

VIII Zusammenfassung der Dissertation zum Thema:

„Vergleichende Analyse der essentiellen Proteine pUL25 und pUL17 des Pseudorabies Virus und des Herpes Simplex Virus 1“

vorgelegt von

Jana Kuhn

Die funktionelle Charakterisierung und molekulare Analyse konservierter viraler Genprodukte, die meist an grundlegenden Schritten der Virusreplikation beteiligt sind, schafft die Basis für die Entwicklung von Impfstoffen, diagnostischen Verfahren sowie therapeutischen Ansätzen. Dabei stellen das humanpathogene Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1) und das tierpathogene Pseudorabies Virus (PrV) geeignete Modellsysteme zur Untersuchung der Herpesvirusreplikation dar. Beide Viren sind eng verwandt, replizieren sehr schnell, haben ein breites Wirtsspektrum in der Zellkultur und sind gentechnisch relativ einfach zu verändern.

Ziel dieser Arbeit war die vergleichende Untersuchung viraler Genfunktionen im Replikationszyklus der Alphaherpesviren HSV-1 und PrV. Im Vordergrund stand dabei die Analyse von Mutanten in den für die Virusreifung im und die Freisetzung viraler Kapside aus dem Zellkern bedeutsamen Genprodukten pUL17 und pUL25. Dazu wurden das HSV-1 und PrV Genom, die als artifizielle Bakterienchromosomen (BAC) kloniert vorlagen, in *E.coli* mutagenisiert. Nach Deletion der einzelnen oder beider Gene wurden die Auswirkungen auf die Replikation der Virusrekombinanten parallel in der Zellkultur untersucht. Zusätzlich wurde mittels komplementierender Zelllinien getestet, inwieweit die jeweiligen Virusproteine auch im heterologen Virus-system funktionell waren.

In einem weiteren Teil der Arbeit wurden pUL25-Konstrukte zur Untersuchung der intrazellulären Verteilung des für die Tegumentierung der Nukleokapside im Zytoplasma wichtigen Genprodukts pUL36 verwendet und so die Funktionalität der NLS des pUL36 gezeigt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- (1) HSV-1 und PrV pUL25 werden für die primäre Umhüllung reifer C-Kapside an der inneren Kernmembran benötigt und sind somit an der Freisetzung der Nukleokapside aus dem Zellkern beteiligt. In Abwesenheit von pUL25 werden keine infektiösen Viren produziert. Es kommt zur Akkumulation von Nukleokapsiden an der inneren Kernmembran, während der Knospungsprozess in den Kernspalt nicht stattfindet. Für die Verpackung der Virus-DNA in Kapside ist pUL25 nicht essentiell.
- (2) HSV-1 pUL25 komplementiert teilweise die Funktion in PrV- Δ UL25, was auf überlappende Funktionen der sequenzhomologen Proteine hindeutet. Eine reziproke Transkomplementierung dagegen erfolgte nicht.
- (3) Für pUL17 konnte keine heterologe Transkomplementation festgestellt werden. Möglicherweise übt HSV pUL17 Funktionen aus, die PrV pUL17 nicht übernehmen kann, und umgekehrt.
- (4) Bei gleichzeitiger Abwesenheit der Komplexpartner pUL25 und pUL17 kommt es bei beiden Viren zur Akkumulation von B-Kapsiden im Kern, was auf einen Defekt in der DNA-Verpackung hinweist. Der Defekt der gleichzeitigen Deletion von pUL17 und pUL25 entspricht dem der UL17-Einzelmutante, was die Hypothese unterstützt, dass pUL25 zu einem späteren Zeitpunkt als pUL17 an der Virusreifung beteiligt ist.
- (5) Die gleichzeitige Expression von pUL25 und pUL17 verbesserte die partielle Komplementierung von PrV- Δ UL25 durch HSV-1 pUL25 nicht. Möglicherweise ist der Einbau der heterologen Proteine in das Kapsid beeinträchtigt oder die einzelnen Komplexpartner erfüllen verschiedene Aufgaben.
- (6) Mittels GFP- getaggtter pUL25-Konstrukte, die mit der putativen NLS des pUL36 fusioniert wurden, konnte die Funktionalität des Kernlokalisierungssignals von pUL36 demonstriert werden. Während

transient exprimiertes pUL25 in der Immunfluoreszenz homogen im Zytoplasma verteilt ist, ist NLS-pUL25 ausschließlich im Zellkern detektierbar.

IX Anhang

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit bisher von mir weder an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald noch einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zum Zwecke der Promotion eingereicht wurde.

Ferner erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die darin angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Jana Kuhn
Geburtsdatum: 08.11.1976
Geburtsort: Greifswald
Familienstand: verheiratet, 2 Kinder (*2004, *2009)

Ausbildung

1983 – 1991 Grundschule „POS Erich Weinert“, Greifswald

1991 – 1995 Johann-Gottfried-Herder-Gymnasium, Greifswald
Abschluss: Abitur

1995 – 1999 Dr. Gillmeisterschule, Heide
Ausbildung zur MTA-L
Abschluss: Examen

1999 – 2006 Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald
Studium der Humanbiologie
Abschluss: Diplom
Diplomarbeit am Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Greifswald:
„Untersuchungen zur posttranslationalen Modifizierung von PDX-1 (pancreatic duodenal homeobox 1)“

2006 – 2008 Friedrich-Loeffler-Institut, Greifswald – Insel Riems,
Wissenschaftliche Mitarbeiterin
Dissertation:
„Vergleichende Analyse der essentiellen Proteine pUL25 und pUL17 des Pseudorabies Virus und des Herpes Simplex Virus 1“

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die durch ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. T.C. Mettenleiter für die Möglichkeit, die Arbeit an seinem Institut anzufertigen, sein immer reges Interesse am Fortgang dieser Arbeit, sowie die zahlreichen wertvollen Anregungen und die Möglichkeit, die Ergebnisse dieser Arbeit auf vielen Kongressen vorstellen und publizieren zu dürfen.

Frau Dr. B. Klupp für die wissenschaftliche Berteuung im Labor, die vielfältige Unterstützung vor allem bei kniffligen Angelegenheiten und der Veröffentlichung der Ergebnisse, sowie für ihr stetes grosses Interesse an dieser Arbeit und ihr Verständnis.

Herrn Dr. habil. Granzow für die Durchführung der elektronenmikroskopischen Untersuchungen und die exzellenten Aufnahmen.

Herrn Dr. Riebe und der Zellbank für das rasche Bereitstellen der Zellen.

Frau Diana Werner für die zügige Einarbeitung in die Labormethoden einschließlich der Tipps und Tricks und die tatkräftige Unterstützung vor allem während der letzten Monate.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für Molekularbiologie möchte ich mich für die freundliche Aufnahme, die Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Mein herzlichster Dank gilt meiner Familie, die auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.