**, 19-22.
- Leopold, P.L., Kreitzer, G., Miyazawa, N., Rempel, S., Pfister, K.K., Rodriguez-Boulan, E. and Crystal, R.G. (2000) Dynein- and microtubule-mediated translocation of adenovirus serotype 5 occurs after endosomal lysis. *Hum Gene Ther*, **11**, 151-165.
- Leslie, R.J., Saxton, W.M., Mitchison, T.J., Neighbors, B., Salmon, E.D. and McIntosh, J.R. (1984) Assembly properties of fluorescein-labeled tubulin in vitro before and after fluorescence bleaching. *J Cell Biol*, **99**, 2146-2156.
- Loomis, J.S., Courtney, R.J. and Wills, J.W. (2003) Binding partners for the UL11 tegument protein of herpes simplex virus type 1. *J Virol*, **77**, 11417-11424.
- Luby-Phelps, K. (2000) Cytoarchitecture and physical properties of cytoplasm: volume, viscosity, diffusion, intracellular surface area. *Int Rev Cytol*, **192**, 189-221.
- Luduena, R.F. (1998) Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications. *Int Rev Cytol*, **178**, 207-275.
- Luxton, G.W., Haverlock, S., Coller, K.E., Antinone, S.E., Pincetic, A. and Smith, G.A. (2005) Targeting of herpesvirus capsid transport in axons is coupled to association with specific sets of tegument proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 5832-5837.
- Lycke, E., Hamark, B., Johansson, M., Krotochwil, A., Lycke, J. and Svennerholm, B. (1988) Herpes simplex virus infection of the human sensory neuron. An electron microscopy study. *Arch Virol*, **101**, 87-104.
- Lycke, E., Kristensson, K., Svennerholm, B., Vahlne, A. and Ziegler, R. (1984) Uptake and transport of herpes simplex virus in neurites of rat dorsal root ganglia cells in culture. *J Gen Virol*, **65** (Pt 1), 55-64.
- Lye, R.J., Porter, M.E., Scholey, J.M. and McIntosh, J.R. (1987) Identification of a microtubule-based cytoplasmic motor in the nematode *C. elegans*. *Cell*, **51**, 309-318.
- Mabit, H., Nakano, M.Y., Prank, U., Saam, B., Döhner, K., Sodeik, B. and Greber, U.F. (2002) Intact microtubules support adenovirus and herpes simplex virus infections. *J Virol*, **76**, 9962-9971.
- Marozin, S., Prank, U. and Sodeik, B. (2004) Herpes simplex virus type 1 infection of polarized epithelial cells requires microtubules and access to receptors present at cell-cell contact sites. *J Gen Virol*, **85**, 775-786.
- McDonald, D., Vodicka, M.A., Lucero, G., Svitkina, T.M., Borisy, G.G., Emerman, M. and Hope, T.J. (2002) Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *J Cell Biol*, **159**, 441-452.
- McGeoch, D.J., Dalrymple, M.A., Davison, A.J., Dolan, A., Frame, M.C., McNab, D., Perry, L.J., Scott, J.E. and Taylor, P. (1988) The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol*, **69** (Pt 7), 1531-1574.
- McLauchlan, J., Addison, C., Craigie, M.C. and Rixon, F.J. (1992) Noninfectious L-particles supply functions which can facilitate infection by HSV-1. *Virology*, **190**, 682-688.
- McLauchlan, J. and Rixon, F.J. (1992) Characterization of enveloped tegument structures (L particles) produced by alphaherpesviruses: integrity of the tegument does not depend on the presence of capsid or envelope. *J Gen Virol*, **73** (Pt 2), 269-276.
- McMillan, T.N. and Johnson, D.C. (2001) Cytoplasmic domain of herpes simplex virus gE causes accumulation in the trans-Golgi network, a site of virus envelopment and sorting of virions to cell junctions. *J Virol*, **75**, 1928-1940.
- McNabb, D.S. and Courtney, R.J. (1992) Characterization of the large tegument protein (ICP1/2) of herpes simplex virus type 1. *Virology*, **190**, 221-232.
- Merdes, A., Heald, R., Samejima, K., Earnshaw, W.C. and Cleveland, D.W. (2000) Formation of spindle poles by dynein/dynactin-dependent transport of NuMA. *J Cell Biol*, **149**, 851-862.

- Mettenleiter, T.C. (2000) Aujeszky's disease (pseudorabies) virus: the virus and molecular pathogenesis--state of the art, June 1999. *Vet Res*, **31**, 99-115.
- Mettenleiter, T.C. (2002) Herpesvirus assembly and egress. *J Virol*, **76**, 1537-1547.
- Mettenleiter, T.C. (2003) Pathogenesis of neurotropic herpesviruses: role of viral glycoproteins in neuroinvasion and transneuronal spread. *Virus Res*, **92**, 197-206.
- Mettenleiter, T.C. (2004) Budding events in herpesvirus morphogenesis. *Virus Res*, **106**, 167-180.
- Meurer-Grob, P., Kasparian, J. and Wade, R.H. (2001) Microtubule structure at improved resolution. *Biochemistry*, **40**, 8000-8008.
- Milne, R.S., Nicola, A.V., Whitbeck, J.C., Eisenberg, R.J. and Cohen, G.H. (2005) Glycoprotein D receptor-dependent, low-pH-independent endocytic entry of herpes simplex virus type 1. *J Virol*, **79**, 6655-6663.
- Miranda-Saksena, M., Armati, P., Boadle, R.A., Holland, D.J. and Cunningham, A.L. (2000) Anterograde transport of herpes simplex virus type 1 in cultured, dissociated human and rat dorsal root ganglion neurons. *J Virol*, **74**, 1827-1839.
- Mitchison, T. and Kirschner, M. (1984) Dynamic instability of microtubule growth. *Nature*, **312**, 237-242.
- Mitchison, T.J. (1989) Polewards microtubule flux in the mitotic spindle: evidence from photoactivation of fluorescence. *J Cell Biol*, **109**, 637-652.
- Moller, J.V. and le Maire, M. (1993) Detergent binding as a measure of hydrophobic surface area of integral membrane proteins. *J Biol Chem*, **268**, 18659-18672.
- Moss, A.G., Gatti, J.L. and Witman, G.B. (1992) The motile beta/IC1 subunit of sea urchin sperm outer arm dynein does not form a rigor bond. *J Cell Biol*, **118**, 1177-1188.
- Mossman, K.L., Sherburne, R., Lavery, C., Duncan, J. and Smiley, J.R. (2000) Evidence that herpes simplex virus VP16 is required for viral egress downstream of the initial envelopment event. *J Virol*, **74**, 6287-6299.
- Mujumdar, R.B., Ernst, L.A., Mujumdar, S.R., Lewis, C.J. and Waggoner, A.S. (1993) Cyanine dye labeling reagents: sulfoindocyanine succinimidyl esters. *Bioconjug Chem*, **4**, 105-111.
- Muresan, V., Stankewich, M.C., Steffen, W., Morrow, J.S., Holzbaur, E.L. and Schnapp, B.J. (2001) Dynactin-dependent, dynein-driven vesicle transport in the absence of membrane proteins: a role for spectrin and acidic phospholipids. *Mol Cell*, **7**, 173-183.
- Murray, A.W. (1991) Cell cycle extracts. *Methods Cell Biol*, **36**, 581-605.
- Murray, J.W., Bananis, E. and Wolkoff, A.W. (2000) Reconstitution of ATP-dependent movement of endocytic vesicles along microtubules in vitro: an oscillatory bidirectional process. *Mol Biol Cell*, **11**, 419-433.
- Nagafuchi, A. (2001) Molecular architecture of adherens junctions. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 600-603.
- Nagel, C.H. (2002) Der Zelleintritt von Herpes-Simplex-Virus Typ 1 in isolierte Synaptosomen - die Zusammensetzung des zytosolischen Kapsids. Diplomarbeit. *Institut für Biochemie*. Medizinische Hochschule Hannover, Hannover, p. 81.
- Nangaku, M., Sato-Yoshitake, R., Okada, Y., Noda, Y., Takemura, R., Yamazaki, H. and Hirokawa, N. (1994) KIF1B, a novel microtubule plus end-directed monomeric motor protein for transport of mitochondria. *Cell*, **79**, 1209-1220.
- Neugebauer, J.M. (1990) Detergents: an overview. *Methods Enzymol*, **182**, 239-253.
- Newcomb, W.W. and Brown, J.C. (1991) Structure of the herpes simplex virus capsid: effects of extraction with guanidine hydrochloride and partial reconstitution of extracted capsids. *J Virol*, **65**, 613-620.
- Newcomb, W.W. and Brown, J.C. (1994) Induced extrusion of DNA from the capsid of herpes simplex virus type 1. *J Virol*, **68**, 433-440.
- Newcomb, W.W., Juhas, R.M., Thomsen, D.R., Homa, F.L., Burch, A.D., Weller, S.K. and Brown, J.C. (2001) The UL6 gene product forms the portal for entry of DNA into the herpes simplex virus capsid. *J Virol*, **75**, 10923-10932.
- Newcomb, W.W., Thomsen, D.R., Homa, F.L. and Brown, J.C. (2003) Assembly of the herpes simplex virus capsid: identification of soluble scaffold-portal complexes and their role in formation of portal-containing capsids. *J Virol*, **77**, 9862-9871.
- Newcomb, W.W., Trus, B.L., Booy, F.P., Steven, A.C., Wall, J.S. and Brown, J.C. (1993) Structure of the herpes simplex virus capsid. Molecular composition of the pentons and the triplexes. *J Mol Biol*, **232**, 499-511.
- Ng, T.I., Ogle, W.O. and Roizman, B. (1998) UL13 protein kinase of herpes simplex virus 1 complexes with glycoprotein E and mediates the phosphorylation of the viral Fc receptor: glycoproteins E and I. *Virology*, **241**, 37-48.
- Nicola, A.V., Hou, J., Major, E.O. and Straus, S.E. (2005) Herpes simplex virus type 1 enters human epidermal keratinocytes, but not neurons, via a pH-dependent endocytic pathway. *J Virol*, **79**, 7609-7616.
- Nicola, A.V., McEvoy, A.M. and Straus, S.E. (2003) Roles for endocytosis and low pH in herpes simplex virus entry into HeLa and Chinese hamster ovary cells. *J Virol*, **77**, 5324-5332.
- Nicola, A.V. and Straus, S.E. (2004) Cellular and viral requirements for rapid endocytic entry of herpes simplex virus. *J Virol*, **78**, 7508-7517.
- Noda, Y., Okada, Y., Saito, N., Setou, M., Xu, Y., Zhang, Z. and Hirokawa, N. (2001) KIFC3, a microtubule minus end-directed motor for the apical transport of annexin XIIIb-associated Triton-insoluble membranes. *J Cell Biol*, **155**, 77-88.
- Nogales, E. (2000) Structural insights into microtubule function. *Annu Rev Biochem*, **69**, 277-302.
- Nogales, E., Whittaker, M., Milligan, R.A. and Downing, K.H. (1999) High-resolution model of the microtubule. *Cell*, **96**, 79-88.
- Nogales, E., Wolf, S.G. and Downing, K.H. (1997) Visualizing the secondary structure of tubulin: three-dimensional map at 4 Å. *J Struct Biol*, **118**, 119-127.
- Nogales, E., Wolf, S.G. and Downing, K.H. (1998) Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature*, **391**, 199-203.

