

**Charakterisierung der Interaktion
des Herpes-Simplex-Virus Typ 2 Proteins ICP0 mit der
zellulären E3 Ubiquitinligase SIAH-1 und deren Rolle für
den viralen Infektionsverlauf**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

an der Fakultät Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Fachbereich Biologie

der Universität Hamburg

vorgelegt von

Julia Stephanie Czechowicz

aus Berlin

Hamburg, den 14.02.2018

1. Dissertationsgutachter: Herr Prof. Dr. Wilhelm Schäfer
2. Dissertationsgutachter: Herr Prof. Dr. Joachim Hauber

Datum der Disputation: 13.April 2018

Datum der Druckfreigabe: 13.April 2018

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Januar 2014 bis Februar 2018 am Heinrich-Pette-Institut – Leibniz Institut für Experimentelle Virologie in der Abteilung „Antivirale Strategien“ angefertigt.

Teile der Arbeit werden zur Veröffentlichung in einem internationalen *peer reviewed* Journal eingereicht:

Julia Czechowicz, Claus-Henning Nagel, Maike Voges, Michael Spohn, Martha M. Eibl, Joachim Hauber. Interaction of the Cellular E3 Ubiquitin Ligase SIAH-1 and the Viral Immediate-early Protein ICP0 Enables Efficient Replication of Herpes-Simplex-Virus Type 2 *In Vivo*.

Manuskript in Bearbeitung

Danksagung

In diesem Rahmen möchte ich mich ganz herzlich bei all denen bedanken, die mich in der Zeit und bei der Erstellung meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gilt hierbei Herrn Prof. Dr. Joachim Hauber, der mir die Möglichkeit gegeben hat in der Abteilung Antivirale Strategien an diesem spannenden Thema zu arbeiten, und mich dabei all die Jahre stets unterstützte.

Zudem möchte ich mich bei meinem Gutachter Herrn Prof. Dr. Wilhelm Schäfer aus dem Fachbereich Biologie der Universität Hamburg für die Bereitschaft, meine Doktorarbeit zu betreuen, bedanken.

Ein großer Dank gilt auch Herrn Dr. Claus-Henning Nagel, der mir als mein Betreuer in den ersten anderthalb Jahren meiner Doktorarbeit immer mit gutem Rat zur Seite stand und mir bei der Einarbeitung in das Gebiet der Herpesvirologie eine große Hilfe war.

Gleiches trifft zu für Herrn Prof. Dr. William Halford der Southern Illinois University-School of Medicine in Springfield, Illinois, USA. Herr Halford hat mir die einzigartige Möglichkeit gegeben, während eines dreimonatigen Forschungsaufenthalts in seinem Labor das *in vivo* Modell zur Untersuchung des HSV2 Infektionsverlaufs und der Latenz zu erlernen. Zudem stand er mir mit gutem Rat, Materialien und anregenden Diskussionen stets zur Seite.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Abteilung „Antivirale Strategien“ am Heinrich-Pette-Institut in Hamburg für ihre nette Aufnahme und vielfältige Unterstützung während meiner Zeit am HPI. Ein spezieller Dank gilt hierbei Bettina Abel und Britta Weseloh für die technische Unterstützung im Labor. Maïke Voges danke ich für die tolle Zusammenarbeit am HSV2 Projekt und für ihre Unterstützung bei der Durchführung der *in vivo* Experimente.

Bei Jan Chemnitz, Niklas Beschorner, Gábor Dunay, Julia Bialek, Ilona Hauber und Ulrike Lange möchte ich mich für die vielen wissenschaftlichen Anregungen und Ratschläge bedanken, und natürlich für die netten und lustigen Mittagsrunden in unserer Gemeinschaftsküche.

Ein spezieller Dank geht auch an Mitarbeiter anderer Arbeitsgruppen des Heinrich-Pette Instituts, die mich bei der Durchführung meiner Experimente unterstützt haben, wie Gundula Pilnitz-Stolze bei der Herstellung der histologischen Schnitte, Jens Bosse und Rudi Reimer bei der Einweisung in die Mikroskopie, Ursula Müller und alle Tierpfleger bei ihrer Hilfe im

Tierhaus, sowie die Forschungsgruppe Virus Genomik – im Speziellen Daniela Indenbirken und Michael Spohn - für die Sequenzierung meiner HSV2 Konstrukte und die anschließende bioinformatische Auswertung.

Bei Herrn Dr. Jerry P. Weir, Dr. Cement A. Meseda (Center of Biologics Evaluation and Research, Food and Drug Administration, Bethesda, MD, USA), Herrn Dr. B. Karsten Tischer (FU Berlin) und Frau Prof. Dr. Martha M. Eibl (Biomed. Forschungsgemeinschaft mbH, Wien) bedanke ich mich für die Bereitstellung wertvoller Materialien für meine Arbeit.

Ein großer Dank gilt auch der DELIGRAH Graduiertenschule Hamburg für ihre finanzielle Unterstützung und die informativen Seminare und jährlichen *Retreats*. Ohne Unterstützung der DELIGRAH wäre meine Doktorarbeit in diesem Rahmen nicht möglich gewesen.

Zuletzt möchte ich noch meiner Familie, meinen Freunden sowie Max dafür danken, dass sie mir immer stützend und motivierend zur Seite standen.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	VII
Inhaltsverzeichnis	IX
Zusammenfassung	XIII
Abstract	XV
1 Einleitung	1
1.1 <i>Das Herpes-Simplex-Virus</i>	2
1.1.1 Pathologie.....	2
1.1.2 Morphologie und Genomstruktur.....	3
1.1.3 Der lytische HSV Infektionszyklus.....	5
1.1.4 Mechanismen der HSV Latenzetablierung und Virus Reaktivierung.....	8
1.2 <i>Modellsysteme zur Untersuchung der HSV2 Infektion, Pathogenese, Latenz und Reaktivierung</i>	10
1.3 <i>Antivirale Wirkstoffe und Impfstoffentwicklung</i>	12
1.4 <i>Das Infected Cell Protein 0 (ICP0)</i>	14
1.5 <i>Die zellulären SIAH E3 Ubiquitinligasen</i>	18
1.5.1 Interaktion von SIAH-1 mit dem Herpes-Simplex-Virus Protein ICP0.....	20
1.6 <i>Das Ubiquitin-Proteasomen-System</i>	20
1.7 <i>Zielsetzung der Arbeit</i>	22
2 Materialien	24
2.1 <i>Bakterienstämme</i>	24
2.2 <i>Virusstämme</i>	24
2.3 <i>Eukaryotische Zelllinien</i>	24
2.4 <i>Medien</i>	25
2.4.1 Medien für die Anzucht von Bakterien.....	25
2.4.2 Medien für die Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	25
2.5 <i>Oligonukleotide (Primer)</i>	26
2.5.1 Radioaktiv markierte Nukleotide.....	29
2.6 <i>Plasmide</i>	29
2.7 <i>Enzyme</i>	30
2.7.1 Restriktionsendonukleasen.....	31
2.8 <i>Antikörper</i>	31

2.9	Reagenzsysteme.....	32
2.10	DNA- und Protein Längenstandards.....	32
2.11	Antibiotika.....	33
2.12	Proteaseinhibitoren.....	33
2.13	Chemikalien.....	33
2.14	Verbrauchsmaterialien.....	35
2.15	Lösungen und Puffer.....	36
2.16	Geräte.....	37
2.17	Chirurgische Instrumente.....	39
2.18	Software.....	39
3	Methoden.....	40
3.1	Mikrobiologische Methoden.....	40
3.1.1	Kultivierung und Kryokonservierung von Bakterien.....	40
3.1.2	Hitzeschock-Transformation von Bakterien.....	40
3.1.3	Blau-weiß Selektion mittels IPTG und Xgal.....	41
3.2	Molekularbiologische Methoden.....	42
3.2.1	Präparation und Isolierung von Plasmid-DNA.....	42
3.2.2	Analytische Präparationen von BAC-DNA.....	42
3.2.3	Präparation viraler DNA.....	43
3.2.4	Präparation genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen.....	43
3.2.5	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	44
3.2.6	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	44
3.2.7	Quantitative <i>Realtime</i> -PCR.....	47
3.2.8	Standard Klonierung von Plasmid DNA.....	49
3.2.9	Restriktionsfragment-Analyse von PCR-Produkten und Plasmid DNA.....	51
3.2.10	Restriktionsanalyse von BAC- und viraler HSV2-DNA.....	51
3.2.11	Sequenzieren von DNA.....	52
3.2.12	<i>En Passant</i> Mutagenese zur Generierung der HSV2 BAC-Mutanten.....	52
3.2.13	Generierung der Plasmide für die homologe Rekombination in eukaryotischen Zellen.....	56
3.3	Zellbiologische Methoden.....	62
3.3.1	Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen.....	62
3.3.2	Kultivierung und Passagieren adhärenter Zellen.....	63
3.3.3	Homologe Rekombination in eukaryotischen Zellen.....	63
3.3.4	Rekonstitution von HSV2 mittels BAC-Transfektion.....	64
3.3.5	Passage 1 (P1) - Virus Präparation.....	65

3.3.6	Passage 2 (P2) -Virus Präparation und Konzentration viraler Partikel mittels Ultrazentrifugation.	65
3.3.7	Virustiterbestimmung mittels HSV <i>Plaque Assay</i> mit IgG Überschichtung.....	66
3.3.8	Plaquereinigung mittels Verdünnungsreihe zur Herstellung homogener Virusbestände.....	68
3.3.9	HSV2 Wachstumskinetik in eukaryotischen Zellen	69
3.4	<i>Biochemische Methoden</i>	70
3.4.1	Western Blot	70
3.4.2	Immunfärbung von Virusplaques	72
3.4.3	<i>GST-Pulldown Assay</i>	72
3.4.4	Southern Blot.....	74
3.5	<i>In Vivo Analysen im Mausmodell</i>	77
3.5.1	Okulare HSV2 Infektion	77
3.5.2	Messung der Virustiter in der Tränenflüssigkeit infizierter Mäuse	78
3.5.3	Bestimmung der Virustiter im infizierten Gewebe	79
3.5.4	Gesamt DNA Präparation aus eukaryotischem Gewebe.....	80
3.5.5	RNA Präparation aus eukaryotischem Gewebe	81
3.5.6	Bestimmung der viralen Genomkopien und RNA-Expression im Gewebe mittels quantitativer <i>Realtime-PCR</i>	82
3.5.7	Herstellung immunhistologischer Präparate	83
3.5.8	<i>Ex vivo</i> Reaktivierung von HSV2 aus latent infizierten Trigemini-nerven.....	84
3.6	<i>Statistische Analyse</i>	85
4	Ergebnisse	87
4.1	<i>Konstruktion von Herpes-Simplex-Virus Typ 2 ICP0-Mutanten</i>	87
4.1.1	Konstruktion der HSV2 ICP0-Mutanten mittels <i>En Passant</i> Mutagenese.....	87
4.1.2	Konstruktion der HSV2 ICP0-Mutanten über homologe Rekombination	101
4.2	<i>In Vitro Analyse der SIAH-Bindemotiv-defizienten HSV2 ICP0-Mutanten</i>	110
4.2.1	Überprüfung der ICP0:SIAH-1 Interaktion mittels <i>GST-Pulldown</i>	111
4.2.2	Plaquewahrscheinlichkeit der HSV2-Mutanten auf verschiedenen Zelllinien.....	113
4.2.3	Wachstumskinetik der SIAH-bindedefizienten ICP0-Mutanten.....	116
4.2.4	Replikationsverhalten der ICP0-Mutanten.....	120
4.2.5	Protein-Expressionskinetik der SIAH-bindedefizienten ICP0-Mutanten	123
4.3	<i>In vivo Charakterisierung von HSV2 im Mausmodell</i>	129
4.3.1	SIAH-1 RNA Expression im uninfizierten murinen Gewebe	129
4.3.2	Okulare Infektion von C57Bl/6J Mäusen mit HSV2 Wildtyp	130
4.3.3	Viruslast in den innervierenden Geweben	132
4.3.4	<i>Ex vivo</i> Reaktivierung von HSV2 Wildtyp in latent infizierten Trigemini-nerven.....	133
4.3.5	Überprüfung der Ori _L -Sequenz in den <i>En Passant</i> Mutanten	135
4.3.6	Okulare Infektion von C57Bl/6J Mäusen mit den ICP0-GFP Mutanten	136

4.3.7	Ausbreitung und akute Replikation der Mutanten in den innervierenden Geweben.....	138
4.3.8	Virale RNA-Expression der HSV2 Konstrukte im Hirnstamm	145
4.3.9	Reaktivierung der SIAH-bindedefizienten ICP0-Mutanten in latent infizierten Trigemini- nerven	146
4.3.10	<i>In vivo</i> Analyse der über <i>En Passant</i> Mutagenese hergestellten ICP0-Mutanten	147
4.3.11	<i>Next-Generation-Sequencing</i> der hergestellten Virus-Konstrukte mittels Illumina MiSeq™ ...	151
5	Diskussion.....	153
5.1	<i>Auswirkung der inhibierten ICP0:SIAH-1 Interaktion in vitro</i>	153
5.2	<i>In Vivo Analyse der SIAH-bindedefizienten ICP0-GFP Mutanten</i>	155
5.2.1	<i>In vivo</i> Analyse der HSV2 Wildtyp-Konstrukte	157
5.2.2	<i>In vivo</i> Analyse der SIAH-bindedefizienten BAC-Mutante	158
5.3	<i>Potentielle Bedeutung der ICP0:SIAH Interaktion</i>	158
5.3.1	Mögliche Zielstrukturen der ICP0:SIAH-1 Interaktion	160
5.4	<i>Fazit und Ausblick</i>	163
	Erklärung	165
	Eidesstattliche Versicherung	166
6	Literaturverzeichnis.....	167
7	Abkürzungsverzeichnis.....	190
8	Anhang	194

Zusammenfassung

Etwa 15-30% der Weltbevölkerung sind mit dem Herpes-Simplex-Virus Typ 2 (HSV2) infiziert. In den meisten Fällen infiziert HSV2 die Schleimhäute des Genitaltraktes und ist in der Lage nach einer Primärinfektion Latenz in den innervierenden Neuronen zu etablieren. Hierdurch persistiert das Virus ein Leben lang im Menschen und kann unter gewissen Bedingungen wieder reaktivieren. Bis heute gibt es keine Medikamente, die das Virus endgültig entfernen, oder Impfstoffe, die eine Erstinfektion verhindern. Die Mechanismen einer lytischen HSV Infektion und die Prozesse der Latenzetablierung und Reaktivierung sind multifaktoriell und nur unvollständig verstanden. Dem unmittelbar frühen viralen Protein ICP0 (*Infected Cell Protein 0*) wird bei diesen Prozessen eine wichtige Rolle zugesprochen, da es über seine E3 Ubiquitinligase Funktion in der Lage ist, die Abundanz einer Vielzahl an zellulären und viralen Proteine zu regulieren. Zu den Substraten, die von ICP0 für den proteasomalen Abbau markiert werden, gehören vor allem Bestandteile zellulärer Abwehrmechanismen, die an der Eindämmung der HSV Infektion beteiligt sind.

Es konnte bereits früher gezeigt werden, dass ICP0 von HSV2 mit dem humanen SIAH-1 (*Seven in Absentia Homolog*) Protein über hochkonservierte Konsensusmotive interagiert. SIAH-1 besitzt ebenfalls eine E3 Ubiquitinligase Funktion, über die es den proteasomalen Abbau seiner Zielproteine vermittelt. Transfektionsexperimente haben ergeben, dass SIAH-1 ICP0 bei der Interaktion polyubiquitiniert, ein Vorgang, der zum proteasomalen Abbau von ICP0 führt. SIAH-1 spielt unter anderem bei der Zellzyklus- und DNA-Reparatur-Regulierung eine Rolle. Da ICP0 und SIAH-1 an der Regulierung zum Teil identischer Signalwege beteiligt sind (und SIAH-1 verstärkt in Nervenzellen exprimiert wird), könnte eine Interaktion von SIAH mit ICP0 in verschiedenen Phasen der HSV2 Infektion wichtig sein.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Bedeutung der ICP0:SIAH-1 Interaktion im Kontext von replikationskompetentem HSV2. Zu diesem Zweck wurden Virusmutanten konstruiert, in deren ICP0 Protein die SIAH-Bindemotive durch Punktmutationen deletiert wurden. Um die Auswirkung der fehlenden ICP0:SIAH-1 Interaktion auf die lytische und latente Infektion zu untersuchen, wurde der Phänotyp der Mutanten *in vitro* und in einem okularen Mausmodell *in vivo* überprüft. Es zeigte sich, dass die SIAH-bindedefizienten HSV2 Mutanten in ihrem Wachstum gegenüber Wildtypvirus *in vitro* und *in vivo* deutlich attenuiert waren, und sich die DNA- und Proteinexpressionrate signifikant reduzierte. Im Tiermodell waren die Titer der SIAH-bindedefizienten Mutanten an Tag 5 nach der Infektion in den Trigemininalganglien (TG) und im Hirnstamm signifikant niedriger als die von Wildtyp-HSV2.

Zusammenfassung

Reaktivierungsexperimente an präparierten TG-Explantaten zeigten, dass die ICP0-Mutante in der Lage war, Latenz zu etablieren und mit der gleichen Effizienz wie das Wildtypvirus aus der Latenz zu reaktivieren. Die erreichten Virustiter der SIAH-bindedefizienten Konstrukte waren nach der Reaktivierung jedoch deutlich niedriger. Die hier erzielten Ergebnisse zeigen, dass die ICP0:SIAH-1 Interaktion für eine effiziente lytische Genexpression und Virusreplikation notwendig ist, bei der Reaktivierung *per se* jedoch keine Rolle spielt.

Abstract

Herpes-Simplex-Virus Type 2 (HSV2) is a neurotropic human pathogen that has infected about 15-30% of the world's population. HSV2 initially infects and replicates in epithelial cells of the genital tract and invades the nervous system by entering the innervating sensory neurons where life-long latency is established. So far, there are no antiviral therapies available that prevent HSV2 *de novo* infection or eradicate the virus from infected hosts. The processes of the lytic life-cycle, as well as latency establishment and reactivation are complex and only poorly understood. Upon *de novo* infection, the viral infected cell protein 0 (ICP0) is immediately expressed and interacts with various viral and cellular proteins which eventually leads to the proteasomal degradation of the latter. Thus, ICP0 plays a key role in the before mentioned processes.

In transfected tissue culture models it has previously been demonstrated that ICP0 interacts with the cellular E3 ubiquitin ligase SIAH-1, and that SIAH-1 targets ICP0 for proteasomal degradation. The effect of this virus-host interaction during the establishment of HSV2 infection has, as yet, not been elucidated. In order to analyse the role of the interaction in regard to lytic and latent infection, HSV2 ICP0 mutants, in which the SIAH-binding motives were inactivated by point mutations, were constructed here. These mutants were consequently analysed *in vitro* in cell culture, as well as *in vivo*, using an ocular mouse model.

It was confirmed that ICP0 of HSV2 interacts with SIAH-1 via two conserved PxAxVxP amino acid binding motifs. Subsequently, the SIAH-1 binding-deficient HSV2 mutants demonstrated an attenuated growth behavior and were impaired in DNA and protein synthesis *in vitro* and *in vivo*. As compared to wildtype virus, *in vivo* viral loads of SIAH-1 binding-deficient HSV2 mutants were significantly reduced in the trigeminal ganglia (TG) and the brain stem at day 5 post infection. The presented findings suggest that ICP0:SIAH-1 interplay is important for efficient HSV2 replication and gene expression. It was shown in reactivation assays of latently infected intact TG explants, that the SIAH-binding deficient HSV2 mutants were able to reactivate from latency with the same efficiency as wildtype virus, but only achieved reduced viral titers upon reactivation. These data suggested that the ICP0:SIAH-1 interaction is not required for reactivation from latency *per se* but rather for the efficient progression of *in vivo* infection.

1 Einleitung

Der Name *Herpes* leitet sich von dem griechischen Wort *herpein* ab und bedeutet so viel wie „kriechen oder schleichen“. Die Namensgebung beruht auf der Manifestation einer Herpesinfektion, bei der sich die Herpesbläschen langsam in den Schleimhäuten ausbreiten. Bereits Hippokrates hat die Manifestation einer Erkrankung mit Herpes-Simplex-Virus beschrieben. Seither wurden Herpes-Simplex-Viren in verschiedenen medizinischen, sowie literarischen Texten erwähnt, unter anderem im 16. Jahrhundert in William Shakespeares Tragödie „Romeo und Julia“. Der erste eindeutige Nachweis einer infektiösen Genese von HSV wurde 1919 von Löwenstein erbracht (Stroop, 1986). Die erste Isolierung und anschließende Charakterisierung von Viruspartikeln aus dem Bläscheninhalt eines Patienten erfolgte 1946 durch Slavin und Gavett (Slavin & Gavett, 1946). Karl Eduard Schneweis entdeckte schließlich im Jahre 1960, dass die labiale und genitale Herpes-Simplex Infektion auf zwei unterschiedliche Virusspezies zurückzuführen ist.

Herpes-Simplex-Viren gehören zur Familie der *Herpesviridae*. Die Mitglieder der Familie haben eine große Bandbreite an Wirtsorganismen, die von Muscheln (*Bivalves*) bis hin zum Menschen (*Homo sapiens*) reichen. Bis heute wurden 200 Herpesviren entdeckt, von denen über 100 säugerspezifisch sind, jedoch nur neun den Menschen als ihren primären Wirtsorganismus haben (Adams et al., 2012). Zu ihnen gehören neben den Herpes-Simplex-Viren Typ 1 und Typ 2, das Varizella-Zoster-Virus (VZV, auch humanes Herpesvirus 3 beziehungsweise HHV-3), das Epstein-Barr-Virus (EBV, auch humanes Herpesvirus 4 beziehungsweise HHV-4), das humane Cytomegalievirus (HCMV, auch humanes Herpesvirus 5 beziehungsweise HHV-5), die humanen Herpesviren 6A, 6B und 7 (HHV-6A, HHV-6B, HHV-7), und das Karposi-Sarkom-assoziierte Herpesvirus (KSHV, auch humanes Herpesvirus 8 beziehungsweise HHV-8). Alle humanpathogenen Herpesviren sind in der Lage, ihren Wirt latent zu infizieren und unter bestimmten pathophysiologischen Konditionen zu reaktivieren, was zu einer erneuten akuten Infektion des Wirts führt (Arvin et al., 2007).

Basierend auf ihren biologischen Eigenschaften können Herpesviren in die drei Unterfamilien *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae*, und *Gammaherpesvirinae* unterteilt werden (Arvin et al., 2007; Freed & Martin, 2013). Bei den drei Unterfamilien unterscheiden sich unter anderem die Zelltypen, welche von den jeweiligen Viren infiziert werden, sowie der Ort der Latenzetablierung. Herpes-Simplex-Viren gehören zur Unterfamilie der *Alphaherpesvirinae*, sie infizieren primär Zellen der Schleimhäute und bilden Latenz in sensorischen Nervenzellen aus. Cytomegalieviren gehören zu den *Betaherpesvirinae*. Ihre Latenzentwicklung wurde in

verschiedenen Zell- und Gewebetypen, wie Nierenzellen oder sekretorischem Drüsengewebe beobachtet. Zu den *Gammaherpesvirinae* gehört unter anderem KSHV. *Gammaherpesviren* replizieren in lymphoblastoiden Zellen und sind T- und B-Zell spezifisch.

1.1 Das Herpes-Simplex-Virus

Herpes-Simplex-Viren (HSV), häufig auch als Humane Herpesviren (HHV) bezeichnet, werden in zwei Spezies unterteilt: Herpes-Simplex-Virus Typ 1 und Typ 2 (HSV1 und HSV2), wobei HSV1 primär die Schleimhäute der Mundhöhlen (*herpes labialis*) und HSV2 die Schleimhäute des Genitaltrakts (*herpes genitalis*) infiziert. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Herpes-Simplex-Virus Typ 2. HSV2 wird meist über Geschlechtsverkehr übertragen, wobei das Virus in die Epithelzellen der Schleimhäute eindringt und dort repliziert (Wald & Corey, 2007). Die infizierten Zellen werden dabei zerstört, beziehungsweise fusionieren mit ihren Nachbarzellen und bilden Synzytien. Auf diesem Weg wird das Virus freigesetzt und an die Nachbarzellen weitergegeben (Whitley et al., 2007). Nach der Replikation in den Schleimhäuten dringt das Virus in die freien Nervenenden der innervierenden Neuronen ein. Bei HSV2 sind dies meist die Sakralganglien des Rumpfes. Von dort wird das Virus in den Axonen retrograd zum Zellkern transportiert, wo es eine lebenslange Latenz etabliert (Fields et al., 2013). Im latenten Zustand findet so gut wie keine virale Genexpression statt (Jones et al., 1998). Lediglich das *Latency Associated Transcript (LAT)* kann zu diesem Zeitpunkt in hohen Konzentrationen nachgewiesen werden (Stevens et al., 1987). Eine Reaktivierung von HSV wird meist durch Stressfaktoren der Zelle, wie UV-Einstrahlung oder Gewebeschädigungen hervorgerufen. Nach der Reaktivierung werden die Viren vom Zellkern anterograd in den Axonen zurück in die Nervenendigungen transportiert und dort freigesetzt (Smith, 2012). Das freigesetzte Virus infiziert erneut die Schleimhäute und führt dort zu einer akuten Infektion, die sich in auftretenden Läsionen der Haut manifestiert. In einigen Fällen konnte jedoch gezeigt werden, dass die Freisetzung neuer Viruspartikel auch asymptomatisch geschehen kann (Mertz, 2008; Wald et al., 1995).

1.1.1 Pathologie

Wie zuvor erwähnt, ist das Herpes-Simplex-Virus Typ 2 (HSV2) der primäre Verursacher von *Herpes genitalis*. Daneben kann HSV2 auch Primärinfektionen an der Mundschleimhaut und am Auge verursachen (Whitley et al., 2007). Eine Infektion mit HSV2 ist auch dann möglich, wenn eine Person bereits Herpes-Simplex-Virus Typ 1 (HSV1) seropositiv ist, das heißt Antikörper gegen HSV1 besitzt. In einem solchen Fall spricht man von einer initialen HSV2 Infektion (Whitley et al., 2007). Derzeit sind etwa 15-30% der Weltbevölkerung HSV2

positiv, und die Zahl der Neuinfektionen nimmt jährlich zu (Looker et al., 2008; Whitley et al., 2007). Zu den Symptomen einer akuten HSV2 Infektion gehören schmerzhafte Hautläsionen im Genitalbereich, die bei etwa 30% der Betroffenen mehrmals jährlich auftreten können (Geltz et al., 2015; Gupta et al., 2007). Bei immunkompetenten Erwachsenen verläuft eine HSV2 Infektion meist harmlos. Gefährlich ist die Infektion besonders bei immunsupprimierten Patienten (Cunningham et al., 2006) und Schwangeren. Ein HSV2 Ausbruch oder eine Primärinfektion während der ersten Schwangerschaftswochen kann zum Abort führen (Whitley et al., 2007), bei einer Infektion in den letzten Schwangerschaftswochen besteht eine 30-50% Wahrscheinlichkeit, dass sich der Fötus mit HSV2 infiziert. Die höchste Übertragungswahrscheinlichkeit besteht hierbei während der Geburt im Geburtskanal (perinatal) und wird als *Herpes neonatorum* bezeichnet (Whitley & Roizman, 2001). Die Auswirkungen auf das Neugeborene können gravierend sein: In den meisten Fällen tritt ein disseminierter Befall der Organe, einhergehend mit einer Herpes Enzephalitis auf, oder aber eine Enzephalitis ohne Befall weiterer Organe (Whitley et al., 2007). Wird eine Herpesinfektion bei Neugeborenen nicht behandelt, verläuft sie in den meisten Fällen tödlich. Überlebende einer HSV2 Enzephalitis leiden danach häufig an irreparablen Nervenschädigungen. In immunsupprimierten Patienten kann eine HSV2-Primärinfektion, aber vor allem reaktivierte Viren, zu Läsionen im Auge führen (*Herpes Keratitis*), die ohne rechtzeitige Behandlung zur Erblindung führen (Farooq & Shukla, 2012; Liesegang, 2001; Tsatsos et al., 2016). In seltenen Fällen tritt bei immungeschwächten Erwachsenen auch eine HSV2-bedingte Herpes Enzephalitis auf (Steiner et al., 2007; Whitley, 2015; Whitley et al., 2007), die meist durch reaktiviertes Virus verursacht wird. Zudem konnte festgestellt werden, dass eine genitale HSV2 Infektion bei immunsupprimierten, sowie immunkompetenten Menschen das Risiko einer HIV Infektion um das zwei-, bis dreifache erhöht (Barnabas & Celum, 2012). Dieses Risiko kann auch durch die Einnahme von antiherpetischen Medikamenten nicht verringert werden.

1.1.2 Morphologie und Genomstruktur

Bei allen Mitgliedern der *Herpesviridae* besteht das Virion aus einem ikosaedrischen Kapsid in dem sich die lineare doppelsträngige DNA (dsDNA) befindet. Bei Herpes-Simplex-Viren besteht das Kapsid aus 150 Hexons und 12 Pentons (Brown & Newcomb, 2011). Das Kapsid ist von einem Tegument, sowie von einer Hüllmembran umgeben. Die Hüllmembran besteht aus einer Lipiddoppelschicht, die von der Membran der Wirtszelle abstammt und in deren Oberfläche virale Glykoproteine integriert wurden. Die viralen Glykoproteine sind für das Eindringen des Virus in die Wirtszelle verantwortlich (1.1.3). Zwischen Kapsid und äußerer

Einleitung

Hüllmembran befindet sich das Tegument, bestehend aus einer eher unstrukturierten Proteinmatrix. Einige Proteine des Teguments, wie beispielsweise VP16, sind für die Initiierung der Virusreplikation (Batterson & Roizman, 1983) und später für das Austreten des Virus aus der Wirtszelle (Mossman et al., 2000a) essentiell. Andere Proteine wie das Virion *host shut-off* Protein (vhs) bauen zelluläre mRNAs selektiv ab, und optimieren somit den viralen Infektionszyklus (Kwong & Frenkel, 1989). Ebenfalls im Tegument ist das multifunktionelle *Infected Cell Protein 0* (ICP0) enthalten, welches in Abschnitt 1.4 genauer vorgestellt wird. Der Durchmesser eines HSV-Partikels beträgt 150-200 nm.

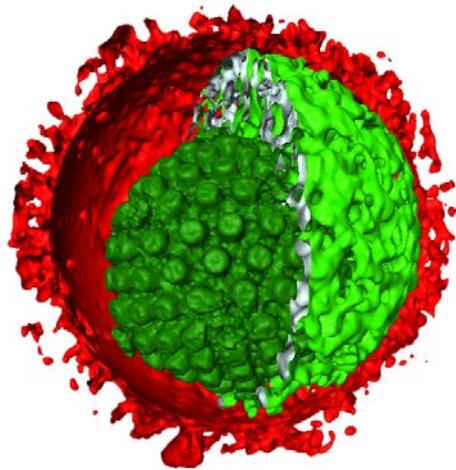


Abbildung 1. Aufbau eines HSV Virions. Dreidimensionale Darstellung eines Virions. Rekonstruktion nach tomographischer Kryoelektronenmikroskopie. Von innen nach außen: Das Kapsid (dunkelgrün), das Tegument (hellgrün), sowie die Hüllmembran (rot) mit den viralen Glykoproteinen (Grünewald et al., 2003).

Das lineare dsDNA-Genom von HSV2 (Stamm HG52) hat eine Größe von etwa 155 kb mit einem G/C-Gehalt von 70,4% (Dolan et al., 1998). Das Genom ist aus zwei Segmenten aufgebaut, der L- (*long*) und der S-Region (*short*) (Fields et al., 2013; Roizman, 1979). Jedes Segment besteht aus einer einzigartigen Sequenz (*unique region*): Der U_L-Region (*unique long*) und der U_S-Region (*unique short*). Die Segmente werden von invertierten Wiederholungen, der *repeat long* (R_L) und *repeat short* (R_S) Sequenz, flankiert. Die invertierten repetitiven Sequenzen die U_L flankieren werden als ab und a'b' (auch aTR_L und a'IR_L) bezeichnet, wohingegen die U_S flankierenden Sequenzen in a'c' und ca (auch a'IR_S und TR_{Sa}) unterteilt sind (Dolan et al., 1998). Die Abkürzungen TR und IR stehen hierbei für *terminal repeats* und *internal repeats*. Die a-Sequenzen enthalten die DR1 Elemente, an denen die Virus-DNA nach der *rolling cycle*-DNA Replikation in Momomere prozessiert

wird. In Virionen können die U_L - und U_S -Region jeweils unterschiedlich zueinander angeordnet sein, so dass insgesamt vier Isomere (im gleichen Verhältnis) existieren (Dolan et al., 1998) (

Abbildung 2). Das Genom von HSV2 kodiert für mindestens 74 offene Leserahmen (*ORFs*= *open reading frames*), von denen wie bei HSV1 13 in der U_S -Region, einer in der R_S -Region, zwei in der R_L -Region und die restlichen 58 in der U_L -Sequenz liegen (Dolan et al., 1998). Gene, die in den invertierten repetitiven Sequenzen lokalisieren kommen jeweils zweimal im Virusgenom vor, so beispielsweise das unmittelbar frühe Gen R_L2 , auch bekannt als *ICP0*.

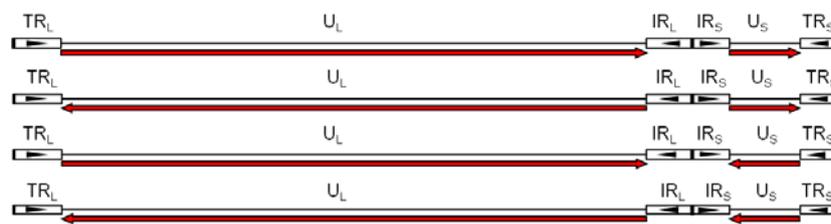


Abbildung 2. Die vier Isomere des HSV Genoms und ihre relative Anordnung der U_L und U_S Sequenzen. Alle Isomere treten in derselben Häufigkeit auf. Die a-Region befindet sich an den Genomenden, sowie an der Verbindung zwischen IR_L und IR_S . Abbildung aus (Nagel et al., 2014)

1.1.3 Der lytische HSV Infektionszyklus

Zum Eindringen in die Wirtszelle nutzt HSV zwei Mechanismen. Im ersten Fall binden virale Glykoproteine wie gD, gB, gH und gL (Avitabile et al., 2009; Gianni et al., 2009) an Oberflächenrezeptoren der Zelle, wie beispielsweise HVEM (*herpes virus entry mediator*), Nectin-1 oder Nectin-2 (Campadelli-Fiume & Menotti, 2007; Kukhanova et al., 2014). Dies führt zur Fusion der Virushüllmembran mit der zellulären Plasmamembran. Neben dieser rezeptorvermittelten Aufnahme kann das Virus über Endozytose beziehungsweise neutrale Fusion in die Wirtszelle eindringen (Arii et al., 2009; Nicola et al., 2005). Nach der Fusion wird das Viruskapsid ins Zellinnere entlassen und mit Hilfe viraler Tegumentproteine entlang eines Mikrotubulinnetzwerks zum Zellkern transportiert (Sodeik et al., 1997). Das virale Kapsid bindet unter anderem abhängig vom Tegumentprotein U_L36 (VP1/2) und den Nukeoporinen Nup358 und Nup214 an die Poren des Zellkerns (Kukhanova et al., 2014; Smith, 2012), sodass die virale DNA in den Zellkern transportiert werden kann. Dort verbleibt die DNA als extrachromosomale genetische Sequenz, die nicht ins Wirtsgenom integriert (Sandri-Goldin, 2007). Umstritten ist hierbei, ob die DNA im Zellkern zirkularisiert oder als lineares Genom bestehen bleibt. Sobald die virale DNA in den Zellkern eingeschleust ist,

Einleitung

formatieren sich repressive Strukturen an ihr mit dem Ziel, die Genexpression des Virus zu inhibieren. Diesem Mechanismus wirken virale Proteine wie das mit in den Zellkern transportierte Tegumentprotein VP16 und das *infected cell protein 0* (ICP0) (1.4) entgegen (Cai & Schaffer, 1992; Everett, 2000; Everett et al., 1998; Fields et al., 2013; Roizman & Whitley, 2013). Die virale Transkription erfolgt zunächst mithilfe der Wirtspoteine RNA Polymerase II (Pol II), dem *host cell factor 1* (HCF) und dem *octamer-binding protein 1* (Oct-1), sowie viraler Faktoren, wie VP16 (Fields et al., 2013; Kristie, 2007; Mackem & Roizman, 1982). Die Transkription ist streng reguliert und folgt einer für HSV typischen Kaskade (Abbildung 3) (Arvin et al., 2007). Zunächst werden die sechs unmittelbar frühen Gene (auch *IE* für *immediate early*, oder α -Gene) exprimiert. Zu ihnen gehören *ICP0*, *ICP4*, *ICP22*, *ICP27*, *ICP47* und *US1.5*. Die meisten unmittelbar frühen Proteine dienen als Transkriptionsfaktoren für die Expression der frühen Gene (*early genes*, auch β -Gene) (Kukhanova et al., 2014). Ein Großteil der β -Gene ist für den viralen Nukleinsäuremetabolismus und die Virusreplikation verantwortlich. In einem letzten Schritt werden die späten Gene (*late genes*), auch als γ -Gene bezeichnet, transkribiert. Die späten Gene werden in einigen Veröffentlichungen je nach deren Transkriptionszeitpunkt noch einmal in späte (*late*) und sehr späte (*very late*) Gene unterteilt (Arvin et al., 2007). Späte Proteine sind meist Bestandteil struktureller Komponenten des Virions (Wald & Corey, 2007; Whitley & Roizman, 2001).

Nach der Expression der *beta*-Gene erfolgt die Replikation der viralen DNA. Zunächst wird die DNA-Doppelhelix an ihren Replikationsursprüngen (*origin of replication*) ori_L und ori_S entwunden. Die Replikation erfolgt nach dem Prinzip des *rolling circle*, synthetisiert durch ein virales Replisom, bestehend aus DNA Polymerase, dem Helicase-Primase-Komplex und dem *single stranded DNA-binding Protein* ICP8 (*infected cell protein 8*) (Arvin et al., 2007; Muylaert et al., 2011; Skaliter & Lehman, 1994). Hierbei wird ein Konkatermer gebildet, das beim Zusammenbau des Nukleokapsids in Monomere gespalten und in das Kapsid eingelagert wird. Die Konkatemere werden im DR1 Element der α -Genomsequenz voneinander getrennt. Alternativ wird diskutiert, dass zwei Schnitte an den L- und S-Enden der DNA zur Entstehung von Monomeren führen, und dass die terminale α -Sequenz nach dieser Spaltung durch Reparatur entsteht (Arvin et al., 2007). Der Zusammenbau des Viruskapsids erfolgt im Nukleus, wobei die viralen Komponenten VP5, VP19c, VP23 und das U_L26 -Genprodukt eine entscheidende Rolle spielen (Fields et al., 2013). Es werden drei Typen von Viruskapsiden unterschieden: A-, B-, und C-Kapside, wobei nur C-Kapside virale DNA enthalten und somit zu infektiösen Virionen reifen können (Homa & Brown, 1997). Im nächsten Schritt verlässt

das Viruskapsid den Zellkern (Mettenleiter & Minson, 2006). Der wahrscheinlichste Vorgang hierfür ist, dass sich das Kapsid zunächst durch die innere Kernmembran in den perinuklearen Raum abknospt. Durch diesen Vorgang erhält das Virus eine primäre Membranhülle. Diese fusioniert anschließend mit der äußeren Kernmembran und setzt das Kapsid ins Zytosol frei (Campadelli-Fiume, 2007; Granzow et al., 2001; Mettenleiter, 2004; Newcomb et al., 2017; Roizman & Taddeo, 2007). In Epithelzellen wird das Kapsid anschließend mit Hilfe der Kapsidproteine U_L36 (VP1/2) und U_L37 (Sandbaumhüter et al., 2013) entlang des zytosolischen Mikrotubulinetzwerks zu Kompartimenten wie dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) und dem Trans-Golgi Netzwerk transportiert, wo das Virus seine eigentliche Hülle erhält (Mettenleiter, 2004; Turcotte et al., 2005). Das behüllte Virus wird anschließend in einem Vesikel zur Plasmamembran transportiert. Dort wird es in den extrazellulären Raum entlassen (Exozytose), indem das Vesikel mit der Zytoplasmamembran verschmilzt (Campadelli-Fiume, 2007; Mettenleiter, 2004). Ein Replikationszyklus in einer HSV empfänglichen Zelle dauert dabei etwa 18-20 Stunden (Kukhanova et al., 2014).

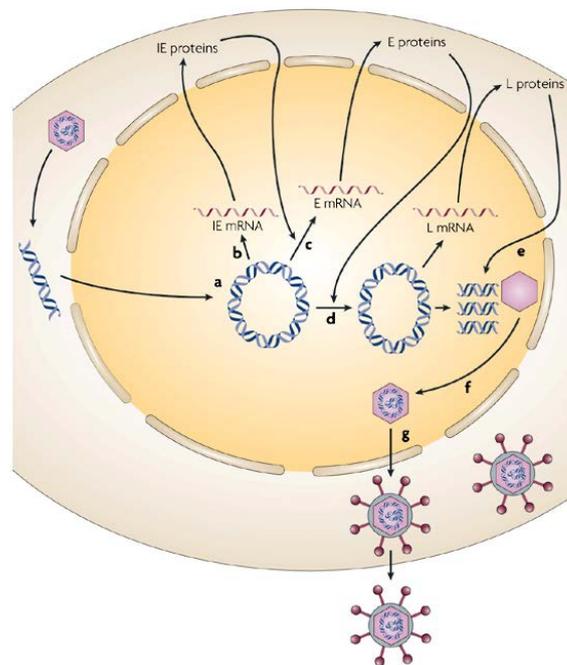


Abbildung 3. Lytischer HSV Infektionszyklus. Nachdem das HS-Viruskapsid in die Zelle eingedrungen ist, wird die virale DNA in den Zellkern transportiert (a). Im Zellkern findet die Genexpression in einer für HSV typischen Kaskade statt. Zunächst werden die unmittelbar-frühen (IE) Gene mit Hilfe der zellulären RNA Polymerase II und dem viralen Protein VP16 transkribiert (b). Die IE mRNA wird anschließend im Zytosol translatiert. Die IE Proteine werden in den Zellkern transportiert, wo sie die Expression der frühen (E) Gene aktivieren (c). Die meisten E Proteine dienen der viralen DNA Replikation im Zellkern (d). Die virale DNA Replikation stimuliert die Expression der späten (L) Gene, deren Produkte Bestandteile des Viruskapsids darstellen (e). Der Zusammenbau des Kapsids und das Beladen mit der viralen DNA finden im Nukleus statt (f). Anschließend verlässt

das Kapsid den Nukleus, erhält an zytoplasmatischen Membranen seine Hülle und verlässt die Zelle mittels Fusion mit der Plasmamembran (g). (Knipe & Cliffe, 2008).

1.1.4 Mechanismen der HSV Latenzetablierung und Virus Reaktivierung

Nach einer akuten Primärinfektion ist HSV in der Lage, in die innervierenden Neurone des periphereren Nervensystems einzudringen und in ihnen Latenz zu etablieren (Arvin et al., 2007; Kramer & Enquist, 2013; Roizman & Whitley, 2013; Spivack & Fraser, 1987). Bei einer okularen, beziehungsweise labialen Infektion sind sensorische Neurone des Trigeminusnervs (TG) der Ort der Latenzbildung (Fields et al., 2013; Sawtell & Thompson, 1992; Thompson & Sawtell, 2006), wobei eine zusätzlich mögliche Latenzetablierung in der Cornea (Kennedy et al., 2011) und im zentralen Nervensystem (Chen et al., 2006; Li et al., 2016) diskutiert wird. Bei einer genitalen Infektion, meist verursacht durch HSV2, wird Latenz in Neuronen der Sakralganglien etabliert (Fields et al., 2013). Im latenten Zustand liegt die virale DNA im Zellkern von Neuronen zirkulär als sogenanntes Episom vor (Efstathiou et al., 1986; Preston & Efstathiou, 2007), das mit Nucleosomen assoziiert ist (Deshmane & Fraser, 1989; Liang et al., 2009; Raja et al., 2016). In diesem Zustand findet keine Virusreplikation und Produktion viraler Partikel statt (Jones, 1998), zudem ist die Genexpression weitestgehend unterdrückt. Wenngleich eine sehr geringe Menge viraler Gentranskripte in diesem Zustand gemessen werden konnte (Fields et al., 2013; Ma et al., 2014; Raja et al., 2016), so akkumuliert ausschließlich das sogenannte *Latency-Associated Transcript* (LAT) in größeren Mengen (Raja et al., 2016; Stevens et al., 1987). Von LAT existieren mehrere durch alternatives Spleißen hervorgegangene RNA Spezies, die zusammengenommen als LATs bezeichnet werden (Fields et al., 2013; Nicoll et al., 2012). Bis jetzt konnte kein LAT Protein nachgewiesen werden (Arvin et al., 2007).

Der Prozess der Latenzetablierung ist noch weitestgehend unverstanden. Es gilt jedoch als sehr wahrscheinlich, dass ein Zusammenspiel des Virus, der Wirtszelle (Eigenschaften der Neurone), und des Immunsystems zur Latenzetablierung führen. Mit Hilfe von *in vivo* Latenzmodellen (Amelio et al., 2006; Diefenbach & Fraefel, 2014; Nicoll et al., 2012; Webre et al., 2012) und *in vitro* Latenz-Zellkultursystemen (Kobayashi et al., 2012) konnten bisher einige an diesem Vorgang beteiligte Faktoren identifiziert werden. Eine wichtige Rolle spielen beispielsweise epigenetische Modifikationen der viralen DNA. Es konnte gezeigt werden, dass im latenten Zustand - anders als in der lytischen Phase - die Promotoren der lytischen Gene nicht mit azetylierten H3 Histonen (Euchromatin) assoziiert sind, sondern mit Heterochromatin-Markern, wie H3K27-me3 und H3K9-me3 (Bloom et al., 2010; Cliffe et al.,

2013; Knipe & Cliffe, 2008; Kwiatkowski et al., 2009). Der LAT-Promoter ist hingegen mit azetylierten Histonen wie H3K9/14-acetyl und H3K4-me2 assoziiert (Bloom et al., 2010; Knipe & Cliffe, 2008; Kubat et al., 2004). In Epithelzellen spielt im lytischen Zustand das Tegumentprotein VP16 eine entscheidende Rolle bei der Derepression der unmittelbar frühen (IE oder α) Gene, indem es nach Eintritt der viralen DNA in den Zellkern Wirtszellfaktoren, wie die Lysin-spezifische Demethylase 1 (LSD1) rekrutiert und diese somit vom HCLR (HDAC/CoREST/LSD1/REST) DNA-Repressorkomplex entkoppelt (Roizman & Whitley, 2013; Roizman et al., 2011). Zudem rekrutiert VP16 den *host cell factor 1* (HCF1), sowie das *octamer-binding protein 1* (Oct-1) an die Promotoren der α -Gene, was zur initialen Transkription der viralen IE Gene durch das zelluläre Transkriptom führt (Fields et al., 2013; Kristie, 2007; Roizman et al., 2005; Wysocka & Herr, 2003). In Neuronen konnte beobachtet werden, dass beim Transport der Viruskapside durch die Axone virale Tegumentproteine wie VP16 nur sehr ineffizient kotransportiert werden, sodass kein VP16 in den Zellkern der Neurone gelangt (Hafezi et al., 2012; Luxton et al., 2005). Das hat zur Folge, dass keine IE Genexpression stattfinden kann. Da unmittelbar frühe virale Proteine wie ICP0 und ICP4 (Everett, 2000; Everett et al., 2006; Gu & DeLuca, 1994; Kristie & Roizman, 1986; Lester & DeLuca, 2011) entscheidend für das Fortschreiten des lytischen Infektionsverlaufs sind (Cai & Schaffer, 1992; Cuchet-Lourenço et al., 2012; Lee et al., 2016), kommt die Virusproduktion ohne sie zum Stillstand.

Die Latenzetablierung kann auch durch das Fehlen bestimmter Wirtszellfaktoren verursacht werden (Kristie, 2015). Wie bereits erwähnt, spielen bei der Initiierung der IE-Gentranskription in Epithelzellen zelluläre Transaktivatoren wie HCF eine wichtige Rolle (Kristie, 2007; Nicoll et al., 2012). HCF liegt in Neuronen jedoch ausschließlich im Zytoplasma vor. Erst nach Stressinduktion (zum Beispiel bei einer Explantation der Ganglien) transloziert HCF in den Zellkern, was zur Virus Reaktivierung führt (Arvin et al., 2007; Fields et al., 2013; Kristie et al., 1999). Da ausschließlich LAT im latenten Zustand in den Neuronen akkumuliert, wird den Transkripten hierbei ebenfalls eine funktionelle Rolle zugeschrieben. Ihre genaue Funktion ist derzeit noch umstritten. In Neuronen konnte bei LAT-defizienten Viren eine erhöhte lytische Genexpression nachgewiesen werden (Chen et al., 1997; Nicoll et al., 2016). Durch das Fehlen von LAT und der damit einhergehenden lytischen Genexpression konnte eine erhöhte Neuronenmortalität im Trigemiusnerv von Kaninchen und Mäusen, wie auch in Zellkultur festgestellt werden (Ahmed et al., 2002; Perng et al., 2000; Thompson & Sawtell, 2001). Daraus wurde abgeleitet, dass LATs eine Rolle beim Schutz der Neurone vor Apoptose spielen (Ahmed et al., 2002; Perng et al., 2000) und weniger bei der

Latenzetablierung (Javier et al., 1988). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass LATs die lytische Genexpression während der Latenz aktiv unterdrücken (Cliffe et al., 2009; Wang et al., 2005). Durch diese Fähigkeit könnten sie wichtig für die Aufrechterhaltung des latenten Zustands in Neuronen sein.

Im Zusammenhang mit Latenzetablierung wurde auch eine Rolle des Immunsystems diskutiert. Ausschlaggebend hierfür war die Beobachtung, dass CD8⁺ T-Zellen 5 bis 7 Tage nach Infektion die infizierten Ganglien infiltrieren (Divito et al., 2006) und in diesen aktiviert bleiben (Khanna et al., 2003; Verjans et al., 2007). Zudem konnte ein Anstieg an Zytokinen wie IFN- γ und Chemokinen gemessen werden, was zur Unterdrückung der Virusreplikation führte (Bigley, 2014; Fields et al., 2013; Halford & Gebhardt, 2011).

1.2 Modellsysteme zur Untersuchung der HSV2 Infektion, Pathogenese, Latenz und Reaktivierung

Zur Untersuchung der HSV Pathogenese, sowie zur Aufklärung von Mechanismen der Latenzetablierung und Initiierung der Reaktivierung aus der Latenz wurden zahlreiche Modelle etabliert. Zur Untersuchung der akuten HSV Infektion und zur Austestung antiviraler Reagenzien werden vorwiegend Experimente *in vitro* in immortalisierten Zelllinien durchgeführt. Eine Standardzelllinie zur HSV Erforschung sind Verozellen, Nierenepithelzellen aus der grünen Meerkatze (Cai & Schaffer, 1992; Field et al., 2013; Halford et al., 2010; Stow & Stow, 1986; Halford & Schaffer, 2000). Ein Nachteil dieser Zelllinie kann jedoch darin gesehen werden, dass Nierenzellen nicht den Zelltyp der eigentlichen HSV Infektion repräsentieren. Als Alternative wurden daher primäre Neuronen als *in vitro* Model entwickelt, wobei neuronale Zelllinien vor allem zur Analyse der HSV Latenz herangezogen werden (Kim et al., 2014; Kobayashi et al., 2012; Wilson & Mohr, 2012).

Neben 2D-Zellkulturmodellen können Biopsien verstorbener HSV-positiver Patienten oder Cornea Explantate (Drevets & Carr, 2016; Efstathiou et al., 1986) verwendet werden, um eine HSV Infektion direkt im „natürlichen Wirt“ zu untersuchen. Ein Nachteil ist jedoch, dass diese Präparate sehr limitiert und deshalb schwer erhältlich sind. Neben den *in vitro* Modellen spielen vor allem Tiermodelle eine zunehmend wichtige Rolle. Tiermodelle haben den Vorteil, dass in ihnen komplexe Zusammenhänge der Infektion untersucht werden können (Divito et al., 2006; Efstathiou & Preston, 2005; Hill et al., 2012; Kennedy et al., 2011; Menendez & Carr, 2017). Dabei werden, um den Einfluss des Hormonhaushalt oder des

Immunsystems auf die HSV Infektion zu untersuchen, vorzugsweise transgene Tiere eingesetzt, in denen beispielsweise wichtige Komponenten der untersuchten Signalwege deletiert oder inaktiviert wurden (Conrady et al., 2011; Parker et al., 2016; Halford et al., 2006; Webre et al., 2012). Zur Untersuchung der HSV Infektion werden die entsprechenden Tiere hauptsächlich über die okulare Route, das heißt über die Cornea, infiziert (Gordon et al., 2003; Halford & Schaffer, 2001; Halford et al., 2010; Halford et al., 2011; Thompson & Sawtell, 2006). Eine Alternative bietet die Infektion über die Sohle der Hinterpfoten (Halford et al., 2013; Ohashi et al., 2011; Subak-Sharpe et al., 1984). Zur Charakterisierung einer HSV2 Infektion wird zudem häufig eine genitale Infektion durchgeführt (Conrady et al., 2011; Halford et al., 2011, 2013; Stanberry, 1991). Beim okularen Infektionsmodell, welches auch in dieser Arbeit angewandt wurde, kann die Effizienz der Virusreplikation in der Cornea unter dem Mikroskop (Halford et al., 2010), sowie mit Hilfe von Abstrichen der Tränenflüssigkeit (Halford & Schaffer, 2000) untersucht werden. Die Latenzetablierung in sensorischen Neuronen der TGs, sowie Virus Reaktivierungsprozesse, können in diesem Modell *in vivo* über Induktion durch hyperthermischen Stress (Sawtell & Thompson, 1992), sowie *ex vivo* durch Präparieren der latent infizierten TGs im Detail analysiert werden (Arbuckle et al., 2014; Liang et al., 2009; Proença et al., 2016). Beide Verfahren trugen bereits entscheidend zur Identifizierung wichtiger Reaktivierungsfaktoren bei (Webre et al., 2012). Generell werden als Tiermodelle vor allem Meerschweinchen (Scriba, 1975), Kaninchen (Kibrick, 1966; Nesburn et al., 1977) und Mäuse (Stevens & Cook, 1971) verwendet. Alle drei Versuchstierarten lassen sich mit dem humanen Herpes-Simplex-Virus Typ 1 und 2 infizieren, das heißt, dass das Virus am Ort der Primärinfektion repliziert und Latenz in den innervierenden Neuronen etabliert. Meerschweinchen werden vor allem zur Analyse der HSV2 Genitalinfektion und zur Identifizierung neuer HSV Vakzine eingesetzt (Bourne et al., 2003; Halford et al., 2013). Kaninchen kommen überwiegend bei der Untersuchung der HSV1 Latenz nach okulärer Infektion zum Einsatz, oft kombiniert mit der Austestung antiviraler Medikamente (Kumar et al., 2010; Nesburn et al., 1994; Webre et al., 2012). Zudem konnte festgestellt werden, dass viele HS-Virusstämme nach der Latenzetablierung in Kaninchen spontan reaktivieren können (Hill et al., 2012; Kaufman et al., 1996; Webre et al., 2012), ein Phänomen, das auch beim Menschen beobachtet werden kann (Fields et al., 2013; Mark et al., 2008). Aus diesem Grund wird das Kaninchenmodell auch zur Untersuchung spontaner Reaktivierungsprozesse herangezogen. Die Haltung und Zucht, vor allem von Inzuchttieren und transgenen Kaninchen, ist jedoch sehr kostenintensiv und aufwendig (Pennington et al., 2017). Aus diesem Grund werden Mäuse im Rahmen von

in vivo HSV Versuchen am häufigsten eingesetzt. Die Haltung und Zucht dieser Versuchstiere ist vergleichsweise günstig, und es existieren zahlreiche Inzuchtstämme und transgene Tiere (Dasgupta & Benmohamed, 2012; Pennington et al., 2017; Webre et al., 2012). Dabei verringert der Einsatz von Inzuchtstämmen, aufgrund des identischen genetischen Hintergrunds Schwankungen und Varianzen innerhalb eines Experiments. Zudem konnte gezeigt werden, dass verschiedene Mausstämme unterschiedlich auf eine HSV Infektion reagieren, die überwiegend auf die genetischen Hintergründe und das Immunsystem der verwendeten Tiere zurückzuführen sind (Casparly et al., 1980; Lundberg et al., 2008; Webre et al., 2012; Zawatzky et al., 1982). So konnte gezeigt werden, dass der Inzucht Mausstamm C57Bl/6 aufgrund seiner Fähigkeit große Mengen $IFN\alpha/\beta$ zu produzieren, besonders resistent gegen HSV1 und vor allem HSV2 Infektionen ist (Casparly et al., 1980; Zawatzky et al., 1982) und Infektionen mit virulenten Virusstämmen wie HSV2 MS überlebt (Lopez, 1975; Zawatzky et al., 1982).

1.3 Antivirale Wirkstoffe und Impfstoffentwicklung

Durch die intensive Erforschung der Herpesviren konnten Medikamente entwickelt werden, die es Patienten ermöglichen ohne größere Beeinträchtigungen mit dem Virus zu leben. Dennoch ist HSV aufgrund seiner Fähigkeit Latenz zu etablieren in der Lage, ein Leben lang in seinem Wirtsorganismus zu verweilen und unter bestimmten Bedingungen zu reaktivieren. Bis heute existieren keine Medikamente, die das Virus vollständig aus dem menschlichen Organismus entfernen (Kukhanova et al., 2014). Zudem sind keine Impfstoffe erhältlich, die einen Schutz gegen eine Erstinfektion mit HSV bieten (Halford, 2014; Johnston et al., 2016).

Auf dem Markt erhältliche antivirale Medikamente wie Aciclovir, Vanciclovir oder Famiciclovir greifen als Nucleosid-Analoga in den Mechanismus der Virusreplikation ein (Kukhanova et al., 2014). Aciclovir wird durch die virale Thymidinkinase aktiviert und fungiert in seiner aktivierten Form (als Triphosphat) als Guanodin-Analogon. Der Einbau des aktivierten Wirkstoffs in die virale DNA, anstelle von Guanodin, führt zum anschließenden Kettenabbruch der DNA-Synthese (Elion et al., 1977; Schaeffer et al., 1978). Patienten, die Nucleosid Analoga-resistente HSV Stämme in sich tragen, können mit *Foscarnet* (PFA) behandelt werden. *Foscarnet* ist ein Pyrophosphat Analogon, das in der Lage ist, das aktive Zentrum der viralen DNA Polymerase zu besetzen, um somit die Bindung neuer Nucleotide für die DNA-Synthese zu inhibieren (Öberg, 1989). Neben Inhibitoren der Virusreplikation wurden auch Wirkstoffe untersucht, die das Eindringen in die Wirtszelle verhindern sollen.

Ein Beispiel ist das natürlich vorkommende Lactoferrin (Berlutti et al., 2011). Lactoferrin bindet kompetitiv zu Wirtszellrezeptoren an virale Glykoproteine und verhindert so die rezeptorvermittelte Virusaufnahme in die Zelle. In den letzten Jahren wurden zudem antiherpetische Wirkstoffe synthetisiert, die den viralen Helikase-Primase Komplex (U_L5 , U_L52 und U_L8) inhibieren.

Der aktuelle Fokus zur Bekämpfung von Infektionen mit Herpes-Simplex-Viren liegt auf der Entwicklung von Impfstoffen. Ein Schwerpunkt stellen hierbei Impfstoffe gegen HSV2 dar. Dabei können verschiedene Impfstoffarten unterschieden werden (Halford, 2014). *Subunit*-Vakzine (Bernstein et al., 2011; Bourne et al., 2005; Weir et al., 1989), die nur einen Teil der HSV-Antigene enthalten und daher als besonders sichere Kandidaten gelten (Halford, 2014), wurden lange Zeit intensiv erforscht. Die am detailliertesten untersuchten *Subunit*-Vakzine sind Glykoprotein gB und gD enthaltende Impfstoffe (Bernstein et al., 2010; Bernstein et al., 2011; Bourne et al., 2003), deren Wirksamkeit bei einer HSV2 Infektion in klinischen Studien jedoch bislang nicht bestätigt werden konnte (Cohen, 2010; Corey et al., 1999; Mertz et al., 1990; Straus et al., 1997). Derzeit befindet sich ein weiteres *Subunit*-Vakzin, GEN-003 der Firma Genocea, in Vorbereitung für eine Phase III klinische Studie. Dieses Vakzin enthält das Glykoprotein gD in Kombination mit einem Fragment des unmittelbar frühen Proteins ICP4 und dem M2 Matrixprotein als Adjuvans (Fenske, 2017; Skoberne et al., 2013; Wald, 2014). Als erfolgversprechender gelten derzeit jedoch sogenannte Vollvakzine. Vollvakzine können inaktivierte Viruspartikel (Totimpfstoffe), replikationsinkompetente Viren, oder replikationskompetente attenuierte Lebendvakzine sein (Aurelian et al., 1999; Awasthi et al., 2012; Delagrave et al., 2012; Halford et al., 2010; Halford et al., 2011; Mundle et al., 2013). Ein Beispiel eines attenuierten Lebendvakkzins (*live-attenuated vaccine*) ist eine HSV2 Mutante, deren ICP0 durch Deletion der NLS-Domäne (nukleares Lokalisierungssignal) inaktiviert wurde (Halford et al., 2010). Die Mutante zeigte im Maus- und Meerschweinchen - Modell im Vergleich mit einer gD *Subunit*-Vakzine eine deutlich höhere Wirksamkeit bei einer HSV2 Wildtyp-Infektion (Halford et al., 2011; Halford et al., 2013). Im Jahr 2016 wurde eine klinische Studie der Phase I mit dieser als „Theravax HSV2“ bezeichneten Lebendvakzine mit vielversprechenden Ergebnissen (Halford, 2017) durchgeführt. Kritiker argumentieren jedoch, dass attenuierte Lebendvakzine aufgrund ihrer Fähigkeit zu replizieren und gegebenenfalls Latenz zu etablieren eine Gefahr, besonders für immunsupprimierte Patienten, darstellen könnten (Aurelian, 2004; Halford, 2014). Um dieses Risiko zu umgehen wurden replikationsinkompetente Viren wie das HSV2 ACAM-529 (HSV529) generiert. In dieser Vakzine wurden die essentiellen Gene U_L5 und U_L29 durch Deletion entfernt (Bernard

et al., 2015; Da Costa et al., 2000; Mundle et al., 2013). Im Tiermodell zeigte sich auch hier eine effizientere Wirkung als bei der *Subunit* gD Vakzine (Delagrave et al., 2012). Derzeit befindet sich dieser Impfstoff zur Untersuchung in einer klinischen Phase II Studie. Neben den erwähnten Beispielen existieren noch weitere Vakzine-Kandidaten (Johnston et al., 2016). Die meisten potentiellen Vakzine sollen jedoch der therapeutischen Behandlung dienen. Ein präventiver Impfstoff existiert zur Anwendung am Menschen derzeit nicht.

1.4 Das Infected Cell Protein 0 (ICP0)

Das HSV2 *infected cell protein 0* (ICP0), auch bekannt unter den Synonymen $\alpha 0$ oder Vmw IE 118 (aufgrund der apparenten molekularen Masse von 118 kDa; IE für *immediate early*), ist ein multifunktionelles virales Regulatorprotein, das mit einer Vielzahl viraler und zellulärer Proteine in Zusammenhang gebracht wird (Gu, 2016). Das ICP0-kodierende Gen (*ICP0*, oder auch R_{L2}) liegt diploid im Genom von Herpes-Simplex-Virus Typ 1 und Typ 2 vor, wobei jeweils eine Kopie in einer der beiden langen repetitiven Regionen (R_L) lokalisiert ist (Preston et al., 1978). Der offene Leserahmen des HSV2 *ICP0* umfasst 3.065 Basenpaare (bp) (Virusstamm HG52) und besteht aus drei Exons (Abbildung 10) (Arvin et al., 2007). Die entsprechenden Introns scheinen *in vitro*, sowie *in vivo* keine Funktion zu haben (Gu, 2016; Natarajan et al., 1991). Auch konnte in infizierten Zellen in Zusammenhang mit *ICP0* bislang kein alternativer Spleißprozess nachgewiesen werden (Gu, 2016). Das HSV2 ICP0 Protein besteht aus 824 Aminosäuren (AS). ICP0 des HSV1 ist mit 775 AS geringfügig kleiner (Abbildung 4).

Beide Proteine sind zu 54,2 % identisch (Vergleich der AS-Sequenzen von HSV1 ICP0 [AER37939] und HSV2 ICP0 [YP_009137151] mit der SIM Alignment Funktion der ExPasy *Software*). Zudem ist ICP0 unter den Alphaherpesviren hoch konserviert (Arvin et al., 2007). Da R_{L2} zu den unmittelbar frühen Genen gehört, ist ICP0 eines der ersten viralen Proteine, das in der Wirtszelle exprimiert wird (Roizman et al., 2005). ICP0 besitzt mehrere funktionelle Domänen, über die es wichtige Funktionen ausübt. Zu diesen gehören unter anderem das nukleare Lokalisationssignal (NLS), das den Transport des Proteins in den Zellkern ermöglicht, ein USP7 Bindemotiv, sowie eine im N-Terminus liegende Cysteinreiche C3HC4 RING-finger (*really interesting new gene*) Domäne (Abbildung 4) (Freemont et al., 1991)

ICP0 wurde außerdem als Bestandteil des inneren Teguments identifiziert (Delboy et al., 2010). Die vermutlich wichtigste Funktion des *Infected Cell Proteins 0* besteht darin, die

virale Genexpression während der lytischen Phase zu steigern und die Produktion von Virionen bei der Reaktivierung aus der Latenz zu ermöglichen (Fields et al., 2013; Gu, 2016; Halford & Schaffer, 2001). So konnte gezeigt werden, dass ICP0-defiziente HS-Viren nach der Reaktivierung keine infektiösen Partikel bilden (Halford & Schaffer, 2001; Thompson & Sawtell, 2006). Aufgrund seiner Bedeutung für den Infektionsverlauf konzentriert sich ein Großteil der HSV Forschung auf die Untersuchung der ICP0-Wirkmechanismen. Größtenteils wurden diese Experimente bislang mit Herpes-Simplex-Virus Typ 1 durchgeführt. Da die für ICP0 essentiellen Domänen jedoch in ICP0 aus HSV1 wie aus HSV2 vorkommen und eine Homologie von 65% - 87% aufweisen (Halford et al., 2010), kann davon ausgegangen werden, dass beide ICP0 Proteine eine ähnliche oder gar identische Funktion ausüben.

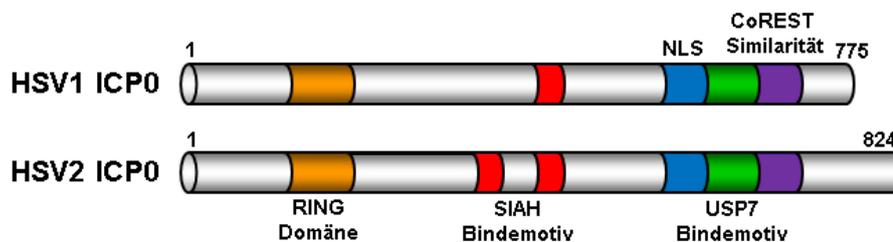


Abbildung 4. Schematische Darstellung der funktionellen Domänen der ICP0 Proteine HSV1 ICP0 ist mit 775 Aminosäuren (AS) geringfügig kürzer als ICP0 aus HSV2, das eine Länge von 824 AS aufweist. Beide Proteine besitzen eine RING (*really interesting new gene*) Domäne (gelb), ein nukleares Lokalisierungssignal (NLS, blau), ein USP7 (Ubiquitin-spezifische Protease 7) Bindemotiv (grün), sowie eine Sequenz, die dem zellulären CoREST Protein ähnelt (violett). HSV1 ICP0 besitzt zudem ein SIAH-Konsensus-Bindemotiv, wohingegen ICP0 aus HSV2 zwei SIAH-Bindemotive enthält (rot).

Für die meisten bereits charakterisierten Funktionen spielt die RING Domäne, die ICP0 eine E3 Ubiquitinligase Funktion verleiht (Boutell et al., 2002), eine entscheidende Rolle. Über seine RING Domäne ist ICP0 in der Lage, seine Zielproteine für den proteasomalen Abbau (1.6) zu markieren (Boutell et al., 2002). Zelluläre Proteine die von ICP0 polyubiquitiniert werden, sind vor allem Bestandteile zellulärer Abwehrmechanismen, die an der Eindämmung der HSV Infektion beteiligt sind. Zu ihnen gehören Faktoren der intrinsischen Immunabwehr, wie die nuklearen Domänen (ND10), auch bekannt als Kremer-Körper oder PML onkogene Domänen (PODs) (Borden, 2002; Everett & Chelbi-Alix, 2007). ND10s sind aus verschiedenen Isoformen des PML Proteins (*promyelocytic leukemia*), Sp100 (*speckled protein of 100 kDa*), hDaxx (*human death domain-associated protein 6*), und ATRX (*alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked*) aufgebaut (Lanfranca et al., 2014). Während einer Virusinfektion inhibieren diese Proteine aktiv die virale Transkription und

Einleitung

Replikation (Everett, 2001; Everett et al., 2006; McNally et al., 2008; Tavalai & Stamminger, 2008). Zu Beginn der Herpesinfektion kolokalisiert ICP0 im Zellkern mit den ND10s und ubiquitiniert Sp100 und PML, was zur Auflösung der subnuklearen Strukturen führt (Everett, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass ICP0 hierbei bevorzugt SUMO (*small ubiquitin-like modifier*) modifiziertes PML ubiquitiniert (Boutell & Everett, 2003; Cuchet-Lourenço et al., 2011). Wird *ICP0* in Herpes-Simplex-Virus Typ 1 deletiert, ist das Virus in seinem Wachstum deutlich attenuiert (Everett et al., 2008; Negorev et al., 2006; Sacks & Schaffer, 1987). Bei einer gleichzeitigen Deletion zellulärer Kernkomponenten wie PML und Sp100 konnte der attenuierte Phänotyp der ICP0-Mutante in Teilen wieder aufgehoben werden (Everett et al., 2008).

Zur Steigerung der Virusreplikation greift ICP0 zudem direkt in Mechanismen der zellulären Reparaturmaschinerie ein. Es konnte gezeigt werden, dass ICP0 in der Lage ist, die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase C (DNA-PKc) für den proteasomalen Abbau zu markieren (Parkinson et al., 1999). Der Abbau der Untereinheit führt zur Unterbrechung der (nicht-homologen *end-joining*) DNA-Reparatur und gleichzeitig zu einer verstärkten Virusreplikation (Lees-Miller et al., 1996). Zudem ist ICP0 in der Lage die zelluläre Checkpoint-Kinase 2 (Chk2), über eine ATM-abhängige Phosphorylierung zu aktivieren, was zur Arretierung des Zellzyklus in der G2/M Phase führt und dadurch die Bedingungen für die Virusreplikation optimiert (Boutell & Everett, 2013; Lanfranca et al., 2014; Li et al., 2008).

Eine weitere Gruppe von Zielproteinen sind epigenetische Modifikatoren wie Histon-Deacetylasen (HDACs). ICP0 enthält in seinem C-Terminus eine Serin-reiche Region, die eine große Ähnlichkeit mit coREST, dem zellulären Corepressor für den Transkriptionsrepressor REST (*repressor element 1 silencing transcription factor*), aufweist (Abbildung 4) und auf eine Interaktion mit dem coREST/REST/HDAC-Komplex hindeutet (Gu & Roizman, 2009). Die Histondeacetylasen 1 und 2 haben zum Ziel, aktive Marker (Acetylreste) von der viralen DNA zu entfernen, um die virale Transkription zu inhibieren. ICP0 wirkt diesem Prozess entgegen indem es coREST/REST von den HDACs dissoziiert (Gu & Roizman, 2007; Gu & Roizman, 2009; Gu et al., 2005; Roizman et al., 2005).

ICP0 inhibiert auch Komponenten des angeborenen Immunsystems, die durch die Virusinfektion aktiviert wurden. So wurde beschrieben, dass ICP0, um Interferon (IFN) α/β -Signalwege zu inhibieren, zellulären Faktoren wie STAT-1 (*signal transducer and activator of transcription 1*) (Halford et al., 2006; Halford et al., 2010) und vermutlich IFI16 (*IFN γ*

inducible protein 16) (Orzalli et al., 2012) entgegenwirkt. IFN stimuliert wiederum die Expression mehrerer antiviraler Faktoren, beispielsweise PML und Sp100 (Regad & Chelbi-Alix, 2001). Im Gegensatz zu Wildtyp HSV sind ICP0-defiziente Viren in Gegenwart von IFN α/β deutlich in ihrem Replikationsverhalten attenuiert (Halford et al., 2010; Härle et al., 2002; Mossman et al., 2000b). Des Weiteren wird angenommen, dass ICP0 mit Bestandteilen des Toll-like Rezeptor 2 (TLR-2)- induzierten Signalweges wechselwirkt (van Lint et al., 2010). TLRs spielen bei der Erkennung von Pathogenen und der darauffolgenden Aktivierung des Typ 1 IFN eine Rolle (Lester & Li, 2014). ICP0 wirkt dem entgegen, indem es TLR Adapter-Moleküle wie MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*) polyubiquitiniert und dadurch dem proteasomalen Abbau zuführt (van Lint et al., 2010).

Es ist anzunehmen, dass ICP0 mit noch einer weitaus größeren Anzahl an zellulären Proteinen interagiert. Diskutiert werden unter anderem die E3 Ubiquitinligase RFN8 (Lilley et al., 2010), die bei der DNA-Reparatur eine Rolle spielt, oder p53 (Boutell & Everett, 2003). Im Laufe der Infektion akkumuliert ICP0 im Zytoplasma. Seine dortige Funktion ist noch weitgehend ungeklärt. In diesem Zusammenhang konnten Paladino und Kollegen jedoch zeigen, dass ICP0 im Zytoplasma die Aktivierung des *Interferon response factor 3* (IFR3) inhibiert (Paladino et al., 2010).

Neben der Ubiquitinierung von Zielproteinen ist ICP0 in der Lage Homo-Dimere zu bilden (Ciuffo et al., 1994) und sich selbst zu ubiquitinieren. Aufgrund dieser Autoubiquitinierung ist ICP0 instabil (Boutell et al., 2002; Canning et al., 2004; Zhu et al., 2014). Interagiert ICP0 jedoch mit der Ubiquitin-spezifischen Protease 7 (auch beschrieben als Herpes-assoziierte Ubiquitin-spezifische Protease [HAUSP]), entfernt diese von ICP0 die Ubiquitinmodifizierungen und wird dabei meist selbst ubiquitiniert und proteasomal abgebaut (Boutell et al., 2005). Die Interaktion von ICP0 mit USP7 erfolgt unter anderem über ein Bindemotiv (Canning et al., 2004).

Neben den aufgelisteten Domänen besitzt ICP0 hochkonservierte Bindemotive über die es mit dem zellulären *Seven in Absentia Homolog* Protein SIAH-1 interagiert (Abbildung 4). Interessanterweise enthält HSV1 ICP0 ein singuläres SIAH-Bindemotiv, wohingegen ICP0 von HSV2 vermutlich zwei Motive aufweist (Nagel et al., 2011). Die entsprechenden Aminosäuresequenzen in HSV2 sind in Tabelle 29 dargestellt. Die Erforschung der ICP0:SIAH Interaktion und deren Rolle für den HSV2 Infektionsverlauf ist Thema der vorliegenden Arbeit.

1.5 Die zellulären SIAH E3 Ubiquitinligasen

Mitglieder der *Seven in Absentia Homolog (SIAH)*-Familie sind zelluläre Faktoren, die mit Hilfe einer RING-Domäne E3 Ubiquitinligase Funktion ausüben. Sie markieren dadurch die entsprechenden Zielproteine für den proteasomalen Abbau (1.6) (House et al., 2009). Das erste Mitglied der Familie wurde in *Drosophila* beschrieben und als *Seven in Absentia (Sina)* bezeichnet (Carthew & Rubin, 1990). In *Drosophila* spielt Sina eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung des Facettenauges (Carthew & Rubin, 1990; Carthew et al., 1994; Tang et al., 1997). Sina ist evolutionär hoch konserviert, im Menschen konnten zwei Sina Homologe identifiziert werden die folglich als *Seven in Absentia Homologs (SIAH)* bezeichnet werden. Die zwei menschlichen Sina Homologe, SIAH-1 und SIAH-2, werden durch zwei verschiedene Gene kodiert (Hu et al., 1997). SIAH-1 ist mit 282 Aminosäuren geringfügig kleiner als das SIAH-2 Protein von 324 Aminosäuren (Hu et al., 1997). Beide Proteine stimmen jedoch zu 77% in ihrer Sequenz überein und weisen eine RING-Domäne und eine C-terminale Substratbindedomäne auf (Abbildung 5) (Della et al., 1993; House et al., 2009; Hu et al., 1997). Aufgrund ihrer E3 Ubiquitinligase Funktion interagieren beide SIAH Proteine mit einer Vielzahl zellulärer Faktoren, die Komponenten verschiedener Signalwege sind (House et al., 2009). Dabei bindet SIAH meist über seine Substratbindedomäne an konservierte PxAxVxPxxR Konsensus-Bindemotive im Zielprotein (House et al., 2003). Zu diesen SIAH-Zielproteinen gehören unter anderem Komponenten des Östrogen-Signalwegs, der Hypoxie-Antwort, der DNA-Reparaturmaschinerie und des Ras-Signalwegs (Dimitrova et al., 2010; Frasor et al., 2005; House et al., 2009; Matsuzawa & Reed, 2001; Nakayama et al., 2009; Winter et al., 2008). Die Wirkmechanismen beider SIAH-Ubiquitinligasen können sich dabei teilweise unterscheiden. Über die Interaktion bei der Hypoxie-Antwort scheint SIAH-2 eine Rolle bei der Förderung des Wachstums von Brustkrebstumoren auszuüben (House et al., 2009; Möller et al., 2009). SIAH-1 hingegen scheint bei Leberkrebs an der Unterdrückung der Tumorentwicklung beteiligt zu sein, indem es Apoptose in malignen Hepatozyten induziert (Yoshibayashi et al., 2007). In Bezug auf den Ras-Signalweg konnte festgestellt werden, dass SIAH-2 einen negativen Ras-Regulator, Sprouty2, polyubiquitiniert, und somit die Ras Signaltransduktion fördert (Nadeau et al., 2007).

