

**Visualisierung phasentypisch exprimierter  
viraler Proteine des neurotrophen  
Varicella-Zoster-Virus nach Mutagenese  
bakterieller artifiziieller Chromosome**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
**Tanja Spieckermann**  
Kiel, 2013

Erster Gutachter: Prof. Dr. Helmut Fickenscher

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Thomas Roeder

Tag der mündlichen Prüfung: 13.12.2013

Zum Druck genehmigt: 13.12.2013

gez.: Prof. Dr. Wolfgang J. Duschl, Dekan



**I INHALTSVERZEICHNIS**

<b>I</b>	<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>II</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>II</b>
<b>1</b>	<b>Zusammenfassung/Summary</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>3</b>
	<b>2.1 Herpesviren</b> .....	<b>3</b>
	<b>2.2 Das Varicella-Zoster-Virus</b> .....	<b>3</b>
	2.2.1 Die Pathogenese des Varicella-Zoster-Virus .....	<b>3</b>
	2.2.2 Morphologie und Genomorganisation .....	<b>4</b>
	2.2.3 Der VZV-Replikationszyklus .....	<b>7</b>
	<b>2.3 Nahtlose und markerlose Erstellung von VZV-Mutanten</b> .....	<b>10</b>
	<b>2.4 Phasentypisch exprimierte VZV-Proteine</b> .....	<b>13</b>
	2.4.1 Der latent exprimierte Regulator 4p .....	<b>13</b>
	2.4.2 Die latent exprimierten Proteine 21p und 29p .....	<b>15</b>
	2.4.3 Das „axonale Leitprotein“ 65p .....	<b>16</b>
	2.4.4 Das Kapsidprotein 23p .....	<b>17</b>
	<b>2.5 Axonaler Transport in Neuronen</b> .....	<b>18</b>
	2.5.1 Aufbau und Funktion sensorischer Neurone .....	<b>18</b>
	2.5.2 Axonaler Transport .....	<b>20</b>
	2.5.3 Axonaler Transport des Varicella-Zoster-Virus .....	<b>21</b>
	<b>2.6 Ziele dieser Arbeit</b> .....	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>23</b>
	<b>3.1 Material</b> .....	<b>23</b>
	3.1.1 Plasmide, BACs und Viren .....	<b>23</b>
	3.1.2 Puffer und Lösungen .....	<b>23</b>
	3.1.3 Medien und Reagenzien .....	<b>25</b>
	3.1.4 Oligonukleotide .....	<b>26</b>
	3.1.5 Antikörper .....	<b>28</b>
	3.1.6 Zellkultur-Materialien .....	<b>29</b>
	3.1.7 Geräte .....	<b>29</b>
	<b>3.2 Zellbiologische und virologische Methoden</b> .....	<b>30</b>
	3.2.1 Zellkultur .....	<b>30</b>
	3.2.2 Virusrekonstitution und Viruskultur .....	<b>30</b>
	3.2.3 Kinetiken und Titrationsen von Viren .....	<b>31</b>
	3.2.4 Deckgläschen- und Glasbodenschälchen-Behandlung .....	<b>32</b>
	3.2.5 Präparation und Infektion sensorischer Neurone von Ratten .....	<b>32</b>
	3.2.6 Sensorische Ratten-Neurone im Mikrofluss-Kammer-System .....	<b>33</b>
	3.2.7 Immunfärbungen .....	<b>34</b>
	3.2.8 Mikroskopie .....	<b>35</b>

<b>3.3</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>36</b>
3.3.1	<i>En passant</i> -Mutagenese .....	36
3.3.2	DNA-Isolation.....	38
3.3.3	Restriktionsfragment-Analyse .....	38
3.3.4	Polymerase-Kettenreaktion .....	39
3.3.5	Agarose-Gelelektrophorese .....	39
3.3.6	Sequenzierungen.....	40
3.3.7	RNA-Präparation .....	40
3.3.8	Reverse-Transkriptase-PCR.....	41
3.3.9	Proteinisolation und Immunblot-Analyse .....	42
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>44</b>
<b>4.1</b>	<b>Herstellung rekombinanter Viren</b> .....	<b>44</b>
4.1.1	<i>Recombineering</i> an latent exprimierten Leserahmen .....	44
4.1.2	Rekonstitution der Virusmutanten.....	48
4.1.3	VZV mit grün markiertem 65p und rot markiertem Kapsidprotein.....	50
4.1.4	Nachweis der gezielten Veränderungen der ORF65-Virusmutanten....	53
<b>4.2</b>	<b>Replikation der rekombinanten Viren</b> .....	<b>56</b>
4.2.1	Replikationsverhalten .....	56
4.2.2	Cytopathische Veränderungen .....	59
4.2.3	Lokalisation der Fusionsproteine in permissiven Zellen .....	63
<b>4.3</b>	<b>Rekombinante Viren in sensorischen Neuronen</b> .....	<b>73</b>
4.3.1	Lokalisation der Fusionsproteine in Neuronen der Ratte.....	73
4.3.2	Retrograde und anterograde Infektionen von Neuronen .....	82
<b>4.4</b>	<b>Sequenzanalyse des klonierten VZV-Genoms</b> .....	<b>85</b>
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>88</b>
<b>5.1</b>	<b>Rekombinante Viren</b> .....	<b>88</b>
5.1.1	Replikationsverhalten der rekombinanten Viren .....	88
5.1.2	Expression der Fusionsproteine .....	92
<b>5.2</b>	<b>Lokalisationsbestimmungen für die viralen Fusionsproteine</b> .....	<b>95</b>
5.2.1	Lokalisation bei der Replikation in permissiven Zelllinien.....	95
5.2.2	Lokalisation in infizierten sensorischen Neuronen.....	98
<b>5.3</b>	<b>Retrograde und anterograde Infektionswege</b> .....	<b>101</b>
<b>5.4</b>	<b>Sequenzeigenschaften des klonierten VZV-Wildtyp-Genoms</b> .....	<b>103</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>105</b>
<b>7</b>	<b>Publikationen/Präsentationen</b> .....	<b>116</b>
<b>8</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>117</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>118</b>
<b>10</b>	<b>Erklärung</b> .....	<b>119</b>

## II ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

BAC	bakterielles artifizielles Chromosom
BSA	bovines Serumalbumin
bp	Basenpaar
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
CPE	Cytopathischer Effekt
DAPI	4', 6-Diamidin-2'-Phenylindol-Dihydrochlorid
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid
E	<i>early</i> , früh
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> , Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i> , grün fluoreszierendes Protein
EHV	Equines Herpesvirus
F-Plasmid	<i>fertility plasmid</i> , Fertilitäts-Plasmid
FKS	fötales Kälberserum, fötales Rinderserum
vor	vorwärts
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HFF	<i>human foreskin fibroblasts</i> , humane Vorhaut-Fibroblasten
HRP	<i>horse raddish peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
HSV	Herpes-Simplex-Virus
ICP	<i>infected cell protein</i>
IE	<i>immediate early</i> , sehr früh
IDE	<i>insulin-degrading enzyme</i>
Ig	Immunglobulin
IR <sub>L,S</sub>	<i>internal repeat of the U<sub>L</sub> or U<sub>S</sub> region</i> , interne repetitive Sequenz der U <sub>L</sub> - oder U <sub>S</sub> -Region
kb	Kilobasen
L	<i>late</i> , spät
LB	Luria-Broth Medium
M6P	Mannose-6-Phosphat
MPR	Mannose-6-Phosphatrezeptor
mRFP	monomeres rot fluoreszierendes Protein
NES	<i>nuclear export signal</i> , Kern-Export-Signal
NGF	<i>nerve growth factor</i> , Nerven-Wachstumsfaktor
NLS	<i>nuclear localization sequence</i> , Kernlokalisations-Sequenz

OD	Optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> , Offener Leserahmen
<i>pac</i>	<i>packaging site</i> , Verpackungssignal
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBST	PBS mit Tween
PBSTM	PBS mit Tween und Magermilchpulver
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PFU	<i>plaque forming units</i> , Plaque-bildende Einheiten
pH	pondus hydrogeni, negativer Logarithmus der Wasserstoff-Ionen-Konzentration
pi	<i>post infection</i> , nach Infektion
PIC	Protease-Inhibitor-Cocktail
psm	positiver Selektionsmarker
PRV	Pseudorabies-Virus
rev	revers
RFLP	<i>restriction fragment length polymorphism</i> , Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus
R	<i>repeat</i> , repetitive Sequenzeinheit
RIPA	<i>radio-immunoprecipitation assay</i> , Radio-Immunpräzipitations-Test
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
SCa, b	<i>slow component a, b</i> ; Langsame Komponente a, b
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
soi	<i>sequence of interest</i> , ausgewählte Sequenz
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TR <sub>L, S</sub>	<i>terminal repeat of the U<sub>L</sub> or U<sub>S</sub> region</i> , terminale repetitive Sequenz der U <sub>L</sub> - oder U <sub>S</sub> -Region
U	<i>unit</i> , Aktivitätseinheit für Enzyme
U <sub>L</sub>	<i>Unique long region</i> , einmalig vorkommende, lange Region
U <sub>S</sub>	<i>Unique short region</i> , einmalig vorkommende, kurze Region
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	<i>weight</i> , Gewicht pro Volumen
VZV	Varicella-Zoster-Virus
WT	Wildtyp

## 1 ZUSAMMENFASSUNG

Das humanpathogene Varicella-Zoster-Virus (VZV) gehört zu den  $\alpha$ -Herpesviren, verursacht bei der Primärinfektion die Windpocken (Varizellen) und kann nach Reaktivierung aus latenter Persistenz in sensorischen Ganglien die schmerzhafte Gürtelrose auslösen (Herpes Zoster). Diese Schmerzen können als postherpetische Neuralgie über lange Zeit andauern. Zum besseren Verständnis der VZV-Infektion sensorischer Neurone wurden verschiedene Proteine, die typischerweise während der Virus-Latenz exprimiert werden, mit dem grün fluoreszierenden Protein (eGFP) fusioniert, so dass diese Proteine nach der Virusinfektion in permissiven Zellen und in sensorischen Ratten-Neuronen sowie deren Axone beobachtet werden konnten. Zum Vergleich wurde auch das durch den Leserahmen ORF23 kodierte Kapsidprotein (23p) markiert, da dieses Protein nur bei der lytischen, permissiven Infektion gebildet wird. Für diesen Zweck wurde das als bakterielles artifizielles Chromosom (BAC) klonierte Genom des Wildtyp-VZV HJO eingesetzt. Das BAC kann aufgrund der zwischen die viralen Genomenden inserierten Anteile des F-Plasmids stabil in Bakterien gehalten und in der *En passant*-Mutagenese durch homologe Rekombination ohne sekundäre Veränderungen manipuliert werden. Fast alle geplanten rekombinanten Viren mit eGFP-Proteinfusionen konnten in permissiven eukaryonten Zellen rekonstituiert werden. Die rekonstituierten Viren zeigten aber gegenüber dem Wildtyp-Virus eine deutlich reduzierte Replikation, was bei der 29p-GFP-Fusionsmutante besonders ausgeprägt war. Zur Bestimmung der Lokalisation der Fusionsproteine wurden die für VZV permissiven Zelltypen eingesetzt, nämlich primäre menschliche Fibroblasten und die humane Melanom-Zelllinie MeWo, und mit sensorischen Neuronen der Ratte verglichen. Die untersuchten Proteine zeigten während der lytischen Infektion in den permissiven MeWo-Zellen und Fibroblasten die erwarteten Lokalisationsorte und auch in infizierten sensorischen Neuronen konnten diese bestätigt werden. In weiteren Experimenten wurde 65p, das als „axonales Leitprotein“ des VZV in Neuronen gilt, ebenfalls mit eGFP fusioniert. Damit gleichzeitig der Transport der viralen Kapside im Axon beobachtet werden konnte, wurde auch eine Doppelfusions-Mutante mit eGFP an 65p und dem monomeren rot fluoreszierenden Protein (mRFP) an 23p hergestellt. Durch die retrograde Infektion primärer sensorischer Neurone im Mikrofluss-Kammer-System sollte die Beteiligung des 65p am axonalen Viruspartikel-Transport hinsichtlich der möglichen Kolo-kalisation von 23p mit 65p untersucht werden. Tatsächlich erwies sich der axonale Transport von 65p und des Kapsids (23p) als voneinander unabhängig. Somit war es in dieser Arbeit erstmals möglich, die Lokalisationsmuster und teilweise auch die Funktionen unterschiedlicher viraler Proteine nach der Infektion mit gezielten VZV-Rekombinanten des Wildtyp-Iso-lats HJO zu untersuchen.

## 1 SUMMARY

The human pathogen Varicella-zoster virus (VZV) belongs to the  $\alpha$ -herpesviruses, causes chickenpox (varicella) upon primary infection, and can induce painful shingles (herpes zoster) after reactivation from latent persistence in sensory ganglia. This pain can persist as post-herpetic neuralgia over long periods. To better understand the VZV infection of sensory neurons, various proteins which are typically expressed during virus latency were fused with the enhanced green fluorescent protein (eGFP) in order to observe these proteins after virus infection in permissive cells and in sensory rat neurons as well as in their axons. For comparison, the capsid protein 23p encoded by open reading frame ORF23 was also tagged because this protein is only expressed during the lytic, permissive infection. For this purpose, the genome of wildtype VZV HJO, cloned as a bacterial artificial chromosome, was used. This BAC can be stably maintained in bacteria and can be manipulated by *en passant* mutagenesis and homologous recombination without secondary changes due to the insertion of F-plasmid components between the genomic ends of the virus. Almost all the planned virus recombinants with eGFP protein fusions could be reconstituted in permissive eukaryotic cells. However, the reconstituted viruses showed a markedly reduced replication in contrast to wildtype virus, especially for the 29p-GFP-fusion mutant. For the determination of the localization of the fusion proteins, the VZV-permissive cell types were used, namely primary human fibroblasts and the human melanoma cell line MeWo, and compared to sensory neurons from rat. The investigated proteins showed the expected localization patterns during lytic infection in permissive MeWo cells and fibroblast which also could be confirmed in infected sensory neurons. In further experiments, the putative axonal guidance protein 65p for VZV in neurons was also fused to eGFP. In order to study simultaneously the axonal transport of virus capsids, a double mutant with eGFP fused to 65p and monomeric red fluorescent protein (mRFP) fused to 23p was generated. By the retrograde infection of primary sensory neurons in the microfluidic chamber system the participation of 65p in the axonal virus particle transport was investigated with respect to a possible colocalization between 23p and 65p. Actually, the axonal transport of 65p and the capsid (23p) turned out to be independent from each other. Taken together, the localization patterns and partially also the functions of various virus proteins were investigated for the first time after infection with targeted VZV recombinants of wildtype isolate HJO.

## 2 EINLEITUNG

### 2.1 Herpesviren

Die mehr als hundert bekannten Herpesvirus-Spezies kommen weltweit bei fast allen Vertebraten vor. Sie haben Menschen und Säugetiere oder auch Fische, Reptilien und Vögel, und sogar einige Wirbellose als Wirt (Roizman & Baines, 1991). Das Wort Herpes stammt von dem griechischen Wort  $\epsilon\rho\pi\epsilon\iota\nu$  (kriechen) ab, was die kriechende Ausbreitung der Bläschen bei einer Herpes-Infektion der Haut beschreibt. Die Herpesviren persistieren nach der Primärinfektion lebenslang im Körper und können nach ihrer Reaktivierung aus der Latenz erneut zu Symptomen führen. Nur acht dieser zahlreichen Herpesvirus-Spezies sind humanpathogene Herpesviren. Diese acht Viren lassen sich den drei Unterfamilien der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Herpesvirinae zuordnen, wobei das besondere Merkmal der  $\alpha$ -Herpesvirinae ihr Tropismus für sensorische Neurone ist. Zu den neurotrophen humanpathogenen Herpesviren zählen das Herpes-Simplex-Virus (HSV) mit seinen beiden Spezies HSV-1 und HSV-2 sowie das Varicella-Zoster-Virus (VZV), das nach der systematischen Nomenklatur als Humanes Herpesvirus Typ 3 bezeichnet und dem Genus Varicellovirus ( $\alpha_2$ -Herpesviren) zugeordnet wird. Im Vergleich zum HSV-1 repliziert VZV langsamer und hat ein wesentlich engeres Wirts- und Wirtszell-Spektrum, es infiziert in der Regel nur Zellen humanen oder simianen Ursprungs. Zum Genus Varicellovirus gehören unter anderem auch das simiane Varicellovirus, das Equine Herpesvirus Typ 1 (EHV-1), und das neurotrope Pseudorabies-Virus der Schweine (PRV) (Cohen et al, 2007; Gray, 2004).

### 2.2 Das Varicella-Zoster-Virus

#### 2.2.1 Die Pathogenese des Varicella-Zoster-Virus

Meist im Kindesalter verursacht das ubiquitär verbreitete VZV die Windpocken (Varizellen; englisch: *chickenpox*) und kann nach jahrelanger Persistenz die Gürtelrose auslösen (Herpes Zoster, englisch: *shingles*). Das hochkontagiöse Virus induziert durch Tröpfcheninfektion die Primärinfektion, die nach einer Inkubationszeit von etwa 14 Tagen zu einem pockenähnlichen, aber morphologisch heterogenen und stark juckenden Ausschlag führt. Der Inhalt dieser Varizellen-Bläschen, als auch Inhalt der Zoster-Bläschen ist bei direktem Kontakt ansteckend (Arvin, 2001; Grose, 1981).

Nach der Infektion des oberen Respirationstraktes und der initialen Replikation in den Lymphknoten breitet sich das Virus während der primären Virämie im retikuloendothelialen System aus und befällt besonders die Leber und Milz (Grose, 1981). Schon ab 14 Tagen vor Auftreten des Ausschlags ist VZV in den mononukleären Zellen des peri-

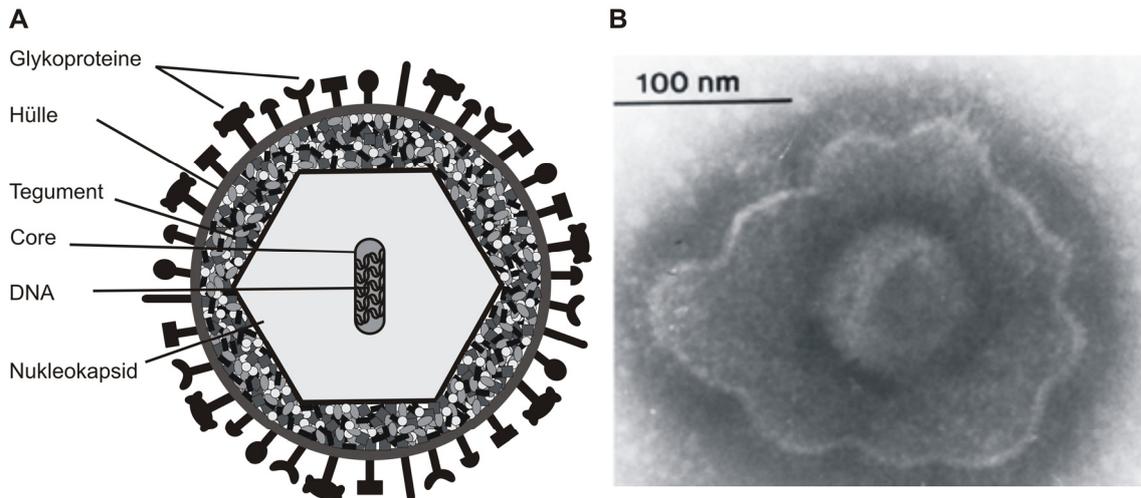
pheren Blutes nachweisbar (Ozaki et al., 1994). Im Rahmen der sekundären Virämie wird das Virus vor allem durch infizierte T-Lymphozyten bis in die Epithelzellen der Haut verbreitet (Koropchak et al., 1992; Moffat et al., 1995) und löst dort das typische Exanthem aus. Neben den CD4- und CD8-positiven T-Lymphozyten werden auch B-Lymphozyten und Monozyten infiziert (Mainka et al., 1998; Moffat et al., 1995).

Nach der Primärinfektion erreicht das Virus über die Nervenbahnen, welche die betroffenen Hautareale innervieren, oder den Blutkreislauf die sensorischen Neurone der Trigemini- und Spinalganglien. Dort verbleibt das Virus dann in Form zirkulärer Virus-Genome (Annunziato et al., 2000, Cohen & Straus, 1996). Dabei ist die Virus-DNA sowohl in den Zellkernen der Neurone als auch in den die Neurone umgebenden Satellitenzellen nachweisbar (Lungu et al., 1995; Kennedy et al., 1998). Eine Reaktivierung erfolgt meist erst nach Jahrzehnten und führt zur Rekurrenz der Erkrankung in Form der Gürtelrose. Der Herpes Zoster kommt gehäuft bei immunsupprimierten oder bei älteren Menschen vor und kann auch nach Abheilung der Gürtelrose zu lang anhaltenden Schmerzen in den betroffenen Nerven führen. Diese postherpetische Neuralgie zeichnet sich durch die Entwicklung einer Hyperalgesie bzw. einer Allodynie aus (Choi & Rowbotham, 1997; Rowbotham & Fields, 1996; Rowbotham et al., 1996). Die Hyperalgesie beschreibt eine übermäßige Reaktion auf einen schmerzauslösenden Reiz wie z.B. Kälte, Hitze oder Druck, während die Allodynie eine Schmerzreaktion auf einen nicht Schmerz-typischen Reiz darstellt (Fleetwood-Walker et al., 1999).

Im Allgemeinen sind die Windpocken eine harmlose Kinderkrankheit. Sie können aber besonders bei Erwachsenen zu schweren Komplikationen wie Meningitis, Enzephalitis oder Pneumonie führen. Die Lebendimpfung zur Prävention der Windpocken ist in Deutschland seit 2004 verfügbar und mittlerweile allgemein empfohlen. Ein höher dosierter Lebendimpfstoff für Personen ab dem 60. Lebensjahr dient der Prävention des Herpes Zoster (Oxman et al., 2005). Die VZV-Impfstoffe sind vom japanischen VZV-Stamm *parental* Oka abgeleitet, welcher durch mehrfache Passage u.a. in Meerschweinchen-Zellen attenuiert wurde (Takahashi et al., 1974).

### **2.2.2 Morphologie und Genomorganisation**

Die umhüllten VZV-Partikel haben einen Durchmesser von etwa 200 nm. Die lineare doppelsträngige DNA umfasst 125 Kilobasen (kb) und kodiert für 71 offene Leserahmen (*open reading frames*, ORF). Im Nukleokapsid ist die DNA um eine Proteinachse gewickelt, was zusammen als Core bezeichnet wird (Puvion-Dutilleul et al., 1987). Das ikosaedrische Nukleokapsid hat einen Durchmesser von etwa 100-110 nm und besteht aus 162 Kapsomeren (Almeida et al., 1962) (Abb.1).

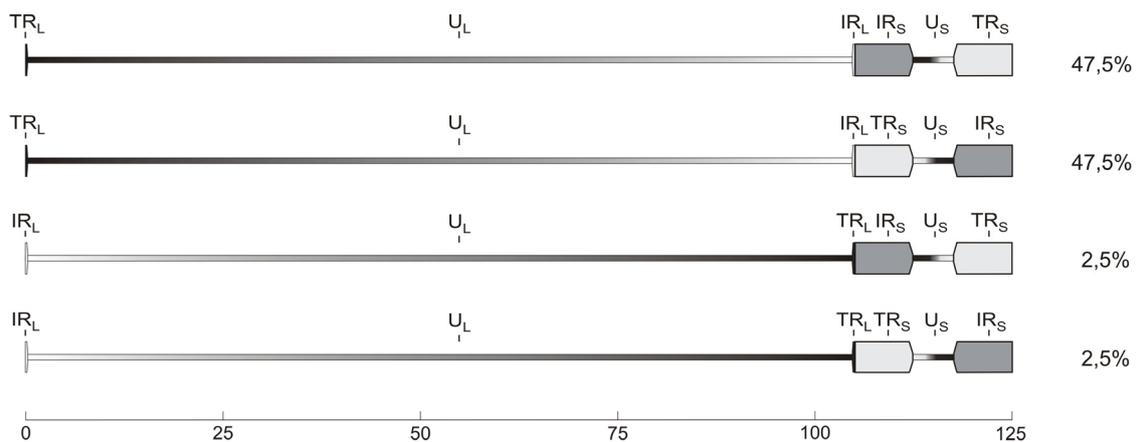


**Abb. 1: Schematischer Aufbau des Varicella-Zoster-Virus.** A. VZV ist ein umhülltes Virus mit doppelsträngiger DNA, die um eine Proteinachse gewickelt ist (Core). Zwischen dem ikosaedrischen Nukleokapsid und der Membran befindet sich das Tegument, das Transaktivatoren für die initiale Genexpression enthält. Über die Glykoproteine in der Lipidmembran kann das Virus an die Rezeptoren der Wirtszelle binden. B. Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Virions (aus: Straus et al., 1988).

In der Lipid-Doppelschicht der Virushülle befinden sich die acht herpesviralen Glykoproteine gB (kodiert durch ORF31), gC (ORF14), gE (ORF68), gH (ORF37), gI (ORF67), gK (ORF5), gL (ORF60) und gM (ORF50), die sowohl im Infektionszyklus als auch bei der Induktion der Immunantwort eine große Rolle spielen (Davison & Scott, 1986; Forghani et al., 1994; Grose, 1990). Ein Herpesvirus-spezifisches Merkmal ist das Tegument, das eine Proteinschicht zwischen dem Nukleokapsid und der Virusmembran bildet. Die Produkte von ORF4, ORF10, ORF47, ORF62 und ORF63 sind Tegumentproteine, die schon mit dem Virus in die Wirtszelle gebracht werden (Kinchington et al., 1992, 1995; Moriuchi et al., 1993).

VZV besitzt das kleinste Genom der humanen Herpesviren. Wie bei den meisten Herpesviren ist das Genom aus einer einmalig vorkommenden langen (*unique long region*,  $U_L$ ) und kurzen Region (*unique short region*,  $U_S$ ) aufgebaut. Diese beiden Regionen sind von invertierten, repetitiven Sequenzen umgeben: den internen und terminalen Sequenzwiederholungen der  $U_L$ -Region (*internal repeat* der  $U_L$ -Region,  $IR_L$ , *terminal repeat* der  $U_L$ ,  $TR_L$ ) und der  $U_S$ -Region (*internal repeat* der  $U_S$ -Region,  $IR_S$ ; *terminal repeat* der  $U_S$ -Region,  $TR_S$ ). Das VZV-Genom kommt hauptsächlich in zwei isomeren Formen vor: Während die L-Region ( $U_L$  mit  $TR_L$  und  $IR_L$ ) zumeist nur in einer Orientierung vorliegt, existiert die S-Region ( $U_S$  mit  $IR_S$  und  $TR_S$ ) in beiden Orientierungen (Ecker & Hyman, 1982; Straus et al., 1982). Nur in etwa 5% der Genome liegt die L-Region invertiert vor (Davison, 1984; Hayakawa et al., 1987; Kinchington et al., 1985; Straus et al., 1982) (Abb. 2).

Der ORF0 (Synonym ORF S/L) liegt am Anfang der  $U_L$ -Region und direkt benachbart zu den Verpackungssequenzen (*packaging sites, pac*), die für das Schneiden und Verpacken der DNA-Konkatamere nach der Replikation notwendig sind (Kemble et al., 2000; McVoy et al., 2000). Eine der zwei konservierten *pac*-Sequenzen, *pac1*, liegt in den großen Wiederholungssequenzen der S-Region, während das *pac2* Signal in den *L-Repeats* liegt, wodurch die beiden Verpackungssignale an den Genomenden am S/L-Übergang zueinander benachbart sind.



**Abb. 2: Isomere Formen des VZV-Genoms.** Das Genom des VZV umfasst 125 kb. In 50% der Genome liegt die  $U_S$ -Region invertiert vor und nur in 5% der Fälle ist die  $U_L$ -Region gedreht (adaptiert aus Wussow et al., 2009).

Das virale Genom umfasst weitere interne repetitive Sequenzabschnitte, die sich aus verschiedenen Sequenz-Elementen zusammensetzen. Der erste von insgesamt fünf direkt wiederholten Sequenzen (*direct repeats, R1-R5*), von denen vier in der  $U_L$ -Region liegen und R1-R4 besonders GC-reiche Sequenzen sind, liegt im ORF11 (Kinoshita et al., 1988). Der R2 ist in ORF14 lokalisiert. Durch unterschiedliche Anzahl der Reiterationen der Sequenz-Elemente haben verschiedene VZV-Stämme unterschiedlich lange 14p-Proteine (Kinchington et al., 1986). R3 liegt im ORF22 und ist mit bis zu 1000 bp die größte *repeat*-Sequenz im prototypischen VZV-Stamm Dumas (Davison & Scott, 1986). Der R4 besteht aus mehreren 27 bp-Elementen und dessen Länge variiert ebenfalls innerhalb verschiedener VZV-Stämme. Der R4 ist sowohl im  $TR_S$  als auch im  $IR_S$  lokalisiert, und liegt zwischen ORF62 bzw. ORF71 und dem lytischen Replikationsursprung  $Ori_S$  (Casey et al., 1985). Als einziger *repeat* ist der R5 AT-reich und liegt zwischen ORF60 und ORF61. Während der europäische VZV-Laborstamm Dumas nur eine Kopie von R5 aufweist, weisen andere VZV-Stämme mehrere R5-Kopien auf (Hondo & Yogo, 1988). Gerade in diesen repetitiven Sequenzabschnitten besteht eine deutliche Stamm-Variabilität.

### 2.2.3 Der VZV-Replikationszyklus

Der Replikationszyklus des VZV umfasst als wesentliche Hauptphasen 1. die Adsorption und den Eintritt in die Wirtszelle, 2. die Genomreplikation und Synthese der Strukturproteine sowie 3. den Zusammenbau, die Morphogenese und die Freisetzung aus der Zelle. VZV adsorbiert, ähnlich wie das Cytomegalovirus, HSV und PRV, über unspezifische, elektrostatische Interaktionen zwischen den viralen Glykoproteinen und zellulären Oberflächenstrukturen wie dem Heparansulfat-Proteoglykan-Rezeptor an die Wirtszelle (Kari & Gehrtz, 1992; Mettenleiter et al., 1990; Shieh et al., 1992; WuDunn & Spear, 1989). VZV-spezifische Rezeptorfunktionen zur Adsorption an die Wirtszelle sind für den Kationen-unabhängigen Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (MPR) und für das *insulin degrading enzyme* (IDE) beschrieben (Chen et al., 2004; Li et al., 2006; Zhu et al., 1995a). Es wird aber angenommen, dass die Bindung an den Heparansulfat-Proteoglykan-Rezeptor die initiale Anheftung darstellt (Zhu et al., 1995a). Welche Rezeptorfunktionen MPR oder IDE genau übernehmen, wird noch diskutiert.

Vier VZV-Glykoproteine (gB, gE, gH und gI) besitzen auf ihren Oberflächen N-verknüpfte komplexe Oligosaccharide mit Mannose-6-Phosphat (M6P)-Gruppen und stellen Liganden für den MPR dar (Gabel et al., 1989). Allerdings konnten Zhu et al. (1995a) mit einem Liganden-Blotting-Experiment zeigen, dass lösliches MPR nicht an virale Glykoproteine bindet. Die Tatsache, dass M6P eine Infektion mit zellfreiem VZV blockiert, könnte ein Hinweis darauf sein, dass der MPR den Zelleintritt von zellfreiem VZV durch die Interaktion mit viralen Glykoproteinen ermöglicht, die M6P in ihren Oligosacchariden auf der Oberfläche enthalten (Chen et al., 2004; Gabel et al., 1989; Zhu et al., 1995a,b). Zelllinien ohne MPR-Expression werden nur durch zellassoziertes, aber nicht durch zellfreies VZV infiziert, was zeigt, dass der MPR die Zell-Zell-Ausbreitung nicht unterstützt und der dominante Infektionsweg über zellassoziertes VZV von MPR unabhängig ist (Chen et al., 2004). Im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) lokalisierte, intrazelluläre MPR vermitteln wahrscheinlich durch die Interaktion mit den M6P-Gruppen der viralen Glykoproteine das Verpacken der neu synthetisierten Virionen auf dem Weg zur Freisetzung in endosomale Vesikel (Chen et al., 2004; Griffith et al., 1988). In MPR-freien Zellen werden die umhüllten Viren hingegen nicht zu den Endosomen transportiert und zellfrei freigesetzt (Chen et al., 2004).

Das Glykoprotein gE ist für die Replikation von VZV notwendig (Mo et al., 2002) und spielt in der Adsorption und der Infektion von VZV eine große Rolle. Li et al. (2006) konnten zeigen, dass die extrazelluläre Domäne von gE mit IDE interagiert. Eine Blockierung von IDE führt zu einer reduzierten Infektivität und Ausbreitung des Virus von Zelle zu Zelle. In nicht humanen Zelllinien, die schwer mit VZV zu infizieren sind,

führt die zusätzliche Expression von humanem IDE zur Verstärkung der zellfreien und zellassozierten VZV-Infektion. IDE stellt somit einen zellulären Rezeptor für VZV dar und bestärkt die wesentliche Rolle von gE (Li et al., 2006).

In Analogie zu HSV wird für VZV angenommen, dass mehr als ein virales Glykoprotein an der Anheftung beteiligt ist. Bei HSV-1 sind gB und gC für die Adsorption verantwortlich und auch gB von VZV bindet an Heparansulfat (Jacquet et al., 1998). Aber es ist noch unklar, ob auch bei VZV gC an der Adsorption beteiligt ist. Während bei HSV-1 auch gD involviert ist, fehlt bei VZV ein gD-Gen. Des Weiteren ist der gH:gL-Komplex bei VZV für die Fusion der Virushülle mit der Zellmembran notwendig (Duus et al., 1995; Rodriguez et al., 1993). Während gE eine wesentliche Rolle für die VZV-Infektion spielt, hat gI keinen Einfluss auf die VZV-Infektion, ist aber für die optimale Replikation und die Prozessierung von gE verantwortlich (Cohen & Nguyen, 1997).

Durch Fusion der Virus- mit der Zellmembran gelangen Nukleokapsid und Tegument ins Cytoplasma und werden durch zelluläre Systeme zum Zellkern transportiert. Dort wird die lineare virale DNA aus dem Kapsid freigesetzt (Abb. 3). Durch einen C-Überhang am 3'-Genom-Ende und ein G-Überhang am 3'-Ende der L-Region kann die doppelsträngige DNA im Zellkern zum Episom zirkularisiert werden (Davison et al., 1984).

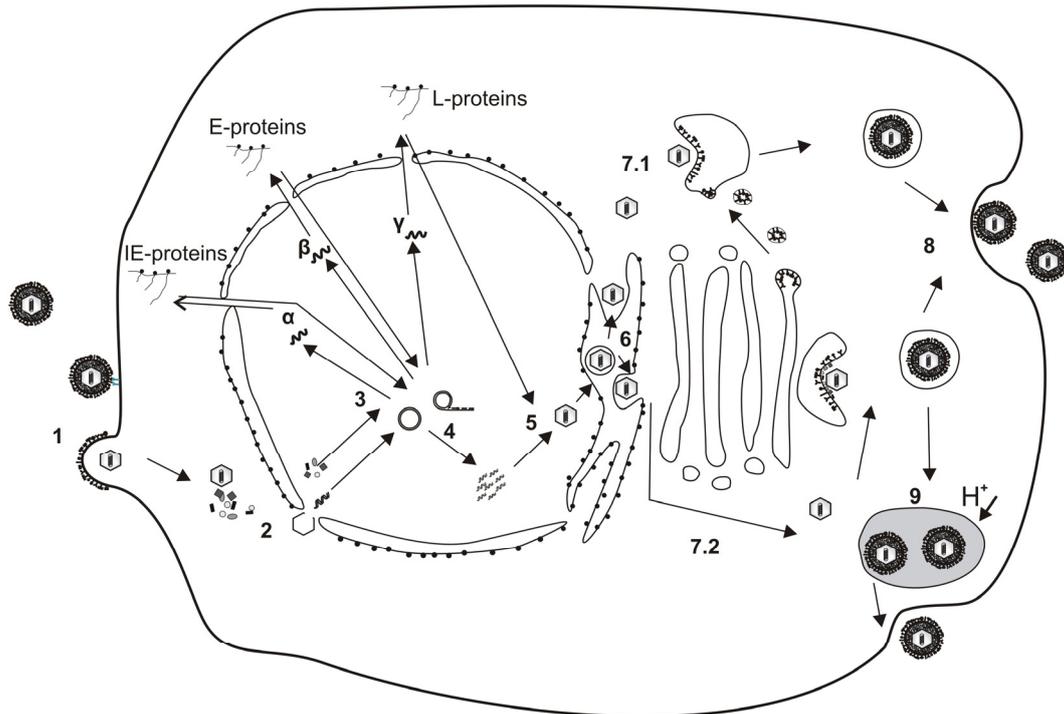
In einer zeitlichen Transkriptionskaskade werden zunächst die sehr früh exprimierten Gene (*immediate early*-, IE-,  $\alpha$ -Gene) transkribiert, welche durch die aus dem Virion stammenden Tegument-Proteine der Gene ORF4, ORF10, ORF62 und ORF63 (4p, 10p, 62p, 63p) transaktiviert werden (Kinchington et al., 1992, 1995). Im Cytoplasma werden die IE-Transkripte in die IE-Proteine translatiert, die zurück in den Zellkern transportiert werden und die Expression der früh exprimierten Gene (*early*-, E-,  $\beta$ -Gene) induzieren. Zu den IE-Proteinen gehören 4p, 62p und 63p (Debrus et al., 1995; Defechereux et al., 1997; Forghani et al., 1990). Wegen seiner Homologie zu ICP0 von HSV-1 wäre zu erwarten, dass auch 61p ein IE-Protein von VZV ist, wofür es aber bisher keine experimentelle Evidenz gibt. Die IE-Proteine werden innerhalb der ersten Stunden nach Infektion gebildet, das IE62 ist schon ein bis zwei Stunden nach der Infektion nachweisbar (Reichelt et al., 2009).

E-Proteine wie die DNA-Polymerase oder Proteinkinasen sind für die DNA-Replikation essentiell. Die zirkularisierte, episomale VZV-DNA wird ebenso wie bei HSV-1 oder PRV vermutlich nach dem *rolling circle*-Mechanismus repliziert (Ben-Porat & Rixon, 1979; Davison, 1984; Jacob et al., 1979). Die dabei entstehenden DNA-Konkatamere, bei denen die viralen Genome „*head to tail*“ verbunden sind, werden an den spezifischen *cis*-Elementen *pac1* und *pac2* in die einzelnen genomischen DNA-Abschnitte

zerlegt. Aufgrund der Ringform der replizierenden episomalen DNA entstehen die verschiedenen isomeren Formen des viralen Genoms durch homologe Rekombination zwischen den terminalen und internen invertierten repetitiven Sequenzen. Nach der Replikation der viralen DNA werden die spät exprimierte Gene (*late*-, L-,  $\gamma$ -Gene), deren Expression durch E-Proteine reguliert wird, transkribiert und in Strukturproteine translatiert. Wenn die neu synthetisierte DNA in das Kapsid eingebaut ist, werden die Viruspartikel zur Kern- und dann zur Zellmembran transportiert.

Nach der aktuell am ehesten akzeptierten Hypothese erhalten die Nukleokapside bei ihrer Knospung in den perinukleären Raum ihre erste, vorübergehende Hülle aus der inneren Kernmembran. Beim Verlassen der Zisternen des rauen endoplasmatischen Retikulums fusioniert die erste Virushülle mit der Membran des rauen endoplasmatischen Retikulums. So können die cytoplasmatischen, nackten Nukleokapside erklärt werden, die elektronenmikroskopisch beobachtet werden. Über den Weg der zweiten Umhüllung und der Virusfreisetzung wird noch diskutiert. Nach der Theorie von Jones & Grose (1988) werden nun die Nukleokapside in cytoplasmatische Vesikel verpackt, die zuvor mit Mikrovesikeln aus dem TGN fusionierten und die viralen Glykoproteine tragen (Grose, 1990). So entstehen vollständig behüllte Viren, die in Vesikeln zur Zelloberfläche transportiert und nach Membranfusion zwischen Vesikel und Zellmembran durch Exocytose freigesetzt werden. Dabei bleibt allerdings unklar, wie die Tegument-Proteine eingebaut werden können.

Das Konzept von Gershon et al. (1994) und Chen et al. (2004) wird den Besonderheiten von VZV am ehesten gerecht. Die viralen Glykoproteine werden demnach im rauen endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und ins TGN transportiert (Gershon et al., 1994; Zhu et al., 1995c). Dann werden die Nukleokapside von den TGN-Zisternen umgeben. Dabei ist die äußere Fläche der konkaven TGN-Membranseite mit Tegumentproteinen assoziiert und die innere konkave Fläche mit Glykoproteinen bestückt. Auf der äußeren, konvexen TGN-Membranfläche befinden sich cytosolische Proteine und die MPR. Die Nukleokapside werden hier umhüllt, indem die ehemals konkave Seite zur Virushülle und die konvexe äußere Fläche zum Transport-Vesikel werden. Die vollständigen Virionen können so durch vesikulären Transport zur Zelloberfläche gebracht und dort nach Fusion mit der Zellmembran freigesetzt werden (Abb. 3). Nach Chen et al. (2004) transportieren diese Vesikel die Viren zu den späten Endosomen, in denen diese teilweise degradiert und anschließend durch Exocytose freigesetzt werden. Das wäre eine Erklärung dafür, dass freigesetzte Virionen in Zellkultur häufig deformiert sind und sich morphologisch von Virionen aus Hautbläschen unterscheiden.



**Abb. 3: Der Replikationszyklus des Varicella-Zoster-Virus.** 1: Das Virus adsorbiert an Rezeptoren der Wirtszelloberfläche und wird über Membranfusion von der Zelle aufgenommen. 2: Das Nukleokapsid und die Tegumentproteine werden zum Zellkern transportiert und die DNA wird in den Zellkern entlassen. 3: Die transaktivierenden Tegumentproteine induzieren die Transkription der  $\alpha$ -Gene (IE-Gene). In einer Kaskade werden zuerst die IE- oder  $\alpha$ -Proteine exprimiert, die im Zellkern die Expression der E- oder  $\beta$ -Gene aktivieren. Die E-Proteine sind hauptsächlich an der Replikation der viralen DNA beteiligt. Danach werden die L- oder  $\gamma$ -Gene transkribiert und im Cytoplasma in Strukturproteine translatiert. 4: Die DNA wird nach dem *rolling circle*-Mechanismus vervielfältigt und die entstandenen Konkatenomere werden in Einzelgenome geschnitten. 5: DNA und Kapsid bilden das Nukleokapsid. 6: An der Kernmembran erhalten die Nukleokapside ihre erste Hülle, die sie beim Verlassen des endoplasmatischen Retikulums wieder verlieren. 7: Die finale Hülle bekommen die Viruspartikel entweder (7.1:) durch den Einschluss in cytoplasmatische Vesikel, die durch Fusion mit TGN-Vesikeln die viralen Glykoproteine enthalten, oder (7.2:) durch Einschluss in TGN-Zisternen, in denen (8:) die Partikel zur Zellmembran befördert und schließlich durch Fusion freigesetzt werden. (9:) Nach Chen et al. (2004) werden die Virionen zu Endosomen transportiert und vor der Freisetzung degradiert. (Schematisiert aus Sadzot-Delvaux, C, Baudoux L, Defecheraux P, Piette J, Rentier B. (1993). *Overview of the replication cycle of varicella-zoster virus*. S. 21-42: In: Wolff MH, Schönemann S, Schmidt A. (Hrsg): *Varicella-Zoster virus: molecular biology, pathogenesis and clinical aspects*. Contributions to Microbiology. 3.Vol., Karger, Basel; Chen et al., 2004).

Entsprechend werden die Viren *in vivo* in epidermalen Zellen nicht zu den Endosomen transportiert, da diese Zellen keinen MPR ausbilden (Chen et al., 2004; Gershon & Gershon, 2010). *In vitro* repliziert VZV dagegen in stark zellassoziierter Weise und ist im Überstand als zellfreies Virus nicht zu finden.

### 2.3 Nahtlose und markerlose Erstellung von VZV-Mutanten

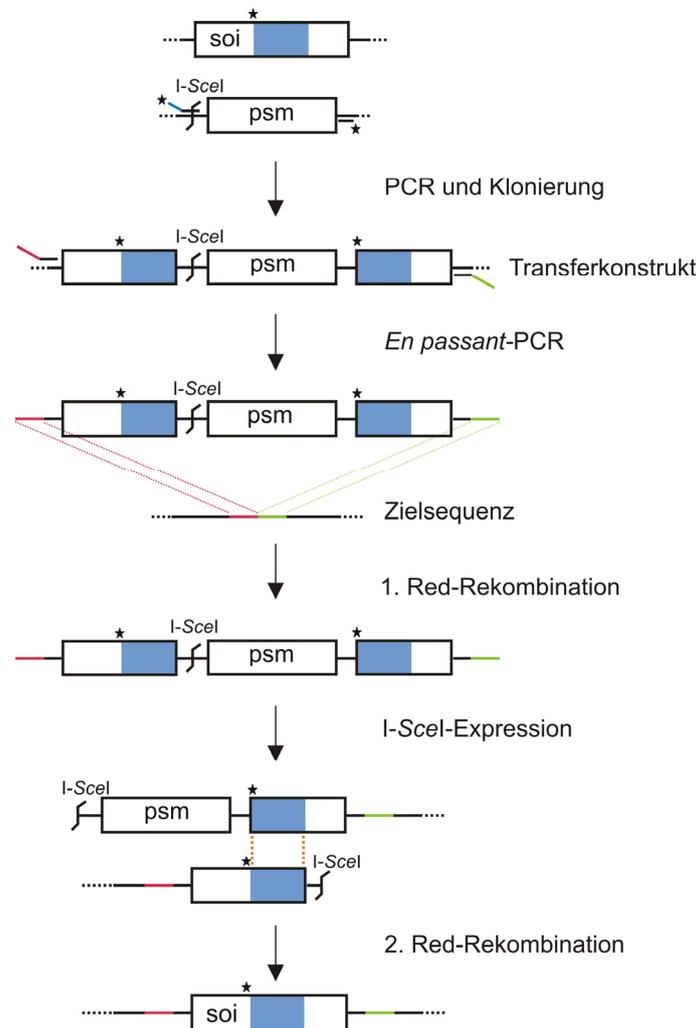
Herpesvirale Genome, die als bakterielle artifizielle Chromosome (BAC) kloniert wurden, können mit der Methode der *En passant*-Mutagenese effizient manipuliert werden (Tischer et al., 2006). Durch eine vom bakteriellen Fertilitäts (F)-Plasmid abgeleitete

Sequenz können DNA-Segmente mit bis zu 300 kb stabil in Bakterien vermehrt und manipuliert werden (Shizuya et al., 1992).

Der Vektor pBeloBAC11 basiert auf dem bakteriellen F-Plasmid und trägt außer den Genen *oriS* und *repE* (zur kontrollierten Weitergabe des Plasmids) und *parA/B* (zur Kontrolle der Kopienzahl) nur eine Chloramphenicol-Resistenz (Shizuya et al., 1992), und wird daher auch als „MiniF“-Vektor bezeichnet. Mit diesem in das Virusgenom integrierten „MiniF“-Vektor können herpesvirale Genome als *single copy* BAC-Plasmid kloniert und gezielt und effizient rekombiniert werden (Messerle et al., 1997). Der *Escherichia (E.) coli*-Stamm GS1783, in dem das herpesvirale Genom manipuliert und vermehrt wird, stammt von dem *E. coli*-Stamm EL350 ab, der für die Rekombinationsgene eines defekten  $\lambda$ -Phagen kodiert. Das *red*-Rekombinationssystem des  $\lambda$ -Phagen, das durch einen temperatursensitiven Promotor reguliert wird, besteht aus den Genen *exo* und *bet* und wird durch *gam* unterstützt (Lee et al., 2001; Murphy et al., 1998). Gam verhindert, dass die bakterielle RecBCD-Nuklease von *E. coli* die inserierte Fremd-DNA zerschneidet, während die 5'-3'-Exonuklease Exo und das Einzelstrang-DNA-Bindeprotein Bet für die Rekombinationsaktivität verantwortlich sind. Des Weiteren kodieren die Bakterien für die durch Arabinose induzierbare *homing* Endonuklease I-SceI (Tischer et al., 2009). Diese Endonuklease besitzt eine Erkennungssequenz von 18 bp, weshalb das Vorkommen einer zweiten I-SceI-Schnittstelle im Virus-Genom nahezu ausgeschlossen ist.

Für die Durchführung der *En passant*-Mutagenese wird zunächst ein Transfervektor benötigt, das sich aus der zu inserierenden Sequenz und einem Selektionsmarker mit I-SceI-Schnittstelle zusammensetzt. (Abb. 4). Zunächst wird in einer Polymeraseketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) über ein entsprechendes Oligonukleotid eine Sequenzduplikation von mind. 50 bp, die flankierend zu einer auf dem Vektor einmalig vorkommenden Schnittstelle ist, an die I-SceI-Erkennungssequenz am positiven Selektionsmarker (psm) angehängt. Da beide Oligonukleotide am 5'-Ende die Sequenz der Schnittstelle tragen, kann das PCR-Produkt in diese inseriert werden. Dann wird mit diesem Transferkonstrukt als Matrize und entsprechend synthetisierten Oligonukleotiden das PCR-Fragment für die erste homologe Rekombination amplifiziert. Dieses Fragment wird durch Sequenzüberhänge von 50 bp flankiert, die homolog zu der Insertionsstelle im Genom sind und über die das Produkt durch die erste Red-Rekombination in die Zielsequenz hineingebracht wird. Durch Temperaturerhöhung und Arabinose-Zugabe werden die Red-Gene und die Endonuklease I-SceI induziert, wodurch es zum Doppelstrangbruch und zur zweiten Rekombination

bination über die zuvor eingefügte Duplikation und damit zur Entfernung des Selektionsmarkers kommt.



**Abb.4 Die *En-passant*-Mutagenese:** Per PCR wird an einen Positiven Selektionsmarker (*psm*) mit I-SceI-Schnittstelle eine 50 bp-Duplikation der ausgewählte Sequenz (*sequence of interest, soi*), die vor einer einzelnen Schnittstelle im Vektor (\*) liegt, angefügt. Das hergestellte Amplifikat kann über die ebenfalls angefügten, flankierenden Schnittstellen in die Restriktionsschnittstelle (\*) eingefügt werden. In der *En passant*-PCR mit dem Transferkonstrukt als Matrize werden dem PCR-Produkt zur Insertionsstelle homologe Sequenzüberhänge von 50 bp angefügt, über die das PCR-Produkt in der ersten Red-Rekombination in das Genom inseriert werden kann. Anschließend wird die DNA an der I-SceI-Schnittstelle geschnitten und über die Duplikation kommt es zur zweiten homologen Rekombination. Der Selektionsmarker wird dabei entfernt und weitere Fremdsequenzen bleiben im Genom nicht zurück (adaptiert nach Tischer et al., 2006).

So ist es möglich, das Genom quasi „im Vorbeigehen“ (französisch: *en passant*) zu verändern, so dass dabei keine weiteren Fremdsequenzen wie Selektionsmarker oder *loxP*-Rekombinase-Bindestellen zurück bleiben, wie es beim Cre/*loxP*-Rekombinationssystem der Fall ist. Mit dieser Methode können gezielt Gene inseriert oder deletiert werden, oder ein einzelner Basenaustausch vorgenommen werden.

An den Genomenden herrscht während der Virusreplikation eine hohe Rekombinationsfrequenz zwischen den homologen Bereichen. Durch Einfügen der „MiniF“-Sequenz zwischen die *pac*-Sequenzen am Genomende war es möglich, dass das Vektorrückgrat nach Transfektion in permissive Zellen im Rahmen der viralen DNA-Replikation nach einigen Passagen in Zellkultur autonom aus dem Virusgenom entfernt wird (Wussow et al., 2009). Somit können Virusmutanten generiert werden, bei denen nur die gezielte Veränderung eingefügt wird, ohne dass operationale Sequenzen wie „MiniF“-Vektor oder Selektionsmarker in der rekombinanten Virusmutante zurück bleiben.