- Nogales, E., Wolf, S.G., Khan, I.A., Luduena, R.F. and Downing, K.H. (1995) Structure of tubulin at 6.5 Å and location of the taxol-binding site. *Nature*, **375**, 424-427.
- Ogasawara, M., Suzutani, T., Yoshida, I. and Azuma, M. (2001) Role of the UL25 gene product in packaging DNA into the herpes simplex virus capsid: location of UL25 product in the capsid and demonstration that it binds DNA. *J Virol*, **75**, 1427-1436.
- Ohara, P.T., Chin, M.S. and LaVail, J.H. (2000) The spread of herpes simplex virus type 1 from trigeminal neurons to the murine cornea: an immunoelectron microscopy study. *J Virol*, **74**, 4776-4786.
- Ohka, S., Yang, W.X., Terada, E., Iwasaki, K. and Nomoto, A. (1998) Retrograde transport of intact poliovirus through the axon via the fast transport system. *Virology*, **250**, 67-75.
- Oiwa, K. and Sakakibara, H. (2005) Recent progress in dynein structure and mechanism. *Curr Opin Cell Biol*, **17**, 98-103.
- Ojala, P.M., Sodeik, B., Ebersold, M.W., Kutay, U. and Helenius, A. (2000) Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro. *Mol Cell Biol*, **20**, 4922-4931.
- Olmsted, J.B. and Borisy, G.G. (1975) Ionic and nucleotide requirements for microtubule polymerization in vitro. *Biochemistry*, **14**, 2996-3005.
- Ormo, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L.A., Tsien, R.Y. and Remington, S.J. (1996) Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein. *Science*, **273**, 1392-1395.
- Ovechkina, Y. and Wordeman, L. (2003) Unconventional motoring: an overview of the Kin C and Kin I kinesins. *Traffic*, **4**, 367-375.
- Overton, H., McMillan, D., Hope, L. and Wong-Kai-In, P. (1994) Production of host shutoff-defective mutants of herpes simplex virus type 1 by inactivation of the UL13 gene. *Virology*, **202**, 97-106.
- Paschal, B.M., Shpetner, H.S. and Vallee, R.B. (1987) MAP 1C is a microtubule-activated ATPase which translocates microtubules in vitro and has dynein-like properties. *J Cell Biol*, **105**, 1273-1282.
- Paschal, B.M. and Vallee, R.B. (1987) Retrograde transport by the microtubule-associated protein MAP 1C. *Nature*, **330**, 181-183.
- Paschal, B.M. and Vallee, R.B. (1993) Microtubule and axoneme gliding assays for force production by microtubule motor proteins. *Methods Cell Biol*, **39**, 65-74.
- Pelkmans, L., Kartenbeck, J. and Helenius, A. (2001) Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol*, **3**, 473-483.
- Penfold, M.E., Armati, P. and Cunningham, A.L. (1994) Axonal transport of herpes simplex virions to epidermal cells: evidence for a specialized mode of virus transport and assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 6529-6533.
- Perdue, M.L., Cohen, J.C., Kemp, M.C., Randall, C.C. and O'Callaghan, D.J. (1975) Characterization of three species of nucleocapsids of equine herpesvirus type-1 (EHV-1). *Virology*, **64**, 187-204.
- Perdue, M.L., Cohen, J.C., Randall, C.C. and O'Callaghan, D.J. (1976) Biochemical studies of the maturation of herpesvirus nucleocapsid species. *Virology*, **74**, 194-208.
- Perdue, M.L., Kemp, M.C., Randall, C.C. and O'Callaghan, D.J. (1974) Studies of the molecular anatomy of the L-M cell strain of equine herpes virus type 1: proteins of the nucleocapsid and intact virion. *Virology*, **59**, 201-216.
- Perez, A., Li, Q.X., Perez-Romero, P., Delassus, G., Lopez, S.R., Sutter, S., McLaren, N. and Fuller, A.O. (2005) A new class of receptor for herpes simplex virus has heptad repeat motifs that are common to membrane fusion proteins. *J Virol*, **79**, 7419-7430.
- Perez-Romero, P. and Fuller, A.O. (2005) The C terminus of the B5 receptor for herpes simplex virus contains a functional region important for infection. *J Virol*, **79**, 7431-7437.
- Ploubidou, A. and Way, M. (2001) Viral transport and the cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 97-105.
- Pollock, N., Koonce, M.P., de Hostos, E.L. and Vale, R.D. (1998) In vitro microtubule-based organelle transport in wild-type Dictyostelium and cells overexpressing a truncated dynein heavy chain. *Cell Motil Cytoskeleton*, **40**, 304-314.
- Pomeranz, L.E., Reynolds, A.E. and Hengartner, C.J. (2005) Molecular biology of pseudorabies virus: impact on neurovirology and veterinary medicine. *Microbiol Mol Biol Rev*, **69**, 462-500.
- Potel, C., Kaelin, K., Gautier, I., Lebon, P., Coppey, J. and Rozenberg, F. (2002) Incorporation of green fluorescent protein into the essential envelope glycoprotein B of herpes simplex virus type 1. *J Virol Methods*, **105**, 13-23.
- Radtke, K., Döhner, K. and Sodeik, B. (2006) Viral interactions with the cytoskeleton: A hitchhiker's guide to the cell. *Cellular Microbiology*, *Cell Microbiol*, **8**, 387-400.
- Reynolds, A.E., Fan, Y. and Baines, J.D. (2000) Characterization of the U(L)33 gene product of herpes simplex virus 1. *Virology*, **266**, 310-318.
- Reynolds, A.E., Wills, E.G., Roller, R.J., Ryckman, B.J. and Baines, J.D. (2002) Ultrastructural localization of the herpes simplex virus type 1 UL31, UL34, and US3 proteins suggests specific roles in primary envelopment and egress of nucleocapsids. *J Virol*, **76**, 8939-8952.
- Robertson, A.M. and Allan, V.J. (2000) Brefeldin A-dependent membrane tubule formation reconstituted in vitro is driven by a cell cycle-regulated microtubule motor. *Mol Biol Cell*, **11**, 941-955.
- Rodriguez, O.C., Schaefer, A.W., Mandato, C.A., Forscher, P., Bement, W.M. and Waterman-Storer, C.M. (2003) Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis. *Nat Cell Biol*, **5**, 599-609.
- Rogers, S.L., Tint, I.S., Fanapour, P.C. and Gelfand, V.I. (1997) Regulated bidirectional motility of melanophore pigment granules along microtubules in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 3720-3725.
- Roghi, C. and Allan, V.J. (1999) Dynamic association of cytoplasmic dynein heavy chain 1a with the Golgi apparatus and intermediate compartment. *J Cell Sci*, **112**, 4673-4685.

