

Aus dem Institut für Virologie
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Vergleichende Analysen zur Replikation und zum intraaxonalen Transport des
Pseudorabiesvirus und des Herpes Simplex Virus Typ 1 in primären Rattenneuronen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Alexandra Stephanie Negatsch
aus Köln

Leipzig, 2014

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Manfred Coenen

Betreuer: Prof. Dr. Dr. h.c. Thomas C. Mettenleiter
Prof. Dr. Dr. Thomas W. Vahlenkamp

Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. Thomas C. Mettenleiter, Institut für molekulare Virologie und Zellbiologie, Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Greifswald - Insel Riems
Prof. Dr. Dr. Thomas W. Vahlenkamp, Institut für Virologie, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig
Prof. Dr. Joachim Kühn, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Medizinische Fakultät, Westfälische Wilhelms-Universität Münster

Tag der Verteidigung: 25. Februar 2014

Diese Arbeit wurde am Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit am Standort Riems im Institut für molekulare Virologie und Zellbiologie (ehemals Institut für Molekularbiologie) unter der Betreuung von Prof. Dr. Dr. h.c. Thomas C. Mettenleiter und Prof. Dr. Dr. Thomas W. Vahlenkamp angefertigt.

Für meine Eltern, Geschwister und Sebastian

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungen.....	6
1 Einleitung.....	1
2 Literaturübersicht	3
2.1 Herpesviren	3
2.1.1 Alphaherpesviren.....	4
2.1.1.1 Aufbau	4
2.1.1.2 Genomorganisation.....	6
2.1.2 Das Pseudorabiesvirus (PrV)	6
2.1.3 Das Herpes Simplex Virus Typ 1 (HSV-1)	7
2.2 Neurotropismus und Replikationszyklus von Alphaherpesviren	9
2.2.1 Neurotropismus	9
2.2.2 Replikationszyklus.....	10
2.2.2.1 Eintritt der Viren in die Wirtszelle.....	11
2.2.2.2 DNA Replikation und Genexpression	11
2.2.2.3 Kapsidassembly und Freisetzung aus dem Zellkern.....	12
2.2.2.4 Tegumentierung und sekundäre Umhüllung.....	13
2.2.2.5 Freisetzung der Viren aus der Wirtszelle.....	14
2.2.3 Latenz	14
2.2.4 Intraaxonaler Transport von Alphaherpesviren	15
2.2.4.1 Retrograder intraaxonaler Transport	16
2.2.4.2 Anterograder intraaxonaler Transport	17
2.2.4.2.1 Anterograder intraaxonaler Transport von PrV	18
2.2.4.2.2 Anterograder intraxonaler Transport von HSV-1	19
2.2.4.2.3 Die Proteine US9, gE, und gI.....	20
2.2.4.2.4 Analysesysteme für den anterograden intraaxonalen Transport	21
2.3 Neuronale primäre Zellkulturen.....	22
2.3.1 Anatomische Grundlagen des oberen Cervicalganglions und des Spinalganglions	23
2.3.1.1 Oberes Cervicalganglion (Ganglion cervicale craniale)	23
2.3.1.2 Spinalganglion (Ganglion spinale).....	23
3 Tiere, Material und Methoden	25
3.1 Tiere	25

3.2	Material.....	25
3.2.1	Virusstämme	25
3.2.2	Säugerzelllinien	26
3.2.3	Bakterienstämme.....	26
3.2.4	Bacterial Artificial Chromosome.....	26
3.2.5	Plasmide	26
3.2.6	Antikörper und Antiseren	27
3.2.7	Medien und Lösungen für die permanente Zellkultur	27
3.2.8	Medien und Lösungen für die primäre Zellkultur	28
3.2.9	Medien und Lösungen für die Bakterienkultur.....	28
3.2.10	Puffer und Lösungen	29
3.2.10.1	Southern Blot	31
3.2.10.2	Western Blot	32
3.2.11	Reagentien.....	32
3.2.11.1	Nukleinsäuren und Nukleotide	32
3.2.11.2	Aminosäuren und Proteine.....	33
3.2.11.3	Enzyme.....	33
3.2.11.4	Kommerzielle Kits	33
3.2.11.5	Chemikalien	34
3.2.12	Geräte und Laborhilfsmittel.....	35
3.2.13	Verbrauchsmaterialien.....	37
3.2.14	Internetadressen und Software.....	38
3.3	Methoden.....	38
3.3.1	Rattenzucht zur terminierten Embryonengewinnung.....	38
3.3.1.1	Verpaarung der Ratten.....	38
3.3.1.2	Vaginalzytologie.....	38
3.3.1.3	Euthanasie der tragenden Ratte	38
3.3.1.4	Gewinnung der Embryonen.....	39
3.3.2	Zellkultur.....	39
3.3.2.1	Präparation von primären Rattenneuronen	39
3.3.2.1.1	Präparierung und Kultivierung von oberen Cervikalganglien.....	39
3.3.2.1.2	Präparierung und Kultivierung von Spinalganglien.....	40
3.3.2.2	Kultivierung von permanenten Zelllinien.....	40
3.3.3	Explantatsystem	40
3.3.3.1	Vorbereitung der Zellkulturgefäße	40

3.3.3.2	Einsäen und Kultivierung der Explantate	41
3.3.3.3	Infektion der Explantate	41
3.3.4	Modifiziertes Drei-Kammer-System	41
3.3.4.1	Vorbereitung der Zellkulturgefäße	41
3.3.4.2	Generierung des modifizierten Drei-Kammer-Systems.....	41
3.3.4.3	Einsäen der Zellen ins modifizierte Drei-Kammer-System.....	42
3.3.4.4	Behandlung des modifizierten Drei-Kammer-Systems mit 1-β-D-Arabinofuranosylcytosin (Ara-C).....	42
3.3.4.5	Infektion des modifizierten Drei-Kammer-Systems	43
3.3.5	Elektronenmikroskopie	43
3.3.6	Live-Cell-Imaging.....	43
3.3.7	Virusanzucht.....	44
3.3.7.1	Virusanzucht	44
3.3.7.2	Plaquetest.....	44
3.3.8	DNA-Isolierung und Analyse.....	45
3.3.8.1	Präparation von Virus-DNA.....	45
3.3.8.2	Phenolextraktion und Ethanolpräzipitation	45
3.3.8.3	Präparation von Plasmid-DNA	45
3.3.8.4	Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration.....	46
3.3.8.5	Southern-Blot-Hybridisierung	46
3.3.8.6	Sequenzierung.....	47
3.3.9	RNA-Isolierung und Analyse.....	47
3.3.10	DNA-Klonierung.....	47
3.3.10.1	Spaltung der DNA mit Restriktionsenzymen.....	47
3.3.10.2	Agarosegelelektrophorese	48
3.3.10.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	48
3.3.10.4	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	48
3.3.10.5	Klenow-Behandlung	49
3.3.10.6	Phosphorylierung von Nukleinsäuren.....	49
3.3.10.7	Phosphatase-Behandlung von DNA-Vektoren.....	49
3.3.10.8	Ligation	49
3.3.10.9	Herstellung kompetenter Bakterien	49
3.3.10.10	Transformation kompetenter Bakterien	50
3.3.10.11	Herstellung kompetenter Bakterien für Elektroporation	50
3.3.10.12	Transformation elektrokompenter Bakterien.....	50

3.3.11	Herstellung und Charakterisierung von rekombinanten Viren	50
3.3.11.1	BAC-Mutagenese.....	50
3.3.11.2	Transfektion eukaryontischer Zellen.....	51
3.3.11.2.1	Calcium-Phosphat-Präzipitation.....	51
3.3.11.2.2	FuGENE® HD Transfection Reagent.....	52
3.3.11.3	Plaquereinigung	52
3.3.11.4	Ein-Stufen-Wachstumskinetik	52
3.3.11.5	Plauegrößenbestimmung	53
3.3.12	Proteinnachweis	53
3.3.12.1	Western-Blot	53
3.3.12.2	Coomassie-Färbung.....	54
3.3.12.3	Indirekter Immunfluoreszenztest	54
3.3.13	Herstellung monospezifischer Antiseren.....	55
3.3.13.1	Expression bakterieller Fusionsproteine.....	55
3.3.13.2	Elektroelution der Fusionsproteine.....	55
3.3.13.3	Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration.....	55
3.3.13.4	Kaninchenimmunisierung.....	56
4	Ergebnisse.....	57
4.1	Neuronenkultivierung.....	57
4.1.1	Kultivierung des oberen Cervikalganglions	57
4.1.2	Kultivierung von Spinalganglien.....	57
4.2	Infektionsexperimente in Explantaten und ultrastrukturelle Analyse	59
4.2.1	Infektion mit PrV Kaplan	60
4.2.2	Infektion mit HSV-1 HFEM.....	60
4.2.3	Infektion mit HSV-1 SC 16.....	61
4.2.4	Infektion mit HSV-1 17+.....	62
4.2.5	Infektion mit HSV-1 KOS	63
4.3	Etablierung eines modifizierten Drei-Kammer-Systems	65
4.3.1	Elektronenmikroskopie	69
4.3.1.1	Nicht infizierte Spinalganglien	69
4.3.1.2	Infektion mit PrV Kaplan.....	72
4.3.2	Live-Cell-Imaging.....	74
4.3.2.1	Infektion mit PrV KaplanUL35gfp	74
4.3.2.2	Infektion mit PrV Δ US9UL35gfp	77
4.3.3	Etablierung einer Ein-Stufen-Wachstumskinetik in primären Rattenneuronen	78

4.4 Vergleichende Analyse von HSV- 1 KOS und HSV- 1 17+ bezüglich der Genregion US9 und US8a.....	79
4.4.1 Sequenzierung	79
4.4.2 RNA Analyse	82
4.4.3 Proteinanalysen.....	82
4.4.4 Herstellung und Charakterisierung von US8a und US9 HSV-1 17 Deletionsmutanten	84
4.4.4.1 Generierung der Transferplasmide.....	84
4.4.4.2 BAC-Mutagenese.....	84
4.4.4.3 Charakterisierung.....	85
4.4.4.3.1 Ein-Stufen-Replikationskinetik	85
4.4.4.3.2 Plaquegrößenanalyse.....	85
5 Diskussion.....	87
6 Zusammenfassung.....	95
7 Summary	97
8 Literaturverzeichnis	99
Anhang	115
Danksagung.....	116

Abkürzungen

A	Adenin
A.dest.	Aqua destillata
A.tridest.	Aqua tridestillata
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ARA-C	β -D-Arabinofuranosylcytosin
AS	Aminosäure
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
Bp	Basenpaare
Brn-3	brain-specific homeobox protein
BSA	Bovines Serum-Albumin
C	Cytosin
Ca	Circa
CBS	Citrate buffered saline
CPE	Cytopathogener Effekt
DABCO	(1,4-Diazabicyclo(2,2,2)-octan)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
DRG	Dorsal Root Ganglia (Spinalganglien)
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
FC	Fragment crystalline
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut
FLP	Flippase-Rekombinase
FRT	FLP recognition target
G	Guanin
g(p)	Glykoprotein
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion S-Transferase
H	Stunde
HBS	HEPES-gepufferte Salzlösung
HCF	Host cell factor
HCMV	Humanes Cytomegalievirus
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaciny]-ethan-sulfonsäure
HHV	Humanes Herpesvirus
Hpi	Hours post infection
Hsp	Heat shock protein

HSPG	Heparansulfatproteoglykan
HSV-1	Herpes Simplex Virus Typ1
IAC	Isoamylalkohol/Chloroform
IE	Immediate early
IFT	Immunfluoreszenztest
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IR	Internal repeat
IR	Inverted repeat
IHRES	Internal ribosomal entry site
Kb	Kilobasenpaare
Kbp	Kilobasenpaare
kDA	Kilodalton
kDa	Kilodalton
KHC	Kinesin heavy chain
KIF	Kinesinisoform
KLC	Kinesin
Ktlg.-Nr.	Katalognummer
LAP	Latency-associated promotor
LAT	Latency-associated transcript
LB	Luria Broth
M-Kompartiment	Mittleres Kompartiment
MEM	Minimum essential medium
MES	2-N-Morpholinoethansulfonsäure
Min	Minute
MOI	Multiplicity of infection
mRNA	Messenger RNA
MT	Mikrotubuli
MTOC	Microtubule organizing center
N-Kompartiment	Neuritenkompartiment
NGF	Nerve Growth Factor
Nm	Nanometer
Nt	Nukleotid(e)
Oct-1	Octamer binding protein 1
OD	Optische Dichte
ORF	Open reading frame
Ori	Origin of replication
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pfu	Plaqueformingunits
pH	Potentia hydrogenii
PrV	Pseudorabiesvirus
Rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
S-Kompartiment	Somakompartiment

SCG	Superior cervical Ganglia (oberes Cervikalganglion)
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin
TGN	Trans-Golgi Netzwerk
TR	Terminal repeat
UL	Unique long Region
ÜN	Über Nacht
US	Unique short Region
UV	Ultraviolett
ZU	Ultrazentrifuge
Vhs	Virion host shut-off
ZB	Zellbank
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Die Familie der Herpesviren ist eine der bedeutendsten Virusfamilien. Über 200 verschiedene Herpesviren sind bereits bekannt. Herpesviren sind ubiquitär verbreitet und human- wie auch veterinärmedizinisch von hoher Bedeutung. Im Fokus dieser Arbeit stehen das Herpes Simplex Virus Typ 1 (HSV-1) und das Pseudorabiesvirus (PrV). Beide werden in die Ordnung der Herpesvirales, Familie der Herpesviridae, Subfamilie Alphaherpesvirinae, Genus Simplexvirus (HSV-1) bzw. Genus Varizellovirus (PrV) eingeteilt. HSV-1 und PrV sind gut untersucht und eignen sich optimal als Modell für Studien zur Replikation und zum intraaxonalen Transport *in vitro* als auch *in vivo*. Alphaherpesviren zeichnen sich durch ihr breites Wirtsspektrum, die schnelle Replikationsrate und den ausgeprägten Neurotropismus aus. Dieser beinhaltet die Möglichkeit der Etablierung einer Latenz in neuronalen Ganglien als Voraussetzung für eine lebenslange Infektion. Die Viren müssen dabei nach Infektionseintritt und lytischer Replikation über weite Strecken aktiv intraaxonal transportiert werden, um zum Ort der Latenz zu gelangen. Zwei verschiedene intraaxonale Transportrichtungen sind bekannt. Beim retrograden Transport handelt es sich um den Transport nach der Virusinfektion zum neuronalen Zielort. Dieser Vorgang ist gut untersucht. Morphologisch werden nackte Viruskapside entlang von Mikrotubuli zum gewünschten Ort der Latenz transportiert. Der anterograde intraaxonale Transport dagegen beschreibt den umgekehrten Weg. Nach Reaktivierung der Latenz werden die Viruspartikel entlang von Mikrotubuli zum Ort der Primärinfektion transportiert. Dabei werden zwei verschiedene Transportmodelle kontrovers diskutiert: Das Married Model und das Subassembly Model. Beim Married Model werden behüllte Virionen in Transportvesikeln entlang des Axons transportiert und am Axonterminus bzw. der Synapse entlassen. Dieses Modell wurde für PrV vermutet und konnte mittlerweile hinreichend bestätigt werden. Beim Subassembly Model wird vermutet, dass die einzelnen Strukturkomponenten (tegumentassoziiertes Kapsid und Glykoproteinhülle) einzeln entlang des Axons transportiert werden und innerhalb des Axons an Auftreibungen, sogenannten Varicosities, oder am Axonterminus zusammengebaut und als Virionen entlassen werden. Dieses Modell wurde lange für HSV-1 vermutet. Jüngste Studien gaben aber Hinweise darauf, dass auch HSV-1 das Married Model nutzen könnte. Wichtige virale Interaktionspartner für die Vermittlung des anterograden Transports sind die Proteine pUS9, gE und gI. Die Rolle von pUS9 und die Beteiligung am anterograden Transport wird kontrovers diskutiert. Bei PrV wird pUS9 als essentiell vermutet. Dagegen zeigte sich bei HSV-1 bislang ein eher kontroverses Bild. Für die Analysen des intraaxonalen anterograden Transports bei PrV und HSV-1 und die Aufklärung der Funktion von pUS9 wurden bisher unterschiedliche Techniken verwendet. So kamen neben Elektronenmikroskopie und Live-Cell-Imaging-Mikroskopie auch Fluoreszenzmikroskopie zum Einsatz. Die Varianz der neuronalen Zellkultur und der verwendeten Analysesysteme ist dabei enorm. So wurden Explantatsysteme, aber auch Kammersysteme verwendet. Ein direkter Vergleich zwischen PrV und HSV-1 in ein und demselben Analysesystem wurde bisher nicht durchgeführt. Zur Differenzierung des anterograden Transports wurden häufig Drei-Kammer-Modelle verwendet. Aber auch hier konnten keine eindeutigen Ergebnisse erzielt werden. Problematisch war hier besonders die Qualität der elektronenmikroskopischen Aufnahmen, die keine eindeutigen Aussagen zuließen. Die Aufklärung der intraaxonalen anterograden Transportmechanismen ist von großer Bedeutung. Die besondere Relevanz liegt hier in einer

möglichen Neuentwicklung von antiviralen Therapeutika. Bislang werden nur Therapeutika zur Hemmung der DNA Synthese eingesetzt. Auch könnten so möglicherweise schwere Reinfektionen verhindert werden. Weiterhin ist die Aufklärung der intraaxonalen anterograden Transportvorgänge für neuronale Tracer- und Vektorsysteme von großer Bedeutung.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb zum ersten Mal ein etabliertes neuronales Kultursystem zur Analyse des intraaxonalen anterograden Transports genutzt werden, um zwischen PrV und HSV-1 direkt vergleichen zu können. Hierfür wurde das Explantatsystem eingesetzt, welches zuvor bereits für PrV erfolgreich etabliert worden war. Es wurden vier verschiedene HSV-1 Stämme untersucht und analysiert. Weiter sollte ein Drei-Kammer-System so modifiziert werden, dass es auch für die Analyse mittels Elektronenmikroskopie genutzt werden konnte und gleichzeitig eine optimale Bildqualität lieferte. Zur optimalen Ausnutzung der gewonnenen Embryonen für die neuronalen Primärkulturen wurde eine weitere Neuronenkultur aus Spinalganglien etabliert. Im Verlauf der vorliegenden Arbeit zeigte sich bei den Explantatanalysen im Vergleich zu den drei anderen HSV-1 Stämmen ein auffälliger Phänotyp des HSV-1 Stamm KOS. Aufgrund des unterschiedlichen Phänotyps sollte der Virusstamm hinsichtlich der Genregion US9 weiter untersucht werden. Basierend auf diesen Analysen wurden vom HSV-1 Stamm 17 isogene Deletionsmutanten von pUS9 und pUS8a mittels rekombinanter BAC Technologie hergestellt, um für die weitere Analyse im modifizierten Drei-Kammer-System zur Verfügung zu stehen.

2 Literaturübersicht

2.1 Herpesviren

Die besondere Bedeutung der Herpesviren liegt in ihrem weltweiten Vorkommen und der ubiquitären Verbreitung. Es sind über 200 Arten von verschiedenen Herpesviren bereits bekannt und nahezu jede Spezies ist betroffen. So findet man Herpesviren nicht nur in Säugern oder Vögeln, sondern auch in Reptilien und Muscheln. Der Name der Herpesviren leitet sich vom griechischen Wort „herpein“ ab, welches kriechen bedeutet. Herpesviren breiten sich über den gesamten Körper aus. Nach der lokalen Infektion „kriechen“ sie sozusagen zum jeweiligen Zielort (METTENLEITER. 2010, MODROW. 2008). Seit dem Mittelalter bekannt, werden die Herpesviren heutzutage vor allem mit milden Infektionen der Haut- und Schleimhäute assoziiert. Dabei sind sie in der Lage, neben milden und klinisch inapparent verlaufenden Infektionen, auch schwere Enzephalitiden und maligne Tumore auszulösen (SODEIK et al. 2009). Besonders bei immungeschwächten Patienten spielen Herpesvirusinfektionen eine immer größere Rolle. Neben der hohen humanmedizinischen Relevanz sind Herpesviren auch veterinärmedizinisch von großer Bedeutung. So sind tierpathogene Herpesviren sowohl im Nutz- als auch im Heimtierbereich für hohe wirtschaftliche Verluste verantwortlich. Charakteristisch für alle Herpesviren ist die typische Viruspartikelmorphologie (ROIZMAN et al. 2007). Das Partikel besteht aus einem linearen doppelsträngigem DNA Genom dem sogenannten Core und den 3 Strukturkomponenten Kapsid, Tegument und Glykoproteinhülle, auch Envelope genannt. Die reifen Virionen sind in Abhängigkeit der eingelagerten Tegumentschicht zwischen 120 und 260 nm groß. Das lineare doppelsträngige DNA Genom variiert innerhalb der Herpesviren sehr stark in seiner Größe und Basenzusammensetzung. So werden Genomgrößen zwischen 130 (Varizella-Zoster-Virus, LIU und ZHOU 2007) und 295 kbp (Koi-Herpesvirus, AOKI et al. 2007) beobachtet. Bei Bestimmung des G/C Gehaltes der einzelnen Herpesvirusgenome fand man Spannen zwischen 36% (Humanes Herpesvirus-7, MEGAW et al. 1998) und 74% (Herpes B Virus, PERELYGINA et al. 2003). Bei der Einteilung der Herpesviren spielen vor allem die Morphologie der Viruspartikel, die Serologie, die biologischen Eigenschaften und der Genomaufbau eine entscheidende Rolle (DAVISON et al. 2010, DAVISON et al. 2009). Die Ordnung der *Herpesvirales* umfasst neben der Familie der *Herpesviridae*, in der die Säuger- und Vögelviren eingeteilt sind, auch die neue Familie der *Alloherpesviridae*. Dort sind die Viren der Reptilien und Fische zu finden. Ein bekannter Vertreter ist z.B. das Koi-Herpesvirus, welches im Genus *Cyprinivirus* zu finden ist. Das einzige bislang bekannte Muschelherpesvirus ist in die Familie der *Malacoherpesviridae* eingeteilt. (DAVISON. 2010, DAVISON et al. 2005). Die Familie der *Herpesviridae* wird weiter unterteilt in die drei Subfamilien *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* und *Gammaherpesvirinae*. Die Subfamilie *Alphaherpesvirinae* umfasst unter anderem die Genera *Simplexvirus* und *Varicellovirus* in denen Human- und Säugetierherpesviren zu finden sind. Dabei werden in das Genus *Simplexvirus* die humanpathogenen Herpes Simplex Viren Typ 1 und 2 (HSV-1 und 2) eingeteilt. Im Genus *Varicellovirus* sind neben dem Varizella-Zoster-Virus (VZV), dem Erreger der Windpocken, auch das tierpathogene Pseudorabiesvirus (PrV), die equinen Herpesviren 1 und 4 (EHV 1 und 4) und die bovinen Herpesviren 1 und 4 (BHV 1 und 4) zu finden. In den Genera *Mardi-* und *Iltovirus* sind pathogene Vogelherpesviren, wie das Virus der infektiösen Laryngotracheitis (ILTIV) und das Marek-Virus (MDV) zu finden. Alphaherpesviren zeichnen sich besonders durch das experimentell breite Wirtsspektrum, eine schnelle Replikationsrate und die Etablierung einer lebenslangen

Latenz in sensorischen Ganglien aus (PELLETT und ROIZMAN 2007). Zur Subfamilie der *Betaherpesvirinae* zählen das humane Cytomegalovirus (HCMV), das humane Herpesvirus Typ 6 (HHV-6) und das humane Herpesvirus Typ 7 (HHV-7). Bekannte tierpathogene Erreger sind z.B. das murine Cytomegalievirus (MCMV) und das Equine Herpesvirus Typ 2 (EHV-2). Die Einteilung erfolgt in die Genera *Cytomegalovirus*, *Muromegalovirus* und *Roseolovirus*. Charakteristisch für Betaherpesviren sind das enge Wirtsspektrum und die lange Dauer des Replikationszyklus. Die infizierten Zellen sind oft vergrößert, was auch als Cytomegalie bezeichnet wird. Anders als bei Alphaherpesviren wird Latenz in nicht-neuronalen Zellen wie in sekretorischen Drüsen, lymphoretikulärem Gewebe und Nierenzellen etabliert (PELLETT und ROIZMAN 2007). Die Vertreter der Gammaherpesviren werden in die Genera *Lymphocryptovirus*, *Rhadinovirus*, *Macavirus* und *Percavirus* eingeteilt. Im Genus *Lymphocryptovirus* wird der Erreger des Pfeifferischen Drüsenfieber, das Epstein-Barr-Virus (HHV-4), eingeteilt. Im Genus *Rhadinovirus* sind neben dem humanen Herpesvirus 8 (HHV-8), das tierpathogene bösartige Katarrhalfieber Virus des Rindes (BKFFV) und das Channel-Catfish-Virus (CCV) zu finden. Die Gammaherpesviren zeichnen sich besonders durch das speziesspezifische Wirtsspektrum und die Fähigkeit eine Latenz vorzugsweise in B- oder T- Lymphozyten zu etablieren aus. Weiter sind sie mit Tumoren assoziiert wie z.B. dem Burkitt Lymphom oder dem Kaposi Sarkom (PELLETT und ROIZMAN 2007).

2.1.1 Alphaherpesviren

2.1.1.1 Aufbau

Alphaherpesviren sind charakteristisch aufgebaut. Die ungefähre Größe der Virionen beträgt zwischen 200 und 250 nm. Die Viruspartikel bestehen aus einem linearen doppelsträngigem DNA Genom, dem sogenannten **Core** und den 3 Strukturkomponenten: **Kapsid**, **Tegument** und **Envelope** (siehe Abb. 1) (PELLETT und ROIZMAN 2007).

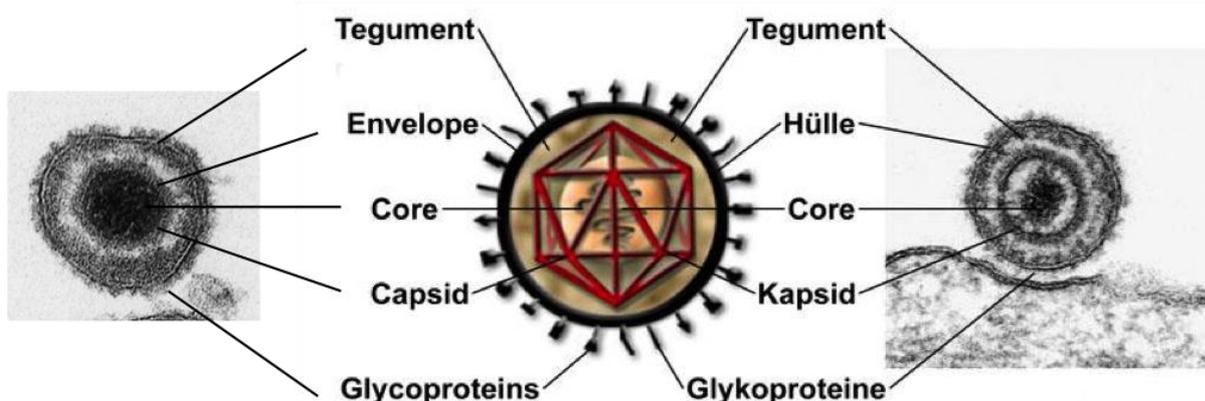


Abb. 1: **Schematische und ultrastrukturelle Darstellung eines Alphaherpesviruspartikels.** Das lineare doppelsträngige DNA Genom, auch Core genannt, ist umgeben vom ikosaedrischen Kapsid. Dieses Nukleokapsid ist eingebettet vom Tegument und von einer äußeren Hülle (Envelope) umgeben. Die Hülle besteht hauptsächlich aus Glykoproteinen, welche als sogenannte Spikes ultrastrukturell zu erkennen sind. (Diese Abb. wurde zur Verfügung gestellt von Dr. habil. Granzow, FLI Insel-Riems)

Beim **Core** handelt es sich um eine fibrilläre Proteinmatrix. Die lineare, doppelsträngige DNA ist mit dieser Matrix assoziiert. Elektronenoptisch wirkt die DNA wie auf einer Art Spule aufgewickelt (FURLONG et al. 1972). Das Core wird von einem ikosaedrischen (T=16) Kapsid aus 162 Capsomeren, welche wiederum aus 150 Hexonen und 12 Pentonen bestehen, umgeben. Es hat einen ungefähren Durchmesser von 125 nm (BROWN und NEWCOMB 2011, PELLETT und ROIZMAN 2007, NEWCOMB et al. 1993). Den Hauptbestandteil des Kapsids bildet das Hauptkapsidprotein, welches vom UL19 Gen kodiert wird. Es handelt sich hierbei um ein innerhalb der Herpesviren stark konserviertes Gen. Das Hauptkapsidprotein formt dabei das Grundgerüst des ikosaedrischen Kapsids (STEVENS und SPEAR 1996), indem jeweils 5 Kopien (Pentone) bzw. 6 Kopien (Hexone) von pUL19 zu 161 Kapsomeren zusammentreten. Verbunden und stabilisiert wird es durch die Triplexproteine, welche aus jeweils zwei Kopien von pUL18 und einer Kopie von pUL38 bestehen (ZHOU et al. 2000). Den Hexonen aufgelagert ist das kleine Kapsidprotein pUL35 (TRUS et al. 1995, BOOY et al. 1994). Während die Hexone die Kanten und Flächen des Kapsids bilden, stellen die Pentone die Eckpunkte dar. An einem Eckpunkt befindet sich ein zylindrisches Portal, welches aus 12 Molekülen von pUL6 gebildet wird. Dieses Protein wird auch als Portalprotein bezeichnet (NEWCOMB et al. 2001) und dient zur späteren Einschleusung und Verpackung der neusynthetisierten DNA (HOMA et al. 1997). Das Kapsid wird wiederum vom **Tegument** umgeben. Es füllt den Raum zwischen Kapsid und Envelope aus. Die Tegumentproteine spielen eine große Rolle während des gesamten Replikationsvorgangs (GUO et al. 2010, METTENLEITER. 2002). Sie sind neben dem Transport der Nukleokapside zum Zellkern auch an der Virionmorphogenese und am Austritt der Virionen aus dem Zellkern beteiligt (SUBAK-SHARPE und DARGAN 1998, FUCHS et al. 2002a,b). Weiterhin wirken sie sowohl an der Aktivierung der herpesviralen Expressionskaskade bei der Replikation, als auch an der Runterregulierung der angeborenen Immunabwehr des Wirts mit (CASTILLO und KOWALIK 2002, ISHOV et al. 2002, ZHU et al. 2002, BRESNAHAN und SCHENK 2000). Das Tegument besteht aus einer inneren Struktur, welche mit den Kapsidproteinen assoziiert ist und einer äußeren Komponente, welche mit den cytoplasmatischen Domänen der viralen Membranproteine interagiert. HSV-1 kodiert für über 26 verschiedene Tegumentproteine (LORET et al. 2008). Dabei stehen besonders pUL36, pUL47, pUL48 und pUL49 im Fokus (HEINE et al. 1974). Weitere wichtige Tegumentproteine sind unter anderem auch das virion host shut-off (vhs) Protein pUL41 als auch die Proteinkinase pUS3 (OVERTON et al. 1992, SCHEK und BACHENHEIMER 1985). Der abschließende **Envelope** besteht vorallem aus Glykoproteinen und wird daher auch als Glykoproteinhülle bezeichnet. PrV und HSV-1 codieren jeweils 16 Envelopeproteine. Darunter sind 11 Glykoproteine gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gK, gL, gM und gN. (PELLETT und ROIZMAN 2007). Einige Glykoproteine liegen als heterodimere Komplexe vor, so z.B. gH/gL und gE/gI. Weiter werden auch noch 4 nicht glykosilierte Membranproteine pUL20, pUL43, pUS9 und pUL24 exprimiert. Ein weiteres Membranprotein pUL34 wird dagegen nur im Stadium der primären Umhüllung nachgewiesen, nicht aber in reifen Virionen (Fuchs et al. 2002b, Klupp et al. 2000a). Die Proteine der äußeren Virushülle übernehmen vielfältige Aufgaben während der Virusmorphogenese. So sind sie für den Eintritt und Austritt der Viren aus der Wirtszelle verantwortlich und auch an der weiteren Virusausbreitung, dem sogenannten cell-to-cell-spread, beteiligt. Weiter übernehmen sie Aufgaben bei der Modulation der Immunantwort und fördern die Bildung von Syncytien (PELLETT und ROIZMAN 2007, POMERANZ et al. 2005).

2.1.1.2 Genomorganisation

Die Genomorganisation ist typisch für Herpesviren und basiert auf der Anordnung von einmalig (*unique*) und wiederholt (*repeat*) vorkommenden Sequenzabschnitten. Diese Musteranordnung ist abhängig vom jeweiligen Vertreter und wird in 6 Klassen, A-F unterteilt (Roizman et al. 2007). Bei HSV-1 und PrV wird das Genom in ein langes und ein kurzes Segment unterteilt. Diese Regionen enthalten einmalig vorkommender Sequenzfolgen, die als Unique long (UL) und Unique short (US) Regionen bezeichnet und von sich wiederholenden Sequenzen flankiert werden. Je nach Lage, an den Enden oder innerhalb des Genoms werden diese Sequenzfolgen auch als Terminal Repeats (TR) oder Internal Repeats (IR) bezeichnet. Durch Rekombination innerhalb der Repeat Regionen entstehen bei HSV-1 vier und bei PRV zwei Genomisomere. Grundsätzlich liegt das herpesvirale Genom als lineare, doppelsträngige DNA vor. Die Länge variiert zwischen 120 und 250 kbp. Nach der Infektion nimmt das Genom eine zirkuläre Form an und liegt episomal im Kernplasma vor. Die Expression der einzelnen Gene wird von einem dem Leserahmen vorgelagerten Promoter kontrolliert. Dieser wird von der wirtseigenen RNA-Polymerase II erkannt. Für die Bezeichnung der einzelnen Gene bei HSV-1 und PrV werden die codierenden Leserahmen anhand ihrer Lokalisation vom Anfang der UL Region bis zum Ende der US Region durchnummeriert (UL1-UL56, US1- US12). Für die Bezeichnung der jeweiligen Proteine wird der Präfix „p“ bzw. „g“ bei Glykoproteinen verwendet.

2.1.2 Das Pseudorabiesvirus (PrV)

Das Pseudorabiesvirus, als Suid Herpesvirus 1 (SHV-1) bezeichnet, ist weltweit verbreitet und von großer wirtschaftlicher Bedeutung. Es ist Überträger der Aujeszkyschen Krankheit. Entdeckt wurde die Erkrankung 1902 durch Aladar Aujeszky (AUJESZKY. 1902). Während das Virus im westlichen Teil Europas und den USA weitestgehend eingedämmt ist, stellt es in anderen Ländern durch die endemische Verbreitung weiterhin eine große Problematik da (POMERANZ et al. 2005). Besonders in Wildschweinen ist das Virus weiterhin verbreitet (MAHMOUD et al. 2011, HAHN et al. 2010, SCHULZE et al. 2010) In Deutschland gehört die Krankheit zu den anzeigepflichtigen Tierseuchen. Hauptwirt und Überträger der Aujeszkyschen Krankheit ist das Schwein, wobei neben Hunden auch Katzen, Wiederkäuer, Nerze, Frettchen und Nagetiere als Endwirte sehr empfänglich sind (METTENLEITER. 2008). Eine Infektion der Endwirte verläuft in der Regel tödlich. Eine humanpathogene Eigenschaft des Virus konnte nicht nachgewiesen werden. Epidemiologisch spielen Endwirte aber keine Rolle. Beim Schwein ist die Ausprägung der klinischen Leitsymptomatik und auch die Pathogenese sehr variabel. Sie variieren beide je nach Alter der Tiere und Virulenz der Erreger (METTENLEITER. 2008, GERDTS et al. 1997, PENSAERT und KLUGE 1989). Generell werden schwere Verläufe, gekennzeichnet durch zentralnervöse Störungen insbesondere Enzephalitiden, nur bei Ferkeln beobachtet. Je jünger die Tiere desto stärker sind die Störungen des Zentralnervensystems ausgeprägt. Bei älteren Tieren dominieren Störungen im Respirationstrakt und Reproduktionstrakt. So werden bei Mastschweinen neben respiratorischen Symptomen und hohem Fieber häufig auch Anorexie und somit ein starker Gewichtsverlust beobachtet. Selten äußern sich ZNS Symptome durch eine Schwäche in der Hinterhand und einer hundesitzigen Stellung. Bei Sauen werden zusätzlich durch Endometritis und Plazentitis ausgelöste Aborte mit teilweise mumifizierten Feten beobachtet (GERDTS et al. 1997, PENSAERT und KLUGE 1989). Sekundärinfektionen z.B. durch Influenzaviren oder Bakterien können den Verlauf verkomplizieren. Das Ausmaß der wirtschaftlichen Verluste ist enorm. Eine

Behandlung erfolgt symptomatisch, wobei das jeweilige nationale Tierseuchenrecht zur Anwendung kommt. Durch die Entwicklung des ersten Markerimpfstoffs konnte PrV eingedämmt werden. Dabei setzten sich attenuierte Impfstoffe durch, die am Glykoprotein E und an der Thymidinkinase deletiert sind (MARESCH et al. 2012, van OIRSCHOT et al. 1990). Die Pathogenese startet zumeist mit einer Infektion über den Respirationstrakt. Das Nasensekret gilt als besonders virulent und ist neben Milch und Sperma der bedeutendste Infektionsweg (DIEUZY et al. 1987). Das Virus vermehrt sich primär in den Epithelien der Nasen- und Rachenschleimhaut. Die weitere Ausbreitung erfolgt über die lymphatischen Bahnen. Über den *N. olfactorius* gelangen die Viruspartikel in den Trigeminierv, um dort eine Latenz zu etablieren. Nach Reaktivierung werden die Viren über die neuronalen Leitungsbahnen an den Ort der Primärinfektion zurücktransportiert. Auch unter Laborbedingungen kommt PrV eine wichtige Rolle zu. So eignet es sich besonders als Modell, um die Virusmorphogenese und die damit verbundenen Transportvorgänge der Alphaherpesviren genauer erforschen zu können (POMERANZ et al. 2005). Durch die hochvirulenten Eigenschaften in Bezug auf Nager können diese hervorragend als Modellorganismen untersucht werden (KLOPFLEISCH et al. 2006, BABIC et al. 1994). Dagegen wird durch die fehlende Infektion zum Menschen ein sicheres Arbeiten im Labor gewährleistet. Besonders Studien zu intraaxonalen Transportvorgängen und neuronalen Tracersystemen sind so möglich (METTENLEITER. 2008). Weiter wird PrV erfolgreich als virales Vektorsystem eingesetzt (CHEN et al. 2011, ZHANG et al. 2011).

2.1.3 Das Herpes Simplex Virus Typ 1 (HSV-1)

Über 90% der Bevölkerung sind mit HSV-1 infiziert. Damit ist es die weltweit wohl häufigste Virusinfektion. Der Großteil der HSV-1 Infektionen verläuft inapparent oder sehr mild und ist gekennzeichnet durch Veränderungen an Haut- und Schleimhäuten. Es können aber auch schwere Infektionen ausgelöst werden. Betroffen sind hier das Gehirn, die Augen, die inneren Organe und der Gastrointestinaltrakt (METTENLEITER. 2010, SODEIK et al. 2009). Besonders bei immungeschwächten Personen spielen diese Krankheitsbilder eine wichtige Rolle (KEATING et al. 2012, SIEBRACK et al. 1982). Die Pathogenese startet meistens durch Aufnahme der Viren an verletzten Haut- und Schleimhautzellen. Nach einer lokalen lytischen Infektion in den Epithelzellen und Keratinozyten werden die Viruspartikel innerhalb von 1-2 Tagen retrograd entlang der sensorischen Nervenbahnen zum Ganglion, dem Ort der Latenzbildung, transportiert (PELLETT und ROIZMAN 2007). Bevorzugt ist hier das Trigeminale Ganglion, aber auch andere Ganglien wie Spinalganglien im Lumbosakralbereich oder das Ganglion nodosum können infiziert werden (PERNG und JONES 2010). Es folgt die Etablierung einer Latenz, welche Tage bis Jahre andauern kann. Nach der Reaktivierung werden die Viren erneut anterograd entlang der sensorischen Nervenbahnen zur Zielzelle, dem Eintrittsort der Primärinfektion, transportiert, um dort eine Reinfektion auszulösen. Die Übertragung erfolgt meistens über den Speichel, aber auch durch Geschlechtsverkehr und bei der Geburt. Klinisch muss vor allem zwischen einer Primärerkrankung und Rezidiven unterschieden werden. Die Inkubationsdauer bei einer Primärinfektion beträgt 2 - 12 Tage und findet meistens schon im Kindesalter statt. Rezidivierende Infektionen können vor allem durch Stress, Infektionen, Sonnen- oder Röntgenbestrahlung oder auch Immunsuppression ausgelöst werden. Am häufigsten wird HSV-1 in der Bevölkerung mit dem Krankheitsbild des Herpes labialis assoziiert. Dabei handelt es sich um eine rezidivierende Infektion am Übergang zwischen Haut und Schleimhaut in Form von juckenden Papeln, die sich zu

1-3 mm großen Bläschen entwickeln. Die Bläschen platzen auf und heilen entweder unter Krustenheilung ab oder entwickeln sich zu Geschwüren besonders in der Nasolabialregion. Je nach Lokalisation handelt es sich dann um Herpes labialis oder facialis (FATAHZADEH 2012). Weitere Krankheitsbilder, die bei einer HSV-1 Infektion auftreten können, sind die Gingivostomatitis herpetica, Herpes genitalis, das Exzema herpeticum und die Keratoconjunctivitis herpetica. Bei der Gingivostomatitis herpetica handelt es sich um eine Manifestation einer Primärinfektion im Mund- und Zahnfleischbereich in Form von Bläschen und Ulzeration. Beim Herpes genitalis tritt eine Infektion im Genitalbereich auf, diese wird meistens eher durch das nahe verwandte HSV-2 ausgelöst. Bei der Keratoconjunctivitis herpetica findet man Bläschenbildung und ggf. Ulzerationen im Epithel der Kornea und auf der Bindehaut. Diese können eine Hornhauttrübung zur Folge haben. Wiederholte Rezidive oder ein Eindringen in tiefere Hautschichten führen meist zur Erblindung (ASHAYE und AIMOLA 2008, HOGAN et al. 1965). Weiter können schwere Infektion des ZNS beobachtet werden, wie die Herpes-Simplex-Enzephalitis oder Herpes neonatorum. Bei der Enzephalitis handelt es sich um eine seltene, lebensbedrohliche Primärinfektion, die sich in typischen Enzephalitissymptomen wie Kopfschmerzen, Erbrechen, Fieber und Krämpfen verdeutlicht. Überlebende klagen häufig über Langzeitschäden (SKELLY et al. 2012, SABAH et al. 1994). Beim Herpes neonatorum wird das Neugeborene während des Geburtsvorganges mit HSV infiziert. Symptomatisch können milde Läsionen der Haut bis hin zu schweren Formen einer generalisierten Herpessepsis beobachtet werden (LEVIN et al. 2001, GABLER-SANDBERGER. 1996). Die generalisierte Form führt unbehandelt zu 80% zum Tod der Kinder (SODEIK et al. 2009). Auch hier tritt eine Infektion mit HSV-2 häufiger auf als mit HSV-1. Mittel der Wahl zur Therapie einer HSV-1 Infektion sind Hemmstoffe der DNA-Synthese wie Aciclovir oder Valaciclovir in Form von Salben oder Cremes bis hin zur oralen oder sogar intravenösen Gabe bei schweren Infektionen (SODEIK et al. 2009).

2.2 Neurotropismus und Replikationszyklus von Alphaherpesviren

2.2.1 Neurotropismus

Eine besondere Eigenschaft von Alphaherpesviren ist der ausgeprägte Neurotropismus. Definitionsgemäß beinhaltet dieser Neurotropismus sowohl die Eigenschaft zur Infektion und Replikation im zentralen Nervensystem, als auch die Fähigkeit zur Etablierung einer lebenslangen Latenz in Neuronen (WHITLEY. 2004). Für die Klinik und Pathogenese spielt das eine große Rolle, da die Viren in der Lage sind, schwere Enzephalitiden auszulösen. Dabei ist sowohl der wirtschaftliche Verlust bei den tierpathogenen Herpesviren von entscheidender Bedeutung, als auch die klinischen Ausmaße beim Menschen, wo es zu einer lebenslangen Schädigung kommen kann. Nach Eintritt des Virus in die Epithelzelle wird das Virus entlang von Axonen der sensorischen Nervenzellen retrograd zum Zellkörper des Ganglions transportiert. Im Zellkörper findet dann entweder die lytische Replikation statt oder das Virus hat die Möglichkeit eine lebenslange Latenz zu etablieren. Nach Reaktivierung durch z.B. Stress, Hitze oder Infektion geht das Virus wieder in den lytischen Replikationszyklus über und die neu generierten Viruspartikel werden anterograd über die axonalen Leitungsbahnen wieder zur Epithelzelle transportiert um eine Reinfektion auszulösen (PELLETT und ROIZMAN 2007) (siehe Abb. 2).

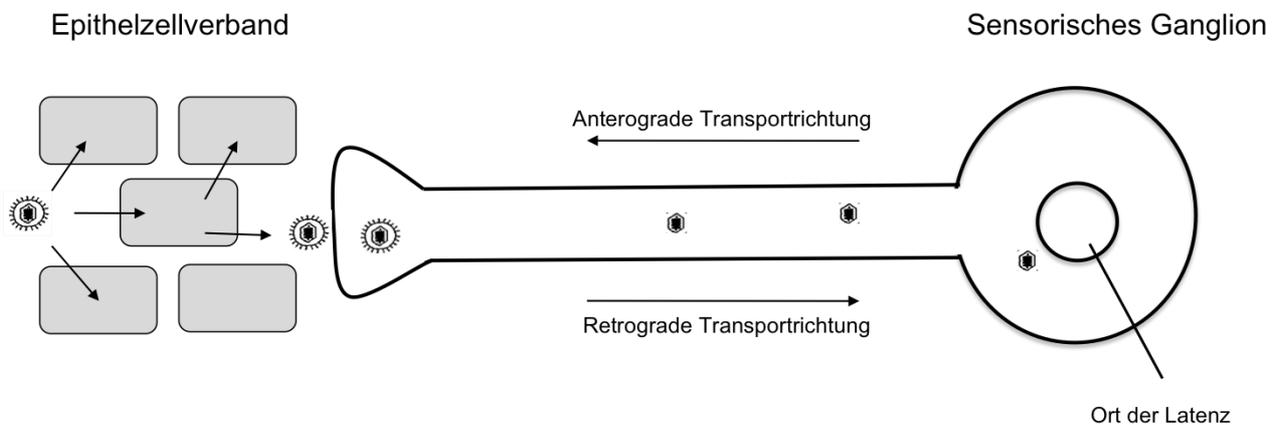


Abb. 2: **Schematische Darstellung eines Infektionsverlauf von Alphaherpesviren.** Der Viruseintritt erfolgt zunächst über die Epithelzelle, wo es zur lytischen Virusreplikation kommt mit anschließendem retrograden intraaxonalem Weitertransport zum Zellkern, um dort entweder weiter lytisch zu replizieren oder eine lebenslange Latenz zu etablieren. Nach Reaktivierung der Latenz durch z.B. Stress, Hitze oder Infektion werden die Viruspartikel anterograd intraaxonale zum Eintrittsort der Primärinfektion zurücktransportiert, um dort eine erneute Infektion hervorzurufen (modifiziert nach ROIZMAN et al. 2007).

2.2.2 Replikationszyklus

Der herpesvirale Replikationszyklus ist für PrV und HSV-1 gut untersucht (GRANZOW et al. 1997, METTENLEITER. 2002, METTENLEITER et al. 2009) und soll im Folgenden genauer erläutert werden. Beim lytischen Replikationszyklus der Alphaherpesviren können verschiedene Morphogenesestadien des Virus während der Replikation beobachtet werden: Eintritt des Virus in die Wirtszelle, DNA Replikation, Virusassembly und Freisetzung der Viren aus der Wirtszelle (siehe Abb. 3). Das Virusassembly kann wiederum in die Stadien des Kapsidassemblies, der Tegumentierung und der sekundären Umhüllung unterteilt werden. Der Zyklus ist unabhängig vom Zelltyp und läuft in neuronalen, polaren Zellen wie auch in nicht polaren Zellen ähnlich ab.

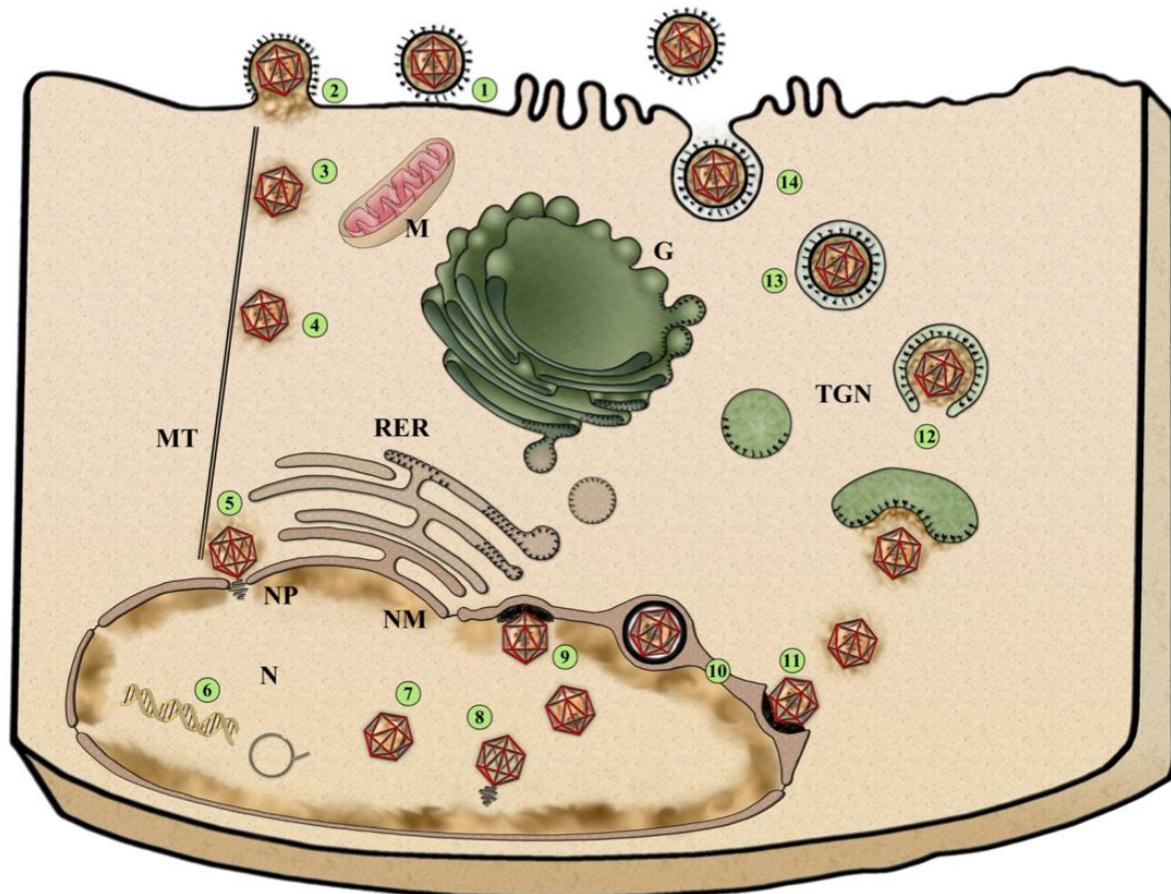


Abb. 3: **Schematische Darstellung des Replikationszyklus am Beispiel vom Pseudorabiesvirus.** Der Zyklus beginnt mit dem Attachment (1) des Virus an die Zellmembran mit anschließender Penetration (2). Entlang von Mikrotubuli (MT) werden die nackten Kapside nach Eintritt zum Zellkern (N) transportiert (3,4), um an der Kernpore (NP) anzudocken und die DNA in den Zellkern zu entlassen (5). Es folgt die Replikation der viralen DNA (6) und der anschließende Kapsidzusammenbau (7,8). Zur Freisetzung aus dem Zellkern binden die Kapside an die innere Kernmembran (9), wo eine Fusion mit der inneren und äußeren Kernmembran stattfindet, um schließlich die Kapside ins Cytoplasma zu entlassen (11). Die weitere Reifung in Form der sekundären Umhüllung folgt im Cytoplasma. Die zur Verfügung gestellten Vesikel vom Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) verbinden sich mit den Kapsiden (12). Die reifen behüllten Virionen in Vesikeln werden zur Zelloberfläche transportiert (13), um als reife Viruspartikel nach Fusion mit der Zellmembran entlassen zu werden (14). RER, raues plasmatisches Retikulum; M, Mitochondrien; G, Golgi-Apparat (modifiziert nach METTENLEITER. 2008)

2.2.2.1 Eintritt der Viren in die Wirtszelle

PrV und HSV-1 sind in der Lage, viele verschiedene Zelltypen zu infizieren. So werden neben Epithelzellen auch Lymphozyten, Fibroblasten oder Neuronen infiziert. Der Prozess des Eintritts der Herpesviren in die jeweilige Wirtszelle ist sehr komplex (CONNOLLY et al. 2011, SPEAR und LONGNECKER 2003). Als Eintrittsweg wird entweder eine direkte Fusion mit der Plasmamembran oder ein durch Endocytose vermittelter Weg, welcher als pH-abhängig oder pH-unabhängig beobachtet wurde, genutzt (MILNE et al. 2005, NICOLA et al. 2003). Der Eintrittsweg ist dabei vom jeweiligen Wirtszelltyp abhängig. Bei Neuronen und Epithelzellen erfolgt meistens der Viruseintritt durch Endocytose. Dabei stehen die viralen Glycoproteine der Virushülle im Vordergrund. Diese vermitteln eine Anheftung, das sogenannte Attachment, und die anschließende Fusion mit der Wirtszellmembran. Ein geringer pH-Wert ist nicht essentiell kann aber den Fusionsprozess unterstützen (DOLLERY et al. 2010). Nur ein geringer Teil der exprimierten Glykoproteine ist für den Eintritt von essentieller Bedeutung. Bei der Bindung an die Wirtszelle stehen die Glykoproteine B und C im Mittelpunkt. Die Glykoproteine interagieren mit Heperansulfaten und Proteoglykanen an der Wirtszelloberfläche und vermitteln so die weitere Fusion (LAQUERRE et al. 1998). Sie gehören zusammen mit dem Heterodimerenkomplex gH/gL zur viralen Fusionsmaschinerie und ermöglichen den Eintritt in die Zelle. Ein weiteres wichtiges Protein beim Zelleintritt ist gD. Während das Glycoprotein gD bei PrV keine essentielle Rolle spielt (CH'NG et al. 2007, SCHMIDT et al. 2001), wird es doch bei HSV-1 auch zum Zellattachment benötigt (GERAGHTY et al. 1998). Dabei bindet gD an 3 verschiedenen Rezeptorklassen: Dem Herpes virus entry mediator (HVEM), Nectin-1 und Nectin-2 und an dem 3-O-Sulfat Heperansulfatrezeptor (CONNOLLY et al. 2011, Spear et al. 2000). Nach der Bindung erfolgt eine Konformationsänderung der Profusionsdomäne von gD und einer anschließenden Aktivierung von gB und gH/L. Über die weitere Rolle des gH/L Komplexes wird intensiv geforscht (EISENBERG et al. 2012, FUCHS et al. 2012). Es wird spekuliert, das gH/gL eine Hemifusion der Zellmembran vermittelt (SUBRAMANIAN und GERAGHTY 2007). Das Glykoprotein B dient im weiteren Verlauf zur Stabilisierung und Vergrößerung der Fusionspore (MAURER et al. 2008, ATANASIU et al. 2007, CAI et al. 1998). Es kommt zur vollständigen Fusion von Virushülle und Zellmembran. Nach Eintritt der Viren in die Zelle dissoziieren die äußeren Tegumentproteine und die mit dem inneren Tegument assoziierten Kapside werden entlang von Mikrotubuli durch das zelluläre Motorprotein Dynein zum Zellkern transportiert, um dort an der Kernpore die virale DNA zu entlassen (GRANZOW et al. 2005, LUXTON et al. 2005). Am Transportprozess beteiligt sind vor allem das große Tegumentprotein pUL36 und pUL37, welche mit dem Nukleokapsid assoziiert sind (ANTINONE et al. 2006, GRANZOW et al. 2005). Das Tegumentprotein pUL36 vermittelt dabei sowohl das Andocken der ankommenden Kapside an die Kernpore (COPELAND et al. 2009) als auch die Freisetzung der DNA in den Zellkern (JOVASEVIC et al. 2008)

2.2.2.2 DNA Replikation und Genexpression

Die herpesvirale Genexpression wird kaskadenartig reguliert (BEN-PORAT und KAPLAN 1985, ROIZMAN et al. 2007). Dabei wird die virale DNA im Nukleus transkribiert und die Proteinsynthese erfolgt anschließend im Cytoplasma. Es wird die Wirtsreplikationsmaschinerie in Form der RNA-Polymerase II zur Transkription genutzt. Bei der Genexpression werden 4 verschiedene Gruppen unterschieden: die α oder immediate-early (IE) Gene, die β Gene oder early (E) Gene und die γ oder late Gene (L), welche in γ_1 (leaky-late) und γ_2 (true late) unterteilt werden. Die Genexpression bei HSV-1 ist besonders gut untersucht. Sie startet ca. 2 - 4 Stunden nach Infektion mit den IE Genen. Unterstützt wird der Vorgang durch das virale Tegumentprotein pUL48. Dabei bindet

pUL48 an das zelluläre host-cell-factor (HCF) Protein. Dieser Komplex wiederum bindet an den zellulären Transkriptionsfaktor Oct-1, welcher an die virale DNA gebunden ist. Bei HSV-1 werden in die Gruppe der IE Gene 6 verschiedene Proteine eingeteilt: ICP0, ICP4, ICP22, ICP27, ICP 47 und US 1.5. Die IE Gene haben neben der Aktivierung und Regulation der E Gene die Aufgabe, die Immunabwehr zu modulieren und die Wirtszelle für die produktive Replikation vorzubereiten. Sie sind besonders gut untersucht und stellen den zentralen Startpunkt der gesamten Genexpression dar (WEIR, 2001). Zwischen 4 und 8 Stunden nach der Infektion ist die höchste Expressionsrate der E Gene zu beobachten. Die exprimierten Proteine übernehmen regulatorische Aufgaben während der Replikation der viralen DNA und dem Nukleotidmetabolismus. Zusätzlich sind sie nötig, um die L Gene zu starten. Die Expression der L Gene ist abhängig von der DNA Replikation. Diese kodieren vor allem für Proteine, welche für das Virusassembly und den Austritt aus der Zelle benötigt werden. Die Vorgänge der DNA Replikation sind innerhalb der Herpesviren stark konserviert. Für HSV-1 ist dieser Vorgang besonders gut untersucht (WELLER und COEN 2012). Während der Replikation nimmt das Genom eine zirkularisierte Form ein und der Vorgang läuft im Rolling Circle Mechanismus ab. Bei HSV-1 und PrV sind innerhalb des Genoms drei Replikationsursprünge bekannt. Zum einen OriS welcher zweimal vorkommt und OriL, der in der Unique Long region zu finden ist. Für die Replikation werden 7 virale Proteine benötigt. Von diesen Proteinen sind 6 innerhalb der gesamten Familie der Herpesviren konserviert. Dabei handelt es sich um ein DNA Einzelstrang bindendes Protein welches ICP8 oder pUL29 genannt wird, die 2 Untereinheiten der DNA Polymerase aus pUL30 und pUL42 und dem Helikase/Primase Komplex des pUL5, pUL8 und pUL52. Als 7. Protein wird zusätzlich pUL9 codiert, welches auch als origin-binding Protein bezeichnet wird. Die DNA Synthese wird an einem der drei Replikationsstartpunkte initiiert. Dabei interagiert OriS oder OriL mit dem pUL9/ICP8 Komplex. Dieser wiederum rekrutiert den Helikase/Primase Komplex, welcher die doppelsträngige DNA entwindet und kurze RNA Primer synthetisiert. Diese starten die DNA Replikation. Dafür wird die DNA Polymerase an die Replikationsgabel rekrutiert. Die Interaktion mit dem Helikase/Primase Komplex ist essentiell (CARRINGTON-LAWRENCE und WELLER 2003) und es konnte gezeigt werden, dass besonders UL8 und UL5 mit pUL30 interagieren (MARSDEN et al. 1996). Nach der Elongation entsteht eine concatemere DNA, welche für die weitere Enkapsidierung benötigt wird (WELLER und COEN 2012, LO PIANO et al. 2011).