## **2.4 Phasentypisch exprimierte VZV-Proteine**

Während der VZV-Latenz in sensorischen Ganglien des Menschen können die sechs typischen Transkripte für ORF4, ORF21, ORF29, ORF62, ORF63 und ORF66 detektiert werden (Cohrs et al., 1996, 2003; Meier et al., 1993; Kennedy et al., 1999). Die ORF63-mRNA ist das am meisten exprimierte Transkript während der Latenz (Cohrs et al., 2000). Auch die entsprechenden Proteine können in latent infizierten Neuronen nachgewiesen werden (Cohrs et al., 2003; Lungu et al., 1998; Mahalingam et al., 1996).

### **2.4.1 Der latent exprimierte Regulator 4p**

Der ORF4 ist essentiell für die virale Replikation und die Ausbildung der Latenz (Cohen et al., 2005; Sato et al., 2003). Das von ORF4 abgeleitete Protein IE4 oder 4p ist ein phosphoryliertes Tegumentprotein von 51 kDa (Defechereux et al., 1993), das sowohl durch das Virion in die Zielzelle eingebracht, als auch als IE-Protein sehr früh im Replikationszyklus exprimiert wird. Wie IE62 und IE63 reguliert auch IE4 die Genexpression, indem es die  $\alpha$ -Gene transaktiviert (Defechereux et al., 1997). Diese transaktivierende Funktion ist abhängig von einer Dimerisierung, die durch das GK YFKC-Hexapeptid im Cystein-reichen C-Terminus und durch zentrale Domänen im Protein vermittelt wird. Des Weiteren sind diese Domänen auch für die cytoplasmatische Lokalisation bzw. den Export aus dem Nukleus von 4p verantwortlich (Baudoux et al., 2000). Das Protein 4p reguliert nicht nur direkt, sondern auch indirekt die Transkription, da es z.B. die transaktivierende Funktion von IE62 verstärkt (Defechereux et al., 1997). Der virale ORF4-Promotor wird wiederum von IE62 zusammen mit dem zellulären *upstream stimulation factor* transaktiviert (Michael et al., 1998).

Das HSV-1-Homolog zu 4p von VZV ist das 63 kDa-Protein ICP27 (*infected cell protein*), das zu 28% in der Aminosäuresequenz mit 4p übereinstimmt (Davison &

Scott, 1986; Defecheraux et al., 1993; Perera et al., 1994). ICP27 weist mehrere Kernlokalisations-Sequenzen (*nuclear localization sequence*, NLS) auf. Durch ein Leucin-reiches Kern-Export-Signal (*nuclear export signal*, NES) im N-Terminus wechselt es zwischen Nukleus und Cytoplasma hin und her (Sandri-Goldin, 1998; Soliman et al., 1997). Dabei transportiert es HSV-1-Transkripte aus dem Nukleus ins Cytoplasma und hat somit regulatorische Funktion in der Genexpression. Dem Protein 4p fehlt ein solches NES im N-Terminus und es ist daher hauptsächlich im Cytoplasma lokalisiert (Baudoux et al., 2000). Der Export von 4p aus dem Zellkern in das Cytoplasma erfolgt über einen von *chromosome region maintenance 1* (Crm1) abhängigen Transport. Dieses Exportprotein Crm1 ist ein Ran-GTP-abhängiger Transporter, den auch RNA-Export-Proteine nutzen (Ullman et al., 1997). Auch ICP27 vermittelt viralen RNA-Transport aus dem Zellkern über das Exportin Crm1 (Soliman & Silverstein, 2000).

ICP27 nimmt auch Einfluss auf den Übergang von der IE-Phase in die E-Phase der Infektion, indem es das Spleißen von Prä-mRNAs verhindert und so die Gene für die Proteine ICP0, ICP22 und ICP47 runter reguliert (Sandri-Goldin & Mendoza, 1992). Bei VZV sind außer ORF42/45 keine Gene bekannt, die gespleißt werden (Davison und Scott, 1986), außerdem hat 4p nur eine transaktivierende Funktion, keine Repressionsaktivität (Moriuchi et al., 1994).

Speziell im C-Terminus sind ICP27 und 4p nahezu identisch in ihrer Aminosäuresequenz. Trotz der deutlichen Sequenzhomologie von insgesamt ca. 45% ist durch IE4 aber keine funktionelle Komplementierung einer ICP27-Deletions-Mutante von HSV-1 möglich (Defechereux et al., 1993; Perera et al., 1994; Moriuchi et al., 1994). Nach Moriuchi et al. (1995) ist auch der N-Terminus von ORF4 für transaktivierende Funktionen wichtig. Diese Sequenz kann hingegen den N-Terminus von ICP27 in seiner Funktion ersetzen. ICP27 weist nahe des N-Terminus eine Sequenz ähnlich zu einer RGG-Box auf. Die RGG-Box ist ein RNA-bindendes Motiv, das bei zellulären Proteinen vorkommt, die im mRNA- und tRNA-Metabolismus eine Rolle spielen. Dieses Motiv ist reich an Arginin- und Glycinresten und stellt eine NLS dar. Bei IE4 lässt sich keine RGG-Box finden, dafür besitzt es aber drei Arginin-reiche Domänen (Ra, Rb, Rc), von denen Rb und Rc mit Transkriptionsfaktoren interagieren. Im N-terminalen Bereich der Rb-Domäne befinden sich außerdem drei bZIP-Motive bzw. Leucin-Zipper-Motive, die im Allgemeinen bei der DNA-Bindung oder Protein-Dimerisierung eine Rolle spielen. Rb wie auch Rc spielen zwar für die Transaktivierung eine Rolle, nicht aber für die Dimerisierung (Baudoux et al., 2000). Des Weiteren befindet sich innerhalb der Rb-Domäne eine NLS, die ebenso wie das Exportprotein Crm1 am nukleocytoplasmati-

schen *shuttling* des IE4 beteiligt ist, wenn auch nur in geringem Ausmaß (Baudoux et al., 2000). Trotz ihrer Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz und teilweiser Komplementierung von ICP27 in der N-terminalen Region durch IE4, scheinen IE4 und ICP27 keine homologen Funktionen zu besitzen.

ICP27 ist zwar bei HSV-1 ebenso an der Ausbildung der Latenz beteiligt (Katz et al., 1990), wird aber im Gegensatz zu IE4 nicht während der Latenz exprimiert. Während der frühen lytischen Phase lokalisiert IE4 im Nukleus und in der späteren Infektionsphase dann hauptsächlich im Cytoplasma (Baudoux et al., 2000; Cohen et al., 2005). In latent infizierten Neuronen liegt IE4 cytoplasmatisch vor und ist erst nach der Reaktivierung wieder im Nukleus lokalisiert (Lungu et al., 1998).

#### **2.4.2 Die latent exprimierten Proteine 21p und 29p**

ORF21 umfasst 3,1 kb (Davison & Scott, 1986) und sein Genprodukt wird erst in der frühen Phase exprimiert. Das E-Protein 21p hat 115 kDa, aber die genaue Funktion ist noch unklar. Es ist zwar für die lytische Infektion und Replikation essentiell, aber nicht für die Ausbildung der Latenz (Xia et al., 2003). In VZV-infizierten Zellen ist 21p wie sein HSV-1-Homolog UL37 mit dem reifenden Nukleokapsid assoziiert (Mahalingam et al., 1998). Der ORF29 mit 3,6 kb kodiert für das etwa 130 kDa große virale Einzelstrang-DNA-bindende Protein (*major single-strand DNA-binding protein*) (Kinchington et al., 1988, 1992). Das von ORF29 abgeleitete 29p ist wie 21p ein E-Protein und kommt nicht im Virion vor (Davison & Scott, 1986). Beide Proteine weisen zwar mögliche Phosphorylierungsstellen auf, werden aber während der lytischen Infektion nicht phosphoryliert (Cohrs et al., 2002).

Wie sein HSV-1-Homolog ICP8 ist 29p für die Replikation notwendig und auch für die Latenz essentiell (Cohen et al., 2007; Kinchington et al., 1988; Ruyechan & Weir, 1984). Ganglienzellen können aber auch ohne ORF29 lytisch infiziert werden (Cohen et al., 2007). Das Protein 29p besitzt zwar keine klassische NLS oder ein NES wie ICP8 (Kinchington et al., 1988; Rost & Liu, 2003; Taylor & Knipe, 2003), weist aber eine Kerntransport-Domäne im Bereich der Aminosäuren 9-154 auf, die direkt oder indirekt mit zellulären Karyopherinen interagiert, so dass 29p auf Ran-abhängigem Weg in den Nukleus transportiert wird. Karyopherin  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$  sind für den Kerntransport notwendig, der unabhängig von anderen VZV-Faktoren erfolgt (Kamei et al., 1999; Moore & Blobel, 1993; Stallings & Silverstein, 2005).

ORF21 wird durch einen IE62-abhängigen Promotor reguliert, der in der nicht-kodierenden Region zwischen ORF20 und ORF21 liegt (Cohrs et al., 1998; Xia & Straus,

1999). Die Expression von ORF29 wird durch einen von zwei bidirektionalen orientierten, überlappenden Promotoren reguliert. Der andere Promotor übernimmt auf dem Gegenstrang die Regulation von ORF28, welcher die virale DNA-Polymerase kodiert (Meier & Straus, 1993; Yang et al., 2004). Von ORF29 wird ein polyadenyliertes 4,2 kb-Transkript und ein kleineres Transkript mit 4,1 kb abgelesen (Meier & Straus, 1993), während der Latenz ist aber nur das größere Transkript nachweisbar (Stallings et al., 2006). Das IE62 ist zur effizienten Expression von ORF29 notwendig, aber auch 4p kann den divergenten Promotor transaktivieren (Meier & Straus, 1995; Meier et al., 1994; Yang et al., 2004).

Bei HSV-1 bilden die zu 21p und 29p homologen Proteine UL37 und ICP8 einen Komplex. So eine Komplexbildung von 21p mit 29p konnte bei VZV allerdings nicht gezeigt werden. Denn während 29p und ICP8 von HSV-1 auf Aminosäure-Ebene zu 88% übereinstimmen, sind 21p und UL37 dagegen in weniger als 10% der Aminosäure-Sequenz homolog (Cohrs et al., 2002; Shelton et al., 1990, 1994).

Das Protein 21p ist während der lytischen Infektion sowohl im Nukleus als auch im Cytoplasma lokalisiert, 29p zeigt während der lytischen Infektion als DNA-Binde-Protein hauptsächlich eine nukleäre Lokalisation (Lungu et al., 1998; Stallings et al., 2006). In latent infizierten Zellen, in der kaum Genexpression statt findet, sind 21p und 29p auf das Cytoplasma begrenzt (Lungu et al., 1998). Nach der Reaktivierung lassen sich beide Proteine wieder sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma nachweisen (Lungu et al., 1998; Stallings et al., 2006).

### **2.4.3 Das „axonale Leitprotein“ 65p**

ORF65 ist eines der vier Gene ORF65-ORF68 und mit 309 bp der kleinste Leserahmen der  $U_S$ -Region. Das davon abgeleitete 65p mit 11 kDa hat einen hydrophoben C-Terminus und trägt zahlreiche N-terminale Serin- und Threonin-Reste (20%) als mögliche Phosphorylierungsstellen (Davison & Scott, 1986). Die Rolle von 65p ist für VZV noch nicht geklärt. Das Protein 65p ist zu US9 von HSV-1 homolog (Frame et al, 1986) und auch andere  $\alpha$ -Herpesviren wie HSV-2, EHV-1 und PRV kodieren für ein homologes Protein (Brideau et al., 1998; Dolan et al, 1998; Telford et al, 1992). Im Gegensatz zu den homologen Genen bei HSV-1 oder PRV (Longnecker & Roizman, 1986; Mettenleiter et al, 1988) ist ORF65 weder *in vitro* noch *in vivo* für die Replikation notwendig. (Cohen et al., 2001; Niizuma et al., 2003). Infolge von Phosphorylierungen ist 65p als 16 kDa-Protein im Immunblot nachweisbar, und nicht mit den vorhergesagten 11 kDa. Das Protein 65p wird durch die zelluläre Casein-Kinase II phos-

phoryliert und nicht durch die viralen Serin-Threonin-Proteinkinasen ORF47 und ORF66 (Cohen et al., 2001).

Das Protein 65p zeigt eine Reihe von Ähnlichkeiten zu dem PRV-Homolog US9, wie die Lokalisation im Golgi-Apparat in infizierten Zellen oder die Typ II-Membran-Topologie (Cohen et al., 2001). Entsprechend ragt der N-Terminus ins Cytosol und der C-Terminus liegt außerhalb der Plasmamembran. Die Typ II-Transmembrandomäne ist bei PRV-US9 und VZV-65p sowie den homologen Proteinen von HSV-1 oder EHV-1 konserviert (Lyman et al., 2009). Auch weitere Domänen vor dem Transmembranmotiv sind bei PRV und VZV konserviert: ein Di-Leucin-Motiv, eine saure und eine basische Domäne. Die basische Domäne ist Arginin-reich und liegt direkt vor dem Transmembranmotiv. Der Austausch von zwei konservierten Tyrosinen zu Alaninen in der sauren Tyrosin- und Serin-reichen Domäne führt zum Abbruch des anterograden Transports der Strukturproteine von PRV. Auch eine Mutation der beiden Serine, die außerdem Phosphorylierungsstellen der Casein-Kinase II sind, hat Auswirkungen auf den viralen axonalen Transport des Virus und damit auf die neuronale Ausbreitung von PRV (Brideau et al., 2000b; Tomishima & Enquist, 2001). Dagegen hat eine Mutation im Di-Leucin-Motiv keine Auswirkungen auf die anterograde, transneuronale Ausbreitung von PRV (Brideau et al., 1999, 2000b). Bei VZV-65p sind diese beiden Tyrosine (Y44, Y45) und Serine (S46, S48) konserviert, die bei dem PRV-Homolog (Y49, Y50, S51, S53) für die Ausbreitung im Nervensystem essentiell sind (Brideau et al., 2000b). Trotz der Homologie konnte VZV-65p sein PRV-Homolog US9 in PRV-Mutanten hinsichtlich des axonalen Transports nicht ersetzen (Lyman et al., 2009).

#### **2.4.4 Das Kapsidprotein 23p**

Das von ORF23 exprimierte Protein 23p ist eines der sechs Proteine, die das VZV-Nukleokapsid bilden. In Analogie zu anderen Herpesviren wie HSV-1, HSV-2 oder Marek's-Disease-Virus sind außer ORF23 auch ORF20, ORF33, ORF33.5, ORF40 und ORF41 für die Bildung des VZV-Nukleokapsids notwendig (Cohen et al., 1980; del Rio et al., 2005; Gibson & Roizman, 1972; Kut & Raschaert, 2004). Für alle VZV-Kapsidproteine gibt es homologe HSV-1-Proteine (Chaudhuri et al., 2008). Das Protein 23p ist das kleinste der VZV-Kapsidproteine und homolog zu VP26 (UL35), dem kleinsten HSV-1-Kapsidprotein (Booy et al., 1994; McNabb & Courtney, 1992). Aufgrund der Sequenzhomologie wäre zu erwarten, dass die von ORF20, ORF23, ORF40 und ORF41 abgeleiteten Proteine die äußere Schicht des VZV-Kapsids bilden.

Die Aminosäuresequenz des 23p hat im Vergleich zu VP26 und den anderen UL35-homologen Proteinen doppelten Umfang. Während die erste Hälfte des Proteins konser-

viert vorliegt, ist der C-Terminus von 23p deutlich länger und somit VZV-spezifisch (Chaudhuri et al., 2008). Im Gegensatz zu den latent exprimierten IE- bzw E-Proteinen 4p, 21p und 29p ist 23p als Strukturprotein ein L-Protein und wird nur lytisch exprimiert. VP26 von HSV-1 wird ebenfalls erst spät im Replikationszyklus gebildet und kommt in mehreren phosphorylierten Formen vor (McNabb & Courtney, 1992). Auch 23p hat 13 mögliche Phosphorylierungsstellen, weshalb 23p im Immunblot mit bis zu 30 kDa detektierbar ist, obwohl 26 kDa entsprechend der Aminosäuresequenz vorhergesagt sind (Chaudhuri et al., 2008). Im Bereich der Aminosäuren 229-234 im C-Terminus liegt ein SRSRRV-Motiv, das für die Kernlokalisierung von 23p essentiell ist. Außer 23p besitzt nur 33.5p ebenfalls eine NLS und ist selbstständig im Nukleus lokalisiert. Beide Proteine können das große Kapsidprotein 40p in den Nukleus transportieren (Chaudhuri et al., 2008).

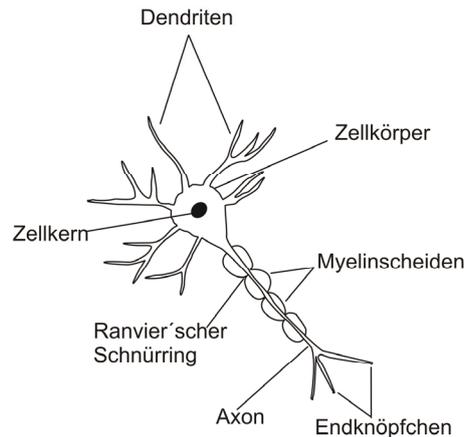
## **2.5 Axonaler Transport in Neuronen**

### **2.5.1 Aufbau und Funktion sensorischer Neurone**

Die besondere Aufgabe der Neurone liegt in der Aufnahme, Verarbeitung und Weiterleitung von Signalen. Nervenzellen sind typischerweise aus dem Zellkörper (Soma) und den Nervenleitern (Neuriten) aufgebaut. Die ankommenden Neuriten werden Dendriten genannt, die abgehenden Neuriten heißen Axone (Abb. 5). Neurone, die Signale erhalten und zum zentralen Nervensystem leiten, werden als sensorische Neurone bezeichnet. Die Zellkörper der sensorischen oder auch so genannten afferenten Neurone sind in den Trigemini- oder Spinalganglien konzentriert. Diese liegen außerhalb des Zentralen Nervensystems und empfangen Reize aus den Organen und Sinnesorganen und leiten diese an das Zentrale Nervensystem, an das Rückenmark und Gehirn, weiter. Nervenzellen, die durch Endknöpfchen an den Axon-Enden mit Muskeln in Verbindung stehen und Reize vom Gehirn an die Muskeln übertragen und somit Bewegungen auslösen, werden Motoneurone oder auch efferente Neurone genannt. Je nach Anzahl der Axone und Dendriten wird zwischen unipolaren, bipolaren und multipolaren Neuronen unterschieden. Unipolare Neurone sind bei Wirbellosen beschrieben und besitzen nur ein Axon, das sich am Ende in Dendriten verzweigt, aber keine Dendriten, die vom Zellkörper ausgehen. Bipolare Neurone sind aus einem Axon und einem Dendriten aufgebaut. In den Spinalganglien sind die Neurone pseudo-unipolar, d.h. die beiden Äste verschmelzen zu einem Neurit, von dem der Zellkörper abgeht und der sich dann in peripheres und zentrales Axon teilt. Die meisten der Neurone sind aber multipolar (Abb. 5) und verfügen über ein Axon und viele Dendriten, die über den ganzen Zellkörper verteilt sind (Kandel, 1995).

Ein Reiz wird als elektrische Erregung (Aktionspotential) über die Nervenbahnen geleitet. Von der Außen- zur Innenmembran herrscht ein elektrisches Ladungsgefälle, das durch eine unterschiedliche Verteilung von Kalium-, Natrium- und Chloridionen verursacht wird. Dieses so genannte Ruhepotential wird durch Natrium-Kaliumpumpen in der Membran aufrechterhalten. Ein elektrischer Impuls führt zur Depolarisierung des Ruhepotentials, wodurch ein Aktionspotential ausgelöst wird. Dieses wird als elektrische Erregung über das Axon zum nächsten Neuron weitergeleitet, wobei zur Beschleunigung dieser Signalleitung die Axone meist mit Myelinscheiden umgeben sind. Diese Myelinscheiden werden von Gliazellen gebildet, die im Nervensystem stützende und Struktur gebende Funktionen übernehmen. Im peripheren Nervensystem bilden die Schwann-Zellen die Myelinscheiden, im zentralen Nervensystem sind es die Oligodendrozyten. Während die Oligodendrozyten mehrere Axone mit Myelin versorgen, versorgt eine Schwann-Zelle dagegen immer nur ein Axon. Die Myelinscheiden werden durch Einschnürungen, die Ranvier'schen Schnürringe, unterbrochen. Dort liegt das Axon frei und das Signal wird schnell vorwärts geleitet, indem es von Schnürring zu Schnürring springt. Zu den Gliazellen gehören auch die Astrozyten und die Mikroglia des zentralen Nervensystems. Die Mikroglia entfernen als Phagozyten z.B. abgestorbene Nervenzellen. Die häufigsten Gliazellen sind die Astrozyten, die einen unregelmäßigen, sternenförmigen Zellkörper haben. Astrozyten bilden viele Fortsätze aus und stellen damit Kontakt zu Nervenzellen, dem Rückenmark oder Blutgefäßen her. Außerdem können sie restliches Kalium aufnehmen und so die Depolarisierung von Nachbarzellen verhindern (Kandel, 1995).

Das Axon-Endknöpfchen der präsynaptischen Zelle und die signalempfangende, postsynaptische Zelle bilden die Synapse. Durch Einstrom von Calciumionen in die präsynaptische Zelle werden Neurotransmitter durch Exocytose aus synaptischen Vesikeln freigesetzt und der ankommende Impuls in ein chemisches Signal umgewandelt. Die freigesetzten Neurotransmitter wie Glutamat, Acetylcholin oder Noradrenalin wandern über den synaptischen Spalt zur postsynaptischen Zelle. Dort wird das chemische Signal wieder in ein Aktionspotential umgewandelt und weitergeleitet. Die Aminosäure Glutamat ist der wichtigste erregende Transmitter im Gehirn und Rückenmark. Dagegen haben  $\gamma$ -Aminobuttersäure und Glycin als Neurotransmitter eine hemmende Wirkung. Bei Bindung dieser Transmitter an die Rezeptoren in der postsynaptischen Zelle strömen mit den positiv geladenen Natrium- auch negativ geladene Chloridionen in die Zelle, was dazu führt, dass an der postsynaptischen Zelle kein Aktionspotential mehr ausgelöst wird, da der Effekt der Natriumionen neutralisiert wird (Alberts et al., 2002).



**Abb. 5: Aufbau eines multipolaren Neurons:** Ein Neuron besteht aus dem Zellkörper (Soma), den ankommenden Nervenfasern (Dendriten) und dem abgehenden Axon. Das Axon ist von Myelinscheiden umgeben, die in regelmäßigen Abständen eingeschnürt sind (Ranvier'scher Schnürring).

### 2.5.2 Axonaler Transport

Der axonale Transport von Zellbestandteilen, Vesikeln oder auch viralen Partikeln kann vom Soma des Neurons zur nächsten Zelle vorwärts (anterograd) oder von einer Zelle durch das Axon rückwärts zurück in den Zellkörper des Neurons gerichtet sein (retrograd). Dabei wird zwischen dem schnellen axonalen Transport mit einer Geschwindigkeit von 50-400 mm/d und dem langsamen axonalen Transport mit 0,2-8 mm/d unterschieden (Lasek et al., 1984). Auf dem schnellen Transportweg, der sowohl retrograd als auch anterograd stattfindet, werden Membranorganellen, kleine Vesikel und andere Zellbestandteile transportiert (Lasek et al., 1984). So wird der Nervenwachstumsfaktor (*nerve growth factor*, NGF), nachdem er von postsynaptischen Zellen gebildet und durch das Axon aufgenommen worden ist, retrograd zum Zellkörper transportiert (Schwartz, 1995), während Neurotransmitter und ATPasen anterograd zum Axon-Ende bewegt werden (Lasek et al., 1984).

Das Motorprotein Kinesin ist für den anterograden Transport verantwortlich, der retrograde Transport beruht dagegen auf dem Motorprotein Dynein (Goldstein & Yang, 2000). Gebunden an Mikrotubuli führt Dynein retrograde Bewegungen zum negativen Ende der Mikrotubuli, zum Soma hin, aus. Kinesin ist der Gegenspieler zu Dynein und bindet ebenfalls an Mikrotubuli. Die Bewegungen sind zum positiven Ende der Mikrotubuli, zum Axon-Ende hin, ausgerichtet. Da Dynein im retrograden Transport über Kinesin dominiert, kann es auch anterograde Bewegung vermitteln, was sich auf die Transportgeschwindigkeit auswirkt (Gross et al., 2000; Ross et al., 2006; Smith, 2012).

Über den langsamen Transportweg, der auch als axoplasmatische Strömung bezeichnet wird, werden keine Organellen, sondern Proteine der cytomplasmatischen Matrix mit 0,2-8 mm/d in anterograder Richtung bewegt (Brady & Lasek, 1982; Lasek et al., 1984). Dazu gehören Proteine des Cytoskeletts und des Metabolismus. Dieser langsame Transport unterteilt sich in die Komponente a (*slow component a*, SCa) mit 0,2-1 mm/d und die Komponente b (SCb) mit 2-8 mm/d (Black & Lasek, 1980). Über den SCa-Weg werden entlang der Mikrotubuli Cytoskelett-Proteine wie Tubulin oder Neurofilamente bewegt (Brady et al., 1984; Hoffman & Lasek, 1980). Auf dem SCb-Weg werden z.B. Aktin, Clathrin oder Calmodulin sowie Enzyme aus dem Intermediärstoffwechsel wie die Pyruvat-Kinase in Richtung Axon transportiert (Black & Lasek, 1979; Brady et al, 1981; Garner & Lasek, 1981; Lasek et al, 1984). Diese axoplasmatische Strömung kommt nur in anterograder Richtung vor.

### **2.5.3 Axonaler Transport des Varicella-Zoster-Virus**

Da humane sensorische Neurone in der Regel nicht verfügbar sind und die VZV-Infektion tierischer Neuronen mit VZV weniger effizient ist, sind derartige Experimente erschwert (Steain et al., 2010). Experimente zum Transport von HSV und PRV in aviären oder Nager-Neuronen oder in Neuronen aus *in vitro*-differenzierten Stammzellen zeigten, dass sich anterograd wie retrograd transportierte Viren bzw. Kapside nicht kontinuierlich bewegen, sondern sogar in die entgegengesetzte Richtung wechseln können (Antinone & Smith 2010; Smith et al., 2004).

Zunächst wurde für den retrograden Transport von VZV analog zu HSV-1 nach Eintritt in die Axone in der Epidermis eine Geschwindigkeit von 200-400 mm/d angenommen, was in etwa 3,5  $\mu\text{m/s}$  entspricht (Arvin, 1995; Schwartz, 1984). Zuletzt konnte die Geschwindigkeit des retrograden VZV-Transports in Axonen Neuronen, die aus humanen embryonalen Stammzellen differenziert wurden, mit durchschnittlich 1,4  $\mu\text{m/s}$  bestimmt werden (Grigoryan et al., 2012). Das ist schneller als bei PRV mit 0,7-1  $\mu\text{m/s}$  (Liu et al., 2008; Smith et al., 2001), aber doch deutlich langsamer als kürzlich mit 2  $\mu\text{m/s}$  beobachtet (Antinone & Smith, 2010). Bei HSV-1 beträgt die Geschwindigkeit im Durchschnitt 1,3  $\mu\text{m/s}$ , ein ähnlicher Wert wie bei VZV (Grigoryan et al., 2012). In unterschiedlichen Neuronentypen und abhängig von der Kulturmethode sind unterschiedliche Transportgeschwindigkeiten zu erwarten, dagegen sollten unterschiedliche, aber verwandte Alphaherpesviren unter ähnlichen Kulturbedingungen vergleichbare Transportgeschwindigkeiten zeigen (Grigoryan et al., 2012).

Auch der anterograde Transportweg ist für VZV noch wenig untersucht. Bekannt ist, dass das VZV-65p die Funktion des homologen US9 im anterograden Transport der

Viruspartikel im PRV-Hintergrund nicht ersetzen kann (Lyman et al., 2009). Bei PRV besitzt neben dem US9 auch der Komplex aus den Glykoproteinen gE:gI eine wichtige Rolle in der anterograden Neuron-Zell-Ausbreitung, und eine Deletion von gE oder gI führt zu einem reduzierten anterograden Transport (Ch'ng & Enquist, 2005). Bei VZV spielt dieser Proteinkomplex gE:gI ebenfalls eine Rolle in der Neurovirulenz, die aber noch weitgehend ungeklärt ist. Das VZV-gI scheint ein aber ein neurotroper Faktor und essentiell für die Ausbreitung in Spinalganglien zu sein (Christensen et al., 2013).

## **2.6 Ziele dieser Arbeit**

Die Mechanismen der Reaktivierung des VZV aus der Latenz sind noch wenig verstanden. Deswegen war das Ziel dieser Arbeit, Proteine, die während der Latenz exprimiert werden und solche, die an der axonalen Ausbreitung von Neuronen zurück in die Haut beteiligt sein könnten, unter ihrer Expression durch rekombinante Viren näher zu untersuchen. Mit dem zuvor als bakterielles artifizielles Chromosom klonierten VZV-Wildtyp-Stamm HJO sollten diese ausgewählten Proteine mit dem grün fluoreszierenden Protein eGFP fusioniert und in Replikationskompetente Virusmutanten eingebracht werden. Ziel war es, die Replikation dieser Viren und die Lokalisation der Proteine in permissiven Zellen und Neuronen aus der Ratte zu untersuchen. Durch eine Doppelmutante mit grün markiertem, so genanntem Axon-Leit-Protein 65p und rot markiertem Viruskapsid sollte auch die Beteiligung von 65p am axonalen Transport in lebenden Neuronen analysiert werden.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Plasmide, BACs und Viren

Tab. 1: Plasmide, bakterielle artifizielle Chromosome und Varicella-Zoster-Viren

Bezeichnung	Kurzbeschreibung	Referenz
<b>Plasmide</b>		
pEP-EGFP-in	Rekombinations-Plasmid mit durch Kanamycin-Resistenzkassette unterbrochenem eGFP-Leserahmen	Tischer et al., 2006
pEP-mRFP1-in	Rekombinations-Plasmid mit durch Kanamycin-Resistenzkassette unterbrochenem mRFP-Leserahmen	Tischer et al., 2006
<b>Bakterielle artifizielle Chromosome (BACs)</b>		
pHJOpac	Genom des Wildtyp-VZV-Isolats HJO, mit „MiniF“-Sequenz zwischen den Genomenden	Wussow et al., 2009
PG4	pHJOpac mit eGFP N-terminal an ORF4	
PG21	pHJOpac mit eGFP N-terminal an ORF21	
PG65	pHJOpac mit eGFP N-terminal an ORF65	
PG23	pHJOpac mit eGFP N-terminal an ORF23	
P21G	pHJOpac mit eGFP C-terminal an ORF21	
P29G	pHJOpac mit eGFP C-terminal an ORF29	
P65G	pHJOpac mit eGFP C-terminal an ORF65	
PG65R23	pHJOpac mit eGFP N-terminal an ORF65 und mRFP N-terminal an ORF23	
<b>Viren</b>		
PAC	VZV HJO ohne „MiniF“-Sequenz nach Rekonstitution	Wussow et al., 2009
G4 <sub>rVZV</sub>	PAC mit N-terminal fusioniertem eGFP an ORF4	
G21 <sub>rVZV</sub>	PAC mit N-terminal fusioniertem eGFP an ORF21	
G23 <sub>rVZV</sub>	PAC mit N-terminal fusioniertem eGFP an ORF23	
G65 <sub>rVZV</sub>	PAC mit N-terminal fusioniertem eGFP an ORF65	
21G <sub>rVZV</sub>	PAC mit C-terminal fusioniertem eGFP an ORF21	
29G <sub>rVZV</sub>	PAC mit C-terminal fusioniertem eGFP an ORF29	
65G <sub>rVZV</sub>	PAC mit C-terminal fusioniertem eGFP an ORF65	
G65R23 <sub>rVZV</sub>	PAC mit N-terminal fusioniertem eGFP an ORF65 und N-terminal fusioniertem mRFP an ORF23	

##### 3.1.2 Puffer und Lösungen

Alle Chemikalien wurden, wenn nicht anders dargestellt, von Sigma (Taufkirchen), Roth (Karlsruhe) oder Merck (Darmstadt) in *pro analysis*-Qualität bezogen. Wasser bezieht sich immer auf steriles, destilliertes Wasser, wenn nicht anders erwähnt.

Tab. 2: Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese

Bezeichnung	Zusammensetzung	
1x Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE)	89 mM 89 mM 2 mM	Tris Borsäure Ethylendiamin-Tetraessigsäure, pH 8 ( <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> , EDTA)
Agarose-Gel	0,6-1%(w/v)	Agarose (Life technologies, Darmstadt) in 1x TBE
6x DNA-Ladepuffer	50% (v/v) 10 mM 0,25% (v/w)	Glycerol (Gerbu, Heidelberg) EDTA, pH 8 Bromphenolblau in Wasser

Tab. 3: Lösungen und Puffer für Protein-Analysen

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Sammelgel (5%, 5 ml)	3,3 ml 0,83 ml 0,63 ml 50 µl 5 µl	Wasser 30% Acrylamid-Bisacrylamid-Mix (37,5:1) 1M Tris-HCl, pH 6,8 10% (w/v) Ammoniumpersulfat (Amresco, Solon, OH, USA) TEMED
Trenngel (8-12%, 5 ml)	1,6-2,3 ml 1,3-2,0 ml 1,3 ml 50 µl  50 µl 2-3 µl	Wasser 30% Acrylamid-Bisacrylamid-Mix (37,5:1) 1,5M Tris-HCl, pH 8 10% (w/v) Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> , SDS) 10% (w/v) Ammoniumpersulfat TEMED
1x SDS-Laufpuffer	25 mM 192 mM 0,1% (w/v)	Tris Glycin SDS
1x Transferpuffer	25 mM 192 mM 10% (v/v)	Tris Glycin Methanol pH ~ 8,3
5x Laemmli-Puffer	312 mM 10% (w/v) 50% (v/v) 25% (v/v) 0,02% (w/v)	Tris-HCl, pH 6,8 SDS Glycerin β-Mercaptoethanol Bromphenolblau
Radioimmunpräzipitations- test -Puffer ( <i>radio-immunoprecipitation assay</i> , RIPA)	50 mM 150 mM 5 mM 1% (v/v) 0,1%(v/v) 0,5% (v/v)	Tris-HCl, pH 7,5 NaCl (J.T. Baker, Deventer, Niederlande) EDTA, pH 8 Igepal CA-630 (Nonidet-P-40) SDS Na-Desoxycholat
Proteinase-Inhibitor- Cocktail-Puffer (7x PIC)	1 Tablette  1,5 ml	<i>cOmplete proteinase inhibitor cocktail</i> gegen Serin Cystein- und Metalloproteasen (Roche, Mannheim) Wasser
RIPA-PIC	1x	RIPA-Puffer mit 1x PIC
1x Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	137 mM 2,7 mM 100 mM 20 mM	NaCl KCl Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,2-7,4
PBS mit Tween20 (PBST)	0,05% oder 0,1% (v/v)	Tween20 in PBS
Blockpuffer (PBSTM)	5% (w/v)	Magermilchpulver in 0,1% PBST

Tab. 4: Lösungen und Puffer für DNA-Analysen

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Lösung I	10 mM 25 mM 5 mg	EDTA, pH 8 Tris-HCl, pH 8 RNaseA (Fermentas/Thermo Scientific, Idstein)
Lösung II	0,2 M 1% (v/v)	NaOH SDS
Lösung III	3 M	K-Acetat, pH 5,5
10x PE-Puffer	500 mM 100 mM 15 mM 0,01% (w/v)	KCl Tris-HCl, pH 8,3 MgCl <sub>2</sub> Gelatine, sterilfiltriert
Lysepuffer	1x 0,5% (v/v) 0,7% (v/v)	PE-Puffer Tween20 Proteinase K (Roche) in Wasser

### 3.1.3 Medien und Reagenzien

Tab. 5: Bakterienmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung	
LB-Medium ( <i>Luria broth</i> )	10 g/l 10 g/l 5 g/l	Trypton Hefeextrakt NaCl pH 7
LB Agar mit - Kanamycin - Chloramphenicol	15 g/l 30 µg/ml 30 µg/ml	Agarose in LB-Medium Kanamycin (in Wasser gelöst) Chloramphenicol (in Ethanol gelöst)

Tab. 6: Reagenzien und Fertigmedien für die Zellkultur (U, *unit*, Aktivitätseinheit für Enzyme)

Bezeichnung	Konzentration	Hersteller
Ciprofloxacin (Ciprobay)	2 mg/ml	Bayer (Leverkusen)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ohne L-Glutamin (" <i>high glucose</i> ")	4,5 g/l Glucose	PAA (Cölbe)
DMEM mit L-Glutamin (" <i>low glucose</i> ")	1 g/l Glucose	PAA
Fötales Kälberserum (FKS)	-	PAA
Gentamicin	10 mg/ml	PAA
L-Glutamin (100x)	200 mM	PAA
Laminin (Maus)	1 mg/ml	Sigma
Liberase (Blendzyme 1)	90 µg/ml	Roche
NGF (Maus) 2,5 S (grade II)	10 µg/ml	Alomone (Jerusalem, Israel)
OptiMEM	-	Life technologies (Darmstadt)
PBS ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>	-	PAA
Penicillin/Streptomycin (P/S, 100x)	10.000 U/ml bzw. 10 mg/ml	PAA
Poly-L-Lysin Hydrobromid (70-150 MDa)	1 mg/ml	Sigma
Protein-Lipid-Komplex	zu je 2,5 ml	Biochrom (Berlin)
TNB-100	3,86 g/l NaHCO <sub>3</sub>	Biochrom

Bezeichnung	Konzentration	Hersteller
10x Trypsin(1:250)/EDTA	0,5% Trypsin, 0,2% EDTA	Biochrom
1x Trypsin-EDTA, mit Phenolrot	0,05% Trypsin, 0,02% EDTA	Life technologies

Tab. 7: Gebrauchsmedien und Lösungen für die Zellkultur

Bezeichnung	Zusammensetzung
3,5%-BSA-TNB	TNB-Kulturmedium, 3,5% (w/v) bovines Serumalbumin (BSA), steril filtriert
D10	DMEM „high glucose“, 10% (v/v) FKS, 100 U/ml bzw. 100 µg/ml P/S, 2 mM L-Glutamin
D10C	D10 mit 10 µg/ml Ciprofloxacin
Einfriermedium	FKS mit 10% (v/v) Dimethylsulfoxid (Biomol, Hamburg)
4% Paraformaldehyd	4% (w/v) Paraformaldehyd in 1x PBS, pH7,2
PSGC-Puffer	5% (w/v) Saccharose, 0,1% (w/v) Na-Glutamat, 10% (v/v) FKS in 1x PBS
TNB-Kulturmedium	50 ml TNB-100, 2 ml Protein-Lipid-Komplex, 400 U/ml bzw. 400 µg/ml P/S, 400 µM L-Glutamin
TNB-NGF	TNB-Kulturmedium, 100 ng/ml mouse NGF
Zamboni-Fixativ	2% (w/v) Paraformaldehyd, 15% (v/v) gesättigte 1,2%ige Pikrinsäure in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,3

### 3.1.4 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit eingesetzten Oligonukleotide wurden von der Fa. Biomers in Ulm synthetisiert.

Tab. 8: Oligonukleotide (vor, Vorwärts-Orientierung; rev, reverse Orientierung)

Kodierung	Bezeichnung	Sequenz (5´ - 3´)
<b>1) <i>En passant</i>-Mutagenese (EPM)</b>		
EPM1	eGFP-4 vor	TCT TCA CAA ATA GTA GAC ACG TCT GGG TCG GTT GGA ATT GAA GCA GAG GCC TTG TAC AGC TCG TCC ATG C
EPM2	eGFP-4 rev	CGG AAG ATA CAG GCA ACT GCA AAC ACG CAA TTG TCA GAT ATT TTG CAG CCA TGG TGA GCA AGG GCG AGG A
EPM3	eGFP-21 vor	TGT AGC TTT TTC ATA TCA CGT TAT AAA GTT AAG TCA GCG TAG AAT ATA CCA TGG TGA GCA AGG GCG AGG A
EPM4	eGFP-21 rev	TTA CTT AAA TCA TCC AAA AGT TTT TGT GTA TCA TAA CAA ATT GGT TCT TCC TTG TAC AGC TCG TCC ATG C
EPM5	eGFP-29 vor	GTC ATT TGA CCC TGC CAA CAA CCC CCC ATT ATT ACG AGT ACT TCA CCA AAA TGG TGA GCA AGG GCG AGG A
EPM6	eGFP29 rev	ACG TAA CCC AGG GGC CCC GTG GGC ACT GTC ACA GTC TTC TGA GTA TTT TCC TTG TAC AGC TCG TCC ATG C
EPM7	eGFP-65 vor	GGT ATT AAA CAC TTT TAA ACT AGC CTG CTG GCC TTA CAA TCT GGA TTT CTA TGG TGA GCA AGG GCG AGG A
EPM8	eGFP-65 rev	GCT TCC ATC AGT AAG GCC ACG GCC TCA CCC TCC ATG GTG TTT TGT CCG GCC TTG TAC AGC TCG TCC ATG C
EPM9	eGFP-23 vor	GTG GTG GGG TTG CTG GGA TCA AAG ACT ACA CGA GAC GAT GCG GGT TGT GTC TTG TAC AGC TCG TCC ATG C

Kodierung	Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')
<b>1) <i>En passant</i>-Mutagenese (EPM)</b>		
EPM10	eGFP-23 rev	CGC AGA TGT ACG TGT ATG CTG TTA TCG ATT GTC CCG TAA ACT AAT AAA CGA TGG TGA GCA AGG GCG AGG A
EPM11	4-eGFP vor	ATA CAA ATT AGT ATG TTT TGA CAA GCA TGA AAA AGG TAT TTT TTA TTT TAC TTG TAC AGC TCG TCC ATG C
EPM12	4-eGFP rev	AGC TCC TCG CCC TTG CTC ACG CAG TTA AAG GTA CTA CAC TTA AAA TAT TTA CCG TAT GGA CGG GCG TCA G
EPM13	21-eGFP vor	ATG TAG ATT TGC GTC TTG GCG TAC CCG GGA ATA CAA GTG GGA GTG ACC CTG TGA GCA AGG GCG AGG AGC T
EPM14	21-eGFP rev	ATA AAA ACC ACA AAT ACT TTA ATG TAC ATA AAC ACG CCT GTT TTA TAT TAC TTG TAC AGC TCG TCC ATG C
EPM15	29-eGFP vor	ATC TTA GTG GTA TTC CCA TAA AAC ATG GGA ACA TTA CAA TGG AAA TGA TTG TGA GCA AGG GCG AGG AGC T
EPM16	29-eGFP rev	TAC GTA CAC TCA CCC GCG TGT GGG CTT TAA TTG GAT AAA GAG GGA GGT TAC TTG TAC AGC TCG TCC ATG C
EPM17	65-eGFP vor	TGA CGG GAG CGG CCT TTG CCT TGG GAT ATA TAA CGT CAC AAT TTG TTG GAG TGA GCA AGG GCG AGG AGC T
EPM18	65eGFP rev	AAC TCT TCT TCC GTA TCC GTA GAT TCC GAG TCC TCG AAA TCG TCC ACT TAC TTG TAC AGC TCG TCC ATG C
EPM19	mRFP-23 vor	GTG GTG GGG TTG CTG GGA TCA AAG ACT ACA CGA GAC GAT GCG GGT TGT GTC AAG GCG CCG GTG GAG TGG C
EPM20	mRFP-23 rev	CGC AGA TGT ACG TGT ATG CTG TTA TCG ATT GTC CCG TAA ACT AAT AAA CGA TGG CCT CCT CCG AGG ACG T
<b>2) Sequenzierung (S)</b>		
S1	eGFP-4 vor	AAT GCA AAG TCA TCC GAA GG
S2	eGFP-4 rev	TGA CTA AAC ACG CCC ATT GC
S3	eGFP-21 vor	ATA ATG TTA GGT AGG AGG AGC C
S4	eGFP-21 rev	TGG TCT TTC GTT GTC CGC TTC
S5	eGFP-29 vor	GAC TAA GTG TAC CGA CGT G
S6	eGFP-29 rev	AAC CCA AAC CGT TCT CGA G
S7	eGFP-65 vor	GAT CCG ATT ATA AGA GGG CG
S8	eGFP-65 rev	ACC TAC GAG AGA TCC TGA CAC CC
S9	eGFP-23 vor/ mRFP-23 vor	TTC TGG CAT CAG CGA TGT
S10	eGFP-23 rev/ mRFP-23 rev	GAC ATA TGC CCT GTT CGT TG
S11	21-eGFP vor	ATT CTG GAC CTC AGA TGG G
S12	21-eGFP rev	ATA CAA ACG AAA CGC CCA G
S13	29-eGFP vor	AGC CAT GAC ACC ACA TCT AAC
S14	29-eGFP rev	ACT GTA AGC TGA ATG GTT GGA G
S15	4-eGFP vor	ATA TAT CCC CAA CGT CGC C
S16	4-eGFP rev	TCG TGT TGA ATG TAC CCT CTC
S17	65-eGFP vor	GTA TTT GCT ATG ACG GGA G
S18	65-eGFP rev	ACC TAC GAG AGA TCC TGA CAC CC
S19	eGFP vor	AGC AAG GGC GAG GAG CTG TTC
S20	eGFP rev	TCA CGA ACT CCA GCA GGA CC

Kodierung	Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')
<b>3) Reverse-Transkriptase-PCR (RT)</b>		
RT1	GAPDH vor	GCA GGG GGG AGC CAA AAG GG
RT2	GAPDH rev	TGC CAG CCC CAG CGT CAA AG
RT3	eGFP-21 rev	TGG TCT TTC GTT GTC CGC TTC
RT4	eGFP-4 rev	AAT GCA AAG TCA TCC GAA GG
RT5	eGFP-65 rev	CGG TTG TAT GGC TGT TAT C
RT6	eGFP-23 vor/ mRFP-23 vor	TTC TGG CAT CAG CGA TGT C
RT7	21-eGFP vor	ATT CTG GAC CTC AGA TGG G
RT8	29-eGFP vor	AGC CAT GAC ACC ACA TCT AAC
RT9	65-eGFP vor	GTA TTT GCT ATG ACG GGA G
RT10	mRFP-23 rev	GAC ATA TGC CCT GTT CGT TG
RT11	eGFP vor	AGC AAG GGC GAG GAG CTG TTC
RT12	eGFP rev	TCA CGA ACT CCA GCA GGA CC

### 3.1.5 Antikörper

**Tab. 9:** Antikörper, deren Herkunft, eingesetzte Verdünnung und Hersteller (Ig, Immunglobulin)

Bezeichnung	Spezies, Verwendung, Verdünnung	Hersteller
<b>primäre Antikörper</b>		
VZV-Glykoprotein I (Anti-gI, monoklonal)	Maus, Immunfluoreszenz, 1:800	Millipore (Billerica, MA, USA)
β-III-Tubulin (monoklonal)	Maus, Immunfluoreszenz, 1:250	R&D Systems (Wiesbaden)
Golgin 97 (monoklonal)	Maus, Immunfluoreszenz, 1:200	Santa Cruz (Heidelberg)
Anti-GFP (polyklonal)	Kaninchen, Immunblot, 1:750	Gentaur (Aachen)
Anti-RFP (monoklonal)	Maus, Immunblot, 1:750	Abcam (Cambridge, UK)
β-Aktin (monoklonal)	Kaninchen, Immunblot, 1:500	CellSignalling (Danvers, MA, USA)
<b>sekundäre Antikörper</b>		
Alexa Fluor®-488-konjugiert, anti-Maus-IgG (polyklonal)	Ziege, Immunfluoreszenz, 1:1000	Life technologies
Alexa Fluor®-568-konjugiert, anti-Maus-IgG (polyklonal)	Ziege, Immunfluoreszenz, 1:1000	Life technologies
Alexa Fluor®-350-konjugiert, anti-Maus-IgG (polyklonal)	Ziege, Immunfluoreszenz, 1:250	Life technologies
Meerrettich-Peroxidase-konjugiert ( <i>horse raddish peroxidase</i> , HRP), anti-Kaninchen-IgG (polyklonal)	Ziege, Immunblot, 1:8000	Dianova (Hamburg)
HRP-konjugiert, anti-Maus-IgG (polyklonal)	Ziege, Immunblot, 1:8000	Dianova

### 3.1.6 Zellkultur-Materialien

Alle Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur wurden, wenn nicht hier dargestellt, von Greiner (Solingen) oder Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

**Tab. 10:** Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Herkunft
Deckgläschen 12 mm	Hartenstein (Würzburg)
Dispenser-Spitzen, 5 ml	Hartenstein
Flaschenaufsatz-Filter	Millipore (Merck, Darmstadt)
Glasbodenschälchen	Willco Wells BV (Amsterdam, Niederlande)
Glas-Pasteurpipetten	Hartenstein (Würzburg)
Mikrofluss-Kammern ( <i>Microfluidic chambers</i> )	Xona (Temecula, CA, USA)
PCR-Röhrchen	Biozym Scientific (Hessisch Oldendorf)
Rundfilter	Hartenstein
Sterilfilter 0,45 µm und 0,22 µm	VWR (Darmstadt)

### 3.1.7 Geräte

**Tab. 11:** Geräte

Gerät	Hersteller
Binokular MZ12 <sub>5</sub>	Leica (Wetzlar)
CO <sub>2</sub> -Inkubator Hera Cell 240	Hereaus/ Thermo Scientific
Einfrierbox ( <i>Cryo freezing Container</i> )	Nalgene/ Thermo Scientific
Elektrophorese <i>PowerSupply</i> EPS301	GE Healthcare (Freiburg)
Feinwaage BP 210 S	Sartorius (Göttingen)
Fluoreszenzmikroskop DM IL	Leica
Fluorimeter „Safire II“	Tecan (Crailsheim)
Gel iX Imager	Intas (Göttingen)
Gene Pulser XCell	BioRad (München)
Heiz-Magnetrührer COMBIMAG RET	IKA (Staufen)
<i>Image System</i> LAS-300 (CCD-Kamera)	Fuji (Tokio, Japan)
<i>Life Cell Imaging</i> Mikroskop 81X	Olympus (Hamburg)
Konfokales Mikroskop LSM 510 Meta	Zeiss (Jena)
Multifuge 4KR Hereaus	Thermo Scientific
pH-Meter <i>SevenEasy</i>	Mettler Toledo (Gießen)
Photometer	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Präparationsbesteck	Aesculap (Tuttlingen)
Roller/Mixer Smart SRT9	BioCote (Wolverhampton, UK)
Schüttelinkubator HT Multitron	Infors (Basel, Schweiz)
<i>Semi-dry</i> Blot-Apparatur TransBlot SD	BioRad (München)
SDS-Elektrophorese-Kammern <i>Dual Gel Caster</i>	GE Healthcare
Sterile Werkbank HeraSafe	Thermo Scientific

Gerät	Hersteller
Thermocycler T3000	Biometra (Göttingen)
Thermomixer <i>compact</i>	Eppendorf
Tischzentrifuge Pico/Fresco	Heraeus/ Thermo Scientific
Tischzentrifuge 5804 R	Eppendorf
Ultraschallgerät Sonifier 250	Branson (Fullerton, CA, USA)
Vortexer <i>Genius 3</i>	IKA
Waage EG	KERN (Balingen)
Wasserbad GRANT GLS 400	VWR (Darmstadt)

## 3.2 Zellbiologische und virologische Methoden

### 3.2.1 Zellkultur

Als für VZV permissive Zellen dienten die humane Melanom-Zelllinie MeWo (von Prof. Charles Grose aus Iowa erhalten; Grose & Brunel, 1978) und primäre humane Fibroblasten, die aus Präputien Neugeborener oder Kleinkinder gewonnen wurden (humane Vorhaut-Fibroblasten, *human foreskin fibroblasts*, HFF). Die adhärenenten Zellen wurden in Zellkulturflaschen in D10- bzw. D10C-Medium im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> sowie 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert und ein- bis zweimal pro Woche mit Trypsin abgelöst und verdünnt ausgesät.