- Roizman, B. and Knipe, D.M. (2001) Herpes Simplex Viruses and Their Replication. In Knipe, D.M. and Howley, P.M. (eds.), *Fundamental Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 1123-1183.
- Roizman, B. and Pellet, P.E. (2001) The family herpesviridae: a brief introduction. In Knipe, D.M. and Howley, P.M. (eds.), *Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Vol. 1, pp. 2381-2397.
- Roller, R.J. and Roizman, B. (1992) The herpes simplex virus 1 RNA binding protein US11 is a virion component and associates with ribosomal 60S subunits. *J Virol*, **66**, 3624-3632.
- Sakato, M. and King, S.M. (2004) Design and regulation of the AAA+ microtubule motor dynein. *J Struct Biol*, **146**, 58-71.
- Sale, W.S., Fox, L.A. and Smith, E.F. (1993) Assays of axonemal dynein-driven motility. *Methods Cell Biol*, **39**, 89-104.
- Salmon, B., Cunningham, C., Davison, A.J., Harris, W.J. and Baines, J.D. (1998) The herpes simplex virus type 1 U(L)17 gene encodes virion tegument proteins that are required for cleavage and packaging of viral DNA. *J Virol*, **72**, 3779-3788.
- Schafer, D.A., Gill, S.R., Cooper, J.A., Heuser, J.E. and Schroer, T.A. (1994) Ultrastructural analysis of the dynactin complex: an actin-related protein is a component of a filament that resembles F-actin. *J Cell Biol*, **126**, 403-412.
- Schiff, P.B., Fant, J. and Horwitz, S.B. (1979) Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature*, **277**, 665-667.
- Schmitz, J.B., Albright, A.G., Kinchington, P.R. and Jenkins, F.J. (1995) The UL37 protein of herpes simplex virus type 1 is associated with the tegument of purified virions. *Virology*, **206**, 1055-1065.
- Schroer, T.A. (2004) Dynactin. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **20**, 759-779.
- Schroer, T.A., Schnapp, B.J., Reese, T.S. and Sheetz, M.P. (1988) The role of kinesin and other soluble factors in organelle movement along microtubules. *J Cell Biol*, **107**, 1785-1792.
- Schroer, T.A. and Sheetz, M.P. (1991) Two activators of microtubule-based vesicle transport. *J Cell Biol*, **115**, 1309-1318.
- Sciortino, M.-T., Suzuki, M., Taddeo, B. and Roizman, B. (2001) RNAs Extracted from Herpes Simplex Virus 1 Virions: Apparent Selectivity of Viral but Not Cellular RNAs Packaged in Virions. *J. Virol.*, **75**, 8105-8116.
- Shah, J.V., Flanagan, L.A., Janmey, P.A. and Leterrier, J.F. (2000) Bidirectional translocation of neurofilaments along microtubules mediated in part by dynein/dynactin. *Mol Biol Cell*, **11**, 3495-3508.
- Sheaffer, A.K., Newcomb, W.W., Gao, M., Yu, D., Weller, S.K., Brown, J.C. and Tenney, D.J. (2001) Herpes simplex virus DNA cleavage and packaging proteins associate with the procapsid prior to its maturation. *J Virol*, **75**, 687-698.
- Sims, P.J., Waggoner, A.S., Wang, C.H. and Hoffman, J.F. (1974) Studies on the mechanism by which cyanine dyes measure membrane potential in red blood cells and phosphatidylcholine vesicles. *Biochemistry*, **13**, 3315-3330.
- Smibert, C.A., Johnson, D.C. and Smiley, J.R. (1992) Identification and characterization of the virion-induced host shutoff product of herpes simplex virus gene UL41. *J Gen Virol*, **73** (Pt 2), 467-470.
- Smibert, C.A., Popova, B., Xiao, P., Capone, J.P. and Smiley, J.R. (1994) Herpes simplex virus VP16 forms a complex with the virion host shutoff protein vhs. *J Virol*, **68**, 2339-2346.
- Smith, G.A. and Enquist, L.W. (2002) Break Ins and Break Outs: Viral Interactions with the Cytoskeleton of Mammalian Cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **18**, 135-161.
- Smith, G.A., Gross, S.P. and Enquist, L.W. (2001) Herpesviruses use bidirectional fast-axonal transport to spread in sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 3466-3470.
- Smith, G.A., Pomeranz, L., Gross, S.P. and Enquist, L.W. (2004) Local modulation of plus-end transport targets herpesvirus entry and egress in sensory axons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 16034-16039.
- Smith, G.L., Murphy, B.J. and Law, M. (2003) Vaccinia virus motility. *Annu Rev Microbiol*, **57**, 323-342.
- Sodeik, B. (2000) Mechanisms of viral transport in the cytoplasm. *Trends Microbiol*, **8**, 465-472.
- Sodeik, B. (2002) Unchain my heart, baby let me go--the entry and intracellular transport of HIV. *J Cell Biol*, **159**, 393-395.
- Sodeik, B., Ebersold, M.W. and Helenius, A. (1997) Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J Cell Biol*, **136**, 1007-1021.
- Spear, P.G. (2004) Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. *Cell Microbiol*, **6**, 401-410.
- Stearns, T. (1995) Green fluorescent protein. The green revolution. *Curr Biol*, **5**, 262-264.
- Steffen, W., Hodgkinson, J.L. and Wiche, G. (1996) Immunogold localisation of the intermediate chain within the protein complex of cytoplasmic dynein. *J Struct Biol*, **117**, 227-235.
- Steiner, I. (1996) Human herpes viruses latent infection in the nervous system. *Immunol Rev*, **152**, 157-173.
- Steuer, E.R., Wordeman, L., Schroer, T.A. and Sheetz, M.P. (1990) Localization of cytoplasmic dynein to mitotic spindles and kinetochores. *Nature*, **345**, 266-268.
- Steven, A.C. and Spear, P.G. (1997) Herpesvirus capsid assembly and envelopment. In Chiu, W., Burnett, R. and Garcea, R. (eds.), *Structural Biology of Viruses*. Oxford University Press, New York, N.Y., pp. 312-351.
- Suikkanen, S., Aaltonen, T., Nevalainen, M., Valilehto, O., Lindholm, L., Vuento, M. and Vihinen-Ranta, M. (2003) Exploitation of microtubule cytoskeleton and dynein during parvoviral traffic toward the nucleus. *J Virol*, **77**, 10270-10279.
- Suomalainen, M., Nakano, M.Y., Keller, S., Boucke, K., Stidwill, R.P. and Greber, U.F. (1999) Microtubule-dependent plus- and minus end-directed motilities are competing processes for nuclear targeting of adenovirus. *J Cell Biol*, **144**, 657-672.
- Susalka, S.J., Hancock, W.O. and Pfister, K.K. (2000) Distinct cytoplasmic dynein complexes are transported by different mechanisms in axons. *Biochim Biophys Acta*, **1496**, 76-88.
- Tai, A.W., Chuang, J.Z. and Sung, C.H. (2001) Cytoplasmic dynein regulation by subunit heterogeneity and its role in apical transport. *J Cell Biol*, **153**, 1499-1509.

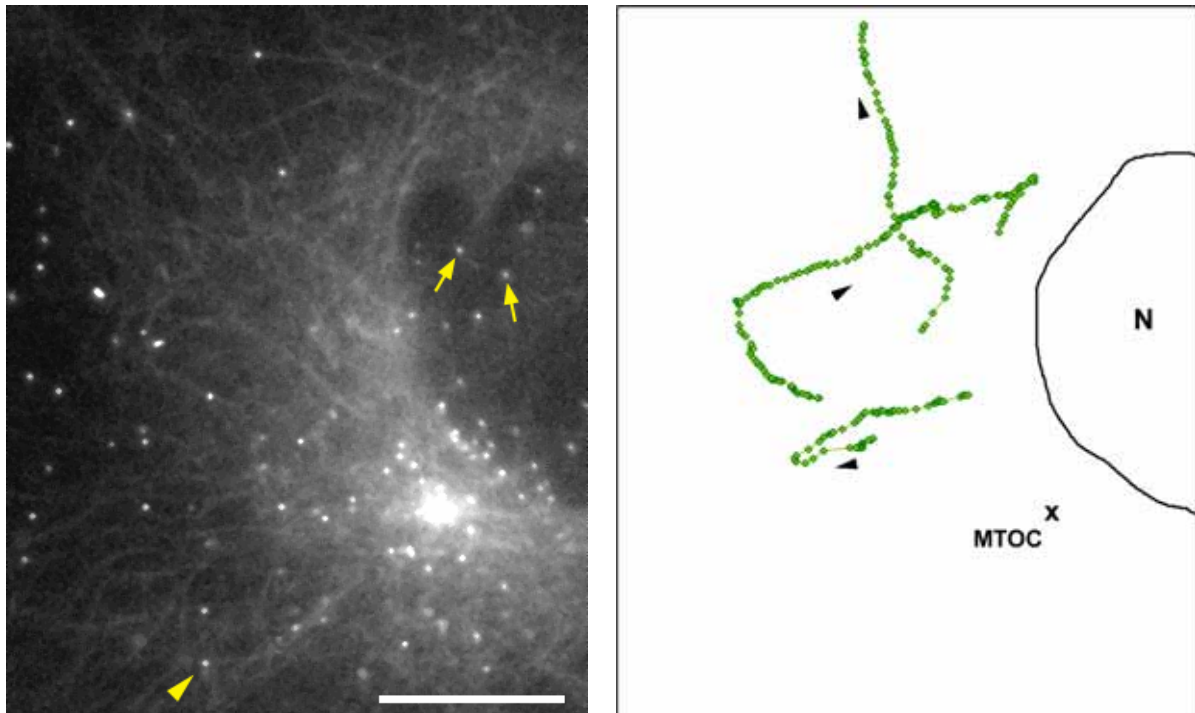
- Thurlow, J.K., Rixon, F.J., Murphy, M., Targett-Adams, P., Hughes, M. and Preston, V.G. (2005) The herpes simplex virus type 1 DNA packaging protein UL17 is a virion protein that is present in both the capsid and the tegument compartments. *J Virol*, **79**, 150-158.
- Tomishima, M.J. and Enquist, L.W. (2001) A conserved alpha-herpesvirus protein necessary for axonal localization of viral membrane proteins. *J Cell Biol*, **154**, 741-752.
- Tomishima, M.J. and Enquist, L.W. (2002) In vivo egress of an alphaherpesvirus from axons. *J Virol*, **76**, 8310-8317.
- Tomishima, M.J., Smith, G.A. and Enquist, L.W. (2001) Sorting and transport of alpha herpesviruses in axons. *Traffic*, **2**, 429-436.
- Topp, K.S., Bisla, K., Saks, N.D. and Lavail, J.H. (1996) Centripetal transport of herpes simplex virus in human retinal pigment epithelial cells in vitro. *Neuroscience*, **71**, 1133-1144.
- Topp, K.S., Meade, L.B. and LaVail, J.H. (1994) Microtubule polarity in the peripheral processes of trigeminal ganglion cells: relevance for the retrograde transport of herpes simplex virus. *J Neurosci*, **14**, 318-325.
- Trus, B.L., Cheng, N., Newcomb, W.W., Homa, F.L., Brown, J.C. and Steven, A.C. (2004) Structure and polymorphism of the UL6 portal protein of herpes simplex virus type 1. *J Virol*, **78**, 12668-12671.
- Trus, B.L., Homa, F.L., Booy, F.P., Newcomb, W.W., Thomsen, D.R., Cheng, N., Brown, J.C. and Steven, A.C. (1995) Herpes simplex virus capsids assembled in insect cells infected with recombinant baculoviruses: structural authenticity and localization of VP26. *J Virol*, **69**, 7362-7366.
- Tsien, R.Y. (1998) The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*, **67**, 509-544.
- Turcotte, S., Letellier, J. and Lippe, R. (2005) Herpes simplex virus type 1 capsids transit by the trans-Golgi network, where viral glycoproteins accumulate independently of capsid egress. *J Virol*, **79**, 8847-8860.
- Tynan, S.H., Purohit, A., Doxsey, S.J. and Vallee, R.B. (2000) Light intermediate chain 1 defines a functional subfraction of cytoplasmic dynein which binds to pericentrin. *J Biol Chem*, **275**, 32763-32768.
- Urrutia, R., McNiven, M.A., Albanesi, J.P., Murphy, D.B. and Kachar, B. (1991) Purified kinesin promotes vesicle motility and induces active sliding between microtubules in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 6701-6705.
- Urrutia, R., Murphy, D.B., Kachar, B. and McNiven, M.A. (1993) Kinesin-mediated vesicular transport in a biochemically defined assay. *Methods Cell Biol*, **39**, 253-266.
- Vale, R.D. (2000) AAA proteins. Lords of the ring. *J Cell Biol*, **150**, F13-19.
- Vale, R.D. (2003) The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell*, **112**, 467-480.
- Vale, R.D., Reese, T.S. and Sheetz, M.P. (1985a) Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell*, **42**, 39-50.
- Vale, R.D., Schnapp, B.J., Mitchison, T., Steuer, E., Reese, T.S. and Sheetz, M.P. (1985b) Different axoplasmic proteins generate movement in opposite directions along microtubules in vitro. *Cell*, **43**, 623-632.
- Vale, R.D., Schnapp, B.J., Reese, T.S. and Sheetz, M.P. (1985c) Organelle, bead, and microtubule translocations promoted by soluble factors from the squid giant axon. *Cell*, **40**, 559-569.
- Vallee, R.B., Williams, J.C., Varma, D. and Barnhart, L.E. (2004) Dynein: An ancient motor protein involved in multiple modes of transport. *J Neurobiol*, **58**, 189-200.
- van Genderen, I.L., Brandimarti, R., Torrisi, M.R., Campadelli, G. and van Meer, G. (1994) The phospholipid composition of extracellular herpes simplex virions differs from that of host cell nuclei. *Virology*, **200**, 831-836.
- Vaughan, K.T. and Vallee, R.B. (1995) Cytoplasmic dynein binds dynactin through a direct interaction between the intermediate chains and p150Glued. *J Cell Biol*, **131**, 1507-1516.
- Vaughan, P.S., Miura, P., Henderson, M., Byrne, B. and Vaughan, K.T. (2002) A role for regulated binding of p150(Glued) to microtubule plus ends in organelle transport. *J Cell Biol*, **158**, 305-319.
- Vigers, G.P., Coue, M. and McIntosh, J.R. (1988) Fluorescent microtubules break up under illumination. *J Cell Biol*, **107**, 1011-1024.
- Vittone, V., Diefenbach, E., Triffett, D., Douglas, M.W., Cunningham, A.L. and Diefenbach, R.J. (2005) Determination of interactions between tegument proteins of herpes simplex virus type 1. *J Virol*, **79**, 9566-9571.
- Vrabec, J.T. and Alford, R.L. (2004) Quantitative analysis of herpes simplex virus in cranial nerve ganglia. *J Neurovirol*, **10**, 216-222.
- Wagner, M., Ruzsics, Z. and Koszinowski, U.H. (2002) Herpesvirus genetics has come of age. *Trends Microbiol*, **10**, 318-324.
- Wagner, O.I., Ascano, J., Tokito, M., Letierrier, J.F., Janmey, P.A. and Holzbaur, E.L. (2004) The interaction of neurofilaments with the microtubule motor cytoplasmic dynein. *Mol Biol Cell*, **15**, 5092-5100.
- Wang, Z. and Sheetz, M.P. (2000) The C-terminus of tubulin increases cytoplasmic dynein and kinesin processivity. *Biophys J*, **78**, 1955-1964.
- Waterman-Storer, C.M., Bonifacio, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. and Yamada, K.M. (1998) Microtubule-organelle motility assays. In Wiley, J. (ed.), *Current Protocols in Cell Biology*, New York, p. Unit 13.11.
- Waterman-Storer, C.M., Karki, S. and Holzbaur, E.L. (1995) The p150Glued component of the dynactin complex binds to both microtubules and the actin-related protein centractin (Arp-1). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 1634-1638.
- Weinheimer, S.P., Boyd, B.A., Durham, S.K., Resnick, J.L. and O'Boyle, D.R., 2nd. (1992) Deletion of the VP16 open reading frame of herpes simplex virus type 1. *J Virol*, **66**, 258-269.
- Wessel and Flügge. (1984) A method for quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Analytical Biochemistry*, **138**, 141-143.