2.2.2.3 Kapsidassembly und Freisetzung aus dem Zellkern

Das Kapsidassembly erfolgt autokatalytisch bevorzugt an bestimmten Orten im Zellkern, den sogenannten Assemblons (BAINES und DUFFY 2006). Zuvor werden die benötigten Proteine im Cytoplasma synthetisiert und in den Zellkern transportiert. Die hierfür benötigten Proteine sind innerhalb der Herpesviren hochkonserviert (STEVEN et al. 2005). Dabei werden die Kapsidproteine autokatalytisch um ein Gerüst (*engl. scaffold*) gebaut, welches vom pUL26.5, dem sogenannten Scaffoldprotein, gebildet wird. Weitere benötigte Proteine sind pUL38, pUL35, pUL25, pUL19, pUL18 und pUL6 (siehe 2.1.1.1) Während des autokatalytischen Assemblys entstehen 3 verschiedene Kapsidformen: A-, B- und C-Kapside (BROWN und NEWCOMB 2011, HOMA und BROWN 1998, GIBSON und ROIZMAN 1972). Bei den A-Kapsiden handelt es sich um leere Kapside ohne ein Gerüst und ohne virale DNA. Die B-Kapside enthalten das Gerüst ohne DNA (NEWCOMB und BROWN 1991). Bei den C-Kapsiden handelt es sich um die reifen Nukleokapside, welche auch in infektiösen Virionen zu finden sind (HEYMANN et al. 2003). Zeitgleich mit der Verpackung des DNA Genoms wird auch das Scaffoldprotein durch die Protease pUL26 entfernt. Es entstehen reife Kapside, welche mit den konservierten Proteinen pUL17 und

pUL25 assoziiert sind (KUHNS et al. 2010). Dabei ist pUL17 notwendig, um pUL25 zu binden. Es wird vermutet, dass pUL25 für die weitere Stabilisation der Kapside notwendig ist und später eine Rolle bei der weiteren Tegumentierung einnimmt (siehe 2.2.2.4). Nach dem Kapsidzusammenbau erfolgt die Freisetzung aus dem Zellkern. Der eingesetzte Mechanismus ist einzigartig für Herpesviren, können doch die fertigen Kapside aufgrund ihrer Größe nicht über die Kernpore entlassen werden. Im Vordergrund des Mechanismus, des sogenannten Nuclear Egress, stehen die Membranproteine pUL34 und pUL31, welche als Komplex vorliegen und die Proteinkinase pUS3 (METTENLEITER et al. 2013, REYNOLDS et al. 2002, WAGENAAR et al. 1995). Die Kapside gelangen zur inneren Kernmembran. Dabei interagiert der pUL34/pUL31 Komplex mit den Membranproteinen der inneren Kernmembran Laminin und Emerin (SCHUSTER et al. 2012, LEACH und ROLLER 2010) und es kommt zur Knospung des Kapsids durch die innere Kernmembran in den perinukleären Spalt. Dieser Schritt wird auch als Primary Envelopment bezeichnet. Anschließend wird durch Fusion mit der äußeren Kernmembran der Prozess des sogenannten Deenvelopment eingeleitet (JONES und BAINES 2011, METTENLEITER et al. 2009, GRANZOW et al. 1997). Nach Abschluss des Deenvelopment werden die unbehüllten Kapside wieder ins Cytoplasma entlassen. Während des gesamten Vorganges ist neben pUL31/pUL34 auch die Proteinkinase pUS3 notwendig (KLUPP et al. 2001a). Es konnte gezeigt werden, dass sie für die Phosphorylierung von pUL31 und gB verantwortlich ist (MOU et al. 2009, WISNER et al. 2009). Eine Beteiligung der viralen Fusionsmaschinerie ähnlich wie beim Viruseintritt konnte bislang nicht bestätigt werden. Der genaue Mechanismus des Nuclear Egress ist Gegenstand der aktuellen Forschung und noch nicht abschließend geklärt (METTENLEITER et al. 2013).

2.2.2.4 Tegumentierung und sekundäre Umhüllung

Nach der Freisetzung der Nukleokapside aus dem Zellkern folgt die Tegumentierung und die sekundäre Umhüllung der Viren. Dabei muss eine Verbindung zwischen dem Kapsid, dem inneren und äußeren Tegument und anschließend dem Envelope vermittelt werden. Auch dieser Vorgang ist sehr komplex und zahlreiche Protein-Protein Interaktionen sind beteiligt. Die genauen Vorgänge konnten bislang nicht komplett geklärt werden und sind Gegenstand der aktuellen Forschung. Im Vordergrund steht hier vor allem das große multifunktionale Tegumentprotein pUL36. Bei HSV-1 und PrV ist pUL36 essentiell für die virale Replikation (FUCHS et al. 2004, DESAI. 2000, BATTERSON et al. 1983). Wie bei anderen Morphogeneseschritten bei denen pUL 36 eine zentrale Rolle einnimmt, ist es auch bei der Tegumentierung und anschließendem Transport aus der Zelle von wichtiger Bedeutung. Es wird vermutet ,dass pUL36 als inneres Tegumentprotein über den C-Terminus mit dem Kapsidprotein pUL25 interagiert (COLLER et al. 2007, LEE et al. 2006) und so die Verbindung zum Kapsid herstellt (BUCKS et al. 2007). Auch bei den anschließenden weiteren Vorgängen der Virusreifung scheint es bei der Verbindung von innerem und äußeren Tegument und der Rekrutierung der weiteren Tegumentproteine beteiligt zu sein. Dabei liegt pUL36 im Komplex mit pUL37 vor (HENAFF et al. 2013, KELLY et al. 2012). Während pUL37 bei HSV-1 als essentieller Komplexpartner an der Replikation beteiligt ist, spielt es bei PrV keine essentielle Rolle (LEEGE et al. 2009, ROBERTS et al. 2009). Jedoch beeinflusst es auch hier die Tegumentierung (KLUPP et al. 2001b). Ein weiterer wichtiger Faktor bei der Tegumentierung ist der tripartite Komplex aus pUL11, pUL21 und pUL16. Er ist innerhalb der Familie der Herpesviridae konserviert. Dabei ist pUL21 vermutlich schon im Nukleus mit dem Kapsid assoziiert (KLUPP et al. 2005, DE WIND et al. 1992). Es bindet das Tegumentprotein pUL 16 (KLUPP et al. 2005), welches zwei Bindungsstellen für pUL21 und pUL11 besitzt (MECKES et al. 2010). PUL 11 ist sowohl in der Plasma- als auch in der Kernmembran nachweisbar und steuert

möglicherweise die Rekrutierung weiterer Tegumentproteine (LOOMIS et al. 2001). Weiterhin sind der Komplex sowie pUL36 am Transport der umhüllten Viruspartikel beteiligt (DIEFENBACH et al. 2002, SHANDA und WILSON 2008). Dabei handelt es sich um einen aktiven durch Mikrotubuli vermittelten Transport. Für die finale Umhüllung der Viren werden Vesikel vom Golgiapparat genutzt. Man geht davon aus, dass die komplette Umhüllung im Zellkompartiment des sogenannten Trans-Golgi-Netzwerks (TGN) stattfindet (METTENLEITER. 2006). Dabei interagieren die äußeren Tegumentproteine pUL41, pUL46, pUL47, pUL48 und pUL49 mit den Glykoproteinen des Envelopes, um eine Verbindung herzustellen (METTENLEITER. 2002, 2004). In verschiedenen Studien konnten bereits mögliche Interaktionspartner detektiert werden. So bindet z.B. pUL49 von HSV-1 und PrV an cytoplasmatischen Domänen von gE und gM (STYLIANOOU et al. 2009, FUCHS et al. 2002b). Das Tegumentprotein pUL48 bindet wiederum an pUL49 und interagiert mit gH und gD (KAMEN et al. 2005, ZHU und COURTNEY 1994). Besonders pUL48 ist dabei an vielen Interaktionen beteiligt, um eine Verbindung zwischen innerem und äußerem Tegument und dem Envelope zu vermitteln (GUO et al. 2010).

2.2.2.5 Freisetzung der Viren aus der Wirtszelle

Zur anschließenden Freisetzung werden die behüllten Viren in Vesikeln zur Zellmembran transportiert und nach Fusion von Vesikel- und Plasmamembran als reife Viruspartikel freigesetzt (GRANZOW et al. 2001). Über die viralen Interaktionspartner ist bei diesem Vorgang bisher wenig bekannt. Im Mittelpunkt bei HSV-1 und PrV stehen hier vor allem das gK und das pUL20 (CHOULJENKO et al. 2012, DAVID et al. 2012, METTENLEITER et al. 2009). Beide Proteine bilden einen Komplex, der mit gB und gH interagiert und so eine Membranfusion ermöglicht (CHOULJENKO et al. 2009, 2010). Auf zellulärer Ebene wird vermutet, dass die SNARE-Proteinkomplexe (*engl. soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*) an der Virusfreisetzung beteiligt sein könnten (CURANOVIC et al. 2009, CAI et al. 2007) und mit den Microdomänen, welche pUS9 enthalten, interagieren (KRAMER und ENQUIST 2013, KRAMER et al. 2012). Das Membranprotein pUS9 spielt eine große Rolle beim intraaxonalen anterograden Transportes (siehe 2.2.4.2.3).

2.2.3 Latenz

Die Fähigkeit der Alphaherpesviren, eine lebenslange Latenz in Neuronen zu etablieren, ist einzigartig. Bereits Anfang des 20. Jahrhundert wurde das Phänomen beobachtet und später durch BURNET und WILLIAMS (1939) beschrieben. Ein beliebtes Studienobjekt waren zunächst Kaninchen, sowie später auch Mäuse (WEBRE et al. 2012, STEVENS. 1976, KAUFMAN et al. 1967). Aber auch in Zellkultur wurden mehrere Modellansätze verfolgt (STEVENS. 1975). Für HSV-1 sind diese Vorgänge besonders gut untersucht und sollen im Folgenden dargestellt werden. Die Phase der Latenz kann in 3 Stadien eingeteilt werden: 1. Etablierung, 2. Erhaltung, 3. Reaktivierung. Dies wird auch als Latency-Reactivation Cycle bezeichnet (PERNG and JONES 2010). Zur Etablierung der Latenz werden Nukleokapside retrograd entlang der axonalen Leitungsbahnen der sensorischen Neuronen zu den Zellkörpern der Ganglien transportiert (PELLETT und ROIZMAN 2007). Dabei wird bei einer oralen, nasalen oder okularen Infektion von HSV-1 das Trigeminale Ganglion bevorzugt, während bei einer genitalen Infektion die Latenz in Spinalganglien etabliert wird (JONES. 1998, WAGNER und BLOOM 1997). Neben dem Trigeminale Ganglion wurden latente HSV-1 Partikel auch im Ganglion Nodosum oder im N.vagus detektiert (GESSER und KOO 1997, LÖHR et al. 1990). Ca. 40% der Ganglien beinhalten latentes HSV-1 (SATWELL. 1997, MAGGIONCALDA et al.1996). Nach retrogradem intraaxonalem

Transport der Nukleokapside zum Zellkörper des Ganglions findet meistens zunächst eine produktive Replikation statt, bevor das Virus in die latente Phase übergeht. Je mehr Replikation vor der Latenz stattgefunden hat, desto mehr Ganglienzellen sind anschließend latent infiziert. Erforderlich ist dieser Vorgang aber nicht. Defekte Deletionsmutanten zeigen trotz eines Replikationsdefizits die Etablierung einer Latenz (COEN et al. 1989, LEIB et al. 1989). Jedoch waren deutlich weniger Ganglien latent infiziert. Der Übergang zur Latenz beginnt, wenn die Kaskade der viralen Genexpression zum Erliegen kommt und nur die Gene, welche für das latency-associated transcript (LAT) kodieren, exprimiert werden (MARGOLIS et al. 1992). Das Erliegen der viralen Genexpression kommt durch ein Ausbleiben der Expressierung der IE Gene durch pUL48 zustande (O'HARE. 1993, O'HARE und GODING (1988)). Das geschieht über zelluläre Transkriptionsfaktoren, die eine Interaktion mit pUL48 verhindern und somit die Expression von IE Genen unterdrücken. Für eine Interaktion von pUL48 mit den IE Promotoren muss das Protein zuvor mit den zellulären Proteinen Oct-1 und HCF interagieren. Bei Etablierung der Latenz sind die zellulären Transkriptionsfaktoren Zhangei und Luman im Übermaß vorhanden und binden das freie HCF, so dass eine Interaktion mit pUL48 nahezu zum Erliegen kommt (LU und MISRA 2000). Weitere regulatorische Faktoren könnten Transkriptionsfaktoren aus der Brn3 Familie sein (HAGMANN et al. 1995, TURNER et al. 1997). Generell wurde herausgefunden, dass die benötigten IE Promotoren in sensorischen Neuronen Regulationsmechanismen unterliegen, die von epithelialen Zellen verschieden sind (PERNG und JONES 2010). Während der Latenz wird das LAT überexprimiert. Bei dem LAT handelt es sich um ein stabiles 8,5 Kb großes Transkript, welches in ein 2 Kb und ein unstabiles 6,5 Kb Transkript gespleißt wird. Das korrekte Spleißen des 2 Kb großen Transkriptes ist wichtig für die weitere Etablierung und Erhaltung der Latenz (KANG et al. 2003, MADOR et al. 1995). Es konnte hauptsächlich im Nucleus aber auch im Cytoplasma nachgewiesen werden (NICOSIA et al. 1994). Die Expression des LAT erfolgt über zwei Promotoren, LAP 1 und LAP 2. LAT ist antiparallel zum ICP0 Gen. Daher wird zur Inhibierung eine Wirkung über einen Antisense-Mechanismus vermutet. Weiterhin kodiert LAT für 4 microRNAs (miRNAs), welche ebenfalls die Aktivierung der IE Gene unterdrücken (UMBACH et al. 2008). Die Phase der Erhaltung der Latenz wird durch das Ausbleiben der Expression viraler Gene, welche für eine produktive Infektion notwendig wären, gekennzeichnet. Nur LAT wird im Übermaß exprimiert. Dabei steht LAT im Fokus für eine mögliche Regulierung des Latency-Reactivation Zyklus und die Inhibierung der Apoptose. Weiter wird Latenz definiert als eine Phase, wo infektiöse Virionen mit Standardmethoden zur Virusisolation nicht nachgewiesen werden können (PERNG and JONES 2009). Die Phase der Erhaltung kann beliebig lang dauern. Im Anschluss folgt die Reaktivierung des Virus aus der Latenz. Dabei stimulieren externe Faktoren wie z.B. Stress oder Immunsuppression die virale Genexpression. Es folgt ein lytischer Replikationszyklus und der anschließende intraaxonale anterograde Transport zum Ausgangspunkt der Infektion. Eine Reinfektion am Ort der Primärinfektion wird ausgelöst (PELLETT und ROIZMAN 2007).

2.2.4 Intraaxonaler Transport von Alphaherpesviren

Eine besondere Eigenschaft der Alphaherpesviren ist der ausgeprägte Neurotropismus und die Fähigkeit zur Latenzbildung in Neuronen (PELLET und ROIZMAN 2007, WHITLEY 2007). Die zuvor bei der Replikation neu generierten Viruspartikel müssen dabei weite Strecken überwinden, um entlang der Nervenbahnen zum Zielort transportiert zu werden. Würde der Transport nur durch Diffusion stattfinden, würde es Berechnungen zu Folge ca. 230 Jahre dauern, um die Partikel 1cm zu transportieren (SODEIK. 2000). Es handelt sich beim intraaxonalen Transport um einen bidirektionalen, aktiven Transport (SMITH et al., 2001), der durch zelluläre Motorproteine wie

Dynein und Kinesin vermittelt wird (DODDING und WAY 2011, RADTKE et al. 2006, DÖHNER et al. 2005a, DÖHNER et al. 2005b). Dabei werden zwei Transportrichtungen unterschieden, der retrograde und der anterograde intraaxonale Transport.

2.2.4.1 Retrograder intraaxonaler Transport

Der retrograde intraaxonale Transport der Viruspartikel beschreibt folgenden Transportweg: Nach Eintritt der Viruspartikel in die sensorische Nervenzelle werden diese entlang der Axone zum Zellkern des Ganglions transportiert, um dort eine lebenslange Latenz zu etablieren oder weiter lytisch zu replizieren (SMITH 2012, ROIZMAN et al. 2007). Der Vorgang des retrograden Transportes ist gut untersucht und sowohl bei HSV-1 als auch bei PrV konserviert (ANTINONE und SMITH 2009). Der Eintritt in das Neuron wird durch Fusion der Glycoproteinhülle mit der Plasmamembran vermittelt (AKTHAR und SHUKLA 2009, GRANZOW et al. 2005, SIMPSON et al. 2005, LYCKE. 1988). Anschließend werden die Kapside entlang von Mikrotubuli intraaxonale weitertransportiert. Wie auch bei nicht neuronalen Zellen wird im weiteren Verlauf die DNA an der Kernpore freigesetzt. Ultrastrukturelle Studien konnten diese Morphologie bestätigen. Es wird davon ausgegangen, dass nur die inneren Tegumentproteine weiter mit den Kapsidproteinen assoziiert sind und beide Strukturen mit dem Dynein-Motor-Komplex interagieren. Dabei stehen besonders die Proteine UL36 und UL37 im Fokus (ZAICHNICK et al. 2013), während die äußeren Tegumentproteine UL47, UL48 und UL49 vom Kapsid dissoziieren, wie auch in nicht neuronalen Zellen (siehe 2.2.2.1). Bisherige Studien, welche konfokale Zeitrafferaufnahmen benutzten, zeigten, dass sowohl bei HSV-1 als auch bei PrV pUL36 und pUL37 als innere Tegumentproteine mit dem Kapsid assoziiert bleiben (ANTINONE und SMITH 2009). Neueste Studien zu HSV-1, welche Fluoreszenzmikroskopie und Transmissionselektronenmikroskopie benutzten, konnten dagegen zeigen, dass wohl ein großer Teil des pUL37 vom Kapsid dissoziiert. Eine Kollokalisierung mit pUL36 konnte aber wie in bisherigen Studien auch bestätigt werden (AGGERWAL et al. 2012). Genauere Studien sind notwendig, um mögliche weitere Interaktionspartner herauszufinden. Beim retrograden Transport handelt es sich um einen aktiven Transport entlang der Mikrotubuli des Axons, welcher durch die zellulären Motorproteine Dynein und Dynactin vermittelt wird. Bei den Mikrotubuli handelt es sich um lange cytoskeletale Filamente. Sie dienen als Gleitschienen, um Vesikel und Organellen zu transportieren. Die Wand eines Mikrotubulus besteht aus 13 Proteinfilamenten, welche aus α - und β -Tubulinunterheiten bestehen. Es handelt sich hierbei um sehr dynamische Strukturen, die einem ständigen Auf- und Abbau unterliegen. Die Mikrotubuli verfügen über ein Minus- und ein Plusende, wobei das Plusende gewöhnlich am terminalen Teil des Axons zu finden ist und das Minusende mit dem Mikrotubuli-Organisationszentrum (MTOC), welches nahe am Zellkern lokalisiert, verbunden ist. Durch Gifte wie Colchicin oder Vinblastin kann der Aufbau der Mikrotubuli gehemmt werden. (HIRSCH-KAUFFMANN und SCHWEIGER 2000). In Studien zu HSV-1 konnte herausgefunden werden, dass funktionelle Mikrotubuli essentiell für den retrograden Transport sind (TOPP et al. 1994). Das cytoplasmatische Dynein ist ein minus-end gerichtetes mikrotubuliassoziiertes Motorprotein, welches für die retrograden Transportvorgänge in Neuronen zuständig ist (GOLDSTEIN und YANG. 2000). Aber auch bei anderen wichtigen zellulären Prozessen spielt es eine bedeutende Rolle, wie z.B. bei der Mitose oder der Aufrechterhaltung des Golgiapparates (KING. 2003). Strukturell besteht der cytoplasmatische Dynein 1 Komplex aus schweren, mittleren und leichten Ketten. Je nach Gewebe und Funktion sind diese Ketten unterschiedlich angeordnet und in verschiedener Anzahl vorhanden (DIEFENBACH et al. 2006). Als Cofaktor zum Dynein ist am retrograden Transport das Dynactin beteiligt. Es bindet direkt an die Mikrotubuli und steigert die effektive Transportstrecke des

dyneinvermittelten Transports (KAMAL und GOLDSTEIN 2000, KING und SCHROER 2000). Zusätzlich greift es in die Regulation von Dynein ein (HOLLERAN et al. 1998). Für die Anlagerung von Dynein an die Membran wird es aber nicht benötigt (HAGHNIA et al. 2007).

2.2.4.2 Anterograde intraaxonaler Transport

Der anterograde intraaxonale Transport beschreibt den Transport der neusynthetisierten Virionen nach einer Reaktivierung aus der Latenz z.B. durch Stress, Hitze oder Infektion, welche vom peripheren Ganglion zum Epithelgewebe, dem Ort der primären Infektion transportiert, werden (KRAMER und ENQUIST 2013, SMITH. 2012, ROIZMAN et al. 2007). Ähnlich zum retrograden Transport ist auch der anterograde Transport ein aktiver, gerichteter Mikrotubuli-assoziiertes Transport und wird durch das Motorprotein Kinesin vermittelt. Über 45 verschiedene Kinesinmotorproteine sind in Säugerzellen bekannt. Eingeteilt werden sie nach der Lokalisierung der hochkonservierten Motorproteindomäne, welche sich N-terminal, in der Mitte oder C-terminal befinden kann. Neueste Studien konnten das Kinesinmotorprotein KIF1A als relevantes Motorprotein für den anterograden Transport identifizieren (KRAMER et al. 2012, LO et al. 2011). Der anterograde intraaxonale Transport der Viruspartikel und die anschließende stattfindende Virusmorphogenese der Partikel der Alphaherpesviren wird kontrovers diskutiert. Zwei verschiedene mögliche Transportmodelle für PrV und HSV-1 werden in der Literatur beschrieben (zusammengefasst in SMITH. 2012; KRATCHMAROV et al. 2012, CURANOVIC und ENQUIST 2009, DIFENBACH et al. 2008). Dabei handelt es sich um das **Married Model** und das **Subassembly Model** (siehe Abb. 4). Bei beiden geht es um die unterschiedliche morphologische Struktur der neu generierten Viruspartikel und wie diese entlang des Axons transportiert werden. Beim Married Model wird davon ausgegangen, dass die neusynthetisierten Virionen im Cytoplasma umhüllt werden und anschließend in Vesikeln entlang des Axons anterograd transportiert werden. Die Freilassung der Partikel erfolgt an der jeweiligen Synapse bzw. Wachstumskegel. Beim Subassembly Modell geht man dagegen davon aus, dass die neusynthetisierten Subkomponenten (tegument-assoziiertes Kapsid und Glykoproteinhülle) einzeln entlang des Axons anterograd transportiert werden. Der Zusammenbau und die anschließende Freilassung erfolgt erst an sogenannten Auftreibungen (engl. *Varicosities*) entlang des Axons oder an der Synapse bzw. am Wachstumskegel. In den vergangenen Jahren wurden unterschiedliche Methoden wie z.B. Elektronenmikroskopie, Live-Cell-Imaging und Immunfluoreszenzmikroskopie benutzt, um die Vorgänge der Virusmorphogenese und des anschließenden Transports darzustellen. Neben unterschiedlichen Methoden wurden auch unterschiedliche Analysesysteme von neuronalen Kulturen gewählt. Die Ergebnisse zeigten dabei Unterschiede innerhalb der Transportmechanismen bei PrV und HSV-1. Erstaunlich ist hierbei, warum zwei nahe verwandte Viren unterschiedliche Transportmodelle nutzen sollten. Die verschiedenen Ansätze für PrV und HSV-1 sollen in den folgenden Abschnitten näher beschrieben werden (siehe 2.2.4.2.1 und 2.2.4.2.2). Dabei wird in einem weiteren Abschnitt auch genauer auf die möglichen viralen Interaktionspartner eingegangen, die für einen anterograden Transport nötig sind (siehe 2.2.4.2.3). Eine besondere Relevanz für die Aufklärung dieser molekularen Mechanismen liegt in möglichen Ansatzpunkten für eine antivirale Therapie oder mögliche Prävention einer Reinfektion. Die genaue Identifizierung der zu transportierenden Strukturen wäre auch für die Verwendung von neuronalen Tracer- und Vektorsystemen von großer Bedeutung (ENQUIST. 2012, CURANOVIC und ENQUIST 2009).

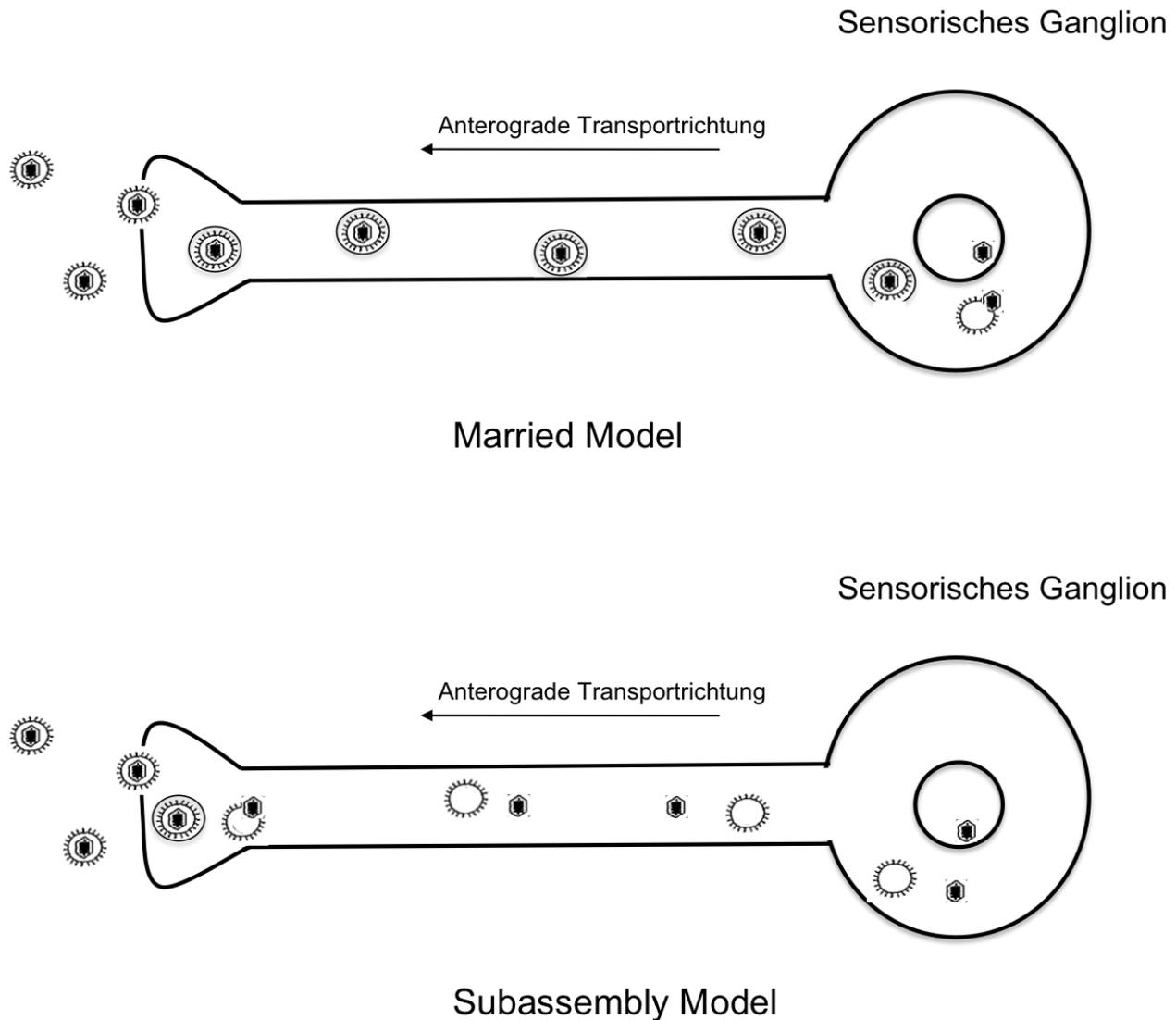


Abb. 4: **Schematische Darstellung der kontrovers diskutierten Transportmodelle zum intraaxonalen anterograden Transport bei HSV-1 und PrV.** Beim Married Model werden behüllte Virionen in Vesikeln anterograd transportiert. Die Freisetzung erfolgt an der Synapse. Beim Subassembly Model dagegen werden die Strukturkomponenten der Viruspartikel einzeln anterograd transportiert. Die Zusammensetzung erfolgt erst an der Synapse oder an den Varicosities mit anschließender Freisetzung (modifiziert nach Diefenbach et al. 2008).

2.2.4.2.1 Anterograde intraaxonale Transport von PrV

Der anterograde Transport von PrV Partikeln ist mittlerweile gut untersucht. Lange Zeit wurde für PrV das Married Modell favorisiert, welches mittlerweile als Transportform bestätigt und akzeptiert ist. Während alte Studien zuerst auf das Subassembly Modell hindeuteten (CURANOVIC et al. 2009, METTENLEITER et al. 2003, ENQUIST et al. 1998) mussten diese durch die voranschreitenden Möglichkeiten der Analysetechniken neu bewertet werden. In einer Live-Cell-Imaging Studie von ANTINONE et al. (2006) konnte mit rekombinanten Pseudorabiesviren, welche am Glykoprotein D und am kleinen Kapsidprotein pUL35 mit Fluoreszenzproteinen fusioniert waren, eindeutig eine Kolo-kalisierung bei über 86% der Partikel gezeigt werden. Elektronenmikroskopische Studien in neuronalen Explantaten bestätigten diese Transportform. Über 90% der analysierten Partikel wurden als behüllte Virionen in Vesikeln nachgewiesen (MARESCH et al. 2010). Um eine mögliche Reinfektion der Neuronen zu verhindern und

aufgrundessen möglicherweise retrograd anstatt anterograd transportierte Partikel zu analysieren, wurde hier zusätzlich eine gB-Null Mutante von PrV eingesetzt, die nur eine Replikationsrunde durchführen kann. Eine Reinfektion ist hier ausgeschlossen (MARESCH et al. 2010). Diese Ergebnisse bestätigten auch frühere Studien (FEIERBACH et al. 2007, LYMAN et al. 2007, DEL RIO et al. 2005). Ein weiterer Ansatz zur Analyse des anterograden Transportes ist die Verwendung von Campenot Kammern (siehe auch 2.2.4.2.4). Dabei handelt es sich um spezielle Teflonringe, welche in verschiedene Kompartimente unterteilt sind. Diese Kammern werden auf die neuronalen Kulturen aufgesetzt. Sie sind kommerziell in verschiedenen Varianten und Unterteilungen erhältlich. Die häufigste Anwendung zur Analyse zum intraaxonalen Transport ist hier das Drei-Kammer-Modell (CURANOVIC et al. 2009, CH'NG 2005). In den durchgeführten Studien mit PrV konnte gezeigt werden, dass die PrV Virionen behüllt in Vesikeln intraaxonal transportiert werden (TAYLOR et al. 2012, HUANG et al. 2010, CH'NG und ENQUIST 2005).

2.2.4.2.2 Anterograder intraxonaler Transport von HSV-1

Anders als bei PrV werden die Ergebnisse der Studien zum intraaxonalen anterograden Transport von HSV-1 kontrovers diskutiert. Auch hier wurden verschiedene Analysemethoden wie Elektronenmikroskopie, Live-Cell-Imaging und Immunfluoreszenzmikroskopie eingesetzt. Für HSV-1 wurde lange das Subassembly Modell als Transportmodell vermutet. Dieses Modell wurde von PENFOLD et al. (1994) aufgestellt. In der elektronenmikroskopischen Studie zeigten sich nackte Kapside in HSV-1 infizierten Axonen. Darauf folgende ebenfalls elektronenmikroskopische Studien bestätigten zunächst das Bild von unbehüllten Kapsiden und Glykoproteinhüllen, welche einzeln anterograd transportiert wurden (IBIRICU et al. 2011, MIRENDA-SAKSENA et al. 2009, 2000, SAKSENA et al. 2006) und entlang des Axons an den Varicosities (DEREGGE et al. 2006) oder Synapsen bzw. Wachstumskegel (MIRENDA-SAKSENA et al. 2002) freigesetzt wurden. Auch mehrere fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen gaben Hinweise auf dieses Transportmodell (SNYDER et al. 2006, 2007, 2008). Dabei wurden Antikörper gegen verschiedene Glykoproteine und das Hauptkapsidprotein pUL19 verwendet. Die Colokalisation war minimal und es wurde auf einen separaten Transport geschlossen. Neuere Analysen revidierten das Bild und gaben Hinweise, dass auch die HSV-1 Virionen gemäß dem Married Model, also behüllt in Vesikeln entlang des Axons transportiert werden könnten. Schon ganz früh durchgeführte elektronenmikroskopische Studien beobachteten, dass keine nackten Kapside, sondern behüllte Virionen während des anterograden Transports transportiert werden (HILL et al. 1972, COOK et al. 1973, LYCKE et al. 1988). Diese Ergebnisse konnten aber zunächst über viele Jahre nicht bestätigt werden. Erst neuere Studien zeigten ein eindeutigeres Bild. Als Methoden wurde hier auch wieder Live-Cell-Imaging (ANTINONE et al. 2010) und Elektronenmikroskopie genutzt (NEGATSCH et al. 2010). Bei der durchgeführten Live-Cell-Imaging Studie von ANTINONE and Kollegen (2010) wurden rekombinante HSV-1 Viren verwendet, welche am gB und pUL35 mit Fluoreszenzproteinen fusioniert waren. Eine Colokalisierung konnte bei 65 - 70% der Partikel beobachtet werden. Durch die schlechte Vergleichbarkeit der neuronalen Systeme, der Analysemethoden und der untereinander verwendeten verschiedenen HSV-1 Stämme konnte bisher jedoch kein Modell direkt bestätigt und akzeptiert werden (SMITH. 2012, KRATCHMAROV et al. 2012). In der Studie von WISNER et al. (2011) wird sogar davon ausgegangen, dass beide Modelle parallel verwendet werden, wobei der separate Transport dominieren soll. Eine erste vergleichende elektronenmikroskopische Untersuchung von PrV, HSV-1 und HSV-2 im Drei-Kammer-Modell gab Hinweise auf das Married Modell als Transportform. Allerdings räumen die Autoren ein, durch eine schlechte Auflösung und Qualität der elektronenmikroskopischen Bilder

nicht immer einwandfrei Viruspartikel und Neurovesikel unterscheiden zu können. (HUANG et al. 2010). Dieser Umstand erschwert die Analyse zusätzlich. Weitere vergleichende, parallele Untersuchungen sind für die Klärung notwendig.

2.2.4.2.3 Die Proteine US9, gE, und gI

Bei einer Herpesinfektion müssen die Virionen weite Strecken innerhalb der Axone zurücklegen. Ohne einen gerichteten aktiven Transport über weite Strecken ist die weitere Infektion der Ganglien und die Etablierung einer Latenz nicht möglich (CURANOVIC und ENQUIST 2009). Da es sich hier um einen aktiven gerichteten Transport handelt, gelingt dieser nicht ohne ein geeignetes Transportsystem. Dabei spielen, wie schon beschrieben, zelluläre mikrotubuli-assoziierte Motorproteine eine Rolle. Aber auch virale Proteine werden benötigt, welche die Transportvorgänge vermitteln und mit den zellulären Proteinen interagieren. Im Zentrum einer solchen Funktion stehen die viralen Proteine pUS9, gE und gI (LYMAN et al. 2007, CH'NG und ENQUIST 2005, TOMISHIMA und ENQUIST 2001). Versuche mit Deletionsmutanten zeigten, dass der anterograde Transport deutlich reduziert wird (SNYDER et al. 2008, LYMAN et al. 2007, CH'NG und ENQUIST 2005). Dabei steht pUS9 besonders im Vordergrund (LYMAN et al. 2008). Bei dem Tegumentprotein pUS9 handelt es sich um ein Typ II Membranprotein. Es umfasst 98 Aminosäuren (AS) und besteht aus einer kurzen Ektodomäne und einer ca. 68 AS langen cytoplasmatischen Domäne (BRIDEAU et al. 1998). Innerhalb der Alphaherpesviren ist es hochkonserviert und liegt vorwiegend phosphoryliert vor (KRATCHMAROV et al. 2013, LYMAN et al. 2009). Für die Replikation in Zellkultur wird es nicht benötigt. Lokalisiert ist das Protein in den vom TGN abgehenden Vesikeln. LYMAN et al. (2008) zeigten, dass pUS9 mit sogenannten lipidraft Mikrodomänen assoziiert ist, welche eine Interaktion mit zellulären Proteinen und viralen Proteinen ermöglichen. KRAMER et al. (2012) konnten dabei zeigen, dass bei PrV pUS9 mit dem Kinesin-3-Motorprotein Kif1A interagiert. Eine weitere Rolle scheint dabei die Phosphorylierung des Proteins zu spielen. So konnte gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung von pUS9 für die Interaktion mit Kif1A nicht essentiell ist, wohl aber die Transporteffizienz steigert (KRATCHMAROV et al. 2013). Unterstützt wird pUS9 von gE und gI. Dabei handelt es sich um Typ I Transmembranproteine, welche als Heterodimere vorliegen. Sie verfügen sowohl über extrazelluläre Domänen, als auch über eine ca. 100 AS große cytoplasmatische Domäne. Verschiedene Tyrosin und Dileucin Motive lassen auf eine Lokalisation im Trans-Golgi-Netzwerk schließen (MCMILLAN und JOHNSON 2001, ALCONADA et al. 1999). Vermutet wird, dass der gE/gI Komplex die Interaktion von pUS9 mit zellulären Adaptorproteinen stabilisiert (LYMAN et al. 2008). Die Funktion von pUS9 und die genaue Vermittlung der Prozesse am Übergang zum Axon und anschließendem Transport ist nicht abschließend geklärt. Aktuell wird angenommen, dass pUS9 in der phosphorylierten Form, bedingt durch die Lokalisation in den abgehenden TGN-Vesikeln, die virale und zelluläre Maschinerie ankurbelt und so eine Interaktion von Vesikeln und Motorproteinen vermittelt. Dabei ist nicht klar ob pUS9 nur am Prozess des Axonal Sortings beteiligt ist oder auch während des kompletten intraaxonalen Transports (CURANOVIC und ENQUIST 2009). Zwei verschiedene Modelle wurden für eine mögliche Funktion von pUS9 bei HSV-1 aufgestellt: Das Loading- und das Adaptor Modell. Beim Loading Modell sind gE/gI und pUS9 am TGN in der Membran lokalisiert und fördern die Akkumulation von viralen Membran- und Tegumentproteinen. Die viralen Proteine werden in Vesikel verpackt und auf Kinesinmotoren geladen (HOWARD et al. 2013, SNYDER et al. 2008). Beim Adaptormodell vermitteln gE/gI und pUS9 direkt die Verbindung von glykoproteinbeladenen Vesikeln mit Kinesin und so den axonalen Transport (HOWARD et al. 2013, JOHNSON und BAINES 2011). Welches Modell korrekt ist, ist

nicht abschließend geklärt und Gegenstand der aktuellen Forschung (HOWARD et al. 2013). Ähnlich der kontroversen Diskussion um die Morphologie der Viruspartikel beim intraaxonalen anterograden Transport bei HSV-1 und PrV wird auch die Rolle der möglichen Transportproteine pUS9 und gE/gI kontrovers diskutiert (SMITH. 2012, CURANOVIC und ENQUIST 2009, DIEFENBACH et al. 2006). Während bei PrV pUS9 als essentiell für den anterograden axonalen Transport beschrieben wird, ist die Rolle bei HSV-1 noch nicht abschließend geklärt. Verschiedene Studien in vivo und in vitro zur Funktion von PrVUS9 konnten zeigen, dass pUS9 für den anterograden intraaxonalen Transport benötigt wird (TAYLOR et al. 2012, LYMAN et al. 2007, BRIDEAU et al. 2000). TAYLOR et al. (2012) nutzen für ihre Analysen rekombinante PrV Virusmutanten, welche am pUS9 mit GFP assoziiert waren. In Live-Cell-Imaging Analysen konnte so die Transportdynamik, Lokalisation und Funktion genauer bestimmt werden. Die bisherigen Ergebnisse konnten so bestätigt werden. Bei HSV-1 zeigte sich dagegen ein unterschiedliches Bild. Während der Komplex gE/gI als essentiell für den anterograden Transport gesehen wurde, ist die Rolle von pUS9 unklar (MCGRAW et al. 2009, LAVAIL et al. 2007). Selbst Untersuchungen mit unterschiedlichen HSV-1 Stämmen zeigten unterschiedliche Ergebnisse über die Relevanz von pUS9 bei HSV-1 (SNYDER et al. 2008). In der neuesten Studie von HOWARD et al. (2013) wurde gezeigt, dass pUS9 bei HSV-1 wahrscheinlich eine ähnlich wichtige Rolle spielt wie bei PrV. Ähnlich wie bei der ungeklärten Morphogenese der Viruspartikel beim anterograden Transport wäre es wichtig, die genauen Abläufe der beteiligten viralen Interaktionspartner zu kennen, um weitere mögliche Ansätze einer viralen Therapie zu erhalten. Bislang werden als therapeutisches Mittel einer Herpesvirusinfektion nur Hemmstoffe der viralen Replikation angewendet.

2.2.4.2.4 Analysesysteme für den anterograden intraaxonalen Transport

Wie beschrieben wird der anterograde intraaxonale Transport bei PrV und HSV-1 kontrovers diskutiert und ist Gegenstand der aktuellen Forschung. Während bei PrV das Married Modell als Transportform bestätigt wurde, gibt es bei HSV-1 Klärungsbedarf. Ein Problem der bisherigen Forschung ist die große Varianz der Analysemethoden und -systeme, die eine Vergleichbarkeit nahezu unmöglich machen. Auch der Einsatz verschiedener Virusstämme erschwert die Interpretation. KRATCHMAROV et al. (2012) fassen die einzelnen Analysesysteme und Methoden für PrV und HSV-1 genauer zusammen. Grob lassen sich die in vitro Analysesysteme in Explantat- und Kammersysteme einteilen. Bei den Explantatsystemen handelt es sich um primäre neuronale Kulturen, wobei entweder das obere Zervikalganglion (*engl. superior cervical ganglia*, SCG) oder Spinalganglien (*engl. dorsal root ganglia*, DRG) als Ganzes verwendet werden. Die Ganglien werden überwiegend aus Embryonen gewonnen. Hierfür werden bevorzugt Mäuse, Ratten oder Hühner verwendet. In einigen Versuchen wurden auch humane Embryonen eingesetzt (MIRENDA-SAKSENA et al. 2009, LYCKE et al. 1988). Die gewonnenen Explantate siedeln sich auf den speziell beschichteten Zellkulturschalen ab und die Axone wachsen in alle Richtungen aus. Untersucht werden diese Explantate elektronenmikroskopisch oder mit Hilfe des Live-Cell-Imaging Verfahrens. Aber auch fluoreszenzmikroskopische Analysen sind möglich. Problematisch an diesem System ist die Analyse eines gerichteten Transportes und somit die exakte Unterscheidung zwischen anterograder oder retrograder Transportrichtung. Auch Reinfektionen innerhalb des Beobachtungszeitraumes sind bei diesem System möglich. Bisher eingesetzte Deletionsmutanten, die nur eine Replikationsrunde durchführen, minderten diese Problematik (MARESCH et al. 2010). Daher wurde schon früh versucht, mit Hilfe von Kammersystemen eine gerichtete Transportanalyse durchzuführen. CAMPENOT et al. (1977) entwickelten das erste System. Anschließend wurden die Campenotkammern weiter modifiziert. Für die Transportanalyse

von Alphaherpesviren wurde besonders das Drei-Kammer-System verwendet (CURANOVIC et al. 2009, CH'NG und ENQUIST 2006, CH'NG et al. 2005b). Dabei wird die Kammer in ein S- (Soma), ein M- (Mittleres) und ein N- (Neuriten) Kompartiment eingeteilt. Die dissoziierten Neuronen werden ins S- Kompartiment eingesät und bilden an vorher definierten Rillen entlang Axone zum N-Kompartiment. Auch hier werden, wie bei den Explantatkulturen, vorwiegend neuronale Kulturen aus dem oberen Cervikalganglion oder Spinalganglion verwendet. Eine Besonderheit ist die vorherige Dissoziation der neuronalen Zellen aus den jeweiligen Ganglien z.B. durch Trypsin. Abgedichtet werden die einzelnen Kompartimente durch Silikon und eine Methocelschicht. Diese fungieren als Diffusionsbarriere. Nur die Axone sind in der Lage diese Barriere zu passieren. Als Besonderheit können ins N- Kompartiment auch Epithelzellen eingesät werden, so dass auch Analysen zum direkten Übertrag von Axon zum Epithel möglich sind (TAYLOR et al. 2012, CH'NG und ENQUIST 2005b). Aber auch Zwei-Kammer-Systeme wurden für Transportanalysen verwendet und etabliert (FEIERBACH et al. 2007, HOLLAND et al. 1999, PENFOLD et al. 1994). Als eine weitere Möglichkeit wird die sogenannten mikrofluide Kammer genutzt (HOWARD et al. 2013, WISNER et al. 2011, LIU et al. 2007). Wie bei allen anderen Kammersystemen ist auch hier das Ziel, eine Abgrenzung zwischen Zellkörper und Axon zu erreichen, so dass Reinfektionen und mögliche retrograde Transporte während der Analyse ausgeschlossen werden. Hauptproblem ist bei vielen Systemen die aufwendige Erarbeitung und die Undichtigkeit zwischen den einzelnen Kompartimenten, die durch kleinste mechanische Einwirkungen hervorgerufen werden kann.

2.3 Neuronale primäre Zellkulturen

In dieser Arbeit wurden primäre neuronale Zellkulturen verwendet. Bei den Zellkulturtechniken wird grundsätzlich in primäre und permanente Zellkulturen unterschieden. Bei permanenten Zellkulturen handelt es sich um etablierte Zelllinien, welche aus verschiedenen Geweben des Organismus gewonnen werden und unbegrenzt in Kultur gehalten werden können. Für die primäre Zellkultur werden die Gewebe dagegen direkt aus dem Organismus gewonnen und kultiviert. Die Kultivierung ist nur für einen begrenzten Zeitraum möglich. Primäre Zellkulturen erhält man entweder nach enzymatischer Dissoziation von Gewebefragmenten z.B. durch Trypsin oder Collagenasen oder aus Explantatkulturen. Oft werden Kulturen aus embryonalem Gewebe verwendet, da hier noch keine komplette Ausdifferenzierung der Zellen stattgefunden hat und die Kulturen durch Zugaben von externen Wachstumsfaktoren wie z.B. dem Nerve Growth Factor positiv beeinflusst werden können. Primärkulturen bieten den Vorteil, dass sie weitestgehend dem ursprünglichen Zelltyp im Organismus ähnlich sind und so besser als Modell verwendet werden können. Dieser Umstand ist bei permanenten Zelllinien oft nicht mehr gegeben. Weiter bieten primäre Zellkulturen die Möglichkeit, Tierversuche zu reduzieren und nach dem 3R-Prinzip zu ersetzen. Nachteilig ist die kurze Kultivierungszeit und der erhebliche Aufwand bei der Erstellung der Präparate (WOBUS. 1997). Versuche zur Kultivierung von Zellen und vor allem Neuronen fand schon sehr früh zu Beginn des 20. Jahrhunderts statt. So versuchte HARRISON (1907) eine erste Kultivierung von neuronalen Gewebeexplantaten von Froschembryonen. Jedoch war das Forschungsgebiet durch unsterile Verhältnisse und schwierige Bedingungen eher unbeliebt. Erst mit der Entdeckung des Penicillin und der technischen Möglichkeit steril zu arbeiten war eine Weiterentwicklung der Kultivierung möglich. Auch die Entwicklung von speziellen Medien und Seren trug zum Fortschritt erheblich bei. Die ersten primären Neuronenkulturen wurden um 1970 entwickelt. So beschrieben MAINS und PATTERSON (1973) die Verwendung von oberen Cervicalganglien für die dissoziierte neuronale Zellkultur. Bereits früher wurden Spinalganglien kultiviert (SCOTT et al. 1969), genauso wie Kulturen aus dem Rückenmark (FISCHBACH. 1972)

und dem Cerebellum (VARON and RAIBORN 1969). Als Beschichtung der Zellkulturgefäße wurden zunächst Collagenlösungen verwendet (BORNSTEIN. 1958). Später wurden auch Polylysinlösungen eingesetzt (LINDL und BAUER 1989). Im Laufe der Zeit wurde die Beschichtung weiterentwickelt, um die Überlebenszeit der kultivierten Präparate zu verlängern und optimale Wachstumsbedingungen zu schaffen. Heute werden auch häufig Laminine zur zusätzlichen Beschichtung eingesetzt (CH'NG et al. 2005, CURANOVIC et al. 2009). Die Verbesserung der Kultivierungsbedingungen ist nach wie vor Gegenstand der aktuellen Forschung. Immer wieder werden neue Modelle etabliert (CHEN et al. 2013).

2.3.1 Anatomische Grundlagen des oberen Cervicalganglions und des Spinalganglions

Grundsätzlich wird beim Nervensystem ein zentraler und ein peripherer Teil unterschieden. Das zentrale Nervensystem (ZNS) besteht aus Gehirn und Rückenmark. Der periphere Teil wird auch als vegetatives Nervensystem bezeichnet und besteht aus einem sympathischen und parasympathischen Anteil. Eingebettet in die peripheren Nerven sind Ansammlungen von Nervenzellen, die als Ganglien bezeichnet werden. Sie dienen als Umschaltstellen und verbinden die Erregungen der prä- und postganglionären Fasern. Es handelt sich hierbei um knötchenförmige Verdickungen von unterschiedlicher Größe. Aufgebaut sind sie aus einer bindegewebigen Kapsel (Epi- und Perineurium). Diese enthält große Nervenzellen, welche wiederum von einer Hülle aus Mantelzellen, der sogenannten Neuroglia, umschlossen sind. Diese dienen als Binde- und Stützfunktion. Für die hier verwendeten primären neuronalen Zellkulturen wurden obere Cervicalganglien und Spinalganglien eingesetzt. Sie sind beide Teil des sympathischen Nervensystems (NICKEL et al. 2004). Der anatomische Aufbau wird im Folgenden erläutert.