### 3.2.2 Virusrekonstitution und Viruskultur

Rekombinantes Virus wurde durch die Transfektion der hergestellten bakteriellen artifizialen Chromosome (*bacterial artificial chromosomes*, BACs) in permissive MeWo-Zellen rekonstituiert. Dazu wurde aus Bakterien isolierte BAC-DNA über Lipofektion in die MeWo-Zellen eingebracht. Die Zellen wurden tags zuvor in einer Flachboden-Platte mit sechs Kulturgefäßen (6er-Platte) mit  $1 \times 10^6$  Zellen pro Vertiefung ausgesät, die BAC-DNA wurde per Maxi-Präparation nach Herstellerangaben (Qiagen, Hamburg) isoliert und über Nacht bei 4°C gelöst. Pro Vertiefung wurden 8 µl Lipofectamin2000 (Life technologies) mit 242 µl OptiMEM vermischt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und zu einem Gemisch aus 4 µg DNA in 250 µl OptiMEM gegeben. Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde der 500 µl-Ansatz tropfenweise auf die Zellen gegeben, deren Medium zuvor durch DMEM ohne Zusätze ausgetauscht worden war. Nach 24 h wurde das Medium ohne Zusätze gegen D10 gewechselt, nach weiteren 24 h wurden die Zellen aus drei Vertiefungen vereinigt und in eine Zellkulturflasche mit 175 cm<sup>2</sup> Kulturoberfläche (T175) überführt. Nach 6-8 d zeigten sich erste cytopathische Effekte (CPE). War dies nicht der Fall, wurden die Zellen ein weiteres Mal passagiert, damit die Rekonstitution und Virusreplikation begünstigt wurde. Nach erfolgreicher Transfek-

tion wurde das Virus auf primäre Fibroblasten gebracht, indem MeWo-Zellen in T75-Flaschen überinfiziert wurden, so dass 3-4 d nach Infektion (*days post infection*, dpi) etwa 90% der Zellen abgestorben waren. Durch Kokultivierung mit den restlichen infizierten, überlebenden MeWo-Zellen wurden die Fibroblasten infiziert.

VZV-infizierte Kulturen mit ca. 25-50% CPE wurden etwa 1-2 mal pro Woche mit Trypsin abgelöst, verdünnt und auf zuvor ausgesäte, uninfizierte Zellen gegeben und durch Kokultivierung neu infiziert. Dabei wurden infizierte MeWo-Zellen in T75-Flaschen und HFF-Infekte in T25-Flaschen kultiviert. MeWo-Zellen in Passage 6-8 und mit etwa 60% CPE wurden 3-4 dpi geerntet und für die Wachstumskinetik in zehn Portionen zu je 1 ml in Einfriermedium bei -80°C eingefroren.

Zur Herstellung zellfreier Lysate nach Harper et al. (1998) wurden VZV-infizierte MeWo-Zellen 3-4 dpi in 2 ml PSGC-Puffer oder abgewandeltem Puffer mit TNB (TNB-Kulturmedium mit 20% FKS, 10% Dimethylsulfoxid) aus T75-Flaschen abgekratzt und auf Eis für 6x 10 s bei 21 kHz mit 10 s Pause mit einer konischen Sonde sonifiziert. Anschließend wurden die Zelltrümmer bei 1.000x g für 15 min bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand wurde bei -80°C für mindestens eine Nacht vor der Infektion eingefroren. Für die Infektion wurden die 2 ml-Lysate auf Eis aufgetaut und steril filtriert. Jeweils 250 µl wurden auf frisch ausgesäte sensorische Ratten-Neurone gegeben. Als Positivkontrolle wurden frisch gesplittete Fibroblasten mit 500 µl Lysat infiziert. Nach einer Passage der Fibroblasten oder 4-5 dpi waren neue CPEs zu erkennen.

### 3.2.3 Kinetiken und Titrationsen von Viren

Für die Bestimmung der Infektiösität, also der Plaque-bildenden Einheiten (*Plaque forming units*, PFU), wurden jeweils  $2 \times 10^5$  nicht infizierte MeWo-Zellen pro Vertiefung in 500 µl D10-Medium in einer 24er-Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurden jeweils 100 µl der infizierten Zellen aus einer Verdünnungsreihe von  $10^{-1}$  bis  $10^{-5}$  aus zuvor eingefrorenen Proben für die Infektion in Quadruplikaten eingesetzt. Nach drei Tagen wurden die Zellen mit 2% Paraformaldehyd in PBS für 20 min fixiert, zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in PBS belassen. Für die PFU-Bestimmung des Wildtyps (WT) PAC, der kein fluoreszierendes Protein exprimiert, schloss sich eine Immunfluoreszenz-Färbung mit dem monoklonalen Primärantikörper Anti-gl gegen das Glykoprotein I und dem Alexa Fluor-488-gekoppelten Sekundärantikörper gegen murines IgG an. Die CPEs der rekombinanten, eGFP bzw. mRFP exprimierenden Viren konnten direkt am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden.

Für die Replikationskinetik wurden MeWo-Zellen in einer 6er-Platte mit  $1 \times 10^6$  Zellen pro Vertiefung ausgesät und an d 0 mit jeweils 50 PFU infiziert. Von d 1-5 wurden die Zellen aus jeweils einer Vertiefung geerntet und in 1 ml-Proben in Einfriermedium bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren. Die Titrations von d 1-5 wurden analog zu der oben beschriebenen PFU-Bestimmung durchgeführt. Für jedes Virus wurden drei Röhrchen in Quadruplikaten in zwei unabhängigen Experimenten titriert und die Werte für jedes Experiment gemittelt. Die ermittelten PFU wurden logarithmisch zur Basis 10 dargestellt. Zum besseren Vergleich wurden die Werte zusätzlich normalisiert auf den Wert 1.

#### **3.2.4 Deckgläschen- und Glasbodenschälchen-Behandlung**

Die Deckgläschen für die Kultivierung sensorischer Ratten-Neurone zum Zwecke konfokaler Mikroskopie-Aufnahmen wurden zunächst für 30 min in 1 M HCl inkubiert und anschließend für 1 h in Wasser gewaschen. Nach 10 min Kochen in absolutem Ethanol wurden die Deckgläschen erneut für 2 h in Wasser gewaschen, bevor sie autoklaviert wurden. Nach der Trocknung wurden die Deckgläschen abgeflammt und mit 35  $\mu\text{l}$  Poly-L-Lysin und Laminin (je 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) für 2 h beschichtet, anschließend dreimal mit PBS gewaschen und wieder getrocknet.

Für die Kultivierung und Infektion sensorischer Ratten-Neurone im Mikrofluss-Kammer-System (*microfluidic chamber*-System) oder für die Fluoreszenz-Mikroskopie wurden sterile Glasbodenschälchen mit 400  $\mu\text{l}$  1 M HCl für 30 min vorgereinigt, dann dreimal mit Wasser gewaschen und mit 400  $\mu\text{l}$  absolutem Ethanol für 10 min behandelt. Nach drei Waschschritten mit Wasser wurden die Glasbodenschälchen getrocknet. Vor dem Aussäen der Neurone wurden die Glasbodenschälchen mit 150  $\mu\text{l}$  Poly-L-Lysin plus Laminin (je 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) für 2 h beschichtet und anschließend dreimal mit Wasser gewaschen und getrocknet. Für die *microfluidic chamber*-Experimente wurden die Glasbodenschälchen über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  mit 70  $\mu\text{l}$  Poly-L-Lysin (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) beschichtet. Nach dreimaligem Waschen mit Wasser wurden die runden Kammern (Abb. 6) auf das getrocknete Deckglas der Glasbodenschälchen gesetzt und mit 20  $\mu\text{l}$  Laminin (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) auf beiden Seiten der Kammer bei  $37^\circ\text{C}$  für etwa 2-3 h beschichtet. Anschließende Waschschriffe entfielen.

#### **3.2.5 Präparation und Infektion sensorischer Neurone von Ratten**

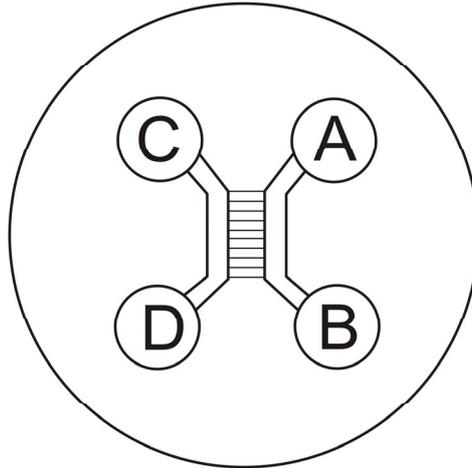
Die Präparation der Spinalganglien aus weiblichen Wistar-Ratten mit 100-160 g (Charles River, Köln-Sulzfeld) wurde nach Kress und Fickenscher (2001) durchgeführt. Nachdem die Wirbelsäule heraus genommen, in PBS gesäubert und der Länge nach aufgetrennt worden war, wurden die Spinalganglien in DMEM mit Gentamycin (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) unter binokular-mikroskopischer Sicht heraus präpariert. Anschließend wurden

die Spinalganglien von Geweberesten befreit, bevor sie einmal für 30 min und anschließend für 45 min mit 90 µg/ml Kollagenase (Liberase) in DMEM mit niedriger Glucose-Konzentration bei 37°C inkubiert wurden. Danach wurden die Spinalganglien zweimal mit PBS gewaschen und 30 min mit Trypsin-EDTA behandelt. Nach drei Waschschritten mit DMEM-Gentamycin und zwei Waschschritten mit TNB-Kulturmedium wurden die DRG mit einer feuerpolierten Pasteurpipette dissoziiert, in TNB-Kulturmedium mit 3,5% BSA bei 300 Umdrehungen pro Minute (*rounds per minute*, rpm) für 10 min bei 4°C sedimentiert, wiederum mit TNB-Kulturmedium gewaschen (5 min, 760 rpm, 4°C) und schließlich in 1.200 µl TNB-NGF (100 ng/ml) mit einer feuerpolierten Pasteurpipette resuspendiert. Die Neuronensuspension wurde als Tropfen auf Poly-L-Lysin und Laminin beschichtete Deckgläschen in 24er-Platten (je 80 µl) oder auf Glasbodenschälchen (je 100 µl) gegeben. Für die Infektion durch Korkultivierung mit infizierten primären Fibroblasten wurden 40 µl (ca.  $1 \times 10^4$  Zellen) der zuvor aus T25-Flaschen geernteten, mit PBS gewaschenen und in 2 ml TNB-NGF aufgenommen infizierten Fibroblasten in den Neuronen-Tropfen gegeben und für 4 h in diesem sehr kleinen Volumen inkubiert. Schließlich wurden 2 ml TNB-NGF in die Glasbodenschälchen bzw. 500 µl auf die Kulturen auf Deckgläschen gegeben.

### 3.2.6 Sensorische Ratten-Neurone im Mikrofluss-Kammer-System

Eine Mikrofluss-Kammer (*microfluidic chamber*, Abb. 6) hat vier Vertiefungen (A-D), je zwei davon sind durch einen Kanal miteinander verbunden. Durch Mikrokanäle stehen die beiden Hauptkanäle ebenfalls miteinander in Verbindung. Auf der somalen Seite (rechts, A+B) wurden die Neurone ausgesät, auf der axonalen Seite (links, C+D) wurden zu den durch die Mikrokanäle gewachsenen Axonen entweder infizierte Zellen für Experimente mit retrograder Infektion oder uninfizierte Zellen zur anterograden Infektion gegeben. Nach dem Waschen wurden die aus einer Ratte präparierten sensorischen Neurone in 35 µl TNB-NGF mit einer feuerpolierten Pasteurpipette resuspendiert und 5 µl der Neuronensuspension wurden in die obere Vertiefung (A) der somalen Seite gegeben (etwa 300-600 Neurone pro Kammer).

Das Herausziehen der Laminin-Lösung aus dem Hauptkanal durch die untere Vertiefung (B) erleichterte das Hineinfließen der Neurone in den Hauptkanal. Ca. 30-60 min nach dem Aussäen wurden die Vertiefungen der somalen Seite mit drei Tropfen (etwa 100 µl) TNB-NGF befüllt. Zur Erhöhung des hydrostatischen Drucks auf der axonalen Seite wurden in diese Vertiefungen vier Tropfen (etwa 130 µl) TNB-Kulturmedium mit 10x NGF-Konzentration gegeben, so dass das Wachstum der Axone auf die axonale Seite gelenkt wurde.



**Abb. 6:** Aufbau der *microfluidic chamber*. Je zwei Vertiefungen (A+B, C+D) sind durch Hauptkanäle miteinander verbunden. Diese Hauptkanäle wiederum stehen durch Mikrokanäle miteinander in Verbindung (HxBxL: 10  $\mu\text{m}$  x 5  $\mu\text{m}$  x 450  $\mu\text{m}$ ).

Für den retrograden Infektionsweg wurden 3 d nach dem Aussäen der Neurone infizierte Fibroblasten in die Vertiefungen der axonalen Seite gegeben. Dazu wurden Fibroblasten mit etwa 50% CPE aus einer T25-Flasche geerntet, gewaschen, in 1 ml TNB-NGF resuspendiert und 70  $\mu\text{l}$  in jede Vertiefung gegeben (ca.  $3 \times 10^4$  Zellen). Damit der hydrostatische Druck auf der somalen Seite erhöht und ein eventuelles Durchfließen infizierter Fibroblasten vermieden werden konnte, wurden etwa 50  $\mu\text{l}$  TNB-NGF zum vorhandenen Medium in die Vertiefungen der somalen Seite gegeben. Für den anterograden Infektionsweg wurden die Neurone auf der somalen Seite mit 70  $\mu\text{l}$  infizierten Fibroblasten aus 1 ml TNB-NGF kokultiviert, nachdem das Medium entfernt worden war. Infizierte Fibroblasten waren 1 d zuvor in D10 auf der axonalen Seite ausgesät worden (ca  $5 \times 10^4$  Zellen/Vertiefung). Das Ergebnis des retrograden oder anterograden Infektionsweges wurde ab d 2 beobachtet und am Fluoreszenzmikroskop dokumentiert.

### 3.2.7 Immunfärbungen

Alle Wasch- und Färbeschritte fanden, wenn nicht anders erwähnt, bei Raumtemperatur statt. Die für die Replikationskinetik mit dem WT-Virus PAC infizierten MeWo-Zellen wurden durch eine indirekte Immunfluoreszenz-Färbung sichtbar gemacht. Zunächst wurden die Zellen 3 dpi mit PBS gewaschen und anschließend mit 2% Paraformaldehyd in PBS für 20 min fixiert. Nach zwei Waschschritten mit PBS wurden die Zellen mit 1% Saponin (w/v) in PBS für 5 min permeabilisiert, wieder zweimal mit PBS gewaschen, und unspezifische Bindungsstellen der Zellen mit 10% FKS (v/v) in PBS als Blockpuffer für 1 h geblockt. Anschließend wurden die Zellen für 1 h mit dem Primärantikörper Anti-gl in Blockpuffer mit 0,02% Natriumazid inkubiert,

dreimal für 5 min mit PBS gewaschen und 1 h mit dem Fluoreszenz-gekoppelten anti-Maus Sekundärantikörper Alexa Fluor-488 in Blockpuffer gefärbt (Tab. 9).

Für konfokale Aufnahmen der adhärenen Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesäte und infizierte MeWo-Zellen oder primäre Fibroblasten 3 dpi zunächst analog zu WT PAC-infizierten MeWo-Zellen fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellkerne für 20 min mit 4',6-Diamidin-2'-Phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI, 2 µg/ml in PBS, Life technologies) angefärbt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in Einbett-Medium ohne DAPI (Vectashield, Vector Laboratories, Peterborough, UK) auf Objektträgern eingedeckelt. Zur TGN-Anfärbung der Zellen, die mit G65<sub>rVZV</sub> bzw. 65G<sub>rVZV</sub> infiziert waren, wurden diese vor der DAPI-Behandlung einer Immunfluoreszenz-Färbung, wie für WT PAC-infizierte Zellen beschrieben, mit dem primären Antikörper Golgin 97 und dem Alexa Fluor-568-gekoppelten anti-Maus Sekundärantikörper unterzogen.

Infizierte Neurone wurden 2-3 dpi vorsichtig mit PBS gewaschen, ohne die Zellen der Luft auszusetzen oder eintrocknen zu lassen, 20 min mit Zamboni-Fixativ fixiert und wieder vorsichtig mit PBS gewaschen. Die Permeabilisierung erfolgte mit 0,1% Triton X-100 in PBS für 5 min. Nach einem Blockierungsschritt für 1 h mit 10% (v/v) Ziegenserum (Dianova) in PBS als Blockpuffer wurden die Zellen 1 h mit dem Primärantikörper gegen  $\beta$ -III-Tubulin in Blockpuffer inkubiert. Nach drei Waschschritten mit PBS für jeweils 5 min wurde der in PBS verdünnte Fluoreszenz-gekoppelte Sekundärantikörper Alexa Fluor-568 (gegen Kaninchen-Ig) ebenfalls für 1 h auf den Zellen gelassen, die Zellen wurden erneut gewaschen und anschließend im Einbett-Medium mit DAPI (Vectashield) eingedeckelt. Im Falle des „Zweifarbigen-Virus“ G65R23<sub>rVZV</sub> wurde der Alexa Fluor-350-gekoppelte anti-Kaninchen Sekundärantikörper verwendet. Die Kernfärbung erfolgte mit dem Farbstoff TO-PRO-3-Iodid (1 mM in Dimethylsulfoxid, Life technologies), der in einer Verdünnung von 1:1.000 in PBS für 15-20 min eingesetzt wurde und dessen Anregungsmaximum im infraroten Bereich bei 642 nm liegt. Die Zellen wurden nach dem Waschen mit PBS in Einbett-Medium ohne DAPI eingedeckelt.

### 3.2.8 Mikroskopie

Die Bilder zur Bestimmung der Lokalisationsmuster der jeweiligen Fusionsproteine wurden an einem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop (LSM 510 Meta, Zeiss) mit einem 40/4.1-Apochromat Öl-Objektiv aufgenommen. Die Aufnahmen wurden mit 1.024 x 1.024 Pixel und einer Lochblenden-Einstellung von etwa 1-1,2 *Airy units* durchgeführt. Wenn die *Airy Unit* bei 1 liegt, ist das Verhältnis zwischen Signalstärke und Hintergrundrauschen optimal. Bei Werten über 1 wird mehr Licht durchgelassen, so dass die

Signalstärke zwar besser wird, die Aufnahmen werden aber weniger konfokal. Die Bilder wurden aus dem Mittelwert aus zwei bis vier Bildaufnahmen generiert (*Scan Average*), somit wurde die Bildqualität durch das Verbessern des Signal-Rausch-Verhältnisses optimiert. Für die Aufnahmen im blauen Wellenlängenbereich (etwa 342-455 nm) wurde der UV-Laser „Enterprise“ eingesetzt, für GFP-Aufnahmen im grünen Wellenlängenbereich (etwa 488-519 nm) ein Argon-Laser. Zwei Helium-Neon-Laser wurden für die Detektion im roten (etwa 578-607 nm) und infrarot-nahen (etwa 642-661 nm) Bereich verwendet. Kontrast und Helligkeit wurden nachträglich mit der *LSM Image Browser Software* (Zeiss) justiert.

Für den Vergleich der Fluoreszenzstärken bzw. der Plaque-Morphologie wurden die CPEs auf Fibroblasten und MeWo-Zellen am *Life cell Imaging*-Fluoreszenzmikroskop (Olympus) mit GFP-Filter bzw. RFP-Filter untersucht und abgebildet. Auch die Betrachtung retrograder und anterograder Infektionsansätze sensorischer Ratten-Neurone im *microfluidic chamber*-System sowie die Beobachtung infizierter Neurone in Glasbodenschälchen wurden am Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. Des Weiteren diente das Fluoreszenzmikroskop der Auswertung der Kinetiken.

### **3.3 Molekularbiologische Methoden**

#### **3.3.1 *En passant*-Mutagenese**

Die Methode der *En passant*-Mutagenese (Tischer et al., 2006) wurde zur Fusion der Leserahmen für eGFP und mRFP an ausgewählte virale Proteine im BAC pHJOpac angewandt (Wussow et al., 2009). Das BAC pHJOpac trägt das Genoms des WT-Stamms HJO, das zwischen den viralen DNA-Verpackungsstellen *pac1+2* den vom bakteriellen F-Plasmid abgeleiteten „MiniF“-Vektor trägt, so dass das virale Genom in Bakterien als Einzelkopie-Plasmid stabil vermehrt und manipuliert werden kann. Die „MiniF“-Sequenz besteht nur aus Genen für die Weitergabe des Plasmids (*oriS* und *repE*), für die Kontrolle der Kopienzahl (*parA/B*) und für eine Chloramphenicol-Resistenz. Über die *En passant*-Mutagenese wurden die eGFP- bzw. mRFP-Leserahmen in N- oder C-terminaler Position an ausgewählte virale Leserahmen von Genen der Latenz (ORF4, ORF21, ORF29), des kleinen Kapsidproteins (ORF23) und des so genannten „axonalen Leitproteins“ ORF65 fusioniert.

Zunächst wurden eGFP- und mRFP-Fragmente per *polymerase chain reaction* (Polymerasekettenreaktion, PCR) amplifiziert. Dabei wurden durch entsprechende Oligonukleotide (EPM-Oligonukleotide, Tab. 8) homologe 50 bp-Sequenzen flankierend zu der Insertionsstelle im Genom an das eGFP- bzw. mRFP-Fragment angefügt. Als Matrize diente das Plasmid pEP-EGFP-in, welches einen durch eine Kanamycin-

Resistenzkassette mit I-SceI-Schnittstelle unterbrochenen eGFP-Leserahmen enthielt, oder das Plasmid pEP-mRFP-in für die entsprechende Amplifikation von mRFP. Die PCR-Produkte wurden über ein Agarosegel aufgetrennt, die Banden wurden ausgeschnitten und über eine Anionenaustauscher-Chromatografie-Säule (Nucleospin Extract II, Macherey-Nagel, Düren) gereinigt. Durch Elektroporation wurden diese DNA-Fragmente für die erste Rekombination in die *E. coli* Zellen GS1783 eingebracht, ein abgeleiteter EL350 *E. coli*-Stamm, der für die Gene *exo*, *beta* und *gam* des defekten Prophagen  $\lambda$  unter einem temperatursensitiven Promotor kodiert. Gam verhindert, dass die RecBCD Nuklease von *E. coli* die inserierte Fremd-DNA zerschneidet, während die Exonuklease *exo* und das Einzelstrang-DNA-Bindeprotein *bet* für die Rekombinationsaktivität verantwortlich sind. Zellen des *E. coli*-Stamms GS1783, die pHJOpac oder ein anderes Ausgangs-BAC enthielten, wurden wie folgt elektrokompotent gemacht. Zunächst wurden die *E. coli* Zellen in 50 ml LB-Medium mit Chloramphenicol als Antibiotikum (im Verhältnis 1:20 aus einer Über-Nacht-Kultur) bis zu einer optischen Dichte (OD) von 0,5-0,7 angezogen, anschließend für 15 min in einem 42°C-Wasserbad zur Induktion der Rekombinationsgene des defekten  $\lambda$ -Phagen inkubiert und anschließend für 20 min im Wasser-Eis-Bad abgekühlt. Nach dreimaligem Waschen mit 10% (v/v) eiskaltem Glycerin (5 min, 4.500x g, 0°C) wurden die Bakterien in 50 ml (1/100 Volumen) 10% Glycerin resuspendiert und in Proben zu 50  $\mu$ l entweder sofort für die Elektroporation verwendet oder im Ethanol-Trockeneisbad schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Elektrokompotente Zellen wurden mit 100 ng frischem PCR-Produkt in einer Küvette mit 1 mm Spaltbreite mit 1,5 kV/cm<sup>2</sup>, 25  $\mu$ F und 200  $\mu$  $\Omega$  elektroporiert, 2 h bei 32°C in 1 ml LB geschüttelt und auf Kanamycin-Chloramphenicol-Platten ausplattiert.

Nach 48 h bei 32°C wurden Einzelklone mittels Kolonie-PCR, Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus-Analyse (*restriction fragment length polymorphism*, RFLP) und Sequenzierung durchsucht. Entsprechende Klone wurden über Nacht in LB-Medium mit Chloramphenicol und Kanamycin angezogen. Für den zweiten Rekombinationsschritt wurde daraus am nächsten Tag eine Hauptkultur nur mit Chloramphenicol angeimpft. Nach 3-4 h bei 32°C wurde durch Zugabe von 1% Arabinose für 1 h die Restriktionsendonuklease I-SceI induziert und das BAC-Genom an der I-SceI-Schnittstelle geschnitten. Anschließend wurden bei 42°C für 30 min die Rekombinasen des defekten  $\lambda$ -Phagen induziert und die Kanamycin-Kassette durch einen weiteren homologen Rekombinationsschritt über die in den eGFP- bzw. mRFP-Leserahmen enthaltenen Sequenzduplikationen entfernt. Nach weiteren 3-4 h Schütteln bei 32°C wurden die Bakterien auf Platten mit Chloramphenicol und Arabinose ausplattiert. Wie

nach der ersten Rekombination wurden Klone mit Kolonie-PCR, RFLP und Sequenzierung auf den korrekten Einbau der Fusionsgene überprüft.

### 3.3.2 DNA-Isolation

Kleine DNA-Mengen für RFLP-Analysen wurden durch alkalische Lyse isoliert („Mini-Präp“). Dazu wurden 5 ml Bakterienkultur mit entsprechendem Antibiotikum über Nacht bei 32°C angezogen und bei 3.500 rpm für 10 min abzentrifugiert. Die Bakterien wurden in 300 µl Lösung I resuspendiert (Tab. 4), nach Zugabe von Lösung II wurde der Ansatz invertiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Präzipitation von Zelltrümmern und chromosomaler DNA wurden 300 µl Lösung III dazugegeben, die Proben wurden wiederum invertiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Die BAC-DNA wurde durch Zugabe von 800 µl Isopropanol gefällt, bei Raumtemperatur für 20 min bei 13.000 rpm sedimentiert und mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen (13.000 rpm, 15 min, Raumtemperatur). Anschließend wurde die DNA in 52 µl Wasser aufgenommen und bei Raumtemperatur durch vorsichtiges Schütteln gelöst.

Zum Einsatz in Transfektionen wurde BAC-DNA in größeren Mengen (500ml) mit dem Maxi-Kit nach Herstelleranleitung isoliert (Qiagen) und die DNA in 80-100 µl molekularbiologisch reinem Wasser (Eppendorf) über Nacht bei 4°C gelöst. Für die sequenzielle Analyse von Virus-DNA aus permissiven humanen Zellen nach der Rekonstitution wurden während den ersten Virus-Passagen infizierte Zellen geerntet ( $1-5 \times 10^6$  Zellen) und mit 1 ml PBS gewaschen (5 min, 6500 rpm, Raumtemperatur). Die Zellen wurde in 500 µl Lyse-Puffer (Tab. 4) für 90 min bei 56°C lysiert und die Proteinase K anschließend für 15 min bei 95°C inaktiviert. Für die PCR wurde 1 µl des Lysats eingesetzt.

### 3.3.3 Restriktionsfragment-Analyse

Zur Überprüfung der gezielten Genfusionen im BAC-klonierten Virusgenom wurden die entsprechenden Klone über Nacht in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika kultiviert und die BAC-DNA durch „Mini-Präp“ gewonnen. Die sedimentierte und getrocknete DNA wurde in 52 µl molekularbiologisch reinem Wasser durch vorsichtiges Schütteln gelöst und in 20 µl-Ansätzen mit 17 µl DNA, 2 µl 10x Enzym-Puffer und 1 µl Enzym über Nacht oder für mindestens 6 h bei entsprechender Temperatur verdaut oder direkt in 50 µl Restriktionsenzym-Verdauansätzen gelöst (BAC-DNA-Sediment, 2,5 µl Enzym, 5 µl 10x Puffer, 42,5 µl Wasser) und geschnitten. Eingesetzte Enzyme waren *Bam*HI, *H*IndIII, *E*coRV, *P*stI, *P*vull, *S*alI und *S*maI (Fermentas/Thermo Scientific) sowie *B*srGI (NEB, Ipswich, MA, USA). Von der verdauten DNA wurden 10 µl zusammen mit 2 µl 6x Ladepuffer auf ein 0,6%iges Agarosegel aufgetragen und für etwa 24 h bei 40 V aufgetrennt.

### 3.3.4 Polymerase-Kettenreaktion

Durch PCR wurden DNA-Fragmente für die Klon-Identifikation, zur Sequenzierung oder für die *En passant*-Mutagenese amplifiziert. Standardmäßig wurden 50 µl-Ansätze benutzt, die sich wie folgt zusammensetzten: 1x PCR-Puffer, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP-Mix (alle Fermentas/Thermo Scientific), je 1 µM Oligonukleotid, 1 U Taq-Polymerase (Thermo Scientific) und 250-500 ng DNA. Die PCR wurde in der Regel unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Initialer Denaturierungsschritt für 4 min bei 95°C, dann 25-30 Zyklen mit Denaturierung für 30 s bei 95°C, Oligonukleotid-Anlagerung (*Annealing*) bei 55°C für 30 s und Elongation bei 72°C mit 1 kb/min, letzter Syntheseschritt für 10 min bei 72°C, dann 4°C. Die *Annealing*-Temperatur (*T<sub>m</sub>*) wurde gegebenenfalls mit dem *T<sub>m</sub>-Calculator* von Finnzymes ermittelt und angepasst ([www.finnzymes.com/tm\\_determination.html](http://www.finnzymes.com/tm_determination.html)).

Für Amplifikate mit minimaler Fehlerrate zum Einsatz in der *En passant*-Mutagenese wurde die Phusion-Polymerase (Finnzymes, Thermo Scientific) in 50 µl-Ansätzen eingesetzt: 1x HF-Puffer mit 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP-Mix, je 0,5 µM je Oligonukleotid (EPM-Oligonukleotide, Tab. 8), 1 U Phusion-Polymerase. Das PCR-Programm umfasste folgende Schritte: Initialer Denaturierungsschritt (98°C, 30 s), dann 30-35 Zyklen bei 98°C für 10 s, 30 s bei 55-65°C, 30 s/kb bei 72°C und finaler Elongationsschritt für 10 min, dann 4°C. Die erforderliche Schmelztemperatur für das *Annealing* wurde mit dem *T<sub>m</sub>-Calculator* ([www.finnzymes.com/tm\\_determination.html](http://www.finnzymes.com/tm_determination.html)) von Finnzymes ermittelt.

### 3.3.5 Agarose-Gelelektrophorese

PCR-Fragmente für die *En passant*-Mutagenese, die RT-PCR oder für Sequenzierungen wurden über Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Entsprechende Mengen Agarose wurden für 0,8-1% (w/v) Agarosegele in 1x TBE-Puffer aufgekocht, mit Ethidiumbromid (2 µg/ml) versetzt und in Gelkammern gegossen. Ein Fünftel eines DNA-PCR-Ansatzes oder die Hälfte eines PCR-Ansatzes aus cDNA (*complementary DNA*, komplementäre DNA) wurde mit 6x Ladepuffer versetzt und im Gel aufgetrennt. Fragmente für die *En passant*-Mutagenese wurden im Gesamtansatz im Agarosegel aufgetrennt, ausgeschnitten und über eine Anionenaustauscher-Säule (Macherey-Nagel) gereinigt, bevor 1 µl des Eluats zur Mengenbestimmung erneut über ein Agarosegel aufgetrennt wurde. Die Bandenmuster wurden unter ultraviolettem Licht mit Hilfe der CCD-Kamera detektiert und dokumentiert.

### 3.3.6 Sequenzierungen

Für Sequenzierungsreaktionen wurde das BigDye Kit v1.1 (Applied Biosystems, Life technologies) verwendet. Der zu überprüfende Genabschnitt wurde per PCR amplifiziert und über eine Säule nach Herstellerangaben aufgereinigt (Macherey-Nagel). Anschließend wurde das Fragment in 30 µl molekularbiologisch reinem Wasser eluiert und die Menge im Agarosegel abgeschätzt. Von dem PCR-Produkt wurden 25-50 ng als Matrize in einem 10 µl-Gesamtansatz mit 1 µl 5x BigDye-Puffer und 0,5 µM je Oligonukleotid eingesetzt (S- Oligonukleotide, Tab. 8). Die PCR-Bedingungen waren: Initiale Denaturierung bei 96°C für 1 min, dann 24 Zyklen mit 96°C für 10 s, 50°C für 5 s und 4min bei 60°C, anschließend 4°C. Die Sequenzierungen wurden im Kapillarsequenzer des Instituts für Klinische Molekularbiologie durchgeführt und die Auswertungen erfolgten mit der Software Vector NTI Contig-Express (Life technologies).

Ein Verfahren des *next generation sequencing* wurde angewandt, damit die Richtigkeit der viralen Sequenz des im BAC pHJOpac klonierten VZV-Genoms im Vergleich zu der Sequenz des ursprünglichen WT-Isolats HJO verifiziert werden konnte. Dazu wurde BAC-DNA von pHJOpac mittels Maxi-Präparation aus *E. coli* GS1783 isoliert und am Institut für Klinische Molekularbiologie durch die Arbeitsgruppe von Dr. Hemmrich-Stanisak sequenziert (Illumina, San Diego, CA, USA). Die Sequenz wurde mit dem *Integrative Genome Viewer* (IGV, *Broad Institute*, [www.broadinstitute.org/igv/](http://www.broadinstitute.org/igv/)) ausgewertet, mit den Sequenzen des HJO und pHJOpac verglichen und abweichende Sequenzen auf ihre möglichen Auswirkungen überprüft.

### 3.3.7 RNA-Präparation

Für die Analyse der Mutanten auf Transkriptionsebene wurde RNA aus infizierten Zellen nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) isoliert. Die infizierten MeWo-Zellen wurden 3-4 dpi aus T75-Flaschen in 4 ml PBS abgekratzt, bei 6.500 rpm und 4°C für 10 min abzentrifugiert, anschließend schockgefroren und bei -80°C gelagert. Für die RNA-Isolation wurden die Proben in 1 ml Trizol-Reagenz (Life technologies) resuspendiert, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und nach Zugabe von 200 µl Chloroform für 15 s geschüttelt, bevor das Gemisch wieder für 2-3 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Zur Phasentrennung wurde der Ansatz bei 13.000 rpm und 4°C für 15 min zentrifugiert. Die wässrige Phase mit der RNA wurde zur Fällung in ein neues Reaktionsgefäß mit 500 µl Isopropanol überführt. Nach Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur wurde die präzipitierte RNA bei 13.000 rpm und 4°C für 15 min sedimentiert, mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen (8.000 rpm, 4°C, 10 min) und in 30 µl Diethylpyrocarbonat-behandeltem Wasser (Life technologies) auf Eis gelöst. Nach spektralphotometrischer Konzentrationsbestimmung mit 1 OD = 40 µg/µl RNA wurde

die RNA mit DNase I (Roche) behandelt. In 50 µl-Ansätzen wurden 16 µg RNA zusammen mit 1x Puffer und 5 U DNase I sowie 20 U RNase-Inhibitor (Fermentas/Thermo Scientific) für 20 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die DNase I bei 75°C für 10 min inaktiviert. Die restliche RNA wurde bei -80°C gelagert.

### 3.3.8 Reverse-Transkriptase-PCR

Für die Umschreibung der RNA in cDNA wurden folgende 40 µl-Ansätze verwendet. Zum Ausschluss einer Kontamination durch genomische oder virale DNA wurde dabei parallel pro Ansatz eine Kontrolle ohne Reverse Transkriptase (-RT) mitgeführt: 25 µl DNase I behandelte RNA, 1 µg Oligo(dT)<sub>12-18</sub> (Life technologies) und 500 µM dNTP-Mix (Fermentas/Thermo Scientific) wurden für 5 min bei 65°C inkubiert, dann auf Eis abgekühlt und mit 5x Transkriptions-Puffer und 5 mM Dithiothreitol (beide Life technologies) versetzt. Nach 2 min bei 42°C wurde zu den +RT-Ansätzen 200 U SuperScript-II-RT (Life technologies) gegeben und die RNA bei 42°C für 50 min in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde die RT bei 70°C für 15 min inaktiviert. Die Negativkontrollen blieben ohne RT.

**Tab. 12:** *Annealing*-Temperaturen für den Nachweis der Fusionsgene bzw. eGFP

<b>Fusionsgen</b>	<b>Annealing-Temperatur</b>
eGFP-ORF4	64,3°C
eGFP-ORF21	68,8°C
eGFP-ORF65	58,6°C
eGFP-ORF23	65,7°C
ORF21-eGFP	62,0°C
ORF29-eGFP	61,9°C
ORF65-eGFP	57,7°C
eGFP	68,2°C

Die PCR für den Nachweis der Fusionsgene wurde in 20 µl-Ansätzen mit der Phusion-Polymerase durchgeführt: 2 µl (1/10 Volumen) cDNA, 1x HF-Puffer, 200 µM dNTP-Mix, je 0,5 µM je Oligonukleotid (RT- Oligonukleotide, Tab. 8), 0,4 U Phusion-Polymerase. Die Schmelztemperatur wurde im Finnzyme *Tm-Calculator* ermittelt ([www.finnzymes.com/tm\\_determination.html](http://www.finnzymes.com/tm_determination.html)). Für die Synthese wurden 1 kb/30 s angesetzt. Als Positivkontrolle wurden immer Ansätze zum Nachweis des Haushaltsgens Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) mitgeführt, als Negativkontrolle wurde auf eGFP im WT PAC getestet. Das PCR-Programm umfasste folgende Schritte: 98°C für 1 min zur initialen Denaturierung, dann 35 Zyklen mit 98°C für 10 s, X°C für 30 s (Tab. 12), 72°C für 35 s und finaler Syntheseschritt für 10 min,

dann 4°C. Für den GAPDH-Nachweis wurde das PCR-Programm nach einem zweistufigen Protokoll durchgeführt: Initiale Denaturierung bei 98°C für 1 min, dann 25 Zyklen bei 98°C für 10 s, *Annealing* und Synthese bei 72°C für 25 s, als finaler Schritt 72°C 10 min, anschließend 4°C. Die *Annealing*-Temperaturen für die verschiedenen Fusionsgene sind in Tab. 12 zusammengefasst.

### 3.3.9 Proteinisolation und Immunblot-Analyse

Zur Untersuchung des viralen eGFP- oder mRFP-Fusionsproteins wurden infizierte MeWo-Zellen aus einer T75-Flasche in 4 ml PBS abgekratzt (ca.  $6 \times 10^6$  Zellen/ml) und bei 13.000 rpm und 4°C für 5 min abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 300 µl RIPA-PIC-Puffer (Tab. 3) resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Die Zelltrümmer wurden bei 13.000 rpm und 4°C für 20 min sedimentiert und das Proteinlysate in 50 µl-Proben bei -80°C gelagert. Die Proteinmengenbestimmung wurde mit dem *Quick Start Bradford Protein-Assay Kit* (BioRad, München) durchgeführt. In drei parallelen Ansätzen wurde pro Probe in einer 96-Flachbodenplatte 1 µl Protein-Lysat zu 149 µl Wasser gegeben, mit 150 µl Nanoquant-Lösung gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption wurde spektralphotometrisch bei  $\lambda=595$  nm am Fluorimeter Safire II gemessen.

Von dem Lysat wurden 100 µg (als Ausnahme 30 µg aus Lysat G4<sub>rVZV</sub>-infizierter Zellen) mit 1x Laemmli-Puffer gemischt und bei 95°C für 10 min erhitzt (Laemmli, 1970). Die Proteine wurden abhängig von ihrer molekularen Masse durch eine 8-12%ige, diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Als Größenstandard wurde der „*Prestained*“ oder der „*Prestained Plus*“ Proteinmarker (Thermo Scientific) verwendet. Als GFP-Positivkontrolle diente ein Lysat aus GFP-überexprimierenden HeLa-Zellen. Für die RFP-Positivkontrolle wurde ein Lysat aus Cytomegalovirus-infizierten primären Fibroblasten verwendet, die ein pUL35a-mRFP-Fusionsprotein exprimierten (beides von Gregor Maschkowitz zur Verfügung gestellt). Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine im *Semi-dry*-Blotverfahren bei 12 V für 30-40 min auf eine 8 x 6 cm große Nitrocellulose-Membran (Hybond C, GE Healthcare, Freiburg) übertragen. Die Membranen wurden in 5% PBSTM (Blockpuffer) für 1 h oder über Nacht bei 4°C geblockt und mit dem in Blockpuffer verdünnten Primärantikörper über Nacht bei 4°C oder 1 h bei Raumtemperatur inkubiert (Tab. 9). Nach mehrmaligem Waschen für 30 min mit 0,05% PBST wurden die Membranen für 1 h bei Raumtemperatur mit HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper in 5% PBSTM inkubiert (anti-Kaninchen-IgG für den GFP-Nachweis, anti-Maus-IgG für den RFP-Nachweis, Tab. 9) und anschließend mehrmals mit 0,05% PBST gewaschen. Die Proteinbanden wurden mit den Pico/Femto-Chemilumineszenz-Kits (Pierce, Rockford, IL,

USA) detektiert und mit der CCD-Kamera dokumentiert. Für den  $\beta$ -Aktin-Nachweis wurden dieselben Proteinproben parallel auf ein zweites Gel aufgetragen und mit einem  $\beta$ -Aktin-Antikörper und dem sekundärem anti-Kaninchen HRP-Antikörper detektiert.

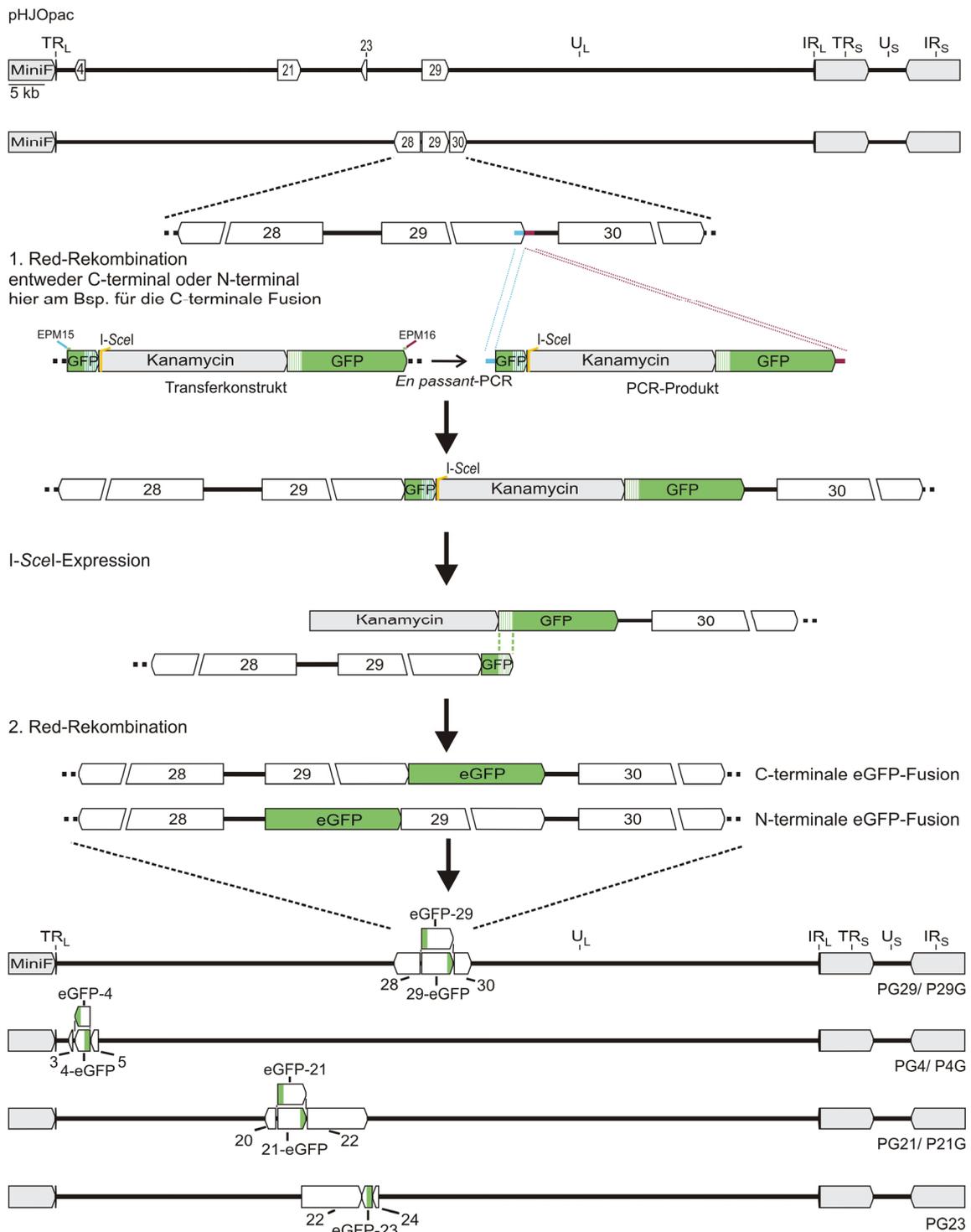
## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Herstellung rekombinanter Viren

#### 4.1.1 *Recombineering* an latent exprimierten Leserahmen

Damit Proteine, die auch während der VZV-Latenz exprimiert werden, hinsichtlich ihrer Lokalisation und Funktion in infizierten permissiven Zellen und sensorischen Neuronen untersucht werden konnten, wurde der Leserahmen für das grün fluoreszierende Protein eGFP aus der Qualle *Aequorea victoria* innerhalb des VZV-Genoms an ausgewählte, latent exprimierte Leserahmen fusioniert, und zwar an ORF4, ORF21 und ORF29. Zum Vergleich wurde auch eine Fusion von eGFP an ORF23 einbezogen, das als Kapsidprotein nur während der lytischen Infektion gebildet wird. ORF4, ORF21 und ORF29 sollten sowohl C- als auch N-terminal mit eGFP fusioniert werden. Denn einerseits konnten aus der Literatur kaum Angaben über eine zu präferierende Position entnommen werden, und andererseits erlaubten herkömmliche plasmidische Expressionsvektoren keine Aussage darüber, inwiefern die Veränderungen des exprimierten Proteins die Virusreplikation beeinflussen. Da für das Protein 23p aus früheren Arbeiten dieser Arbeitsgruppe bereits bekannt war, dass eine Fusion am N-Terminus des viralen Proteins keinen gravierenden Einfluss auf die Virus-Replikation nimmt, wurde eGFP nur an diesem Ende von ORF23 angefügt. Da das 23p aufgrund der Sequenzhomologie zu den HSV-1 Kapsidproteinen vermutlich die äußere Schicht des Nukleokapsids bildet (Chaudhuri et al., 2008), ist anzunehmen, dass so das N-terminale eGFP auf der Außenseite des Viruskapsides lokalisiert ist. Mit der Strategie der *En passant*-Mutagenese (Tischer et al., 2006) konnte der eGFP-Fusionsanteil sehr effizient in das als BAC klonierte Virusgenom (Wussow et al., 2009) eingefügt werden, das in Bakterien vergleichsweise einfach manipuliert werden kann. Die Methode der *En passant*-Mutagenese besteht aus zwei aufeinander folgenden homologen Rekombinationsschritten. Durch die erste Red-Rekombination wird eGFP zusammen mit einem Selektionsmarker an die gewünschte Sequenz in das Virusgenom eingebracht, und in einem anschließenden zweiten Red-Rekombinationsschritt wird der Selektionsmarker entfernt, so dass nur eGFP im Genom zurück bleibt, ohne weitere Fremdsequenzen zu hinterlassen.

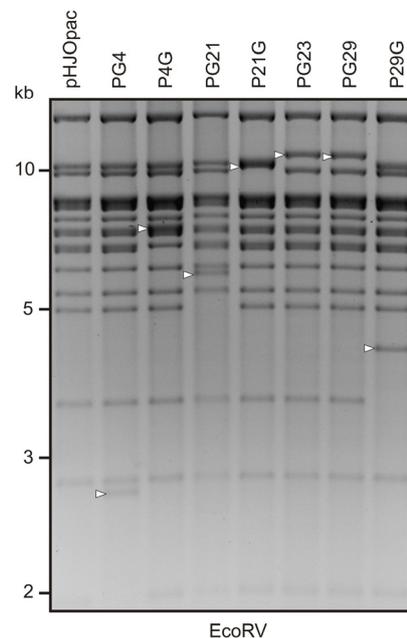
In Vorarbeiten war der Transfervektor pEP-EGFP-in durch PCR erstellt worden, der eine Kanamycin-Resistenzkassette mit I-SceI-Schnittstelle innerhalb des eGFP-Leserahmens enthält, sowie eine Sequenzduplikation von 72 bp, die in den eGFP-Leserahmen eingefügt worden war (Tischer et al., 2006). Im ersten Schritt der *En passant*-Mutagenese wurde eGFP von dem Plasmid pEP-EGFP-in als Matrize amplifiziert.



**Abb. 7: En-passant-Mutagenese zum Einbringen von eGFP in ausgewählte ORFs in das BAC pHJOpac, am Beispiel für eine C-terminale Fusion an ORF29.** Mit dem Transfervektor pEP-EGFP-in als Matrice und den Oligonukleotiden EPM15 und EPM16 wurde ein PCR-Produkt hergestellt, das flankierende Sequenzen trug, die zur entsprechenden Insertionsstelle homolog waren, wie es hier am Beispiel für den C-Terminus von ORF29 dargestellt ist. Der eGFP-Leserahmen liegt im PCR-Produkt durch eine Kanamycin-Resistenzkassette geteilt vor. Nach dem Einbringen des PCR-Fragments durch Elektroporation in die Bakterien kam es zur ersten homologen Rekombination in der das PCR-Fragment in das Virusgenom integriert wurde. Durch Arabinose wurde die Endonuklease Scel induziert, deren Schnittstelle an der Kanamycin-Kassette liegt. Es kam zur zweiten homologen Red-Rekombination über die zuvor in eGFP eingefügte Sequenzduplikation, wodurch die Kanamycin-Kassette vollständig entfernt wurde, so dass eGFP C-terminal fusioniert an ORF29 vorlag. Ebenso entstanden rekombinante BACs mit eGFP N- und C-terminal an ORF4, ORF21 sowie am N-Terminus von ORF29 und ORF23.

Dabei entstand ein Fragment, das eGFP mit der Kanamycin-Resistenzkassette enthielt und durch Sequenzüberhänge von 50 bp flankiert wurde, die homolog zu der geplanten Insertionsstelle waren (Abb. 7). Die erste Rekombination erfolgte nach dem Einbringen des gereinigten PCR-Produktes durch Elektroporation in *E. coli* GS1783, welche das WT-BAC pHJOpac enthielten.