- Wessendorf, M.W. and Brelje, T.C. (1992) Which fluorophore is brightest? A comparison of the staining obtained using fluorescein, tetramethylrhodamine, lissamine rhodamine, Texas red, and cyanine 3.18. *Histochemistry*, **98**, 81-85.
- White, C.A., Stow, N.D., Patel, A.H., Hughes, M. and Preston, V.G. (2003) Herpes simplex virus type 1 portal protein UL6 interacts with the putative terminase subunits UL15 and UL28. *J Virol*, **77**, 6351-6358.
- Whitley, R.J., Kimberlin, D.W. and Roizman, B. (1998) Herpes simplex viruses. *Clin Infect Dis*, **26**, 541-553.
- Whittaker, G.R., Riggio, M.P., Halliburton, I.W., Killington, R.A., Allen, G.P. and Meredith, D.M. (1991) Antigenic and protein sequence homology between VP13/14, a herpes simplex virus type 1 tegument protein, and gp10, a glycoprotein of equine herpesvirus 1 and 4. *J Virol*, **65**, 2320-2326.
- Willard, M. (2002) Rapid Directional Translocations in Virus Replication. *J Virol*, **76**, 5220-5232.
- Wilson, L. and Jordan, M.A. (1995) Microtubule dynamics: taking aim at a moving target. *Chem Biol*, **2**, 569-573.
- Wingfield, P.T., Stahl, S.J., Thomsen, D.R., Homa, F.L., Booy, F.P., Trus, B.L. and Steven, A.C. (1997) Hexon-only binding of VP26 reflects differences between the hexon and penton conformations of VP5, the major capsid protein of herpes simplex virus. *J Virol*, **71**, 8955-8961.
- Wisner, T.W. and Johnson, D.C. (2004) Redistribution of cellular and herpes simplex virus proteins from the trans-golgi network to cell junctions without enveloped capsids. *J Virol*, **78**, 11519-11535.
- Wittmann, T. and Hyman, T. (1999) Recombinant p50/dynamitin as a tool to examine the role of dynactin in intracellular processes. *Methods Cell Biol*, **61**, 137-143.
- Wolfstein, A., Nagel, C.H., Radtke, K., Döhner, K. and Allan, J.V. (2006) The inner tegument promotes herpes simplex virus capsid motility along microtubules *in vitro*. *Traffic*, **7**, 227-237.
- Wysocka, J. and Herr, W. (2003) The herpes simplex virus VP16-induced complex: the makings of a regulatory switch. *Trends Biochem Sci*, **28**, 294-304.
- Xu, Y., Takeda, S., Nakata, T., Noda, Y., Tanaka, Y. and Hirokawa, N. (2002) Role of KIFC3 motor protein in Golgi positioning and integration. *J Cell Biol*, **158**, 293-303.
- Yang, T.T., Cheng, L. and Kain, S.R. (1996) Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein. *Nucleic Acids Res*, **24**, 4592-4593.
- Ye, G.J., Vaughan, K.T., Vallee, R.B. and Roizman, B. (2000) The herpes simplex virus 1 U(L)34 protein interacts with a cytoplasmic dynein intermediate chain and targets nuclear membrane. *J Virol*, **74**, 1355-1363.
- Young, A., Dichtenberg, J.B., Purohit, A., Tuft, R. and Doxsey, S.J. (2000) Cytoplasmic dynein-mediated assembly of pericentriolar and gamma tubulin onto centrosomes. *Mol Biol Cell*, **11**, 2047-2056.
- Zelius, B., Stewart, R. and Ross, J. (1996) The virion host shutoff protein of herpes simplex virus type 1: Messenger ribonucleolytic activity *in vitro*. *J Virol*, **70**, 2411-2419.
- Zhang, Y. and McKnight, J.L. (1993) Herpes simplex virus type 1 UL46 and UL47 deletion mutants lack VP11 and VP12 or VP13 and VP14, respectively, and exhibit altered viral thymidine kinase expression. *J Virol*, **67**, 1482-1492.
- Zhang, Y., Sirko, D.A. and McKnight, J.L. (1991) Role of herpes simplex virus type 1 UL46 and UL47 in alpha TIF-mediated transcriptional induction: characterization of three viral deletion mutants. *J Virol*, **65**, 829-841.
- Zhou, Z.H., Chen, D.H., Jakana, J., Rixon, F.J. and Chiu, W. (1999) Visualization of tegument-capsid interactions and DNA in intact herpes simplex virus type 1 virions. *J Virol*, **73**, 3210-3218.
- Zhou, Z.H., He, J., Jakana, J., Tatman, J.D., Rixon, F.J. and Chiu, W. (1995) Assembly of VP26 in herpes simplex virus-1 inferred from structures of wild-type and recombinant capsids. *Nat Struct Biol*, **2**, 1026-1030.

