

I Einleitung

Die Ordnung der Herpesvirales

Herpesviren gehören zu den am weitesten verbreiteten viralen Infektionserregern. Sie wurden in mehr als 80 Wirbeltierarten, darunter Säugetiere, Vögel, Reptilien und Fische, als auch in einigen Wirbellosen nachgewiesen (Roizman & Baines, 1991). Von den bisher mehr als 200 identifizierten Vertretern der Herpesviren sind acht als humanpathogen beschrieben: Herpes Simplex Virus Typ 1 und 2 (HSV-1, humanes Herpesvirus-1 (HHV-1), HSV-2/HHV-2), Varizella Zoster Virus (VZV/HHV-3), Epstein-Barr-Virus (EBV/HHV-4), Humanes Zytomegalievirus (HCMV/HHV-5) und die humanen Herpesviren Typ 6, 7, und 8 (HHV-6, HHV-7, HHV-8). Daneben gibt es veterinärmedizinisch bedeutsame Herpesviren, die Infektionen bei landwirtschaftlichen Nutztieren verursachen und dort zu wirtschaftlichen Verlusten führen. Hierzu gehören beim Schwein das Pseudorabies Virus (PrV oder Suid Herpesvirus 1), beim Rind das Bovine Herpesvirus Typ 1 (BoHV-1), beim Pferd das Equine Herpesvirus Typ 1 (EHV-1), bei den Fischen das Koi-Herpesvirus (KHV), beim Geflügel das Marek's Disease Virus (MDV) und das Infektiöse Laryngotracheitis Virus (ILTAV oder Gallid Herpesvirus 2). Auch Austern- und Muschelbestände sind durch Herpesvirusinfektionen bedroht (Renault et al., 1995).

Die Ordnung der *Herpesvirales* umfasst behüllte Viren mit einem doppelsträngigen, linearen DNA-Genom. Ihnen sind einige morphologische und biologische Merkmale gemein (Pellet & Roizman, 2007). Die Herpesviren zählen bezüglich ihres Genoms und ihrer Morphologie zu den größten und komplexesten Viren. Sie kodieren für zwischen ca. 70 und mehr als 200 Proteine, wobei etwa die Hälfte der viralen Genprodukte als nichtessentiell für die Replikation in Zellkultur eingestuft wird.

Die Herpesviren sind in der Regel wirtsspezifisch und können unterschiedliche Erkrankungen hervorrufen, bei denen sich die Viren in Lymphozyten, Nervenzellen oder epidermalen Zellen vermehren. Die Produktion infektiöser Nachkommenviren und deren Freisetzung führen dabei stets zum Zelltod.

Ein besonderes Merkmal der Herpesviren ist ihre Fähigkeit, im infizierten Organismus lebenslang in einem Zustand der Latenz zu verbleiben. Diese Latenz kann nach einer Erstinfektion mit produktiver Virusvermehrung in bestimmten Zellen z.B. in Neuronen im Trigemininalganglion (HSV-1, PrV) oder in den Sakralganglien (HSV-2, VZV), aber auch in B-Zellen (EBV) induziert werden. In der latenten Phase

wird kein infektiöses Virus gebildet, das virale Genom ist jedoch nachweisbar. Die Transkription der so genannten *latency associated transcripts* (LAT's) ist auf wenige Genomregionen beschränkt. Eine Reaktivierung führt zur lytischen Infektion, bei der erneut Virus gebildet wird. Sie kann durch endogene oder exogene Stressfaktoren ausgelöst werden. Hierzu zählen unter anderem UV-Strahlen, Corticosteroide oder Infektion und Immunsuppression (Engels & Ackermann, 1996; Steiner, 1996).

Einige Herpesviren wie z.B. das Epstein-Barr-Virus (EBV), das Humane Herpesvirus Typ 8 (HHV-8) und das Marek's Disease Virus können Zellen transformieren und so zur Bildung von Tumoren führen.