2.3.1.1 Oberes Cervicalganglion (Ganglion cervicale craniale)

Der obere Teil des sympathischen Grenzstranges (*Pars Cervicalis*) besteht aus drei Ganglien. Sie werden entsprechend ihrer Lokalisation als oberes-, mittleres oder unteres Cervicalganglion bezeichnet. Das obere Cervicalganglion ist das größte der drei Ganglien und liegt zwischen dem 2. und 3. Halswirbel, ventral vom Hinterhauptsbein und in direkter Nähe der aus der Schädelhöhle austretenden Gehirnnerven IX – XII. Weiter befindet sich in enger Lokalisation die *A. carotis communis*. Das obere Cervicalganglion fungiert als Umschaltstelle des Sympathicus für den Kopf und den kopfnahen Halsbereich. Bei den entspringenden Nervenfasern aus dem oberen Cervicalganglion handelt es sich ausschließlich um postganglionäre Fasern, welche hauptsächlich den Arterien folgen. Dabei werden 5 Nervenäste direkt vom Ganglion abgegeben, die sich im weiteren Verlauf weiter verzweigen. Einer der stärksten Äste ist der *N. caroticus internus*. Weiter wird der *N. jugularis*, die *Nn. Carotici externi*, die *Rami communicantes grisei* und die *Rami laryngopharyngei* abgegeben. Die präganglionären ankommenden Nervenfasern stammen vor allem aus dem thoracalen Rückenmarkssegment (Th 2-5) und bilden den Halsteil des *N. sympathicus* (NICKEL et al. 2004).

2.3.1.2 Spinalganglion (Ganglion spinale)

Die Rückenmarksnerven entspringen jeweils aus einer dorsalen und ventralen Wurzel (*Radix dorsalis et ventralis*). Eingelagert in die Dorsalwurzel befindet sich das Spinalganglion (*Ganglion spinale*). Die Dorsalwurzeln führen dabei afferente, somato- und viscerosensible Nervenfasern, welche Erregungen der äußeren Haut, der Muskeln, Sehnen, Knochen und der Eingeweide über die Wurzeintrittszone am Dorsalhorn zum Rückenmark leiten. Die Nervenzellen dieser Fasern liegen direkt im Spinalganglion. Dabei handelt es sich um pseudounipolare Neuronen. Jedes

Rückenmarksegment hat 2 Spinalganglien, welche im jeweiligen *Foramen intervertebrale* lokalisiert sind. Die Ventralwurzeln dagegen enthalten efferente, somatomotorische und visceromotorische Nervenfasern. Nach Durchdringung der *Dura mater spinalis* vereinigen sich die Nervenfasern beider Wurzeln anschließend zum Stamm der Spinalnerven, dem *Truncus n. spinalis*, und verlassen durch das *Foramen intervertebrale* den Wirbelkanal. Dabei kommt es zur Mischung der afferenten und efferenten Fasersysteme (NICKEL et al. 2004).

3 Tiere, Material und Methoden

3.1 Tiere

- Crl:CD(SD) Ratten Charles River WIGA
- Kaninchen New Zealand White Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln

Alle hier stattgefundenen Tierversuche erfolgten mit der Genehmigung vom Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei (LALLF) Mecklenburg-Vorpommern unter folgendem Aktenzeichen FLI 6/08, Az. LALLF M-V/TSD/7221.3-2.3-005/08.

3.2 Material

Die hier stattgefundenen Gentechnikenarbeiten erfolgten mit der Genehmigung durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales Mecklenburg-Vorpommern erteilt am 09. 05. 2011 mit dem Aktenzeichen 4/11.15.11 für die Herstellung der PrV-Deletionsmutanten und mit dem Aktenzeichen 4/11.37.11 für die Herstellung der HSV-1 Deletionsmutanten.

3.2.1 Virusstämme

<u>Virusstamm</u>	<u>Erhalten von</u>
PrV Kaplan	B. Klupp (FLI)
PrV KaplanUL35gfp	B. Klupp (FLI)
PrV Δ US9	B. Klupp (FLI)
PrV Δ US9UL35gfp	B. Klupp (FLI)
HSV-1 KOS	P. Spear (Chicago)
HSV-1 HFEM	T. Minson (Cambridge)
HSV-1 17+	V. Preston (Glasgow)
HSV-1 SC16	T. Minson (Cambridge)
HSV-1 17 Δ US9	In dieser Arbeit generiert
HSV-1 17 Δ US8a	In dieser Arbeit generiert
HSV-1 17 lox/P	In dieser Arbeit generiert

3.2.2 Säugerzelllinien

Zelllinie	Spezies	Erhalten von
RK13	Kaninchen	Ktlg.-Nr. 109 (Zellbank-FLI)
PSEK	Schwein	Ktlg.-Nr. 326 (Zellbank-FLI)
Vero	grüne Meerkatze	Ktlg.-Nr. 228 (Zellbank-FLI)

3.2.3 Bakterienstämme

<u>Bakterienstamm</u>	<u>Erhalten von</u>
E. coli XL1Blue MRF'	Stratagene
E. coli DH5 α	Invitrogen

3.2.4 Bacterial Artificial Chromosome

<u>BAC</u>	<u>Erhalten von</u>
pHSV-17	David Johnson
pHSV-17 Δ US9	In dieser Arbeit generiert
pHSV-17 Δ US8a	In dieser Arbeit generiert

3.2.5 Plasmide

<u>Plasmid</u>	<u>Erhalten von</u>
pcDNA3	Invitrogen
pcGex-4T-3	Amersham Bioscience
pBluescript II SK+/-	Stratagene
pKD13	W. Fuchs (FLI)
pCP20	W. Fuchs (FLI)
pMC-Cre	W.Fuchs (FLI)

pcDNA/US8a	In dieser Arbeit generiert
pcGEX-4T-3/US9	
pcGEX-4T-3/US8a	
pBI17US8a,US9	
pBI17 Δ US9kan	
pBI17 Δ US8akan	

3.2.6 Antikörper und Antiseren

<u>Bezeichnung</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Hersteller</u>
Anti Neuron specific beta III Tubulin antibody	IF 1:1000	Abcam
Anti - US9 HSV-1	IF 1:100	In dieser Arbeit generiert
Anti-US8a HSV-1	WB 1: 5000-10000	
Anti - UL11 HSV-1	IF 1:100 WB 1:10000	W. Fuchs (FLI)
Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG	IF 1:1000	Invitrogen

3.2.7 Medien und Lösungen für die permanente Zellkultur

Die Zellkulturmedien wurden von der Zellbank des FLI Insel Riems zur Verfügung gestellt.

Zellkulturmedium ZB 5

MEM Eagle mit Hanks-Salzen und
MEM Eagle mit Earle-Salzen im Verhältnis
1:1
10 ml nicht essentielle Aminosäuren
120 mg Natrium-Pyruvat
10 % fetales Kälberserum (FKS)
ad 1000 ml Aqua dest.

Zellkulturmedium ZB 5b

MEM Eagle mit Hanks-Salzen und MEM Eagle
mit Earle-Salzen im Verhältnis
1:1
10 ml nicht essentielle Aminosäuren
120 mg Natrium-Pyruvat
5 % fetales Kälberserum (FKS)
ad 1000 ml Aqua dest.

Versen-Trypsin-Lösung (ATV)

0,4 g/l NaCl
 1,25 g/l Trypsin
 0,57 g/l Na₂HPO₄
 0,25 g/l EDTA
 0,1 g/l KCl
 0,1 g/l KH₂PO₄
 sterilfiltrieren, Lagerung bei -20°C

Antibiotika

Penicillin/Streptomycin (Sigma)
 Gebrauchsverdünnung: 1:100
 Geneticin (50 mg/ml) (Gibco)
 Gebrauchsverdünnung: 1:100

Methocelmedium

20 g/l Methylcellulose
 9,4 g/l MEM (Gibco BRL), autoklavierbar
 autoklavieren,
 2,2 g/l NaHCO₃ und 1 % Glutamax II in
 1,5 % PBS lösen (erhitzen) und sterilfiltriert
 zugeben
 Gebrauchsverdünnung 1:4 verdünnt in ZB5b-
 Medium, Lagerung bei 4°C

3.2.8 Medien und Lösungen für die primäre Zellkultur

Neuronenmedium

40 ml DMEM/F12 (1:1)
 400 mg bovines Serumalbumin (BSA)
 400 µl Glukose (460 mg/ml)
 400 µl Transferrin (10 mg/ml)
 400 µl Putrescine (1,6 mg/ml)
 400 µl Insulin (1 mg/ml)
 400 µl Glutamin (200 mM)
 200 µl Penicillin-Streptomycin (50 µg/ml)
 200 µl Kanamycin (10 mg/ml)
 40 µl Selen (30 µM)
 12 µl Progesteron (66,7 µM)
 20 µl Nerve Growth Factor 2,5S (100 µg/ml)
 sterilfiltrieren.

3.2.9 Medien und Lösungen für die Bakterienkultur

LB-Medium

10 g NaCl
 10 g Casein-Hydrolysat
 5 g Hefe-Extrakt
 ad 1l A. dest.
 autoklavieren, für Agarplatten 15g Agar
 zugeben

SOB-Medium

2 g Casein-Hydrolysat
 500 mg Hefe-Extrakt
 200 µl NaCl (5M)
 250 µl KCl
 ad 100ml A. tridest.
 autoklavieren, Zugabe von je 1ml
 sterilfiltriertem MgSO₄ (1M) und MgCl₂ (1M)

Antibiotika

Ampicillin
(10 mg/ml in H₂O)
Gebrauchskonzentration: 100 µg/ml
sterilfiltrieren, Lagerung bei -20°C
Chloramphenicol
(34 mg/ml in Ethanol)
Gebrauchskonzentration: 34 µg/ml
Lagerung bei -20°C
Kanamycin (50 mg/ml)
Gebrauchskonzentration: 50 µg/ml
Lagerung bei -20°C

Induktoren

IPTG (100 mM in H₂O)
Gebrauchskonzentration: 0,1 – 1 mM
sterilfiltriert, Lagerung bei -20°C
X-Gal (2% w/v in N,N-dimethylformamid)
Gebrauchskonzentration: 2,5 µg/ml
Lagerung bei -20°C (lichtgeschützt)

SOC-Medium

SOB-Medium + 20mM Glucose

3.2.10 Puffer und Lösungen

Lösung I für Präparation von Plasmid-DNA (Suspension-Puffer)

50 mM Glucose
25 mM Tris-HCl (pH 8.0)
10 mM EDTA

Lösung II für Präparation von Plasmid-DNA (Lysis-Puffer)

200 mM NaOH
1% (w/v) SDS

Lösung III für Präparation von Plasmid-DNA (Neutralisierungspuffer)

3 M Kaliumacetat
2 M Essigsäure
Lysispuffer
1% NP40
1% Doca
0,1% SDS
1x PBS
Gebrauchsfertige Lösung: Zusatz von Proteinaseinhibitor (20 mM PMSF)

PBS

140 mM NaCl
6,5 mM Na₂HPO₄
2,7 mM KCl
1,5 mM KH₂PO₄
pH 7.4 einstellen, autoklavieren

RNase

5 mg RNase
50 µl Tris-HCl, pH 7,5
30 µl NaCl
ad 10 ml Aqua dest., im Wasserbad 15 min erhitzen.
50 x EP-Puffer
484,6 g Tris
68,0 g Natriumacetat
37,2 g EDTA
ad 2000 ml Aqua dest., mit HCl auf pH 7,2 einstellen

Fluoreszenzerhaltungspuffer (DABCO)

2,5 g 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
90 ml Glycerol
10 ml PBS
ad 100 ml Aqua dest.
20 x Pronasepuffer
11,69 g NaCl,
2,43 g Tris-HCl
ad 100 ml Aqua dest., pH 7,2

Pronase

500 mg Pronase
in 100 ml 5 x Pronasepuffer
2 x HBS
5,96 g Hepes
0,134 g Na₂HPO₄
8,18 g NaCl
ad 500 ml Aqua dest.

TEN

10 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 7,4
1 ml 0,5 M Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)
15 ml 5 M NaCl
ad 500 ml Aqua dest

Sarkosylpuffer

7,5 ml 1 M Tris-HCl, pH 8,3
10 ml (25 mM) EDTA, pH 8,0
30 ml Sarkosyl
ad 100 ml Aqua dest.

Zitratpuffer

3,94 g NaCl
4,2 g Zitronensäure
0,372 g KCl

ad 500 ml Aqua dest., pH 3,0; sterilfiltrieren

Agarosegel 1,5 %

1,2 g Agarose
80 ml 0,5 x TBE-Puffer
10 µl Ethidiumbromid

50 x Tris-Azetat-EDTA (TAE)-Puffer

242 g Tris
20 g Natriumazetat
57,1 ml Eisessig
100 ml 0,5 M EDTA, pH 8
ad 1000 ml Aqua dest

10 x Tris-Borat-EDTA (TBE)-Elektrophoresepuffer

108 g Tris, pH 8
55 g Borsäure
40 ml 0,5 M EDTA
ad 1000 ml Aqua dest

0,5 M EDTA

186,12 g Na₂EDTA·2H₂O
700 ml 1 M Tris-HCl, pH 8,3
50 ml 10 M NaOH
auf pH 8,0 einstellen
ad 1000 ml Aqua dest., autoklavieren

3.2.10.1 Southern Blot

20 x SSC-Puffer

175,32 g NaCl
88,23 g tri-Natriumzitat-Dihydrat
ad 1000 ml H₂O,
mit HCl auf pH 7,0 einstellen

Vorhybridisierungslösung

80 ml 20 x SSPE
40 ml Magermilch 10%
20 ml Heringssperma DNA in H₂O (10 mg/ml)
40 ml SDS 10 %
200 ml Formamidanon
20 ml H₂O

20 x SSPE

175,3 g NaCl
27,6 g NaH₂PO₄
7,4 g EDTA
ad 1000 ml H₂O, pH 7,4

Hybridisierungslösung

Vorhybridisierungslösung
+ 32P markierte Sonde

3.2.10.2 Western Blot**10 % Trenngel**

0,1 ml SDS 10%
 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
 3,33 ml Acrylamid (30 %)
 4,0 ml H₂O
 10 µl Tetramethylethyldiamin (TEMED)
 50 µl Ammoniumpersulfat (10 %)

10 x PAGE Puffer

30,3 g Tris
 141,1 g Glycin
 ad 1000 ml H₂O

SDS-Probenpuffer

11,25 ml Tris-HCl, pH 6,8
 18 ml SDS 10%
 9 ml Glycerin
 4,5 ml 2-Mercaptoethanol
 Spatelspitze Bromphenolblau

20 x TBS-T-Puffer

100 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 7,6
 87,6 g NaCl
 10 ml Tween 20
 ad 500 ml Aqua dest.

3 % Sammelgel

0,05 ml SDS 10%
 1,25 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
 0,65 ml Acrylamid (30 %)
 3,05 ml H₂O

Transferpuffer

500 ml 10 x PAGE Puffer
 500 ml Methanol
 4000 ml H₂O

SDS-Laufpuffer

200 ml 10 x PAGE Puffer
 20 ml SDS 10%
 1800 ml H₂O

3.2.11 Reagentien**3.2.11.1 Nukleinsäuren und Nukleotide****Bezeichnung**

DNA aus Heringssperma
 DNA Marker (1kbp Leiter)
 Oligonukleotid-Primer
 SP6, T7, M13uni, M13rev,
 5' pGex- Sequencing Primer
 dATP, dCTP, dGTP, dTTP, ATP
 [32P]dCTP (10mCi/ml, 3000 Ci/mmol)

Hersteller

Serva
 Gibco
 Roche
 ICN

Primer: Eurofins
 HUS8A-F
 CAGAATTCTCTCCCTCCACCACCAATGG

HUS9-F
 CAGAATTCTTCCGGCCTCGATGAC

HUS9-R
 CACTCGAGGAGACAACATTGCCAAC

3.2.11.2 Aminosäuren und Proteine

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
BSA (Bovines Serumalbumin)	Promega
BSA (nukleasefrei)	NEB
Benchmark™ Protein Ladder	Invitrogen
Benchmark™ Prestained Protein Ladder	Invitrogen

3.2.11.3 Enzyme

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Alkalische Phosphatase	Roche
DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment)	NEB
DNA-Polymerase Taq/ Platinum Pfx	Promega/ Gibco BRL
DNase I (RNase-frei)	Roche
Lysozym	Serva
Neuraminidase	Roche
Pronase	Roche
Restriktionsendonukleasen	Roche, Gibco BRL, NEB, Promega
RNase A	Sigma
T4 DNA-Ligase	Gibco BRL
T4 Polynukleotidkinase	NEB
T7 RNA-Polymerase	Stratagene

3.2.11.4 Kommerzielle Kits

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Gel DNA recovery Kit	Zymoclean
Rediprime II Random DNA Labelling Kit	Amersham Biosciences
Qiagen Plasmid Purification Kit	Quiagen

ABI Prism® Big Dye™	Applied Biosystems Introducers
Terminator Sequencing Kit	
FuGENE® Transfection Reagent	Roche
SuperSignal West Pico	Amersham Bioscience

3.2.11.5 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Aceton	Roth
Acrylamid	Roth
Agar	MP Biomedicals
Agarose	Invitrogen
Ammoniumsulfat	Serva
Boratpuffer (pH11) (H ₃ BO ₃ , NaOH, KCl)	Sigma
Borsäure	Roth
Bromphenolblau	Serva
Casein-Hydrolysat	Oxoid
Citronensäure	Roth
Coomasie Brilliant Blue	Ferak Berlin
DABCO (1,4-Diazabicyclo(2,2,2)-octan)	Merck
DMEM/F12 GlutaMAX™-I	Gibco Invitrogen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Serva
EGTA (Ethylen glycol-bis(β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure)	Roth
Eosin G 15935	Merck
Ethanol 99,8 %	Roth
Ethidiumbromid	Serva
Formalin	Roth
Glucose	Roth
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
HBSS (Hanks Balanced Salt Solution) Puffer	Thermo Scientific Hyclone
HBSS mit Kalzium/Magnesium	Fisher Scientific
Hefe-Extrakt	ICN Biomedicals
HEPES (N-2-Hydroxyethyl-piperazin-N-ethansulfonsäure)	Merck
Hexaminkobalt(III)chlorid	Sigma
Insulin	Sigma
IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid)	Sigma
Isofluran	cp-pharma
Isopropanol	Roth
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka

Kristallviolett	Merck
L-Glutamin	Invitrogen
Magermilchpulver	Hobbybäcker-Versand
MEM (Eagle's Minimum Essential Medium)	Gibco
MES (2-N-Morpholinoethansulfonsäure)	Sigma
Methanol	Roth
Methylcellulose	Sigma
Natriumacetat	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Roth
Natriumhydroxid	Roth
Natural Mouse Laminin	Invitrogen
Nerve Growth Factor (NGF) 2,5S	Invitrogen
N-Lauroylsarkosinat	Fluka
Opti-MEM	Invitrogen
Paraformaldehyd	Serva
Penicillin-Streptomycin	Gibco BRL
Phenol	Roth
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	Roth
Poly-DL-Ornithin	Sigma Aldrich
Progesteron	Sigma
Progesteron	Sigma
Putrescine	Sigma
Saccharose	Roth
Salzsäure	Riedel de Haén
Saponin	Fluka
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth
Selen	Sigma
Sterile Kochsalzlösung (NaCl 0,9%)	B.Braun
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylendiamin)	Sigma
Transferrin	Sigma
Tris-Base (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)	Invitrogen
Triton X-100	Serva
Trypsin	Worthington
Trypsin-Inhibitor	Sigma
Tween 20	Sigma Aldrich
Wasser für Zellkulturzwecke (HyClone)	Fisher Scientific
β-D-Arabinofuranosylcytosine (ARA-C)	Sigma-Aldrich

3.2.12 Geräte und Laborhilfsmittel

Bezeichnung

Bal - Tec Med 020 Coating System
BAS-Kassette

Hersteller

Bal-Tec/Leica
Fujifilm

Brutschränke für permanente und neuronale Zellkulturen und Bakterien	Bachofer, Heraeus, Forma Scientific
Elektroblotapparatur Trans-Blot-Semi-Dry	BioRad
Elektroelutionskammer Centrilutor	Amicon
Elektronenmikroskop 400T	Philips
Elektroporationssystem Gene Pulser Xcell	BioRad
Feinwaage	Satorius
Fluoreszenzmikroskop Nikon Eclipse Ti-S	Nikon
Nikon NIS-Elements Imaging	
Gel-Dokumentationssystem HeroDoc II	Herolab
Gelelektrophoresekammer, horizontal	BioRad
Gelelektrophoresekammer, vertikal	BioRad
Geltrockner	SLG
Heizblock Thermostat 5320	Eppendorf
Hybridisierungsöfen	Biometra

Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop-System: Leica, Zeiss

TCS SP5

mit invertiertem Mikroskop DMI6000

Objektive:

HCX PL APO lambda blue 63.0x1.40 OIL UV

HCX PL APO lambda blue 20.0x0.70 IMM

UV

Immersionöl:

Immersionöl™ 518F

Laser:

Diode 405 (UV) Leica

Argon Leica

DPSS 561 Leica

Kühlwasserbad 2219 Multitemp II	Amersham-Pharmacia
Kühlzentrifuge Centrifuge 5402	Eppendorf
Laborwaage	Vibra
Lichtmikroskop TM	Nikon
Magnetrührer M30E Framo	Framo, IKAMAG
Mikroschere, Mikropinzette für Präparation	Fine Science Tools
Mikrowellenherd 7032	Privileg
Molecular Imager® Chemidoc™ XRS+	BioRad
pH-Meter	WTW
Phosphoimager FLA-3000	Fujifilm

Pipetten	Eppendorf, Gilson
Rotationsofen	Biometra
Schüttelheizblock Thermomixer 5436	Eppendorf
Schüttelinkubator G25	New Brunswick Scientific
Spannungsgeräte	Biometra, BioRad, Amersham-Pharmacia
Spectrophotometer DU 640	Beckmann
Stereomikroskop	Zeiss
Sterilbank	Heraeus
Transilluminator FIX-20M	Serva
Ultrazentrifugen:	Beckmann
Optima TL (Rotor TLA45)	
LE70, LE80K, LE80-XP	
(Rotoren: SW28, SW32, SW40 TI)	
UV Crosslinker Stratalinker 1800	Stratagene
Vakuumentrifuge Univapo 150 H	Uniequip
Vortex REAX 2000	Heidolph
Wasserbad	GFL
Zentrifugen:	Heraeus, Beckmann, Hettich, Eppendorf
Biofuge 15, Megafuge 1.0 R	
J2-HS (Rotoren: JA-10, -14, -20)	
Universal 30 RF	
Typ 5415C, 5415D, 5403	

3.2.13 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung

Aclar-Fluoropolymer Film
 Campenotkammern
 Filme
 Glaspetrischalen
 Handschuhe
 Kratzer
 Nitrocellulosemembran Protran® BA83
 Nylonmembran Hybond-N+
 Objektträger (Super frost® plus)
 Plastikware
 (Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße,
 Zellkulturschalen, Zentrifugenröhrchen
 Silikon1 Dow Corning Silikon
 Silikon2 Elastosil 41
 Tupfer
 µ-Dishes 35mm

Hersteller

Sciences Services
 Tyler Research
 Polaroid, Fuji, ORWO
 Roth
 B.Braun Melsungen AG
 Tylor Research
 Whatman/GE Healthcare
 Amersham-Pharmacia
 Menzel-Gläser
 Costar, Greiner, Sarstedt, Eppendorf,
 Beckman

 Dow Corning
 Wacker Chemie AG
 B.Braun Melsungen AG
 Ibbidi

3.2.14 Internetadressen und Software

- Advanced Image Data Analyzer Software (AIDA) Raytest
- CodonCode Aligner Version 3.7
- GCG Wisconsin Package (Accelrys Inc.)
- Image J Software (ABRAMOFF et al. 2004)
- LAS AF Version 2.4.1 build 6384 (Leica)
- Microsoft® Office Mac 2008
- www.ncbi.nlm.nih.gov

3.3 Methoden

3.3.1 Rattenzucht zur terminierten Embryonengewinnung

3.3.1.1 Verpaarung der Ratten

Für die benötigte Anzahl an Embryonen wurden durchschnittlich pro Woche 3 Rattenpärchen zusammengesetzt. Dabei wurde immer ein Weibchen in die Kiste des entsprechenden Bockes überführt. Die Zusammensetzung erfolgte vorzugsweise am Nachmittag. Danach wurden bei den Weibchen an höchstens drei aufeinanderfolgenden Tagen tägliche Vaginaltupfer genommen und für die Vaginalzytologie verwendet (siehe 3.3.1.2). Die Vaginalzytologie diente zum Nachweis von Spermien infolge einer stattgefundenen Besamung und somit zur Bestimmung des Startpunktes für die terminierte Embryonengewinnung. Bei einem positiven Spermanachweis innerhalb des Zeitraumes von 3 Tagen wurden die Pärchen wieder getrennt. Die positiven Rattenweibchen wurden gekennzeichnet und 15-17 Tage später zur Gewinnung der Rattenembryonen euthanasiert. Rattenweibchen, die in diesen Tagen keinen positiven Spermanachweis aufwiesen, wurden ebenfalls nach spätestens 3 Tagen vom Bock getrennt und in den nächsten Wochen erneut versucht, zu verpaaren.

3.3.1.2 Vaginalzytologie

Nach der Verpaarung wurde bei den weiblichen Tieren an drei aufeinander folgenden Tagen feuchte Vaginaltupfer genommen. Die entnommenen Tupfer wurden auf Objektträger abgerollt und luftgetrocknet. Die Abstriche wurden anschließend für 1 min in Eosin gefärbt und anschließend mehrmals in Aqua dest. geschwenkt, gespült und anschließend wieder luftgetrocknet. Die Durchmusterung der einzelnen Objektträger erfolgte lichtmikroskopisch. In Abhängigkeit des Ergebnisses wurde weiter vorgegangen (siehe 3.3.1.1).

3.3.1.3 Euthanasie der tragenden Ratte

Die tragenden Tiere wurden am Tag 15-17 der Trächtigkeit zunächst mit Isofluran® sediert. Dazu wurden sie einzeln in einen geschlossenen Behälter gesetzt. Anschließend erfolgte eine Begasung mit Isofluran und anschließend CO₂ bis zum Tod des Tieres, welcher reflektorisch genau überprüft wurde.

3.3.1.4 Gewinnung der Embryonen

Die am Tag 15-17 der Trächtigkeit euthanasierte Ratte wurde auf den Rücken gelegt und der komplette Bauchbereich mit Desinfektionsspray eingesprüht. Für die nachfolgende Sektion wurden 2 sterile anatomische Pinzetten sowie 2 sterile Scheren verwendet. Dabei wurde mit Hilfe der Pinzette die Haut am Bauchbereich in der Höhe der Regio umbilicalis angehoben und ein linearer Schnitt parallel der Linea Alba vom Urogenitaltrakt bis zur Höhe des Diaphragma durchgeführt. Die Haut wurde stumpf abpräpariert und die Muskulatur freigelegt. Danach erfolgte ein Besteckwechsel. Mit der zweiten Schere und Pinzette wurde die Muskulatur durchtrennt und die Bauchhöhle eröffnet. Anschließend wurde die Eröffnung V-förmig erweitert, bis der mit Embryonen gefüllte Uterus gut sichtbar war und herauspräpariert werden konnte. Der herauspräparierte Uterus wurde in eine Glaspetrischale gelegt. Anschließend wurde mit Hilfe von zwei kleinen anatomischen Pinzetten die äußere Schicht zerstört und die Embryonen mit der Eihülle wurden freigelegt. Die Eihülle wurde ebenfalls mit den zwei Pinzetten zerstört und der Embryo wurde vollständig in eine sterile Glaspetrischale überführt, welche mit HBSS Puffer (Thermo Scientific Hyclone) zuvor gefüllt wurde. Es erfolgten 2 Waschungen, indem die Embryonen von einer Schale zur jeweils frischen nächsten Schale überführt wurden.

3.3.2 Zellkultur

3.3.2.1 Präparation von primären Rattenneuronen

Die gewonnenen und gewaschenen Embryonen wurden nacheinander unter einem Stereomikroskop mit Hilfe von feinen Seziernessern (Fine Science Tools) genau an der Halslinie dekapitiert. Für die weiteren Schritte wurden entweder der Kopf für die Präparation des oberen Cervikalganglions oder der Torso für die Präparation der Spinalganglien verwendet. Dementsprechend wurden nach der Dekapitierung der Kopf und der Torso jeweils in mit HBSS Puffer (Thermo Scientific Hyclone) gefüllte Petrischalen überführt und für die weitere Präparation benutzt.

3.3.2.1.1 Präparierung und Kultivierung von oberen Cervikalganglien

Die Präparierung des Oberen Cervikalganglions (engl. Superior cervical ganglia, SCG) erfolgte nach dem Protokoll von CH'NG et al. (2005). Dazu wurden unter einem Stereomikroskop die unteren Mandibeln aus den Köpfen der zuvor dekapitierten Embryonen freigelegt. Hierfür wurde zunächst ein Schnitt vom Mundwinkel längs zum Hinterkopf und parallel unterhalb des Ohres durchgeführt. Die unteren Mandibeln wurden in neue, mit HBSS Puffer (Thermo Scientific Hyclone) gefüllte, Petrischalen gegeben. Danach wurden die Präparate so gedreht, dass die Zunge und der Larynx zu sehen waren. Mit speziellen Seziernessern (Fine Science Tools), welche schon zur Dekapitierung verwendet wurden, wurden die Reste der Wirbelsäule entfernt und ein Schnitt in der Mitte der Präparate gesetzt, beginnend am Larynx zu dem Teil, wo vorher die Wirbelsäule lokalisiert gewesen war. Durch diesen Schnitt wurden die oberen Zervikalganglien zugänglich und konnten entfernt werden. Dafür wurde das Präparat zunächst noch einmal um 180° gedreht, so dass die Zunge und Larynx auf dem Boden der Petrischale lokalisiert waren. Anschließend wurden die paarig angelegten oberen Zervikalganglien, welche mit der *A.carotis* verbunden und nahe dem *Ganglion nodosum* lokalisiert sind, einzeln herauspräpariert und für das Explantatsystem mit Hilfe einer Pasteurpipette in 0,5 ml Reaktionsgefäße verbracht und bis zur Kultivierung auf Eis gestellt (siehe 3.3.3.2). Die Pasteurpipette wurde vor dem Gebrauch unter einem Bunsenbrenner abgeflammt, um die scharfkantigen Glasränder abzuschmelzen. Für das modifizierte Drei-Kammer-System wurden die einzeln herauspräparierten Ganglien mit Hilfe einer Pasteurpipette in

einem 1,5 ml mit HBSS Puffer gefüllten Reaktionsgefäß gesammelt und auch anschließend bis zur weiteren Verwendung auf Eis gestellt (siehe 3.3.4.3). Die Anzahl der gesammelten Ganglien richtete sich nach der Menge der eingesetzten Kulturen. Für ein modifiziertes Drei-Kammer-System wurden 1-2 obere Cervikalganglien benötigt.

3.3.2.1.2 Präparierung und Kultivierung von Spinalganglien

Die Präparation der Spinalganglien (engl. Dorsal Root Ganglia, DRG) wurde modifiziert nach BURKEY et al. (2004) durchgeführt. Dazu wurde der Torso der dekapitierten Embryonen verwendet. Alle weiteren Schritte erfolgten unter einem Stereomikroskop. Die Embryonen wurden dazu in Bauchlage verbracht. Mit einer speziellen Mikroschere (Fine Science Tools) wurde von cranial nach caudal eine Laminektomie durchgeführt. Das Rückenmark wurde entnommen und der Spinalkanal vorsichtig freigelegt. Die Spinalganglien waren danach als kleine, dichte, weiße Punkte eindeutig anatomisch zwischen den Foramina intervertebralia lokalisierbar. Sie wurden einzeln mit Mikropinzetten (Fine Science Tools) unter ständiger stereomikroskopischer Kontrolle herausgenommen und mit HBSS Puffer (Thermo Scientific Hyclone) in 1,5 ml gefüllte Reaktionsgefäße gesammelt. Die Anzahl der gesammelten Ganglien richtete sich nach der Menge der eingesetzten Kulturen. Für ein modifiziertes Drei-Kammer-System wurden 20 Spinalganglien benötigt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die gesammelten Ganglien auf Eis gestellt und anschließend weiter aufgearbeitet (siehe 3.3.3.2).

3.3.2.2 Kultivierung von permanenten Zelllinien

In der Arbeit wurden mehrere permanente Zelllinien verwendet, wie RK-13 Zellen, Verozellen und PSEK Zellen. Die Kultivierung der permanenten Zelllinien erfolgte in feuchter Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO₂ Gehalt in MEM. Dem Medium wurden entweder 5% oder 10% an FKS zugesetzt. Es erfolgte in regelmäßigen Abständen ein Umsetzen der jeweiligen Zellen. Dazu wurde das Medium entfernt, die Zellen mit ATV (Trypsin-EDTA-Lösung) gespült und anschließend unter ATV versetzt und im Brutschrank inkubiert bis zum vollständigen Ablösen des Zellrasens. Die Zellen wurden vereinzelt und in einem Verhältnis von 1:6 umgesetzt.

3.3.3 Explantatsystem

Das in dieser Arbeit verwendete Explantatsystem war bereits erfolgreich am FLI-Insel Riems von Dr. Christina Maresch etabliert worden (MARESCH et al. 2010).

3.3.3.1 Vorbereitung der Zellkulturgefäße

Für die Generierung des Explantatsystems mussten zunächst die Zellkulturgefäße beschichtet werden. Für die Elektronenmikroskopie wurden sterile Glaszellkulturschalen, in denen ein zuvor zugeschnittener steriler Objektträger gelegt wurde, verwendet. Diese Gefäße wurden 48h vor dem geplanten Einsäen der Explantate mit 500µg/ml Poly-DL-Ornithin (Sigma Aldrich) in Boratpuffer beschichtet. Nach 24h Inkubationszeit in feuchter Atmosphäre bei 37°C und 5% CO₂ Gehalt wurde nach 3-maligem Waschen mit speziellem Wasser für Zellkulturzwecke (Fisher Scientific) die verwendeten Zellkulturgefäße erneut mit 10µg/ml Laminin (Natural Mouse Laminin, Invitrogen) beschichtet, welches zuvor in HBSS Puffer (Thermo Scientific Hyclone) gelöst wurde. Es erfolgte eine erneute Inkubation für 24h unter den zuvor genannten Bedingungen. Vor dem jeweiligen Einsäen wurden die Zellkulturgefäße erneut zweimal gewaschen.

3.3.3.2 Einsäen und Kultivierung der Explantate

Die präparierten und gesammelten SCG (siehe 3.3.2.1.1) wurden bei 4000 rpm 2min zentrifugiert, so dass die Ganglien sich am unteren Rand des 0,5ml Reaktionsgefäß absetzen konnten. Um die Ganglien nicht zu beschädigen, wurden die scharfkantigen Ränder einer Pasteurpipette durch kurzzeitiges Abflammen abgeschmolzen. Mit der vorbehandelten Pasteurpipette wurden nun die Ganglien einzeln in die zuvor behandelten Zellkulturgefäße mittig auf die Glasobjektträger gesetzt (siehe 3.3.3.1) und zum Absetzen auf dem Glasobjektträger für 1h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 1 h wurden die Kulturen einzeln mit frischem, vorgewärmten Neuronenmedium vorsichtig überschichtet und erneut inkubiert. Die Kultivierung wurde in regelmäßigen Abständen lichtmikroskopisch kontrolliert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 3 Tage.

3.3.3.3 Infektion der Explantate

Die Explantate wurden nach 7 Tagen Kultivierung für die Infektion verwendet. Zuvor erfolgte eine lichtmikroskopische Überprüfung. Unzureichend ausgewachsene Kulturen, fehlerhafte oder kontaminierte Proben wurden verworfen. Für die Infektion wurde der Titer des jeweiligen Virus auf 1×10^5 pfu/ml eingestellt. Dazu wurden die Viren in Neuronenmedium verdünnt und die Lösung auf die Explantate gegeben. Das Erhaltungsmedium der Kulturen wurde verworfen. Nach der Infektion erfolgte eine Inkubation von 1h in feuchter Atmosphäre bei 37°C und 5% CO₂ Gehalt. Danach wurde die Virusverdünnung abgenommen und vorsichtig mit frischem vorgewärmten Neuronenmedium ersetzt. Es erfolgte eine weitere Inkubation bis zum gewünschten Analysezeitpunkt zwischen 16h und 20h. Anschließend wurden die Explantate für die elektronenmikroskopische Analyse verwendet (siehe 3.3.5)

3.3.4 Modifiziertes Drei-Kammer-System

Das für diese Arbeit verwendete Drei-Kammer-System wurde modifiziert nach CURANOVIC et. al. (2009).

3.3.4.1 Vorbereitung der Zellkulturgefäße

In Abhängigkeit der späteren Analysen wurden unterschiedliche Zellkulturgefäße verwendet, je nachdem ob das Live-Cell-Imaging Verfahren oder Elektronenmikroskopie genutzt wurde. Für die elektronenmikroskopischen Analysen wurden zunächst spezielle Aclarfolien auf einen Durchmesser von 26 cm ausgestanzt. Diese wurden gereinigt und in Plastikzellkulturschalen gelegt. Anschließend erfolgte eine Beglimmung der Folien mit Argon für 1min zur Reduzierung der starken Oberflächenspannung der Folien und somit zur Herabsetzung der starken Hydrophobizität für ein verbessertes Beschichtungsergebnisses. Die Beglimmung erfolgte mit einem Bal-Tec Med 020 Coating System und wurde von Frau Meyer aus dem Labor für Elektronenmikroskopie unter der Leitung von Herrn Dr. habil. Granzow durchgeführt. Anschließend wurden die Zellkulturgefäße mit den beglimmten Folien unter UV-Licht für 30min sterilisiert. Die so vorbereiteten Schalen wurden danach wie beim Explantatsystem beschichtet, ebenso die für das Live-Cell-Imaging verwendeten μ -Dishes. (siehe 3.3.3.1)

3.3.4.2 Generierung des modifizierten Drei-Kammer-Systems

Nach mehrmaligem Waschen mit speziellem Wasser für Zellkulturzwecke (Fisher Scientific) wurden die Zellkulturgefäße luftgetrocknet. Es wurden entweder die schon beschriebenen vorbereiteten Aclarfolien oder μ -Dishes verwendet (siehe 3.3.4.1). Anschließend wurden mit Hilfe eines Kratzers (Tyler Research) parallele Furchen auf die Zellkulturgefäße aufgebracht. In die Mitte der Furchen wurden 50 μ l eines 1% Methocel-Neuronenmedium-Gemisches getropft. Die

anschließend verwendeten Campenot Kammern aus Teflon (Tylor Research) wurden mit Hilfe einer Gefäßklemme an den Mittelstegen vorsichtig befestigt. Für das spätere Aufbringen der Campenot Kammern auf die vorbereiteten Zellkulturgefäße wurden 2 unterschiedliche Silikonarten verwendet. Zunächst wurden mit Hilfe einer silikongefüllten (Dow Corning Silikon) vorbereiteten Spritze und einer speziell vorbereiteten Kanüle beide Mittelstege der fixierten Campenot Kammer mit Silikonstreifen versehen. Das vorbereitete Zellkulturgefäß mit den eingebrachten Rillen und dem Methoceltropfen wurde mittig auf die Teflonkammern platziert und umgedreht. Die Fixierung mit der Gefäßklemme wurde vorsichtig gelöst. Zur weiteren Verklebung und Abdichtung des Außenrings der Campenot Kammer wurde ein weiteres Silikon (Wacker Silikon Elastosil E41) verwendet, welches auch mittels einer Spritze und Kanüle um die Kammer herum aufgebracht wurde. Anschließend wurden die einzelnen Kompartimente mit HBSS Puffer (Thermo Scientific Hyclone) befüllt, so dass eine Austrocknung der Beschichtung verhindert wurde. Die geklebten Kammersysteme wurden zur besseren Aushärtung des Silikons 24h bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Kompartimente mehrmals mit HBSS Puffer (Thermo Scientific Hyclone) gewaschen und anschließend mit vorgewärmten Neuronenmedium befüllt. Dabei wurde je 150 µl in das S – und das M – Kompartiment gegeben, sowie 300 µl in das N- Kompartiment. Die so vorbereiteten Kammersysteme wurden im Brutschrank bei 37° C bis zum Einsäen der präparierten und aufgearbeiteten Nervenzellen (siehe 3.3.4.3) vorgewärmt.

3.3.4.3 Einsäen der Zellen ins modifizierte Drei-Kammer-System

Für das modifizierte Drei-Kammer-System wurden sowohl die zuvor präparierten SCG als auch DRG verwendet. Die frei präparierten und auf Eis gekühlten Ganglien (siehe auch 3.3.2.1.1 und 3.3.2.1.2) in HBSS Puffer (Thermo Scientific Hyclone) wurden bei 4000 rpm für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und pro Reaktionsgefäß 500 µl Trypsinlösung (500 µg/ml) zugegeben. Der Ansatz wurde für 25 min bei 37° C inkubiert und anschließend erneut zentrifugiert. Wieder wurde der Überstand entfernt und pro Reaktionsgefäß 500µl Trypsininhibitorlösung (1 mg/ml) hinzugegeben. Es folgte eine zweite Inkubation bei 37° C für 10 min und erneute Zentrifugation. Nach Entfernen des Überstandes und Zugabe von 500 µl frischem Neuronenmedium wurde das Zellpellet mit einer abgeflamnten sterilen Pasteurpipette dissoziiert, bis ein homogenes Zellgemisch entstanden war. Das Volumen des Reaktionsgefäßes wurde entsprechend der benötigten Ganglienanzahl pro Kammer mit entsprechendem Neuronenmedium aufgefüllt und anschließend in die vorbereiteten Kammern (siehe 3.3.4.2) ins S-Kompartiment eingesäht. Pro Kammer und S-Kompartiment wurde ca. 100 µl des Zellgemisches verwendet. Abschließend wurde lichtmikroskopisch die Dichtigkeit der S-Kompartimente überprüft. Kammern, in denen Zellen im M-Kompartiment sichtbar waren wurden sofort verworfen. Bis zur nächsten Überprüfung und Behandlung mit 1-β-D-Arabinofuranosylcytosin (Ara-C) wurden die modifizierten Drei-Kammer-Systeme für 24 h bei 37° C und 5 % CO₂ inkubiert.

3.3.4.4 Behandlung des modifizierten Drei-Kammer-Systems mit 1-β-D-Arabinofuranosylcytosin (Ara-C)

Die frisch ausgesäten modifizierten Drei-Kammer-Systeme vom Vortag wurden lichtmikroskopisch überprüft. Dabei wurde besonders der Übergang vom S - Kompartiment zum M - Kompartiment auf Undichtigkeiten hin überprüft. Eine Behandlung mit 1-β-D-Arabinofuranosylcytosin (Ara-C) wurde nur im S-Kompartiment durchgeführt. Das Neuronenmedium wurde komplett entfernt und mit 200 µl pro S-Kompartiment einer frisch angesetzten Ara-C Lösung überschichtet. Für die Ara-C Lösung wurde ein 10 mmol Ara-C Stock 1:1000 in frischem Neuronenmedium verdünnt. Die

eingesetzte Menge richtete sich nach der Menge der vorhandenen modifizierten Drei-Kammer-Systeme. Es folgte eine Inkubation für 4 h bei 37° C und 5 % CO₂. Anschließend wurde das Medium im S-Kompartiment entfernt und durch frisches erwärmtes Neuronenmedium ersetzt. Die modifizierten Drei-Kammer-Systeme wurden erneut bis zum nächsten Mediumwechsel inkubiert und regelmäßig kontrolliert. Der Mediumwechsel wurde alle 3-4 Tage in allen Kompartimenten durchgeführt. Die Kultivierung bis zur Infektion dauerte in der Regel 14 Tage. Anschließend wurden die Kammersysteme für weitere Analysen wie z.B. Elektronenmikroskopie (siehe 3.3.5) und Live-Cell-Imaging (siehe 3.3.6) verwendet.

3.3.4.5 Infektion des modifizierten Drei-Kammer-Systems

Die Infektion des modifizierten Drei-Kammer-Systems erfolgte sowohl für das Live-Cell-Imaging (siehe 3.3.6) als auch für die Elektronenmikroskopie (siehe 3.3.5) nach ca. 14 Tagen. Die Kulturen wurden vor der Infektion lichtmikroskopisch untersucht und der Grad des Auswachsens überprüft. Für die Infektionsversuche wurden nur Kulturen verwendet, die bis in das N-Kompartiment ausgewachsen waren. Die verwendeten Viren wurden zunächst auf 1×10^6 pfu/ml in Neuronenmedium verdünnt und anschließend nach Abnahme des alten Mediums vorsichtig ins S-Kompartiment gegeben. Es wurde besonders darauf geachtet eine Infektion des M-Kompartiments zu vermeiden. Die infizierten Kulturen wurden für 1 h bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde die Virussuspension entfernt und die Kulturen mit vorgewärmten Neuronenmedium überschichtet und erneut zwischen 18 und 24h inkubiert. Zum vorher genau festgelegten Infektionszeitpunkt wurden die Kulturen entweder sofort für die Verwendung im Live-Cell-Imaging (siehe 3.3.6) eingesetzt oder für die anschließende Präparation für die Elektronenmikroskopie (siehe 3.3.5) fixiert.

3.3.5 Elektronenmikroskopie

Die Präparationen und elektronenmikroskopischen Auswertungen der Experimente dieser Arbeit wurden im Laboratorium für Elektronenmikroskopie von Herrn Dr. habil. Granzow durchgeführt. Es wurden infizierte bzw. nicht infizierte Ganglienexplantate (siehe 3.3.3.3) oder modifizierte Drei-Kammer-Kulturen verwendet (siehe 3.3.4.5). Die verwendeten Kulturen wurden zu den gewünschten Zeitpunkten nach der Infektion mit 2,5% Glutardialdehyd gepuffert in 0,1 M Natriumcacodylat-Puffer (300 mosmaol/l, pH 7,2) für 60 min bei RT fixiert. Dabei wurde bei dem modifizierten Drei-Kammer-Modell in den einzelnen Kompartimenten fixiert und die modifizierte Campenotkammer auf den Kulturen belassen. Es folgten mehrere Waschschrte und anschließend eine Nachfixierung mit 1% Osmiumtetroxid und eine Blockkontrastierung über Nacht mit Uranylacetat. Danach wurde eine stufenweise Entwässerung in Ethanol und Propylenoxid durchgeführt. Es folgte die Infiltration mit Epoxidharz und die Polymerisation für 4 Tage bei 59 °C. Für die nachfolgende Anfertigung von Ultradünnschnitten mussten die behandelten Explantate durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendem Tauchen in Wasser von den Objektträgern gelöst werden. Bei dem modifizierten Drei-Kammer-System wurde das polymerisierte Harz einzeln mit einem Skalpell aus den Kompartimenten entfernt, so dass jeweils für eine Kultur 3 Epoxidharzblöckchen vorhanden waren. Die so erhaltenden Epoxidharzblöckchen sowohl von den Explantaten als auch von den Drei-Kammer-Kulturen wurden für die Ultradünnschnitte verwendet und mit Uranylacetat und Bleisalzen nachkontrastiert. Die Auswertung erfolgte an einem Philipps Tecnai 12 Transmissionselektronenmikroskop.

3.3.6 Live-Cell-Imaging

Für das Live-Cell-Imaging wurden sowohl primäre Neuronenkulturen aus dem oberen Cervikalganglion (SCG) als auch von Spinalganglien (DRG) verwendet, welche im neu etablierten

modifizierten Drei-Kammer-Modell kultiviert wurden (siehe 3.3.4). Die Infektion der Kulturen erfolgte wie unter (3.3.4.5) aufgeführt. Zur Untersuchung des anterograden intraaxonalen Transportes wurden die modifizierten Drei-Kammer-Systeme im S-Kompartiment infiziert und 18-24h nach der Infektion untersucht. Für die Infektion wurden rekombinante Viren verwendet, welche am Kapsidprotein pUL35 mit autofluoreszierenden Fluorophoren wie GFP (green fluorescence protein) fusioniert sind (KRAUTWALD et al. 2008, DESAI und PERSON 1998). Zum besseren Darstellung der infizierten Axone und zur Überprüfung der Transportfähigkeit und Lebensfähigkeit der Neuronen wurde ein Neurovesikelmarker (FM4-64 dyes, Molecular Probes) angewendet. Der Marker wurde zwei Stunden vor der Aufnahme ins S-Kompartiment gegeben. Nach 30 min Inkubation bei 37° C wurde zur Entfernung des Markers ein kompletter Mediumwechsel im S-Kompartiment durchgeführt. Der Marker diene ebenfalls zur Überprüfung der Dichtigkeit der einzelnen Kompartimente. Durch das Verkleben sollte es nicht möglich sein, dass der Marker durch Diffusion in das M-Kompartiment gelangt. Einzig gefärbte transportierte Vesikel sollten im M-Kompartiment sichtbar sein. Undichte Drei-Kammer-Systeme wurden sofort verworfen.

Zur Analyse wurde das konfokale Laser Scan Mikroskop Leica SP5 verwendet. Ein großer Vorteil dieses Systems liegt in einer im Mikroskop integrierten beheizbaren Wärmekammer, worin das Präparat wie unter normalen Kulturbedingungen im Brutschrank bei 37 ° C über längere Zeit beobachtet werden konnte. So waren auch Beobachtungen über mehrere Stunden möglich, ohne dass eine Beschädigung der empfindlichen Kulturen auftrat. Die zu untersuchenden Kulturen wurden mit einem Argon Laser (488nm) und einem Helium-Neon-Laser (543nm) bestrahlt und die Emissionen aufgezeichnet. Die Laserleistung wurde bei beiden Lasern auf 8 % gesetzt. Als Objektiv wurde ein 63 x 1,4 Ölimmersionsobjektiv verwendet. Die Aufnahmen wurden bidirektional bei einer Geschwindigkeit von 1000 Hz gescannt. Die so entstandenen Zeitserienaufnahmen in Stapeln wurden als z-Projektionen über die Zeit dargestellt und von der geräteeigenen Software berechnet und übereinander projiziert. Die aufgezeichneten Sequenzen wurden mit Hilfe der ImageJ Software (ABRAMOFF et al. 2004) ausgewertet.

3.3.7 Virusanzucht

3.3.7.1 Virusanzucht

Für die Anzucht der unterschiedlichen verwendeten PrV Stämme wurden PSEK Zellen verwendet. Die Anzucht von HSV-1 erfolgte auf Verozellen. Die Virusinfektion der zu einem Monolayer ausgewachsenen Zellen erfolgte mit einer MOI von 0,1. Anschließend wurden die Zellen bei 37°C und einem CO₂ Gehalt von 5% ca. 3 Tage inkubiert bis ein vollständiger cytopathogener Effekt (CPE) zu beobachten war und die Zellkulturüberstände geerntet werden konnten. Es folgte eine Portionierung und Lagerung bei -70°C. Für jede Virusanzucht wurde anschließend ein Plaquetest durchgeführt (siehe 3.3.7.2).

3.3.7.2 Plaquetest

Für die Durchführung einer Titration zur Quantifizierung infektiöser Virionen wurden von den jeweiligen Virussuspension Verdünnungsreihen in MEM mit 5% FKS hergestellt und anschließend auf konfluente RK-13 Zellen für PrV oder auf Verozellen für HSV-1 in Mikrotiterplatten gegeben. Nach zweistündiger Inkubation bei RT wurde das Inokulum entfernt, durch 0,25x Methocelmedium ersetzt und die Inkubation bei 37°C fortgesetzt. Nach 2-3 Tagen erfolgte eine einstündige Fixierung der Zellen mit 5 % iger Formaldehydlösung. Im Anschluss wurden die Zellen mit Wasser gespült und für 15 min mit 1% Kristallviolett in 50% Ethanol gefärbt. Danach erfolgte eine weitere

Spülung und Trocknung der Mikrotiterplatten bei RT. Die Bestimmung des Virustiters (pfu/ml) erfolgte durch Auszählung der Plaques.

3.3.8 DNA-Isolierung und Analyse

3.3.8.1 Präparation von Virus-DNA

Für die Präparation der jeweils benötigten viralen DNA wurde das aus der Virusanzucht (siehe 3.3.7.1) gewonnene Zellpellet verwendet. Es erfolgte eine Waschung mit TEN-Puffer und anschließende Zentrifugation für 10 min bei 4000 rpm. Das Zellpellet wurde in TEN-Puffer resuspendiert und mit Sarcosyl-Puffer 15 min bei 65° C lysiert. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation mit 30 µl RNase A (10mg/ml) für 30 min bei 37° C und danach mit 300 µl Pronase über Nacht bei 42° C. Am nächsten Tag wurde die DNA durch Phenol-Extraktion gereinigt und mit Hilfe von Ethanol gefällt (siehe 3.3.8.2).

3.3.8.2 Phenolextraktion und Ethanolpräzipitation

Um Proteine und andere Verunreinigungen aus der Nukleinsäurelösung zu entfernen, wurde Phenol verwendet. Dabei wurde die DNA-Lösung mit 1 Volumen Phenol versetzt und im Anschluss für 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen und in ein Phenol/Chloroform-Gemisch (1:1) überführt. Der Zentrifugiervorgang wurde wiederholt und die Extraktion mit Chloroform wiederholt. Danach erfolgte die Präzipitation mit Ethanol. Dazu wurde die gewonnene wässrige Phase mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 4,8) und 3 Volumen Ethanol gemischt und über Nacht bei -20°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Gemisch für 20 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE-Puffer resuspendiert (pH 8). Die Konzentration und Reinheit der DNA wurde photometrisch (siehe 3.3.8.4) und auf einem Agarosegel bestimmt und überprüft.

3.3.8.3 Präparation von Plasmid-DNA

Schnellpräparation von Plasmid-DNA (Minipräparation)

Plasmid-tragende Bakterienklone wurden aus Einzelkolonien gepickt und zur Anzucht in 2 ml LB-Medium unter Zusatz eines selektiven Antibiotikums gegeben. Die Anzucht erfolgte über Nacht bei 37° C. Von den Übernachtskulturen wurden jeweils 1,5 ml Bakteriensuspension in entsprechende Reaktionsgefäße überführt und für 3 min bei 13200 rpm zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Bakterienpellet in 200 µl Lösung I resuspendiert, danach 200µl Lösung II zugegeben und vorsichtig gemischt. Im Anschluss erfolgte eine Zugabe von 300µl Natriumacetat (3M, pH 4,8) und Inkubation für 10 min auf Eis. Das Gemisch wurde für 10 min bei 13200 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und mit 450 µl Isopropanol gemischt. Anschließend wurde erneut für 15min bei 13200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nach Trocknung wurde das Pellet in 50µl TE-Puffer (pH 8,0) + RNase A (50µg/ml) gelöst und für 30 min bei 37° C inkubiert.