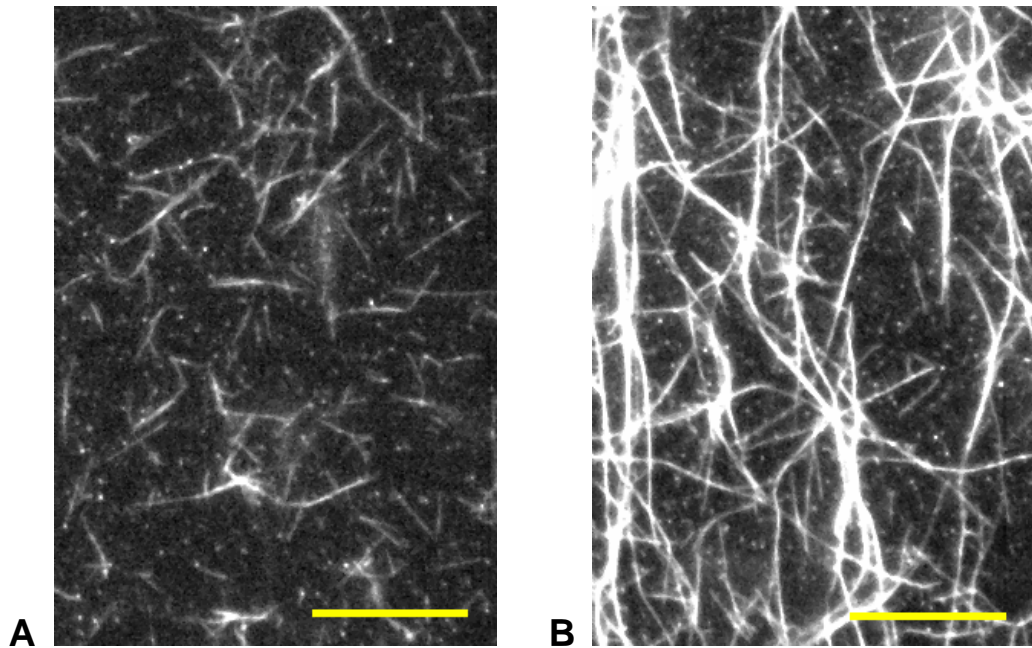
8 Anhang

8.1 Filme

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Filme befinden sich auf der beigelegten CD als QuickTime Movie-Dateien. Die Moviedateien werden am besten von der lokalen Festplatte aus gestartet. Die Filme 4 bis 8 entsprechen den Videos V1 bis V4 aus Wolfstein et al. (2006).

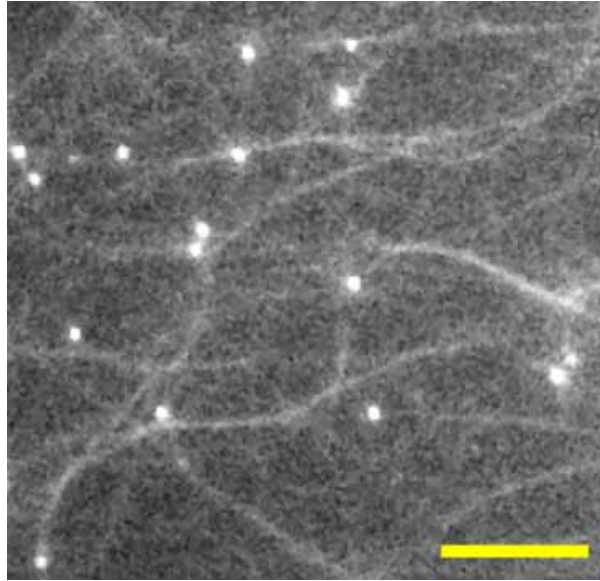


Film 1. Kapsidtransport entlang von MT *in vivo*. Hierfür wurden PtK₂-Zellen mit HSV1-GFPVP26 infiziert. Die verwendete Zelllinie war mit YFP-Tubulin stabil transfiziert, so dass die MT zusammen mit den eintretenden HSV1-GFPVP26-Partikeln nach Anregung durch den GFP-Filter untersucht werden konnten. Die grauen Filamente sind die MT, welche am MTOC (x) ihren Ursprung hatten. Die HSV1-GFPVP26-Partikel bewegten sich 2 h nach Inokulation bidirektional bis zu 28 μm entlang der MT, oszillierten in Bereichen von maximal 3 μm (Pfeilspitze) oder waren stationär am Nukleus (N, gelbe Pfeile) und MTOC. Der gezeigte Film mit einer Länge von 321 s wurde mit einer zeitlichen Auflösung von 1,1 s pro Bild aufgenommen. Skalierungsbalken 10 μm . Die Bahnen von drei HSV1-GFPVP26-Partikeln sind im rechten Bild dargestellt. Die Pfeilspitzen zeigen in ihre Bewegungsrichtungen.



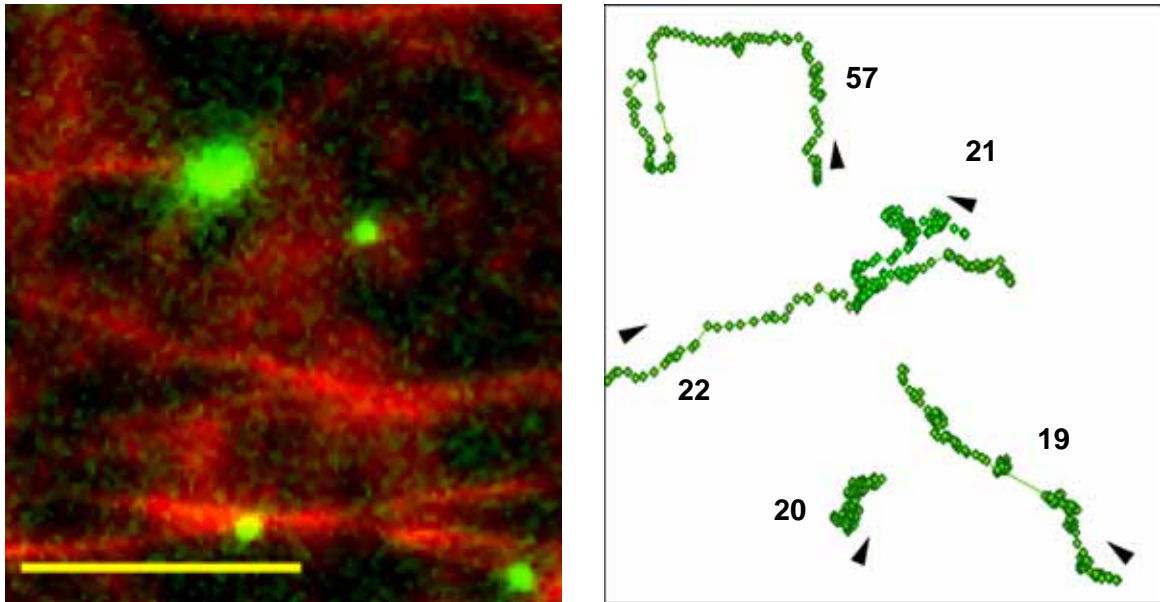
Film 2. Die Beschichtung der Glasoberfläche wirkt sich auf die Immobilität der MT aus.

Die Glasoberfläche wurde entweder mit 5 mg/ml BSA (A) oder 5 mg/ml Diethylaminoethyl (DEAE)-Dextran (B) beschichtet. Die angehefteten Cy3-MT wurden für 100 s und mit einer zeitlichen Auflösung von 1 s mit den Olympus XI70 System und der Imago CCD Kamera mit 640 x 480 Pixel (vgl. Kap. 4.1.2, S.23; Filterblock 3) aufgezeichnet. Die mit 10 mg/ml BSA angehefteten Cy3-MT waren schwächer markiert als die DEAE angehefteten MT und schwangen und glitten über die Oberfläche (A). Die DEAE-angehefteten MT waren weitgehend stationär. Sie waren länger und erschienen vermutlich durch Quervernetzung der MT unterschiedlich stark markiert. Skalierungsbalken: 10 μm .



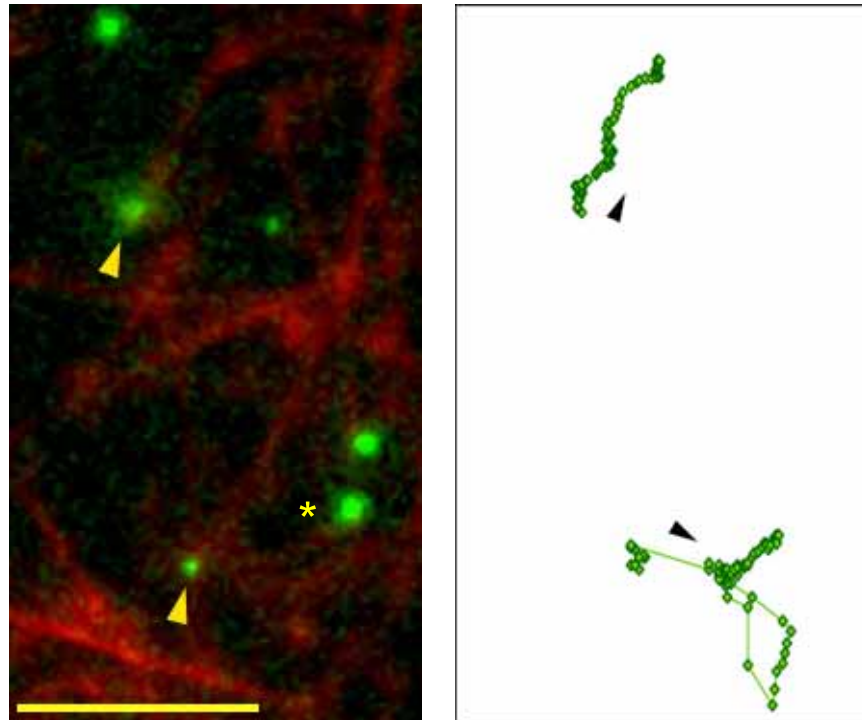
Film 3. Eine sehr langsame Kapsidbewegung ($< 0,02 \mu\text{m/s}$) von HSV1-GFPVP26-Kapsiden wurde mit Säugercytosol aus Rattenleber *in vitro* beobachtet.

Die HSV1-GFPVP26-Kapside (weiße Punkte) wurden aus extrazellulären Virionen nach Extraktion mit 1% TX-100 und 0,1 M KCl gewonnen. Sie wurden in Cytosol mit einer Proteinkonzentration von 57,0 mg/ml resuspendiert und in die mikroskopische Beobachtungskammer, die mit Cy3-MT (weiße Filamente) beschichtet wurde, perfundiert. Der gezeigte Film mit einer Länge von 1000 s (ca. 17 min) wurde mit einer zeitlichen Auflösung von 10 s pro Bild unter Verwendung des GFP-Filtersatzes und einem 100x Objektiv aufgenommen (vgl. Kap. 4.1.2, S.23; Leica DM IBRE System). Bildausschnitt $30,6 \mu\text{m} \times 29,3 \mu\text{m}$. Skalierungsbalken (gelb): $5 \mu\text{m}$.



Film 4. Der HSV1-GFPVP26-Kapsidtransport entlang von MT wurde *in vitro* rekonstruiert.