Da Ras ein Onkogen ist, und auch die anderen beschriebenen Signalwege mit der Entwicklung von Tumoren assoziiert sind, liegt ein Schwerpunkt der SIAH Forschung auf der Entwicklung neuer Krebstherapieansätze, mit SIAH als Zielstruktur (House et al., 2009; Wong & Moller, 2013). Neben der Interaktion mit Tumor-assoziierten Faktoren wird angenommen, dass SIAH-1 eine Rolle bei der Homöostase der präsynaptischen aktiven Zonen (AZ)

verschiedener Neurone spielt (Waites et al., 2013), indem es mit Bestandteilen der Präsynapse wie Bassoon und Piccolo, die am Aufbau der aktiven Zone beteiligt sind, interagiert (Cases-Langhoff et al., 1996; Fejtova & Gundelfinger, 2006). Da diese beiden Proteine zusätzlich eine Funktion bei der Ausbildung von Synapsen einnehmen (Waites et al., 2005), kann eine Beteiligung von SIAH auch in diesem Prozess nicht ausgeschlossen werden. Diese Hypothese kann unter anderem dadurch gestützt werden, dass SIAH auch mit Komponenten synaptischer Vesikel (SV) wie dem SV Membranprotein Synaptophysin interagiert (Wheeler et al., 2002).

Teile der bisherigen SIAH-Forschungsergebnisse wurden im Mausmodell gewonnen. Aufgrund seiner evolutionären Konservierung existieren drei murine Sina Homologe die als SIAH-1A, SIAH-1B und SIAH-2 bezeichnet werden und durch unabhängige Gene kodiert werden (Della et al., 1993). Es konnte festgestellt werden, dass sich das humane SIAH-1 Protein und das murine SIAH-1A in nur einer Aminosäure unterscheiden, und dass das murine und humane SIAH-2 zu 96,6% identisch sind (Hu et al., 1997). Aufgrund der fast identischen Sequenzen von SIAH-1A und SIAH-1B wird davon ausgegangen, dass das SIAH-1 Gen im Laufe der Evolution in der Maus dupliziert wurde (Della et al., 1993). Die hohen Homologien zwischen humanem und murinem SIAH-1 und SIAH-2 machen deshalb die Maus zu einem idealen Versuchstiermodell. So konnte mit Hilfe transgener Mäuse gezeigt werden, dass Böcke bei einem *knock-out* von SIAH-1A steril sind (Dickins et al., 2002). Ein Doppel-*knock-out* von SIAH-1A und SIAH-2 ist letal, wohingegen ein SIAH-2 *knock-out* (vermutlich aufgrund der Kompensation durch SIAH-1) zu keinen signifikanten phänotypischen Veränderungen in der adulten Maus führt (Frew et al., 2003). Diese Ergebnisse unterstreichen noch einmal die Bedeutung der Funktion beider SIAH-Proteine.

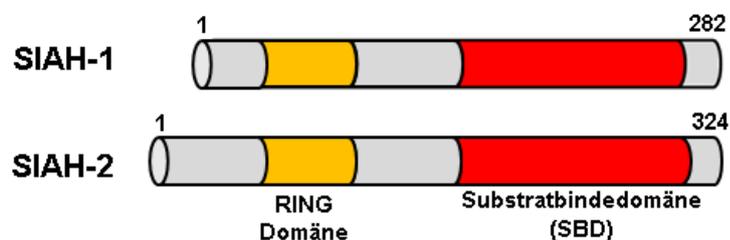


Abbildung 5. Die Seven in Absentia Homologe SIAH-1 und SIAH-2. Beide SIAH Proteine besitzen in ihrer Proteinsequenz eine konservierte RING-Domäne, sowie eine Substratbindedomäne, die konservierte PxAxVxP-Konsensusmotive in ihren Zielproteinen erkennt. SIAH-1 hat 282 Aminosäuren (AS), wohingegen SIAH-2 aus 324 AS besteht. Schema nach Dr. Claus-Henning Nagel (Heinrich-Pette-Institut).

1.5.1 Interaktion von SIAH-1 mit dem Herpes-Simplex-Virus Protein ICP0

Neben der Ubiquitinierung von zellulären Proteinen konnte auch eine Interaktion von SIAH-1 mit dem HSV *infected cell protein 0* (ICP0) nachgewiesen werden (1.4), sodass der Proteinfamilie eine mögliche antivirale Bedeutung zugeschrieben wurde (Nagel et al., 2011). Transfektionsexperimente haben ergeben, dass SIAH-1 direkt über seine Substratbindedomäne mit den PxAxVxP-Motiven in ICP0 interagiert und das virale Protein polyubiquitiniert, was zum Abbau von ICP0 führen kann. Diese Beobachtungen konnten in Transfektionsexperimenten beim HSV2 ICP0 Protein, sowie bei ICP0 aus HSV1 gemacht werden (Nagel et al., 2011).

SIAH Proteine werden (ubiquitär) in fast allen Zelltypen und Geweben exprimiert (Hu et al., 1997), wobei in Mäusen eine verstärkte Expression in olfaktorischen Epithelzellen (SIAH-2) und Nervenzellen, dem Ort wo Herpes-Simplex-Viren replizieren und Latenz etablieren, beobachtet wurde (Della et al., 1993; Hu et al., 1997; Moriyoshi et al., 2004). Es wurde daher spekuliert, dass SIAH eine Rolle bei der Inhibierung der Reaktivierung latenter Herpesviren spielen könnte, aber auch bei der Repression der lytischen Virusinfektion in anderen Geweben des Wirtsorganismus (Nagel et al., 2011).

1.6 Das Ubiquitin-Proteasomen-System

Zum Abbau extra- und intrazellulärer Proteine bedient sich die eukaryotische Zelle unterschiedlicher Mechanismen. Neben dem eher unspezifisch ablaufenden lysosomalen Abbau (Ciechanover et al., 1984a; Hershko & Ciechanover, 1982) ist der hoch-spezifische, streng regulierte Ubiquitin-Proteasom-vermittelte Abbau (UPS) weit verbreitet (Ciechanover et al., 1984a; Hochstrasser, 1996). Der proteasomale Abbau dient der Entfernung neu synthetisierter Proteine, die falsch gefaltet oder modifiziert wurden (Ciechanover et al., 1984a; Ciechanover et al., 1984b; Seufert & Jentsch, 1990), aber auch der Regulierung des Zellzyklus und der Zelldifferenzierung, sowie der Transkription, der DNA Reparatur, der Kontrolle von Stress-induzierten Signalwegen, oder der Immunabwehr von Pathogenen (Finley, 2009; Glickman & Ciechanover, 2002; Hideshima et al., 2011; Hochstrasser, 1995). Der Prozess ist hoch komplex und erfolgt meist über eine hierarchische Aktivitätsabfolge dreier Familien von Ubiquitin-Enzymen, den E1-, E2- und E3-Enzymen. Zunächst aktiviert das E1-Enzym das hochkonservierte 76 Aminosäuren enthaltende Peptid Ubiquitin (Ub), indem es unter ATP-Verbrauch eine kovalente Thioesterbindung zwischen dem C-Terminus von Ub und einem Cysteinrest in seinem katalytischen Zentrum herstellt (Kleiger & Mayor,

2014). In einem nächsten Schritt wird das aktivierte Ub auf ein E2-Ubiquitin-konjugierendes Enzym (UBC) übertragen (Glickman & Ciechanover, 2002; Huang et al., 2007). Vom E2-Enzym wird das Ub schließlich mit Hilfe von E3 Ubiquitinligasen auf das Zielprotein (Substrat) übertragen, indem das E3-Enzym das E2-Ub und das Substrat gleichzeitig bindet und eine kovalente Bindung zwischen dem Ubiquitin und der ϵ -NH₂-Gruppe eines Lysinrests im Zielprotein knüpft (Glickman & Ciechanover, 2002; Hershko et al., 1984). Die meisten E3 Ubiquitinligasen besitzen eine RING (*really interesting new gene*) Domäne, mit der sie das E2-Enzym rekrutieren und binden (Dou et al., 2012; Jackson et al., 2000; Lorick et al., 1999; Plechanovov et al., 2012), wobei das Ub direkt vom UBC auf das Substrat übertragen wird (Seufert & Jentsch, 1992). Bislang konnten in Säugetieren über 600 E3-Enzyme identifiziert werden, zwei E1-Enzyme, und etwa 40 UBCs (Deshaies & Joazeiro, 2009).

Im letzten Schritt wird das ubiquitinierte Substrat über das 26S Proteasom abgebaut. Damit das Substrat effektiv vom Proteasom erkannt wird, ist eine Polyubiquitinierung des Substrats, vorzugsweise durch an Lysine-48 verknüpfte Ubiquitinketten, nötig (Kar et al., 2012; Passmore & Barford, 2004). Hierbei werden zum Teil mit Hilfe von E4-Enzymen (Ubiquitinketten-Elongationsfaktoren) (Koegl et al., 1999) weitere Ubiquitinreste kovalent an das initiale Ubiquitin gebunden. Es konnte festgestellt werden, dass mindestens vier Ub-Reste für den effektiven proteasomalen Abbau notwendig sind (Thrower, 2000). Neben den Polyubiquitinketten spielen häufig posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierung, oder SUMOylierung der Ligasen, beziehungsweise der Substrate durch SUMO-1 (*Small Ubiquitin-related Modifier-1*) (Sriramachandran & Dohmen, 2014) eine wichtige Rolle bei der Erkennung von Proteinen durch das Proteasom (Glickman & Ciechanover, 2002).

Das 26S Proteasom ist eine multikatalytische Protease, die in höher entwickelten Eukaryoten im Nukleus sowie im Zytoplasma lokalisiert (Brooks et al., 2000; Palmer et al., 1996). Das Proteasom ist aus einer proteolytischen 20S Kerneinheit und einer regulatorischen 19S Einheit aufgebaut (DeMartino et al., 1994; Glickman et al., 1998; Tanaka, 1998; Zwickl et al., 2001). Beim Abbau von polyubiquitinierten Substraten bindet dieses zunächst an Rezeptoren der 19S Einheit (Elsasser et al., 2004; Hershko & Ciechanover, 1998; Verma et al., 2004), was zur Aufnahme des Proteins in die proteolytische Kammer der Kerneinheit führt (Groll et al., 2000). Neben der Erkennung und Aufnahme des Zielproteins wird der regulatorischen Einheit eine Funktion bei der Entfaltung des Substrats zugesprochen. (Braun et al., 1999; Hershko & Ciechanover, 1998; Hochstrasser, 1996; Strickland et al., 2000). Zudem wird durch die 19S Einheit die Polyubiquitinkette vom Substrat abgespalten (Papa et al., 1999; Yao & Cohen, 2002), sodass das freie Ub anschließend wieder im Zellstoffwechsel verarbeitet werden kann

(Glickman & Ciechanover, 2002; Hough & Rechsteiner, 1986). Das Substrat wird anschließend von der 20S Einheit in kurze AS-Ketten gespalten (Finley, 2009; Glickman & Ciechanover, 2002).

Um eine ungewollte Markierung eines Proteins für den proteasomalen Abbau rückgängig zu machen, verfügt die Zelle über sogenannte Deubiquitinasen (DUBs). Diese Enzyme sind in der Lage Ub von Substraten abzuspalten, um somit die Ub-Kette zu kürzen oder ganz vom Zielprotein zu entfernen (Chung & Baek, 1999; Komander et al., 2009). Eine solche Deubiquitinase ist zum Beispiel die mit ICP0 potentiell interagierende Ubiquitin-spezifische Peptidase 7 (USP7 oder auch HAUSP) (Canning et al., 2004; Li et al., 2002; Ma et al., 2010).

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung der ICP0:SIAH-1 Interaktion im Kontext von replikationskompetentem Herpes-Simplex-Virus Typ 2 (HSV2) zu untersuchen, um sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Hinweise auf das virale Replikationsverhalten zu erhalten. Zu diesem Zweck sollten als erstes die SIAH-Bindemotive im viralen HSV2 ICP0 Protein durch Punktmutationen inaktiviert werden. Um einen veränderten Phänotyp der generierten Mutanten aufgrund des Mutageneseverfahrens ausschließen zu können, wurden zwei unterschiedliche Herstellungswege geplant: die *En Passant* Mutagenese in Bakterien, sowie die homologe Rekombination in eukaryotischen Zellen.

Andere HSV Mutanten, in denen entweder die RING Domäne in ICP0 fehlte oder der gesamte ICP0-Leserahmen deletiert wurde, zeigen ein verringertes Wachstum auf bestimmten Zelllinien und eine eingeschränkte virale Proteinexpression (Cai & Schaffer, 1992; Everett, 1988; Everett, 2000; Everett et al., 2008; Sacks & Schaffer, 1987). Die Auswirkung der fehlenden ICP0:SIAH-1 Interaktion auf Wachstum und Proteinexpression in den hier hergestellten Virusmutanten sollte *in vitro* charakterisiert werden.

Im lebenden Organismus ist HSV2 in der Lage, nach einer akuten Infektion der Schleimhäute in die innervierenden sensorischen Neurone einzudringen und dort Latenz zu etablieren. Unter bestimmten Bedingungen kann das Virus anschließend wieder aus der Latenz reaktivieren (Fields et al., 2013). Die Auswirkung der fehlenden ICP0:SIAH-1 Interaktion auf eine HSV2 Infektion im lebenden Organismus sollte deshalb sowohl für den lytischen, als auch den latenten Infektionsverlauf im nächsten Schritt in einem okularen Mausmodell untersucht werden.

Zur eindeutigen Charakterisierung sollten die SIAH-bindedefizienten Mutanten in den *in vitro* und *in vivo* Experimenten direkt mit dem Wildtypvirus verglichen werden.

Die Charakterisierung von ICP0 mit Hilfe der generierten Deletionsmutanten könnte in Zukunft eine Basis für die mögliche Entwicklungen neuer antiviraler Therapien gegen HSV2 bieten.

2 Materialien

2.1 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> GS 1783	auf <i>E. coli</i> DY380 basierend (Tischer et al., 2010; Lee et al., 2001)
<i>E. coli</i> DH5 α	Invitrogen (Karlsruhe)
<i>E. coli</i> BL 3 pLysS	Invitrogen (Karlsruhe)
<i>E. coli</i> XL-10 Gold	Stratagene (La Jolla CA, USA)

2.2 Virusstämme

HSV2 Stamm MS (ATCC® VR-540™)	
HSV2 ICP0 Δ 19-162-GFP	(Halford et al., 2010)
HSV2 (MS) Lox	Claus-Henning Nagel (HPI) (Czechowicz, 2013)
HSV2 (MS) ICP0 ^{NxNI} [52.1]	Julia Czechowicz (HPI) (Czechowicz, 2013)

2.3 Eukaryotische Zelllinien

BHK-21 (ATCC® CCL-10™)	Aus Baby-Goldhamsternierenzellen gewonnene Zelllinie (adhärent) mit Fibroblastenmorphologie
HepaRG™ (Life Technologies)	Adhärente humane bipotente Stammzelllinie mit Eigenschaften adulter Hepatozyten. Ursprung: Mit chronischer Hepatitis C assoziiertes Hepatokarinom (Gripon et al., 2002; Marion et al., 2010)
U2OS (ATCC® HTB-96™)	Adhärente immortalisierte humane Osteosarkomzelllinie mit Epithelzellmorphologie
Vero (ATCC® CCL-81™)	immortalisierte Nierenepithelzellen aus der adulten grünen Meerkatze

2.4 Medien

2.4.1 Medien für die Anzucht von Bakterien

LB-Medium (*Lysogeny Broth-Medium*)

- 10 g/l Bacto-Trypton
- 5 g/l Bacto-Hefe Extrakt
- 8 g/l Natriumchlorid (NaCl)
- 1 g/l Glucose
- pH 7.2 (eingestellt mit NaOH)

2.4.2 Medien für die Kultivierung eukaryotischer Zellen

DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) Biochrom (Berlin)

versetzt mit:

- 10% fötales Kälberserum (FKS) (v/v), Biochrom (Berlin)
- 4 mM L-Glutamin Biochrom (Berlin)
- 1 mM Natriumpyruvat Biochrom (Berlin)
- 50 U/ml Penicillin Biochrom (Berlin)
- 50 µg/ml Streptomycin Biochrom (Berlin)
- 5% NaHCO₃ (7,5% w/v) Biochrom (Berlin)

DMEM für HepaRG-Zellen Biochrom (Berlin)

enthält neben den oben aufgelisteten Inhaltsbestandteilen:

- 5 µg/ml bovines Insulin Sigma Aldrich (St. Louis)
- 50 µM Hydrocortisone Sigma Aldrich (St. Louis)

RPMI 1640 Lonza (Basel, CH)

versetzt mit:

- 10% FKS (PAN) Biotech (Aidenbach)
- 4 mM L-Glutamin Biochrom (Berlin)
- 50 U/ml Penicillin Biochrom (Berlin)
- 50 µg/ml Streptomycin Biochrom (Berlin)

RPMI für Virusinfektionen

enthält neben den oben aufgelisteten Inhaltsbestandteilen:

- 2,5% 1 M HEPES Biochrom (Berlin)

Materialien

Opti-MEM® (serumreduziertes Medium)

Gibco® by Life Technologies

(Carlsbad, CA, USA)

Die Inaktivierung des fötalen Kälberserums erfolgte für 30 min bei 56°C.

2.5 Oligonukleotide (*Primer*)

Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA) synthetisiert. Für die BAC-Mutagenese erfolgte eine PAGE-Reinigung der Oligonukleotide.

Tabelle 1. PCR-Primer für die *En Passant* Mutagenese. Unterstrichen: Neu inserierte Restriktionsschnittstelle. *Kursiv*: Bindung der *Primer* an den komplementären DNA-Strang.

Name	Sequenz (5'- 3'Richtung)	Funktion
CHN312for	GCCACAGTCGTCGGGGCGCGCGG CGCGCCCCGGCGGCCAATGCCA ATCGCGTCAGATCTCCGCCCCGCG CCGCCCGGACAAGGATGACGACG ATAAG	Mutagenese des VxP1 SIAH- Bindemotivs in HSV2 ICP0 zu NxN1 (AS-Position 414-416 in ICP0)
CHN313rev	GCTCGCAGACACCACGGGGGCGG CGGCGGCGCGGGGCGGAGATCTG ACGCGATTGGCATTGGCCGCGCG GGGGCGCGCCCGCAGGGTAATGCCA GTGTTAC	
CHN283for	GGTGGGATCTGGGTCTGGGGGCG GCCCTGCCGTCGCGGCCAATGTG AATAGAGTGGCTAGCCTTCCCCCT GCGGCCGGCGGACAAGGATGACGA CGATAAG	Mutagenese des VxP2 SIAH- Bindemotivs in HSV2 ICP0 zu NxN2 (AS-Position 316-318 in ICP0)
CHN284rev	GCCGCGCCTGCGCGCGCCCCCG CCGGCCGCAGGGGGAAGGCTAGC CACTCTATTCACATTGGCCGCGAC GGCAGGGCCGCCAGGGTAATGCCA GTGTTAC	
JCZ003for	TGCGGGCGGGGGTGGGATCTGGG TCTGGGGGCGGCCCTGCCGTCGC GGCCGGCCTGGTGATGATGGCGG GATCG	Amplifizierung Rekombination/Insertion der rpsLneo Kasette. Region: NxN1/NxN2
JCZ004rev	GCCGCGTCCGCGCTCGCAGACAC CACGGGGGCGGCGGCGGCGCGGG GCGGTCAGAAGAAGTTCGTCAAGA AGGCG	Amplifizierung zur Rekombination/Insertion der rpsLneo Kasette. Region: NxN1/NxN2

Tabelle 2. PCR-Primer zur Generierung des Homologieplasmids für die homologe Rekombination.

Name	Sequenz (5'- 3'Richtung)	Funktion
CHN364for	TTAAGAATTCCTGATTACTTTCTT GGCAG	Herstellung des 5'Homologiearms (517bp) <i>upstream</i> von ICP0 aus HSV2 +EcoRI Schnittstelle <i>Primer</i> für anschließende Splice- overlap PCR (1037 bp)
CHN365rev	GCCGAGTGTTAGCTCCCCTCTAGA GCTAGGATCCGAGCCGGGGTAGG GTAGAC	Herstellung des 5'Homologiearms (517bp) <i>upstream</i> von ICP0 aus HSV2 + BamHI + XbaI Schnittstelle + <i>overlap</i>
CHN366for	GAGTCTACCCTACCCCGGCTC GGATCCTAGCTCTAGAGGGGAGC TAACACTCGGC	Herstellung des 3'Homologiearms (545 bp) <i>downstream</i> von ICP0 aus HSV2 + BamHI + XbaI Schnittstelle + <i>overlap</i>
CHN367rev	TTAAGTCGACCCTGTCAACACGG ACACAC	Herstellung des 3'Homologiearms (545 bp) <i>downstream</i> von ICP0 aus HSV2 + SalI Schnittstelle <i>Primer</i> für anschließende Splice- overlap PCR (1037 bp)

Tabelle 3. Primer und Sonden für die Realtime-PCR.

Name	Sequenz (5'- 3'Richtung)	Funktion
β -Actin for	TCCTGAGACTCCCAGCACAC	Quantifizierung von Maus <i>beta-actin</i> - Sequenzen
β -Actin rev	ACACTCAGGGCAGGTGAAACT	
β -Actin Sonde	(FAM)-TGCACTCCTTGCATGTCTCAGA- (TAMRA)	
gB for	TGCAGTTTACGTATAACCACATACAGC	Quantifizierung von HSV2 <i>U_L27</i> - Sequenzen nach (Namvar et al., 2005)
gB rev	AGCTTGCGGGCCTCGTT	
gB Sonde	(FAM)-CGCCCCAGCATGTCATTCACGT- (TAMRA)	
GAPDH for	GTCATCAATGGAAATCCCATCA	Quantifizierung von <i>gapdh</i> -Sequenzen
GAPDH rev	TGGTTCACACCCATGACGAA	
GAPDH Sonde	(FAM)-TCTTCCAGGAGCGAGATCCCTC- (TAMRA)	
HBG for	CTTAATGCCTTAACATTGTGTATAA	Quantifizierung von <i>hbg</i> -Sequenzen
HBG rev	GAATATGCAAATAAGCACACATATAT	
HBG Sonde	(FAM)-ACTTTACACAGTCTGCCTAGTACA	

Materialien

	TTAC-(TAMRA)	
SIAH-1 for	TAAATGGTCATAGGCGACGA	Quantifizierung von <i>siah-1</i> und <i>siah-1A</i> (Maus) Sequenzen
SIAH-1 rev	GCAATGCTGGTGTCAAAGAC	
SIAH-1 Sonde	(FAM)-CGAGGAGTCGCTTCCCAAGTCA-(TAMRA)	

Tabelle 4. Primer für die Herstellung der Southernblot Sonden.

Name	Sequenz (5'- 3'Richtung)	Funktion
NB175for	ATTTACTCGAGGCTAGCATGGCCA CAACCATGGTGAG	Generierung einer 726 bp Sonde, die an die eGFP-Sequenz der HSV2 ICP0-GFP Konstrukte bindet. <i>Primer</i> enthalten XhoI Schnittstelle
NB87rev	TAAATCTCGAGTACTTGTACAGCT CGTCCATG	
JCZ048for	ATTTACTGCAGCACGGTGAGAGGG CGA	Generierung einer 860 bp-Sonde, die an die ICP0 Wildtyp- Sequenz in HSV2 MS bindet. <i>Primer</i> enthalten PstI Schnittstelle
JCZ050rev	ATTTACTGCAGACTATCAGGTACG CCACC	

Tabelle 5. Primer zur Sequenzierung der HSV2 Mutanten.

Name	Sequenz (5'- 3'Richtung)	Funktion
JCZ040for	GATGAAGATGATGACCTG	Sequenzierung der SIAH-Bindedomänen in ICP0-GFP aus HSV2
JCZ036rev	AAGATGCAGAACTAGACG	
CHN307for	AGGACGATGACCTGGCCG	Amplifikation der SIAH-Bindedomänen in HSV2 ICP0 der BAC-Mutanten. <i>Outer-PCR</i> für Sequenzierung
CHN308rev	TGAGCCTGGGTCATGCGC	
CHN309for	TCCCTCTGCAGTGGACTAC	Amplifikation der SIAH-Bindedomänen in HSV2 ICP0 der BAC-Mutanten. <i>Nested-PCR</i> für Sequenzierung
CHN310rev	GTGCGCGTCCACCGGCAC	
M13for*	TGTAAAACGACGGCCAGT	Standard <i>Primer</i> (Seqlab). Sequenzierung von ICP0 aus HSV2 (kloniert in einen TOPO-Vektor oder pUC19 Vektor)
M13rev*	CAGGAAACAGCTATGAC	
CHN305for	TCGAGGCGGGCCTGATGG	Sequenzierung von HSV2 Stamm MS Wildtyp
JCZ50rev_PstI	ATTTACTGCAGACTATCAGGTA CGCCACC	

*Universeller *Primer* für Vektoren, die die N-terminale Kodierungssequenz des LacZ Gens enthalten.

2.5.1 Radioaktiv markierte Nukleotide

α -³²P-dCTP von Hartman Analytical (Braunschweig)

α -³²P-dATP von Hartman Analytical (Braunschweig)

2.6 Plasmide

Tabelle 6. BACmide und Plasmide für die *En Passant* Mutagenese, sowie Plasmide zur Herstellung der Transferplasmide für die homologe Rekombination.

Name	Funktion	Herkunft
BACmide		
pHSV2(MS)Lox	Modifikation von pHSV2(MS)BAC (Meseda et al., 2004) Ausgangskonstrukt für Herstellung der HSV2-ICP0-Mutanten über <i>En Passant</i> Mutagenese	Dr. Claus-Henning Nagel, HPI (Hamburg)
pHSV2(MS)ICP0^{NxN1} [52.1]	HSV2 BACmid mit Mutation des 1. SIAH-Bindemotivs (V414N, P416N) in ICP0 und zusätzlicher BglII Schnittstelle. Klon 52.1 als Ausgangskonstrukt für die SIAH Doppelmutante HSV2 NxN1/2	Julia Czechowicz, HPI (Hamburg) (Czechowicz, 2013)
Plasmide für die <i>En Passant</i> Mutagenese		
pEP-kan-S	Plasmid für Red-Rekombination mit Kanamycin-Resistenzgen und I-SceI Erkennungsstelle	(Tischer et al., 2006)
pcDNA3GFPsh0	Vektor, der unter der Kontrolle des PGK-Promotors GFP exprimiert	Dr. Jan Chemnitz, HPI (Hamburg)
pUC19	Plasmid zur Klonierung des Homologieplasmids für die homologe Rekombination. Enthält Amp-resistenz- und LacZ Gen	Addgene (Cambridge, MA, USA)
pICP0-hom	Homologieplasmid für die homologe Rekombination in HSV2	Dr. Claus-Henning Nagel und Bettina Abel, HPI (Hamburg)
pcDNA3-ICP0-GFP	Eukaryotisches Expressionsplasmid. Kodiert für das HSV2 Gen <i>ICP0</i> , welches C-terminal mit GFP fusioniert ist. Die <i>ICP0</i> -Sequenz enthält keine Introns und ist GC-optimiert. Verwendet zur Konstruktion des Wildtyp-Transferplasmids	GeneArt (Regensburg), (Nagel et al., 2011)

Materialien

pcDNA3-ICP0N_xN1-GFP	Eukaryotisches Expressionsplasmid. Mutation des 1. SIAH-Bindemotivs (V414N, P416N) in HSV2 ICP0. ICP0 wird als GFP-Fusionsprotein exprimiert. Zur Konstruktion des N _x N1-Transferplasmids	Dr. Claus-Henning Nagel und Bettina Abel, HPI (Hamburg),
pcDNA3-ICP0N_xN2-GFP	Eukaryotisches Expressionsplasmid. Mutation des 2. SIAH-Bindemotivs (V316N, P318N) in HSV2 ICP0. ICP0 wird als GFP-Fusionsprotein exprimiert. Zur Konstruktion des N _x N2-Transferplasmids	
pcDNA3-ICP0N_xN1/2-GFP	Eukaryotisches Expressionsplasmid. Mutation des 1. und 2. SIAH-Bindemotivs in HSV2 ICP0. ICP0 wird als GFP-Fusionsprotein exprimiert. Zur Konstruktion des N _x N1/2-Transferplasmids	

Tabelle 7. Liste der Transferplasmide für die homologe Rekombination.

Name	Funktion	Herkunft
pICP0hom-ICP0-GFP	Transferplasmid zur Herstellung des HSV2 Wildtyps mit GC-optimierter <i>ICP0</i> Sequenz ohne Introns, als ICP0-GFP Fusionsprotein	Dr. Claus-Henning Nagel und Julia Czechowicz, HPI (Hamburg)
pICP0hom-ICP0^{N_xN1}-GFP	Transferplasmid zur Herstellung einer HSV2 Mutante mit GC-optimierter <i>ICP0</i> Sequenz mit Mutation des 1. SIAH-Bindemotivs (V414N, P416N)	
pICP0hom-ICP0^{N_xN2}-GFP	Transferplasmid zur Herstellung einer HSV2 Mutante mit GC-optimierter <i>ICP0</i> Sequenz und Mutation des 2. SIAH-Bindemotivs (V316N, P318N)	
pICP0hom-ICP0^{N_xN1/2}-GFP	Transferplasmid zur Herstellung einer HSV2 Mutante mit GC-optimierter <i>ICP0</i> Sequenz und Inaktivierung beider SIAH-1-Bindedomänen durch VxP1/2->N _x N1/2	

2.7 Enzyme

Phusion High Fidelity Polymerase

NewEngland Biolabs

(Ipswich MA, USA)

TaqPlus Precision Polymerase

Agilent (Santa Clara CA, USA)

Klenow-Polymerase	(Roche, Mannheim)
Alkalische Phosphatase Neufuchsin Plus K0625	Dako/Agilent (Santa Clara, CA, USA)
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega (Madison, WI, USA)

2.7.1 Restriktionsendonukleasen

Die Restriktionsendonukleasen wurden in den vom Hersteller empfohlenen Puffersystemen verwendet.

Tabelle 8. Restriktionsendonukleasen (Restriktionsenzyme).

Enzym	Sequenz (5' -> 3')	Hersteller
AgeI	A↓CCGGT	New England Biolabs (NEB), Ipswich, USA
ApaLI	G↓TGCAC	Fermentas, St Leon-Rot
AscI	GG↓CGCGCC	NEB
BglII	A↓GATCT	NEB
BspHI	T↓CATGA	NEB
BstBI	TT↓CGAA	NEB
DpnI	GA ^m ↓TC	Fermentas, nur methylierte DNA
EcoRI	G↓AATTC	NEB
EcoRV	GAT↓ATC	NEB
HpaI	GTT↓AAC	NEB
HindIII	A↓AGCTT	NEB
KpnI	GGTAC↓C	NEB
NcoI	C↓CATGG	NEB
NheI	G↓CTAGC	NEB
NotI	GC↓GGCCGC	NEB

2.8 Antikörper

Tabelle 9. Primärantikörper für Western Blot und Immunohistochemie.

Antigen	Name/ Bezeichnung	Spezies	Arbeitsverdünnung
GFP	pAb von Novus Biologicals, Littleton, CO	Huhn IgY	1:5000
GST	Direkt markierter pAb IRDye 700DX konjugiert. Von Rockland, Limerick, PA	Ziege	1:2500
HSV2(MS)	pAb ABIN387093 für IHC-P von antibodies-online, Atlanta	Kaninchen IgG	1:100
ICP0(2)	pAb R147 von Prof. Dr. Martha Eibl, Biomed. Forschungsgesellschaft mbH, Wien	Kaninchen	1: 2000
ICP27(2)	pAb R152 von Prof. Dr. Martha Eibl, Biomed. Forschungsgesellschaft mbH,	Kaninchen	1: 2000

Materialien

	Wien		
ICP0(1)	mAb 11060 von Santa Cruz Biotechnology Inc.	Maus IgG2b	1: 2000
PML	pAb H-238 von Santa Cruz Biotechnology Inc.	Kaninchen	1:2000
SIAH-1	pAb N-15 von Santa Cruz Biotechnology Inc.	Ziege IgG	1:200
VP5(1/2)	mAb H1.4 von Acris Antibodies GmbH, Herford	Maus IgG1	1: 2000
α -Tubulin	mAb DM1A von Sigma, St Louis	Maus IgG1	1: 5000

Tabelle 10. Sekundärantikörper für Western Blot und Immunhistologie.

Antigen	Name / Bezeichnung	Spezies	Verdünnung
Maus	mAb IRDye 800CW von Licor, Bad Homburg	Ziege IgG (H+L)	1: 10.000
Kaninchen	mAb IRDye 680CW von Licor, Bad Homburg	Ziege IgG (H+L)	1: 10.000
Kaninchen	Histofine <i>Simple Stain</i> Alkalische Phosphatase für Immunhistologie, Nichirei Biosciences Inc., Tokyo, Japan	Ziege	1:1

2.9 Reagenzsysteme

NucleoBond X BAC Kit	Machery-Nagel (Düren)
5'-Prime-Masternix	5 Prime (Boulder CO, USA)
Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG	Life Technologies (Carlsbad CA, USA)
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen (Hilden)
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
Random Primed DNA Labeling Kit	Roche (Mannheim)
Rapid DNA Dephos & Ligation Kit	Roche (Mannheim)
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen (Karlsruhe)

2.10 DNA- und Protein Längenstandards

1 kb DNA ladder (#N3232)	NewEngland Biolabs (Ipswich MA, USA)
100 bp DNA ladder (#N3231)	NewEngland Biolabs (Ipswich MA, USA)
BenchMark Prestained Protein ladder	Invitrogen (Karlsruhe)
Chameleon Duo Pre-stained Protein ladder	LI-COR (Lincoln, NE, USA)

2.11 Antibiotika

Ampicillin	Roche (Mannheim)
Chloramphenicol	Sigma (München)
Kanamycin	Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA)
Penicillin	Biochrom (Berlin)
Streptomycin	Biochrom (Berlin)

2.12 Proteaseinhibitoren

Aprotinin (5 mg/ml in PBS/50% Glycerin)	Biomol (Hamburg)
Leupeptin (5 mg/ml in 50% Glycerin)	Biomol (Hamburg)
Pepstatin A (1 mg/ml in Methanol)	Biomol (Hamburg)
Pefabloc SC (25 mg/ml in 50% Glycerin)	Biomol (Hamburg)

2.13 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid im Verhältnis 29:1	Biorad (München)
Agarose	PEQLAB (Erlangen)
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma (München)
Antigen Retrieval Citrat Plus (10x)	Biogenex (Fremont CA, USA)
Bovines Insulin	Sigma (München)
Borsäure	Roth (Karlsruhe)
Bromphenolblau	Sigma (München)
5-brom-4-chlor-3-indoxyl-beta- D-galactopyranosid (Xgal)	Sigma (München)
Chloroform	Merck (Darmstadt)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Serva (Heidelberg)
Hämatoxylin	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Hybridisierungslösung (HybExpress)	Takara/Clontech (Mountain View CA, USA)
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl) -ethansulfonsäure (HEPES)	Biomol (Hamburg)

Materialien

Hydrocortison (wasserlöslich)	Sigma (München)
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma (München)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Kälberserumalbumin (BSA)	NEB (Ipswich, MA, USA) (Waltham MA, USA)
Kristallviolett Indikator	Roth (Karlsruhe)
L-Glutamin	Biochrom (Berlin)
Lysozym (human)	Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA)
Magermilchpulver	Wulf und Co. (Hamburg)
Magnesiumchlorid	Merck (Darmstadt)
2-Mercaptoethanol	Merck (Darmstadt)
Methanol	Merck (Darmstadt)
2-Morpholinoethansulfonsäure	Biomol (Hamburg)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt)
Natriumbicarbonat-Puffer (7,5 % w/v)	Biochrom (Berlin)
Natrium-Citrat-Dihydrat	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
Natriumchloridlösung (isoton)	B. Braun (Melsungen)
Natriumhydroxid	Roth (Karlsruhe)
Natriumpyruvat	Biochrom (Berlin)
N, N, N', N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Biorad (München)
NP-40	Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA)
Paraformaldehyd	Merck (Darmstadt)
PeqGOLD TriFast™	Peqlab (Erlangen)
Phenol	Merck (Darmstadt)
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	Sigma (München)
Ponceau S	Serva (Heidelberg)
Rox Reference Dye	Invitrogen, Life Technologies (Carlsbad CA, USA)
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Merck (Darmstadt)
5-Sulfosalicylsäure-Dihydrat	Merck (Darmstadt)
TransIT-LT1	Mirus Bio (Madison WI, USA)
Trichloressigsäure	Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA)
Triton X 100	Roth (Karlsruhe)

Tris	Biomol (Hamburg)
Trypsin/ EDTA	Biochrom (Berlin)
Tween-20	Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA)
Trizol (peqGold TriFast)	VWR International (Radnor, PA, USA)
Tramadol (Tramal)	Grünenthal (Aachen)
Ketaminhydrochlorid	WDT (Garbsen)
Xylazin (Sedaxylan)	WDT (Garbsen)
ZnCl ₂	Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA)

Weitere nicht spezifisch aufgeführte Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Bayer (Leverkusen), Becton Dickinson (Heidelberg), Biomol (Hamburg), AppliChem (Darmstadt), Peqlab (Erlangen), Quiagen (Hilden), Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Invitrogen (Karlsruhe) und Fermentas (St. Leon-Rot).

Das Einwiegen der Chemikalien wurde mit einer Digitalwaage durchgeführt, der pH-Wert der einzelnen Lösungen wurde, wenn nötig, mit einem kalibrierten pH-Meter auf den gewünschten Wert eingestellt. Zum Sterilisieren wurden Lösungen und Medien in einem Autoklaven dampfsterilisiert.

2.14 Verbrauchsmaterialien

Zellkulturplatten	TPP (Trasadingen CH)
Biosphere [®] FilterTips (10/ 20/ 200/1000 µl)	Sarstedt (Nümbrecht)
Falcon Reaktionsgefäße (15 ml, 25ml, 50 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schüll (Dassel)
Nylontransfermembran	GE Health Care (Little Chalfont, UK)
Objektträger (Super Frost Plus)	Hassa-Laborbedarf (Lübeck)
PCR-Reaktionsgefäße	Sarstedt (Nümbrecht)
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Röntgenfilm	GE Health Care (Little Chalfont, UK)
<i>Safe Seal</i> Reaktionsgefäße (2 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Spritzen (1ml, 5 ml und 10 ml)	B. Braun (Melsungen)
Sterilfilter	Millex [®] (Irland)
Sterile Nadeln (27G1/2, 25G 5/8)	Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA)

Materialien

twin.tec PCR-Platten	Eppendorf (Hamburg)
Wattestäbchen	Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Zellkultur-Flaschen (T-25,-75,-175)	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellschaber	Sarstedt (Nümbrecht)

2.15 Lösungen und Puffer

Agar	1,5% (w/v) Agar in LB-Medium, ggf. mit Antibiotikum versetzten (siehe 2.11). Bei <i>En Passant</i> Mutagenese zzgl. 1% (w/v) L-Arabinose
Denaturierungslösung	0,5 M Natriumhydroxid (NaOH) und 1,5 M Natriumchlorid (NaCl)
DNA-Ladepuffer (5x)	20% (v/v) Glycerin, 10 mM EDTA, pH 8, 10% Orange G (Fluka Chemika) in Elutionspuffer (EB von Qiagen)
DNA-Ladepuffer (6x)	40 % Saccharose, 1 mM EDTA, pH 8.0, 10 % Bromphenolblau
E1A Puffer	50 µM HEPES KOH, 100mM NaCl, 0,1% NP-40 in Wasser mit KOH auf pH 7-7.5 (steril)
Kristallviolett-Lösung (5%)	5 g Kristallviolett Pulver in 100ml Ethanol reinst.
Kristallviolett-Lösung (0,1%)	5% Kristallviolettlösung 50x mit dest.Wasser verdünnen
<i>High Stringency</i> Waschpuffer	1x Standard Saline Citrate (SSC), 0,1% (v/v) SDS
<i>Low Stringency</i> Puffer	0,1% (w/v) SDS in 2x SSC
MNT-Puffer	0,02 M 2-Morpholinoethansulfonsäure (MES), 0,1 M NaCl und 0,03 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), pH 7.2
MTTBS Puffer	50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% TX-100
Neutralisierungslösung	0,5 M Tris und 1,5 M NaCl
NTE-Puffer	100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA (pH 8.0)

Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>Phosphate buffered saline</i> , PBS)	138 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7.2
PBS-EDTA	PBS, 1 mM EDTA (steril)
<i>Ponceau</i> Farbstoff	30% (w/v) 5-Sulfosalicylsäure, 30% (v/v) Trichloressigsäure und 2% (w/v), <i>Ponceau S</i>
Protein Probenpuffer (6x)	350 mM Tris/HCl (pH 6.8), 10% (w/v) SDS, 36% (v/v) Glycerin, 6% (v/v) 2-Mercaptoethanol und 0,01% (w/v) Bromphenolblau Mit dest. Wasser auf Endvolumen bringen
Resuspensionspuffer (RSB)	0,1 M Tris, 0,1 M KCl, 10 mM Magnesiumchlorid (MgCl ₂), pH 7.5
RIPA Lysepuffer	150 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl pH 8.0, 1% NP-40 0,5% Na-deoxycholate, 5 mM EDTA, Proteaseinhibitoren
SSC (20x)	0,3 M Natrium-Citrat, 3 M NaCl, pH 7.0
TAE-Puffer (50x):	2,0 M Tris, 1,0 M Natriumacetat, 50 mM EDTA, pH 7.4
TBE (5x)	0,45 M Tris, 0,45 M Borsäure, 0,5 M EDTA, pH 8.0
Tris-gepufferte Salzlösung (<i>Tris buffered saline</i> , TBS)	1,5 M NaCl, 0,1 M Tris, pH 8.0
TBS-Tween (TBS-T)	0,2 % (v/v) Tween-20 in 1x TBS

2.16 Geräte

Analysewaage AT200/9	Mettler (Gießen)
Brutschrank Functionline	Heraeus (Hanau)
Brutschrank Heracell	Heraeus (Hanau)
Brutschrank Minitherm	Heraeus (Hanau)
CCD Kamera Diana II	Raytest (Straubenhardt)
Combi Spin FVL-2400N	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Dunkelkammer evo II	Raytest (Straubenhardt)
Einfrierbox	Stratagene (La Jolla Ca, USA)
Einbettgießstation EG 1600	Leica (Wetzlar)

Materialien

Elektrische Waage GJ4100-2M	Kern+Sohn (Balingen)
Elektrophorese Power Supply EPS 300	Pharmacia Amersham (Amersham, UK)
Filmkassette	Goos Suprema (Heidelberg)
Gene Pulser II Eletroporator	Biorad (München)
Geldokumentationssystem Gelstudio Sa	Analytik Jena (Jena)
Gelkammern Mini Trans Blot Cell	Bio-Rad Laboratories (München)
Gelkammer Maxi S Plus	Peqlab (Erlangen)
Glasschalen (Küvetten) für Histologie	Sarstedt (
Imaging System Odyssey	Li-Cor (Bad Homburg)
Infiltrationsautomaten ASP300	Leica (Wetzlar)
Kühlzentrifuge J6-MI	Beckman Coulter (Brea CA, USA)
Kühlzentrifuge Avanti J-25	Beckman Coulter (Brea CA, USA)
Kühlzentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus (Hanau)
Magnetrührer	Heidolph (Schwabach)
Mini Trans-Blot Cell	Biorad (München)
Mikroskop Axiovert 40CFL	Zeiss (Oberkochen)
Mikroskop Axiovert 200	Zeiss (Oberkochen)
Mikroskop Nikon C2+	Nikon (Tokio, Japan)
Mikroskop Nikon Eclipse Ni	Nikon (Tokio, Japan)
Mikrotom HM325	MICROM (CA, USA)
MS 1 Minishaker	IKA (Staufen)
Neubauer Zählkammer	Marienfeld GmbH & Co. KG (Lauda-Königshofen)
PCR System GeneAmp [®] 9700	Applied Biosystems [™] by Life Technologies (Carlsbad CA, USA)
PCR System 7500 Fast Real-Time	Applied Biosystems [™] by Life Technologies (Carlsbad CA, USA)
pH-Meter	inolab (Weilheim)
Pipetman	Gilson (Middleton, WI, USA)
Schüttelinkubator UT-5K	Infors (Bottmingen, CH)
Sterilwerkbank Herasafe KS12	Heraeus (Hanau)
Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg)
Trockenschrank B 15	Heraeus (Hanau)
Ultraschalldesintegrator W-450	Branson (Dietzenbach)

Ultrazentrifuge Optima LE-80K	Beckman Coulter (Brea CA, USA)
UV/VIS Spectrophotometer DU [®] 730	Beckman Coulter (Brea CA, USA)
UV Stratalinker 1800	Stratagene (La Jolla, USA)
UV-Transilluminator TFM-20	UVP (Upland CA, USA)
Wippschüttler DRS-12	Gudenrath & Co. (Hamburg)
Zentrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)

2.17 Chirurgische Instrumente

Arterienpinzette gezahnt	FST Science Tools (Heidelberg)
Autoklavierbehälter	FST Science Tools (Heidelberg)
Bonn Schere 8.5cm	FST Science Tools (Heidelberg)
Einmal-Skalpell	Roth (Karlsruhe)
Ganglienpinzette	Roboz (Gaithersburg, MD, USA)
Gewebepinzette 1x2 Zähne	FST Science Tools (Heidelberg)
Ohrstanze	FST Science Tools (Heidelberg)
Semken Pinzette 13 cm gebogen	FST Science Tools (Heidelberg)
Wagner Schere 12 cm	FST Science Tools (Heidelberg)

2.18 Software

Adobe Photoshop CS 5.1 / (CS3)	Adobe Systems (München)
CLC Main Workbench 7	QIAGEN Bioinformatics (Venlo, Niederlande)
Clone Manager 5	SECentral-Scientific & Educational Software (Cary, NC, USA)
Fiji is just ImageJ	National Institute of Health (USA)
GraphPad Prism 5.03	GraphPad Software (La Jolla CA, USA)
Image Studio Software Version 5.2.5	Licor (Lincol, NE, USA)
Microsoft Office 2010	Microsoft (Redmond, USA)
NIS-Elements Advanced Research (AR)	Nikon (Tokio, Japan)

3 Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung und Kryokonservierung von Bakterien

Bakterien wurden für die Plasmidisolierung in 2 ml (Minipräparation) oder 250 ml (Maxipräparation) beziehungsweise 500 ml bei BACmiden LB-Medium versetzt und mit einem geeigneten Selektionsantibiotikum über Nacht bei 37°C beziehungsweise 32°C (BACmide) unter Schütteln inkubiert.

Für die Kryokonservierung transformierter Bakterien wurden 250 µl Bakteriensuspension aus einer Maxi-Übernachtskultur mit 250 µl sterilem Glycerin gemischt, in ein Kryokonservierungsgefäß überführt, und bei -80°C aufbewahrt.

Zur Herstellung von Selektionsagarplatten wurden 500 ml LB-Medium mit 5,5 g Agar versetzt und autoklaviert. Im Anschluss wurde die Agarlösung auf 50°C abgekühlt, 500 µl des jeweiligen Antibiotikums hinzugefügt und jeweils rund 5 ml in Petrischalen gegossen.

Tabelle 11. Antibiotikumskonzentrationen zur Kultivierung von Bakterien.

Antibiotikum	Konzentration
Ampicillin	100 µg/ml
Kanamycin	30 µg/ml
Chloramphenicol	17 µg/ml

3.1.2 Hitzeschock-Transformation von Bakterien

Für die Hitzeschock-Transformation von DNA in Bakterien wurden 200 µl chemisch kompetente *E.coli* auf Eis aufgetaut und mit 1 µg Plasmid-DNA oder einem Ligationsansatz von 20 µl versetzt und vorsichtig gemischt. Im Anschluss wurde der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 45 s in ein 42°C Wasserbad überführt (Hitzeschock). Danach wurden die Zellen für 2 min auf Eis gekühlt und anschließend 900 µl RT-warmes LB-Medium oder S.O.C. ohne Antibiotika hinzugefügt. Der Ansatz wurde für eine Stunde unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde der Ansatz für 2 min bei 3.800 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Bakterien vorsichtig im Rücklauf (ca. 20 µl)

resuspendiert. Die Suspension wurde auf Selektionsagarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.1.3 Blau-weiß Selektion mittels IPTG und Xgal

Diese Methode dient zur Identifizierung von Bakterienklonen, die ein gewünschtes Transgen (*Insert*) aufgenommen haben. In dieser Arbeit wurden *E. coli* mit dem Plasmid pUC19 transformiert, in das vorab das Homologiefragment (5'- und 3'-Homologiearm) siehe 3.2.13.1 liegiert wurde. pUC19 enthält das Reporter-gen LacZ, welches für die β -Galaktosidase kodiert. Im Leserahmen des LacZ Gens ist eine multiple Integrationsstelle (*multiple cloning site* = *MCS*) eingefügt, in die das gewünschte DNA-Fragment inseriert werden sollte. Der pUC19 Vektor trägt zudem als zusätzlichen Selektionsmarker das Ampicillin-Resistenzgen. Hat die Bakterienzelle pUC19 aufgenommen, erwarb es die Ampicillin-Resistenz und kann sich auf einer Ampicillin-enhaltenden Kultivierungsplatte vermehren. Bei einer erfolgreichen Integration des Transgens in die *MCS*, wird der Leserahmen des LacZ Gens in pUC19 unterbrochen und die Bakterien exprimieren keine funktionsfähige β -Galaktosidase. Um die Expression von β -Galaktosidase zu initiieren, wird IPTG (ein Galactose-Thioglycosid) auf die Kulturagarplatten gegeben. IPTG bindet als Induktor an den LacZ Promotor, ohne Zugabe des Induktors ist das Gen aufgrund eines gebundenen Lac-Repressors (LacI) an den Promotor inaktiv. Um die Funktionsfähigkeit der β -Galactosidase zu überprüfen, wurde zusätzlich der Farbstoff Xgal auf die Agarplatten plattiert. β -Galactosidase ist in der Lage Xgal in 5,5'-Dibromo-4,4'-Dichloro-Indigo (blau) und Galactose zu spalten. Bakterienklone, die eine funktionsfähige β -Galaktosidase exprimieren erscheinen als blaue Kolonien auf der Kultivierungsplatte. Bakterienklone, die puC19 mit dem gewünschten *Insert* aufgenommen haben, erscheinen demnach als weiße Kolonien.

Für die blau- weiß Selektion wurden Selektionsagarplatte mit 100 μ g/ml Amp + 40 μ l IPTG und 40 μ l Xgal plattiert und für eine Stunde an der Luft getrocknet. Im Anschluss wurden die transformierten Bakterien (3.1.2) auf der behandelten Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am Folgetag wurden ausschließlich weiße Kolonien isoliert. Von ihnen wurden Übernachtkulturen für eine anschließende DNA Isolierung angesetzt. Mittels Restriktions-Analyse musste überprüft werden, ob die Klone das korrekte Plasmid mit dem erwünschten *Insert* trugen (siehe Abschnitt 3.2.13.1).

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Präparation und Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Präparation von Plasmid-DNA in kleinem (Mini) oder großem (Maxi) Maßstab wurden 2 ml beziehungsweise 250 ml LB-Medium mit geeignetem Selektionsantibiotikum mit einer Kolonie des transformierten Bakterienstamms angeimpft und über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Die Präparation und Isolierung wurde nach Herstellerangaben mithilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit oder QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Qiagen) durchgeführt und die Plasmid-DNA im Anschluss entweder in Wasser (Maxi-DNA) oder in Tris-HCl Elutionspuffer (EB) von Qiagen aufgenommen. Die Plasmid-DNA, die im Maximaßstab präpariert wurde, wurde im Anschluss auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt.

3.2.2 Analytische Präparationen von BAC-DNA

Präparation von BAC-DNA im kleinen Maßstab erfolgte aus 2 ml Übernachtskultur. Hierfür wurden 2 ml mit Antibiotikum versetztes LB-Medium (Tabelle 11) mit einer transformierten *E. coli* GS1783 Kolonie angeimpft und über Nacht bei 32°C auf einem Schüttler inkubiert. Für die anschließende DNA-Präparation wurde das NucleoBond X-BAC Kit der Firma Machery-Nagel (Düren) verwendet. Zunächst wurden die Zellen für 1 min bei 20.800 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde in 200 µl Resuspensionspuffer resuspendiert, mit 300 µl Lysispuffer für maximal 5 min bei RT lysiert und der Ansatz anschließend mit 300 µl Neutralisierungspuffer für 5 min auf Eis neutralisiert. Ausgefällene Proteine und genomische DNA wurden für 20 min bei 20.800 x g pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 600 µl Isopropanol zur Fällung der BAC-DNA hinzugegeben. Der Ansatz wurde dann für 20 min bei 20.800 x g zentrifugiert und das Pellet anschließend mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen und für 10 min bei 20.800 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die DNA für etwa 10 min an der Luft getrocknet. Die Elution der DNA erfolgte mit Tris-HCl Elutionspuffer (EB) von Qiagen.

Die Präparation von BAC-DNA in großem Maßstab erfolgte aus 500 ml Übernachtskultur (3.1.1). Anschließend wurde die Bakteriensuspension für 15 min bei 3.300 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Auch hier wurde für die DNA-Präparation das NucleoBond X-BAC Kit der Firma Machery-Nagel verwendet. Die DNA-Präparation im großen Maßstab erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die DNA wurde im Anschluss für etwa 10 min an der Luft getrocknet und anschließend in rund 250 µl sterilem Wasser eluiert.

3.2.3 Präparation viraler DNA

Zur Präparation viraler DNA aus HSV2-Kapsiden (angelehnt an Ravi, Kennedy, & MacLean, 1998) wurden die mit Passage 2-Virus infizierten Zellen (3.3.6) bei 37°C aufgetaut, in ein 15 ml Gefäß überführt und mit RSB-Puffer auf ein Volumen von 3 ml eingestellt. Im Anschluss wurden 3 ml RSB-Puffer + 1% (v/v) TX-100 hinzugegeben, so dass eine Endkonzentration von 0,5% (v/v) TX-100 vorlag. Zur Lyse der Zellen wurde der Ansatz für 10 min auf Eis inkubiert. Zum Anreichern der Zellkerne wurde das Lysat für 10 min bei 3.300 x g zentrifugiert und der Überstand in einem 15 ml Röhrchen auf Eis gesammelt. Das Pellet wurde in 6 ml RSB-Puffer + 0,5% TX-100 resuspendiert, erneut für 10 min bei 4°C inkubiert und anschließend für 10 min bei 3.300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit dem vorherigen Überstand vereinigt und in SW40 Ultrazentrifugationsröhrchen überführt. Über eine Ultrazentrifugation sollten zunächst die Viruskapside angereichert werden. Die Zentrifugation erfolgte in einem SW40Ti Rotor (Beckman) für 90 min bei 114.000 x g und 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das Kapsidpellet über Nacht bei 4°C in 800 µl NTE-Puffer resuspendiert.

Am folgenden Tag wurden die Kapside nach Zugabe von 200 µl 5x SDS/EDTA (12.5% SDS (w/v), 50 mM EDTA in NTE-Puffer) für 5-10 min bei 37°C lysiert. Zum Aufreinigen der freigesetzten viralen DNA wurde 1 ml Phenol/Chloroform/Isoamyl im Verhältnis 25:24:1 hinzugegeben, der Ansatz 50 x invertiert und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 5 min bei 20.800 x g zentrifugiert und die obere Phase mit einer gekürzten Pipettenspitze in ein neues Röhrchen überführt und erneut für 5 min wie zuvor zentrifugiert. Dieser Schritt wurde solange wiederholt, bis keine Interphase mehr sichtbar war. Im Anschluss wurde die abgenommene obere Phase mit NTE-Puffer auf 1 ml Volumen eingestellt, 1 ml Chloroform/Isoamyl im Verhältnis 24:1 (v/v) hinzugegeben und 50 x invertiert. Der Ansatz wurde 5 min bei 20.800 x g zentrifugiert und die obere Phase vorsichtig abgenommen. Aus dieser Phase wurde die virale DNA mit 800 µl Isopropanol präzipitiert. Die DNA wurde 10 min bei 20.800 x g zentrifugiert und im Anschluss mit 2 ml 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die DNA kurz an der Luft getrocknet und anschließend in 10 mM Tris-Cl pH 8.0 + 50 µg/ml RNaseA über Nacht bei 4°C resuspendiert.

3.2.4 Präparation genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen

Die (infizierten) Zellen wurden vom Substrat abgelöst und einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 200 x g zentrifugiert und das Zellpellet für die Präparation der genomischen DNA verwendet. Die Präparation erfolgte nach

Herstellerangaben mithilfe des QIAamp DNA Blood Mini Kits (Qiagen). Die Zellen wurden zunächst über Guanidiniumchlorid und Proteinase K aufgeschlossen, wobei zelluläre Proteine denaturiert und abgebaut, und die zelluläre (und virale) DNA freigesetzt wurde. Die DNA wurde anschließend in 50 µl Wasser eluiert.

3.2.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte durch das DU 730 Spektralphotometer der (Beckman Coulter). Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei 260 nm, was auf die Absorption der Nukleinsäurebasen zurückzuführen ist. Mittels der Absorption bei 260 nm kann die Konzentration der DNA wie folgt mit dem Lambert-Beer'schen Gesetz berechnet werden:

$$E = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I_1} \right) = \varepsilon * c * d$$

Mit E = Extinktion; I_0 = Intensität des einfallenden Lichts; I_1 = Intensität des transmittierten Lichts; ε = Extinktionskoeffizient, c = Konzentration der absorbierten Substanz und d = Dicke der Küvette

Beträgt die $OD_{260} = 1$ (OD = optische Dichte) liegt eine Konzentration von 50 µg/ml DNA beziehungsweise 40 µg/ml RNA vor (bei $d = 1$ cm). Zur Überprüfung der Reinheit der gemessenen DNA- oder RNA-Probe, wird die Absorption bei 280 nm und bei 230 nm herangezogen. Ist die gemessene Probe rein, liegt der Quotient der Absorption von 260 nm/280nm für DNA bei etwa 1,8 und für RNA bei etwa 2,0. Der Quotient der Absorption von 260nm/230 nm liegt im Optimalfall zwischen 2,0 und 2,2. Fallen die Quotienten anders aus, kann dies an einer Verunreinigung mit Proteinen liegen, die ihr Absorptionsmaximum bei 280 nm besitzen oder an einer Verunreinigung mit Phenolen und Kohlenhydraten, die bei 230 nm absorbieren.

3.2.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Über die Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*= PCR) kann ein gewünschter DNA-Abschnitt *in vitro* amplifiziert werden. Die PCR besteht aus einer zyklischen Abfolge von Inkubationsschritten. Beginnend mit der Denaturierung, bei der sich die Doppelstränge der *Template*-DNA in ihre Einzelstränge auftrennen, gefolgt vom sogenannten *Annealing*, dem Anlagern der Oligonukleotid-Primer an die einzelsträngige *Template*-DNA. Anschließend folgt die Elongation, bei der die enzymatische Verlängerung der DNA mit Hilfe der Polymerase stattfindet, sodass zum Ende hin wieder ein DNA-Doppelstrang vorliegt. Denaturierung, *Annealing* und Elongation werden zyklisch so lange

wiederholt, bis ein exponentieller Anstieg der synthetisierten DNA erfolgt (Mullis et al., 1986)

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde im GeneAmp® 9700 System (Applied Biosystems) durchgeführt. Als Polymerase wurde die *Phusion* Polymerase, sowie in Teilen der 2.5x 5`Mastermix (New England Biolabs) verwendet. Die *Phusion* Polymerase verfügt über eine 3`-5`-Exonukleaseaktivität (*Proof-Reading* Funktion). Sie ist eine rekombinante Form der ursprünglich aus dem thermophilen Archaeobakterium *Pyrococcus furiosus* stammenden Polymerase.

Tabelle 12. Beispiel eines PCR-Ansatzes mit *Phusion* Polymerase.

PCR-Ansatz	
10 µl	5x Phusion Puffer HF oder GC
1 µl	Primer forward (10 µM)
1 µl	Primer reverse (10 µM)
1 µl	dNTP (10 mM)
0,5 µl	<i>Phusion</i> Polymerase
x µl	<i>Template</i> DNA (10-100 ng)
auf 50 µl	Steriles Wasser

Ein PCR Ansatz mit dem 5`Mastermix wurde unter anderem zur Amplifizierung von ICP0-Regionen in den in 3.2.12 hergestellten BAC-Mutanten angefertigt.

Tabelle 13. PCR-Ansatz mit dem 5`-Mastermix zur Amplifizierung der VxP-Regionen in ICP0 der HSV2 BACs.

PCR-Ansatz	
20 µl	2.5 x 5` Prime Mastermix
2,5 µl	DMSO
1 µl	CHN307for
1 µl	CHN308rev
1 µl	BAC-DNA
24,5 µl	Wasser

Je nach Aktivitätsoptimum der Polymerase und nach Länge der zu amplifizierenden Sequenz können die Elongationstemperatur und die Elongationszeit variieren. Die *Annealing*-Temperatur richtet sich nach der Schmelztemperatur der *Primer* (unter anderem aufgrund des GC-Gehalts).

Methoden

Ein PCR-Programm mit der *Phusion* Polymerase ist im Folgenden wiedergegeben:

Phusion PCR-Programm

98°C 30''
98°C 10'' ;
60°C 30'' ; 30x
72°C 1' ;
72°C 10'
4°C

Der PCR-Ansatz des 5'-Mastermix Ansatzes erfolgte nach:

PCR-Programm

95°C 30'' ;
95°C 30'' ;
60°C 30'' ; 30x
72°C 1.5' ;
72°C 5'
4°C

3.2.6.1 Nested PCR

Das Prinzip dieser hochspezifischen PCR-Variante basiert auf der Anreicherung eines zuvor hergestellten PCR-Fragments. In diesem Fall wurden mittels *nested* PCR der Bereich der SIAH-Bindemotive (VxP1-, und VxP2-Region) im *ICP0*-Fragment aus Tabelle 13 angereichert.

Tabelle 14. Nested PCR zu Anreicherung der VxP-Regionen in *ICP0* der HSV2 BACs.

PCR-Ansatz	
20 µl	2.5 x 5' Prime Mastermix
2,5 µl	DMSO
1 µl	CHN309for
1 µl	CHN310rev
1 µl	PCR-Reaktion aus 3.2.6
24,5 µl	Wasser

PCR-Programm

95°C 30'' ;
95°C 30'' ;
60°C 30'' ; 30x
72°C 30'' ;
72°C 5'
4°C

Das *nested* PCR-Produkt (607 bp) wurde im Anschluss über ein 2% Agarosegel aufgetrennt, die erwünschte Bande separiert und die entsprechende DNA über Gelextraktion nach 3.2.6.3 isoliert und in 50 µl Elutionspuffer von Qiagen eluiert. Im Anschluss wurde das *nested* PCR-Fragment in einen TOPO-Vektor ligiert (3.2.8.1) und der Vektor extern sequenziert (Seqlab) (3.2.11).

3.2.6.2 Direkte Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mithilfe des PCR-Aufreinigungs-Kits QIAquick® PCR Purification Kit (250) von Qiagen gemäß den Herstellerangaben. Die gereinigte DNA wurde in 30 µl sterilem Wasser oder EB-Puffer von Qiagen eluiert.

3.2.6.3 Aufreinigung von PCR-Produkten durch Gelextraktion

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten über eine Gelextraktion wurde das gesamte Volumen der PCR-Proben mit Ladebuffer auf ein 1-2% Agarosegel aufgetragen. Die Proben wurden je nach erwarteter Fragmentgröße für mindestens 30 min bei einer Spannung von 80-90 V separiert. Im Anschluss wurden die Banden durch UV-Licht sichtbar gemacht und die erwünschte Gel-Bande separiert und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion des DNA-Fragments aus dem entsprechenden Gelblock erfolgte mithilfe des Extraktionskits QIAquick® Gel Extraction kit (Qiagen) gemäß den Herstellerangaben. Die gereinigte DNA wurden im Anschluss in 30 µl sterilem Wasser oder EB-Puffer von Qiagen eluiert.

3.2.7 Quantitative *Realtime*-PCR

Zur quantitativen Analyse der Virusreplikation (DNA) und der Genexpression (RNA, umgeschrieben in cDNA nach 3.5.5.2), wurde die Taqman-Methode, eine spezielle Art der *Realtime*-PCR, herangezogen. Mit Hilfe der *Realtime*-PCR kann die virale DNA beziehungsweise cDNA Kopienzahl der eingesetzten Probe bestimmt werden. Die Quantifizierung erfolgt über die Messung von Fluoreszenzsignalen, die während der PCR-Zyklen in Echtzeit erfasst werden. Die Messung erfolgt über eine Sonde, die komplementär zur Zielsequenz ist. Die Sonde ist an ihrem 5'-Ende mit dem Molekül 6-Carboxyfluorescein (FAM, Fluoreszenzdonor) und am 3'-Ende mit dem Molekül Tetramethylrhodamin (TAMRA, Fluoreszenzakzeptor) gekoppelt. TAMRA fungiert hierbei als Quencher, der die Fluoreszenz des Reporter-Fluoreszenzfarbstoffs FAM über einen FRET-Effekt (Förster-Resonanzenergietransfer) unterdrückt. Während der Elongation wird die gebundene Sonde durch die Taq-Polymerase, die eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität besitzt, am 5'-Ende abgebaut. Dadurch entfernen sich Quencher und Fluorophor voneinander und es kann ein Reporter-Fluoreszenzsignal gemessen werden.

Methoden

Um immer am Anfang der exponentiellen Amplifikations-Phase messen zu können, wird häufig der C_t -Wert (engl. *cycle threshold* für Schwellenwert-Zyklus) verwendet. Der C_t -Wert beschreibt den Zyklus, an dem die Reporter-Fluoreszenz erstmals signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Über die Berechnung des C_t -Werts erfolgt die relative Quantifizierung.

Mit der Erstellung einer Standardkurve durch serielle Verdünnung eines Standardplasmids, das die zu amplifizierende Zielsequenz enthält, kann über den gemessenen C_t -Werten die DNA-Ausgangsmenge bestimmt werden.

Als Mastermix wurde der Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG verwendet. Die Reaktion wurde in Reaktionsplatten mit 96 Vertiefungen durchgeführt. Für einen *Realtime*-PCR Ansatz wurden folgende Mengen eingesetzt (Tabelle 15).

Tabelle 15. Zusammensetzung des *Realtime*-PCR Mastermix.

Ansatz	gB	GAPDH	HBG	Beta-Actin	SIAH-1
Mastermix (2x)	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
Primer for (10 µM)	0,9 µl	0,3 µl	0,3 µl	0,9 µl	0,9 µl
Primer rev (10 µM)	0,9 µl	0,9 µl	0,9 µl	0,9 µl	0,9 µl
Sonde (10 µM)	0,25 µl	0,15 µl	0,2 µl	0,25 µl	0,25 µl
Steriles Wasser	1,93 µl	2,63 µl	2,58 µl	1,93 µl	1,93 µl

Für die Kompensierung von Fluoreszenzabweichungen in den einzelnen Vertiefungen wurden zu dem finalen Mastermix für eine 96-well Reaktionsplatte 2 µl Rox Reference Dye gegeben. Zunächst wurde für jeden PCR Durchlauf eine Standardkurve erstellt. Hierfür wurde von einem Standardplasmid eine serielle Verdünnung von 3×10^1 bis 3×10^5 Kopien/µl hergestellt. Im Anschluss wurden je 9 µl des Mastermixansatzes in jede Vertiefungen der Reaktionsplatte pipettiert und mit 1 µl der zu messenden Probe beziehungsweise des Standards aus der Verdünnungsreihe versetzt. Als Negativkontrolle diente steriles Wasser. Die Messung jeder Probe erfolgte in Quadrupeln. Die Reaktionsplatte wurde anschließend mit einer adhäsiven Folie verschlossen und 2 min bei 300 x g bei RT zentrifugiert. Anschließend wurde die Platte in das 7500 Fast *Realtime*-PCR System (Applied Biosystems) eingebracht und folgendes PCR-Programm gestartet (Tabelle 16).

Tabelle 16. Zyklen-Programm für die *Realtime*-PCR.

	Schritt	Temperatur	Dauer	
1.	Initiale Denaturierung	95°C	3 min	
2.	Denaturierung	95°C	15 sec	} 40 Zyklen
3.	Hybridisierung und Elongation	60°C	30 sec	

Für die Auswertung wurden nur Werte einbezogen, deren C_t-Wert in dem von der Standardkurve abgedeckten Bereich lag. Anschließend wurden die Mittelwerte der gemessenen Quadrupel gebildet und die Kopienzahl der viralen DNA- beziehungsweise cDNA-Sequenzen auf die Werte der internen Kontrolle normalisiert:

$$\text{Kopienzahl (normalisiert)} = \frac{\bar{\chi}(\text{Quadrupel})}{\bar{\chi}(\text{interne Kontrolle})}$$

Der Gesamtfehler wurde mittels Gauß'scher Fehlerfortpflanzung berechnet:

$$u = \frac{\bar{\chi}(\text{Quadrupel})}{\bar{\chi}(\text{interne Kontrolle})} \cdot \sqrt{\left(\frac{\sigma(\text{Quadrupel})}{\bar{\chi}(\text{Quadrupel})}\right)^2 + \left(\frac{\sigma(\text{interne Kontrolle})}{\bar{\chi}(\text{interne Kontrolle})}\right)^2}$$

u = Gesamtfehler; $\bar{\chi}$ = Mittelwert; und σ = Standardabweichung

3.2.8 Standard Klonierung von Plasmid DNA

Für die Klonierung von DNA-Konstrukten wurden standardmäßig 1-2 µg Plasmid-DNA und 2-10 µg PCR-Produkt nach Herstellerangaben mit spezifischen Restriktionsendonukleasen fragmentiert, auf einem präparativen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und die gewünschten DNA-Banden anschließend mittels Qiaquick Gel Extraction Kit isoliert (3.2.6.3). Die Ligation wurde mithilfe des DNA Rapid Dephosphorylation and Ligation Kit (Roche) mit 50 ng bis 100 ng Vektor und der dreifachen molaren Menge an DNA-Insert durchgeführt (Tabelle 17).

Tabelle 17. Ligationsansatz.

Ansatz	
x μ l	gereinigtes <i>Insert</i>
x μ l	gereinigter linearisierter Vektor
2 μ l	Puffer 3
10 μ l	Puffer 4
1 μ l	<i>Vial 5 (Ligase)</i>
auf 20 μ l	Mit sterilem Wasser

Als Kontrolle diente ein Ligationsansatz, bei dem anstelle des DNA-*Inserts* Wasser eingesetzt wurde. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt, für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und in chemisch kompetente Bakterien transformiert (3.1.2).

Zur Kontrolle einer erfolgreichen Klonierung wurde routinemäßig Plasmid-DNA aus fünf Bakterienkolonien isoliert und die Plasmid-DNA mithilfe einer geeigneten Restriktionsanalyse (3.2.9) und anschließender DNA-Sequenzierung (3.2.11) überprüft.

3.2.8.1 TOPO- Klonierung

Die TOPO-Klonierung ist eine Methode der Klonierung, bei der eine durch die Taq-Polymerase amplifizierte DNA-Sequenz (PCR-Produkt) ohne Ligase in einen spezifischen Vektor, den TOPO-Vektor, ligiert wird. An den TOPO-Vektor ist kovalent eine Topoisomerase gebunden, welche die DNA an einer bestimmten Erkennungssequenz im TOPO-Vektor schneidet. Bei Zugabe des PCR-Produkts wird der zu dem Zeitpunkt noch lineare Vektor durch die Topoisomerase mit dem PCR-Produkt verbunden.

Bei der Versuchsdurchführung wurde das PCR Produkt (*Insert*) in einen TOPO-Vektor ligiert und anschließend in speziell dafür vorgesehene chemisch kompetente DH5 α -Zellen transformiert, um die Anzahl der DNA-Kopien zu erhöhen. Für die TOPO-Reaktion wurde folgender Ansatz gewählt:

4 μ l PCR-Konstrukt

1 μ l Salzlösung

1 μ l TOPO-Vektor

Der Ansatz wurde für 5 min bei RT inkubiert und anschließend auf Eis platziert. Die weiterfolgenden Schritte der TOPO-Transformation entsprachen denen des *TOPO TA Cloning Kit for Sequencing* Protokolls von Invitrogen, Abschnitt *One Shot® chemical transformation*. Nach der Transformation wurden vier bis sieben Klone isoliert und diese in 2 ml LB-Medium + Amp überführt und über Nacht bei 37°C auf einem Schüttelinkubator kultiviert. Von der

Suspension wurde anschließend, wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben, Plasmid-DNA präpariert. Im Anschluss wurden 5 µl DNA in einem Doppelverdau mit geeigneten Restriktionsenzymen (zum Beispiel EcoRI/NcoI) überprüft und potentiell korrekte Plasmid-Klone sequenziert.

3.2.9 Restriktionsfragment-Analyse von PCR-Produkten und Plasmid DNA

DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen der Firmen NEB, Fermentas oder Thermo Fisher Scientific inkubiert. Standardmäßig wurden 1-2 µg Plasmid-DNA beziehungsweise 2-10 µg PCR-Produkt für eine Restriktionsanalyse verwendet (Tabelle 18).

Tabelle 18. Ansatz Standard-Restriktionsanalyse.

Ansatz	
x µl	DNA
1 µl	Restriktionsenzym
3 µl	Zugehöriger Puffer (10x)
auf 30 µl	mit sterilem Wasser

Der Ansatz wurde für eine Stunde bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur inkubiert und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt und analysiert. Alternativ konnten die enzymatisch hergestellten Fragmente über das QIAquick Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben isoliert und gereinigt werden (3.2.6.3).

3.2.10 Restriktionsanalyse von BAC- und viraler HSV2-DNA

Um den Erfolg der Mutagenese (3.2.12 und 3.3.3) zu überprüfen, wurde BAC-DNA beziehungsweise virale DNA mit einer Restriktionsendonuklease behandelt, mit der man aufgrund einer erfolgten Insertion oder Deletion eine Veränderung im spezifischen Restriktionsendonuklease-Bandenmuster erkennen konnte. Folgender Ansatz wurde hierfür angesetzt (Tabelle 19).

Tabelle 19. Ansatz BAC-DNA Restriktionsanalyse.

Ansatz	
10 µl	DNA
0,5 µl	Restriktionsenzym
2 µl	Zugehöriger Puffer (10x)
2 µl	BSA (10x) optional nach Enzym
auf 20 µl	mit sterilem Wasser

Die Ansätze wurden für zwei Stunden bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur inkubiert. Nach Zugabe von 5 µl 5x DNA-Gelladepuffer wurden die Proben auf ein 0,6-0,8% Agarosegel in 0.5x TBE aufgetragen und je nach den erwarteten DNA-Fragmentgrößen für

mindestens 14 Stunden bei einer Spannung von bei 2.8 V/cm bei 4°C separiert. Als Marker wurden 5 µl 1kb DNA *ladder* (N3232) (NEB) aufgetragen, um eine Aussage über die Größe und das Bandenmuster der DNA-Fragmente zu erhalten.

3.2.11 Sequenzieren von DNA

Im Anschluss an eine positive Selektion mittels Restriktionsfragment-Analyse wurden 5 µl DNA zur DNA-Sequenzierung zur Firma SeqLab (Göttingen) geschickt. Die externe Sequenzierung erfolgte im Falle einer TOPO-Klonierung oder bei Konstrukten mit einem pUC19 Rückgrat mit den *Primern* M13rev oder M13for der Firma Seqlab. Alternativ wurden 2 µl eines hauseigenen 10 pmol/µl *Primers* hinzugegeben. Die Sequenzierung erfolgte nach der Sangermethode (Sanger-Sequenzierung).

3.2.11.1 Next Generation Sequencing

Die Sequenzierung der vollständigen Virusgenome wurde von Mitarbeitern der Forschungsgruppe Virus Genomik (Prof. A. Grundhoff) am Heinrich-Pette-Institut durchgeführt. Hierfür wurde die virale DNA zunächst aus BHK-21 Zellen isoliert (3.2.3) und durch Sonifizieren fragmentiert. Die DNA-„Bibliothek“ wurde nach Angaben des „*Protocol for use with NEB Next Ultra DNA Library Prep Kit for Illumina (E7370)*“ (NEB) hergestellt. Die Sequenzierung erfolgte mit einem MiSeq Illumina^{TR} Instrument. Die *in silico* Konstruktion der gesamten Genomsequenz aus den einzelnen Sequenzierreaktionen (*reads*) erfolgte mit dem SPAdes v3.10.1 Programm. Der Vergleich der Gesamt-Sequenz mit der Referenzsequenz HSV2 HG52 (NC_001798.2) erfolgte mit dem blast v2.7.1 Programm.

3.2.12 *En Passant* Mutagenese zur Generierung der HSV2 BAC-Mutanten

Die Herstellung der BAC-Mutanten erfolgte mittels *En Passant* Mutagenese, einer speziellen Form der BAC-Mutagenese (Tischer et al., 2010). Die Durchführung erfolgte in *E. coli* GS1783 in zwei aufeinanderfolgenden Red-Rekombinationsschritten (Abbildung 7).