Präparation von größeren Mengen Plasmid-DNA (Midipräparation)

Für die so genannte Midipräparation wurde das QIAGEN Plasmid Midi Kit[®] benutzt. Auch hier wurden zunächst Bakterienklone aus Einzelkolonien gepickt und in 2ml LB-Medium unter Zusatz selektiver Antibiotika über Nacht bei 37° C angezogen. Die Übernachtskulturen wurden in 200ml LB Medium unter Zusatz von selektiven Antibiotika verimpft und über Nacht bei 37° C geschüttelt. Die anschließende Aufarbeitung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

3.3.8.4 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäurelösungen wurde mit Hilfe eines Photometers durchgeführt. Es wurden Adsorptionsspektren (220-320 nm) im UV-Bereich aufgenommen. Anschließend konnte die Nukleinsäurekonzentration aus der Extinktion bei 260 nm wie folgt berechnet werden:

$$OD_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \mu\text{g/ml dsDNA}$$

Die Reinheit der Nukleinsäurelösung wurde über den Quotienten OD_{260}/OD_{280} bestimmt. Der bestimmte Wert sollte demnach zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Werte unter 1,8 deuteten auf Verunreinigungen mit Proteinen hin.

3.3.8.5 Southern-Blot-Hybridisierung

Herstellung der ^{32}P -markierten DNA-Sonde

Für die Herstellung der ^{32}P -Sonde wurden zunächst 20-100 ng Plasmid-DNA mit 50 μl H_2O gemischt und bei 100 °C für 15 min aufgeköcht. Nach Abkühlung auf Eis wurden von diesem Ansatz 45 μl mit 5 μl $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP in Rediprime überführt und für 1h bei 37° C inkubiert. Danach erfolgte eine Reinigung über eine SigmaSpin™ Post-Reaction Purification Säule nach Angaben des Herstellers. Anschließend wurde der gereinigte Ansatz für weitere 5 min aufgeköcht, in die Hybridisierungslösung gegeben und über Nacht im Hybridisierungsofen bei 65° - 68° in Abhängigkeit der jeweiligen Probe inkubiert.

Transfer auf Nylon Membran

Für den Transfer auf eine Nylon-Membran wurde die zu untersuchende DNA mit BamHI gespalten, auf ein ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel gegeben und über Nacht bei 25V getrennt. Das Agarosegel wurde mit einem fluoreszierenden Lineal fotografiert und die Spaltung überprüft. Anschließend erfolgten zur Vorbereitung des Transfers mehrere Waschschrte. Zunächst wurde das Gel für 10 min in 0,25m HCl depurinisiert und anschließend 3x mit Wasser gespült. Danach wurde zweimal mit 0,5 n NaOH/0,9 m NaCl für jeweils 15 min denaturiert und anschließend mit Wasser gespült. Zum Schluss wurde das Gel für 2x 30 min in 0,9 m NaCl/ 1M Tris (pH = 7,4) neutralisiert. Für das Blotting wurde ein feuchtes Filterpapier über eine Glasplatte gelegt, so dass beide Enden in eine Wanne mit 12x SSC Puffer ragten. Darüber wurde das Gel platziert. Anschließend wurde die zuvor in Aqua dest. eingelegte Nylonmembran auf das Gel gelegt. Unter das Gel wurden an den Rändern Röntgenstreifen platziert und mit zwei feuchten und einem trockenen Filterpapier überschichtet. Über das Konstrukt wurde ein Stapel aus trockenem Zellstoff gelegt, mit einem Gewicht (ca. 500g) beschwert und für ca. 20 h bei RT stehen gelassen. Der Transfer der Nukleinsäure auf die Membran konnte nun durch die anliegenden Kapillarkräfte über Nacht stattfinden. Um die DNA kovalent an die Membran zu binden, wurde die Membran anschließend im UV-Crosslinker kurz bestrahlt und unter Vakuum bei 80° C für 2 h getrocknet. Die getrocknete Membran wurde anschließend bei RT in Folie aufbewahrt oder sofort für die Hybridisierung verwendet.

Hybridisierung

Die zuvor getrocknete Membran wurde zur Hybridisierung zunächst in 2x SCC Puffer eingelegt. Die Hybridisierungslösung wurde gemäß Protokoll angesetzt und anschließend bei 100° C für 5 min gekocht und direkt in ein Hybridisierungsrohr mit der Membran gegeben. Es erfolgte eine Inkubation bei 65° - 68° für 4 h. Anschließend konnte die zuvor hergestellte Sonde dazugegeben werden. Es erfolgte eine erneute Inkubation bei 65° - 68°C über Nacht. Am nächsten Tag wurde die Hybridisierungslösung dekantiert und die Membran im Hybridisierungsrohr mehrmals mit 2xSSC/ 0,5% SDS bei 68° C gewaschen. Anschließend wurden Waschvorgänge mit 0,1x SSC/ 0,5% SDS bei 68° C durchgeführt, bis die Waschlösung keine Radioaktivität mehr aufwies. Die Membran wurde aus dem Hybridisierungsrohr entfernt, getrocknet und in Folie eingewickelt. Zur Exposition wurde die eingewickelte Membran für 24h auf eine spezielle Fotoplatte in eine BAS-Kassette (Fujifilm) bei RT gelegt. Anschließend erfolgte die Detektion.

Detektion

Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines Phospho-Imager FLA-3000 (Fujifilm). Dafür wurde die Fotoplatte in den Phospho-Imager eingelesen und mit Hilfe der Advanced Image Data Analyzer Software ausgewertet.

3.3.8.6 Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte nach der Kettenabbruch-Methode nach SANGER et al. (1977). Nach diesem Prinzip enthält der eingesetzte Reaktionsmix neben allen vier Desoxyribonukleotiden und der thermostabilen DNA-Polymerase auch jeweils ein Didesoxyribonukleotid in geringer Molarität. Bei der durchgeführten in vitro DNA-Synthese führt der Einbau eines Didesoyribonukleotid zum Abbruch aufgrund des Fehlens einer freien 3'-OH-Gruppe. Es entstehen so Gemische mit unterschiedlich langen Produkten. Zur Analyse werden diese auf ein denaturierendes Polyacrylamid-Harnstoffgel gegeben und nach der elektrophoretischen Trennung die DNA-Sequenzmuster abgelesen. Für diese Arbeit wurde das kommerzielle ABI PRISM® Big Dye™ Terminator Sequencing Kit verwendet. Für einen Sequenzieransatz wurde auf 10 µl ca. 1 µg Plasmid-DNA oder 10 ng/100 bp PCR-Produkt mit dem vorhandenen Reaktionspuffer und 5 pmol Primer gemischt. Mit Hilfe eine Cyclers (Biorad) folgte die in vitro DNA Sythese nach initialer Denaturierung in 25 Zyklen (10s 95° C, 5 s 55° C und 4 min 60° C). Der Reaktionsansatz wurde anschließend mit 10 µl H₂O vermischt und über eine SigmaSpin™ Post-Reaction Purification Säule gereinigt. Von dem gewonnenen Eluat wurden 10 µl mit 10µl Formamid gemischt und in einem Genetic Analyzer 3130 (ABI/Hitachi) analysiert. Die erhaltenen Rohdaten wurden am PC mit der Software GCG, CodonCode Aligner und Chromas Lite ausgewertet.

3.3.9 RNA-Isolierung und Analyse

Die Arbeiten mit RNA wurden von Herrn Dr. Fuchs, Labor für Molekularbiologie animaler Herpesviren, Institut für Molekularbiologie, FLI-Insel Riems durchgeführt.

3.3.10 DNA-Klonierung

3.3.10.1 Spaltung der DNA mit Restriktionsenzymen

Die Spaltung der eingesetzten DNA mit Restriktionsenzymen erfolgte nach den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen. Für die Spaltung von 1 µg DNA wurden 5-20 U des gewünschten

Restriktionsenzym eingesetzt. Dabei wurde das Ansatzvolumen so gewählt, dass der Anteil der glycerolhaltigen Enzym Lösungen nicht mehr als 10% betrug.

3.3.10.2 Agarosegelelektrophorese

Für die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden, in Abhängigkeit zu der Größe des gesuchten DNA-Fragmentes, 15 mm starke, 0,6 – 1,5 % (w/v) Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde in 1x TAE Puffer aufgekocht, mit 0,3 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in die entsprechenden Gelträger gegossen. Nach der Polymerisierung wurden die Gele in entsprechenden Gelelektrophoresekammern mit 1x TAE Puffer bedeckt. Die aufzutrennende DNA wurde mit 1/10 Volumen Probenpuffer versetzt und auf die Gele aufgetragen. Als Längenstandard diente ein 1kbp-Marker. Anschließend erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung bei 35-80 V. Für die Auswertung wurden die fluoreszierenden DNA-Banden mit Hilfe eines UV-Transilluminators (256 nm) dargestellt und mit einem Geldokumentationsgerät fotografiert.

3.3.10.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR) wurde zur gezielten und schnellen Amplifikation von DNA-Abschnitten verwendet (MULLIS et al. 1993). Nach der Amplifikation konnten diese zur Klonierung oder Sequenzierung eingesetzt werden. Die dazu verwendeten Oligonukleotidprimer (20 – 25mer) sind in der Lage, mit der komplementären DNA-Matrize zu hybridisieren und so die DNA Synthese zu starten. Beginnend mit der Denaturierung der DNA werden zyklisch verschiedene Phasen der in vitro DNA Synthese durchlaufen, wie die Primer Hybridisierung (Annealing) und DNA-Synthese (Elongation), um mit Hilfe einer thermostabilen DNA-abhängigen DNA-Polymerase an den 3' - OH Enden der Primer freie dNTP's zu polymerisieren und so den Abschnitt zwischen den Primern zu synthetisieren und zu amplifizieren.

Die Zusammenstellung des Reaktionsansatzes erfolgte nach den Empfehlungen des Herstellers. Für einen 50 µl Volumen Ansatz wurden 10-100 ng Template DNA, 50 pmol beider Primer, 0,3 mM dNTPs, 1 mM MgSO₄, steriles Aqua tridest. und 1 U Platinum[®] Pfx DNA Polymerase (Invitrogen) gemischt. Für eine Steigerung der Effizienz besonders bei sehr GC-reicher DNA wurde optional noch der mitgelieferte Enhancer eingesetzt. Die Konzentration wurde in Abhängigkeit von der verwendeten DNA entsprechend angepasst. Die anschließende in vitro DNA-Synthese erfolgte in einem Thermocycler (Biorad). Nach einer initialen Denaturierung bei 95° C für 3 min folgte in 35 Zyklen die Denaturierung bei 95° C für 30 sec, dann die Annealing Phase bei 2° C über der Schmelztemperatur der jeweiligen Primer für 30 sec, gefolgt von der Elongations Phase bei 70° C für 1 min/kpb Produktlänge. Nach Beendigung der Zyklen folgte nach eine letzte Synthesephase bei 70° C für 10 min. Die erhaltenen Amplifikationsprodukte wurden mittels der Agarosegelelektrophorese (siehe 3.3.10.2) überprüft und anschließend gereinigt (siehe 3.3.10.4).

3.3.10.4 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach der elektrophoretischen Auftrennung (siehe 3.3.10.2) wurde die gewünschte Bande mit einem Skalpell unter UV-Licht (366 nm) aus dem Gel geschnitten. Die Extraktion erfolgte entweder durch Phenol und Ethanolpräzipitation oder durch das Zymoclean[™] Gel DNA Recovery Kit. Bei dem kommerziell erhältlichen Kit wurde die Extraktion nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die Phenolextraktion wurde das gewonnene Agarosegelstück zerkleinert, mit 1 Volumen Phenol versetzt, für 30 sec in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend für 20 min bei 15000 rpm zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und mit 1 Volumen IAC

ausgeschüttelt. Anschließend erfolgte eine Ethanolpräzipitation über Nacht bei -20°C . Dafür wurde die wässrige Phase mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 4.8) und 3 Volumen Ethanol gemischt. Nach der Präzipitation folgte eine Zentrifugation bei 13200 rpm für 15 min. Der Überstand wurde dekantiert und das erhaltene Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und Trocknung wurde das DNA-Pellet in 30 μl TE Puffer (pH 7,4) aufgenommen. Zur Kontrolle wurde 1 μl auf ein 0,7% Agarosegel aufgetragen.

3.3.10.5 Klenow-Behandlung

Eine Klenow-Behandlung wurde dann durchgeführt, wenn nach der Spaltung mit Restriktionsenzymen unterschiedliche Einzelstrangüberhänge von Vektor- und Insert-DNA vorhanden waren. Dabei wurden die 5' - 3' Polymerase und die 3' - 5' Exonuklease Aktivitäten der DNA-Polymerase I aus *E.coli* genutzt, um die entstandenen Einzelstrangüberhänge von Vektor- und Insert-DNA zu glätten (5' Überhänge) bzw. abzubauen (3' Überhänge). Dafür wurden zu 5 μg DNA Spaltansatz 1 μl dNTP-Mix (je 2.5 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP) und 0,5 μl Klenow-Polymerase zugegeben. Der Ansatz wurde anschließend bei RT für 30 min inkubiert und nachfolgend wurde das Enzym bei 75°C für 15 min inaktiviert.

3.3.10.6 Phosphorylierung von Nukleinsäuren

Für eine erfolgreiche Klonierung musste eine Phosphorylierung der PCR Produkte durchgeführt werden, die über keine 5' Phosphatgruppe verfügten. Für den 20 μl Reaktionsansatz wurden ca. 5 pmol DNA mit 2 μl mM ATP, 10 U T4 Polynukleotidkinase und Reaktionspuffer gemischt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 70°C für 10 min und eine Klenow-Behandlung (siehe 3.3.10.5)

3.3.10.7 Phosphatase-Behandlung von DNA-Vektoren

Um nach Einsatz von Restriktionsenzymen die Religation des Vektors zu verhindern, wurde eine Phosphatasebehandlung durchgeführt. Dabei macht man sich die Eigenschaften der Calf intestinal Phosphatase (CIP) zunutze. Dieses Enzym ist in der Lage, die Phosphatgruppe am 5' - Ende des Vektors enzymatisch zu entfernen und somit die Rezirkularisierung des Vektors zu verhindern. Für die Reaktion wurde der zuvor mit Restriktionsenzymen gespaltene Ansatz mit 1x CIP-Puffer auf 270 μl aufgefüllt. Nach Zugabe von 1 U CIP wurde der Ansatz für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Enzyminaktivierung erfolgte durch Zugabe von 30 μl 0,1 M EGTA und anschließender Inkubation für 10 min bei 65°C . Die Nukleinsäure wurde anschließend durch Phenolextraktion und Ethanolpräzipitation gereinigt (siehe 3.3.8.2).

3.3.10.8 Ligation

Zur Ligation wurde die T4-DNA Ligase verwendet. Dazu wurden der gespaltene und desphosphorierte Vektor, sowie das zu ligierende DNA-Fragment im Verhältnis von 1:5 in einem 20 μl Ligationsansatz gemischt. Zusätzlich wurden 0,5 U T4-Ligase und 4 μl 5x T4-Ligase-Puffer zugegeben. Der Ligationsansatz wurde anschließend für 10 min bei 37°C , 1h bei RT und über Nacht bei 15°C inkubiert.

3.3.10.9 Herstellung kompetenter Bakterien

Die Herstellung von kompetenten *E.coli* Bakterien erfolgte nach HANAHAN (1983). Zunächst wurde eine 2ml frische Übernachtskultur angezchtet. Von dieser Übernachtskultur wurden 200 μl in einen 10ml Ansatz mit SOB-Medium verimpft und bei 37°C bis zur einer OD_{660} von etwa 0,4 geschüttelt. Dieser Ansatz wurde anschließend in ein Zentrifugenröhrchen überführt, für 10 min auf

Eis gekühlt und für 10 min bei 4000 rpm und 4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Sediment mit 30 ml kaltem TFB resuspendiert. Der Ansatz wurde erneut für 10 min auf Eis gekühlt und anschließend wieder zentrifugiert. Das Sediment wurde nun in 4 ml kaltem TFB aufgenommen und resuspendiert. Anschließend erfolgte eine zweimalige Zugabe von 280µl DMSO und die Kultur wurde jeweils für 15 min auf Eis gekühlt. Der fertige Ansatz wurde nun in 200 µl-Portionen aliquotiert und bei -70° C weggefroren.

3.3.10.10 Transformation kompetenter Bakterien

Für die Transformation wurden die kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde 1-100 ng ligierte Plasmid-DNA zugegeben und der Ansatz 30 min auf Eis gekühlt. Danach erfolgte ein Hitzeschock für 2 min bei 42° C und eine erneute Inkubation für 2 min auf Eis. Nach Zugabe von 800µl SOC-Medium wurde der Ansatz für 1h bei 37° C geschüttelt. Die Suspension wurde 3 min bei 7000 rpm zentrifugiert, der Überstand dekantiert und in 100 µl SOC-Medium resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension auf LB- Agarplatten, welche die den Resistenzgenen der verwendeten Plasmide entsprechenden Antibiotika enthielten, ausplattiert und über Nacht bei 37° C inkubiert. Die so erhaltenen Klone wurden angezogen, die Plasmid-DNA präpariert (siehe 3.3.8.3) und charakterisiert.

3.3.10.11 Herstellung kompetenter Bakterien für Elektroporation

Die Herstellung kompetenter Bakterien für die Elektroporation erfolgte ebenfalls nach HANAHAN (1983). Es wurden 3ml einer frischen Bakterienkultur in 100ml SOA mit 1ml Ampicillin, 100µl Chloroform, 1,2 ml Arabinose versetzt und bei 30° C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8-1 geschüttelt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 4500 rpm für 15 min. Danach wurde das erhaltene Pellet in 25ml 10% Glycerol resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die Waschschrte wurden noch 2x durchgeführt und dabei das Volumen des zur Resuspendierung verwendeten 10% Glycerols jedes Mal verringert, so dass das Pellet zum Schluss in 450µl 10% Glycerol aufgenommen wurde und 50µl Aliquots bei -70° C zur weiteren Lagerung eingefroren wurden.

3.3.10.12 Transformation elektrokompenter Bakterien

Zunächst wurde eine Elektroporationsküvette auf Eis vorgekühlt. Die elektrokompenten Bakterien (siehe 3.3.10.11) wurden ebenfalls auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 5 µl der zu transformierenden DNA zugegeben und der komplette Ansatz in die Küvette verbracht und durch einen elektrischen Schock (1250 V, 25 µF, 200 Ω, 5 ms) transformiert. Die Küvette wurde mit 800 µl SOC gespült und dieses Gemisch in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 37° C geschüttelt. Von diesem Ansatz wurden 50µl direkt auf die vorbereiteten Agarplatten, welche die den Resistenzgenen der verwendeten Plasmide entsprechenden Antibiotika enthielten, ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Der restliche Ansatz wurde 3 min bei 5000 rpm zentrifugiert, der Überstand dekantiert und in 100µl SOC resuspendiert. Auf einer zweiten Platte wurden diese Bakterien dann ebenfalls ausplattiert.

3.3.11 Herstellung und Charakterisierung von rekombinanten Viren

3.3.11.1 BAC-Mutagenese

Zur Herstellung von rekombinanten HSV-1 Viren wurde die Technologie der BAC (*bacterial artificial chromosome*) - Mutagenese genutzt. Diese Technik ermöglicht die gezielte Mutagenisierung des herpesviralen Genoms in einem prokaryotischen System. Für diese Arbeit wurde zur Mutagenisierung das RecET System, welches auch als *Red* Rekombinasessystem

bekannt ist, genutzt (WAGNER et al. 2004). Bei diesem System liegt das gesamte herpesvirale Genom als *bacterial artificial chromosome* in *E.coli* vor und kann beliebig in Bakterien vermehrt und mutagenisiert werden.

Für die Herstellung von HSV-1 17 Deletionsmutanten wurde der virale BAC von GIERASCH et al. (2006) verwendet. Hierbei war die BAC-Kassette zwischen der Genregion von UL37 und UL 38 integriert und von loxP Stellen flankiert. Für die Generierung der verschiedenen HSV-1 Deletionsmutanten wurden zunächst Plasmide konstruiert, welche die gewünschte Deletion im gewünschten Genabschnitt enthielten. Dazu wurde das zu deletierende Gen durch ein von *FLP recognition target* (FRT) Sequenzen flankiertes Kanamycin-Resistenzgen (Km^R) aus pKD 13 ersetzt (DATSENKO et al. 2000). Anschließend wurde dieser Bereich mittels PCR amplifiziert und mit Hilfe der Elektroporation in die HSV-1 BAC tragenden Bakterien transformiert. Zuvor wurde in die elektrokompenten HSV-1 BAC tragenden Bakterien bereits das Helferplasmid pKD46 eingebracht, welches die *Red* Rekombinase des Bakteriophagen λ unter Kontrolle eines Arabinose-induzierbaren Promoter (P_{Ara}) codiert. Dieses Helferplasmid diente der Vermittlung einer effizienten homologen Rekombination der Virussequenzen. Nach der Transformation konnten rekombinante Klone durch die Resistenz gegenüber Chloramphenicol (vermittelt durch den HSV-1 BAC) und Kanamycin selektiert werden. Zur anschließenden Entfernung der Kanamycinkassette wurde pCP20 (CHERPANOW und WACKERNAGEL 1995), welches für die *FRT-site* spezifische *FLP-Rekombinase* codiert, als weiteres Helferplasmid genutzt. Die *FRT site* spezifischen Überhänge blieben allerdings bestehen. Durch eine anschließende Selektion mit Chloramphenicol konnten rekombinante Bakterien selektiert werden. Eine Eliminierung der Helferplasmide erfolgte durch die entsprechende Anpassung der Kulturbedingungen, da beide Helferplasmide eine Temperatursensitivität bei 30°C aufweisen. Bei den jeweiligen Zwischenschritten der Mutagenese wurde die genomische DNA mit Hilfe von Southern Blot Hybridisierung (siehe 3.3.8.5) und Sequenzierung (siehe 3.3.8.6) überprüft. Anschließend folgten weitere Schritte zur Entfernung der BAC Kassette. Zunächst wurde die BAC-DNA aus den Bakterien isoliert und Verozellen damit transfiziert. Es folgte eine Cotransfektion mit dem Plasmid pMC-Cre, welches für die *Cre* Rekombinase codierte. Durch homologe Rekombination unter Verwendung des *Cre/loxP-Systems* konnte die BAC-Kassette entfernt werden. Die transfizierten Zellen wurden bis zur Ausbildung eines CPE inkubiert. Die erfolgreiche homologe Rekombination zeigte sich durch das Ausbleiben der Fluoreszenz infolge der fehlenden BAC-Kassette. Zur Selektion und Aufreinigung wurden anschließend Plaquetests auf Verozellen durchgeführt und nicht fluoreszierende Einzelplaques isoliert. Es folgten mehrere Plaquareinigungen. Die erhaltenen rekombinanten Viren wurden durch Restriktionsanalysen (siehe 3.3.10.1) und Southern Blot Hybridisierung (siehe 3.3.8.5) überprüft und anschließend funktionell charakterisiert.

3.3.11.2 Transfektion eukaryontischer Zellen

3.3.11.2.1 Calcium-Phosphat-Präzipitation

Für die Transfektion wird die verwendete DNA mit einer Calciumchlorid-Natriumphosphat-Lösung gemischt. Sie heftet sich dabei an das präzipitierende Calciumphosphat an, welches phagozytotisch von den Zellen aufgenommen werden kann (GRAHAM und VAN DER EB 1973). Für eine Co-Transfektion wurden 5- 10 μ g Virus DNA und 2 μ g Plasmid DNA zu einem Volumen von 438 μ l in 10 mM TrisHCl Lösung verdünnt und 62 μ l 2M $CaCl_2$ und 500 μ l 2x HBS tröpfchenweise zugegeben. Der Ansatz wurde 30 min bei RT inkubiert und nach einem Mediumwechsel auf die verwendeten subkonfluenten Zellen gegeben. Es folgte eine Inkubation

bei 37° C für 4h und anschließend ein Glycerolschock. Dabei wurde das Transfektionsgemisch abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Nach Zugabe der frisch hergestellten Glycerolschocklösung aus 15% Glycerollösung in 1x HBS für 2 min folgten wiederum zwei Waschschrte mit PBS und Zugabe von ZB5b Medium. Die Zellen wurden anschließend bei 37° C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden ein Mediumwechsel und eine lichtmikroskopische Kontrolle der Zellen durchgeführt.

3.3.11.2.2 FuGENE® HD Transfection Reagent

Beim kommerziell erhältlichen FUGENE® HD Transfection Reagent (Roche) handelt es sich um ein nicht-liposomales Multikomponentenreagenz, welches sich durch hohe Stabilität und geringe Zytotoxizität auszeichnet. Für den Transfektionsansatz wurden 3 µl FuGENE Reagenz pro µg DNA direkt in 100µl Opti-MEM® (Invitrogen) Medium gegeben. Nach Zugabe der eingesetzten DNA wurde der Ansatz vorsichtig gemischt und 30 min bei RT inkubiert. Die verwendeten subkonfluenten Zellen wurden einmal mit ZB5b gewaschen und der Transfektionsmix tropfenweise über die Zellen verteilt. Die Zellen wurden bei 37° C und 5 % CO₂ über Nacht inkubiert, am nächsten Tag lichtmikroskopisch kontrolliert und ein Mediumwechsel mit ZB5b durchgeführt.

3.3.11.3 Plaquereinigung

Für die Selektion genetisch homogener rekombinanter Viren wurde eine Plaquereinigung durchgeführt. Dazu wurde eine konfluente 6 Well-Mikrotiterplatte mit 500µl der jeweiligen Virussuspension infiziert und für 1h bei RT geschwenkt. Danach wurde der Überstand abgesaugt und durch 2ml Methocel-Medium ersetzt. Nach 2-3 Tagen Inkubation bei 37° C und 2,5 % CO₂ wurden die Kulturen entweder lichtmikroskopisch oder fluoreszenzmikroskopisch überprüft und Einzelplaques markiert. Diese wurden unter sterilen Bedingungen gepickt und in ZB5b Medium aufgenommen. Die verdünnten Viren wurden für eine erneute Infektion verwendet. Dieser Vorgang wurde bis zu 3x wiederholt.

3.3.11.4 Ein-Stufen-Wachstumskinetik

Permanente Zelllinien

Für die Charakterisierung von Viren wurden Ein-Schritt-Wachstumskinetiken erstellt. Dazu wurden Verozellen auf 24 Well-Mikrotiterplatten ausgesät und diese konfluenten Platten 20 min auf Eis vorgekühlt. Anschließend wurden die Platten mit einer MOI von 5 infiziert und 1h bei 0° C inkubiert. Dieser Schritt diente der Virusadsorption. Nach einer Stunde wurde das Inokulum abgesaugt, vorgewärmtes Medium auf die Zellen gegeben und die infizierten Platten 1h bei 37° C inkubiert, um eine synchrone Infektion zu gewährleisten. Danach erfolgte ein zweiminütiger Citratschock mit CBS (pH 3,0), um ungebundene und nicht penetrierende Virionen zu inaktivieren. Nach mehreren Waschungen mit PBS wurden die Zellen mit ZB 5b Medium überschichtet und bei 37° C inkubiert. 0h, 6h, 12h, 24, 36h und 48h nach Infektion wurden die Zellen mit Überstand geerntet und bei -70° C eingefroren. Nach einmaligem Auftauen bei 37° C wurden anschließend die Virustiter im Plaquetest bestimmt (siehe 3.3.7.2).

Primäre Rattenneuronen

Für die Analyse der Ein-Schritt-Wachstumskinetik auf primären Rattenneuronen wurde das obengenannte Protokoll auf die empfindlichen Primärzellkulturen angepasst. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Ein-Schritt-Wachstumskinetiken auf Neuronen aus Spinalganglien erstellt. Die präparierten Spinalganglien wurden in 24 Vertiefungen einer 48 Well-Mikrotiterplatte kultiviert

(siehe 3.3.2.1.2). Anschließend erfolgte die Infektion mit 1ml einer Virussuspension mit 1×10^6 pfu/ml und Inkubation von 1 h bei 37 ° C. Nach der Inkubation wurde das Inokulum vorsichtig entfernt und danach für 1 min ein Citratschock mit CBS (pH 3,0) durchgeführt. Anschließend erfolgten 2 Waschungen mit PBS und Zugabe von vorgewärmtem Neuronenmedium. Wie auch zuvor wurde 0h, 6h, 12h, 24h, 36h und 48h nach Infektion Zellen und Überstand vorsichtig geerntet und bei -70° C eingefroren. Nach einmaligem Auftauen bei 37° C wurden anschließend die Virustiter im Plaquetest bestimmt (siehe 3.3.7.2).

3.3.11.5 Plaquetestbestimmung

Für die Plaquetestbestimmung wurden 50 Einzelplaques lichtmikroskopisch vermessen und der Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet. Die Auswertungen erfolgten an drei unabhängig ausgeführten Experimenten. Bei der Charakterisierung von rekombinanten Viren wurde immer als Standard der jeweilige Wildtyp mitgeführt.

3.3.12 Proteinnachweis

3.3.12.1 Western-Blot

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um Proteine anhand ihres Molekulargewichts elektrophoretisch aufzutrennen, wurde die eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet. Die vertikale Elektrophorese erfolgte in denaturierenden, diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen (LAEMMLI, 1970). Dazu wurde zuerst ein ca. 1mm dickes Trenngel gegossen, welches in Abhängigkeit von der Größe des Proteins zwischen 7,5 und 15 % Acrylamid enthielt. Anschließend wurde das Gel nach Polymerisierung mit einem ca. 2cm hohen niederprozentigen Sammelgel (3% Polyacrylamid) überschichtet. Zur Formung von Geltaschen wurde zusätzlich ein Kamm ins Gel eingebracht. Nach der Polymerisierung wurde der Kamm entfernt und die entstandenen Geltaschen wurden gründlich mit Wasser gespült. Die Gele wurde in eine vorgefertigte Gelapparatur (Bio-Rad) eingesetzt und mit SDS-Gelelektrophoresepuffer überschichtet. Die zu untersuchenden Proben wurden mit SDS-Probenpuffer resuspendiert, für 5 min bei 95° C denaturiert und für 5 min bei 13200 rpm zentrifugiert. Die Proben und ein zum Abschätzen des Molekulargewichts verwendeter Größenstandard wurden anschließend auf die vorbereiteten Gele aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in SDS-Elektrophoresepuffer bei konstant 200 V für etwa 45 min. Die Auftrennung größerer Proteinmengen wurde in großen präparativen Gelen bei 10 mA über Nacht durchgeführt.

Protein Transfer mit Hilfe des Semi-Dry-Blot Verfahrens

Nach der elektrophoretischen Auftrennung erfolgte der Proteintransfer. Dafür wurde eine Semi-Dry-Blotter (Bio-Rad) verwendet. Auf die Elektrodenplatte des Gerätes wurden zunächst 5 in Transferpuffer getränkte Filterpapiere gelegt. Darauf wurde die Nitrozellulosemembran platziert, welche ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert wurde. Anschließend folgten das Gel und 5 weitere in Transferpuffer getränkte Filterpapiere. Der Transfer erfolgte für 120 min bei 25 V. Nach dem Transfer wurde die Konstruktion abgebaut. Die Banden der vorgefärbten Markerproteine konnten eindeutig auf der Nitrozellulosemembran zugeordnet werden und wurden gekennzeichnet. Die Membran wurde für weitere Schritte zunächst in TBS-T Puffer eingelegt und anschließend weiter verwendet.

Inkubation mit Antiserum und Chemilumineszenz-Nachweisreaktion

Die Nitrozellulosemembran wurde zunächst für 1h in TBS-T mit 5% (w/v) Magermilchpulver und 3% (s/v) BSA eingelegt und bei RT geschwenkt. Damit wurden unspezifische Proteinbindungsstellen blockiert und die Membran auf die Inkubation mit dem gewünschten Antiserum vorbereitet. Nach der Blockierung folgte dann die Inkubation mit dem gewünschten Antiserum für 1h bei RT. Die Antiseren wurden hierfür in TBS-T Puffer mit 0,5% (w/v) Magermilchpulver und 0,3% (w/v) BSA verdünnt. Es wurden Verdünnungen zwischen 1:1000 - 1:10000 verwendet. Anschließend erfolgten 3 Waschschrte mit TBS-T Puffer für jeweils 10 min und die Inkubation mit einem Peroxidase-konjugierten, speziesspezifischen Sekundärintiserum für 30 min bei RT. Das Sekundärintiserum wurde 1:20000 verdünnt. Nach 5 weiteren Waschschrten mit TBS-T Puffer erfolgte der Nachweis der gebundenen Peroxidase mit dem Super Signal® West Pico Chemiluminescent Kit, welches nach Herstellerangaben verwendet wurde. Für die Dokumentation wurde ein Chemiluminator (Bio-Rad) verwendet. Die apparenten Massen der detektierten Proteine wurden anhand der Markerbanden bestimmt.

3.3.12.2 Coomassie-Färbung

Die aus der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese gewonnenen Trenngele wurden für 20 min in Coomassie Färbelösung I gefärbt. Nach Dekantierung der Färbelösung wurden die Gele jeweils für 30 min in SDS-Polyacrylamidgel-Fixierer mehrmals gewaschen bis nur noch die gefärbten Proteinbanden sichtbar waren. Anschließend wurden die Gele ausgewertet. Für eine spätere Erhaltung wurden die Gele auf Filterpapier gelegt und anschließend 40 min bei 80° C unter Vakuum (Geltrocknungs-Apparatur) getrocknet.

Bei der Elution von bakteriellen Fusionsproteinen aus präparativen Polyacrylamidgelen wurde zur Färbung Coomassie-Lösung II und zur Entfärbung 30% Methanol verwendet. Dies sollte zur einer effizienteren Proteinelution beitragen.

3.3.12.3 Indirekter Immunfluoreszenztest

Für diese Arbeit wurden indirekte Immunfluoreszenztests sowohl an infizierten permanenten Zelllinien wie RK-13 und Vero, als auch an primären Rattenneuronen durchgeführt. Die Auswertung erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop Nikon Eclipse Ti-S. Es wurden Aufnahmen im Ein- und Mehrkanalmodus erstellt. Beim Mehrkanalmodus werden mehrere Aufnahmekanäle zusammengeschaltet und parallel dargestellt.

Permanente Zelllinien

Die infizierten Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend mit 3% Paraformaldehyd (PFA) in TBS-T Puffer für 20 min fixiert. Danach wurden die Zellen gewaschen und für 1h mit dem Primärintiserum inkubiert. Nach 3-maligem Waschen mit TBS-T wurde die Kultur mit dem Sekundärintiserum für 30 min im Dunkeln inkubiert und wiederum 3x mit TBS-T Puffer gewaschen. Zur Fluoreszenzerhaltung wurden die Zellen mit DABCO überschichtet und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

Primäre Rattenneuronen

Die infizierten und nicht infizierten primären Rattenneuronen wurden zunächst mit PBS einmal gewaschen und anschließend mit 3,2% Paraformaldehyd in PBS für 1h bei RT fixiert. Die Fixierlösung wurde dazu vorsichtig entfernt und die Kulturen 3x mit 3% BSA in PBS gewaschen. Zur Permeabilisierung wurde mit 0,5% Saponin/3%BSA in PBS für 10 min bei RT inkubiert.

Anschließend erfolgte die Zugabe des Primärantiseraums verdünnt in PBS/BSA/SAP und eine Inkubation für 1h bei RT. Nach Entfernung des Primärantiseraums und 3 Waschschritten mit PBS wurden die Kulturen erneut im Dunkeln mit dem Sekundärantiserum für eine 1h bei RT inkubiert. Das Sekundärantiserum wurde anschließend entfernt und die Kulturen 3x mit PBS gewaschen und anschließend mit Aqua dest. überschichtet. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop.

3.3.13 Herstellung monospezifischer Antiseren

Die Herstellung monospezifischer Antiseren wurde für die weitere Charakterisierung von viralen Genprodukten benötigt. Dazu wurde zuerst das zu untersuchende Protein in *E.coli* als Fusionsprotein exprimiert und gereinigt. Anschließend wurde es für die Immunsierung eines Kaninchens verwendet und das Antiserum gewonnen (FUCHS et al. 2002a). Die so hergestellten monospezifischen Antiseren standen dann für weitere Analysen zur Verfügung.

3.3.13.1 Expression bakterieller Fusionsproteine

Die benötigten heterologen Proteine wurden als Fusionsproteine in *E.coli* mit Hilfe der Glutathion-S-Transferase (GST; 220 Aminosäuren) aus *Schistosoma japonicum* exprimiert. Dazu wurde das verwendete Gen im Leseraster in den verwendeten pGEX-4T-1 Expressionsvektor kloniert. Die Expression erfolgte unter der Kontrolle des hybriden *tac*-Promotors. Dieser ist durch Glucose reprimierbar und durch IPTG induzierbar. Zur Vermehrung der pGEX-Expressionsplasmide wurden Bakterien des *E.coli* Stammes XL1Blue MRF' verwendet. Eine frische Übernachtskultur wurde bei einer OD_{660nm} von 0,2 in 50 ml YT-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 1% Glucose verimpft und bis zur einer OD_{660nm} von 0,6 - 0,8 bei 37° C geschüttelt. Anschließend wurde der Ansatz für 10 min bei 3500 rpm zentrifugiert, sedimentiert und im gleichen Volumen glukosefreien Mediums resuspendiert. Danach erfolgte die Induktion der Expression durch Zugabe von 1mM IPTG. Nach einer Inkubation von 3-5 h bei 37° C wurden die Proben erneut bei 6000 rpm für 10 min zentrifugiert und das Bakteriensediment bei -20° C gelagert. Die Expression wurde durch Entnahme von 1 ml Proben kurz vor der Induktion und jeweils stündlich danach kontrolliert. Die Proben wurden zentrifugiert und in SDS-Probenpuffer (10 µl pro 0,1 OD_{660nm}) lysiert. Die erhaltenen Proben wurden anschließend im Western Blot (siehe 3.3.12.1) und nach Comassie-Färbung (siehe 3.3.12.2) analysiert.

3.3.13.2 Elektroelution der Fusionsproteine

Für die Elektroelution wurden die Proteine zunächst aus den Bakterien isoliert. Dazu wurden die sedimentierten Bakterien einer 50 ml Kultur in 2 ml SDS-Probenpuffer lysiert und in präparativen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Anschließend wurde eine Coomassie-Färbung (siehe 3.3.12.2) der Gele durchgeführt und die erwartete Bande des Fusionsproteins ausgeschnitten. Zur Elektroelution wurde eine Centrilon-Kammer vorbereitet und mit Elutionspuffer befüllt. Anschließend wurden die ausgeschnittenen Gelstücke in Ultrafiltrations-Gefäße gesteckt und diese in die gefüllte Centrilon-Kammer verbracht. Die Elektroelution erfolgte über Nacht bei 30 V. Danach wurden die Gelstücke entfernt und die Eluate in den Ultrafiltrations-Gefäßen durch Zentrifugation bei 6000 rpm auf ein Volumen von ca. 50µl eingengt. Anschließend erfolgten zwei Waschschrritte mit je 2ml PBS und erneuter Zentrifugation zur Einengung. Der Proteingehalt wurde bestimmt (siehe 3.3.13.3) und das Eluat bei -20° C gelagert.

3.3.13.3 Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration von Lösungen wurde mit Hilfe des „Bicinchoninat“-Proteinassay (STOSCHEK. 1990) durchgeführt. Dafür wurden 1 - 20µl der zu

untersuchenden Probe mit 1 ml BCA-Lösung gemischt und 30 min bei 60° C inkubiert. Die Extinktion der Lösungen wurden photometrisch bei 562 nm bestimmt und anschließend die Proteinkonzentration ermittelt. Dazu wurde eine mit 0-20 µg BSA erstellte Eichgerade verwendet.

3.3.13.4 Kaninchenimmunisierung

Zur Gewinnung der monospezifischen Antiseren wurden Kaninchen immunisiert. Beginnend mit der ersten Immunisierung wurden 100µg des gereinigten Proteins in 500µl PBS mit 500µl Freundschem Adjuvans emulgiert und intramuskulär injiziert. Danach erfolgten weitere Immunisierungen zunächst nach 6 Wochen und anschließend im vierwöchigem Rhythmus. Es wurde jeweils die gleiche Proteinmenge mit inkomplettem Freundschem Adjuvans appliziert. 3 Wochen nach jeder durchgeführten Immunisierung wurde die Immunantwort kontrolliert. Dazu wurden den Kaninchen ca. 10 ml Blut aus der Ohrvene entnommen. Zur Gewinnung des Serums mussten die gewonnenen Blutproben zunächst 1h bei RT und weiter über Nacht bei 4° C gerinnen. Anschließend wurde das geronnene Blut für 10 min bei 3000rpm zentrifugiert und für 30 min bei 56° C zur Inaktivierung der Komplementreaktion inkubiert. Mit Hilfe von Western-Blot-Analysen wurde das Serum auf seine Aktivität hin analysiert. Wenn innerhalb des Immunisierungszeitraumes keine weiteren Steigerungen der spezifischen Reaktionen erreichbar waren, wurden die Kaninchen narkotisiert und anschließend entblutet. Dafür wurde eine Injektionsnarkose mit 30mg/kg Ketamin und 5mg/kg Rompun verwendet. Das Serum wurde wie oben beschrieben aufgearbeitet und portionsweise bei -20° C gelagert. Das so gewonnene Antiserum

4 Ergebnisse

4.1 Neuronenkultivierung

Für die Analysen des anterograden intraaxonalen Transports von PrV und HSV-1 mussten zunächst primäre Neuronenzellkulturen generiert und etabliert werden. Es wurden primäre Neuronenkulturen aus dem oberen Cervikalganglion und aus Spinalganglien verwendet.

4.1.1 Kultivierung des oberen Cervikalganglions

Die Kultivierung des oberen Cervikalganglions wurde wie beschrieben, durchgeführt (MARESCH. 2010, MARESCH et al. 2010, CH'NG et al. 2005). Dabei musste besonders auf eine saubere Präparation geachtet werden. Das obere Cervikalganglion ist sehr nah am *Ganglion distale (nodosum)* lokalisiert. Eine eindeutige morphologische Unterscheidung der beiden Ganglien ist während der Präparation trotz der Verwendung eines Stereomikroskops nicht immer genau möglich (CH'NG et al. 2005). Das benachbarte *Ganglion distale (nodosum)* ist aber für eine primäre Neuronenzellkultur nicht zu verwenden. Die falsch gewonnenen Präparate wurden 24h nach der Präparation aussortiert, da sie eindeutig lichtmikroskopisch am fehlenden Auswachsen der Axone zu erkennen waren.

Nach erfolgreicher Kultivierung wurden die Neuronenkulturen des oberen Cervikalganglions besonders für elektronenmikroskopische Analysen verwendet. Hierfür wurden die Ganglien als Explantate kultiviert (siehe 4.2). Eine Behandlung mit Ara-C (siehe 4.1.2) wurde nicht etabliert, da das Wachstum der Explantate durch Gliazellen nicht behindert wurde und elektronenmikroskopisch eindeutig der Unterschied zwischen neuronalen Strukturen wie z.B. Axone und Wachstumskegel und nicht neuronalen Strukturen dargestellt werden konnte. Aber auch für die Live-Cell-Imaging Analysen wurden die Kulturen des oberen Cervikalganglions verwendet. Hierfür wurden die Kulturen genauso wie die Kulturen der Spinalganglien mit Ara-C behandelt (siehe 4.1.2.).

4.1.2 Kultivierung von Spinalganglien

Die Kultivierung von Spinalganglien erfolgte parallel zur Kultivierung des oberen Zervikalganglions. Es wurde eine Kultivierungsmethode nach BURKEY et al. (2004) gewählt. Durch die Kultivierung von Spinalganglien konnten die gewonnenen Rattenembryonen effizienter verwertet und parallele Analysen des intraaxonalen anterograden Transportes bei PrV und HSV-1 durchgeführt werden. Durch die parallele Verwendung der Embryonen von denen der Kopf für die Präparation des oberen Cervikalganglions und der Torso für die Präparation der Spinalganglien genutzt wurde, konnte die Anzahl der benötigten Versuchstiere deutlich gesenkt werden. Zusätzlich bestand so die Möglichkeit, vergleichende Analysen in zwei unterschiedlichen neuronalen Systemen durchzuführen, ohne eine höhere Versuchstieranzahl zu benötigen. Ein weiterer Vorteil gegenüber der Kultivierung des oberen Cervikalganglions lag in der schnelleren und saubereren Präparation. Durch die eindeutige Lokalisierung der Spinalganglien waren die gewonnenen Kulturen weniger verunreinigt. Eine Co-Lokalisierung mit anderen Ganglien, wie beim oberen Cervikalganglion mit dem *Ganglion distale (nodosum)* (CH'NG et al. 2005), lag nicht vor. In dieser Arbeit wurden die kultivierten dissoziierten Spinalganglien insbesondere für die Analysen im modifizierten Drei-Kammer-System (siehe 4.3) und für Ein-Schritt-Wachstumskinetiken (siehe 4.3.3) benutzt. Für das Explantatsystem sind diese primären Zellkulturen eher ungeeignet.

Nach der Präparation und Kultivierung wurde eine zusätzliche Behandlung mit β -D-Arabinofuranosylcytosine (Ara-C) etabliert. Ara-C ist ein antimetabolisch wirkendes Cytostatikum, welches insbesondere in der Krebstherapie bei Leukämie eingesetzt wird. Die Wirkung beruht auf einer Hemmung der DNA-Synthese. Nach der Phosphorylierung zu den aktiven Metaboliten Ara-C-Diphosphat und anschließend Ara-C-Triphosphat wird dieser aktive Metabolit bei der DNA Synthese anstelle des Cytosintriphosphats eingebaut und führt zu einer gleichzeitigen Hemmung der DNA-Polymerase (ZURBON. 2003). Als Folge stirbt die sich teilende Zelle ab. Die gewonnenen Ganglien sind umgeben von Gliazellen, welche Stützfunktionen und stoffwechselaktive Aufgaben der Nervenzellen übernehmen. Sie werden auch als Stütz- und Ammenzellen der Nervenzellen bezeichnet. Im Gegensatz zu den Nervenzellen, welche als postmitotische, nicht teilungsfähige Zellen vorliegen, sind die Gliazellen in der Lage, Mitose durchzuführen. Bei der Präparation ist es nicht möglich, ausschließlich Neuronen zu gewinnen. Die mitgewonnenen Gliazellen führen zu einem schlechten Auswachsen der Neuronen und zu einem Überwuchern der Kulturen. Durch den zugegebenen Nerv Growth Factor (NGF) sind die Gliazellen darüberhinaus in der Lage, ein Aussehen ähnlich Nervenzellen anzunehmen und die Differenzierung zwischen Neuronen und Gliazellen zu erschweren. Daher wurden die generierten Kulturen 24 h nach der Präparation mit Ara-C behandelt. Nach 4 Stunden Inkubationsdauer wurde das Cytostatikum wieder entfernt. Die mitotischen Gliazellen starben ab, während die Nervenzellen weiter auswuchsen (siehe Abb. 5). In besonderen Fällen wurde diese Behandlung nach 3 Tagen erneut durchgeführt.

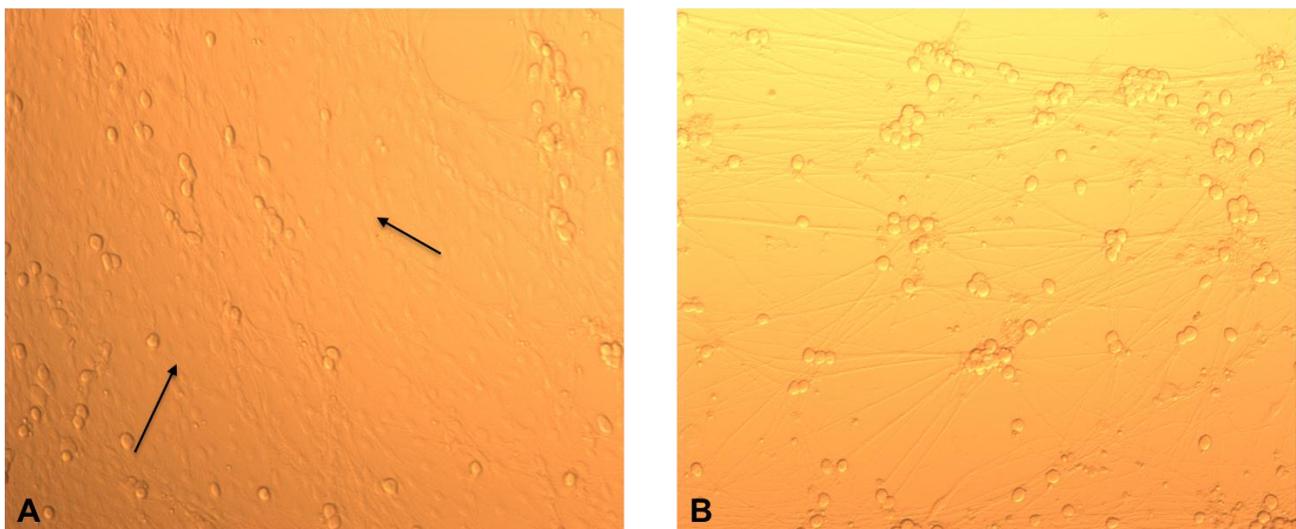


Abb. 5: Lichtmikroskopische Aufnahmen von dissoziierten kultivierten Spinalganglien vor (A) und nach (B) einer Behandlung mit Ara-C. In den unbehandelten Kulturen (A) sind zunächst deutlich Überwucherungen von Gliazellen zu erkennen (schwarzer Pfeil). Neuronale Strukturen der Spinalganglien lassen sich nur erahnen. Nach der Behandlung mit Ara-C (B) wird das ausgeprägte Wachstum der Neuronen deutlich sichtbar (A und B, x100).

Anschließend wurden die Neuronen lichtmikroskopisch, fluoreszenzmikroskopisch und elektronenmikroskopisch auf ihre Beschaffenheit hin untersucht. Lichtmikroskopisch ist deutlich die typische Morphologie der Neuronen zu erkennen. Nervenzellen bestehen strukturell aus einem Perikaryon, Dendriten, Axonen und Synapsen, welche unter in vitro Kulturbedingungen zunächst als Wachstumskegel des ausprossenden Axons zu erkennen sind. Diese Strukturen ließen sich morphologisch eindeutig identifizieren. Für eine weitere Kontrolle wurden die dissoziierten Spinalganglien mit einem spezifischen Neuronenmarker (β -III-Tubulin) im Immunfluoreszenztest

dargestellt und ausgewertet. Zunächst wurden Aufnahmen von ungerichteten dissoziierten Spinalganglien erstellt (Abb. 6). Im weiteren Verlauf wurden auch Aufnahmen von Neuronen im modifizierten Drei-Kammer-Modell erstellt (siehe 4.3). Auch elektronenmikroskopisch wurden zunächst nicht infizierte dissoziierte Spinalganglien auf eine charakteristische Neuronenmorphologie hin untersucht, bevor Infektionsexperimente durchgeführt werden konnten (siehe 4.3.1.1).

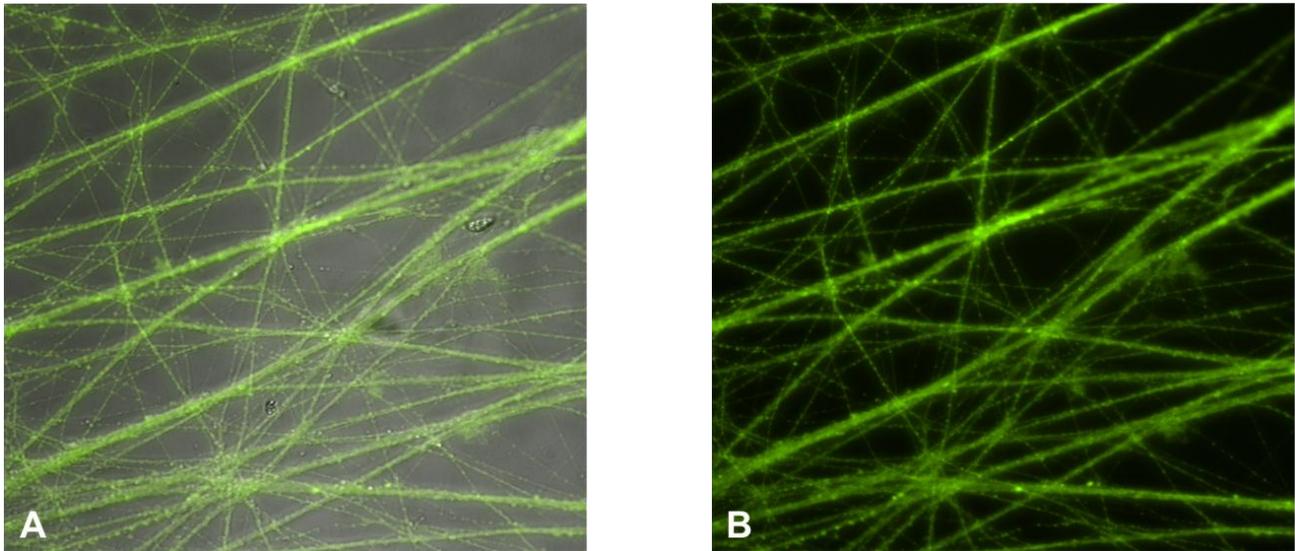


Abb. 6: **Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von dissoziierten Spinalganglien angefärbt mit dem spezifischen Neuronenmarker β -III-Tubulin.** Darstellung im Mehrkanalmodus (A) und Einkanalmodus (B) (A und B, x400)

4.2 Infektionsexperimente in Explantaten und ultrastrukturelle Analyse

Ein Problem der bisherigen Analysen zum anterograden intraaxonalen Transport war die schlechte Vergleichbarkeit der einzelnen verwendeten Analysesysteme. In der Vergangenheit wurden unterschiedliche Untersuchungssysteme mit verschiedenen eingesetzten HSV-1 Stämmen verwendet (KRATCHMAROV et al. 2012). Zusammenfassend zeigten sich bei einer Vielzahl von unterschiedlichen Analysen deutliche Unterschiede im Replikationsverhalten und beim anterograden intraaxonalen Transport der HSV-1 Partikel. Das in dieser Arbeit verwendete einheitliche Analysesystem sollte zum ersten Mal einen direkten Vergleich zwischen PrV und 4 verschiedenen HSV-1 Stämmen ermöglichen. Die Infektionsexperimente wurden mit Explantaten aus dem oberen Cervikalganglion durchgeführt. Die Explantate wurden aus 15 Tage alten Rattenembryonen gewonnen und kultiviert (siehe 4.1.1). Nach einer lichtmikroskopischen Überprüfung auf Wachstum, Verunreinigung und der allgemeinen Beschaffenheit der Kulturen wurden die Explantate mit dem jeweiligen zu untersuchenden Virusstamm mit einem Virustiter von 1×10^5 pfu/ml, verdünnt in Neuronenmedium, infiziert und zwischen 16 und 20 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte die Aufarbeitung und die elektronenmikroskopische Analyse im Labor für Elektronenmikroskopie von Herrn Dr. habil. H. Granzow (siehe Abb. 7).