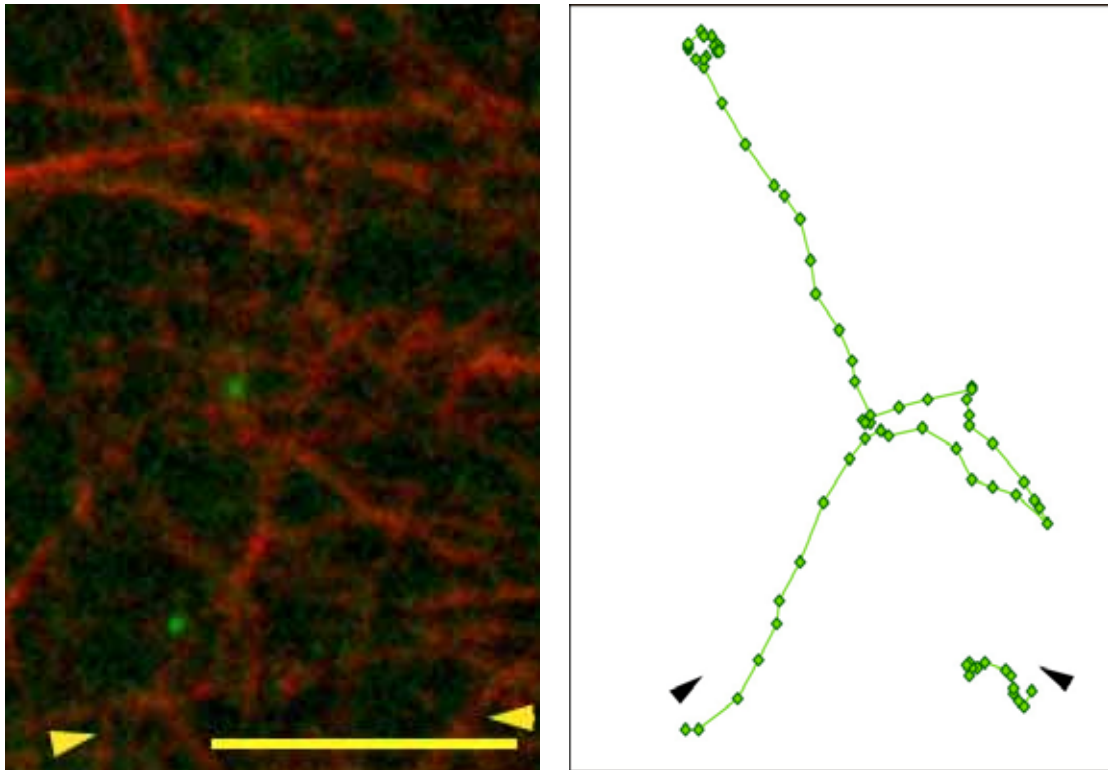
In diesem Film (links) wird die Bewegung der Partikel 19 bis 22 und 57 gezeigt (vgl. Abb. 5.17, S.78; oberer Kasten). Die HSV1-GFPVP26-Kapside (grüne Punkte) wurden aus extrazellulären Virionen nach Extraktion mit 1% TX-100 und 1 M KCl gewonnen. Sie wurden in Cytosol mit einer Proteinkonzentration von 2,5 mg/ml resuspendiert und in die mikroskopische Beobachtungskammer, die mit Cy3-MT (rot) beschichtet wurde, perfundiert. Bei dem Leica DM IBRE System (vgl. Kap. 4.1.2, S.23) unter Verwendung des 100x Objektivs betrug der mit der Kamera aufgenommene Bildausschnitt $48\ \mu\text{m} \times 65\ \mu\text{m}$. Der gezeigte Film mit einer Länge von 320 s wurde mit einer zeitlichen Auflösung von 1,6 s pro Bild unter Verwendung des GFP-Filtersatzes aufgenommen. Die Bildsequenz wurde einem Bild von den Cy3-MT überlagert (rot). Die Bahnen der Kapside in diesem Film sind im rechten Bild dargestellt. Die Pfeilspitzen zeigen in ihre Bewegungsrichtungen. Skalierungsbalken (gelb): $5\ \mu\text{m}$. Entspricht Video V1 aus Wolfstein et al. (2006).



Film 5. Variation der HSV1-GFPVP26 Kapsid Geschwindigkeit entlang von MT *in vitro*

HSV1-GFPVP26-Kapside zeigten verschiedene Verhaltensweisen im *in vitro* Testsystem. Der Stern markiert ein stationäres am MT gebundenes Kapsid. Dieser Film zeigt ein Beispiel für ein schnelles Kapsid (untere Pfeilspitze), das sich entlang eines Cy3-markierten MT mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von $0,13 \pm 0,02 \mu\text{m/s}$ und einer maximalen Geschwindigkeit von $1 \mu\text{m/s}$ bewegte, und ein anderes Beispiel für einen langsamen Transport entlang eines Cy3-markierten MT (obere Pfeilspitze) mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von $0,10 \pm 0,00 \mu\text{m/s}$ und einer maximalen Geschwindigkeit von $0,26 \mu\text{m/s}$.

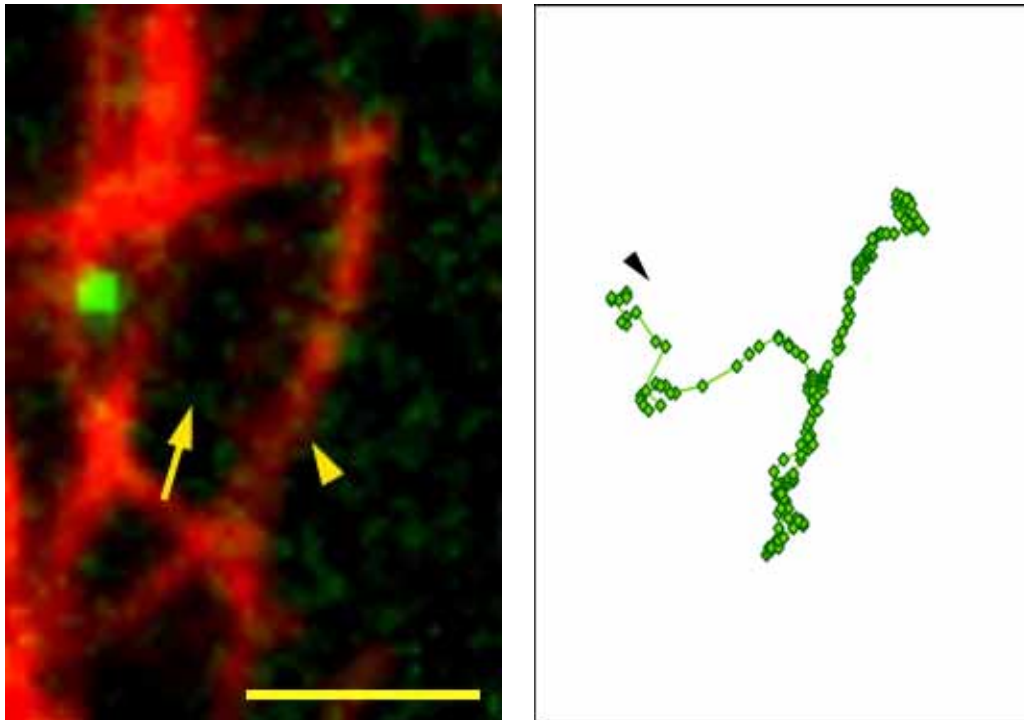
Die HSV1-GFPVP26-Kapside (grüne Punkte) wurden aus extrazellulären Virionen nach Extraktion mit 1% Triton X-100 und 1 M KCl gewonnen. Sie wurden in Cytosol der Proteinkonzentration von 10 mg/ml resuspendiert und in einer mikroskopischen Beobachtungskammer, die mit Cy3-markierten MT (rot) beschichtet wurde, perfundiert. Der Ausschnitt wurde mit dem 100x Objektiv für 155 s und einer zeitlichen Auflösung von 1,6 s pro Bild mit dem Leica DM IBRE System und einem GFP-Filter aufgenommen. Die Bildfolge der GFP Signale wurde nachfolgend einem Bild der Cy3-MT überlagert. Die Bahnen der Kapside in diesem Film sind im rechten Bild dargestellt. Die Pfeilspitzen zeigen in ihre Bewegungsrichtung. Skalierungsbalken (gelb): $5 \mu\text{m}$. Entspricht Video V2 aus Wolfstein et al. (2006).



Film 6. Langstreckentransport eines HSV1-GFPVP26 Kapsids entlang von MT *in vitro*

Dieser Film (linkes Bild) zeigt ein Beispiel für einen schnellen Transport, der im unteren linken Teil des Films startete (linke Pfeilspitze) und mit einer mittleren Geschwindigkeit von $0,31 \pm 0,21 \mu\text{m/s}$ eine Strecke von $30,5 \mu\text{m}$ zurücklegte. Ein anderer kurzer Transport begann im unteren rechten Teil des Films (rechte Pfeilspitze).