3.2.12.1 Ausgangskonstrukt für die *En Passant* Mutagenese

Zur Mutagenese in Bakterien musste das virale Genom von wildtyp (wt) HSV2 (Stamm MS) zunächst als BAC kloniert werden. Dieser Schritt wurde von Meseda und Kollegen durchgeführt und das Konstrukt, als pHSV2(MS)BAC bezeichnet, uns zur Verfügung gestellt (Meseda et al., 2004). Die BAC-Kassette wurde hier in das *U_L23* Gen (kodierend für die Thymindinkinase) ligiert. Um die Wildtypsequenz wieder herzustellen, wurde von Dr. Claus-Henning Nagel (Heinrich-Pette-Institut, Hamburg) der Leserahmen von *U_L23* repariert (Czechowicz, 2013). Zudem wurde in die BAC-Kassette das Gen für die *Cre*-Rekombinase,

die ausschließlich in eukaryotischen Zellen exprimiert wird, inseriert und die BAC-Kassette mit LoxP Sequenzen flankiert (Abbildung 6). Dieser Schritt gewährleistete, dass die BAC-Kassette nach Transfektion eukaryotischer Zellen durch Cre-vermittelte Rekombination aus dem viralen Genom entfernt wurde, sodass reines Wildtypvirus in der Zelle produziert wird (Czechowicz, 2013). Das Konstrukt wurde als pHSV2(MS)Lox bezeichnet und diente als Ausgangskonstrukt für die Generierung der SIAH-bindedefizienten ICP0-Mutanten.

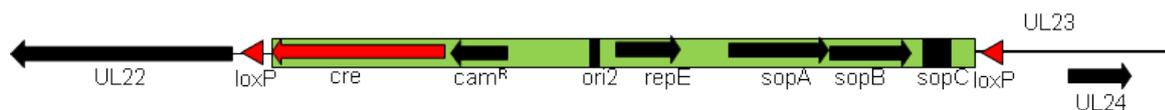


Abbildung 6. Ausschnitt aus pHSV2(MS)Lox. Schematische Darstellung der Modifikationen von U_L23 und der von loxP-Sequenzen flankierten BAC-Kassette. Diese enthält eine Cre-Kassette (Cre), das Chloramphenicolresistenzgen (Cam^R), die Gene für die Plasmid-Partitionierungs-Proteine *sopA*, *sopB* und *sopC*, sowie das Replikations-Initiator Protein (*repE*), das die Replikation des Genoms vom Ursprung (*origin*) *ori2* ausgehend initiiert. Abbildung nach Dr. Claus-Henning Nagel (Heinrich-Pette-Institut)

3.2.12.2 Induktion der Red-Enzyme

Es wurden 5 ml LB-Medium + 17 $\mu\text{g/ml}$ Chloramphenicol mit 10 μl Flüssigkultur des pHSV2(MS)Lox tragenden Bakterienstamms angeimpft und bei 32°C schüttelnd inkubiert bis die OD_{600} einen Wert von 0.6-0.8 erreichte. Im Anschluss wurde die Kultur für 15 min bei 42°C inkubiert. Dieser Schritt diente zur Induktion der Red-Gene.

3.2.12.3 Herstellung elektrokompenter Zellen

Nach der Inkubation bei 42°C wurde die Kultur umgehend für 20 min auf Eis inkubiert. Alle weiteren Schritte erfolgten von nun an bei 0°C. Nach der Inkubation wurden die Zellen bei 1.700 x g für 15 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml eiskaltem sterilem Wasser resuspendiert. Die Suspension wurde in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und für 1 min bei 20.800 x g zentrifugiert und das Pellet im Anschluss erneut in 1 ml eiskaltem Wasser resuspendiert. Dieser Schritt wurde insgesamt 3x wiederholt. Anschließend wurde das Bakterienpellet in 50 μl eiskaltem 10% Glycerol aufgenommen. Die Bakterien waren nun bereit für die Elektroporation mit dem jeweiligen PCR-Rekombinationsfragment.

3.2.12.4 Herstellung des Rekombinationsfragments

Zur Amplifikation des Rekombinationsfragments wurden je nach herzustellendem Konstrukt unterschiedliche Primer verwendet (Tabelle 1). Die Amplifikation erfolgte in Fünffachansätzen gemäß dem folgenden Pipettierschema (Tabelle 20).

Tabelle 20. Herstellung der PCR-Rekombinationsfragmente für die *En Passant* Mutagenese. Zur Herstellung der SIAH-bindedefizienten ICPO-Mutanten mittels *En Passant* Mutagenese wurden zunächst PCR-Rekombinationsfragmente generiert, die die Punktmutationen enthielten. Die Reaktionen wurden im Fünffachansatz durchgeführt und auf fünf Reaktionsgefäße à 50 µl aufgeteilt. Volumenangaben in µl. Ansatz nach (Tischer et al., 2010)

PCR-Ansatz	NxN1 (V414N/P416N)	NxN2 (V316N/P318N)
Wasser	133,25	133,25
DMSO	6,25	6,25
2.5x 5'Mastermix	100	100
CHN312for 10 µM	5	
CHN313rev 10 µM	5	
CHN283for 10 µM		5
CHN284rev 10 µM		5
pEP-Kan-S 10 ng/µl	0,5	0,5

PCR Programm

95°C 2'
95°C 30" ;
52°C 30" ; 10x
72°C 1,5' ;
95°C 30" ;
68°C 30" ; 25x
72°C 1,5' ;
72°C 5'

Nach der PCR wurden die fünf Ansätze vereinigt und gemäß Abschnitt 3.2.6.2 aufgereinigt. Im Anschluss wurde der Ansatz für 30 Minuten bei 37°C mit der Restriktionsendonuklease DpnI inkubiert, um restliches pEP-Kan-S abzubauen. Somit wurde verhindert, dass *E. coli* mit integriertem pEP-Kan-S als falsch-positiver Klon auf der Kanamycin-Agarplatte wuchs. DpnI prozessiert die Sequenz GATC nur, wenn die entsprechende DNA methyliert ist. Dies ist bei dem PCR-Produkt nicht der Fall, jedoch bei dem pEP-Kan-S Ausgangs-Plasmid.

Ansatz

11,5 µl Fast Digest-Puffer
2 µl FastDigest-DpnI

Um zu überprüfen, ob das PCR-Fragment amplifiziert wurde, wurden 5 µl auf ein 1% Agarosegel in 1x TAE aufgetragen und für 30 min bei 100 V elektrophoretisiert. Danach erfolgte eine erneute Aufreinigung des hergestellten PCR-Konstrukts nach 3.2.6.2.

3.2.12.5 Elektroporation und erste Red-Rekombination

Küvetten für die Elektroporation wurden vorab auf Eis gekühlt. Zur Elektroporation wurden 5 µl aufgereinigtes PCR-Produkt mit 50 µl Bakteriensuspension (3.2.12.3) gemischt und in vorgekühlten Küvetten vorgelegt. Die Elektroporation erfolgte bei 2.5 kV, 200 Ω und 25 µF. Im Anschluss wurde 1 ml 32°C warmes LB-Medium hinzugegeben und der Ansatz für 1 Stunde bei 32°C inkubiert. Danach wurde die Flüssigkultur für 1 min bei 18.000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Im verbliebenen Restüberstand (ca. 20 µl) wurde das Zellpellet resuspendiert und auf Selektionsagarplatte (Chloramphenicol und Kanamycin; siehe Tabelle 11) ausgestrichen. Die Platte wurde für 1-2 Tage bei 32°C inkubiert bis Kolonien sichtbar waren. 10-20 Kolonien wurden anschließend isoliert und über Nacht in 2 ml LB-Medium mit Chloramphenicol und Kanamycin bei 32°C inkubiert. Am Folgetag wurde die DNA der Intermediate nach 3.2.2 isoliert und durch Restriktionsanalyse 3.2.10 die Rekombination überprüft.

3.2.12.6 Zweite Red-Rekombination

Zwei ml LB-Medium + 17 µg/ml Chloramphenicol ohne Kanamycin wurden mit 10 µl Übernachtskultur eines potentiell korrekten Intermediates inokuliert und für 4 Stunden bei 32°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden 2 ml auf 32°C vorgewärmtes LB-Medium mit 17 µg/ml Chloramphenicol und 0,1% (w/v) L-Arabinose zur I-SceI Induktion hinzugegeben und bei 32°C für eine weitere Stunde inkubiert. Zur Induktion der Red-Enzyme wurde der Ansatz für 30 min in einem 42°C warmen Wasserbad inkubiert und im Anschluss für 2 Stunden bei 32°C geschüttelt. Mit einer Impföse wurden 10 µl der Suspension auf eine Selektionsagarplatte (Chloramphenicol + 1% [w/v] L-Arabinose) ausgestrichen und über Nacht bei 32°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden 10 Kolonien erst auf eine Agarplatte mit Chloramphenicol + Kanamycin, und im Anschluss mit derselben Öse auf eine Agarplatte mit ausschließlich Chloramphenicol aufgebracht. Nur bei denjenigen Klonen, die auf der Chloramphenicol-Platte, aber nicht auf der Kanamycin enthaltenden Platte angewachsen sind, erfolgte die zweite Red-Rekombination. Von diesen Klonen wurden Übernachtskulturen in LB-Medium mit Chloramphenicol angesetzt und anschließend die DNA präpariert. Zur Identifizierung korrekter Mutanten wurde die DNA im Anschluss mit verschiedenen Restriktionsenzymen behandelt 3.2.10 und das Bandenmuster der Restriktionsfragmente überprüft. Von den als positiv identifizierten Kolonien wurde im

Methoden

Anschluss der mutierte *ICP0*-Bereich (VxP-Region) amplifiziert (3.2.6, 3.2.6.1) und anschließend zur DNA-Sequenzierung (3.2.11) in einen TOPO-Vektor ligiert (3.2.8.1).

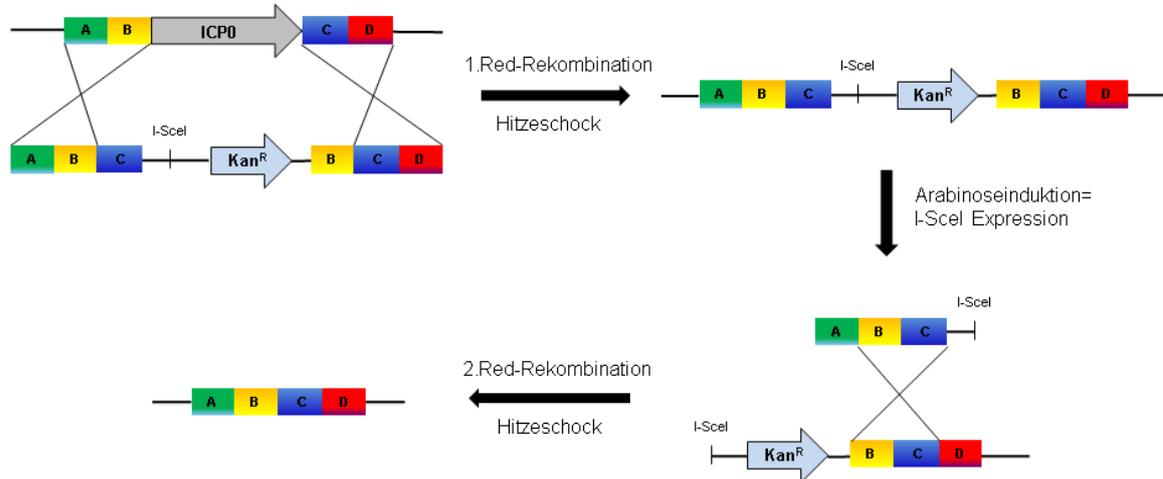


Abbildung 7. Schematische Darstellung der *En Passant* Mutagenese am Beispiel der Deletion von *ICP0*. Die Sequenzen A-D stellen die Homologiearme dar. Sie haben jeweils eine Größe von 20 bp, farblich gleich markierte Abschnitte sind sequenzidentisch. Ebenfalls angezeigt sind das *ICP0* Gen, sowie das PCR-Produkt, das eine Kanamycinresistenzkassette *Kan^R* und die I-SceI Restriktionsschnittstelle trägt. Die *En Passant* Mutagenese erfolgt in zwei Schritten: (1) Nach Hitzeschock bei 42°C erfolgt die erste Red-Rekombination der *ICP0*-Region im Genom mit dem PCR-Produkt; (2) Nach Arabinose-induzierter Expression von I-SceI durch *E. coli* GS 1783 und anschließendem Hitzeschock bei 42°C erfolgt die zweite Red-Rekombination. Hierbei wird die *Kan^R*-Kassette aus dem Genom entfernt und es bleibt ausschließlich die gewünschte Mutation zurück.

3.2.13 Generierung der Plasmide für die homologe Rekombination in eukaryotischen Zellen

Bei der homologen Rekombination werden in zwei voneinander unabhängigen DNA-Strängen genetische Sequenzen über Homologiearme reziprok ausgetauscht. In dieser Arbeit wurde die DNA-Sequenz von Wildtyp *ICP0* aus HSV2 durch eine Intron-freie, GC-optimierte *ICP0* Sequenz ersetzt, die an ihrem C-Terminus mit der DNA-Sequenz (*ORF*) von GFP fusioniert war. Durch GC-Optimierung wurde vorgenommen, um die nachfolgenden Klonierungsschritte und Amplifizierungen zu vereinfachen. Zur Herstellung einer *ICP0*-Mutante mit mutierter VxP-Region (*ICP0^{NxN}*) enthielt die synthetisierte *ICP0-GFP* Sequenz zudem eine Punktmutation in der/den SIAH-Bindedomäne(n) (Tabelle 25). Für die homologe Rekombination musste zunächst das Transferplasmid hergestellt werden, welches die Zielsequenz trug und von Homologiearmen flankiert war. Die Klonierung des Transferplasmids erfolgte in mehreren Schritten.

3.2.13.1 Klonierung des Homologieplasmids

Im ersten Schritt wurde ein Plasmid generiert, welches die HSV2-Homologiearme zur homologen Rekombination trug (Homologieplasmid). Hierfür wurden folgende Ausgangskonstrukte verwendet:

- 1.) virale DNA von HSV2 Stamm MS zur Amplifizierung der Homologiearme
- 2.) Vektor pUC19 (kodiert für die Sequenz des Selektionsmarkers LacZ)

Zudem wurden folgende Oligonukleotid-*Primer* eingesetzt (Tabelle 21).

Die Klonierung des Homologieplasmids erfolgte durch Dr. Claus-Henning Nagel und Bettina Abel (Heinrich-Pette-Institut).

Tabelle 21. *Primer* zur Klonierung des Homologieplasmids.

<i>Primer</i>	
CHN364for	mit EcoRI Erkennungsstelle
CHN365rev	mit SalI Erkennungsstelle
CHN366for	mit BamHI und XbaI Erkennungsschnittstelle und <i>overlap</i>
CHN367rev	mit BamHI und XbaI Erkennungsstelle und <i>overlap</i>

Die Amplifizierung der Homologiearme erfolgte mittels *Phusion* PCR. In einem Ansatz wurden mit den *Primern* CHN364/365 der 5'Homologiearm (517 bp) hergestellt, und im anderen mit den *Primern* CHN366/CHN367 der 3'Homologiearm (545 bp).

Tabelle 22. Ansatz zur Herstellung der Homologiearme mittels *Phusion* PCR.

Ansatz	
2,5 µl	<i>Forward Primer</i> (10 µM)
2,5 µl	<i>Reverse Primer</i> (10 µM)
1,0 µl	dNTPs (10mM)
0,5 µl	<i>Phusion</i> Polymerase
10 µl	5x <i>Phusion</i> GC Puffer
1-2 µl	virale DNA (ca. 100 ng)
31,5 µl	steriles Wasser

Programm

98°C 30''
 98°C 10'' ;
 60°C 30'' : 30X
 72°C 1' ;
 72°C 10'
 4°C

Methoden

Die PCR Ansätze wurde auf ein 1,5% Gel geladen, bei 90V für 45-60 min separiert und die erwünschten Banden (517 bp und 545 bp) aus dem Gel isoliert, nach 3.2.6.3 aufgereinigt und im Anschluss in 50 µl Wasser eluiert.

Im darauffolgenden Schritt wurden *Splice*-Überhänge der beiden Homologiearme mittels *Splice-overlap PCR* generiert.

Tabelle 23. *Splice-overlap PCR*.

Ansatz	
2,5 µl	CHN364 for (10 µm)
2,5 µl	CHN367 rev (10 µm)
1,0 µl	dNTPs (10mM)
0,5 µl	Phusion Polymerase
10 µl	5x Phusion GC Puffer
1,0 µl	PCR Produkt aus 5' Homologie
1,0 µl	PCR Produkt aus 3' Homologie
30,5 µl	steriles Wasser

Das PCR-Programm entsprach dem der *Phusion*-PCR.

Das zu erwartende PCR-Amplifikat hatte eine Länge von 1.037 bp. Auch hier wurde der Ansatz im Anschluss per Gelextration aufgereinigt und in 50 µl Wasser eluiert.

Im nächsten Schritt wurde das *Splice*-Überhangfragment sowie der Zielvektor pUC19 für die Klonierung des Homologieplasmids in einem Doppelverdau mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und SalI wie folgt behandelt (Tabelle 24).

Tabelle 24. Restriktionsansatz des Zielvektors pUC19 und des *Inserts* (Homologiearme) mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und SalI.

Ansatz 1 Vektor	Ansatz 2 Fragment (<i>Insert</i>)
2 µg pUC19	45 µl PCR-Produkt
2 µl Puffer	5 µl Puffer
1 µl EcoRI	0.5 µl EcoRI
1 µl SalI	0.5 µl SalI
14 µl Wasser	-/-

Beide Ansätze wurden für 1h bei 37°C inkubiert.

Ansatz 1 wurde über eine Gelextraktion aufgereinigt, und Ansatz 2 über eine direkte Aufreinigung des PCR-Produkts nach 3.2.6.2. Beide Produkte wurden in 50 µl Wasser eluiert.

Im Anschluss erfolgte die Ligation des Homologieplasmids mit 7 µl PCR Fragment (*Insert*) und 1 µl pUC19 Vektor nach 3.2.8.

Der Ansatz wurde 15-20 min bei RT inkubiert und anschließend in X_L10 Gold Bakterien nach 3.1.2 transformiert. Die Analyse der Kolonien erfolgte am Folgetag über eine blau-weiß Selektion nach 3.1.3. Hierfür wurden 10 weiße Kolonien isoliert und eine 2ml Über-Nachtkultur in LB-Medium + Ampicillin angesetzt. Am Folgetag wurde die DNA präpariert (3.2.1).

Zur Identifizierung korrekter Klone, die das Homologieplasmid aufgenommen hatten, wurde im nächsten Schritt ein Test von 3 µl DNA mit den Restriktionsenzymen EcoRI und SalI wie in 3.2.9 durchgeführt. Die zu erwartenden Banden hatten die Länge von 1.037 bp für das *Insert* und 2.639 bp für den Vektor. Die DNA der Klone mit korrektem Bandenmuster wurden im Anschluss mit den Seqlab-Primern M13rev und M13for sequenziert (3.2.11). Das Homologieplasmid wurde von nun an als pICP0hom (Abbildung 8) bezeichnet.

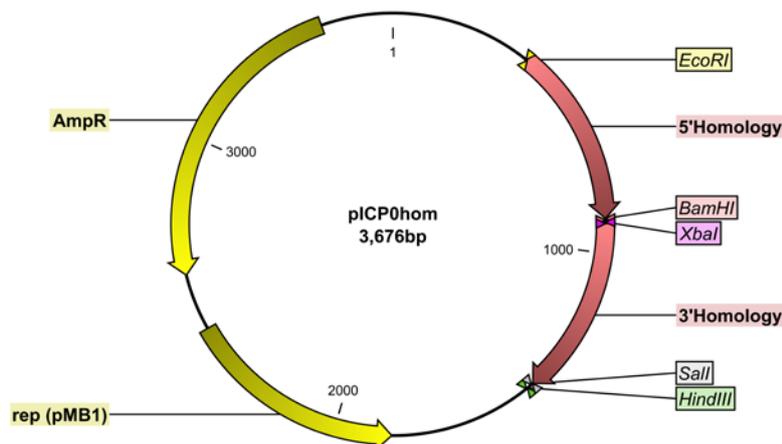


Abbildung 8. pICP0hom Vektorkarte. Die 5`- und 3`- Homologiearme (rot) wurden in den pUC19 Vektor ligiert. Sie sind identisch zur Sequenz, die das Wildtyp HSV2 *ICP0* Gen flankieren. Zusätzlich angezeigt sind die Restriktionsschnittstellen verschiedener Restriktionsendonukleasen, sowie die Ampicillinresistenzkassette und der Replikationsursprung *origin of replication* (gelb) in pUC19.

3.2.13.2 Klonierung des Transferplasmids

Im nächsten Schritt wurden die Transferplasmide für die anschließende homologe Rekombination generiert. Hierfür benötigte man folgende Ausgangskonstrukte:

1.) pICP0hom

und je nach herzustellendem Konstrukt *¹

A) pcDNA3-ICP0-GFP

B) pcDNA3-ICP0^{NxN1}-GFP

C) pcDNA3-ICP0^{NxN2}-GFP

D) pcDNA3-ICP0^{NxN1/2}-GFP

*¹ Das eukaryotische Expressionsplasmid pcDNA3-ICP0-GFP mit der *ICP0*-Sequenz aus HSV2 wurden bereits früher publiziert (Nagel et al., 2011). Details, siehe Tabelle 25. Die pcDNA3-ICP0^{NxN}-GFP Plasmide wurden anschließend von Dr. Claus-Henning Nagel aus diesem Plasmid generiert. Hierbei wurden die jeweiligen Punktmutationen in den SIAH-Bindemotiven (Tabelle 25) mit dem *QuikChange site directed mutagenesis kit* (Agilent) eingefügt. Die daraus resultierenden AS-Sequenzen sind in Tabelle 29 dargestellt.

Tabelle 25. DNA-Sequenz der SIAH Konsensus-Bindemotive. Aufgezeigt sind die Sequenzen der intakten Bindemotive in HSV2 Wildtyp (wt) *ICP0* (VxP1 und VxP2-Region), sowie die Sequenz von Wildtyp *ICP0-GFP* (VxP1-GFP und VxP2-GFP). Daneben sind die Sequenzen der inaktivierten Bindemotive in *ICP0-GFP* (NxN1-GFP und NxN2-GFP) aufgelistet. Unterstrichen sind Basentriplets, die für die Bindung an SIAH, beziehungsweise für deren Inaktivierung entscheidend sind. Bei der Inaktivierung wird anstelle von Valin (V) und Prolin (P) jeweils Asparagin (N) in die AS-Sequenz eingebaut.

Konsensus-Bindemotiv in HSV2 ICP0	DNA-Sequenz
VxP1 wt	GCG GCC <u>GTC</u> GCC <u>CCG</u> CGC GTC
VxP2 wt	GCG GCC <u>GTC</u> GTG <u>CCG</u> AGA GTG
VxP1-GFP	GGT GCT <u>GTG</u> GCA <u>CCA</u> CGC GTG
VxP2-GFP	GCA GCT <u>GTG</u> GTG <u>CCA</u> CGT GTG
Inaktiviertes Bindemotiv	DNA-Sequenz
NxN1-GFP	GGT GCT <u>AAT</u> GCA <u>AAT</u> CGC GTG
NxN2-GFP	GGA GCT <u>AAT</u> GTG <u>AAT</u> CGT GTG

Zunächst wurden 20 µl des Homologieplasmids pICP0-hom und des jeweilige pcDNA3-Plasmid in einem Doppelsatz mit den Enzymen XbaI und BamHI behandelt. Nach 1h bei 37°C wurden die Ansätze auf ein 1% Agarosegel aufgetragen. Die zu erwartenden Banden hatten im Fall von pICP0hom eine Länge von 3.672 bp (linearisiert), bei den pcDNA3-Plasmiden eine Länge von 3198 bp (*ICP0-GFP Insert*) und 5376 bp (pcDNA3 Vektor-Rückgrat). Die Fragmente wurden im Anschluss mittels Gelextration aufgereinigt und in 50 µl Wasser eluiert. Im nächsten Schritt wurden 7 µl *Insert (ICP0-GFP)* mit 1 µl Vektor pICP0-hom ligiert (3.2.8, Abbildung 9). Der Ansatz wurde für 15-20 min bei RT inkubiert und im Anschluss wie in 3.2.13.1 beschrieben behandelt. Hier erfolgte jedoch keine blau-weiß Selektion, sondern lediglich eine Selektion über Antibiotika-Resistenz (Ampicillin). Ein Testverdau von der DNA der Klone erfolgte mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und SalI (3.2.9). Hier galt es nicht nur zu überprüfen, ob das *Insert* integriert worden war, sondern auch in welcher Orientierung dies erfolgte.

Von zwei Klonen wurde im Anschluss eine DNA-Präparation im großen Maßstab (3.1.1, 3.2.1) angefertigt und die DNA anschließend auf 1µg/µl eingestellt. Im Anschluss erfolgte eine DNA-Sequenzierung der Konstrukte mit den Oligonukleotid-*Primern* JCZ040for, sowie den SeqLab Oligonukleotiden M13for und M13rev. Bei einem positiven Sequenzierergebnis wurde die DNA für die nachfolgende homologe Rekombination verwendet.

Folgende Transferplasmide wurden generiert:

- A) pICP0hom-ICP0-GFP (Abbildung 9)
- B) pICP0hom-ICP0^{NxN1}-GFP
- C) pICP0hom-ICP0^{NxN2}-GFP
- D) pICP0hom-ICP0^{NxN1/2}-GFP

Beschreibung der Plasmide und ihrer Funktion, siehe Tabelle 7.

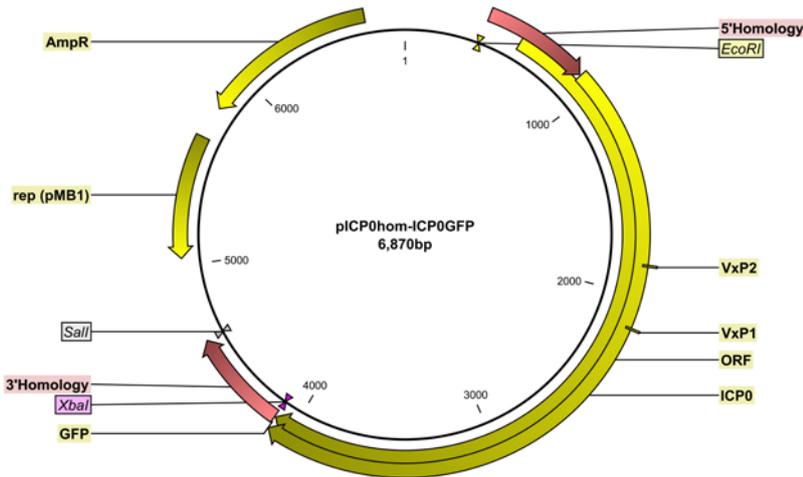


Abbildung 9. pICP0hom-ICP0GFP Vektorkarte. Die GC-optimierte *ICP0-GFP* Sequenz wurde in Vektor pICP0hom zwischen die 5'- und 3'- Homologiearme (rot) ligiert. Zusätzlich angezeigt sind die Restriktionsschnittstellen verschiedener Restriktionsendonukleasen, sowie die Ampicillinresistenzkassette, der Replikationsursprung *origin of replication (rep)* (gelb) und die intakten SIAH-Bindemotive (VxP1 und 2) in ICP0.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen

Adhärente konfluente Zellen wurden mit 2 ml Trypsin vom Boden gelöst, in 13 ml Kulturmedium resuspendiert und anschließend für 5 min bei 200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 5×10^6 Zellen in 1 ml FCS + 10% (v/v) DMSO resuspendiert, und in ein 1,8 ml Kryokonservierungsgefäß mit Außengewinde überführt. Die Gefäße wurden zum schonenden Einfrieren in eine auf 4°C vorgekühlte Einfrierbox verbracht. Die Einfrierbox ermöglicht das Abkühlen der Zellen mit einer definierten Rate von -1°C/min. Hierfür wurde die Einfrierbox mit den Kryogefäßen zunächst für zwei Tage bei -80°C gelagert und die Gefäße zur langfristigen Lagerung daraufhin in einen -180°C Stickstofftank verbracht.

Zum Auftauen wurden die eingefrorenen Zellen zügig im 37°C Wasserbad aufgetaut. Sobald nur noch ein kleiner Teil der Suspension gefroren war, wurde die Zellsuspension in ein Reaktionsgefäß mit 10 ml vorgewärmten DMEM überführt und bei 200 x g für 5 min zentrifugiert. Um das DMSO vollständig zu entfernen, wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 10 ml 1x PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden im Anschluss in 15 ml DMEM aufgenommen und in einer 75 cm² Zellkultur-Flasche ausgesät.

3.3.2 Kultivierung und Passagieren adhärenter Zellen

Vero-, BHK-, und U2OS Zellen wurden in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) versetzt mit 10% hitzeinaktiviertem FCS (Biochrom), 4 mM L-Glutamin, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin, 1 mM Natriumpyruvat und 5% Natriumbicarbonat Puffer (7,5% w/v) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Bei HepaRG-Zellen wurden zu dem oben genannten Inhaltsstoffen 5 µg/ml bovines Insulin und 1 µg/ml Hydrocortison hinzugegeben. Bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen (2-3x pro Woche) passagiert. Hierfür wurden die adhärenen Zellen zunächst mit 12 ml PBS je Flasche gewaschen und anschließend durch Inkubation mit 2 ml 0,05% Trypsin/EDTA für 2-5 min bei 37°C vom Zellkulturflaschenboden abgelöst. Das Ablösen der Zellen durch Trypsin/EDTA wurde im Anschluss durch Zugabe von 13 ml DMEM beendet und die Zellen vorsichtig resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen im Verhältnis 1:5 bis 1:10 in 75 cm² Zellkulturflaschen mit einem Gesamtvolumen von 15 ml ausgesät. Die Zellen wurden bis höchstens Passage 30 verwendet.

3.3.3 Homologe Rekombination in eukaryotischen Zellen

Zur Herstellung von HSV2 ICP0-Mutanten mittels homologer Rekombination in eukaryotischen Zellen wurde Passage 2 Virus HSV2 Stamm MS Wildtyp (HSV2 (MS)) verwendet, sowie die in 3.2.13.2 hergestellten Transferplasmide, die die erwünschte Zielsequenz (*Insert*) trugen und von Homologiearmen, die der HSV2 Wildtypsequenz (Aufwärts und abwärts der *ICP0*-Sequenz) entsprachen, flankiert waren (Abbildung 10). Zunächst wurden 20 µg des jeweiligen Transferplasmid mit dem Restriktionsenzym Sall (nach Ansatz Tabelle 24) für 2h bei 37°C linearisiert. Parallel wurden U2OS Zellen in einer 6-*well* Platte mit 5x10⁵ Zellen/Vertiefung in 2 ml Kulturmedium ohne Antibiotikum ausgesät. Am Folgetag erfolgte die Transfektion der U2OS Zellen mit dem jeweiligen linearisierten Transferplasmid.

Ansatz

2 µg linearisiertes Transferplasmid

200 µl OptiMEM

7 µl TransIT

Der Ansatz wurde im Anschluss kurz gevortext, für 30 min bei RT inkubiert und anschließend auf die Zellen pipettiert. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurden die transfizierten Zellen mit HSV2(MS) Wildtyp*² mit einer MOI von 5 pfu/Zelle infiziert. Hierfür wurden die transfizierten Zellen zunächst mit 1x PBS gewaschen und für 20 min auf Eis vorgekühlt. Das Virus (MOI 5) wurde in insgesamt 0,5 ml RPMI

angesetzt und für 1 Stunde auf die Zellen gegeben, die Inkubation erfolgte auf Eis. Nach Entfernung des Inokulums wurden 2 ml Vollmedium auf die Zellen gegeben und diese bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Zur Überprüfung erfolgreicher Rekombination wurden 24-48 Stunden nach der Infektion die Virusplaques des Zellrasens mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops hinsichtlich grün fluoreszierender Plaques analysiert. Etwa 3 Tage nach der Infektion waren die Zellkulturen durchinfiziert (CPE) und wurden zusammen mit dem Überstand in ein Kyroreaktionsgefäß überführt und 2x in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei 37°C wieder aufgetaut, um die infizierten Zellen aufzuschließen. Das rekombinante Virus konnte entweder bei -80°C gelagert werden, oder wurde direkt im Anschluss über eine Verdünnungsreihe Plaque-gereinigt (3.3.8).

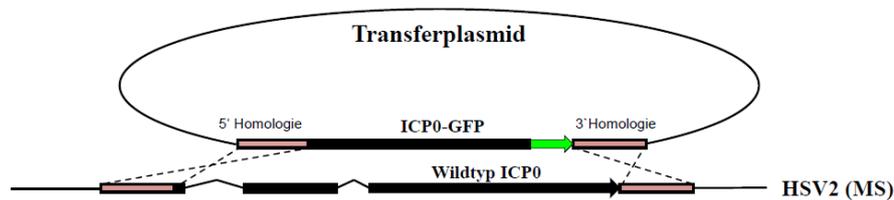


Abbildung 10. Homologe Rekombination. Zellen wurden mit dem Transferplasmid transfiziert und nach 24 Stunden mit HSV2 MS Wildtyp (HSV2 (MS)) infiziert. Über die homologen Sequenzen (rot) im Transferplasmid und dem HSV2 Genom erfolgte die Rekombination. Hierbei wurde die Wildtyp *ICP0* Sequenz in HSV2 MS gegen die synthetische *ICP0-GFP* Sequenz ausgetauscht.

*² Wildtyp HSV2 MS wurde vorab über eine Verdünnungsreihe (3.3.8) Plaque-gereinigt.

3.3.4 Rekonstitution von HSV2 mittels BAC-Transfektion

In 2 ml DMEM kultivierte U2OS Zellen wurden am Vortag in 6-well Platten mit 5x10⁵ Zellen/Plattenvertiefung ausgesät. Am nächsten Tag wurde der BAC-Transfektionsansatz hergestellt, wie folgt:

Ansatz

200 µl OptiMEM

0.25 µg BAC-DNA (hergestellt im Maximaßstab)

1.75 µg Lachssperma-DNA

6 µl TransIT Reagenz

Der Ansatz wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, in eine 6-well Platte mit zuvor ausgesäten U2OS Zellen gegeben und bei 37°C bis zur Plaquebildung inkubiert. Daraufhin wurden die infizierten Zellen geerntet (P0-Präparation) und entweder in ein

Kryoschraubgefäß überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert, oder direkt für eine Passage 1 Viruspräparation verwendet.

3.3.5 Passage 1 (P1) - Virus Präparation

Zwei 75 cm^2 -Flaschen mit konfluenten BHK-21 Zellen wurden mit den zuvor geernteten infizierten U2OS Zellen (P0 Präparation 3.3.4) inokuliert. Hierbei wurde jeweils 1 ml Inokulum in eine T75-Flasche vorgelegt. Anschließend wurden die Kultur-Flaschen bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Als Anhaltspunkt für den Erntezeitpunkt wurde die allgemeine Zellmorphologie herangezogen. Beim zytopathischen Effekt (CPE), das heißt wenn die infizierten Zellen komplett abgerundet und zum Großteil vom Substrat abgelöst sind, sollte die Ernte erfolgen.

Die Ernte erfolgte durch Abklopfen der noch adhärennten BHK-21 Zellen vom Substrat und durch das anschließende Sammeln der infizierten Zellen in einem 50 ml Zentrifugationsgefäß auf Eis. Die infizierten BHK-21 Zellen wurden für 10 min bei 4°C und $440 \times g$ zentrifugiert. Der Bodensatz (Pellet) wurde in 2 ml 1x MNT resuspendiert und zweimal in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut, um die restlichen Zellen aufzuschließen. Dieser Ansatz wurde in Kryokonservierungsgefäße zu je 200 μl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

3.3.6 Passage 2 (P2) -Virus Präparation und Konzentration viraler Partikel mittels Ultrazentrifugation

Für Infektionsexperimente wurde Virus der Passage 1 aus dem Überstand infizierter BHK-21 Zellen verwendet. Der Titer des P1-Virus wurde vor der Infektion bestimmt (siehe 3.3.7), um die notwendige Virusmenge für die Infektion berechnen zu können. Es sollten zehn konfluente T75 Flaschen BHK-21 Zellen mit einer MOI von 0,01pfu/Zelle infiziert werden, dabei wurde von einer Zelldichte von etwa 5×10^6 Zellen/T75 Flasche ausgegangen.

Die berechnete Menge an P1-Virus wurde mit insgesamt 28 ml RPMI verdünnt. BHK-21 Zellen wurden mit 12 ml/Flasche PBS gewaschen. Im Anschluss wurden 3 ml Inokulum (Virus-RPMI) je Zellkulturflasche hinzugegeben und die fest verschlossenen Flaschen für 1-2 h bei RT auf einem Wippschüttler inkubiert. Anschließend wurden zum Inokulum 12 ml/Flasche Kulturmedium ohne Antibiotikum gegeben, der Schraubverschluss leicht geöffnet, und die Flaschen bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert, bis die Zellen möglichst vollständig infiziert und vom Substrat abgelöst waren. Auch hierbei galt der zytopathische Effekt als Richtlinie für den optimalen Zeitpunkt der Ernte.

Vor der Viruspräparation wurden alle Lösungen auf Eis vorgekühlt und die einzelnen Schritte bei 0°C durchgeführt. Die Kulturflasche mit den infizierten BHK-21 Zellen wurden fest verschlossen und adhärenente Zellen durch Klopfen gelöst. Medium und Zellen wurden in 50 ml Röhren gesammelt und die Flaschen anschließend mit insgesamt 10 ml 1x PBS gewaschen. Die Waschlösung wurde zu den vorab geernteten Proben gegeben. Im Anschluss wurden diese bei 3.300 x g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der Bodensatz (Pellet) bestand aus infizierten Zellen, der Überstand enthielt die ins Medium freigesetzten Viruspartikel. Mit dem Virusüberstand und dem Zellbodensatz wurde jeweils getrennt weitergearbeitet: Das Zellpellet wurde in insgesamt 10 ml 1x PBS resuspendiert und erneut für 10 min zentrifugiert. Der PBS-Überstand wurde anschließend verworfen und das Zellpellet in 1 ml MNT resuspendiert und zum Aufschließen und Freisetzen zell-assoziiierter Viruspartikel zweimal in flüssigem Stickstoff schockgefroren, und bei 37°C im Wasserbad wieder aufgetaut. Zum Abschluss wurden die Proben in Kyroschraubgefäße aliquotiert, nochmals in Stickstoff schockgefroren und bei - 80°C gelagert.

Die Viruspartikel aus dem Virusüberstand des ersten Schritts wurden mittels Ultrazentrifugation in einer Optima LE-80K Ultrazentrifuge (Beckman Coulter) konzentriert. Hierfür wurden sie in SW28 Ultrazentrifugengefäße überführt und bis auf 0,01 g tariert. Die Ultrazentrifugation wurde bei 19.100 x g und 4°C für 52 min durchgeführt. Danach wurde der Überstand verworfen und das Viruspellet (als „Mediumpellet“ bezeichnet) vorsichtig in 1 ml MNT-Puffer resuspendiert. Die Virussuspension wurde anschließend in sterile Schraubröhren aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Das Protokoll zur P2-Viruspräparation wurde ebenso für P3- und P4-Viruspräparationen eingesetzt.

3.3.7 Virustiterbestimmung mittels HSV *Plaque Assay* mit IgG Überschichtung

Der *Plaque Assay* ist ein quantitativer Nachweis infektiöser Partikel zur Bestimmung des Virustiters. Die Durchführung erfolgte wie früher beschrieben (Döhner et al., 2002). In Zellkulturschalen mit sechs Vertiefungen wurden am Vortag 5×10^5 U2OS Zellen- oder HepaRG Zellen/Vertiefung, beziehungsweise 3×10^5 Verozellen/Vertiefung ausgesät. Zur Titerbestimmung wurde zunächst eine Verdünnungsreihe der zu testenden Virussuspension in Zehnerschritten angesetzt. Die Verdünnung erfolgte in RPMI 1640 + 0,1% BSA in Duplikaten oder Triplikaten. Hierbei wurde zunächst 1 ml RPMI/BSA in eine Vertiefung einer 24-well Zellkulturplatte pipettiert und anschließend 11,1 µl der Virusstammlösung hinzupipettiert (entspricht einer 10^{-2} Verdünnung). Aus der ersten Verdünnung wurden 111 µl in die nächste Vertiefung transferiert, um eine 10^{-3} Verdünnung zu erhalten. Dieser Schritt

wurde zur Erstellung einer Verdünnungsreihe entsprechend wiederholt. Von den jeweiligen Verdünnungen wurden 0,5 ml (Virus-RPMI) auf die vorab ausgesäten Zellen gegeben und für 1 h bei RT auf dem Wippschüttler inkubiert. Anschließend wurde das Inokulum entfernt und 2 ml DMEM + 25 µg/ml humanem Immunglobulin G (IgG) zu den Zellen hinzugegeben und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Das Hinzufügen von humanen IgG ins Medium verhinderte während der Inkubation eine ungewollte Infektion von Zellen über das Kulturmedium mit Virionen der Folgegeneration, die den Titer des Ursprungsinokulums verfälschen würden. Aufgrund der weltweit hohen Anzahl an HSV-seropositiven Menschen befinden sich in deren Serum oftmals HSV neutralisierende IgGs. Dementsprechend wurden entsprechende Seren zur Überschichtung beim *Plaque Assay* verwendet. Somit erlaubten diese IgGs nur eine Bildung von Infektionshöfen (Plaques) durch direkte Infektionen von Nachbarzellen durch Zell-Zell-Kontakt.

Nach zwei bis drei Tagen, wenn Plaques zu erkennen waren, wurde das Medium von den Zellen abgenommen und die Zellen mit 1 ml -20°C Methanol pro Vertiefung für 5 min fixiert. Das Methanol wurde im Anschluss entfernt, die Zellen getrocknet und für 1 Stunde mit 0,1% Kristall-Violett angefärbt. Die nicht infizierten Zellen erschienen violett, wohingegen Infektionshöfe nicht angefärbt waren. Diese Zonen im Zellrasen wurden anschließend gezählt. Jedes Plaque entsprach hierbei ursprünglich einem infektiösen Partikel. Je nach Viruskonzentration bildeten sich unterschiedlich viele Plaques auf dem Zellrasen (Abbildung 11) mithilfe derer der Titer des Virus-Stocks in pfu/ml berechnet werden konnte:

$$\text{Titer} \left(\frac{\text{pfu}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{Anzahl der Plaques } (\bar{\chi}) \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Inokulationsvolumen in ml}}$$

Mit $\bar{\chi}$ = Mittelwert

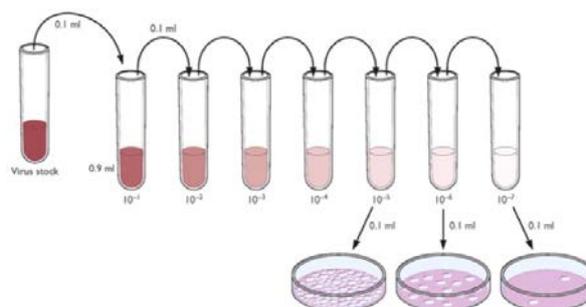


Abbildung 11. HSV *Plaque Assay* zur Bestimmung des Virustiters. Die in Zehnerschritten angefertigte Verdünnungsreihe der Virusstammmlösung wird auf den entsprechenden konfluenten Zellrasen gegeben. Mit Hilfe der Anzahl der gebildeten Infektionshöfe (Plaques) im Zellrasen kann

Methoden

der Titer der Virussuspension bestimmt werden. Jedes Plaque geht hierbei auf ein infektiöses Viruspartikel zurück. Abbildung entnommen aus:

(www.virology.ws/wpcontent/uploads/2009/07/plaque-assay).

3.3.7.1 Bestimmung der Größe viraler Plaquehöfe

Vom gegebenen Virusinokulum wurde zunächst eine Verdünnungsreihe nach 3.3.7 hergestellt und diese im Anschluss auf konfluent in einer 6-*well* Platte wachsende U2OS Zellen gegeben. Nach einer Stunde wurde das Inokulum entfernt und die Zellen mit 2 ml Vollmedium + 25 ng/ml IgG inkubiert (3.3.7). Nach 48 Stunden wurden die Zellen fixiert und mit 0,1% Kristallviolett gefärbt um zu überprüfen, bei welcher Verdünnung die Virusplaques am besten gemessen werden können. Die entsprechenden Vertiefungen (*wells*) wurden mit Hilfe eines Geldokumentationssystems aufgenommen und die Fläche der einzelnen Plaques anschließend mittels Photoshop bestimmt. Das Experiment wurde dreimal wiederholt. Statistische Unterschiede in den Plaquehöfen der einzelnen Virus-Konstrukte wurden mittels Mann-Whitney U Test berechnet.

3.3.8 Plaquereinigung mittels Verdünnungsreihe zur Herstellung homogener Virusbestände

Am Vortag wurden U2OS Zellen mit 5×10^5 Zellen/Vertiefung in 6-*well* Platten ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden zwei 1:10 Verdünnungsreihen des inhomogenen Virusbestandes mit den Verdünnungen 10^{-2} - 10^{-9} in RPMI/FCS nach 3.3.7. hergestellt. Im Anschluss wurden 0.5 ml der jeweiligen Verdünnungen auf die ausgesäten U2OS Zellen geben und für 1h bei RT auf einem Wippschüttler inkubiert. Danach wurde das Inokulum von den Zellen abgenommen und die Zellen mit 1 ml 1% LMP-Agarose in DMEM beschichtet.

1% LMP Agarose in DMEM

0,2 g LMP Agarose

10 ml H₂O (steril)

➔ 2% LMP-Agarose

Diese wurde in der Mikrowelle erhitzt und danach auf eine Temperatur von etwa 37°C abgekühlt. Parallel wurde 2x DMEM angesetzt und im Verhältnis 1:1 mit der 2% LMP-Agarose gemischt.

Die 6-*well* Platten wurden zum Aushärten der LMP-Agarose für 30 min bei 4°C inkubiert und anschließend mit 500 µl DMEM überschichtet und bei 37°C inkubiert, bis Virusplaques auf dem Zellrasen sichtbar wurden.

3.3.8.1 Erster Zyklus der Plaquereinigung

Nach 24-48 Stunden wurden entsprechende Plaques mikroskopisch analysiert. Je nach Fragestellung wurden entweder GFP-positive grün fluoreszierende Plaques ausgewählt oder, im Falle der Plaquereinigung von HSV2 Wildtyp, Plaques mittlerer Größe. Die Plaques wurden unter dem Mikroskop wie folgt isoliert: Mit einer 100 µl Pipette, deren vordere Pipettenspitze vorab abgeschnitten wurde, wurde vorsichtig ins Plaque gestochen und wenige µl des Plaques aufgesaugt (ca. 10-20 µl). Es wurden ausschließlich Plaques in Plattenvertiefungen (*wells*) geerntet, in dem nur 1 bis maximal 2 Plaques vorhanden waren, um sicherzustellen, dass die Viruspopulation des ersten Zyklus auf einem einzigen Ausgangsplaque basierte. Insgesamt wurden je Runde zwischen 4 und 6 Plaques isoliert. Das jeweils geerntete Plaque wurde anschließend in 200 µl RPMI in einem 1,5 ml Schraubröhrchen eluiert, gevortext und einige Stunden bei 4°C gelöst. Im Anschluss wurde das Röhrchen 1x schockgefroren und bei 37°C aufgetaut. Das Inokulum wurde dann in eine 24-*well* Vertiefung überführt, in die vorab U2OS Zellen ausgesät wurden. Die Zellen wurden etwa 3-4 Tage infiziert und anschließend in ein Kryoreaktionsgefäß überführt und zum Aufschließen der Zellen 2x schockgefroren und bei 37°C aufgetaut. Die hierbei erhaltene Virusstammlösung wurde als Zyklus 1 Virus bezeichnet.

Das Virus des ersten Reinigungszyklus wurde für eine erneute Plaquereinigung mittels Verdünnungsreihe verwendet. Insgesamt wurden drei bis vier Zyklen durchgeführt, um eine 100% homogene Virus-Stammlösung (*Stock*) zu erhalten. Je nach Anzahl der isolierten Plaques wurde anstelle einer Reinigung im 6-*well* Format die Reinigung im 24-*well*, beziehungsweise 96-*well* Format durchgeführt. Im 96-*well* Format wurden Vertiefungen (*wells*), in denen nur ein Plaque vorhanden war, durchinfiziert und die infizierten Zellen anschließend geerntet und wie zuvor beschrieben weiter verfahren. Für das in dieser Arbeit beschriebene Verfahren wurden Protokolle aus (Marconi & Manservigi, 2014), sowie in Teilen (Thompson et al., 2014) herangezogen. Sobald alle Plaques einer Virusstammlösung vergleichbar waren, beziehungsweise mikroskopisch zu 100% grün fluoreszierend erschienen, wurde von dem Plaque-gereinigten Virus Virusbestände produziert (3.3.5, 3.3.6).

3.3.9 HSV2 Wachstumskinetik in eukaryotischen Zellen

Bei zwölf Erntezeitpunkten wurden für jedes Viruskonstrukt Zellen in vier 6-*well* Platten ausgesät (da in Duplikaten gearbeitet wurde, wurden jeweils zwei *wells* pro Zeitpunkt geerntet). Verozellen wurden mit einer Dichte von 3×10^5 Zellen/Vertiefung ausgesät, HepaRG-Zellen und U2OS Zellen mit 5×10^5 Zellen/Vertiefung. Eine zusätzliche Vertiefung (*well*) mit Zellen wurde als Kontrolle zum Bestimmen der Zellzahl am Tag der Infektion

Methoden

hinzugezogen. Am Folgetag wurde die Zellzahl/Vertiefung bestimmt und die für die Wachstumskurve einzusetzende Virusmenge wie folgt berechnet:

$$\frac{(\text{Anzahl der Vertiefungen} \times \left(\frac{\text{Zellzahl}}{\text{Vertiefung}}\right) \times \text{MOI})}{\text{Virustiter}} \times 1000 = \text{Virusmenge in } \mu\text{l}$$

Die berechnete Virusmenge wurde in 12 ml RPMI (0,5 ml RPMI x 24 Vertiefungen) angesetzt. Die Zellen wurden zunächst mit 1xPBS gewaschen und im Anschluss mit 0,5 ml Inokulum pro Vertiefung bei RT inkubiert. Nach einer Stunde wurde das Inokulum entfernt und die Zellen mit 1x PBS gewaschen. Im Anschluss wurde 1 ml frisches DMEM in jede Vertiefung (*well*) gegeben und die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Zu den jeweiligen Erntezeitpunkten wurden die adhärennten Zellen mit einem Zellschaber vom Boden gelöst und in 1,5 ml Schraub-Reaktionsgefäße überführt. Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Bestimmung der Virustiter wurde für jeden Erntezeitpunkt ein *Plaque Assay* nach Protokoll 3.3.7 durchgeführt und mit den Mittelwerten \pm SD der berechneten Titer die Wachstumskurve aufgezeichnet. Zudem konnte über den Titer die MOI des jeweiligen Messzeitpunkts wie folgt berechnet werden:

$$\frac{\text{Virustiter}}{\left(\frac{\text{Zellzahl}}{\text{Vertiefung}}\right)} \times \text{Inokulum/Vertiefung} = \text{MOI}$$

3.4 Biochemische Methoden

3.4.1 Western Blot

Der *Western Blot* ist ein antikörperbasierter Nachweis von immobilisierten Proteinen. Hierbei werden die Proteine zunächst durch ein Polyacrylamid-Gel (SDS-PAGE) aufgetrennt, dann auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und durch spezifische Antikörper detektiert.

3.4.1.1 Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die zu untersuchenden Proben wurden zunächst in 2x Probenpuffer + β -Mercaptoethanol aufgenommen und zum Scheren der genomischen DNA für wenige Sekunden mit Ultraschall auf Eis beschallt. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 95°C denaturiert und die Lysate für 5 min bei 20.800 x g zentrifugiert, um unlöslichen Zelltrümmer abzutrennen.

Parallel wurden Polyacrylamid-Trenn- und Sammel-Gele (SDS-PAGE) gemäß den Ansätzen in Tabelle 26 und

Tabelle 27 präpariert. Hierbei wurden zum Nachweis von kleinen Proteinen mit 30 bis etwa 60 kDa 12% Trenngele angefertigt, und beim Nachweis von Proteinen mit einer Molekularmasse von über 80 kDa Trenngele mit 7,5% Acrylamid.

Tabelle 26. Pipettierschema für SDS-PAGE Trenngele.

Ansatz	Konzentration	
	7,5 %	12%
30% Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	2,5 ml	4,0 ml
Wasser	4,9 ml	3,3 ml
4x Trenngelpuffer	2,5 ml	2,5 ml
10% SDS	100 µl	100 µl
10% APS	50 µl	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl

Tabelle 27. Pipettierschema für SDS-PAGE Sammelgele.

Ansatz	
440 µl	30% Acrylamid
2,0 ml	Wasser
830 µl	4x Sammelgelpuffer
33 µl	10% SDS
25 µl	10% APS
10 µl	TEMED

Bei der Verwendung eines Probenkamms mit zehn Vertiefungen wurden 20 µl Probe und 5 µl Protein Marker aufgetragen und die Proben für 65 min bei 20 mA je Gel elektrophoretisiert.

3.4.1.2 Transfer auf Nitrozellulosemembran und Antikörpernachweis

Im Anschluss wurden die Proteine mittels Nassblot auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Das Transferieren erfolgte für 45-60 min bei 70 V. Um alle Proteinbanden

sichtbar zu machen und den Transfer zu überprüfen, wurden die Membranen zunächst mit dem Farbstoff Ponceaurot angefärbt. Anschließend wurde die Membran mit TBS-T gewaschen und unspezifische Bindestellen der Proteine mit 5% Blockpuffer (Milchpulver in TBS-T) saturiert. Insgesamt wurde die Membran eine Stunde in Blockpuffer inkubiert und dann erneut mit TBS-T gewaschen. Im Anschluss wurde die Membran mit einer Verdünnung des primären Antikörpers (AK) in 5% (w/v) BSA in PBS + 0,01% Azid, entweder bei 4°C über Nacht oder 2 h bei RT inkubiert. Danach wurden der primäre AK (1. AK) abgenommen und die Membran 3x für 5 min mit TBS-T gewaschen. Nach dem Waschschrift wurde die Membran für 1 h bei RT mit dem in 5% (w/v) BSA in PBS + 0,01% Azid verdünnten sekundären Antikörper (2. AK) inkubiert. Nach Abnahme des 2. AK wurde die Membran erneut 3x je 10 min in TBS-T gewaschen und anschließend in PBS gelagert. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mit Hilfe des Imaging System Odyssey (Licor) über die Fluoreszenz des Sekundärantikörpers. Die Messung der Fluoreszenz-Signalintensitäten der einzelnen Proteinbanden (in Pixel) erfolgte mit Hilfe der *Licor Image Studio Software*.

3.4.2 Immunfärbung von Virusplaques

U2OS Zellen wurden am Vortag in einer 6-well Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurde von den Plaque-gereinigten (3.3.8) GFP-exprimierenden Viren eine 1:10 Verdünnungsreihe mit den Verdünnungen 10^{-1} - 10^{-4} hergestellt und die Zellen mit jeweils 0,5 ml der Verdünnungen für 1h infiziert. Anschließend wurde das Inokulum abgenommen und die Zellen mit Kulturmedium bei 37°C inkubiert. Nach der Infektion (24-60 Stunden) wurden die Zellen für 15 min mit Methanol fixiert und über Nacht getrocknet. Am Folgetag wurden die Zellen mit 1 ml/well 0.5% BSA/PBS für 1h geblockt. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit 0,5ml/well anti-ICP0 1:2000 und anti-GFP 1:2500 (Tabelle 9) in BSA/PBS für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Antikörper wurden anschließend abgenommen und die Zellen 3x für 10 min mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Markierung mit den Sekundärantikörpern 0,5 ml/well anti-rabbit 680 und anti-chicken 800 1:10000 (Tabelle 10) in BSA/PBS für 1 Stunde. Die Zellen wurden anschließend 3x mit PBS gewaschen. Die immungefärbten Plaques wurden mit 1 ml/well PBS unter dem Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200 (Zeiss) analysiert und Aufnahmen mit der *Zeiss LSM imaging software* und Adobe Photoshop CS3 bearbeitet.

3.4.3 GST-Pulldown Assay

Der GST-Pulldown (GST= Glutathion S-transferase) wurde angewandt, um zu überprüfen, ob 1.) Wildtyp ICP0 und SIAH-1 miteinander interagieren, und 2.) ICP0, dessen PxAxVxP -

Motive durch eine Punktmutation inaktiviert wurden, tatsächlich nicht mehr mit SIAH-1 interagieren kann.

Hierfür wurden zunächst $2,5 \times 10^6$ U2OS Zellen in einer 10 cm Kulturschale ausgesät und am Folgetag mit Wildtypvirus beziehungsweise den entsprechenden SIAH-Bindemutanten mit einer MOI von 0,01 *pfu*/Zelle infiziert. Nach einer Stunde wurde das Inokulum entfernt und die infizierten Zellen bei 37°C gelagert. Die Zellen wurden 48 Stunden nach Infektion in einem 50 ml Reaktionsgefäß auf Eis gesammelt und anschließend bei 200 x g für 5 min pelletiert. Das Pellet wurde im Anschluss mit 1 ml PBS gewaschen, in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß transferiert und für 30 Sekunden bei 20.000 x g erneut zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 650 µl RIPA-Lysepuffer +1x Proteaseinhibitoren (2.12) lysiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz bei 18.000 x g für 15 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand auf Eis in ein neues Gefäß überführt. Das Pellet wurde in 650 µl 1x Probenpuffer resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt. Vom Überstand wurden 60 µl (10% des Ausgangsvolumens) abgenommen und 12 µl 6x Probenpuffer hinzugegeben. Diese Probe galt als *Input*-Ladekontrolle verwendet und ebenfalls bei -20°C gelagert.

Parallel zur Infektion der U2OS Zellen wurden 2 ml LB-Medium+ Amp mit 1.) *E. coli* BL3 pLysS pGEX4T-1, welches GST exprimiert (Kontrolle), und 2.) *E. coli* BL3 pLysS pGEX-SIAH-1, welches GST-SIAH-1 exprimiert, angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am Folgetag wurden jeweils 250 ml LB-Medium + Amp mit der jeweiligen Übernachtskultur angesetzt. Diese wurde bei 37°C bis zu einer OD_{600} von 0,5 inkubiert. Zu der ersten Bakterienkultur mit pGEX4T-1 wurden im Anschluss 0,02 mM IPTG hinzugegeben. Zur zweiten Kultur, die pGEX-SIAH-1 enthielt, wurden 1 mM IPTG und 0,1 µM $ZnCl_2$ gegeben. Die Ansätze wurden für 4 weitere Stunden bei 30°C geschüttelt. Im Anschluss wurden die Bakterienkulturen bei 3.000 x g für 15 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Bakterienpellets wurden jeweils in 25 ml MTTBS Puffer mit 3 mg/ml Lysozym und 1x Proteaseinhibitoren lysiert und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Lysate 3x für rund 10 Sekunden auf Eis mit Ultraschall behandelt, bis die Lösung nicht mehr viskos erschien und dann bei 20.000 x g für 30 min und 4°C zentrifugiert. Zum Überstand wurden 1 ml in MTTBS Puffer equilibrierte Glutathion Sepharose (GSH)-*beads* (10% *beads slurry* in Lösung) hinzugegeben und für 30 min bei RT geschüttelt. Die beladenen Sepharose-*beads* wurden im Anschluss bei 250 x g für 1 min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Im Anschluss wurden die *beads* mit 1 ml NETN Puffer gewaschen und die GSH-*beads* erneut bei 250 x g für 1 min zentrifugiert. Der Waschschrift wurde insgesamt 3x

wiederholt. Anschließend wurde das Pellet in 1,6 ml E1A Waschpuffer oder alternativ in RIPA Puffer resuspendiert und auf Eis aufbewahrt.

Im Anschluss wurden je 250 µl der GST-(SIAH-1) beladenen GSH-*beads* zu den zuvor lysierten infizierten Zellüberständen hinzugegeben. Der Ansatz wurde über Nacht bei 4°C zum Binden des Proteins ICP0 an SIAH-1 auf einer Dreheinrichtung rotiert. Die *beads* wurden anschließend bei 100 x g für 1 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt, mit 1x Probenpuffer vermengt (diese Proben dienten als Einsatz-Ladekontrolle) und bei -20°C gelagert. Die *bead*-Pellets wurden 3x mit 1 ml E1A Puffer gewaschen und im Anschluss in 60-100µl 2x Probenpuffer resuspendiert. Zur Denaturierung, und um die Proteine von den *beads* zu lösen, wurden die Proben für 5 min bei 95°C erhitzt und anschließend bei 20.000 x g für 5 min zentrifugiert. Zur *Pulldown*-Analyse wurden je 15-20 µl Probe auf ein 7,5% SDS-Gel aufgetragen, elektrophoretisch separiert und anschließend nach Protokoll 3.4.1.2 auf eine Nitrozellulosemembran übertragen.

3.4.4 Southern Blot

Der *Southern Blot* dient zum Nachweis einer bestimmten DNA-Sequenz mit Hilfe einer spezifischen radioaktiv markierten Sonde. Hierbei wird die zu analysierende DNA zunächst mit ausgewählten Restriktionsenzymen inkubiert und die DNA-Fragmente über Gelelektrophorese separiert. Im Anschluss wird die DNA auf eine Trägermembran übertragen und die erwünschte Sequenz mit einer hierfür synthetisierten Sonde markiert. Die Sonde besteht aus einer DNA die zur gewünschten Sequenz der Probe komplementär ist. Die Markierung erfolgt durch Basenpaarung von Sonde und DNA-Sequenz. Die anschließende Detektion der radioaktiv markierten DNA erfolgte durch Schwärzung eines Röntgenfilms.

3.4.4.1 Vorbereitung der DNA

Virale DNA von HSV2 MS Wildtyp und der über homologe Rekombination hergestellten Konstrukte wurde zunächst mit den Restriktionsenzymen Enzymen HindIII beziehungsweise NcoI behandelt und die Fragmente durch Gelelektrophorese separiert, siehe 3.2.10. Das Agarosegel wurde im Anschluss für 30 min in 0,25 M HCl inkubiert. Dies diente der Fragmentierung längerer DNA-Fragmente. Zur Denaturierung der doppelsträngigen DNA wurde das Gel anschließend für 30 min in Denaturierungspuffer gelegt, gefolgt von einer 30 min Inkubation in Neutralisierungspuffer.

3.4.4.2 Transfer der DNA auf Nylonmembran

Über Nacht erfolgte der Transfer der DNA-Fragmente auf eine Nylonmembran über einen Kapillarblot in 20x SSC. Am Folgetag wurde die Membran entnommen und 2x für wenige

Sekunden mit UV-Licht bestrahlt (0,12 Joule), um die DNA-Fragmente auf der Membran zu fixieren (*cross linking*). Zur Prähybridisierung wurde die Membran für 5 min in 2x SSC getaucht und für 1 Stunde in 30 ml Prähybridisierungs-Lösung (HybExpress von Takara Clontech) in einem Rotationsofen bei 65°C inkubiert.

3.4.4.3 Herstellung der Hybridisierungssonde

Die Herstellung der Sonde erfolgte mittels *Phusion* PCR:

Ansatz

31,5 µl Wasser
10 µl 5x Phusion HF Puffer
1 µl dNTPs 10 mM
2,5 µl *Primer for* (10 pmol/µl)
2,5 µl *Primer rev* (10 pmol/µl)
0,5 µl DNA
0,5 µl Phusion

PCR-Programm

95°C 5' ;
95°C 10" ;
60°C 30" ; 30x
72°C 1' ;
72°C 5'
4°C

Verwendete Oligonukleotid-*Primer*, siehe Tabelle 4. Als Template diente zum einen virale DNA von HSV2 MS Wildtyp und zum anderen pcDNA3GFPsh0 zur Amplifizierung von eGFP. Die PCR-Produkte (860 bp wt *ICP0* und 726 bp GFP) wurden mit dem QIAquick® PCR Purification Kit aufgereinigt und mit den *Primern* NB175for und JCZ048for sequenziert (3.2.11). Im Anschluss wurde die Sequenz über das *Random Primed DNA Labeling Kit* (Roche) mit radioaktivem α -³²P-dCTP beziehungsweise α -³²P-dATP markiert. Vorab wurden 25 ng PCR-Produkt für 10 min bei 95°C denaturiert, und anschließend auf Eis inkubiert, danach folgte die Markierung mit der Sonde (Tabelle 28).

Tabelle 28. Ansatz zur Herstellung der radioaktiv-markierten Hybridisierungssonde.

Ansatz	
25 ng	PCR-Produkt
3 µl	dDTPs
2 µl	<i>Reaction Mix</i> (Lösung 6)
5 µl	(2 MBq) α - ³² P-dCTP
auf 19 µl	mit RNase freiem Wasser
+1µl	Klenow-Polymerase (Lösung7)

Der Ansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden anschließend 2 µl 0,2 M EDTA hinzugegeben. Nicht inkorporierte radioaktive Nukleotide wurden über eine Ionenaustauschsäule entfernt. Hierbei wurde der Ansatz zunächst auf die Säulen gegeben und für 2 min bei 1.000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss enthielt die radioaktive Sonde.

3.4.4.4 Hybridisierung

Zur Hybridisierung wurde die Sonde für 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eis inkubiert, um zu verhindern, dass sich die einzelnen DNA-Stränge nach der Denaturierung wieder zusammenlagerten. Im Anschluss wurde die Sonde zur Hybridisierungslösung gegeben und die Membran zusammen mit der Lösung über Nacht bei 65°C im Rotationsofen inkubiert. Am Folgetag wurde die Membran mit jeweils 20 ml der auf 65°C vorgewärmten Waschlösung (*high* und *low stringency* Puffer) für 30 min gewaschen und anschließend auf einem Whatmann-Papier getrocknet. Abschließend wurde die Membran zur Detektion der Radioaktivität in eine Kassette zwischen zwei Verstärkerfolien platziert und mit einem Röntgenfilm exponiert. Die Exposition erfolgte bei -80°C über verschiedene Zeiträume. Die Entwicklung des Films erfolgte mit einem Standard-Röntgenfilmentwickler.

3.4.4.5 Entfernen der Radioaktivität von der Membran (*stripping*)

Zum Entfernen der spezifisch gebundenen Sonde wurde die markierte Membran mit einer *stripping* Lösung (0,1% SDS) für 2-4 min bei 95°C erhitzt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Membran wurde danach zweimal mit Waschlösung gewaschen und danach getrocknet. Die Membran war nun bereit für die Hybridisierung mit einer neuen Sonde.

3.5 *In Vivo* Analysen im Mausmodell

Für die Durchführung der *in vivo* Experimente wurden unter SPF-Bedingungen*¹ (SPF= *Spezifisch Pathogen frei*) gezüchtete C57Bl/6J Mäuse aus der hauseigenen Zucht bezogen und die Tiere in IVC-Käfigen gehalten. Die Käfiggröße entsprach einem Typ II Lang-Käfig, wobei maximal 5 Tiere (6 Tiere, wenn <20 g) pro Käfig gehalten wurden. Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung 6 bis 8 Wochen alt und vorwiegend weiblich.

*¹ Für den SFP Hygienestatus, siehe (Mähler et al., 2014)

3.5.1 Okulare HSV2 Infektion

C57Bl/6J Mäuse wurden am Vortag des Versuches gewogen, um das Anästhetikum für den Eingriff mit 100mg/kg Ketamin + 7 mg/kg Xylazin in 99% NaCl-Lösung anzusetzen. Zum Ansetzen des Narkosemittels wurde wie folgt verfahren:

Narkosemittelberechnung am Beispiel einer Maus (Körpergewicht: 20 g)

Ketaminstammlösung: 100 mg/ml
 Empfohlene Endkonzentration: 100 mg/kg => 2 mg/20 g
 $(2 \text{ mg}/100 \text{ mg}) \times 1000 \text{ } \mu\text{l} = \mathbf{20 \text{ } \mu\text{l}}$

Das heißt, es müssen pro Versuchstier mit einem Körpergewicht von 20 g 20 μl Ketamin Stammlösung für die Narkose eingesetzt werden.

Xylazin (Sedaxylan) Stammlösung: 20 mg/ml
 Empfohlene Endkonzentration: 7 mg/kg => 0,14 mg/20g
 $(0,14 \text{ mg}/7 \text{ mg}) \times 1000 \text{ } \mu\text{l} = \mathbf{7 \mu\text{l}}$

Das heißt, es müssen je Versuchstier (Körpergewicht 20 g) 7 μl Sedaxylan Stammlösung in einem Gesamtvolumen von 100 μl für die Narkose eingesetzt werden.

Dies entspricht bei einem 100x Ansatz

2.000 μl Ketamin
 700 μl Xylazin
 7.300 μl 99% NaCl-Lösung (steril)

Am nächsten Morgen wurde zunächst das Virus für die Infektion mit einer Konzentration von $2,5 \times 10^4$ pfu/ μl in Vollmedium angesetzt und auf Eis verwahrt. Im Anschluss wurden die Versuchstiere durch die intra-peritoneale (i.p.) Injektion des Anästhetikums narkotisiert. Sobald die Tiere die Tiefschlafphase erreicht hatten wurden durch eine vorab leicht gebogene

25-gauge Kanüle beide Corneas in einem rasterartigen Muster oberflächlich verletzt (angeritzt). Im Anschluss wurde die Tränenflüssigkeit abgetupft und jeweils 4 µl Inokulum auf die Augen getropft. Somit wurde jedes Auge mit einem Titer von 1×10^5 pfu infiziert. Kontrollmäuse wurden gleich behandelt und mit 4 µl DMEM inokuliert. Die Tiere wurden bis zum Erwachen aus der Narkose unter eine Wärmelampe gehalten. Um auftretende Schmerzen zu lindern, wurde in den ersten 3-4 Tagen nach der Operation das Trinkwasser der Tiere je 100 ml mit 2,5 mg Tramadol (Tramal) versetzt.

3.5.2 Messung der Virustiter in der Tränenflüssigkeit infizierter Mäuse

Über die nächsten 7 Tage wurden die Virustiter in der Tränenflüssigkeit der Mäuse gemessen (Abbildung 13). Hierfür wurde die Tränenflüssigkeit mit einem Wattestäbchen aufgenommen und der wattehaltige Anteil in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit 400 µl DMEM + 5% FBS + Pen-Strep überführt und bis zur Analyse auf Eis gelagert. Der erste Messpunkt erfolgte nach 8 h und diente zur Überprüfung, ob das zur Infektion eingesetzte Inokulum deaktiviert war. Somit wurde der Virustiter der akuten Infektion nicht verfälscht.

3.5.2.1 Mikrotiter-Plaque Assay im 96-well Format

Zur Bestimmung der Virustiter während der akuten HSV-Infektionsphase in der Cornea wurde ein Mikrotiter-Plaque Assay herangezogen. Das Protokoll wurde dankenswerter Weise von Herrn Prof. W. Halford, Southern Illinois University, USA, bereitgestellt.

Am Vortag wurden Verozellen mit einer Dichte von $1,5 \times 10^6$ Zellen/Platte in einer 96-well Platte ausgesät. Nach 8 Stunden, sowie am Tag 1, 2, 3, 5 und 7 nach der Infektion wurde die Tränenflüssigkeit der Versuchstiere gemäß 3.5.2 aufgenommen, der Ansatz mehrmals pipettiert und gevortext. Die in Kulturmedium eluierte Tränenflüssigkeit wird im Folgenden als „Augenabstrich“ bezeichnet.

Je 96-well Platte konnten insgesamt 16 Proben analysiert werden (Abbildung 12). Hierfür wurden zunächst Verdünnungsreihen der Augenabstriche in einer 96-Rundbodenplatte wie folgt angefertigt: In die erste, sowie siebte Spalte (Spalte A und G) der 96-Rundbodenplatte wurden jeweils 200 µl des Augenabstrichs vorgelegt. In alle anderen Vertiefungen wurden 200 µl Kulturmedium gegeben. Im nächsten Schritt wurden 50 µl aus Spalte A beziehungsweise Spalte G in die zweite (beziehungsweise achte) Spalte (Spalten B und H) transferiert und mindestens 30x durch Pipettieren vermischt. Hierdurch entstand in der zweiten und achten Spalte eine 4-fach Verdünnung (50:200) des Augenabstrichs. Diese serielle Verdünnung wurde bis zur sechsten beziehungsweise zwölften Spalte (Spalte F und

L) fortgesetzt, sodass in den letzten Spalten schließlich eine Verdünnung von 1:3125 des Augenabstrichs vorlag. Für jeden Pipettierschritt wurden neue Pipettenspitzen verwendet.

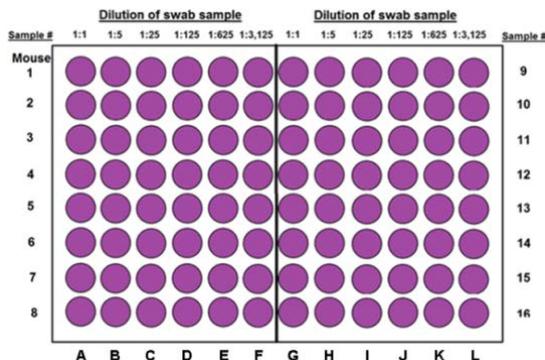


Abbildung 12. Serielle Verdünnung der Augenabstriche infizierter Mäuse.

Im Anschluss wurde das Medium von den am Vortag ausgesäten Verozellen abgenommen und je 50 μ l der hergestellten Augenabstrich-Verdünnungen auf die Zellen gegeben. Hierbei wurden die Verdünnungen aus Spalte A der Rundbodenplatte in Spalte A der 96-Vertiefungsplatte pipettiert. Dieser Vorgang wurde entsprechend fortgesetzt. Im Anschluss wurden die Zellen für 1h bei RT auf einem Wippschüttler inkubiert. Danach wurde das Inokulum verworfen und je Platten-Vertiefung 150 μ l Kulturmedium mit 25 ng/ μ l IgG (siehe 3.3.7) gegeben und die Platten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen für 5-10 Minuten mit eiskaltem Methanol fixiert und für 1h mit 0,1% Kristallviolett gefärbt. Zuletzt wurden die Plaques in den einzelnen Vertiefungen (*wells*) gezählt, um den Virustiter im Augenabstrich nach 3.3.7 zu berechnen.

3.5.3 Bestimmung der Virustiter im infizierten Gewebe

Ausgewählte Versuchstiere wurden an Tag 3, 5 und 7 nach der Infektion mit CO₂ getötet und anschließend durch Perforation des Herzens ausgeblutet. Im Anschluss wurde die Schädeldecke geöffnet und die Trigeminierven und der Hirnstamm präpariert. Die beiden Trigeminierven einer Maus wurden gemeinsam in ein mit 600 μ l Kulturmedium (DMEM+ 5% FCS+ Pen-Strep) befülltes 2 ml Reagiergefäß platziert. Auch der Hirnstamm wurde in ein Reagiergefäß mit 600 μ l Vollmedium überführt. Im Anschluss wurden die Proben auf Eis für 3x 10 Sekunden mittels Ultraschall homogenisiert. Von jeder Probe wurden im Anschluss 300 μ l abgenommen und für die DNA und RNA Isolierung verwendet (3.5.4). Die verbliebenen 300 μ l wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C eingefroren. Um die infizierten Zellen aufzuschließen wurden diese Homogenisate bei 37°C aufgetaut. Anschließend wurden die

Methoden

Proben für 2 min bei 7.000 x g zentrifugiert, um die verbliebenen Gewebereste zu entfernen. Von den Überständen wurde eine 1:10 Verdünnungsreihe mit den Verdünnungen 10^0 - 10^3 angefertigt, um die Virustiter mittels *Plaque Assay* wie folgt zu bestimmen:

Verzellen wurden am Vortag mit 3×10^5 Zellen/*well* in einer 12-*well* Platte ausgesät. Am Folgetag wurde das Kulturmedium von den Zellen abgenommen und diese mit 200 μ l Inokulum/*well* der einzelnen Verdünnungen inkubiert. Nach 1-2 Stunden wurde das Inokulum entfernt und 1 ml Kulturmedium + 25 ng/ml IgG (siehe 3.3.7) auf die Zellen gegeben und diese bei 37°C inkubiert. Nach 48 Stunden wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit eiskaltem Methanol fixiert und anschließend mit 0,1% Kristallviolett gefärbt. Über die gezählten Plaques/*well* wurde im Anschluss nach 3.3.7 der Virustiter im Gewebe bestimmt.

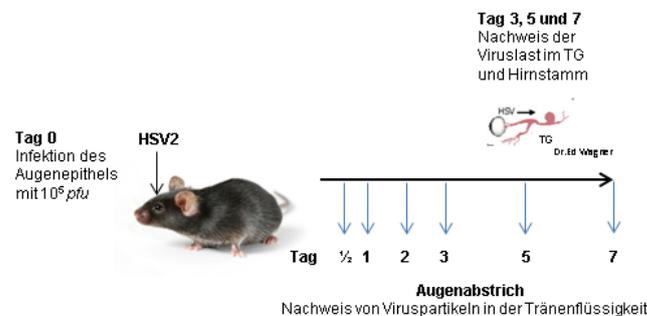


Abbildung 13. Okulares Infektionsmodell. Die Cornea von C57Bl/6J Mäusen wurde mit HSV2 mit einer Konzentration von 10^5 pfu/Auge infiziert. An den angegebenen Tagen nach der Infektion wurden Viruspartikel in der Tränenflüssigkeit mittels Mikrotiter-*Plaque Assay* auf Verzellen nachgewiesen. An Tag 3, 5 und 7 nach Infektion wurden die Trigeminasnerven (TG) und der Hirnstamm der Tiere isoliert, homogenisiert und die Viruslast der Gewebe durch Titer-Berechnung und mittels *Realtime-PCR* (DNA-Kopien) bestimmt.