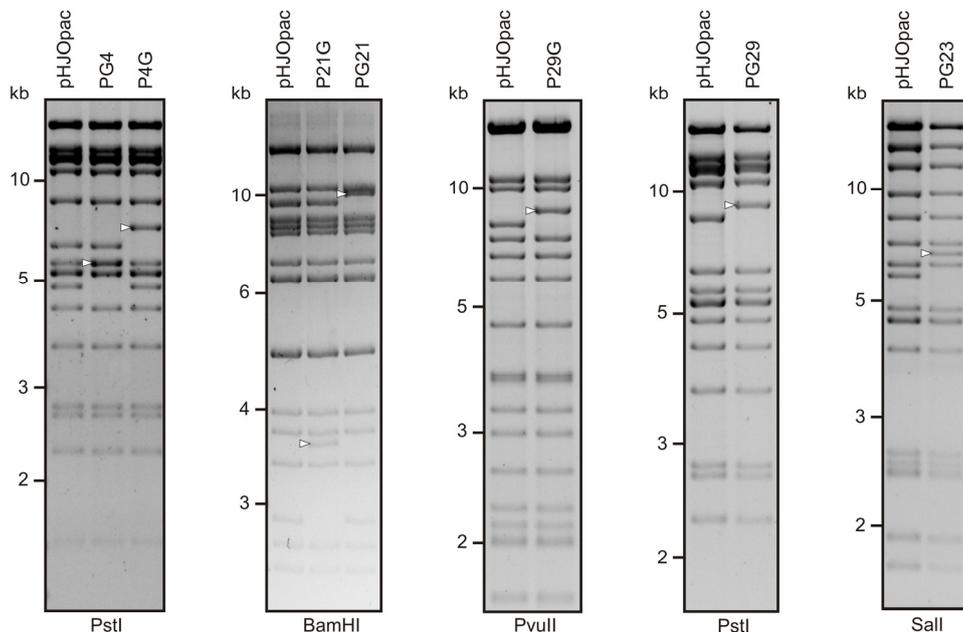
Anschließend wurde in ausgewählten Klonen die Expression der Restriktionsendonuklease I-SceI durch Arabinose-Zugabe induziert und das Genom an der Schnittstelle geschnitten. Durch die zweite Rekombination über die zuvor eingefügte Sequenz-Duplikation (Abb.7, grün gestrichelte Markierungen) ließ sich die Kanamycin-Kassette wieder entfernen. Die BACs, in denen eGFP an ORF4, ORF21 und ORF29 am N- und C-Terminus bzw. N-terminal an ORF23 fusioniert vorlag, wurden PG4 und P4G, PG21 und P21G, PG29 und P29G sowie PG23 genannt. Zur Überprüfung des korrekten Einbaus des eGFP-Leserahmens in die unterschiedlichen Positionen an den verschiedenen ORFs wurden die BAC-Genome auf spezifische RFLPs untersucht. Jede Insertionsvariante wurde mit mindestens zwei verschiedenen Enzymen überprüft. Die durch den Verdau mit entsprechenden Enzymen erstellten Bandenmuster der rekombinanten BACs wurden mit dem des WT pHJOpac verglichen.



**Abb. 8: *EcoRV*-RFLP-Analyse der hergestellten BACs.** Die isolierte BAC-DNA der rekombinanten BACs und von pHJOpac wurde mit *EcoRV* verdaut und die Banden wurden im Agarosegel aufgetrennt. Das Bandenmuster zeigte die erwarteten Größenunterschiede einzelner Fragmente im Vergleich zum WT pHJOpac. Die betroffenen Banden sind mit weißen Pfeilköpfen markiert. Invertierte Grauton-Darstellung.

Mit *EcoRV* konnten alle unterschiedlichen Mutanten mit einem einzigen Restriktionsenzym verdaut und ein im Vergleich zum WT pHJOpac verändertes Bandenmuster er-

stellt werden (Abb. 8). Bei dem BAC PG4 wechselte das entsprechende EcoRV-Fragment, auf dem ORF4 liegt, durch den Einbau des eGFP-Leserahmens von 1,9 kb auf 2,6 kb und bei P4G von 6,3 kb auf 7,0 kb. Die beim WT beobachtete 4,9 kb-Bande erschien beim BAC PG21 bei 5,4 kb, während bei P21G das EcoRV-Fragment statt bei 9,1 kb jetzt bei 9,8 kb lag. Da sich eGFP-ORF23 und eGFP-ORF29 zusammen auf einem Restriktionsfragment von EcoRV befanden, entstanden sowohl für PG23 als auch PG29 die gleichen Bandenmuster mit einem 10,8 kb-EcoRV-Fragment statt vorher 10,1 kb. Dagegen ergab sich durch den Einbau von eGFP an den C-Terminus von ORF29 für P29G ein anderes Bandenmuster. Das 3,5 kb-Fragment wies durch die Integration von eGFP nun 4,2 kb auf. Jedes DNA-Fragment, das durch das inserierte eGFP vergrößert wurde und damit im Gel höher lief, wurde mit einem weißen Pfeilkopf markiert (Abb.8).



**Abb. 9: RFLP-Analysen der hergestellten BACs mit einem zweiten Enzym.** Nachweis der erfolgreichen Manipulation der BACs mit einem zweiten Enzym. Die veränderten Bandenpositionen sind mit weißen Pfeilköpfen markiert. Abbildung in invertierter Darstellung.

Zur weiteren Bestätigung der korrekten Insertion wurde für jedes BAC ein zweites RFLP-Muster im Vergleich zum WT pHJOpac erstellt. Die BACs PG4 und P4G wurden zusätzlich mit *PstI* verdaut (Abb. 9), während die ORF21-Fusionen mit *BamHI* überprüft wurden. Mit *PvuII* konnte die Insertion von eGFP am N-Terminus von ORF29 und mit *PstI* die C-terminale Fusion an ORF29 nachgewiesen werden. Das BAC PG23 wurde zur weiteren Überprüfung der eGFP-Insertion mit *Sall* verdaut. Die RFLP-Analysen zeigten für alle BACs, bei denen eGFP in das Genom eingebaut worden war, nach der ersten (Daten nicht dargestellt) und der zweiten Red-Rekombination die Bandenver-

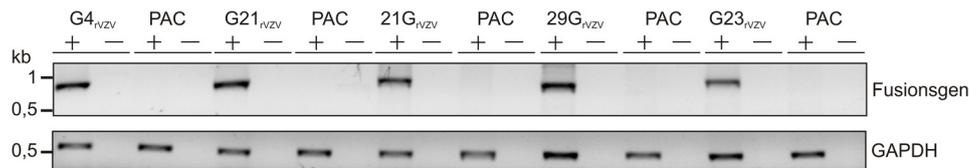
schiebungen, die durch den Einbau des 714 bp umfassenden eGFP-Leserahmens erwartet wurden.

#### 4.1.2 Rekonstitution der Virusmutanten

Nachdem durch RFLP- und nachfolgender Sequenz-Analyse der korrekte Einbau des eGFP bestätigt war, wurden die jeweiligen BACs in die permissive humane Melanom-Zelllinie MeWo transfiziert. Etwa fünf bis zehn Tage nach der Transfektion entwickelten sich die ersten CPEs. Allerdings kam es auch vor, dass die Rekonstitution erst nach weiteren Passagen der transfizierten Zellen erfolgte, z.B. bei 4G<sub>rVZV</sub> oder 29G<sub>rVZV</sub>. Dagegen blieb die Virus-Rekonstitution aus dem BAC PG29 erfolglos, denn auch nach mehreren Transfektionsversuchen und Passagen ließ sich dieses Virus nicht rekonstituieren. Aus dem BAC P4G konnte zwar das Virus hergestellt werden, aber das Virus replizierte sehr langsam und konnte nicht stabil in Kultur gehalten werden. Die rekombinanten Viren, die sich erfolgreich rekonstituieren und in Zellkultur passagieren ließen, wurden mit G4<sub>rVZV</sub> (N- terminale Fusion), G21<sub>rVZV</sub>, 21G<sub>rVZV</sub> (N- und C-terminale Fusion), 29G<sub>rVZV</sub> sowie G23<sub>rVZV</sub> benannt. Die Übergangsbereiche zwischen viraler und inserierter DNA wurden für diese Viren aus gesamtzellulärer DNA aus MeWo-Zellen durch PCR bestätigt.

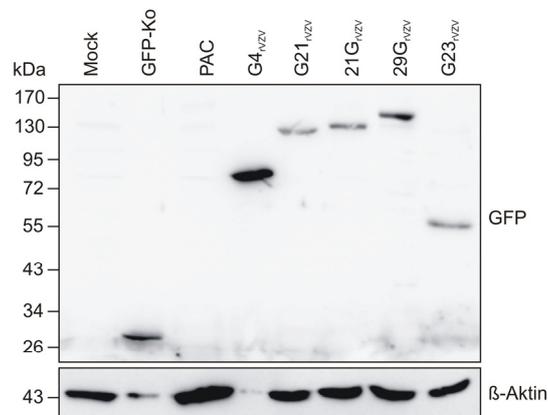
Zur Bestätigung der Genfusion auf Transkriptionsebene wurde aus infizierten Zellen isolierte RNA zunächst mit Dnase I behandelt, damit eventuell vorhandene kontaminierende chromosomale bzw. virale DNA degradiert werden konnte, bevor die RNA in cDNA umgeschrieben wurde. Zum Ausschluss von Resten genomischer oder viraler DNA wurde parallel immer ein Kontrollansatz ohne reverse Transkriptase mitgeführt. Als Positivkontrolle dienten Transkripte der zellulären GAPDH. Für jedes Fusionsgen lag die erwartete PCR-Fragmentgröße bei etwa bei 800-900 bp, das Fragment für GAPDH umfasste etwa 540 bp. Alle Fusionsgene wurden positiv auf die korrekte Fusion mit eGFP getestet. Der eGFP-Nachweis im WT PAC blieb wie erwartet negativ (Abb. 10).

Nach dem RNA-Nachweis sollten die Fusionsprodukte auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Infizierte MeWo-Zellen wurden hierfür abzentrifugiert und lysiert. Zunächst wurden 100 µg Protein (30 µg aus Lysat G4<sub>rVZV</sub>-infizierter Zellen) per SDS-PAGE nach ihrer molekularen Masse aufgetrennt, dann auf eine Membran übertragen und anschließend mit einem GFP-Antikörper detektiert (Abb. 11). Als Mock-Kontrolle diente ein Lysat uninfizierter MeWo-Zellen und als Positivkontrolle wurde Lysat von Hela-Zellen eingesetzt, die eGFP überexprimiert hatten.



**Abb 10: Nachweis der eGFP-Fusion auf Transkript-Ebene.** Die RNA wurde aus infizierten MeWo-Zellen isoliert und mit reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Mit Oligonukleotiden, die im entsprechenden viralen Leserahmen und im eGFP-Bereich anlagerten, konnte die Fusion auf RNA-Ebene nachgewiesen werden. Bei allen Fusionsgenen ergab sich eine Bandengröße von etwa 800-900 bp. Die zelluläre Kontrolle GAPDH lief bei etwa 540 bp. +: mit RT, -: ohne RT. Invertierte Darstellung der Banden.

Als zelluläre Positivkontrolle diente  $\beta$ -Aktin mit 43 kDa. Das eGFP umfasst 27 kDa und aufgrund der Proteingröße des 4p mit 51 kDa war das Fusionsprotein G4 wie erwartet bei etwa 80 kDa zu detektieren. Das Protein von ORF21 hat 115 kDa. Die Bande von 21G lief leicht niedriger bei etwa 135 kDa, was der erwarteten Größe des Fusionsproteins entsprechen könnte. Für das N-terminale Fusionsprotein G21 konnte eine Bande bei nur etwa 130 kDa detektiert werden. Mit 130 kDa ist 29p hier das größte VZV-Protein, es konnte als Fusionsprotein aber nur mit etwa 145 kDa dargestellt werden.



**Abb. 11: Nachweis der Fusionsproteine im Immunblot.** Nach der Auftrennung in der SDS-PAGE wurden die im Rahmen der Virusreplikation exprimierten Proteine mit dem GFP-Antikörper auf der Membran detektiert. Jedes Fusionsprotein zeigte die erwartete Bandengröße. Als Mock-Kontrolle wurden uninfectierte MeWo-Zellen eingesetzt, als Negativkontrolle diente Lysat von WT PAC-infizierten Zellen, als Positivkontrolle (GFP-Ko) wurde eGFP aus HeLa-Zell-Lysat detektiert. Als zelluläre Positivkontrolle wurde  $\beta$ -Aktin nachgewiesen. Invertierte Darstellung der Banden.

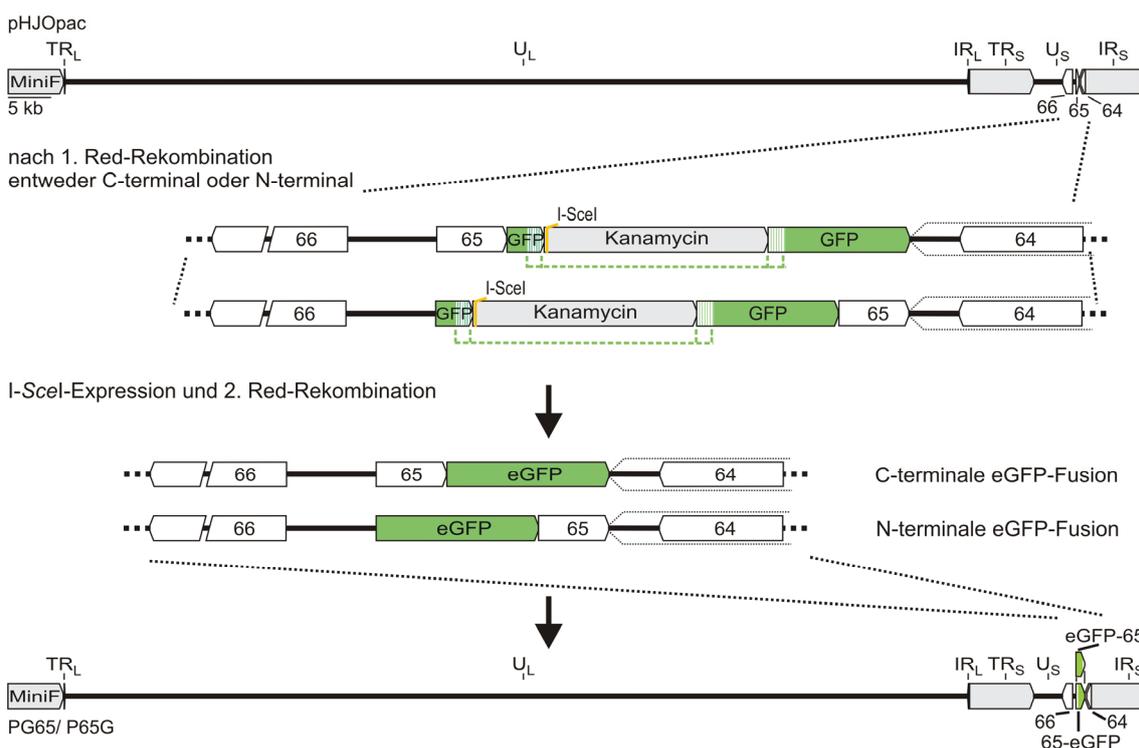
Das Protein 23p zeigt aufgrund der variablen Phosphorylierungen Banden von 26-30 kDa im Immunblot. Mit dem GFP-Antikörper konnte eine Bande bei 55 kDa detektiert werden, was etwa 28 kDa für den 23p-Anteil entspricht. Das Fusionsprotein G4 konnte als besonders stark exprimiertes virales Protein nachgewiesen werden, da die Fusions-

protein-Bande trotz geringer eingesetzter Proteinmenge (erkennbar an der schwachen  $\beta$ -Aktin-Bande) sehr deutlich war.

Von den sieben hergestellten BACs konnten sechs rekombinante Viren in MeWo-Zellen rekonstituiert werden, aus PG29 ließ sich kein Virus herstellen. Nur ein rekombinantes Virus (4G<sub>rVZV</sub>) war in der Replikationsfähigkeit zu stark eingeschränkt und konnte deshalb in Zellkultur nicht stabil passagiert werden. Bei den fünf passagierbaren Viren G4<sub>rVZV</sub>, G21<sub>rVZV</sub>, 21G<sub>rVZV</sub>, 29G<sub>rVZV</sub> und G23<sub>rVZV</sub> konnten sowohl die Fusionsgene als auch die Fusionsproteine nachgewiesen werden.

#### 4.1.3 VZV mit grün markiertem 65p und rot markiertem Kapsidprotein

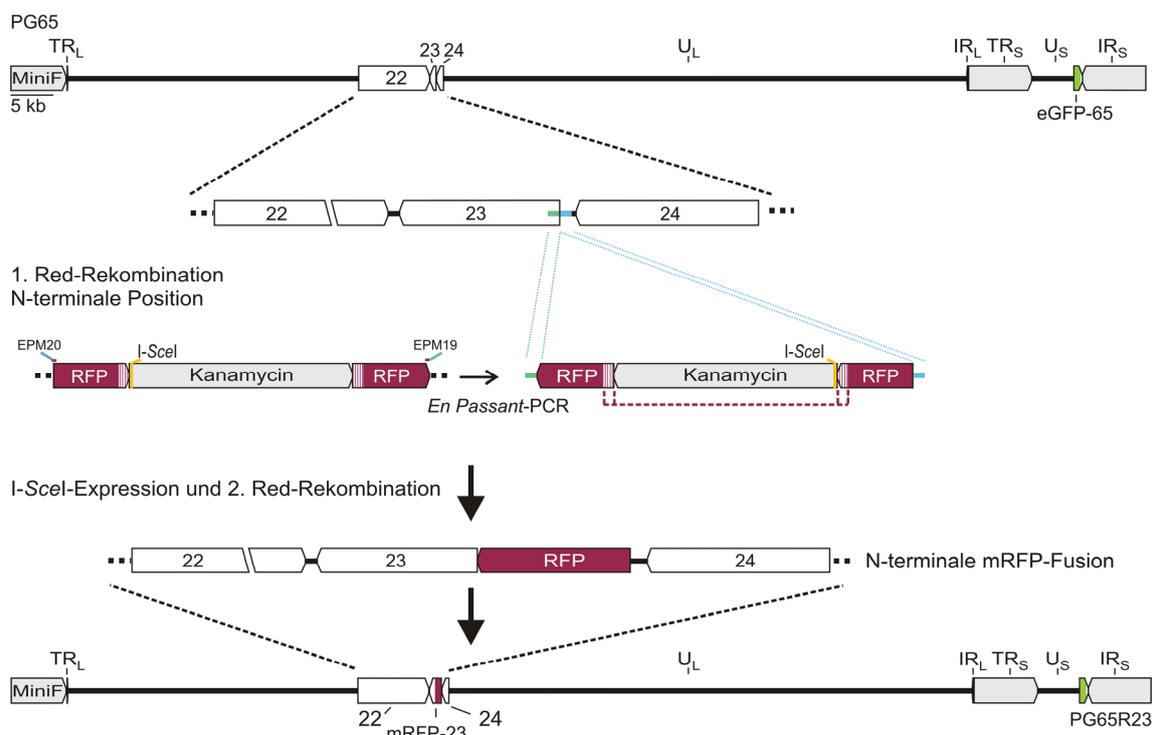
Das Protein 65p ist zu US9 von PRV homolog, das dort für den axonalen Transport der Viruspartikel essentiell ist. Zur Überprüfung, ob 65p bei VZV eine ähnliche Funktion hat, wurde 65p ebenfalls am C- und N-terminalen Ende mit eGFP fusioniert.



**Abb. 12: En passant-Mutagenese zur Herstellung der BACs PG65 und P65G.** Mit dem Plasmid pPE-EGFP-in als Matrize wurden PCR-Produkte hergestellt, die zur entsprechenden Insertionsstelle im BAC pHJOpac homologe, flankierende Sequenzen von 50 bp trugen. Der Leserahmen eGFP liegt im PCR-Produkt durch eine Kanamycin-Kassette unterbrochen vor. Nach der Elektroporation der Bakterien mit diesem PCR-Fragment kam es zur ersten homologen Rekombination und das PCR-Fragment wurde in das virale Genom integriert, entweder N- oder C-terminal an ORF65. Durch Arabinose wurde die Endonuklease I-SceI induziert und es kam zur zweiten homologen Red-Rekombination, in der die Kanamycin-Kassette vollständig entfernt wurde, so dass eGFP entweder C- oder N-terminal fusioniert an ORF65 vorlag.

Die Herstellung der rekombinanten BACs wurde entsprechend zu den vorherigen *En passant*-Mutageneseschritten durchgeführt (Abb. 12).

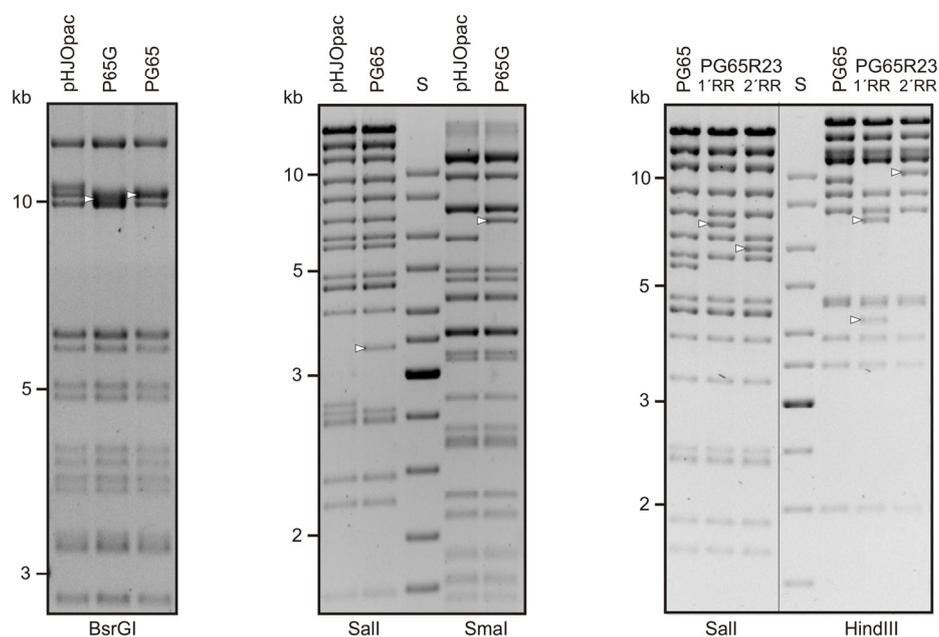
Aus früheren Untersuchungen war bereits bekannt, dass das Kapsidprotein 23p in Axonen infizierter, kultivierter Ratten-Neurone nachgewiesen werden kann. Damit eine mögliche Kolo-kalisation von 65p mit 23p in Neuronen direkt untersucht werden konnte, wurde zusätzlich ein „Zweifarbener“-Virus hergestellt, mit eGFP N-terminal fusioniert an 65p und mRFP am N-Terminus von 23p. Dazu wurde in dem BAC PG65 der Leserahmen ORF23 mit dem mRFP-Leserahmen am N-terminalen Ende fusioniert und das BAC PG65R23 hergestellt (Abb. 13).



**Abb. 13:** *En passant*-Mutagenese zur Herstellung des BACs PG65R23. Analog zu PG23 wurde mRFP N-terminal an ORF23 angefügt, so dass das BAC PG65R23 entstand, mit eGFP fusioniert an ORF65 und mRFP N-terminal fusioniert an ORF23.

Der G65-Hintergrund wurde für das „Zweifarbener“-Virus gewählt, da die Fluoreszenz des N-terminalen eGFP deutlich stärker war als das C-terminale eGFP im 65p-Fusionsprotein. Aufgrund der vorhergesagten Topologie dieses Membranproteins entspricht die G65-Variante der intrazellulären Lokalisation des eGFP-Fusionsanteils. Durch den Verdau mit zwei unterschiedlichen Enzymen wurden die RFLPs der rekombinanten BACs mit dem des WT pHJOpac verglichen (Abb. 14). Da der eGFP-Leserahmen ebenfalls eine *BsrGI*-Schnittstelle enthielt, entstanden bei der Analyse von PG65

und P65G mit dem Restriktionsenzym *BsrGI* Unterschiede im Bandenmuster bei etwa 10 kb und bei ca. 1-1,5 kb. Das Bandenmuster von PG65 wies eine zusätzliche Bande von 1 kb auf, bei P65G entstand eine Bande bei 1,3 kb. Diese Unterschiede bei etwa 1 kb wurden hier aber nicht dargestellt, weil bei niedrigen Bandengrößen unter 2 kb die DNA-Menge zur deutlichen Darstellung zu gering ist. Dafür war bei beiden BACs das 10,5 kb-Fragment kleiner – bei PG65 um 0,3 kb und bei P65G um 0,6 kb –, so dass insgesamt der Einbau von etwa 700 bp nachgewiesen werden konnte. Für einen weiteren Abgleich des RFLP-Musters zum WT pHJOpac wurde das BAC PG65 mit *Sall* und P65G mit *SmaI* verdaut.



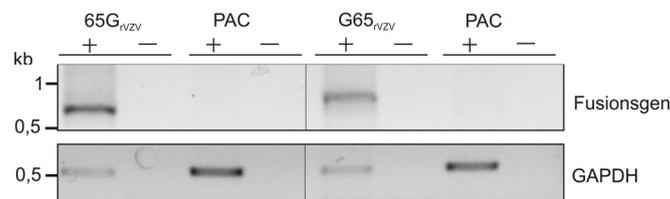
**Abb. 14: RFLP-Analyse der BACs PG65, P65G und PG65R23.** Die isolierte BAC-DNA wurde für die präzise Überprüfung mit zwei verschiedenen Enzymen verdaut und die Banden im Agarosegel aufgetrennt. Das Bandenmuster zeigte die erwarteten Bandenunterschiede der rekombinanten BACs im Vergleich zum WT pHJOpac bzw. im Vergleich zum BAC PG65. Die wesentlichen Auffälligkeiten sind mit weißen Pfeilspitzen markiert. Für das BAC PG65R23 ist der Verdau sowohl nach der ersten, als auch nach der zweiten Rekombination gezeigt. Invertierte Darstellung der Banden. S: Standardmarker, RR: Red-Rekombination.

Beim „Zweifarbent“-BAC PG65R23 wurden die RFLPs nach der ersten und nach der zweiten Rekombination im Vergleich zum Ausgangs-BAC PG65 mit einem *Sall*- und *HindIII*-Verdau dargestellt. Die Bandengröße des entsprechenden Fragments vergrößerte sich durch den Einbau des mRFP-Leserahmens mit der Kanamycin-Resistenzkassette nach der ersten Rekombination um 1,6 kb. Nach der zweiten Rekombination und der Eliminierung der Kanamycin-Kassette war das entsprechende Fragment nur noch um knapp 700 bp vergrößert. Somit wechselte das 5,7 kb große *Sall*-Fragment nach der ersten Rekombination zunächst auf 7,3 kb, und nach der zweiten

Rekombination auf 6,3 kb. Der *Hind*III-Verdau wies nach der ersten Rekombination ein zusätzliches Fragment auf, da in der Kanamycin-Kassette eine weitere *Hind*III-Schnittstelle vorliegt. Das *Hind*III-Fragment von 9,2 kb verkleinerte sich auf 7,1 kb und dafür entstand eine zusätzliche Bande bei 3,7 kb, was insgesamt einer Insertion von etwa 1,6 kb entsprach. Nach der zweiten Rekombination vergrößerte sich die 9,2 kb-Bande auf 9,9 kb. Für alle drei BACs, in denen eGFP an ORF65 fusioniert wurde, konnten die erwarteten Bandenverschiebungen in der RFLP-Analyse nachgewiesen werden.

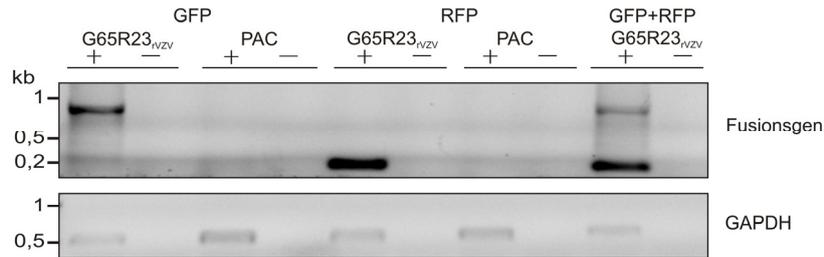
#### 4.1.4 Nachweis der gezielten Veränderungen der ORF65-Virusmutanten

Nach der Transfektion in MeWo-Zellen wurden alle Virusmutanten rekonstituiert und mit G65<sub>IVZV</sub>, 65G<sub>IVZV</sub> und G65R23<sub>IVZV</sub> benannt. Für den Fusionsnachweis auf Transkript-Ebene wurde die aus infizierten Zellen isolierte RNA in cDNA umgeschrieben und die Fusion mit Oligonukleotiden nachgewiesen, die zum einen im zu untersuchenden viralen ORF65, und zum anderen im eGFP-Leserahmen anlagerten (Abb. 15). Als zelluläre Kontrolle diente GAPDH, und zum Ausschluss von Verunreinigung durch genomische oder virale DNA wurden Ansätze ohne Reverse Transkriptase mitgeführt. Das PCR-Fragment für das ORF65-Fusionsgen mit C-terminalem eGFP konnte mit etwa 700 bp amplifiziert werden, während sich für die N-terminale Fusion ein PCR-Fragment von etwa 800 bp ergab. Erwartungsgemäß war eGFP im WT PAC nicht nachweisbar.



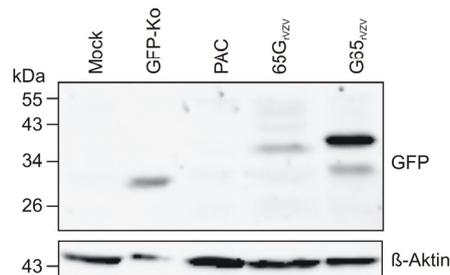
**Abb 15: Nachweis der eGFP-Fusion auf Transkript-Ebene für G65<sub>IVZV</sub> und 65G<sub>IVZV</sub>.** Die RNA wurde aus infizierten MeWo-Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mit Oligonukleotiden, die im ORF65 und im eGFP-Anteil des Fusionsgens banden, wurde die Fusion auf RNA-Ebene nachgewiesen. Für die C-terminale Fusion konnte das erwartete PCR-Fragment mit etwa 700 bp amplifiziert werden, das Fragment für das N-terminale Fusionsgen hatte etwa 800 bp. Die zelluläre Kontrolle GAPDH lief bei etwa 540 bp und erwartungsgemäß blieb der Nachweis auf eGFP im WT PAC negativ. +: mit RT, -: ohne RT. Invertierte Darstellung der Banden.

Für das Virus G65R23<sub>IVZV</sub> wurden die Fusionsgene eGFP-65 und eGFP-23 sowohl einzeln, als auch in einem Ansatz mit gleichzeitig vier Oligonukleotiden amplifiziert. Das Fusionsgen eGFP-65 konnte mit etwa 800 bp nachgewiesen werden und das Fragment mit ca. 200 bp bestätigte die Fusion von mRFP an ORF23 (Abb. 16).



**Abb 16: Nachweis der Fusion von eGFP und mRFP mit viralen Leserahmen auf Transkript-Ebene für G65R23<sub>VZV</sub>.** Die RNA wurde aus infizierten MeWo-Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mit Oligonukleotiden, die entweder in ORF65 und eGFP oder in ORF23 und mRFP anlagerten, konnte die Fusion auf RNA-Ebene nachgewiesen werden. Auch der gleichzeitige Einsatz von vier Oligonukleotiden konnte beide Amplifikate nachweisen. Das Fusionsgen eGFP-65 zeigte eine Bande von 800 bp, das PCR-Fragment für mRFP-23 hatte dagegen nur knapp 200 bp. Erwartungsgemäß blieb der Nachweis auf eGFP im WT PAC negativ. Die zelluläre Kontrolle GAPDH lief bei etwa 540 bp. +: mit RT, -: ohne RT. Invertierte Darstellung der Banden.

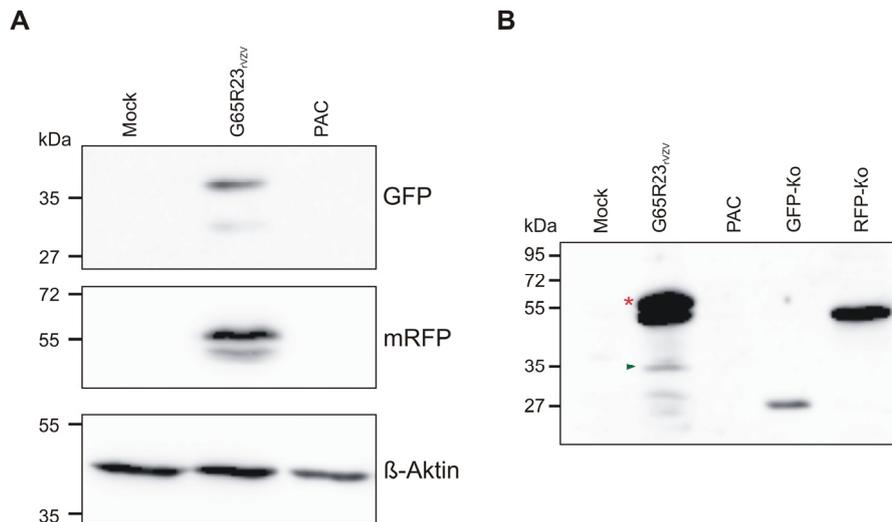
Für den Protein-Nachweis im Immunblot wurden G65<sub>VZV</sub>, 65G<sub>VZV</sub> oder G65R23<sub>VZV</sub> infizierte MeWo-Zellen geerntet. Nach Bestimmung des Proteingehalts im Lysat wurden 100 µg Protein in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Membran übertragen. Das Fusionsprotein 65G konnte im Immunblot mit Anti-GFP bei etwa 35 kDa detektiert werden, was einer 65p-Größe von 11 kDa entsprechen würde, da eGFP alleine 27 kDa aufweist. Allerdings konnten nur geringe Mengen von 65G detektiert werden. Das Fusionsprotein G65 zeigte im Immunblot zwei Banden, eine schwache lief bei knapp unter 34 kDa und eine starke Bande lief bei ca. 40 kDa (Abb. 17).



**Abb 17: Nachweis der eGFP-Fusion auf Proteinebene für G65<sub>VZV</sub> und 65G<sub>VZV</sub>.** Mit GFP-Antikörpern konnten beide Fusionsproteine nachgewiesen werden. Das C-terminal fusionierte Protein 65G war bei etwa 35 kDa nur schwach detektierbar. Das Protein G65 wurde dagegen mit zwei Banden detektiert, eine schwächere bei etwa 30 kDa, und eine starke Bande bei knapp 40 kDa. β-Aktin mit 43 kDa diente als zelluläre Positivkontrolle. In uninfizierten Zellen (Mock) und PAC-infizierten Zellen blieb der eGFP-Nachweis erwartungsgemäß negativ. Als Positivkontrolle (GFP-Ko) wurde eGFP aus Hela-Zell-Lysat detektiert. Invertierte Darstellung der Banden.

Das Lysat der mit G65R23<sub>VZV</sub>-infizierten Zellen wurde mit GFP- und RFP-Antikörpern sowohl einzeln, als auch mit beiden Antikörpern in einem Ansatz, untersucht. Bei dem Einzelnachweis zeigten sich auch hier die für das G65 schon vorher detektierten zwei

Banden, eine schwache konnte bei etwa 30 kDa und eine stärkere Bande bei knapp 40 kDa detektiert werden. Das R23-Fusionsprotein ließ sich ebenfalls mit zwei Banden bei etwas über 55 kDa und knapp unter 55 kDa, also bei etwa 53-57 kDa, detektieren. Das würde der Größe von 26-30 kDa bei unterschiedlichen Phosphorylierungsformen von 23p entsprechen (Abb. 18A).



**Abb. 18: Nachweis der eGFP- und mRFP-Fusion auf Proteinebene für G65R23<sub>vzv</sub>.** **A.** Einzelnachweis der Fusionsproteine mit GFP- und RFP-Antikörpern. Das Protein G65 wurde bei etwa 40 kDa und mit schwacher Bande auch bei etwa 30 kDa detektiert. Das Fusionsprotein R23 zeigte Banden bei 53-57 kDa. Als zelluläre Positivkontrolle diente β-Aktin (43 kDa). **B.** Auch bei gleichzeitigem Einsatz der GFP- und RFP-Antikörpern konnten beide Proteine nachgewiesen werden. Der rote Stern markiert das Fusionsprotein R23 in seinen unterschiedlichen Phosphorylierungsformen, der grüne Pfeilkopf markiert das Fusionsprotein G65. Als Positivkontrollen wurde eGFP aus Hela-Zell-Lysat (GFP-Ko) und ein ppUL35a-mRFP Fusionsprotein (RFP-Ko) nachgewiesen. Invertierte Darstellung der Banden.

Auch im Doppelansatz war diese Doppelbande für das Fusionsprotein R23 detektierbar. Die im Einzelansatz detektierte 40 kDa-Bande für G65 lief im Doppelansatz bei etwa 35 kDa. Außerdem waren zwei zusätzliche Banden nachweisbar, zum einen eine Bande bei etwa 30 kDa, die der zuvor im Einzelnachweis bei etwas unter 34 kDa detektierten Bande entsprechen könnte. Zum anderen konnte eine weitere, wahrscheinlich unspezifische Bande bei knapp unter 27 kDa detektiert werden. Die GFP-Kontrolle ergab wie erwartet eine Bande bei 27 kDa. Die RFP-Kontrolle ist ein Fusionsprotein aus ppUL35a des Cytomegalovirus mit 22 kDa und mRFP mit 27 kDa und konnte erwartungsgemäß bei ca. 50 kDa detektiert werden (Abb.18B). Somit konnten für alle drei rekombinanten Viren, die aus den BACs PG65, P65G und PG65R23 in MeWo-Zellen rekonstituiert wurden, die Fusionsgene und Fusionsproteine dargestellt werden.

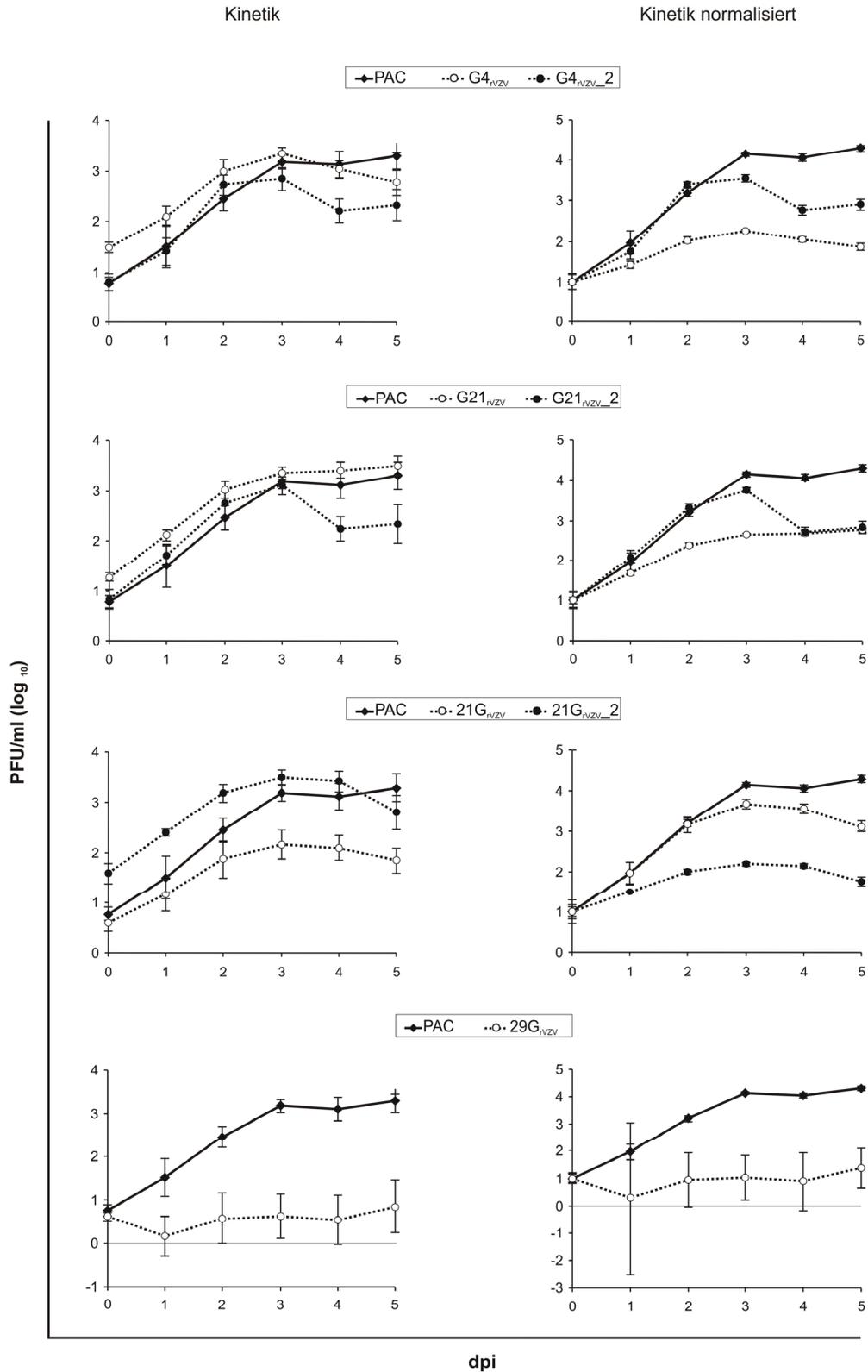
## 4.2 Replikation der rekombinanten Viren

### 4.2.1 Replikationsverhalten

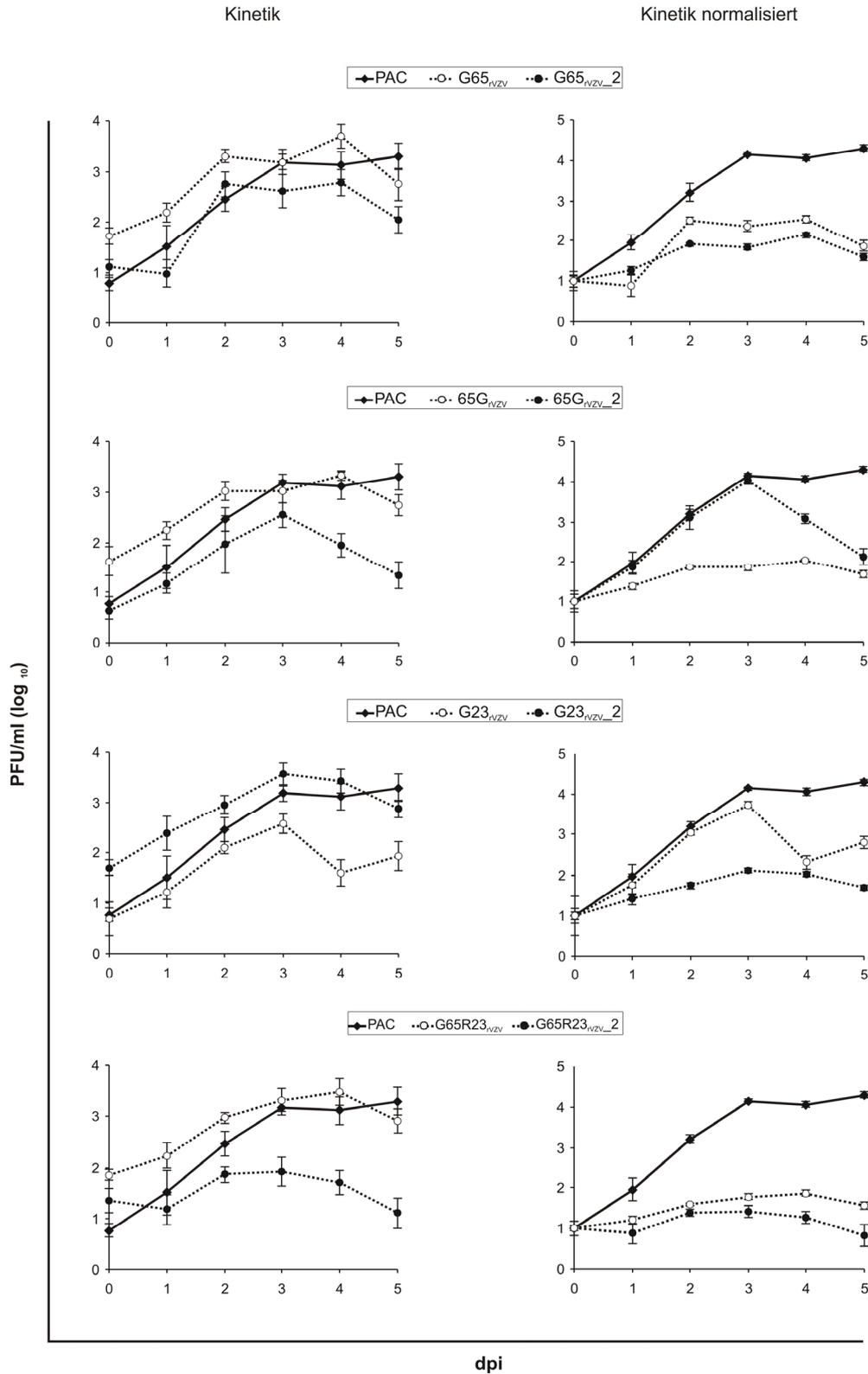
Eine N- oder C-terminale eGFP-Fusion eines viralen Leserahmens kann das Replikationsverhalten der entsprechenden Virusmutante beeinflussen. Zum Vergleich der Replikationsgeschwindigkeit der Mutanten mit dem WT wurden MeWo-Zellen im 6er-Plattenformat infiziert. Von Tag eins bis fünf wurden Zellen aus je einer Vertiefung geerntet und dann in Quadruplikaten titriert. Der Mittelwert für den Titer in PFU/ml wurde aus zwölf Werten von drei in Quadruplikaten titrierten Röhrchen berechnet, ebenso die Standardabweichungen. Die Anzahl der PFU/ml wurde logarithmisch zur Basis 10 im Graphen dargestellt. Zwei unabhängig voneinander durchgeführte Replikationskinetiken wurden in einem Graphen dargestellt. Da es bei dem hoch zellassoziiert replizierenden VZV sehr schwierig war, die definierte Ausgangsmenge von 50 infektiösen Einheiten an Tag 0 einzusetzen, wurden die Werte für eine bessere Übersicht zusätzlich auf den Wert 1 normalisiert dargestellt.

Allgemein war auffällig, dass sich die Replikationskurven verschiedener Virusmutanten ähnelten, z.B. G4<sub>rVZV\_2</sub> und G21<sub>rVZV\_2</sub> (Abb. 19). Aus den Replikationskurven war ohne Normalisierung meist nur schwer zu erkennen, ob ein rekombinantes Virus wirklich eine zum WT PAC unterschiedliche Replikation zeigte. Aber die Kinetiken nach der Normalisierung zeigten, dass zwar alle Viren im Vergleich zum WT PAC eine schwächere Replikation aufwiesen, dass aber außer bei 29G<sub>rVZV</sub> kein ausgeprägtes Replikationsdefizit vorlag. Die Replikation der Mutante 29G<sub>rVZV</sub> war so stark eingeschränkt, dass das Virus zwar noch in Zellkultur passagiert werden konnte, aber der für die Replikationskinetiken benötigte Titer nicht erreichbar war. Daher konnte für diese Mutante nur eine einzige Replikationskurve erstellt werden. Allerdings wurde hier zur Berechnung der Wert 1 statt Null eingesetzt, wenn keine CPEs bei der Titration gezählt werden konnten. Nach mehreren Passagen zeigte dieses Virus ein verbessertes Replikationsverhalten und die weitere Passagierung durch Kokultivierung mit infizierten Zellen wurde effektiver und schneller.

Die CPEs zeigten dagegen einen Mix aus grün fluoreszierenden Zellen und Zellen ohne Fluoreszenz. Nach Sequenzierung des PCR-amplifizierten Fusionsgens stellte sich heraus, dass diese Viren eine Deletion eines einzigen Nukleotids vier Basen vor dem eGFP-Leserahmen aufwiesen. So ergab sich eine Leserasterverschiebung, die direkt vor dem eGFP-Leserahmen zu einem Stoppcodon führte. Da das eGFP nicht weiter exprimiert werden konnte, war das Virus 29G<sub>rVZV</sub> in seiner Replikation nicht mehr eingeschränkt. Für die weiteren Versuche wurden nur Viren in früher Passage, mit langsamer Replikation und grün fluoreszierenden CPEs eingesetzt.



**Abb. 19: Kinetik der Viren mit Fusionsproteinen latent exprimierter Gene.** Die Replikationsgeschwindigkeit der Mutanten, in denen die latent exprimierten ORFs mit eGFP fusioniert waren, wurde im Vergleich zu der Replikationsgeschwindigkeit von WT PAC graphisch dargestellt. Die PFU/ml sind logarithmisch auf der Y-Achse aufgetragen, auf der X-Achse sind die Tage nach Infektion (dpi) dargestellt. Für 29G<sub>NZV</sub> wurden für nicht vorhandene CPEs der Wert 1 eingesetzt, damit sich die Kinetik graphisch darstellen ließ.



**Abb. 20: Kinetik der rekombinanten Viren mit fusionierten Kapsidprotein und „neuronalen Leitprotein“.** Die Replikationsgeschwindigkeit der Mutanten, in denen ORF65 und ORF23 mit eGFP oder mRFP fusioniert waren, wurde im Vergleich zur Replikationskinetik des WT PAC graphisch dargestellt. Die PFU/ml sind logarithmisch auf der Y-Achse aufgetragen, auf der X-Achse sind die Tage nach Infektion (dpi) dargestellt.

Die Viren G21<sub>rVZV</sub> und 21G<sub>rVZV</sub> zeigten im Vergleich zum WT PAC eine ähnliche, leicht reduzierte Replikationsgeschwindigkeit. Die Fusion mit eGFP, aber nicht die Position der Fusion beeinflusste also die Replikationsgeschwindigkeit. Die Replikation von G4<sub>rVZV</sub> war ähnlich eingeschränkt wie die von G21<sub>rVZV</sub> und 21G<sub>rVZV</sub>. Es war zu beachten, dass fast alle Viren entweder von Beginn an eine schwächere Replikation zeigten, oder zunächst ähnlich dem WT replizierten und dann die Replikationsgeschwindigkeit nach drei Tagen deutlich abnahm.

Dieser Effekt konnte auch bei G23<sub>rVZV</sub> und 65G<sub>rVZV</sub> in der normalisierten Kinetik beobachtet werden (Abb. 20). Auch wenn sich in einer Kurve initial kein Unterschied zum PAC zeigte, waren in beiden Experimenten im Vergleich zum WT 5 dpi deutlich weniger PFU nachweisbar. Insgesamt war also auch bei diesen Viren die Replikationsgeschwindigkeit eingeschränkt. Bei G65<sub>rVZV</sub> war dieser verzögerte Effekt nicht zu beobachten und beide Replikationskurven zeigten im Vergleich zum WT PAC eine abgeschwächte Replikationsgeschwindigkeit. Auch das „Zweifarbigen“-Virus G65R23<sub>rVZV</sub> hatte gegenüber dem WT eine deutlich verminderte Replikationsgeschwindigkeit. Bei der mikroskopischen Beobachtung dieser Zellkulturen fiel auf, dass G65R23<sub>rVZV</sub>-infizierte Zellen schneller abstarben und sich das Virus sehr langsam ausbreitete. Eine weitere Infektion durch Kokultivierung mit infizierten Zellen war nur etwa 3-5 dpi möglich. Zum Zeitpunkt 7 dpi waren kaum noch lebende, infizierte Zellen übrig, so dass die Infektiosität zu diesem Zeitpunkt stark abnahm.

Zwar zeigten alle rekombinanten Viren und dabei besonders das Virus G65R23<sub>rVZV</sub> im Vergleich zum WT eine reduzierte Replikationsgeschwindigkeit, aber nur das Virus 29G<sub>rVZV</sub> war so eingeschränkt in seiner Replikation, dass es schwer zu kultivieren war.