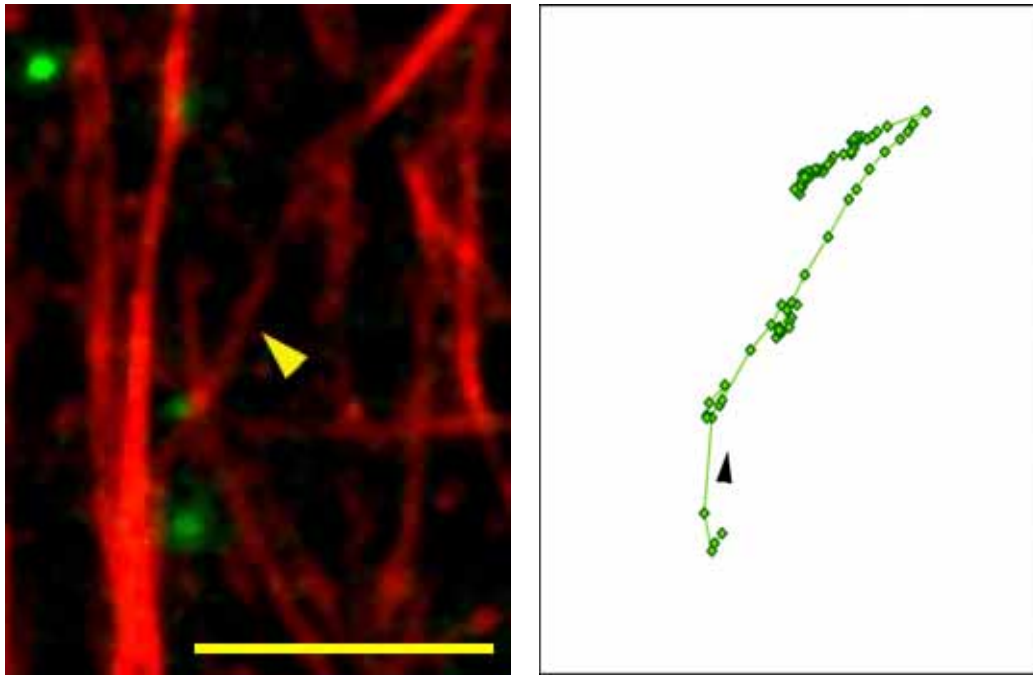
HSV1-GFPVP26-Kapside (grüne Punkte) wurden aus extrazellulären Virionen nach Extraktion mit 1% Triton X-100 und 1 M KCl gewonnen. Sie wurden in Cytosol der Proteinkonzentration von 5 mg/ml resuspendiert und in eine mikroskopische Beobachtungskammer perfundiert, die mit Cy3 markierten MT (rot) beschichtet war. Der Ausschnitt wurde mit einem 100x Objektiv für 128 s und einer zeitlichen Auflösung von 1,6 s pro Bild mit dem Leica DM IBRE System und einem GFP-Filter aufgenommen. Die Bildfolge der GFP Signale wurde nachfolgend einem Bild der Cy3-MT überlagert. Die Bahnen der Kapside in diesem Film sind im rechten Bild dargestellt. Die Pfeilspitzen zeigen in ihre Bewegungsrichtung. Skalierungsbalken (gelb): $5 \mu\text{m}$. Entspricht Video V3 aus Wolfstein et al. (2006).



Film 7. HSV1-GFPVP26 Kapsidtransport entlang von Cy3- und unmarkierten MT *in vitro*.

Dieser Film (linkes Bild) zeigt ein Beispiel für einen HSV1-GFPVP26 Kapsidtransport entlang eines Cy3-MT (gelbe Pfeilspitze) und eines unmarkierten MT (gelber Pfeil). Das Kapsid wechselt dabei von einem unmarkierten MT zu einem Cy3-MT und stoppt später, bevor es die Richtung auf dem Cy3-MT wechselt.

Die HSV1-GFPVP26-Kapside (grüne Punkte) wurden aus extrazellulären Virionen nach Extraktion mit 1% Triton X-100 und 1 M KCl gewonnen. Sie wurden in Cytosol der Proteinkonzentration von 2,5 mg/ml resuspendiert und in eine mikroskopische Beobachtungskammer, die mit Cy3-markierten MT (rot) beschichtet worden war, perfundiert. Der Ausschnitt wurde mit einem 100x Objektiv für 304 s und einer zeitlichen Auflösung von 1,6 s pro Bild mit dem Leica DM IBRE System (vgl. Kap. 4.1.2, S.23) und einem GFP-Filter (vgl. Kap, Filterblock 1) aufgenommen. Die Bildfolge der GFP Signale wurde nachfolgend einem Bild der Cy3-MT überlagert. Skalierungsbalken (gelb): 5 μm . Die Bahn des Kapsids in diesem Film ist im rechten Bild dargestellt. Die Pfeilspitze deutet in die Bewegungsrichtung. Entspricht Video V4 aus Wolfstein et al. (2006).



Film 8. Die Bewegung der HSV1-GFPVP26 Kapside entlang der MT *in vitro* wird häufig durch Pausen unterbrochen.

HSV1-GFPVP26 Kapside zeigten verschiedene Verhaltensweisen im *in vitro* Testsystem. Dieser Film (linkes Bild) zeigt ein Beispiel für einen HSV1-GFPVP26 Kapsidtransport mit einer 6 s-langen Pause zwischen zwei Läufen (gelbe Pfeilspitze). Dieses Kapsid bewegte sich mit einer mittleren Geschwindigkeit von $0,15 \pm 0,02 \mu\text{m/s}$ und einer maximalen Geschwindigkeit von $1 \mu\text{m/s}$ entlang einer Strecke von $17,7 \mu\text{m}$.

Die HSV1-GFPVP26-Kapside (grüne Punkte) wurden aus extrazellulären Virionen nach Extraktion mit 1% Triton X-100 und 1 M KCl gewonnen. Sie wurden in Cytosol der Proteinkonzentration von 5 mg/ml resuspendiert und in einer mikroskopischen Beobachtungskammer, die mit Cy3-markierten MT (rot) beschichtet worden war, perfundiert. Der Ausschnitt wurde mit dem 100x Objektiv für 166 s und einer zeitlichen Auflösung von 1,6 s pro Bild mit dem Leica DM IBRE System und einem GFP-Filter (vgl. Kap. 4.1.2, S.23; Filterblock 1) aufgenommen. Die Bildfolge der GFP-Signale wurde anschließend einem Bild der Cy3-MT überlagert. Skalierungsbalken (gelb): $5 \mu\text{m}$. Die Bahn des Kapsids in diesem Film ist im rechten Bild dargestellt. Die Pfeilspitze deutet in die Bewegungsrichtung. Entspricht Video V5 aus Wolfstein et al. (2006).

8.2 Ergänzende Tabellen

Tabelle 8.1: Position der Banden von nukleären HSV1 Kapsiden in einem linearen Saccharosegradienten mit 20 bis 50% (v/w) bzw. 18,7 bis 43,5% (w/w) Saccharose nach 80 min Zentrifugation im SW40-Rotor. Die Positionen wurden visuell über die Lichtstreuung bestimmt. In der Röhrenmitte betrug die Konzentration 31,1% (w/w). Für HSV1-GFPVP26 sind die Standardabweichungen angegeben. Der Wert in Klammern gibt die Anzahl der Experimente an.

Kapside	wt	HSV1- Δ VP26	HSV1-GFPVP26
	% (w/w)	% (w/w)	% (w/w)
A	26,0 (1)	24,5 (1)	25,6 \pm 0,7 (3)
B	27,3 (1)	26,0 (1)	27,2 \pm 0,8 (3)
C	31,6 (1)	29,6 (1)	31,3 \pm 1,0 (3)

Tabelle 8.2: ^{35}S -Methionin/Cystein markierte Kapsidproteine von HSV1. Der Schwefelgehalt der einzelnen Kapsidproteine ergibt sich aus dem Cystein bzw. Methionin-Anteil an den Aminosäuren. Der Anteil an ^{35}S für den verwendeten Markierungs-Mix war für Cystein 70/85 und für Methionin 15/85.

	Kopien/ Kapsid	Cystein /Protein	Methionin /Protein	^{35}S -Cystein /Protein	^{35}S -Methionin /Protein	^{35}S /Protein	^{35}S /Kapsid	relativer ^{35}S -Anteil
VP5	960	25	30	20,59	5,29	25,88	24847,06	67
VP19c	320	12	8	9,88	1,41	11,29	3614,12	10
VP22a	1153*	4	6	3,29	1,06	4,35	5018,94	13
VP23	640	4	5	3,29	0,88	4,18	2672,94	7
VP24	147	3	4	2,47	0,71	3,18	466,94	1
VP26	900	0	4	0,00	0,71	0,71	635,29	2
VP1-3	110-150	24	36	19,76	6,35	26,12	2611,76	~7

(Newcomb et al., 1993)

* +/- 169 Kopien

** 900 , 300 - 450 für HSV1-GFPVP26 – Kapside (P. Desai, persönliche Mitteilung)

8.3 Programme

Die in dieser Arbeit verwendeten Visual Basic Programme (VBA) sind auf der beigefügten CD im Ordner Programme enthalten. Das Programm **Stereologie.bas** diente zur stereologischen Bestimmung der MT-Länge (vgl. Abb. 4.6; Kap. 4.2.5, S.45). Das Programm **Bahnanalyse.bas** wurde zur Analyse der Kapsidbahnen verwendet (vgl. Tabellen 5.6 und 5.7; Kap. 5.3.5, S. 82).

Die Visual Basic (VBA) Programme (Programmname.bas) werden in *Microsoft Excel 2000* oder *XP* implementiert: Der **Visual Basic-Editor** befindet sich im Menue **Extras** im Unterpunkt **Makro**. Dort werden die Programme unter **Datei** mit dem Befehl **Datei importieren** importiert. Die Programme werden dann im Ordner **Module** im **Projekt Explorer** angezeigt. Durch Doppelklicken wird der Quellcode geöffnet. Vor dem Starten des Programms wird der Curser in das Unterprogramm **Sup HP** des Quellcodes geklickt. Das Programm wird dann im Menue **Ausführen** mit **Sub/UserForm ausführen** gestartet.

Einige Unterprogramme sind hier in Auszügen angegeben.

Stereologie

Das Stereologie Programm **stereologie.bas** wird auf die Excel-Dateien **m1.xls, m2.xls... mtM.xls**, die in den Ordner unter **C:\ordnername\kammerX (X=1, 2, ..., N)** gespeichert wurden, angewendet. Die Exceldateien **m1.xls, m2.xls... mtM.xls** enthalten die Grauwerte der Bilder, die von den mikroskopischen Perfusionskammern **kammerX (X=1, 2, ..., N)** aufgenommen wurden. Eine Exceldatei **mtM.xls** enthält dabei die Grauwerte eines Bildes, die aufgrund der beschränkten Tabellenbreite (256 Zellen) auf drei Excel-Tabellen aufgeteilt wurden.