Die Klassifizierung der Herpesviren

Herpesviren unterscheiden sich morphologisch deutlich von anderen Viren. Ursprünglich wurden alle Herpesviren anhand ihrer biologischen Merkmale in die drei Unterfamilien der *Alpha-, Beta- und Gammaherpesvirinae* innerhalb der Familie der *Herpesviridae* gruppiert (Roizman et al., 1992). Neuere Erkenntnisse auf molekularer Ebene führten 2008 im Zuge der *Genomics-Ära* zu einer Aktualisierung dieser Einteilung. Umfangreiche Sequenzanalysen zeigen, dass das Genom der Herpesviren der Fische, Amphibien und Weichtiere (Mollusken) nur eine geringe Homologie zur Hauptlinie der Familie der *Herpesviridae* aufweist (Davison, 2002). Dies führte zur Etablierung einer neuen Ordnung der *Herpesvirales*, die die Herpesviren aufgrund ihrer genetischen Unterschiede in drei Familien gliedert: die Familie der *Herpesviridae* (Herpesviren der Säugetiere, Vögel und Reptilien) sowie zwei neue Familien *Alloherpesviridae* (Herpesviren der Fische und Amphibien) und *Malacoherpesviridae* (Herpesviren der Mollusken) (Davison et al., 2009, Davison, 2010). Die Unterteilung der Familie der *Herpesviridae* aufgrund unterschiedlicher Replikationsverhalten und Wirts- bzw. Zellspezifitäten in die Subfamilien der *Alpha-, Beta- und Gammaherpesvirinae* konnte durch die Sequenzanalysen bestätigt werden und hat somit weiterhin Bestand. So sind die Alphaherpesviren genetisch miteinander stärker verwandt als mit den Beta- und Gammaherpesviren und umgekehrt.

Alphaherpesviren sind durch ein breites Wirtsspektrum, einen kurzen Replikationszyklus (in Zellkultur weniger als 24 h) und eine schnelle Ausbreitung in Zellkultur mit effizienter Lyse der infizierten Zellen gekennzeichnet. *In vivo* verhalten sich die Viren neurotrop und sind in der Lage sensorische Ganglien latent zu infizieren. Die

Alphaherpesvirinae werden in vier Genera unterteilt. Dem Genus *Simplexvirus* gehören die humanpathogenen HSV-1 und HSV-2 an. Dem Genus *Varicellovirus* werden das humanpathogene Varizella-Zoster-Virus (VZV) sowie die tierpathogenen Equinen Herpesviren 1 und 4 (EHV-1 und -4), die Bovinen Herpesviren 1 und 5 (BoHV-1 und -5) und das Pseudorabies Virus (PrV) zugeordnet (Roizman et al., 1992). Aufgrund ihrer Genomorganisation und Sequenzhomologie werden die Genera *Mardivirus* mit dem Erreger der Marekschen Krankheit (MDV) und *Iltovirus* mit dem Erreger der Infektiösen Laryngotracheitis (ILTV) ebenfalls den Alphaherpesviren zugeordnet (Minson et al., 2000).

Betaherpesviren sind durch ein eingeschränktes Wirtsspektrum und einen längeren Replikationszyklus charakterisiert. Sie breiten sich entsprechend langsam in der Zellkultur aus, wobei es zu einer charakteristischen Vergrößerung der infizierten Zellen (Zytomegalie) kommt. Latente Infektionen kommen in sekretorischen Drüsen, lymphoretikulären Zellen, der Niere und anderen Geweben vor. Den Betaherpesviren werden die vier Genera *Cytomegalovirus* mit dem Humanen Cytomegalievirus (HCMV), *Muromegalovirus* mit dem Murinen Cytomegalievirus (MCMV), *Roseolovirus* mit den Humanen Herpesviren Typ 6 und 7 sowie *Proboscivirus* mit dem Endotheliotropen Elefantenherpesvirus (EIHV-1) zugeordnet.

Gammaherpesviren weisen ein sehr enges Wirtsspektrum auf. Es werden fast ausschließlich lymphoblastoide Zellen produktiv oder latent infiziert, wobei lytische Infektionen auch in Epithelzellen und Fibroblasten stattfinden können. Zu den Gammaherpesviren gehören die Genera *Lymphocryptovirus* mit dem humanpathogenen Epstein-Barr-Virus (EBV), *Rhadinovirus* mit dem Humanen Herpesvirus Typ 8 (Kaposi's sarcoma-associated Herpesvirus, KSHV), *Macavirus* mit dem Bovinen Herpesvirus 6 (BoHV-6) sowie *Percavirus* mit den Equinen Herpesviren 2 und 5 (EHV-2, EHV-5). Einige Vertreter der Gammaherpesviren wie z.B. EBV und HHV-8 besitzen transformierende Eigenschaften.

In die Familie der *Alloherpesviridae* wurde das Genus *Ictalurivirus* mit dem Koi-Herpesvirus (KHV) und den Froschherpesviren RaHV-1 und -2 gruppiert.

Die Familie der *Malacoherpesviridae* umfasst bisher nur das Genus *Ostreavirus*, das als einzige Spezies das Austernherpesvirus 1 (OsHV-1) enthält.