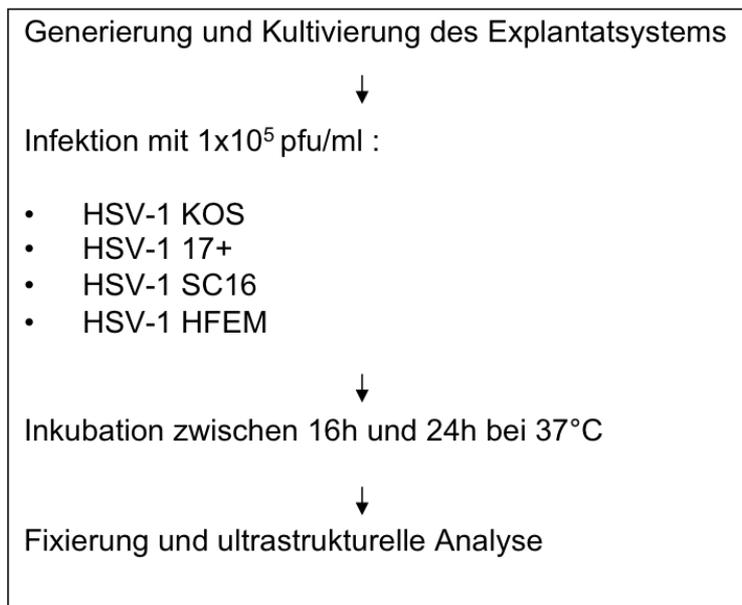


Abb. 7: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus

4.2.1 Infektion mit PrV Kaplan

Die Infektion mit dem Wildtypstamm PrV Kaplan wurde im Rahmen einer Dissertation am FLI bereits durchgeführt (MARESCH. 2010). So wurden beim intraaxonalen Transport überwiegend umhüllte Virionen in Vesikeln detektiert. Diese waren perlenschnurartig entlang des Axons aufgereiht und mikrotubuliassoziiert. Die zusätzliche Verwendung einer gB-negativen PrV Mutante bestätigte die Analyse. Auch hier wurden überwiegend umhüllte Vironen in Vesikeln detektiert. Nach Quantifizierung der beobachteten Partikel zeigte sich, dass 90% als behüllte Virionen in Vesikeln und nur 10% als nackte Kapside vorlagen. Auch wurde in Kinetikstudien der optimale Infektionszeitraum für die Beobachtung des intraaxonalen Transportes bestimmt. An diesem Wert orientierten sich die nachfolgend in dieser Arbeit durchgeführten vergleichenden Experimente mit den 4 verschiedenen HSV-1 Stämmen.

4.2.2 Infektion mit HSV-1 HFEM

Für die Infektion wurde der HSV-1 Stamm HFEM verwendet. Als Besonderheit weist dieser Stamm eine Mutation in der long terminal repeat Region auf, die zur Eliminierung einer Kopie des latenz-assoziierten Gens führt (SPIVACK et al. 1987). Auswirkungen auf die Neuroinvasion konnten aber nicht gezeigt werden, so dass dieser Stamm für Transportanalysen verwendet werden konnte. Die Infektion wurde wie beschrieben durchgeführt und anschließend elektronenmikroskopisch ausgewertet. Zunächst wurde die Infektion im Zellkörper der Neuronen überprüft. Im Zellkörper konnten alle Stadien der Replikation nachgewiesen werden wie z.B. die primäre Umhüllung an der inneren Kernmembran, sowie die sekundäre Umhüllung im Cytosol. Daher konnte von einer produktiven Infektion in den neuronalen Explantaten ausgegangen werden. Anschließend erfolgte die Auswertung des intraaxonalen Transports. Es waren Viruspartikel sowohl in Axonen als auch in den jeweiligen Wachstumskegeln (*engl.: Growth Cones*), den Synapsen ähnlichen Strukturen, zu erkennen. Vorwiegend konnten, wie auch schon bei der Infektion von PrV Kaplan beschrieben, weitestgehend behüllte Virionen in Vesikeln detektiert werden. Aber auch nackte Kapside konnten vereinzelt beobachtet werden. Von 3 unabhängig durchgeführten Experimenten wurden 48 Ultradünnschnitte ausgewertet und quantifiziert. Es wurden 140 Viruspartikel in Axonen und Wachstumskegeln detektiert. Davon waren 101 (72%) der Partikel behüllte Virionen in Vesikeln

und 39 (28%) nackte Kapside. Dieser Eindruck verstärkte sich mit voranschreitender Infektion. Anders als bisher vermutet, wurden hier vermehrt komplett behüllte Viren nachgewiesen (siehe Abb. 8).

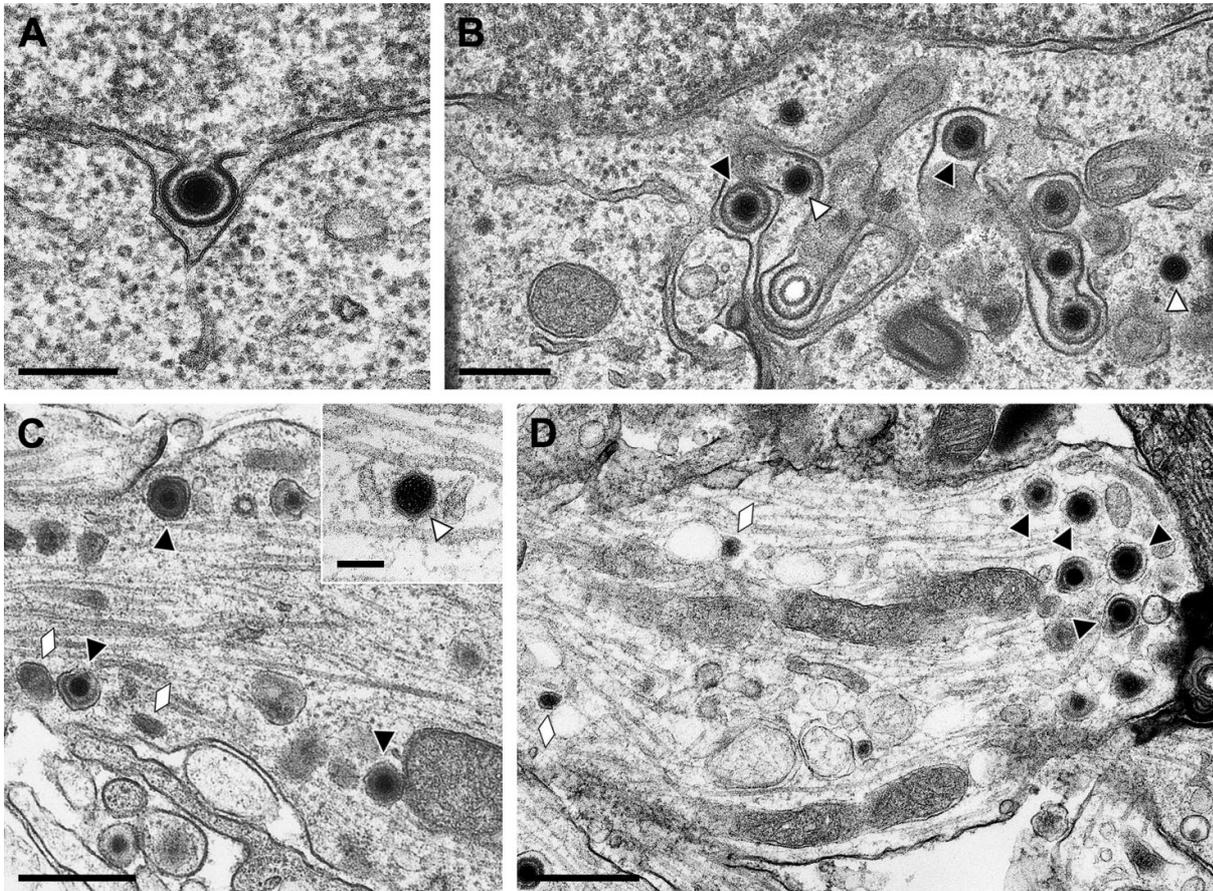


Abb. 8: **Ultrastrukturelle Analyse von primären Ratteneuronen infiziert mit HSV-1 HFEM.** Die Aufnahmen zeigen eine primäre Umhüllung eines Virion an der inneren Kernmembran (A) und sekundäre Umhüllungstadien im Cytosol (B). Im Axon werden sowohl behüllte Virionen in Vesikeln (C), als auch unbehüllte nackte Kapside in Axonen (C, kleiner Kasten) detektiert. (D) Auch im Wachstumskegel werden vermehrt behüllte Virionen in Vesikeln dargestellt. Die schwarzen Dreiecke zeigen die behüllten Virionen, weiße Dreiecke die nackten Kapside. Neurovesikel sind mit weißen Rauten gekennzeichnet. Skalen: 200nm in A, 300 nm in B, 500 nm in C und D und 100 nm in C, kleiner Kasten. (Aufnahmen aus NEGATSCH et al. 2010)

4.2.3 Infektion mit HSV-1 SC 16

Der verwendete HSV-1 Stamm SC 16 wurde als Primärisolat aus einem infizierten Gehirn gewonnen (HILL et al. 1975). Auch bei diesem Stamm wurde nach Protokoll infiziert und für die elektronenmikroskopische Analyse wurden die infizierten Explantate aufgearbeitet. Wie bei HSV-1 HFEM wurde auch hier zunächst die Produktivität der Infektion anhand von verschiedenen Replikationsstadien im Cytosol untersucht. Sowohl primäre Umhüllungstadien im perinukleären Spalt als auch sekundäre Umhüllungstadien der Virionformation im Cytoplasma konnten elektronenmikroskopisch dargestellt werden. Im Axon und den angrenzenden Wachstumskegeln konnten behüllte Virionen in Vesikeln beobachtet werden. Aber auch nackte Kapside wurden nachgewiesen. Die Quantifizierung stellte sich hier weitaus schwieriger dar als bei HSV-1 HFEM, da insgesamt deutlich weniger Viruspartikel beobachtet werden konnten. Es wurden aus 2 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten 20 Ultradünnschnitte ausgewertet. Es

wurden insgesamt 36 Partikel beobachtet davon waren 27 (70%) behüllte Virionen in Vesikeln und 9 (25%) nackte Kapside.

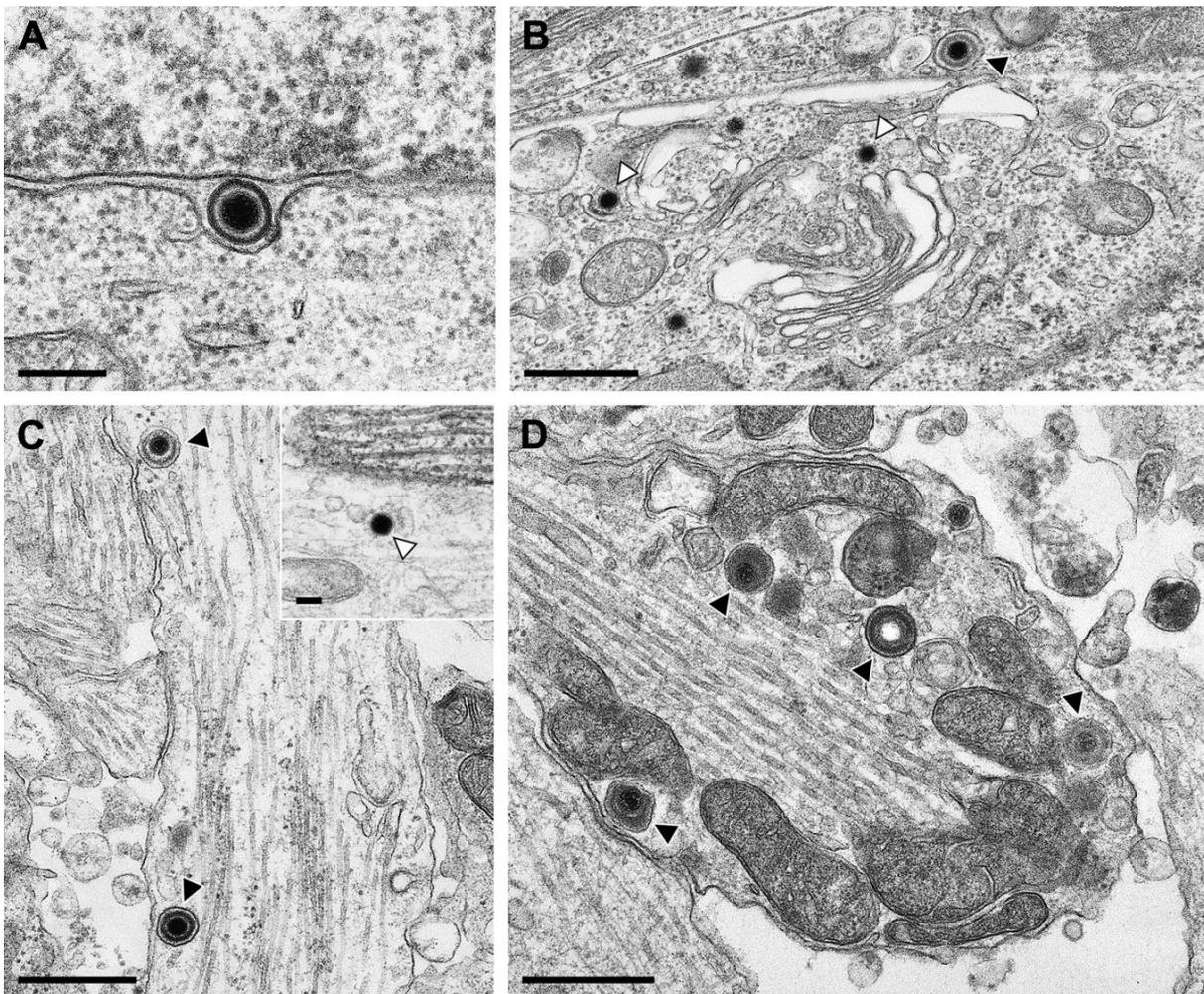


Abb. 9: **Ultrastrukturelle Analyse von primären Rattenneuronen infiziert mit HSV-1 SC16.** Darstellung einer Primärumhüllung im perinukleären Spalt (A) und einer sekundäre Umhüllung im Cytosol (B). Im Axon werden sowohl behüllte Virionen in Vesikeln (C), als auch unbehüllte nackte Kapside in Axonen (C, kleiner Kasten) detektiert. (D) Auch im Wachstumskegel werden vermehrt behüllte Virionen in Vesikeln dargestellt. Die schwarzen Dreiecke zeigen die behüllten Virionen, weiße Dreiecke die nackten Kapside. Skalen: 200nm in A, 500 nm in B bis D und 100 nm in C, kleiner Kasten. (Aufnahmen aus NEGATSCH et al. 2010)

4.2.4 Infektion mit HSV-1 17+

Bei dem verwendeten HSV-1 Stamm 17+ handelte es sich ebenfalls um ein Primärisolat (BROWN et al. 1972). Nach Infektion und Auswertung zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei HSV-1 SC16. Auch hier konnten die typischen Stadien einer produktiven Replikation dargestellt werden. In den Axonen und Wachstumskegeln wurden vorwiegend behüllte Virionen in Vesikeln beobachtet, aber auch nackte Kapside konnten detektiert werden. Ähnlich wie bei HSV-1 SC 16 war auch hier die Quantifizierung schwieriger. Es konnten insgesamt weniger Viruspartikel als bei HSV-1 HFEM nachgewiesen werden. Von 2 unabhängig durchgeführten Experimenten wurden 19 Ultradünnschnitte angefertigt. Insgesamt wurden 28 Viruspartikel gefunden. Davon waren 22 (75%) behüllte Virionen in Vesikeln und 7 (25%) nackte Kapside.

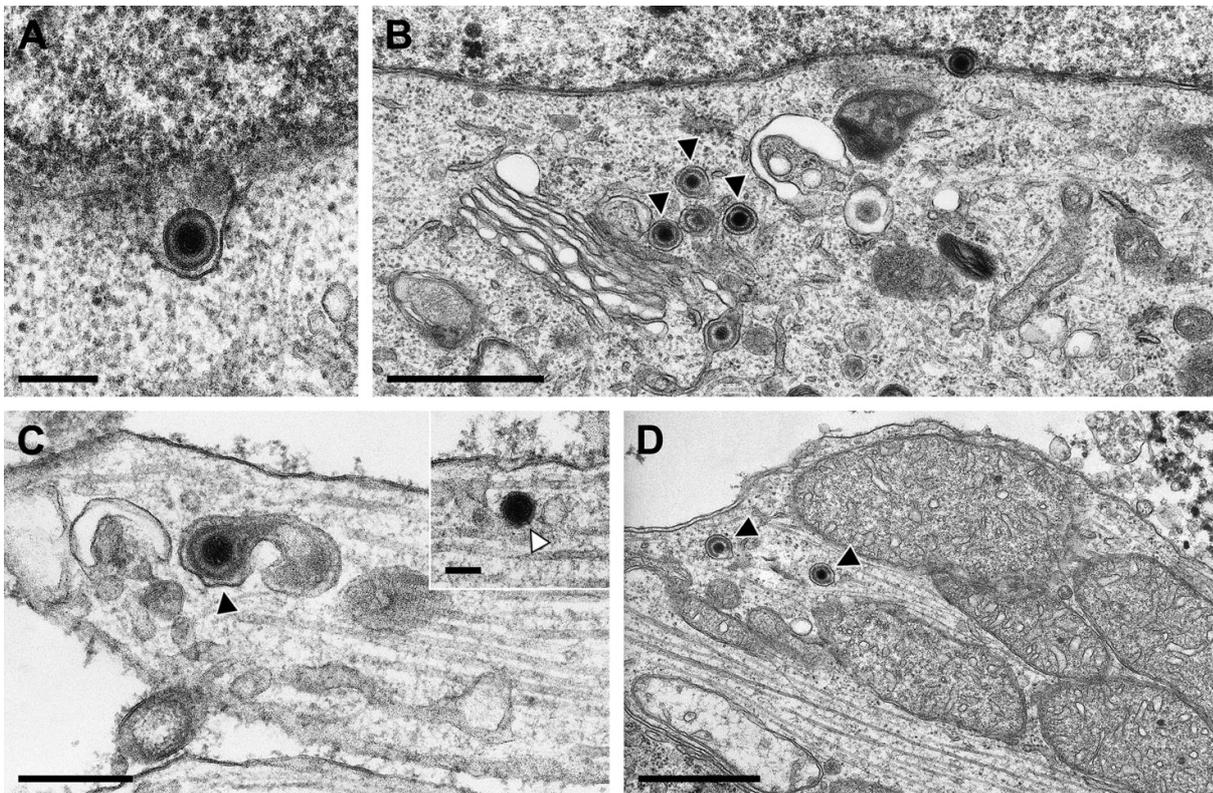


Abb. 10: **Ultrastrukturelle Analyse von primären Rattenneuronen infiziert mit HSV-1 17+**. Die Aufnahmen zeigen eine Primärumhüllung eines Virion im perinukleären Spalt (A) sowie sekundäre Umhüllungsstadien im Cytosol einer Nervenzelle (B). Im Axon werden sowohl behüllte Virionen in Vesikeln (C) als auch nackte Kapside dargestellt (C, kleiner Kasten). Am Wachstumskegel sind zwei behüllte Virionen in Vesikeln sichtbar (D). Die schwarzen Dreiecke zeigen die behüllten Virionen, weiße Dreiecke die nackten Kapside. Skalen: 200nm in A, 1 μ m in B und C, 300nm in D und 100 nm in C, kleiner Kasten. (Aufnahmen aus NEGATSCH et al. 2010)

4.2.5 Infektion mit HSV-1 KOS

Für dieses Experiment wurde der HSV- 1 Stamm KOS verwendet. Bei diesem Stamm handelt es sich um einen Laborstamm, welcher ursprünglich von K.O. Smith isoliert und beschrieben wurde (SMITH. 1964). In den Zellkörpern zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei den drei anderen HSV-1 Stämmen. Neben der primären Umhüllung an der inneren Kernmembran konnten auch hier wieder die sekundären Umhüllungsstadien im Cytoplasma nachgewiesen werden. Bei der Analyse der Axone und der Wachstumskegel zeigte sich aber ein deutlich anderes Bild. Hauptsächlich wurden nackte Kapside beobachtet und nur wenige behüllte Virionen in Vesikeln. Es wurden 4 voneinander unabhängige Experimente durchgeführt und davon 48 Ultradünnschnitte angefertigt und ausgewertet. Insgesamt wurden 73 Viruspartikel detektiert. Davon wurden 51 (70%) als nackte Kapside und nur 22 (30%) als behüllte Virionen in Vesikeln nachgewiesen.

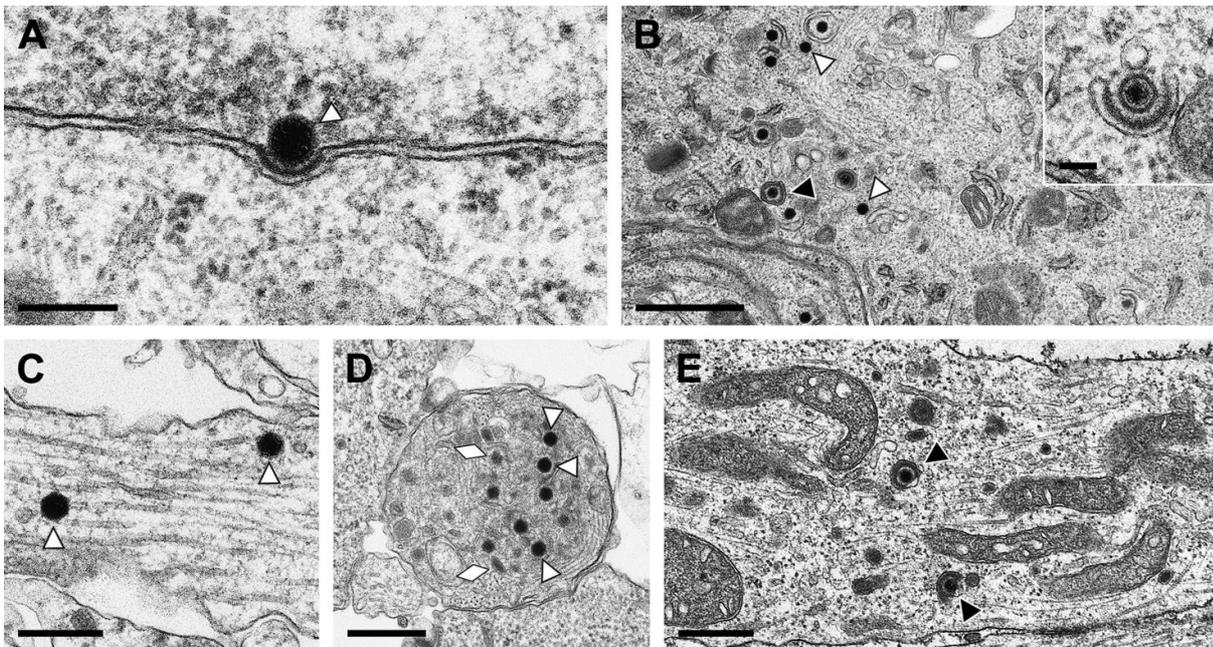


Abb. 11: **Ultrastrukturelle Analyse von primären Rattenneuronen infiziert mit HSV-1 KOS.** Die Aufnahmen zeigen primäre Umhüllungsstadien an der inneren Kernmembran (A) und sekundäre Umhüllungsstadien im Cytosol (B), wie z.B. die Tegumentierung (B kleiner Kasten). Im Axon (C) und im Wachstumskegel (D) werden vorwiegend nackte Kapside, aber auch behüllte Virionen in Vesikeln detektiert (E). Die schwarzen Dreiecke zeigen die behüllten Virionen, weiße Dreiecke die nackten Kapside. Neurovesikel sind mit weißen Rauten markiert. Skalen: 200nm in A, 1µm in B, 300nm in C, 500nm in D und E, 100 nm in B, kleiner Kasten. (Aufnahmen aus NEGATSCH et al. 2010)

Tab. 1: **Quantitative Auswertung der elektronenmikroskopischen Analyse des intraaxonalen Transportes von 4 verschiedenen HSV-1 Stämmen und PrV Kaplan.** Prozentuale Verteilung der beobachteten Viruspartikel in den Axonen und Wachstumskegeln. Die Werte von PrV Kaplan wurden bereits in einer vorherigen Studie (MARESCH et al. 2010) ermittelt und als Vergleichswerte herangezogen.

Virus Stamm	Behüllte Virionen in Vesikeln (%)	Nackte Kapside (%)
HSV- 1 HFEM	72	28
HSV-1 SC16	75	25
HSV-1 17+	75	25
HSV-1 KOS	30	70
<i>PrV Kaplan</i>	90	10

4.3 Etablierung eines modifizierten Drei-Kammer-Systems

Nach der gelungenen Etablierung und Analyse des Explantatsystems sollte der gerichtete anterograde intraaxonale Transport in einem Drei-Kammer-System genauer untersucht werden. Bei einem Drei-Kammer-System werden die Neuronen in drei von einander unabhängigen Kompartimenten analysiert. Die Einteilung erfolgt in das **S - (Soma) Kompartiment**, das **M - (Mittlere) Kompartiment** und das **N - (Neuriten) Kompartiment**. Die Neuronen werden in das S-Kompartiment eingesät und die Axone wachsen entlang von vorher eingebrachten und definierten Rillen in das M- und N- Kompartiment ein. Eine Methocel- und Silikonschicht verhindert die Verbindung der Kompartimente untereinander und ist nur für die auswachsenden Axone durchlässig (siehe Abb. 12) In der Vergangenheit wurde das Drei-Kammer-System für Live-Cell-Imaging Analysen und für elektronenmikroskopische Untersuchungen eingesetzt. Eine zufriedenstellende Bildqualität konnte in den elektronenmikroskopischen Analysen bislang nicht erreicht werden.

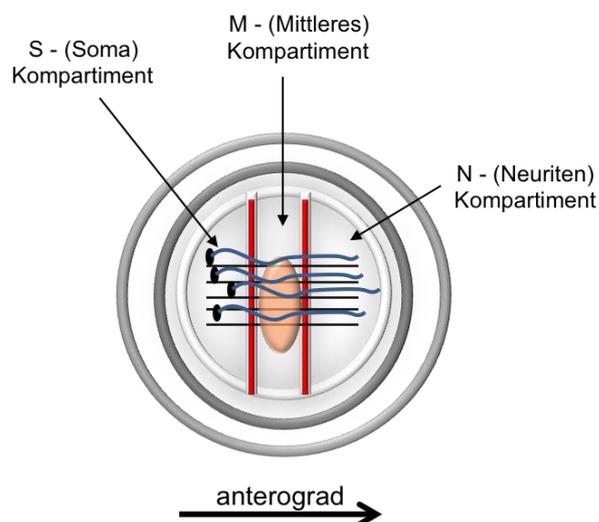


Abb. 12: **Schematische Darstellung des modifizierten Drei-Kammer-Systems.** Einteilung in die drei voneinander unabhängigen Kompartimente. Einsaat der neuronalen Zellen ins S - Kompartiment (schwarz = Zellkörper, blau = Axone), welche ins M - und N - Kompartiment auswachsen. Die Abdichtung der Kompartimente erfolgt durch Silikon (rot und dunkelgrau) und einem Methocelgemisch (ovaler rosa Kreis). Diese verhindert eine Verbindung der Kompartimente untereinander und ist nur für die Neuronen durchlässig.

Ziel dieser Arbeit war es, ein Drei-Kammer-System so zu modifizieren, dass es für elektronenmikroskopische wie für Live-Cell-Imaging Analysen genutzt werden kann und zusätzlich eine optimale Bildqualität erreicht wird. Auch wurde angestrebt, den Prozess der aufwendigen Erstellung und Aufarbeitung der Kammern zu vereinfachen und den erheblichen Ausschuss an undichten und fehlerhaft erstellten Kammern zu minimieren.

Das hier verwendete Drei-Kammer-System wurde nach dem Protokoll von CURANOVIC et al. (2009) modifiziert. Die Beschichtung blieb unverändert zum Explantatsystem und wurde für das modifizierte Drei-Kammer-System angepasst. Ein Problem bei der bisherigen Durchführung lag in der Undichtigkeit zwischen den einzelnen Kompartimenten. Das hing mit der aufwendigen Klebetechnik zusammen, mit der die einzelnen Kompartimente abgedichtet werden müssen. Kleinste Verschiebungen des Silikons auf den Teflonringen führten zur Undichtigkeit und somit zur

Unbrauchbarkeit des Systems. Der Ausschuss bei herkömmlich generierten Drei-Kammer-Systemen, bearbeitet nach dem Protokoll von CURANOVIC et al. 2009, lag bei ca. 40%. Ein weiteres Problem war, dass undichte Kammern nicht immer sofort einwandfrei makroskopisch bei der Generierung erkannt werden konnten. Erst nach Kultivierung der neuronalen Zellen wurden diese erkannt. Der Ausschuss an den mühsam gewonnen neuronalen Primärzellkulturen war daher unbefriedigend. Ein weiterer Grund für die Modifizierung lag in der Analysetechnik für die Elektronenmikroskopie. Nach Durchführung des beschriebenen Protokolls wurden die Teflonringe nach der Infektion und anschließenden Fixierung vorsichtig abgenommen und die verwendete Aclarfolie mit den ausgewachsenen infizierten Neuronen wurde weiter aufgearbeitet. Ein Problem lag aber auch hier in der hohen Verlustrate der Präparate, die beim Ablöseprozess verloren gingen. Außerdem war durch diese Art der Fixierung die Qualität der elektronenmikroskopischen Bilder nicht zufriedenstellend.

Ziel war es daher, eine Möglichkeit zu finden, die infizierten neuronalen Zellen in den Teflonringen zu fixieren und aufzuarbeiten, so dass jedes Kompartiment als einzelnes Epoxidharzblöckchen elektronenmikroskopisch analysiert werden konnte. Da das bisher verwendete Silikon (Dow Corning Silikon) der Aufarbeitung nicht standhielt und die Drei-Kammer-Systeme auch hier wieder undicht wurden, wurde ein zweites Silikon verwendet (Elastosil Silikon). Die Modifizierung bestand darin, dass die Mittelstege zunächst mit dem DowCorning Silikon, wie im Protokoll (CURANOVIC et al. 2009) beschrieben, abgedichtet wurden und die Campenotkammern auf die verwendeten Aclarfolien oder μ -Dishes geklebt wurden. Danach wurde der äußere Ring der Teflonkammer mit Elastosil Silikon abgedichtet. Der Vorteil lag hier in einer anderen Beschaffenheit des Silikons, welches flüssiger ist als das Dow Corning Silikon und somit besser unter die Ränder der Teflonkammer fließen kann. Das Elastosil härtete erst über einen Zeitraum von 24h richtig aus. Auch war der Bearbeitungsschritt wesentlich einfacher zu handhaben, als die Verklebetechnik mit dem Dow Corning Silikon. Die Fehlerrate der generierten Präparate bezüglich der Undichtigkeit lag nach der Modifizierung nur noch bei ca. 10%. Dieser Ausschuss kam aber nicht aufgrund der Klebetechnik zustande, sondern hauptsächlich durch die sich anschließenden Waschvorgänge. Aufgrund der hohen Zelltoxizität infolge des Verklebens mit dem Elastosil Silikon mussten die generierten modifizierten Drei-Kammer-Systeme gründlich gewaschen werden. Jedes Kompartiment musste mehrmals mit HBSS Puffer gewaschen werden, bis es verwendet werden konnte. Durch die mechanischen Einwirkungen konnte eine Undichtigkeit zwischen den Kompartimenten entstehen, welche aber noch vor Einsaat der neuronalen Zellen erkannt wurde. Die Verwendung von sehr feinen Pipettenspitzen, welche normalerweise für PCR-Techniken eingesetzt werden, reduzierte diesen Ausschuss nochmals. Im Anschluss an die Waschvorgänge wurden die dissoziierten Spinalganglien eingesät und kultiviert.

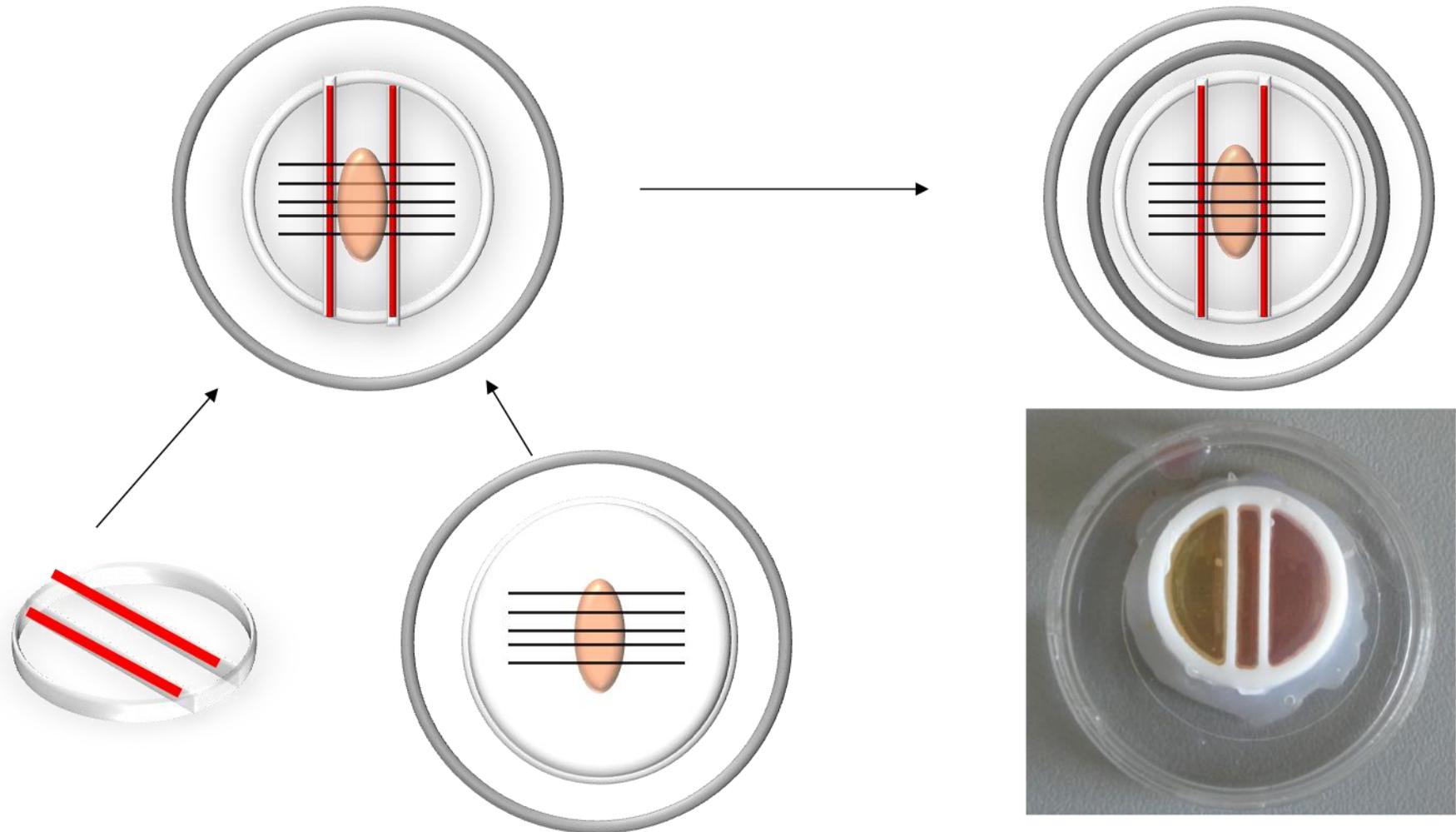


Abb. 13: **Schematische und fotografische Darstellung des modifizierten Drei-Kammer-Systems.** Vorbereitung der Campenotkammer (weiß) mit DowCorningSilikon (rot), paralleles Aufbringen der definierten Rillen und des mittig platzierten Methoceltropfens (ovaler rosa Kreis) auf den verwendeten Aclarfolien oder μ -Dishes. Kleben der Campenotkammer auf das vorbereitete Gefäß mit anschließender Abdichtung des äußeren Kammerrings mit Elastosil Silikon (dunkelgrau). Zugabe von HBSS Puffer in jedes Kompartiment und Aushärtung des Silikons über 24h.

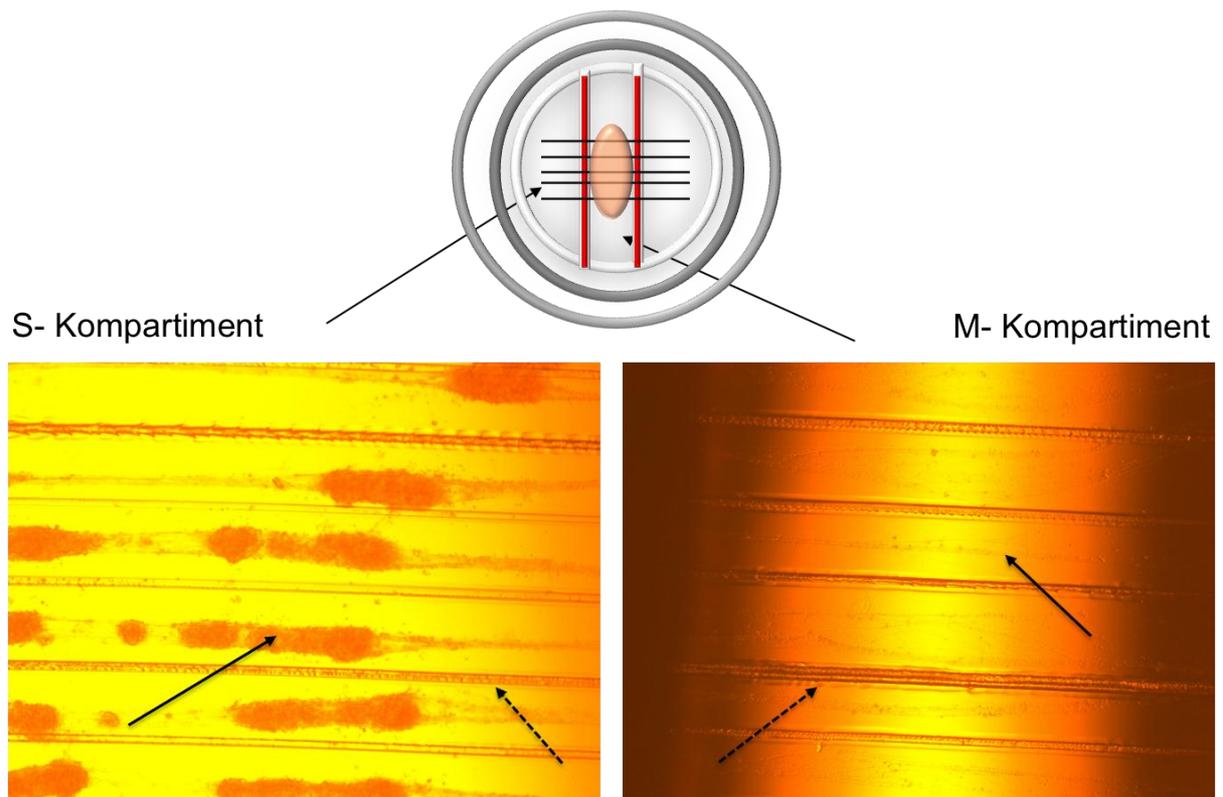


Abb. 14: **Darstellung lichtmikroskopischer Aufnahmen von Spinalganglien im modifizierten Drei-Kammer-System.** Von Zellkörpern ausgehend wachsen die Axone (schwarzer Pfeil) entlang definierter vorher eingebrachter Rillen (gestrichelter Pfeil) vom S - ins M - bzw. N - Kompartiment aus (x200).

Durch diese Modifizierung war es nun zum ersten Mal möglich, dieses System auch für elektronenmikroskopische Studien mit exzellenter Bildqualität zuverlässig einzusetzen. Der Vorteil gegenüber dem Explantatsystem liegt in der Kompartimentierung und der möglichen Analyse eines gerichteten Transportes. Zur Etablierung des modifizierten Drei-Kammer-Systems wurden zunächst nicht infizierten Spinalganglien elektronenmikroskopisch analysiert (siehe 4.3.1.1). Anschließend wurden weitere Infektionsexperimente mit PrV Kaplan durchgeführt, um Vergleichswerte für zukünftige Analysen mit PrV Deletionsmutanten zu erhalten (siehe 4.3.1.2). Parallel wurden mit dem modifizierten Drei-Kammer-System auch Live-Cell-Imaging Analysen durchgeführt (siehe 4.3.2.).

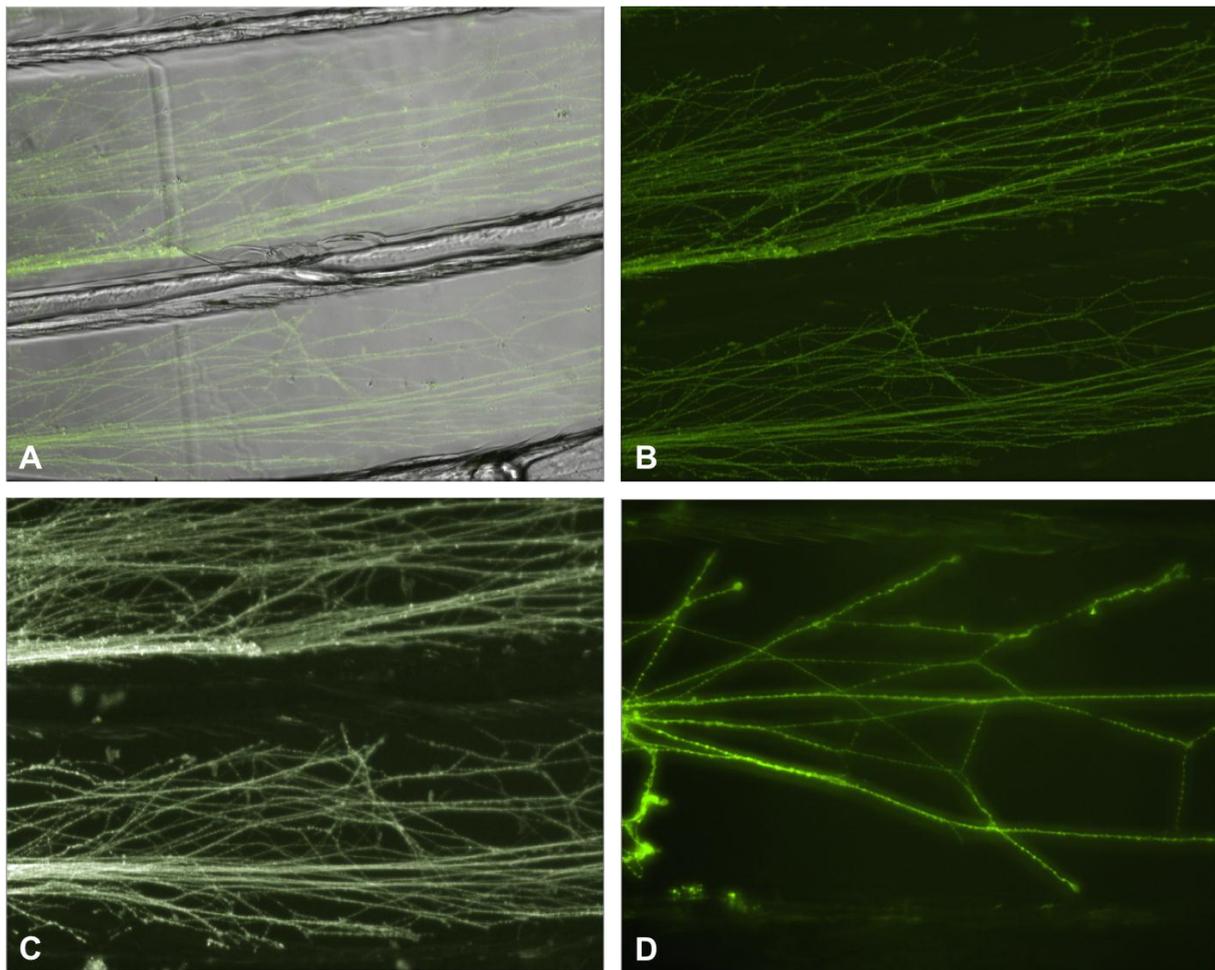


Abb. 15: **Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von dissoziierten Spinalganglien im modifizierten Drei-Kammer-System.** Darstellung mittels des spezifischen Neuronenmarkers β - III- Tubulin. Aufnahmen aus dem M - Kompartiment (A-C, x200) bzw. aus dem N-Kompartiment (D, x400) im Mehr- und Einkanalmodus.

4.3.1 Elektronenmikroskopie

4.3.1.1 Nicht infizierte Spinalganglien

Zur Etablierung des modifizierten Drei-Kammer-Systems wurden zunächst Präparate von nicht infizierten Spinalganglien erstellt und analysiert. Sie dienten vor allem zur Übersicht und einer ersten Kontrolle, ob das modifizierte Drei-Kammer-System funktionell und anwendbar ist. Gleichzeitig konnte so die Neuronenbeschaffenheit der Spinalganglien überprüft werden. Die generierten Präparate wurden ca. 14 Tage kultiviert und anschließend elektronenmikroskopisch untersucht im Labor für Elektronenmikroskopie von Dr. habil. H. Granzow.

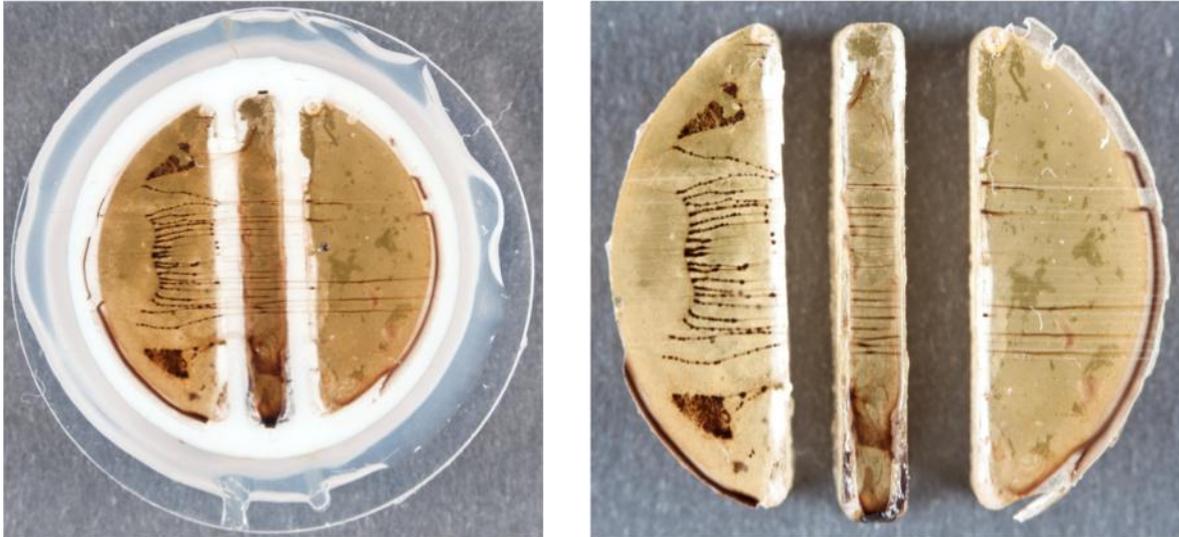


Abb. 16: **Fotographische Darstellung eines modifizierten Drei-Kammer-Systems nach Aufarbeitung für die elektronenmikroskopische Analyse.** Durch die Modifikation können die 3 Kompartimente separat aus der Kammer entfernt werden und stehen nun einzeln zur Analyse zur Verfügung. (Aufnahmen: Dr.habil. Granzow, FLI- Insel Riems)

Die analysierten Proben zeigten eine eindeutige Neuronenmorphologie wie auch schon für die primären Neuronenkulturen des oberen Cervikalganglions beschrieben (MARESCH. 2010). Im S-Kompartiment konnten neben den neuronalen Zellkörpern auch axonale Strukturen detektiert werden. Im Zellkörper konnten die verschiedenen Zellorganellen wie z.B. der Golgi-Apparat oder Mitochondrien dargestellt werden (siehe Abb. 17). Die Aufnahmen des M-Kompartiment zeigten Axone, welche, wie beabsichtigt, einzeln und entlang der vorgegebenen Rillen ausgewachsen waren (siehe Abb. 17). Neben den deutlich erkennbaren Strukturen der parallel angeordneten Mikrotubuli waren auch vesikuläre Strukturen zu erkennen. Hierbei handelte es sich um Neurovesikel. Diese gaben Hinweise auf einen aktiv stattfindenden Transport in den generierten in-vitro Kulturen und somit auf die Lebensfähigkeit der primären Neuronenkulturen. Im N-Kompartiment zeigte sich ein ähnliches Bild wie im M-Kompartiment (hier nicht dargestellt). Hervorzuheben ist hier die ausgesprochen scharfe Bildqualität, die mit der modifizierten Methode erreicht werden konnte.

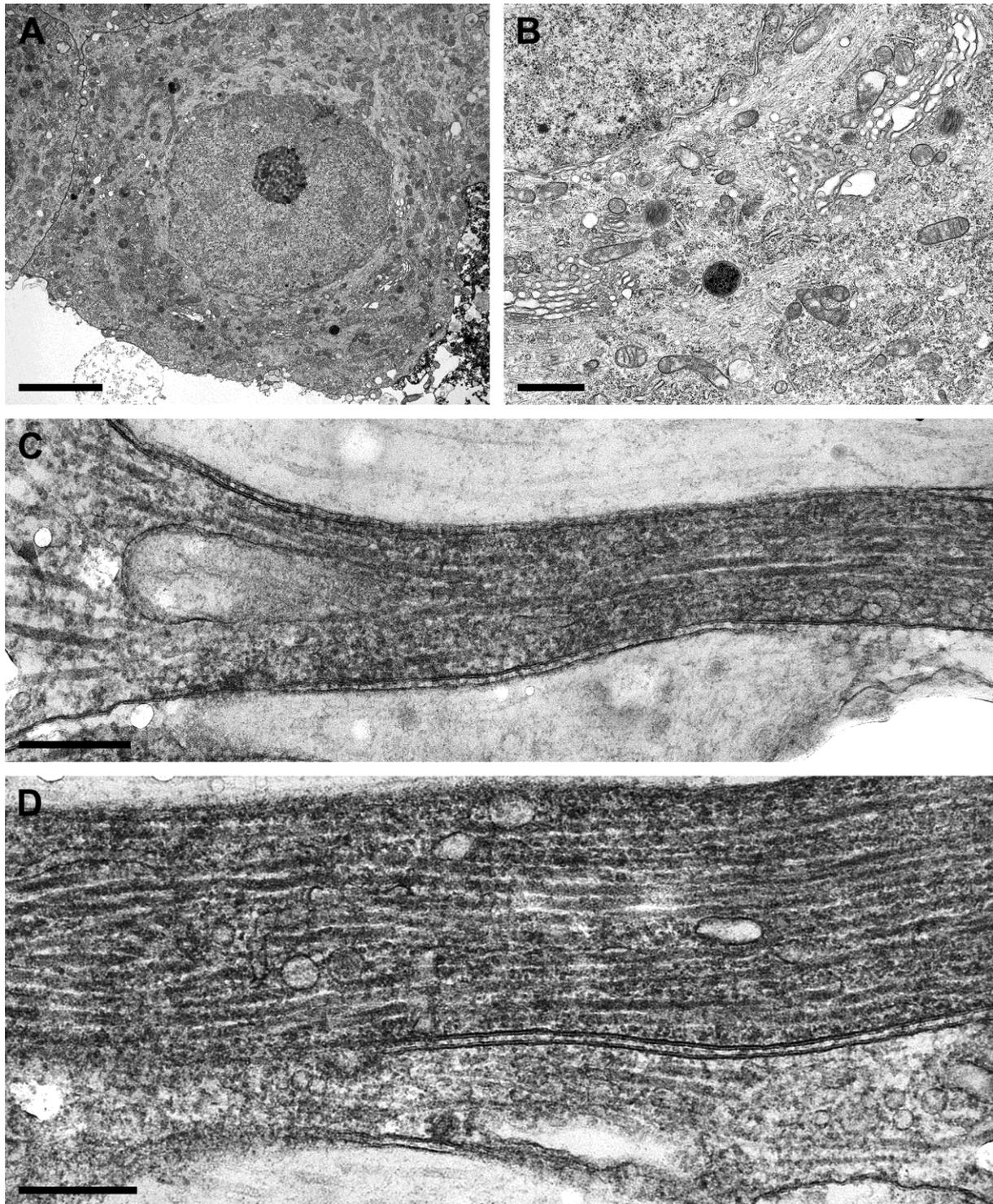


Abb. 17: **Ultrastrukturelle Analyse von nicht infizierten Spinalganglien im modifizierten Drei-Kammer-System.** (A und B) Darstellung eines neuronalen Zellkörpers im S-Kompartiment. (C und D) Darstellung eines Axons im M-Kompartiment. Deutlich können mikrotubuläre als auch neurovesikuläre Strukturen detektiert werden. Skalen: 5 μ m in A, 1 μ m in B , 300nm in C und D.

4.3.1.2 Infektion mit PrV Kaplan

Da PrV Kaplan eine gute Replikation in primären Rattenneuronen zeigt (MARESCH et al. 2010), wurde dieser Virusstamm auch für die ersten Analysen und Etablierung des modifizierten Drei-Kammer-Systems verwendet. Analog zu den elektronenmikroskopischen Untersuchungen mit nicht infizierten Spinalganglien wurden auch hier die generierten modifizierten Drei-Kammer-Systeme für 14 Tage kultiviert. Anschließend folgte die Infektion mit 1×10^6 pfu/ml und Inkubation bis zum gewünschten Analysezeitpunkt. Die Kulturen wurden nach 18 bis 24 h fixiert und analysiert.

Nach der elektronenmikroskopischen Analyse zeigte sich in allen 3 Kompartimenten eine produktive Infektion. So konnten einzelne Replikationsstadien wie z.B. die Tegumentierung (siehe Abb. 18) im S-Kompartiment deutlich dargestellt werden. In den Axonen des M-Kompartimentes zeigten sich umhüllte Virionen in Vesikeln. Aufgrund der charakteristischen Morphologie konnten diese Viruspartikel eindeutig von Neurovesikeln unterschieden werden. Auch hier ist wieder die Bildqualität hervorzuheben. Da eine Reinfektion nach einem längeren Untersuchungszeitraum auch im Drei-Kammer-System nicht ausgeschlossen ist, konnten nach 24h auch vereinzelt nackte Kapside in den axonalen Strukturen detektiert werden.