Sub HP()

ordnername = "Ordnername" Ordnername wird durch den Namen des Ordners ersetzt

pi = 3.141592654

i_max = 582

j_max = 256

schwelle = 120

For ordner = 1 To N

N = Anzahl der Perfusionskammern`

For expnr = 1 To M

M = Anzahl der Tabellen mit den Grauwerten der Bilder

datei = "mt" & expnr & ".xls"

kammer = "kammer" & ordner

Workbooks.Open FileName:= _

"C:\ & ordnername & "\ & kammer & "\ & datei

m = 3

l = 0

For l = 1 To 3

Sheets("tabelle" & l).Select

einlesen

For schleife = 1 To 3

m = m + 1

Sheets.Add

```

    Sheets("sheet" & m).Select
    schreiben
    stereogitter
    winkel(l, m) = dalpha * 180 / pi
    schnittpunkte(l, m) = zaehler
    zaehler = 0
    Next schleife
  Next l
  Sheets.Add
  Sheets("sheet" & m + 1).Select
  tabelle
  ActiveWorkbook.SaveAs FileName:= _
    "C:\" & ordnername & "\" & kammer & "\mt-Auswertung" & expnr
  ActiveWorkbook.Close FileName:= _
    "C:\" & ordnername & "\" & kammer & "\mt-Auswertung" & expnr
  Next expnr
Next ordner
End Sub

```

Die Ergebnisse mit der Anzahl der Kreuzungspunkten des Gitters und den MT werden dann in den Excel-Tabellen **mt-Auswertung1 ... mt-AuswertungM** ausgegeben.

Unterprogramm das ein Sterologiegitter mit **D = 55 Pixel** um den Winkel **Alpha** dreht und zeichnet:

```

Sub stereogitter()
  gitterlinien_x = 5
  gitterlinien_y = 10
  dalpha = 0

```

Randomize

dalpha = Rnd * pi / 2

Bestimmung eines Zufallswinkels um den das Stereologiegitter gedreht werden soll:

Rnd ist eine Zufallszahl zwischen 0 und 1

Horizontal

schritt = 55

j = -3 * schritt

For n = 1 To gitterlinien_x + 10

For i = -200 To i_max + 100

gitterdrehen

gitterzeichnen

Next i

j = j + schritt

Next n

Horizontale Gitterweite D = 55 Pixel

Vertikal

schritt = 55

i = -3 * schritt

For n = 1 To gitterlinien_y + 10

For j = -200 To j_max + 200

gitterdrehen

gitterzeichnen

Next j

i = i + schritt

Next n

End Sub

Vertikale Gitterweite D = 55 Pixel

Programm zur Analyse der Kapsidbahnen

Dieses Programm wird in die Exceldatei importiert (siehe oben) und auf die aktive Exceltabelle angewendet. Diese enthält in der ersten Spalte die Partikelnummer, in der zweiten die in zwei aufeinanderfolgenden Bildern zurückgelegte Strecke und in der Dritten das Zeitintervall. Die erste Zeile enthält die Beschriftung der Spalten. Die Daten hierfür wurden aus dem Programm MetaMorph, das zur Aufzeichnung der Partikelbahnen verwendet wurde, über einen Dynamischen Datenaustausch (DDE) importiert.

Unterprogramm zur Bestimmung der Laufstrecken, Pausen und Bahnlänge eines Kapsids:

```
Sub runs_and_stops() (run lenght)
nullenzaehler = 0
For i = 2 To i_max - 1
  If ds(i) > 0 Then
    run_length(j) = run_length(j) + ds(i)      Laufstreckenlänge
    If track_nr(i) <> track_nr(i + 1) And ds(i + 1) <> 0 Then j = j + 1
    If ds(i + 1) = 0 Then j = j + 1
  End If
  If ds(i) = 0 And dt(i) <> 0 Then
    nullenzaehler = nullenzaehler + 1
    stop_time(k) = stop_time(k) + dt(i)      Pausenlänge
    If track_nr(i) <> track_nr(i + 1) And ds(i + 1) = 0 Then k = k + 1
    If ds(i + 1) <> 0 Then k = k + 1
  End If
Next i
j_max = j
stops = k - 1
End Sub
```

```
Sub path_length()
For i = 2 To i_max
  path(k) = path(k) + ds(i)      Bahnlänge
  If track_nr(i) <> track_nr(i + 1) Then k = k + 1
Next i
k_max = k
If path(k_max) = 0 Then k_max = k - 1
End Sub
```

8.4 Lebenslauf

Ausbildung

1991	Abitur am Ratsgymnasium Stadthagen in Stadthagen
1991-1998	Studium der Chemie an der Technischen Universität Darmstadt
1992	Vordiplom in den Fächern Anorganische Chemie, Physik, Organische Chemie und Physikalische Chemie
1998	Diplomprüfung in den Fächern Biochemie, Organische Chemie, Physikalische Chemie und Chemische Technologie Diplomarbeit am Institut für Biochemie unter der Leitung von Dr. Michael Kemme in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H.G. Gassen zu dem Thema „Charakterisierung von Prokallikrein-aktivierenden Proteasen aus humanem Speichel“

Doktorarbeit

1998 - 2003	Doktorand an der Medizinischen Hochschule Hannover am Zentrum Biochemie in der Arbeitsgruppe von HD Dr. Beate Sodeik
Seit 2003	Doktorand an der Medizinischen Hochschule Hannover am Institut für Virologie in der Arbeitsgruppe von HD Dr. Beate Sodeik
01.09.1998 bis 31.08.2004	Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Medizinischen Hochschule Hannover in der Arbeitsgruppe von HD Dr. Beate Sodeik

Auslandsaufenthalte

August/September 2000	Aufenthalt im Rahmen einer Kollaboration im Labor von Dr Viktoria J. Allan im Dept. for Biochemistry, School of Biological Sciences, University of Manchester, UK
-----------------------	---

8.5 Wissenschaftliche Beiträge

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

A Wolfstein, CH Nagel, K Radtke, K Döhner, V Allan & B Sodeik (2006).
The inner tegument promotes herpes simplex virus capsid motility along microtubules *in vitro*
Traffic, 7: 227-237

K Döhner, **A Wolfstein**, U Prank, C Echeverri, D Dujardin, R Valle & B Sodeik (2002).
Function of dynein and dynactin in Herpes simplex virus capsid transport
Molecular Biology of the Cell 13: 2795-2809

Manuskript in Vorbereitung:

K Döhner, F Büttner, **A Wolfstein**, U Prank, H Ewers & B Sodeik.
Plus- and minus-end directed microtubule transport during the cell entry of herpes simplex virus type 1

Poster bei wissenschaftlichen Fachkongressen

Der präsentierende Autor/in ist unterstrichen

Gordon Conference 2001

A Wolfstein, K Döhner, U Prank, C Echeverri, P Desai, R Vallee & B Sodeik
Dynein-mediated transport of HSV1 capsids to the nucleus

Annual Meeting of the German Society of Virology, 2001, Dresden

K Döhner, **A Wolfstein**, U Prank, C Echeverri, P Desai, R Vallee & B Sodeik
Dynein-mediated transport of HSV1 capsids to the nucleus

26th International Herpesvirus Workshop, 2001, Regensburg

A Wolfstein, K Döhner, P Keller, VJ Allan & B Sodeik
In vivo and *in vitro* HSV1 capsid motility along microtubules

K Döhner, **A Wolfstein**, U Prank, C Echeverri, D Dujardin, R Vallee & B Sodeik
Dynein-mediated transport of HSV1 capsids to the nucleus

EMBO-Workshop: *The Cell Biology of Virus Infection*, 2001, EMBL, Heidelberg

A Wolfstein, K Döhner, P Keller, VJ Allan & B Sodeik
In vivo and *in vitro* HSV1 capsid motility along microtubules

K Döhner, **A Wolfstein**, U Prank, C Echeverri, D Dujardin, R Vallee & B Sodeik
Dynein-mediated transport of HSV1 capsids to the nucleus

1st Workshop of the Study Group in the Society of Virology on the Cell Biology of Viral Infections, October 2002, Zeilitzheim

K Döhner, **A Wolfstein**, U Prank, C Echeverri, D Dujardin, R Vallee & B Sodeik
Function of dynein and dynactin in Herpes Simplex Virus Capsid Transport

2nd Workshop of the Study Group in the Society of Virology on the Cell Biology of Viral Infections, September 2003, Zeilitzheim

A Wolfstein, K Döhner, CH Nagel, S Schmidt, VJ Allan & B Sodeik
Plus- and minus-end directed microtubule transport of Herpes Simplex Virus capsids *in vivo* and *in vitro*

EMBO-Workshop: The CellBiology of Virus Infection, 2004, EMBL, Heidelberg

K Döhner, F Büttner, **A Wolfstein**, S Schmidt & B Sodeik
Plus- and minus-end directed microtubule-mediated transport of HSV1-GFPVP26 during early phases of infection

A Wolfstein, CH Nagel, K Döhner, VJ Allan & B Sodeik
The inner tegument of Herpes Simplex Virus promotes capsid transport along microtubules *in vitro*

3rd Workshop of the Study Group in the Society of Virology on the Cell Biology of Viral Infections, September 2004, Zeilitzheim

A Wolfstein, CH Nagel, K Döhner, VJ Allan & B Sodeik
The inner tegument of Herpes Simplex Virus promotes capsid transport along microtubules *in vitro*

Annual Meeting of the German Society of Virology, March 2005, Hannover

K Döhner, F Büttner, **A Wolfstein**, S Schmidt & B Sodeik
Plus- and minus-end directed microtubule transport of herpes simplex virus type 1 early in infection

30th International Herpesvirus Workshop, 2005, Turku

K Döhner, F Büttner, **A Wolfstein**, S Schmidt & B Sodeik
Plus- and minus-end directed microtubule-transport of herpes simplex virus type 1 early in infection

A Wolfstein, K Radtke, CH Nagel, K Döhner, VJ Allan and B Sodeik
The inner tegument promotes HSV1 capsid motility along microtubules *in vitro*

Vorträge bei wissenschaftlichen Fachkongressen

Workshop des Arbeitskreis „Zellbiologie von Virusinfektionen“ der Gesellschaft für Virologie im Schloss Zeilitzheim, Oktober 2002:

A Wolfstein, K Döhner, P Keller, VJ Allan and B Sodeik.
In vivo and *in vitro* HSV1 capsid motility along microtubules