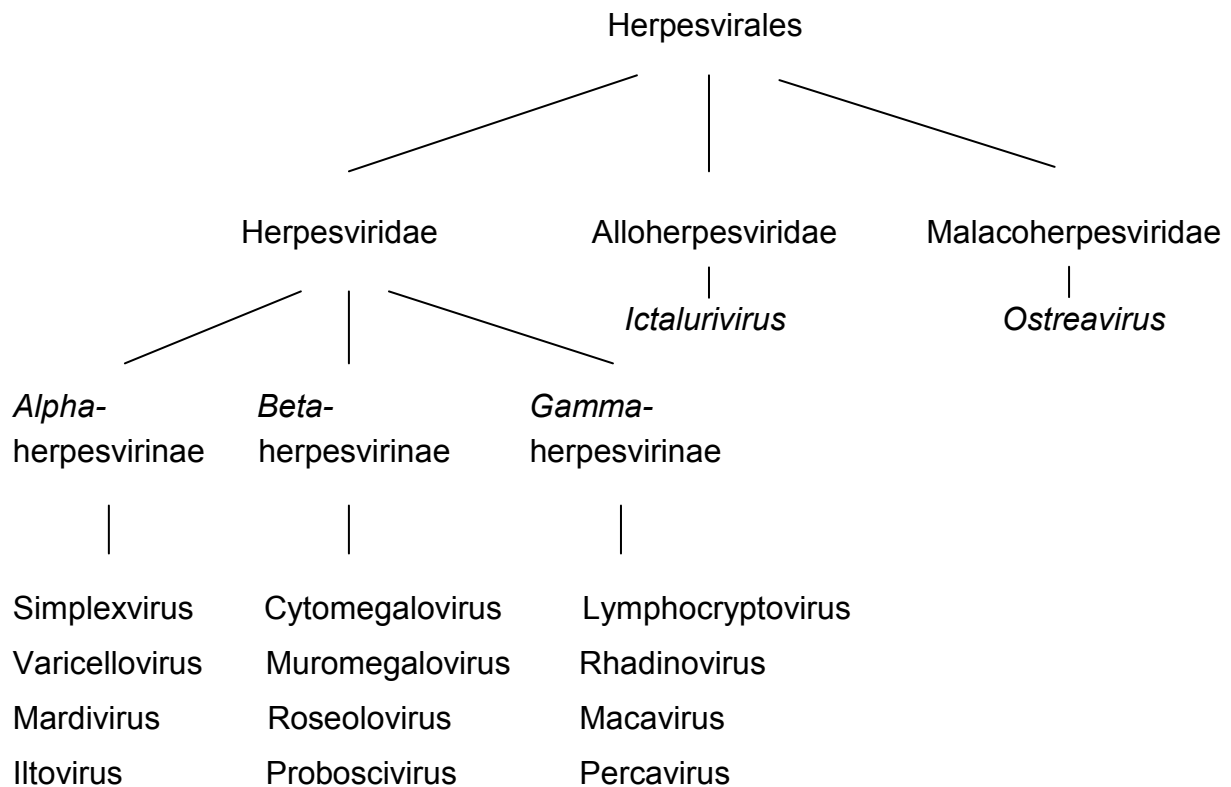


Abb. 1: Klassifizierung der Herpesviren. Die neue Einteilung der Herpesviren ist anhand dieses Diagramms dargestellt.

Die Morphologie der Herpesviren

Alle Herpesviren sind durch eine charakteristische Virusmorphologie gekennzeichnet (Roizman, 1996). Im Elektronenmikroskop lassen sich vier Strukturkomponenten unterscheiden: Kern, Kapsid, Tegument und Hülle (Abb. 2). Der elektronendichte Kern (*core*) enthält die virale genomische DNA, die als lineares doppelsträngiges Molekül vorliegt (Furlong et al., 1972; Minson et al., 2000). Sie wird von einem ikosaedrischen Kapsid der Triangulationszahl 16 ($T=16$) umgeben, das aus 162 symmetrisch angeordneten Struktureinheiten (Kapsomeren) besteht und einen Durchmesser von ca. 100 nm aufweist. Zusammen bilden Kern und Kapsid das sogenannte Nukleokapsid, das von einer amorphen Proteinschicht, dem Tegument, umschlossen wird. Die äußere Hülle (*envelope*) bildet eine von der Wirtszelle abstammende Lipidmembran, in die virale, größtenteils glykosilierte Proteine eingelagert sind (Ginsberg, 1988). Herpesvirionen bestehen aus mehr als 30 unterschiedlichen viralen Proteinen und sind im Durchmesser zwischen 120 und 300 nm groß. Sie gehören folglich mit zu den größten Viruspartikeln. Der Durchmesser

variiert dabei in Abhängigkeit von der Menge des eingelagerten Teguments (Roizman & Furlong, 1974).