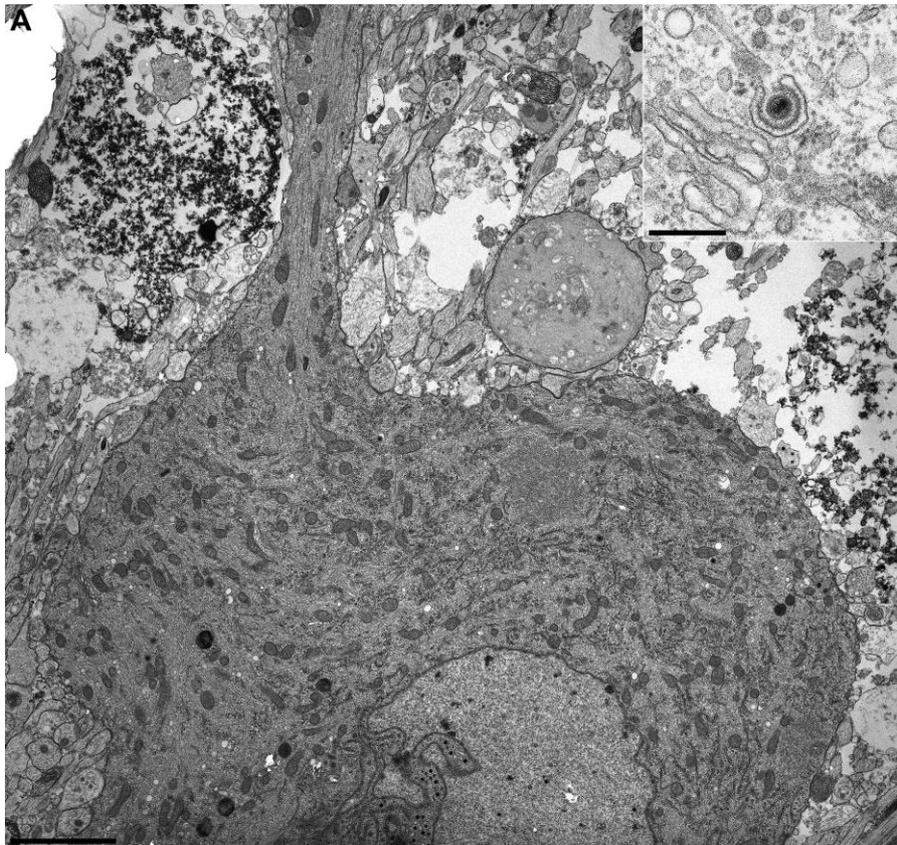


Abb. 18: **Ultrastrukturelle Analyse vom S-Kompartiment des modifizierten Drei-Kammer-Systems infiziert mit PrV Kaplan.** Die Aufnahme zeigt einen infizierten neuronalen Zellkörper. Einzelne Replikationsstadien wie z.B. die Tegumentierung (oberer kleiner Kasten) lassen sich ultrastrukturell gut darstellen. Skalen: 3 μ m in A, 300nm kleiner Kasten.

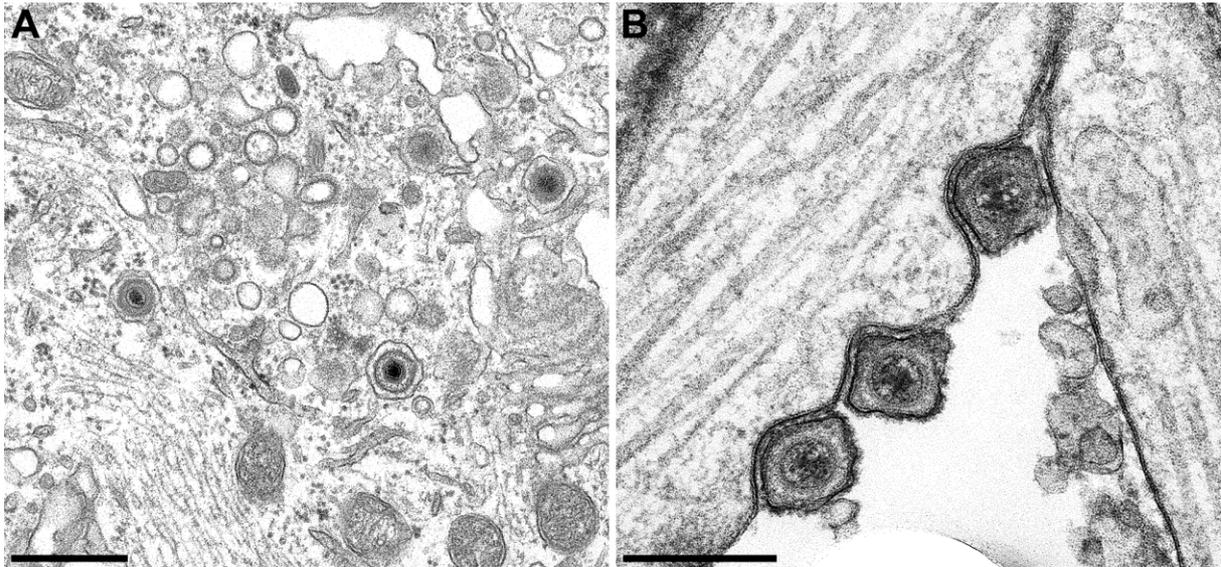


Abb. 19: **Ultrastrukturelle Analyse von Spinalganglien im S-Kompartiment des modifizierten Drei-Kammer-Systems infiziert mit PrV Kaplan 20 hpi.** (A) Darstellung eines infizierten neuronalen Zellkörpers. (B) Die Nahaufnahme zeigt den beginnenden Eintritt von 3 Viruspartikeln ins Axon durch Endozytose. Skalen: 500nm in A, 250nm in B

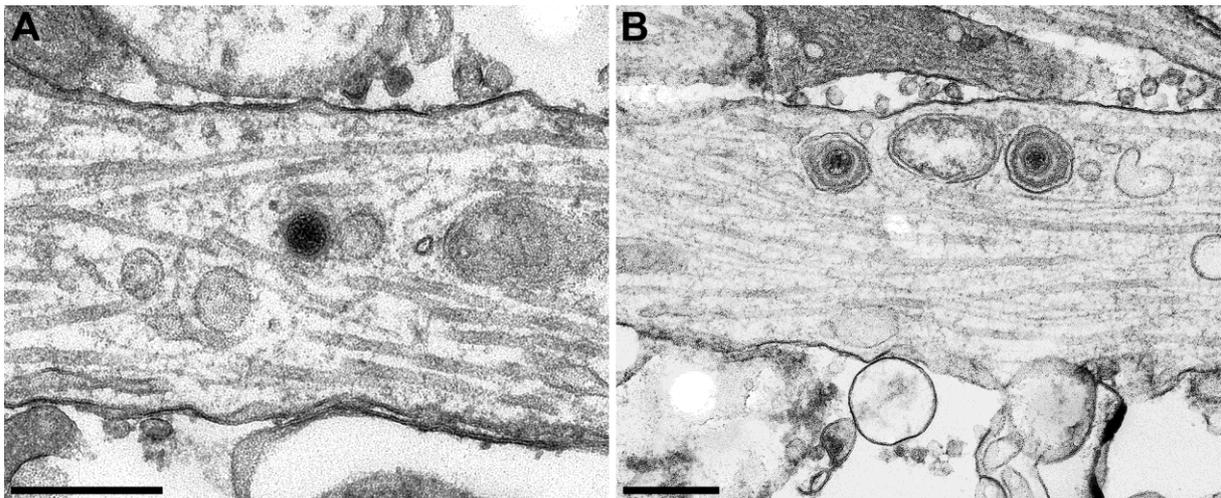


Abb. 20: **Ultrastrukturelle Analyse von Spinalganglien im M-Kompartiment des modifizierten Drei-Kammer-Systems infiziert mit PrV Kaplan 20 hpi.** (A) Darstellung eines nackten Kapsids. (B) Darstellung von umhüllten Viruspartikeln in Vesikeln. Die Viruspartikel sind durch die Bildqualität eindeutig zu identifizieren und können von neurovesikulären Strukturen eindeutig abgegrenzt werden. Skalen: 300nm in A und B

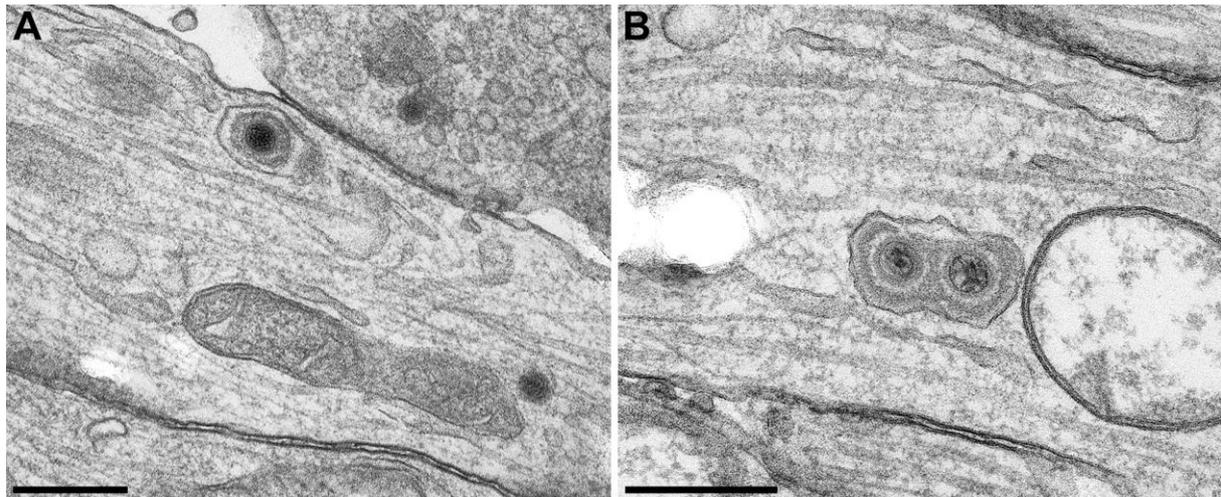


Abb. 21: **Ultrastrukturelle Analyse von Spinalganglien im M- Kompartiment des modifizierten Drei-Kammer-Systems infiziert mit PrV Kaplan 20 hpi.** (A und B) Die Aufnahmen zeigen einen intraaxonalen Transport von behüllten Virionen in Vesikeln. Skalen: 300nm in A und B

4.3.2 Live-Cell-Imaging

Das modifizierte Drei-Kammer-System wurde ebenfalls für Analysen mit dem Live-Cell-Imaging Verfahren verwendet und so weiter charakterisiert. Für die Infektion wurden grün fluoreszierende Viren verwendet, welche am pUL35, dem kleinen Kapsidprotein, mit EGFP fusioniert waren (KRAUTWALD et al. 2008). Das ermöglichte eine optimale Beobachtung des intraaxonalen Transports. Zusätzlich wurde zur besseren Sichtbarmachung und zur Überprüfung der Transport – und Lebensfähigkeit der Neuronen ein Neurovesikelmarker (FM 4-64 dyes) eingesetzt. Für die Etablierung eines Standards wurden die modifizierten Drei-Kammer-Systeme zunächst mit dem rekombinanten PrV-Wildtyp infiziert. Im Anschluss wurde das Transportverhalten einer PrV pUS9 Deletionsmutante untersucht. Das Transmembranprotein pUS9 spielt eine entscheidende Rolle beim anterograden intraaxonalen Transport von PrV und ist essentiell am Prozess des Axonal Sortings beteiligt (CURANOVIC und ENQUIST 2009). In vorherigen Analysen bei MARESCH. (2010) konnte bereits ein Transportdefekt innerhalb eines Untersuchungszeitraumes von 24h im herkömmlichen Drei-Kammer-System nach CURANOVIC et al. (2009) gezeigt werden. Aufgründessen eignete sich die Deletionsmutante hervorragend zur weiteren Etablierung und Charakterisierung des modifizierten Drei-Kammer-Systems. Nach der erfolgreichen Etablierung sollte dieses System für zukünftige Untersuchungen isogener Deletionsmutanten von PrV und HSV-1 zur Verfügung stehen.

4.3.2.1 Infektion mit PrV KaplanUL35gfp

Die Neuronenkulturen wurden im modifizierten Drei-Kammer-System angezogen und nach ca. 14 Tagen für die Versuche verwendet. Dabei wurde besonders auf ein korrektes Auswachsen der Axone geachtet. Es wurden nur Kammern verwendet bei denen die Neuronen vom S-Kompartiment bis hin zum N-Kompartiment vollständig ausgewachsen waren. Gleichzeitig wurde auf die Dichtigkeit der Kammersysteme geachtet. Die Überprüfung erfolgte zunächst lichtmikroskopisch 24h nach dem Einsäen der Zellen. Kammersysteme welche z.B. Zellkörper oder Verunreinigungen im M- oder N-Kompartiment aufwiesen,

wurden verworfen. Anschließend erfolgte die Infektion mit 1×10^6 pfu/ml und Inkubation bis zum gewünschten Analysezeitpunkt. Die Präparate wurden zwischen 18 und 24h beobachtet. Der Neurovesikelmarker wurde 2h vor Beginn der Live-Cell-Imaging Aufnahmen hinzugegeben und 30 min vor der Analyse entfernt. Er diente neben der Beurteilung der Lebens- und Transportfähigkeit der Neuronen auch zur erneuten Überprüfung der Dichtigkeit der Kammersysteme.

Bei den durchgeführten Analysen waren deutlich eine produktive Infektion und der intraaxonale Transport der Viruspartikel zu sehen. Die Neuronenmorphologie wurde durch den eingesetzten Neurovesikelmarker deutlich im S-Kompartiment dargestellt. Ebenso konnte ein aktiver Transport der Vesikel in allen drei Kompartimenten beobachtet werden, das auf eine gute Lebens- und Transportfähigkeit der primären Neuronen hindeutete. Besonders im M-Kompartiment ließen sich die neuronalen Vesikel gut darstellen (siehe Abb. 22). Bei dem beobachteten intraaxonalen Transport handelte es sich um einen bidirektionalen Transport. Es waren zahlreiche Partikel zu sehen, welche sich kontinuierlich bewegten. Fast alle Zellkörper im S-Kompartiment waren infiziert. Im M- und N-Kompartiment konnten ebenfalls zahlreiche sich kontinuierlich bewegende Viruspartikel detektiert werden. Für die Analysen wurden obere Cervikalganglien oder Spinalganglien eingesetzt. Ein Unterschied beim Transportverhalten der Viren konnte dabei nicht festgestellt werden. Die erhaltenen Ergebnisse deckten sich mit Resultaten vorheriger durchgeführter Studien (MARESCHEK, 2010) unter Verwendung der herkömmlichen Drei-Kammer-Systeme (CURANOVIC et al. 2009).

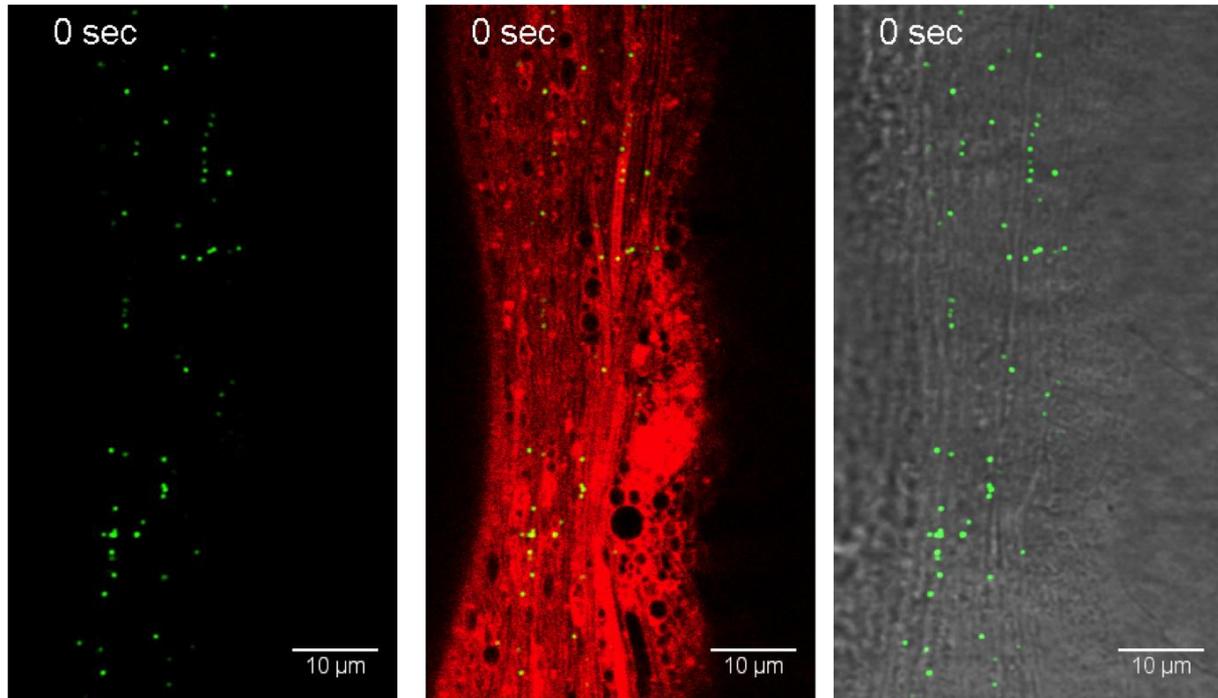


Abb. 22: **Live Cell Imaging Studien mit PRV KaplanUL35gfp infizierten oberen Cervikalganglien 18 - 20 hpi.** Darstellung eines infizierten Axons im S-Kompartiment des modifizierten Drei-Kammer-Systems mit drei verschiedenen Aufnahmekanälen. Deutlich ist ein bidirektionaler Transport der grün fluoreszierenden Viruspartikel sichtbar. Die durch den eingesetzten Neurovesikelmarker sichtbaren neuronalen Strukturen sind rot dargestellt, (Filmmaterial: siehe Anhang und externe DVD).

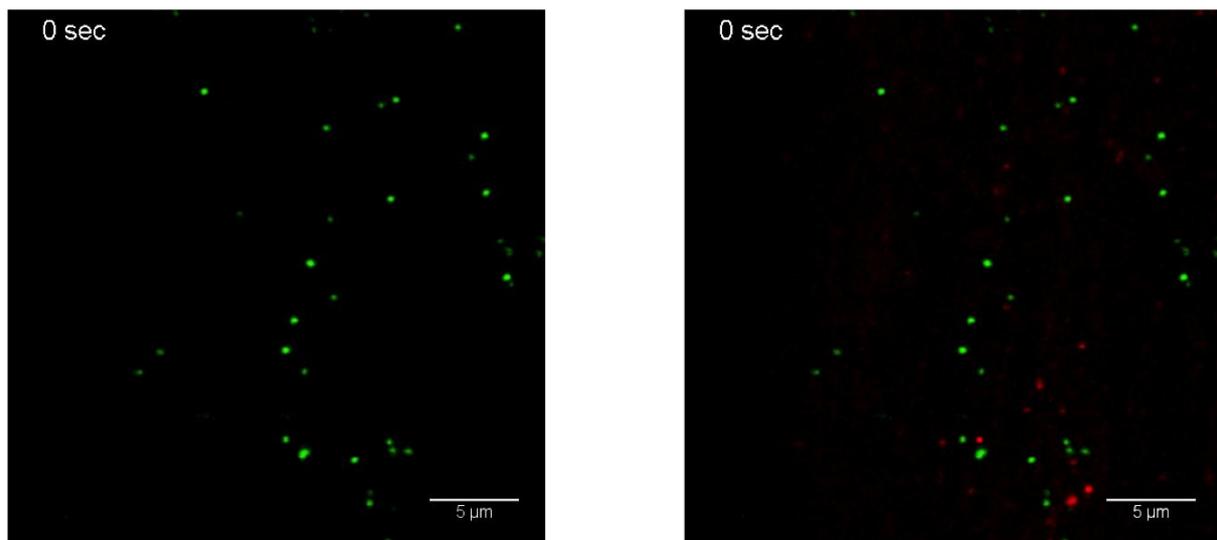


Abb. 23: **Live Cell Imaging Studien mit PRV KaplanUL35gfp infizierten oberen Cervikalganglien 18 - 20 hpi.** Darstellung eines infizierten Axons im M-Kompartiment des modifizierten Drei-Kammer-Systems in 2 verschiedenen Aufnahmekanälen. Deutlich ist ein bidirektionaler Transport der grün fluoreszierenden Viruspartikel sichtbar. Neurovesikel sind rot dargestellt, (Filmmaterial: siehe Anhang und externe DVD).

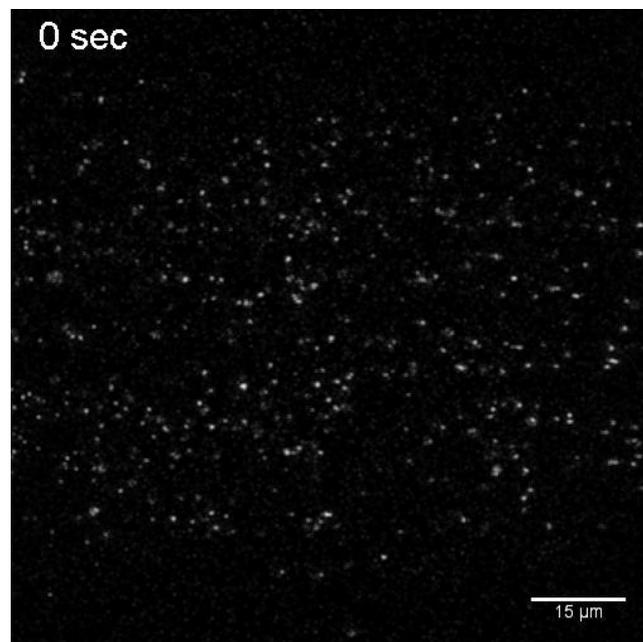


Abb. 24: **Live Cell Imaging Studien mit PrV KaplanUL35gfp infizierten Spinalganglien 18 - 20 hpi.** Darstellung eines infizierten Axons im S-Kompartiment des modifizierten Drei-Kammer-Systems. Auch hier ist eine produktive Replikation verbunden mit einem bidirektionalen Transport sichtbar. Ein Unterschied zu den oberen Cervikalganglien konnte nicht detektiert werden, (Filmmaterial: siehe Anhang und externe DVD).

4.3.2.2 Infektion mit PrV Δ US9UL35gfp

Auch hier wurde für die Infektion ein grün fluoreszierendes Virus eingesetzt, welches eine Deletion innerhalb des codierenden Genabschnitts für das Protein pUS9 aufwies. Analog zum Wildtypvirus wurden dieselben Parameter zur Infektion benutzt. Der eingesetzte Vesikelmarker machte auch hier die Neuronenmorphologie deutlich und diente weiterhin zur Überprüfung der Dichtigkeit der einzelnen Kompartimente. Beginnend mit der Analyse 18h nach der Infektion wurde im S-Kompartiment eine deutliche Kumulation der neu generierten Viren in den Zellkörpern der Neuronen sichtbar. Im Gegensatz zum PrV Wildtypstamm konnten aber keine Viruspartikel in den Axonen detektiert werden. Auch im M- bzw. N-Kompartiment konnten keine Partikel detektiert werden (hier nicht dargestellt). Ein axonaler Transport war demnach nicht zu beobachten. Auch hier wurden parallel primäre neuronale Zellen aus dem oberen Cervikalganglion wie aus Spinalganglien eingesetzt. Die Ergebnisse zeigten keine Unterschiede und deckten sich erneut mit den vorherigen Resultaten unter Verwendung des herkömmlichen Drei-Kammer-Systems (MARESCH. 2010).

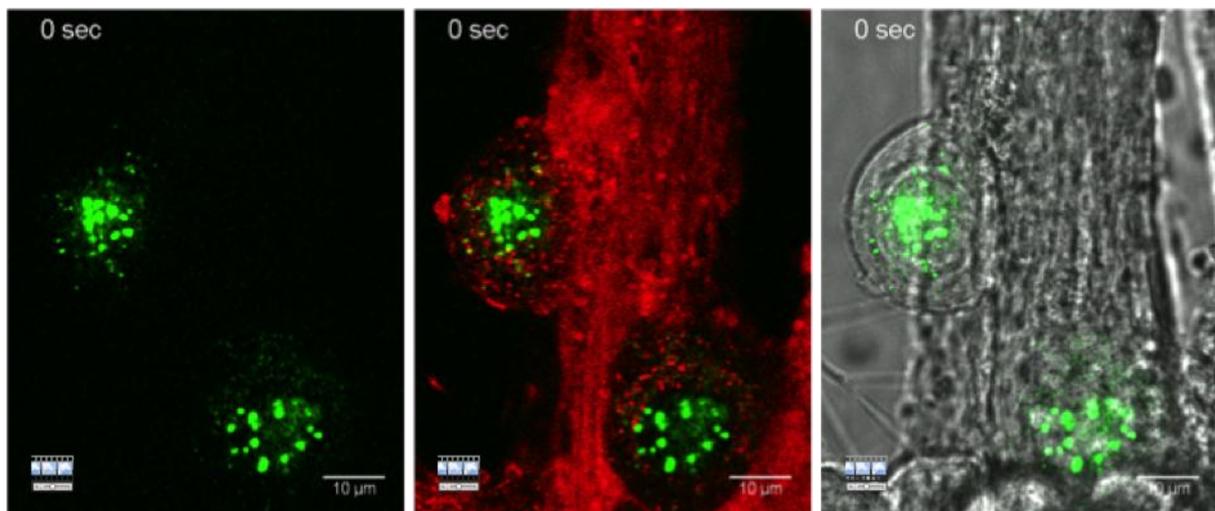


Abb. 25: **Live Cell Imaging Studien mit PRV Δ US9UL35gfp infizierten dissoziierten oberen Cervikalganglien 18 - 20 hpi.** Darstellung von infizierten dissoziierten oberen Cervikalganglien im S-Kompartiment mit 3 verschiedenen Aufnahmekanälen. Durch die Deletion im Genbereich US9 ist kein Transport der Viruspartikel sichtbar. Die Infektion verläuft nur in den neuronalen Zellkörpern (Filmmaterial: siehe Anhang und externe DVD).

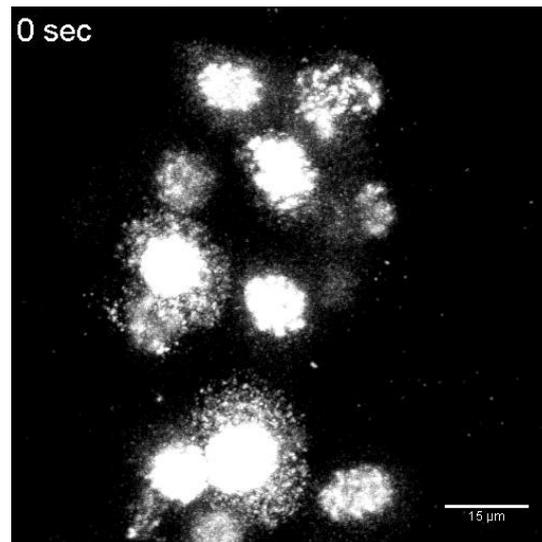


Abb. 26: **Live Cell Imaging Studien mit PRV Δ US9UL35gfp infizierten Spinalganglien im S-Kompartiment 18 - 20 hpi.** Auch hier konnte kein aktiver Transport detektiert werden und die Infektion verläuft nur in den neuronalen Zellkörpern. Ein Unterschied zu den verwendeten oberen Cervikalganglien konnte erneut nicht festgestellt werden (Filmmaterial: siehe Anhang und externe DVD).

4.3.3 Etablierung einer Ein-Stufen-Wachstumskinetik in primären Rattenneuronen

Es wurde ein System zur Durchführung von Ein-Stufen-Wachstumskinetiken in neuronalen Primärkulturen etabliert, um nicht transportierende Viren wie z.B. PrV Δ US9 auf ihre Funktionalität und Replikationsfähigkeit in Neuronen zu untersuchen. Dazu wurde das bisher verwendete Protokoll für permanente Zelllinien auf die primären Spinalganglien angepasst und die kultivierten Spinalganglien nach Protokoll infiziert. Nach 0, 6, 12, 24, 36 und 24h wurden Zeitwerte genommen und anschließend auf RK-13 Zellen titriert und ausgewertet (siehe Abb.: 27). Zur Etablierung wurden zunächst PrV Wildtyp und 3 verschiedene rekombinante PrV Stämme verwendet. Bei den rekombinanten PrV Stämmen handelte es sich um Viren, von denen bekannt ist, dass diese Dysfunktionen im anterograden intraaxonalen Transport aufweisen, jedoch in Zellkultur replikationsfähig sind. Es wurden drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt. Das Wildtypvirus PrV Kaplan wurde hier als Standard verwendet. Nach der Auswertung zeigte sich, dass alle drei verwendeten rekombinanten PrV Viren in der Lage waren, in Neuronen zu replizieren. In Bezug auf Titer und Replikationsverhalten waren sie mit PrV Kaplan vergleichbar.

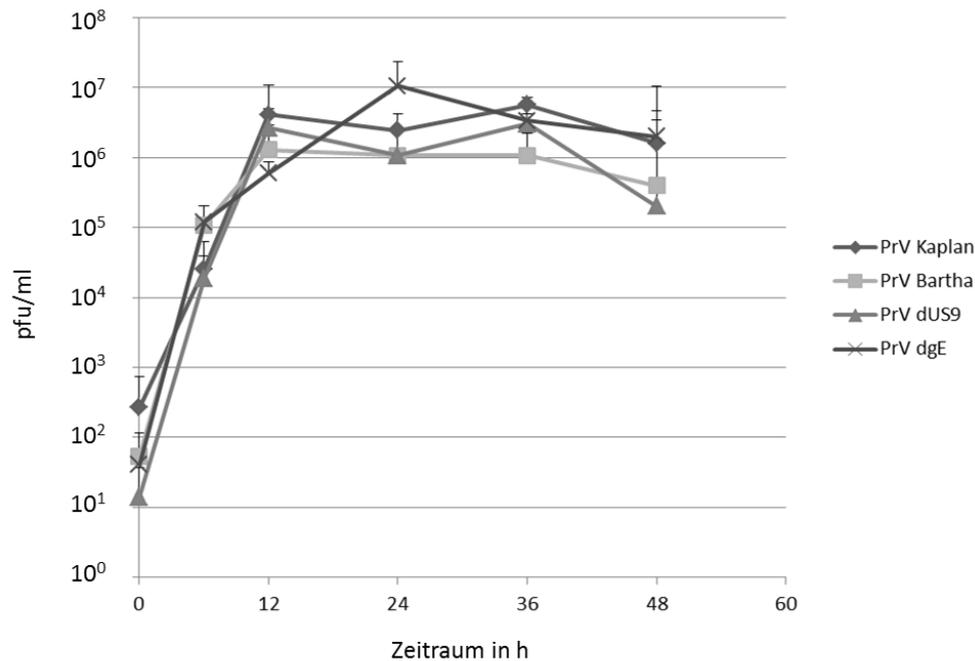


Abb. 27: **Etablierung einer Ein-Stufen-Wachstumskinetik in primären Spinalganglien.** Alle 4 eingesetzten Virusstämme zeigen eine produktive und für PrV typische Replikation, ähnlich zu permanenten Zelllinien. Es wurden 3 voneinander unabhängige Versuche durchgeführt.

4.4 Vergleichende Analyse von HSV- 1 KOS und HSV- 1 17+ bezüglich der Genregion US9 und US8a

Eine wichtige Rolle beim intraaxonalen anterograden Transport spielen die Proteine pUS9, gE und gI (CURANOVIC und ENQUIST 2009). Bei HSV-1 wird die Funktion von pUS9 kontrovers diskutiert (SMITH 2013, KRATCHMAROV et al. 2012, DIEFENBACH et al. 2008). Der unterschiedliche Phänotyp von HSV-1 KOS in den elektronenmikroskopischen Darstellungen ließ auf mögliche Unterschiede bezüglich pUS9 hindeuten, welche auf der genetischen Ebene genauer untersucht werden sollten. Es wurden vergleichende Sequenzanalysen sowie Gen- und Proteinexpressionsanalysen durchgeführt.

4.4.1 Sequenzierung

Für die vergleichenden Sequenzanalysen wurden HSV-1 KOS und HSV-1 17 verwendet. Beide HSV-1 Stämme wurden in der Vergangenheit oft für Analysen genutzt. HSV-1 17 wurde weiterhin dafür verwendet, um die erste komplette Genomsequenz von HSV-1 zu erstellen (MCGEOCH et al. 1985,1988; GenBank accession no. 14112) Darüber hinaus stehen beide Stämme als *bacterial artificial chromosomes* (BAC) zur Verfügung. Von der HSV-1 17 Sequenz wurden Primer für die Gene US8a und US9 generiert (Invitrogen) und anschließend für die PCR Amplifikation genutzt. Es folgte eine Klonierung in die eukaryotischen und prokaryotischen Expressionsvektoren pcDNA3 und pcGEX-4T-2 mit Hilfe zusätzlich eingefügten Schnittstellen von EcoRI und XhoI (Abb. 28). Durch Restriktions- und Sequenzanalysen wurde die Richtigkeit der Klonierung überprüft und bestätigt. Die

gewonnenen prokaryotischen Expressionsplasmide wurden zur Herstellung von Fusionsproteinen genutzt und zur anschließenden Generierung von monospezifischen Kaninchenantisera verwendet (FUCHS et al. 2002a). Die gewonnenen Antisera wurden für Analysen zur Proteinexpression verwendet

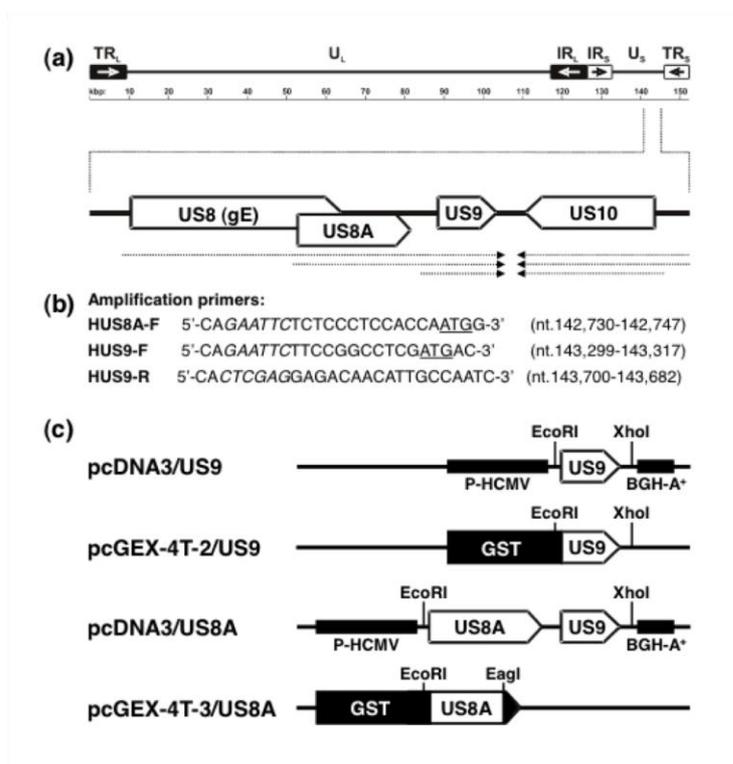


Abb. 28: **Klonierungsschema von US8a und US9.** (a) Schematische Darstellung des HSV-1 Genoms mit vergrößernder Darstellung der die Klonierung betreffenden Genabschnitte. Dabei stellen die großen Pfeile die offenen Leserahmen (ORFs) und die gestrichelten Pfeile die viralen Transkripte dar. (b) Darstellung der verwendeten Primer für die Amplifikation von US8a und US9. Die vorausgesagten Startcodons sind unterstrichen. Die künstlichen Schnittstellen für EcoRI und XhoI sind kursiv dargestellt. (c) Darstellung der verschiedenen hergestellten Plasmidkonstrukte (Abbildung aus NEGATSCH et al. 2011).

Die generierten eukaryotischen Expressionsplasmide wurden sequenziert. Bei HSV-1 17 stimmte die erhaltene Sequenz zu 100% mit der publizierten Sequenz aus der Genbank überein. Bei HSV-1 KOS dagegen wurden 3 Basenaustausche innerhalb des untersuchten 971 bp großen Fragments detektiert. Dazu wurden aus verschiedenen Laboratorien 2 HSV-1 KOS Isolate ebenfalls untersucht, genauso wie die 2 erhältlichen BAC Klone. Auch bei diesen Viren wurden die Mutationen gefunden. Der erste Nukleotidaustausch, eine Transition von T zu C, ist an Position 142802 zu finden. Infolgedessen wird ein Methionin anstelle eines Threonin codiert. Die zweite Mutation ist ebenfalls eine Transition T zu C an Position 143221. Dies hat ein Auflösen des Stopcodons von US8a zur Folge und bewirkt eine Verlängerung des Proteins von 159 AS auf 190 AS. Zusätzlich wird die an dieser Stelle vorausgesagte TATA Box von US9 zwischen Position 143219 und 143224 (MCGEOCH et al. 1985) verändert und reduziert die Ähnlichkeit zur Konsensussequenz. Bei der dritten Substitution an Position 143384 wird C zu T und dadurch ein Stopcondon eingefügt. Eine charakteristische *Sa*I Schnittstelle verschwindet ebenfalls. Das Stopcodon bewirkt eine Verkleinerung von 90 AS auf 57 AS. Die Expression des vorhergesagten hydrophoben C-Terminus der Transmembrandomaine wird unterbunden. Bei pUS9 handelt es sich um ein

Transmembranprotein Typ II. Die ausbleibende Expression des C-Terminus könnte zur Folge haben, dass pUS9 als nicht mehr funktionelles lösliches Protein bei HSV-1 KOS vorliegt. Es folgten weitere Analysen auf der RNA und Proteinebene.

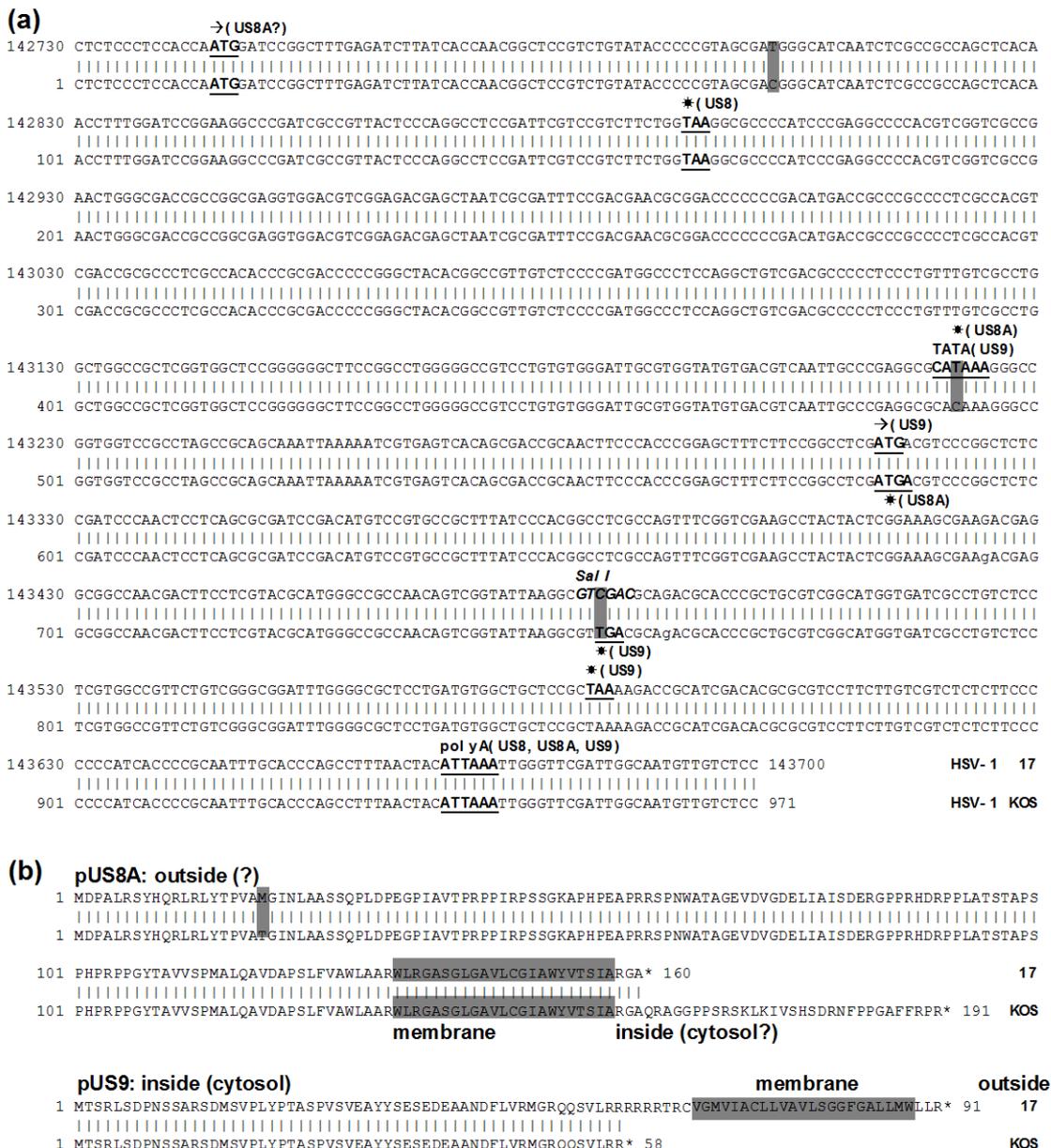


Abb. 29 Vergleichende Darstellung der DNA (a) und vorhergesagten Proteinsequenz (b) von HSV-1 17 und HSV-1 KOS. Die Nukleotidnummerierung erfolgte analog zur vorhandenen Genbanksequenz (X14112). Die drei gefundenen Mutationen sind hervorgehoben. Mögliche Start- und Stopcodonbereiche sind unterstrichen. Die typische Sall Schnittstelle bei HSV-1 17 ist kursiv hervorgehoben. Bei der vorhergesagten Proteinsequenz wurden ebenfalls die verschiedenen Bereiche hervorgehoben. Deutlich zeigt sich hierbei die Verkürzung von pUS9 bei HSV-1 KOS und die dadurch ausbleibende C-terminale Transmembrandomaine infolge des eingefügten Stopcodons (Abbildung aus NEGATSCH et al. 2011).

4.4.2 RNA Analyse

Alle 3 gefundenen Mutationen könnten in der Lage sein, die virale Genexpression zu beeinflussen. Es folgten deshalb weitere Untersuchungen zur Genexpression auf RNA Ebene. Diese Untersuchungen wurden von Dr. Walter Fuchs, Institut für Molekularbiologie, FLI-Riems durchgeführt. Es wurden Zellen mit HSV-1 KOS und mit HSV-1 17 infiziert und nach 6h durch Northern Blot Hybridisierung analysiert. Erwartungsgemäß konnten 3 virale Transkripte mit den erwarteten Größen von 2.5 , 1.1 und 0.6 kbp detektiert werden. Dabei ist das Fragment bei 0.6 kbp spezifisch für US9. Sowohl bei HSV-1 KOS als auch bei HSV-1 17 zeigten densitometrische Analysen beim Fragment 2.5 und 1.1 gleiche Mengen. Das Fragment 0.6 war bei mit HSV-1 KOS infizierten Zellen im Gegensatz zu HSV-1 17 um 65% reduziert (siehe Abb. 30). Dieses Ergebnis konnte auch zu früheren und späteren Zeitpunkten der Infektion bestätigt werden (hier nicht dargestellt).

4.4.3 Proteinanalysen

Für Western Blot Analysen wurden Verozellen mit HSV-1 17 und HSV-1 KOS infiziert und analysiert. Als Antiserum wurde das vorher generierte Anti-US9 Serum verwendet. Als Kontrolle wurden nicht infizierte Zellen eingesetzt. Die vorhergesagte kalkulierte Masse von pUS9 beträgt 10 kDa. Bei HSV-1 17 infizierten Zellen wurden Massen zwischen 14-20 kDa detektiert. Die Differenz zur vorher kalkulierten Masse von pUS9 stimmt mit vorherigen Analysen überein (FRAME et al.1986) und hängt wahrscheinlich mit der unterschiedlichen Phosphorylierung des Proteins zusammen. Bei HSV-1 KOS infizierten Zellen wurde kein pUS9 detektiert. Als Kontrolle wurde die Reaktivität auf ein anderes virales Genprodukt überprüft. Dazu wurde ein Antiserum gegen pUL 11 verwendet (LEEGE et al. 2009). Hiermit wurde sowohl bei HSV-1 17 als auch bei HSV-1 KOS infizierten Zellen die gewünschte Proteinbande sichtbar. Gleichzeitig wurden auch Western Blot Analysen bezüglich des Proteins pUS8a durchgeführt. Die durch die Mutation vorhergesagte Vergrößerung des Proteins konnte bestätigt werden und deckte sich mit der vorausgesagten kalkulierten Masse von 20.2 kDa für HSV-1 KOS. In HSV-1 17 wurde die kalkulierte Masse von 16.8 kDa ebenfalls detektiert und bestätigt.

Weiterhin wurden indirekte Immunfluoreszenztests auf RK13 Zellen mit dem Anti-US9 Serum durchgeführt. Es zeigten sich ähnliche Ergebnisse wie auch bei den Western Blot Analysen. So zeigte sich bei HSV-1 17 infizierten Zellen eine starke Reaktion in Form einer deutlichen Fluoreszenz. PUS9 konnte somit nachgewiesen werden. Dagegen wurden bei HSV-1 KOS infizierten Zellen nur sehr schwache Signale detektiert. Diese waren wohl auf eine unspezifische Antikörperbindung am FC-bindenden Teil von HSV-1 gE zurückzuführen. Somit konnte auch hier keine Expression von pUS9 nachgewiesen werden. Bei Untersuchungen zu pUS8a konnten erneut sowohl bei HSV-1 17 als auch bei HSV-1 KOS infizierten Zellen eindeutige Immunreaktionen detektiert werden. Parallel wurden Zellen mit den generierten eukaryotischen Expressionsplasmiden transfiziert und ebenfalls in Western Blot- und indirekten Immunfluoreszenzanalysen untersucht. Auch hier zeigte sich dasselbe Bild. Bei Western Blot und indirekten Immunfluoreszenzanalysen konnte nur HSV-1 17 pUS9 detektiert werden. Trotz gleicher Transfektionseffizienz wurde kein HSV-1 KOS pUS9 nachgewiesen. Da aufgrund der vorausgegangen Analysen davon ausgegangen werden musste, dass HSV-1 KOS keinen C-terminalen pUS9 Teil mehr exprimiert, wurde das Antiserum zusätzlich auf seine Funktionalität hin überprüft. Es sollte dabei ausgeschlossen werden, dass ggf. der N-terminale Part vom generierten Anti-US9 Serum bei HSV-1 KOS nicht erkannt wird. Zur Überprüfung wurden Zellen mit einem Expressionsplasmid transfiziert. Dieses Expressionsplasmid enthielt die Aminosäuren 1 – 58 von

pUS9 fusioniert mit EGFP. Es zeigte sich eine stabile Expression des Fusionsproteins. Auch konnte pUS9 sowohl in Western Blot Analysen als auch in indirekten Immunfluoreszenztests nachgewiesen werden.

Zusammenfassend zeigte sich, dass eine stabile Expression von pUS9 bei HSV-1 KOS nicht stattfindet und HSV-1 KOS offenbar eine natürliche pUS9 Nullmutante darstellt.

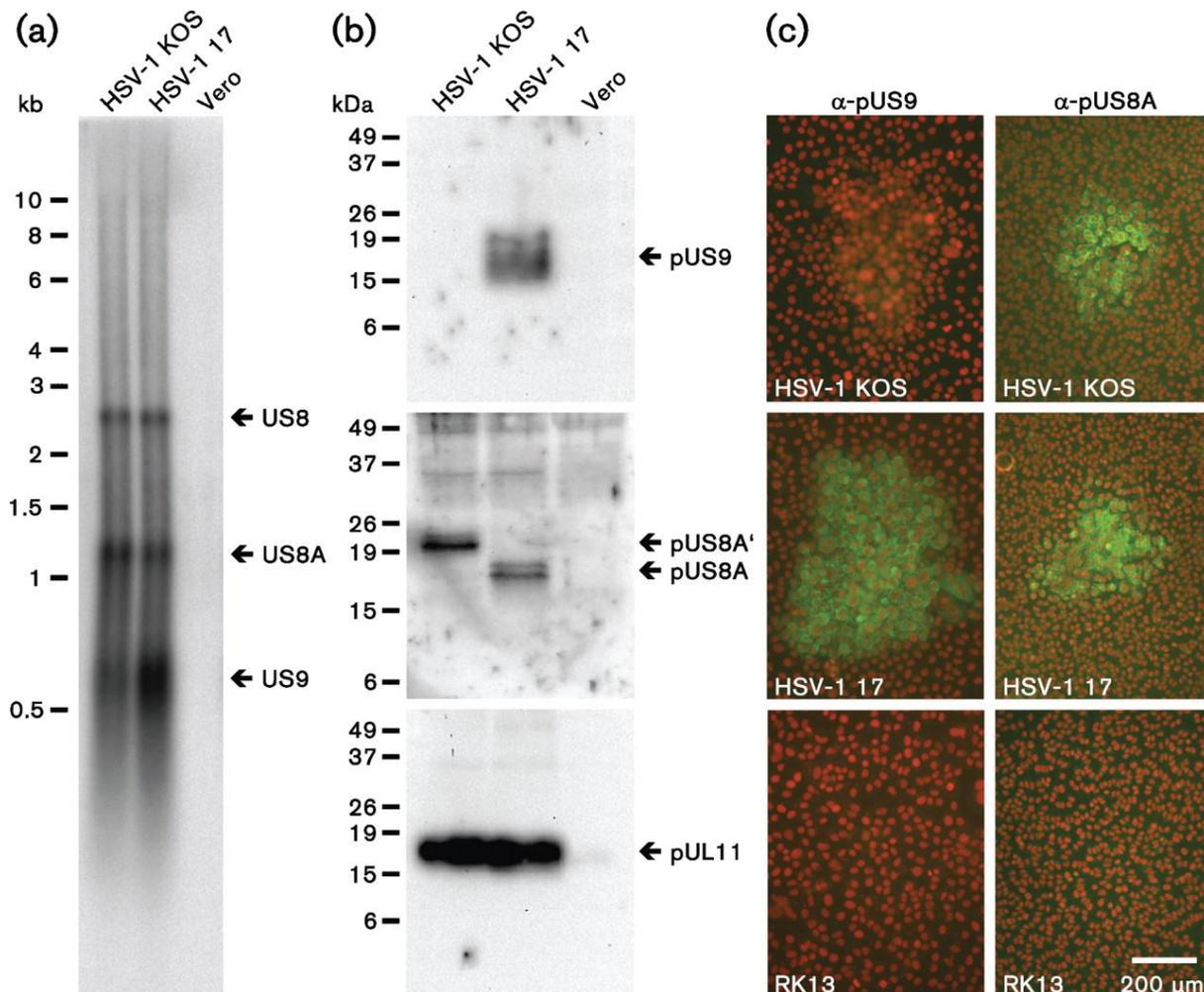


Abb. 30: **Vergleichende Darstellung der Genexpression von US8a und US9 von HSV-1 KOS und 17.** (a) Northern Blot Analyse: Die Verringerung der US9 spezifischen Bande von HSV-1 KOS infizierten Zellen bei 0.6 kb ist sichtbar im Vergleich zu HSV-1 17. (b) Western Blot Analyse: Bei HSV-1 KOS kann keine Expression einer US9 Bande detektiert werden. Die durch die Mutation vorausgesagte Vergrößerung des US8a Protein auf 20.2 kDa ist sichtbar. Als Kontrolle wurde pUL11 verwendet. Bei HSV-1 17 findet sich sowohl die erwartete Bande für US9 als auch die erwartete Bande von pUS8a bei 16.8kDa. (c) Indirekte Immunfluoreszenzanalysen: Bei HSV-1 KOS zeigte sich im Gegensatz zu HSV-1 17 eine minimale Fluoreszenzreaktion. Bei der Verwendung des Anti-US8a Serums wurden bei beiden Stämmen Fluoreszenzen detektiert. Als Kontrolle wurden nicht infizierte RK-13 Zellen verwendet (Abbildung aus NEGATSCH et al. 2011).

4.4.4 Herstellung und Charakterisierung von US8a und US9 HSV-1 17 Deletionsmutanten

Für weitere Analysen der Membranproteine pUS9 und pUS8a wurden Deletionsmutanten des Stamms HSV-1 17 hergestellt und charakterisiert. Hierfür wurde ein Red Rekombinasesystem verwendet. Bei diesem System liegt das gesamte herpesvirale Genom als *bacterial artificial chromosome* in *E.coli* vor und kann beliebig in Bakterien vermehrt und mutagenisiert werden. Für diese Arbeit wurde der virale BAC von GIERASCH und et al. (2006) verwendet. Bei dieser Konstruktion ist die BAC-Kassette zwischen den UL37- und UL38 Genen integriert und von loxP Stellen flankiert. Zusätzlich ist eine Chloramphenicolresistenzkassette vorhanden.

4.4.4.1 Generierung der Transferplasmide

Für die nachfolgende BAC-Mutagenese wurden zunächst entsprechende Transferplasmide konstruiert. Als Plasmid wurde pBluescript (pBI) verwendet. Analog zu den Plasmidkonstruktionen für die Sequenzanalysen (siehe 4.4.1 und Abb. 28) wurde auch hier der Bereich von US8a und US9 amplifiziert und unter Verwendung der Spaltstellen *EcoRI* und *XhoI* in das Plasmid eingefügt (pBIH17US8a,9). Sequenz- und Restriktionsanalysen bestätigten die Klonierung. Für die Deletion im Bereich der Genregion US9 wurde die Restriktionsendonuklease *BseRI* gewählt und für die Genregion US8a wurde das Restriktionsenzym *BstBI* verwendet. Die gewünschten Bereiche wurden deletiert und erneut in Sequenz- und Restriktionsanalysen überprüft. Anschließend wurde eine Kanamycinkassette flankiert von spezifischen FRT-Sites ebenfalls in den Vektor kloniert. Dafür wurde das Plasmid pKD13 mit der Restriktionsendonuklease *BstBI* gespalten und einer Klenowbehandlung unterzogen. Das Insert wurde anschließend an Stelle des deletierten Genabschnitts integriert. Die generierten Plasmide pBIH17 Δ US8akan und pBIH17 Δ US9kan wurden anschließend für die weiteren Schritte der BAC-Mutagenese verwendet.

4.4.4.2 BAC-Mutagenese

Für die anschließende BAC-Mutagenese wurden die konstruierten Plasmide verwendet. Dafür wurde das jeweilige Plasmid zunächst mit der Restriktionsendonuklease *DraI* linearisiert und mittels PCR unter Verwendung der Primer US8aF und US9 R der entsprechende Abschnitt amplifiziert. Anschließend folgte die Transformation mittels Elektroporation in die HSV-1 BAC tragenden Bakterien. Für eine homologe Rekombination wurde das Helferplasmid pKD46 benötigt, welches die Red Rekombinase unter Kontrolle des Arabinose-induzierbaren Promoters (P_{Ara}) exprimiert. Das Helferplasmid wurde zuvor in den viralen BAC transformiert. Nach Rekombination erfolgte eine Selektion der rekombinanten Klone mit Chloramphenicol (vermittelt durch den HSV-1 BAC) und Kanamycin. Die rekombinanten Klone wurden mittels Southern Blot Hybridisierung und Sequenzierung überprüft. Anschließend wurde die Kanamycinkassette durch das Helferplasmid pCP20 wieder entfernt. Dabei wurde das FLP-Rekombinase System verwendet. Die rekombinanten Klone wurden mittels Chloramphenicol selektiert und erneut auf die gewünschte Deletion hin untersucht. Zur Entfernung der BAC-Kassette wurde das Cre/loxP System verwendet. Die BAC DNA der rekombinanten Klone wurde isoliert. Anschließend folgte eine Co-Transfektion auf Verozellen mit dem Plasmid pMC-Cre, welches für die Cre Rekombinase codiert. Nach Ausbildung eines CPE wurden Plaquetests auf Verozellen durchgeführt und es folgten mehrere Plaquereinigungen.

In Southern Blot Hybridisierungen und Sequenzierung wurde die Anwesenheit der gewünschten Mutation bestätigt. Auch Western Blot Analysen zeigten keine Expression von pUS9 (siehe Abb. 31) oder pUS8a (hier nicht dargestellt). Die erhaltenen Viren wurden anschließend auf ihre Funktionalität überprüft und charakterisiert.