3.5.4 Gesamt DNA Präparation aus eukaryotischem Gewebe

Zur DNA und RNA Isolierung aus den Trigeminasnerven und dem Hirnstamm von C57Bl/6J Mäusen wurden die Gewebe zunächst wie in 3.5.3. beschrieben homogenisiert. 300 μ l des resuspendierten Gewebes wurden umgehend in ein Reagiergefäß mit 500 μ l Trizol transferiert und für mehrere Minuten gevortext, bis alle Gewebereste aufgelöst waren. Im Anschluss wurden die Proben bei -80°C eingefroren. Zur Weiterverarbeitung wurden die Proben bei RT aufgetaut, 200 μ l Chloroform hinzugegeben und erneut für 1 min gevortext. Die Proben wurden anschließend für 2-3 min bei RT inkubiert und für 15 min bei 9.000 x g und 4°C zentrifugiert. In der oberen Phase befand sich die RNA, diese wurde abgenommen und die Präparation wie in 3.5.5 beschrieben durchgeführt. Aus der unteren Phase wurde die DNA

isoliert. Die Präparation erfolgte gemäß dem TRIzol™ Reagent Protokoll des Invitrogen *User guides*, Abschnitt *Tissues*. Anstelle der 8 mM NaOH wurde die DNA zum Ende in 35 µl sterilem Wasser aufgenommen und über Nacht bei 4°C resuspendiert.

3.5.5 RNA Präparation aus eukaryotischem Gewebe

Wie zuvor in 3.5.4 beschrieben, wurde das in Trizol aufgenommene Gewebe zunächst mit 200 µl Chloroform versetzt, gevortext und anschließend bei 9.000 x g für 15 min zentrifugiert. Die obere Phase wurde für die RNA-Isolierung abgenommen. Zunächst wurden 500 µl Isopropanol in frische 1,5 ml Reagiergefäße vorgelegt und der RNA-haltige Überstand hinzupipettiert. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und bei 4°C und 9.000 x g für 20 min zentrifugiert. Alle Zentrifugationschritte erfolgten im Folgenden bei 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 500 µl 80% Ethanol gewaschen und bei 20.800 x g für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet luftgetrocknet. Anschließend wurde die RNA in 20 µl RNase-freiem Wasser eluiert und bei -80°C gelagert.

3.5.5.1 DNase Behandlung

Zum Abbau von DNA in den RNA-Proben wurde eine DNase Behandlung durchgeführt. Hierfür wurden die gefrorenen Proben zunächst bei 65°C für 15 min aufgetaut, graduell auf 30°C abgekühlt und anschließend auf Eis gestellt. Folgender Ansatz wurde für die Behandlung mit DNase angesetzt:

20 µl RNA

1,0 µl DNase

2,2 µl Puffer

Der Ansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend mit RNase freiem Wasser auf ein Volumen von 100 µl eingestellt. Anschließend wurden 100 µl Phenol hinzugegeben und für 15 min bei RT und 20.800 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in das 2,5-fache Volumen Ethanol überführt und 1/10 Volumen Natriumacetat (3M) zugeben. Der Ansatz wurde 30 min bei 20.800 x g bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 500 µl 80% Ethanol gewaschen und bei 4°C für 20 min bei 20.800 x g zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde anschließend getrocknet und in 20 µl RNase freiem Wasser eluiert.

3.5.5.2 cDNA Synthese

Mithilfe der Reversen Transkriptase kann RNA in cDNA umgeschrieben werden. In diesem Fall wurde für die reverse Transkription die *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse*

Methoden

Transkriptase (M-MLV RT) von Promega verwendet. Zunächst wurde die Konzentration der aus dem Gewebe isolierten RNA photometrisch nach 3.2.5 bestimmt. Im Anschluss wurde jeweils 1 µg RNA für das Umschreiben in cDNA wie folgt eingesetzt:

Ansatz des Mastermix je Probe:

4 µl	5x M-MLV Puffer
2 µl	dNTPs (10 mM)
1 µl	oligo dT Primer (100 µM)
0,5 µl	M-MLV RT

Von dem Ansatz wurden 7,2 µl für die Reverse Transkription eingesetzt:

7,2 µl	Mastermix
1 µg	RNA-Probe
Auf 20 µl	mit RNase-freiem Wasser

PCR-Programm

25 °C	10 min
42 °C	90 min
95 °C	5 min
12 °C	∞

Die PCR-Produkte wurden im Anschluss bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.5.6 Bestimmung der viralen Genomkopien und RNA-Expression im Gewebe mittels quantitativer *Realtime*-PCR

Zur Bestimmung der Anzahl der viralen DNA-Kopien pro Gewebe einer infizierten C57Bl/6J Maus wurde die in 3.5.4 isolierte DNA herangezogen und die Kopienzahl des viralen Gens *U_L27* mittels quantitativer *Realtime*-PCR (3.2.7) gemessen und auf Sequenzen des zellulären (murinen) β-Actin normalisiert. Zur Bestimmung der Expression viraler Gene wurde die in cDNA umgeschriebene RNA aus 3.5.4 eingesetzt und die Kopienzahl von *U_L27* mittels *Realtime*-PCR gemessen. Zur Normalisierung wurden cDNA Sequenzen des Gens für Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) herangezogen (Tabelle 3).

3.5.7 Herstellung immunhistologischer Präparate

3.5.7.1 Einbetten der Gewebe

HSV2 infizierten Mäusen wurden an Tag 3 und 5 nach Infektion die Trigeminierven (TG) als ganze Einheit entnommen und in 4% Paraformaldehyd (PFA) in PBS überführt. Die TG wurden für mindestens 48 Stunden in 4% PFA fixiert und anschließend über Nacht (rund 12 Stunden) in einen Vakuum Infiltrationsautomaten geben. Am Folgetag wurden die Proben in Paraffin eingebettet. Die Paraffinblöcke mit dem enthaltenen Gewebe wurde anschließend am Mikrotom in 10 µm dicke Präparate geschnitten, auf Super Frost Plus Objektträger übertragen und über Nacht bei 37°C getrocknet.

3.5.7.2 Vorbehandlung der Paraffinschnitte

Die Objektträger wurden für 20 min bei 56°C erhitzt und anschließend bei RT 2x für jeweils 10 min in Xylol getaucht, dieser Schritt diente der Entparaffinierung. Anschließend erfolgte die Inkubation der Präparate in einer Ethanol-Verdünnungsreihe, das heißt die Objektträger wurden bei RT zunächst 2x für 2 min in 100% Ethanol inkubiert. Anschließend jeweils 2 min zunächst in 95%, 90%, 80%, 70% und zuletzt in 50% Ethanol. Dieser Schritt diente der Entwässerung der Gewebe und der Entfernung des Xylols. Abschließend wurden die Proben zum Waschen 10x in destilliertes Wasser getaucht. Parallel wurde ein Schnellkochtopf mit 700 ml destilliertem Wasser befüllt. Darin wurde ein Glasbehälter (Küvette) gestellt, der mit 250 ml dest. Wasser + 25 ml Antigen *Retrieval* Citrat Plus (10x) befüllt war. In die Küvette wurden anschließend bis zu 10 Objektträger mit den jeweiligen Schnitten gestellt und der Schnellkochtopf verschlossen. Der Topf wurde in einer Mikrowelle für 16 min bei 850 Watt erhitzt, anschließend für 30 min bei 450 Watt weiter inkubiert (hitzeinduzierte Antigenmaskierung) und danach für 20 min auf RT abgekühlt. Die Objektträger wurden anschließend aus der Küvette entnommen und 3x für 5 min bei RT in PBS+ 0,02% Tween und anschließend 3x für 5 min in 1x PBS (pH 7,4) gewaschen.

3.5.7.3 Immunhistochemische Färbung

Zur Präinkubation wurden die Präparate bei RT für 30 min in 10% Normalserum in PBS (Serum der Spezies, aus welcher der sekundäre Antikörper stammte) inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Markierung mit dem polyklonalen HSV2 Primärantikörper (Tabelle 9). Der Antikörper wurde hierfür bei einer 1:50 Verdünnung in Dako *Antibody Diluent* +2% Normalserum eingesetzt und die Präparate bei 4°C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Präparate 3x für je 5 min in PBS + Tween und 3x in PBS gewaschen. Die sekundäre Antikörpermarkierung erfolgte mit dem Sekundärantikörper Histofine *Simple Stain*, der mit Alkalischer Phosphatase als Markerenzym gekoppelt war. Der sekundäre

Methoden

Antikörper wurde in einer 1:1 Verdünnung eingesetzt und bei RT für 45 min auf die Präparate gegeben. Anschließend wurden die Objektträger wie zuvor beschrieben in PBS + Tween und PBS gewaschen.

Die histochemische Reaktion erfolgte durch die Zugabe von Neufuchsinhaltiger Lösung (Neufuchsin Plus), die in Gegenwart der Alkalischen Phosphatase (Markerenzym) zu einem roten Reaktionsprodukt führte, und somit die lokale Immunreaktion sichtbar machte. Die Proben wurden hierfür bei RT für 5 min in die entsprechende Lösung getaucht und anschließend für 5 min mit destilliertem Wasser abgespült. Zur Markierung der Zellkerne wurden die Präparate anschließend für 20 Sekunden mit Hämatoxylin gegengefärbt und danach für 2-5 min mit warmem Leitungswasser zum Bläuen gebracht.

Abschließend wurden die Präparate in Eindeckmedium (wässrig) eingebettet und die Schnitte mit Hilfe eines Nikon Eclipse Ni Mikroskops untersucht. Die Bildbearbeitung erfolgte mit der NIS Elements AR Software, der Fiji Software und Powerpoint.

3.5.8 *Ex vivo* Reaktivierung von HSV2 aus latent infizierten Trigeminnerven

40 Tage nach der okularen Infektion wurden die Mäuse mit CO₂ getötet und anschließend durch Perforation des Herzens ausgeblutet. Im Anschluss wurde die Schädeldecke geöffnet und die latent infizierten TG als ganze Einheit (Explantat) vorsichtig mit einem scharfen Skalpell und einer Ganglienpinzette präpariert. Jedes einzelne Ganglion wurde in eine Vertiefung einer 24-well Platte transferiert, die zuvor mit 1 ml Kulturmedium befüllt wurde. Die Platte wurde anschließend bei 37°C inkubiert. Zwei Stunden nach der Inkubation bei 37°C wurde die Viruslast in allen Ganglienüberständen gemessen, um gegebenenfalls akut infizierte Ganglienexplantate aus der Versuchsreihe auszuschließen. Die *ex vivo* HSV2-Reaktivierung erfolgte in der hier beschriebenen Versuchsreihe ausschließlich durch mechanischen Stress (Präparieren der latent infizierten Ganglien).

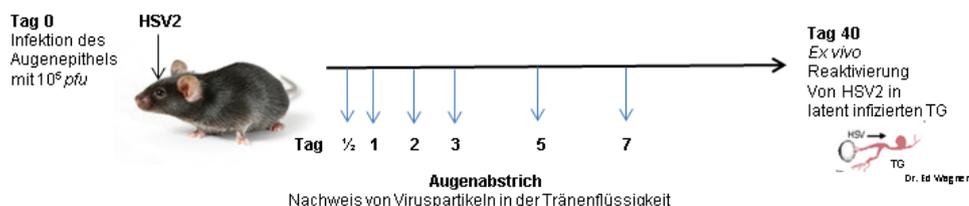


Abbildung 14. HSV Reaktivierungsmodell. C57Bl/6J Mäuse wurden okulär mit HSV2 infiziert und die akute Infektion mittels Messung der Viruslast im Augenabstrich überprüft. 40 Tage nach Infektion wurden latent infizierte Trigeminnerv-Explantate präpariert und die Reaktivierung *ex vivo* protokolliert.

In den folgenden 11 Tagen *post extraction* (p.e.) wurde der Reaktivierungsprozess wie folgt überprüft: Am Vortag wurden in einer 24-well Platte $1,5 \times 10^5$ Verozellen/Vertiefung ausgesät. Sobald der Zellrasen konfluent war wurden $100 \mu\text{l}$ des Ganglienüberstands auf die Zellen pipettiert und für 1 Stunde bei RT auf einem Wippschüttler inkubiert. Der Ganglienüberstand wurde anschließend abgenommen und die Zellen mit $500 \mu\text{l}$ Kulturmedium + 25 ng/ml IgG bei 37°C inkubiert. Nach etwa 48 Stunden wurden die Zellen mit Methanol fixiert. Virusplaques auf dem Zellrasen sind hierbei ein Indiz für reaktiviertes Virus. Die Zellen wurden anschließend für 1 Stunde mit 0,1% Kristallviolett angefärbt, um nach (3.3.7) die Virustiter zu bestimmen.

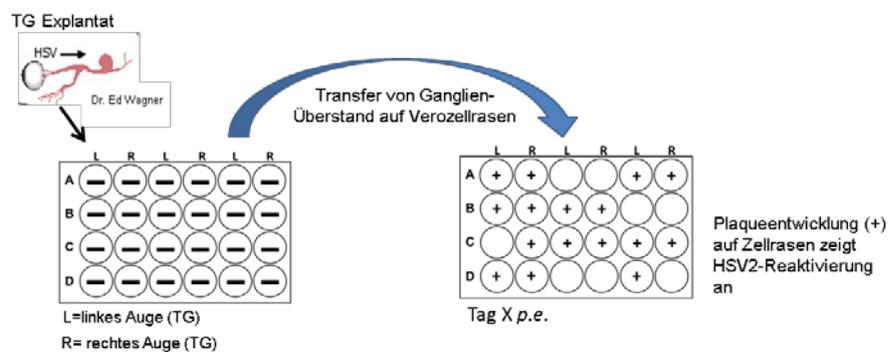


Abbildung 15. Ex vivo Reaktivierungsassay. Latent infizierte Trigemini-nerv (TG)-Explantate wurden einzeln in die Vertiefung einer mit 1 ml Kulturmedium befüllten 24-well Platte überführt. In regelmäßigen Abständen wurden je $100 \mu\text{l}$ Teil des Überstands auf konfluent wachsende Verozellen gegeben, um die Entwicklung von Virusplaques zu überprüfen. Diese dienten als Indiz für reaktiviertes HSV2.

Parallel wurden die mit ICP0-GFP-Viren latent infizierten Ganglienexplantate, unter dem Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200 (Zeiss) und Nikon C2+ überprüft. Entsprechende Aufnahmen wurden mit Hilfe der Zeiss *LSM imaging software*, *NIS Elements AR* und Adobe Photoshop CS3 bearbeitet.

3.6 Statistische Analyse

Statistische Analysen wurden mit der GraphPad Prism 5.03 Software durchgeführt. Sofern die Werte nicht normalverteilt waren wurde beim Vergleich von zwei Gruppen der studentische t-test mit dem Mann-Whitney U *Post*-test angewandt. Beim Vergleich von jeweils zwei Gruppen in einem *Pool* von mehreren Gruppen zu einem bestimmten Zeitpunkt wurde der one-way ANOVA (Kruskal-Wallis Test, da nicht parametrisch) mit dem Dunn's *Post*-test angewandt. Bei einem Vergleich mehrerer Gruppen innerhalb einer Kinetik, unter anderem bei der Analyse von Wachstumskurven, wurde der 2-way ANOVA (*two-way analysis of*

Methoden

variance) angewandt mit dem Bonferroni *post-test* zum Vergleich aller Gruppen untereinander zum jeweiligen Zeitpunkt. P-Werte <0.001 wurden als *** Signifikanz dargestellt. P-Werte >0.05 wurden als nicht signifikant bewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Konstruktion von Herpes-Simplex-Virus Typ 2 ICP0-Mutanten

Um die Bedeutung eines Gens oder einer Proteininteraktion zu untersuchen, ist unter anderem die Konstruktion von Deletionsmutanten hilfreich. Wichtig ist dabei, das ursprüngliche Genom bis auf die gewünschte Mutation nicht, beziehungsweise so wenig wie möglich zu verändern, um den Phänotyp der Mutante einwandfrei auf die eingeführte Mutation zurückführen zu können.

Im ersten Teil dieser Arbeit wird die Konstruktion von replikationskompetenten HSV2 Mutanten beschrieben, in denen die SIAH-Bindemotive in der kodierenden Sequenz des unmittelbar frühen Gens *ICP0* durch Punktmutationen inaktiviert wurden (Tabelle 25, Abbildung 17 und Abbildung 21). Die Herstellung dieser Mutanten ermöglichte es, die Bedeutung der ICP0:SIAH Proteininteraktion für den HSV2 Infektionsverlauf im *in vitro* Zellkulturmodell, sowie in einem *in vivo* Mausmodell zu studieren. Die HSV2 ICP0-Mutanten wurden auf zwei voneinander unabhängigen Wegen generiert. Die erste Konstruktion erfolgte mittels *En Passant* Mutagenese in Bakterien (3.2.12). Ausgangskonstrukt für die *En Passant* Mutagenese war das BACmid pHSV2(MS)Lox Klon [B.1.11.28] (Abbildung 16), beschrieben in 3.2.12.1, welches bereits in (Czechowicz, 2013) auf seine Integrität überprüft wurde.

Die zweite Methode zur Konstruktion von SIAH-bindedefizienten ICP0-Mutanten war die homologe Rekombination in eukaryotischen Zellen. Ausgangskonstrukt für die homologe Rekombination war das Plaque-gereinigte Wildtypvirus HSV2 Stamm MS. Die Herstellung von SIAH-bindedefizienten ICP0-Mutanten über zwei unabhängige Methoden in unterschiedlichen Organismen sollte sicherstellen, dass der beobachtete Phänotyp im Vergleich zum Wildtyp zweifelsfrei auf die gegebene Mutation zurückzuführen war und nicht auf die Methode des benützten Mutagenese-Verfahrens. Zudem zeigte jede der angewandten Methoden gewisse Vor- und Nachteile bei der Herstellung und Überprüfung der Konstrukte, welche in späteren Abschnitten genauer beschrieben werden.

Die Konstruktion der HSV2 ICP0-Mutanten erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Claus-Henning Nagel, Heinrich-Pette-Institut.

4.1.1 Konstruktion der HSV2 ICP0-Mutanten mittels *En Passant* Mutagenese

Da eine Mutagenese großer herpesviraler Genome (>120 kb) mittels Restriktionsverfahren oder QuikChangeTM basierenden Methoden kaum zufriedenstellend bewerkstelligt werden

kann (Tischer et al., 2010; Tischer et al., 2006), ist die *En Passant* Mutagenese (3.2.12) ein geeignetes Verfahren zur gezielten Veränderung des HSV2 Erbgutes. Hierbei wird das vollständige Genom zunächst in einen BAC-Vektor (BAC = *bacterial artificial chromosome*) ligiert, und bleibt dabei so stabil, dass gezielte Veränderungen am Virusgenom vorgenommen werden können (Brune et al., 2000; Nagel et al., 2014). Dabei basiert die *En Passant* Methode auf dem Red-Rekombinationssystem (Red $\alpha\beta\gamma$ -System) aus dem Bakteriophagen λ , und ermöglicht die Insertion von doppelsträngiger DNA in das virale Genom (Tischer et al., 2010; Tischer et al., 2006). Für die Red-Rekombination wird vorzugsweise der *E. coli* Stamm GS1783 verwendet. Dieser trägt in seinem Genom bereits die für die Red-Rekombination erforderlichen Gene (Tischer et al., 2010).

Das Genom der Herpes-Simplex-Viren kodiert für zwei identische Kopien des *infected cell proteins*, kurz ICP0. Beide ICP0-Genkopien liegen in den repetitiven langen Regionen des Genoms, eine im TR_L (*terminal repeat region long*) und die zweite Kopie im IR_L (*internal repeat region long*) Bereich (Abbildung 16). Zur Generierung einer homozygot vorliegenden Mutation in ICP0, mussten folglich beide Genkopien (durch gegebenenfalls zwei aufeinanderfolgende Mutageneseverfahren) mutiert werden. Zudem besitzt HSV2 in seiner ICP0-Sequenz, wie bereits in 1.5 beschrieben, zwei SIAH Konsensus-Bindemotive, die es galt, zu inaktivieren.

4.1.1.1 Herstellung von HSV2 ICP0-Mutanten mit inaktivierten SIAH-Bindemotiven

Die HSV2 ICP0-Mutante, deren erste Bindedomäne (VxP1) mittels *En Passant* Mutagenese deletiert wurde, wurde bereits früher beschrieben und hinsichtlich seiner Integrität überprüft (Czechowicz, 2013). In der vorliegenden Arbeit wurde die Herstellung der HSV2 Mutante mit einer Deletion des zweiten SIAH-Bindedomäne (VxP2) und der Deletion beider SIAH-Bindemotive (VxP1/2) vorgenommen. Die AS-Sequenzen der intakten SIAH-Bindemotive, sowie der inaktiven Variante sind in Tabelle 29 aufgezeigt. Die anschließende Analyse der Mutanten erfolgte mittels Restriktionsfragment-Analyse und DNA-Sequenzierung des mutierten Bereichs. Zur *in silico* Erstellung der Vektorkarten und des jeweiligen Restriktionsfragmentmusters wurde die Referenzsequenz von HSV2 Stamm HG52 (GenBank *accession no.* Z86099) herangezogen, da das Genom von HSV2 Stamm MS bisher noch nicht vollständig sequenziert ist.

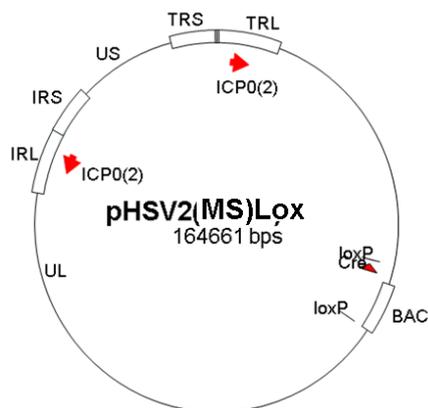


Abbildung 16. Vektorkarte von BACmid pHSV2(MS)Lox. Das BACmid hat eine Größe von 164.661 Basenpaaren (bp). Angezeigt ist die von den loxP Sequenzen flankierte BAC-Kassette mit dem integrierten Gen *Cre*, sowie die beiden *ICP0*-Kopien, die in der invertierten langen Region (IR_L = *internal repeat region long*) und der nicht-invertierten langen Region (TR_L = *terminal repeat region long*) liegen. Ebenfalls angegeben sind die *unique long region* (U_L), sowie die *unique short region* (U_S), mit den an die U_S Region angrenzende invertierte kurze Region (IR_S = *internal repeat region short*) und die nicht-invertierte kurze Region (TR_S = *terminal repeat region short*). (Czechowicz, 2013)

4.1.1.1 Herstellung der HSV2- $ICP0^{N \times N 2}$ Mutante und deren Überprüfung

Zur Inaktivierung der zweiten SIAH-Bindedomäne in HSV2 *ICP0* wurden die Aminosäure (AS)-Sequenz an Position 316 bis 322 in *ICP0* verändert. Hierbei war die Punktmutation von Valin (V) an Position 316 und Prolin (P) an Position 318 zu Asparagin (N) entscheidend für die potentielle Inaktivierung des Konsensus-Bindemotivs (House et al., 2006), siehe Tabelle 29. Zudem wurde zur Identifizierung korrekter Mutanten mittels Restriktionsfragment-Analyse eine Restriktionserkennungsstelle für das Enzym *NheI* in den Bereich der SIAH-Bindedomäne eingebracht (AS 321-322). Die Basentriplets wurden hierfür so verändert, dass *NheI* die Sequenz als Schnittstelle erkennen konnte, sich die Aminosäuresequenz bei der Translation jedoch nicht veränderte (Abbildung 17). Aufgrund des Aminosäureaustauschs im zweiten SIAH-Bindemotiv wurde die Mutante als $N \times N 2$ -Mutante bezeichnet.

P	A	V	A	A	V	P	R	V	A	S	L	
CCT	GCC	GTC	GCG	GCC	GTC	GTG	CCG	AGA	GTG	GCC	TCT	VxP2
P	A	V	A	A	N	V	N	R	V	A	S	L
CCT	GCC	GTC	GCG	GCC	AAT	GTG	AAT	AGA	GTG	GCT	AGC	$N \times N 2$
										<u>NheI</u>		

Abbildung 17. Das VxP2 SIAH-Bindemotiv in HSV2 *ICP0*. Grün markiert sind die für eine Interaktion mit SIAH essentiellen Aminosäuren (VxP) und die für sie kodierenden Basentriplets. Rot markiert wurden die durch BAC-Mutagenese eingeführten Veränderungen in der Basenabfolge. Anstelle von Valin und Prolin wurden zwei Asparagin ($N \times N$) in die AS-Sequenz eingefügt. Zusätzlich wurde in die DNA-Sequenz eine *NheI*-Restriktionsstelle inseriert. Der angezeigte Bereich entspricht der Aminosäuresequenz an Position 311-323.

Tabelle 29. Aminosäuresequenz der SIAH Konsensus-Bindemotive in HSV2. Schwarz markiert wurden die Aminosäuren, die im SIAH-Konsensus-Bindemotiv konserviert sind. Eine Punktmutation der zentralen Aminosäuren Valin (V) und Prolin (P) zu Asparagin (N), führt zu einer Inaktivierung des Bindemotivs.

Konsensus-Bindemotiv in ICP0	Position	P(x)xAxVxP
HSV2		
VxP1	406-420	RAAR P RAAV A PRVRS
VxP2	308-322	GGG P AV A AVVPRVAS
Inaktiv		NxN

Wie bereits in 3.2.12 im Detail beschrieben, erfolgte die *En Passant* Mutagenese in zwei Schritten: Um die mutierten HSV2 Klone über Antibiotika-Resistenz zu selektieren, wurden zunächst HSV2 Intermediate hergestellt, die neben der veränderten *ICP0*-Sequenz eine Kanamycin-Kassette enthielten. Mittels Restriktionsendonuklease-Behandlung der Intermediate wurde ein potentiell positiver Klon für den zweiten und finalen Schritt der *En Passant* Mutagenese identifiziert. Zur Analyse wurden die Klone in einer Doppelanalyse mit den Enzymen NheI und HindIII behandelt und mit dem Ausgangskonstrukt pHSV2(MS)Lox verglichen. Die erwarteten Bandenmuster nach dem Restriktionsmuster sind in Tabelle 30 aufgelistet.

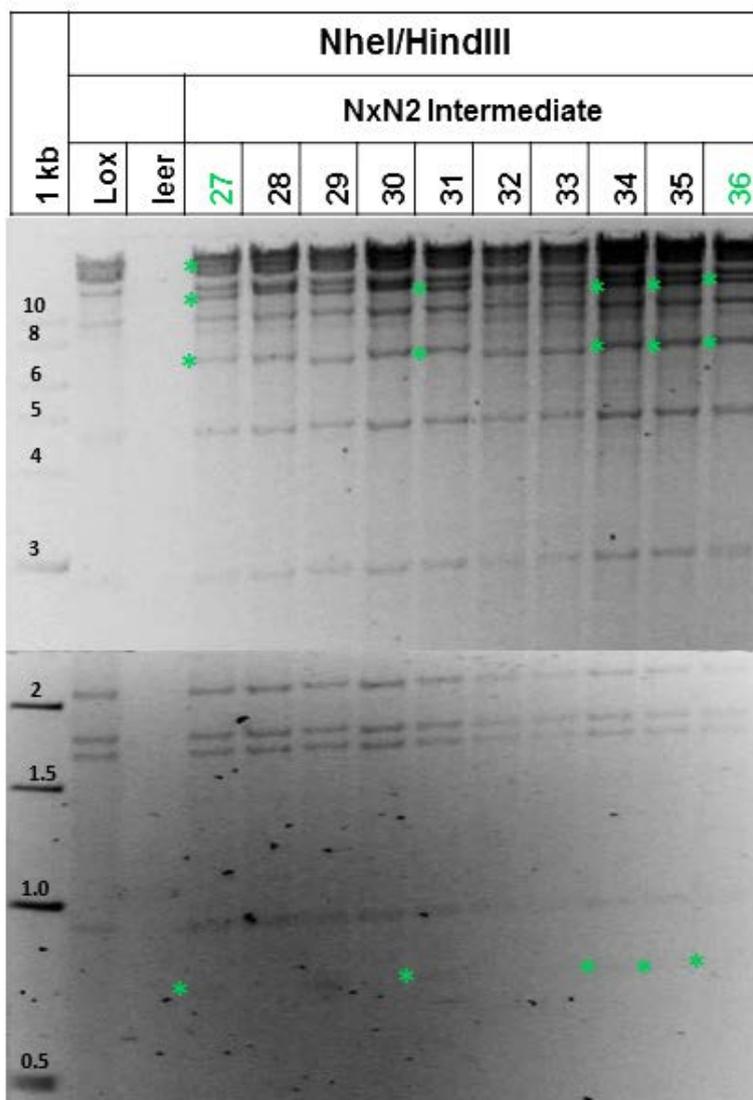


Abbildung 18. Restriktionsanalyse der Nxn2-Intermediate. DNA von pHSV2(MS)Lox (Lox) und von den pHSV2(MS)ICP0^{Nxn2} Intermediaten 27 bis 36 wurde mit den Enzymen NheI/HindIII behandelt, auf 0,8% Agarose in 0,5x TBE aufgetragen und für 15 Stunden bei 2.8 V/cm elektrophoretisiert. Mit grünen Sternen markierte Fragmente zeigen die deutlich erkennbaren erwünschten Bandenmuster nach dem ersten Schritt der *En Passant* Mutagenese. Mit den grün markierten Klonen 27 und 36 wurde die weitere Rekombinationsanalyse durchgeführt.

Tabelle 30. Restriktionsbandenverschiebungen der BAC-Intermediate. Die erwarteten Änderungen des Bandenmusters in den pHSV2(MS)ICP0^{Nxn2} -und pHSV2(MS)ICP0^{Nxn1/2} -Intermediate gegenüber pHSV2(MS)Lox. Basierend auf einer zusätzlichen NheI-Erkennungsstelle in der ICP0^{Nxn2}-Sequenz und der Kanamycinresistenzkassette. Angabe in Basenpaaren (bp).

Enzym	pHSV2(MS)Lox	pHSV2(MS)ICP0 ^{Nxn2} - und pHSV2(MS)ICP0 ^{Nxn1/2} -Intermediate
NheI/HindIII	20.817; 17.970	13.944; 11.650; 6.324; 736; 342

Intermediat 27 zeigte alle erwarteten Bandenmuster (Tabelle 30) auf. Auch die Intermediate 31 und 34-36 erschienen korrekt, wobei hier die Banden oberhalb von 12 kb nicht eindeutig

Ergebnisse

getrennt voneinander wahrgenommen werden konnten. Mit den Intermediaten 27 und 36 wurde der zweite Rekombinationsschritt der *En Passant* Mutagenese durchgeführt. In diesem Schritt wurde die Kanamycin-Resistenzkassette wieder entfernt und potentiell positive Klone anschließend über eine Kanamycin-negativ und Chloramphenicol-positiv Selektion (*Replika-Picking*) identifiziert. Potentiell positive Klone wurden im Anschluss in einem erneuten Doppelverdau mit den Enzymen NheI/HindIII identifiziert.

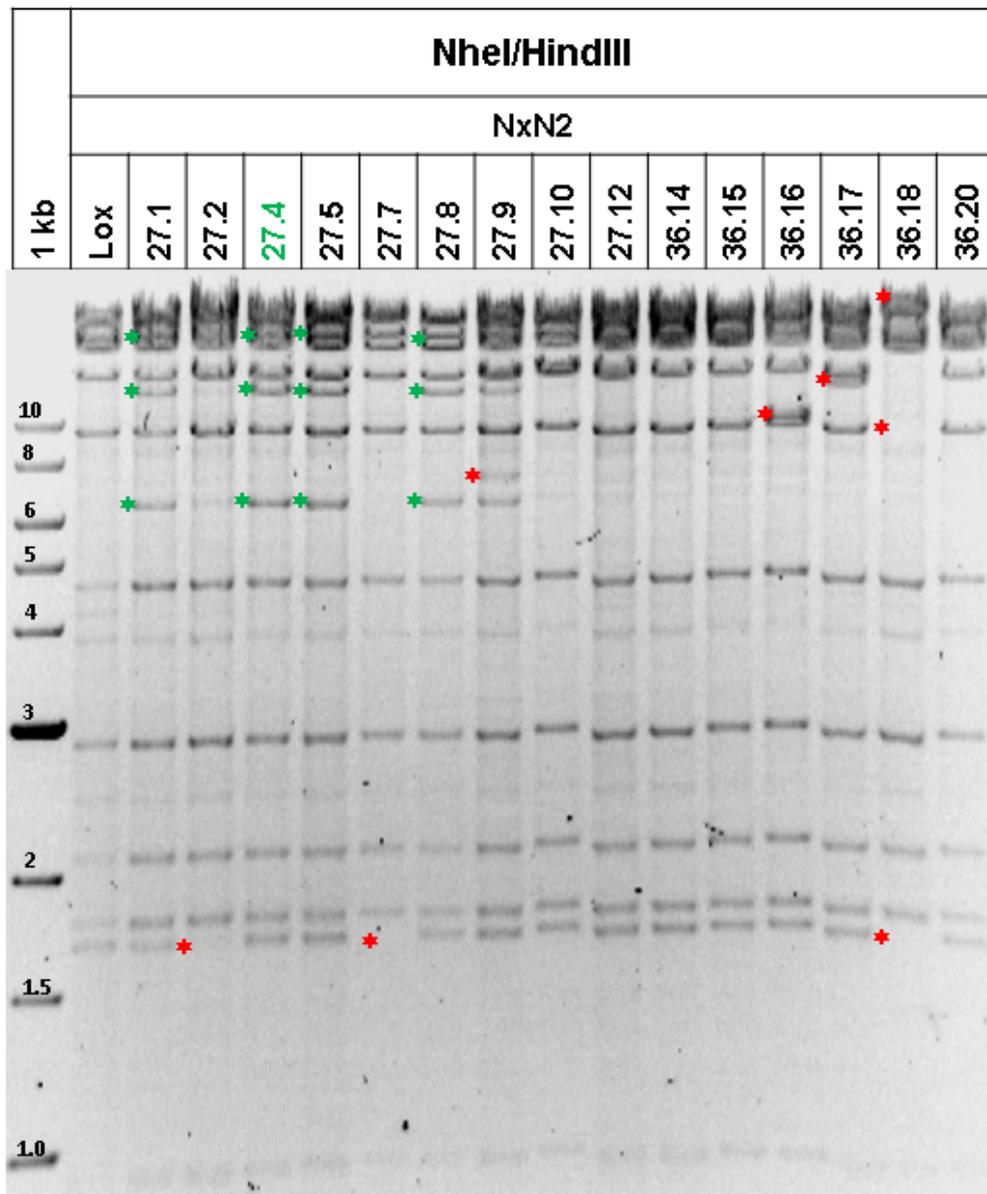


Abbildung 19. Restriktionsanalyse der NxN2-Mutanten. BAC-DNA von pHSV2(MS)Lox (Lox) und den angegebenen pHSV2(MS)ICP0^{NxN2}-Konstrukten (NxN2) wurde mit den Enzymen NheI/HindIII behandelt, auf 0,8% Agarose in 0,5x TBE aufgetragen und für 15 Stunden bei 2.8 V/cm elektrophoretisiert. Mit einem grünen Stern markierte Fragmente zeigen die erwünschten Bandenmuster nach dem zweiten Schritt der *En Passant* Mutagenese an. Mit einem roten Stern wurden unerwünschte Banden markiert. Der grün markierte Klon 27.4 wurde für die weitere Analyse der NxN2 Mutation herangezogen.

Tabelle 31. Bandenmuster in pHSV2(MS)ICP0^{NxN2}. Aufgrund einer zusätzlichen NheI-Erkennungsstelle in der ICP0^{NxN2} Sequenz verändert sich das pHSV2(MS)Lox Bandenmuster. Angaben in Basenpaaren (bp).

Enzym	pHSV2(MS)Lox	pHSV2(MS)ICP0 ^{NxN2}
NheI/HindIII	20.817, 17.970	13.944, 11.650, 6324

Die Klone 27.1; 27.4; 27.5 und 27.8 zeigten das erwünschte Bandenmuster nach dem Entfernen der Kanamycin-Kassette. Alle vier Klone wurden im Anschluss mit insgesamt acht Enzymen behandelt, um neben den erwünschten Bandenverschiebungen das Rückgrat des BACmids zu überprüfen. Bei dem achtfachen Enzymverdau wurden die NxN2-Mutanten mit dem Ausgangskonstrukt pHSV2(MS)Lox verglichen. Bei allen verwendeten Restriktionsenzymen, mit Ausnahme von NheI/HindIII, sollte das Restriktionsmuster zwischen HSV2(MS)Lox und der NxN2-Mutante identisch sein. Klon 27.4 zeigte bei der Restriktionsanalyse ein einwandfreies Bandenmuster (Abbildung 20), sodass die *ICP0*-Region des Konstruktes, das die SIAH-Bindemotive enthielt, im Anschluss sequenziert wurde (3.2.8.1, 3.2.11). Die entsprechenden Sequenzierergebnisse zeigten das Vorhandensein der erwünschten Punktmutationen und die Sequenz der zusätzlichen NheI-Erkennungsstelle. Der restliche sequenzierte Bereich war unversehrt, sodass dieser Klon für weiterführende Analysen herangezogen wurde. Das entsprechende Konstrukt wurde im Folgenden als pHSV2(MS)ICP0^{NxN2} [27.4], beziehungsweise vereinfacht als NxN2-Mutante bezeichnet.

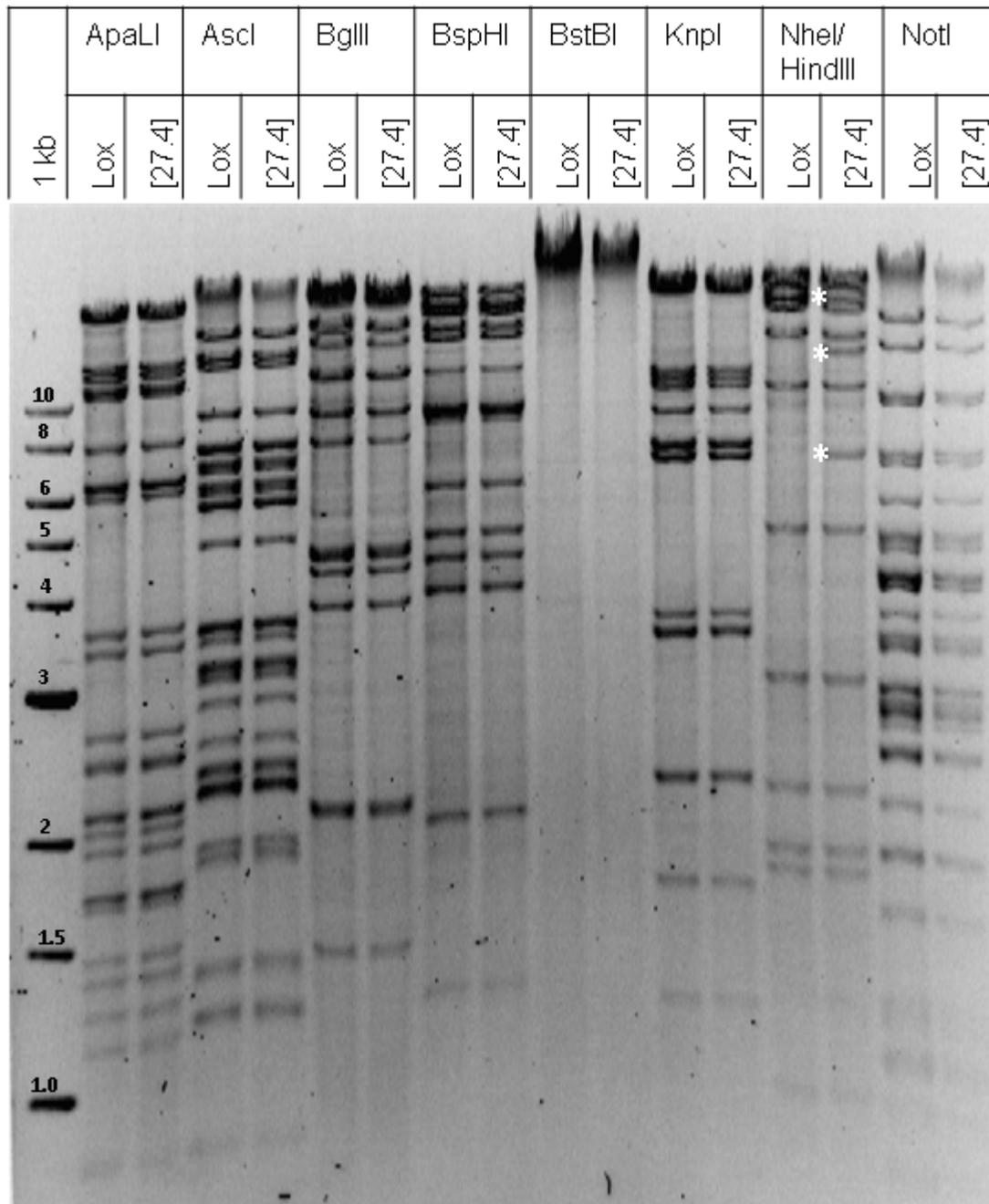


Abbildung 20. Restriktionsanalyse mit acht Enzymen. BAC-DNA von pHSV2(MS)Lox (Lox) und von pHSV2(MS)ICP0^{NxN2} [27.4] wurde mit den acht angegebenen Enzymen behandelt, auf 0,7% Agarose in 0,5x TBE aufgetragen und für 17 Stunden bei 2.8 V/cm separiert. Mit einem weißen Stern markierte Fragmente zeigen die erwarteten Bandenmuster bei NxN2 Klon [27.4] aufgrund der Insertion der NheI Restriktionserkennungsstelle.

4.1.1.1.2 Herstellung der HSV2 ICP0^{NxN1/2} -Mutante und Überprüfung der Integrität

Zur Herstellung der SIAH-bindedefizienten Doppelmutante wurde ein HSV2 Konstrukt herangezogen, indem bereits das erste SIAH-Bindemotiv inaktiviert wurde (NxN1-Mutante). Die Mutagenese des ersten Motivs wurde in (Czechowicz, 2013) detailliert beschrieben, und das korrekte finale Konstrukt als pHSV2 ICP0^{NxN1} Klon [52.1] bezeichnet. Entscheidend für

die Inaktivierung des ersten SIAH-Bindemotivs in ICP0 war die Punktmutation der Aminosäuren Valin (V) an Position 414 in ICP0 und Prolin an Position 416 zu jeweils Asparagin (N) (Tabelle 29). Zudem wurde in das erste SIAH-Bindemotiv eine zusätzliche BglII Restriktionsstelle eingefügt (AS 419-420). Wie bei der NheI-Schnittstelle im zweiten SIAH-Bindemotiv wurden auch hier die Basentriplets so verändert, dass sich die Wildtyp-Aminosäuresequenz nicht änderte. Die DNA-Sequenzunterschiede zwischen dem intakten ersten SIAH-Bindemotiv und dem inaktivierten Motiv mit der zusätzlichen Restriktionsschnittstelle sind in Abbildung 21 aufgezeigt.

In der vorliegenden Arbeit wurde das zweite SIAH-Bindemotiv mittels *En Passant* Mutagenese in der NxN1-Mutante wie in 4.1.1.1.1 beschrieben deletiert. Die SIAH-bindedefiziente Doppelmutante trug dementsprechend die Mutation V414N/P416N, sowie die Punktmutation V316N/P318N in der *ICP0*-Sequenz beider Genkopien. Aufgrund der veränderten Aminosäuresequenz in beiden SIAH-Bindemotiven wurde das Konstrukt als pHSV2 ICP0^{NxN1/2}, beziehungsweise vereinfacht als NxN1/2-Mutante bezeichnet.

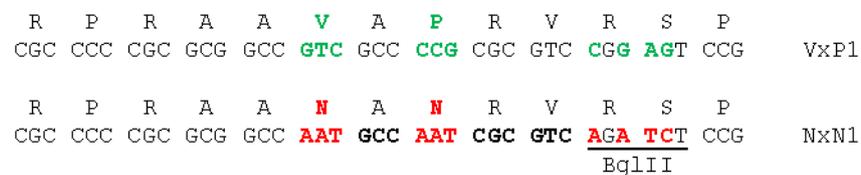


Abbildung 21. Das VxP1 SIAH-Bindemotiv in ICP0 aus HSV2. Grün markiert sind die für eine SIAH-Interaktion essentiellen Aminosäuren (VxP) und die für sie kodierenden Basentriplets. Rot markiert wurden die durch BAC-Mutagenese eingeführten Veränderungen in der Basenabfolge. Anstelle von Valin (V) und Prolin (P) wurden zwei Asparagin (NxN) in die AS-Sequenz eingefügt. Zusätzlich wurde in die DNA-Sequenz eine BglII-Restriktionsstelle inseriert. Der angezeigte Bereich entspricht der Aminosäuresequenz 409-421.

Auch hier erfolgte die Mutagenese des VxP2-Motivs in zwei Schritten. Zur Kontrolle der hergestellten Intermediate wurden diese mit den Enzymen NheI/HindIII in einem Doppelansatz behandelt und mit den Konstrukten pHSV2(MS)Lox und HSV2(MS)ICP0^{NxN1} Klon [52.1] verglichen. Aufgrund der Insertion der Kanamycin-Resistenzkassette in die NxN1/2-Intermediate sollten sich die gleichen Veränderungen im Bandenmuster ergeben, wie bei den NxN2-Intermediaten aus 4.1.1.1.1. Die entsprechenden Bandenmuster sind in Tabelle 30 aufgezeigt.

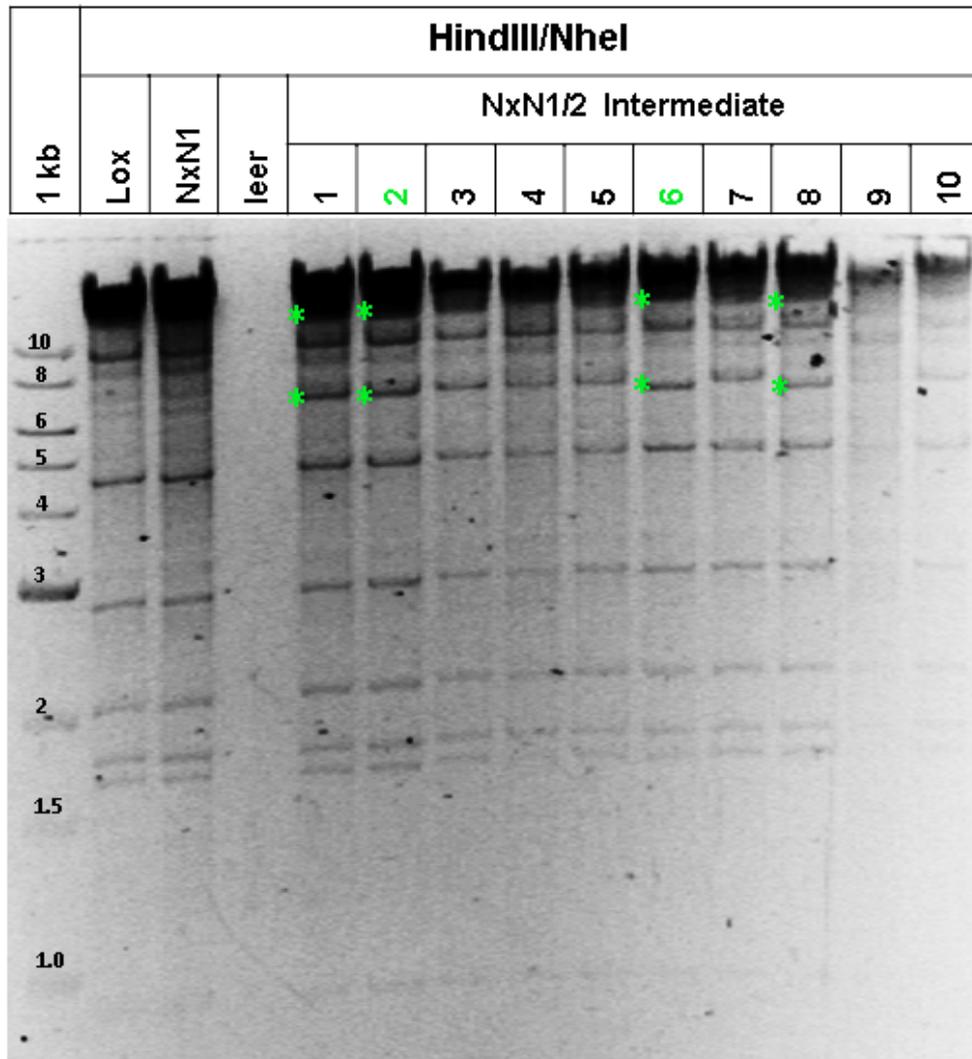


Abbildung 22. Restriktionsanalyse der NxN1/2 Intermediate. BAC-DNA von pHSV2(MS)Lox, pHSV2(MS)ICP0^{NxN1/2} und den pHSV2(MS)ICP0^{NxN1/2} Intermediaten 1 bis 10 wurde mit den Restriktionsenzymen NheI/HindIII behandelt, auf 0,6% Agarose in 0,5x TBE aufgetragen und für 15 Stunden bei 2.8 V/cm elektrophoretisiert. Mit einem grünen Stern markierte Fragmente zeigen die erwarteten Bandenmuster nach dem ersten Schritt der *En Passant* Mutagenese. Mit einem grünen Stern markierte Klone galten als potentiell positiv. Mit Klon 2, 3 und 6 wurde der zweite Schritt der Mutagenese durchgeführt.

Aufgrund des Bandenmusters wurden die Konstrukte 1, 2, 6 und 8 als potentiell positiv angesehen. Bei den restlichen Intermediaten war auch von einem korrekten Bandenmuster auszugehen, aufgrund der geringen DNA-Konzentration bei den Konstrukten 9 und 10, und der leichten Verschiebung aller Restriktionsfragmente bei den Konstrukten 3, 4, und 7 gegenüber 1, 2, 6 und 8 war eine Aussage hier jedoch nicht eindeutig festzumachen. Zudem ist zu erwähnen, dass das Restriktionsmuster im Bereich überhalb der 10 kb Marke und unterhalb der 1 kb Marke bei allen Intermediaten nicht eindeutig zu identifizieren war. Für den zweiten Rekombinationsschritt wurden daraufhin die Konstrukte 2 und 6, sowie Konstrukt 3 als Kontrolle ausgewählt. Nach der zweiten Rekombination wurden die fertigen

Klone wie zuvor durch eine Kanamycin-negativ Chloramphenicol-positiv Selektion identifiziert und mittels Restriktionsanalyse mit dem Enzym AscI und im Doppelverdau mit den Enzymen NheI/HindIII auf ihre Integrität überprüft. Die AscI-Analyse diente zur Überprüfung der Unversehrtheit des BACmid-Rückgrates, da HSV2 über sein Genom verteilt 49 AscI-Schnittstellen besitzt (Angabe nach *in silico* Überprüfung der Vektorkarte von HSV2 HG52). Hier sollte sich das Restriktionsmuster der NxN1/2-Mutante nicht vom Muster des pHSV2(MS)Lox unterscheiden. Bei einer Doppelanalyse mit den Enzymen NheI/HindIII sollten die in Tabelle 32 aufgelisteten Bandenmuster sichtbar sein.

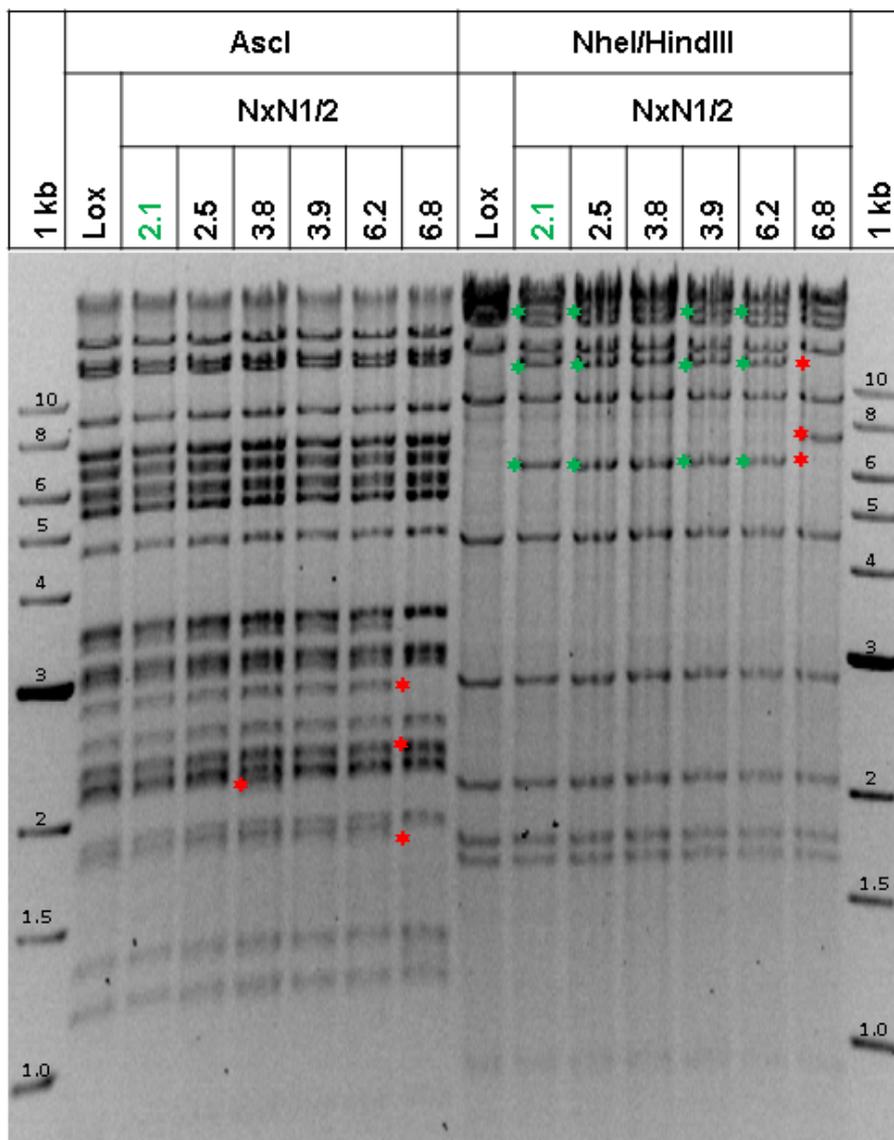


Abbildung 23. Restriktionsanalyse der NxN1/2-Mutante. BAC-DNA von pHSV2(MS)Lox und den angegebenen pHSV2(MS)ICP0^{NxN1/2}-Konstrukten wurde mit den Enzymen AscI und NheI/HindIII behandelt, auf 0,6% Agarose in 0,5x TBE aufgetragen und für 15 Stunden bei 2.8 V/cm elektrophoretisiert. Die mit grünen Sternen markierten Klone gelten aufgrund der erwünschten

Ergebnisse

Bandenverschiebungen als potentiell positiv. Die roten Sterne markierten unerwünschte Veränderungen im Bandenmuster. Mit Klon 2.1 wurden weitere Experimente durchgeführt.

Tabelle 32. Erwartete Änderungen des Bandenmusters in der NxN1/2-Mutante, auftretend aufgrund der zusätzlichen BglI- und NheI-Erkennungsstellen in den HSV2(MS)ICP0^{NxN1/2} Konstrukten. Angaben in Basenpaaren (bp).

Enzym	pHSV2(MS)Lox	pHSV2(MS)ICP0 ^{NxN1/2}
BglI	34.805; 22.740	21.255; 13.554; 2x 11.370
NheI/HindIII	20.817; 17.970	13.944; 11.650; 6324

Anhand der Restriktionsfragment-Analyse konnten die Klone 2.1, 2.5, sowie 3.9 und 6.2 als potentiell positive NxN1/2-Mutanten identifiziert werden (Abbildung 23). Klon 2.1 wurde für die Durchführung weiterer Experimente ausgesucht und seine Integrität vorab durch einen achtfachen-Enzymverdau genauer überprüft. Mit Ausnahme der Restriktionsendonukleasen BglI und NheI/HindIII sollten die Bandenmuster des Konstruktes pHSV2(MS)Lox und der NxN1/2-Mutante identisch sein. Die Bandenmuster nach BglI-Behandlung war auf die zusätzliche Restriktionsschnittstelle im NxN1-Bereich zurückzuführen. Die erwarteten Veränderungen im Fragmentmuster sind in Tabelle 32 aufgelistet.

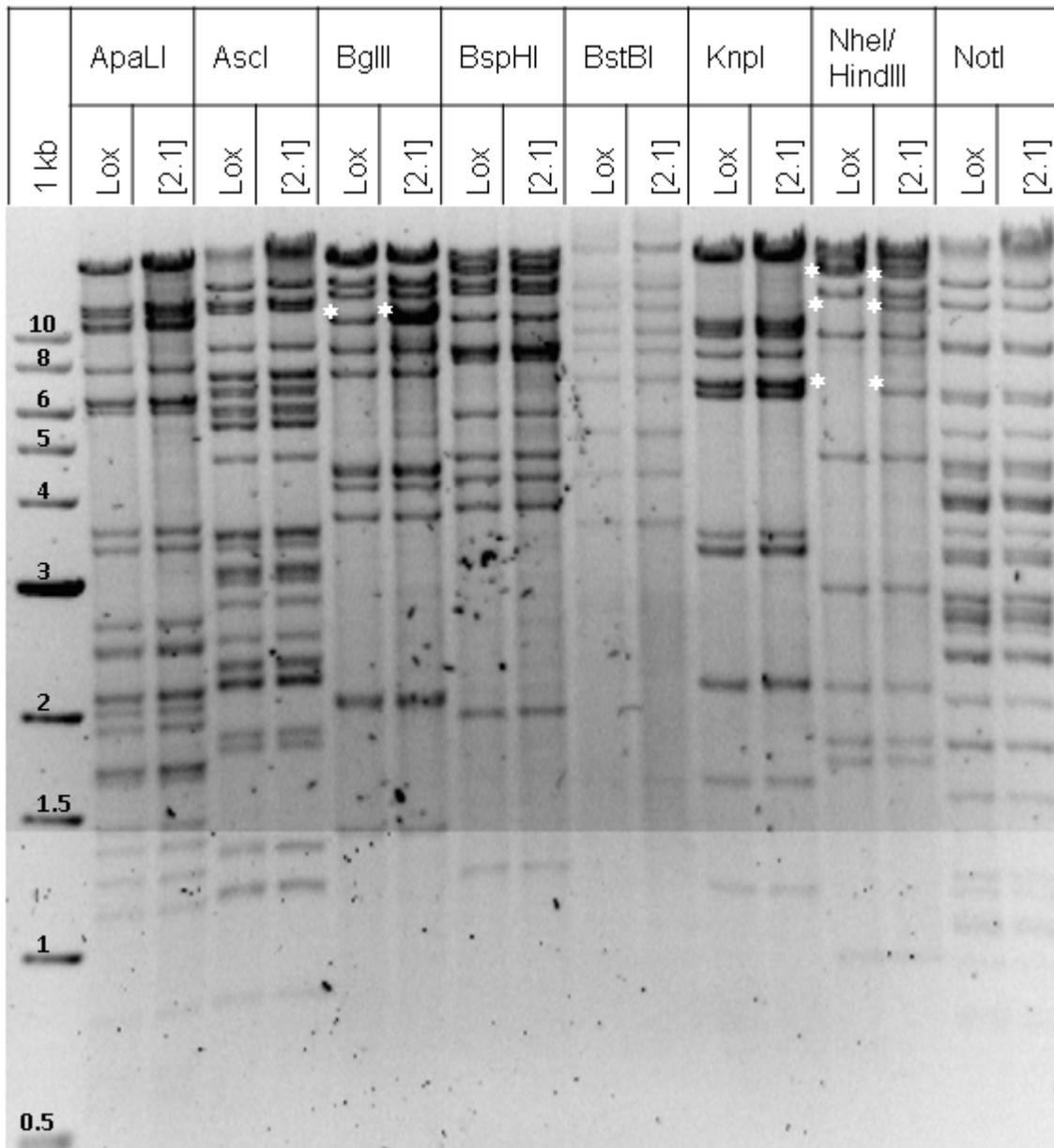


Abbildung 24. Restriktionsanalyse der NxN1/2-Mutante mit acht Enzymen. BAC-DNA von pHSV2(MS)Lox und pHSV2(MS)ICP0^{NxN1/2} Klon [2.1] wurde mit den 8 angegebenen Enzymen behandelt, auf 0,7% Agarose in 0,5x TBE aufgetragen und für 17 Stunden bei 2,8 V/cm aufgetrennt. Weiße Steren markieren die erkennbaren erwünschten Bandenverschiebungen nach dem zweiten Schritt der *En Passant* Mutagenese aufgrund der zusätzlichen NheI und BglII Schnittstelle in der DNA-Sequenz.

Der NxN1/2 Klon [2.1] wies in seinem BACmid Rückgrat anhand der Restriktionsanalysen keine Veränderungen gegenüber pHSV2 Lox auf und zeigte bei der NheI/HindIII Doppelanalyse die erwarteten Bandenmuster. Bei der Behandlung mit BglII waren bei der NxN1/2-Mutante die erwarteten zusätzlichen Banden bei 11.370 bp zu detektieren. Eine 13.554 bp Bande war nicht eindeutig auszumachen, da auf etwa der gleichen Höhe bei Lox und der Mutante eine zusätzliche Bande (14.3 kb) auftritt. Oberhalb von 17 kb waren

Ergebnisse

Fragment-Größenunterschiede nur schwierig auszumachen, sodass die 21.255 bp Bande nicht eindeutig identifiziert werden konnte. Die *ICP0*-Sequenz, die die SIAH-Bindedomänen enthielt, wurde daraufhin in einen TOPO-Vektor ligiert und anschließend sequenziert (3.2.8.1, 3.2.11). Die Ergebnisse zeigten die erwünschten Veränderungen in der DNA-Sequenz der Doppelmutante im Bereich der SIAH Konsensus-Motive. Das Konstrukt wurde daraufhin für weitere Experimente verwendet und im Folgenden als pHSV2(MS)ICP0^{NxN1/2} [2.1], beziehungsweise vereinfacht als NxN1/2-Mutante bezeichnet.

Vor der detaillierten Charakterisierung wurden alle generierten Klone mit inaktivierter SIAH-Bindedomäne, inklusive der NxN1-Mutante [52.1], synchron mit den Enzymen AscI, BglI, NheI/HindIII und NotI behandelt und ihre Bandenmuster verglichen. Alle Konstrukte waren bei Behandlung mit den Enzymen AscI und NotI in ihrem Bandenmuster identisch, lediglich bei einer Analyse mit BglI und NheI/HindIII zeigten sich im Vergleich zu pHSV2(MS)Lox die erwünschten Veränderungen im Bandenmuster bei den jeweiligen Mutanten. Zudem war bei dieser Analyse die 21.255 bp Bande bei der NxN1 -und NxN1/2-Mutante besser zu erkennen.

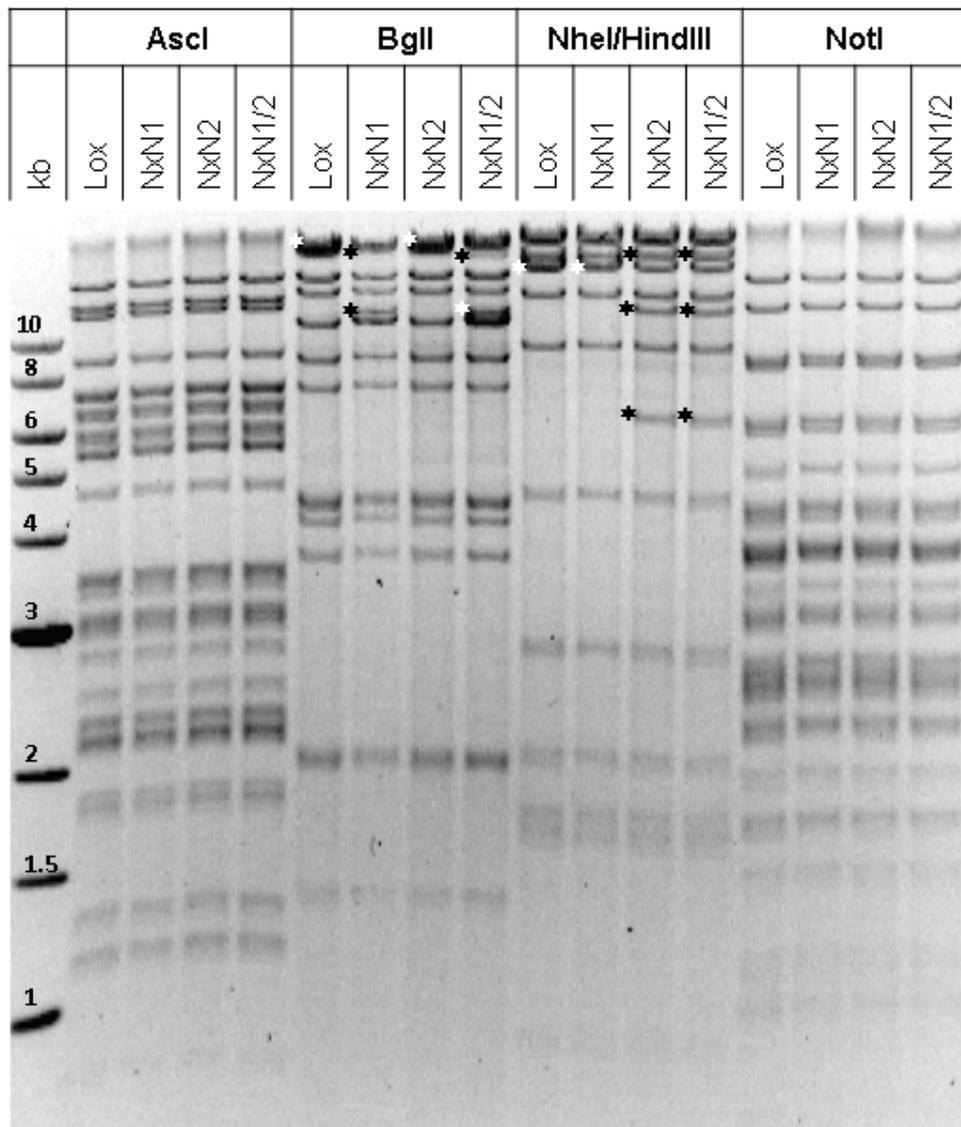


Abbildung 25. Restriktionsanalyse der hergestellten ICP0-Mutanten. BAC-DNA von Wildtyp pHSV2(MS)Lox und den Mutanten pHSV2(MS)ICP0^{NxN1} [52.1], pHSV2(MS)ICP0^{NxN2} [27.4] und pHSV2(MS)ICP0^{NxN1/2} [2.1] wurde mit den angegebenen Enzymen behandelt, auf 0,7% Agarose in 0,5x TBE aufgetragen und für 17 Stunden bei 2.8 V/cm elektrophoretisiert. Mit einem weißen, beziehungsweise schwarzen Stern markierte Fragmente zeigen die erwünschten Veränderungen im Bandenmuster nach der *En Passant* Mutagenese auf.

4.1.2 Konstruktion der HSV2 ICP0-Mutanten über homologe Rekombination

Eine HSV2-Mutagenese in Bakterienzellen (wie die *En Passant* Mutagenese) kann zur Folge haben, dass gewisse Strukturen im Herpesgenom verloren gehen oder verkürzt werden (Balliet and Schaffer, 2006; Nagel et al., 2014). Ein Grund hierfür ist, dass die bakterielle Replikationsmaschinerie über gewisse Sequenzen, wie Sekundärstrukturen im HSV Genom, hinweg liest. Die deletierten Sequenzen können dabei so klein sein, dass sie mittels Restriktionsfragment-Analysen nicht immer sichtbar gemacht werden können. Aufgrund dieser negativen Nebeneffekte wurden die vorab beschriebenen SIAH-bindedefizienten ICP0-

Mutanten zudem in eukaryotischen Zellen über homologe Rekombination hergestellt. Mit Hilfe der homologen Rekombination in eukaryotischen Zellen (3.3.3) sollte ausgeschlossen werden, dass phänotypische Veränderungen in den BAC-Mutanten auf ungewollte Deletionen im Rückgrat zurückzuführen waren. Über den genauen Ablauf bei der homologen Rekombination von HSV in eukaryotischen Zellen ist noch wenig bekannt. Der Prozess erfolgt höchstwahrscheinlich während der Virusreplikation und wird durch virale Proteine wie ICP8 (*single-strand DNA-binding protein*) und die zelluläre DNA-Reparaturmaschinerie ermöglicht (Muylaert et al., 2011; Nimonkar & Boehmer, 2003; Sawitzke, 2009). Aufgrund der relativ niedrigen Rekombinationsrate ist es notwendig, zusätzliche Selektionsmarker in die Zielsequenz zu integrieren, wie das Gen des *green fluorescent proteins* (GFP) (Halford et al., 2010; Ramachandran et al., 2008)

Die homologe Rekombination wurde in U2OS Zellen durchgeführt. Zur Identifizierung korrekter Klone, wurden hier anstelle einer zusätzlichen Restriktionsschnittstelle in der DNA-Sequenz Mutanten mit einer *ICP0-GFP* Fusionssequenz generiert, und potentiell positive Klone über die *GFP*-Sequenz, beziehungsweise GFP Expression identifiziert. Zudem wurde die Sequenz des *ICP0*-Leserahmens „Kodon-optimiert“, um den hohen GC-Gehalt des Gens zu verringern. Insgesamt wurden vier Konstrukte generiert: HSV2 *ICP0-GFP* Wildtyp, ohne Mutationen in den SIAH-Bindemotiven, sowie drei SIAH-Bindemutanten, in denen entweder eines der beiden SIAH-Bindemotive deletiert wurde oder beide zusammen (DNA-Sequenz, siehe Tabelle 25). Die homologe Rekombination erfolgte nach 3.3.3. Die eingesetzten Transferplasmide sind in Tabelle 7 aufgelistet. Für die homologe Rekombination mussten zunächst die Transferplasmide molekular kloniert werden (3.2.13.2). Zur Identifizierung potentiell positiver Transferplasmide wurden jeweils fünf bis sechs Konstrukte (markiert durch die Buchstaben A bis D) mit den Restriktionsenzymen EcoRI/SalI behandelt.

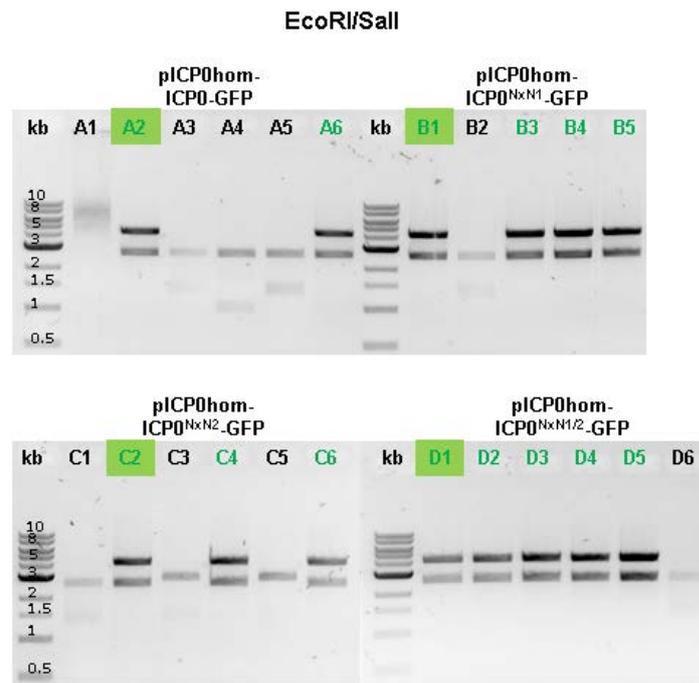


Abbildung 26. Restriktionsanalyse der Transferplasmide. DNA der angegebenen Transferplasmide wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI und SalI behandelt, auf 1% Agarose in 0,5% TAE aufgetragen und bei 100V für 60 min elektrophoretisiert. Die Buchstaben stehen hierbei für das Plasmid und die Nummer für den jeweiligen molekularen Klon. Eine grüne Beschriftung steht für potentiell positive Konstrukte. Hellgrün hinterlegte Konstrukte wurden für die homologe Rekombination verwendet.

Die mit grüner Schrift markierten Konstrukte wurden als potentiell positiv identifiziert, da sie nach der Restriktionsanalyse die erwarteten Fragmentgrößen von 4.235 bp und 2.635bp aufzeigten. Von den als positiv identifizierten Konstrukten wurde der DNA-Bereich der SIAH-Bindedomänen in den jeweiligen Transferplasmiden sequenziert. Die Plasmide A2, B1, C2 und D1 zeigten die erwünschte DNA-Sequenz und wurden für die homologe Rekombination weiter verwendet. Ab diesem Zeitpunkt wurden die ausgewählten Transferplasmide ausschließlich mit dem jeweiligen Buchstaben gekennzeichnet, das heißt Plasmid A2 wurde zu Transferplasmide A, usw. Die homologe Rekombination wurde mit dem Plaque-gereinigten HSV2 Wildtyp MS Klon 1 (MS 1) beziehungsweise parallel mit Klon 5 (MS 5) durchgeführt (3.3.3). Die Identifizierung potentiell positiver Mutanten erfolgte über die GFP-Expression der Mutanten und der damit einhergehenden grünen Fluoreszenz der Virusplaques bei Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop. Grüne Virusplaques (das heißt potentiell positive Konstrukte) wurden isoliert und in drei aufeinanderfolgenden Plaquareinigungsverfahren (3.3.8) gereinigt. Hierbei wurde bei der Kennzeichnung der jeweiligen rekombinanten Konstrukte als erstes die Nummer des Ursprungsvirus-Klon angegeben (1 oder 5 für MS Klon 1 und MS Klon 5), gefolgt vom Buchstaben des

Ergebnisse

Transferplasmids (siehe 3.2.13.2 und Abbildung 26). Die darauffolgenden Zahlen gaben den isolierten Klon der jeweiligen Reinigungszyklus an. Die Homogenität der Virusbestände wurde anschließend mittels Immunfärbung der Virusplaques überprüft (3.4.2). Die für die Färbung verwendeten Antikörper waren gegen das GFP Protein (angezeigt durch grüne Fluoreszenz) und ICP0 (angezeigt durch rote Fluoreszenz) gerichtet. Ausschließlich die Viruspopulationen, bei denen nur grün beziehungsweise gelb fluoreszierende Plaques (Überlagerung von grüner und roter Fluoreszenz) detektierbar waren, wurden als 100% homogene Viruskultur betrachtet. Bei vereinzelt auftretenden ausschließlich roten Plaques wurde eine erneute Plaque-Reinigung der GFP-positiven Plaques durchgeführt. Die Virus-Konstrukte, die durch Immunfärbung überprüft wurden, sind in Tabelle 33 aufgeführt. Als Kontrolle wurden Zellen mit den Wildtypvirus-Klonen HSV2 MS 1 und MS 5 infiziert, deren Plaques ausschließlich rot fluoreszierten sollten (da HSV2 Wildtyp keine GFP-Sequenz in seinem Genom enthält).

Tabelle 33. Plaque-gereinigte Klone. Rekombinante Viren wurden aus Wildtyp HSV2 Klon MS 1 oder MS 5 und dem jeweiligen Transferplasmid (A-D) nach dem dritten und vierten Reinigungszyklus hergestellt, wobei Transferplasmid (A) die Sequenz von Wildtyp *ICP0-GFP* trug; (B) die NxN1-GFP Mutation; (C) die NxN2-GFP Mutation; und (D), eine Deletion in beiden SIAH-Bindemotiven (NxN1/2-GFP). Die hinter den Buchstaben angegebenen Ziffern stellen den isolierten Klon des jeweiligen Reinigungszyklus dar.

Zyklus 3	A	B	C	D
HSV2	ICP0-GFP	NxN1-GFP	NxN2-GFP	NxN1/2-GFP
MS 1	1A6.1.1	1B3.3.1	1C1.1.3	1D3.1.3
	1A6.1.2	1B5.1.1	1C3.1.2	1D4.1.1
	1A6.1.3	1B5.1.2		
	1A7.1.1	1B5.1.3		
	1A7.1.2			
	1A7.1.3			
MS 5	5A1.1.1	5B6.2.2	5C1.1.1	5D2.3.2
	5A4.3.2	5B6.2.3	5C4.3.1	5D8.2.1
				5D8.2.2
				5D8.2.3
Zyklus 4	B		D	
HSV2	NxN1-GFP		NxN1/2-GFP	
MS 1	1B3.3.1.1		1D4.1.1.1	
	1B3.3.1.2		1D4.1.1.2	
	1B3.3.1.3		1D4.1.1.3	
	1B5.1.3.1		1D4.1.1.4	
	1B5.1.3.2		1D4.1.1.5	

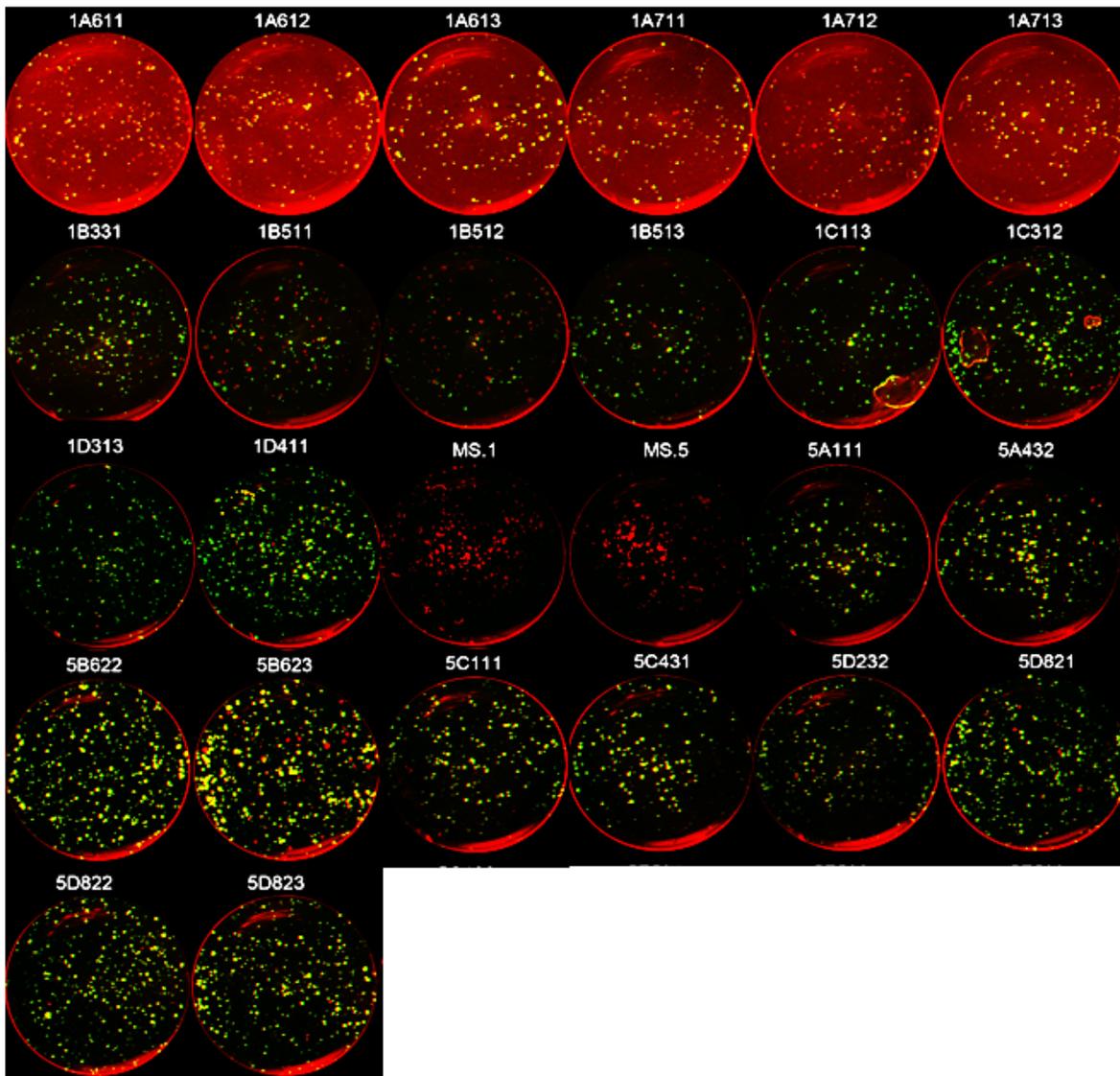


Abbildung 27. Immunfärbung von Virusplaques. U2OS Zellen wurden entweder mit HSV2 MS Wildtyp (MS.1 und MS.5) oder mit den genannten HSV2 Konstrukten des dritten Reinigungszyklus infiziert und anschließend bei 37°C inkubiert. Nach 48 Stunden wurden die infizierten Zellen fixiert und mit den Antikörpern anti-GFP (grüne Fluoreszenz) und anti-ICP0 (rote Fluoreszenz) markiert. Aufnahmen mit 5x Objektiv am Axiovert 200 Mikroskop (Zeiss). Bildbearbeitung mit Adobe Photoshop CS5.1.