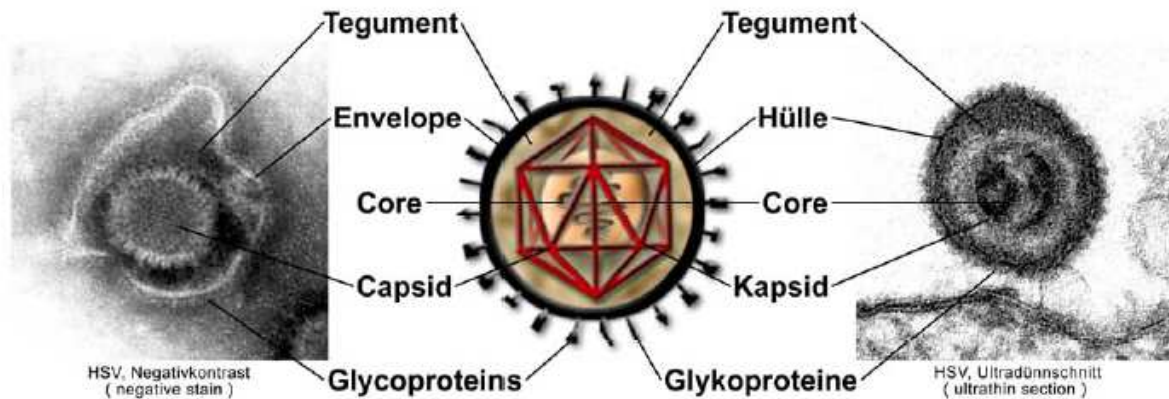


Abb. 2: Morphologie eines Herpesvirions. Der Aufbau eines HSV-1 Partikels ist anhand der elektronenmikroskopischen Aufnahmen (links und rechts) und einer schematischen Übersicht (Mitte) dargestellt (Fotos und Grafik: Dr. H. Granzow, M. Jörn)

Die Genomorganisation

Das Genom der Herpesviren besteht aus einer doppelsträngigen, linearen DNA, deren Länge je nach Virusspezies zwischen 124 kbp (Simian Varicellovirus, SVV) und 295 kbp (Koi-Herpesvirus, KHV) variiert (Gray et al., 2001; Hutoran et al., 2005). Große Abweichungen bestehen auch in der Basenzusammensetzung der DNA. Der G+C-Gehalt liegt dabei zwischen 34% (Canines Herpesvirus) und 74,5% (Herpes B Virus) (Roizman, 1996; Pereylygina, 2003).

Charakteristisch für die Herpesvirusgenome sind die nur einmal vorkommenden (*unique*) Regionen sowie interne (IR) und terminale (TR) Sequenzwiederholungen, wobei die Bedeutung der Sequenzwiederholungen noch unklar ist (Pellet & Roizman, 2007). Die Anzahl und Orientierung dieser *repeats* ermöglicht eine Klassifizierung der herpesviralen Genome in sechs Gruppen (A – F) (Roizman, 1982). Die Gruppen D und E, die nur bei den Alphaherpesviren vorkommen, gliedern den nicht repetitiven Teil des Genoms in zwei Bereiche: U_L - (*unique long*) und U_S - (*unique short*) Region. Durch die repetitiven Regionen können die U_S -Region oder die U_L - und U_S -Region in antiparallelen Orientierungen auftreten, so dass zwei bzw. vier isomere Genomformen entstehen (Roizman & Pellet, 2001).

Die Anzahl der kodierten Proteine liegt zwischen 70 und mehr als 200, wobei sowohl einige der Strukturproteine als auch regulatorische Proteine für die erfolgreiche

Etablierung einer Infektion und die Replikation bei allen Vertretern der Herpesviridae konserviert sind (Davison, 2002).