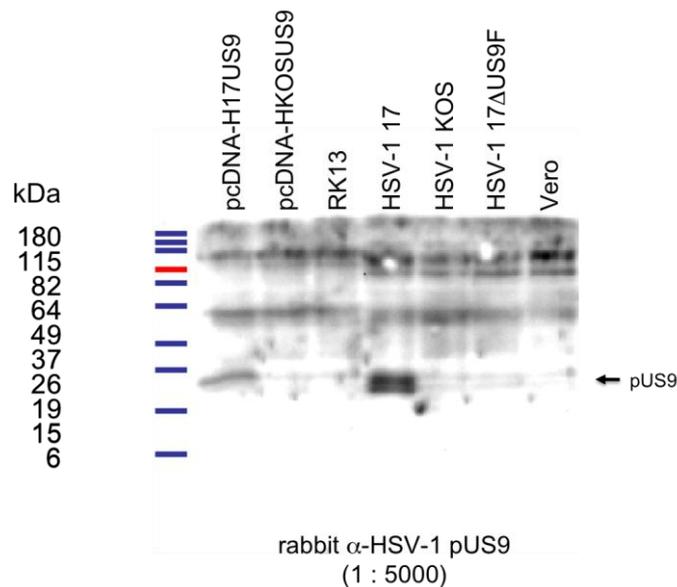


Abb. 31: **Überprüfung der neu generierten HSV-1 17 Δ US9F Virusmutante nach BAC Mutagenese durch Western Blot Analyse.** Nur bei HSV-1 17 und dem Plasmidkonstrukt pcDNAH17US9 wird eine Expression einer typischen pUS9 Bande sichtbar. Wie erwartet wird bei der HSV-1 17 Δ US9F Virusmutante keine spezifische Bande detektiert. Als Kontrolle wurden RK-13 und Verozellen, sowie HSV-1 KOS und pcDNA-HKOSUS9 mitgeführt.

4.4.4.3 Charakterisierung

Die Charakterisierung der Deletionsmutanten erfolgte durch Ein-Stufen-Wachstumskinetiken und Plaquegrößenanalysen. Es wurden jeweils 3 voneinander unabhängige Versuche durchgeführt. Dazu wurden HSV- 1 17, HSV- 1 Δ US8aF, HSV-1 17 Δ US9F und HSV-1 17lox/P verwendet. Dabei handelte es sich um den Ausgangswildtypstamm von HSV-1 17, um die 2 generierten Deletionsmutanten und um den Rescuewildtypvirus, der aus dem verwendeten Ausgang HSV-1 17 BAC generiert wurde.

4.4.4.3.1 Ein-Stufen-Replikationskinetik

In den durchgeführten Analysen zeigte sich eine produktive Replikation bei den Deletionsmutanten und beim Rescuewildtypvirus. Im Vergleich zum Wildtypvirus ist das Wachstum jedoch deutlich geringer und es werden nicht so hohe Virustiter erreicht. Die Differenz beträgt zwischen 2 und 3 Logstufen je nach Zeitwert (Abb. 32). Es wurden 3 voneinander unabhängige Versuche durchgeführt.

4.4.4.3.2 Plaquegrößenanalyse

Bei Plaquegrößenanalysen konnten keine Auffälligkeiten im Vergleich zum Wildtypvirus detektiert werden. Es zeigte sich eine produktive Infektion mit vergleichbaren Werten zum Wildtypvirus (siehe Abb. 33). Es wurden 3 voneinander unabhängige Versuche durchgeführt.

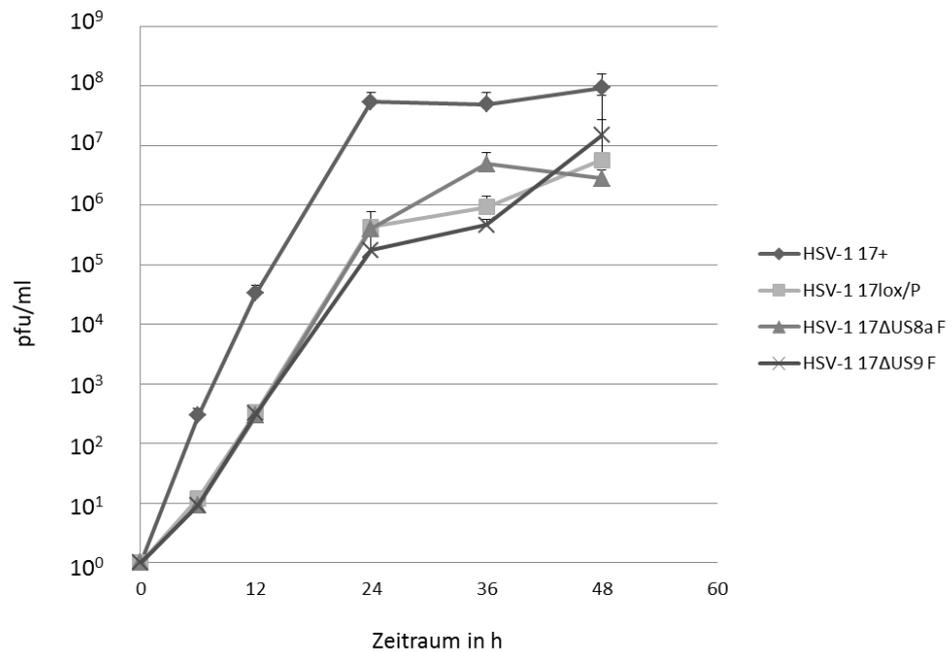


Abb. 32: **Ein-Stufen-Wachstumskinetik der neu generierten HSV-1 17 Deletionsmutanten im Vergleich zu HSV-1 17 Wildtyp.** Alle 4 verwendeten Viren zeigen eine produktive Replikation. Es wurden 3 voneinander unabhängige Analysen durchgeführt

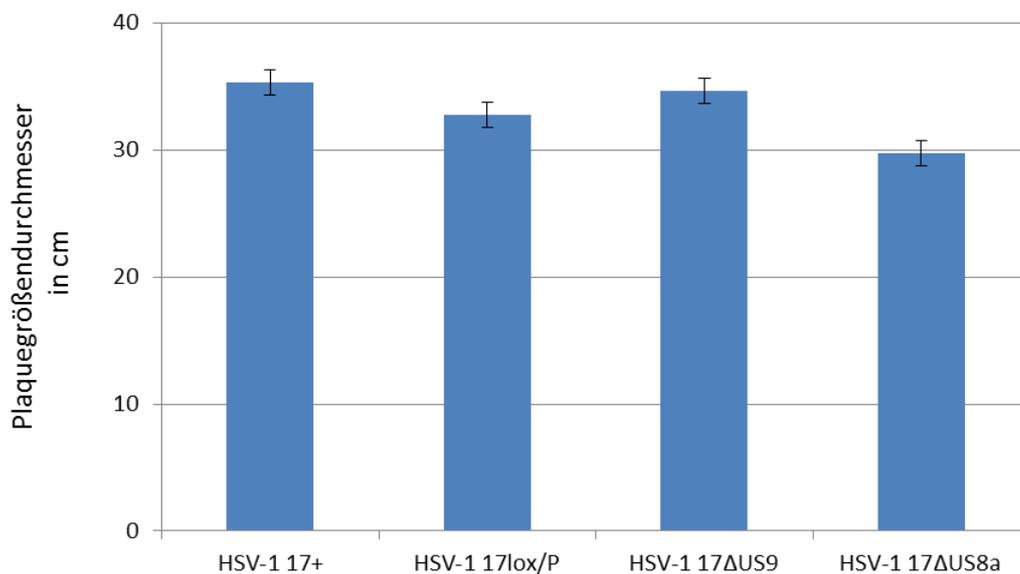


Abb. 33: **Plaquegrößenanalyse der neu generierten HSV-1 17 Deletionsmutanten im Vergleich zum HSV-1 17 Wildtyp.** Es zeigt sich eine produktive Replikation mit geringen Abweichungen zum Ausgangswildtypvirus. Es wurden 3 voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.

5 Diskussion

Beim intraaxonalen Transport der Alphaherpesviren handelt es sich um einen bidirektionalen, aktiven durch Mikrotubuli vermittelten Transport (SMITH et al. 2001). Zwei Transportrichtungen retrograd und anterograd werden unterschieden. Beim retrograden Transport werden die Viruspartikel vom Ort der Primärinfektion zum Ort der Latenzbildung transportiert. Dieser Vorgang ist gut untersucht. Dabei werden Nukleokapside assoziiert mit den inneren Tegumentproteinen pUL36, pUL37 und pUS3 entlang des Axons transportiert (ZAICHICK et al. 2013, AGGERWAL et al. 2012, ANTINONE und SMITH 2009). Vermittelt wird dieser Vorgang durch die zellulären Motorproteine Dynein und Dynaktin (DIEFENBACH et al. 2008). Der anterograde Transport beschreibt dagegen den Transportweg nach der Reaktivierung zum Ort der Primärinfektion. Die Folge ist die erneute Ausscheidung infektiöser Viren. Auch dieser Transport ist aktiv und wird durch das Kinesin Motorprotein, Kif1A, vermittelt (KRAMER et al. 2012, LO et al. 2010). Der anterograde intraaxonale Transportvorgang der Alphaherpesviren wird kontrovers diskutiert (SMITH. 2012, KRATCHMAROV et al. 2012, CURANOVIC und ENQUIST 2009, DIEFENBACH et al. 2008). Zwei Modelle wurden bislang beschrieben. Beim Married Model werden neu synthetisierte behüllte Virionen innerhalb von Vesikeln entlang des Axons transportiert. Die Freisetzung erfolgt an der Synapse bzw. am Wachstumskegel. Dieses Modell wurde lange für PrV favorisiert und schließlich durch zahlreiche in vivo und in vitro Studien unter Verwendung von Elektronenmikroskopie, Live-Cell-Imaging und Fluoreszenzmikroskopie bestätigt. Dabei wurden sowohl Explantat- als auch Kammersysteme zur Analyse verwendet. Beim Subassembly Model dagegen sollen die neusynthetisierten viralen Strukturkomponenten Nukleokapsid (assoziiert mit dem inneren Tegument) und Glykoproteinhülle separat entlang des Axons transportiert werden. Der Zusammenbau und die Freisetzung erfolgt entweder an der Synapse bzw. am Wachstumskegel oder an speziellen Auftreibungen (engl. *Varicosities*) entlang des Axons. Dieses Modell wurde lange Zeit für HSV-1 vermutet. Jedoch gaben ältere und aktuelle Studien eher Hinweise auf das Married Model. Die Varianz innerhalb der verwendeten Analysetechniken, Virusstämmen und neuronalen Kultursystemen ist aber so hoch, dass eine Vergleichbarkeit der Analysen untereinander nicht möglich ist (KRATCHMAROV et al. 2012). So wurden zur Darstellung des anterograden Transportweges neben Elektronenmikroskopie auch Live-Cell-Imaging- und Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt. Für die benötigten neuronalen Primärkultursysteme wurden Ratten-, Mäuse-, Hühner- oder auch menschliche Embryonen genutzt. Dabei wurden meistens obere Cervikalganglien oder Spinalganglien für die Neuronenkulturen verwendet, die zur weiteren Analyse im Explantatsystem oder auch Kammersystem genutzt wurden (KRATCHMAROV et al. 2012).

Aufgrund dieser Problematik war das Ziel dieser Arbeit, zum ersten Mal ein einheitliches Kultur- und Analysesystem für die Untersuchungen des intraaxonalen anterograden Transports von PrV und HSV-1 einzusetzen. Als Analysemethode wurde die Elektronenmikroskopie gewählt. Das zuvor erfolgreich etablierte Explantatsystem von MARESCH et al. (2010) wurde auch für die weiteren Analysen von HSV-1 benutzt. Es wurden 4 verschiedene HSV-1 Stämme HSV-1 HFEM, HSV-1 17+, HSV-1 SC16 und HSV-1 KOS für die Untersuchung verwendet, um mögliche Unterschiede zu detektieren. Die hierfür verwendeten neuronalen Explantate wurden aus oberen Cervikalganglien von Rattenembryonen gewonnen. Das obere Cervikalganglion wurde schon

häufig erfolgreich für neuronale Transportanalysen bei Alphaherpesviren eingesetzt (CURANOVIC et al. 2009, CH'NG et al. 2005) und ist seit 1969 von SCOTT et al. (1969) für die Neuronenkultur etabliert. Die neuronalen Explantate wurden mit den verschiedenen HSV-1 Stämmen infiziert und nach 16 - 20 h elektronenmikroskopisch analysiert. Die Infektion erfolgte analog zu den vorher durchgeführten Experimenten mit PrV (MARESCH et al. 2010). Bei der elektronenmikroskopischen Analyse konnte bei allen 4 HSV-1 Stämmen in den Zellkörpern der Ganglien eine produktive Infektion in Form von typischen Stadien der Virusmorphogenese wie z.B. dem Nuclear Egress oder der Tegumentierung nachgewiesen werden. Alle vier Stämme waren auch in der Lage in den neuronalen Explantaten zu replizieren. Das deutete auf eine gute Qualität der Neuronen hin und bestätigte die Lebens- und Transportfähigkeit der Primärkulturen.

Die elektronenmikroskopische Auswertung der Axone und Wachstumskegel ergab bei den HSV-1 Infektionen unterschiedliche Ergebnisse. Grundsätzlich konnten deutlich weniger Viruspartikel im Axon detektiert werden, als nach einer entsprechenden Infektion mit PrV. Der Virusstamm HSV-1 HFEM zeigte die meisten Viruspartikel. Im Vergleich zu einer PrV Infektion war er jedoch um das 5-10 fache reduziert (MARESCH et al. 2010). Diese Ergebnisse deckten sich mit einer effizienteren und schnelleren Infektion von PrV, die auch schon in vivo an Mäusen gezeigt werden konnte (KLOPFLEISCH et al. 2006, POMERANZ et al. 2005). Jedoch konnten ausreichend Viruspartikel zur Analyse detektiert werden. So zeigte sich, dass bei HSV-1 HFEM 72% der Viruspartikel als behüllte Virionen in Vesikeln vorlagen und nur 28% als nackte Kapside. Demnach wird von HSV-1 HFEM eher das Married Model als anterogrades Transportmodell genutzt. Bei PrV wurden 90% der Partikel behüllt in Virionen transportiert und nur 10% als nackte Kapside detektiert (MARESCH et al. 2010). Die HSV-1 Stämme 17+ und SC16 zeigten ein ähnliches Bild wie HSV-1 HFEM. 75% der Viruspartikel wurden als behüllte Virionen in Vesikeln detektiert und nur 25% als nackte Kapside. Dies lässt ebenfalls auf eine Nutzung des Married Models als bevorzugtes Transportmodell schließen. Ähnliche Ergebnisse konnten ANTINONE et al. (2010) in einer Live-Cell-Imaging Studie zeigen. Dabei wurden ein Kapsidprotein und das Glykoprotein gB mit GFP fusioniert. Es zeigte sich, dass 65-70% der Partikel eine Colokalisierung aufwiesen. HUANG et al. (2010) verglichen zum ersten Mal HSV-1, HSV-2 und PrV in einem Drei-Kammer-System. Auch hier ließen die elektronenmikroskopischen Aufnahmen Rückschlüsse auf das Married Model zu. In bisher durchgeführten elektronenmikroskopischen Studien zeigte sich, dass bei HSV-1 eher das Subassembly Model als Transportmodell genutzt wird und somit einzelne Strukturkomponenten entlang des Axons transportiert werden, die dann an Verdickungen des Axons (DEREGGE et al. 2006) oder an der Synapse bzw. Wachstumskegel (MIRANDA-SAKSENA et al. 2002) zusammengebaut und anschließend freigesetzt werden. Von PENFOLD et al. (1994) wurde dieses Model zum ersten Mal beschrieben und durch weitere elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigt (IBIRICU et al. 2011, MIRANDA-SAKSENA et al. 2009, 2000, SAKSENA et al. 2006). Parallel ergaben fluoreszenzmikroskopische Studien ebenfalls Hinweise auf das Subassembly Model (SNYDER et al. 2006, 2007, 2008). Dazu wurden Antiseren gegen verschiedene Glykoproteine und das Hauptkapsidprotein pUL19 verwendet. Früh durchgeführte elektronenmikroskopische Studien dagegen zeigten eher behüllte Virionen während des anterograden Transportes von HSV-1 (LYCKE et al. 1988, COOK et al. 1973, HILL et al. 1972). Diese kontroversen Ergebnisse lassen sich möglicherweise durch die unterschiedlichen Analysetechniken und die verschiedenen Analysesysteme erklären. KRATSCHMAROV et al. (2012) erstellten eine Übersicht über die bisher durchgeführten Analysemethoden und befassten sich mit der Problematik des kontrovers diskutierten Ablauf des intraaxonalen Transportweges bei

PrV und HSV-1. Auch hier wird die Vielzahl und Varianz der einzelnen Systeme deutlich, die einen Vergleich kaum zulassen. Auch könnte mittlerweile der Fortschritt der modernen Analysetechnik die abweichenden Ergebnisse erklären. KRATCHMAROV et al. (2012) weisen beispielsweise daraufhin, dass ein Ausbleiben einer Colokalisierung bei Immunfluoreszenzstudien auch auf eine fehlende Antikörperbindung z.B. durch eine fehlerhafte Behandlung und dadurch schlechten Permeabilität der neuronalen Kulturen hinweisen könnte. Mögliche Abweichungen in der Interpretation von ultrastrukturellen Aufnahmen könnten durch die schlechte Bildqualität zustande gekommen sein. Auch mögliche Reinfektionen und somit retrograd transportierte Viruspartikel müssen ggf. neu bewertet werden. Weiter lassen die unterschiedlichen verwendeten neuronalen Kultursystem wie z.B. bei IBIRICU et al. (2011), wo kurz ausgewachsene Trigeminalganglien verwendet werden, keine genauen Vergleiche zu. So mussten auch bei PrV durch neuere und qualitativ hochwertigere Analysemethoden Ergebnisse, die zunächst auf das Subassembly Model hinwiesen, neu bewertet werden (CURANOVIC et al. 2009, METTENLEITER et al. 2003, ENQUIST et al. 1999). WISNER et al. (2011) weisen in ihrer Studie auf die Möglichkeit hin, dass ggf. beide Transportwege von HSV-1 parallel genutzt werden könnten, wobei das Subassembly Model dominieren soll. Zur weiteren klärenden Analyse müssen vergleichende Untersuchungen möglichst in einem gerichteten Analysesystem, wie z.B. im modifizierten Drei-Kammer-System, unter identischen Bedingungen durchgeführt werden.

Erstaunlicherweise zeigte sich bei der ultrastrukturellen Analyse von HSV-1 KOS Explantaten ein anderes Ergebnis. Hier wurden 70% der Viruspartikel als nackte Kapside und nur 30% als behüllte Virionen in Vesikeln detektiert. Ob dieser Stamm wirklich das Subassembly Model nutzt, wie in vorherigen elektronenmikroskopischen Analysen beschrieben oder ein anderer Defekt den unterschiedlichen Phänotyp erklärt, sollte weiter untersucht werden. Fokussiert wurde dabei insbesondere die Genregion um US9.

Die Gene US7, US8 und US9 codieren für die Proteine gI, gE und pUS9. Diese stehen im Fokus als virale Vermittler der anterograden Transportvorgänge und sollen insbesondere beim Vorgang des Axonal Sortings eine bedeutende Rolle spielen (LYMAN et al. 2007, CH'NG und ENQUIST 2005, TOMISHIMA und ENQUIST 2001). Dabei liegt das Hauptaugenmerk auf dem pUS9. Die Proteine gE und gI, welche als heterodimerer Komplex vorliegen, sollen diese Vorgänge unterstützen und stabilisieren. Bei pUS9 handelt es sich um ein Transmembranprotein vom Typ II, welches in den vom TGN abgehenden Vesikeln lokalisiert und mit sogenannten lipid-raft Mikrodomänen assoziiert ist (LYMAN et al. 2008, BRIDEAU et al. 1998). Aufgrund der Lokalisation ist es somit in der Lage, sowohl mit zellulären als auch mit viralen Interaktionspartnern zu agieren und das Axonal Sorting zu vermitteln. Innerhalb der Alphaherpesviren ist es konserviert und liegt vorwiegend phosphoryliert vor (KRATCHMAROV et al. 2013, LYMAN et al. 2009). Es ist nicht abschließend geklärt, ob pUS9 nur am Prozess des Axonal Sortings oder auch am axonalen Transport direkt beteiligt ist (CURANOVIC und ENQUIST 2009). Aktuell wird vermutet, dass pUS9 durch die Lokalisation in den vom TGN abgehenden Vesikeln in seiner phosphorylierten Form die Interaktion von Vesikeln und Motorproteinen, insbesondere mit dem Kinesin-3-Motorprotein Kif1A, vermittelt (KRAMER et al. 2012, CURANOVIC und ENQUIST 2009). Die mögliche Relevanz von pUS9 bei PrV und HSV-1 wird ähnlich wie die anterograden intraaxonalen Transportvorgänge kontrovers diskutiert (SMITH 2012, CURANOVIC und ENQUIST 2009, DIEFENBACH et al. 2008). Bei PrV konnten verschiedene Studien in vivo und in vitro zeigen, dass pUS9 für anterograde Transportvorgänge benötigt wird (TAYLOR et al. 2012, LYMAN et al. 2007, BRIDEAU et al. 2000).

Bei HSV-1 wird pUS9 von einigen als essentiell und von anderen als nicht essentiell für anterograde Transportvorgänge angesehen (HOWARD et al. 2013, MCGRAW et al. 2009, LAVAIL et al. 2007). Selbst bei der Untersuchung von 2 unterschiedlichen HSV-1 Stämmen zeigten sich verschiedene Ergebnisse (SNYDER et al. 2008). Im Hinblick auf diese Problematik und den abweichenden Phänotyp von HSV-1 KOS sollten mögliche weiterführende Analysen auf der genetischen Ebene bezüglich der Genregion US9 mögliche Erklärungen für die gegensätzlichen Ergebnisse bei der Analyse von HSV-1 KOS im Vergleich zu den 3 anderen HSV-1 Stämmen aufzeigen.

Für Sequenzanalysen bezüglich der US9 Genregion von HSV-1 KOS wurde als Vergleich der Virusstamm HSV-1 17 verwendet. HSV-1 17 wurde für die Herstellung der ersten Genomsequenz von HSV-1 benutzt (MCGEOCH et al., 1985,1988; GenBank accession no. 14112). Bei HSV-1 17 stimmte die erhaltene Sequenz zu 100% mit der Gendatenbank überein. Bei HSV-1 KOS dagegen zeigten sich innerhalb des untersuchten 971 bp großen Fragments 3 Punktmutationen. Dadurch weist HSV-1 KOS an der vorhergesagten TATA-Box von US9 eine Mutation auf. Zusätzlich trägt das offene Leseraster durch eine weitere Mutation ein vorzeitiges Stopcodon auf und wird dadurch auf 58 Kodons reduziert, im Gegensatz zu anderen HSV-1 Stämmen, wo es 91 Kodons umfasst. Die Mutation an der TATA-Box verändert auch das ursprüngliche Stopcodon vom US8a Gen was zur einer Verlängerung von ursprünglich 161 zu 191 Kodons führt. Da alle 3 Mutationen in der Lage wären, erheblichen Einfluss auf die Genexpression und die Funktionalität von pUS9 zu nehmen, wurden weitere Analysen durchgeführt. Dabei konnten Analysen zur Genexpression den Verdacht bestätigen. So zeigte sich bei Northern Blot Analysen eine Reduzierung der US9 spezifischen Bande um 65% im Gegensatz zur detektierten Bande bei HSV-1 17. Weiter konnten weder bei Western Blot Analysen noch bei der Durchführung eines indirekten Immunfluoreszenztests ein funktionelles Genprodukt von US9 bei HSV-1 KOS nachgewiesen werden. Lediglich im indirekten Immunfluoreszenztest war eine schwache Reaktion bei HSV-1 KOS infizierten Zellen zu detektieren, was wahrscheinlich an einer unspezifischen Reaktion vom Antiserum mit dem Fc-Part von gE liegt. Eine Nichterkennung des verwendeten Antiserums gegen den N-terminalen Part von pUS9 in Folge des nicht exprimierten C-Terminus konnte ausgeschlossen werden. So lässt sich zeigen, dass die 2. und 3. detektierte Mutation im Bereich der Genregion von US8a und US9 einen erheblichen Einfluss auf die Proteinfunktion von US9 hat. So bewirkt die Mutation der TATA Box eine geringere US9 Transkription und die ausbleibende Expression des C – Terminus in Folge des Stopcodons lässt folgern, dass pUS9 nicht mehr als funktionelles Membranprotein vorliegt. Zusammenfassend scheint eine stabile Expression von pUS9 nicht stattzufinden. Im Gegensatz dazu konnte bei den Analysen zu US8a keine Unterschiede zur Gen- und Proteinexpression festgestellt werden. In Western Blot Analysen zeigte sich die vorhergesagte Vergrößerung des Proteins in Folge der zweiten Mutation. Allerdings lassen sich die Auswirkungen der Mutation im Bereich des US8a Gen schwer abschätzen, da bislang die Funktion von US8a gänzlich unbekannt ist (DAVISON et al. 2010). MCDONALD et al. (2012) untersuchten die komplette Genomsequenz von HSV-1 KOS. Die hier gefundenen Mutation im Bereich US8a und US9 konnte bestätigt werden. Auch in der Studie von IBIRICU et al. (2011) wurde die hier beschriebene Mutation bestätigt.

Dass HSV-1 KOS eine natürlich US9 Nullmutante darstellt, lässt die vorherigen Ergebnisse neu bewerten. So könnte es sein, dass es sich bei den beobachteten, überwiegend nackten Kapsiden, um retrograd transportierte Kapside handelt, da eine gerichtete Transportanalyse im

Explantatsystem nicht durchgeführt werden kann. Es könnte sich hierbei um eine Reinfektionen handeln. Die detektierten behüllten Virionen in Vesikeln könnten anterograd transportierte Partikel darstellen, wie dies auch bei den restlichen HSV-1 Stämmen beobachtet werden konnte. Der Transport würde auch hier wie bei den anderen Stämmen dann bevorzugt nach dem Married Model verlaufen. Das Protein pUS9 bei HSV-1 könnte demnach eine ähnlich wichtige Rolle wie bei PrV einnehmen (HOWARD et al. 2013). Der anterograde intraaxonale Transport kommt bei PrV und HSV-1 durch einen Wegfall von pUS9 nicht gänzlich zum Erliegen, ist aber stark reduziert (HOWARD et al. 2013, SMITH. 2012). So könnte es auch hier Hinweise für einen reduzierten Transport von HSV-1 KOS durch die natürlich Deletion von pUS9 geben. In der Vergangenheit wurde HSV-1 KOS häufig für entsprechende Analysen genutzt. Sowohl in Zellkultur als auch in vivo konnte eine effiziente Replikation gezeigt werden (DIX et al. 1983). Jedoch wurde auch hier von einer attenuierten Neurovirulenz berichtet. Diese wurde bisher jedoch anderen Genregionen zugeordnet (PERNG et al. 2002, THOMPSON et al. 1986). Im Hinblick auf diese Problematik sequenzierten MACDONALD et al. (2012) das komplette Genom von HSV-1 KOS. Im Vergleich zur Genomsequenz von HSV-1 17 wurden zahlreiche Unterschiede detektiert. Weitere Analysen lassen in Zukunft gegebenenfalls Rückschlüsse auf das veränderte Pathogeneseverhalten von HSV-1 KOS zu. Zur weiteren Klärung bezüglich des Transportverhaltens und der Rolle des Transmembranproteins pUS9 sind Untersuchungen in einem gerichteten Transportsystem, sowie die Charakterisierung entsprechender Deletionsmutanten notwendig.

Für weitere Analysen wurden deshalb von HSV-1 17 Deletionsmutanten von US8a und US9 mittels BAC Mutagenese generiert und charakterisiert (GIERASCH et al. 2006). Bei der Analyse zeigte sich, dass die Proteine, wie erwartet, für die Virusreplikation in Zellkultur nicht notwendig sind. In Wachstumskinetiken und Plaquegrößenanalysen konnte gezeigt werden, dass die Deletionsmutanten ein produktives Replikationsverhalten ähnlich dem Wildtypvirus aufweisen. LAVAIL et al. (2007) zeigten ähnliche Ergebnisse für eine US9 Deletionsmutante von HSV-1 F. Auch hier wurde für die Deletion das Restriktionsenzym *BseRI* gewählt. Es zeigten sich keine Unterschiede im Replikationsverhalten in Zellkultur im Vergleich zum Wildtypvirus. Genauso wenig wie bei MCGRAW et al. (2009), die eine US9 Nullmutante von HSV-1 NS analysierten.

Um den anterograden Transport spezifischer untersuchen zu können, sind vor allem Kammersysteme gut geeignet. Beim Kammersystem besteht die Möglichkeit, die Transportwege gerichtet zu analysieren und zwischen anterograder und retrograder Transportrichtung zu unterscheiden. Dafür wurden in der Vergangenheit häufig modifizierte Drei-Kammer-Systeme nach CAMPENOT. (1977) eingesetzt (CURANOVIC et al. 2009, CH'NG und ENQUIST 2006, CH'NG et al. 2005). Die Einteilung erfolgt hier in ein S (Soma) - , ein M (Mittleres) - und ein N (Neuriten) - Kompartiment. Die dissoziierten neuronalen Zellen werden ins S-Kompartiment eingesät und wachsen entlang vorher gesetzter Rillen zum N-Kompartiment aus. Die einzelnen Kompartimente werden durch eine Silikon- und Methocelschicht abgedichtet und so voneinander abgetrennt. Nur die Axone sind in der Lage, diese Barrieren zu passieren. Die neuronalen Kulturen benötigen ca. 14 Tage zum Auswachsen. Für die Analyse des anterograden Transports werden die neuronalen Kulturen im S-Kompartiment infiziert und nach 18-24h in allen 3 Kompartimenten analysiert. Bei PrV wurde dieses Kammersystem schon häufig für Transportanalysen verwendet. So konnte hierbei bestätigt werden, dass PrV das Married Model als Transportmodell für den anterograden Transport nutzt (TAYLOR et al. 2012, HUANG et al. 2010, CH'NG und ENQUIST 2005). Auch bei HSV-1 kam es für Transportanalysen erstmalig zum Einsatz (HUANG et al. 2010). Als

Analysemethode beim Drei-Kammer-System wird häufig die Live-Cell-Imaging Mikroskopie verwendet. Aber auch elektronenmikroskopische Studien sind möglich. Ein großes Problem stellt dabei jedoch die mangelnde Bildqualität dar. HUANG et al. (2010) konnten nicht eindeutig zwischen Viruspartikeln und Neurovesikeln unterscheiden. Auch andere Aufnahmen zeigten nicht die Qualität, wie im Explantatsystem (MARESCH et al. 2010). Deshalb war es Ziel dieser Arbeit, das Drei-Kammer-System so zu modifizieren, dass es auch für ultrastrukturelle Analysen mit optimaler Bildqualität genutzt werden kann. Das modifizierte Drei-Kammer-System basierte auf dem Protokoll von CURANOVIC et al. (2009). Die Modifizierung bestand darin, dass die Mittelstege mit dem herkömmlich verwendeten Silikon (Dow Corning), die Außenkante aber mit einem zweiten Silikon (Elastosil) verklebt wurden. Die neue Verklebung führte zu einer besseren Abdichtung der Kompartimente und zu einer einfacheren und schnelleren Handhabung bei der Generierung. Der Ausschuss durch undichte Kammersysteme konnte erheblich minimiert werden. Weiterhin ist es mit dieser Technik möglich, die 3 Kompartimente der Kammer einzeln elektronenmikroskopisch zu analysieren. Bisher mussten die Kammer bzw. der Teflonring nach einer Fixierung zunächst entfernt und anschließend alle Kompartimente zusammenhängend analysiert werden (CURANOVIC et al. 2009). Durch die Modifizierung ist es nun möglich, nach der Fixierung, die einzelnen Kompartimente innerhalb der Kammer separat aufzuarbeiten und so die Teflonringe auf den Kulturen zu belassen. So konnten mögliche mechanische Schäden an den aufwendig hergestellten Kulturen vermieden werden. Es entstanden pro Kammer 3 einzelne Epoxidharzblöcke, die zur elektronenmikroskopischen Analyse verwendet werden konnten.

Zur funktionellen Charakterisierung des neuen modifizierten Drei-Kammer-Systems wurden Live-Cell-Imaging und elektronenmikroskopische Analysen durchgeführt. Für die Live-Cell-Imaging Analysen wurden PrVKaplanUL35gfp und PrV Δ US9UL35gfp eingesetzt. Für die elektronenmikroskopischen Analysen wurden zunächst nicht infizierte neuronale Kulturen untersucht, später mit PrV Kaplan infizierte Systeme. Durch die eindeutige elektronenmikroskopische Charakterisierung von PrV Kaplan im Explantatsystem (MARESCH et al. 2010) und auch in Live-Cell-Imaging Studien (MARESCH. 2010) eignete es sich hervorragend als Kontrolle für die Etablierung des modifizierten Drei-Kammer-Systems. Besonders die schnelle Replikationsrate lässt eine zuverlässige Analyse erwarten. Die PrV Δ US9UL35GFP Mutante wurde wegen ihres Transportdefektes bezüglich des anterograden Transportes ausgesucht. So konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass pUS9 bei PrV für die anterograde Ausbreitung der Infektion von großer Bedeutung ist (LYMAN et al. 2007, TOMISHIMA und ENQUIST 2001, BRIDEAU et al. 2000). MARESCH. (2010) beschreibt bereits einen beobachteten Transportdefekt innerhalb 24h nach Infektion. Auch hier wurde die Mutante PrV Δ US9UL35GFP genutzt. Weiterhin sollte die Transportfähigkeit der Neuronen im modifizierten Drei-Kammer-System getestet werden. Besonderer Wert wurde bei der Analyse aber auch auf eine Überprüfung der Dichtigkeit zwischen den Kompartimenten und der Funktionsfähigkeit der kultivierten Neuronen gelegt.

Für die Live-Cell-Imaging Analysen wurden die Präparate mit rekombinanten grün fluoreszierenden Viren infiziert und zwischen 18 und 24 Stunden nach Infektion beobachtet. Bei der Infektion mit PrV KaplanUL35gfp zeigte sich eindeutig eine produktive Infektion in den infizierten Zellkörpern im S-Kompartiment, wie auch in den Axonen im M- und N-Kompartiment. Wie bei SMITH et al. (2001) konnte ein bidirektionaler aktiver Transport detektiert werden. Die Lebens- und Transportfähigkeit der Neuronen wurden durch einen speziellen Membran- und Vesikelmarker überprüft mit dem eindeutig die neuronale Membran wie auch Neurovesikel, die

entlang des Axons transportiert werden, dargestellt werden konnten. Der Fluoreszenzmarker wird oft verwendet, um neuronale Vesikel darzustellen. So nutzen BETZ und BEWICK (1992) den verwendeten Marker ebenfalls zur Darstellung synaptischer Vesikel. Bei der Infektion mit PrV Δ US9UL35gfp konnte wie erwartet zwischen 18 und 24h kein Transport von Viruspartikeln detektiert werden. Die Fluoreszenz war nur in den Zellkörpern im S-Kompartiment sichtbar. Einzig die Neurovesikel wurden ins M- und N-Kompartiment transportiert. Die Analysen bestätigten die bereits gewonnenen Ergebnisse von MARESCH. (2010) im Drei-Kammer-System nach CURANOVIC et al. (2009) im durchgeführten Beobachtungszeitraum von 18 bis 24h nach der Infektion.

Für ultrastrukturelle Analysen der neuronalen Kultursysteme wurden zunächst Aufnahmen von nicht infizierten dissoziierten Spinalganglien im Drei-Kammer-System erstellt, um anschließend die PrV Kaplan Infektionen zu analysieren. Die Infektion erfolgte im S-Kompartiment und wurde zwischen 18 und 24h analysiert. In den Aufnahmen der nicht infizierten modifizierten Drei-Kammer-Systeme zeigten sich im S-Kompartiment eindeutige zelluläre und axonale Strukturen. Sie sind mit den vorher detektierten neuronalen Strukturen im Explantatsystem vergleichbar (MARESCH et al. 2010). Im M- und N- Kompartiment dominierten, wie erwartet, ausschließlich axonale Strukturen. Die Qualität der Bilder ist herausragend, so können sowohl mikrotubuläre, als auch neurovesikuläre Strukturen eindeutig detektiert werden. Auch bei den mit PrV Kaplan infizierten neuronalen Kultursystemen sind die Viruspartikel gut zu erkennen. So werden im S-Kompartiment in den Zellkörpern eindeutig einzelne Stadien der Replikation wie z.B. die Tegumentierung detektiert, was auf eine produktive Infektion hinweist (MARESCH et al. 2010, GRANZOW et al. 1997). Weiterhin lassen diese Ergebnisse auf eine gute Lebens- und Transportfähigkeit der Neuronen schließen. Im M- und N-Kompartiment wurden überwiegend behüllte Virionen in Vesikeln detektiert. Dabei eignete sich das M-Kompartiment für die Darstellung am Besten. Schon CH'NG und ENQUIST (2005) nutzen für ihre elektronenmikroskopischen Studien das M-Kompartiment aufgrund der hohen axonalen Dichte als besten Ausgangspunkt für die Analyse. Wie in anderen Studien beschrieben ist eine Reinfektion nach einem bestimmten Zeitraum auch im Drei-Kammer-System nicht ausgeschlossen. So konnten nach einem längeren Analysezeitraum von 24h auch vereinzelt vorrausichtlich retrograd transportierte nackte Kapside detektiert werden. Auch in dieser Studie kann wieder bestätigt werden, dass PrV Kaplan das Married Model zum Transport verwendet. Das modifizierte Drei-Kammer-System steht nun zur weiteren Analyse des Transportverhaltens von HSV-1 und der Rolle von pUS9 zur Verfügung.

Parallel zum modifizierten Drei-Kammer-System wurde eine weitere primäre Neuronenkultur etabliert. So wurden nun auch Spinalganglien für das modifizierte Drei-Kammer-System verwendet. Dazu wurden von den Embryonen der Kopfbereich für die Präparation der oberen Cervicalganglien und der übriggebliebene Torso für die Präparation der Spinalganglien genutzt. Ein weiterer Vorteil der Spinalganglien liegt auch in einer einfacheren und präziseren Präparation. Das obere Cervicalganglion liegt in direkter Nachbarschaft zum Ganglion Nodosum. Eine Unterscheidung unter stereomikroskopischen Bedingungen ist oft schwierig (CH'NG et al. 2005). Jedoch ist das Ganglion Nodosum für eine primäre Zellkultur nicht geeignet. Fehlerhaft erstellte Präparate mussten dadurch verworfen werden. Die Lokalisationen von Spinalganglien sind eindeutig. Jedoch sind diese für Explantatanalysen weniger geeignet. Die Spinalganglien wurden nach der Präparation und Kultivierung ultrastrukturell und fluoreszenzmikroskopisch mit Hilfe eines Neuronenmarkers analysiert. Elektronenmikroskopisch zeigte sich die typische

Neuronenmorphologie, welche auch schon im Explantatsystem bei Verwendung der oberen Cervicalganglien beobachtet wurde (MARESCH et al. 2010). Bei den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen mit dem spezifischen Neuronenmarker β - III - Tubulin zeigten sich deutliche Reaktionen in Form von grünen Fluoreszenzsignalen. Auch hier konnten neuronale Zellkörper sowie axonale Strukturen identifiziert und differenziert werden. Der neuronenspezifische Marker wird standardmäßig zur Identifizierung und Charakterisierung von neuronalen Zellen eingesetzt und gilt als neuronenspezifisch (XU et al. 2012, MOODY et al. 1989). Nach der Präparation der Ganglien und einer Kultivierung von 24h wurde zusätzlich eine Behandlung mit Ara-C etabliert, um Überwucherungen durch Gliazellen zu verhindern. Es zeigte sich, dass eine Einwirkung von Ara-C über 4 Stunden für eine effektive Wachstumsinhibition von Gliazellen ausreichend ist. Die antimitotische Wirkung von Ara-C wird bereits seit Beginn der Neuronenkultivierung zur Eliminierung von nicht neuronalen Zellen genutzt und wurde immer weiter optimiert (DELIVOPOULOS und MURRAY 2011, SEIL et al. 1980, WOOD. 1976). Sowohl obere Cervicalganglien als auch Spinalganglien wurden als Primärkulturen häufig für die Analyse von Alphaherpesviren verwendet und sind in ihrer Funktion als gleichwertig zu betrachten. Unterschiede im anterograden intraaxonalen Transport zwischen beiden Primärkultursystemen konnten in dieser Arbeit nicht festgestellt werden.

Zur weiteren Überprüfung der Replikationsfähigkeit von einzelnen Deletionsmutanten in neuronalen Zellen wurden Ein-Stufen-Wachstumskinetiken auf neuronalen Primärkulturen durchgeführt. Dadurch sollte es ermöglicht werden rekombinante Viren bzw. isogene Deletionsmutanten schon vorab auf ihr Replikationsverhalten in Neuronen hin zu untersuchen, bevor sie für Analysen in den aufwendig generierten modifizierten Drei-Kammer-Systemen genutzt werden sollten. Durch die Empfindlichkeit der neuronalen Primärkulturen war eine Durchführung von Ein-Stufen-Wachstumskinetiken in primären Neuronen in der Vergangenheit oft schwierig. Das Protokoll für die Durchführung von Ein-Stufen-Wachstumskinetiken auf permanenten Zellkulturen musste modifiziert und auf die empfindlichen Primärkulturen angepasst werden. Zur Charakterisierung wurde auf Spinalganglien eine Ein-Stufen-Wachstumskinetik mit PrV Kaplan, PrV - Δ US9, PrV - Δ gE und PrV Bartha erstellt. Die Deletionsmutanten PrV - Δ US9, PrV - Δ gE und PrV Bartha zeigen einen eingeschränkten anterograden axonalen Transport, jedoch normales Replikationsverhalten (KLOPFLEISCH et al. 2006). In 3 unabhängigen Experimenten zeigten sich, wie erwartet, keine Unterschiede im Replikationsverhalten der Deletionsmutanten im Gegensatz zu PrV Kaplan. Alle 4 eingesetzten Viren waren in der Lage in Neuronen aus Spinalganglien zu replizieren. Die erhaltenen Virustiter erreichten ähnliche Werte wie auf permanenten Zellkulturen z.B. auf Vero- oder RK13 Zellen. Die Ergebnisse deckten sich ebenfalls mit durchgeführten Ein-Stufen-Wachstumskinetiken auf Primärkulturen aus dem oberen Cervicalganglion mit HSV-1 NS Wildtyp und den daraus generierten Deletionsmutanten von US9, gE und gI (MCGRAW und FRIEDMAN 2009, MCGRAW et al. 2009) Das System für Ein-Stufen-Wachstumskinetiken auf primäre Neuronenkulturen wurde demnach erfolgreich etabliert.

6 Zusammenfassung

Alexandra Negatsch

Vergleichende Analysen zur Replikation und zum intraaxonalen Transport des Pseudorabiesvirus und des Herpes Simplex Virus Typ 1 in primären Rattenneuronen

Institut für Virologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Eingereicht im September 2013

98 Seiten, 33 Abbildungen, 1 Tabelle, 274 Literaturangaben, 1 Anhang , 1 DVD

Schlüsselworte: Herpes Simplex Virus Typ 1, Pseudorabiesvirus, intraaxonaler anterograde Transport, Married Model, Subassembly Model, Genregion US9, Drei-Kammer-System, primäre Neuronenkultur

Nach dem Eintritt in den Wirtsorganismus und initialer Replikation infizieren Alphaherpesviren Neuronen zur weiteren Ausbreitung im Nervensystem und zur Etablierung einer Latenz. Dazu werden die Viruspartikel innerhalb der Axone retrograd von der Peripherie zum neuronalen Zellkörper transportiert. Die umgekehrte Richtung beschreibt den Weg des anterograden Transports vom Zellkörper zur Synapse für weitere Infektionen von Neuronen höherer Ordnung oder zurück zur Peripherie. Der retrograde intraaxonale Transport ist gut untersucht. Dagegen wird über den anterograden Transport kontrovers diskutiert. Zwei verschiedene Transportmodelle werden vermutet. Das „Married Model“ postuliert, dass umhüllte Virionen innerhalb von Vesikeln entlang des Axons transportiert werden. Die Freisetzung der Partikel erfolgt an der jeweiligen Synapse durch Endocytose. Das „Subassembly Model“ geht dagegen davon aus, dass einzelne Virusstrukturkomponenten (Nukleokapsid, Hülle) entlang des Axons transportiert werden. Der Zusammenbau und die Freisetzung erfolgt am Axonterminus bzw. an der Synapse (in vivo) oder am Wachstumskegel (in vitro) oder an speziellen Auftreibungen des Axons, den sogenannten Varicosities. Nach Infektion eines neuronalen Explantatsystems mit dem Pseudorabiesvirus (PrV) konnten ultrastrukturell umhüllte Virionen in Vesikeln detektiert werden und so der Nachweis der Gültigkeit des „Married Model“ als vorherrschendes Transportmodell geführt werden. Dagegen ist die Situation beim prototypischen Alphaherpesvirus, dem Herpes Simplex Virus Typ 1 (HSV-1), weiterhin ungeklärt. Aufgrund der zahlreichen unterschiedlichen Analysemethoden und -systeme war ein direkter Vergleich der beiden Viren bislang nicht möglich. Daher sollte in dieser Arbeit ein standardisiertes neuronales Kultursystem genutzt werden, um vier verschiedene HSV-1 Stämme im Vergleich zu PrV zu untersuchen. Für die Infektionen wurden sowohl Neuronen aus dem oberen Cervikalganglion als auch aus Spinalganglien genutzt. So konnte gezeigt werden, dass in Neuronen, welche mit den HSV-1 Stämmen HFEM, 17+ und SC16 infiziert waren ca. 75% als umhüllte Virionen in Vesikeln und ca. 25% als nackte Kapside vorlagen. Insgesamt war die Anzahl der Viruspartikel in HSV-1 infizierten Neuronen signifikant geringer als in PrV infizierten Kulturen. Überraschenderweise zeigten mit HSV-1 KOS infizierte Neuronen ein reverses Bild. Hier lagen nur 25% der Viruspartikel als umhüllte Virionen in Vesikeln vor, während 75% als nackte Kapside detektiert wurden. Dieser unerwartete Phänotyp sollte auf molekularbiologischer Ebene genauer untersucht werden. Dabei wurde auf die Genregion von US9 fokussiert. Das von US9 codierte

Membranprotein spielt eine wichtige Rolle während des Zusammenbaus der Virionen und bei anschließenden axonalen anterograden Transportvorgängen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das HSV-1 KOS Genom durch verschiedene Basenaustausche an der vorhergesagten TATA-Box von US9 eine Mutation aufweist. Zusätzlich trägt das offene Leseraster durch eine weitere Mutation ein vorzeitiges Stopcodon auf und wird dadurch auf 58 Kodons reduziert, im Gegensatz zu anderen HSV-1 Stämmen, wo es 91 Kodons umfasst. Die Mutation an der TATA-Box verändert auch das ursprüngliche Stopcodon vom US8a Gen, was zur einer Verlängerung von ursprünglich 161 zu 191 Kodons führt. In Northern Blot Analysen konnte eine reduzierte Transkription von US9 in HSV-1 KOS infizierten Zellen detektiert werden. In HSV-1 KOS infizierten Zellen konnten mittels eines spezifischen Antiserums gegen US9 im Western Blot kein Genprodukt nachgewiesen werden. Auch Immunfluoreszenzanalysen zeigten, dass das abgeleitete verkürzte Protein offenbar nicht stabil exprimiert wird. Dagegen konnten Western Blot Analysen die Vergrößerung des pUS8a bestätigen. Der beobachtete auffällige intraaxonale Phänotyp könnte somit durch die Mutation des US9 Protein erklärt werden. Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass auch bei HSV-1 vorwiegend das „Married Model“ für den anterograden intraaxonalen Transportweg bevorzugt wird und somit beide Alphaherpesviren, HSV-1 und PrV, denselben Transportweg nutzen.

7 Summary

Alexandra Negatsch

Comparative analysis of replication and intraaxonal transport of the Herpes Simplex Virus Type I and the Pseudorabiesvirus in primary rat neurons.

Institute of Virology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted in September 2013

98 pages, 33 figures, 1 table, 274 references, 1 appendix, 1 DVD

keywords: Herpes Simplex Virus Type I, Pseudorabiesvirus, intraaxonal anterograde transport, Married Model, Subassembly Model, gene region US9, tri-chamber-system, primary neuronal cell culture

After primary replication at the site of entry into the host alphaherpesviruses infect and establish latency in neurons. To this end, they are transported within axons retrogradely from the periphery to the cell body for replication and in anterograde direction to synapses for infection of higher order neurons or back to the periphery. The retrograde transport of incoming nucleocapsids is well documented. In contrast, there is still significant controversy on the mode of anterograde transport. Two models have been proposed to explain anterograde herpesviral transport. The 'married model' entails transport of enveloped virions within neuronal vesicles with virus release by exocytosis. In contrast, the 'subassembly model' suggests separate transport of nucleocapsids and envelopes with virus formation occurring either along the axon at bulges designated as varicosities or at axon termini, i.e. synapses (in vivo) or growth cones (in vitro). By several experimental approaches including high-resolution transmission electron microscopy of primary neuronal cultures from embryonic rat superior cervical ganglia infected with pseudorabies virus (PrV), presence of enveloped virions in axons within vesicles supporting the 'married model' of anterograde transport of complete virus particles within vesicles could be verified. However, due to different experimental conditions a direct comparison with the situation in the prototypic alphaherpesvirus HSV-1, and between different HSV-1 strains, was not possible so far. Thus, a standardized neuronal culture system was set up to analyze in parallel different HSV-1 strains and compare these data with PrV infection. To this end, rat superior cervical ganglia and dorsal root ganglia were used as sources for neurons. It was demonstrated that in neurons infected by HSV-1 strains HFEM, 17+ or SC16, approx. 75% of virus particles observed intraaxonally or in growth cones late after infection constitute enveloped virions within vesicles, whereas approx. 25% presented as naked capsids. In general, the number of HSV-1 particles in the axons was significantly less than observed after PrV infection. Surprisingly, HSV-1 strain KOS exhibited a reverse picture with 25% enveloped virions and 75% naked capsids. To test for the molecular basis of this unexpected phenotype, the US9 gene region of HSV-1 KOS was further analyzed. The membrane protein encoded by the US9 gene of alphaherpesviruses plays an important role during virion assembly and transport in neurons. It was shown that in HSV-1 strain KOS, due to base substitutions, the predicted TATA-box of US9 is mutated, and a premature stop is present at codon 58 of US9, which contains 91 codons in other HSV-1 strains. The TATA-box mutation also removes the native stop codon of the adjacent US8A gene, leading to extension of the coding

region from 160 to 191 codons. Northern blot analyses revealed reduced transcription of US9 in cells infected with HSV-1 KOS. Moreover, a US9-specific antiserum did not detect any gene products in Western blot and immunofluorescence analyses of KOS-infected cells, indicating that the truncated protein is not stable. In contrast, Western blot reactions of a pUS8A-specific antiserum confirmed enlargement of this protein in HSV-1 KOS. Thus, the observed phenotype may be due to an impairment of pUS9 function in HSV-1 KOS. In summary, it was shown that HSV-1 also predominantly uses the 'married model' pathway for anterograde intraaxonal transport which indicates that both alphaherpesviruses, HSV-1 and PrV, developed essentially the same mode of transport.

8 Literaturverzeichnis

1. Abramoff MD, Magalhaes PJ, Ram SJ: Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*. 2004;11:36-42.
2. Aggarwal A, Miranda-Saksena M, Boadle RA, Kelly BJ, Diefenbach RJ, Alam W, u. a. Ultrastructural visualization of individual tegument protein dissociation during entry of herpes simplex virus 1 into human and rat dorsal root ganglion neurons. *J Virol*. 2012;86:6123–37.
3. Akhtar J, Shukla D. Viral entry mechanisms: cellular and viral mediators of herpes simplex virus entry. *FEBS J*. 2009;276:7228–36.
4. Alconada A, Bauer U, Sodeik B, Hoflack B. Intracellular traffic of herpes simplex virus glycoprotein gE: characterization of the sorting signals required for its trans-Golgi network localization. *J Virol*. 1999;73:377–87.
5. Antinone SE, Shubeita GT, Coller KE, Lee JI, Haverlock-Moyns S, Gross SP, u. a. The Herpesvirus capsid surface protein, VP26, and the majority of the tegument proteins are dispensable for capsid transport toward the nucleus. *J Virol*. 2006;80:5494–8.
6. Antinone SE, Smith GA. Retrograde axon transport of herpes simplex virus and pseudorabies virus: a live-cell comparative analysis. *J Virol*. 2010;84:1504–12.
7. Antinone SE, Zaichick SV, Smith GA. Resolving the assembly state of herpes simplex virus during axon transport by live-cell imaging. *J Virol*. 2010;84:13019–30.
8. Aoki T, Hirono I, Kurokawa K, Fukuda H, Nahary R, Eldar A, u. a. Genome Sequences of Three Koi Herpesvirus Isolates Representing the Expanding Distribution of an Emerging Disease Threatening Koi and Common Carp Worldwide. *J Virol*. 2007;81:5058–65.
9. Ashaye A, Aimola A. Keratitis in children as seen in a tertiary hospital in Africa. *J Natl Med Assoc*. 2008;100:386–90.
10. Atanasiu D, Whitbeck JC, Cairns TM, Reilly B, Cohen GH, Eisenberg RJ. Bimolecular complementation reveals that glycoproteins gB and gH/gL of herpes simplex virus interact with each other during cell fusion. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:18718–23.
11. Aujeszky A: Über eine neue Infektionskrankheit bei Haustieren. *Zbl Bakt 1 Orig* 1902;32: 353–357.
12. Babic N, Mettenleiter TC, Ugolini G, Flamand A, Coulon P. Propagation of Pseudorabies Virus in the Nervous System of the Mouse after Intranasal Inoculation. *Virology*. 1994;204:616–25.
13. Baines JD, Duffy C.. Nucleocapsid assembly and envelopment of herpes simplex virus. In: Sandri-Goldin R, Hrsg. *Alpha Herpesviruses: Molecular and Cell Biology*. Norwich: Horizon Press; 2006. p. 175-204.
14. Batterson W, Furlong D, Roizman B. Molecular genetics of herpes simplex virus. VIII. further characterization of a temperature-sensitive mutant defective in release of viral DNA and in other stages of the viral reproductive cycle. *J Virol*. 1983;45:397–407.
15. Ben-Porat T, Kaplan AS. *Molecular Biology of Pseudorabies Virus*. In: Roizman B, Hrsg.. *The Herpesviruses*. New York: Springer; 1985.
16. Betz WJ, Bewick GS. Optical analysis of synaptic vesicle recycling at the frog neuromuscular junction. *Science*. 1992;255:200–3.

