

Peter Lütkes  
Dr. med.

## **Expression des Einzelstrang-DNA-Bindungsproteins UL29 von Herpes-simplex-Virus Typ 1 (Stamm Angelotti) in Insektenzellen**

Geboren am 20.11.1967 in Schmallenberg  
Reifeprüfung am 10.06.1987 in Schmallenberg  
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1989 bis WS 1996  
Physikum am 15.03.1991 an der Universität Heidelberg  
Klinisches Studium in Heidelberg  
Praktisches Jahr in Heidelberg  
Staatsexamen am 06.05.1991 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Deutsches Krebsforschungszentrum  
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. habil. K.-W. Knopf

In der vorliegenden Arbeit gelang die Expression des UL29-Gens von HSV-1-ANG sowohl im gekoppelten Transkriptions-/Translations-System *in vitro* als auch unter Nutzung des transienten  $\nu$ TF7-3 RNA Polymerase Hybrid Systems sowie nach Konstruktion eines rekombinanten Baculovirus in Sf9-Insektenzellen. Hierzu wurde zunächst das vollständige offene Leseraster des UL29-Gens in den Vektor pBluescript kloniert, der für die *in vitro* Expression und das transiente  $\nu$ TF7-3 Hybrid-System mit Expression des UL29-Genproduktes in BHK21-Zellen genutzt wurde. In diesen Systemen war das UL29-Genprodukt durch Autoradiographie bzw. Immunoblotanalysen in der erwarteten Größenordnung von etwa 130 kDa nachweisbar.

Zur Etablierung des Baculovirus-Überexpressionssystems wurde der Expressionsvektor pVLUL29 kloniert, der die vollständige Gensequenz des UL29-Gens enthielt. Daran schloß sich eine homologe Rekombination dieser Gensequenz in das Genom der Baculoviren an. Dort lag das Gen unter der Kontrolle des starken Polyhedrin-Promotors vor. Die Selektion der rekombinanten Viren war einfach und schnell durchführbar, da durch die Rekombinationsvorgänge das lacZ-Gen des hier genutzten modifizierten Baculovirus zerstört wurde und rekombinante Viren durch eine Farbreaktion leicht nachweisbar waren.

Die erfolgreiche Integration des UL29-Gens in das Wirtsgenom der Baculoviren wurde mit einer Southern-Blot-Analyse nachgewiesen. Das Wachstumsverhalten der rekombinanten Viren entsprach dem des Wildtyps. Anhand einer Expressionskinetik wurde gezeigt, daß das UL29-Genprodukt bereits nach 24h in den infizierten Sf9-Insektenzellen vorlag und nach 5 Tagen maximal angereichert war. Damit wurde die notwendige Vorarbeit für weitere Experimente geleistet, die der Aufklärung der Rolle des UL29-Genproduktes in der HSV-1-DNA-Replikation dienen sollen.