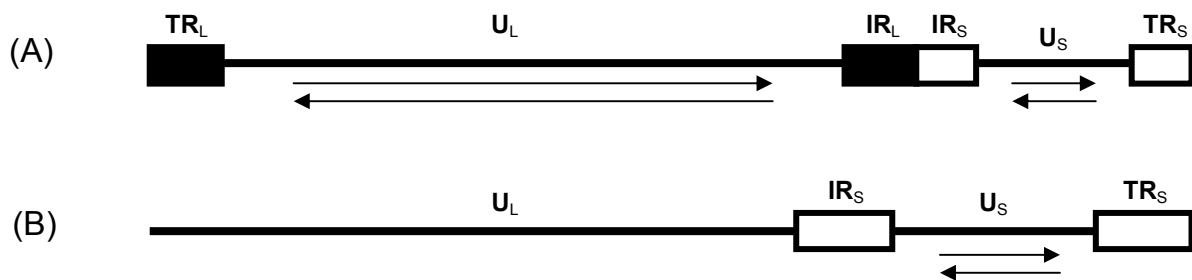


Abb. 3: Schematische Darstellung der Genomorganisation des HSV-1 (A) und des PrV (B). Das herpesvirale Genom besteht aus einer U_L- und einer U_S-Region, die von repetitiven Sequenzen getrennt (IR) bzw. flankiert sind (TR). Die Pfeile stellen mögliche Orientierungen der Genomisomere dar.

Kapsid

Das Kapsid der Herpesviren wird von fünf verschiedenen, konservierten Proteinen gebildet: pUL19, pUL18, pUL38, pUL6 und pUL35. Das Hauptkapsidprotein pUL19 bildet dabei mit 960 Kopien (Steven & Spear, 1997) 162 Kapsomere, die Grundeinheiten des Kapsids (150 Hexone, 12 Pentone), die nur über die Bodenschicht direkt miteinander verbunden sind (Zhou et al., 1999). Zwei Kopien des pUL18 und eine Kopie des pUL38 bilden eine Triplexstruktur, die durch Interaktion mit der mittleren Domäne des pUL19 die Kapsomeren miteinander verbindet (Zhou et al., 2000) und somit das Kapsid stabilisiert. Auf den Hexonen befinden sich je sechs Kopien des kleinen kapsidassoziierten Proteins pUL35, das mit der oberen Domäne des pUL19 interagiert, jedoch für die Kapsidbildung und Virusreplikation der Alphaherpesviren nicht essentiell ist (Desai et al., 1998; Krautwald et al., 2008). Die Ecken des Ikosaeders werden durch die Pentone gebildet, wobei einer dieser Vertices aus einem zylindrischen Kanal aus 12 Kopien des Portal-Proteins pUL6 besteht, durch den die virale DNA während der Verpackung eingeschleust wird (Newcomb et al., 2001; Trus et al., 2004). Die Proteine pUL26 und pUL26.5 bilden die Gerüststruktur (*scaffold*), an die sich die Kapsidproteine zu einem Kapsid-Vorläufer (Prokapsid) zusammenlagern (Newcomb et al., 1996). Dabei kodiert das UL26.5 Gen für die Hauptkomponente des *scaffolds*, während UL26 zusätzlich für eine Serin-Protease kodiert, die benötigt wird, um das Gerüst wieder aus dem Kapsid

zu entfernen. Im Gegensatz zu den *scaffold*-Proteinen ist die Protease jedoch auch in reifen Virionen detektierbar (Michael et al., 2006).

Daneben wurden mit pUL17 und pUL25 weitere Proteine identifiziert, die mit dem Kapsid eng assoziiert sind (Conway et al., 2010; Kaelin et al., 2000; Klupp et al., 2005; Newcomb et al., 2006; Thurlow et al., 2005, Trus et al., 2007).

Tegument

Etwa die Hälfte der viralen Strukturproteine bildet das Tegument, das bislang als amorphe, unstrukturierte Schicht galt, die Kapsid und Virushülle verbindet. Diese Annahme wird zunehmend von dem Bild eines komplexen Netzwerkes von Protein-Protein-Interaktionen ersetzt, von denen erst einige wenige aufgeklärt werden konnten. Die Funktionen der Tegumentproteine sind sehr vielfältig und beinhalten strukturelle und regulatorische Aufgaben. Einzelne Proteine sind dabei teilweise multifunktionell und/oder können redundante Aufgaben erfüllen, wodurch die Aufklärung ihrer Funktionen erschwert wird.