Die Ergebnisse der Antikörperfärbung zeigten, dass die Plaques des Wildtypvirus (HSV2 MS 1 und MS 5) auf dem U2OS-Zellrasen ausschließlich rot fluoreszierten. Des Weiteren war erkennbar, dass in den meisten Plattenvertiefungen (*wells*) einige Plaques rot fluoreszierten, was auf eine Mischpopulation von Wildtypvirus und rekombiniertem Virus hindeutete. Davon ausgeschlossen waren die Klone 1A6.1.3, 1A7.1.3, 1C1.1.3 und 1C3.1.2, sowie 5B6.2.2, 5C1.1.1, 5C4.3.1, 1D3.1.3 und 5D8.2.2 (Abbildung 27), sie bildeten ausschließlich Plaques auf dem Zellrasen aus, die grün und gelb fluoreszieren und wurden deshalb als homogene Viruspopulationen eingestuft. Alle anderen Konstrukte wurde über eine weitere

Ergebnisse

Verdünnungsreihe Plaque-gereinigt und anschließend erneut mittels Antikörperfärbung überprüft. Hier zeigte sich, dass die Plaques aller Konstrukte, mit Ausnahme von 1B3.3.1.2, ausschließlich grün und gelb fluoreszierten (Abbildung 28), sodass diese als homogene Viruspräparationen (Virus-Stocks) eingestuft wurden. Klon 1B3.3.1.2 wurde verworfen.

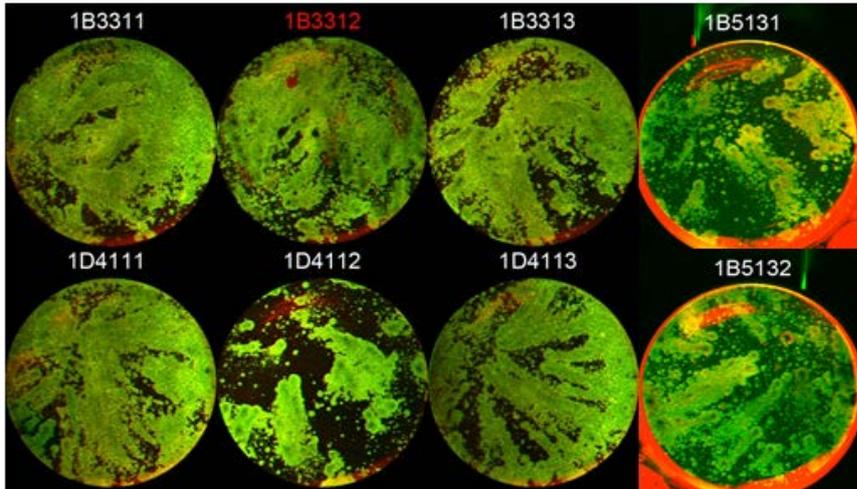


Abbildung 28. Immunfärbung viraler Plaques des vierten Reinigungszyklus. U2OS Zellen wurden mit den genannten HSV2 Konstrukten des vierten Reinigungszyklus infiziert und anschließend bei 37°C inkubiert. Nach 60 Stunden wurden die Zellen fixiert und mit den Antikörpern anti-GFP (grüne Fluoreszenz) und anti-ICP0 (rote Fluoreszenz) markiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Aufnahme mit 5x Objektiv am Axiovert 200 Mikroskop (Zeiss). Bildbearbeitung mit Adobe Photoshop CS5.1.

4.1.2.1 Überprüfung der Integrität der ICP0-GFP Mutanten

Nach der Identifizierung rekombinierter homogener Virusbestände über Antikörperfärbung (Abbildung 27 und Abbildung 28) wurde zunächst Virus in größerem Maßstab in BHK-21 Zellen produziert (3.3.5 und 3.3.6) und im Anschluss virale DNA aus den infizierten Zellen isoliert (3.2.3). Die virale DNA der rekombinanten Konstrukte und der Ausgangskonstrukte HSV2 MS Klon 1 und 5 wurde mit dem Restriktionsenzym HindIII behandelt, um die Integrität der Genome zu überprüfen (Abbildung 29). Da eine Restriktionsfragment-Analyse von linearer viraler DNA (isoliert aus eukaryotischen Zellen) aufgrund der Topologie und dem Auftreten von vier verschiedenen HSV2 Isomeren (Abschnitt 1.1.2) nicht immer eindeutig ist (Czechowicz, 2013), wurde das Vorhandensein der GFP- und der GC-optimierten synthetischen *ICP0*-Sequenz in den rekombinanten Konstrukten anschließend im Southern Blot überprüft (Abbildung 30, Abbildung 31). Verwendet wurde eine radioaktiv markierte Sonde, die ein 860bp Fragment in Wildtyp *ICP0* nachwies, sowie eine Sonde die ein 726 bp Fragment in GFP erkannte.

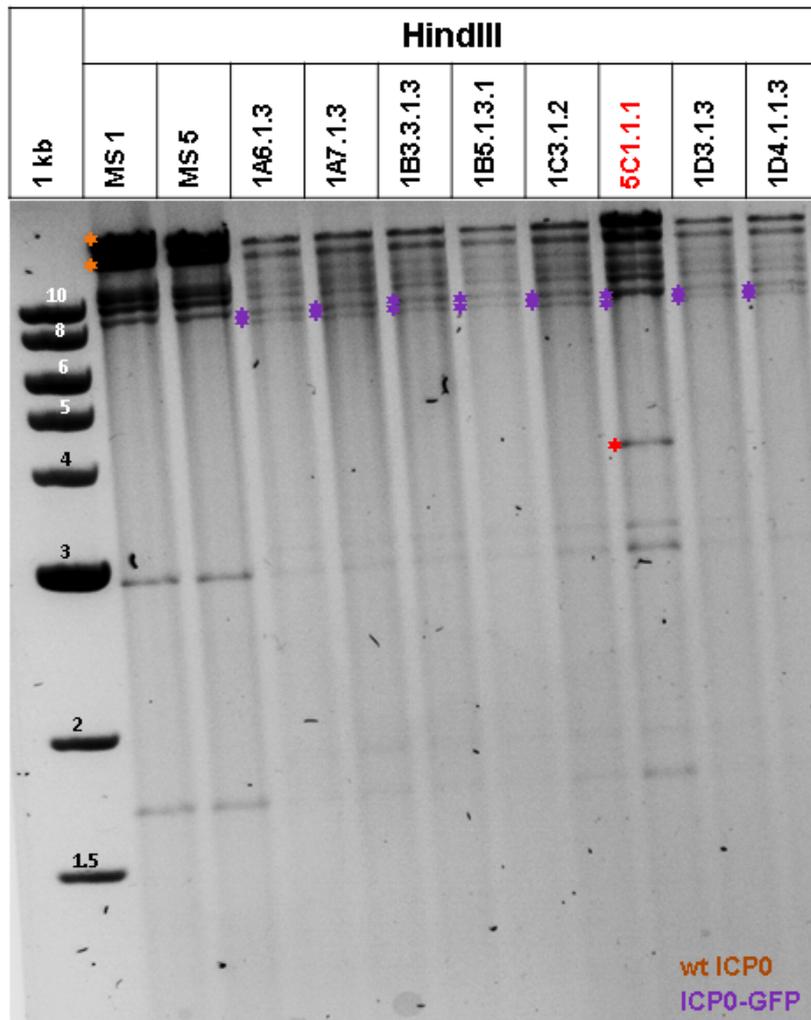


Abbildung 29. Restriktionsanalyse der homolog rekombinierten ICP0-Mutanten. Virale DNA von HSV2 Wildtyp (MS1 und MS5) und den entsprechenden homolog rekombinierten Konstrukten wurde mit der Restriktionsendonuklease HindIII behandelt, auf 0,7% Agarose in 0,5x TBE aufgetragen und für 17 Stunden bei 2.8 V/cm elektrophoretisiert. Orange Sterne markieren HSV2 Wildtyp *ICP0*-Fragmente, violette Sterne markieren *ICP0-GFP* Fragmente. Rote Beschriftung und rote Sterne markieren unerwartete Veränderungen im Bandenmuster und das Verwerfen des entsprechenden Konstruktes.

Nach dem HindIII-Restriktionsverdau zeigten alle Konstrukte mit Ausnahme des HSV2 N_xN₂-Klons 5C1.1.1 das erwartete Bandenmuster, obgleich die Identifizierung aller DNA-Banden bei den HSV2 Wildtyp-Konstrukten MS1 und MS 5 schwierig war, da hier das Gel mit DNA überladen wurde und einige Banden nicht getrennt voneinander wahrgenommen werden konnten (Abbildung 29). Die anschließende Southern Blot Analyse zeigte jedoch, dass beim Verwenden einer HSV2 Wildtyp *ICP0* Sonde ausschließlich die beiden *ICP0*-Kopien von HSV2 MS 1 und MS 5 Wildtyp markiert wurden, welche eine Größe von 20.7 kb (*ICP0* Kopie in *TR_L*) und von 17.8 kb (*ICP0* Kopie in *IR_L*) hatten (Abbildung 29; orange Sterne). Die Kodon-optimierten *ICP0*-Kopien der homolog rekombinierten Konstrukte wurden durch diese Sonde nicht detektiert (Abbildung 30 A), auch nicht nach 24-stündiger

Ergebnisse

Membran-Exposition des entsprechenden Röntgenfilms. Da bei den homolog rekombinierten Konstrukten weder eine radioaktiv markierte Bande mit einer Größe von 20.7 kb, noch mit 17.8 kb zu erkennen war, bewies der Southern Blot, dass beide ursprünglichen *ICP0*-Wildtypsequenzen durch Rekombination in dem entsprechenden Genom verloren gingen. Um eine erfolgreiche Integration des *ICP0-GFP* Gens in den rekombinierten Konstrukten nachzuweisen, wurde im Anschluss die HSV2 Wildtyp *ICP0* Sonde von der Membran durch Waschen entfernt (*stripping*) (3.4.4.5), und die Membran anschließend mit der GFP Sonde inkubiert. Durch die sich anschließende Schwärzung des Expositionsfilms, konnte gezeigt werden, dass die GFP-Sonde ausschließlich die rekombinierten Konstrukte markierte. Bei HSV2 MS Wildtyp (MS 1 und MS 5) konnten mit derselben Sonde dagegen keine DNA-Fragmente markiert werden (Abbildung 30 B). Aufgrund einer *Hind*III Restriktionsanalyse lagen die zu detektierenden Bandensignale bei den homolog-rekombinierten Viren mit 7,5 kb und 8 kb jedoch so dicht beieinander (Abbildung 29; violette Sterne), dass mit der Sonde nicht eindeutig gezeigt werden konnte, ob lediglich eine oder beide *ICP0-GFP* Kopien im HSV Genom vorlagen (Abbildung 30 B). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass bei Konstrukt 5C1.1.1 ein unerwartetes DNA-Fragment durch die Sonde markiert wurde, sodass dieser Klon verworfen wurde.

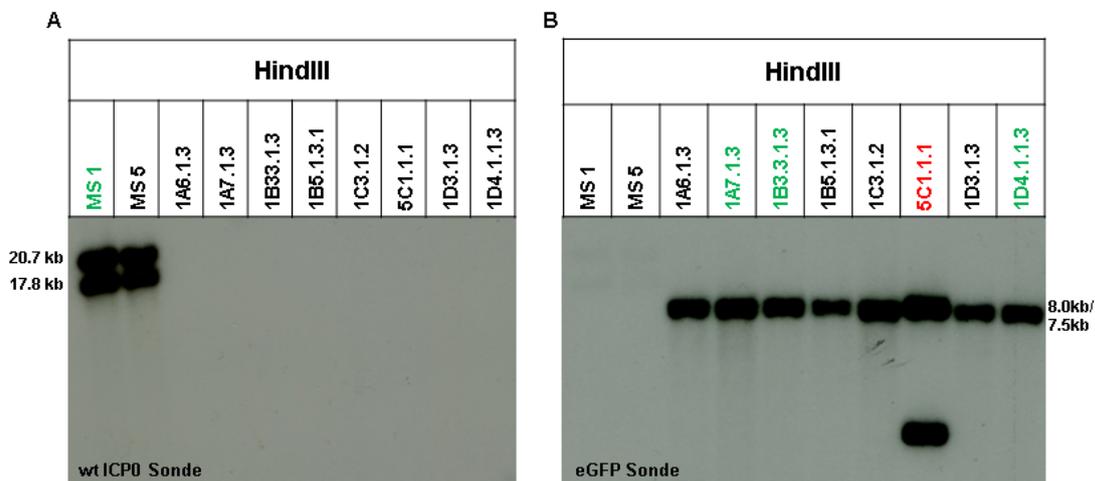


Abbildung 30. Überprüfung der Rekombination mittels Southern Blot. Virale DNA von HSV2 Wildtyp (MS 1 und MS 5) und den homolog rekombinierten Konstrukten wurde vorab mit der Restriktionsendonuklease *Hind* III behandelt und durch Gelelektrophorese chromatographiert (Abbildung 29). Die DNA wurde auf eine Nylonmembran transferiert und rekombinante DNA-Fragmente mit einer α 32 P-dCTP-markierten Sonde identifiziert. (A) Detektion von Wildtyp *ICP0* mit einer Sonde, die gegen die HSV2 Wildtyp *ICP0*-Sequenz gerichtet ist. Exposition des Films über Nacht. (B) Detektion des Kodon-optimierten *ICP0-GFP* mit einer radioaktiv markierten eGFP Sonde, wobei die Expositionszeit des Films 2 Stunden betrug.

Mit allen weiteren Konstrukten wurde eine Restriktionsanalyse mit dem Enzym NcoI durchgeführt, da die hier zu detektierenden Fragmente von 8.2 kb (*ICP0-GFP* Kopie in *TR_L*) und 4.8 kb (*ICP0-GFP* Kopie in *IR_L*) ausreichend zu separieren waren (violetter Stern, Abbildung 31 A). Klon 5C1.1.1 wurde durch den NxN2-Klon 1C1.1.3 ersetzt. Die Restriktionsanalyse zeigte bei allen Konstrukten, mit Ausnahme von 1C3.1.2 und höchstwahrscheinlich 1C1.1.3, das korrekte Bandenmuster (Abbildung 31). Eine anschließende Southern Blot Analyse mit derselben GFP-Sonde zeigte nach Schwärzung eines Röntgenfilms bei allen homolog rekombinierten Konstrukten zwei markierte Banden der erwarteten Größe (Abbildung 31 B). Bei den NcoI behandelten HSV2 Wildtyp-Konstrukten MS 1 und MS 5 wurden durch die GFP-Sonde keine DNA-Fragmente markiert. Mithilfe des Southern Blots konnte bewiesen werden, dass in allen untersuchten Konstrukten beide *ICP0*-Kopien vorhanden waren, und dass beide Wildtyp *ICP0*-Kopien durch die synthetische *ICP0-GFP* Sequenz ersetzt wurden. Aufgrund des Auftretens eines unerwarteten Restriktionsfragments wurde Konstrukt 1C3.1.2 verworfen (rot markierte Bande Abbildung 31 A). Von den potentiell korrekten Konstrukten wurde im Anschluss die *ICP0*-Region, welche die SIAH-Bindemotive enthielt, DNA-sequenziert (3.2.11). Die in Abbildung 31 B grün markierten Konstrukte besaßen die korrekte Sequenz und wurden für die darauffolgenden Analysen verwendet.

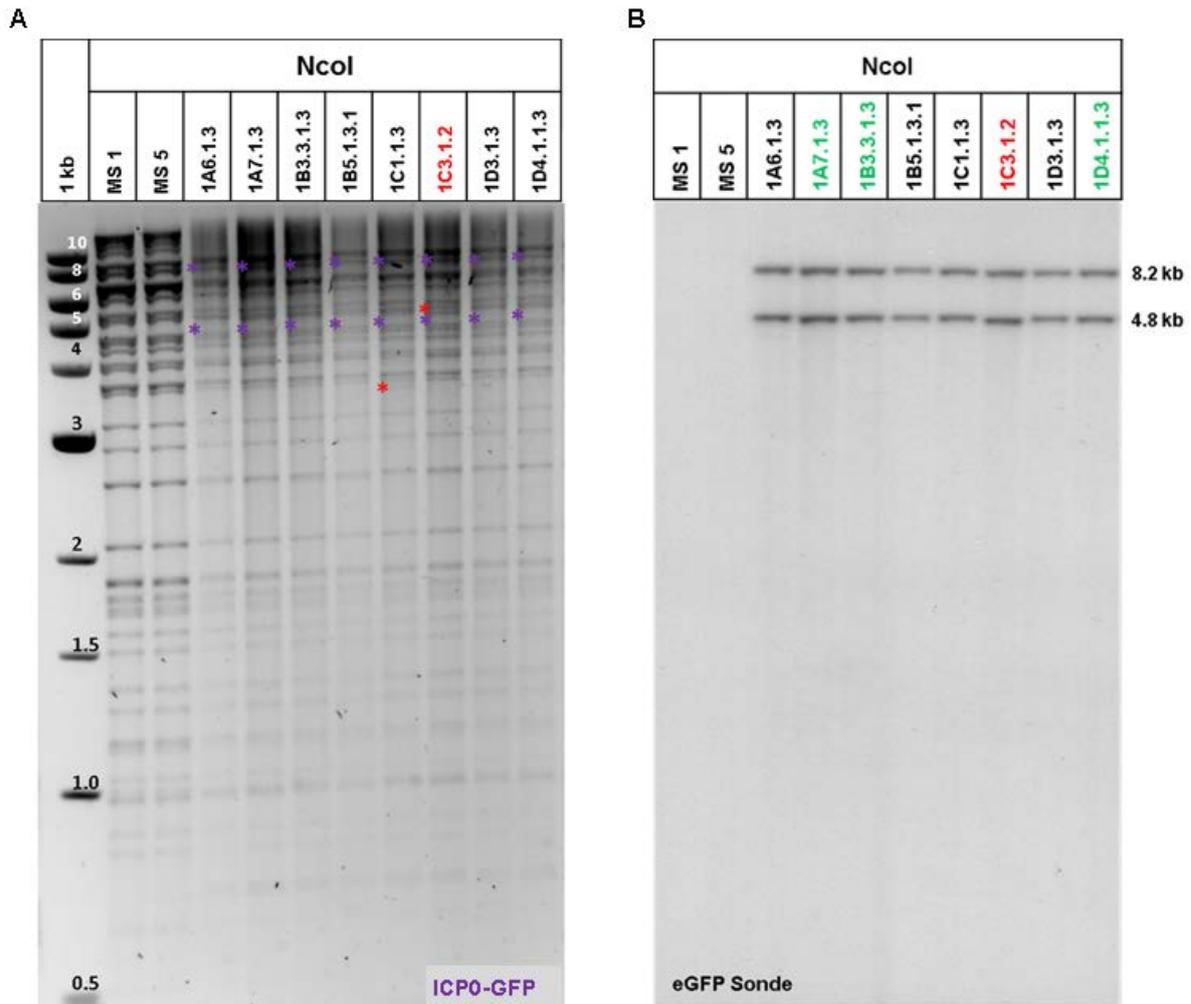


Abbildung 31. Überprüfung der rekombinierten HSV2 Konstrukte. (A) Virale DNA wurde mit dem Enzym NcoI behandelt, auf 0,7% Agarose in 0,5x TBE aufgetragen und für 17 Stunden bei 2.8 V/cm elektrophoretisiert. Violette Sterne markieren die GFP-Fragmente, rote Sterne markieren unerwartete Bandenmuster. (B) Detektion von ICP0-GFP mit einer radioaktiv-markierter eGFP Sonde. Zweistündige Exposition des Films. Radioaktivität α ^{32}P -dATP.

4.2 *In Vitro* Analyse der SIAH-Bindemotiv-defizienten HSV2 ICP0-Mutanten

Nach der Überprüfung der Integrität der zuvor generierten HSV2 ICP0-Mutanten wurde der Phänotyp der einzelnen Konstrukte in Zellkultur, sowie mittels molekularbiologischer und biochemischer Methoden charakterisiert. Hierfür wurden die SIAH-bindedefizienten ICP0-Mutanten jeweils direkt mit dem korrespondierenden HSV2 Wildtyp verglichen. Konkret wurden die durch *En Passant* Mutagenese hergestellten Konstrukte mit HSV2(MS)Lox verglichen, und die über homologe Rekombination hergestellten Mutanten wurden HSV2 (MS) ICP0-GFP gegenübergestellt. Anschließend wurden die Ergebnisse der *En Passant* Konstrukte mit denen der homolog in eukaryotischen Zellen rekombinierten Mutanten verglichen.

4.2.1 Überprüfung der ICP0:SIAH-1 Interaktion mittels GST-Pulldown

In einer früheren Arbeit konnten House und Kollegen zeigen, dass ein Aminosäureaustausch von Valin (V) und Prolin (P) zu Asparagin (N) in der PxAxVxP-SIAH-Bindedomäne ausreicht, um eine Interaktion von SIAH mit seinem Substrat zu inhibieren (House et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit galt es zu überprüfen, ob diese Punktmutationen in den beiden SIAH-Konsensusmotiven im viralen HSV2 ICP0 Protein ebenfalls zu einer Auflösung der ICP0:SIAH Interaktion führt. Hierfür wurde ein GST-Pulldown Assay (3.4.3) durchgeführt, bei dem GST-SIAH-1 gekoppelte Partikel (*beads*) entweder mit dem viral exprimierten Wildtyp ICP0 oder dem jeweiligen mutierten ICP0^{NxN} inkubiert wurden. Nach dem *Pulldown* wurde mit anti-ICP0 und anti-GFP Antikörpern überprüft, ob ICP0 der verschiedenen Konstrukte an GST-SIAH-1 gebunden hatte oder aufgrund der Punktmutation nicht mehr mit SIAH-1 interagiert. Es konnte gezeigt werden, dass in den SIAH-Pulldown Eluaten Wildtyp ICP0 beziehungsweise Wildtyp ICP0-GFP vorhanden war, da nach der Inkubation mit dem ICP0 Antikörper eine deutliche Proteinbande von 110 kDa (wt ICP0) und 140 kDa (ICP0-GFP) detektiert wurde (Abbildung 32 A-B). Auch der GFP Antikörper erkannte nach dem *Pulldown* beim ICP0-GFP Eluat eine Bande bei 140 kDa. In den SIAH-Pulldown Eluaten wurde durch den ICP0 Antikörper zudem das viral exprimierte ICP0^{NxN2} Protein detektiert. Bei der *En Passant* Mutante lag diese Bande bei 110 kDa und bei der homolog rekombinierten NxN2-GFP Mutante bei etwa 140 kDa. Bei beiden NxN2-Mutanten war die nachgewiesene ICP0-Bande jedoch schwächer als die jeweilige Wildtyp ICP0-Bande. Nach einer Deletion des ersten SIAH-Bindemotivs (NxN1), beziehungsweise beider Bindemotive (NxN1/2) konnte mit den verwendeten Antikörpern kein ICP0 beziehungsweise ICP0-GFP im *Pulldown* Eluat detektiert werden. Um zu überprüfen, ob das Fehlen von ICP0^{NxN1} und ICP0^{NxN1/2} in den Eluaten nicht auf einen Fehler bei der Aufbereitung der Proben zurückzuführen war, wurde der *Pulldown* mit einem GST Antikörper als Ladekontrolle behandelt. Die Ergebnisse zeigten, dass GST-SIAH-1 in allen auf das Gel geladenen Proben vorhanden war und eine fehlerhafte Aufbereitung ausgeschlossen werden konnte. Um die ICP0-Expression in allen generierten Konstrukten zu überprüfen, wurden 10% der infizierten Zellysate, die für den *Pulldown* verwendet wurden (*Input*), vorab mittels Western Blot untersucht. Bei allen Zellysaten war eine ICP0-Bande nachweisbar, auch bei der NxN1- und NxN1/2 -Mutante (Abbildung 32 C-D). Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass ICP0^{NxN1} und ICP0^{NxN1/2} nicht mehr in der Lage waren, mit SIAH-1 zu interagieren. ICP0 und ICP0^{NxN2} interagierten hingegen mit SIAH-1, auch wenn die Interaktion von SIAH-1 und ICP0^{NxN2} von schwächerer Natur zu sein schien. Die Ergebnisse der ICP0-SIAH

Ergebnisse

Interaktionsanalyse waren für die BAC-Konstrukte und die über homologe Rekombination hergestellten Mutanten identisch. Zugleich konnte bei diesem Experiment bestätigt werden, dass die Konstrukte, die über homologe Rekombination generiert wurden, ausschließlich das ICP0-GFP Fusionsprotein exprimierten, da die ICP0-Mutanten einen dem GFP-tag entsprechenden Massenzuwachs (etwa 26,9 kDa) aufwiesen.

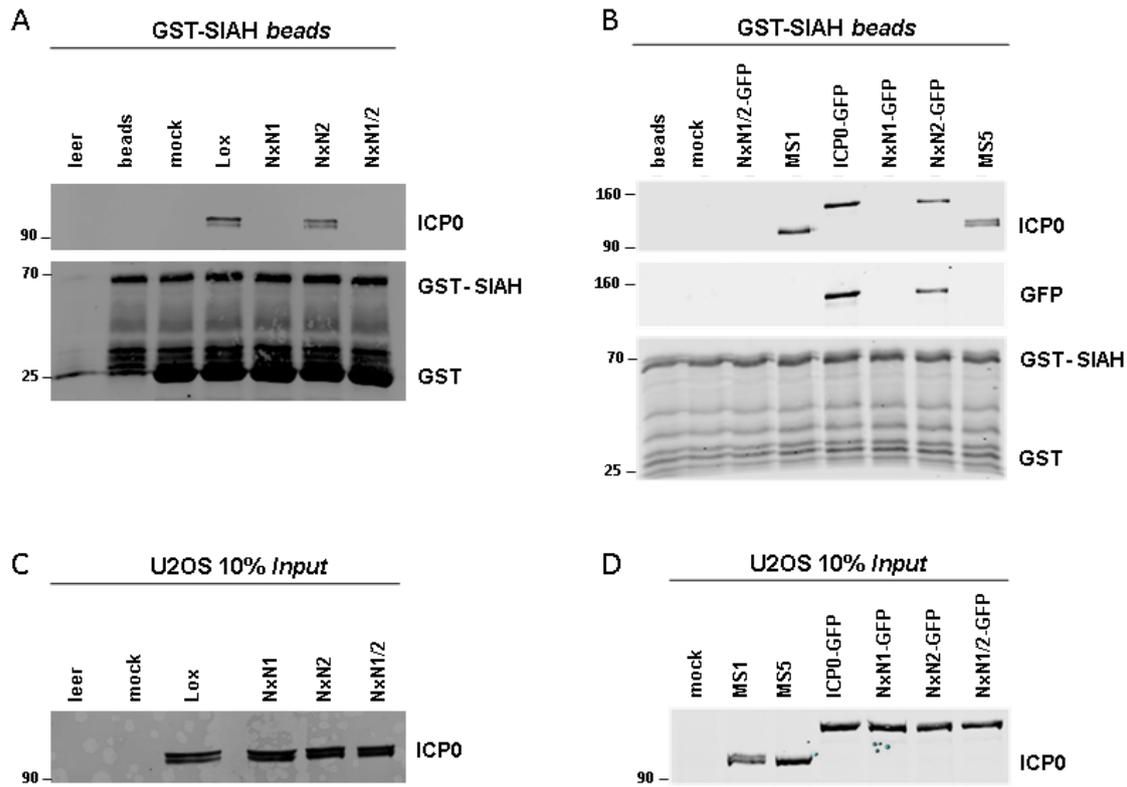


Abbildung 32. GST-Pulldown von viral exprimiertem ICP0. U2OS Zellen wurden mit einer MOI von 0,01 *pfu*/Zelle infiziert und nach 24 Stunden geerntet und lysiert. Die Zellysate (*Input*) wurden im Anschluss mit SIAH-1-gekoppelten Glutathion Sepharose *beads* inkubiert. Über einen GST-Pulldown wurde überprüft, ob Wildtyp ICP0 (von HSV2 Lox, HSV2 MS Klon 1 beziehungsweise MS Klon 5 und HSV2 ICP0-GFP) und ICP0 der NxN-Mutanten mit SIAH-1 interagierten. Als Kontrolle wurden Zellysate, die mit ungekoppelten *beads* (ohne GST-SIAH-1) inkubiert wurden (*beads*), sowie uninfizierte Zellen (*mock*) herangezogen. Die jeweiligen Proteine wurden anschließend mittels Antikörperfärbung detektiert. **(A)** U2OS Zellen wurden mit den über *En Passant* Mutagenese hergestellten Konstrukten infiziert. **(B)** U2OS Zellen wurden mit den Konstrukten aus homologer Rekombination in eukaryotischen Zellen infiziert. **(C und D)** 10% der infizierten Zellysate (*Input*) wurden über SDS-PAGE separiert, auf eine Membran transferiert und das Vorhandensein von ICP0 mittels Antikörperfärbung überprüft. **(C)** Zellen wurden mit den *En Passant* Konstrukten infiziert. **(D)** Zellen wurden mit den homolog rekombinierten Konstrukten inkubiert.

Da die Interaktion zwischen SIAH-1 und ICP0^{NxN2} nicht vollständig inhibiert wurde, wurde in den folgenden Experimenten nur noch mit der SIAH-bindungsdefizienten Doppelmutante (NxN1/2-Mutante), sowie vereinzelt mit der NxN1-Mutante gearbeitet. Bei der

Doppelmutante versprach man sich im Falle eines veränderten Infektionsverlaufs den prägnanteren Phänotyp im Vergleich zu einem Virus, welches noch schwach mit SIAH-1 interagiert. Zudem konnte man ausschließlich bei dieser Mutante die Auswirkung einer vollständig fehlenden ICP0:SIAH Interaktion untersuchen.

4.2.2 Plaquewahrscheinlichkeit der HSV2-Mutanten auf verschiedenen Zelllinien

Zur Untersuchung des Phänotyps der ICP0-Mutanten *in vitro* wurde Virus der Passage 3 (P3) (Virus aus dem Medium *pellet*, 3.3.6) verwendet. Nach der Produktion der Virus-Stocks in BHK-21 Zellen wurden die Virustiter mittels *Plaque Assay* (3.3.7) auf verschiedenen Zelllinien bestimmt. Mithilfe dieses Experiments sollte geklärt werden, ob eine nicht stattfindende ICP0:SIAH Interaktion einen Einfluss auf die Fähigkeit von HSV2 hatte, Plaques auf unterschiedlichen Zelltypen auszubilden. Hierfür wurden Verozellen herangezogen, die Epithelzellmorphologie aufweisen und als Standardzelllinie für Herpes-Simplex-Virus Assays routinemäßig Verwendung finden (Halford & Schaffer, 2000; Halford et al., 2010; Stow & Stow, 1986). Zudem wurden HepaRG-Zellen ausgewählt, eine immortalisierte bipotente Stammzelllinie, die Eigenschaften von Hepatozyten aufweist (Marion et al., 2010). Als dritte Zelllinie wurden humane U2OS Zellen verwendet. U2OS Zellen sind in der Lage die Funktion des viralen Proteins ICP0 zu komplementieren (Everett et al., 2008, 2009; Namvar et al., 2005), sodass ICP0-defiziente beziehungsweise RINGfinger-defiziente ICP0-Mutanten problemlos Plaques auf ihnen ausbilden und hohe Titer erreichen können. Auf anderen Zelllinien wie Verozellen ist ihre Plaquewahrscheinlichkeit hingegen deutlich verringert (Sacks & Schaffer, 1987). Die Durchführung der *Plaque Assays* erfolgte in der vorliegenden Arbeit in Triplikaten. Das Auswerten der Plaqueanzahl auf den drei Zelllinien erfolgte 48 Stunden nach Infektion.

Es zeigte sich, dass die NxN1/2-Mutanten, genauso wie ihr korrespondierender HSV2 Wildtyp, auf Vero-, HepaRG- und U2OS Zellen die gleiche Anzahl an Plaques ausbildete. Das bedeutet, die NxN1/2-Mutanten erzielten 48 Stunden nach Infektion (*p.i.*) auf den einzelnen Zelllinien jeweils ähnliche bis gleiche Virustiter, wobei die Titer auf HepaRG-Zellen etwas geringer ausfielen als auf den anderen Zellen (Tabelle 34). Die Unterschiede in den erzielten Titern auf Vero- und U2OS Zellen, im Vergleich zu den Titern auf HepaRG-Zellen, waren jedoch nicht signifikant. Auch bei den korrespondierenden HSV2 Wildtypviren (HSV2 *Lox* und HSV2 ICP0-GFP) und der NxN1-Mutante waren die erzielten Titer auf HepaRG-Zellen etwas niedriger als auf den beiden anderen Zelllinien. Die NxN1-Mutante erzielte auf allen Zelllinien etwas niedrigere Titer als ihre korrespondierende NxN1/2-

Ergebnisse

Mutante, die Titerunterschiede waren jedoch nicht signifikant. Und auch die NxN1- Mutante bildete auf allen drei untersuchten Zelllinien Plaques mit derselben Wahrscheinlichkeit. Neben den rekombinierten Wildtyp-Konstrukten HSV2 Lox und HSV2 ICP0-GFP wurde die Plaqueswahrscheinlichkeit des Ursprungsvirus HSV2 MS wt auf U2OS Zellen und Verozellen überprüft. Es zeigte sich, dass das Ursprungsvirus, genauso wie die anderen untersuchten Konstrukte, auf beiden Zelltypen die gleiche Anzahl an Plaques bildete.

Des Weiteren wurde zum Vergleich eine Mutante herangezogen, bei der die RING-finger Domäne in ICP0 fehlte (Δ RING), da die AS 19-104 durch den GFP-Leserahmen (*ORF*) ersetzt und die AS-Sequenz 105-162 deletiert worden waren (Halford et al., 2010). Die Δ RING-Mutante, auch bezeichnet als HSV2 ICP0 Δ 19–162-GFP, wurde auf Vero- und U2OS Zellen parallel titriert. Es zeigte sich, dass die Mutante nach 48 Stunden *p.i.* deutlich weniger Plaques auf Verozellen ausgebildet hatte als auf U2OS Zellen, sodass die Titer auf Verozellen um zwei log-Stufen niedriger ausfielen (Tabelle 34). Hiermit konnte eine verringerte Plaqueswahrscheinlichkeit der Δ RING-Mutante auf Verozellen nachgewiesen und diese direkt mit der Plaqueswahrscheinlichkeit der generierten SIAH-bindedefizienten Mutante auf Vero- und U2OS Zellen verglichen werden.

Tabelle 34. Plaqueswahrscheinlichkeit auf U2OS-, Vero-, und HepaRG -Zellen. Von Passage 3 Virus-Stocks (P3) wurden 1:10 Verdünnungen hergestellt und die jeweiligen Zelllinien in Triplikaten mit dem gegebenen Virusinokulum inkubiert. 48 Stunden nach Infektion wurden die Zellen fixiert. Die gebildeten Virusplaques auf dem Zellrasen wurden ausgezählt und darüber die Virustiter bestimmt (3.3.7). In der Tabelle angegeben sind die Titer-Mittelwerte der jeweiligen experimentellen Triplikate.

Virus P3	Titer (pfu/ml)		
	U2OS	Vero	HepaRG
HSV2 MS1 wt	$2,8 \times 10^7$	$3,5 \times 10^7$	-
HSV2 ICP0-GFP	$1,85 \times 10^8$	$1,9 \times 10^8$	$4,9 \times 10^7$
HSV2 ICP0 ^{NxN1/2} -GFP	$1,53 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$	$6,0 \times 10^7$
HSV2 ICP0 ^{NxN1} -GFP	$7,5 \times 10^7$	$6,4 \times 10^7$	$1,9 \times 10^7$
HSV2 ICP0 Δ 19-162-GFP	$1,5 \times 10^7$	$3,0 \times 10^5$	-
HSV2 (MS)Lox	$3,17 \times 10^7$	-	$2,6 \times 10^7$
HSV2 ICP0 ^{NxN1/2} (2.1)	$1,9 \times 10^7$	-	$1,21 \times 10^7$
HSV2 ICP0 ^{NxN1} (52.1) P2 * ¹	$1,1 \times 10^7$	-	$9,2 \times 10^6$

*¹ Titer entnommen aus (Czechowicz, 2013)

Eine Beeinträchtigung der Plaqueswahrscheinlichkeit der SIAH-bindedefizienten Mutanten konnte nicht festgestellt werden, jedoch zeigte sich bei den über *En Passant* Mutagenese hergestellten Konstrukten, dass die Durchmesser der Plaqueshöfe von HSV2 Lox deutlich größer waren als die der entsprechenden NxN-Mutanten. U2OS Zellen wurden daraufhin mit verschiedenen Verdünnungen der jeweiligen Konstrukte infiziert und nach 48 Stunden fixiert.

Anschließend wurden in den Zellkulturschalen die Vertiefungen (*wells*) ausgewählt, in denen die gebildeten Virusplaques getrennt voneinander identifiziert werden konnten. Die Größe der Plaques aller Konstrukte wurde mit Hilfe von Adobe Photoshop CS3 vermessen und die Plaques von HSV2 Lox mit den Plaques der *En Passant* NxN-Mutanten verglichen. Es zeigte sich, dass die Plaques von HSV2 Lox im Durchschnitt doppelt so groß waren wie die aller drei NxN-Konstrukte (Abbildung 33). Ähnliche Unterschiede in der Plaquesgröße wurden zwischen HSV2 Lox und der NxN1-Mutante auf HepaRG beobachtet (Czechowicz, 2013).

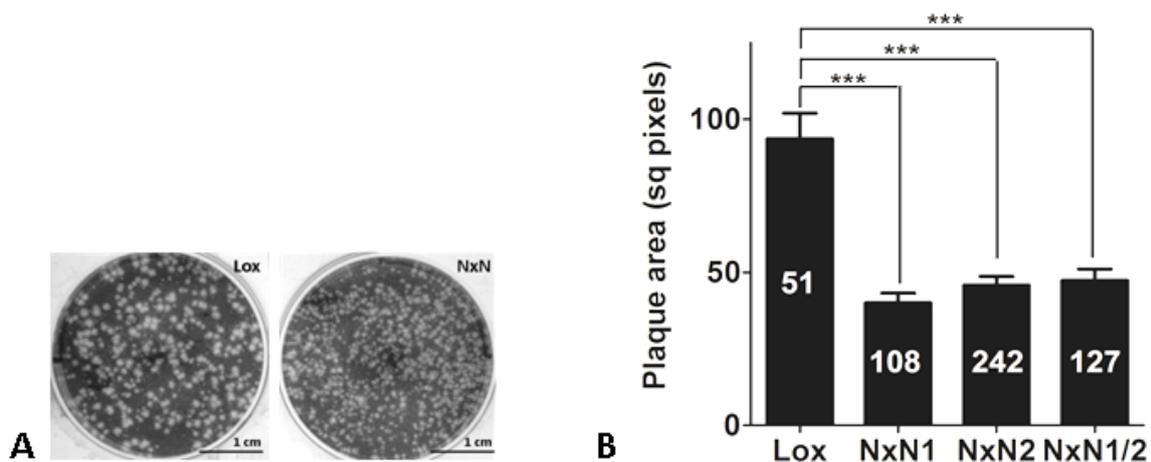


Abbildung 33. Bestimmung der viralen Plaquesgröße. (A) U2OS Zellen wurden mit HSV2(MS)Lox (Lox) und HSV2(MS)ICP0^{NxN1/2}[2.1] (NxN) infiziert und die Zellen nach 48 Stunden fixiert und mit 0,1% Kristallviolett gefärbt. Die durch die infektiösen Viruspartikel gebildeten Plaques erschienen hierbei weiß auf dunklem Hintergrund (Zellrasen). Aufnahme mit dem Geldokumentationssystem Gelstudio Sa (B) Die Größe der Plaques wurde mit Adobe Photoshop CS3 bestimmt (Angabe in *square (sq) pixels*) und in ein Balkendiagramm überführt. Jeder Balken entspricht hierbei dem Mittelwert +/- SD der gemessenen Plaques. Die Anzahl der ausgewerteten Plaques ist in den Balken genannt. Signifikante Unterschiede in den Plaquesgrößen der NxN-Mutanten im Vergleich zu Lox wurden mit Hilfe des Mann-Whitney U Tests ermittelt. *** entspricht $p < 0,001$.

Bei den über homologe Rekombination hergestellten Konstrukten konnten keine eindeutigen Unterschiede in der Plaquesgröße zwischen HSV2 ICP0-GFP Wildtyp und den NxN-GFP Mutanten beobachtet werden. Dabei bildeten die GFP-exprimierenden Viren auf Verozellen geringfügig kleinere Plaques als das Ursprungsvirus HSV2 MS Wildtyp. Aufgrund der allgemein sehr kleinen Plaques des Plaques-gereinigten HSV2 MS (Klon 1 und Klon 5), wie auch der homolog rekombinierten GFP-Konstrukte im Vergleich zu den BAC-Konstrukten war die Analyse der Plaquesdurchmesser schwierig und uneindeutig und wurde daher nicht weiterverfolgt.

4.2.3 Wachstumskinetik der SIAH-bindedefizienten ICP0-Mutanten

Obwohl die Fähigkeit der NxN1/2-Mutante auf Verozellen, U2OS-, und HepaRG-Zellen mit der selben Wahrscheinlichkeit Plaques auszubilden nicht beeinträchtigt war, fiel während der Produktion der *Virus-Stocks* ein verzögertes Wachstum der SIAH-bindedefizienten Doppelmutante im Vergleich zum Wildtyp in den ersten Stunden nach Infektion auf. Diese Beobachtung wurde sowohl bei den BAC-Mutanten, als auch bei den homolog in eukaryotischen Zellen rekombinierten Konstrukten gemacht. Um eine Wachstumshemmung nachzuweisen, wurden entsprechende Kinetiken auf unterschiedlichen Zelllinien bei hoher und niedriger MOI durchgeführt (3.3.9). Zunächst wurden die Konstrukte untersucht, die über homologe Rekombination hergestellt wurden. Im ersten Versuchsaufbau wurden U2OS Zellen und Verozellen mit einer MOI von 1 *pfu*/Zelle infiziert. In regelmäßigen Abständen wurde 1.) der Überstand der infizierten Zellen alleine oder 2.) der Überstand zusammen mit den infizierten Zellen geerntet, wobei die infizierten Zellen durch schockfrieren aufgeschlossen wurden. Die Virustiter der Zellen beziehungsweise des Überstands wurden mittels Standard *Plaque Assay* (3.3.7) in Duplikaten oder Triplikaten auf Verozellen bestimmt. In einem zweiten Experiment wurden Verozellen mit einer niedrigen MOI von 0.01 *pfu*/Zelle infiziert und die Virustiter der infizierten Zellen anschließend in Duplikaten oder Triplikaten bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die Titer des HSV2 ICP0-GFP Wildtyps und der NxN1/2-GFP Mutante unabhängig von der Zelllinie und der initialen MOI in den ersten 10 Stunden *p.i.* vergleichbar waren. Danach stiegen die Titer des Wildtyp-Konstrukts stärker an als die Titer der SIAH-bindedefizienten NxN1/2-GFP-Mutante, und waren in beiden Zelllinien, Vero und U2OS, nach 35 Stunden *p.i.* signifikant und um bis zu einer halben log-Stufe höher (Abbildung 34). Bei einem Vergleich aller Experimente (Abbildung 34) wurden jedoch auch einige Unterschiede zwischen den Titern, welche aus dem infektiösen Überstand und den infizierten Zellen gewonnen wurden, deutlich. Die erzielten Virustiter der Partikel aus dem Überstand waren allgemein um bis zu einer log-Stufe niedriger als die Titer der Viren aus den entsprechenden Wirtszellen. Bei einem Vergleich der Wachstumskinetiken von HSV2 ICP0-GFP und der NxN1/2-Mutante zeigte sich zudem, dass sich im Überstand von U2OS Zellen und Verozellen die durchschnittlichen Titer beider Konstrukte nach 40 Stunden wieder angleichen und im anschließenden Messzeitraum, das heißt zwischen 48 und 60 Stunden *p.i.*, fast identisch waren (Abbildung 34 A, B). Bei den aus infizierten Zellen gewonnenen Viruspartikeln blieb die Titerdifferenz zwischen der NxN1/2-Mutante und HSV2 Wildtyp nach 40 Stunden bestehen, wobei die NxN1/2-GFP Mutante bis zum Ende der Messreihe signifikant niedrigere Titer als HSV2 ICP0-GFP zeigte (Abbildung

34 C, D). Es konnte zudem beobachtet werden, dass in infizierten Verozellen bei einer MOI von 1 pfu/Zelle die Titer von HSV2 Wildtyp bereits nach 15 Stunden *p.i.* signifikant höher waren als die Titer der SIAH-Bindemutante. Signifikante Differenzen konnten im Verozellüberstand bei einer MOI von 1 pfu/Zelle zu diesem Zeitpunkt noch nicht festgestellt werden (Vergleich Abbildung 34 A mit C).

Bei einem Vergleich der Wachstumskinetiken bei unterschiedlicher initialer MOI auf Verozellen (Abbildung 34 C, D) konnte beobachtet werden, dass bei hoher MOI von 1 pfu/Zelle die Titer des ICP0-GFP Konstruktes früher (nach 15 Stunden) signifikant höher waren als die Titer der NxN1/2-GFP Mutante. Bei niedriger MOI von 0,01 pfu/Zelle waren die Titer der beiden Konstrukte erst nach 30 Stunden *p.i.* signifikant unterschiedlich. Der Vergleich zeigte, dass es bei einer Infektion mit niedriger MOI länger dauerte bis die gleichen Titer wie bei einer hohen MOI erreicht waren. Berechnete man aus den gemessenen Titern die korrespondierende MOI (die zum gegebenen Zeitpunkt vorlag) (3.3.9) zeigte sich, dass im Falle einer Wildtyp HSV2 Infektion bei einer Initial-Infektion von 1 pfu/Zelle nach 24 Stunden bereits 5 pfu/Zelle vorhanden waren, bei einer Initial-Infektion von 0,01 pfu/Zelle nur etwa 3 pfu/Zelle (Abbildung 35). Das Wachstumsverhalten der beiden Virus-Konstrukte war auf Verozellen bei niedriger und hoher MOI jedoch gleich. Bei der Durchführung der Wachstumskinetiken bei unterschiedlicher MOI wurde neben HSV2 Wildtyp und der SIAH-bindedefizienten Mutante auch die Δ RING-Mutante HSV2 ICP0 Δ 19-162-GFP mit herangezogen (Abbildung 34 C, D). Wie bereits in 4.2.2 gezeigt, sind ICP0 Δ RING-Mutanten bei einer Infektion von Verozellen in ihrem Wachstum deutlich attenuiert. In diesem Experiment sollte die Wachstumskinetik der Δ RING-Mutante direkt mit der SIAH-bindedefizienten ICP0-Mutante verglichen werden. Es zeigte sich, dass die Δ RING-Mutante bei einer MOI von 1 pfu/Zelle nach 15 Stunden und bei einer MOI von 0,01 pfu/Zelle 30 Stunden nach Infektion signifikant um 1,5 bis 2 log-Stufen niedrigere Titer erzielte als HSV2 ICP0-GFP Wildtyp. Die signifikanten Titerunterschiede der beiden Konstrukte blieben bis zum Ende des Messzeitraums bestehen. Die Δ RING-Mutante erzielte auch deutlich niedrigere Titer auf Verozellen als die SIAH-bindedefiziente ICP0-Mutante, auch wenn die Unterschiede geringer waren als im Vergleich mit HSV2 Wildtyp. Hier waren bei hoher initialer MOI die Titer der Δ RING-Mutante ab 25 Stunden *p.i.* signifikant niedriger (um eine bis 1,5 log-Stufen) und bei einer MOI von 0,01 pfu/Zelle, ab 30 Stunden *p.i.*.

Ergebnisse

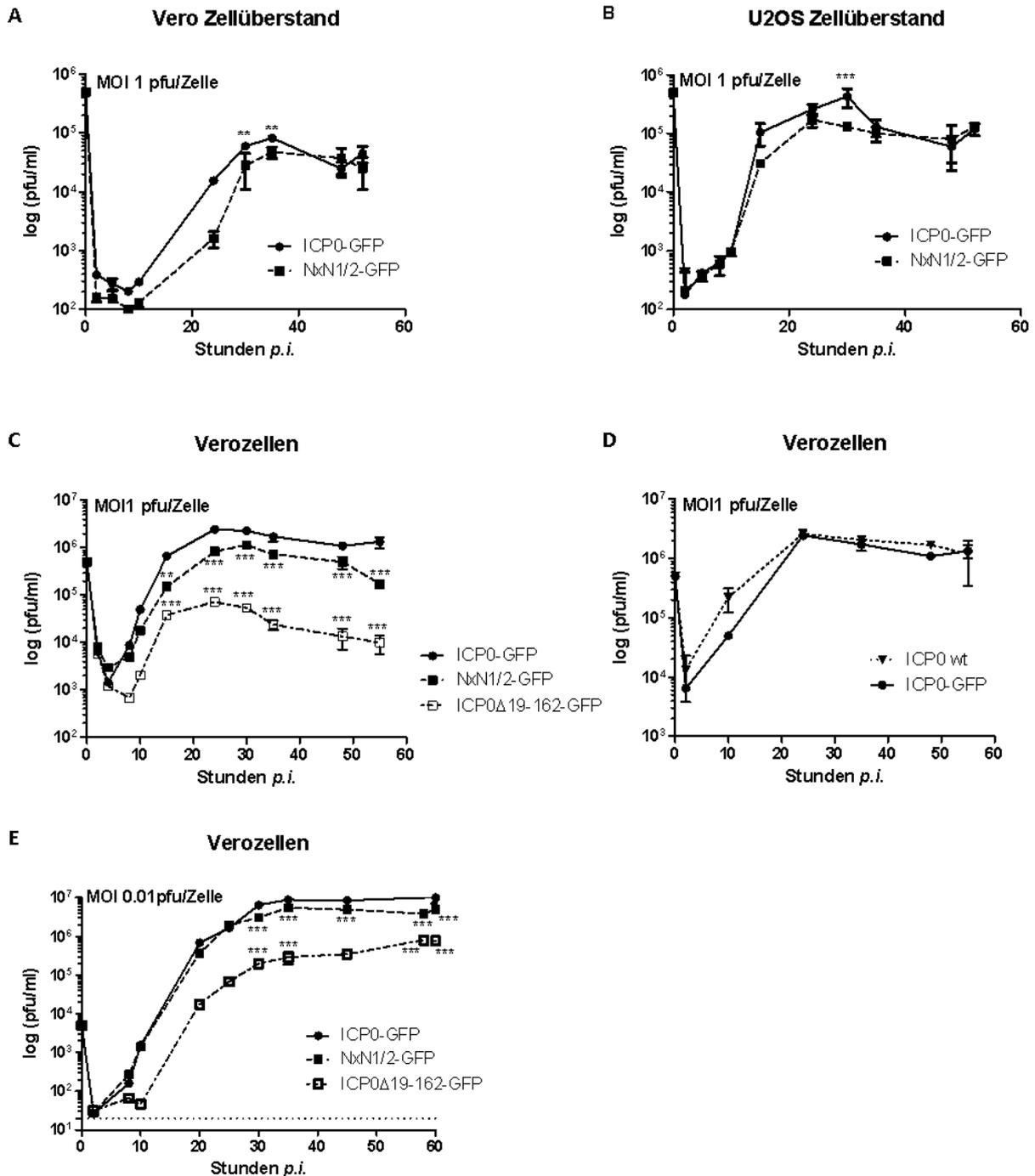


Abbildung 34. In Vitro Wachstumsverhalten der homolog rekombinierten ICP0-Mutanten. Vero- und U2OS Zellen wurden in Duplikaten oder Triplikaten mit den Konstrukten HSV2 ICP0-GFP und HSV2 ICP0^{NΔN1/2}-GFP mit einer MOI von 1 pfu/Zelle (A bis C) oder einer MOI von 0,01 pfu/Zelle (E) infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden ausschließlich die Zellüberstände (A und B) oder die infizierten Zellen zusammen mit dem Überstand (C und D, E) geerntet und das Virus auf Verozellen titriert. In (C) und (E) wurde zusätzlich die RING-defiziente ICP0-Mutante HSV2 ICP0Δ19-162-GFP (ICP0Δ19-162-GFP) titriert. (C) und (D) wurden simultan durchgeführt und zur besseren Übersicht, und aufgrund der größeren Messzeiträume bei HSV2 MS wt (ICP0 wt) auf zwei Graphen dargestellt. Jedes Signal entspricht dem Mittelwert ± SD des Virustiters zum gegebenen Zeitpunkt. Statistische Analysen wurden mit Hilfe des 2-way ANOVA und Bonferroni *post-test* durchgeführt. Signifikanzen zwischen Wildtyp und den ICP0-Mutanten wurden mit ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$ dargestellt. Die Werte wurden logarithmisch (\log_{10}) in einer Wachstumskurve als Funktion der Zeit aufgetragen. Die gestrichelte Linie in (E) markiert die Nachweisgrenze.

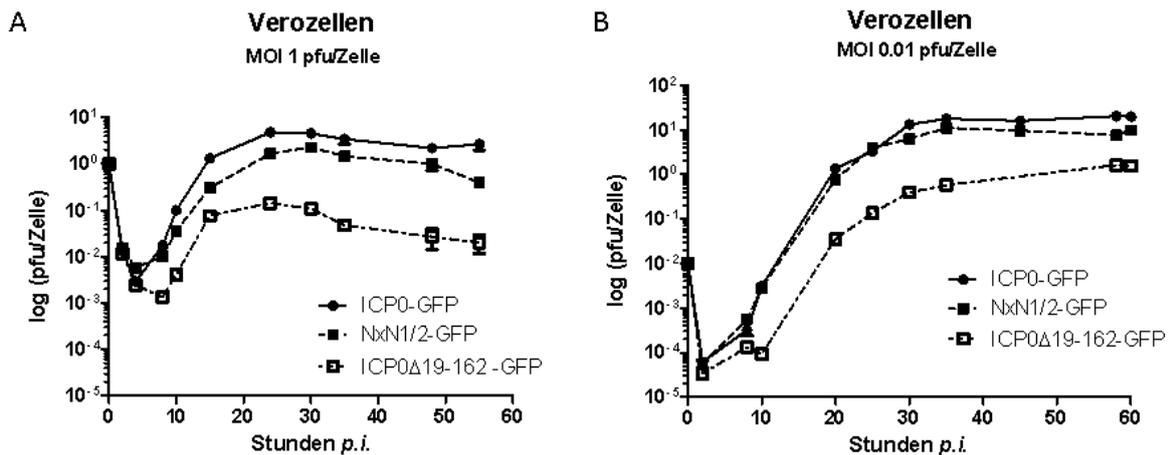


Abbildung 35. Berechnete Anzahl der pfu/Zelle (MOI) . Verozellen wurden in Duplikaten mit den oben genannten Konstrukten mit einer MOI von 1 pfu/Zelle (A) oder 0,01 pfu/Zelle (B) infiziert, die Zellen in regelmäßigen Abständen geerntet und wiederum auf Verozellen titriert. Über die gemessenen Virustiter (siehe Abbildung 23 C und D) wurden die MOI berechnet, die zum jeweiligen Zeitpunkt vorlagen. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert \pm SD der MOI angegeben in *pfu/Zelle*. Die Werte wurden logarithmisch in einer Kurve als Funktion der Zeit aufgetragen.

Des Weiteren wurde das Wachstumsverhalten der BAC-Konstrukte untersucht. Hierfür wurden U2OS Zellen mit einer sehr niedrigen MOI von 0,001 pfu/Zelle infiziert, die Zellen in regelmäßigen Abständen geerntet und daraus isoliertes Virus wiederum auf U2OS-Zellen titriert. In einem Messzeitraum von 80 Stunden *p.i.* zeigte sich, dass die SIAH-bindedefiziente BAC-Mutante ab 20 Stunden *p.i.* geringere Titer erreichte als HSV2 Lox Wildtyp (Abbildung 36A). Ab 60 Stunden *p.i.* waren die Titer der NxN1/2-Mutante signifikant um bis zu einer log-Stufen niedriger als die Titer von HSV2 Lox. Die Signifikanz blieb bis zum Endpunkt der Analyse nach 80 Stunden *p.i.* bestehen.

Neben der Analyse der ICP0-Mutanten, die durch *En Passant* Mutagenese generiert wurden, wurden auch das Ausgangskonstrukt HSV2(MS)Lox mit dem Wildtyp-Ursprungsvirus HSV2 MS wt (in Abbildung 33 und 35 als ICP0 wt bezeichnet) mit Hilfe einer Wachstumskurve auf U2OS Zellen verglichen. Dieses Experiment sollte zeigen, ob die Konstrukte bereits vor der Mutagenese Wachstumsunterschiede aufwiesen. Es zeigte sich, dass HSV2 Lox und HSV2 MS wt über einen Zeitraum von 80 Stunden vergleichbare Titer erreichten (Abbildung 36 B). Des Weiteren wurde ein Experiment durchgeführt, indem HSV2 MS wt und HSV2 ICP0-GFP Wildtyp über einen Zeitraum von 60 Stunden mit einer initialen MOI von 1 pfu/Zelle auf Verozellen verglichen wurden. Es sollte hierbei untersucht werden, ob der GFP-tag *in vitro* Einfluss auf die Wachstumseigenschaften des Virus nahm. Auch HSV2 MS wt und HSV2 ICP0-GFP zeigten zu keinem Zeitpunkt der Messreihe signifikant unterschiedliche Titer (Abbildung 34 E). Es konnte somit nachgewiesen werden, dass alle Wildtyp-Konstrukte,

Ergebnisse

sowohl auf Verozellen und U2OS Zellen, durch vergleichbare Wachstumseigenschaften aufwiesen.

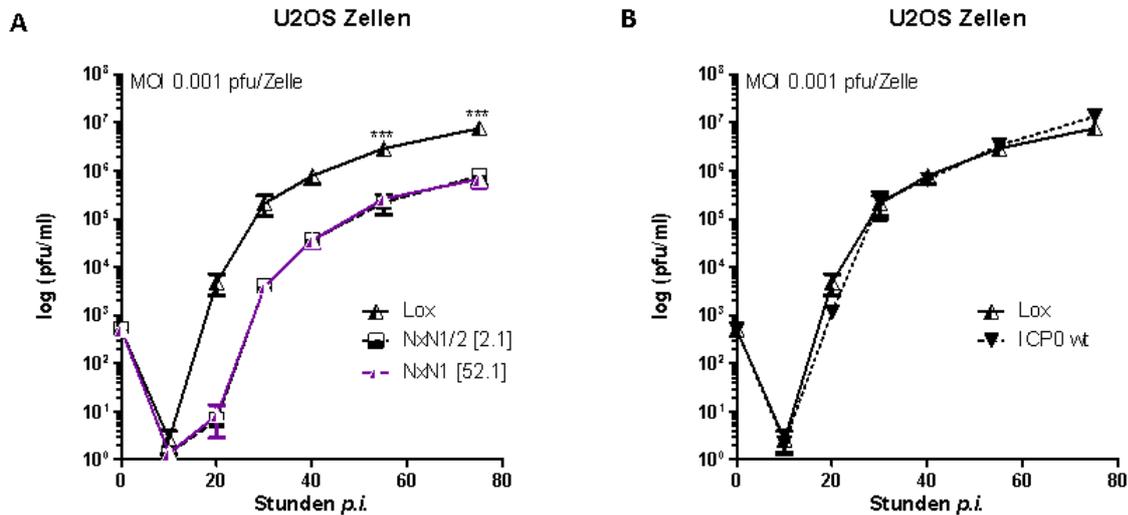


Abbildung 36. Wachstumsverhalten der BAC-Mutanten. U2OS Zellen wurden in Triplikaten mit (A) den BAC-Konstrukten HSV2(MS)Lox (Lox), HSV2 ICP0^{NxN1}[52.1] und HSV2 ICP0^{NxN1/2}[2.1] und (B) mit den Wildtypkonstrukten HSV2(MS)Lox und HSV2 MS wt (ICP0 wt) mit einer MOI von 0,001 pfu/Zelle infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die infizierten Zellen mit dem Überstand geerntet und das Virus auf U2OS Zellen titriert. Jeder Messpunkt entspricht dem Mittelwert \pm SD des Virustiters in pfu/ml. Statistische Analysen wurden mit Hilfe des *two-way* ANOVA und Bonferroni *post-test* durchgeführt. Signifikanzen zwischen Lox und den ICP0-Mutanten wurden mit *** $p < 0.001$ dargestellt. Die Werte wurden logarithmisch in einer Wachstumskurve als Funktion der Zeit aufgetragen.

4.2.4 Replikationsverhalten der ICP0-Mutanten

Um zu überprüfen, ob die SIAH-bindedefizienten ICP0-Mutante beider Mutageneseverfahren in ihrer Replikation beeinträchtigt waren, wurden U2OS- und HepaRG-Zellen mit den jeweiligen HSV2 Konstrukten mit einer MOI von 1 oder 2 pfu/Zelle in Duplikaten infiziert und in einem Zeitraum von 12 Stunden in regelmäßigen Abständen geerntet, um die virale und zelluläre genomische DNA zu isolieren. Mittels Taqman PCR (3.2.7) wurde die Anzahl der viralen DNA-Kopien zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Die verwendeten *Primer* und die Sonde waren gegen Sequenzen des viralen Gens *U_L27* gerichtet, welches das Glykoprotein gB kodiert (Tabelle 3). Die Werte wurden auf die Gensequenz für humanes β -Globin (HBG) normalisiert. Erste virale DNA-Kopien konnten bei beiden Konstrukten bereits zwei Stunden nach Infektion detektiert werden. Die SIAH-bindedefizienten Mutanten (NxN1/2-GFP und NxN1/2 [2.1]) und die Wildtypkonstrukte HSV2 Lox und HSV2 ICP0-GFP wiesen in den ersten vier Stunden nach Infektion zunächst eine vergleichbare Anzahl an

Virus DNA-Kopien pro infizierter Zelle auf. Nach 4-6 Stunden stieg die Anzahl der viralen Wildtyp DNA Kopien auf beiden Zelllinien im Vergleich zu den NxN1/2-Mutanten jedoch leicht an. Nach 8 Stunden *p.i.* wurde der Unterschied zwischen den SIAH-bindedefizienten Mutanten und dem korrespondierenden Wildtyp immer deutlicher und erreichte die größte Differenz 12 Stunden nach der Infektion, da die Anzahl der Wildtyp gB-Kopien in dem gemessenen Zeitraum stetig anstieg, sich bei der NxN1/2-Mutante in den ersten 8 Stunden *p.i.* jedoch kaum veränderte. Nach 12 Stunden lag in den infizierten Zellen etwa 5x bis 6x mehr virale Wildtyp-DNA vor als bei den NxN1/2-Mutanten. Die deutlichen Unterschiede zwischen Wildtyp und SIAH-bindedefizienter ICP0-Mutante waren bei den BAC-Konstrukten, sowie bei den homolog rekombinierten Konstrukten zusehen. Dies deutete auf eine attenuierte Replikation der SIAH-bindedefizienten ICP0-Mutanten hin. Bei einem Vergleich von HSV2 Lox mit der über *En Passant* Mutagenese hergestellten NxN1-Mutante Klon [52.1] zeigte sich, dass die Differenz nach der Deletion von lediglich der ersten Bindedomäne (VxP1 Motiv) nicht ganz so deutlich war, wie bei einer Mutation beider Konsensus-Bindemotive. Hier war die Anzahl der Lox gB-Kopien nach 12 Stunden *p.i.* etwa 3x so hoch wie die gB-Kopienzahl bei Zellen, die mit der NxN1-Mutante infiziert wurden. Bei einer Messung der viralen DNA-Expression von Lox und NxN1/2 [2.1] über einen Zeitraum von 24 Stunden zeigte sich, dass sich die Differenz in zwischen HSV2 Wildtyp und der NxN1/2-Mutante im späteren Verlauf der Infektion wieder verringerte, da die DNA-Kopienzahl von HSV2 NxN1/2 im Zeitraum von 15-24 Stunden *p.i.* stärker anstieg, die Replikation des Wildtyps hingegen zu stagnieren schien.

Es war hier nicht möglich, die DNA-Expression über einen längeren Zeitraum als 24 Stunden zu messen, da zu einem späteren Zeitpunkt die infizierten Zellen vollständig lysiert und die genomische DNA degradiert war, sodass eine Normalisierung auf die Sequenz eines zellulären Haushaltsgens wie HBG zu keinem eindeutigen Ergebnis führte.

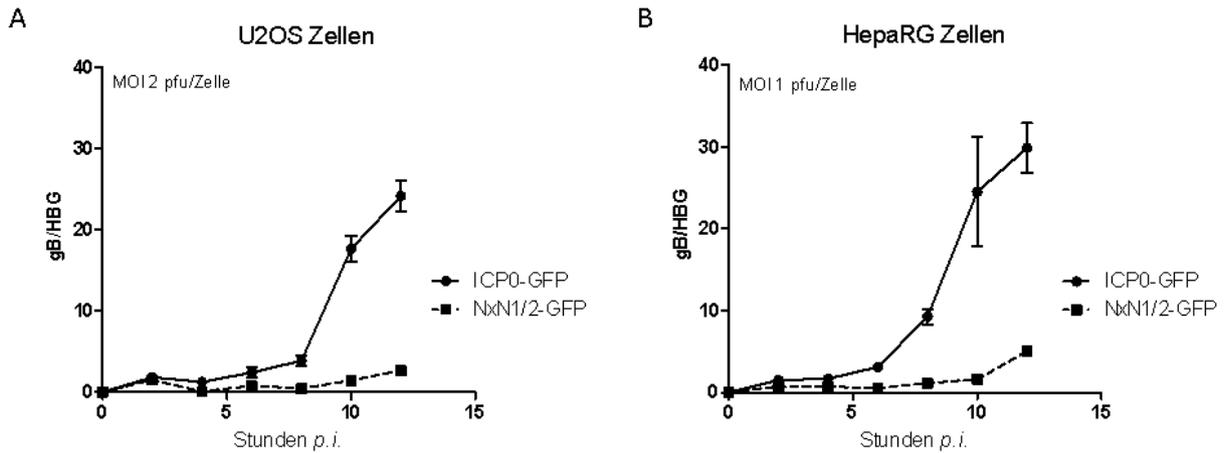


Abbildung 37. DNA-Expression der homolog rekombinierten Konstrukte. (A) U2OS Zellen wurden in Duplikaten mit den Konstrukten HSV2 ICP0-GFP (ICP0-GFP) und HSV2-ICP0^{NxN1/2}-GFP (NxN1/2-GFP) mit einer MOI von 2 *pfu*/Zelle infiziert. (B) HepaRG Zellen wurden in Duplikaten mit den gegebenen Konstrukten mit einer MOI von 1 *pfu*/Zelle infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten (Stunden *p.i.*) wurden die infizierten Zellen geerntet und virale und genomische DNA isoliert. Die Anzahl der DNA Kopien wurde mittels quantitativer *Realtime* PCR bestimmt. Die verwendeten *Primer* und die Sonde waren gegen das virale Gen *U_L27* gerichtet, welches für das Glykoprotein gB kodiert. Die Werte wurden auf die Gensequenz für humanes β -Globin normalisiert.

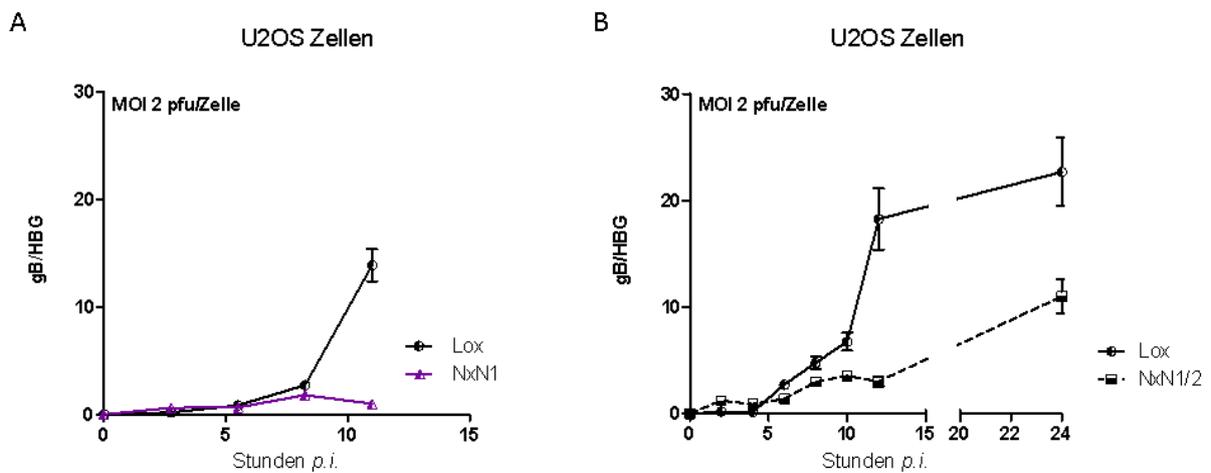


Abbildung 38. DNA-Expression der BAC-Konstrukte. U2OS Zellen wurden in Duplikaten (A) mit den Konstrukten HSV2(MS)Lox (Lox) und HSV2-ICP0^{NxN1} [52.1] (NxN1) und (B) mit HSV2 Lox und HSV2-ICP0^{NxN1/2} [2.1] (NxN1/2) mit einer MOI von 2 *pfu*/Zelle infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten (Stunden *p.i.*) wurden die infizierten Zellen geerntet und zelluläre genomische und virale DNA isoliert. Die Anzahl der DNA Kopien wurden mittels quantitativer *Realtime* PCR bestimmt. Die verwendeten *Primer* und die Sonde waren gegen das virale Gen *U_L27* gerichtet, welches für das Glykoprotein gB kodiert. Die Werte wurden auf die Gensequenz für humanes β -Globin normalisiert.

4.2.5 Protein-Expressionskinetik der SIAH-bindedefizienten ICP0-Mutanten

Neben der DNA-Expression wurde die Translation viraler Gene von HSV2 Wildtyp und der SIAH-bindedefizienten N_xN1/2-Mutante genauer untersucht. Um zu überprüfen, ob die für HSV typische Proteinexpressionskaskade von den unmittelbar frühen bis zu den späten Proteinen durch die Inhibierung der ICP0:SIAH-1 Interaktion beeinträchtigt ist, wurde die Expressionsrate verschiedener viraler Proteine von HSV2 Wildtyp und den SIAH-bindedefizienten Mutanten über einen Zeitraum von 2 bis 48 Stunden analysiert. Zu den untersuchten viralen Proteinen gehörten die unmittelbar frühen Proteine ICP0 (mit einer molekularen Masse von 110 kDa beziehungsweise etwa 140 kDa als GFP-Fusionsprotein) und ICP27 (63 kDa), sowie das späte Kapsidprotein VP5 (149 kDa). HepaRG Zellen, U2OS Zellen und Verozellen wurden mit den jeweiligen Konstrukten mit einer MOI von 1 beziehungsweise 2 pfu/Zelle infiziert und die infizierten Zellen in regelmäßigen Abständen geerntet, lysiert und die Proteinexpression mittels Western Blot (3.4.1) untersucht. Als Ladekontrolle diente das zelluläre Protein α -Tubulin (55 kDa). Es zeigte sich, dass in allen drei Zelltypen die mit der N_xN1/2-Mutante infiziert wurden die untersuchten viralen Proteine detektiert werden konnten. Zudem waren die unmittelbar frühen Proteine in der Expressionskinetik früher nachweisbar als das späte Protein VP5, sodass davon ausgegangen werden konnte, dass die für HSV typische Genexpressions-Kaskade nicht beeinträchtigt war und die Proteine in der korrekten Abfolge exprimiert wurden. Bei einem Vergleich der Proteinexpression der SIAH-bindedefizienten Mutante mit dem korrespondierenden Wildtyp HSV2 Lox beziehungsweise HSV2 ICP0-GFP konnte jedoch beobachtet werden, dass die Proteinexpression der N_xN1/2-Mutante in den ersten 12 Stunden nach Infektion (*p.i.*) vermindert war. Dies war für ICP0 und ICP27, sowie für VP5 der Fall und war unabhängig von der infizierten Zelllinie (Abbildung 39 bis Abbildung 42). So war die ICP0-Bande in HSV2 ICP0-GFP infizierten U2OS Zellen bei einer MOI von 2 pfu/Zelle bereits nach 2 Stunden *p.i.* schwach und nach 4 Stunden deutlich detektierbar, in N_xN1/2-GFP infizierten U2OS Zellen erst nach 4 Stunden *p.i.* schwach und nach 6-8 Stunden deutlich nachweisbar. Das späte Protein VP5 war bei HSV2 ICP0-GFP infizierten U2OS-Zellen nach 6 Stunden schwach und nach 8 Stunden deutlich detektierbar, in N_xN1/2-GFP infizierten Zellen war erst nach 10-12 Stunden eine schwache VP5 Bande auszumachen (Abbildung 39), wobei auch das ICP27-spezifische Signal bei der N_xN1/2-Mutante deutlich schwächer war. Die in den ersten 12 Stunden *p.i.* verringerte Proteinexpression war auch in U2OS Zellen zu beobachten, die mit der *En Passant* N_xN1/2-Mutante mit einer MOI von 2 pfu/Zelle infiziert wurde. Auch hier war zu erkennen, dass die Expression des späten Proteins VP5 stärker verringert war als die der unmittelbar frühen Proteine (Abbildung 40).