#### 4.2.2 Cytopathische Veränderungen

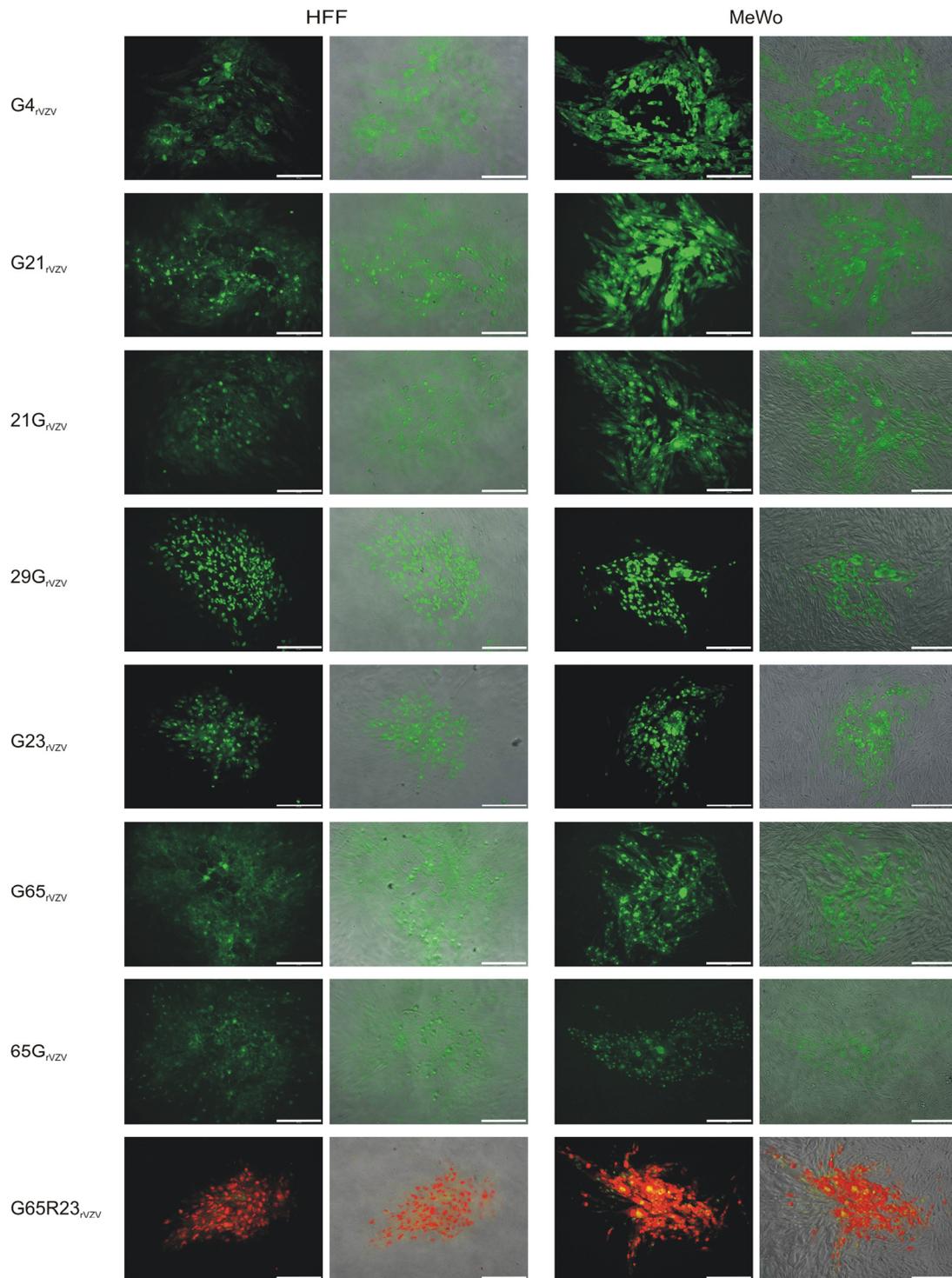
Für den Vergleich der Fluoreszenzmuster und der Fluoreszenzstärke der unterschiedlichen Virusmutanten wurden primäre Fibroblasten und MeWo-Zellen auf Deckgläschen in 24er-Platten ausgesät und einen Tag später infiziert. Nach 3 dpi wurden die Zellen fixiert, gewaschen und auf Objektträgern eingedeckelt. Für die Darstellung der Fluoreszenzmuster der CPEs wurden die Aufnahmen für jede Mutante unter optimalen Belichtungseinstellungen des Fluoreszenzmikroskops durchgeführt. Für unterschiedliche Virusmutanten zeigten sich unterschiedliche Fluoreszenzmuster in Abhängigkeit von der Lokalisation des eGFP-Fusionsanteils des Proteins (Abb. 21).

Die Proteine 29G und G23 zeigten eine punktförmige, eher nukleäre CPE-Morphologie, die in Fibroblasten wie in MeWo-Zellen deutlich erkennbar war. Dagegen war die

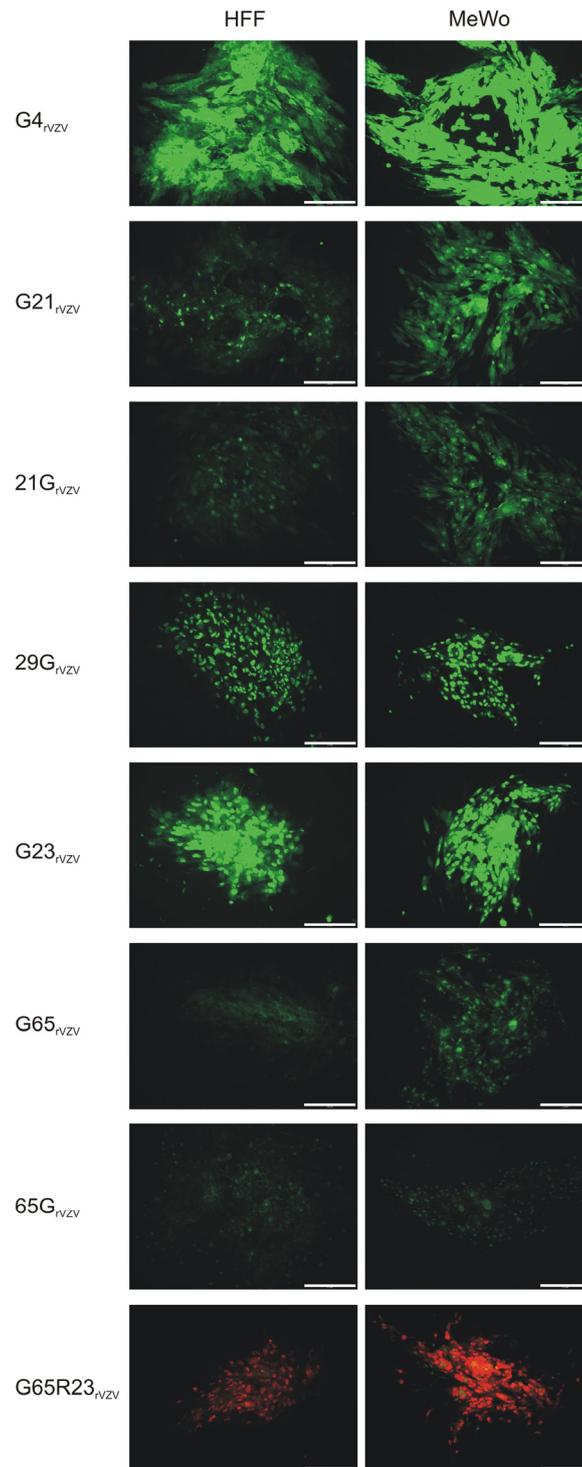
Fluoreszenz von G4<sub>rVZV</sub>, G21<sub>rVZV</sub> und 21G<sub>rVZV</sub> in den gesamten Zellen des CPEs zu sehen, was auf eine Lokalisation sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern schließen ließ. Dabei waren in Fibroblasten neben starken, punktförmigen Fluoreszenzmustern auch schwache Fluoreszenzsignale sichtbar, die diffus über die gesamten Zellen des CPE verteilt waren. Diese Abstufung war in MeWo-Zellen nicht oder kaum zu beobachten. In CPEs von G65<sub>rVZV</sub>- und 65G<sub>rVZV</sub>-infizierten Zellen zeigte das Fluoreszenzmuster in MeWo-Zellen eine eher punktförmige Morphologie. In Fibroblasten waren die Signale weniger punktförmig, eher unstrukturiert und diffus mit wenigen starken Fluoreszenzpositionen. Die CPE-Morphologie von G65R23<sub>rVZV</sub>-infizierten Zellen zeigte ein ähnliches Bild wie CPEs G23<sub>rVZV</sub>-infizierter Zellen. Das lag daran, dass die sehr schwache grüne Fluoreszenz von G65 durch die starke rote Fluoreszenz von R23 überlagert wurde. Somit stellte sich ein ähnliches Muster dar wie bei CPEs von G23<sub>rVZV</sub>-infizierten Zellen. Die genaue Lokalisation der Fusionsproteine konnte aber erst in der konfokalen Mikroskopie ermittelt werden.

Zum Vergleich der Fluoreszenzstärke der einzelnen N- oder C-terminalen Fusionsproteine wurden alle CPEs unter den gleichen Mikroskopeinstellungen untersucht (Abb. 22). Das Fusionsprotein G4 zeigte die stärksten Fluoreszenzsignale. Aber auch die Proteine 29G und G23 hatten starke Fluoreszenzsignale, sowohl in primären Fibroblasten als auch in MeWo-Zellen. Dabei war die Signalstärke von G23 noch etwas stärker als die des Fusionsproteins 29G. Die ORF21-Fusionsproteine fluoreszierten mit schwacher Intensität, wobei sich die C- und N-terminalen Varianten kaum unterschieden. Die N-terminale Fusion (G21) zeigte geringfügig stärkere grüne Signale als 21G. Die Derivate des 65p hatten die schwächsten Fluoreszenzsignale. Dabei erzeugte die Fusion am C-Terminus deutlich schwächere Signale als die N-terminale Fusion. Dieser Unterschied ließ sich in den Aufnahmen allerdings nicht gut darstellen, da sich die schwache Fluoreszenz kaum vom Hintergrund unterscheiden ließ.

Bei dem Virus G65R23<sub>rVZV</sub> wurde die schwache G65-Fluoreszenz durch die starken R23-Signale überdeckt, so dass weitgehend nur rote Fluoreszenzsignale sichtbar wurden. Die G65-Signale waren nur durch wenige punktförmige Gelbfärbungen zu erkennen. Die Intensitäten von R23 waren mit denjenigen von G23 vergleichbar. Dieser Unterschied in der Fluoreszenzstärke von G65 und R23 erklärt auch die im Immunblot detektierte, schwache Bande von G65 im Vergleich zu den detektierten Banden von R23 (Abb. 18).



**Abb. 21: CPE-Morphologie in Fibroblasten (HFF) und MeWo-Zellen.** Die Aufnahmen für jede Mutante wurden mit optimaler Mikroskopeinstellung vorgenommen. Die Bilder zeigen Aufnahmen mit GFP-Filter und daneben GFP mit Durchlicht. Die Proteine G23 bzw. R23 und 29G hatten ein punktförmiges Muster, das auf eine nukleäre Lokalisation hindeutete. Die anderen Proteine zeigten sowohl punktförmige Muster zusammen mit diffusen Fluoreszenzsignalen. Der Größenstandard zeigt 200  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 22: Vergleich der Fluoreszenzstärken unterschiedlicher Mutanten in Fibroblasten (HFF) und MeWo-Zellen.** Die Aufnahmen wurden für alle Mutanten in derselben Mikroskopeinstellung vorgenommen. Die Proteine G4, G23 und 29G zeigten besonders starke Fluoreszenzsignale, während die Fluoreszenz der Fusionsproteine von ORF21 und ORF65 schwach war. Bei G65R23<sub>NVZV</sub> sind die GFP-Signale des G65 nur als gelbe Punkte zu erkennen, da die starke Fluoreszenz des R23 die G65-Signale überlagerte. Der Größenstandard zeigt 200  $\mu\text{m}$ .

Zusammenfassend zeigten also G4, aber auch 29G und G23 starke Fluoreszenzsignale. Alle anderen Fusionsproteine hatten eine relativ schwache Fluoreszenzintensität. Bei dem Doppelfusions-Virus G65R23<sub>rVZV</sub> waren die Fluoreszenzsignale von G65 und R23 entsprechend zu G65 in G65<sub>rVZV</sub>-infizierten Zellen und G23 in G23<sub>rVZV</sub>-infizierten Zellen.

Unterschiede ergaben sich nicht nur in Abhängigkeit des fusionierten viralen Leserahmens, sondern auch in Abhängigkeit der Position des fusionierten Proteins eGFP bzw mRFP. Bei ORF4 war die Position des eGFP nicht von Bedeutung. Sowohl in N- als auch in C-terminaler Position zeigten die Proteine starke Signale. Obwohl 4G<sub>rVZV</sub> zu langsam replizierte und nicht stabil in Zellkultur gehalten werden konnte, waren Fluoreszenzaufnahmen in frühen Passagen noch möglich (Daten nicht gezeigt), die den Aufnahmen mit G4<sub>rVZV</sub> stark ähnelten. Bei den Viren mit markiertem ORF21 waren die Signale leicht stärker, wenn eGFP in N-terminaler Position fusioniert war (G21). Auch im Fall von G65<sub>rVZV</sub> und 65G<sub>rVZV</sub> zeigte eine Fusion am N-Terminus stärkere Fluoreszenzsignale als die C-terminale Variante.

#### **4.2.3 Lokalisation der Fusionsproteine in permissiven Zellen**

Zur genaueren Bestimmung der Lokalisation der Fusionsproteine wurden Aufnahmen am konfokalen Laser-Scan-Mikroskop durchgeführt. Dafür wurden auf Deckgläschen ausgesäte und infizierte MeWo-Zellen und Fibroblasten 3 dpi fixiert, gewaschen und die Zellkerne mit DAPI angefärbt. Die Aufnahmen erfolgten mit einem 40er Öl-Objektiv.

Das Fusionsprotein G4 lokalisierte hauptsächlich im Cytoplasma mit starker Fluoreszenzintensität (Abb. 23). Ein schwaches GFP-Signal konnte auch im Zellkern beobachtet werden, was in den Fibroblasten gut zu erkennen war.

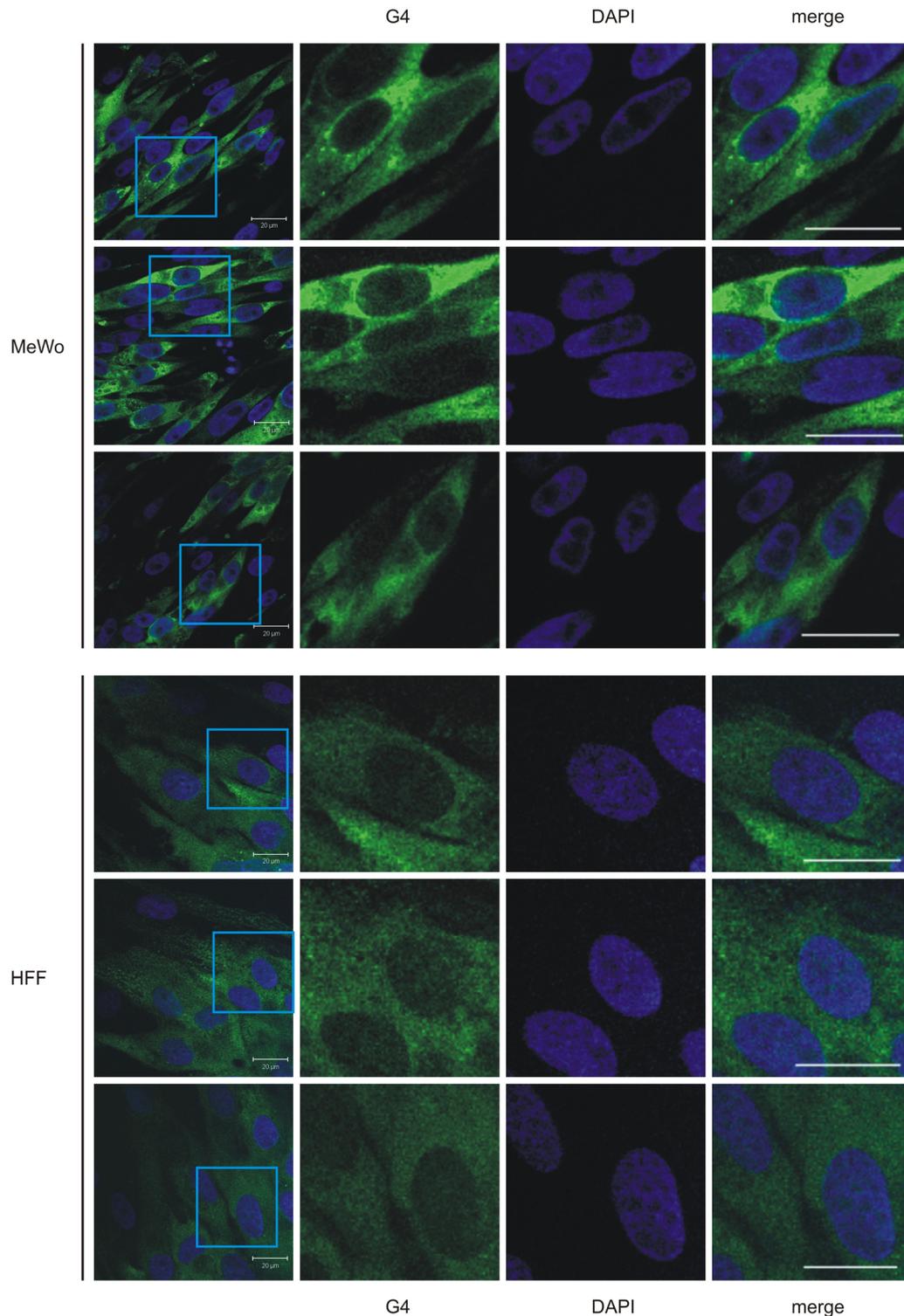
Das Protein 21p konnte sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern nachgewiesen werden. Die Verteilung war mit schwachen Fluoreszenzsignalen diffus über die ganze Zelle, nur punktuell waren stärkere Signale bei G21 um den Nukleus zu detektieren (Abb. 24). Zwischen Cytoplasma und Nukleus war kein Unterschied in der Fluoreszenzstärke auszumachen. Auch 21G zeigte stärkere Signale in der Zellkernregion (Abb. 25). Außerdem konnte 21G in Fibroblasten einmal deutlich im Nukleus detektiert werden (Abb. 25, HFF, dritte Bildreihe). Die N-terminale Fusion (G21) zeigte, wie schon vorher beobachtet, leicht stärkere Fluoreszenzsignale.

Das Protein 29G konnte ausschließlich im Zellkern detektiert werden (Abb. 26). Dabei zeigte sich eine morphologische Vielfalt punktförmiger Signale, von sehr klein bis relativ groß, oder manchmal auch eine globuläre Verteilung (Reichert et al., 2009), die

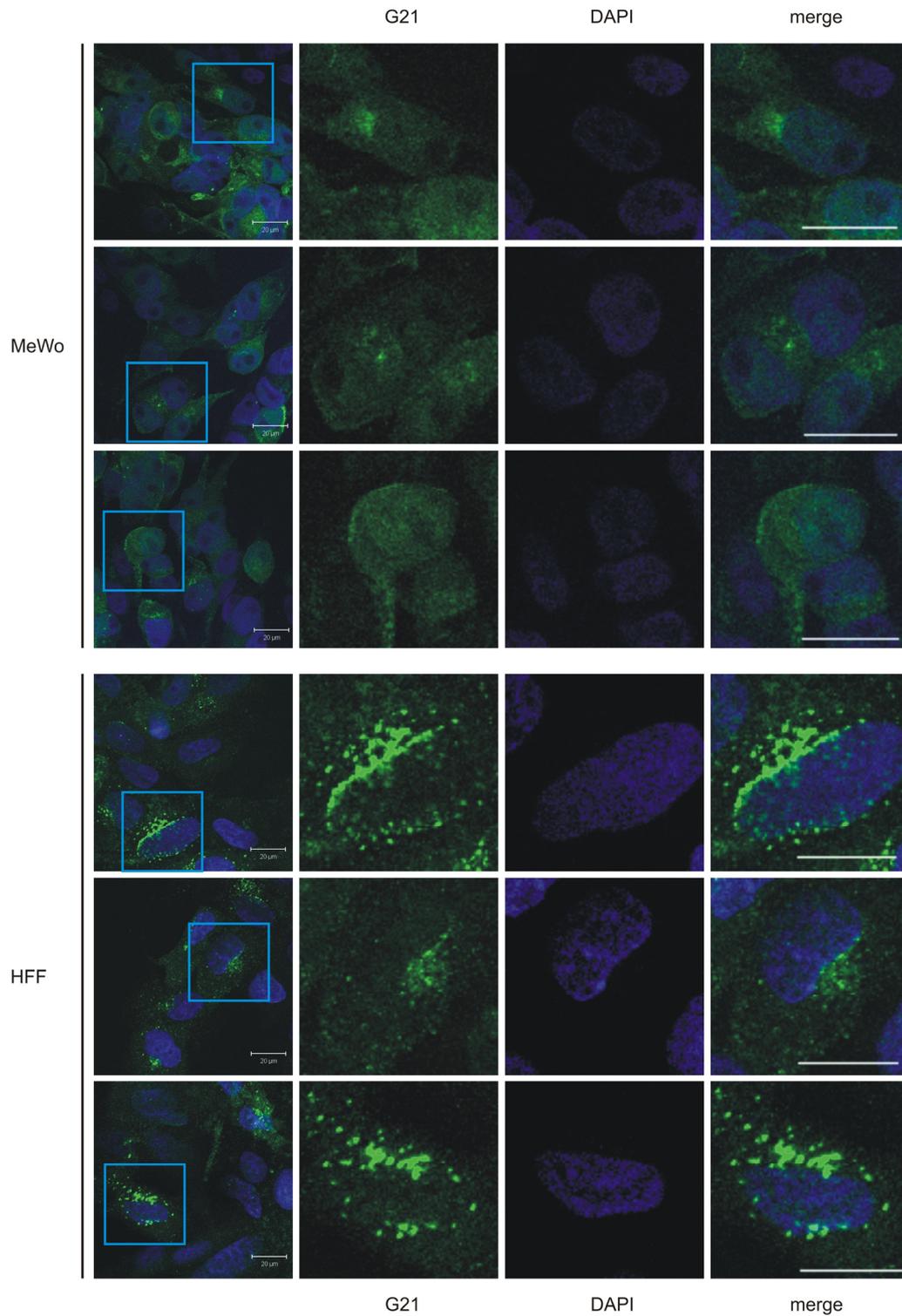
bisweilen lokal im Zellkern oder über den ganzen Zellkern verteilt waren. Diese lokalen Verteilungen zeigten immer starke Signale, während die restlichen, über den Nukleus verteilten Fluoreszenzsignale auch schwächer sein konnten. Wie 29G lokalisierte auch G23 (Abb. 27) hauptsächlich im Nukleus. Das Protein 23p konnte aber auch mit schwacher Fluoreszenzintensität im Cytoplasma gezeigt werden, was seiner Rolle bei der Morphogenese entspricht.

Das Protein 65p wurde im TGN und in perinukleären Membranstrukturen nachgewiesen (Abb. 28 und 29). Allerdings war die Fluoreszenz bei beiden Fusionsproteinen sehr schwach und schwer vom Hintergrundrauschen zu trennen. Zur besseren Darstellung der Lokalisation der 65p-Fusionsproteine wurde die Lochblende weiter geöffnet, damit die Signalstärke durch mehr Licht aus den unscharfen Regionen verstärkt werden konnte, wodurch aber der konfokale Charakter dieser Aufnahmen beeinträchtigt wurde. Die Fusion am N-Terminus zeigte auch hier leicht stärkere Fluoreszenzsignale als die C-terminale Fusionsvariante.

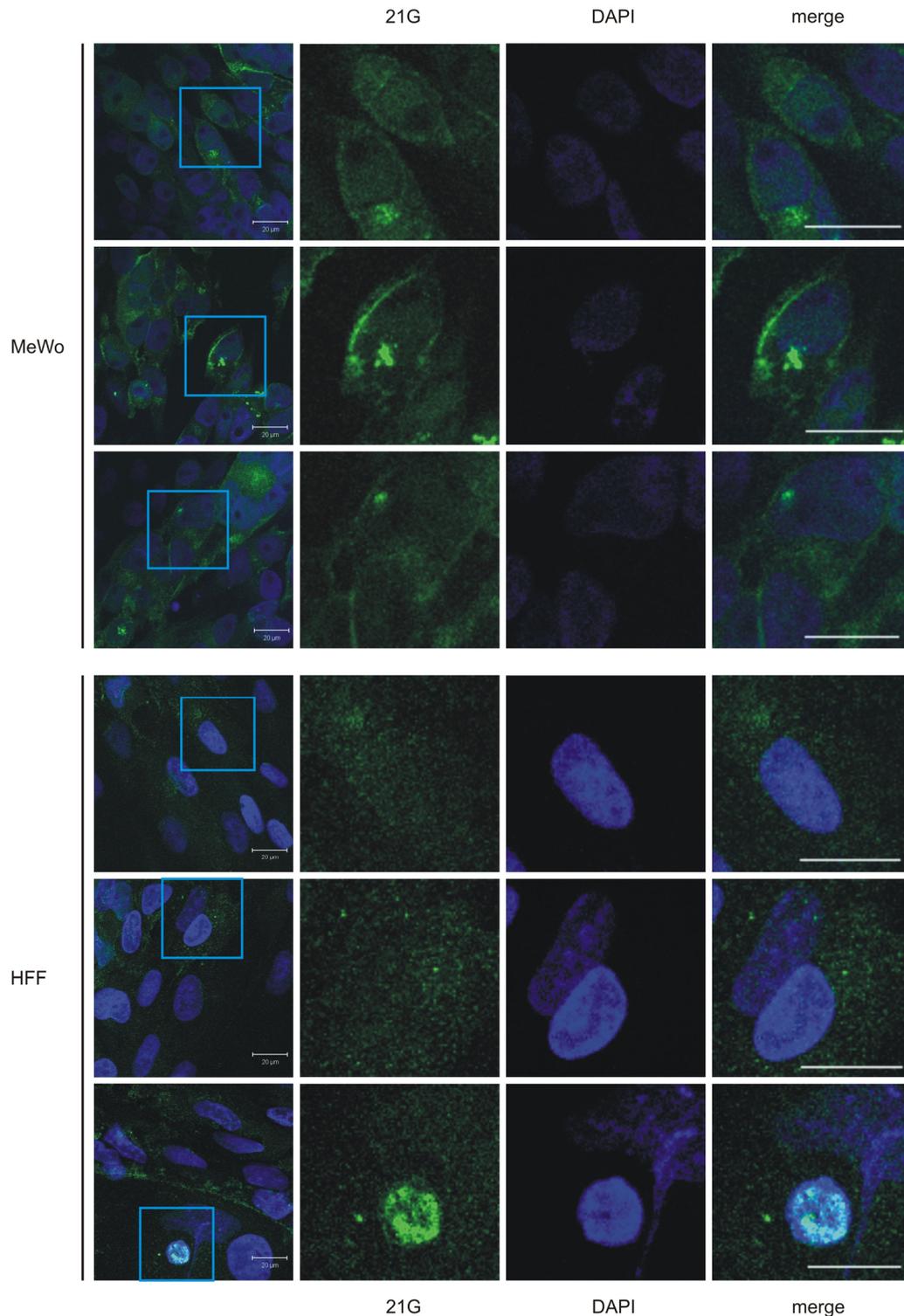
Wie bei den vorherigen Einzeluntersuchungen lokalisierten bei Infektion der Zellen mit dem Virus G65R23<sub>rVZV</sub> das Fusionsprotein G65 mit schwächeren Fluoreszenzsignalen im TGN und in perinukleären Membranstrukturen und das Protein R23 mit stärkerer Intensität im Zellkern (Abb. 30). In einigen Fibroblasten war R23 auch mit schwacher Intensität im Cytoplasma zu erkennen (Abb. 30, HFF-Zellen, erste Bildreihe). Die G65-Fluoreszenzsignale wurden nachträglich mit der Software optimiert, wodurch eine verbesserte morphologische Darstellung erzielt werden konnte. Zum Nachweis der TGN-Lokalisation von 65p wurde das TGN mit dem Antikörper Golgin 97 in G65<sub>rVZV</sub>- bzw. 65G<sub>rVZV</sub>-infizierten Zellen angefärbt. Die Aufnahmen bestätigten für beide Fusionsproteine, dass 65p im TGN lokalisierte. Außerdem war G65 in MeWo-Zellen erneut in Membranstrukturen, die nicht nur perinukleär waren, zu detektieren (Abb. 31). Die Lokalisationsorte aller hier dargestellten Fusionsproteine konnten somit detailliert beschrieben werden.



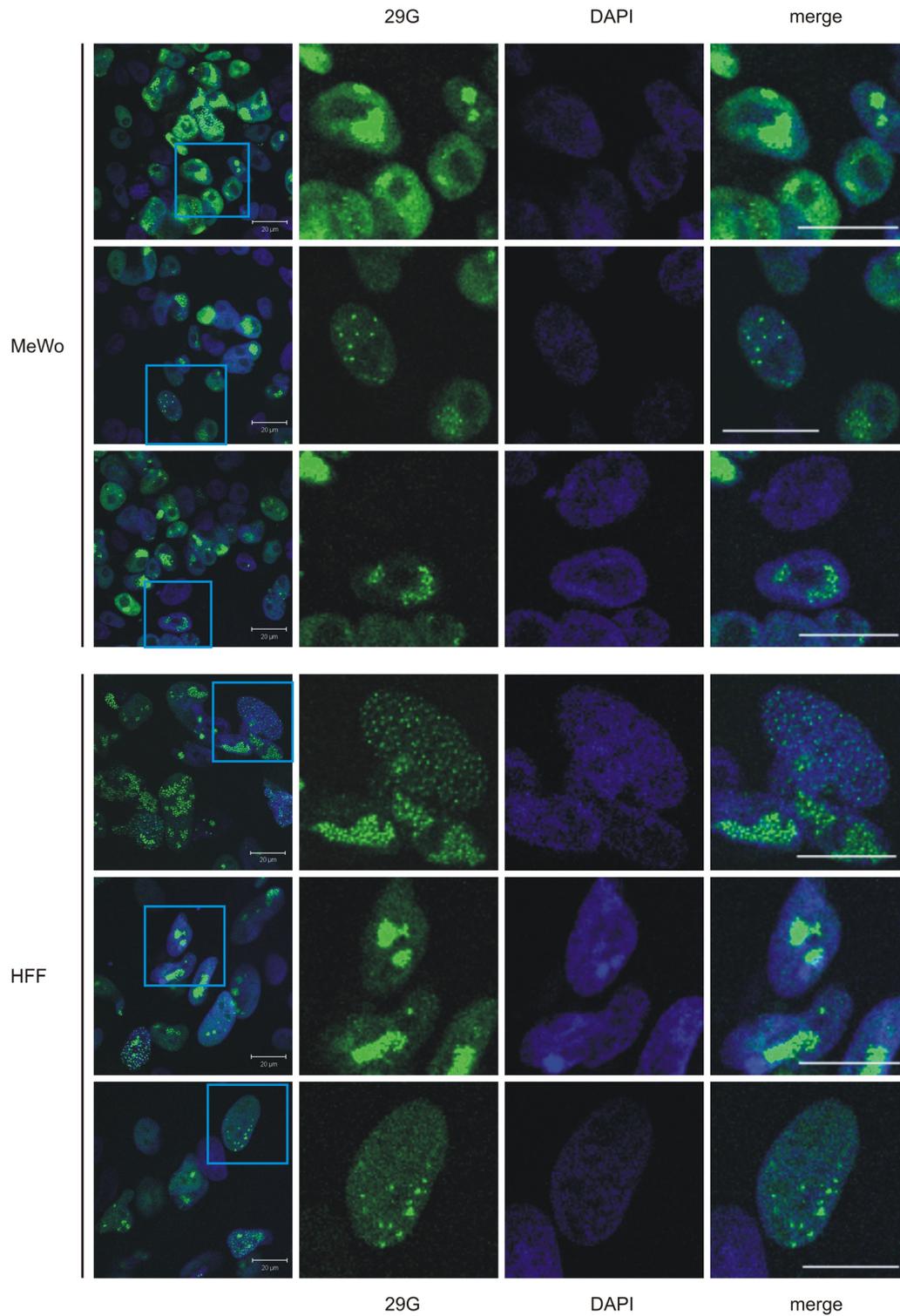
**Abb. 23: Lokalisation von G4 in MeWo-Zellen und Fibroblasten.** Die linke konfokale Bildreihe zeigt aufgenommene CPEs mit G4<sub>rVZV</sub> in MeWo- und HFF-Zellen 3 dpi. Die rechts folgenden Bilder zeigen den Ausschnitt der blauen Markierung mit GFP (G4), DAPI und als Überlagerung (merge). Gut zu erkennen war, dass das Protein G4 hauptsächlich im Cytoplasma lokalisierte und nur mit schwacher Fluoreszenz im Zellkern detektiert werden konnte. Der Größenstandard zeigt 20 μm für die Bilder G4, DAPI und merge.



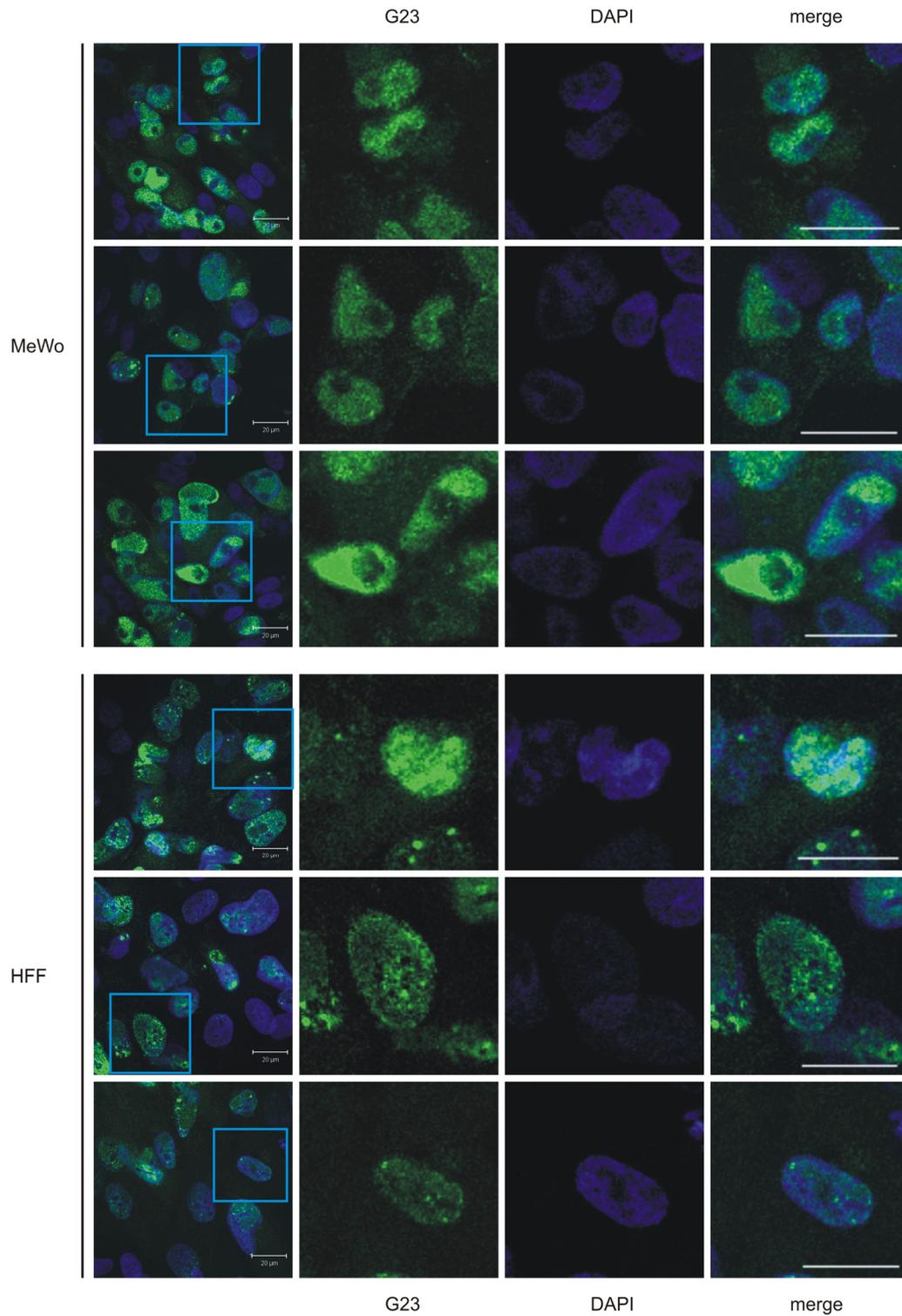
**Abb. 24: Lokalisation von G21 in MeWo-Zellen und Fibroblasten.** Die linke konfokale Bildreihe zeigt aufgenommene CPEs von G21<sub>VZV</sub> in MeWo- und HFF-Zellen 3 dpi. Die rechts folgenden Bilder zeigen den Ausschnitt der blauen Markierung für GFP (G21), DAPI und als Überlagerung (merge). G21 lokalisierte sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern, oft mit einer diffusen Verteilung. Stärkere Fluoreszenzsignale gab es nur perinukleär. Der Größenstandard zeigt 20 µm für die Bilder G21, DAPI und merge.



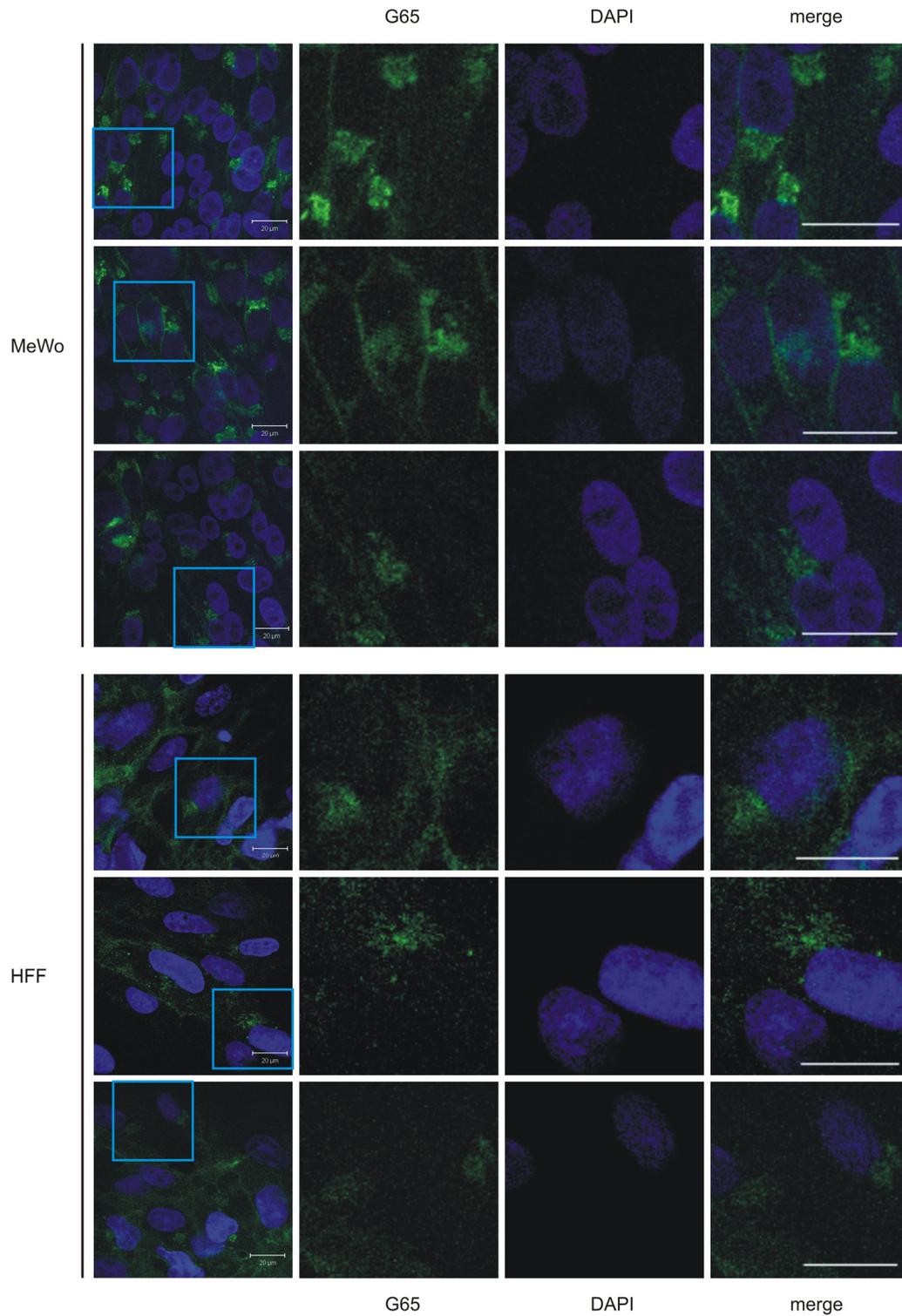
**Abb. 25: Lokalisation von 21G in MeWo-Zellen und Fibroblasten.** Die linke konfokale Bildreihe zeigt aufgenommene CPEs von 21G<sub>VZV</sub> in MeWo- und HFF-Zellen 3 dpi. Die rechts folgenden Bilder zeigen den Ausschnitt der blauen Markierung für GFP (21G), DAPI und als Überlagerung (merge). Die Lokalisation des 21G unterschied sich nicht im Vergleich zu dem Virus mit der N-terminalen Fusion. Das 21G lokalisierte sowohl im Cytoplasma als auch im Nukleus und konnte auch perinukleär gezeigt werden. In infizierten Fibroblasten konnte 21p mit starken Signalen im Zellkern detektiert werden (dritte Bildreihe). Der Größenstandard zeigt 20 µm für die Bilder 21G, DAPI und merge.



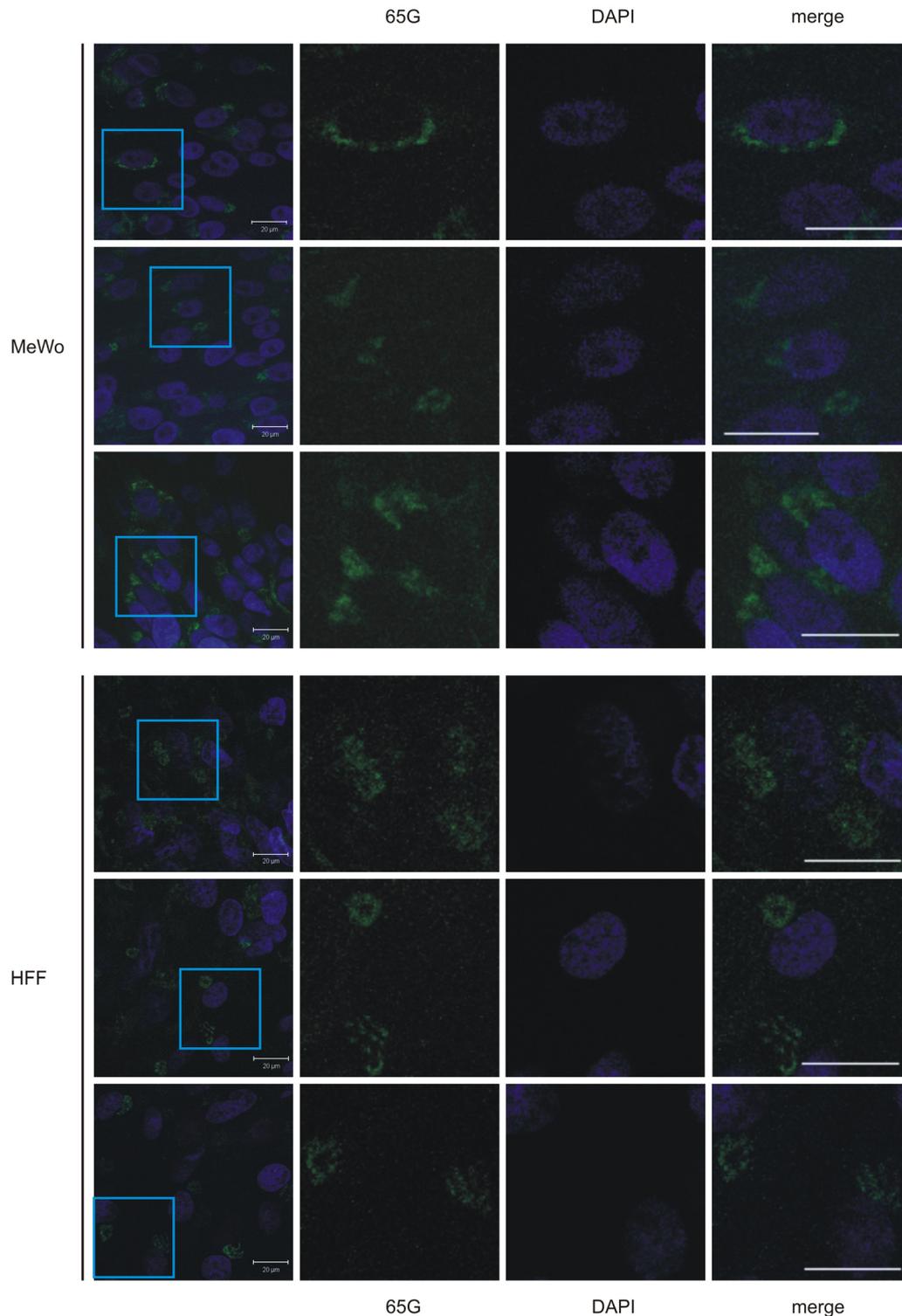
**Abb. 26: Lokalisation von 29G in MeWo-Zellen und Fibroblasten.** Die linke konfokale Bildreihe zeigt aufgenommene CPEs von 29G<sub>IVZV</sub> in MeWo- und HFF-Zellen 3 dpi. Die rechts folgenden Bilder zeigen den Ausschnitt der blauen Markierung für GFP (29G), DAPI und als Überlagerung (merge). Das Protein 29G lokalisierte nur im Zellkern, teils punktförmig, teils globulär. Der Größenstandard zeigt 20  $\mu\text{m}$  für die Bilder G29, DAPI und merge.



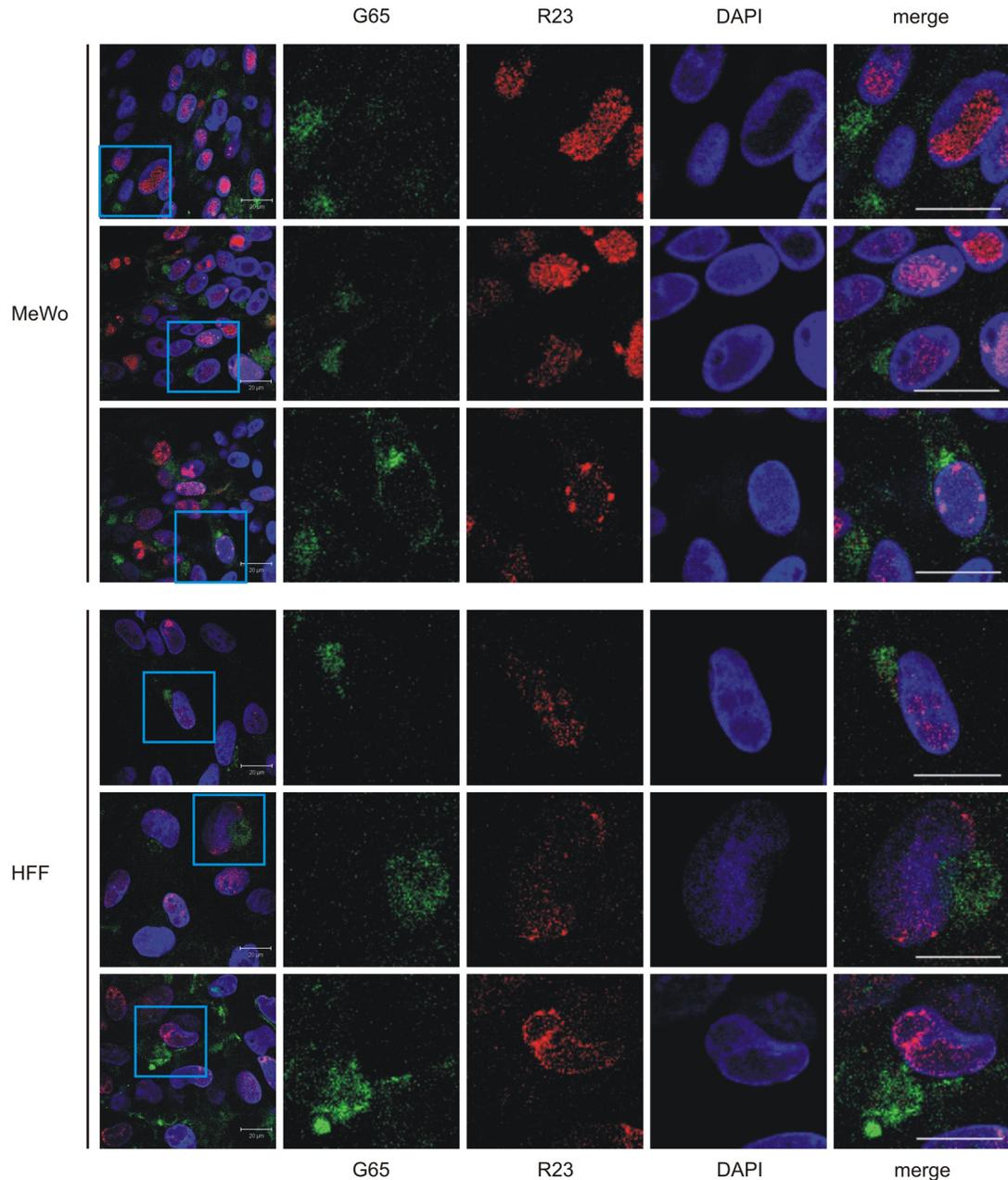
**Abb. 27: Lokalisation von G23 in MeWo-Zellen und Fibroblasten.** Die linke konfokale Bildreihe zeigt aufgenommene CPEs von G23<sub>VZV</sub> in MeWo- und HFF-Zellen 3 dpi. Die rechts folgenden Bilder zeigen den Ausschnitt der blauen Markierung für GFP (G23), DAPI und als Überlagerung (merge). G23 lokalisierte mit starker Fluoreszenz im Zellkern, war aber diffus mit schwacher Intensität auch im Cytoplasma erkennbar. Der Größenstandard zeigt 20 µm für die Bilder G23, DAPI und merge.



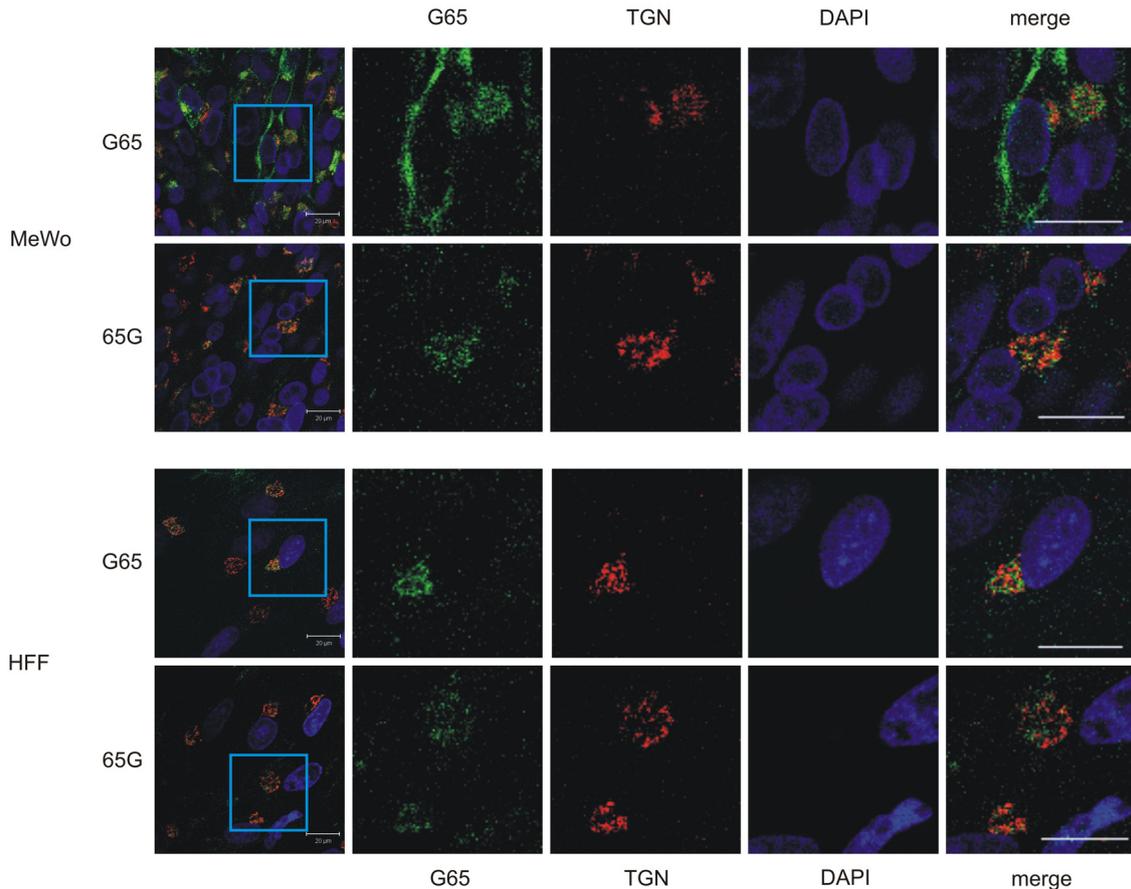
**Abb. 28: Lokalisation von G65 in MeWo-Zellen und Fibroblasten.** Die linke konfokale Bildreihe zeigt aufgenommene CPEs von G65<sub>VZV</sub> in MeWo- und HFF-Zellen 3 dpi. Die rechts folgenden Bilder zeigen den Ausschnitt der blauen Markierung für GFP (G65), DAPI und als Überlagerung (merge). Das G65 konnte im TGN und in perinukleären Membranstrukturen detektiert werden. Der Größenstandard zeigt 20  $\mu$ m für die Bilder G65, DAPI und merge.