Nach dem Eintritt des Virus in die Wirtszelle (Penetration) dissoziiert ein Großteil des Teguments vom Kapsid in das Zytoplasma. Einige Proteine sind für die Modifizierung der Zelle nach Virusinfektion und die frühe virale Genexpression zuständig. Das sogenannte *virus host shutoff (vhs)* Protein pUL41 hat dabei die Aktivität einer mRNA-spezifischen RNase und führt durch den Abbau der zellulären mRNA zur Hemmung der Proteinbiosynthese der Wirtszelle (Kwong & Frenkel, 1989). Proteine, die mit dem Kapsid assoziiert bleiben, gewährleisten den aktiven Transport entlang der Mikrotubuli zum Zellkern (Sodeik, 2000). Weiterhin dienen Tegumentproteine zur Translokation der Kapside zum trans-Golgi-Netzwerk und zur finalen Umhüllung der Nukleokapside während der Virusmorphogenese.

Die innerste Tegumentschicht, die dem Kapsid aufgelagert ist, zeigt noch dessen ikosaedrische Symmetrie (Zhou et al., 1999). Immunelektronenmikroskopische Untersuchungen HSV-1 und PrV infizierter Zellen zeigten, dass während der Virusreifung im Zytoplasma die Tegumentproteine pUL36, pUL37 und pUS3 als erste dem Kapsid aufgelagert werden (Fuchs et al., 2002; Granzow et al., 2001; Reynolds et al., 2002). Dabei interagiert pUL36 vermutlich mit den Pentonen (Zhou et al., 1999). Die äußere Tegumentschicht hingegen vermittelt den Kontakt zur Lipidhülle durch Proteine, die u.a. an zytoplasmatische Domänen viraler Glykoproteine binden,

welche in Membranen des trans-Golgi-Netzwerkes eingelagert wurden. Zu diesen Tegumentproteinen zählen pUL46, pUL47, pUL48 und pUL49.

Weitere Bestandteile des Teguments sind die Proteinkinasen pUS3 und pUL13, wobei pUS3 in PrV als bisher einziges Tegumentprotein sowohl in primär umhüllten als auch reifen Virionen nachgewiesen werden konnte (Granzow et al., 2004). pUS3 ist vor allem an der effizienten Freisetzung der primär umhüllten Virionen aus dem Kernspalt beteiligt. Dabei spielen Modifizierungen der Kernlamina (Bjerke & Roller, 2006) sowie viraler und zellulärer Proteine eine wichtige Rolle (Asai et al., 2007; Kato et al., 2006).

Die Tegumentproteine pUL11, pUL16 und pUL21 sind innerhalb der Herpesviren konserviert und bilden wahrscheinlich einen tripartiten Komplex, da Interaktionen zwischen pUL11 und pUL16 (Loomis et al., 2003) als auch zwischen pUL21 und pUL16 von HSV-1 und PrV (Klupp et al., 2005; Harper et al., 2010) gezeigt werden konnten.

Mittels massenspektrometrischer Proteomanalysen von HSV-1, PrV, EBV, HCMV und KSHV Virionen wurden zahlreiche zelluläre Proteine als Strukturkomponenten des Virions identifiziert (Bechtel et al., 2005; del Rio et al., 2005; Johannsen et al., 2004; Kattenhorn et al., 2004; Loret et al., 2008; Michael et al., 2006; Varnum et al., 2004). Dies sind vor allem Proteine des Vesikeltransportes (Clathrin), Komponenten des Zytoskeletts (Aktin, Tubulin, Myosin) und Hitzeschockproteine (Hsp70, Hsp90).

Virushülle

Die Virushülle (*envelope*) besteht aus einer Lipidmembran, die von zellulären Membranen des Trans-Golgi-Netzwerkes abstammt (Gershon et al., 1994; Granzow et al., 2001; Turcotte et al., 2005; Zhu et al., 1995). Die Hülle der Alphaherpesviren enthält mindestens zehn verschiedene Glykoproteine (gB, gC, gD, gE, gH, gI, gK, gL, gM, gN) und einige nicht glykosylierte Proteine (pUL20, pUL43, pUS9). Die Oberflächenproteine stellen sich in elektronenmikroskopischen Aufnahmen als Protrusionen (*spikes*) dar und sind sowohl an der Adsorption und der Penetration als auch an der Virusmorphogenese, der Freisetzung und der Virusausbreitung beteiligt. Sie bestimmen somit den Tropismus und die Virulenz des Virus. Sie befinden sich nicht nur an der Virusoberfläche, sondern werden auch auf der Oberfläche infizierter Zellen exprimiert und sind die Hauptziele der zellulären und humoralen Immunantwort des Wirtes (Ben Porat et al., 1986; Mettenleiter, 2000).

gB bildet ein Homodimer, während gH/gL, gE/gI und gM/gN funktionelle heterodimere Komplexe bilden.