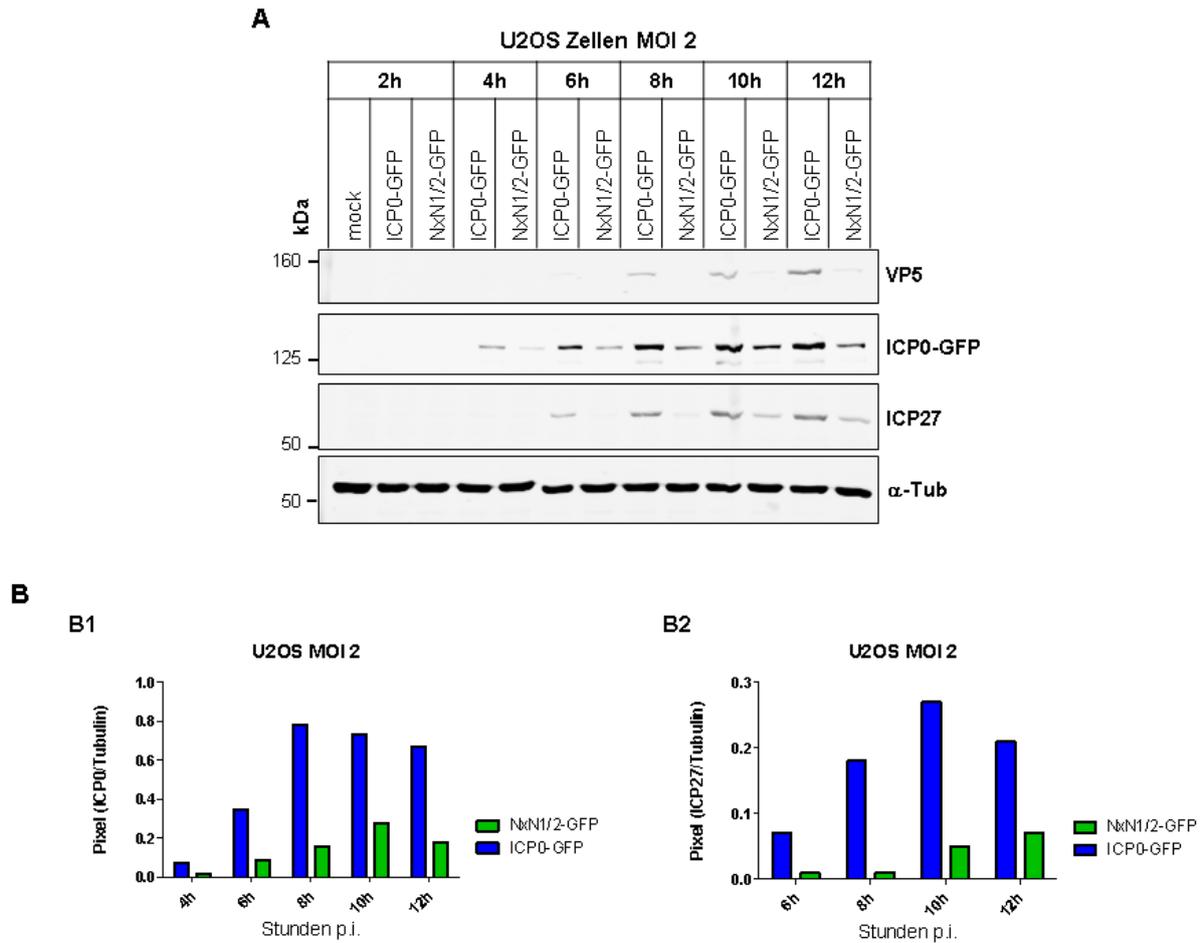


Abbildung 39. Proteinexpression der homolog rekombinierten ICP0-Mutanten in U2OS Zellen. U2OS Zellen wurden mit den Konstrukten HSV2 ICP0-GFP (ICP0-GFP) und HSV2-ICP0^{NxN1/2}-GFP (NxN1/2-GFP) mit einer MOI von 2 *pfu*/Zelle infiziert. **(A)** Infizierte Zellpellets wurden zu den angegebenen Zeitpunkten *p.i.* (*h*= *hours*) geerntet und Proteine mittels SDS-PAGE separiert und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die viralen Proteine VP5, ICP0 und ICP27 wurden mit spezifischen Antikörpern markiert. α -Tubulin (α -Tub) diente als Ladekontrolle. Angabe der molekularen Masse in kDa. **(B)** Quantifizierung der Proteine mit Hilfe der *Licor Image Studio Software*. Die Intensitäten der Antikörpersignale von **(B1)** ICP0 und **(B2)** ICP27 wurden bestimmt und auf die korrespondierenden Tubulinsignale normalisiert. Angabe der Intensitäten in Pixel.

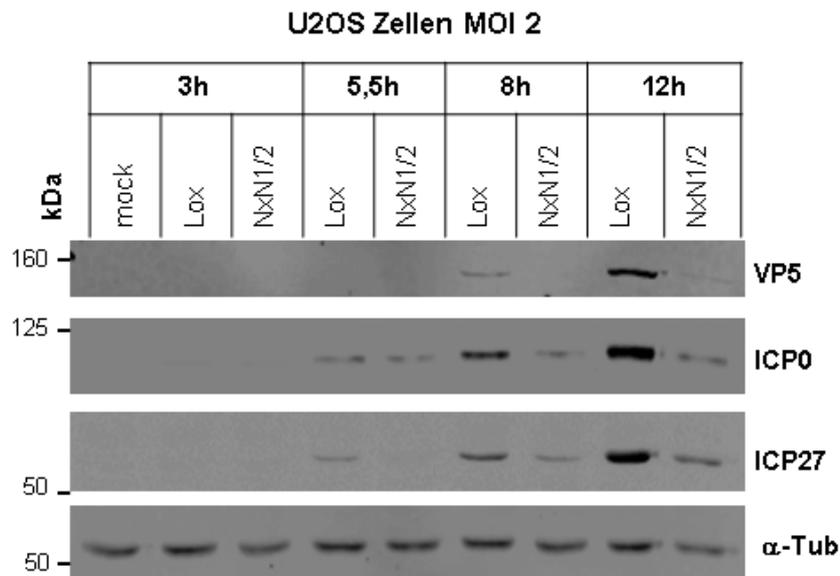


Abbildung 40. Proteinexpression der BAC-Mutanten in U2OS Zellen. U2OS Zellen wurden mit den Konstrukten HSV2(MS) Lox (Lox) und HSV2- ICP0^{NxN1/2} Klon [2.1] (NxN1/2) mit einer MOI von 2 *pfu*/Zelle infiziert. Die infizierte Zellpellets wurden zu den angegebenen Zeitpunkten *p.i.* (h= hours) geerntet und Proteine mittels SDS-PAGE separiert und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die viralen Proteine VP5, ICP0 und ICP27 wurden mit spezifischen Antikörpern markiert. α -Tubulin (α -Tub) diente als Ladekontrolle. Angabe der molekularen Masse in kDa.

Um die Proteinkonzentration (*de novo* Expressionsrate) der einzelnen Konstrukte zu verschiedenen Zeitpunkten vergleichen zu können, wurden über quantitatives Western Blot *Imaging* die Signalintensitäten der Antikörper-markierten Proteinbanden mit Hilfe der *Licor Image Studio Software* (3.4.1.2) gemessen und anschließend auf die Signalintensitäten der Ladekontrolle α -Tubulin normalisiert. Bei dem Vergleich der Signalintensitäten der Proteine von HSV2 ICP0-GFP und HSV2 ICP0^{NxN1/2}-GFP zeigte sich, dass die höchste Differenz in den Proteinkonzentrationen beider Virus-Konstrukte auf allen Zelllinien 8 Stunden *p.i.* vorlag. In HSV2 ICP0-GFP infizierten Verozellen und U2OS Zellen war die ICP0-Signalintensität etwa 5x so stark wie in HSV2 ICP0^{NxN1/2}-GFP infizierten Zellen (Abbildung 39 B1, Abbildung 42 B1). In HepaRG Zellen war das ICP0-Signal bei einer Wildtypinfektion nach 8 Stunden *p.i.* sogar 6x stärker als bei einer Infektion mit der SIAH-bindedefizienten Mutante, und nach 12 Stunden *p.i.* immer noch etwa 2,5x stärker (Abbildung 41 B1). Differenzen in den Signalintensitäten konnten auch bei den ICP27- und VP5-Signalen nachgewiesen werden. Bei ICP27 und VP5 waren die Unterschiede zwischen Wildtyp und der NxN1/2-Mutante sogar noch deutlicher. In ICP0-GFP infizierten HepaRG-Zellen waren die VP5 Signalintensität nach 6 Stunden 8x stärker und nach 12 Stunden noch 3,5x so stark wie in NxN1/2-GFP infizierten HepaRG Zellen (Abbildung 41 B2). Das ICP27-Signal war in ICP0-

Ergebnisse

GFP infizierten U2OS Zellen nach 8 Stunden etwa 10x und nach 12 Stunden noch etwa 3x stärker als das ICP27-Signal bei einer NxN1/2-GFP Infektion (Abbildung 39).

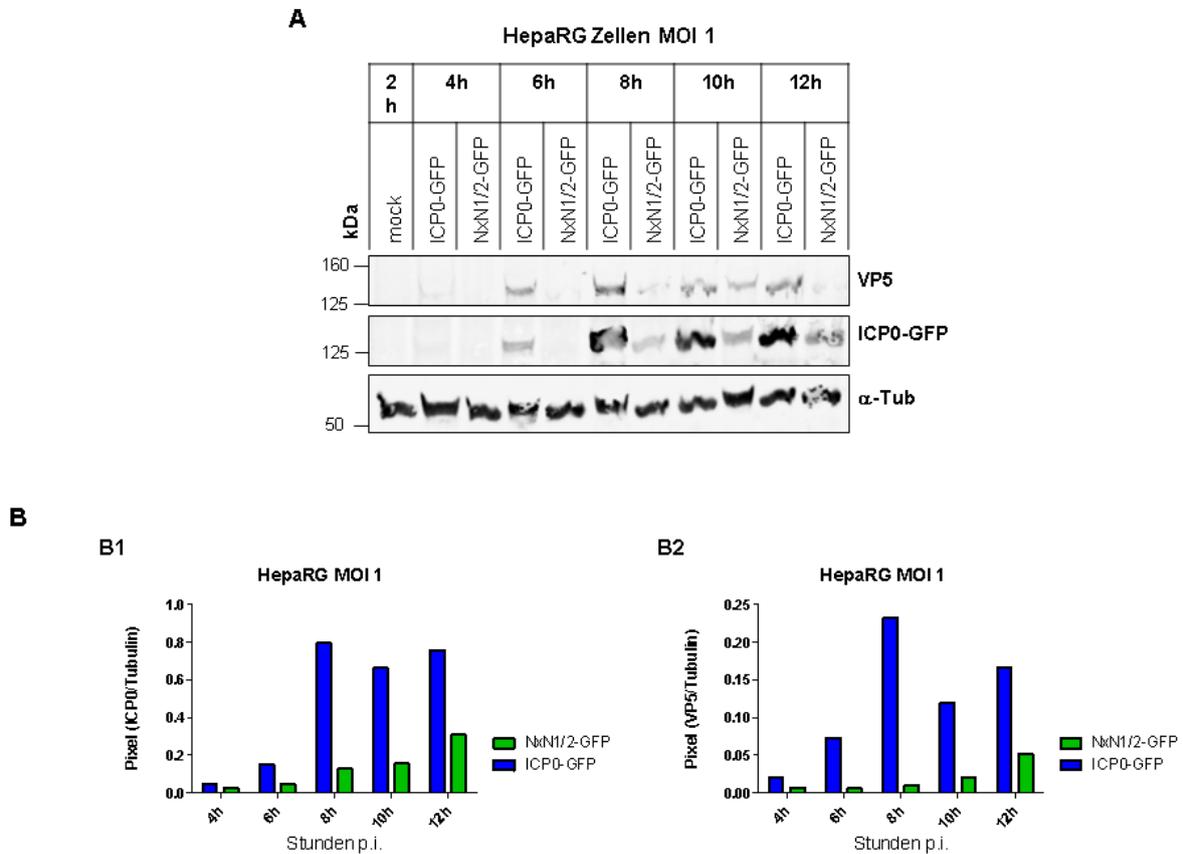


Abbildung 41. Proteinexpression der homolog rekombinierten ICP0-Mutanten in HepaRG Zellen. HepaRG Zellen wurden mit den Konstrukten HSV2 ICP0-GFP (ICP0-GFP) und HSV2-ICP0^{NxN1/2}-GFP (NxN1/2-GFP) mit einer MOI von 1 *pfu*/Zelle infiziert. (A) Infizierte Zellpellets wurden zu den angegebenen Zeitpunkten *p.i.* (*h*= *hours*) geerntet und Proteine mittels SDS-PAGE separiert und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die viralen Proteine VP5 und ICP0 wurden anschließend mit spezifischen Antikörpern markiert. α -Tubulin (α -Tub) diente als Ladekontrolle. Angabe der molekularen Masse in kDa. (B) Quantifizierung der Proteine mit Hilfe der *Licor Image Studio Software*. Die Intensitäten der Antikörpersignale von (B1) ICP0 und (B2) VP5 wurden vermessen und auf die korrespondierenden Tubulinsignale normalisiert. Angabe der Intensitäten in Pixel.

Nach 24 Stunden *p.i.* war in infizierten Verozellen fast kein Unterschied mehr in der Signalstärke der viralen Proteine beider Konstrukte auszumachen (Abbildung 42). Es war jedoch zu erkennen, dass die Differenz in den Bandenintensitäten nach 30 Stunden *p.i.* wieder leicht zunahm. Die ICP0-Intensität bei der NxN1/2-GFP Mutante wurde im Zeitraum von 30-48 Stunden *p.i.* rund 1,5x bis 2x schwächer als die Intensität von Wildtyp ICP0-GFP, und auch das VP5 Signal der NxN1/2-GFP Mutante war nach 35 Stunden *p.i.* rund 1,5x schwächer. In MOI 1 infizierten U2OS Zellen war das ICP0^{NxN1/2}-Signal nach 35 Stunden

sogar nur noch 1/4x so stark wie das der Wildtyp ICP0-Bande (Anhang Abbildung 64). Neben den viralen Proteinen wurde zudem die Menge des zellulären *Promyelocytic Leukemia* Proteins (PML) innerhalb der 48-Stundenkinetik auf Verzellen untersucht, wobei der verwendete Antikörper alle PML-Isoformen erkannte (Tabelle 9). Der Abbau von PML spielt bei der HSV Infektion eine entscheidende Rolle. Dabei wird PML von Wildtyp ICP0 polyubiquitiniert, was zum proteasomalen Abbau des Zielproteins führt (Everett et al., 2006). Die Quantifizierung des PML-Signals zeigte, dass es zwischen Wildtyp HSV2 und NxN1/2-GFP infizierten Verzellen bei einer initialen MOI von 1 *pfu*/Zelle zu keinem Zeitpunkt einen (relevanten) Unterschied in der PML-Menge gab (Abbildung 42 B3).

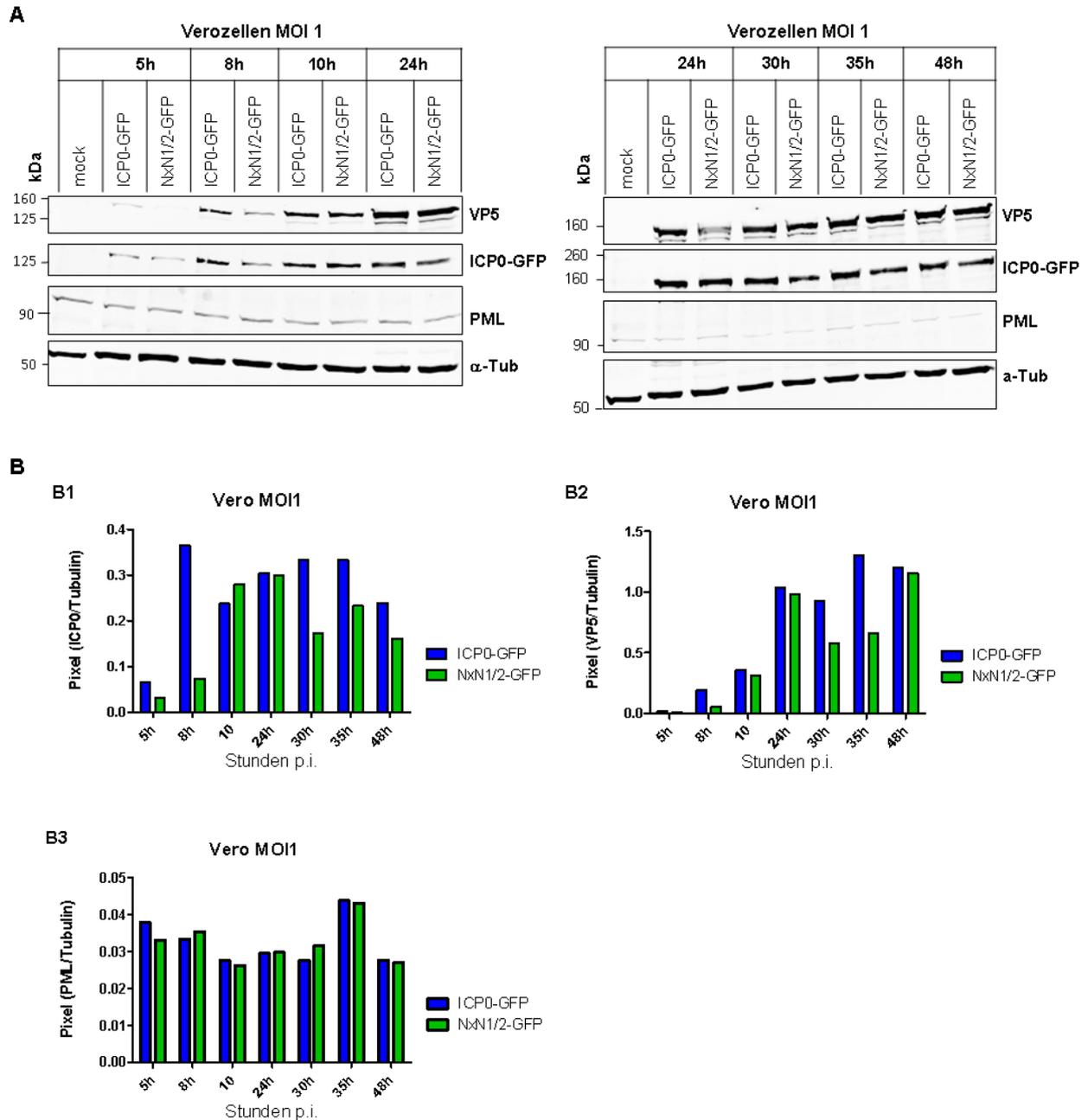


Abbildung 42. Proteinexpression der homolog rekombinierten ICP0-Mutanten in Verozellen. Verozellen wurden mit den Konstrukten HSV2 ICP0-GFP (ICP0-GFP) und HSV2-ICP0^{NxN1/2}-GFP (NxN1/2-GFP) mit einer MOI von 1 *pfu*/Zelle infiziert. (A) Infizierte Zellkulturen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten *p.i.* (*h*= *hours*) geerntet und Proteine mittels SDS-PAGE separiert und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die viralen Proteine VP5 und ICP0, sowie zelluläres PML wurden mit spezifischen Antikörpern markiert. Tubulin (α -Tub) diente als Ladekontrolle. Angabe der Proteingröße in kDa. (B) Quantifizierung der Proteine mit Hilfe der *Licor Image Studio Software*. Die Intensitäten der Antikörpersignale für (B1) ICP0, (B2) VP5, und (B3) PML wurden bestimmt und auf die korrespondierenden Tubulinsignale normalisiert. Angabe der Intensitäten in Pixel.

4.3 *In vivo* Charakterisierung von HSV2 im Mausmodell

In diesem Teil der Arbeit wurden SIAH-bindedefiziente ICP0-Mutanten in einem *in vivo* Tiermodell analysiert. Als Versuchstier wurde die Maus ausgewählt, da HSV in Mäusen eine lytische, sowie latente Infektion verursachen kann (Details, siehe 1.2). Zudem haben Sequenzanalysen gezeigt, dass sich das murine Protein SIAH-1A in nur einer Aminosäure vom menschlichem SIAH-1 unterscheidet (Hu et al., 1997), sodass davon auszugehen war, dass beide Proteine eine identische Funktion ausüben. Um Schwankungen bei den Resultaten aufgrund des genetischen Hintergrunds der Tiere möglichst gering zu halten, wurde für die Versuchsdurchführung ein Inzuchtstamm (C57Bl/6) eingesetzt. *In vivo* galt es zu überprüfen, ob die zuvor *in vitro* analysierten Konstrukte in der Lage waren, eine akute Infektion im lebenden Organismus zu verursachen, das heißt effektiv am Ort der Primärinfektion zu replizieren. Hierfür wurden C57Bl/6J Mäuse über die okulare Route mit 10^5 pfu/Auge infiziert. Im Falle einer akuten Infektion sollte in einem nächsten Schritt die Fähigkeit der Konstrukte untersucht werden, sensorische Neurone des peripheren Nervensystems (PNS) zu infizieren und sich von dort weiter im zentralen Nervensystem (ZNS) auszubreiten. Hierfür wurden die Trigeminierven (PNS), die das Auge der Tiere innervierten und der Hirnstamm (ZNS) isoliert und auf das Vorhandensein von HSV2 untersucht. Abschließend wurde *ex vivo* überprüft, ob HSV2-Mutanten in der Lage waren, Latenz in den innervierenden Neuronen des PNS zu etablieren und aus dieser nach mechanischer Stimulation wieder zu reaktivieren.

Das okulare Infektionsmodell wurde bereits von mehreren internationalen Arbeitsgruppen (Halford & Schaffer, 2001; Halford et al., 2010; Summers et al., 2001; Thompson et al., 2014) sowohl zur Analyse von Infektionen mit HSV1 und HSV2, als auch für Latenz beziehungsweise Reaktivierungsexperimente (Nicoll et al., 2016; Raja et al., 2016; Yao et al., 2012) eingesetzt und eignete sich deshalb hervorragend zur Beantwortung der Fragenstellungen dieses Projektabschnittes.

4.3.1 SIAH-1 RNA Expression im uninfizierten murinen Gewebe

Um vorab die Anwesenheit von SIAH-1 (und somit eine potentielle ICP0:SIAH Interaktion) in den zu untersuchenden Mausgeweben zu überprüfen, wurde die SIAH-1 RNA Expression im Auge, im Trigeminierv und im Hirnstamm uninfizierter Mäuse (n=3) mittels quantitativer *Realtime*-PCR (3.2.7) gemessen. Hierfür wurde aus den Geweben die gesamte RNA isoliert (3.5.5) und davon 1 µg in cDNA umgeschrieben (3.5.5.2). Die so bestimmten SIAH-1 cDNA Kopien pro Gewebe wurden auf Sequenzen des zellulären GAPDH normalisiert. Es zeigte sich, dass in allen untersuchten Geweben SIAH-1 RNA vorlag. Die durchschnittlich höchste Expression war in den Trigeminierven nachzuweisen, wobei die

Ergebnisse

Unterschiede der SIAH-1 RNA-Konzentrationen im Auge, TG und Hirnstamm nicht signifikant waren.

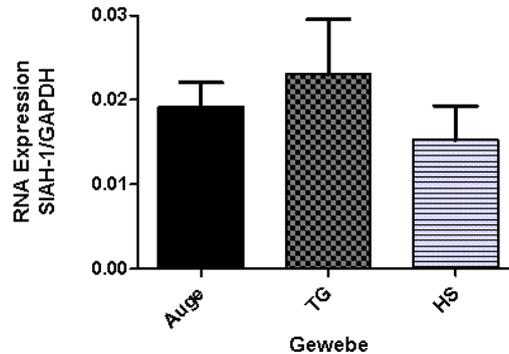


Abbildung 43. SIAH-1 Expression im murinen Gewebe. Beide Augen, Trigemini-nerven (TG), sowie der Hirnstamm (HS) von n=3 uninfizierten weiblichen 7 Wochen alten C57Bl/6J Mäusen wurden homogenisiert, die RNA isoliert und 1 µg davon in cDNA umgeschrieben. Mittels quantitativer *Realtime*-PCR wurde die Anzahl der SIAH-1 RNA (cDNA)-Kopien pro Gewebe bestimmt und auf cDNA Sequenzen des zellulären Hausgaltsgens GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase) normalisiert. Jeder Balken stellt den Mittelwert der relativen RNA-Kopien +/- Standardabweichung dar. Signifikanzen wurden mit dem *one-way* ANOVA und dem Dunn` *Post*-test überprüft. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der SIAH-1 Expression zwischen den getesteten Geweben festgestellt werden.

4.3.2 Okulare Infektion von C57Bl/6J Mäusen mit HSV2 Wildtyp

Vor der *in vivo* Charakterisierung der SIAH-bindedefizienten Mutanten, die über *En Passant* Mutagenese in Bakterien oder homologe Rekombination in eukaryotischen Zellen hergestellt worden waren, wurde zunächst überprüft, ob die jeweiligen HSV2 Wildtyp-Konstrukte in der Lage waren, eine akute Infektion in C57Bl/6J Mäusen auszulösen. Zudem sollte überprüft werden, ob HSV2 ICP0-GFP aufgrund der GFP-Expression in seiner Replikation *in vivo* attenuiert war, wie es in Bezug auf GFP-exprimierende Viren unter anderem durch Balliet und Mitarbeiter beschrieben wurde (Balliet et al., 2007). Hierfür wurden jeweils 25-30 Tiere mit den generierten HSV2 Lox -und HSV2 ICP0-GFP Konstrukten, oder mit HSV2 MS Wildtyp Klon 1 (HSV2 MS wt) infiziert. Die Virusreplikation im Auge wurde anschließend in einem Zeitraum von 7 Tagen durch Messung der Virustiter in der Tränenflüssigkeit analysiert (3.5.2). Bei allen drei Wildtyp-Konstrukten konnte nach 24 Stunden infektiöses Virus in der Tränenflüssigkeit nachgewiesen werden (Abbildung 44). Es konnte somit gezeigt werden, dass alle Wildtyp-Konstrukte eine akute Infektion in den Corneas der Mäuse hervorriefen und somit pathogen waren. Mit den berechneten Titern konnte eine Wachstumskurve für jedes Konstrukt in dem analysierten Messzeitraum erstellt werden. Anhand der Wachstumskurve zeigten alle drei Konstrukte den

gleichen Infektionsverlauf im Auge. Bei dem Vergleich der erreichten Virustiter zeigte sich jedoch, dass HSV2 ICP0-GFP geringere Titer erreichte als HSV2 Lox und HSV2 MS wt. Die Titerunterschiede waren an Tag 1 und zwischen Tag 3 und 5 nach der Infektion signifikant. Die Titer der beiden letzteren waren über den Messzeitraum von 7 Tagen vergleichbar (Abbildung 44).

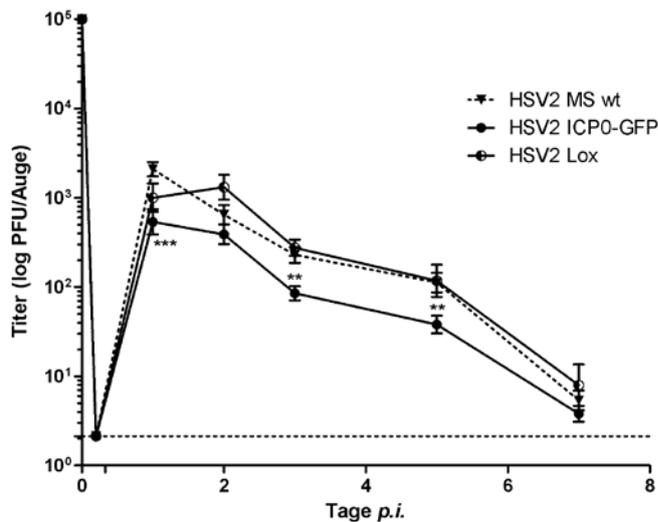


Abbildung 44. Akute Replikation der HSV2 Wildtyp-Konstrukte im Augenepithel. Die Augen von C57Bl/6J Mäuse wurden mit den jeweiligen HSV2 Wildtyp-Konstrukten mit einem Titer von 1×10^5 pfu/Auge infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten (Tage p.i.) wurden die Virustiter in der Tränenflüssigkeit mittels *Plaque Assay* auf Verozellen bestimmt. Es sind die Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten gezeigt. Die einzelnen Messpunkte stellen den Mittelwert \pm SEM der Titer ($n=25$ HSV2 Lox, $n=30$ HSV2 MS wt und $n=30$ HSV2 ICP0-GFP) zum jeweiligen Zeitpunkt dar. Signifikanzen gegenüber HSV2 MS wt wurden mit Hilfe des *two-way* ANOVA berechnet. Die Virustiter wurden logarithmisch (\log_{10}) als Funktion der Zeit angegeben.

Neben den gemessenen Virustitern in der Tränenflüssigkeit der Tiere wurde zudem das Erscheinungsbild der Versuchstiere begutachtet. Hier zeigte sich, dass alle Mäuse wenige Tage nach der Infektion leicht an Gewicht verloren und kurze Zeit nach der Infektion erblindeten. Bei einem Vergleich der HSV2 ICP0-GFP infizierten Mäuse mit HSV2 Lox und HSV2 MS wt infizierten Tieren waren jedoch auch Unterschiede zu erkennen. Die Tiere, die mit ICP0-GFP Virus infiziert wurden zeigten äußerlich bis auf verstärktes Putzverhalten, kleine fellfreie Bereiche um die Augen und angeschwollene Schnauzen nach 3 bis 5 Tagen keine großen Veränderungen. HSV2 Lox und MS wt infizierte Mäuse hatten etwa 7-8 Tagen nach der Infektion großräumig haarlose Stellen und Wunden im Kopfbereich. Zudem entwickelte ein Großteil der Tiere 1-3 Wochen nach der Infektion neuronale Schäden bis hin zu einer Herpes-Enzephalitis, die sich in Gleichgewichtsstörungen, Lethargie,

Schnappatmung und sporadischen Zuckungen äußerten, sodass die Tiere umgehend eingeschläfert werden mussten. Bei den HSV2 Lox infizierten Tieren mussten aufgrund dieser Symptome alle für die Latenz-Experimente vorgesehenen Mäuse zwischen Woche 2 und 3 *p.i.* eingeschläfert werden. Die HSV2 wt infizierten Mäuse überlebten die Infektion zu 80% und die HSV2 ICP0-GFP infizierten Tiere zu 100%. Diese Tiere eigneten sich daher gut für Langzeitstudien und Reaktivierungsexperimente der HSV2 GFP-Konstrukte.

4.3.3 Viruslast in den innervierenden Geweben

An Tag 5 *p.i.* wurden je Viruskonstrukt fünf infizierte Mäuse eingeschläfert und die Trigeminiernerven (TG) und der Hirnstamm entnommen, um nach Protokoll 3.5.3 die Viruslast zu bestimmen. Viruspartikel aller drei Konstrukte konnten 5 Tage *p.i.* in den untersuchten Geweben nachgewiesen werden. Bei der Berechnung der Virustiter in den Geweben zeigte sich, dass die Titer von HSV2 ICP0-GFP, genauso wie zuvor in der Tränenflüssigkeit, im TG und Hirnstamm niedriger waren als die der anderen Konstrukte. Zudem waren die durchschnittlichen Titer von HSV2 Lox im TG höher als die von HSV2 MS wt, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Die Titerunterschiede zwischen HSV2 Lox und HSV2 ICP0-GFP waren hingegen im TG signifikant, jedoch nicht im Hirnstamm (Abbildung 45).

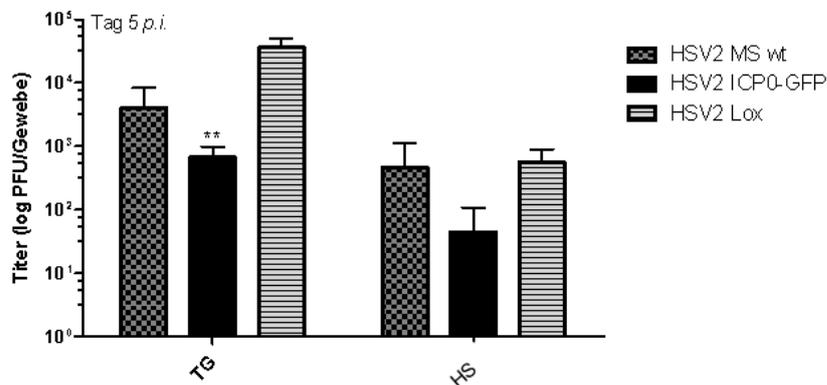


Abbildung 45. Gemessene Virustiter im HSV2 Wildtyp-infiziertem Gewebe. C57Bl/6J Mäuse wurden mit den Wildtyp-Konstrukten HSV2 MS wt, HSV2 ICP0-GFP und HSV2 Lox infiziert. An Tag 5 *p.i.* wurde der Hirnstamm (HS) und die Trigeminiernerven (TG) isoliert, homogenisiert und die Virustiter im Gewebe mittels *Plaque Assay* auf Verozellen bestimmt. Die Balken stellen den Mittelwert +/- SEM der Titer (n=5 je Viruskonstrukt) dar. Signifikanzen wurden mit Hilfe des *one-way ANOVA* und *Dunn's Post-test* berechnet mit ** $p=0,0025$ zwischen HSV2 Lox und HSV2 ICP0-GFP im TG. Die Titer sind auf einer logarithmischen (\log_{10}) Skala dargestellt.

4.3.4 *Ex vivo* Reaktivierung von HSV2 Wildtyp in latent infizierten Trigeminiernerven

Da alle HSV2 Lox infizierten Mäuse 2 bis 3 Wochen nach Infektion wegen neuronaler Schäden aus dem Versuch genommen werden mussten, wurden die Reaktivierungsexperimente ausschließlich mit HSV2 MS wt und HSV2 ICP0-GFP infizierten Tieren durchgeführt. Vierzig Tage *p.i.* wurden die Trigeminiernerven (Explantate) aus den Tieren präpariert, in Kulturmedium bei 37°C inkubiert und die Reaktivierung der HSV2 Konstrukte *ex vivo* überprüft (3.5.8). Bei beiden Konstrukten konnten an Tag 3 *p.e.* (*post explantation*) erste Viruspartikel im Überstand der Trigeminiernerven nachgewiesen werden. An Tag 5 waren in 90% der HSV2 MS wt Überstände Viruspartikel nachweisbar. Bei den mit HSV2 ICP0-GFP infizierten Ganglien (TG) waren es 70% an Tag 5 und ebenfalls 90% an Tag 7, was bei beiden Konstrukten die gleiche finale Reaktivierungsquote bedeutete (Abbildung 46A), wenngleich auch die Reaktivierung von HSV2 ICP0-GFP in einigen Ganglien verzögert war. Beim Ausschließen der TGs, in deren Überstand kein Virus nachweisbar war, waren die durchschnittlich erzielten Virustiter im Überstand an allen Tagen *p.e.* für beide Konstrukte vergleichbar (Abbildung 46 B-C).

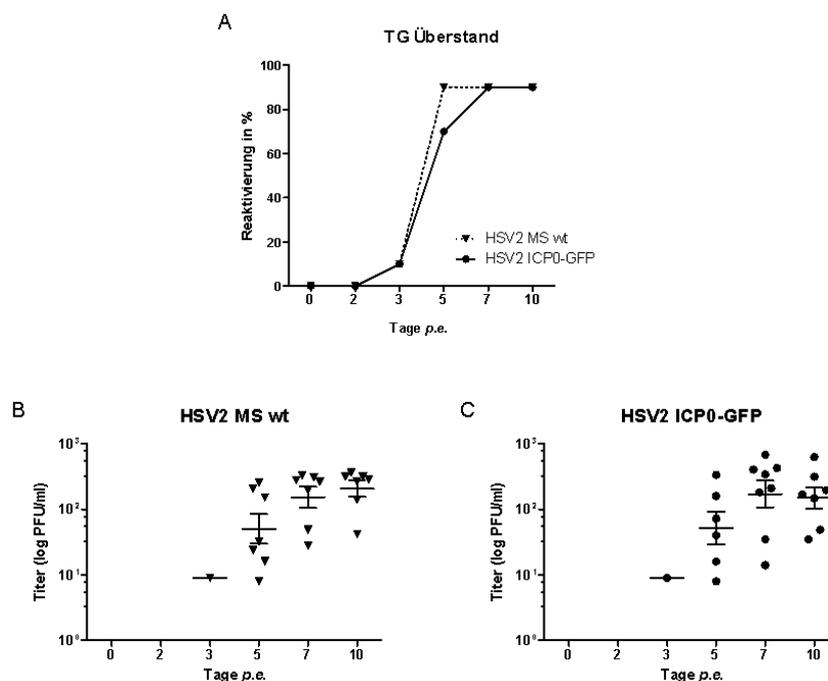


Abbildung 46. *Ex Vivo* Reaktivierung von HSV2 Wildtyp. Aus latent mit HSV2 MS wt oder HSV2 ICP0-GFP infizierten Mäusen wurden 40 Tage *p.i.* die Trigeminiernerven (TG) präpariert und in Kulturmedium inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten (Tage *p.e.*) wurde über die Messung infektiöser Partikel im TG-Überstand eine Reaktivierung der Konstrukte überprüft (n=8 Ganglien (TG) je Viruskonstrukt). (A) Die Anzahl viruspositiver Überstände wurde in Prozent (%) Reaktivierung als Funktion der Zeit (Tage *p.e.*) angegeben. (B) Die Virustiter von reaktiviertem HSV2 MS wt im

Ergebnisse

Ganglienüberstand, sowie (C) die Virustiter von reaktiviertem HSV2 ICP0-GFP wurden auf Verozellen bestimmt und auf eine logarithmisch (\log_{10}) Skala aufgetragen. Jedes Zeichen steht für den Titer eines Ganglienüberstands. Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM der Virustiter zum jeweiligen Zeitpunkt.

Parallel zur Titerbestimmung im Überstand wurden die latent mit HSV2 ICP0-GFP infizierten Ganglienexplantate in regelmäßigen Abständen unter dem Fluoreszenzmikroskop inspiziert. Grün fluoreszierende Ganglien deuteten durch die Expression des ICP0-GFP Fusionsproteins eine Reaktivierung der Viren an.

Bereits 2 Tage *p.e.* konnten grün fluoreszierende Bereiche in einigen Ganglien detektiert werden, die sich in den darauffolgenden Tagen verstärkten und weiter ausbreiteten. An Tag 5 fluoreszierten bereits große Teile der einzelnen TGs (Abbildung 47).

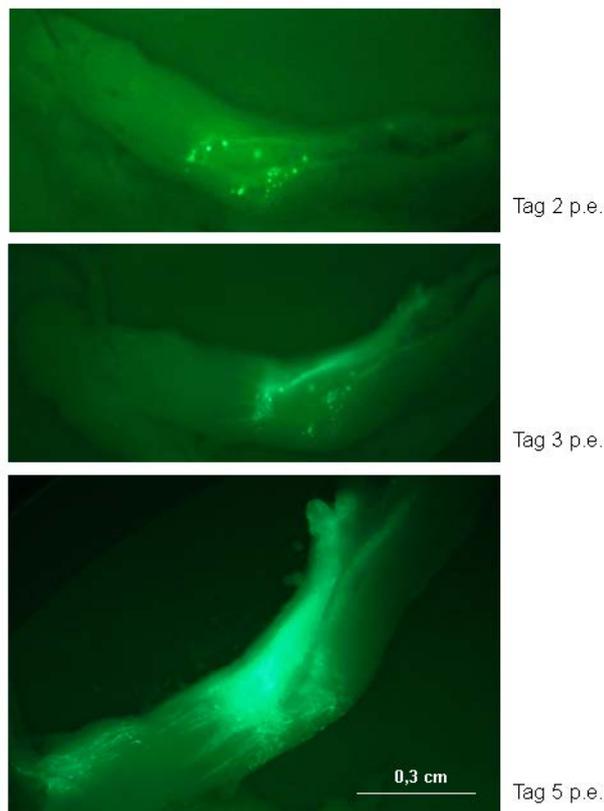


Abbildung 47. Nachweis der Reaktivierung von HSV2 ICP0-GFP mittels Fluoreszenzmikroskopie. Latent mit HSV2 ICP0-GFP infizierte Ganglien wurden 40 Tage *p.i.* isoliert. An den angegebenen Tagen *p.e.* wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie die ICP0-GFP Expression überprüft, die reaktivierte Viren anzeigte. Aufnahmen erfolgten mit dem Axiovert 200 Mikroskop (Zeiss) mit 5x Objektiv. Größenbalken 0.3 cm.

4.3.5 Überprüfung der Ori_L-Sequenz in den *En Passant* Mutanten

Es konnte gezeigt werden, dass die HSV2 Wildtyp-Konstrukte akute Infektionen in C57Bl/6J Mäusen verursachten und HSV2 MS wt, sowie HSV2 ICP0-GFP Latenz in den innervierenden Trigeminalganglien etablierten und *ex vivo* wieder reaktivieren konnten. Im nächsten Schritt sollten die SIAH-bindedefizienten ICP0-Mutanten *in vivo* charakterisiert werden. Eine gewisse Problematik bei *in vivo* Analysen von HSV2-Mutanten, die durch BAC-Mutagenese hergestellt wurden, besteht in der Tatsache, dass beim Passagieren in Bakterien der ori_L (*origin of replication*), welcher in der U_L-Region des Virusgenoms lokalisiert ist, verloren gehen kann (Weller et al., 1985; Nagel et al., 2014) (Abbildung 48 C). Diese HSVΔori_L-Viren sind *in vivo* in ihrem Replikationsverhalten und bei der Reaktivierung aus der Latenz attenuiert (Balliet & Schaffer, 2006), wohingegen ihr Phänotyp *in vitro* dadurch nur geringfügig beeinträchtigt wird (Balliet et al., 2005; Weller et al., 1985; Nagel et al., 2014).

Das Genom von HSV2 ist durch repetitive und G/C-reiche Bereiche charakterisiert (Dolan et al., 1998). Hinzu kommen Haarnadelstrukturen, aus denen der ori_L und die beiden oris bestehen (Balliet & Schaffer, 2006). Diese Eigenschaften können im Rahmen einer DNA-Sequenzanalyse problematisch sein. Da zu Beginn der *in vivo* Experimente aufgrund der technischen Entwicklung zudem noch keine *Next-Generation-Sequencing* (NGS) Ergebnisse der mutierten HSV2 Genome vorlagen, und die PCR-Amplifizierung der ori_L-Regionen für eine anschließende Sanger-Sequenzierung (3.2.11) erfolglos blieb, wurde das Vorhandensein des ori_L in den *En Passant* Konstrukten mittels Restriktionsverdau überprüft. Für die Analyse wurde BAC-DNA mit den Restriktionsenzymen AscI und BglIII behandelt. Anhand der hierbei entstandenen Fragmentmuster konnte eine potentielle Deletion der 144 bp Haarnadelstruktur (Einzelstrang Palindrom) des ori_L nachgewiesen werden. Das ori_L-enthaltende Fragment sollte bei einem AscI Verdau 1.483 bp ausmachen, und nach BglIII-Behandlung 4.700 bp. Es zeigte sich, dass bei Behandlung mit AscI die ori_L Bande bei HSV2 ICP0^{NxN1} [52.1] und HSV2 ICP0^{NxN1/2} [2.1] fehlte, beziehungsweise so verkleinert war, dass sie im Bandenmuster nicht mehr eindeutig getrennt von der darunterliegenden 1.218 bp Bande wahrgenommen werden konnte (Abbildung 48 A). Bei der Behandlung mit BglIII erschien das ori_L-enthaltende Fragment bei der NxN1- und NxN1/2-Mutante um wenige Basenpaare verkürzt, so dass es noch detektierbar war (Abbildung 48 B). Bei der Restriktionsendonuklease-Analyse von HSV2 Lox und der NxN2-Mutante [27.4] waren korrekte ori_L-enthaltende Banden zu erkennen, bei ihnen schien folglich der ori_L vorhanden zu sein.

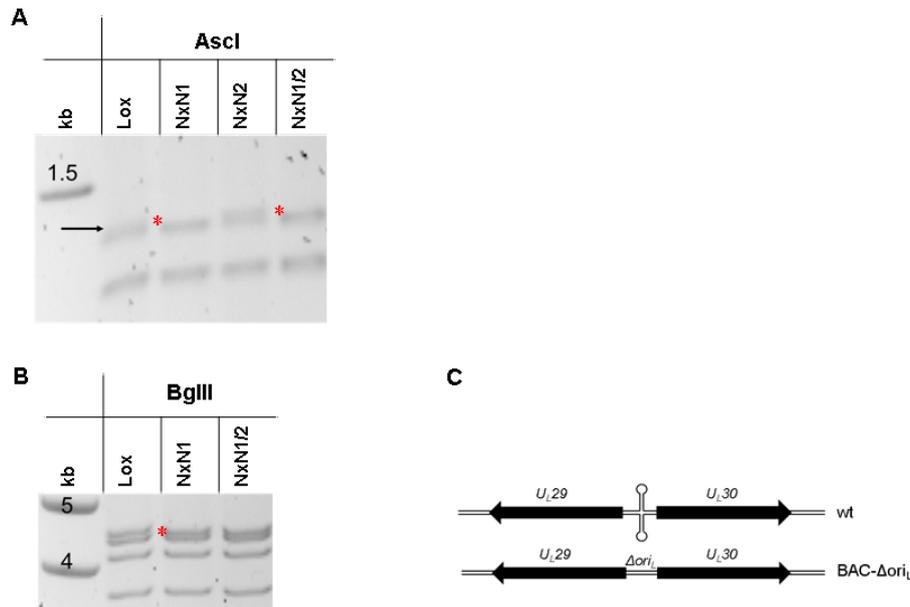


Abbildung 48. Überprüfung der ori_L -Sequenz in den BAC-Mutanten. (A) BACmid DNA der angegebenen Konstrukte wurde mit dem Enzym AsclI behandelt und anschließend in 1% Agarose in 0,5x TBE für 15 Stunden bei 2.8 V/cm elektrophoretisiert. Rote Sterne zeigen das Fehlen einer Bande im Restriktionsfragmentmuster an. (B) BACmid DNA der angegebenen Konstrukte wurde mit dem Enzym BglII behandelt und anschließend in 0,8% Agarose in 0,5x TBE für 15 Stunden bei 2.8 V/cm separiert. Der rote Stern kennzeichnet eine unerwartete Veränderung (Verringerung der Fragmentgröße) im Bandenmuster. (C) Schematische Darstellung des Genomausschnitts von HSV Wildtyp (wt), in dem die Gene U_L29 und U_L30 lokalisiert sind. Zwischen den Genen befindet sich die ori_L (origin of replication in der unique long region (U_L)), der eine Haarnadelstruktur besitzt. Bei bakterieller Passage kann diese Haarnadelstruktur verloren gehen (Δori_L). Abbildung aus (Nagel et al., 2014).

Anhand der Ergebnisse wurde die *in vivo* Charakterisierung der SIAH-bindedefizienten ICP0-Mutanten primär mit den homolog in eukaryotischen Zellen rekombinierten Konstrukten durchgeführt. Zudem wurde virale DNA der homolog rekombinierten Viren, sowie BAC-DNA der *En Passant* Mutanten zur Genom-Sequenzierung mittels Illumina MiSeq™ in die hausinterne Sequenzierplattform des Heinrich-Pette-Instituts (AG Grundhoff) gegeben. Die Sequenzierungen sollten ein mögliches Fehlen des ori_L in den beiden BAC-Mutanten, sowie mögliche weitere Fehler in den Genomsequenzen der Mutanten aufdecken, Ergebnisse siehe 4.3.11.

4.3.6 Okulare Infektion von C57Bl/6J Mäusen mit den ICP0-GFP Mutanten

Zur Charakterisierung der SIAH-bindedefizienten ICP0-GFP Mutanten im Tiermodell wurden die Experimente wie in 3.5 und 4.3.2 konzipiert und die NxN1/2-GFP Mutante, sowie in Teilen die NxN1-GFP Mutante mit ihrem Wildtyp-Referenzkonstrukt HSV2 ICP0-GFP verglichen. Insgesamt wurden n=50 Tiere mit HSV2 ICP0-GFP beziehungsweise mit der NxN1/2-GFP Mutante, sowie n=20 Tiere mit der NxN1-GFP Mutante infiziert. In allen drei

Versuchstiergruppen konnte ab 24 Stunden nach Infektion, in einem Messzeitraum von 7 Tagen, infektiöses Virus in der Tränenflüssigkeit nachgewiesen werden. Somit konnte gezeigt werden, dass die SIAH-bindedefizienten Mutanten NxN1-GFP und NxN1/2-GFP eine akute Infektion in der Cornea hervorrufen können. Mit Hilfe der über die Viruspartikel berechneten Titer konnte eine Replikationskurve der Konstrukte über einen Zeitraum von 7 Tagen erstellt werden. Bei einem Vergleich der Kurve von HSV2 ICP0-GFP und der NxN1/2-GFP Mutante zeigte sich, dass beide Konstrukte einen ähnlichen Infektionsverlauf aufzeigten und zwischen Tag 2 und 7 *p.i.* vergleichbare Titer erreichten. Lediglich 24 Stunden *p.i.* waren die durchschnittlich gemessenen Virustiter der NxN1/2-Mutante signifikant niedriger als die des HSV2 Wildtyps.

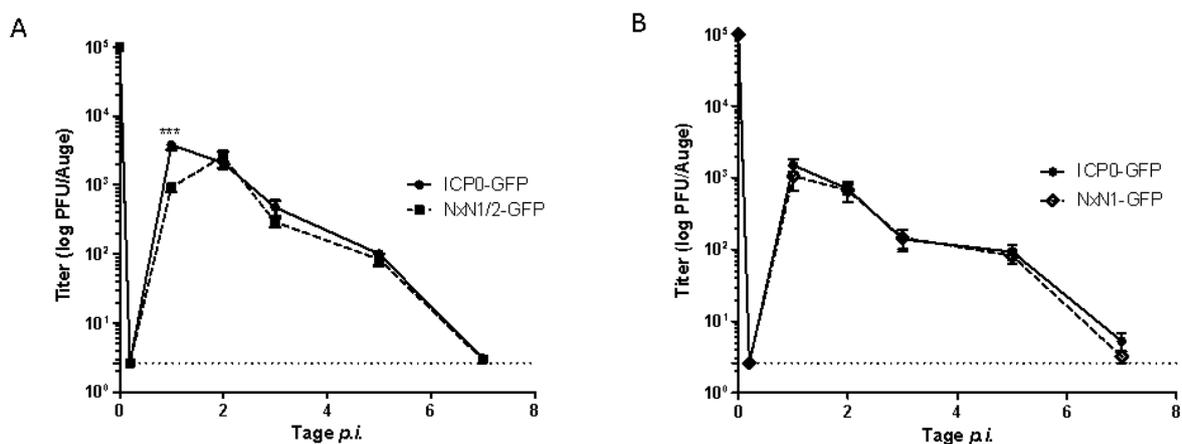


Abbildung 49. Akute Virusreplikation im Augenepithel. Beide Augen von C57Bl/6J Mäusen wurden mit (A) HSV2 ICP0-GFP (ICP0-GFP) und HSV2-ICP0^{NxN1/2}-GFP (NxN1/2-GFP) und (B) HSV2 ICP0-GFP und HSV2-ICP0^{NxN1}-GFP (NxN1-GFP) infiziert (Titer: 1×10^5 pfu/Auge). Zu den angegebenen Zeitpunkten (Tage *p.i.*) wurden die Virustiter in der Tränenflüssigkeit mittels *Plaque Assay* auf Verozellen bestimmt. Die einzelnen Punkte stellen den Mittelwert \pm SEM der Titer zum jeweiligen Zeitpunkt dar. Es sind Ergebnisse von (A) vier unabhängigen Experimenten mit insgesamt $n=50$ je Mutante und (B) zwei unabhängigen Experimenten mit $n=20$ je Mutante gezeigt. Signifikanzen wurden mit Hilfe des *two-way* ANOVA und dem Bonferroni *post-test* berechnet. Die Titer wurden logarithmisch (\log_{10}) als Funktion der Zeit angegeben.

Die Replikationskurven von HSV2 ICP0-GFP und der NxN1-Mutante waren ebenfalls vergleichbar. Zwar war auch hier 24 Stunden nach Infektion der durchschnittliche Virustiter der NxN1-Mutante etwas geringer als der des HSV2 Wildtyps, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant.

Äußerlich zeigten die Tiere, die mit HSV2 ICP0-GFP infiziert waren, keine Unterschiede zu Tieren, die mit den NxN-GFP Mutanten infiziert wurden. Alle Mäuse überlebten die Infektion in dem Untersuchungszeitraum von bis zu 40 Tagen zu 100%. In der akuten Infektionsphase

Ergebnisse

verloren alle Tiere der drei Gruppen geringfügig an Gewicht und zeigten ein verstärktes Putzverhalten. Zudem erblindeten die meisten Tiere wenige Tage nach der Infektion, und es bildeten sich haarlose Stellen um die Augen, wobei die Schnauzen leicht geschwollen waren (Abbildung 50). Keines der Tiere entwickelte auffällige neurologische Störungen.

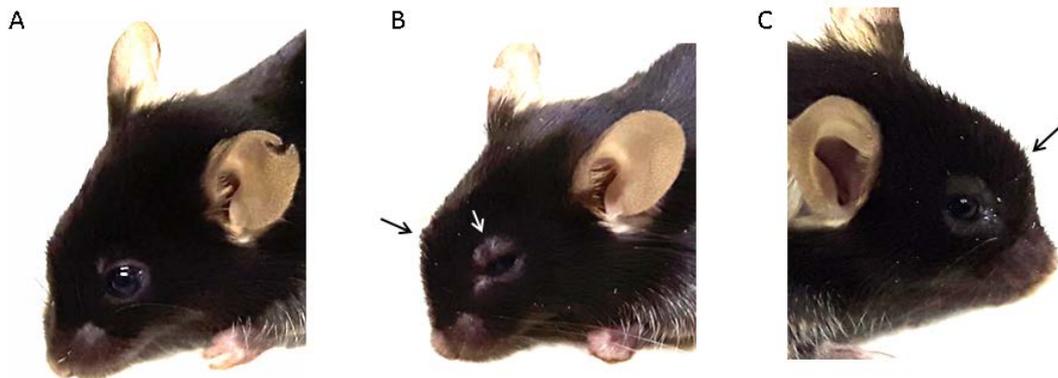


Abbildung 50. Äußeres Erscheinungsbild HSV2 ICP0-GFP infizierter C57Bl/6J Mäuse. Corneas von C57Bl/6J Mäusen wurden mit verschiedenen Virus-Konstrukten mit einem Titer von 10^5 pfu/Auge infiziert. Sieben Tage nach der Infektion wurde das äußere Erscheinungsbild der Tiere dokumentiert. (A) Uninfiziertes Versuchstier, (B) HSV2 ICP0-GFP infiziertes Tier, und (C) HSV2 ICP0^{N_xN1/2}-GFP infiziertes Tier. Der weiße Pfeil markiert haarlose Stellen am Auge aufgrund der Infektion, schwarze Pfeile markieren die angeschwollenen Schnauzen der infizierten Tiere. Aufnahmen mit der Galaxy S5neo Kamera: 16 Megapixeln Auflösung und 1/3.1-Zoll-Sensor.

4.3.7 Ausbreitung und akute Replikation der Mutanten in den innervierenden Geweben

Um zu überprüfen, ob die SIAH-bindedefiziente Doppelmutanten in der Lage war, nach einer Primärinfektion in der Cornea in die innervierenden Nervenendungen der Trigeminalganglien (TG) einzuwandern und weiter bis in den Hirnstamm (ZNS) zu gelangen, wurde an Tag 3, 5 und 7 *p.i.* die Viruslast in den jeweiligen Geweben bestimmt (3.5.3, 3.5.4). In früheren Publikationen konnte gezeigt werden, dass erste Viruspartikel 2-3 Tage *p.i.* im TG nachweisbar sind (Nicoll et al., 2012) und ab Tag 6 *p.i.* durch das murine Immunsystem, das heißt durch Infiltration von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen in die infizierten TG, beseitigt werden (Divito et al., 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Viruslast im Gewebe zunächst über die Virustiter mittels *Plaque Assay* bestimmt (3.3.7, 3.5.3). An Tag 3 *p.i.* konnten im TG, und vereinzelt in geringen Mengen auch im Hirnstamm, Viruspartikel der N_xN1/2-GFP Mutante und des HSV2 Wildtyps detektiert werden. Die durchschnittlichen Titer der beiden Konstrukte waren an Tag 3 *p.i.* in beiden Geweben vergleichbar. An Tag 5 *p.i.* waren die durchschnittlichen

Virustiter der SIAH-bindedefizienten Mutante in den TGs signifikant um eine log-Stufe niedriger als die von HSV2 ICP0-GFP. Die Titer glichen sich erst an Tag 7 *p.i.* wieder an, als die Viruslast beider Konstrukte bereits deutlich abgenommen hatte (Abbildung 51 A). Ähnliches zeigte sich bei den Virustitern im Hirnstamm. An Tag 5 *p.i.* waren die Titer von HSV2 ICP0-GFP signifikant höher als die der NxN1/2-GFP Mutante, wenn gleich die Differenz im TG nochmals um etwa eine halbe log-Stufe erhöht war. Im Hirnstamm war der signifikante Unterschied auch noch an Tag 7 *p.i.* zu beobachten (Abbildung 51 B).

An Tag 5 *p.i.* wurde in zwei unabhängigen Experimenten HSV2 ICP0^{NxN1}-GFP mituntersucht. Die NxN1-Mutante erreichte im TG ähnliche hohe Titer wie der HSV2 ICP0-GFP Wildtyp, im Hirnstamm waren die Titer der NxN1-Mutante jedoch signifikant niedriger als die von HSV2 ICP0-GFP (Abbildung 51 C). In den unabhängig durchgeführten Experimenten waren die durchschnittlichen Titerunterschiede zwischen der NxN1/2-GFP Mutante und dem Wildtyp geringer, mit einer Signifikanz von ** $p < 0,01$ anstelle von *** $p < 0,001$ im TG und * $p < 0,05$ anstelle von ** $p < 0,01$ im Hirnstamm (Abbildung 51). Hier war jedoch die Stichprobe mit $n=10$ je Viruskonstrukt geringer als bei den vorherigen Experimenten mit $n=20$ an Tag 5 *p.i.* (Abbildung 51 A-B).

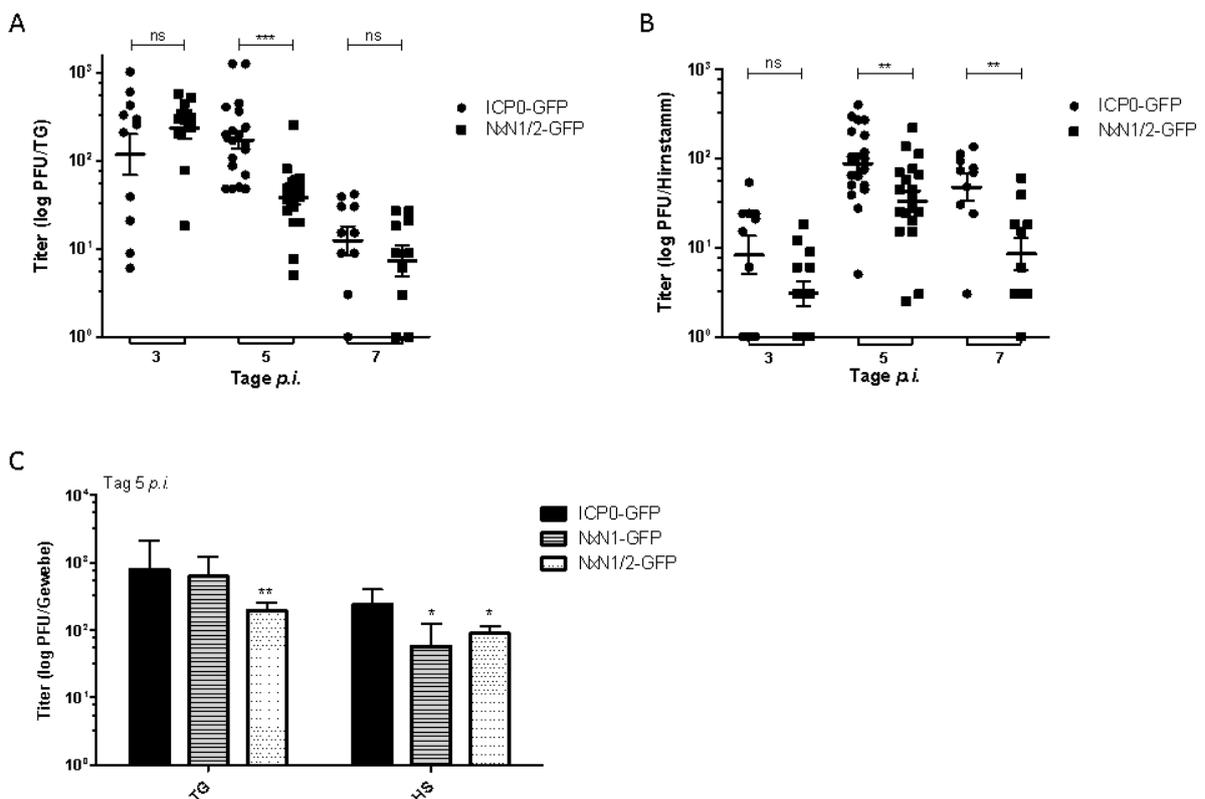


Abbildung 51. Virusaussbreitung und Replikation im PNS und ZNS. (A-B) C57Bl/6J Mäuse wurden mit HSV2 ICP0-GFP (ICP0-GFP) oder HSV2 ICP0^{NxN1/2}-GFP (NxN1/2-GFP) infiziert. An

Ergebnisse

Tag 3, 5 und 7 nach Infektion (*p.i.*) wurden (**A**) die Trigeminiernerven (TG beziehungsweise das periphere Nervensystem (PNS)) homogenisiert oder (**B**) der Hirnstamm (beziehungsweise das zentrale Nervensystem (ZNS)) homogenisiert und die Virustiter auf Verozellen bestimmt. Jedes Symbol repräsentiert den Titer eines individuellen Versuchstieres. Angezeigt ist der Mittelwert \pm SEM der Titer, die vier unabhängigen Experimenten entstammen. Die Titer sind logarithmisch (\log_{10}) dargestellt. Signifikanzen wurden mit Hilfe des Mann-Whitney U Tests berechnet, mit *** $p < 0,001$ und ** $p < 0,01$, ns= nicht signifikant. (**C**) C57Bl/6J Mäuse wurden mit den angezeigten Viren okular infiziert. An Tag 5 *p.i.* wurden die TGs und der Hirnstamm (HS) der Versuchstiere homogenisiert und die Virustiter auf Verozellen bestimmt. Balkendiagramme repräsentieren den Mittelwert \pm SEM der jeweiligen Virustiter (jeweils $n=10$). Die Ergebnisse entstammen zwei unabhängigen Experimenten. Signifikanzen gegenüber HSV2 ICP0-GFP wurden mittels *one-way* ANOVA und Dunn's *Post-test* berechnet, mit ** $p < 0,01$ und * $p < 0,05$.

Mit Hilfe von *Plaque Assays* (3.3.7) werden ausschließlich infektiöse Viruspartikel erfasst. Um die absolute Viruslast zu bestimmen, das heißt auch die DNA-Kopien anderer nicht-infektiöser Viruspartikel (Döhner et al., 2006) zu messen, wurde die Hälfte der jeweiligen Gewebepräparationen nach Homogenisierung lysiert und genomische und virale DNA daraus isoliert (3.5.4). Mittels quantitativer *Realtime-PCR* (3.2.7) wurde die Anzahl der viralen Genomkopien anhand der Kopien des Gens *UL27*, welches Glykoprotein B (gB) kodiert, bestimmt und auf Sequenzen des zellulären murinen Haushaltsgens β -Actin normalisiert (3.2.7). Die Werte wurden anschließend auf einen als 100% festgelegten Referenzwert (eine Probe, die bei jeder PCR mitgemessen wurde) bezogen. Mittels PCR konnte gleichzeitig überprüft werden, ob die zuvor gemessenen Virustiter nicht aufgrund von unvollständiger Homogenisierung der Gewebe beeinflusst waren. Bei der Isolierung der DNA zeigte sich, dass die gesamte DNA-Ausbeute aus den Geweben sehr gering war und eine Messung der viralen DNA, beispielsweise im TG, an der Nachweisgrenze stattfand. Die Ergebnisse spiegelten jedoch die Resultate der Virustiter (infektiöser Partikel) wider, wenngleich die Unterschiede zwischen der *NxN1/2*-Mutante und dem ICP0-GFP Wildtyp bei der Bestimmung der viralen Genomkopien pro Gewebe nicht überaus signifikant waren. Die DNA-Ausbeute war im Hirnstamm geringfügig höher und die Messung der viralen DNA-Kopien/Gewebe somit etwas genauer. Die Anzahl der gB-Kopien des HSV2 ICP0-GFP Wildtyps waren im Hirnstamm an Tag 5 im Durchschnitt um das 4-fache und an Tag 7 *p.i.* um etwa das 3-fache höher als die gB-Kopienzahl der *NxN1/2*-GFP Mutante. In Wildtyp-infizierten TGs konnte an Tag 5 *p.i.* im Durchschnitt doppelt so viel gB gemessen werden wie in HSV2 ICP0^{*NxN1/2*}-GFP infizierten TGs.

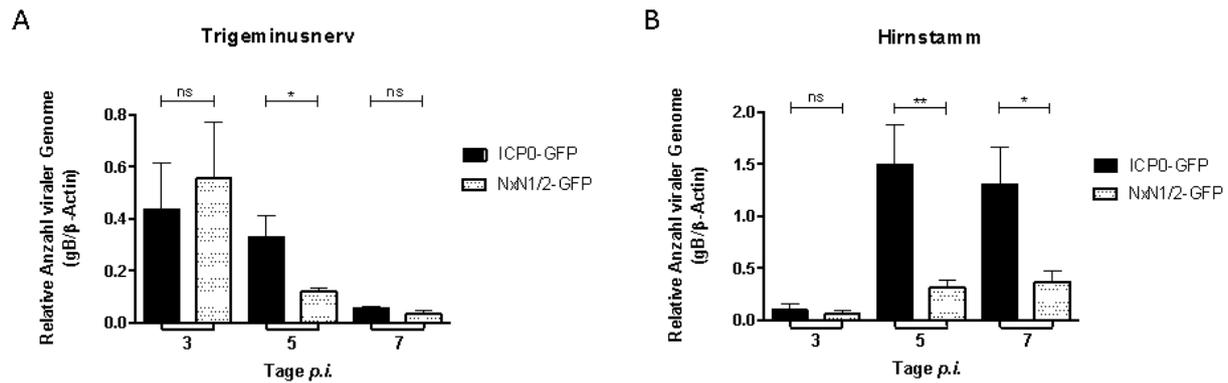


Abbildung 52. Replikation der HSV2 Konstrukte im akut infizierten Gewebe. Gewebe der mit HSV2 ICP0-GFP (ICP0-GFP) oder HSV2 ICP0^{NxN1/2}-GFP (NxN1/2-GFP) infizierten C57Bl/6J Mäuse wurde an Tag 3, 5 und 7 nach Infektion (*p.i.*) homogenisiert und die Gesamt-DNA isoliert. Mittels Taqman-PCR wurden die viralen DNA-Kopien von *U_L27*-Sequenzen, kodierend für gB, im Gewebe bestimmt und auf Sequenzen des zellulären β-Actins normalisiert. **(A)** Virale DNA-Kopien im Trigeminusnerv. Untersuchte Versuchstiere: n=5 an Tag 3 *p.i.*, n=8 an Tag 5 *p.i.* und n=4 an Tag 7 *p.i.*, aus zwei unabhängigen Experimenten. **(B)** Virale DNA-Kopien im Hirnstamm, mit n=10 Versuchstieren an Tag 3 *p.i.*, n=15 an Tag 5 *p.i.* und n=8 an Tag 7 *p.i.*. Die Ergebnisse entstammen drei unabhängigen Experimenten. Jeder Balken stellt den Mittelwert der relativen viralen DNA-Kopien (Genome) bezogen auf einen Referenzwert (ICP0-GFP infizierte Gewebeprobe an Tag 5 *p.i.*) +/- Standardabweichung dar. Signifikanzen wurden mittels Mann-Whitney U Test bestimmt. **(A)** Signifikanz *p= 0,049. **(B)** Signifikanzen mit ** p=0,0022 und * p= 0,0248, ns= nicht signifikant.

4.3.7.1 Immunhistologische Untersuchung der infizierten Trigeminusnerven

Um die Infektion des peripheren Nervensystems durch HSV2 ICP0-GFP und die SIAH-bindedefiziente Doppelmutante, beziehungsweise die Lokalisierung der Viren, in den Trigeminusnerven zu identifizieren und visualisieren, wurden an Tag 3 und 5 *p.i.* Gewebeschnitte (10 μm Dicke) von PFA-fixierten Trigeminusnerven entlang der Längsachse angefertigt. Die Schnitte wurden anschließend mit einem polyklonalen HSV2 Antikörper markiert (3.5.7). Parallel wurden als Kontrolle uninfizierte TG mit demselben Antikörper behandelt. Es zeigte sich, dass der Antikörper in den uninfizierten Ganglien keine Zellen markierte. In den HSV2 ICP0^{NxN1/2}-GFP und HSV2 ICP0-GFP infizierten Ganglienpräparaten wurden an Tag 3 und 5 *p.i.* einige sensorische Neurone durch den Antikörper markiert (Rotfärbung). Die Markierung erfolgte in den untersuchten Schnitten über das Ganglion verteilt, zum Teil in stark gebündelten Bereichen (Abbildung 53 A-D; Abbildung 54), was eine aktive Replikation beider Konstrukte andeutete.

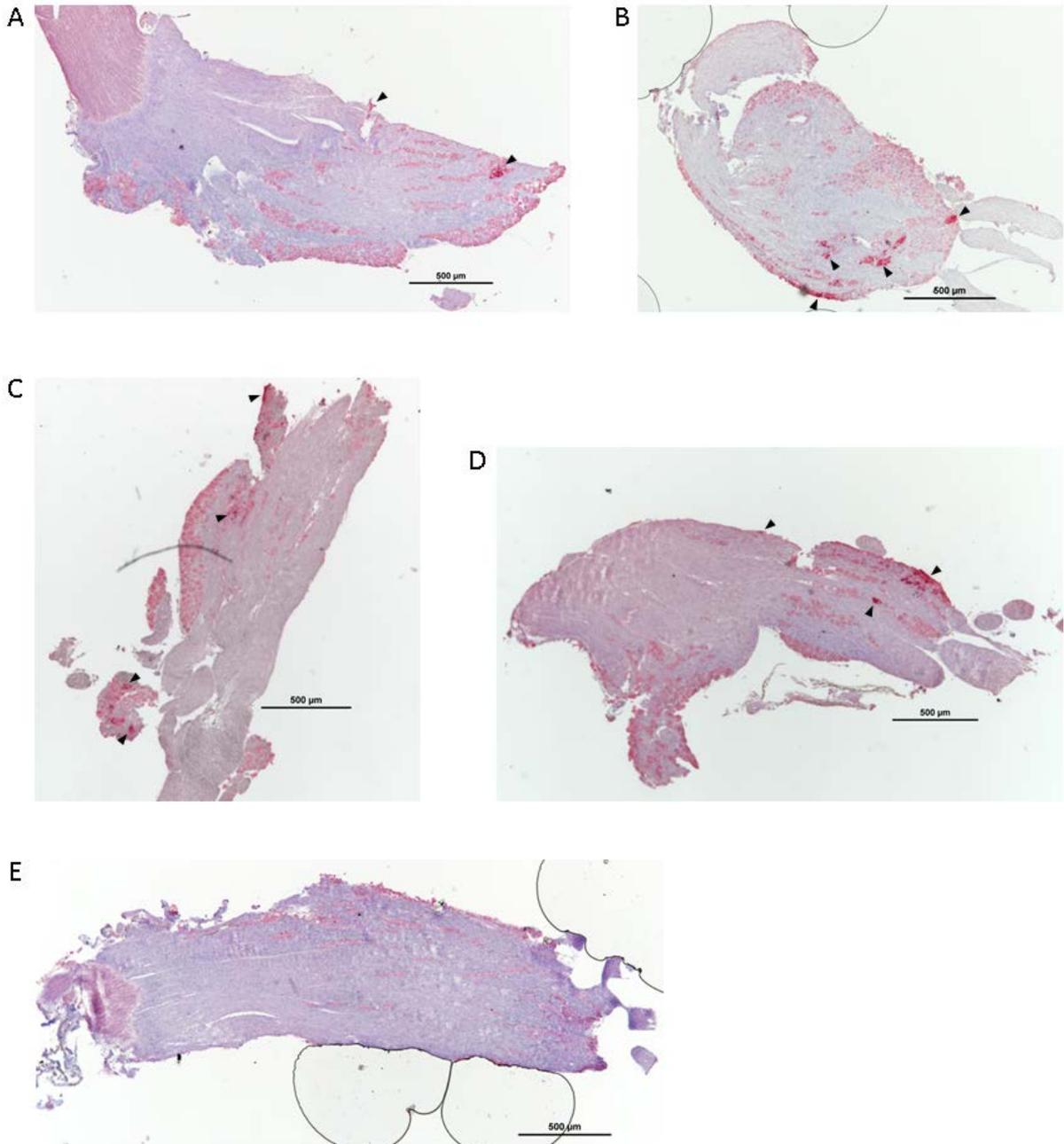


Abbildung 53. Immunhistologische Färbung infizierter Trigeminierven, Tage drei *p.i.* Drei Tage nach Infektion von C57Bl/6J Mäusen mit HSV2 ICP0-GFP (A und B) und HSV2-ICP0^{NxN1/2}-GFP (C und D) wurden die Trigeminierven isoliert, in 4% PFA fixiert und 10 µm Längsschnitte angefertigt. (E). Als Kontrolle dienten Schnitte von nicht-infizierten C57Bl/6J Versuchstieren. Die Schnitte wurden anschließend mit polyklonalem HSV2 AK inkubiert. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hämatoxylin (blau). Schwarze Pfeile kennzeichnen AK-markierte Zellen. Die Aufnahmen erfolgten mit 4x Objektiv am Mikroskop Nikon Eclipse Ni., Größenbalken: 500 µm.

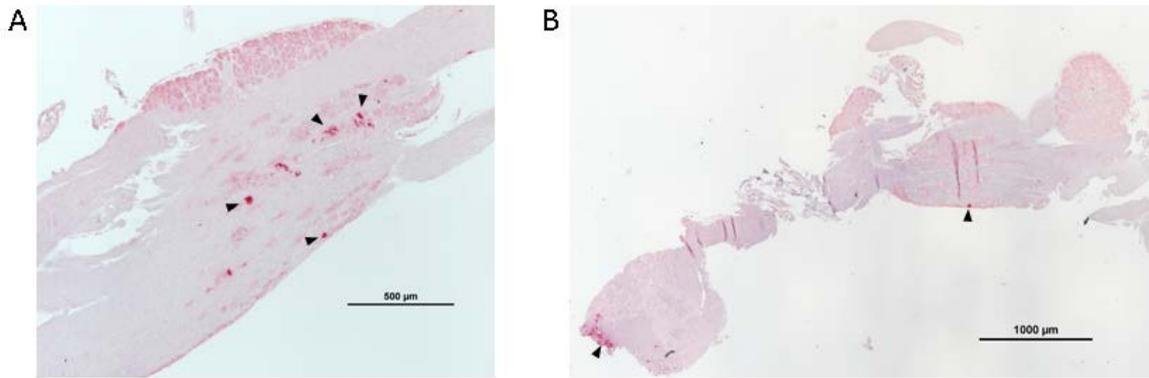


Abbildung 54. Immunhistologische Färbung der infizierten Trigeminierven, fünf Tage *p.i.* Aus (A) HSV2 ICP0-GFP und (B) HSV2 ICP0^{NxN1/2}-GFP infizierten C57Bl/6J Mäuse wurden 5 Tage nach Infektion die Trigeminierven isoliert, und in 4% PFA fixiert. Anschließend wurden Längsschnitte von 10 µm Dicke angefertigt. Diese wurden mit polyklonalem HSV2 Antikörper inkubiert und Zellkerne mit Hämatoxylin angefärbt (geblaut). Die Aufnahmen erfolgten mit 2x und 4x Objektiv am Mikroskop Nikon Eclipse Ni, mit Größenbalken: 1000 µm bei der 2x Vergrößerung und 500 µm beim 4x Objektiv.

Bei einer höheren Auflösung wurden die infizierten sensorischen Neurone in den hergestellten Schnittpräparationen von Tag 3 *p.i.* genauer untersucht. Dabei galt es zu überprüfen, ob der Antikörper in HSV2 ICP0^{NxN1/2}-GFP infizierten Zellen gegebenenfalls andere Bereiche markierte (z.B. ausschließliche Kernlokalisation) als in Wildtyp-infizierten sensorischen Neuronen. Mit einem 40x Objektiv waren die sensorischen Neurone mit ihren Zellkernen und die Nervenfasern deutlich sichtbar (Abbildung 55 A). Bei der gegebenen Auflösung konnten keine Unterschiede in den markierten Zellbereichen zwischen einer HSV2 ICP0-GFP und einer HSV2 ICP0^{NxN1/2}-GFP Infektion beobachtet werden. Bei beiden Viren färbte der Antikörper in den meisten Zellen den Zellkern und das Zytoplasma (Abbildung 55 B-C).

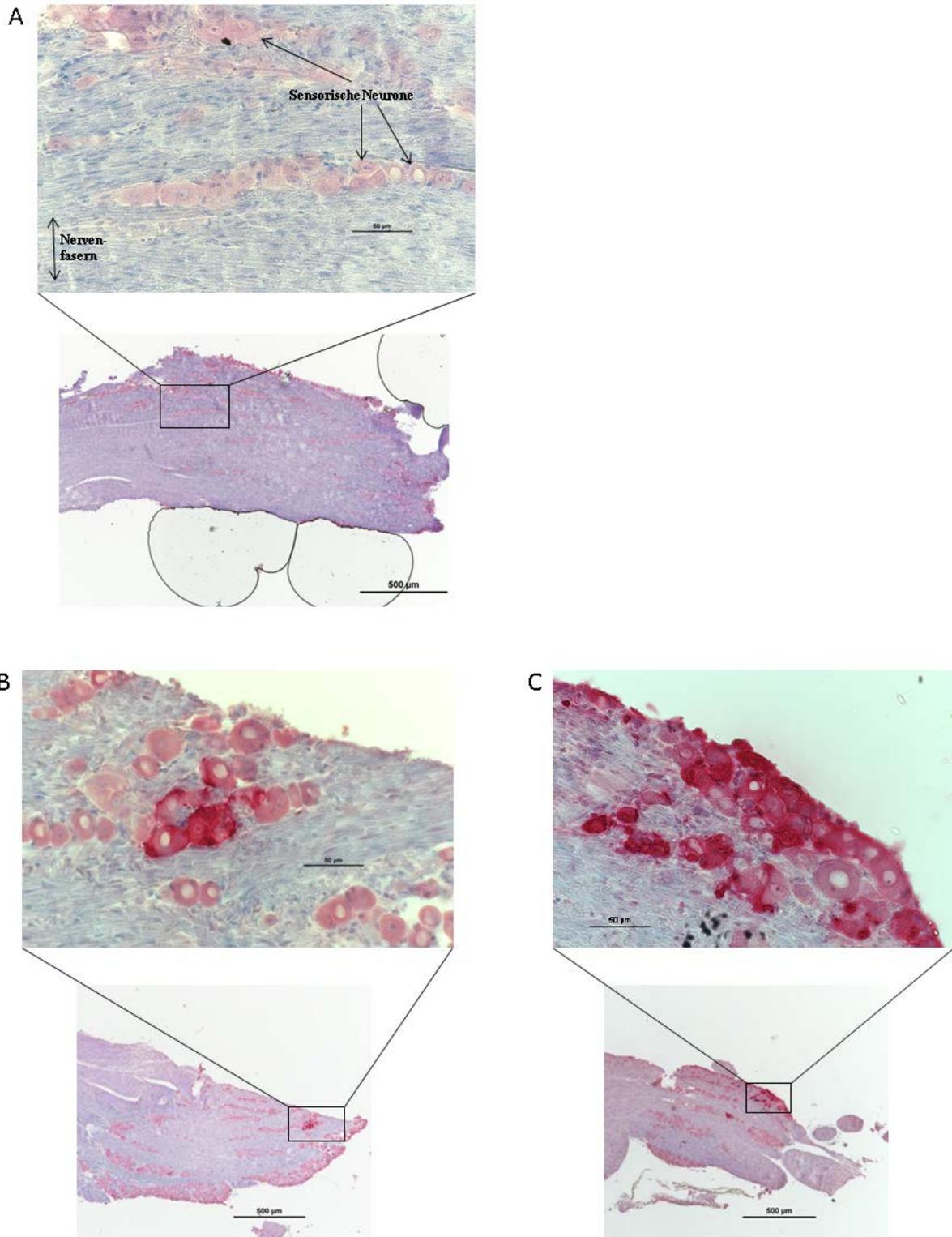


Abbildung 55. Immunhistologische Färbung HSV2 infizierter Trigeminusnerven. Aus (A) nicht-infizierten, (B) mit HSV2 ICP0-GFP infizierten und (C) HSV2 ICP0^{N_xN1/2}-GFP infizierten C57B/6J Mäusen wurden 3 Tage nach Infektion die Trigeminusnerven isoliert und in 4 % PFA fixiert. Anschließend wurden Längsschnitte mit 10 µm Dicke angefertigt. Die Schnitte wurden mit polyklonalem HSV2 Antikörper inkubiert und Zellkerne mit Hämatoxylin angefärbt (blau). Die Aufnahmen erfolgten mit 4x und 40x Objektiv am Mikroskop Nikon Eclipse Ni, mit Größenbalken: 500 µm bei 4x Vergrößerung, und 50 µm bei 40x Vergrößerung. Pfeile in (A) kennzeichnen sensorische Nervenzellen (rötliche Färbung), sowie Nervenfasern (grau-bläuliche Färbung).