**Abb. 29: Lokalisation von 65G in MeWo-Zellen und Fibroblasten.** Die linke konfokale Bildreihe zeigt aufgenommene CPEs von 65G<sub>IVZV</sub> in MeWo- und HFF-Zellen 3 dpi. Die rechts folgenden Bilder zeigen den Ausschnitt der blauen Markierung für GFP (65G), DAPI und als Überlagerung (merge). Das Protein 65G lokalisierte im TGN und zeigte schwächere Signale als die N-terminale Fusionsvariante. In MeWo-Zellen konnte 65G auch perinukleär detektiert werden. Der Größenstandard zeigt 20 μm für die Bilder 65G, DAPI und merge.



**Abb. 30: Lokalisation von G65 und R23 in MeWo-Zellen und Fibroblasten.** Die linke konfokale Bildreihe zeigt aufgenommene CPEs von G65R23<sub>rVZV</sub> in MeWo- und HFF-Zellen 3 dpi. Die rechts folgenden Bilder zeigen den Ausschnitt der blauen Markierung für GFP (G65), RFP (R23), DAPI und als Überlagerung (merge). Das Protein G65 lokalisierte im TGN und in perinukleären Membranstrukturen. Das Protein R23 konnte im Zellkern und mit sehr schwacher Intensität auch im Cytoplasma detektiert werden. Die Fluoreszenzintensität des Proteins G65 war insgesamt schwächer als die des R23. Der Größenstandard zeigt 20 μm für die Bilder G65, R23, DAPI und merge.

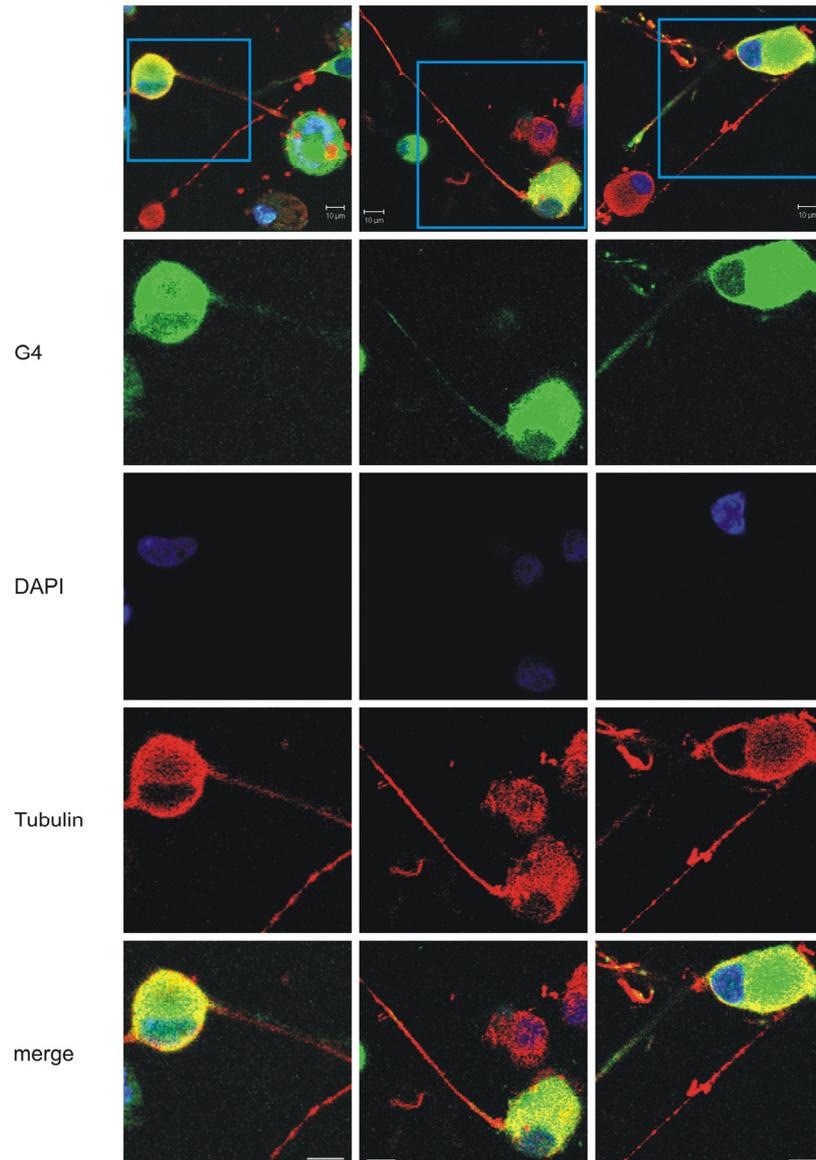


**Abb. 31: Nachweis der Lokalisation der Proteine G65 und 65G im TGN.** Das TGN wurde mit dem Antikörper Golgin 97 markiert (rot). Beide Fusionsvarianten lokalisierten im TGN. Das G65 konnte auch in Membranregionen gezeigt werden. Größenstandard ist 20  $\mu\text{m}$  für die Bilder G65, TGN, DAPI und Überlagerung (merge).

### 4.3 Rekombinante Viren in sensorischen Neuronen

#### 4.3.1 Lokalisation der Fusionsproteine in Neuronen der Ratte

Für den Nachweis der Lokalisation der Fusionsproteine in sensorischen Neuronen der Ratte wurden die frisch präparierten Ratten-Neurone auf Deckgläschen ausgesät und sofort durch Kokultivierung mit infizierten Fibroblasten infiziert. Die Neurone wurden 3 dpi mit Zamboni's Fixativ fixiert und die Zellkerne mit DAPI angefärbt. Im Falle des „Zweifarbenvirus“ G65R23<sub>rVZV</sub> wurden die Zellkerne mit dem TO-PRO-3 Iodid sichtbar gemacht, da die Neurone selbst mit dem Primärantikörper gegen  $\beta$ -III-Tubulin und einem Alexa Fluor-350-gekoppelten sekundären Antikörper gefärbt wurden. Der Chromophor dieses Sekundärantikörpers hat wie der Fluoreszenz-Farbstoff DAPI das Anregungsmaximum bei einer Wellenlänge von 350 nm. Zum Ausschluss von Verwirrungen wurden die Zellkerne analog zu den vorherigen Aufnahmen in DAPI-blauer Falschfarbe und die Neurone statt in DAPI-blau in türkis-blau dargestellt.

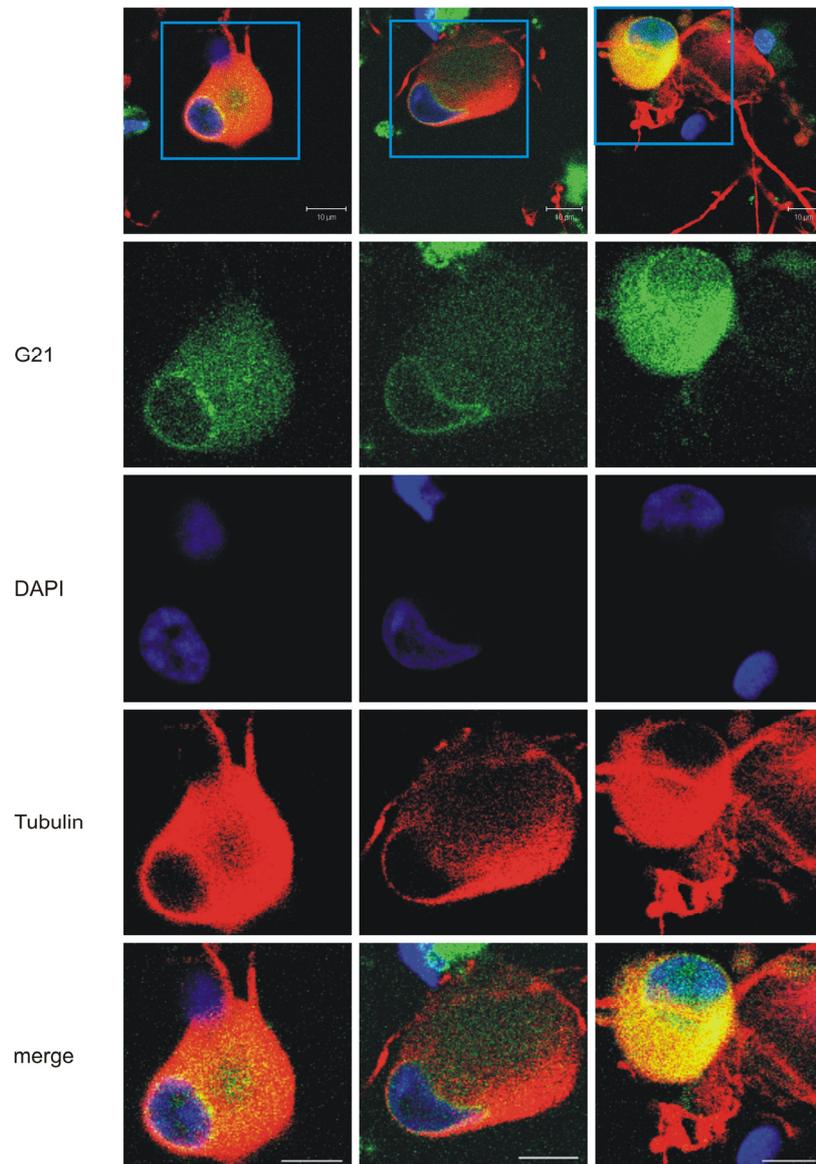


**Abb. 32: Lokalisation des Proteins G4 in sensorischen Ratten-Neuronen.** Die obere konfokale Bildreihe zeigt G4<sub>rVZV</sub>-infizierte sensorische Ratten-Neurone 3 dpi. Die nach unten folgenden Bilder zeigen den Ausschnitt aus der blauen Markierung für GFP (G4), DAPI, Alexa Fluor-568 ( $\beta$ -III-Tubulin) und als Überlagerung (merge). Das Protein G4 lokalisierte mit starken Fluoreszenzsignalen im Cytoplasma, es ist nur sehr schwach im Zellkern zu erkennen. Auch in den Axonen konnte das Protein detektiert werden. Der Größenstandard zeigt 10  $\mu$ m.

Das Protein G4 lokalisierte ebenso wie in MeWo-Zellen und Fibroblasten auch in den Neuronen im Cytoplasma, ebenfalls mit starken Fluoreszenzsignalen (Abb. 32). Wie in den permissiven Zelllinien waren auch in den sensorischen Neuronen Signale im Nukleus mit schwacher Fluoreszenz erkennbar. Auch in den Axonen konnte das Protein G4 sehr gut detektiert werden.

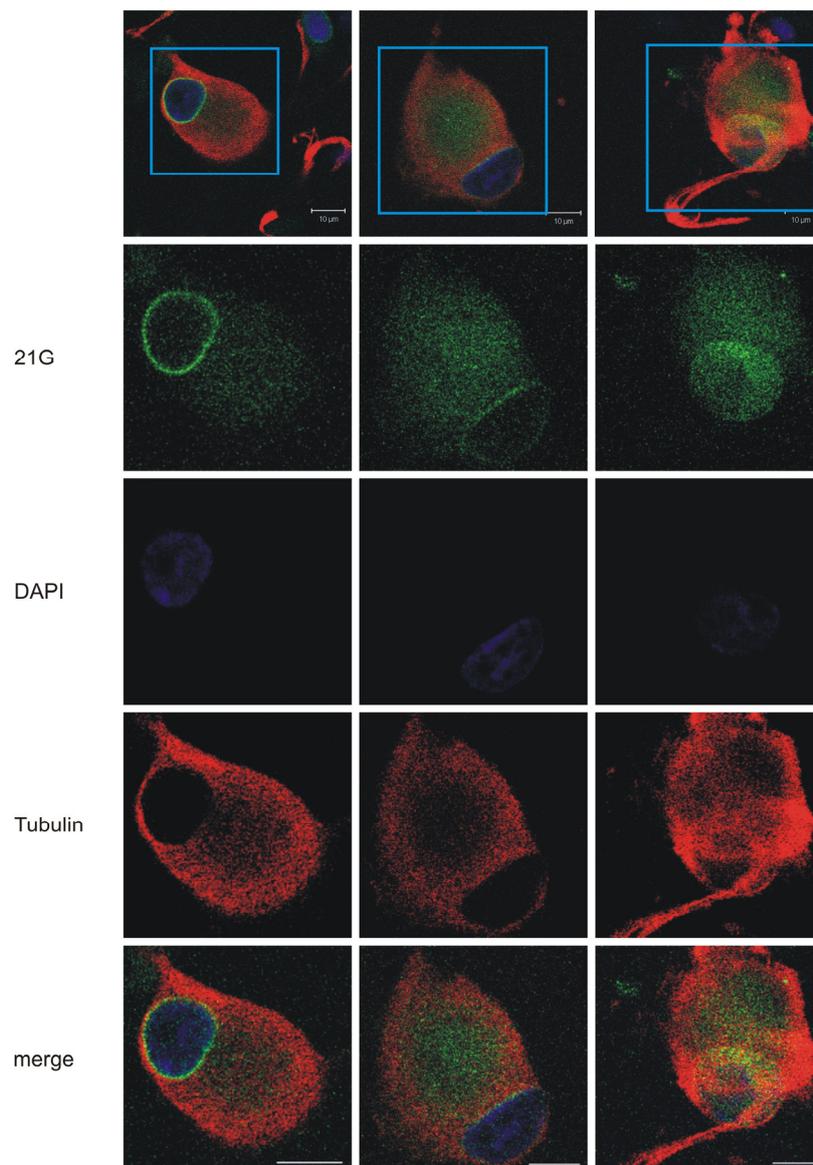
Die beiden Fusionsvarianten von 21p zeigten Fluoreszenzsignale, die zu denen in permissiven Zellen ähnlich waren (Abb. 33, Abb. 34). Mit schwacher Fluoreszenzinten-

sität konnten Signale im Cytoplasma und im Nukleus beobachtet werden. Dabei war die Fluoreszenzintensität im Cytoplasma stärker als im Zellkern. Mehrmals konnten stärkere Signale rund um den Zellkern an perinukleären Membranen detektiert werden, aber in Axonen waren die 21p-Varianten nicht nachweisbar. Die Fluoreszenzsignale waren etwas schwächer, wenn ORF21 am C-Terminus mit eGFP fusioniert war.



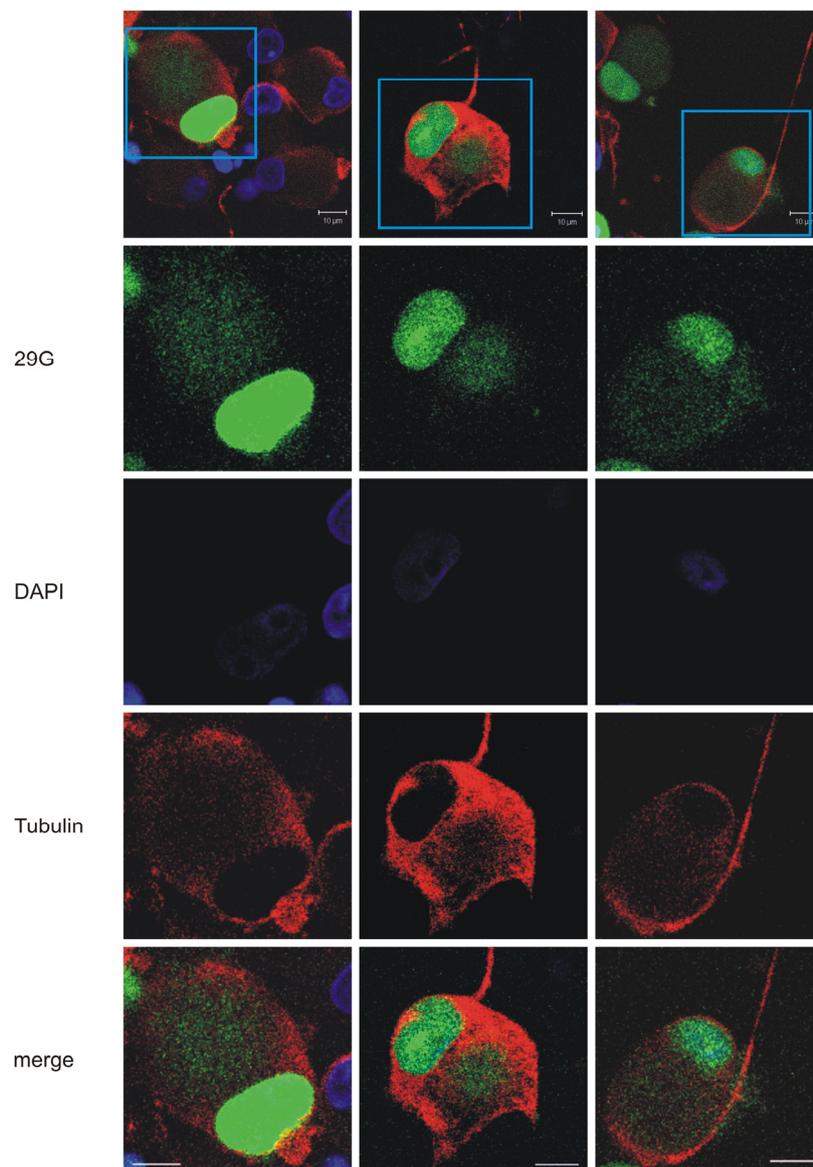
**Abb. 33: Lokalisation des Proteins G21 in sensorischen Ratten-Neuronen.** Die obere konfokale Bildreihe zeigt G21<sub>rVZV</sub>-infizierte sensorische Ratten-Neurone 3 dpi. Die nach unten folgenden Bilder zeigen den Ausschnitt aus der blauen Markierung für GFP (G21), DAPI, Alexa Fluor-568 ( $\beta$ -III-Tubulin) und als Überlagerung (merge). Das Protein G21 lokalisierte in den Ratten-Neuronen etwas stärker im Cytoplasma als im Nukleus. Auch in der perinukleären Membranregion konnte das G21 beobachtet werden. In den Axonen war das Protein nicht zu erkennen. Der Größenstandard zeigt 10  $\mu$ m für alle Bilder.

Die Verteilung von 29p änderte sich in Neuronen im Vergleich zu der Lokalisation in MeWo-Zellen und Fibroblasten. Das Protein 29p war hier ebenfalls im Nukleus mit starken Signalen zu detektieren, diesmal konnte es aber auch im Cytoplasma detektiert werden, wenn auch mit schwächeren Fluoreszenzsignalen. In den Axonen konnte 29p allerdings nicht gezeigt werden (Abb. 35). Das Fusionsprotein G23 hatte wieder ein zu 29G ähnliches Signalmuster (Abb. 36). Auch G23 konnte im Nukleus und im Cytoplasma nachgewiesen werden.

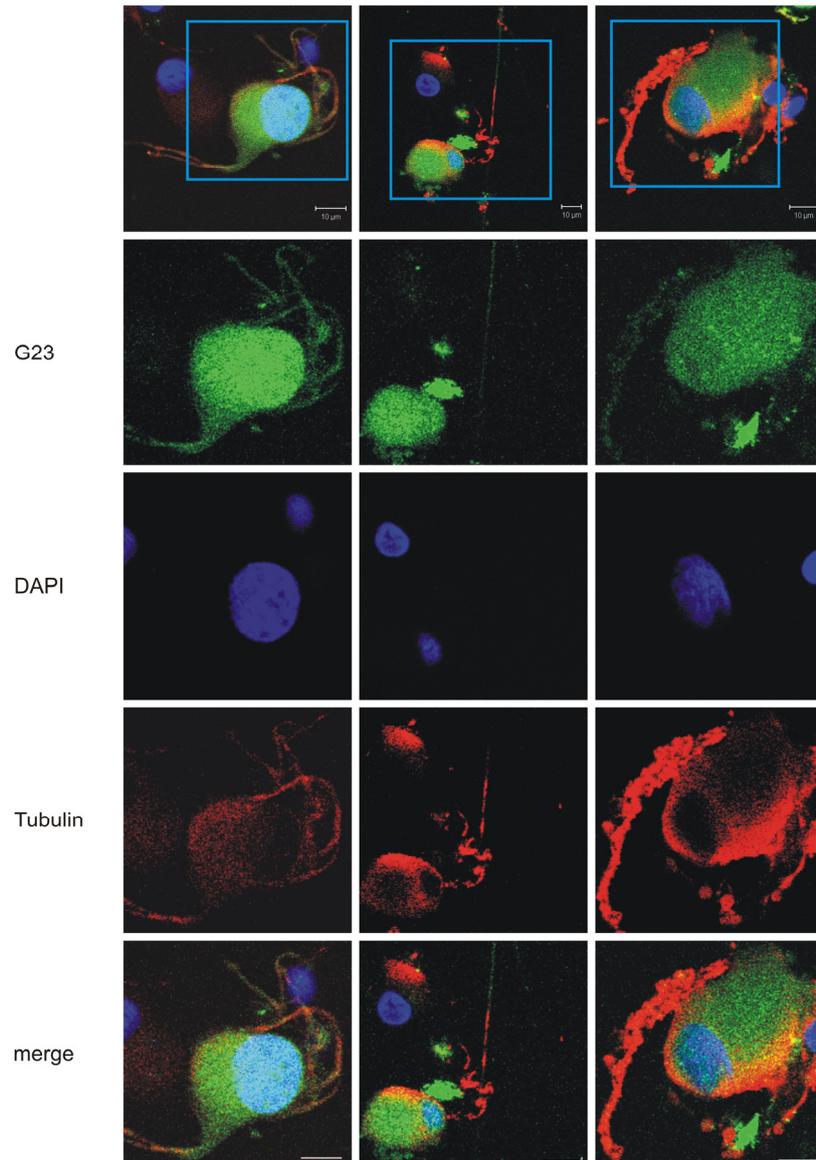


**Abb. 34: Lokalisation des Proteins 21G in sensorischen Ratten-Neuronen.** Die obere konfokale Bildreihe zeigt 21G<sub>VZV</sub>-infizierte sensorische Ratten-Neurone 3 dpi. Die nach unten folgenden Bilder zeigen den Ausschnitt aus der blauen Markierung für GFP (21G), DAPI, Alexa Fluor-568 (β-III-Tubulin) und als Überlagerung (merge). Das Protein 21G lokalisierte im Cytoplasma und mit etwas schwächeren Signalen im Nukleus. Das 21G konnte wie auch G21 deutlich in der perinukleären Membranregion beobachtet werden. In den Axonen konnte das Protein nicht detektiert werden. Der Größenstandard zeigt 10 μm für alle Bilder.

Dabei waren die Fluoreszenzintensitäten ähnlich stark. Wie erwartet, konnte G23 auch in den Axonen detektiert werden. Die Fusionsproteine von ORF65, G65 und 65G, zeigten in den Neuronen schwache Fluoreszenzsignale, die aber etwas stärker waren als in den permissiven Zelltypen (Abb. 37, Abb. 38). Die N-terminale Fusion war in der Fluoreszenzintensität etwas stärker als die C-terminale Fusion. Die Proteine lokalisierten im Cytoplasma, z.T in punktförmiger oder globulärer Form.

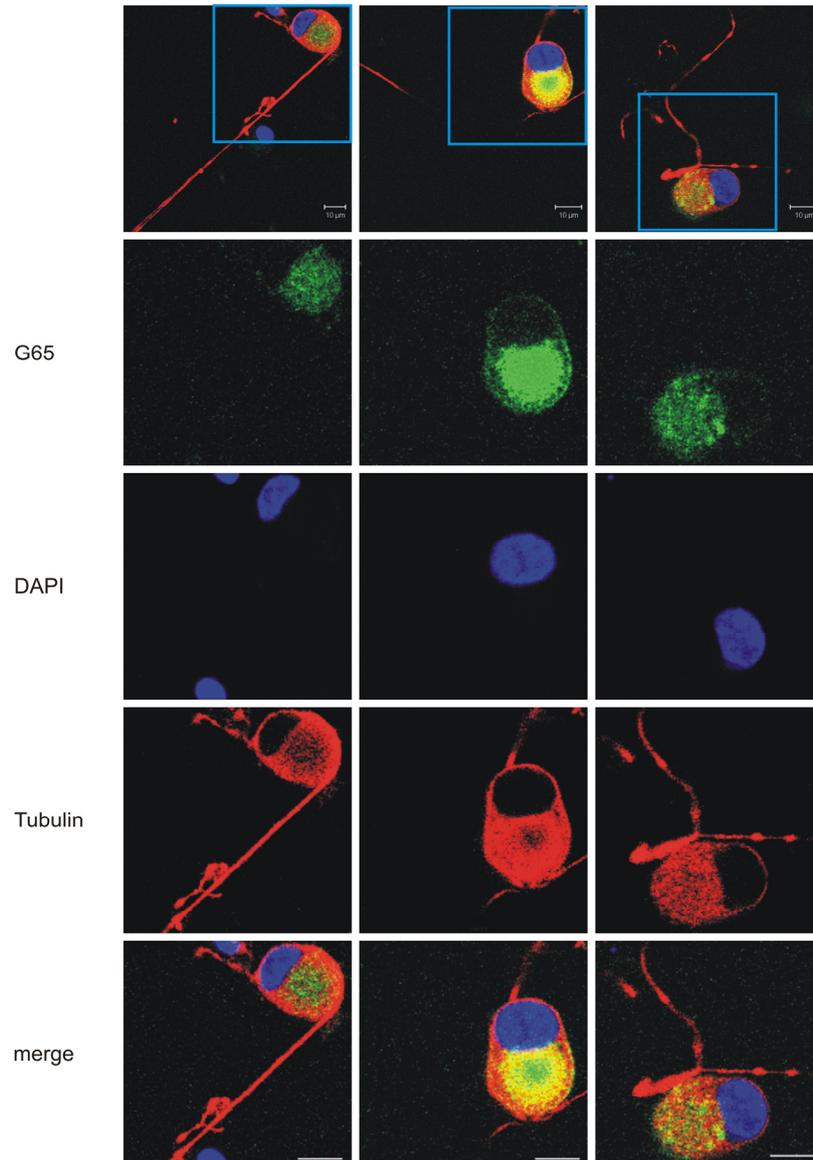


**Abb. 35: Lokalisation des Proteins 29G in sensorischen Ratten-Neuronen.** Die obere konfokale Bildreihe zeigt 29G<sub>VZV</sub>-infizierte sensorische Ratten-Neurone 3 dpi. Die nach unten folgenden Bilder zeigen den Ausschnitt aus der blauen Markierung für GFP (29G), DAPI, Alexa Fluor-568 ( $\beta$ -III-Tubulin) und als Überlagerung (merge). Das Protein 29G lokalisierte in Ratten-Neuronen mit starker Fluoreszenzintensität im Nukleus und mit schwachen Signalen auch im Cytoplasma. In den Axonen konnte das Protein nicht gezeigt werden. Der Größenstandard zeigt 10  $\mu$ m für alle Bilder.



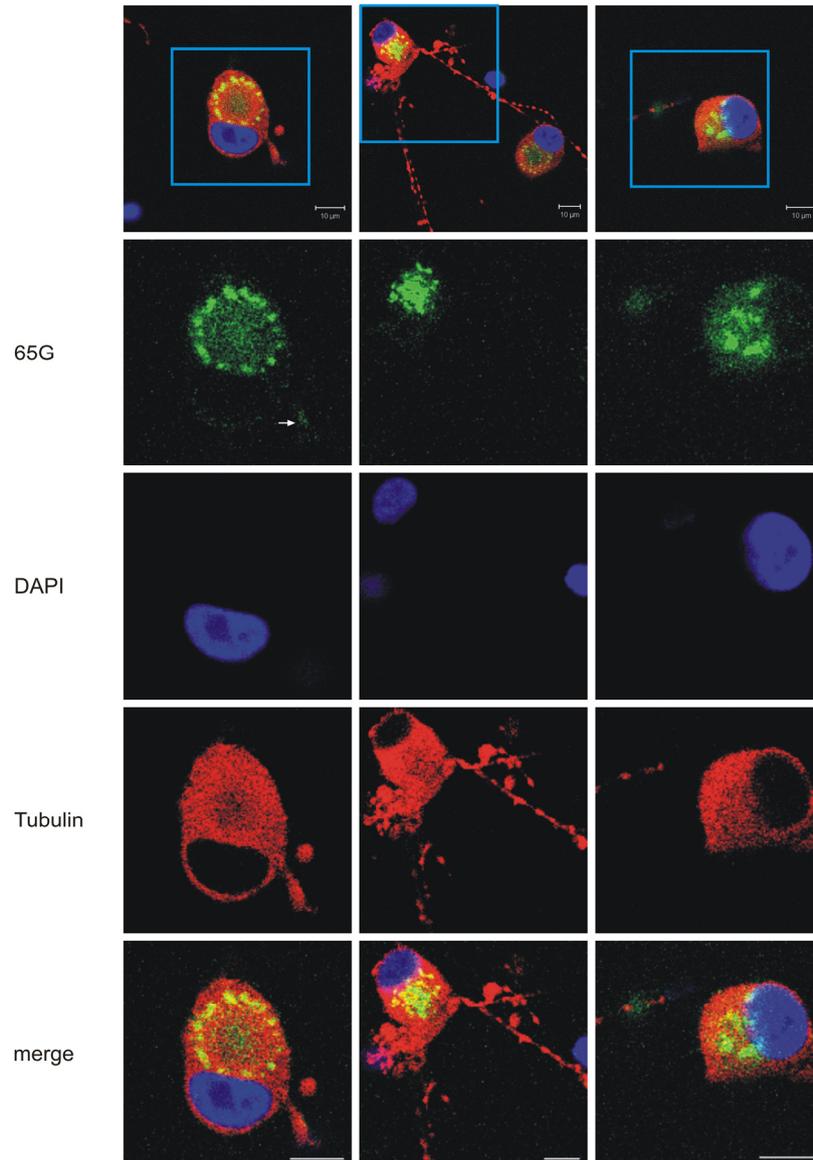
**Abb. 36: Lokalisation des Proteins G23 in sensorischen Ratten-Neuronen.** Die obere konfokale Bildreihe zeigt G23<sub>vZV</sub>-infizierte sensorische Ratten-Neurone 3 dpi. Die nach unten folgenden Bilder zeigen den Ausschnitt aus der blauen Markierung für GFP (G23), DAPI, Alexa Fluor-568 ( $\beta$ -III-Tubulin) und als Überlagerung (merge). Das Protein G23 lokalisierte sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern. Auch in den Axonen konnte das Protein G23 deutlich beobachtet werden. Der Größenstandard zeigt 10  $\mu$ m für alle Bilder.

Mit sehr schwachen Fluoreszenzsignalen konnte das G65 vermutlich in der perinukleären Membranregion beobachtet werden. In den Axonen waren beide 65p-Fusionsproteine entgegen den Erwartungen nicht zu detektieren. Nur bei 65G war eine schwache grüne Fluoreszenz im Bereich eines Axons erkennbar (Abb. 38, erste Bildreihe, weißer Pfeil).



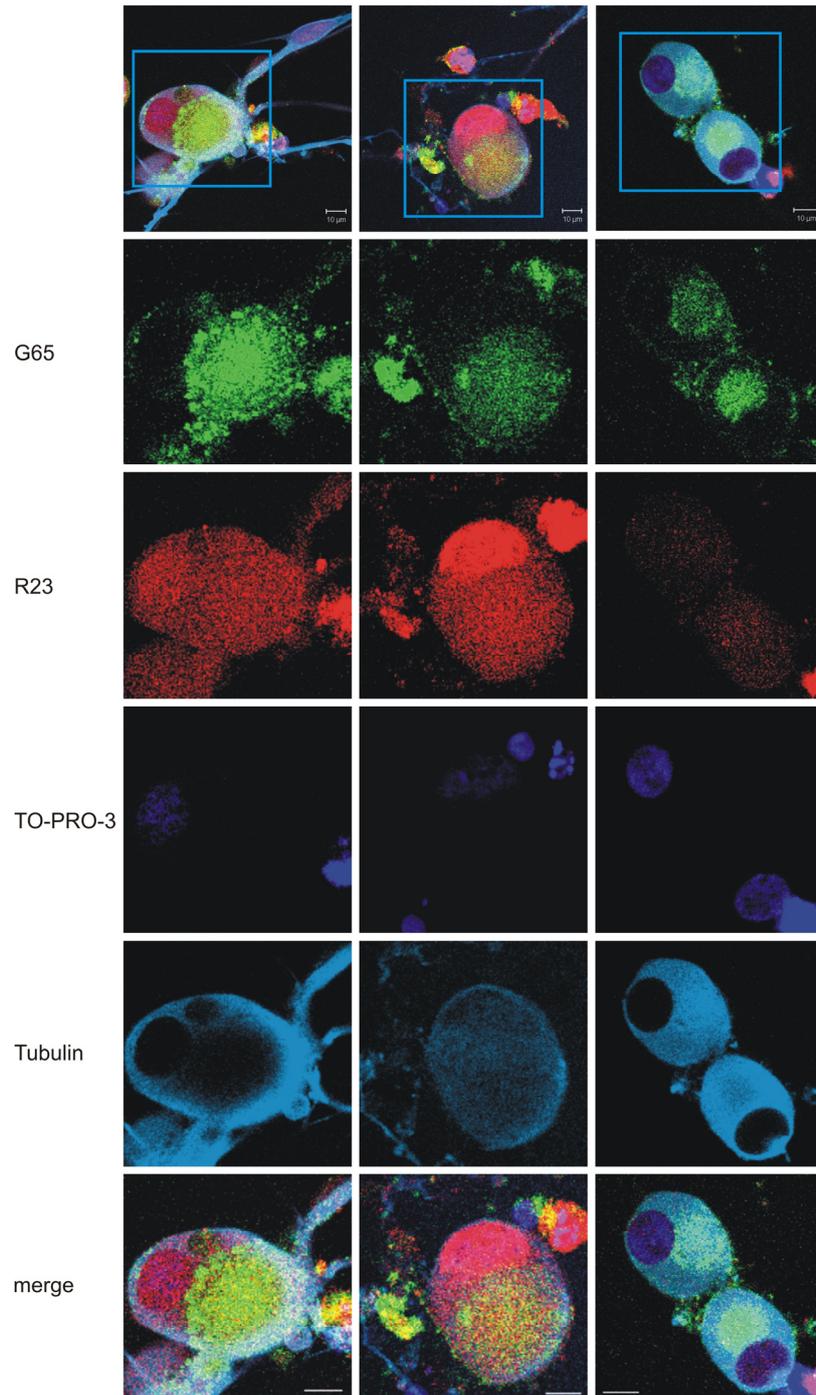
**Abb. 37: Lokalisation des Proteins G65 in sensorischen Ratten-Neuronen.** Die obere konfokale Bildreihe zeigt G65<sub>VZV</sub>-infizierte sensorische Ratten-Neurone 3 dpi. Die nach unten folgenden Bilder zeigen den Ausschnitt aus der blauen Markierung für GFP (65G), DAPI, Alexa Fluor-568 ( $\beta$ -III-Tubulin) und als Überlagerung (merge). Das Protein G65 lokalisierte in den Neuronen im Cytoplasma. Auch in perinukleären Membranstrukturen war das Protein schwach zu erkennen. In den Axonen konnte das Protein G65 nicht gezeigt werden. Der Größenstandard zeigt 10  $\mu$ m für alle Bilder.

Bei Infektion der Neurone mit der doppelt markierten Mutante G65R23<sub>VZV</sub> entsprach die jeweilige Lokalisation der beiden Fusionsproteine G65 und R23 derjenigen aus den Einzelnachweisen für G65 und G23 (Abb. 39). Das Fusionsprotein G65 war im Cytoplasma detektierbar und mit schwachen Signalen in Membranstrukturen. R23 zeigte starke Fluoreszenzintensitäten in der gesamten Zelle. Die Fluoreszenzsignale waren im Zellkern meist stärker als im Cytoplasma, was bei den Aufnahmen für G23 allein nicht so deutlich hervor getreten war (Abb. 36).



**Abb. 38: Lokalisation des Proteins 65G in sensorischen Ratten-Neuronen.** Die obere konfokale Bildreihe zeigt 65G<sub>rVZV</sub>-infizierte sensorische Ratten-Neurone 3 dpi. Die nach unten folgenden Bilder zeigen den Ausschnitt aus der blauen Markierung für GFP (65G), DAPI, Alexa Fluor-568 ( $\beta$ -III-Tubulin) und als Überlagerung (merge). Das Protein 65G lokalisierte in Neuronen der Ratte im Cytoplasma, z:T in globulärer Form. In Membranregionen war das 65G nicht zu erkennen. Auch in den Axonen konnte das Protein 65G nicht detektiert werden. Nur einmal war ein schwaches grünes Fluoreszenzsignal im Bereich des Axons zu erkennen (erste Bildreihe, weißer Pfeil). Der Größenstandard zeigt 10  $\mu$ m für alle Bilder.

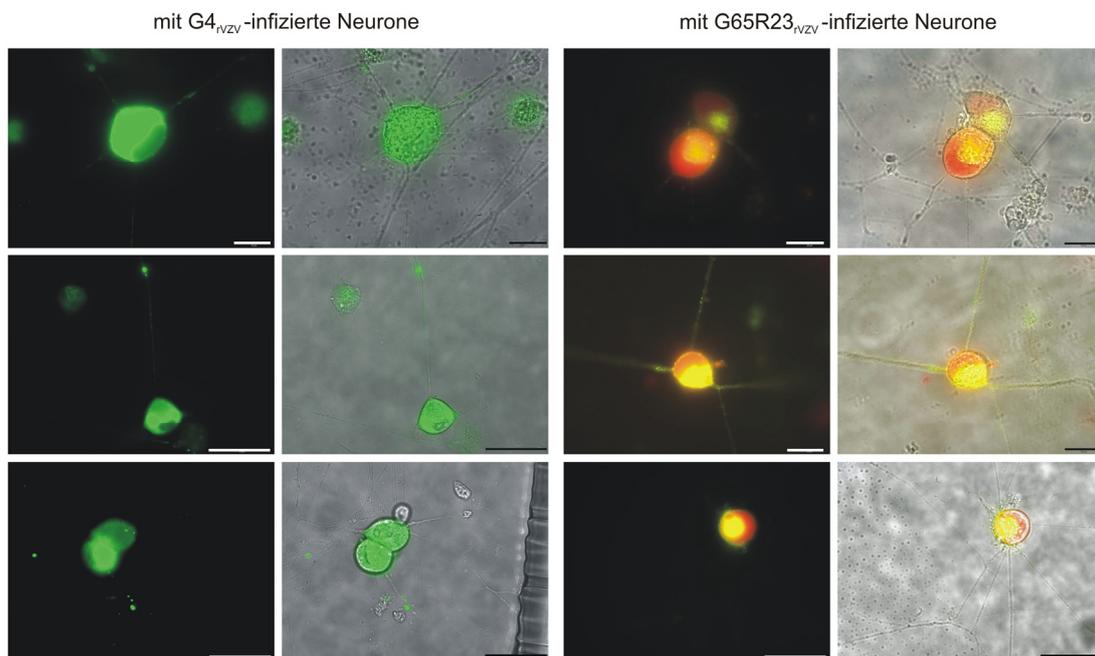
Zusammenfassend konnten für alle Fusionsproteine, die auch während der Latenz exprimiert werden, die erwarteten Lokalisationsorte nachgewiesen werden. Die Fusionsproteine, die während der Latenz nicht exprimiert werden, zeigten die für eine lytische, permissive Infektion entsprechenden Lokalisationen.



**Abb. 39: Lokalisation der Proteine G65 und R23 in sensorischen Ratten-Neuronen.** Die obere konfokale Bildreihe zeigt G65R23<sub>vzv</sub>-infizierte sensorische Ratten-Neurone 3 dpi. Die nach unten folgenden Bilder zeigen den Ausschnitt aus der blauen Markierung für GFP (G65), RFP (G23), TO-PRO-3 als DAPI-Falschfarbe und  $\beta$ -III-Tubulin in türkis-blau (Alexa Fluor 350) und als Überlagerung (merge). Das Protein G65 wurde im Cytoplasma detektiert. R23 lokalisierte im Cytoplasma und im Zellkern, dort mit z.T. stärkerer Fluoreszenz als im Cytoplasma. Auch in den Axonen war das Protein R23 zu erkennen. Der Größenstandard zeigt 10  $\mu$ m für alle Bilder.

### 4.3.2 Retrograde und anterograde Infektionen von Neuronen

Die Lokalisation der Fusionsproteine, die durch konfokale Mikroskopie in den fixierten Neuronen und permissiven Zellen ermittelt wurde, konnte auch in lebenden Neuronen am Beispiel von G4<sub>rVZV</sub>- und G65R23<sub>rVZV</sub>-infizierten Neuronen dargestellt werden (Abb. 40). Dafür waren frisch präparierte sensorische Ratten-Neurone auf Glasbodenschälchen ausgesät und sofort für die Infektion mit infizierten Fibroblasten kokultiviert worden. Zwei bis drei Tage später wurden die infizierten Neurone unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht.



**Abb. 40: Sensorische Ratten-Neuronen nach Infektion mit G4<sub>rVZV</sub> und G65R23<sub>rVZV</sub>.** Das Protein G4 lokalisierte in den Ratten-Neuronen hauptsächlich im Cytoplasma und war nur wenig im Nukleus zu finden. Bei der Infektion mit G65R23<sub>rVZV</sub> lokalisierte das Protein R23 sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern. Das Protein G65 war nur im Cytoplasma zu finden, daher war die Überlagerung zwischen G65 und R23 als Gelbfärbung zu sehen. Die Größenstandards zeigen 20 µm für die kleinen und 50 µm für die größeren Balken.

Wie zuvor bei der konfokalen Mikroskopie gesehen, lokalisierte G4 hauptsächlich im Cytoplasma der Neurone und war nur schwach im Nukleus zu erkennen. Nach der Infektion mit G65R23<sub>rVZV</sub> war das rot fluoreszierende Protein R23 sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma verteilt. Da das grün fluoreszierende Protein G65 nur im Cytoplasma lokalisierte, entstand für das Cytoplasma durch die Kolo-kalisation eine Gelbfärbung

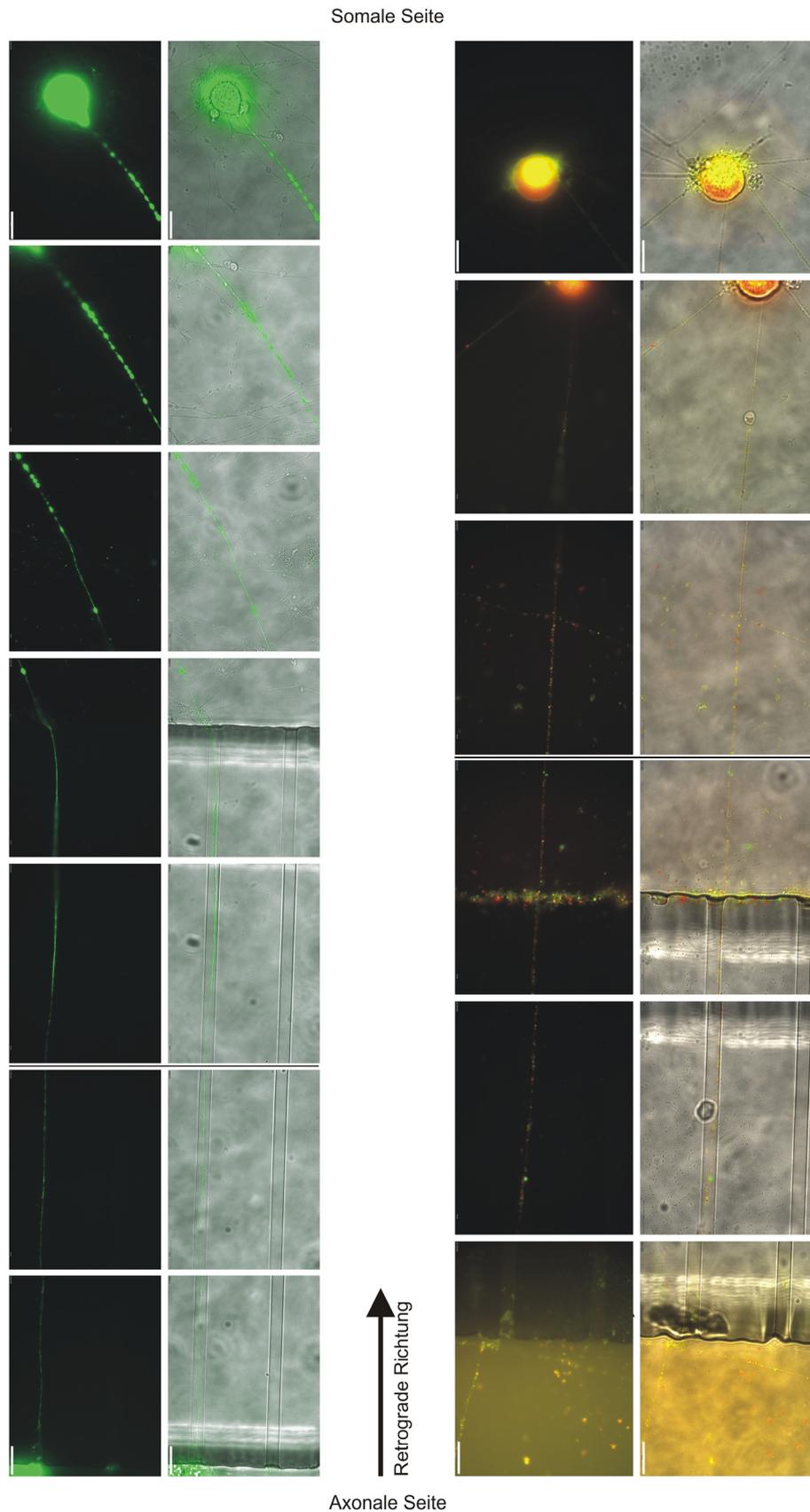
Aufgrund der deutlichen Sequenzhomologie von VZV-65p zum US9 aus PRV sollte untersucht werden, ob auch 65p eine Funktion im axonalen Transport viraler Kapside übernimmt. Da bereits bekannt war, dass das Kapsidprotein 23p in Axonen nachweis-

bar ist, wurde das „Zweifarbigen“-Virus G65R23<sub>rVZV</sub> für Experimente in den *microfluidic chambers* eingesetzt. So sollte sich eine mögliche Kollokalisierung der beiden Proteine direkt nachweisen lassen. Die Ratten-Neurone wurden im *microfluidic chamber*-System über retrograden oder anterograden Weg infiziert. Als Positivkontrolle wurden Neurone mit G4<sub>rVZV</sub> infiziert, da die Fluoreszenzsignale des Fusionsproteins G4 gut zu erkennen waren. Außerdem war durch die konfokalen Aufnahmen bekannt, dass auch G4 in den Axonen nachweisbar ist.

Im *microfluidic chamber*-System wurden die aus den Spinalganglien der Ratte frisch präparierten sensorischen Neurone auf der so genannten somalen Seite der Kammern ausgesät. Durch zehnfach höhere Konzentration an NGF auf der axonalen Kammerseite wurde das Wachstum der Axone auf diese Seite gelenkt. Für die retrograde Infektion wurden drei Tage später infizierte Fibroblasten in die Vertiefungen der axonalen Seite gegeben, so dass zunächst die Axone und in der Folge nach axonalem Transport auch die Zellkörper auf der somalen Seite der Kammer infiziert werden konnten. Für den anterograden Infektionsweg wurden drei Tage nach dem Aussäen der Neurone uninfizierte Fibroblasten oder MeWo-Zellen in die Vertiefungen auf der axonalen Seite gegeben. Am nächsten Tag wurden die Neurone mit infizierten Fibroblasten bzw. MeWo-Zellen kokultiviert und die infizierten Kulturen an den darauf folgenden Tagen unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet und dokumentiert (Abb. 41).

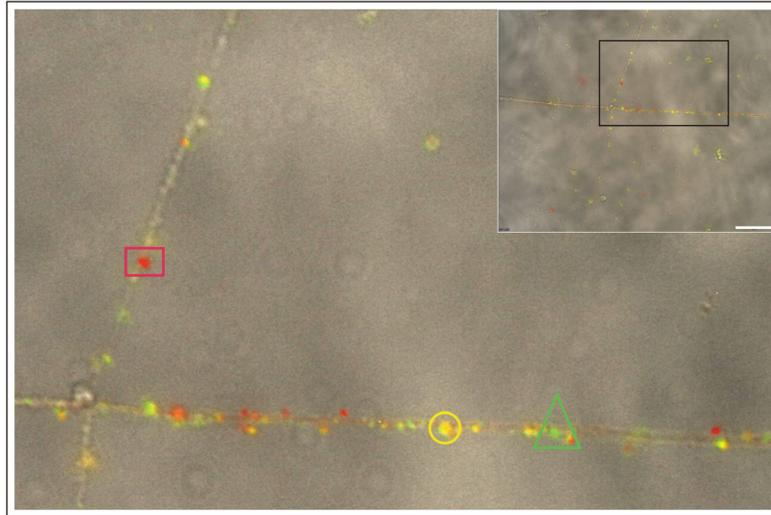
Während der retrograde Infektionsweg mikroskopisch dokumentiert werden konnte, stellte sich der anterograde Infektionsweg als nicht realisierbar heraus. Die Durchführung der Virusinfektion der Neurone in diesen Kammern zeigte sich generell als problematisch. Von Versuch zu Versuch war die Anzahl der Neurone, die sich im Hauptkanal sammelten, stark unterschiedlich, und ebenso deren Tendenz, mit ihren Axonen durch die Mikrokäle zu wachsen. Trotz zahlreichen Veränderungen hinsichtlich der Anzahl der ausgesäten und infizierten Zellen und der Bedingungen für die Beschichtung der Oberflächen mit Laminin konnten anterograde Infektionen nicht erzielt werden.

Über den retrograden Infektionsweg erreichten die Viruspartikel zwar die Neurone, aber auch bei hoher Anzahl von Neuronen im Hauptkanal der somalen Seite konnten nur wenige Neurone infiziert werden. Dabei war die Infektion der Neurone mit dem Virus G4<sub>rVZV</sub> effizienter als mit dem Virus G65R23<sub>rVZV</sub>, und es waren deutlich grün fluoreszierende Partikel in den Axonen sichtbar. Die Fluoreszenzsignale konnten von der axonalen Kammerseite aus durch die Mikrokäle bis zum infizierten Zellkörper verfolgt werden (Abb. 41).



**Abb. 41: Retrograde Infektion von Neuronen mit  $G4_{VZV}$  und  $G65R23_{VZV}$ , bei denen der Verlauf der Axone gut durch die Fluoreszenz der Fusionsproteine G4 bzw. G65 und R23 von der axonalen Seite durch die Mikrokanäle bis hin zum Zellkörper zu verfolgen ist. Die retrograde Richtung verläuft von unten nach oben. Der Größenstandard zeigt 20  $\mu\text{m}$  für jede Bildreihe.**

Nach retrograder Infektion der Neurone mit G65R23<sub>rVZV</sub> waren der rot fluoreszierende Zellkern, und das durch die Überlagerung von rot fluoreszierendem R23 und grün fluoreszierendem G65 gelb gefärbte Cytoplasma deutlich zu erkennen. In den Axonen waren Viruspartikel sichtbar, die grün (65p), rot (23p) und nur manchmal gelb fluoreszierten (Abb. 42). Somit wurde 65p offenbar unabhängig vom Kapsid in den Axonen transportiert.