Das Pseudorabies Virus

Das Pseudorabies Virus (PrV), welches der binären Taxonomie der Viren folgend korrekterweise als Suid Herpesvirus 1 (SuHV-1) bezeichnet wird, gehört zur Unterfamilie der neurotrophen Alphaherpesviren innerhalb der Familie der *Herpesviridae*. Die nahe Verwandtschaft zu BoHV-1, EHV-1 und VZV führte zur Einordnung in das Genus *Varicellovirus*.

Das Pseudorabies Virus ist der Erreger der Aujeszky'schen Krankheit, die 1902 erstmals von dem ungarischen Tierarzt Aladár Aujeszky beschrieben wurde (Aujeszky, 1902). Da die Erkrankung Symptome hervorruft, die denen der Tollwut (*Rabies*) ähneln, wird sie auch als Pseudowut (*Pseudorabies*) bezeichnet.

PrV kann nahezu alle Säugetierarten infizieren, wobei die Mortalitätsrate fast 100% beträgt (Wittmann, 1984). Nur das Schwein kann in Abhängigkeit von der Virulenz und Infektionsdosis des Erregers sowie Alter und Immunstatus des Wirtes eine produktive Infektion überleben und gilt somit als das einzige natürliche Reservoir für das Virus (Wittmann & Rziha, 1989). Einzig Einhufer und höhere Primaten, einschließlich des Menschen, sind gegenüber PrV-Infektionen resistent (Mettenleiter, 1994).

In der molekularbiologischen Forschung stellt PrV ein sehr gutes Modellsystem zur Aufklärung grundlegender Mechanismen einer Herpesvirusinfektion dar, da das breite Wirtsspektrum die Etablierung verschiedener Infektionsmodelle erlaubt, der Mensch jedoch unempfindlich gegenüber dem Erreger ist.

Das Genom des PrV besteht aus 143,461 kbp und ist durch einen sehr hohen G/C-Gehalt von ca. 73% gekennzeichnet (Mettenleiter, 1994a). Es enthält 72 offene Leseraster, die für 70 verschiedene Proteine kodieren (Klupp et al., 2004). Aufgrund der zwei „inverted repeats“, die das Genom in eine U_L-Region und U_S-Region teilen (Abb. 3B), wird das PrV-Genom der Gruppe D der Herpesvirusgenome zugeordnet (Roizman, 1994). Durch eine Inversion der U_S-Region können zwei isomere Genomformen auftreten. Das PrV-Genom zeigt eine weitgehend kolineare Anordnung der Gene im Vergleich zum HSV-1 Genom. Eine Ausnahme stellt eine 40 kbp große Inversion im Bereich der U_L-Region dar, in der die Gene UL27 – UL44 im

Vergleich zum HSV-1 Genom in umgekehrter Orientierung liegen (Ben-Porat & Kaplan, 1985; Dezélee et al., 1996; Bras et al., 1999). Die biologische Bedeutung dieser Inversion ist jedoch unklar. Nach bisherigen Erkenntnissen existieren im PrV-Genom drei funktionale Startpunkte der viralen DNA-Replikation, zwei innerhalb der „inverted repeats“ und einer in der Mitte der U_L-Region.

Die Pathogenese des Pseudorabies Virus

Die Aujeszky'sche Krankheit ist eine anzeigepflichtige Erkrankung von hoher wirtschaftlicher Bedeutung in der Nutztierhaltung. Mitte des 20. Jahrhunderts war das Virus weltweit verbreitet und verursachte hohe ökonomische Verluste beim Schwein. Eine systematische Bekämpfung mit Hilfe von Markervakzinen, die durch das Fehlen nicht essentieller Glykoproteine (z.B. gE, gC, gG) eine Unterscheidung von geimpften und Feldvirus-infizierten Tieren ermöglicht, hat weltweit große Erfolge erzielt (Pensaert & Morrison, 2000). Seit 2001 ist die Aujeszky'sche Krankheit in Deutschland bei Hausschweinen nicht mehr aufgetreten (Müller et al., 2003).