4.3.8 Virale RNA-Expression der HSV2 Konstrukte im Hirnstamm

Um eine Aussage über die Transkriptionsrate viraler Gene (wie U_L27) bei fehlender ICP0:SIAH Interaktion im akut infizierten murinen Gewebe treffen zu können, wurde an Tag 3, 5 und 7 *p.i.* die gesamte RNA aus dem Hirnstamm von HSV2 ICP0^{NxN1/2}-GFP und (als Kontrolle) von HSV2 ICP0-GFP infizierten Mäusen isoliert, und 1 μ g RNA anschließend in cDNA umgeschrieben (3.5.5.2). Die cDNA-Kopien viraler gB Sequenzen pro Hirnstamm wurden mittels Taqman PCR (3.2.7) gemessen und auf Sequenzen des zellulären (murinen) GAPDH normalisiert. Die Werte wurden anschließend auf einen als 100% festgelegten Referenzwert bezogen. Bei einem Vergleich der beiden Virus-Konstrukte zu den gegebenen Zeitpunkten konnte gezeigt werden, dass an Tag 3 *p.i.* im Durchschnitt dieselbe Anzahl an gB RNA-Kopien im Wildtyp-GFP infizierten und HSV2 ICP0^{NxN1/2}-GFP infizierten Gewebe vorlag. An Tag 5 *p.i.* wurde in HSV2 ICP0-GFP infizierten Hirnstammproben etwa 3,5x soviel virale RNA gemessen wie Geweben die mit der NxN1/2-GFP Mutante infiziert wurden. Der Unterschied wurde an Tag 7 *p.i.* noch einmal signifikanter, hier lagen in Wildtyp-infizierten Geweben im Durchschnitt 8x so viele RNA-Kopien vor wie in Geweben, die mit der SIAH-bindedefizienten Doppelmutante infiziert waren (Abbildung 56).

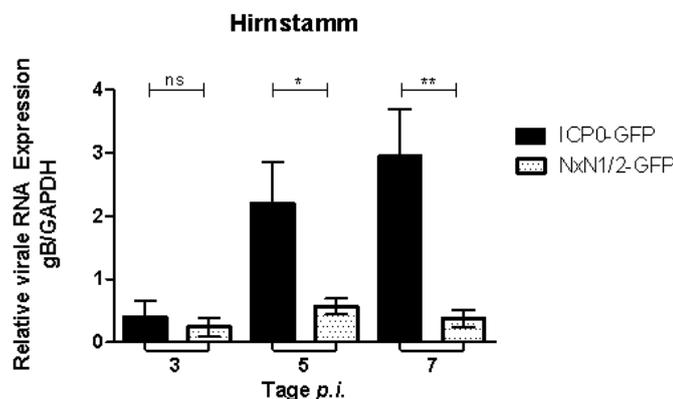


Abbildung 56. RNA Expression der HSV2 Konstrukte im akut infizierten Hirnstamm. Der Hirnstamm der mit HSV2 ICP0-GFP (ICP0-GFP) oder HSV2 ICP0^{NxN1/2}-GFP (NxN1/2-GFP) infizierten C57Bl/6J Mäuse wurde an Tag 3, 5 und 7 nach Infektion (*p.i.*) homogenisiert und die gesamte RNA isoliert. Davon wurden 1 μ g RNA in cDNA umgeschrieben. Mittels Taqman-PCR wurden die viralen U_L27 cDNA -Kopien, kodierend für gB, bestimmt und auf cDNA Sequenzen des zellulären GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase) normalisiert. Jeder Balken stellt den Mittelwert der relativen viralen RNA-Kopien bezogen auf einen Referenzwert (eine ICP0-GFP infizierte Gewebeprobe an Tag 5 *p.i.*, festgelegt als 100%) +/- ihre Standardabweichung dar. Untersuchte Versuchstiere: n=5 an Tag 3 *p.i.*, n= 10 an Tag 5 *p.i.* und n=6 an Tag 7 *p.i.*. Die Ergebnisse entstammen zwei unabhängigen Experimenten. Signifikanzen wurden mittels Mann-Whitney U Test bestimmt, mit * p=0,0147, ** p= 0,0087 und ns= nicht signifikant.

4.3.9 Reaktivierung der SIAH-bindedefizienten ICP0-Mutanten in latent infizierten Trigeminiernerven

Um zu testen, ob eine fehlende ICP0:SIAH Interaktion zur Inhibierung der Latenzetablierung in den TGs führte, beziehungsweise zu einem Abbruch der Reaktivierung aus der Latenz, wurden 40 Tage nach Infektion (*p.i.*) *ex vivo* Reaktivierungsexperimente mit latent infizierten Trigeminiern-Explantaten (3.5.8; 4.3.4) durchgeführt. Die Reaktivierungsrate und Kinetik von HSV2 ICP0-GFP Wildtyp und der SIAH-bindedefiziente Doppelmutante wurden jeweils in drei unabhängigen Experimenten miteinander verglichen, indem in regelmäßigen Abständen der Suspensionsüberstand der Explantate mittels *Plaque Assay* (auf Verozellen) auf infektiöses Virus überprüft wurde. Es zeigte sich, dass bei HSV2 ICP0-GFP 4-5 Tage *p.e.* und bei der NxN1/2-GFP Mutante 5 Tage *p.e.*, infektiöse Viruspartikel im Medium nachweisbar waren. Im ersten Experiment konnten nach 10 Tagen in 90% aller Wildtyp HSV2- Überstände infektiöse Partikel detektiert werden, in den darauffolgenden Experimenten lag die finale Reaktivierung von HSV2 ICP0-GFP bei 80% beziehungsweise bei 60%. Ähnlich stellte es sich bei der SIAH-bindedefizienten Doppelmutante dar. Hier lag die finale Reaktivierungsquote im ersten Experiment ebenfalls bei 90%, im zweiten bei 70% und im dritten Experiment bei 50%. Die Doppelmutante war somit in ihrer Reaktivierungseffizienz im Vergleich zum ICP0-GFP Wildtyp bestenfalls nur sehr gering beeinträchtigt. In zwei der Experimente wurde zudem die NxN1-GFP Mutante untersucht. Auch hier konnte 4-5 Tage *p.e.* Virus im Überstand nachgewiesen werden, und die Reaktivierungsquote lag im ersten Experiment 10 Tage nach der Explantation bei 90% und im zweiten Experiment bei 70%.

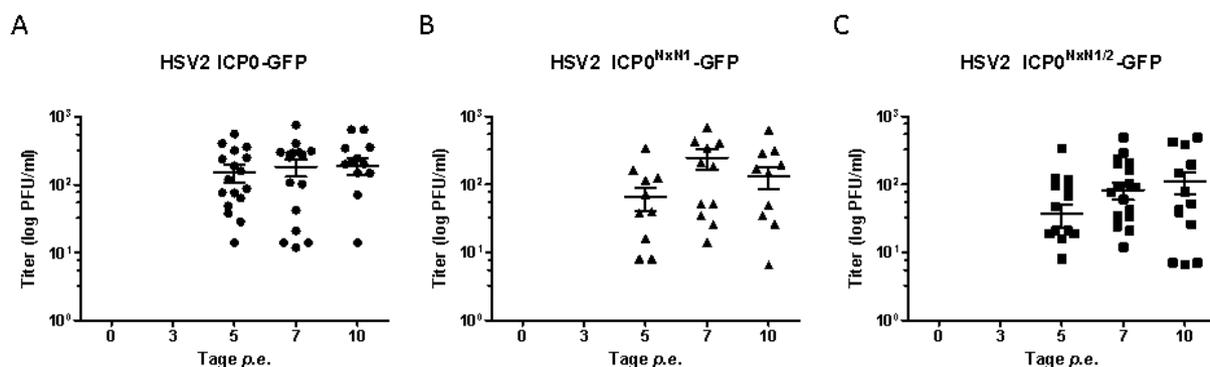


Abbildung 57. Ex Vivo Reaktivierung von SIAH-bindedefizienten ICP0-GFP Mutanten. Aus latent mit (A) HSV2 ICP0-GFP, (B) HSV2 ICP0^{NxN1}-GFP und (C) HSV2 ICP0^{NxN1/2}-GFP infizierten Mäusen wurden 40 Tage *p.i.* die Trigeminiernerven präpariert und in Kulturmedium bei 37°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten (Tage *p.e.*) wurde über die Messung infektiöser Partikel im Ganglienüberstand eine Reaktivierung der Konstrukte überprüft. Die Titer der reaktivierten Viren wurden auf Verozellen bestimmt und auf eine logarithmische (log₁₀) Skala aufgetragen. Jedes Zeichen

steht für den Titer eines Ganglienüberstands. Mit angegeben ist der Mittelwert +/- SEM der Virustiter zum jeweiligen Zeitpunkt.

Beim Vergleich der Virustiter der reaktivierten Konstrukte im Ganglienüberstand zeigte sich, dass die durchschnittlichen Titer von HSV2 ICP0-GFP über den gesamten Messzeitraum höher waren als die durchschnittlichen Titer der SIAH-bindedefizienten Doppelmutante. 5 Tage *p.e.* betrug der Unterschied fast eine log-Stufe, und an Tag 7 *p.e.* waren die durchschnittlichen Wildtyp-titer um etwa eine halbe log-Stufe höher als die der NxN1/2-GFP Mutante. Auch die durchschnittlichen Titer der NxN1-GFP Mutante waren an Tag 5 und 10 *p.e.* niedriger als die des Wildtyps, jedoch war der Unterschied zum Wildtyp geringer als bei der NxN1/2-GFP Mutante (Abbildung 57).

4.3.10 *In vivo* Analyse der über *En Passant* Mutagenese hergestellten ICP0-Mutanten

Im folgenden Experiment wurde der *in vivo* Phänotyp der SIAH-bindedefizienten Doppelmutante analysiert, die über *En Passant* Mutagenese generiert wurde. Hierbei wurde das Ausgangswildtypvirus HSV2(MS)Lox mit der SIAH-bindedefizienten Mutante HSV2 ICP0^{NxN1/2} [2.1] im okularen Mausmodell wie in 4.3.6 verglichen. Ein Schwerpunkt des Experiments bestand darin zu überprüfen, ob die NxN1/2-Mutante *in vivo* in ihrer Replikation deutlich attenuiert war, was ein Hinweis für eine Deletion des ori_L sein könnte (Balliet & Schaffer, 2006). Für die Analyse wurden jeweils 18 Versuchstiere mit entweder HSV2 Lox oder der Doppelmutante am Auge infiziert (3.5.1) und zuerst der akute Infektionsverlauf im Augenepithel nach 3.5.2 protokolliert. Bei beiden Konstrukten konnten nach 24 Stunden infektiöse Viruspartikel in der Tränenflüssigkeit nachgewiesen werden. Es zeigte sich jedoch, dass die viralen Titer der NxN1/2-Mutante ab dem ersten Tag, das heißt ab 24 Stunden *p.i.*, signifikant um bis zu eine log-Stufe niedriger waren als die Titer des Wildtyps HSV2 Lox (Abbildung 58). Bei einem *in silico* Vergleich der Titer der homolog rekombinierten Doppelmutante NxN1/2-GFP und der *En Passant* Mutante NxN1/2 [2.1] in der Tränenflüssigkeit war zu erkennen, dass die *En Passant* Mutante noch einmal deutlich niedrigere Titer erzielte als die homolog rekombinierte Mutante. An Tag 2 *p.i.* waren die durchschnittlichen Titer der *En Passant* Mutante signifikant niedriger als die von NxN1/2-GFP (siehe Abbildung 63, Anhang).

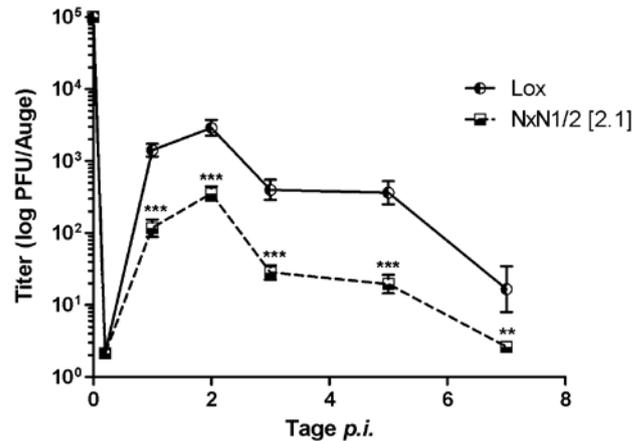


Abbildung 58. Replikation der *En Passant* Konstrukte im Augenepithel. Beide Augen von C57Bl/6J Mäusen wurden mit HSV2 (MS) Lox (Lox) oder HSV2 ICP0^{NxN1/2} Klon [2.1] (NxN1/2 [2.1]) mit einem Titer von 1×10^5 pfu/Auge infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten (Tage *p.i.*) wurden die Virustiter in der Tränenflüssigkeit mittels *Plaque Assay* auf Verozellen bestimmt. Die einzelnen Werte stellen den Mittelwert \pm SEM der Titer zum jeweiligen Zeitpunkt dar. Gezeigt sind die Ergebnisse eines Experiments mit $n=18$ Versuchstieren je Mutante. Signifikanzen wurden mit Hilfe des *two-way* ANOVA berechnet. Die Titer wurden logarithmisch (\log_{10}) als Funktion der Zeit angegeben.

Parallel wurde das äußere Erscheinungsbild der HSV2 Lox und HSV2 ICP0^{NxN1/2} infizierten Tiere protokolliert. Drei Tage nach der Infektion wurden erste Unterschiede zwischen den Mäusen deutlich, die sich im Laufe der 7 Tage verstärkten. Während die HSV2 ICP0^{NxN1/2} [2.1] infizierten Tiere äußerlich keine großen Unterschiede zu uninfizierten Tieren aufwiesen, mit Ausnahme des verstärkten Putzverhaltens, hatten die HSV2 Lox infizierten Tiere wie in 4.3.2 beschrieben große haarlose und teils offene Stellen im Gesicht, teilweise verklebte Augen und angeschwollene Schnauzen (Abbildung 59).

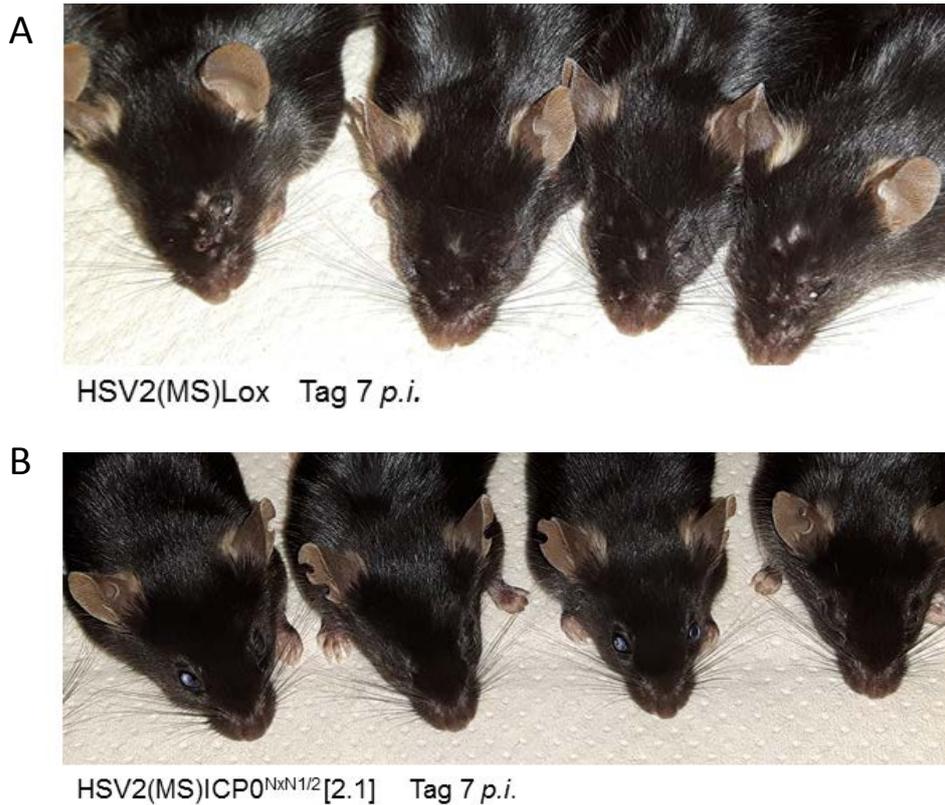


Abbildung 59. Äußeres Erscheinungsbild der BAC-HSV2 ICP0 infizierten Mäuse. 6-8 Wochen alte C57Bl/6J Mäuse wurden über die okuläre Route mit 10^5 pfu/Auge HSV2(MS)Lox (linkes Bild) oder der SIAH bindedefizienten Mutante HSV2(MS)ICP0^{N_{xN1/2}} Klon [2.1] (rechtes Bild) infiziert. An Tag 7 nach Infektion (*p.i.*) wurden die Tiere fotografisch dokumentiert. HSV2(MS)Lox infizierte Mäuse hatten haarlose offene Stellen im Gesicht, geschwollene Schnauzen und verklebte Augen. HSV2 ICP0^{N_{xN1/2}} infizierte Tiere hatten teils trüb verfärbte Augen jedoch keine weiteren erkennbaren Wunden.

Im nächsten Schritt wurden an Tag 3, 5 und 7 nach Infektion jeweils 6 der insgesamt 18 infizierten Tiere für eine Analyse der Viruslast im Trigeminierv und Hirnstamm nach 3.5.3 durchgeführt. Bei einer Messung der viralen Titer in den Trigeminiervnerven zeigte sich, dass verglichen mit HSV2 Lox infizierten Mäusen bei der N_{xN1/2} [2.1]-Mutante zu allen drei Messzeitpunkten signifikant geringere Mengen infektiöse Viruspartikel im Gewebe nachzuweisen waren. An Tag 3 und 5 *p.i.* betrug die Differenz etwa 1,5 log-Stufen und an Tag 7 *p.i.* zwei log-Stufen, wobei bei der N_{xN1/2}-Mutante zu diesem Zeitpunkt (mit einer Ausnahme) bereits kein Virus mehr im TG detektiert werden konnte (Abbildung 60 A). Ähnlich signifikante Unterschiede in den Virustitern waren im Hirnstamm zu beobachten. An Tag 3 *p.i.* waren im Hirnstamm nur bei zwei HSV2 ICP0^{N_{xN1/2}}-infizierten Tieren geringfügige Mengen Virus nachzuweisen, bei einer HSV2 Lox Infektion wurden hingegen alle Tiere positiv auf Virus getestet, wenngleich auch hier die Titer sehr gering waren. Die höchste Titerdifferenz zwischen HSV2 Lox und der SIAH-bindedefizienten Doppelmutante war im

Ergebnisse

Hirnstamm an Tag 5 *p.i.* zu sehen und betrug durchschnittlich zwei log-Stufen (Abbildung 60 B).

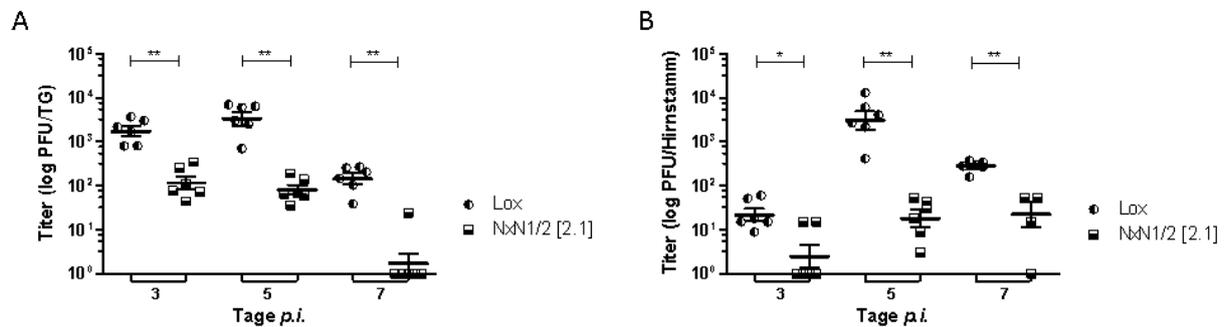


Abbildung 60. Ausbreitung und Replikation der HSV2 BAC-Konstrukte im Gewebe. C57Bl/6J Mäuse wurden mit HSV2(MS)Lox (Lox) oder HSV2 ICP0^{NxN1/2} Klon [2.1] (NxN1/2 [2.1]) infiziert. An Tag 3, 5 und 7 nach Infektion (*p.i.*) wurden (A) die Trigemiusnerven (TG) homogenisiert und (B) der Hirnstamm homogenisiert, und die Virustiter beider Gewebe auf Verozellen bestimmt. Jedes Symbol repräsentiert den Virustiter eines individuellen Versuchstiers. Zusätzlich angezeigt sind der Mittelwert \pm SEM der Titer ($n=6$ je Mutante und Messzeitpunkt). Die Daten entstammen einem Experiment. Die Titer wurden auf einer logarithmischen (\log_{10}) Skala angegeben. Signifikanzen wurden mit Hilfe des Mann-Whitney U Tests berechnet, mit * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$.

Neben der Bestimmung der Viruslast im Gewebe über die Virustiter (infektiöse Partikel) wurde wie in 4.3.7 und 4.3.8 die virale DNA- und RNA-Expression mittels *Realtime*-PCR bestimmt. Auch hier wurde zur Bestimmung die Anzahl viraler *UL27* (gB) Kopien gemessen und auf die Kopien von zellulärem β -Actin (DNA) beziehungsweise GAPDH (RNA) normalisiert. Die DNA-Expression der NxN1/2-Mutante war im Trigemiusnerv an Tag 5 und 7 *p.i.* signifikant geringer als die von HSV2 Lox (Abbildung 60 A). Im Hirnstamm war der signifikante Unterschied bereits an Tag 3 *p.i.* zu messen, wobei die DNA-Expression beider Konstrukte an Tag 3 in den untersuchten Geweben noch sehr gering war. Im Hirnstamm konnte bei einem Großteil der NxN1/2-infizierten Mäusen zu keinem der drei Messzeitpunkte virale DNA nachgewiesen werden (Abbildung 60 B).

Bei der Messung der gB cDNA (RNA) Kopien im Trigemiusnerv und Hirnstamm zeigte die NxN1/2-Mutante zu jedem Zeitpunkt im Durchschnitt eine geringere RNA-Expression als HSV2 Lox (Abbildung 60 C-D). Im Trigemiusnerv war der Unterschied an Tag 3 und 5 *p.i.* jedoch nicht signifikant, wobei an Tag 7 die RNA-Expression beider Konstrukte bereits deutlich absank. Im Hirnstamm war an Tag 5 und 7 *p.i.* die Anzahl der HSV2 Lox RNA-Kopien signifikant höher als die der SIAH-bindedefizienten Mutante. Wie bereits bei der DNA-Expression war in einem Großteil der NxN1/2-infizierten Mäusen im Hirnstamm keine virale RNA nachweisbar (Abbildung 60 D).

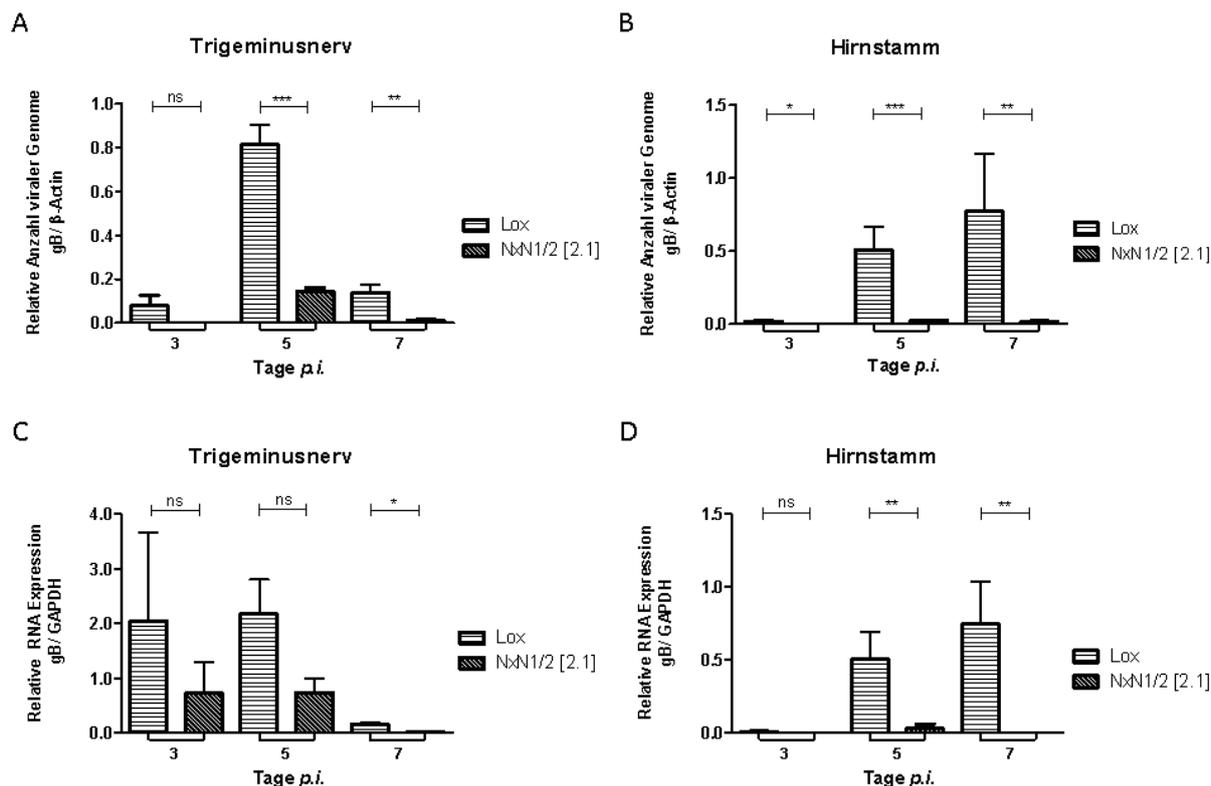


Abbildung 61. Replikation und Genexpression der *En Passant* ICP0-Mutanten im akut infizierten Gewebe. C57Bl/6J Mäuse wurden mit HSV2(MS)Lox (Lox) oder HSV2 ICP0^{NxN1/2} Klon [2.1] (NxN1/2 [2.1]) infiziert. An Tag 3, 5 und 7 nach Infektion (*p.i.*) wurden die Trigeminusnerven (A,C) und der Hirnstamm (B,D) homogenisiert. (A-B) Aus dem Gewebe wurde die Gesamt-DNA isoliert. Mittels Taqman-PCR wurden die viralen DNA-Kopien des Gens *U_L27*, das gB kodiert, bestimmt und auf zelluläres β -Actin normalisiert. (C-D) Aus dem Gewebe wurde RNA isoliert und mittels Taqman-PCR virale *U_L27* RNA-Kopien bestimmt und auf zelluläre GAPDH-Sequenzen normalisiert. Die Balkendiagramme stellen den relativen Mittelwert der RNA-Kopien (bezogen auf einen Referenzwert) +/- Standardabweichung dar; Versuchstiere: n=4 and Tag 3, n=8 an Tag 5, und n=5 an Tag 7 *p.i.*. Signifikanzen wurden mit dem Mann-Whitney U test ermittelt.

4.3.11 Next-Generation-Sequencing der hergestellten Virus-Konstrukte mittels Illumina MiSeq™

Virale DNA aller homolog rekombinierten Viren und des Ursprungsvirus HSV2 MS wt (3.2.3), sowie BACmid DNA (3.2.2) aller *En Passant* Konstrukte wurde in der Sequenzierplattform des Heinrich-Pette-Instituts, Hamburg (Prof. Grundhoff) vollständig mit Hilfe eines Illumina MiSeq Geräts sequenziert und bioinformatisch ausgewertet. Die Sequenzierung der HSV2-GFP Konstrukte (155 kb) konnte das Vorhandensein beider *ICP0-GFP* Kopien in den jeweiligen Virusgenomen, sowie die gewünschten Punktmutationen in den SIAH-bindedefizienten Mutanten (Tabelle 25) bestätigen. Zudem konnte aufgrund der Kodon-Modifizierung zur Verringerung des GC-Gehalts das vollständige *ICP0-GFP* Gen sequenziert und seine Unversehrtheit nach einem Abgleich (*Alignment*) mit der *in silico* Referenzsequenz HSV2 HG52 bestätigt werden. Auch im verbliebenen Genom aller homolog

rekombinierten Konstrukte konnten keine Deletionen nachgewiesen werden. Lediglich besonders GC-reiche Regionen konnten nicht einwandfrei bioinformatisch zugeordnet werden. Als Beispiel ist hier der Bereich 72.200 bp bis 72.400 bp zu nennen, beziehungsweise einige Bereiche in den repetitiven Regionen R_S und R_L . Bei der Sequenzierung der etwa 165kb BACmide konnten aufgrund des hohen GC-Gehalts die *ICP0*-Kopien nicht vollständig bestimmt werden. Die jeweiligen gezielt integrierten Punktmutationen in den SIAH-Bindemotiven der $N \times N$ -Mutanten konnten jedoch bestätigt werden. Bei einer Sequenzierung des BACmid Rückgrats konnten einige Bereiche, genauso wie bei den HSV2-GFP Konstrukten, wegen des GC-Gehalts nicht sequenziert werden. Ein Beispiel war hier der Bereich 82.000 bis 84.000 bp, sowie 115.900bp bis 116.000 bp. In allen BAC-Konstrukten konnte zudem der Bereich, indem der ori_L lokalisiert ist (72.000-73.200 bp) nicht bestimmt werden.

Neben der Überprüfung der Genomvollständigkeit der hergestellten Mutanten wurden die Genome der generierten Virus-Konstrukte, sowie das Genom von HSV2 MS wt mit der *in silico* Referenzsequenz abgeglichen. Es zeigte sich, dass sich alle untersuchten Genome in 316 (untereinander identischen) Basen von HSV2 HG52 unterschieden. Diese Punktmutationen (SNP= *single nucleotide polymorphism*) waren über das gesamte Genom verteilt. Die Sequenzübereinstimmung zwischen HSV2 MS wt und der Referenzsequenz HSV2 HG52 betrug aufgrund dieser SNPs 99,79 Prozent.

5 Diskussion

Die Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass das virale Protein ICP0 durch Mutation der zwei PxAxVxP SIAH-Konsensus-Bindemotive zu PxAxNxN nicht mehr mit der zellulären E3 Ubiquitinligase SIAH-1 interagieren kann. Die dadurch komprimierte ICP0:SIAH-1 Interaktion hat einen negativen Einfluss auf den Phänotyp von replikationskompetentem Herpes-Simplex-Virus Typ 2 *in vitro* sowie *in vivo*.

5.1 Auswirkung der inhibierten ICP0:SIAH-1 Interaktion *in vitro*

Die Inhibierung der ICP0:SIAH-1 Interaktion hatte *in vitro* zur Folge, dass HSV2 in seinem Wachstum attenuiert war. Der attenuierte Phänotyp war sowohl bei einer niedrigen MOI von 0,001 und 0,01 pfu/Zelle, als auch bei einer hohen MOI von 1 pfu/Zelle zu beobachten (4.2.3, Abbildung 34 bis Abbildung 36). Um einen Einfluss des Mutageneseverfahrens auf den Phänotyp auszuschließen, wurden die SIAH-bindedefizienten Mutanten durch zwei unabhängige Verfahren generiert: Über BAC-Mutagenese in Bakterienzellen (4.1.1) und über homologe Rekombination in eukaryotischen Zellen (4.1.2). Das Verhalten der Mutanten wurde anschließend in drei unterschiedlichen Zelllinien überprüft. Die entsprechenden Konstrukte zeigten hier unabhängig von ihrem Herstellungsweg den gleichen Phänotyp (4.2).

Bei der NxN1/2-Mutante war im Vergleich zu Wildtyp HSV2 zudem die Protein- und DNA-Expression reduziert (4.2.4, 4.2.5). Von der verminderten Proteinexpression waren virale Proteine aller Phasen der Expressionskaskade betroffen (Abbildung 39 bis Abbildung 42). Die ICP0:SIAH-1 Wechselwirkung scheint folglich für die allgemeine lytische Genexpression wichtig zu sein, was mit einer effizienten Replikation des Virus einhergeht. Die Genexpressionskaskade wurde durch die fehlende ICP0:SIAH-1 Interaktion nicht unterbrochen, das heißt, alle Gene – unmittelbar frühe sowie späte - wurden in der richtigen Abfolge transkribiert und translatiert.

Wie in 1.4 beschrieben, ist im ICP0 Protein von HSV1 ebenfalls ein PxAxVxP SIAH-Bindemotiv vorhanden, das sich an AS-Position 401-407 von HSV1 ICP0 befindet (Nagel et al., 2011). Diese ICP0-Region wurde bereits von anderen Forschungsgruppen, unter anderem in Bezug auf seine Bedeutung zur HSV1-Transkriptionsaktivierung, untersucht. Roger Everett und Kollegen haben ein HSV1 ICP0 exprimierendes Plasmid konstruiert, in dessen ICP0-Leserahmen ein DNA-Fragment integriert wurde, sodass fünf zusätzliche AS an Position 406 inseriert wurden, was in der Inaktivierung des SIAH-Bindemotivs resultierte. In Kooperation mit ICP4 war die Induktion der Transkription des viralen gD Promoter durch das mutierte ICP0 (in der vorliegenden Arbeit ICP0-aa406 genannt) um 7-22% verringert (Everett, 1987).

Zudem war die HSV1 ICP0-aa406 Mutante in BHK Zellen deutlich attenuiert, was sich unter anderem in vermindertem Wachstum und einer verringerten Proteinexpressionsrate zeigte (Everett, 1987; Everett, 1989). Die intrazelluläre Lokalisierung von ICP0 und ICP4 blieb durch diese Mutation jedoch unverändert (Everett, 1988). Daneben zeigte eine unabhängige Studie, dass eine Deletion der AS 393-448 oder 400-462 in ICP0 aus HSV1 die transkriptionelle Aktivierungsfähigkeit von ICP0 um 34-81% im Vergleich zu Wildtyp ICP0 verringerte (Chen et al., 1991). Zudem wurden je nach eingesetzter MOI bis zu 96% weniger infektiöse Viruspartikel gebildet (Chen & Silverstein, 1992). Die beschriebenen phänotypischen Veränderungen könnten in Teilen auf die Inhibierung der ICP0:SIAH-1 Interaktion zurückzuführen sein. Vor allem das verringerte Wachstum und die reduzierte Proteinexpression von HSV1 ICP0-aa406 (Everett, 1989) stimmen mit dem in der vorliegenden Arbeit festgestellten Phänotyp der SIAH-bindedefizienten Mutante HSV2 ICP0^{NxN1/2} überein.

Zusätzlich zur Untersuchung der SIAH-bindedefizienten HSV2-Konstrukte wurde in der vorliegenden Arbeit die Wachstumskinetik der NxN1/2-Mutante mit dem Wachstum einer ICP0-Mutante verglichen, deren RING-Domäne deletiert war. Über die RING-Domäne übt ICP0 eine seiner wichtigsten Funktionen aus (Everett, 1989). HSV ICP0 Δ RING-Mutanten sind folglich stark in ihrem Wachstum attenuiert und bilden bei einer niedrigen initialen MOI eine deutlich verringerte Anzahl an Plaques auf unterschiedlichen Zelllinien (Cai & Schaffer, 1992; Everett, 1988; Everett et al., 1995). In den durchgeführten Experimenten zeigte sich, dass die Δ RING-Mutante *in vitro* nochmals zwischen 1.0-1,5 log-Stufen niedrigere Titer als die NxN1/2-Mutante erreichte (4.2.3; Abbildung 34 C, E), was den bereits beschriebenen Phänotyp der HSV2 RING-defizienten Mutante bestätigte (Everett, 1988; Everett et al., 1995).

Die Fähigkeit, Plaques auf einem Zellrasen auszubilden wurde bei HSV2 durch die fehlende ICP0:SIAH-1 Interaktion nicht beeinträchtigt. Lediglich eine Verminderung der Plaquegröße konnte bei den über BAC-Mutagenese hergestellten NxN-Mutanten gegenüber seinem Ausgangskonstrukt HSV2 Lox beobachtet werden (Abbildung 33; 4.2.2). Allerdings konnte dieser Phänotyp bei den homolog rekombinierten Konstrukten mit dem ICP0-GFP Fusionsprotein nicht nachgewiesen werden. Der Unterschied in der Plaquegröße der BAC- und der homolog rekombinierten NxN-Mutanten könnte mehrere Gründe haben. 1.) Das Ursprungsvirus der homologen Rekombination, HSV2 MS wt, wurde vor der Mutagenese in mehreren aufeinanderfolgenden Zyklen Plaque-gereinigt (3.3.8). Bei jedem Zyklus wurden Viren isoliert, die mittelgroße bis kleine Plaques bildeten, um zu vermeiden, dass Syn+ Viren,

welche vermehrt Synzytien bilden und hoch virulent sind (Sedarati & Stevens, 1987), als Ausgangskonstrukte für die anschließende Mutagenese dienten (Diefenbach & Fraefel, 2014). Da die Plaques des finalen Wildtypvirus durch die Reinigung eher klein ausfielen, waren potentielle Unterschiede in der Plaquegröße zwischen Wildtyp und den homolog rekombinierten NxN-Mutanten somit nicht mehr klar erkennbar. Das von (Meseda et al., 2004) hergestellte BACmid für die *En Passant* Mutagenese könnte seinen Ursprung in einem Virus haben, welches generell große Plaques bildete, sodass die Unterschiede leichter zu erkennen waren. 2.) Eine weitere Erklärung könnte sein, dass der exprimierte GFP-tag der homolog rekombinierten Viren in Zellkultur kleinere Plaques verursachte.

5.2 *In Vivo* Analyse der SIAH-bindedefizienten ICP0-GFP Mutanten

Bei den *in vivo* Untersuchungen konnte bestätigt werden, dass SIAH im murinen Auge sowie im Trigemiusnerv und Hirnstamm exprimiert wird, sodass davon auszugehen war, dass die ICP0:SIAH-1 Interaktion in den untersuchten Geweben eine Rolle für den HSV2 Infektionsverlauf spielte.

Die Analyse der HSV2-Mutanten im *in vivo* Mausmodell (4.3) zeigte, dass die Mutanten trotz inaktiver ICP0:SIAH-1 Interaktion eine akute Infektion in der Cornea der Tiere verursachten und anschließend in die sensorischen Neuronen des Trigemiusnervs einzudringen vermochten, um dort Latenz zu etablieren. Über die Messung der Virustiter in der Tränenflüssigkeit konnte jedoch festgestellt werden, dass die NxN1/2-GFP Mutante im Vergleich zum ICP0-GFP Wildtyp innerhalb der ersten 24 Stunden *p.i.* bei der Replikation im Augenepithel attenuiert war (4.3.2, Abbildung 49). Zudem erreichte die Mutante an Tag 5 *p.i.* im Trigemiusnerv, sowie an Tag 5 und 7 *p.i.* im Hirnstamm signifikant niedrigere Titer als das entsprechende Wildtypvirus (4.3.3, Abbildung 51). Die verringerte Replikationseffizienz konnte über eine Messung der Virus DNA-Kopien/Gewebe mittels Taqman-PCR bestätigt werden (Abbildung 52). Die Messung der DNA-Kopien im Gewebe zeigte zudem, dass nicht nur weniger infektiöse NxN1/2-GFP Partikel im Gewebe produziert wurden, sondern generell weniger virale DNA synthetisiert wurde. Über die Bestimmung der RNA-Kopien im Hirnstamm wurde zusätzlich eine verminderte Transkription (am Beispiel des frühen Gens *UL27*) festgestellt (Abbildung 56). Die NxN1-Mutante, in der nur eine SIAH-Bindestelle (VxP1) inaktiviert war, zeigte *in vivo* (und in der DNA-Expression *in vitro*) einen intermediären Phänotyp, das heißt, sie schien in ihrer Replikation nicht so stark attenuiert zu sein wie die SIAH-bindedefiziente Doppelmutante (Abbildung 38, Abbildung 49, Abbildung

57), verursachte jedoch, zumindest im Hirnstamm, an Tag 5 *p.i* signifikant geringere Titer als das Wildtypvirus (4.3.6, 4.3.7, Abbildung 51). Es ist jedoch zu erwähnen, dass die NxN1-GFP Mutante *in vivo* nur in einer geringen Zahl an Mäusen getestet wurde. Eine erhöhte Stichprobe könnte möglicherweise potentielle Unterschiede zwischen der NxN1-Mutante und dem Wildtyp besser sichtbar machen.

Unterschiede in der Lokalisierung im Trigeminierv konnte zwischen der NxN1/2-GFP Mutante und HSV2 ICP0-GFP mittels immunhistologischer Färbung von Gewebeschnitten nicht beobachtet werden (Abbildung 53 bis Abbildung 55). Diese Beobachtungen bestätigten, dass die NxN1/2-Mutante in der Lage war, in die Neurone des TG einzudringen und in ihnen zu replizieren. Zum Nachweis wurde hier ein polyklonaler HSV2 Antikörper eingesetzt, der auch bereits fertige Viruskapside erkennt. Zur Markierung von HSV-Transkriptionskompartimenten wäre eventuell in Zukunft ein Antikörper gegen ein spezifisches Virusprotein wie den Transkriptionsaktivator ICP4 geeigneter.

Die Reaktivierungsexperimente von latent infizierten Trigeminierv-Explantaten zeigten, dass HSV2 Wildtyp und die SIAH-bindedefizienten Mutanten NxN1-GFP und NxN1/2-GFP mit der gleichen Effizienz und Kinetik reaktivierten, wenngleich die Virustiter der reaktivierten NxN-Mutanten niedriger ausfielen als die des Wildtypvirus (4.3.9; Abbildung 57). Diese Beobachtungen spiegelten die attenuierte Replikation der SIAH-bindedefizienten Mutanten nach der initialen Reaktivierung im Trigeminierv wider. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Reaktivierung ausschließlich über die mechanische Stressinduktion durch das Präparieren der TG aus dem Wirtsorganismus. Die Trigemininalganglien an sich blieben hierbei intakt. In einem Großteil der etablierten HSV Latenzmodelle werden die präparierten TG anschließend homogenisiert, um den Prozess der Reaktivierung auf neuronaler Zellebene zu analysieren (Diefenbach & Fraefel, 2014; Liu et al., 2000; Nicoll et al., 2016; Sawtell & Thompson, 2004). Über diese Methode kann die Reaktivierung früher und sensitiver bestimmt werden (Doll & Sawtell, 2017; Nicoll et al., 2016). Ein großer Nachteil hierbei ist jedoch, dass das komplexe Zusammenspiel verschiedener Zelltypen im TG nach einer Homogenisierung nicht berücksichtigt wird. So konnte früher festgestellt werden, dass Makrophagen und CD8⁺ T-Zellen eine wichtige Funktion bei der Regulierung der HSV-Replikation im TG und bei der Reaktivierung aus der Latenz einnehmen (Kodukula et al. 1999; T. Liu et al. 2000). Es wäre deshalb denkbar, dass bei einer Dissoziation dieser Zellen von den Neuronen die beobachteten Reaktivierungsmechanismen nicht dem natürlichen Mechanismus entsprechen.

Die *in vivo* Experimente haben gezeigt, dass die ICP0:SIAH-1 Interaktion für eine effiziente Replikation des Virus in der Cornea und im PNS sowie im ZNS notwendig ist. Mit den in diesem Rahmen durchgeführten Versuchen konnte der ICP0:SIAH-1 Interaktion jedoch keine essentielle Rolle bei der Latenzetablierung und Reaktivierung zugeschrieben werden.

5.2.1 *In vivo* Analyse der HSV2 Wildtyp-Konstrukte

Bei einem Vergleich der Replikationseffizienz von HSV2 MS wt mit dem ICP0-GFP-exprimierenden HSV2-Wildtyp wurden beim GFP-Konstrukt geringere Virustiter in der Tränenflüssigkeit sowie im innervierenden Gewebe festgestellt (Abbildung 44, 4.3.2). Der attenuierte Phänotyp war vermutlich auf die GFP-Expression zurückzuführen und wurde bereits zuvor beschrieben (Balliet et al., 2007). Tatsächlich werden GFP-exprimierende Viren standardmäßig zur Analyse im Tiermodell eingesetzt, da die Konstrukte über ihren GFP-Marker effektiv nachgewiesen und visualisiert werden können (Balliet et al., 2007; Halford et al., 2010; Halford et al., 2011). Mit Hilfe der GFP-exprimierenden Konstrukte war es in der vorliegenden Arbeit möglich, zum ersten Mal überhaupt die Virusreaktivierung und anschließende Ausbreitung in ganzheitlichen TG Explantaten *ex vivo* mittels Fluoreszenzmikroskopie zu verfolgen (4.3.4; Abbildung 47). Bei den Reaktivierungsexperimenten diente die GFP-Expression auf Ebene der Proteinexpression zum Nachweis des frühen Reaktivierungsstadiums. So zeigten sich erste GFP-fluoreszierende Signale im TG bereits 24-48 Stunden vor der ersten Messung infektiöser Viruspartikel im Überstand (Abbildung 46, Abbildung 47).

Für die *in vivo* Experimente wurde der Inzuchtstamm C57Bl/6 verwendet. Diese Tiere sind aufgrund ihrer hohen IFN α / β Produktion sehr robust gegenüber Virusinfektionen (Zawatzky et al., 1982). Durch die Auswahl eines immunkompetenten Mausstamms sollte gewährleistet werden, dass die infizierten Tiere den Versuchszeitraum von 40 Tagen im Idealfall zu 100% überleben. Dieses Ziel wurde für die GFP-exprimierenden HSV2 Konstrukte erreicht. Jedoch zeigte sich, dass in diesen Tieren die beobachteten Virustiter und DNA-Kopien bereits bei den HSV2 Wildtyp-Konstrukten relativ niedrig waren im Vergleich mit Virustitern in anderen Mausstämmen (Halford & Schaffer, 2000; Halford et al., 2010). Das hatte zur Folge, dass die hier mittels *Real-time* PCR gemessenen Werte teilweise im Bereich der Nachweisgrenze lagen, was eine Auswertung erschwerte. Der Einsatz eines empfänglicheren Mausstamms wie BALB/c, oder ICR könnte in Zukunft im Falle von SIAH-bindedefizienten ICP0-Mutanten den beobachteten Phänotyp der mutierten Viren gegebenenfalls noch deutlicher sichtbar machen. Für Reaktivierungsexperimente wären diese Mausstämme aufgrund der hohen

Mortalität bei einer HSV2 Infektion (Halford et al., 2011; Webre et al., 2012) jedoch eher ungeeignet.

5.2.2 *In vivo* Analyse der SIAH-bindedefizienten BAC-Mutante

Die *in vivo* Analyse zeigte, dass die SIAH-bindedefiziente Doppelmutante, die über *En Passant* Mutagenese hergestellt wurde, *in vivo* nur eine sehr schwache akute Infektion im murinen Gewebe verursachte (4.3.10). Im Vergleich zu seinem Ausgangs-Wildtyp-Konstrukt HSV2 Lox zeigte sich dies durch signifikant geringere Virustiter in der Cornea während des gesamten Messzeitraums (Abbildung 58), im äußerlich gesunden Erscheinungsbild der NxN1/2 infizierten Tiere (Abbildung 59), sowie durch signifikant geringere Virustiter im TG und Hirnstamm (Abbildung 61). Im Hirnstamm konnte zusätzlich fast keine DNA- und RNA-Expression der NxN1/2-Mutante nachgewiesen werden, sodass von einer deutlich verringerten Ausbreitung der Mutante im Gewebe ausgegangen werden konnte. Im direkten Vergleich der SIAH-bindedefizienten BAC-Mutante (NxN1/2 Klon [2.1]) mit der NxN1/2-GFP Mutante zeigte sich, dass das durch *En Passant* Mutagenese hergestellte Viruskonstrukt nochmals deutlich niedrigere Titer in der Tränenflüssigkeit erreichte, als die NxN1/2-GFP Mutante (Anhang; Abbildung 63). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der veränderte Phänotyp der *En Passant* NxN1/2 -Mutante neben der inaktivierten ICP0:SIAH-1 Interaktion noch eine weitere Ursache hatte. Restriktionsanalysen ließen vermuten, dass die *ori_L*-Sequenz in diesem Konstrukt fehlte (Abbildung 48). Zudem ist bekannt, dass HSV1 Mutanten ohne *ori_L* in ihrem Replikationsverhalten und in ihrer Ausbreitung im TG stark eingeschränkt sind (Balliet & Schaffer, 2006; Balliet et al., 2005) (siehe auch: 4.3.5). Leider konnte diese Vermutung mittels *Next Generation Sequencing* (4.3.11) nicht geklärt werden, da der *ori_L* enthaltende Bereich (etwa 100-200 bp) bei allen sequenzierten Konstrukten nicht detektiert werden konnte. Es ist jedoch unklar, ob die *ori_L*-Region aufgrund ihrer Haarnadelstruktur bei der Erstellung und Amplifizierung der NGS-Sequenzbibliothek deletiert wurde, ob die Sequenz wegen des hohen GC-Gehalts grundsätzlich nicht sequenziert werden kann, oder ob sie tatsächlich bei den BAC-Mutanten beim Passagieren in Bakterien über die Zeit verloren ging.

5.3 Potentielle Bedeutung der ICP0:SIAH Interaktion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben ergeben, dass die ICP0:SIAH-1 Interaktion für die effiziente Virusreplikation entscheidend ist. Durch Nagel und Mitarbeiter konnte früher mittels Protein-Interaktionsexperimenten gezeigt werden, dass SIAH-1 durch diese

Wechselwirkung stabilisiert und ICP0 für den proteasomalen Abbau markiert wird (Nagel et al., 2011). Da SIAH-1 bei dieser Interaktion die E3 Ubiquitinligase Funktion auszuüben scheint, stellt sich die Frage, warum diese Interaktion für HSV2 von Vorteil ist, wenn dabei ein so wichtiges virales Regulatorprotein wie ICP0 inaktiviert beziehungsweise abgebaut wird. Hierfür gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten: 1.) ICP0 interagiert mit SIAH-1 und wird ubiquitiniert. Andere zelluläre SIAH-Substrate werden dadurch stabilisiert. Diese Zielproteine könnten dem Virus einen Vorteil bei der Replikation und/oder der Genexpression verschaffen, sodass das Virus dafür den Abbau von ICP0 in Kauf nimmt. 2.) Durch das Rekrutieren von SIAH-1 in die HSV2 Replikations- und Transkriptionskompartimente könnte ICP0 an SIAH-1 gebundene Substrate mit rekrutieren, die ansonsten nicht oder nur sehr ineffizient in die HSV2 Replikationszentren gelangen könnten. 3.) SIAH-1 selbst könnte bei der Virusreplikation eine Rolle spielen, indem es die Menge und Verteilung von zellulären HSV-Inhibitoren reguliert. ICP0 inhibiert folglich über die Interaktion die Autoubiquitinierung von SIAH-1, um dieses zu stabilisieren, oder 5.) bei einer Virusinfektion *in vivo* führt ICP0 durch die Ubiquitylierung von SIAH-1 vermehrt zu dessen Abbau, da SIAH-1 antivirale Funktionen ausübt. Es ist nicht auszuschließen, dass ICP0 und SIAH-1 sich wechselseitig regulieren. Da hohe Konzentrationen an ICP0 toxisch für die Zelle sind (Hobbs et al., 2001; Samaniego et al., 1997), könnte ein durch SIAH-1 vermittelter proteasomaler Abbau den intrazellulären ICP0-Spiegel kontrollieren. Ein hypothetisches Schema der ICP0-SIAH-1 Interaktion ist in Abbildung 62 dargestellt.

Dass SIAH-1 eine potentiell antivirale Funktion hat ist insofern wahrscheinlich, da dieser zelluläre Faktor grundsätzlich ICP0 entgegenwirkende Funktionen ausübt (Edwards et al., 2017; García-Limones et al., 2016; House et al., 2009; Li et al., 2008). Auch konnten in den letzten Jahren zwei weitere virale Proteine identifiziert werden, die mit SIAH-1 interagieren. Zu ihnen gehören das *open reading frame 45*- Protein (ORF45) des Kaposi-Sarkoma-assoziierten Herpesvirus (KSHV) (Abada et al., 2008), und das Hepatitis B Virus (HBV) X Protein (HBx) (Zhao et al., 2011). In beiden Fällen markiert SIAH-1 die viralen Proteine für den proteasomalen Abbau und übt somit eine antivirale Aktivität aus. HBx ist wie ICP0 ein multifunktionelles virales Regulatorprotein, dessen Polyubiquitinierung durch SIAH-1 zu einer verringerten transkriptionellen Aktivierung von HBV führt. Es wurde daher vermutet, dass SIAH-1 über diesen Mechanismus der Entwicklung von HBV-bedingten Hepatokarzinomen entgegenwirkt (Zhao et al., 2011, Zhao et al., 2016).

Im Falle der HSV Infektion hat sich das Virus die ICP0:SIAH-1 Interaktion anscheinend zu Nutze gemacht. Das SIAH-Interaktionsmotiv ist in den ICP0 Homologen der Simplexviren konserviert (Nagel et al., 2011) und scheint demnach evolutionär von Bedeutung zu sein.

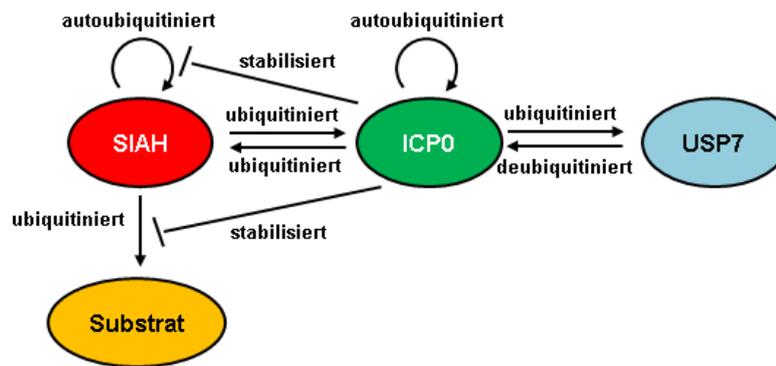


Abbildung 62. Schema der ICP0:SIAH Interaktion. ICP0 und SIAH-1 sind RING-Domänen enthaltende E3 Ubiquitinligasen, die sich vermutlich gegenseitig ubiquitinieren können und, bei Abwesenheit von Substraten, autoubiquitinäre Eigenschaften zeigen. Es wird angenommen, dass durch die ICP0:SIAH-1 Interaktion Substrate (noch unbekannter Art) stabilisiert werden, die ansonsten von SIAH für den proteasomalen Abbau markiert würden. Höchstwahrscheinlich sind diese Substrate für ein effizientes Fortschreiten der HSV2 Infektion von Bedeutung. Bei einer Ubiquitinierung von ICP0 durch SIAH-1, oder nach Autoubiquitinierung von ICP0, kann die Deubiquitinase USP7 die Polyubiquitinketten wieder entfernen. Hierbei wird USP7 wiederum von ICP0 ubiquitiniert, ein Vorgang der im Abbau von USP7 durch das Proteasom resultiert.

5.3.1 Mögliche Zielstrukturen der ICP0:SIAH-1 Interaktion

Die zellulären Vorgänge, die durch die ICP0:SIAH-1 Interaktion beeinflusst werden sind nicht bekannt. Mittels Immunfluoreszenz konnte in Verozellen gezeigt werden, dass bei einer Ko-Transfektion von SIAH-1 und HSV1 ICP0, das virale Protein SIAH-1 in die subnuklearen ND10-Kompartimente rekrutiert (persönliche Beobachtungen, nicht veröffentlicht). SIAH-1 und ICP0 kolokalisieren folglich an dem Ort, an dem die Virustranskription und Replikation stattfindet (Maul, 1998). Bei einer Deletion des PxAxVxP-Bindemotivs in ICP0 liegt dieses immer noch in den ND10-Kompartimenten vor, während SIAH-1 diffus im Nukleoplasma verteilt ist, beziehungsweise verstärkt an der Kernmembran akkumuliert. Beide Proteine interagieren als RING-Domänen enthaltende E3 Ubiquitinligasen mit einer Vielzahl an Faktoren, indem sie unter anderem diese für den proteasomalen Abbau markieren. Es konnte gezeigt werden, dass beide Proteine in der Lage sind, PML abzubauen (Everett & Maul, 1994; Fanelli et al., 2004; Maul et al., 1993). Da ICP0 in den ersten Stunden *p.i.* über den Abbau von PML zur Auflösung der ND10 Strukturen im Zellkern führt (Everett & Maul, 1994; Maul et al., 1993), und SIAH-1 zeitgleich von ICP0 in die Kompartimente rekrutiert wird, wurde

anfänglich über eine mögliche Beteiligung von SIAH-1 an diesem Prozess spekuliert. Western Blot Experimente in der vorliegenden Arbeit konnten jedoch zeigen, dass der proteasomale Abbau von PML durch die inhibierte ICP0:SIAH-1 Interaktion in Verozellen nicht beeinträchtigt ist (Abbildung 42). Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass die Wechselwirkung von ICP0 mit SIAH-1 den Abbau anderer subnuklearer Komponenten beeinflusst.

Im Zusammenhang mit einer Virusinfektion ist die Funktion von SIAH-1 als Regulator des Zellzyklus und der DNA-Reparaturmaschinerie besonders interessant (Dimitrova et al., 2010; García-Limones et al., 2016; House et al., 2009; Winter et al., 2008). Ein Beispiel, bei dem die ICP0:SIAH-1 Interaktion eine Rolle spielen könnte, ist die Regulierung der ATM/ATR induzierten Signalwege. Bei einer Schädigung der zellulären DNA, beispielsweise durch einen Doppelstrangbruch (DSB), werden die Kinasen ATM (*Ataxia-Telangiectasia-Mutated*) und/oder ATR (*Ataxia Telangiectasia and Rad3-related*) aktiviert, die wiederum jeweils die *Checkpoint*-Kinase 2 (Chk2) und 1 (Chk1) über Phosphorylierung aktivieren (Abraham, 2001; Ahn et al., 2004; Bakkenist & Kastan, 2003; Liu Q. et al., 2000; Matsuoka et al., 2000). Die Aktivierung dieser *Checkpoint*-Kinasen führt schließlich zur Arretierung des Zellzyklus am G2/M-Phasenübergang (Ahn et al., 2004; Liu Q. et al., 2000). Dies wird zusätzlich durch die p53 Kinase HIPK2 gefördert. Analysen haben ergeben, dass HIPK2 in gesunden Zellen von SIAH-1 für den proteasomalen Abbau markiert wird, um so einer Blockade des Zellzyklus entgegenzuwirken (Winter et al., 2008). Bei einem DSB wird SIAH-1 jedoch ATM/ATR-abhängig phosphoryliert, was dazu führt, dass SIAH-1 HIPK2 nicht mehr effizient dem Abbau zuführen kann. HIPK2 wird daraufhin in die PML-Kompartimente rekrutiert und dort aktiviert, um so zur Hemmung des Zellzyklus beizutragen (Mo et al., 2003; Winter et al., 2008). Bei einer HSV Infektion wird der ATM/ATR Signalweg ähnlich wie bei einem DSB aktiviert (Edwards et al., 2017; Lilley et al., 2005; Shirata et al., 2005). Es konnte nachgewiesen werden, dass ICP0 für die Aktivierung von ATM und Chk2 (Li et al., 2008), und vermutlich auch ATR (Edwards et al., 2017), essentiell ist und dadurch eine Arretierung des Zellzyklus in der G2/M-Phase gewährleistet. In dieser Phase findet eine erhöhte Virusreplikation statt (Li et al., 2008). In ATM- oder Chk2-defizienten Zellen ist das Virus hingegen in seinem Wachstum attenuiert (Li et al., 2008). Gleiches konnte bei einer Inhibierung von ATR und Chk1 beobachtet werden. Hier führte die Inhibierung zu einer verzögerten Ausbildung der Virusreplikationszentren (Edwards et al., 2017). ICP0 und SIAH-1 scheinen im ATM/ATR-induzierten Signalweg folglich gegensätzliche Ziele zu verfolgen. Es wäre deshalb denkbar, dass SIAH-1 bei einer HSV2 Infektion ICP0 für den

proteasomalen Abbau markiert, um eine Arretierung des Zellzyklus entgegenzuwirken. Da SIAH-bindedefiziente HSV2-Mutanten jedoch in ihrem Wachstum attenuiert sind, könnte ein alternativer Vorgang sein, dass ICP0 SIAH-1 gezielt in die PML-Kompartimente rekrutiert, damit HIPK2 effizienter durch PML aktiviert, beziehungsweise SIAH-1 gleichzeitig durch ATM/ATR inaktiviert wird. García-Limones und Kollegen konnten zudem zeigen, dass SIAH-2 und Chk2 im Zellkern kolokalisieren und Chk2 von SIAH-2 (jedoch nicht von SIAH-1) polyubiquitiniert und abgebaut wird (García-Limones et al., 2016). Auch dieser Prozess wirkt einer Blockierung des Zellzyklus entgegen und entspricht einer ICP0 antagonisierenden Funktion. Da die für eine Interaktion essentiellen AS der SIAH-1-Substratbindedomäne auch in SIAH-2 vorkommen (House et al., 2006) wird angenommen, dass ICP0 ebenfalls mit SIAH-2 interagieren kann (Nagel et al., 2011). Hier könnte die Aufgabe von ICP0 sein, über SIAH-2 Chk2 in seine unmittelbare räumliche Nähe zu rekrutieren. ICP0 aktiviert daraufhin ATM und Chk2 und wird vermutlich zeitgleich (anstelle von Chk2) durch SIAH-2 polyubiquitiniert. Durch die ICP0:SIAH Interaktion wird die Virusreplikation letztendlich optimiert. Eine solche Erklärung ist insofern denkbar, da bislang nicht gezeigt wurde, ob ICP0 mit Chk2 und ATM direkt oder indirekt über ein Adaptormolekül interagiert.

Eine weitere Hypothese zur möglichen Bedeutungen der ICP0:SIAH-1 Interaktion bietet das zelluläre Zielprotein ELL2. ELL2 ist ein wichtiger Bestandteil des Superelongationskomplexes (SEC) (Liu et al., 2012). SECs enthalten verschiedene Transkriptionsfaktoren, die bei der Elongation durch die RNA Polymerase II essentiell sind und unter anderem auch bei der HIV-1 Transkription eine bedeutende Rolle spielen (Luo et al., 2012). SIAH-1 ist in der Lage, ELL2 zu polyubiquitiniieren, was wiederum zu dessen proteasomalen Abbau führt. Bei HIV-1 Infektion konnte gezeigt werden, dass durch die Hemmung von SIAH-1 die ELL2 Konzentration ansteigt und dadurch die SEC-abhängige Transkription vom HIV-1 LTR (*Long Tandem Repeat*) Promotor gesteigert wird (He et al., 2010; Liu et al., 2012). Es wäre denkbar, dass ein solcher Mechanismus auch bei einer HSV Infektion existiert und ICP0 die SIAH-1:ELL2 Interaktion nutzt, um eine effizientere virale Genexpression zu ermöglichen. Die hypothetische Vorgehensweise von ICP0 wäre hierbei ähnlich, wie bei der zuvor beschriebenen Aktivierung von Chk2.

5.4 Fazit und Ausblick

Um die zelluläre Auswirkung der ICP0:SIAH-1 Interaktion weiter aufzuklären, müsste in zukünftigen Experimenten die Abundanz der SIAH Zielproteine in An- und Abwesenheit von ICP0 überprüft werden. Für einen *Proteomic* Ansatz wäre ein SILAC (*stable isotope labeling with amino acids in cell culture*) Experiment denkbar, bei dem über Aminosäuremarkierung mit schweren oder leichten Isotopen Unterschiede in den Proteinmengen bestimmt werden können. Die markierten Proteine werden dabei anhand ihrer unterschiedlichen Massen mittels Massenspektroskopie nachgewiesen (Cuomo et al., 2014).

Eine alternative Möglichkeit zur Untersuchung der ICP0:SIAH-1 Interaktion wäre die Analyse einer HSV2 Infektion in SIAH *knock-out* Zellen. Wie verhält sich eine SIAH-bindedefiziente HSV2 Mutante in diesen Zellen? Ist ihr attenuierter Phänotyp aufgehoben? Ein Versuch monoklonale SIAH-1/2 *Doppelknock-out* Zelllinien (Vero- und USO2-Zellen) mit dem CRISPR/Cas9 Verfahren (CRISPR= *clustered regularly interspaced short palindromic repeat*) zu generieren ist im Rahmen dieser Arbeit bislang gescheitert. Die meisten Zellklone zeigten Probleme bei der Zellteilung: Einige Zellen zeigten unkontrolliertes Größenwachstum, andere wiesen einen apoptotischen Phänotyp auf. Diese Beobachtungen waren aufgrund der Funktion von SIAH-1 und SIAH-2 bei der Zellzyklusregulierung nicht überraschend (Nakayama et al., 2009; Winter et al., 2008; Yoshibayashi et al., 2007) und lassen vermuten, dass ein *Doppelknock-out* von SIAH-1/2 letal für die Zelle ist. Für weitere Analysen wäre in Zukunft ein *knock-down* von SIAH mithilfe von RNA Interferenz (RNAi) ratsamer, wenngleich im Regelfall hierbei keine 100% Entfernung von SIAH erreicht werden kann.

Für eine *in vivo* Analyse könnten SIAH *knock-out* Mäuse herangezogen werden, die bereits generiert wurden (Dickins et al., 2002; Frew et al., 2003). Wie bereits in 1.5 beschrieben, sind SIAH-1/2 *Doppelknock-out* Mäuse nicht lebensfähig (Frew et al., 2003). Ein einzelner *knock out* von SIAH-1A in Weibchen, beziehungsweise von SIAH-2 in Böcken und Weibchen führte unter normalen Lebensbedingungen bei ausgewachsenen Tieren zu keinem signifikant veränderten Phänotyp (Dickins et al., 2002; Frew et al., 2003). Interessant wäre hier zu überprüfen, ob eine HSV2 Wildtyp, beziehungsweise eine HSV2 ICP0^{NxN1/2}-Infektion in diesen Tieren Unterschiede hervorruft.

Neben der Untersuchung der zellulären Auswirkungen bei inhibierter ICP0:SIAH-1 Interaktion könnten auch Strukturanalysen des mutierten ICP0 Proteins durchgeführt werden. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein Austausch von lediglich zwei AS

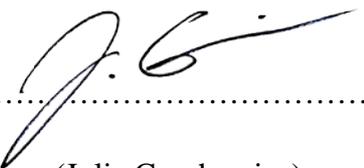
in den SIAH-Konsensus-Bindemotiven ausreicht, um die Interaktion mit SIAH-1 zu hemmen. 3D-Strukturanalysen könnten Aufschluss darüber geben, ob der Austausch von zwei unpolaren AS (Valin und Prolin) durch die polare AS Asparagin Veränderungen in der 3D-Struktur verursacht, sodass ICP0 nicht mehr mit SIAH-1 und gegebenenfalls anderen Proteinen wechselwirken kann. Eine vollständige Inaktivierung der ICP0 Funktion kann durch die NxN-Mutation jedoch ausgeschlossen werden, da die hier generierten NxN-Mutanten *in vitro* weniger stark attenuiert waren als die HSV2 ICP0 Δ RING-Mutante (4.2.3). *In vivo* riefen die SIAH-bindedefizienten Mutanten zudem eine akute Infektion im Auge hervor und zeigten deutliche Reaktivierbarkeit aus der Latenz (d.h. sie bildeten infektiöse Viruspartikel). ICP0-defiziente Mutanten sind dazu nicht mehr in der Lage (Halford & Schaffer, 2001; Halford et al., 2010; Mostafa et al., 2011).

In der vorliegenden Arbeit konnte die Rolle der ICP0:SIAH-1 Interaktion für den lytischen HSV2 Infektionsverlauf, sowie für die Latenzetablierung und Reaktivierung gezeigt werden. Zur Aufklärung der zugrunde liegenden Signalwege und Mechanismen bedarf es jedoch weiterer Experimente. Eine Identifizierung von Zielstrukturen der ICP0:SIAH-1 Interaktion könnte Aufschluss über neue Virus-Wirt Interaktionsnetzwerke geben und gegebenenfalls als Ansatz für die Entwicklung neuer antiviraler Wirkstoffe dienen.

Erklärung

Die im Rahmen dieser Arbeit zur BAC-Mutagenese und homologen Rekombination verwendeten Ausgangsplasmide wurden von Herrn Dr. Claus-Henning Nagel (Heinrich-Pette-Institut, Abteilung Antivirale Strategien) zur Verfügung gestellt. Die histologischen Organschnitte wurden von Frau Gundula Pilnitz-Stolze (Heinrich-Pette-Institut, Technologie-Plattform Mikroskopie) angefertigt.

Hamburg, den 14.02.2018

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'J. C.', written over a horizontal dotted line.

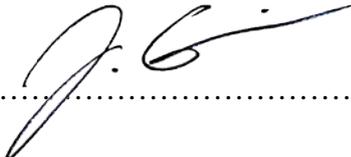
(Julia Czechowicz)

Eidesstattliche Versicherung

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.

Hamburg, den 14.02.2018


.....
(Julia Czechowicz)

6 Literaturverzeichnis

- Abada, R., Dreyfuss-Grossman, T., Herman-Bachinsky, Y., Geva, H., Masa, S.-R., and Sarid, R. (2008). SIAH-1 interacts with the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded ORF45 protein and promotes its ubiquitylation and proteasomal degradation. *J. Virol.* 82, 2230–2240.
- Abraham, R.T. (2001). Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev.* 15, 2177–2196.
- Adams, M.J., Lefkowitz, E.J., King, A.M.Q., Harrach, B., Harrison, R.L., Knowles, N.J., Kropinski, A.M., Krupovic, M., Kuhn, J.H., Mushegian, A.R., et al. (2012). Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2012). *Arch. Virol.* 161, 2921–2949.
- Ahmed, M., Lock, M., Miller, C.G., and Fraser, N.W. (2002). Regions of the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript that protect cells from apoptosis in vitro and protect neuronal cells in vivo. *J. Virol.* 76, 717–729.
- Ahn, J., Urist, M., and Prives, C. (2004). The Chk2 protein kinase. *DNA Repair (Amst)*. 3, 1039–1047.
- Amelio, A.L., McAnany, P.K., and Bloom, D.C. (2006). A chromatin insulator-like element in the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript region binds CCCTC-binding factor and displays enhancer-blocking and silencing activities. *J. Virol.* 80, 2358–2368.
- Arbuckle, J.H., Turner, A.M.W., and Kristie, T.M. (2014). Analysis of HSV viral reactivation in explants of sensory neurons. *Curr. Protoc. Microbiol.* 2014, 14E.6.1-14E.6.21.
- Arii, J., Uema, M., Morimoto, T., Sagara, H., Akashi, H., Ono, E., Arase, H., and Kawaguchi, Y. (2009). Entry of Herpes Simplex Virus 1 and Other Alpha herpesviruses via the Paired Immunoglobulin-Like Type 2 Receptor. *J. Virol.* 83, 4520–4527.
- Arvin, A., Campadelli-Fiume, G., Mocarski, E., Moore, P.S., Roizman, B., Whitley, R., and Yamanishi, K. (2007). *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge University Press.
- Aurelian, L. (2004). Herpes simplex virus type 2 vaccines: new ground for optimism? *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 11, 437–445.
- Aurelian, L., Kokuba, H., and Smith, C.C. (1999). Vaccine potential of a herpes simplex virus type 2 mutant deleted in the PK domain of the large subunit of ribonucleotide reductase (ICP10). *Vaccine* 17, 1951–1963.
- Avitabile, E., Forghieri, C., and Campadelli-Fiume, G. (2009). Cross talk among the glycoproteins involved in herpes simplex virus entry and fusion: the interaction between gB and gH/gL does not necessarily require gD. *J. Virol.* 83, 10752–10760.
- Awasthi, S., Zumbun, E.E., Si, H., Wang, F., Shaw, C.E., Cai, M., Lubinski, J.M., Barrett, S.M., Balliet, J.W., Flynn, J. a., et al. (2012). Live Attenuated Herpes Simplex Virus 2 Glycoprotein E Deletion Mutant as a Vaccine Candidate Defective in Neuronal Spread. *J. Virol.* 86, 4586–4598.
- Bakkenist, C.J., and Kastan, M.B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421, 499–506.

- Balliet, J.W., and Schaffer, P.A. (2006). Point mutations in herpes simplex virus type 1 oriL, but not in oriS, reduce pathogenesis during acute infection of mice and impair reactivation from latency. *J. Virol.* *80*, 440–450.
- Balliet, J.W., Min, J.C., Cabatingan, M.S., and Schaffer, P. a (2005). Site-directed mutagenesis of large DNA palindromes: construction and in vitro characterization of herpes simplex virus type 1 mutants containing point mutations that eliminate the oriL or oriS initiation function. *J. Virol.* *79*, 12783–12797.
- Balliet, J.W., Kushnir, A.S., and Schaffer, P.A. (2007). Construction and characterization of a herpes simplex virus type I recombinant expressing green fluorescent protein: Acute phase replication and reactivation in mice. *Virology* *361*, 372–383.
- Barnabas, R.V., and Celum, C. (2012). Infectious Co-Factors in HIV-1 Transmission Herpes Simplex Virus Type-2 and HIV-1: New Insights and Interventions. *Curr. HIV Res.* *10*, 228–237.
- Batterson, W., and Roizman, B. (1983). Characterization of the Herpes Simplex Virion-Associated Factor Responsible for the Induction of α Genes. *J. Virol.* *46*, 371–377.
- Berlutti, F., Pantanella, F., Natalizi, T., Frioni, A., Paesano, R., Polimeni, A., and Valenti, P. (2011). Antiviral properties of lactoferrin—a natural immunity molecule. *Molecules* *16*, 6992–7012.
- Bernard, M.C., Barban, V., Pradezynski, F., De Montfort, A., Ryall, R., Caillet, C., and Londono-Hayes, P. (2015). Immunogenicity, protective efficacy, and non-replicative status of the HSV-2 vaccine candidate HSV529 in mice and guinea pigs. *PLoS One* *10*.
- Bernstein, D.I., Farley, N., Bravo, F.J., Earwood, J., McNeal, M., Fairman, J., and Cardin, R. (2010). The adjuvant CLDC increases protection of a herpes simplex type 2 glycoprotein D vaccine in guinea pigs. *Vaccine* *28*, 3748–3753.
- Bernstein, D.I., Earwood, J.D., Bravo, F.J., Cohen, G.H., Eisenberg, R.J., Clark, J.R., Fairman, J., and Cardin, R.D. (2011). Effects of herpes simplex virus type 2 glycoprotein vaccines and CLDC adjuvant on genital herpes infection in the guinea pig. *Vaccine* *29*, 2071–2078.
- Bigley, N.J. (2014). Complexity of interferon- γ interactions with HSV-1. *Front. Immunol.* *5*.
- Bloom, D.C., Giordani, N. V., and Kwiatkowski, D.L. (2010). Epigenetic regulation of latent HSV-1 gene expression. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* *1799*, 246–256.
- Borden, K.L. (2002). Pondering the promyelocytic leukemia protein (PML) puzzle: possible functions for PML nuclear bodies. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 5259–5269.
- Bourne, N., Bravo, F.J., Francotte, M., Bernstein, D.I., Myers, M.G., Slaoui, M., and Stanberry, L.R. (2003). Herpes simplex virus (HSV) type 2 glycoprotein D subunit vaccines and protection against genital HSV-1 or HSV-2 disease in guinea pigs. *J. Infect. Dis.* *187*, 542–549.
- Bourne, N., Milligan, G.N., Stanberry, L.R., Stegall, R., and Pyles, R.B. (2005). Impact of immunization with glycoprotein D2/AS04 on herpes simplex virus type 2 shedding into the genital tract in guinea pigs that become infected. *J. Infect. Dis.* *192*, 2117–2123.
- Boutell, C., and Everett, R.D. (2003). The herpes simplex virus type 1 (HSV-1) regulatory

- protein ICP0 interacts with and ubiquitinates p53. *J. Biol. Chem.* 278, 36596–36602.
- Boutell, C., and Everett, R.D. (2013). Regulation of alphaherpesvirus infections by the ICP0 family of proteins. *J. Gen. Virol.* 94, 465–481.
- Boutell, C., Sadis, S., and Everett, R.D. (2002). Herpes simplex virus type 1 immediate-early protein ICP0 and its isolated RING finger domain act as ubiquitin E3 ligases in vitro. *J. Virol.* 76, 841–850.
- Boutell, C., Canning, M., Orr, A., and Everett, R.D. (2005). Reciprocal activities between herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP0, a ubiquitin E3 ligase, and ubiquitin-specific protease USP7. *J. Virol.* 79, 12342–12354.
- Braun, B.C., Glickman, M., Kraft, R., Dahlmann, B., Kloetzel, P.M., Finley, D., and Schmidt, M. (1999). The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat. Cell Biol.* 1, 221–226.
- Brooks, P., Fuertes, G., Murray, R.Z., Bose, S., Knecht, E., Rechsteiner, M.C., Hendil, K.B., Tanaka, K., Dyson, J., and Rivett, J. (2000). Subcellular localization of proteasomes and their regulatory complexes in mammalian cells. *Biochem. J.* 346 Pt 1, 155–161.
- Brown, J.C., and Newcomb, W.W. (2011). Herpesvirus capsid assembly: Insights from structural analysis. *Curr. Opin. Virol.* 1, 142–149.
- Brune, W., Messerle, M., and Koszinowski, U.H. (2000). Forward with BACs - New tools for herpesvirus genomics. *Trends Genet.* 16, 254–259.
- Cai, W., and Schaffer, P.A. (1992). Herpes simplex virus type 1 ICP0 regulates expression of immediate-early, early, and late genes in productively infected cells. *J. Virol.* 66, 2904–2915.
- Campadelli-Fiume, G. (2007). The egress of alphaherpesviruses from the cell. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge University Press, 151–162.
- Campadelli-Fiume, G., and Menotti, L. (2007). Entry of alphaherpesviruses into the cell. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge University Press, 93–111.
- Canning, M., Boutell, C., Parkinson, J., and Everett, R.D. (2004). A RING finger ubiquitin ligase is protected from autocatalyzed ubiquitination and degradation by binding to ubiquitin-specific protease USP7. *J. Biol. Chem.* 279, 38160–38168.
- Carthew, R.W., and Rubin, G.M. (1990). *seven in absentia*, a gene required for specification of R7 cell fate in the *Drosophila* eye. *Cell* 63, 561–577.
- Carthew, R.W., Neufeld, T.P., and Rubin, G.M. (1994). Identification of genes that interact with the *sina* gene in *Drosophila* eye development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 91, 11689–11693.
- Cases-Langhoff, C., Voss, B., Garner, A.M., Appeltauer, U., Takei, K., Kindler, S., Veh, R.W., De Camilli, P., Gundelfinger, E.D., and Garner, C.C. (1996). Piccolo, a novel 420 kDa protein associated with the presynaptic cytomatrix. *Eur. J. Cell Biol.* 69, 214–223.
- Caspary, L., Schindling, B., Dundarov, S., and Falke, D. (1980). Infections of susceptible and resistant mouse strains with herpes simplex virus type 1 and 2. *Arch. Virol.* 65, 219–227.