**Abb. 42: Viruspartikel von G65R23<sub>rVZV</sub> in Axonen** Vergrößerter Ausschnitt aus dem kleinen Bild oben rechts, das ein mit G65R23<sub>rVZV</sub>-infiziertes Axon zeigt. In diesem Axon konnten neben grün fluoreszierenden Partikeln (G65, grünes Dreieck) und rot fluoreszierenden Partikeln (R23, Kapside, rotes Viereck) auch gelb gefärbte Partikel nachgewiesen werden. Der Größenstandard im kleinen Bild zeigt 20  $\mu\text{m}$ .

#### 4.4 Sequenzanalyse des klonierten VZV-Genoms

Das für die Mutagenese verwendete Genom des WT-Isolats HJO von VZV (Kress & Fickenscher, 2001) wurde aus viraler DNA in Cosmid-Vektoren kloniert (Schmidt et al., 2003). Nach Rekonstitution des Genoms durch Kotransfektion der komplementierenden, überlappenden DNA-Abschnitte aus Cosmiden in permissiven MeWo-Zellen wurde das virale Genom in einen BAC-Vektor kloniert. Die mit konventioneller Sanger-Technik erstellte Gesamtsequenz des VZV-HJO-Genoms von 124.928 bp lag bereits vor (GenBank Eintrag AJ871403.1). Durch Transposition des BAC-Vektors wurde mit pHJOpac eine Variante des HJO-BACs erstellt, bei der die Vektoranteile zwischen den Enden des zirkularisierten, viralen Genoms liegen und im Rahmen der Virusreplikation in permissiven Zellen nach wenigen Passagen deletiert werden (Wussow et al., 2009). Allerdings bestand infolge der weiteren Veränderungen am viralen Genom z.B. durch die Transposition der BAC-Vektoranteile eine gewisse Unsicherheit, ob sekundäre Mutationen aufgetreten waren.

Deshalb wurde die Methode des *deep sequencings* (Illumina-Technologie) angewandt, damit die Intaktheit des klonierten viralen Genoms bestätigt und sekundäre Mutationen ausgeschlossen werden konnten. Die Sequenzierung wurde mit freundlicher Unterstützung von Herrn Dr. Hemmrich-Stanisak auf Geräten des Instituts für Klinische Molekularbiologie der CAU in Kiel durchgeführt. Da die erhaltene Sequenzdatenbank die identischen Sequenzen jeweils massenhaft repräsentierte, konnten die erhaltenen Sequenzabschnitte anhand der Vergleichssequenz – „MiniF“-Vektor plus virales Genom aus AJ871403.1 – zusammengesetzt (*aligned*) werden. Mit dem *Integrative Genome Viewer* (IGV) des *Broad Institute* (Cambridge, MA, USA) wurde die neu erhaltene Sequenz des BACs pHJOpac mit dem aus Cosmiden erstellten VZV-HJO-Genom (AJ871403.1) und der aus dem Klonierungsvektor pBeloBAC11 (U51113.1; Wang et al., 1997) abgeleiteten „MiniF“-Sequenz verglichen und auf Veränderungen im Genom untersucht. Die Redundanz der Sequenzierung, also die durchschnittliche Repräsentierung der Genomabschnitte in dem zusammengesetzten Genom (Alignment), war wesentlich höher als der in der Herpesvirologie übliche Minimalwert von sechs.

Die Analyse ergab insgesamt eine fast vollkommene Übereinstimmung der Sequenzen. Die  $U_s$ -Region des HJO-Genoms lag schon im entsprechenden Cosmid-Klon invertiert vor (Schmidt et al., 2003; Wussow et al., 2009). Wegen der entsprechenden Vorgabe aus dem HJO-Genom AJ871403.1 wurde diese invertierte Orientierung auch hier beibehalten. Allerdings ist bekannt, dass die  $U_s$ -Region gleich häufig in beiden Orientierungen in der Viruspopulation vorkommt (Ecker & Hyman, 1992; Straus et al., 1982). Im Vergleich zwischen den beiden Sequenzen wurden insgesamt nur vier Veränderungen beobachtet: zwei Basensubstitutionen, davon eine stille Mutation in ORF28, und zwei Insertionen in nicht-kodierenden Bereichen (Tab. 13). Der Austausch der Base 56.405 von Thymin zu Cytosin in der Aminosäure 197 von ORF28 bewirkte keine Änderung der Aminosäuresequenz. Beide Triplets kodieren die Aminosäure Leucin. Eine weitere Basensubstitution wurde in der repetitiven Region R3 identifiziert. R3 setzt sich aus drei 9 bp-Elementen zusammen (Tab. 13: A, B, C). Zu Beginn des nur einmal vorkommenden 9 bp-Elements „C“ erfolgte der Wechsel von der Base Adenin zu Cytosin (Nukleotidposition 47.861). Diese Mutation führte zu einem Aminosäureaustausch von Threonin zu Prolin im R3 innerhalb des ORF22. Bei den zwei weiteren Unterschieden handelte es sich um Insertionen in nicht-kodierenden Bereichen. Zum einen wurde die Insertion einer weiteren Base Thymin zwischen ORF42 und ORF43 festgestellt, so dass im BAC pHJOpac nun zwölf statt elf Thymine in Serie vorlagen. Eine zweite Insertion wurde in den repetitiven Bereichen  $TR_s$  und  $IR_s$  identifiziert.

**Tab. 133:** Sequenzunterschiede zwischen der aus pHJOpac erhaltenen Sequenz im Vergleich zu dem aus einer Cosmid-Bibliothek erstellten VZV-HJO-Gesamtgenoms AJ871403.1. Die Angaben der Nukleotid- und Aminosäurepositionen beziehen sich auf das Genom von BAC pHJOpac.

<b>ORF28</b>	Nukleotidposition 56.405, Aminosäure 197
AJ871403.1	CTT GCC GAG TGT TTA CGC AGT TCT ATG
pHJOpac	CTT GCC GAG TGT <b>CTA</b> CGC AGT TCT ATG
TTA/ <b>CTA</b> : Leucin	
<b>Repeat 3</b>	Nukleotidposition 47.861, Aminosäure 2473
AJ871403.1	AABBABC B
pHJOpac	AABBABC' B
A = CCCGTCCAG    B = CCCGCGCAG    C = ACCGTCCAG    C' = CCCGTCCAG	
ACC: Threonin/ <b>CCC</b> : Prolin	
<b>ORF42/ORF43</b>	Insertion zwischen Nukleotidposition 84.500/84.501
AJ871403.1	TTT CTT TTT TTT TTT-CCA GTA CAA CCA
pHJOpac	TTT CTT TTT TTT TTT <b>T</b> CCA GTA CAA CCA
<b>nach ORF71 bzw. vor ORF62</b>	Insertion zwischen Nukleotidposition 115.601/115.602 bzw. 127.136/127.137
AJ871403.1	CGTGTGTG-CCCCCCCC / GGGGGGGG-CACAACACG
pHJOpac	CGTGTGTG <b>C</b> CCCCCCCC / GGGGGGGG <b>G</b> CACAACACG

Zwischen Nukleotidposition 115.602 und 115.602 nach ORF71 im TR<sub>S</sub> bzw. zwischen 127.136 und 127.137 vor ORF62 im IR<sub>S</sub> (da die U<sub>S</sub>-Region invertiert vorliegt) wurde ein Cytosin bzw. komplementär gesehen ein Guanin inseriert.

In dem integrierten „MiniF“-Vektor in pHJOpac konnten keine Abweichungen zu der Sequenz des Vektors pBeloBAC11 gefunden werden. Das virale BAC-Genom pHJOpac wurde demnach im Rahmen der unterschiedlichen Rekombinationsereignisse nicht gravierend verändert. Im Vergleich zur ursprünglichen HJO-Sequenz gab es keine Mutationen, von denen funktionelle Unterschiede zu erwarten wären. Das BAC pHJOpac ist somit ein geeignetes Werkzeug, um verschiedene virale VZV-Proteine nach der Infektion mit HJO-Rekombinanten schnell, effizient und gezielt untersuchen zu können.

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Rekombinante Viren

#### 5.1.1 Replikationsverhalten der rekombinanten Viren

Nach der Infektion gelangt VZV retrograd über die Axone oder über den Blutkreislauf in die Neurone der Trigemini- und Spinalganglien und persistiert dort lebenslang in latenter Form. Während der Latenzphase ist die Genexpression von VZV nahezu stillgelegt. Nur die sechs Gene ORF4, ORF21, ORF29, ORF62, ORF63 und ORF66 werden transkribiert und in Proteine translatiert (Cohrs et al., 1996, 2003; Lungu et al., 1998; Mahalingam et al., 1996; Meier et al., 1993; Kennedy et al., 1999). Von diesen sechs Proteinen wurden in dieser Arbeit das IE-Protein 4p und die E-Proteine 21p und 29p mit dem eGFP-Leserahmen am C- und am N-terminalen Ende fusioniert und in rekombinanten Viren an orthotoper Position exprimiert. Alle drei Proteine sind für die Virusreplikation essentiell (Cohen et al., 2005, 2007; Kinchington et al., 1988; Sato et al., 2003; Xia et al., 2003; Zhang et al., 2010). Das Gen ORF23, das für das kleine, oberflächliche Kapsidprotein kodiert, ist zwar für die Replikation theoretisch nicht essentiell, eine ORF23-Deletionsmutante führt aber zu einem Replikationsdefizit gegenüber dem WT (Chaudhuri et al., 2008; Zhang et al., 2010). In Analogie zu den Experimenten mit PRV (Smith et al., 2001) wurde ORF23 N-terminal mit eGFP oder mRFP fusioniert, so dass mit G23 bzw. R23 zum Vergleich ein lytisch exprimiertes Kapsidprotein untersucht werden konnte. Außerdem wurde das nicht essentielle, virale Membranprotein 65p N- oder C-terminal mit eGFP fusioniert. Da das zu 65p homologe US9-Protein aus PRV für den axonalen Transport von Viruspartikeln notwendig ist, sollte untersucht werden, ob 65p mit dem Kapsidprotein 23p in den Axonen kolokalisiert. Mit Ausnahme von ORF23 wurden alle ausgewählten Proteine sowohl am N- als auch am C-terminalen Ende fusioniert, da Angaben über mögliche Einflüsse der Positionierung auf die jeweiligen Proteinfunktionen aus der Literatur kaum verfügbar waren. Der korrekte Einbau des eGFP bzw. mRFP wurde durch RFLP-Analyse und Sequenzierung bestätigt. Anschließend wurden die rekombinanten BACs in MeWo-Zellen transfiziert und nach erfolgreicher Rekonstitution hinsichtlich ihrer Replikationsgeschwindigkeit untersucht. Da das WT-Virus HJO und von pHJOpac abgeleitete, rekombinante WT-Virus PAC mit identischer Kinetik replizierten (Wussow et al., 2009), konnte die Replikationsgeschwindigkeit der Mutanten direkt mit der des WT PAC verglichen werden.

Im Fall von ORF4 konnte nur die Virusrekombinante in Zellkultur gehalten werden, bei der ORF4 am N-Terminus mit eGFP fusioniert war. Aus dem BAC mit der Fusion von eGFP am C-Terminus von ORF4 konnte zwar das Virus rekonstituiert werden, die Rep-

likation war aber für stabile Passagen in der permissiven Zellkultur zu langsam. Für die VZV-Replikation ist die transaktivierende Funktion des IE4 auf die Expression der IE-Gene und auf die Promotoren verschiedener E- und L-Proteine wesentlich. Die transaktivierende Funktion bedarf einer 4p-Dimerisierung, die durch zentrale Domänen und ein C-terminales Hexapeptid bewirkt wird. Eine C-terminale Fusion könnte die Dimerisierung und die Transaktivierung so stark beeinflusst haben, dass die Replikation kaum mehr möglich war. Aber auch die N-terminale eGFP-Fusionsvariante von ORF4 war im Vergleich zum WT in der Replikationsgeschwindigkeit leicht eingeschränkt (Abb. 19). Die Interaktion von 4p mit Transkriptionsfaktoren über die Arginin-reichen Domänen (Ra, Rb und Rc) nahe des N-Terminus könnte durch die N-terminale eGFP-Fusion beeinträchtigt worden sein, da Rb und Rc ebenfalls für die transaktivierende Funktion wichtig sind (Baudoux et al., 2000).

Die Rekonstitution der Virusmutanten mit eGFP an ORF21 war mit beiden eGFP-Positionen erfolgreich. Im Vergleich zum WT war die Replikation bei beiden Virusvarianten in ähnlichem Ausmaße beeinträchtigt (Abb. 19). Da das Protein 21p für die Replikation benötigt wird, könnte der eGFP-Anteil essentielle Funktionen des Proteins und infolge dessen die Replikation bei den rekombinanten Viren mit G21 und 21G beeinflusst haben. Allerdings sind 21p-Proteindomänen noch nicht funktionell kartiert worden. In VZV-infizierten Zellen ist 21p mit dem reifenden Nukleokapsid verbunden (Mahalingam et al., 1998), daher könnte infolge der 21p-Veränderung die Maturation der Nukleokapside beeinträchtigt worden sein und damit zur langsameren Replikation geführt haben.

Im Fall von ORF29 konnte nur die Virusrekombinante mit der C-terminalen eGFP-Fusion rekonstituiert werden. Aus dem BAC mit N-terminaler eGFP-Komponente ließ sich auch nach mehreren Transfektionsversuchen und Passagen kein replikationsfähiges Virus herstellen. Mit ORF29-Expressions-Plasmiden wurde gezeigt, dass eine N-terminale Fusion eine unregelmäßige, vesikuläre 29p-Verteilung nach sich zog, was möglicherweise durch die Degradation nicht korrekt gefalteter Proteine verursacht wurde (Stallings & Silverstein, 2005). Da sich im N-Terminus von 29p im Bereich von Aminosäure 9-154 eine nicht-klassische NLS befindet, lokalisieren N-terminal deletierte Mutanten cytoplasmatisch statt nukleär. Eine eGFP-Fusion am N-Terminus könnte sich demnach sowohl auf die korrekte Faltung als auch auf die Lokalisation ausgewirkt und damit die Regulation der Genexpression gestört haben. Dies könnte zum Verlust der Replikationsfähigkeit geführt haben, so dass eine Rekonstitution nicht stattfinden konnte. Allerdings war auch das rekombinante Virus 29G<sub>rVZV</sub> mit einer C-terminalen Fusion nur sehr schwer zu kultivieren und in der Replikation deutlich eingeschränkt, was

auf eine eingeschränkte DNA-Bindungsfähigkeit zurückgeführt werden könnte (Abb. 19). Die Ausbreitung durch Zell-Zell-Fusion schien beeinträchtigt zu sein, da die CPEs sehr klein blieben und sich das Virus im Zellrasen kaum ausbreitete. Erst, als durch eine spontane Mutation im Virusgenom eGFP nicht weiter exprimiert werden konnte, replizierte das Virus wieder schneller. Während also die Fusion am C-Terminus zwar die Replikation beeinträchtigte, führte eine Fusion am N-terminalen Ende des Proteins zur vollständigen Blockade der Replikation, so dass infektiöses Virus nicht gebildet werden konnte.

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe hatte sich die N-terminale Fusion von ORF23 mit eGFP oder mRFP für die Verwendung in rekombinanten Viren bereits bewährt. Daher wurde 23p auch hier nur am N-terminalen Ende mit eGFP oder mRFP fusioniert. Da das Protein 23p aufgrund der Sequenzhomologien zu den HSV-1 Kapsidproteinen in der äußeren Schicht des Nukleokapsids zu finden ist (Chaudhuri et al., 2008), ist anzunehmen, dass der N-Terminus und somit auch das eGFP auf der Außenseite des Viruskapsids lokalisiert ist. Gegen eine C-terminale eGFP-Positionierung spricht das dort lokalisierte SRSRRV-Motiv, das als NLS fungiert. Außerdem würde der C-Terminus von 23p – entsprechend zur Position des N-Terminus – nach innen zum Core zeigen und somit der Platz für weitere Proteine begrenzt sein. Chaudhuri et al. (2008) konnten mit einem C-terminalen ORF23-mRFP-Fusionsgen kein funktionelles Virus herstellen, ebenso führte dort die Deletion von ORF23 zur Inhibition der Replikation, obwohl das Gen nach Zhang et al. (2010) für die Replikation nicht essentiell ist. Aber durch die Insertion eines mRFP-Gens in die Deletionsstelle des ORF23 konnte die Replikationsfähigkeit des Virus wiederhergestellt werden. Demnach ist ein Virus ohne ORF23 doch in der Lage zu replizieren. Aber bestimmte Strukturmerkmale in der genomischen DNA von VZV müssen offenbar aufrecht erhalten bleiben, wie es durch die Insertion des annähernd gleich großen mRFP-Gens möglich war, damit die Replikationsfähigkeit garantiert bleibt (Chaudhuri et al., 2008).

Mit Expressionsplasmiden zeigten Chaudhuri et al. (2008) außerdem, dass eine Deletion des C-terminalen NLS-Motivs SRSRRV oder eine Punktmutation in diesem Bereich zur cytoplasmatischen statt zur nukleären Lokalisation führte. Entsprechend könnte eine C-terminale eGFP-Fusion an ORF23 den Transport des 23p in den Zellkern blockieren. Da 23p zusammen mit dem Protein 33.5p das große Kapsidprotein 41p in den Nukleus transportiert, könnte eine C-terminale eGFP- oder mRFP-Fusion auch die Morphogenese der Nukleokapside stören und so die Replikation und Infektivität einschränken. Bei allen Expressionsplasmiden war ein 16-Aminosäure-Linker zwischen ORF23 und dem C-terminal gelegenen mRFP eingefügt. Ohne diesen Linker

hatte 23p ebenfalls eine cytoplasmatische Verteilung, ohne dass die NLS verändert worden war. Demnach bewirkte mRFP als C-terminaler Fusionspartner von 23p vermutlich Konformationsänderungen, die indirekt auf die NLS wirkten und somit die Replikation in Zellkultur behinderten (Chaudhuri et al., 2008). Auch die hier untersuchte N-terminale eGFP-Fusion von ORF23 zeigte ein reduziertes Replikationsverhalten im Vergleich zum WT PAC (Abb. 20). Somit haben nicht nur Veränderungen am C-Terminus Auswirkungen auf die Funktion des Proteins 23p, sondern auch N-terminale Fusionen, die möglicherweise bezüglich der Bindung von 23p an andere Kapsidproteine und deren Transport in den Nukleus Einfluss nehmen.

Wie bei ORF23 beeinträchtigte auch die Fusion von eGFP an ORF65 die Replikation, obwohl auch 65p *in vitro* für die Replikation nicht essentiell ist (Zhang et al., 2010). Dabei macht die Position des Fusionsanteils keinen Unterschied aus. Beide Virusvarianten, wie auch das Virus G23<sub>rVZV</sub>, hatten eine ähnlich reduzierte Replikationsgeschwindigkeit im Vergleich zum WT PAC (Abb. 20). Da ORF65-Deletionsmutanten eine normale Replikationsgeschwindigkeit aufweisen (Cohen et al., 2001; Niizuma et al., 2003), sollten durch eGFP bedingte Konformationsänderungen von 65p theoretisch keinen Einfluss auf die Replikation haben. Mögliche Ursachen wären in einer Hemmung von Transportvorgängen oder in strukturellen Veränderungen der VZV-DNA zu suchen, die durch das Einfügen des eGFP-Leserahmens entstanden sein könnten.

Im Fall des „Zweifarbigen“-Virus G65R23<sub>rVZV</sub>, bei dem sowohl ORF65 als auch ORF23 mit eGFP bzw. mRFP fusioniert war, verstärkten sich die negativen Auswirkungen der beiden Genfusionen und die Replikationsgeschwindigkeit des Virus G65R23<sub>rVZV</sub> war etwas stärker beeinträchtigt als die der Einzelfusionsviren G65<sub>rVZV</sub> und G23<sub>rVZV</sub> (Abb. 20). Bei dem Doppelfusionsvirus war auffällig, dass infizierte Zellen schneller als gewöhnlich abstarben. Wegen der langsameren Replikationsgeschwindigkeit konnte dieses Virus nur dann kultiviert werden, wenn die Passagierung durch Kokultivierung infizierter mit uninfizierten Zellen alle drei bis vier Tage stattfand. Nach sieben Tagen waren in der Regel die meisten infizierten Zellen bereits tot, so dass eine weitere Kultivierung dann nicht mehr möglich war. Anhand von Xenotransplantaten menschlicher Haut in immundefizienten Mäusen konnten Chaudhuri et al. (2008) zeigen, dass das Protein 23p *in vivo* für die Infektivität in humanen Hautzellen notwendig ist. Auch wenn 23p für die VZV-Replikation in MeWo-Zellen nicht essentiell ist, waren bei der Infektion mit einer ORF23-Deletionsmutante die Plaquegröße und die Replikationsgeschwindigkeit erheblich kleiner als beim WT. Wenn der Kapsidzusammenbau durch eine Deletion des 23p oder durch eine Proteinfusion gestört ist, scheint sich dies auf die Ausbreitung des Virus von Zelle zu Zelle auszuwirken. Obwohl 65p selbst keine Funktion im

Replikationsgeschehen hat, war bei dem doppelt veränderten Virus die Replikationsgeschwindigkeit so vermindert, dass sich das Virus nicht schnell genug ausbreiten konnte. Das führte dazu, dass die infizierten Zellen im CPE starben, bevor das Virus die benachbarte Zelle infizieren konnte.

Während die Replikationskinetiken zeigten, dass die rekombinanten Viren im Vergleich zum WT PAC eingeschränkt replizierten, konnte dies für die konventionelle Passagierung dieser Viren aber kaum bestätigt werden. Nur die Virusrekombinanten 29G<sub>rVZV</sub> und G65R23<sub>rVZV</sub> waren merklich schwieriger zu kultivieren als der WT. Bei den Titrationsexperimenten, die immer auf derselben Charge von MeWo-Zellen durchgeführt wurden, war auffällig, dass parallel durchgeführte Titrationsversuche verschiedener Viren unabhängig vom Virus einen ähnlichen Kurvenverlauf zeigten. Die Replikationskinetik scheint demnach auch abhängig von dem Passagenalter der kultivierten permissiven MeWo-Zellen zu sein, da sich der Kurvenverlauf je nach Passage änderte, sich aber bei verschiedenen rekombinanten Viren bei gleicher Passagenzahl ähnelte.

### 5.1.2 Expression der Fusionsgene

Die Expression der Fusionsgene wurde einerseits auf Transkript-Ebene und andererseits auf Protein-Ebene überprüft, ob nach Einbau des eGFP-Leserahmens die erwarteten Größenänderungen der betroffenen DNA- und Proteinbanden auftraten und ob alle Fusionsgene und -proteine nachweisbar waren. Für alle Fusionsgene konnten die Transkripte nach RT-PCR mit erwarteten Größen im Agarosegel dargestellt werden (Abb. 10, 15, 16).

Auch der Proteinnachweis war für alle Fusionsproteine positiv. Das Protein 4p oder IE4 ist ein Phosphoprotein des Teguments mit 51 kDa. Zusammen mit eGFP mit 27 kDa ergibt G4 ein Fusionsprotein von 78 kDa. Im Immunblot mit dem GFP-Antikörper konnte das G4 bei etwa 80 kDa nachgewiesen werden, was der bekannten Proteingröße von 51 kDa für 4p entspricht (Abb. 11). Als IE-Gen wird der ORF4 sehr stark exprimiert. Daher war die im Immunblot nachgewiesene G4-Proteinmenge sehr hoch, obwohl deutlich geringere Proteinmengen im Vergleich zu den anderen Lysaten aufgetragen worden waren, was durch den  $\beta$ -Aktin-Nachweis bestätigt wurde.

Das ORF21-Genprodukt hat aufgrund seiner Aminosäuresequenz eine erwartete Größe von 115 kDa. Da es keinen bekannten posttranslationalen Modifikationen unterliegt (Cohrs et al., 2002), wurden die Fusionsproteine G21 und 21G im Immunblot bei etwa 140 kDa erwartet. Das Protein 21G wurde an der Position von ca. 135 kDa detektiert, was der Größe von 21p mit 115 kDa entsprechen könnte. Dagegen hatte das Protein

G21 im Immunblot eine etwas niedrigere Position mit knapp unter 130 kDa, was auf eine Größe des 21p-Anteils von weniger als 115 kDa schließen lässt (Abb. 11). Die Kontrollsequenzierung und der Nachweis auf Transkript-Ebene schlossen aber alle Zweifel am korrekten Einbau des eGFP-Leserahmens vor dem ORF21 aus, da der amplifizierte Bereich den gesamten eGFP-Leserahmen und den Beginn des ORF21 umfasste (Abb. 10). Konformationsänderungen sollten nach der denaturierenden Gelelektrophorese eigentlich unauffällig bleiben und keinen Größenunterschied zeigen. Eine durch Degradation verkürzte Form des G21 hätte vermutlich einen Funktions- oder Lokalisationsunterschied im Vergleich zu 21G hervorgerufen, der aber nicht zu beobachten war. Falls 21p doch posttranslational phosphoryliert würde, hätte eine Fusion am N-Terminus dies verhindert haben können, so dass das Protein eine geringere Größe aufweisen würde. Da 21p zwar mögliche Phosphorylierungsstellen besitzt, aber während der lytischen Infektionsphase nicht phosphoryliert wird, werden eher andere Gründe für die geringere Proteingröße im Immunblot vorliegen, wie z.B. eine besonders stabile Konformation bestimmter Proteindomänen.

Das mit eGFP fusionierte 29p konnte im Immunblot bei 140-145 kDa nachgewiesen werden, was für ca. 120 kDa für das *major DNA-binding protein* sprechen würde (Abb. 10). Allerdings gibt es unterschiedliche Angaben zu der zu erwartenden Größe des 29p. Stallings & Silverstein (2005) berichteten für 29p eine Größe von 120 kDa, zitierten aber Kinchington et al. (1988), die das DNA-Bindeprotein mit 130 kDa nachwiesen. Diese Größe weicht vermutlich aufgrund von unterschiedlichen Experiment-Durchführungen ebenfalls von der von Roberts et al. (1985) beschriebenen Größe mit 125 kDa ab. Zuletzt kalkulierten Lenac Rovis et al. (2013) für 29p 130 kDa, lieferten aber dazu keine experimentellen Ergebnisse. Die im Immunblot nachzuweisende Größe von 29p hängt somit anscheinend unter anderem von experimentellen Faktoren ab, denn das Protein 29p unterliegt keinen Phosphorylierungen (Cohrs et al., 2002). Aber andere Modifikationen könnten durchaus eine Rolle gespielt haben.

Stallings & Silverstein (2006) konnten zeigen, dass ORF29p posttranslational ubiquitiniert oder auch sumoyliert (*small ubiquitine molecules*, kleine Ubiquitin-Moleküle) und somit unter anderem für die Degradation markiert wird. Daher können vergrößerte wie auch verkürzte Formen des 29p in der Zelle vorkommen. Das am häufigsten vorkommende 29p-Peptid, das aber noch ubiquitiniert oder sumoyliert bleibt, hat 105 kDa, wobei die Funktion dieser posttranslationalen Modifikationen noch ungeklärt ist. Die Degradation markierter 29p-Moleküle durch das 26S-Proteasom erfolgt nach Stallings & Silverstein (2006) in einigen Zellen neuronalen Ursprungs, in MeWo-Zellen oder in Epithelzellen (293T-Zellen). Ob die Degradation auch in Fibroblasten erfolgt, ist nicht

bekannt. Das von Kinchington et al. (1988) detektierte 130 kDa-Protein könnte also eine posttranslational modifizierte und nicht degradierte Form des 29p gewesen sein. Denn sowohl Kinchington et al. (1988) als auch Roberts et al. (1985) setzten für ihre Experimente Fibroblasten ein. Da die Degradation am N-terminalen Ende des Proteins stattfindet, fehlt anschließend die NLS, so dass die Proteine auf das Cytoplasma beschränkt sind. Nur ubiquitinierte, nicht degradierte 29p-Proteine lokalisieren sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern. Bei dem hier detektierten 120 kDa-Protein könnte es sich also um eine partiell degradierte 29p-Form handeln. Allerdings waren die Auftrennungsbedingungen für einen höher molekularen Bereich von ca. 130 kDa suboptimal.

Das Protein 23p besitzt sechs Serine und sieben Threonine als mögliche Phosphorylierungsstellen und weist daher im Immunblot eine Größe von 26 bis 30 kDa auf (Chaudhuri et al., 2008). Der Nachweis von G23 mit dem Anti-GFP führte zu einer Bande mit etwa 55 kDa. Dies entspricht 28 kDa für den 23p-Anteil im phosphorylierten Zustand (Abb. 11).

Das Protein 65p ist ein Typ II-Transmembranprotein von vorhergesagten 11 kDa (Davison & Scott, 1986). Aber nach Phosphorylierungen durch die Casein-Kinase II an den Serinen in der sauren Domäne des C-Terminus lässt sich 65p im Immunblot bei 16 kDa detektieren (Cohen et al., 2001). Die Fusionsproteine G65 und 65G wiesen unterschiedliche Größen auf (Abb. 17). Während die 65G-Bande etwa bei 37 kDa detektiert wurde, was den 11 kDa für unphosphoryliertes 65p entspricht, war G65 mit zwei Banden nachzuweisen. Die größere Bande wurde bei etwa 40 kDa detektiert. Für eine Größe von 16 kDa im phosphorylierten Zustand hätte die Bande aber bei 43 kDa laufen müssen. Entsprechend könnte hier der 65p-Anteil des G65 mit nur einem phosphorylierten Serin vorliegen, da der 65p-Anteil von G65 ca. 13 kDa umfasst. Eine C-terminale Fusion von eGFP an 65p scheint sich also auf den Phosphorylierungsgrad auszuwirken, da das 65G im Gegensatz zum phosphorylierten G65 unphosphoryliert vorlag. Die kleinere G65-Bande mit schwächerer Intensität hatte etwa 30 kDa, was darauf hindeutet, dass in geringen Mengen vorhandenes, freies eGFP detektiert wurde.

Bei dem Nachweis der Fusionsproteine aus G65R23<sub>vzv</sub> infizierten Zellen zeigte sich für das Fusionsprotein R23 ein anderes Bild als für G23. Bei der Detektion des R23 mit Anti-RFP zeigten sich sowohl im Einzelnachweis als auch bei paralleler Verwendung von zwei Antikörpern zwei Banden bei etwa 53 kDa und 57 kDa (Abb. 18). Entsprechend der Größe von mRFP mit 27 kDa konnte demnach eine unphosphorylierte Form mit 26 kDa und eine phosphorylierte Form von 23p mit 30 kDa nachgewiesen werden. Auch für das G65 wurden zwei Banden detektiert. Zum einen wurde erneut die

kleinere, schwache 30 kDa-Bande nachgewiesen, die für freies eGFP-Protein sprechen würde. Zum anderen wurde eine Bande mit etwa 40 kDa detektiert, die erneut einen 65p-Anteil von ca. 13 kDa mit einfach phosphoryliertem Serin darstellen könnte (Abb. 18). Bei dem Doppelnachweis lief diese Bande etwas niedriger. Hier zeigten sich auch mehrere Banden ober- und unterhalb der GFP-Kontrolle bei 25-30 kDa. Da mit dem GFP-Antikörper ein polyklonaler Antikörper zur Detektion eingesetzt worden war, waren mögliche Kreuzreaktionen nicht auszuschließen. Insgesamt ließen sich also alle durch die rekombinanten Viren exprimierten Fusionsproteine im Immunblot weitgehend so darstellen, wie es nach der bekannten Proteingröße erwartet wurde.

## **5.2 Lokalisationsbestimmungen für die viralen Fusionsproteine**

### **5.2.1 Lokalisation bei der Replikation in permissiven Zelllinien**

Den ersten Eindruck von der intrazellulären Lokalisation und den Fluoreszenzstärken der fusionierten Proteine vermittelten Fluoreszenzaufnahmen infizierter MeWo-Zellen und primärer Fibroblasten mit dem Fluoreszenzmikroskop. Die unterschiedlichen Fluoreszenzmuster der CPEs, die durch die Infektion mit Fusionsprotein-exprimierenden Virusrekombinanten entstanden, ließen einen ersten Schluss auf ihre zelluläre Lokalisation zu (Abb. 21). Während das Fluoreszenzmuster der Viren 29G<sub>rVZV</sub> und G23<sub>rVZV</sub> punktförmig war und auf eine Lokalisation der Proteine im Zellkern hindeutete, waren die Fluoreszenzmuster bei den anderen Viren eher breiter gestreut und hatten nur punktuell stärkere Fluoreszenzintensitäten. Dies legte nahe, dass diese Proteine vor allem im Cytoplasma lokalisierten und einzelne Anreicherungspositionen aufwiesen, wie z.B. die 65p-Fusionsproteine mit stärkeren Fluoreszenzsignalen im TGN. Die Lokalisation der während der Infektion exprimierten Fusionsproteine entsprach weitgehend den Erwartungen aus den publizierten Ergebnissen für die exprimierten Proteine in Wildtyp-Konfiguration.

Die genauen Lokalisationsbestimmungen der Fusionsproteine wurden am konfokalen Mikroskop drei Tage nach der Infektion durchgeführt, also erst während der späten Infektionsphase. In der sehr frühen lytischen Infektionsphase ist das 4p als Transaktivator nukleär verteilt, in der späten Phase dagegen cytoplasmatisch (Defecheraux et al., 1997). Hier konnte das G4 nach drei Tagen sehr deutlich im Cytoplasma detektiert werden (Abb. 23). Da aber auch schwache Signale im Zellkern sichtbar waren, lag hier wahrscheinlich der Übergang von der frühen zur späten Infektionsphase vor. Im Cytoplasma war die Fluoreszenzintensität sehr hoch, was der im Immunblot nachgewiesenen sehr starken Expression entspricht.

Die Lokalisation des Proteins 21p wurde durch die N- oder C-terminale Position des Fusionsanteils nicht beeinflusst. Beide Varianten zeigten die gleiche, unstrukturierte Verteilung im Cytoplasma und im Zellkern, stets mit schwachen Fluoreszenzsignalen, nur im perinukleären Regionen waren stärkere Signale sichtbar (Abb. 24, 25). Diese Lokalisation im Cytoplasma und Zellkern wurde für das nativ exprimierte Protein auch durch Lungu et al. (1998) gezeigt. Die genaue Funktion des 21p ist noch nicht geklärt. Dieses früh exprimierte Protein ist aber essentiell für die Replikation. Daher wurde ähnlich zu 4p eine starke Expression und damit ein starkes Fluoreszenzsignal erwartet, die durch eGFP bedingte Konformationsänderungen reduziert worden sein könnten. Dies ist aber wenig wahrscheinlich, da nicht nur eine, sondern beide Fusionspositionen zu schwachen Signalen führten und dies auch im Immunblot bestätigt wurde. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass 21p auch im Golgi-Apparat lokalisieren kann (Lenac Rovis et al., 2013), was die Fluoreszenzsignale, die mit stärkeren, punktförmigen Signalen im perinukleären Bereich nachgewiesen wurden, bestätigt (Abb. 24, 25). Da 21p mit dem reifenden Nukleokapsid verbunden wird (Mahalingham et al., 1998), könnte sich der Nachweis von 21p in perinukleären Strukturen dadurch erklären, dass das Kapsid beim Übergang aus dem rauen endoplasmatischen Retikulum in das Cytoplasma die erste Umhüllung wieder verliert und in unbehüllter Form in das TGN wandert.

Die zelluläre Verteilung des Proteins 29p entsprach derjenigen, die von Cohrs et al. (2002) für das nativ exprimierte Protein beschrieben wurde (Abb. 26). Das 29G lokalisierte mit starker Fluoreszenzintensität in punktförmiger oder globulärer Form ausschließlich im Zellkern (Reichelt et al., 2009). In der frühen Phase hat 29p regulatorische Funktionen in der Genexpression und ist als DNA-Bindeprotein essentiell für die Replikation (Cohrs et al., 2002; Kinchington et al., 1988). Eine diffuse cytoplasmatische Verteilung, wie sie von Stallings et al. (2005) gezeigt wurde, konnte hier allerdings nicht beobachtet werden. Nach Stallings & Silverstein (2006) lokalisiert Ubiquitin-markiertes, undegradiertes 29p im Cytoplasma und im Nukleus. Die beschriebene diffuse Färbung von 29p könnte demnach Formen von degradiertem 29p entsprechen, welche in den aktuellen Experimenten aber nicht auftraten. Degradierten Formen des 29p fehlt die NLS, weswegen diese Peptide nur im Cytoplasma vorkommen (Stallings & Silverstein, 2006).

Das Kapsidprotein 23p hatte in den permissiven Zellen eine ähnliche Verteilung wie das Protein 29p (Abb. 27). Das Kapsidprotein lokalisierte mit starker Intensität im Nukleus. Allerdings konnte 23p auch mit schwachen, diffusen Signalen im Cytoplasma beobachtet werden. Im Cytoplasma lokalisiert das 23p während des Transports des ORF40p in den Nukleus. Da aber der Zusammenbau der Nukleokapside im Nukleus

stattfindet, ist 23p hauptsächlich nukleär nachzuweisen. Erst im Rahmen der Morphogenese und Virusfreisetzung ist 23p in erheblichem Umfang im Cytoplasma zu erwarten.

Das Protein 65p lokalisiert wie sein Homolog US9 von PRV vor allem im TGN (Abb. 31). Da es ein endständig verankertes Membranprotein mit Typ II-Topologie ist, liegt das C-terminale Ende des Proteins außerhalb der Zellmembran, während der N-Terminus in das Cytosol zeigt. Wenn 65p mit eGFP an seinem C-Terminus markiert ist, kann es auch ohne Permeabilisierung der Zellmembran an der äußeren Membran mit einem primären GFP-Antikörper und einem rot fluoreszierenden sekundären Antikörper sichtbar gemacht werden, während das intrazelluläre eGFP im TGN unangefärbt grün fluoresziert (Lyman et al., 2008). Außerhalb der Zelle ist eGFP aufgrund des zum Cytosol veränderten pH-Werts nicht fluoreszent und wäre ohne eine Antikörper-Färbung nicht sichtbar. Daher konnte auch beim Fusionsprotein 65G keine Fluoreszenz auf der Membran detektiert werden (Abb. 29). Da bei G65 der eGFP-Anteil in das Cytosol zeigt, waren Fluoreszenzsignale entlang der Zellmembran sichtbar (Abb. 31). Wesentlich öfter konnte G65 dagegen im TGN und in perinukleären Membranstrukturen gezeigt werden (Abb. 28), während das Protein 65G hauptsächlich im TGN und nur einmal perinukleär beobachtet werden konnte (Abb. 29). Eine Erklärung wäre, dass die C-terminal fusionierte eGFP-Komponente durch die Nähe zum Transmembranmotiv die Membranlokalisierung gestört haben könnte. Beide Fusionsproteine hatten nur eine schwache Fluoreszenzintensität, die bei der C-terminalen Markierung noch schwächer war als bei der N-terminalen Variante, was auch der schwachen Signalstärke der 65G-Bande im Immunblot entsprach. Eine mögliche Störung der Integration in Membranen könnte am ehesten sowohl die besonders schwache Fluoreszenzintensität des 65G erklären, als auch die geringe Detektion von 65G in perinukleären Membranstrukturen.

Die Lokalisationsorte der Fusionsproteine R23 und G65 ließen sich auch in G65R23<sub>rVZV</sub>-infizierten MeWo-Zellen und Fibroblasten bestätigen (Abb. 30). Das Fusionsprotein R23 war wie G23 vor allem nukleär mit starken Fluoreszenzsignalen verteilt, während G65 mit schwacher Fluoreszenzintensität wieder im TGN und in perinukleären Membranstrukturen zu detektieren war.

Die Lokalisationsorte der hier untersuchten Fusionsproteine entsprachen denen aus der Literatur bekannten Lokalisationen. Auch das zunächst zu der bekannten Lokalisation abweichende Fluoreszenzmuster des 21p kann durch die kürzlich publizierten Daten von Lenac Rovis et al. (2013) erklärt werden. Das Fusionsprotein G65 war neben der bekannten Lokalisation im TGN auch in perinukleären Strukturen nachweisbar. Diese Lokalisation konnte für das 65G kaum gezeigt werden, da möglicher-

weise die Membranlokalisation aufgrund der Nähe des C-terminalen eGFP-Fusionsanteils zum Transmembranmotiv beeinträchtigt war.

### **5.2.2 Lokalisation in infizierten sensorischen Neuronen**

Die Lokalisation der Fusionsproteine wurde nach der Infektion permissiver Zellen zusätzlich in einem dritten Zelltyp, den sensorischen Neuronen untersucht. Gerade die Proteine 4p, 21p und 29p ändern ihre Lokalisation, wenn sie während der Latenz in neuronalen Zellen exprimiert werden. Durch Kokultivierung mit infizierten Fibroblasten wurden die Ratten-Neurone allerdings lytisch infiziert und eine längerfristige Latenz konnte nicht beobachtet werden. Nach Gershon et al. (2008) sollte eine latente Infektion von Neuronen mit zellfreiem VZV möglich sein, wie es dort für enterische, vegetative Neurone von Meerschweinchen gezeigt wurde. Diese Vorgehensweise war aber auf sensorische Ratten-Neurone nicht übertragbar. Zwar gelang es, Fibroblasten mit zellfreiem Virus zu infizieren, aber sensorische Neurone ließen sich nicht nachweislich lytisch oder gar latent infizieren. In latent infizierten Zellen wären nach Lungu et al. (1998) alle Proteine, die während der Latenz exprimiert werden, nur im Cytoplasma nachweisbar. Ob dies auch auf die klinische Situation im Patienten übertragbar ist, wird kontrovers diskutiert.

Das 4p ist in lytisch infizierten Zellen als Transaktivator der  $\beta$ -Gene zunächst nukleär und später hauptsächlich cytoplasmatisch verteilt. Während der Latenz in Neuronen, in der die Genexpression bis auf wenige Transkripte stillgelegt ist, ist die Lokalisation auf das Cytoplasma beschränkt. Erst nach der Reaktivierung verteilt sich das 4p auch wieder im Zellkern (Lungu et al., 1998), da es erneut Funktion als Transaktivator übernimmt. Mit konfokalen Aufnahmen konnte hier in den lytisch infizierten, sensorischen Ratten-Neuronen 4p mit starker Fluoreszenzintensität im Cytoplasma detektiert werden und mit schwachen Signalen auch im Nukleus (Abb. 32). Die Lokalisation ist also vergleichbar mit derjenigen in den permissiven Zelltypen. In den Axonen der Neurone konnte das Protein G4 ebenfalls beobachtet werden. Da die Neurone lytisch infiziert waren, könnte es also sein, dass sich Viruspartikel mit Tegument-assoziiertem 4p durch retrograden Transport der Virionen von Neuron zu Neuron ausgebreitet hatten. Für die direkte Ausbreitung über Zell-Zell-Fusion waren die Neurone nicht dicht genug ausgesät.

Die Lokalisationsmuster der beiden Fusionsproteine des 21p unterschieden sich nicht voneinander (Abb. 33, 34). Beide Fusionsproteine konnten in den lytisch infizierten Neuronen – wie in den MeWo-Zellen und primären Fibroblasten – sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern mit schwachen Fluoreszenzsignalen detektiert werden. Nur in

den perinukleären Regionen gab es stärkere Signale, die schon in den infizierten, permissiven Zellen detektiert wurden und dafür sprechen könnten, dass unbehüllte Kapside, mit denen 21p assoziiert ist, auf dem Weg ins TGN detektiert wurden.

Da es als früh exprimiertes Protein Funktion in der Genexpression übernimmt, wie z.B. die Verstärkung der Expression IE-62-abhängiger Promotoren (Boucaud et al., 1998), ist 29p in lytisch infizierten nicht-neuronalen und neuronalen Zellen hauptsächlich im Nukleus lokalisiert (Cohrs et al., 2002; Lungu et al., 1998). Nach der Reaktivierung aus der Latenz, in der kaum Genexpression stattfindet und das Protein im Cytoplasma zu finden ist, verteilt sich das Protein 29p im Nukleus und im Cytoplasma (Lungu et al., 1998). Aber die Lokalisation des E-Proteins 29p hängt nicht nur vom lytischen oder latenten Infektionsstatus ab, sondern ist auch vom Zelltyp abhängig, da es sich in Zellen wie enterischen Neuronen aus Meerschweinchen oder aus Astrozytomen abstammenden Zellen (Gehirntumor aus Gliazellen) im Cytoplasma befindet (Stallings et al., 2006). Durch die Proteasomaschinerie wird ubiquitiniertes 29p N-terminal verkürzt, wodurch es die Fähigkeit zur nukleären Lokalisation verliert. In diesen Zellen ist das modifizierte 29p infolge der Degradation der N-terminalen NLS auf das Cytoplasma beschränkt. Die Modifikation verbunden mit der Degradation wirkt sich demnach in verschiedenen Zelltypen unterschiedlich auf die Lokalisation von 29p aus. In dieser Arbeit konnte das Protein in 29G<sub>VZV</sub>-infizierten Neuronen sowohl im Cytoplasma als auch im Nukleus detektiert werden (Abb. 35). Im Zellkern war das Protein allerdings in größeren Mengen nachweisbar als im Cytoplasma, was der Lokalisation nach Lungu et al. (1998) entsprach und wie es für ein Replikations-essentielles Protein erwartet wurde. Obwohl 29p während der Primärinfektion auch in Axonen nachweisbar ist (Annunziato et al., 2000), konnte 29G hier dagegen in den Axonen nicht beobachtet werden.

Als spät exprimiertes Kapsidprotein wird 23p nur während der lytischen Infektionsphase gebildet und ist in permissiven Zellen hauptsächlich im Nukleus zu finden. Über das Lokalisationsmuster von 23p in sensorischen Ratten-Neuronen gibt es bisher kaum Berichte. Bekannt ist, dass 23p in aus pluripotenten Stammzellen differenzierten humanen Neuronen hauptsächlich nukleär vorliegt (Markus et al., 2011). In den in dieser Arbeit infizierten Neuronen war 23p mit starken Fluoreszenzintensitäten sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma zu detektieren (Abb. 36). Dabei war die nukleäre Verteilung etwas stärker. Die hier in Neuronen beobachtete 23p-Verteilung ähnelt somit der Lokalisation während der lytischen, permissiven Infektion von MeWo-Zellen und Fibroblasten.

**Tab. 14:** Übersicht über die Lokalisation der einzelnen Fusionsproteine während der Infektion in MeWo-Zellen, Fibroblasten und sensorischen Neuronen. N: Nukleus, C: Cytoplasma; TGN: Trans-Golgi-Netzwerk, M: Membranstrukturen, >>: stärker als.

Protein	Lokalisation					
	Lytisch infizierte MeWo-Zellen und Fibroblasten (diese Arbeit)	Lytisch infizierte nicht-neuronale Zellen (Cohen et al., 2001; Lungu et al., 1998; Reichelt et al., 2009)	Infizierte Neurone (diese Arbeit)	Infizierte Neurone (Lungu et al., 1998; Markus et al., 2011)	Infizierte Neurone nach Reaktivierung (Lungu et al., 1998)	Latenz (Lungu et al., 1998)
4p	C >> N	N+C	C >> N	C >> N	N + C	C
21p	N + C	N >> C	C >> N	C >> N	N + C	C
29p	N	N >> C	N >> C	N >> C	N + C	C
23p	N >> C	N >> C	N >> C	N >> C		-
65p	TGN/M	TGN/M	C			-

Das Phosphomembranprotein 65p ist wie 23p ebenfalls ein spät exprimiertes Protein, das während der Latenz nicht produziert wird. In den lytisch infizierten Neuronen lokalisierte es im Cytoplasma (Abb. 37, 38). Nur G65 konnte in wenigen Zellen mit geringer Intensität in Membranstrukturen beobachtet werden. Es könnte sich dabei sowohl um die Zellmembran als auch perinukleäre Strukturen gehandelt haben. Da der eGFP-fusionierte N-Terminus in das Cytosol zeigte, war das eGFP innerhalb der Zelle entlang der Zellmembran fluoreszent. Und auch die Membranlokalisierung war nicht beeinträchtigt wie beim 65G. Bei 65G konnten neben der diffusen Verteilung mit schwachen Signalen auch globuläre Verteilungsmuster mit stärkeren Signalen detektiert werden. Das Protein 65p lokalisierte in Neuronen zwar wie in den permissiven Zelllinien auch im Cytoplasma, konnte aber nicht in Membranstrukturen gezeigt werden, da vermutlich die Membranlokalisierung durch die Fusion des eGFP nahe des Transmembranmotivs gestört war. Die Identität der globulären Fluoreszenzsignale ist noch unbekannt. Auch in G65R23<sub>rVZV</sub>-infizierten sensorischen Neuronen ließen sich diese Lokalisationsmuster für die Fusionsproteine R23 und G65 darstellen (Abb. 39). Während R23 im Cytoplasma und im Nukleus detektiert wurde, war G65 im Cytoplasma verteilt.

In der Tab.14 sind die beobachteten Lokalisationen der viralen Fusionsproteine zusammengefasst dargestellt. Während der lytischen Infektionsphase lag 4p hier hauptsächlich im Cytoplasma vor und nur in geringen Mengen im Nukleus von infizierten MeWo-Zellen oder Fibroblasten. In Neuronen konnte es ebenfalls mit starker Intensität im Cytoplasma nachgewiesen werden und kaum im Zellkern. Das früh exprimierte 21p

war sowohl in den permissiven MeWo-Zellen und Fibroblasten als auch in den Neuronen über die gesamte Zelle verteilt. In den Neuronen lokalisierte es allerdings stärker im Cytoplasma und an der Kernmembran statt im Nukleus.

Beim früh exprimierten 29p änderte sich die Verteilung zwischen lytischer Infektion in humanen Zellen und der Infektion von Neuronen nur wenig. Das Protein lag hauptsächlich nukleär vor und nur in den Neuronen ein wenig cytoplasmatisch, wie es auch von Lungu et al. (1998) beschrieben war. Die von Stallings & Silverstein (2006) beobachtete, durch Degradation bedingte cytoplasmatische Lokalisation von 29p in lytisch infizierten, enterischen neuronalen Zellen, ließ sich hier nicht beobachten. Das spät exprimierte Protein 23p war in allen drei Zelltypen wie erwartet im Cytoplasma und im Nukleus zu detektieren, dabei stärker im Zellkern als im Cytoplasma. In MeWo-Zellen und Fibroblasten konnte 65p im TGN und perinukleären Membranstrukturen gezeigt werden, auch bei der Infektion der Neurone hatte 65p eine cytoplasmatische Verteilung, die aber offensichtlich nicht auf das TGN beschränkt war.

### 5.3 Retrograde und anterograde Infektionswege

Das Protein 65p könnte als Homolog zum US9 von PRV eine Funktion im axonalen Transport der VZV-Partikel haben, auch wenn es die Funktion im anterograden Transport in PRV-US9-Deletionsmutanten nicht ersetzen kann (Lyman et al., 2009). Damit eine mögliche Kolo-kalisation des 65p mit dem Kapsidprotein 23p in Axonen untersucht werden konnte, wurde das Virus G65R23<sub>rVZV</sub> hergestellt. Im *microfluidic chamber*-System wurden sensorische Neurone räumlich getrennt von den infizierten bzw. uninfizierten Zellen ausgesät, um so die fluoreszenzmarkierten Virusproteine auf retrogradem und anterogradem Infektionsweg im Axon zu beobachten. Generell war die Infektion der Neurone in diesen Kammern nur schwer zu erreichen. Während die Infektion auf anterogradem Weg nicht erzielt werden konnte, wurde die retrograde Infektion dokumentiert (Abb. 41). Die Effizienz, Neurone retrograd zu infizieren, war bei dem Virus G4<sub>rVZV</sub> stärker als bei G65R23<sub>rVZV</sub>. Auch schon bei Infektionsversuchen zur Bestimmung der Proteinlokalisationen ließen sich die Neurone mit dem Virus G65R23<sub>rVZV</sub> weniger effizient infizieren als mit anderen Viren. Obwohl auch hohe Infektionsraten der Neurone erreicht werden konnten, war der anterograde axonale Transport nicht nachweisbar. Weder durch Kokultivierung mit MeWo-Zellen noch mit primären Fibroblasten konnte dieser Infektionsweg erzielt werden.