17. Booy FP, Trus BL, Newcomb WW, Brown JC, Conway JF, Steven AC. 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*. 1994;91:5652–6.
18. Bornstein MB. Reconstituted rattail collagen used as substrate for tissue cultures on coverslips in Maximow slides and roller tubes. *Lab Invest*. 1958;7:134–7.
19. Bresnahan WA, Shenk TE. UL82 virion protein activates expression of immediate early viral genes in human cytomegalovirus-infected cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:14506–11.
20. Brideau AD, Banfield BW, Enquist LW. The Us9 gene product of pseudorabies virus, an alphaherpesvirus, is a phosphorylated, tail-anchored type II membrane protein. *J Virol*. 1998;72:4560–70.
21. Brideau AD, Card JP, Enquist LW. Role of pseudorabies virus Us9, a type II membrane protein, in infection of tissue culture cells and the rat nervous system. *J Virol*. 2000;74:834–45.
22. Brown SM, Ritchie DA, Subak-Sharpe JH. Genetic studies with herpes simplex virus type 1. The isolation of temperature-sensitive mutants, their arrangement into complementation groups and recombination analysis leading to a linkage map. *J Gen Virol*. 1973;18:329–46.
23. Brown JC, Newcomb WW. Herpesvirus Capsid Assembly: Insights from Structural Analysis. *Curr Opin Virol*. 1. 2011;1:142–9.
24. Bucks MA, O'Regan KJ, Murphy MA, Wills JW, Courtney RJ. Herpes simplex virus type 1 tegument proteins VP1/2 and UL37 are associated with intranuclear capsids. *Virology*. 10. 2007;361:316–24.
25. Burkey TH, Hingtgen CM, Vasko MR. Isolation and culture of sensory neurons from the dorsal-root ganglia of embryonic or adult rats. *Methods Mol Med*. 2004;99:189–202.
26. Burnet FM, Williams SW. Herpes simplex: new point of view. *Med J* 1939;1: 637–640.
27. Cai WH, Gu B, Person S. Role of glycoprotein B of herpes simplex virus type 1 in viral entry and cell fusion. *J Virol*. 1988;62:2596–604.
28. Campenot RB. Local control of neurite development by nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977;74:4516–9.
29. Cardone G, Heymann JB, Cheng N, Trus BL, Steven AC. Procapsid Assembly, Maturation, Nuclear Exit: Dynamic Steps in the Production of Infectious Herpesvirions. *Adv Exp Med Biol*. 2012;726:423–39.
30. Carrington-Lawrence SD, Weller SK. Recruitment of polymerase to herpes simplex virus type 1 replication foci in cells expressing mutant primase (UL52) proteins. *J Virol*. 2003;77:4237–47.
31. Castillo JP, Kowalik TF. Human cytomegalovirus immediate early proteins and cell growth control. *Gene*. 2002;290:19–34.
32. Ch'ng TH, Flood EA, Enquist LW. Culturing Primary and Transformed Neuronal Cells for Studying Pseudorabies Virus Infection. *Methods Mol Biol*. 2005;292:299-316.
33. Ch'ng TH, Enquist LW. Efficient Axonal Localization of Alphaherpesvirus Structural Proteins in Cultured Sympathetic Neurons Requires Viral Glycoprotein E. *J Virol*. 2005a;79:8835–46.
34. Ch'ng TH, Enquist LW. Neuron-to-cell spread of pseudorabies virus in a compartmented neuronal culture system. *J Virol*. September 2005b;79:10875–89.

35. Chen Y, Guo W, Xu Z, Yan Q, Luo Y, Shi Q, u. a. A novel recombinant pseudorabies virus expressing parvovirus VP2 gene: Immunogenicity and protective efficacy in swine. *J. Virol* 2011;8:307.
36. Chen Z, Lee H, Henle SJ, Cheever TR, Ekker SC, Henley JR. Primary Neuron Culture for Nerve Growth and Axon Guidance Studies in Zebrafish (*Danio rerio*). *PLoS ONE*. 2013;8:57539.
37. Cherepanov PP, Wackernagel W. Gene disruption in *Escherichia coli*: T_{CR} and K_{MR} cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene*. 1995 158:9-14.
38. Chouljenko VN, Iyer AV, Chowdhury S, Chouljenko DV, Kousoulas KG. The amino terminus of herpes simplex virus type 1 glycoprotein K (gK) modulates gB-mediated virus-induced cell fusion and virion egress. *J Virol*. 2009;83:12301-13.
39. Chouljenko VN, Iyer AV, Chowdhury S, Kim J, Kousoulas KG. The herpes simplex virus type 1 UL20 protein and the amino terminus of glycoprotein K (gK) physically interact with gB. *J Virol*. 2010;84:8596-606
40. Chouljenko DV, Kim I-J, Chouljenko VN, Subramanian R, Walker JD, Kousoulas KG. Functional Hierarchy of Herpes Simplex Virus 1 Viral Glycoproteins in Cytoplasmic Virion Envelopment and Egress. *J Virol*. 2012;86:4262–70.
41. Coen DM, Kosz-Vnenchak M, Jacobson JG, Leib DA, Bogard CL, Schaffer PA, u. a. Thymidine kinase-negative herpes simplex virus mutants establish latency in mouse trigeminal ganglia but do not reactivate. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86:4736–40.
42. Coller KE, Lee JI-H, Ueda A, Smith GA. The capsid and tegument of the alphaherpesviruses are linked by an interaction between the UL25 and VP1/2 proteins. *J Virol*. 2007;81:11790–7.
43. Connolly SA, Jackson JO, Jardetzky TS, Longnecker R. Fusing structure and function: a structural view of the herpesvirus entry machinery. *Nat Rev Microbiol*. 2011;9:369–81.
44. Cook ML, Stevens JG. Pathogenesis of herpetic neuritis and ganglionitis in mice: evidence for intra-axonal transport of infection. *Infect Immun*. 1973;7:272–88.
45. Copeland AM, Newcomb WW, Brown JC. Herpes simplex virus replication: roles of viral proteins and nucleoporins in capsid-nucleus attachment. *J Virol*. 2009;83:1660–8.
46. Curanović D, Ch'ng TH, Szpara M, Enquist L. Compartmented neuron cultures for directional infection by alpha herpesviruses. *Curr Protoc Cell Biol*. 2009;Chapter 26:Unit 26.4.
47. Curanovic D, Enquist L. Directional transneuronal spread of α -herpesvirus infection. *Future Virol*. 2009;4:591.
48. Datsenko KA, Wanner BL. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:6640-6645.
49. David AT, Saied A, Charles A, Subramanian R, Chouljenko VN, Kousoulas KG. A herpes simplex virus 1 (McKrae) mutant lacking the glycoprotein K gene is unable to infect via neuronal axons and egress from neuronal cell bodies. *MBio*. 2012;3:00144–00112.
50. Davison AJ. Herpesvirus systematics. *Vet Microbiol*. 2010;143:52–69.
51. Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, McGeoch DJ, Minson AC, u. a. The order Herpesvirales. *Arch Virol*. 2009;154:171–7.
52. Davison AJ, Trus BL, Cheng N, Steven AC, Watson MS, Cunningham C, u. a. A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *J Gen Virol*. 2005;86:41–53.

53. Delivopoulos E, Murray AF. Controlled adhesion and growth of long term glial and neuronal cultures on Parylene-C. *PLoS ONE*. 2011;6:25411.
54. Desai PJ. A null mutation in the UL36 gene of herpes simplex virus type 1 results in accumulation of unenveloped DNA-filled capsids in the cytoplasm of infected cells. *J Virol*. Dezember 2000;74:11608–18.
55. Desai, P. and S. Person. Incorporation of the green fluorescent protein into the herpes simplex virus type 1 capsid. *J. Virol*. 1998 72:7563-7568.
56. Diefenbach RJ, Miranda-Saksena M, Diefenbach E, Holland DJ, Boadle RA, Armati PJ, u. a. Herpes simplex virus tegument protein US11 interacts with conventional kinesin heavy chain. *J Virol*. 2000;76:3282–91.
57. Diefenbach RJ, Miranda-Saksena M, Douglas MW, Cunningham AL. Transport and egress of herpes simplex virus in neurons. *Rev Med Virol*. 2008;18:35–51.
58. Dix RD, McKendall RR, Baringer JR. Comparative neurovirulence of herpes simplex virus type 1 strains after peripheral or intracerebral inoculation of BALB/c mice. *Infect Immun*. 1983;40:103–12.
59. Dodding MP, Way M. Coupling viruses to dynein and kinesin-1. *EMBO*. 2011;30:3527–39.
60. Doerr HW, Gerlich WH. *Medizinische Virologie: Grundlagen, Diagnostik, Prävention und Therapie viraler Erkrankungen*. 2. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2009.
61. Döhner K, Nagel C-H, Sodeik B. Viral stop-and-go along microtubules: taking a ride with dynein and kinesins. *Trends Microbiol*. 2005;13:320–7.
62. Döhner K, Sodeik B. The role of the cytoskeleton during viral infection. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005;285:67–108.
63. Dollery SJ, Delboy MG, Nicola AV. Low pH-induced conformational change in herpes simplex virus glycoprotein B. *J Virol*. 2010;84:3759–66.
64. Draper JM, Huang G, Stephenson GS, Bertke AS, Cortez DA, LaVail JH. Delivery of Herpes Simplex Virus to Retinal Ganglion Cell Axon Is Dependent on Viral Protein Us9. *IOVS* 2013;54:962–7.
65. Eisenberg RJ, Atanasiu D, Cairns TM, Gallagher JR, Krummenacher C, Cohen GH. Herpes Virus Fusion and Entry: A Story with Many Characters. *Viruses*. 2012;4:800–32.
66. Enquist LW, Husak PJ, Banfield BW Smith GA. Infection and spread of alphaherpesviruses in the nervous system. *Adv Virus Res* 1998;51:237-347.
67. Enquist LW. Five Questions about Viral Trafficking in Neurons. *PLoS Pathog*. 2012;8:1002472.
68. Fatahzadeh M. Recurrent oral herpes: diagnosis & management. *J N J Dent Assoc*. 2012;83:24–6.
69. Feierbach B, Bisher M, Goodhouse J, Enquist LW. In vitro analysis of transneuronal spread of an alphaherpesvirus infection in peripheral nervous system neurons. *J Virol*. 2007;81:6846–57.
70. Fischbach GD. Synapse formation between dissociated nerve and muscle cells in low density cell cultures. *Dev Biol*. 1972;28:407–29.
71. Frame MC, McGeoch DJ, Rixon FJ, Orr AC, Marsden HS. The 10K virion phosphoprotein encoded by gene US9 from herpes simplex virus type 1. *Virology*. 1986;150:321–32.
72. Fuchs W, Backovic M, Klupp BG, Rey FA, Mettenleiter TC. Structure-Based Mutational Analysis of the Highly Conserved Domain IV of Glycoprotein H of Pseudorabies Virus. *J Virol*. 2012;86:8002–13.

73. Fuchs W, Granzow H, Klupp BG, Kopp M, Mettenleiter TC. The UL48 Tegument Protein of Pseudorabies Virus Is Critical for Intracytoplasmic Assembly of Infectious Virions. *J Virol.* 2002a;76:6729–42.
74. Fuchs W, Klupp BG, Granzow H, Hengartner C, Brack A, Mundt A, u. a. Physical Interaction between Envelope Glycoproteins E and M of Pseudorabies Virus and the Major Tegument Protein UL49. *J Virol.* 2002b;76:8208–17.
75. Fuchs W, Klupp BG, Granzow H, Osterrieder N, Mettenleiter TC. The interacting UL31 and UL34 gene products of pseudorabies virus are involved in egress from the host-cell nucleus and represent components of primary enveloped but not mature virions. *J Virol.* 2002c; 76:364–78.
76. Fuchs W, Klupp BG, Granzow H, Mettenleiter TC. Essential function of the pseudorabies virus UL36 gene product is independent of its interaction with the UL37 protein. *J Virol* 2004 78:11879-11889.
77. Furlong D, Swift H, Roizman B. Arrangement of herpesvirus deoxyribonucleic acid in the core. *J Virol.* 1972;10:1071–4.
78. Gabler-Sandberger E. Herpes neonatorum--prevention and therapy. Which newborn infants are at risk? When cesarean section, when acyclovir?. *Fortschr Med.* 1996;114:393–4.
79. Ganten D, Ruckpaul K. *Molekular- und Zellbiologische Grundlagen.* 1. Aufl. Berlin Heidelberg New York: Springer; 1997.
80. Geraghty RJ, Krummenacher C, Cohen GH, Eisenberg RJ, Spear PG. Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor. *Science.* 1998;280:1618–20.
81. Gerdts V, Jöns A, Makoschey B, Visser N, Mettenleiter TC. Protection of pigs against Aujeszky's disease by DNA vaccination. *J Gen Virol.* 1997;78:2139–46.
82. Gesser RM, Koo SC. Latent herpes simplex virus type 1 gene expression in ganglia innervating the human gastrointestinal tract. *J Virol.* 1997;71:4103–6.
83. Gibson W, Roizman B. Proteins Specified by Herpes Simplex Virus VIII. Characterization and Composition of Multiple Capsid Forms of Subtypes 1 and 2. *J Virol.* 1972;10:1044–52.
84. Gierasch WW, Zimmerman DL, Ward SL, VanHeyningen TK, Romine JD, Leib DA. Construction and characterization of bacterial artificial chromosomes containing HSV-1 strains 17 and KOS. *Journal of Virological Methods.* 2006;135:197–206.
85. Goldstein LS, Yang Z. Microtubule-based transport systems in neurons: the roles of kinesins and dyneins. *Annu Rev Neurosci.* 2000;23:39–71.
86. Graham FL, van der Eb AJ. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology.* 1973; 52:456-467.
87. Granzow H, Klupp BG, Fuchs W, Veits J, Osterrieder N, Mettenleiter TC. Egress of alphaherpesviruses: comparative ultrastructural study. *J Virol.* 2001;75:3675–84.
88. Granzow H, Klupp BG, Mettenleiter TC. Entry of Pseudorabies Virus: an Immunogold-Labeling Study. *J Virol.* 2005;79:3200–5.
89. Granzow H, Weiland F, Jons A, Klupp BG, Karger A, Mettenleiter TC. Ultrastructural analysis of the replication cycle of pseudorabies virus in cell culture: a reassessment. *J Virol.* 1997;71:2072–82.
90. Gruber CA, Rhee JM, Gleiberman A, Turner EE. POU domain factors of the Brn-3 class recognize functional DNA elements which are distinctive, symmetrical, and highly conserved in evolution. *Mol Cell Biol.* 1997;17:2391–400.

91. Guo H, Shen S, Wang L, Deng H. Role of tegument proteins in herpesvirus assembly and egress. *Protein Cell*. 2010;1:987–98.
92. Haghnia M, Cavalli V, Shah SB, Schimmelpfeng K, Bruschi R, Yang G, u. a. Dynactin Is Required for Coordinated Bidirectional Motility, but Not for Dynein Membrane Attachment. *Molecular Biology of the Cell*. 2007;18:2081–9.
93. Hagmann M, Georgiev O, Schaffner W, Douville P. Transcription factors interacting with herpes simplex virus alpha gene promoters in sensory neurons. *Nucleic Acids Res*. 1995;23:4978–85.
94. Hahn EC, Fadl-Alla B, Lichtensteiger CA. Variation of Aujeszky's disease viruses in wild swine in USA. *Vet Microbiol*. 2010;143:45–51.
95. Hanahan D.. Studies on transformation of escherichia coli with plasmids. *J. Mol. Biol*. 1983; 166: 557-580.
96. Harrison RG. Observations on the living developing nerve fiber. *Anat. Rec.* 1:116-128; *Proc. Soc. Exp. Med.* 1907;140-143.
97. Heine JW, Honess RW, Cassai E, Roizman B. Proteins specified by herpes simplex virus. XII. The virion polypeptides of type 1 strains. *J Virol*. 1974;14:640–51.
98. Henaff D, Rémillard-Labrosse G, Loret S, Lippé R. Analysis of the early steps of herpes simplex virus type 1 capsid tegumentation. *J Virol*. 2013;87:4 895-4906
99. Heymann JB, Cheng N, Newcomb WW, Trus BL, Brown JC, Steven AC. Dynamics of herpes simplex virus capsid maturation visualized by time-lapse cryo-electron microscopy. *Nat Struct Biol*. 2003;10:334–41.
100. Hill TJ, Field HJ, Roome APC. Intra-axonal Location of Herpes Simplex Virus Particles. *J Gen Virol*. 1972;15:253–5.
101. Hirsch-Kaufmann M, Schweiger M. *Biologie für Mediziner und Naturwissenschaftler*. 4. Aufl Stuttgart: Thieme; 2000.
102. Hogan MJ, Kimura SJ, Thygeson P. Observations on herpetic keratitis and keratoconjunctivitis. *AMA Arch Ophthalmol*. 1956;56:375–88.
103. Holland DJ, Miranda-Saksena M, Boadle RA, Armati P, Cunningham AL. Anterograde Transport of Herpes Simplex Virus Proteins in Axons of Peripheral Human Fetal Neurons: an Immunoelectron Microscopy Study. *J Virol*. 1999;73:8503–11.
104. Holleran EA, Karki S, Holzbaur EL. The role of the dynactin complex in intracellular motility. *Int Rev Cytol*. 1998;182:69–109.
105. Homa, Brown. Capsid assembly and DNA packaging in herpes simplex virus. *Rev Med Virol*. 1997;7:107–22.
106. Howard PW, Howard TL, Johnson DC. Herpes simplex virus membrane proteins gE/gI and US9 act cooperatively to promote transport of capsids and glycoproteins from neuron cell bodies into initial axon segments. *J Virol*. 2013;87:403–14.
107. Huang J, Lazear HM, Friedman HM. Completely assembled virus particles detected by transmission electron microscopy in proximal and mid-axons of neurons infected with herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2 and pseudorabies virus. *Virology*. 2011;409:12–6.
108. Jones C. Alphaherpesvirus Latency: Its Role in Disease and Survival of the Virus in Nature. *Adv Virus Res*. 1998;51:81–133.
109. Ibiricu I, Huiskonen JT, Döhner K, Bradke F, Sodeik B, Grünewald K. Cryo electron tomography of herpes simplex virus during axonal transport and secondary envelopment in primary neurons. *PLoS Pathog*. 2011;7:1002406.

110. Ishov AM, Vladimirova OV, Maul GG. Daxx-Mediated Accumulation of Human Cytomegalovirus Tegument Protein pp71 at ND10 Facilitates Initiation of Viral Infection at These Nuclear Domains. *J Virol.* 2002;76:7705–12.
111. Johnson DC, Baines JD. Herpesviruses remodel host membranes for virus egress. *Nat Rev Microbiol.* 2011;9:382–94.
112. Jovasevic V, Liang L, Roizman B. Proteolytic cleavage of VP1-2 is required for release of herpes simplex virus 1 DNA into the nucleus. *J Virol.* 2008;82:3311–9.
113. Kamal A, Goldstein LS. Connecting vesicle transport to the cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol.* 2000;12:503–8.
114. Kamen DE, Gross ST, Girvin ME, Wilson DW. Structural basis for the physiological temperature dependence of the association of VP16 with the cytoplasmic tail of herpes simplex virus glycoprotein H. *J Virol.* 2005;79:6134–41.
115. Kang W, Mukerjee R, Fraser NW. Establishment and maintenance of HSV latent infection is mediated through correct splicing of the LAT primary transcript. *Virology.* 2003;312:233–44.
116. Kaufman HE, Brown DC, Ellison EM. Recurrent herpes in the rabbit and man. *Science.* 1967;156:1628–9.
117. Keating TM, Kurth AE, Wald A, Kahle EM, Barash EA, Buskin SE. Clinical burden of herpes simplex virus disease in people with human immunodeficiency virus. *Sex Transm Dis.* 2012;39:372–6.
118. Kelly BJ, Mijatov B, Fraefel C, Cunningham AL, Diefenbach RJ. Identification of a single amino acid residue which is critical for the interaction between HSV-1 inner tegument proteins pUL36 and pUL37. *Virology* 2012;422:308–16.
119. Kent JR, Kang W, Miller CG, Fraser NW. Herpes simplex virus latency-associated transcript gene function. *J Neurovirol.* 2003;9:285–90.
120. King SJ, Schroer TA. Dynactin increases the processivity of the cytoplasmic dynein motor. *Nat Cell Biol.* 2000;2:20–4.
121. King SM. Organization and regulation of the dynein microtubule motor. *Cell Biology International.* 2003;27:213–5.
122. Klopffleisch R, Klupp BG, Fuchs W, Kopp M, Teifke JP, Mettenleiter TC. Influence of pseudorabies virus proteins on neuroinvasion and neurovirulence in mice. *J Virol.* 2006;80:5571–6.
123. Klupp BG, Granzow H, Mettenleiter TC. Primary Envelopment of Pseudorabies Virus at the Nuclear Membrane Requires the UL34 Gene Product. *J Virol.* 2000a;74:10063–73.
124. Klupp BG, Granzow H, Mettenleiter TC. Effect of the pseudorabies virus US3 protein on nuclear membrane localization of the UL34 protein and virus egress from the nucleus. *J Gen Virol.* 2001a;82:2363–71.
125. Klupp BG, Granzow H, Mundt E, Mettenleiter TC. Pseudorabies virus UL37 gene product is involved in secondary envelopment. *J Virol.* 2001b;75:8927–36.
126. Klupp BG, Nixdorf R, Mettenleiter TC. Pseudorabies Virus Glycoprotein M Inhibits Membrane Fusion. *J Virol.* 2000b;74:6760–8.
127. Klupp BG, Böttcher S, Granzow H, Kopp M, Mettenleiter TC. Complex formation between the UL16 and UL21 tegument proteins of pseudorabies virus. *J Virol.* 2005;79:1510–22.
128. Kramer T, Greco TM, Taylor MP, Ambrosini AE, Cristea IM, Enquist LW. Kinesin-3 Mediates Axonal Sorting and Directional Transport of Alphaherpesvirus Particles in Neurons. *Cell Host & Microbe.* 2012;12:806–14.

129. Kramer T, Enquist LW. Directional spread of alphaherpesviruses in the nervous system. *Viruses*. 2013;5:678–707.
130. Kratchmarov R, Taylor MP, Enquist LW. Making the case: Married versus Separate models of alphaherpes virus anterograde transport in axons. *Reviews in Medical Virology*. 2012;22:378–91.
131. Kratchmarov R, Taylor MP, Enquist LW. Role of Us9 Phosphorylation in Axonal Sorting and Anterograde Transport of Pseudorabies Virus. *PLoS One* . 2013;8.
132. Krautwald M, Maresch C, Klupp BG, Fuchs W, Mettenleiter TC. Deletion or green fluorescent protein tagging of the pUL35 capsid component of pseudorabies virus impairs virus replication in cell culture and neuroinvasion in mice. *J Gen Virol*. 2008;89:1346–51.
133. Kuhn J, Leege T, Granzow H, Fuchs W, Mettenleiter TC, Klupp BG. Analysis of pseudorabies and herpes simplex virus recombinants simultaneously lacking the pUL17 and pUL25 components of the C-capsid specific component. *Virus Res*. 2010;153:20–8.
134. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 277:680-685
135. Laquerre S, Argnani R, Anderson DB, Zucchini S, Manservigi R, Glorioso JC. Heparan sulfate proteoglycan binding by herpes simplex virus type 1 glycoproteins B and C, which differ in their contributions to virus attachment, penetration, and cell-to-cell spread. *J Virol*. 1998;72:6119–30.
136. LaVail JH, Tauscher AN, Sucher A, Harrabi O, Brandimarti R. Viral regulation of the long distance axonal transport of herpes simplex virus nucleocapsid. *Neuroscience*. 2007;146:974–85.
137. Leach NR, Roller RJ. Significance of host cell kinases in herpes simplex virus type 1 egress and lamin-associated protein disassembly from the nuclear lamina. *Virology*. 2010;406:127–37.
138. Lee JI., Luxton GW, Smith GA. Identification of an essential domain in the herpesvirus VP1/2 tegument protein: the carboxy terminus directs incorporation into capsid assemblons. *J Virol* 2006; 80:12086-12094.
139. Leege T, Granzow H, Fuchs W, Klupp BG, Mettenleiter TC. Phenotypic similarities and differences between UL37-deleted pseudorabies virus and herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol*. 2009;90:1560–8.
140. Leib DA, Coen DM, Bogard CL, Hicks KA, Yager DR, Knipe DM, u. a. Immediate-early regulatory gene mutants define different stages in the establishment and reactivation of herpes simplex virus latency. *J Virol*. 1989;63:759–68.
141. Levin MJ, Weinberg A, Leary JJ, Sarisky RT. Development of acyclovir-resistant herpes simplex virus early during the treatment of herpes neonatorum. *Pediatr Infect Dis J*. 2001;20:1094–7.
142. Lindl T, Bauer J. *Zell- und Gewebekultur*. Frankfurt am Main: Fischer; 1987.
143. Liu F, Zhou ZH. Comparative virion structures of human herpesviruses. In: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, u. a., Herausgeber. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge University Press; 2007. Chapter 3
144. Lo KY, Kuzmin A, Unger SM, Petersen JD, Silverman MA. KIF1A is the primary anterograde motor protein required for the axonal transport of dense-core vesicles in cultured hippocampal neurons. *Neurosci Lett*. 2011 24;491:168-73.

145. Löhr JM, Nelson JA, Oldstone MB. Is herpes simplex virus associated with peptic ulcer disease?. *J Virol.* 1990;64:2168–74.
146. Loomis JS, Bowzard JB, Courtney RJ, Wills JW. Intracellular trafficking of the UL11 tegument protein of herpes simplex virus type 1. *J Virol.* 2001;75:12209–19.
147. Loret S, Guay G, Lippé R. Comprehensive characterization of extracellular herpes simplex virus type 1 virions. *J Virol.* 2008;82:8605–18.
148. Lu R, Misra V. Zhangfei: a second cellular protein interacts with herpes simplex virus accessory factor HCF in a manner similar to Luman and VP16. *Nucleic Acids Res.* 2000;28:2446–54.
149. Luxton GWG, Haverlock S, Collier KE, Antinone SE, Pincetic A, Smith GA. Targeting of herpesvirus capsid transport in axons is coupled to association with specific sets of tegument proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102:5832–7.
150. Lycke E, Hamark B, Johansson M, Krotchowil A, Lycke J, Svennerholm B. Herpes simplex virus infection of the human sensory neuron. An electron microscopy study. *Arch Virol.* 1988;101:87–104.
151. Lyman MG, Curanovic D, Enquist LW. Targeting of pseudorabies virus structural proteins to axons requires association of the viral Us9 protein with lipid rafts. *PLoS Pathog.* 2008;4:e1000065.
152. Lyman MG, Feierbach B, Curanovic D, Bisher M, Enquist LW. PRV Us9 Directs Axonal Sorting of Viral Capsids. *J Virol.* 2007;81:11363-11371
153. Lyman MG, Kemp CD, Taylor MP, Enquist LW. Comparison of the pseudorabies virus Us9 protein with homologs from other veterinary and human alphaherpesviruses. *J Virol.* 2009;83:6978–86.
154. Macdonald SJ, Mostafa HH, Morrison LA, Davido DJ. Genome Sequence of Herpes Simplex Virus 1 Strain KOS. *J Virol* 2012a;86:6371–2.
155. Mador N, Panet A, Latchman D, Steiner I. Expression and splicing of the latency-associated transcripts of herpes simplex virus type 1 in neuronal and non-neuronal cell lines. *J Biochem.* 1995;117:1288–97.
156. Maggioncalda J, Mehta A, Su YH, Fraser NW, Block TM. Correlation between herpes simplex virus type 1 rate of reactivation from latent infection and the number of infected neurons in trigeminal ganglia. *Virology.* 1996;225:72–81.
157. Mahmoud HYA, Suzuki K, Tsuji T, Yokoyama M, Shimojima M, Maeda K. Pseudorabies virus infection in wild boars in Japan. *J Vet Med Sci.* 2011;73:1535–7.
158. Mains RE, Patterson PH. Primary Cultures of Dissociated Symphthetic Neurons. *J Cell Biol.* 1973;59:329–45.
159. Maresch C, Granzow H, Negatsch A, Klupp BG, Fuchs W, Teifke JP, u. a. Ultrastructural analysis of virion formation and anterograde intraaxonal transport of the alphaherpesvirus pseudorabies virus in primary neurons. *J Virol.* 2010;84:5528–39.
160. Maresch C. Studien zur Neuroinvasion und zum axonalen Transport von Mutanten des Pseudorabiesvirus im Tiermodell und an Neuronenkulturen [Dissertation med.vet]. Gießen: Univ. Gießen; 2010
161. Maresch C, Lange E, Teifke JP, Fuchs W, Klupp B, Müller T, u. a. Oral immunization of wild boar and domestic pigs with attenuated live vaccine protects against Pseudorabies virus infection. *Veterinary Microbiology.* 2012;161:20–5.
162. Margolis TP, Sedarati F, Dobson AT, Feldman LT, Stevens JG. Pathways of viral gene expression during acute neuronal infection with HSV-1. *Virology.* 1992;189:150–60.

163. Marsden HS, Cross AM, Francis GJ, Patel AH, MacEachran K, Murphy M, u. a. The herpes simplex virus type 1 UL8 protein influences the intracellular localization of the UL52 but not the ICP8 or POL replication proteins in virus-infected cells. *J Gen Virol.* 1996;77:2241–9.
164. Maurer UE, Sodeik B, Grünewald K. Native 3D intermediates of membrane fusion in herpes simplex virus 1 entry. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105:10559–64.
165. McGeoch DJ, Dalrymple MA, Davison AJ, Dolan A, Frame MC, McNab D, u. a. The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol.* 1988;69:1531–74.
166. McGeoch DJ, Dolan A, Donald S, Rixon FJ. Sequence determination and genetic content of the short unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *J Mol Biol.* 1985;181:1–13.
167. McGraw HM, Awasthi S, Wojcechowskyj JA, Friedman HM. Anterograde spread of herpes simplex virus type 1 requires glycoprotein E and glycoprotein I but not Us9. *J Virol.* 2009;83:8315–26.
168. McGraw HM, Friedman HM. Herpes Simplex Virus Type 1 Glycoprotein E Mediates Retrograde Spread from Epithelial Cells to Neurites. *J Virol.* 2009;83:4791–9.
169. McMillan TN, Johnson DC. Cytoplasmic domain of herpes simplex virus gE causes accumulation in the trans-Golgi network, a site of virus envelopment and sorting of virions to cell junctions. *J Virol.* 2001;75:1928–40.
170. Meckes DG Jr, Marsh JA, Wills JW. Complex mechanisms for the packaging of the UL16 tegument protein into herpes simplex virus. *Virology.* 2010;398:208–13.
171. Megaw AG, Rapaport D, Avidor B, Frenkel N, Davison AJ. The DNA sequence of the RK strain of human herpesvirus 7. *Virology.* 1998;244:119–32.
172. Mettenleiter TC. Herpesvirus Assembly and Egress. *J Virol.* 2002;76:1537–47.
173. Mettenleiter TC. Budding events in herpesvirus morphogenesis. *Virus Res.* 2004. 106:167-180
174. Mettenleiter TC. Intriguing interplay between viral proteins during herpesvirus assembly or: the herpesvirus assembly puzzle. *Vet Microbiol* 2006; 113:163-169.
175. Mettenleiter TC. Pseudorabies Virus. In: Mahy BWJ, van Regenmortel MHV, Hrsg. *Encyclopedia of Virology.* 5. Auflage Oxford: Elsevier; 2008. p. 341-351
176. Mettenleiter TC, Klupp BG, Granzow H. Herpesvirus assembly: An update. *Virus Research.* 2009;143:222–34.
177. Mettenleiter TC. Herpesviren. In: Doerr HW, Gerlich WH, Hrsg. *Medizinische Virologie: Grundlagen, Diagnostik, Prävention und Therapie viraler Erkrankungen.* 2. Aufl. Thieme Verlag Stuttgart; 2010.
178. Mettenleiter TC, Müller F, Granzow H, Klupp BG. The way out: what we know and do not know about herpesvirus nuclear egress. *Cellular Microbiology.* 2013;15:170–8.
179. Milne RSB, Nicola AV, Whitbeck JC, Eisenberg RJ, Cohen GH. Glycoprotein D receptor-dependent, low-pH-independent endocytic entry of herpes simplex virus type 1. *J Virol.* 2005;79:6655–63.
180. Mingo RM, Han J, Newcomb WW, Brown JC. Replication of Herpes Simplex Virus: Egress of Progeny Virus at Specialized Cell Membrane Sites. *J Virol.* 2012;86:7084–97.
181. Miranda-Saksena M, Boadle RA, Armati P, Cunningham AL. In rat dorsal root ganglion neurons, herpes simplex virus type 1 tegument forms in the cytoplasm of the cell body. *J Virol.* 2002;76:9934–51.

182. Miranda-Saksena M, Armati P, Boadle RA, Holland DJ, Cunningham AL. Anterograde Transport of Herpes Simplex Virus Type 1 in Cultured, Dissociated Human and Rat Dorsal Root Ganglion Neurons. *J Virol.* 2000;74:1827–39.
183. Miranda-Saksena M, Boadle RA, Aggarwal A, Tijono B, Rixon FJ, Diefenbach RJ, u. a. Herpes Simplex Virus Utilizes the Large Secretory Vesicle Pathway for Anterograde Transport of Tegument and Envelope Proteins and for Viral Exocytosis from Growth Cones of Human Fetal Axons. *J Virol.* 2009;83:3187–99.
184. Modrow S, Falke D, Schätzl H, Truyen U. *Molekulare Virologie.* 3.Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2010.
185. Moody SA, Quigg MS, Frankfurter A. Development of the peripheral trigeminal system in the chick revealed by an isotype-specific anti-beta-tubulin monoclonal antibody. *J Comp Neurol.* 1989;279:567–80.
186. Mou F, Wills E, Baines JD. Phosphorylation of the UL31 Protein of Herpes Simplex Virus 1 by the US3-Encoded Kinase Regulates Localization of the Nuclear Envelopment Complex and Egress of Nucleocapsids. *J Virol.* 2009;83:5181–91.
187. Mullis KF, Faloona S, Scharf R, Saiki G, Horn H, Erlich. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 1986; 51: 263 - 273.
188. Negatsch A, Granzow H, Maresch C, Klupp BG, Fuchs W, Teifke JP, u. a. Ultrastructural Analysis of Virion Formation and Intraaxonal Transport of Herpes Simplex Virus Type 1 in Primary Rat Neurons. *J Virol.* 2010;84:13031–5.
189. Negatsch A, Mettenleiter TC, Fuchs W. Herpes simplex virus type 1 strain KOS carries a defective US9 and a mutated US8A gene. *J Gen Virol.* 2011;92:167–72.
190. Newcomb WW, Brown JC. Structure of the herpes simplex virus capsid: effects of extraction with guanidine hydrochloride and partial reconstitution of extracted capsids. *J Virol.* 1991;65:613–20.
191. Newcomb WW, Juhas RM, Thomsen DR, Homa FL, Burch AD, Weller SK, u. a. The UL6 gene product forms the portal for entry of DNA into the herpes simplex virus capsid. *J Virol.* 2001;75:10923–32.
192. Newcomb WW, Trus BL, Booy FP, Steven AC, Wall JS, Brown JC. Structure of the Herpes Simplex Virus Capsid Molecular Composition of the Pentons and the Triplexes. *Journal of Molecular Biology* 1993;232:499–511.
193. Nicola AV, McEvoy AM, Straus SE. Roles for endocytosis and low pH in herpes simplex virus entry into HeLa and Chinese hamster ovary cells. *J Virol.* 2003;77:5324–32.
194. Nicosia M, Zabolotny JM, Lirette RP, Fraser NW. The HSV-1 2-kb latency-associated transcript is found in the cytoplasm comigrating with ribosomal subunits during productive infection. *Virology.* 1. 1994;204:717–28.
195. Nickel R, Schummer A, Seiferle E. *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band IV: Nervensystem, Sinnesorgane, Endokrine Drüsen.* Böhme G, Hrsg. 4. Aufl. Stuttgart: Thieme ; 2004.
196. O'Hare P. The virion transactivator of herpes simplex virus. *Seminars in Virology.* 1993;4:145–55.
197. O'Hare P, Goding CR. Herpes simplex virus regulatory elements and the immunoglobulin octamer domain bind a common factor and are both targets for virion transactivation. *Cell.* 1988;52:435–45.

198. Penfold ME, Armati P, Cunningham AL. Axonal transport of herpes simplex virions to epidermal cells: evidence for a specialized mode of virus transport and assembly. *Proc Natl Acad Sci USA*. 5. 1994;91:6529–33.
199. Pensaert MB, Kluge JP. Pseudorabies Virus (Aujeszky's Disease). In: Pensaert MB, Hrsg. *Virus Infections of Porcines*. Amsterdam: Elsevier ; 1989. p.39-64.
200. Pellett, PE., Roizman B. The family herpesviridae: a brief introduction. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Hrsg. *Fields Virology* 5. Edition. Lippincott-Raven, Philadelphia; 2007.
201. Pomeranz LE, Reynolds AE, Hengartner CJ. Molecular biology of pseudorabies virus: impact on neurovirology and veterinary medicine. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2005;69:462–500.
202. Van Oirschot JT, Gielkens AL, Moormann RJ, Berns AJ. Marker vaccines, virus protein-specific antibody assays and the control of Aujeszky's disease. *Vet Microbiol*. 1990;23:85–101.
203. Overton HA, McMillan DJ, Klavinskis LS, Hope L, Ritchie AJ, Wong-Kai-In P. Herpes simplex virus type 1 gene UL13 encodes a phosphoprotein that is a component of the virion. *Virology*. 1992;190:184–92.
204. Perelygina L, Zhu L, Zurkühlen H, Mills R, Borodovsky M, Hilliard JK. Complete sequence and comparative analysis of the genome of herpes B virus (Cercopithecine herpesvirus 1) from a rhesus monkey. *J Virol*. 2003;77:6167–77.
205. Perng G-C, Jones C. Towards an Understanding of the Herpes Simplex Virus Type 1 Latency-Reactivation Cycle. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2010;2010:262415
206. Perng G-C, Mott KR, Osorio N, Yukht A, Salina S, Nguyen Q-H, u. a. Herpes simplex virus type 1 mutants containing the KOS strain ICP34.5 gene in place of the McKrae ICP34.5 gene have McKrae-like spontaneous reactivation but non-McKrae-like virulence. *J Gen Virol*. 2002;83:2933–42.
207. Lo Piano A, Martínez-Jiménez MI, Zecchi L, Ayora S. Recombination-dependent concatemeric viral DNA replication. *Virus Res*. 2011;160:1–14.
208. Radtke K, Döhner K, Sodeik B. Viral interactions with the cytoskeleton: a hitchhiker's guide to the cell. *Cellular Microbiology*. 2006;8:387–400.
209. De Regge N, Nauwynck HJ, Geenen K, Krummenacher C, Cohen GH, Eisenberg RJ, u. a. Alpha-herpesvirus glycoprotein D interaction with sensory neurons triggers formation of varicosities that serve as virus exit sites. *J Cell Biol*. 2006;174:267–75.
210. Reynolds AE, Wills EG, Roller RJ, Ryckman BJ, Baines JD. Ultrastructural Localization of the Herpes Simplex Virus Type 1 UL31, UL34, and US3 Proteins Suggests Specific Roles in Primary Envelopment and Egress of Nucleocapsids. *J Virol*. 2002;76:8939–52.
211. Del Rio T, Ch'ng TH, Flood EA, Gross SP, Enquist LW. Heterogeneity of a Fluorescent Tegument Component in Single Pseudorabies Virus Virions and Enveloped Axonal Assemblies. *J Virol*. 2005;79:3903–19.
212. Roberts APE, Abaitua F, O'Hare P, McNab D, Rixon FJ, Passetoup D. Differing roles of inner tegument proteins pUL36 and pUL37 during entry of herpes simplex virus type 1. *J Virol*. 2009;83:105–16.
213. Roizman B., Knipe DM, and Whitley RJ. Herpes Simplex Viruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Hrsg. *Fields Virology* 5. Edition. Lippincott-Raven, Philadelphia; 2007.
214. Sabah M, Mulcahy J, Zenan A. Herpes simplex encephalitis. *Praxis*. 2012;101:1437–40.

215. Saksena MM, Wakisaka H, Tijono B, Boadle RA, Rixon F, Takahashi H, u. a. Herpes Simplex Virus Type 1 Accumulation, Envelopment, and Exit in Growth Cones and Varicosities in Mid-Distal Regions of Axons. *J Virol.* 2006;80:3592–606.
216. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977; 74: 5463–5467.
217. Sawtell NM. Comprehensive quantification of herpes simplex virus latency at the single-cell level. *J Virol.* 1997;71:5423–31.
218. Schek N, Bachenheimer SL. Degradation of cellular mRNAs induced by a virion-associated factor during herpes simplex virus infection of Vero cells. *J Virol.* 1985;55:601–10.
219. Schmidt J, Gerdts V, Beyer J, Klupp BG, Mettenleiter TC. Glycoprotein D-independent infectivity of pseudorabies virus results in an alteration of in vivo host range and correlates with mutations in glycoproteins B and H. *J Virol.* 2001;75:10054–64.
220. Schulze C, Hlinak A, Wohlsein P, Kutzer P, Müller T. Spontaneous Aujeszky's disease (pseudorabies) in European wild boars (*Sus scrofa*) in the federal state of Brandenburg, Germany. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2010;123:359–64.
221. Schuster F, Klupp BG, Granzow H, Mettenleiter TC. Structural Determinants for Nuclear Envelope Localization and Function of Pseudorabies Virus pUL34. *J Virol.* 2012;86:2079–88.
222. Scott BS, Engelbert VE, Fisher KC. Morphological and electrophysiological characteristics of dissociated chick embryonic spinal ganglion cells in culture. *Exp Neurol.* 1969;23:230–48.
223. Seil FJ, Leiman AL, Woodward WR. Cytosine arabinoside effects on developing cerebellum in tissue culture. *Brain Res.* 1980;186:393–408.
224. Shanda SK, Wilson DW. UL36p is required for efficient transport of membrane-associated herpes simplex virus type 1 along microtubules. *J Virol.* 2008;82:7388–94.
225. Sibrack CD, Gutman LT, Wilfert CM, McLaren C, St Clair MH, Keller PM, u. a. Pathogenicity of acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1 from an immunodeficient child. *J Infect Dis.* 1982;146:673–82.
226. Simpson SA, Manchak MD, Hager EJ, Krummenacher C, Whitbeck JC, Levin MJ, Freed CR, Wilcox CL, Cohen GH, Eisenberg RJ, Pizer LI. Nectin-1/HveC Mediates herpes simplex virus type 1 entry into primary human sensory neurons and fibroblasts. *J Neurovirol.* 2005;11:208-18.
227. Skelly MJ, Burger AA, Adekola O. Herpes simplex virus-1 encephalitis: a review of current disease management with three case reports. *Antivir Chem Chemother.* 2012;23:13–8.
228. Smith GA, Gross SP, Enquist LW. Herpesviruses use bidirectional fast-axonal transport to spread in sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:3466–70.
229. Smith G. Herpesvirus transport to the nervous system and back again. *Annu Rev Microbiol.* 2012;66:153–76.
230. Smith KO. Relationship between the Envelope and the Infectivity of Herpes Simplex Virus. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1964;115:814–6.
231. Snyder A, Bruun B, Browne HM, Johnson DC. A Herpes Simplex Virus gD-YFP Fusion Glycoprotein Is Transported Separately from Viral Capsids in Neuronal Axons. *J Virol.* 2007;81:8337–40.
232. Snyder A, Polcicova K, Johnson DC. Herpes simplex virus gE/gI and US9 proteins promote transport of both capsids and virion glycoproteins in neuronal axons. *J Virol.* 2008;82:10613–24.

233. Snyder A, Wisner TW, Johnson DC. Herpes simplex virus capsids are transported in neuronal axons without an envelope containing the viral glycoproteins. *J Virol.* 2006;80:11165–77.
234. Sodeik B. Mechanisms of viral transport in the cytoplasm. *Trends in Microbiology.* 2000;8:465–72.
235. Sodeik B, Messerle M, Schulz TF. Herpesviren. In: Miksits K, Hahn H, Falke D, Kaufmann SHE, Ullmann U, Hrsg. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie.* 4 Aufl. Heidelberg: Springer; 2009.
236. Spear PG, Eisenberg RJ, Cohen GH. Three Classes of Cell Surface Receptors for Alphaherpesvirus Entry. *Virology.* 2000;275:1–8.
237. Spear PG, Longnecker R. Herpesvirus entry: an update. *J Virol.* 2003;77:10179–85.
238. Spivack JG, Fraser NW. Detection of herpes simplex virus type 1 transcripts during latent infection in mice. *J Virol.* 1987;61:3841–7.
239. Steven AC, Spear PG. Herpesvirus capsid assembly and envelopment. In Chiu W, Burnett RM, Garcea R Hrsg. *Structural biology of viruses.* New York: Oxford University Press; 1996. p. 312-351.
240. Steven AC, Heymann JB, Cheng N, Trus BL, Conway JF. Virus maturation: dynamics and mechanism of a stabilizing structural transition that leads to infectivity. *Curr Opin Struct Biol.* 2005;15:227–36.
241. Stevens JG. Latent Herpes Simplex Virus and the Nervous System. In: Arber W, Henle W, Hofschneider PH, Humphrey JH, Jerne NK, Koldovský P, u. a., Hrsg. *Current Topics in Microbiology and Immunology.* Berlin Heidelberg Springer; 1975;70:31-50.
242. Stevens JG. Latent infections by herpes simplex virus in experimental animals. *Surv Ophthalmol.* 1976;21:175–7.
243. Stoscheck CM. Quantitation of protein. *Meth. Enzym* 1990; 182:50-68.
244. Stylianou J, Maringer K, Cook R, Bernard E, Elliott G. Virion incorporation of the herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22 occurs via glycoprotein E-specific recruitment to the late secretory pathway. *J Virol.* 2009;83:5204-18
245. Subak-Sharpe JH, Dargan DJ. Hsv Molecular Biology: General Aspects of Herpes Simplex Virus Molecular Biology. *Virus Genes.* 1998;16:239–51.
246. Subramanian RP, Geraghty RJ. Herpes simplex virus type 1 mediates fusion through a hemifusion intermediate by sequential activity of glycoproteins D, H, L, and B. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104:2903–8.
247. Taylor MP, Kramer T, Lyman MG, Kratchmarov R, Enquist LW. Visualization of an Alphaherpesvirus Membrane Protein That Is Essential for Anterograde Axonal Spread of Infection in Neurons. *mBio* 2012;3:e00063-12
248. Thompson RL, Cook ML, Devi-Rao GB, Wagner EK, Stevens JG. Functional and molecular analyses of the avirulent wild-type herpes simplex virus type 1 strain KOS. *J Virol.* 1986;58:203–11.
249. Tomishima MJ, Enquist LW. A conserved α -herpesvirus protein necessary for axonal localization of viral membrane proteins. *J Cell Biol.* 2001;154:741–52.
250. Topp KS, Meade LB, LaVail JH. Microtubule polarity in the peripheral processes of trigeminal ganglion cells: relevance for the retrograde transport of herpes simplex virus. *J Neurosci.* 1994;14:318–25.

251. Trus BL, Homa FL, Booy FP, Newcomb WW, Thomsen DR, Cheng N, u. a. Herpes simplex virus capsids assembled in insect cells infected with recombinant baculoviruses: structural authenticity and localization of VP26. *J Virol.* 1995;69:7362–6.
252. Turner EE, Rhee JM, Feldman LT. The POU-domain factor Brn-3.0 recognizes characteristic sites in the herpes simplex virus genome. *Nucleic Acids Res.* 1997;25:2589–94.
253. Umbach JL, Kramer MF, Jurak I, Karnowski HW, Coen DM, Cullen BR. MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs. *Nature.* 2008;454:780–3.
254. Varon S, Raiborn CW Jr. Dissociation, fractionation, and culture of embryonic brain cells. *Brain Res.* 1969;12:180–99.
255. Wagenaar F, Pol JM, Peeters B, Gielkens AL, De Wind N, Kimman TG. The US3-encoded protein kinase from pseudorabies virus affects egress of virions from the nucleus. *J Gen Virol.* 1995;76:1851–9.
256. Wagner EK, Bloom DC. Experimental investigation of herpes simplex virus latency. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10:419–43.
257. Wagner M, Ruzsics Z, Koszinowski UH. Herpesvirus genetics has come of age. *Trends Microbiol.* 2002; 10:318-324
258. Webre JM, Hill JM, Nolan NM, Clement C, McFerrin HE, Bhattacharjee PS, u. a. Rabbit and mouse models of HSV-1 latency, reactivation, and recurrent eye diseases. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:612316.
259. Weir JP. Regulation of herpes simplex virus gene expression. *Gene* 2001;271:117–30.
260. Weller SK, Coen DM. Herpes simplex viruses: mechanisms of DNA replication. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4:013011.
261. Whitley RJ. Herpes simplex virus. In: M.W. Scheld, R.J. Whitley, C.M. Marra, Hrsg. *Infections in the central nervous system.* 3.Aufl. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. p.123-144.
262. De Wind N, Wagenaar F, Pol J, Kimman T, Berns A. The pseudorabies virus homology of the herpes simplex virus UL21 gene product is a capsid protein which is involved in capsid maturation. *J Virol.* 1992;66:7096–103.
263. Wisner TW, Wright CC, Kato A, Kawaguchi Y, Mou F, Baines JD, u. a. Herpesvirus gB-induced fusion between the virion envelope and outer nuclear membrane during virus egress is regulated by the viral US3 kinase. *J Virol.* 2009;83:3115–26.
264. Wisner TW, Sugimoto K, Howard PW, Kawaguchi Y, Johnson DC. Anterograde transport of herpes simplex virus capsids in neurons by both separate and married mechanisms. *J Virol.* 2011;85:5919–28.
265. Wobus A. Zellkulturtechniken und Zellmodelle. In: *Molekular- und Zellbiologische Grundlagen.* Ganten D, Ruckpaul K, Hrsg. 1 Aufl. Heidelberg Berlin: Springer; 1997.
266. Wood PM. Separation of functional Schwann cells and neurons from normal peripheral nerve tissue. *Brain Research.* 1976;115:361–75.
267. Xu S-Y, Wu Y-M, Ji Z, Gao X-Y, Pan S-Y. A modified technique for culturing primary fetal rat cortical neurons. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:803930.
268. Zaichick SV, Bohannon KP, Hughes A, Sollars PJ, Pickard GE, Smith GA. The Herpesvirus VP1/2 Protein Is an Effector of Dynein-Mediated Capsid Transport and Neuroinvasion. *Cell Host Microbe.* 2013;13:193–203.

269. Zaichick SV, Bohannon KP, Smith GA. Alphaherpesviruses and the Cytoskeleton in Neuronal Infections. *Viruses*. 2011;3:941–81.
270. Zhang K, Huang J, Wang Q, He Y, Xu Z, Xiang M, u. a. Recombinant pseudorabies virus expressing P12A and 3C of FMDV can partially protect piglets against FMDV challenge. *Res Vet Sci*. 2011;91:90–4.
271. Zhou ZH, Dougherty M, Jakana J, He J, Rixon FJ, Chiu W. Seeing the herpesvirus capsid at 8.5 Å. *Science*. 2000;288:877–80.
272. Zhu FX, King SM, Smith EJ, Levy DE, Yuan Y. A Kaposi's sarcoma-associated herpesviral protein inhibits virus-mediated induction of type I interferon by blocking IRF-7 phosphorylation and nuclear accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:5573–8.
273. Zhu Q, Courtney RJ. Chemical Cross-Linking of Virion Envelope and Tegument Proteins of Herpes Simplex Virus Type 1. *Virology* 1994;204:590–9.
274. Zurborn KH. Antineoplastische Therapie. In: Frölich JC, Kirch V, Hrsg. *Praktische Arzneitherapie*. 4. Aufl. Heidelberg Berlin New York: Springer; 2003.

Anhang

Im hinteren Buchband befestigt, befindet sich eine DVD mit externem Filmmaterial. Die dargestellten Filme beziehen sich auf die Abb.: 22 – 26.

Inhalt DVD:

Enthält 11 Objekte

Dateiverzeichnis:

1. Abb. 22_1.avi
2. Abb. 22_2.avi
3. Abb. 23_1.avi
4. Abb. 23_2.avi
5. Abb. 24.avi
6. Abb. 25_1.avi
7. Abb. 25_2.avi
8. Abb. 25_3.avi
9. Abb. 26.avi
10. Filmmaterial Dissertation.pptx
11. Kurzanleitung.pdf

Kurzanleitung:

Es wird empfohlen die Filme in der bearbeiteten Power Point Präsentation „Filmmaterial Dissertation.pptx“ anzusehen. Für jede Abbildung ist eine Folie vorgesehen. Nach dem Starten der Präsentation werden die Filme automatisch wiedergegeben.

Die Filme können auch einzeln angesehen werden. Es wird empfohlen zum Abspielen bitte ausschließlich den Quick Time Player zu verwenden!

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Thomas C. Mettenleiter möchte ich mich ganz herzlich für die exzellente Betreuung und für die Überlassung des spannenden Themas bedanken. Weiter möchte ich mich für die stete Unterstützung und Motivation bedanken und vorallem auch für das große Verständnis.

Bei Herrn Prof. Dr. Thomas W. Vahlenkamp möchte ich mich ganz besonders für die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit bedanken und für die Bereitschaft diese vor dem Fachbereich in Leipzig zu vertreten.

Bei Herrn Dr. habil. Granzow möchte ich mich für die Bearbeitung der elektronenmikroskopischen Analysen und für die Hilfe bei der Auswertung der elektronenmikroskopischen Bilder bedanken. Auch möchte ich mich besonders für die Bereitschaft der vielen Problemlösungen, die mit so empfindlichen Proben wie primären Neuronenkulturen einhergehen, bedanken.

Dr. Walter Fuchs danke ich besonders für die Einführung in das Gebiet der Molekularbiologie und in das weite Methodenspektrum der Virologie. Weiter möchte ich mich für die nette Aufnahme in sein Labor bedanken, sowie für die anregenden Diskussionen und Hilfestellungen bei meiner Arbeit.

Frau Dr. Christina Maresch danke ich für die Einarbeitung in das Primärzellkultursystem und die terminierte Rattenzucht und den netten Start am FLI.

PD Dr. Stefan Finke danke ich für die Einführung in die Welt der Live-Cell-Imaging Mikroskopie und die Hilfestellungen bei der Analyse und der Interpretation der Ergebnisse.

Bei Charlotte Ehrlich möchte ich mich nicht nur für die nette Aufnahme ins Labor bedanken, sondern auch für die schöne und freundliche Arbeitsatmosphäre und die sehr gute Einarbeitung in ein weites Methodenspektrum.

Bei den Tierpflegern am FLI möchte ich mich für die Pflege meiner Rattenzucht bedanken. Ohne die eine Kultivierung von Primärzellen nicht möglich gewesen wäre.

Bei meinen Eltern möchte ich mich ganz besonders bedanken, dass sie mir diese Arbeit ermöglicht haben und mir immer mit Rat und Tat und vorallem mit viel Zuspruch zur Seite standen.

Bei meinen Geschwistern möchte ich mich auch für die große Unterstützung und den bedingungslosen Rückhalt bedanken.

Meinem Freund Sebastian Klabunde danke ich für den bedingungslosen Rückhalt und für die Gabe mich immer wieder motivieren zu können und dabei unseren Weg immer weiterzugehen.

Allen Mitarbeitern am FLI danke ich für die nette Atmosphäre und die schöne Zeit, die ich auf dem Riems verbringen durfte.