- Chen, J., and Silverstein, S. (1992). Herpes simplex viruses with mutations in the gene encoding ICP0 are defective in gene expression. *J. Virol.* *66*, 2916–2927.
- Chen, J.X., Zhu, X.X., and Silverstein, S. (1991). Mutational analysis of the sequence encoding ICP0 from herpes simplex virus type 1. *Virology* *180*, 207–220.
- Chen, S.H., Yao, H.W., Huang, W.Y., Hsu, K.S., Lei, H.Y., Shiau, A.L., and Chen, S.H. (2006). Efficient reactivation of latent herpes simplex virus from mouse central nervous system tissues. *J. Virol.* *80*, 12387–12392.
- Chen, S.H., Kramer, M.F., Schaffer, P. a, and Coen, D.M. (1997). A viral function represses accumulation of transcripts from productive-cycle genes in mouse ganglia latently infected with herpes simplex virus. *J. Virol.* *71*, 5878–5884.
- Chung, C.H., and Baek, S.H. (1999). Deubiquitinating enzymes: Their diversity and emerging roles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *266*, 633–640.
- Ciechanover, A., Finley, D., and Varshavsky, A. (1984a). The ubiquitin-mediated proteolytic pathway and mechanisms of energy-dependent intracellular protein degradation. *J. Cell. Biochem.* *24*, 27–53.
- Ciechanover, A., Finley, D., and Varshavsky, A. (1984b). Ubiquitin dependence of selective protein degradation demonstrated in the mammalian cell cycle mutant ts85. *Cell* *37*, 57–66.
- Ciufo, D.M., Mullen, M. a, and Hayward, G.S. (1994). Identification of a dimerization domain in the C-terminal segment of the IE110 transactivator protein from herpes simplex virus. *J. Virol.* *68*, 3267–3282.
- Cliffe, A.R., Garber, D. a, and Knipe, D.M. (2009). Transcription of the herpes simplex virus latency-associated transcript promotes the formation of facultative heterochromatin on lytic promoters. *J. Virol.* *83*, 8182–8190.
- Cliffe, A.R., Coen, D.M., and Knipe, D.M. (2013). Kinetics of facultative heterochromatin and polycomb group protein association with the herpes simplex viral genome during establishment of latent infection. *MBio* *4*.
- Cohen, J. (2010). Painful failure of promising genital herpes vaccine. *Science* *330*, 304.
- Conrady, C.D., Halford, W.P., and Carr, D.J.J. (2011). Loss of the Type I Interferon Pathway Increases Vulnerability of Mice to Genital Herpes Simplex Virus 2 Infection. *J. Virol.* *85*, 1625–1633.
- Corey, L., Langenberg, a G., Ashley, R., Sekulovich, R.E., Izu, a E., Douglas, J.M., Handsfield, H.H., Warren, T., Marr, L., Tyring, S., et al. (1999). Recombinant glycoprotein vaccine for the prevention of genital HSV-2 infection: two randomized controlled trials. Chiron HSV Vaccine Study Group. *JAMA* *282*, 331–340.
- Da Costa, X., Kramer, M.F., Zhu, J., Brockman, M.A., and Knipe, D.M. (2000). Construction, phenotypic analysis, and immunogenicity of a UL5/UL29 double deletion mutant of herpes simplex virus 2. *J. Virol.* *74*, 7963–7971.
- Cuchet-Lourenço, D., Boutell, C., Lukashchuk, V., Grant, K., Sykes, A., Murray, J., Orr, A., and Everett, R.D. (2011). SUMO pathway dependent recruitment of cellular repressors to herpes simplex virus type 1 genomes. *PLoS Pathog.* *7*.

- Cuchet-Lourenço, D., Vanni, E., Glass, M., Orr, A., and Everett, R.D. (2012). Herpes Simplex Virus 1 Ubiquitin Ligase ICP0 Interacts with PML Isoform I and Induces Its SUMO-Independent Degradation. *J. Virol.* *86*, 11209–11222.
- Cunningham, A.L., Taylor, R., Taylor, J., Marks, C., Shaw, J., and Mindel, A. (2006). Prevalence of infection with herpes simplex virus types 1 and 2 in Australia: A nationwide population based survey. *Sex. Transm. Infect.* *82*, 164–168.
- Cuomo, A., Sanfilippo, R., Vaccari, T., and Bonaldi, T. (2014). Proteomics meets genetics: SILAC labeling of drosophila melanogaster larvae and cells for in vivo functional studies. *Methods Mol. Biol.* *1188*, 293–311.
- Czechowicz, J. (2013). Herstellung und Charakterisierung von Herpes Simplex Virus 2 Mutanten. Diplomarbeit.
- Dasgupta, G., and Benmohamed, L. (2012). Of Mice and not Humans: How Reliable are Animal Models for Evaluation of Herpes CD8⁺-T cell-Epitopes-Based Immunotherapeutic Vaccine Candidates? *Vaccine* *29*, 5824–5836.
- Delagrave, S., Hernandez, H., Zhou, C., Hamberger, J.F., Mundle, S.T., Catalan, J., Baloglu, S., Anderson, S.F., DiNapoli, J.M., Londoño-Hayes, P., et al. (2012). Immunogenicity and Efficacy of Intramuscular Replication-Defective and Subunit Vaccines against Herpes Simplex Virus Type 2 in the Mouse Genital Model. *PLoS One* *7*.
- Delboy, M.G., Siekavizza-Robles, C.R., and Nicola, A. V (2010). Herpes simplex virus tegument ICP0 is capsid associated, and its E3 ubiquitin ligase domain is important for incorporation into virions. *J. Virol.* *84*, 1637–1640.
- Della, N.G., Senior, P. V, and Bowtell, D.D. (1993). Isolation and characterisation of murine homologues of the Drosophila seven in absentia gene (sina). *Development* *117*, 1333–1343.
- DeMartino, G.N., Moomaw, C.R., Zagnitko, O.P., Proske, R.J., Chu-Ping, M., Afendis, S.J., Swaffield, J.C., and Slaughter, C.A. (1994). PA700, an ATP-dependent activator of the 20 S proteasome, is an ATPase containing multiple members of a nucleotide-binding protein family. *J. Biol. Chem.* *269*, 20878–20884.
- Deshaies, R.J., and Joazeiro, C.A.P. (2009). RING Domain E3 Ubiquitin Ligases. *Annu. Rev. Biochem.* *78*, 399–434.
- Deshmane, S.L., and Fraser, N.W. (1989). During latency, herpes simplex virus type 1 DNA is associated with nucleosomes in a chromatin structure. *J. Virol.* *63*, 943–947.
- Dickins, R. a, Frew, I.J., House, C.M., O'Bryan, M.K., Holloway, A.J., Haviv, I., Traficante, N., de Kretser, D.M., and Bowtell, D.D.L. (2002). The ubiquitin ligase component Siah1a is required for completion of meiosis I in male mice. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 2294–2303.
- Diefenbach, R., and Fraefel, C. (2014). Herpes Simplex Virus: Methods and Protocols. Springer.
- Dimitrova, Y.N., Li, J., Lee, Y.T., Rios-Esteves, J., Friedman, D.B., Choi, H.J., Weis, W.I., Wang, C.Y., and Chazin, W.J. (2010). Direct ubiquitination of β -catenin by Siah-1 and regulation by the exchange factor TBL1. *J. Biol. Chem.* *285*, 13507–13516.
- Divito, S., Cherpes, T.L., and Hendricks, R.L. (2006). A triple entente: virus, neurons, and CD8⁺ T cells maintain HSV-1 latency. *Immunol. Res.* *36*, 119–126.

- 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.
- Döhner, K., Radtke, K., Schmidt, S., and Sodeik, B. (2006). Eclipse phase of herpes simplex virus type 1 infection: Efficient dynein-mediated capsid transport without the small capsid protein VP26. *J. Virol.* *80*, 8211–8224.
- Dolan, A., Jamieson, F.E., Cunningham, C., Barnett, B.C., and McGeoch, D.J. (1998). The genome sequence of herpes simplex virus type 2. *J. Virol.* *72*, 2010–2021.
- Doll, J.R., and Sawtell, N.M. (2017). Analysis of Herpes Simplex Virus Reactivation in Explant Reveals a Method-Dependent Difference in Measured Timing of Reactivation. *J. Virol.* *91*, e00848-17.
- Dou, H., Buetow, L., Sibbet, G.J., Cameron, K., and Huang, D.T. (2012). BIRC7-E2 ubiquitin conjugate structure reveals the mechanism of ubiquitin transfer by a RING dimer. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *19*, 876–883.
- Drevets, P., Chucair-Elliott, A., Shrestha, P., Jenkins, J., Karamichos, D., and Carr, D.J.J. (2016). The Use of Human Cornea Organotypic Cultures to Study Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1) Induced Inflammation. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 1721–1728.
- Edwards, T.G., Bloom, D.C., and Fisher, C. (2017). The ATM and Rad3-related (ATR) Protein Kinase Pathway is Activated by Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1) and Required for Efficient Viral Replication. *J. Virol.*
- Efstathiou, S., and Preston, C.M. (2005). Towards an understanding of the molecular basis of herpes simplex virus latency. *Virus Res.* *111*, 108–119.
- Efstathiou, S., Minson, A.C., Field, H.J., Anderson, J.R., and Wildy, P. (1986). Detection of Herpes Simplex Virus-Specific DNA Sequences in Latently Infected Mice and in Humans. *J. Virol.* *57*, 446–455.
- Elion, G.B., Furman, P.A., Fyfe, J.A., de Miranda, P., Beauchamp, L., and Schaeffer, H.J. (1977). Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *74*, 5716–5720.
- Elsasser, S., Chandler-Mitilello, D., Müller, B., Hanna, J., and Finley, D. (2004). Rad23 and Rpn10 serve as alternate ubiquitin receptors for the proteasome. *J. Biol. Chem.* *279*, 26817–26822.
- Everett, R.D. (1987). A detailed mutational analysis of Vmw110, a trans-acting transcriptional activator encoded by herpes simplex virus type 1. *EMBO J* *6*, 2069–2076.
- Everett, R.D. (1988). Analysis of the functional domains of herpes simplex virus type 1 immediate-early polypeptide Vmw110. *J. Mol. Biol.* *202*, 87–96.
- Everett, R.D. (1989). Construction and characterization of herpes simplex virus type 1 mutants with defined lesions in immediate early gene 1. *J. Gen. Virol.* *70 (Pt 5)*, 1185–1202.
- Everett, R.D. (2000). ICP0, a regulator of herpes simplex virus during lytic and latent infection. *Bioessays* *22*, 761–770.
- Everett, R.D. (2001). DNA viruses and viral proteins that interact with PML nuclear bodies.

Oncogene 20, 7266–7273.

Everett, R.D., and Chelbi-Alix, M.K. (2007). PML and PML nuclear bodies: Implications in antiviral defence. *Biochimie* 89, 819–830.

Everett, R.D., and Maul, G.G. (1994). HSV-1 IE protein Vmw110 causes redistribution of PML. *EMBO J.* 13, 5062–5069.

Everett, R., O’Hare, P., O’Rourke, D., Barlow, P., and Orr, a (1995). Point mutations in the herpes simplex virus type 1 Vmw110 RING finger helix affect activation of gene expression, viral growth, and interaction with PML-containing nuclear structures. *J. Virol.* 69, 7339–7344.

Everett, R.D., Freemont, P., Saitoh, H., Dasso, M., Orr, a, Kathoria, M., and Parkinson, J. (1998). The disruption of ND10 during herpes simplex virus infection correlates with the Vmw110- and proteasome-dependent loss of several PML isoforms. *J. Virol.* 72, 6581–6591.

Everett, R.D., Rechter, S., Papior, P., Tavalai, N., Stamminger, T., and Orr, A. (2006). PML contributes to a cellular mechanism of repression of herpes simplex virus type 1 infection that is inactivated by ICP0. *J. Virol.* 80, 7995–8005.

Everett, R.D., Parada, C., Gripon, P., Sirma, H., and Orr, A. (2008). Replication of ICP0-null mutant herpes simplex virus type 1 is restricted by both PML and Sp100. *J. Virol.* 82, 2661–2672.

Everett, R.D., Parsy, M.-L., and Orr, A. (2009). Analysis of the functions of herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP0 that are critical for lytic infection and derepression of quiescent viral genomes. *J. Virol.* 83, 4963–4977.

Fanelli, M., Fantozzi, A., De Luca, P., Caprodossi, S., Matsuzawa, S.I., Lazar, M.A., Giuseppe Pelicci, P., and Minucci, S. (2004). The Coiled-coil Domain Is the Structural Determinant for Mammalian Homologues of Drosophila Sina-mediated Degradation of Promyelocytic Leukemia Protein and Other Tripartite Motif Proteins by the Proteasome. *J. Biol. Chem.* 279, 5374–5379.

Farooq, A. V., and Shukla, D. (2012). Herpes Simplex Epithelial and Stromal Keratitis: An Epidemiologic Update. *Surv. Ophthalmol.* 57, 448–462.

Fejtova, A., and Gundelfinger, E.D. (2006). Molecular organization and assembly of the presynaptic active zone of neurotransmitter release. *Results Probl. Cell Differ.* 43, 49–68.

Fenske, T. (2017). GEN-003 , a Herpes Simplex Virus Immunotherapy , Elicits Significant Neutralizing Antibody and Cellular Responses in HSV-2 Seropositive Subjects GEN-003 : An immunotherapy for HSV-infected individuals.Presentation.

Field, H.J., Huang, M.L., Lay, E.M., Mickleburgh, I., Zimmermann, H., and Birkmann, A. (2013). Baseline sensitivity of HSV-1 and HSV-2 clinical isolates and defined acyclovir-resistant strains to the helicase-primase inhibitor pritelivir. *Antiviral Res.* 100, 297–299.

Fields, B.N., Knipe, D.M., and Howley, P.M. (2013). *Fields Virology*, 6th Edition. Lippincott Williams & Wilki.

Finley, D. (2009). Recognition and Processing of Ubiquitin-Protein Conjugates by the Proteasome. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 477–513.

- Frasor, J., Danes, J.M., Funk, C.C., and Katzenellenbogen, B.S. (2005). Estrogen down-regulation of the corepressor N-CoR: Mechanism and implications for estrogen derepression of N-CoR-regulated genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *102*, 13153–13157.
- Freed, E., and Martin, M. (2013). *Fields Virology*. 6th Edition. Lippincott Williams & Wilki.
- Freemont, P.S., Hanson, I.M., and Trowsdale, J. (1991). A novel cysteine-rich sequence motif. *Cell* *64*, 483–484.
- Frew, I.J., Hammond, V.E., Dickins, R.A., Quinn, J.M.W., Walkley, C.R., Sims, N.A., Schnall, R., Della, N.G., Holloway, A.J., Digby, M.R., et al. (2003). Generation and Analysis of Siah2 Mutant Mice. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 9150–9161.
- García-Limones, C., Lara-Chica, M., Jiménez-Jiménez, C., Pérez, M., Moreno, P., Muñoz, E., and Calzado, M.A. (2016). CHK2 stability is regulated by the E3 ubiquitin ligase SIAH2. *Oncogene* *35*, 4289–4301.
- Geltz, J.J., Gershburg, E., and Halford, W.P. (2015). Herpes simplex virus 2 (HSV-2) infected cell proteins are among the most dominant antigens of a live-attenuated HSV-2 vaccine. *PLoS One* *10*.
- Gianni, T., Amasio, M., and Campadelli-Fiume, G. (2009). Herpes simplex virus gD forms distinct complexes with fusion executors gB and gH/gL in part through the C-terminal profusion domain. *J. Biol. Chem.* *284*, 17370–17382.
- Glickman, M.H., and Ciechanover, A. (2002). The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction. *Physiol. Rev.* *82*, 373–428.
- Glickman, M.H., Rubin, D.M., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Baumeister, W., Fried, V.A., and Finley, D. (1998). A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell* *94*, 615–623.
- Gordon, Y.J., Yates, K.A., Mah, F.S., and Romanowski, E.G. (2003). The effects of Xalatan on the recovery of ocular herpes simplex virus type 1 (HSV-1) in the induced reactivation and spontaneous shedding rabbit models. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* *19*, 233–245.
- 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.
- Gripon, P., Rumin, S., Urban, S., Le Seyec, J., Glaise, D., Cannie, I., Guyomard, C., Lucas, J., Trepo, C., and Guguen-Guillouzo, C. (2002). Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 15655–15660.
- Groll, M., Bajorek, M., Köhler, A., Moroder, L., Rubin, D.M., Huber, R., Glickman, M.H., and Finley, D. (2000). A gated channel into the proteasome core particle. *Nat. Struct. Biol.* *7*, 1062–1067.
- 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.
- Gu, H. (2016). Infected cell protein 0 functional domains and their coordination in herpes simplex virus replication. *World J. Virol.* 1–13.

- Gu, B., and DeLuca, N. (1994). Requirements for activation of the herpes simplex virus glycoprotein C promoter in vitro by the viral regulatory protein ICP4. *J. Virol.* 68, 7953–7965.
- Gu, H., and Roizman, B. (2007). Herpes simplex virus-infected cell protein 0 blocks the silencing of viral DNA by dissociating histone deacetylases from the CoREST-REST complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 17134–17139.
- Gu, H., and Roizman, B. (2009). The two functions of herpes simplex virus 1 ICP0, inhibition of silencing by the CoREST/REST/HDAC complex and degradation of PML, are executed in tandem. *J. Virol.* 83, 181–187.
- Gu, H., Liang, Y., Mandel, G., and Roizman, B. (2005). Components of the REST/CoREST/histone deacetylase repressor complex are disrupted, modified, and translocated in HSV-1-infected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 7571–7576.
- Hafezi, W., Lorentzen, E.U., Eing, B.R., Müller, M., King, N.J.C., Klupp, B., Mettenleiter, T.C., and Kühn, J.E. (2012). Entry of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) into the distal axons of trigeminal neurons favors the onset of nonproductive, silent infection. *PLoS Pathog.* 8.
- Halford, W.P. (2014). Antigenic breadth: A missing ingredient in HSV-2 subunit vaccines? *Expert Rev. Vaccines* 13, 691–710.
- Halford, W.P. (2017). 21 st CENTURY Herpes Solutions. Presentation.
- Halford, W.P., and Gebhardt, B.M. (2011). Host Interferon: a Silent Partner in the Regulation of Herpes Simplex Virus Latency. *Science*, 85–111.
- Halford, W.P., and Schaffer, P.A. (2001). ICP0 is required for efficient reactivation of herpes simplex virus type 1 from neuronal latency. *J. Virol.* 75, 3240–3249.
- Halford, W.P., and Schaffer, P.A. (2000). Optimized viral dose and transient immunosuppression enable herpes simplex virus ICP0-null mutants To establish wild-type levels of latency in vivo. *J. Virol.* 74, 5957–5967.
- Halford, W.P., Weisend, C., Grace, J., Soboleski, M., Carr, D.J.J., Balliet, J.W., Imai, Y., Margolis, T.P., and Gebhardt, B.M. (2006). ICP0 antagonizes Stat 1-dependent repression of herpes simplex virus: Implications for the regulation of viral latency. *J. Virol.* 3.
- Halford, W.P., Püschel, R., and Rakowski, B. (2010). Herpes simplex virus 2 ICP0- mutant viruses are avirulent and immunogenic: Implications for a genital herpes vaccine. *PLoS One*.
- Halford, W.P., Püschel, R., Gershburg, E., Wilber, A., Gershburg, S., and Rakowski, B. (2011). A live-attenuated HSV-2 ICP0- virus elicits 10 to 100 times greater protection against genital herpes than a glycoprotein D subunit vaccine. *PLoS One* 6.
- Halford, W.P., Geltz, J., and Gershburg, E. (2013). Pan-HSV-2 IgG Antibody in Vaccinated Mice and Guinea Pigs Correlates with Protection against Herpes Simplex Virus 2. *PLoS One* 8.
- Halford, W.P., Geltz, J., Messer, R.J., and Hasenkrug, K.J. (2015). Antibodies Are Required for Complete Vaccine-Induced Protection against Herpes Simplex Virus 2. *PLoS One*.
- Härle, P., Sainz, B., Carr, D.J.J., and Halford, W.P. (2002). The immediate-early protein,

- ICP0, is essential for the resistance of herpes simplex virus to interferon- α/β . *Virology* 293, 295–304.
- He, N., Liu, M., Hsu, J., Xue, Y., Chou, S., Burlingame, A., Krogan, N.J., Alber, T., and Zhou, Q. (2010). HIV-1 Tat and Host AFF4 Recruit Two Transcription Elongation Factors into a Bifunctional Complex for Coordinated Activation of HIV-1 Transcription. *Mol. Cell* 38, 428–438.
- Hershko, A., and Ciechanover, A. (1982). Mechanisms of intracellular protein breakdown. *Annu. Rev. Biochem.* 51, 335–364.
- Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 425–479.
- Hershko, a, Heller, H., Eytan, E., Kaklij, G., and Rose, I. a (1984). Role of the alpha-amino group of protein in ubiquitin-mediated protein breakdown. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 7021–7025.
- Hideshima, T., Richardson, P.G., and Anderson, K.C. (2011). Mechanism of Action of Proteasome Inhibitors and Deacetylase Inhibitors and the Biological Basis of Synergy in Multiple Myeloma. *Mol. Cancer Ther.* 10, 2034–2042.
- Hill, J.M., Nolan, N.M., McFerrin, H.E., Clement, C., Foster, T.P., Halford, W.P., Kousoulas, K.G., Lukiw, W.J., Thompson, H.W., Stern, E.M., et al. (2012). HSV-1 latent rabbits shed viral DNA into their saliva. *Virol. J.* 9.
- Hobbs, W.E., Brough, D.E., Kovesdi, I., and DeLuca, N.A. (2001). Efficient activation of viral genomes by levels of herpes simplex virus ICP0 insufficient to affect cellular gene expression or cell survival. *J. Virol.* 75, 3391–3403.
- Hochstrasser, M. (1995). Ubiquitin, proteasomes, and the regulation of intracellular protein degradation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 215–223.
- Hochstrasser, M. (1996). Ubiquitin-dependent Protein Degradation. *Annu. Rev. Genet.* 30, 405–439.
- Homa, F.L., and Brown, J.C. (1997). Capsid assembly and DNA packaging in herpes simplex virus. *Rev. Med. Virol.* 7, 107–122.
- Hoshino, Y., Qin, J., Follmann, D., Cohen, J.I., and Straus, S.E. (2008). The number of herpes simplex virus-infected neurons and the number of viral genome copies per neuron correlate with the latent viral load in ganglia. *Virology* 372, 56–63.
- Hough, R., and Rechsteiner, M. (1986). Ubiquitin-lysozyme conjugates. Purification and susceptibility to proteolysis. *J. Biol. Chem.* 261, 2391–2399.
- House, C.M., Frew, I.J., Huang, H.-L., Wiche, G., Traficante, N., Nice, E., Catimel, B., and Bowtell, D.D.L. (2003). A binding motif for Siah ubiquitin ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 3101–3106.
- House, C.M., Hancock, N.C., Möller, A., Cromer, B.A., Fedorov, V., Bowtell, D.D.L., Parker, M.W., and Polekhina, G. (2006). Elucidation of the Substrate Binding Site of Siah Ubiquitin Ligase. *Structure* 14, 695–701.
- House, C.M., Möller, A., and Bowtell, D.D.L. (2009). Siah proteins: Novel drug targets in the

- Ras and hypoxia pathways. *Cancer Res.* *69*, 8835–8838.
- Hu, G., Chung, Y.L., Glover, T., Valentine, V., Look, A.T., and Fearon, E.R. (1997). Characterization of human homologs of the *Drosophila* seven in absentia (*sina*) gene. *Genomics* *46*, 103–111.
- Huang, D.T., Hunt, H.W., Zhuang, M., Ohi, M.D., Holton, J.M., and Schulman, B.A. (2007). Basis for a ubiquitin-like protein thioester switch toggling E1-E2 affinity. *Nature* *445*, 394–398.
- Jackson, P.K., Eldridge, A.G., Freed, E., Furstenthal, L., Hsu, J.Y., Kaiser, B.K., and Reimann, J.D.R. (2000). The lore of the RINGs: Substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol.* *10*, 429–439.
- Javier, R.T., Stevens, J.G., Dissette, V.B., and Wagner, E.K. (1988). A herpes simplex virus transcript abundant in latently infected neurons is dispensable for establishment of the latent state. *Virology* *166*, 254–257.
- Johnston, C., Gottlieb, S.L., and Wald, A. (2016). Status of vaccine research and development of vaccines for herpes simplex virus. *Vaccine* *34*, 2948–2952.
- Jones, C. (1998). Alphaherpesvirus Latency: Its Role in Disease and Survival of the Virus in Nature. *Adv. Virus Res.* *51*, 81–133.
- Kar, G., Keskin, O., Nussinov, R., and Gursoy, A. (2012). Human proteome-scale structural modeling of E2-E3 interactions exploiting interface motifs. *J. Proteome Res.* *11*, 1196–1207.
- Kaufman, H.E., Varnell, E.D., Gebhardt, B.M., Thompson, H.W., and Hill, J.M. (1996). Propranolol suppression of ocular HSV-1 recurrence and associated corneal lesions following spontaneous reactivation in the rabbit. *Curr. Eye Res.* *15*, 680–684.
- Kennedy, D.P., Clement, C., Arceneaux, R.L., Bhattacharjee, P.S., Huq, T.S., and Hill, J.M. (2011). Ocular herpes simplex virus type 1: Is the cornea a reservoir for viral latency or a fast pit stop? *Cornea* *30*, 251–259.
- Khanna, K.M., Bonneau, R.H., Kinchington, P.R., and Hendricks, R.L. (2003). Herpes simplex virus-specific memory CD8+T cells are selectively activated and retained in latently infected sensory ganglia. *Immunity* *18*, 593–603.
- Kibrick, S. (1966). Reactivation of Herpetic Keratitis by Epinephrine in Rabbit. *Arch. Ophthalmol.* *75*, 254–260.
- Kim, J.Y., Shiflett, L.A., Linderman, J.A., Mohr, I., and Wilson, A.C. (2014). Using homogeneous primary neuron cultures to study fundamental aspects of HSV-1 latency and reactivation. *Methods Mol. Biol.* *1144*, 167–179.
- Kleiger, G., and Mayor, T. (2014). Perilous journey: A tour of the ubiquitin-proteasome system. *Trends Cell Biol.* *24*, 352–359.
- Knipe, D.M., and Cliffe, A. (2008). Chromatin control of herpes simplex virus lytic and latent infection. *Nat. Rev. Microbiol.* *6*, 211–221.
- Kobayashi, M., Kim, J.-Y., Camarena, V., Roehm, P.C., Chao, M. V., Wilson, A.C., and Mohr, I. (2012). A Primary Neuron Culture System for the Study of Herpes Simplex Virus Latency and Reactivation. *J. Vis. Exp* *3823*.

- Kodukula, P., Liu, T., Rooijen, N. V, Jager, M.J., and Hendricks, R.L. (1999). Macrophage control of Herpes simplex virus type 1 replication in the peripheral nervous system. *J Immunol.* *162*, 2895–2905.
- Koegl, M., Hoppe, T., Schlenker, S., Ulrich, H.D., Mayer, T.U., and Jentsch, S. (1999). A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* *96*, 635–644.
- Komander, D., Clague, M.J., and Urbé, S. (2009). Breaking the chains: Structure and function of the deubiquitinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 550–563.
- Kramer, T., and Enquist, L.W. (2013). Directional spread of alphaherpesviruses in the nervous system. *Viruses* *5*, 678–707.
- Kristie, T.M. (2007). Early events pre-initiation of alphaherpes viral gene expression. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge University Press, 112–127.
- Kristie, T.M. (2015). Dynamic modulation of HSV chromatin drives initiation of infection and provides targets for epigenetic therapies. *Virology* *479–480*, 555–561.
- Kristie, T.M., and Roizman, B. (1986). DNA-binding site of major regulatory protein alpha 4 specifically associated with promoter-regulatory domains of alpha genes of herpes simplex virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* *83*, 4700–4704.
- Kristie, T.M., Vogel, J.L., and Sears, a E. (1999). Nuclear localization of the C1 factor (host cell factor) in sensory neurons correlates with reactivation of herpes simplex virus from latency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 1229–1233.
- Kubat, N.J., Amelio, A.L., Giordani, N. V, and Bloom, D.C. (2004). The Herpes Simplex Virus Type 1 Latency-Associated Transcript (LAT) Enhancer / rcr Is Hyperacetylated during Latency Independently of LAT Transcription The Herpes Simplex Virus Type 1 Latency-Associated Transcript (LAT) Enhancer / rcr Is Hyperacetylat. *J. Virol.* *78*, 12508–12518.
- Kukhanova, M.K., Korovina, A.N., and Kochetkov, S.N. (2014). Human Herpes Simplex Virus: Life Cycle and Development of Inhibitors. *Biochem.-Moscow* *79*, 1635–1652.
- Kumar, M., Kaufman, H.E., Clement, C., Bhattacharjee, P.S., Huq, T.S., Varnell, E.D., Thompson, H.W., and Hill, J.M. (2010). Effect of high versus low oral doses of valacyclovir on herpes simplex virus-1 DNA shedding into tears of latently infected rabbits. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* *51*, 4703–4706.
- Kwiatkowski, D.L., Thompson, H.W., and Bloom, D.C. (2009). The polycomb group protein Bmi1 binds to the herpes simplex virus 1 latent genome and maintains repressive histone marks during latency. *J. Virol.* *83*, 8173–8181.
- Kwong, A.D., and Frenkel, N. (1989). The herpes simplex virus virion host shutoff function. *J. Virol.* *63*, 4834–4839.
- Lanfranca, M.P., Mostafa, H.H., and Davido, D.J. (2014). HSV-1 ICP0: An E3 Ubiquitin Ligase That Counteracts Host Intrinsic and Innate Immunity. *Cells* *3*, 438–454.
- Lee, E.C., Yu, D., Martinez De Velasco, J., Tessarollo, L., Swing, D.A., Court, D.L., Jenkins, N.A., and Copeland, N.G. (2001). A highly efficient Escherichia coli-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA.

Genomics 73, 56–65.

Lee, J.S., Raja, P., and Knipe, D.M. (2016). Herpesviral ICP0 protein promotes two waves of heterochromatin removal on an early viral promoter during lytic infection. *MBio* 7.

Lees-Miller, S.P., Long, M.C., Kilvert, M. a, Lam, V., Rice, S. a, and Spencer, C. a (1996). Attenuation of DNA-dependent protein kinase activity and its catalytic subunit by the herpes simplex virus type 1 transactivator ICP0. *J. Virol.* 70, 7471–7477.

Lester, J.T., and DeLuca, N.A. (2011). Herpes Simplex Virus 1 ICP4 Forms Complexes with TFIID and Mediator in Virus-Infected Cells. *J. Virol.* 85, 5733–5744.

Lester, S.N., and Li, K. (2014). Toll-like receptors in antiviral innate immunity. *J. Mol. Biol.* 426, 1246–1264.

Li, H., Baskaran, R., Krisky, D.M., Bein, K., Grandi, P., Cohen, J.B., and Glorioso, J.C. (2008). Chk2 is required for HSV-1 ICP0-mediated G2/M arrest and enhancement of virus growth. *Virology* 375, 13–23.

Li, L., Li, Z., Wang, E., Yang, R., Xiao, Y., Han, H., Lang, F., Li, X., Xia, Y., Gao, F., et al. (2015). Herpes Simplex Virus 1 Infection of Tree Shrews Differs from That of Mice in the Severity of Acute Infection and Viral Transcription in the Peripheral Nervous System. *J. Virol.* 90, 790–804.

Li, L., Li, Z., Li, X., Wang, E., Lang, F., Xia, Y., Fraser, N.W., Gao, F., and Zhou, J. (2016). Reactivation of HSV-1 following explant of tree shrew brain. *J. Neurovirol.* 22, 293–306.

Li, M., Chen, D., Shiloh, A., Luo, J., Nikolaev, A.Y., Qin, J., and Gu, W. (2002). Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization. *Nature* 416, 648–653.

Liang, Y., Vogel, J.L., Narayanan, A., Peng, H., and Kristie, T.M. (2009). Inhibition of the histone demethylase LSD1 blocks alpha-herpesvirus lytic replication and reactivation from latency. *Nat. Med.* 15, 1312–1317.

Liesegang, T.J. (2001). Herpes simplex virus epidemiology and ocular importance. *Cornea* 20, 1–13.

Lilley, C.E., Carson, C.T., Muotri, A.R., Gage, F.H., and Weitzman, M.D. (2005). DNA repair proteins affect the lifecycle of herpes simplex virus 1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 5844–5849.

Lilley, C.E., Chaurushiya, M.S., Boutell, C., Landry, S., Suh, J., Panier, S., Everett, R.D., Stewart, G.S., Durocher, D., and Weitzman, M.D. (2010). A viral E3 ligase targets RNF8 and RNF168 to control histone ubiquitination and DNA damage responses. *EMBO J.* 29, 943–955.

van Lint, A.L., Murawski, M.R., Goodbody, R.E., Severa, M., Fitzgerald, K. a, Finberg, R.W., Knipe, D.M., and Kurt-Jones, E. a (2010). Herpes simplex virus immediate-early ICP0 protein inhibits Toll-like receptor 2-dependent inflammatory responses and NF-kappaB signaling. *J. Virol.* 84, 10802–10811.

Liu, M., Hsu, J., Chan, C., Li, Z., and Zhou, Q. (2012). The Ubiquitin Ligase Siah1 Controls ELL2 Stability and Formation of Super Elongation Complexes to Modulate Gene Transcription. *Mol. Cell* 46, 325–334.

- Liu, Q., Guntuku, S., Cui, X.S., Matsuoka, S., Cortez, D., Tamai, K., Luo, G., Carattini-Rivera, S., DeMayo, F., Bradley, A., et al. (2000). Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G2/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev.* *14*, 1448–1459.
- Liu, T., Khanna, K.M., Chen, X., Fink, D.J., and Hendricks, R.L. (2000). CD8 + T Cells Can Block Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1) Reactivation from Latency in Sensory Neurons. *J. Exp. Med.* *0*, 1459–1466.
- Looker, K.J., Garnett, G.P., and Schmid, G.P. (2008). An estimate of the global prevalence and incidence of herpes simplex virus type 2 infection. *Bull. World Health Organ.* *86*, 805–812.
- Lopez, C. (1975). Genetics of natural resistance to herpesvirus infections in mice. *Nature* *258*, 152–153.
- Loret, S., and Lippé, R. (2012). Biochemical analysis of infected cell polypeptide (ICP)0, ICP4, ul7 and ul23 incorporated into extracellular herpes simplex virus type 1 virions. *J. Gen. Virol.* *93*, 624–634.
- Lorick, K.L., Jensen, J.P., Fang, S., Ong, A.M., Hatakeyama, S., and Weissman, A.M. (1999). RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 11364–11369.
- Lundberg, P., Ramakrishna, C., Brown, J., Tyszka, J.M., Hamamura, M., Hinton, D.R., Kovats, S., Nalcioğlu, O., Weinberg, K., Openshaw, H., et al. (2008). The immune response to herpes simplex virus type 1 infection in susceptible mice is a major cause of central nervous system pathology resulting in fatal encephalitis. *J. Virol.* *82*, 7078–7088.
- Luo, Z., Lin, C., and Shilatifard, A. (2012). The super elongation complex (SEC) family in transcriptional control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 543–547.
- Luxton, G.W., Haverlock, S., Collier, 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.
- Ma, J., Martin, J.D., Xue, Y., Lor, L.A., Kennedy-Wilson, K.M., Sinnamon, R.H., Ho, T.F., Zhang, G., Schwartz, B., Tummino, P.J., et al. (2010). C-terminal region of USP7/HAUSP is critical for deubiquitination activity and contains a second mdm2/p53 binding site. *Arch. Biochem. Biophys.* *503*, 207–212.
- Ma, J.Z., Russell, T.A., Spelman, T., Carbone, F.R., and Tschärke, D.C. (2014). Lytic Gene Expression Is Frequent in HSV-1 Latent Infection and Correlates with the Engagement of a Cell-Intrinsic Transcriptional Response. *PLoS Pathog.* *10*.
- Mackem, S., and Roizman, B. (1982). Structural features of the herpes simplex virus alpha gene 4, 0, and 27 promoter-regulatory sequences which confer alpha regulation on chimeric thymidine kinase genes. *J. Virol.* *44*, 939–949.
- Mähler (Convenor), M., Berard, M., Feinstein, R., Gallagher, A., Illgen-Wilcke, B., Pritchett-Corning, K., and Raspa, M. (2014). FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab. Anim.* *48*, 178–192.
- Marconi, P., and Manservigi, R. (2014). Herpes simplex virus growth, preparation, and assay. *Methods Mol. Biol.* *1144*, 19–29.

- Margolis, T.P., Sedarati, F., Dobson, A.T., Feldman, L.T., and Stevens, J.G. (1992). Pathways of viral gene expression during acute neuronal infection with HSV-1. *Virology* 189, 150–160.
- Marion, M.J., Hantz, O., and Durantel, D. (2010). The HepaRG cell line: biological properties and relevance as a tool for cell biology, drug metabolism, and virology studies. *Methods Mol. Biol.* 640, 261–272.
- Mark, K.E., Wald, A., Magaret, A.S., Selke, S., Olin, L., Huang, M., and Corey, L. (2008). Rapidly Cleared Episodes of Herpes Simplex Virus Reactivation in Immunocompetent Adults. *J. Infect. Dis.* 198, 1141–1149.
- Matsuoka, S., Rotman, G., Ogawa, A., Shiloh, Y., Tamai, K., and Elledge, S.J. (2000). Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 10389–10394.
- Matsuzawa, S.I., and Reed, J.C. (2001). Siah-1, SIP, and Ebi collaborate in a novel pathway for β -catenin degradation linked to p53 responses. *Mol. Cell* 7, 915–926.
- Maul, G.G. (1998). Nuclear domain 10, the site of DNA virus transcription and replication. *BioEssays* 20, 660–667.
- Maul, G.G., and Everett, R.D. (1994). The nuclear location of PML, a cellular member of the C3HC4 zinc-binding domain protein family, is rearranged during herpes simplex virus infection by the C3HC4 viral protein ICP0. *J. Gen. Virol.* 75, 1223–1233.
- Maul, G.G., Guldner, H.H., and Spivack, J.G. (1993). Modification of discrete nuclear domains induced by herpes simplex virus type 1 immediate early gene 1 product (ICP0). *J. Gen. Virol.* 74, 2679–2690.
- McNally, B.A., Trgovcich, J., Maul, G.G., Liu, Y., and Zheng, P. (2008). A role for cytoplasmic PML in cellular resistance to viral infection. *PLoS One* 3.
- Menendez, C.M., and Carr, D.J.J. (2017). Herpes simplex virus-1 infects the olfactory bulb shortly following ocular infection and exhibits a long-term inflammatory profile in the form of effector and HSV-1-specific T cells. *J. Neuroinflammation* 14.
- Mertz, G.J. (2008). Asymptomatic shedding of herpes simplex virus 1 and 2: implications for prevention of transmission. *J. Infect. Dis.* 198, 1098–1100.
- Mertz, G.J., Ashley, R., Burke, R.L., Benedetti, J., Critchlow, C., Jones, C.C., and Corey, L. (1990). Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of a Herpes Simplex Virus Type 2 Glycoprotein Vaccine in Persons at High Risk for Genital Herpes Infection. *J. Infect. Dis.* 161, 653–660.
- Meseda, C.A., Schmeisser, F., Pedersen, R., Woerner, A., and Weir, J.P. (2004). DNA immunization with a herpes simplex virus 2 bacterial artificial chromosome. *Virology*, 420–428.
- Mettenleiter, T.C. (2004). Budding events in herpesvirus morphogenesis. *Virus Res.* 106, 167–180.
- Mettenleiter, T.C., and Minson, T. (2006). Egress of alphaherpesviruses. *J. Virol.* 80, 1610–1611.
- Mo, A., Hofmann, T.G., Rueffer, S., Klimczak, E., Dro, W., and Will, H. (2003). PML Is

- Required for Homeodomain-interacting Protein Kinase 2 (HIPK2) -mediated p53 Phosphorylation and Cell Cycle Arrest but Is Dispensable for the Formation of HIPK Domains. *Cell* 2, 4310–4314.
- Möller, A., House, C.M., Wong, C.S.F., Scanlon, D.B., Liu, M.C.P., Ronai, Z., and Bowtell, D.D.L. (2009). Inhibition of Siah ubiquitin ligase function. *Oncogene* 28, 289–296.
- Moriyoshi, K., Iijima, K., Fujii, H., Ito, H., Cho, Y., and Nakanishi, S. (2004). Seven in absentia homolog 1A mediates ubiquitination and degradation of group 1 metabotropic glutamate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 8614–8619.
- Mossman, K.L., Sherburne, R., Lavery, C., Duncan, J., and Smiley, J.R. (2000a). Evidence that herpes simplex virus VP16 is required for viral egress downstream of the initial envelopment event. *J. Virol.* 74, 6287–6299.
- Mossman, K.L., Saffran, H.A., and Smiley, J.R. (2000b). Herpes simplex virus ICP0 mutants are hypersensitive to interferon. *J. Virol.* 74, 2052–2056.
- Mostafa, H.H., Thompson, T.W., Kushnir, A.S., Haenchen, S.D., Bayless, A.M., Hilliard, J.G., Link, M.A., Pitcher, L.A., Loveday, E., Schaffer, P.A., et al. (2011). Herpes Simplex Virus 1 ICP0 Phosphorylation Site Mutants Are Attenuated for Viral Replication and Impaired for Explant-Induced Reactivation. *J. Virol.* 85, 12631–12637.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51, 263–273.
- Mundle, S.T., Hernandez, H., Hamberger, J., Catalan, J., Zhou, C., Stegalkina, S., Tiffany, A., Kleanthous, H., Delagrave, S., and Anderson, S.F. (2013). High-Purity Preparation of HSV-2 Vaccine Candidate ACAM529 Is Immunogenic and Efficacious In Vivo. *PLoS One* 8.
- Muylaert, I., Tang, K.-W., and Elias, P. (2011). Replication and recombination of herpes simplex virus DNA. *J. Biol. Chem.* 286, 15619–15624.
- Nadeau, R.J., Toher, J.L., Yang, X., Kovalenko, D., and Friesel, R. (2007). Regulation of Sprouty2 stability by mammalian seven-in-absentia homolog 2. *J. Cell. Biochem.* 100, 151–160.
- Nagel, C.H., Albrecht, N., Milovic-Holm, K., Mariyanna, L., Keyser, B., Abel, B., Weseloh, B., Hofmann, T.G., Eibl, M.M., and Hauber, J. (2011). Herpes Simplex Virus Immediate-Early Protein ICP0 Is Targeted by SIAH-1 for Proteasomal Degradation. *J. Virol.* 85, 7644–7657.
- Nagel, C.H., Pohlmann, A., and Sodeik, B. (2014). Construction and Characterization of Bacterial Artificial Chromosomes (BACs) Containing Herpes Simplex Virus Full-Length Genomes. In *Herpes Simplex Virus: Methods and Protocols*. Springer, 43–62.
- Nakayama, K., Qi, J., and Ronai, Z. (2009). The Ubiquitin Ligase Siah2 and the Hypoxia Response. *Mol. Cancer Res.* 7, 443–451.
- Namvar, L., Olofsson, S., Bergström, T., and Lindh, M. (2005). Detection and typing of herpes simplex virus (HSV) in mucocutaneous samples by TaqMan PCR targeting a gB segment homologous for HSV types 1 and 2. *J. Clin. Microbiol.* 43, 2058–2064.
- Natarajan, R., Deshmane, S., and Everett, R. (1991). A Herpes Simplex Virus Type 1 Mutant

- Lacking the ICPO Introns Reactivates with Normal Efficiency. *J. Virol.* *65*, 5569–5573.
- Negorev, D.G., Vladimirova, O. V., Ivanov, A., Rauscher, F., and Maul, G.G. (2006). Differential Role of Sp100 Isoforms in Interferon-Mediated Repression of Herpes Simplex Virus Type 1 Immediate-Early Protein Expression. *J. Virol.* *80*, 8019–8029.
- Nesburn, A.B., Green, M.T., Radnoti, M., and Walker, B. (1977). Reliable in vivo model for latent herpes simplex virus reactivation with peripheral virus shedding. *Infect. Immun.* *15*, 772–775.
- Nesburn, A.B., Burke, R.L., Ghiasi, H., Slanina, S., Bahri, S., and Wechsler, S.L. (1994). Vaccine therapy for ocular herpes simplex virus (HSV) infection: periocular vaccination reduces spontaneous ocular HSV type 1 shedding in latently infected rabbits. *J. Virol.* *68*, 5084–5092.
- Newcomb, W.W., Fontana, J., Winkler, D.C., Cheng, N., Bernard Heymann, J., and Stevena, A.C. (2017). The primary enveloped virion of herpes simplex virus 1: Its role in nuclear egress. *MBio* *8*.
- 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.
- Nicoll, M.P., Proença, J.T., and Efstathiou, S. (2012). The molecular basis of herpes simplex virus latency. *FEMS Microbiol. Rev.* *36*, 684–705.
- Nicoll, M.P., Hann, W., Shivkumar, M., Harman, L.E.R., Connor, V., Coleman, H.M., Proença, J.T., and Efstathiou, S. (2016). The HSV-1 Latency-Associated Transcript Functions to Repress Latent Phase Lytic Gene Expression and Suppress Virus Reactivation from Latently Infected Neurons. *PLoS Pathog.*
- Nimonkar, A. V., and Boehmer, P.E. (2003). Reconstitution of recombination-dependent DNA synthesis in herpes simplex virus 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 10201–10206.
- Nygårdas, M., Paavilainen, H., Müther, N., Nagel, C.H., Røyttä, M., Sodeik, B., and Hukkanen, V. (2013). A Herpes Simplex Virus-Derived Replicative Vector Expressing LIF Limits Experimental Demyelinating Disease and Modulates Autoimmunity. *PLoS One* *8*.
- Öberg, B. (1989). Antiviral effects of phosphonoformate (pfa, foscarnet sodium). *Pharmacol. Ther.* *40*, 213–285.
- Ohashi, M., Bertke, A.S., Patel, A., and Krause, P.R. (2011). Spread of Herpes Simplex Virus to the Spinal Cord Is Independent of Spread to Dorsal Root Ganglia. *J. Virol.* *85*, 3030–3032.
- Orzalli, M.H., DeLuca, N.A., and Knipe, D.M. (2012). Nuclear IFI16 induction of IRF-3 signaling during herpesviral infection and degradation of IFI16 by the viral ICPO protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 3008–3017.
- Paladino, P., Collins, S.E., and Mossman, K.L. (2010). Cellular localization of the herpes simplex virus ICPO protein dictates its ability to block IRF3-mediated innate immune responses. *PLoS One* *5*.
- Palmer, A., Rivett, A.J., Thomson, S., Hendil, K.B., Butcher, G.W., Fuertes, G., and Knecht, E. (1996). Subpopulations of proteasomes in rat liver nuclei, microsomes and cytosol. *Biochem. J* *316*, 401–407.

- Papa, F.R., Amerik, A.Y., and Hochstrasser, M. (1999). Interaction of the Doa4 deubiquitinating enzyme with the yeast 26S proteasome. *Mol. Biol. Cell* 10, 741–756.
- Parker, Z.M., Pasieka, T.J., Parker, G.A., and Leib, D.A. (2016). Immune- and Nonimmune-Compartment-Specific Interferon Responses Are Critical Determinants of Herpes Simplex Virus-Induced Generalized Infections and Acute Liver Failure. *J. Virol.* 90, 10789–10799.
- Parkinson, J., Lees-Miller, S.P., and Everett, R.D. (1999). Herpes simplex virus type 1 immediate-early protein vmw110 induces the proteasome-dependent degradation of the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase. *J. Virol.* 73, 650–657.
- Passmore, L.A., and Barford, D. (2004). Getting into position: the catalytic mechanisms of protein ubiquitylation. *Biochem. J.* 379, 513–525.
- Pennington, M.R., Ledbetter, E.C., and Van de Walle, G.R. (2017). New paradigms for the study of ocular alphaherpesvirus infections: Insights into the use of non-traditional host model systems. *Viruses* 9.
- Perng, G.C., Jones, C., Ciacci-Zanella, J., Stone, M., Henderson, G., Yukht, A., Slanina, S.M., Hofman, F.M., Ghiasi, H., Nesburn, A.B., et al. (2000). Virus-induced neuronal apoptosis blocked by the herpes simplex virus latency-associated transcript. *Science* 287, 1500–1503.
- Plechanovov, A., Jaffray, E.G., Tatham, M.H., Naismith, J.H., and Hay, R.T. (2012). Structure of a RING E3 ligase and ubiquitin-loaded E2 primed for catalysis. *Nature* 489, 115–120.
- Preston, C.M., and Efstathiou, S. (2007). HSV-1 and 2: Molecular basis of HSV latency and reactivation. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge University Press, 602–615.
- Preston, V.G., Davison, A.J., Marsden, H.S., Timbury, M.C., Subak-Sharpe, J.H., And, and Wilkie, N.M. (1978). Recombinants Between Herpes Simplex Virus Types 1 and 2: Analyses of Genome Structures and Expression of Immediate Early Polypeptides. *J. Virol.* 28, 499–517.
- Proença, J.T., Nelson, D., Nicoll, M.P., Connor, V., and Efstathiou, S. (2016). Analyses of herpes simplex virus type 1 latency and reactivation at the single cell level using fluorescent reporter mice. *J. Gen. Virol.* 97, 767–777.
- Raja, P., Lee, J.S., Pan, D., Pesola, J.M., Coen, D.M., and Knipe, D.M. (2016). A herpesviral lytic protein regulates the structure of latent viral chromatin. *MBio*.
- Ramachandran, S., Knickelbein, J.E., Ferko, C., Hendricks, R.L., and Kinchington, P.R. (2008). Development and pathogenic evaluation of recombinant herpes simplex virus type 1 expressing two fluorescent reporter genes from different lytic promoters. *Virology* 378, 254–264.
- Ravi, V., Kennedy, P.G., and MacLean, A.R. (1998). Functional analysis of the herpes simplex virus type 2 strain HG52 RL1 gene: The intron plays no role in virulence. *J. Gen. Virol.* 79, 1613–1617.
- Regad, T., and Chelbi-Alix, M.K. (2001). Role and fate of PML nuclear bodies in response to interferon and viral infections. *Oncogene* 20, 7274–7286.
- Roizman, B. (1979). The structure and isomerization of herpes simplex virus genomes. *Cell*

16, 481–494.

Roizman, B., and Taddeo, B. (2007). The strategy of herpes simplex virus replication and takeover of the host cell. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge University Press, 163–174.

Roizman, B., and Whitley, R.J. (2013). An Inquiry into the Molecular Basis of HSV Latency and Reactivation. *Annu. Rev. Microbiol.* 67, 355–374.

Roizman, B., Gu, H., and Mandel, G. (2005). The first 30 minutes in the life of a virus: UnREST in the nucleus. *Cell Cycle* 4, 1019–1021.

Roizman, B., Zhou, G., and Du, T. (2011). Checkpoints in productive and latent infections with herpes simplex virus 1: conceptualization of the issues. *J. Neurovirol.* 17, 512–517.

Sacks, W.R., and Schaffer, P.A. (1987). Deletion mutants in the gene encoding the herpes simplex virus type 1 immediate-early protein ICP0 exhibit impaired growth in cell culture. *J. Virol.* 61, 829–839.

Samaniego, L.A., Wu, N., and DeLuca, N.A. (1997). The herpes simplex virus immediate-early protein ICP0 affects transcription from the viral genome and infected-cell survival in the absence of ICP4 and ICP27. *J. Virol.* 71, 4614–4625.

Sandbaumhüter, M., Döhner, K., Schipke, J., Binz, A., Pohlmann, A., Sodeik, B., and Bauerfeind, R. (2013). Cytosolic herpes simplex virus capsids not only require binding inner tegument protein pUL36 but also pUL37 for active transport prior to secondary envelopment. *Cell. Microbiol.* 15, 248–269.

Sandri-Goldin, R.M. (2007). Initiation of transcription and RNA synthesis, processing and transport in HSV and VZV infected cells. *Hum. Herpesviruses Biol. Ther. Immunoprophyl.* 1–13.

Sawitzke, S.K.W. and J.A. (2009). Recombination Promoted by DNA Viruses: Phage λ to Herpes Simplex Virus. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 1841–1850.

Sawtell, N.M., and Thompson, R.L. (1992). Rapid in vivo reactivation of herpes simplex virus in latently infected murine ganglionic neurons after transient hyperthermia. *J. Virol.* 66, 2150–2156.

Schaeffer, H.J., Beauchamp, L., De Miranda, P., Elion, G.B., Bauer, D.J., and Collins, P. (1978). 9-(2-Hydroxyethoxymethyl)guanine activity against viruses of the herpes group. *Nature* 272, 583–585.

Scriba, M. (1975). Herpes simplex virus infection in guinea pigs: an animal model for studying latent and recurrent herpes simplex virus infection. *Infect. Immun.* 12, 162–165.

Sedarati, F., and Stevens, J.G. (1987). Biological basis for virulence of three strains of herpes simplex virus type 1. *J. Gen. Virol.* 68 (Pt 9), 2389–2395.

Seufert, W., and Jentsch, S. (1990). Ubiquitin-conjugating enzymes UBC4 and UBC5 mediate selective degradation of short-lived and abnormal proteins. *EMBO J.* 9, 543–550.

Seufert, W., and Jentsch, S. (1992). In vivo function of the proteasome in the ubiquitin pathway. *EMBO J.* 11, 3077–3080.

Shirata, N., Kudoh, A., Daikoku, T., Tatsumi, Y., Fujita, M., Kiyono, T., Sugaya, Y.,

- Isomura, H., Ishizaki, K., and Tsurumi, T. (2005). Activation of ataxia telangiectasia-mutated DNA damage checkpoint signal transduction elicited by herpes simplex virus infection. *J. Biol. Chem.* *280*, 30336–30341.
- Skaliter, R., and Lehman, I.R. (1994). Rolling circle DNA replication in vitro by a complex of herpes simplex virus type 1-encoded enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 10665–10669.
- Skoberne, M., Cardin, R., Lee, A., Kazimirova, A., Zielinski, V., Garvie, D., Lundberg, A., Larson, S., Bravo, F.J., Bernstein, D.I., et al. (2013). An adjuvanted herpes simplex virus 2 subunit vaccine elicits a T cell response in mice and is an effective therapeutic vaccine in Guinea pigs. *J. Virol.* *87*, 3930–3942.
- Smith, G. (2012). Herpesvirus Transport to the Nervous System and Back Again. *Annu. Rev. Microbiol.* *66*, 153–176.
- 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.
- Spivack, J.G., and Fraser, N.W. (1987). Detection of herpes simplex virus type 1 transcripts during latent infection in mice. *J. Virol.* *61*, 3841–3847.
- Sriramachandran, A.M., and Dohmen, R.J. (2014). SUMO-targeted ubiquitin ligases. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* *1843*, 75–85.
- Stanberry, L.R. (1991). Evaluation of herpes simplex virus vaccines in animals: The guinea pig vaginal model. *Rev. Infect. Dis.* *13*, 920–923.
- Steiner, I., Kennedy, P.G., and Pachner, A.R. (2007). The neurotropic herpes viruses: herpes simplex and varicella-zoster. *Lancet Neurol.* *6*, 1015–1028.
- Stevens, J.G., and Cook, M.L. (1971). Latent herpes simplex virus in spinal ganglia of mice. *Sci.* *173*, 843–845.
- Stevens, J.G., Wagner, E.K., Devi-Rao, G.B., Cook, M.L., and Feldman, L.T. (1987). RNA complementary to a herpesvirus alpha gene mRNA is prominent in latently infected neurons. *Science* *235*, 1056–1059.
- Stow, N.D., and Stow, E.C. (1986). Isolation and characterization of a herpes simplex virus type 1 mutant containing a deletion within the gene encoding the immediate early polypeptide Vmw110. *J. Gen. Virol.* *67*, 2571–2585.
- Straus, S.E., Wald, A., Kost, R.G., McKenzie, R., Langenberg, a G., Hohman, P., Lekstrom, J., Cox, E., Nakamura, M., Sekulovich, R., et al. (1997). Immunotherapy of recurrent genital herpes with recombinant herpes simplex virus type 2 glycoproteins D and B: results of a placebo-controlled vaccine trial. *J. Infect. Dis.* *176*, 1129–1134.
- Strickland, E., Hakala, K., Thomas, P.J., and DeMartino, G.N. (2000). Recognition of misfolding proteins by PA700, the regulatory subcomplex of the 26 S proteasome. *J. Biol. Chem.* *275*, 5565–5572.
- Stroop, W.G. (1986). Herpes simplex virus encephalitis of the human adult: reactivation of latent brain infection. *Pathol. Immunopathol. Res.* *5*, 156–169.
- Subak-Sharpe, J.H., Al-Saadi, S.A., and Clements, G.B. (1984). Herpes Simplex Virus Type 2

- Establishes Latency in the Mouse Footpad and in the Sensory Ganglia. *J. Invest. Dermatol.* *83*, 67–71.
- Summers, B.C., Margolis, T.P., and Leib, D.A. (2001). Herpes Simplex Virus Type 1 Corneal Infection Results in Periocular Disease by Zosteriform Spread. *J. Virol.* *75*, 5069–5075.
- Tanaka, K. (1998). Molecular biology of the proteasome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *247*, 537–541.
- Tang, A.H., Neufeld, T.P., Kwan, E., and Rubin, G.M. (1997). PHYL acts to down-regulate TTK88, a transcriptional repressor of neuronal cell fates, by a SINA-dependent mechanism. *Cell* *90*, 459–467.
- Tavalai, N., and Stamminger, T. (2008). New insights into the role of the subnuclear structure ND10 for viral infection. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* *1783*, 2207–2221.
- Thompson, R.L., and Sawtell, N.M. (2001). Herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript gene promotes neuronal survival. *J. Virol.* *75*, 6660–6675.
- Thompson, R.L., and Sawtell, N.M. (2006). Evidence that the herpes simplex virus type 1 ICP0 protein does not initiate reactivation from latency in vivo. *J. Virol.* *80*, 10919–10930.
- Thompson, R.L., Williams, R.W., Kotb, M., and Sawtell, N.M. (2014). A forward phenotypically driven unbiased genetic analysis of host genes that moderate herpes simplex virus virulence and stromal keratitis in mice. *PLoS One*.
- Thrower, J.S. (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J.* *19*, 94–102.
- Tischer, B.K., Smith, G.A., and Osterrieder, N. (2010). En passant mutagenesis: A Two Markerless red recombination system. *Methods Mol. Biol.* *634*, 421–430.
- Tischer, B.K., Von Einem, J., Kaufer, B., and Osterrieder, N. (2006a). Two-step Red-mediated recombination for versatile high-efficiency markerless DNA manipulation in *Escherichia coli*. *Biotechniques* *40*, 191–197.
- Tsatsos, M., MacGregor, C., Athanasiadis, I., Moschos, M.M., Hossain, P., and Anderson, D. (2016). Herpes simplex virus keratitis: an update of the pathogenesis and current treatment with oral and topical antiviral agents. *Clin. Exp. Ophthalmol.* *44*, 824–837.
- 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.
- Verjans, G.M.G.M., Hintzen, R.Q., van Dun, J.M., Poot, A., Milikan, J.C., Laman, J.D., Langerak, A.W., Kinchington, P.R., and Osterhaus, A.D.M.E. (2007). Selective retention of herpes simplex virus-specific T cells in latently infected human trigeminal ganglia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 3496–3501.
- Verma, R., Oania, R., Graumann, J., and Deshaies, R.J. (2004). Multiubiquitin chain receptors define a layer of substrate selectivity in the ubiquitin-proteasome system. *Cell* *118*, 99–110.
- Waites, C.L., Craig, A.M., and Garner, C.C. (2005). Mechanisms of vertebrate synaptogenesis. *Annu. Rev. Neurosci.* *28*, 251–274.
- Waites, C.L., Leal-Ortiz, S.A., Okerlund, N., Dalke, H., Fejtova, A., Altmann, W.D.,

- Gundelfinger, E.D., and Garner, C.C. (2013). Bassoon and Piccolo maintain synapse integrity by regulating protein ubiquitination and degradation. *EMBO J.* 32, 954–969.
- Wald, A. (2014). GEN003-001 clinical trial result presentation. Available from <http://www.genoecea.com/assets/Interscience-Conference-on-Antimicrobial-Agents-and-Chemotherapy-ICAAC-Denver-CO-September-10-13-2013.pdf> [Accessed August 12, 2014].
- Wald, A., and Corey, L. (2007). Persistence in the population: epidemiology, transmission. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge University Press.
- Wald, A., Zeh, J., Selke, S., Ashley, R.L., and Corey, L. (1995). Virologic characteristics of subclinical and symptomatic genital herpes infections. *N. Engl. J. Med.* 333, 770–775.
- Wang, Q.-Y., Zhou, C., Johnson, K.E., Colgrove, R.C., Coen, D.M., and Knipe, D.M. (2005). Herpesviral latency-associated transcript gene promotes assembly of heterochromatin on viral lytic-gene promoters in latent infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 16055–16059.
- Webre, J.M., Hill, J.M., Nolan, N.M., Clement, C., McFerrin, H.E., Bhattacharjee, P.S., Hsia, V., Neumann, D.M., Foster, T.P., Lukiw, W.J., et al. (2012). Rabbit and mouse models of HSV-1 latency, reactivation, and recurrent eye diseases. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012.
- Weir, J.P., Bennett, M., Allen, E.M., Elkins, K.L., Martin, S., and Rouse, B.T. (1989). Recombinant vaccinia virus expressing the herpes simplex virus Type 1 glycoprotein C protects mice against herpes simplex virus challenge. *J. Gen. Virol.* 70, 2587–2594.
- Weller, S.K., Spadaro, A., Schaffer, J.E., Murray, A.W., Maxam, A.M., and Schaffer, P.A. (1985). Cloning, sequencing, and functional analysis of oriL, a herpes simplex virus type 1 origin of DNA synthesis. *Mol. Cell. Biol.* 5, 930–942.
- Wheeler, T.C., Chin, L.S., Li, Y., Roudabush, F.L., and Li, A. (2002). Regulation of synaptophysin degradation by mammalian homologues of Seven in Absentia. *J. Biol. Chem.* 277, 10273–10282.
- Whitley, R.J. (2015). Herpes Simplex Virus Infections of the Central Nervous System. *Continuum (Minneap. Minn.)* 21, 1704–1713.
- Whitley, R.J., and Roizman, B. (2001). Herpes simplex virus infections. *Lancet* 357, 1513–1518.
- Whitley, R., Kimberlin, D.W., and Prober, C.G. (2007). Pathogenesis and disease. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge University Press.
- Wilson, A.C., and Mohr, I. (2012). A cultured affair: HSV latency and reactivation in neurons. *Trends Microbiol.*
- Winter, M., Sombroek, D., Dauth, I., Moehlenbrink, J., Scheuermann, K., Crone, J., and Hofmann, T.G. (2008). Control of HIPK2 stability by ubiquitin ligase Siah-1 and checkpoint kinases ATM and ATR. *Nat. Cell Biol.* 10, 812–824.
- Wong, C.S.F., and Moller, A. (2013). Siah: A promising anticancer target. *Cancer Res.* 73, 2400–2406.
- 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.

- Yao, T., and Cohen, R.E. (2002). A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature* 419, 403–407.
- Yao, H.W., Ling, P., Chen, S.H., Tung, Y.Y., and Chen, S.H. (2012). Factors affecting herpes simplex virus reactivation from the explanted mouse brain. *Virology* 433, 116–123.
- Yoshiyoshi, H., Okabe, H., Satoh, S., Hida, K., Kawashima, K., Hamasu, S., Nomura, A., Hasegawa, S., Ikai, I., and Sakai, Y. (2007). SIAH1 causes growth arrest and apoptosis in hepatoma cells through beta-catenin degradation-dependent and -independent mechanisms. *Oncol. Rep.* 17, 549–556.
- Zawatzky, R., Gresser, I., DeMaeyer, E., and Kirchner, H. (1982). The Role of Interferon in the Resistance of CS7BL/6 Mice to Various Doses of Herpes Simplex Virus Type 1. *J. Infect. Dis.* 146, 405–410.
- Zhao, J., Wang, C., Wang, J., Yang, X., Diao, N., Li, Q., Wang, W., Xian, L., Fang, Z., and Yu, L. (2011). E3 ubiquitin ligase Siah-1 facilitates poly-ubiquitylation and proteasomal degradation of the hepatitis B viral X protein. *FEBS Lett.* 585, 2943–2950.
- Zhao, J., Wu, J., Cai, H., Wang, D., Yu, L., and Zhang, W.H. (2016). E3 ubiquitin ligase Siah-1 is down-regulated and fails to target natural HBx truncates for degradation in hepatocellular carcinoma. *J. Cancer* 7, 418–426.
- Zhu, Z., Du, T., Zhou, G., and Roizman, B. (2014). The Stability of Herpes Simplex Virus 1 ICP0 Early after Infection Is Defined by the RING Finger and the UL13 Protein Kinase. *J. Virol.* 88, 5437–5443.
- Zwickl, P., Seemüller, E., Kapelari, B., and Baumeister, W. (2001). The proteasome: A supramolecular assembly designed for controlled proteolysis. *Adv. Protein Chem.* 59, 187–222.

7 Abkürzungsverzeichnis

ACV	Aciclovir
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATM	<i>Ataxia-Telangiectasia-Mutated</i>
ATR	<i>Ataxia Telangiectasia and Rad3-related</i>
BAC	künstliches Bakterienchromosom (<i>Bacterial artificial chromosome</i>)
BAK	β -Actin
bp	Basenpaar (<i>basepair</i>)
Cam	Chloramphenicol
Cas	CRISPR-assoziiert
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	Komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
Chk	<i>Checkpoint</i> -Kinase
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPE	Zytopathischer Effekt
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeat</i>
C _t	<i>Threshold Cycle</i>
coREST	<i>Corepressor for REST</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELL2	RNA Polymerase II Elongationsfactor ELL2
FAM	6-Carboxyfluorescein
FCS	fetales Kälberserum
for	<i>Forward</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase

gB	Glykoprotein B
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunden
HBG	humanes beta-globin
HCF	<i>Host Cell Factor</i>
HIPK2	Homeodomain-interacting protein kinase 2
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HS	Hirnstamm
HSV	Herpes-Simplex-Virus
HSV2	Herpes-Simplex-Virus Typ 2
ICP0	<i>Infected Cell Protein 0</i>
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin der Klasse G
i.p.	Intraperitoneal
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
kV	Kilovolt
LAT	<i>Latency Associated Transcript</i>
LB-Medium	Lysogeny Broth (Nährmedium)
min	Minuten
M	Molar (mol/l)
MBq	Megabecquerel
mM	Millimolar (mmol/l)
μM	Micromolar
MOI	Zahlenverhältnis infektiöser Partikel zu deren Zielzellen (<i>multiplicity of infection</i>)
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
N	Asparagin
NLS	Nukleares Lokalisierungssignal
NxN	Die beiden Asparagin (N) werden in ihrer Sequenz von einer beliebigen Aminosäure (x) getrennt

Abkürzungsverzeichnis

OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
ORF	Offener Leserahmen (<i>Open reading frame</i>)
P	Prolin
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PFA	Paraformaldehyd
PFU	Plaque bildende Einheit (<i>Plaque forming unit</i>)
PML	<i>Promyelocytic leukemia</i>
Pen	Penicillin
<i>p.e.</i>	nach Extraction (<i>Post extraction</i>)
<i>p.i.</i>	nach Infektion (<i>Post Infection</i>)
PNS	Peripheres Nervensystem
REST	<i>Repressor Element 1 Silencing Transcription Factor</i>
rev	<i>Reverse</i>
RING	<i>Really Interesting New Gene</i> (Domäne)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>Rounds per minute</i>)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SIAH	<i>Seven in Absentia Homolog</i> (Protein)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese (<i>Sodium-dodecylsulfate-polyacrylamide-gel-electrophoresis</i>)
SPF	Spezifisch pathogenfrei (<i>Specific- pathogen-free</i>)
Strep	Streptomycin
TAMRA	Tetramethylrhodamin
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung, (<i>Tris buffered saline</i>)
TG	Trigeminusnerv (Trigeminalganglion)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Ub	Ubiquitin

USP7	Ubiquitin-spezifische Protease 7
UV-Licht	ultraviolettes Licht
Ü/N	Über Nacht
V	Valin auch: Volt
VxP	Valin (V) und Prolin (P) werden durch eine beliebige Aminosäure (x) getrennt
VP16	<i>Viral Protein 16</i> (Tegumentprotein)
wt	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

Aminosäuren und Nukleotide wurden gemäß IUPAC/IUBMB-Konventionen abgekürzt und, sofern nicht anders angegeben, SI-Einheiten verwendet.

8 Anhang

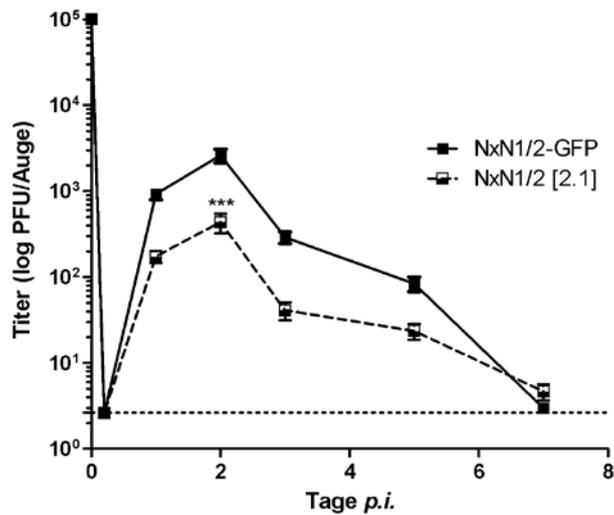


Abbildung 63 Akute Replikation der SIAH-bindedefizienten Doppelmutanten in der Cornea. Corneas von C57Bl/6J Mäusen wurden mit den jeweils mit der über *En Passant* Mutagenese generierten NxN1/2-Mutanten oder der homolog rekombinierten NxN1/2-GFP Mutante mit einem Titer von 1×10^5 pfu/Auge infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten (Tage p.i.) wurden die Virustiter in der Tränenflüssigkeit mittels *Plaque Assay* auf Verzellen bestimmt. Die Titermessungen beider NxN1/2-Mutanten wurden in voneinander unabhängig Experimenten durchgeführt, und lediglich zum Vergleich zusammen in einen Graph aufgetragen. Die Werte stellen den Mittelwert \pm SEM der Titer zum jeweiligen Zeitpunkt dar. Signifikanzen wurden mit Hilfe des *two-way* ANOVA berechnet. Die Virustiter wurden logarithmisch (\log_{10}) als Funktion der Zeit angegeben.

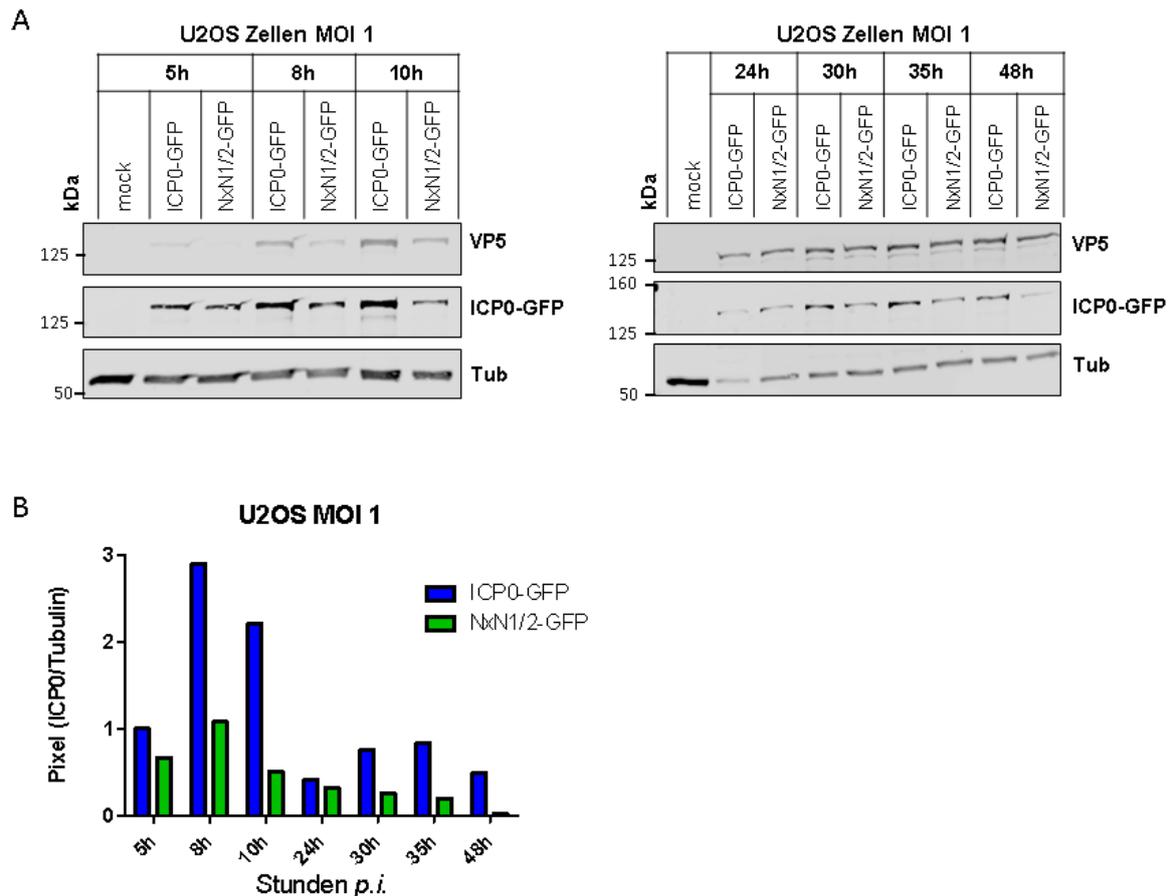


Abbildung 64 48-Stunden Proteinexpressionskinetik auf U2OS-Zellen. U2OS Zellen wurden mit den Konstrukten HSV2 ICP0-GFP (ICP0-GFP) und HSV2 ICP0^{NxN1/2}-GFP (NxN1/2-GFP) mit einer MOI von 1 *pfu*/Zelle infiziert. (A) Infizierte Zellpellets wurden zu den angegebenen Zeitpunkten *p.i.* (h= hours) geerntet und Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die viralen Proteine VP5 und ICP0 wurden mit spezifischen Antikörpern markiert. α -Tubulin (Tub) diente als Ladekontrolle. Angabe der Proteingröße in kDa. (B) Quantifizierung der Proteine mit Hilfe der *Licor Image Studio Software*. Die Intensitäten der Antikörpersignale der ICP0 Banden wurden gemessen und gegen die korrespondierenden Tubulinsignale normalisiert. Angabe der Intensitäten in Pixel.