Da dieser Transportweg nicht realisierbar war, kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob 65p von VZV die Funktion seines Homologs ausübt und für die anterograde Ausbreitung in Neuronenkulturen essentiell ist. Der rückwärts gerichtete Infektionsweg

blieb auch mit dem Virus G4<sub>VZV</sub> erfolglos. Daher wird es wahrscheinlich nicht an einem möglichen Verlust der 65p-Funktion gelegen haben, dass dieser Infektionsweg nicht möglich war. Da 65p im PRV-Hintergrund die Funktion von US9 im anterograden Transport nicht ersetzen kann (Lyman et al., 2009), bleibt es möglich, dass 65p an der axonalen Ausbreitung der VZV-Partikel nicht beteiligt ist. Andererseits beeinflusst die eine C-terminale eGFP-Fusion an US9 bei PRV die anterograde Ausbreitung in Neuronen. Mutanten, die ein US9-GFP-Protein exprimierten, waren nicht mehr in der Lage, sich über axonalen, rückwärts gerichteten Transport auszubreiten (Lyman et al., 2008). Demnach war offenbar nicht die N-terminal fusionierte G65-Virusmutante limitierend, sondern die begrenzten Möglichkeiten, in den *microfluidic chambers* die Neurone auf dem anterograden Weg zu infizieren.

Auch für den retrograden axonalen Transport waren die Infektionsbedingungen noch zu wenig effizient, so dass der Transport der viralen Proteine durch *Life Cell Imaging* nicht kontinuierlich beobachtet werden konnte. Die am ehesten aussichtsreichen Bedingungen dürften sich mit der Infektion durch zellfreies Virus ergeben. Hiermit könnte die Schwierigkeit der Infektion durch Zell-Zell-Kontakte vermieden und somit die Infektionseffizienz gesteigert werden. Außerdem könnten so Bedingungen geschaffen werden, die besser der latenten Infektion von Neuronen entsprechen.

Eine Kolokalisation von 65p mit 23p konnte zwar beobachtet werden, da im Axon einzelne gelb gefärbte Partikel sichtbar waren (Abb. 42). Aber da vor allem grüne und rote Partikel zu erkennen waren, ist es eher wahrscheinlich, dass 65p und das Kapsid im Wesentlichen separat transportiert wurden und es nur gelegentlich zu Überlagerungen im Axon gekommen war. Da die Neurone nicht kontinuierlich mit Beginn des retrograden Transports beobachtet wurden, sondern aufgrund der niedrigen Effizienz erst nachdem das Soma des Neurons ein starkes Fluoreszenzsignal aufwies, ließ sich nicht feststellen, in welche Richtungen die rot und grün fluoreszierenden viralen Partikel transportiert wurden. Die Überlagerung kann durch das zufällige Aufeinandertreffen von Kapsidprotein und 65p zustande gekommen sein, die in unterschiedliche Richtungen transportiert wurden. Denn Dynein ist als Motorprotein für den axonalen Transport in retrograde Richtung verantwortlich, kann aber auch in die anterograde Richtung wechseln.

Um eine definierte Aussage über die Rolle von 65p im axonalen Transport treffen zu können, müssten die Infektionsbedingungen für einen anterograden Infektionsweg optimiert werden. Denn obwohl das 65p hier offensichtlich keine Rolle im retrograden Transport spielte, kann ohne funktionierenden, anterograden Infektionsweg keine Aussage getroffen werden, ob das 65p nicht doch ein „axonales Leitprotein“ ist.

#### 5.4 Sequenzeigenschaften des klonierten VZV-Wildtyp-Genoms

Mit dem *deep sequencing* wurde die Intaktheit des für die Herstellung der Virusmutanten verwendeten BACs pHJOpac bestätigt (Wussow et al., 2009). Weder durch die Cosmid-Komplementation (Schmidt et al., 2003) noch durch den Einbau des BAC-Vektors und seine spätere Transposition (Wussow et al., 2009) haben sich gravierende Veränderungen im VZV-Genom ergeben. Außerdem wurden nur wenige geringfügige Sequenzunterschiede zwischen dem BAC pHJOpac und der ursprünglichen aus Cosmid-Klonen erstellten HJO-Sequenz identifiziert.

Zwei Basensubstitutionen traten auf, die innerhalb eines Leserahmens lagen. Eine davon lag in ORF28, bei der es sich aber um eine stumme Mutation handelte, die somit keine Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz und damit auf die Funktion des Proteins hatte. Eine weitere Basensubstitution fand innerhalb des repetitiven Bereiches R3 im ORF22 statt. R3 ist sogar innerhalb desselben VZV-Stammes variabel und unterschiedlich lang und gilt bei VZV-Isolaten als der repetitive Bereich, der die größte Variabilität zeigt (Straus et al., 1983). Während R3 in der Virion-DNA über 100 Kopien der 9 bp-Elemente mit bis zu 1000 bp umfassen kann, ist R3 aufgrund der Sequenz-Instabilität in Bakterien nach Klonierung und Isolation aus *E. coli* oft kleiner (Davison and Scott, 1986; Straus et al., 1982). Infolge der verschiedenen Repetitionen innerhalb des Leserahmens kommen auch unterschiedlich lange 22p-Proteine vor. Auswirkungen solcher Veränderungen auf die Proteinfunktion sind aber nicht bekannt (Davison and Scott, 1986). Daher ist es unwahrscheinlich, dass sich dieser hier vorgefundene Aminosäureaustausch von Threonin zu Prolin auf die Funktion von 22p auswirkt. Die beiden weiteren Veränderungen im pHJOpac-Genom waren Insertionen in nicht-kodierenden Regionen und daher wahrscheinlich ohne Einfluss auf virale Eigenschaften des VZV. Das optimierte pHJOpac kann also ohne Einschränkungen wie der ursprüngliche WT HJO in Zellkultur behandelt und als BAC pHJOpac einfach in Bakterien manipuliert werden.

Variable Positionen in den VZV-Genomen wurden dazu eingesetzt, die VZV-Stämme in Gruppen oder Clades einzuteilen. Alle Klassifikationen basierten auf Sequenzunterschiede in einzelnen Basen (*single nucleotide polymorphisms*, SNP). Eine Arbeitsgruppe nutzte die „zerstreute“ SNP-Methode (*scattered SNP-method*), in der über Heteroduplex-Mobilitäts-Assays 92 SNPs in 37 ORFs verteilt über das Virusgenom identifiziert und die VZV-Stämme danach eingeteilt wurden (Barrett-Muir et al., 2001; Muir et al., 2002). In einer anderen Analyse wurden fünf Glykoproteine und ORF62 untersucht, und dabei 61 SNPs gefunden, mit denen sich die VZV-Stämme in vier Gruppen einteilen ließen (Faga et al., 2001). Loparev et al. (2004) fanden heraus,

dass die Variabilität des R3 im ORF22 ausreichte, damit vier Clades identifiziert werden konnten. Aufgrund dieser einzelnen Basensubstitutionen bzw. Insertionen und Deletionen und dem daraus resultierenden RFLP-Muster wurden die verschiedenen VZV-Stämme unterschiedlichen Clades zugeordnet. Früher gab es gröbere Klassen, die z.B. die europäischen von den asiatischen Stämmen abgrenzten. Nach der neuesten Nomenklatur von Breuer et al. (2010), die alle vorherigen Einteilungen vereinheitlicht und 27 minimal notwendige SNPs in einzelnen ORFs vorgibt, wird der WT-Stamm HJO dem Clade 3 zugeordnet, während der Laborstamm Dumas zum Clade 1 und japanische Stämme wie der parentale Oka oder der Vakzin-Oka zum Clade 2 gezählt werden. Neben Dumas als Prototyp aus Clade 1 ist der VZV-Stamm HJO der Prototyp von Clade 3 und repräsentativ für viele aus Zoster-Läsionen isolierte Viren.

Das weiter entwickelte BAC pHJOpac kann durch den „MiniF“-Vektor sehr einfach und in Bakterien schnell rekombiniert werden. Durch den Verlust des BAC-Vektors nach einigen Passagen in für VZV permissiven Zellen und den wenigen, nicht essentiellen Mutationen entspricht das pHJOpac-Genom wieder dem VZV-Stamm HJO. Damit ist pHJOpac zusammen mit der *En passant*-Mutagenese ein ideales System zur gezielten und effizienten Funktionsanalyse viraler VZV-Proteine.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (1999)** Ionenkanäle und Signalweiterleitung in Nervenzellen. S. 421-435. In: *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*. 1. Auflage. WILEY-VCH Verlag, Weinheim.
- Almeida JD, Howatson AF, Williams MG (1962)** Morphology of varicella (chicken pox) virus. *Virology* **16**: 353-355.
- Annunziato PW, Lungu O, Panagiotidis C, Zhang JH, Silvers DN, Gershon AA, Silverstein SJ (2000)** Varicella-zoster virus proteins in skin lesions: implications for a novel role of ORF29p in chickenpox. *J Virol* **74**: 2005-2010.
- Antinone SE & Smith GA (2010)** Retrograde axon transport of herpes simplex virus and pseudorabies virus: a live-cell comparative analysis. *J Virol* **84**: 1504-1512.
- Arvin AM (1995)** Varicella-zoster virus. S. 2547-2586. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM (Hrsg.): *Fields Virology*. 3. Ed., Vol. 2, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA, USA.
- Arvin AM (2001)** Varicella-zoster virus: molecular virology and host interaction. *Curr Opin Microbiol* **4**: 442-449.
- Barrett-Muir W, Hawrami K, Clarke J, Breuer J (2001)** Investigation of varicella-zoster virus variation by heteroduplex mobility assay. *Arch Virol Suppl* **17**: 17-25.
- Baudoux L, Defechereux P, Rentier B, Piette J (2000)** Gene activation by Varicella-zoster virus IE4 protein requires its dimerization and involves both the arginine-rich sequence, the central part, and the carboxyl-terminal cysteine-rich region. *J Biol Chem* **275**: 32822-32831.
- Ben-Porat T & Rixon FJ (1979)** Replication of herpesvirus DNA. IV: analysis of concatemers. *Virology* **94**: 61-70.
- Black MM & Lasek RJ (1979)** Axonal transport of actin: slow component b is the principal source of actin for the axon. *Brain Res* **171**: 401-13.
- Black MM & Lasek RJ (1980)** Slow components of axonal transport: two cytoskeletal networks. *J Cell Biol* **86**: 616-623.
- Booy FP, Trus BL, Newcomb WW, Brown JC, Conway JF, Steven AC (1994)** Finding a needle in a haystack: detection of a small protein (the 12-kDa VP26) in a large complex (the 200-MDa capsid of herpes simplex virus). *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 5652-5656.
- Boucaud D, Yoshitake H, Hay J, Ruyechan W (1998)** The varicella-zoster virus (VZV) open-reading frame 29 protein acts as a modulator of a late VZV gene promoter. *J Infect Dis* **178**: 34-38.
- Brady ST & Lasek RJ (1982)** Axonal transport: a cell-biological method for studying proteins that associate with the cytoskeleton. *Methods Cell Biol* **25**: 365-398.
- Brady ST, Tytell M, Heriot K, Lasek RJ (1981)** Axonal transport of calmodulin: a physiologic approach to identification of long-term associations between proteins. *J Cell Biol* **89**: 607-614.
- Brady ST, Tytell M, Lasek RJ (1984)** Axonal tubulin and axonal microtubules: biochemical evidence for cold stability. *J Cell Biol* **99**: 1716-1724.
- Breuer J, Grose C, Norberg P, Tipples G, Schmid DS (2010)** A proposal for a common nomenclature for viral clades that form the species varicella-zoster virus: summary of VZV Nomenclature Meeting 2008, Barts and the London School of Medicine and Dentistry, 24-25 July 2008. *J Gen Virol* **91**: 821-828.

- Brideau AD, Banfield BW, Enquist LW (1998)** The Us9 gene product of pseudorabies virus, an alphaherpesvirus, is a phosphorylated, tail-anchored type II membrane protein. *J Virol* **72**: 4560-4570.
- Brideau AD, del Rio T, Wolffe EJ, Enquist LW (1999)** Intracellular trafficking and localization of the pseudorabies virus Us9 type II envelope protein to host and viral membranes. *J Virol* **73**: 4372-4384.
- Brideau AD, Eldridge MG, Enquist LW (2000b)** Directional transneuronal infection by pseudorabies virus is dependent on an acidic internalization motif in the Us9 cytoplasmic tail. *J Virol* **74**: 4549-4561.
- Casey TA, Ruyechan WT, Flora MN, Reinhold W, Straus SE, Hay J (1985)** Fine mapping and sequencing of a variable segment in the inverted repeat region of varicella-zoster virus DNA. *J Virol* **54**: 639-642.
- Chaudhuri V, Sommer M, Rajamani J, Zerboni L, Arvin AM (2008)** Functions of Varicella-zoster virus ORF23 capsid protein in viral replication and the pathogenesis of skin infection. *J Virol* **82**: 10231-10246.
- Chen JJ, Zhu Z, Gershon AA, Gershon MD (2004)** Mannose 6-phosphate receptor dependence of varicella zoster virus infection in vitro and in the epidermis during varicella and zoster. *Cell* **119**: 915-926.
- Ch'ng TH & Enquist LW (2005)** Efficient axonal localization of alphaherpesvirus structural proteins in cultured sympathetic neurons requires viral glycoprotein E. *J Virol* **79**: 8835-8846.
- Choi B & Rowbotham MC (1997)** Effect of adrenergic receptor activation on post-herpetic neuralgia pain and sensory disturbances. *Pain*. **69**: 55-63.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987)** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**: 156-159.
- Christensen J, Steain M, Slobedman B, Abendroth A (2013)** Varicella-zoster virus glycoprotein I is essential for spread in dorsal root ganglia and facilitates axonal localization of structural virion components in neuronal cultures. *J Virol* [Epub ahead of print]
- Cohen GH, Ponce de Leon M, Diggelmann H, Lawrence WC, Vernon SK, Eisenberg RJ (1980)** Structural analysis of the capsid polypeptides of herpes simplex virus types 1 and 2 *J Virol* **34**: 521-531.
- Cohen JI & Nguyen H (1997)** Varicella-zoster virus glycoprotein I is essential for growth of virus in Vero cells. *J Virol* **71**:6913-6920.
- Cohen, IJ & Straus, SE (1996)** Varicella Zoster and its replication. S. 2525-2545. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM (Hrsg.): *Fields Virology*. 3. Ed., Vol.2, Lippincott-Raven, Philadelphia, PA, USA.
- Cohen JI, Krogmann T, Pesnicak L, Ali MA (2007)** Absence or overexpression of the Varicella-Zoster Virus (VZV) ORF29 latency-associated protein impairs late gene expression and reduces VZV latency in a rodent model. *J Virol* **81**: 1586-1591
- Cohen JI, Krogmann T, Ross JP, Pesnicak L, Prikhod'ko EA (2005)** Varicella-zoster virus ORF4 latency-associated protein is important for establishment of latency. *J Virol* **79**: 6969-6975.
- Cohen JI, Sato H, Srinivas S, Lekstrom K (2001)** Varicella-zoster virus (VZV) ORF65 virion protein is dispensable for replication in cell culture and is phosphorylated by casein kinase II, but not by the VZV protein kinases. *Virology* **280**: 62-71.

- Cohen JI, Straus SE, Arvin A (2007)** Varicella-Zoster Virus Replication, Pathogenesis, and Management. S. 2774-2818. In: Knipe DM & Howley PM (Hrsg.): *Fields Virology*. 5. Ed., Vol.2, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA.
- Cohrs RJ, Barbour M, Gilden DH (1996)** Varicella-zoster virus (VZV) transcription during latency in human ganglia: detection of transcripts mapping to genes 21, 29, 62, and 63 in a cDNA library enriched for VZV RNA. *J Virol* **70**: 2789-2796.
- Cohrs RJ, Barbour M, Gilden DH (1998)** Varicella-zoster virus gene 21: transcriptional start site and promoter region *J Virol* **72**: 42-47.
- Cohrs RJ, Gilden DH, Kinchington PR, Grinfeld E, Kennedy PG (2003)** Varicella-zoster virus gene 66 transcription and translation in latently infected human Ganglia. *J Virol* **77**: 6660-6665.
- Cohrs RJ, Randall J, Smith J, Gilden DH, Dabrowski C, van Der Keyl H, Tal-Singer R (2000)** Analysis of individual human trigeminal ganglia for latent herpes simplex virus type 1 and varicella-zoster virus nucleic acids using real-time PCR. *J Virol* **74**: 11464-71.
- Cohrs RJ, Wischer J, Essman C, Gilden DH (2002)** Characterization of varicella-zoster virus gene 21 and 29 proteins in infected cells. *J Virol* **76**: 7228-7238.
- Davison AJ (1984)** Structure of the genome termini of varicella-zoster virus. *J Gen Virol* **65**: 1969-1977.
- Davison AJ & Scott JE (1986)** The complete DNA sequence of varicella-zoster virus. *J Gen Virol* **67**: 1759-1816.
- Debrus S, Sadzot-Delvaux C, Nikkels AF, Piette J, Rentier B (1995)** Varicella-zoster virus gene 63 encodes an immediate-early protein that is abundantly expressed during latency. *J Virol* **69**: 3240-3245.
- Defechereux P, Debrus S, Baudoux L, Rentier B, Piette J (1997)** Varicella-zoster virus open reading frame 4 encodes an immediate-early protein with posttranscriptional regulatory properties. *J Virol* **71**: 7073-7079.
- Defechereux P, Melen L, Baudoux L, Merville-Louis MP, Rentier B, Piette J (1993)** Characterization of the regulatory functions of varicella-zoster virus open reading frame 4 gene product. *J Virol* **67**: 4379-4385.
- del Rio T, Ch'ng TH, Flood EA, Gross SP, Enquist LW (2005)** Heterogeneity of a fluorescent tegument component in single pseudorabies virus virions and enveloped axonal assemblies. *J Virol* **79**: 3903-3919.
- Dolan A, Jamieson FE, Cunningham C, Barnett BC, McGeoch DJ (1998)** The genome sequence of herpes simplex virus type 2. *J Virol*. **72**: 2010-2021.
- Duus KM, Hatfield C, Grose C (1995)** Cell surface expression and fusion by the varicella-zoster virus gH:gL glycoprotein complex: analysis by laser scanning confocal microscopy. *Virology* **210**: 429-440.
- Ecker JR & Hyman RW (1982)** Varicella zoster virus DNA exists as two isomers. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 156-160.
- Faga B, Maury W, Bruckner DA, Grose C (2001)** Identification and mapping of single nucleotide polymorphisms in the varicella-zoster virus genome. *Virology* **280**: 1-6.
- Fleetwood-Walker SM, Quinn JP, Wallace C, Blackburn-Munro G, Kelly BG, Fiskerstrand CE, Nash AA, Dalziel RG (1999)** Behavioural changes in the rat following infection with varicella-zoster virus. *J Gen Virol* **80**: 2433-2436.

- Frame MC, McGeoch DJ, Rixon FJ, Orr AC, Marsden HS (1986)** The 10K virion phosphoprotein encoded by gene US9 from herpes simplex virus type 1. *Virology* **150**: 321-332.
- Forghani B, Mahalingam R, Vafai A, Hurst JW, Dupuis KW (1990)** Monoclonal antibody to immediate early protein encoded by varicella-zoster virus gene 62. *Virus Res* **16**: 195-210.
- Forghani B, Ni L, Grose C (1994)** Neutralization epitope of the varicella-zoster virus gH:gL glycoprotein complex. *Virology* **199**:458-462.
- Gabel CA, Dubey L, Steinberg SP, Sherman D, Gershon MD, Gershon AA (1989)** Varicella-zoster virus glycoprotein oligosaccharides are phosphorylated during posttranslational maturation. *J Virol* **63**: 4264-4276.
- Garner JA & Lasek RJ (1981)** Clathrin is axonally transported as part of slow component b: the microfilament complex. *J Cell Biol* **88**: 172-178.
- Gershon AA, Chen J, Gershon MD (2008)** A model of lytic, latent, and reactivating varicella-zoster virus infections in isolated enteric neurons. *J Infect Dis* **197**: 61-65
- Gershon AA, Sherman DL, Zhu Z, Gabel CA, Ambron RT, Gershon MD (1994)** Intracellular transport of newly synthesized varicella-zoster virus: final envelopment in the trans-Golgi network. *J Virol* **68**: 6372-6390.
- Gershon MD & Gershon AA (2010)** VZV infection of keratinocytes: production of cell-free infectious virions in vivo. *Curr Top Microbiol Immunol* **342**: 173-188.
- Gibson W & Roizman B (1972)** Proteins specified by herpes simplex virus. 8. Characterization and composition of multiple capsid forms of subtypes 1 and 2. *J Virol* **10**:1044-1052.
- Goldstein LS & Yang Z (2000)** Microtubule-based transport systems in neurons: the roles of kinesins and dyneins. *Annu Rev Neurosci* **23**: 39-71.
- Gray WL (2004)** Simian varicella: a model for human varicella-zoster virus infections. *Rev Med Virol* **14**: 363-381
- Griffiths G, Hoflack B, Simons K, Mellman I, Kornfeld S (1988)** The mannose 6-phosphate receptor and the biogenesis of lysosomes. *Cell* **52**: 329-341.
- Grigoryan S, Kinchington PR, Yang IH, Selariu A, Zhu H, Yee M, Goldstein RS (2012)** Retrograde axonal transport of VZV: kinetic studies in hESC-derived neurons. *J Neurovirol* **18**: 462-470
- Grose C (1981)** Variation on a theme by Fenner: the pathogenesis of chicken pox. *Pediatrics* **68**: 735-737.
- Grose C (1990)** Glycoproteins encoded by varicella-zoster virus: biosynthesis, phosphorylation, and intracellular trafficking. *Annu Rev Microbiol* **44**: 59-80.
- Grose C & Brunel PA (1978)** Varicella-zoster virus: isolation and propagation in human melanoma cells at 36 and 32 degrees C. *Infect Immun* **19**:199-203.
- Gross SP, Welte MA, Block SM, Wieschhaus EF (2000)** Dynein-mediated cargo transport in vivo. A switch controls travel distance. *J Cell Biol* **148**: 945-956.
- Hayakawa Y & Hyman RW (1987)** Isomerization of the UL region of varicella-zoster virus DNA. *Virus Res* **8**: 25-31.
- Harper DR, Mathieu N, Mullarkey J (1998)** High-titre, cryostable cell-free varicella zoster virus. *Arch Virol* **143**: 1163-1170.

- Hoffman PN & Lasek RJ (1980)** Axonal transport of the cytoskeleton in regenerating motor neurons: constancy and change. *Brain Res* **202**: 317-333.
- Hondo R & Yogo Y (1988)** Strain variation of R5 direct repeats in the right-hand portion of the long unique segment of varicella-zoster virus DNA. *J Virol* **62**: 2916-2921.
- Jacob RJ, Morse LS, Roizman B (1979)** Anatomy of herpes simplex virus DNA. XII. Accumulation of head-to-tail concatemers in nuclei of infected cells and their role in the generation of the four isomeric arrangements of viral DNA. *J Virol* **29**: 448-457.
- Jacquet A, Haumont M, Chellun D, Massaer M, Tufaro F, Bollen A, Jacobs P (1998)** The varicella zoster virus glycoprotein B (gB) plays a role in virus binding to cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Virus Res* **53**: 197-207.
- Jones F & Grose C (1988)** Role of cytoplasmic vacuoles in varicella-zoster virus glycoprotein trafficking and virion envelopment. *J Virol* **62**: 2701-2711
- Kamei Y, Yuba S, Nakayama T, Yoneda Y (1999)** Three distinct classes of the alpha-subunit of the nuclear pore-targeting complex (importin-alpha) are differentially expressed in adult mouse tissues. *J Histochem Cytochem* **47**: 363-372.
- Kandel ER (1995)** Neurone und Verhalten. S. 21-40. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (Hrsg.): *Neurowissenschaften- Eine Einführung*. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin/Oxford
- Kari B & Gehrz R (1992)** A human cytomegalovirus glycoprotein complex designated gC-II is a major heparin-binding component of the envelope. *J Virol* **66**: 1761-1764.
- Katz JP, Bodin ET, Coen DM (1990)** Quantitative polymerase chain reaction analysis of herpes simplex virus DNA in ganglia of mice infected with replication-incompetent mutants. *J Virol* **64**: 4288-4295.
- Kemble GW, Annunziato P, Lungu O, Winter RE, Cha TA, Silverstein SJ, Spaete RR (2000)** Open reading frame S/L of varicella-zoster virus encodes a cytoplasmic protein expressed in infected cells. *J Virol* **74**: 11311-11321.
- Kennedy PG, Grinfeld E, Bell JE (2000)** Varicella-zoster virus gene expression in latently infected and explanted human ganglia. *J Virol* **74**: 11893-11898.
- Kennedy PG, Grinfeld E, Gow JW (1998)** Latent varicella-zoster virus is located predominantly in neurons in human trigeminal ganglia. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 4658-4662.
- Kennedy PG, Grinfeld E, Gow JW (1999)** Latent Varicella-zoster virus in human dorsal root ganglia. *Virology* **258**: 451-454.
- Kinchington PR, Bookey D, Turse SE (1995)** The transcriptional regulatory proteins encoded by varicella-zoster virus open reading frames (ORFs) 4 and 63, but not ORF 61, are associated with purified virus particles. *J Virol* **69**: 4274-4282.
- Kinchington PR, Hougland JK, Arvin AM, Ruyechan WT, Hay J (1992)** The varicella-zoster virus immediate-early protein IE62 is a major component of virus particles. *J Virol* **66**: 359-366.
- Kinchington PR, Inchauspe, G, Subak-Sharpe JH, Robey F, Hay J, Ruyechan WT (1988)** Identification and characterization of a varicella-zoster virus DNA-binding protein by using antisera directed against a predicted synthetic oligopeptide. *J Virol* **62**: 802-809.
- Kinchington PR, Reinhold WC, Casey TA, Straus SE, Hay J, Ruyechan WT (1985)** Inversion and circularization of the varicella-zoster virus genome. *J Virol* **6**: 194-200.

- Kinchington PR, Remenick J, Ostrove JM, Straus SE, Ruyechan WT, Hay, J (1986)** Putative glycoprotein gene of varicella-zoster virus with variable copy numbers of a 42-base-pair repeat sequence has homology to herpes simplex virus glycoprotein C. *J Virol* **59**: 660-668.
- Kinoshita H, Hondo R, Taguchi F, Yogo Y (1988)** Variation of R1 repeated sequence present in open reading frame 11 of varicella-zoster virus strains. *J Virol* **62**: 1097-1100.
- Koropchak CM, Graham G, Palmer J, Winsberg M, Ting SF, Wallace M, Prober CG, Arvin AM (1992)** Investigation of varicella-zoster virus infection by polymerase chain reaction in the immunocompetent host with acute varicella. *J Infect Dis* **163**: 1016-1022
- Kress M, Fickenscher H (2001)** Infection by human varicella-zoster virus confers norepinephrine sensitivity to sensory neurons from rat dorsal root ganglia. *FASEB J* **15**:1037-1043.
- Kut E & Rasschaert D (2004)** Assembly of Marek's disease virus (MDV) capsids using recombinant baculoviruses expressing MDV capsid proteins. *J Gen Virol* **85**: 769-774.
- Laemmli UK (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lasek RJ, Garner JA, Brady ST (1984)** Axonal transport of the cytoplasmic matrix. *J Cell Biol* **99**: 212-221.
- Lee EC, Yu D, Martinez de Velasco J, Tessarollo L, Swing DA, Court DL, Jenkins, NA, Copeland NG (2001)** A highly efficient Escherichia coli-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA. *Genomic* **73**: 56-65.
- Lenac Rovis T, Bailer SM, Pothineni VR, Ouwendijk WJ, Simic H, Babic M, Miklic K, Malic S, Verweij MC, Baiker A, Gonzalez O, von Brunn A, Zimmer R, Früh K, Verjans GM, Jonjic S, Haas J (2013)** Comprehensive analysis of varicella-zoster virus proteins using a new monoclonal antibody collection. *J Virol* **87**: 6943-6954.
- Li Q, Ali MA, Cohen JI (2006)** Insulin degrading enzyme is a cellular receptor mediating varicella-zoster virus infection and cell-to-cell spread. *Cell* **127**: 305-316.
- Liu WW, Goodhouse J, Jeon NL, Enquist LW (2008)** A microfluidic chamber for analysis of neuron-to-cell spread and axonal transport of an alpha-herpesvirus. *PLoS One* **3**: e2382.
- Longnecker R & Roizman B (1986)** Generation of an inverting herpes simplex virus 1 mutant lacking the L-S junction a sequences, an origin of DNA synthesis, and several genes including those specifying glycoprotein E and the alpha 47 gene. *J Virol* **58**: 583-591.
- Loparev VN, Gonzalez A, Deleon-Carnes M, Tipples G, Fickenscher H, Torfason EG, Schmid DS (2004)** Global identification of three major genotypes of varicella-zoster virus: longitudinal clustering and strategies for genotyping. *J Virol* **78**: 8349-8358.
- Lungu O, Annunziato PW, Gershon A, Staugaitis SM, Josefson D, LaRussa P, Silverstein SJ (1995)** Reactivated and latent varicella-zoster virus in human dorsal root ganglia. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 10980-10984.
- Lungu O, Panagiotidis CA, Annunziato PW, Gershon AA, Silverstein SJ (1998)** Aberrant intracellular localization of Varicella-Zoster virus regulatory proteins during latency. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 7080-7085.
- Lyman MG, Curanovic D, Brideau AD, Enquist LW (2008)** Fusion of enhanced green fluorescent protein to the pseudorabies virus axonal sorting protein Us9 blocks anterograde spread of infection in mammalian neurons. *J Virol* **82**: 10308-10311.

- Lyman MG, Kemp CD, Taylor MP, Enquist LW (2009)** Comparison of the pseudorabies virus Us9 protein with homologs from other veterinary and human alphaherpesviruses. *J Virol* **83**: 6978-6986
- Mahalingam R, Lasher R, Wellish M, Cohrs RJ, Gilden DH (1998)** Localization of varicella-zoster virus gene 21 protein in virus-infected cells in culture. *J Virol* **72**: 6832-6837.
- Mahalingam R, Wellish M, Cohrs R, Debrus S, Piette J, Rentier B, Gilden DH (1996)** Expression of protein encoded by varicella-zoster virus open reading frame 63 in latently infected human ganglionic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 2122-2124.
- Mainka C, Fuss B, Geiger H, Höfelmayr H, Wolff MH (1998)** Characterization of viremia at different stages of varicella-zoster virus infection. *J Med Virol* **56**: 91-98.
- Markus A, Grigoryan S, Sloutskin A, Yee MB, Zhu H, Yang IH, Thakor NV, Sarid R, Kinchington PR, Goldstein RS (2011)** Varicella-zoster virus (VZV) infection of neurons derived from human embryonic stem cells: direct demonstration of axonal infection, transport of VZV, and productive neuronal infection. *J Virol* **85**: 6220-6233.
- McNabb DS & Courtney RJ (1992)** Identification and characterization of the herpes simplex virus type 1 virion protein encoded by the UL35 open reading frame. *J Virol* **66**: 2653-2663.
- McVoy MA, Nixon DE, Hur JK, Adler SP (2000)** The ends on herpesvirus DNA replicative concatemers contain pac2 cis cleavage/packaging elements and their formation is controlled by terminal cis sequences. *J Virol* **74**: 1587-1592.
- Meier JL & Straus SE (1993)** Varicella-zoster virus DNA polymerase and major DNA-binding protein genes have overlapping divergent promoters. *J Virol* **67**: 7573-7581.
- Meier JL & Straus SE (1995)** Interactions between varicella-zoster virus IE62 and cellular transcription factor USF in the coordinate activation of genes 28 and 29. *Neurology* **45**: 30-32.
- Meier JL, Holman RP, Croen KD, Smialek JE, Straus SE (1993)** Varicella-zoster virus transcription in human trigeminal ganglia. *Virology* **193**: 193-200.
- Meier JL, Luo X, Sawadogo M, Straus SE (1994)** The cellular transcription factor USF cooperates with varicella-zoster virus immediate-early protein 62 to symmetrically activate a bidirectional viral promoter. *Mol Cell Biol* **14**: 6896-6906.
- Messerle M, Crnkovic I, Hammerschmidt W, Ziegler H, Koszinowski UH (1997)** Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 14759-14763.
- Mettenleiter TC, Lomniczi B, Sugg N, Schreurs, C, Ben-Porat T (1988)** Host cell-specific growth advantage of pseudorabies virus with a deletion in the genome sequences encoding a structural glycoprotein. *J Virol* **62**: 12-19.
- Mettenleiter TC, Zsak L, Zuckermann F, Sugg N, Kern H, Ben-Porat T (1990)** Interaction of glycoprotein gIII with a cellular heparinlike substance mediates adsorption of pseudorabies virus. *J Virol* **64**: 278-286.
- Michael EJ, Kuck KM, Kinchington PR (1998)** Anatomy of the varicella-zoster virus open-reading frame 4 promoter. *J Infect Dis* **178**: 27-33.
- Mo C, Lee J, Sommer M, Grose C, Arvin AM (2002)** The requirement of varicella zoster virus glycoprotein E (gE) for viral replication and effects of glycoprotein I on gE in melanoma cells. *Virology* **304**: 176-186.

- Moffat JF, Stein MD, Kaneshima H, Arvin AM (1995)** Tropism of varicella-zoster virus for human CD4+ and CD8+ T lymphocytes and epidermal cells in SCID-hu mice. *J Virol* **69**: 5236-5242.
- Moore MS & Blobel G (1993)** The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature* **365**: 661-663.
- Moriuchi M, Moriuchi H, Debrus S, Piette J, Cohen JI (1995)** The acidic amino-terminal region of varicella-zoster virus open reading frame 4 protein is required for transactivation and can functionally replace the corresponding region of herpes simplex virus ICP27. *Virology* **208**: 76-82.
- Moriuchi H, Moriuchi M, Smith HA, Cohen JI (1994)** Varicella-zoster virus open reading frame 4 protein is functionally distinct from and does not complement its herpes simplex virus type 1 homolog, ICP27. *J Virol* **68**: 1987-1992.
- Moriuchi H, Moriuchi M, Straus SE, Cohen JI (1993)** Varicella-zoster virus open reading frame 10 protein, the herpes simplex virus VP16 homolog, transactivates herpesvirus immediate-early gene promoters. *J Virol* **67**: 2739-2746.
- Muir WB, Nichols R, Breuer J (2002)** Phylogenetic analysis of varicella-zoster virus: evidence of intercontinental spread of genotypes and recombination. *J Virol* **76**: 1971-1979.
- Murphy KC (1998)** Use of bacteriophage lambda recombination functions to promote gene replacement in Escherichia coli. *J Bacteriol* **180**: 2063-2071.
- Niizuma T, Zerboni L, Sommer MH, Ito H, Hinchliffe S, Arvin AM (2003)** Construction of varicella-zoster virus recombinants from parent Oka cosmids and demonstration that ORF65 protein is dispensable for infection of human skin and T cells in the SCID-hu mouse model. *J Virol* **77**: 6062-6065.
- Oxman MN, Levin MJ, Johnson GR, Schmader KE, Straus SE, Gelb LD, Arbeit RD, Simberkoff MS, Gershon AA, Davis LE, Weinberg A, Boardman KD, Williams HM, Zhang JH, Peduzzi PN, Beisel CE, Morrison VA, Guatelli JC, Brooks PA, Kauffman CA, Pachucki CT, Neuzil KM, Betts RF, Wright PF, Griffin MR, Brunell P, Soto NE, Marques AR, Keay SK, Goodman RP, Cotton DJ, Gnann JW Jr, Loutit J, Holodniy M, Keitel WA, Crawford GE, Yeh SS, Lobo Z, Toney JF, Greenberg RN, Keller PM, Harbecke R, Hayward AR, Irwin MR, Kyriakides TC, Chan CY, Chan IS, Wang WW, Annunziato PW, Silber JL; Shingles Prevention Study Group (2005)** A vaccine to prevent herpes zoster and postherpetic neuralgia in older adults. *N Engl J Med* **352**: 2271-2284.
- Ozaki T, Kajita Y, Asano Y, Aono T, Yamanishi K (1994)** Detection of varicella-zoster virus DNA in blood of children with varicella. *J Med Virol* **44**: 263-265.
- Perera LP, Kaushal S, Kinchington PR, Mosca JD, Hayward GS, Straus SE (1994)** Varicella-zoster virus open reading frame 4 encodes a transcriptional activator that is functionally distinct from that of herpes simplex virus homology ICP27. *J Virol* **68**: 2468-2477.
- Puvion-Dutilleul F, Pichard E, Laithier M, Leduc EH (1987)** Effect of dehydrating agents on DNA organization in herpes viruses. *J Histochem Cytochem* **35**: 635-645.
- Reichelt M, Brady J, Arvin AM (2009)** The replication cycle of varicella-zoster virus: analysis of the kinetics of viral protein expression, genome synthesis, and virion assembly at the single-cell level. *J Virol* **83**: 3904-3918.
- Roberts CR, Weir AC, Hay J, Straus SE, Ruyechan WT (1985)** DNA-binding proteins present in varicella-zoster virus-infected cells. *J Virol* **55**: 45-53.
- Rodriguez JE, Moninger T, Grose C (1993)** Entry and egress of varicella virus blocked by same anti-gH monoclonal antibody. *Virology* **196**: 840-844.

- Roizman B & Baines J (1991)** The diversity and unity of Herpesviridae. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **14**: 63-79.
- Ross JL, Wallace K, Shuman H, Goldman YE, Holzbaur EL (2006)** Processive bidirectional motion of dynein-dynactin complexes in vitro. *Nat Cell Biol* **8**: 562-570
- Rost B & Liu J (2003)** The PredictProtein server. *Nucleic Acids Res* **31**: 3300-3304.
- Rowbotham MC & Fields HL (1996)** The relationship of pain, allodynia and thermal sensation in post-herpetic neuralgia. *Brain* **119**: 347-354.
- Rowbotham MC, Yosipovitch G, Connolly MK, Finlay D, Forde G, Fields, HL (1996)** Cutaneous innervation density in the allodynic form of postherpetic neuralgia. *Neurobiol Dis* **3**: 205-214.
- Ruyechan WT & Weir AC (1984)** Interaction with nucleic acids and stimulation of the viral DNA polymerase by the herpes simplex virus type 1 major DNA-binding protein. *J Virol* **52**: 727-733.
- Sadzot-Delvaux C, Baudoux L, Defecheraux P, Piette J, Rentier B (1993)** Overview of the replication cycle of varicella-zoster virus. S. 21-42: In: Wolff MH, Schünemann S, Schmidt A (Hrsg.): *Varicella-Zoster virus: molecular biology, pathogenesis and clinical aspects*. Contributions to Microbiology, Vol.3, Karger, Basel.
- Sandri-Goldin RM (1998)** ICP27 mediates HSV RNA export by shuttling through a leucine-rich nuclear export signal and binding viral intronless RNAs through an RGG motif. *Genes Dev* **12**: 868-879.
- Sandri-Goldin RM & Mendoza GE (1992)** A herpesvirus regulatory protein appears to act post-transcriptionally by affecting mRNA processing. *Genes Dev* **6**: 848-863.
- Sato B, Sommer M, Ito H, Arvin AM (2003)** Requirement of varicella-zoster virus immediate-early 4 protein for viral replication. *J Virol* **77**: 12369-12372.
- Schmidt M, Kress M, Heinemann S, Fickenscher H (2003)** Varicella-zoster virus isolates, but not the vaccine strain OKA, induce sensitivity to alpha-1 and beta-1 adrenergic stimulation of sensory neurones in culture. *J Med Virol* **70**: 82-89.
- Schwartz JH (1984)** Biochemical control mechanisms in synaptic transmissions. S. 121-131. In: Kandel ER & Schwartz JH (Hrsg.): *Principles of neural science*. Elsevier Science Publishing, New York
- Schwartz JH (1995)** Neuronale Proteine. S. 59-72. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (Hrsg.): *Neurowissenschaften- Eine Einführung*. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin/Oxford
- Shelton LS, Albright AG, Ruyechan WT, Jenkins FJ (1994)** Retention of the herpes simplex virus type 1 (HSV-1) UL37 protein on single-stranded DNA columns requires the HSV-1 ICP8 protein. *J Virol* **68**: 521-525.
- Shelton LS, Pensiero MN, Jenkins FJ (1990)** Identification and characterization of the herpes simplex virus type 1 protein encoded by the UL37 open reading frame. *J Virol* **64**: 6101-6109.
- Shieh MT, WuDunn D, Montgomery RI, Esko JD, Spear PG (1992)** Cell surface receptors for herpes simplex virus are heparan sulfate proteoglycans. *J Cell Biol* **116**: 1273-1281.
- Shizuya H, Birren B, Kim UJ, Mancino V, Slepak T, Tachiiri Y, Simon M (1992)** Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in Escherichia coli using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 8794-8797.

- Smith G (2012)** Herpesvirus transport to the nervous system and back again. *Annu Rev Microbiol* **66**:153-176
- Smith GA, Gross SP, Enquist LW (2001)** Herpesviruses use bidirectional fast-axonal transport to spread in sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 3466-3470.
- Smith GA, Pomeranz L, Gross, SP, Enquist LW (2004)** Local modulation of plus-end transport targets herpesvirus entry and egress in sensory axons. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 16034-16039
- Soliman TM & Silverstein SJ (2000)** Herpesvirus mRNAs are sorted for export via Crm1-dependent and -independent pathways. *J Virol* **74**: 2814-2825.
- Soliman TM, Sandri-Goldin RM, Silverstein SJ (1997)** Shuttling of the herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP27 between the nucleus and cytoplasm mediates the expression of late proteins. *J Virol* **71**: 9188-9197.
- Stallings CL & Silverstein SJ (2005)** Dissection of a novel nuclear localization signal in open reading frame 29 of varicella-zoster virus. *J Virol* **79**: 13070-13081.
- Stallings CL & Silverstein SJ (2006)** Posttranslational modification and cell type-specific degradation of varicella-zoster virus ORF29p. *J Virol* **80**: 10836-10846.
- Stallings CL, Duigou GJ, Gershon AA, Gershon MD, Silverstein SJ (2006)** The cellular localization pattern of Varicella-Zoster virus ORF29p is influenced by proteasome-mediated degradation. *J Virol* **80**: 1497-1512.
- Stein M, Slobedman B, Abendroth A (2010)** Experimental models to study varicella-zoster virus infection of neurons *Curr Top Microbiol Immunol* **342**: 211-228
- Straus SE, Hay J, Smith H, Owens J (1983)** Genome differences among varicella-zoster virus isolates. *J Gen Virol* **64**: 1031-41.
- Straus SE, Ostrove JM, Inchauspé G, Felser JM, Freifeld A, Croen KD, Sawyer MH (1988)** NIH conference. Varicella-zoster virus infections. Biology, natural history, treatment, and prevention. *Ann Intern Med* **108**: 221-237.
- Straus SE, Owens J, Ruyechan WT, Takiff HE, Casey TA, Vande Woude GF, Hay J (1982)** Molecular cloning and physical mapping of varicella-zoster virus DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 993-997.
- Takahashi M, Otsuka T, Okuno Y, Asano Y, Yazaki T (1974)** Live vaccine used to prevent the spread of varicella in children in hospital. *Lancet* **2**: 1288-1290.
- Taylor TJ & Knipe DM (2003)** C-terminal region of herpes simplex virus ICP8 protein needed for intranuclear localization. *Virology* **309**: 219-231.
- Telford EA, Watson MS, McBride K, Davison AJ (1992)** The DNA sequence of equine herpesvirus-1. *Virology* **189**: 304-316.
- Tischer BK, Smith GA, Osterrieder N (2009)** En passant mutagenesis: a two step markerless red recombination system. *Methods Mol Biol* **634**:421-430
- Tischer BK, von Einem J, Kaufer B, Osterrieder N (2006)** Two-step red-mediated recombination for versatile high-efficiency markerless DNA manipulation in Escherichia coli. *Biotechniques* **40**: 191-197.
- Tomishima MJ & Enquist LW (2001)** A conserved alpha-herpesvirus protein necessary for axonal localization of viral membrane proteins. *J Cell Biol* **154**: 741-752

- Ullman KS, Powers MA, Forbes DJ (1997)** Nuclear export receptors: from importin to exportin. *Cell* **90**: 967-970.
- Wang K, Boysen C, Shizuya H, Simon MI, Hood L. (1997)** Complete nucleotide sequence of two generations of a bacterial artificial chromosome cloning vector. *Biotechniques* **23**: 992-994.
- WuDunn D & Spear PG (1989)** Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate. *J Virol* **63**: 52-58.
- Wussow F, Fickenscher H, Tischler BK (2009)** Red-mediated transposition and final release of the mini-F vector of a cloned infectious herpesvirus genome. *PLoS One* **4**: e8178
- Xia D & Straus SE (1999)** Transcript mapping and transregulatory behavior of varicella-zoster virus gene 21, a latency-associated gene. *Virology* **258**: 304-313.
- Xia D, Srinivas S, Sato H, Pesnicak L, Straus SE., Cohen JI (2003)** Varicella-zoster virus open reading frame 21, which is expressed during latency, is essential for virus replication but dispensable for establishment of latency. *J Virol* **77**: 1211-1218.
- Yang M, Hay J, Ruyechan WT (2004)** The DNA element controlling expression of the varicella-zoster virus open reading frame 28 and 29 genes consists of two divergent unidirectional promoters which have a common USF site. *J Virol* **8**: 10939-10952.
- Zhang Z, Selariu A, Warden C, Huang G, Huang Y, Zaccheus O, Cheng T, Xia N, Zhu H (2010)** Genome-wide mutagenesis reveals that ORF7 is a novel VZV skin-tropic factor. *PLoS Pathog* **6**: e1000971
- Zhu Z, Gershon MD, Ambron R, Gabel C, Gershon AA (1995a)** Infection of cells by varicella zoster virus: inhibition of viral entry by mannose 6-phosphate and heparin. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 3546-3550.
- Zhu Z, Gershon MD, Gabel C, Sherman D, Ambron R, Gershon A (1995b)** Entry and egress of varicella-zoster virus: role of mannose 6-phosphate, heparan sulfate proteoglycan, and signal sequences in targeting virions and viral glycoproteins. *Neurology* **45**: 15-17.
- Zhu Z, Gershon MD, Hao Y, Ambron RT, Gabel CA, Gershon AA (1995c)** Envelopment of varicella-zoster virus: targeting of viral glycoproteins to the trans-Golgi network. *J Virol* **69**: 7951-7959.

---

## 7 PUBLIKATIONEN/PRÄSENTATIONEN

### Publikationen

**Spieckermann T, Späth M, Kress M, Fickenscher H (2013)** Varicella zoster virus proteins 65p and 23p in permissive cells and sensory neurons studied by recombinant viruses harboring the entire cloned viral wildtype genome HJO. Manuskript zur Publikation eingereicht.

**Spieckermann T, Fickenscher H (2013)** Fluorescence tracing of latency proteins expressed by recombinant varicella-zoster wildtype virus. Manuskript in Vorbereitung

**Wussow F, Spieckermann T, Brunnemann A, Hüske L, Toptan T, Fickenscher H (2011)** Bacterial Genetics of Large Mammalian DNA Viruses: Bacterial Artificial Chromosomes as a Prerequisite for Efficiently Studying Viral DNA Replication and Functions. S.669-694. In: Dr. Herve Seligmann (Hrsg.): *DNA Replication-Current Advances*. Intech press, Rijeka, Wien

### Poster-Präsentationen

April 2010      European Congress of Virology, Cernobbio, Mailand  
Fluorescence tracing of latency proteins in recombinant varicella-zoster virus

März 2013      Kongress der Gesellschaft für Virologie (GfV), Kiel  
Fluorescence tracing of the axonal transport protein ORF65 in recombinant varicella-zoster virus

---

## 8 LEBENSLAUF

### Persönlich Daten:

Name Tanja Spieckermann  
Geburtsdatum 29.06.1979  
Geburtsort Preetz/Plön

### Akademische Ausbildung:

2006-2013 Promotion am Institut für Infektionsmedizin der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
Thema: Visualisierung phasentypisch exprimierter viraler Proteine des neurotrophen Varicella-Zoster-Virus nach Mutagenese bakterieller artifiziieller Chromosome

2004-2005 Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität in Greifswald,  
Thema: Untersuchungen zur Regulation der Aktivität DNA-bindender Proteine in *Bacillus subtilis*, Note: 1,6 (gut)

2001-2004 Hauptstudium Biologie an der Ernst-Moritz-Arndt Universität in Greifswald, Hauptfach: Mikrobiologie und Molekularbiologie

1999-2001 Grundstudium Biologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

### Schule:

1990-1999 Gymnasium Elmschenhagen  
29.06.1999 Abitur  
1986-1990 Grundschule Wellsee

### Praktika:

31.08. – 01.09.2011 Seminar: Tierschutz und Versuchstiere in der Forschung-Einführung

Feb 2003-Mrz 2003 Praktikum bei Ballies und Partner, Fachärzte für Laboratoriumsmedizin, Mikrobiologie und Infektionsepidemiologie in Kiel

Aug 2003-Sep 2003 Praktikum an der Berliner Charité, Institut für Mikrobiologie und Hygiene

---

## 9 DANKSAGUNG

Zu aller erst möchte ich mich bei meinem Betreuer Prof. Dr. Helmut Fickenscher für die Möglichkeit zur Bearbeitung meines Themas sowie den vielen Diskussionen und Ratschlägen bei der Durchführung und Bearbeitung bedanken.

Ich bedanke mich sehr herzlich bei meinen Kolleginnen Anne Brunnemann und Linda Bremer für die vielen spaßigen Stunden zusammen im Büro, die oft zu einem kurzweiligen Arbeitstag führten, aber auch zu vielen fruchtbaren Diskussionen, guten Ratschlägen und neuer Motivation. Dank gilt auch Gregor Maschkowitz und Oliver Braum, die ebenfalls immer für Diskussionen rund um das Labor zu haben waren. Auch die wiederholten abendlichen Restaurant-Prüfungen trugen immer zur guten Stimmung bei, besonders der „spanische Abend“ wird mir in Erinnerung bleiben! Ich wünsche ihnen alles Gute für die Zukunft! Besonderer Dank gilt aber Anne Brunnemann, die mir über die Arbeit hinaus eine Freundin geworden ist, für ihre kritischen Anmerkungen und ihre Unterstützung, auch außerhalb des Labors. Ich wünsche ihr nur das Beste für die Zukunft!

Für die Hilfestellungen zu der *En passant*-Mutagenese und Tipps für die Kinetikdarstellungen danke ich Dr. Karsten Tischer, der jetzt am Bundestag in Berlin arbeitet.

Andi Krumbholz, Andrea Hölzgen und Bianca Großheim danke ich für die nette Arbeitsatmosphäre.

Frau Prof. Dr. Michaela Kress und ihrer AG danke ich für die Einweisung in die Neuronen-Präparation.

Für die Einweisung in die *micorfluidic chamber*-Systeme bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Beate Sodeik und Anna Buch.

Bei Dr. Bertsch und seiner AG im Institut für Immunologie bedanke ich mich für die Einweisung in die Bedienung des Konfokalen Laser Scanning Mikroskopes und die Unterstützung bei der Anfertigung der konfokalen Aufnahmen.

Für die Durchführung des *deep sequencings* bedanke ich mich bei Dr. Hemmrich-Stanisak und seiner AG vom Institut für Klinische Molekularbiologie der CAU in Kiel.

Und ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester sowie meinem Partner Hans Dühr, die mich immer unterstützt und motiviert haben.

---

## **10 ERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich, dass die Abhandlung der vorliegenden Dissertation nach Inhalt und Form die eigene Arbeit ist, abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer Prof. Dr. Helmut Fickenscher. Teile dieser Arbeit sind zur Publikation eingereicht. Des Weiteren entstand die vorliegende Arbeit unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Zudem erkläre ich, dass ich noch keinen Promotionsversuch unternommen habe.