Die Aujeszky'sche Krankheit äußert sich als fiebrige Allgemeinerkrankung mit neurologischen Symptomen einer Meningoenzephalitis, die häufig von Entzündungen des Respirationstrakts einschließlich der Lungen begleitet ist. Nach meist oronasaler Virusaufnahme und primärer Replikation in den Nasenschleimhäuten und dem oberen Respirationstrakt kommt es zu einer raschen Virusausbreitung innerhalb des zentralen Nervensystems (ZNS). Abhängig vom Alter der Tiere und der Virulenz des Virusstammes treten zwei verschiedene Krankheitsbilder auf (Wittmann & Rziha, 1989). Bei Saugferkeln verläuft die Infektion meist letal, wobei überwiegend neurologische Symptome vorherrschen, die von Erregungszuständen und Koordinationsstörungen bis zu Ataxien, Lähmungen der Hintergliedmaßen („dog sitting“) sowie Krämpfen der Rückenmuskulatur und der Extremitäten mit Ruderbewegungen reichen (Pensaert & Kluge, 1989; Wittmann & Rziha, 1989; Wittmann, 1991). Nach ein bis zwei Tagen sterben die Tiere an den Folgen einer Gehirn- und Rückenmarksentzündung (Sabo et al., 1969). Die bei den Saugferkeln hohe Mortalitätsrate von nahezu 100% nimmt mit zunehmendem Alter ab und ist bei adulten Tieren auf 2-5% reduziert (Crandell, 1985). Adulte Tiere zeigen hauptsächlich respiratorische Symptome bzw. sind symptomlos und überleben die Krankheit unter Ausbildung einer lebenslang latenten Infektion in den sensorischen Ganglien.

Infektionen von anderen empfänglichen Spezies führen schnell zu hohem Fieber und starkem Juckreiz („*mad itch*“) an der Eintrittsstelle des Virus (Aujeszký, 1902; Crandell, 1985), der zu einem ausgeprägtem Kratzverhalten bis hin zur Selbstverstümmelung führt. Die Tiere sterben meist nach ein bis zwei Tagen (Aujeszký, 1902).

Das Herpes Simplex Virus Typ 1

HSV-1 wird ebenfalls in die Unterfamilie der neurotrophen Alphaherpesviren eingeordnet und gehört wie das eng verwandte HSV-2 zu den humanpathogenen Simplexviren. Für den Stamm HSV-1 F liegt eine vollständige 152,261 kbp lange Genomsequenz vor. Diese umfasst 90 offene Leserahmen (McGeoch et al., 1988), die für mindestens 84 verschiedene Proteine kodieren. HSV-1 weist ein Genom der Gruppe E auf, das aus einer langen und einer kurzen singulären Region (U_L , U_S) besteht, die jeweils von internen und terminalen invers repetitiven Sequenzen (IR_L , TR_L , IR_S , TR_S) flankiert wird. Durch Rekombination zwischen den repetitiven Sequenzen entstehen vier Genomisomere (Abb. 3A). Der G/C-Gehalt des HSV-1 Genoms beträgt ca. 68%.

Herpes Simplex Viren sind weltweit verbreitet und kommen unter natürlichen Bedingungen nur beim Menschen vor. Das experimentelle Wirtsspektrum umfasst neben dem natürlichen Wirt, dem Menschen, auch zahlreiche andere Spezies wie Affen und Nager. Die Durchseuchungsrate beträgt bis zur Pubertät 50% und erhöht sich im Erwachsenenalter auf über 90%. Eine Infektion mit HSV-1 verursacht in der Regel *herpes labialis* (Lippenherpes).

Die Pathogenese des HSV-1

Natürlicherweise erfolgt die Infektion mit HSV-1 meist schon im Kindesalter durch den Kontakt der Schleimhäute oder verletzter Haut mit virushaltigem Bläscheninhalt oder Sekreten der Mundhöhle (Whitley, 1996). Die Erstinfektion verläuft dabei oft symptomlos.

HSV-1 infiziert zunächst epitheliale Schleimhautzellen, in denen es zur lytischen Vermehrung kommt. Von dort werden die Viren in den Axonen sensorischer Neuronen zum Trigemininalganglion transportiert, wo eine lebenslange, reaktivierbare Latenz etabliert wird. Bei immundefizienten Patienten oder Neugeborenen kann es zu schweren generalisierten Verlaufsformen kommen (*herpes neonatorum*) (Whitley,

2004). Selten wurden im Zusammenhang mit HSV-1 Infektionen auch Enzephalitiden und Keratokonjunktivitiden, die bis zur Erblindung führen können, beschrieben.

Der Infektionszyklus von PrV und HSV-1

Der Infektionszyklus der Alphaherpesviren ist bei PrV und HSV-1 ultrastrukturell und molekularbiologisch sehr gut untersucht (Granzow et al., 2001; Pellet & Roizman, 2007) und gilt als typischer Replikationsablauf für eine lytische Herpesvirusinfektion, der nun im Detail dargestellt werden soll.

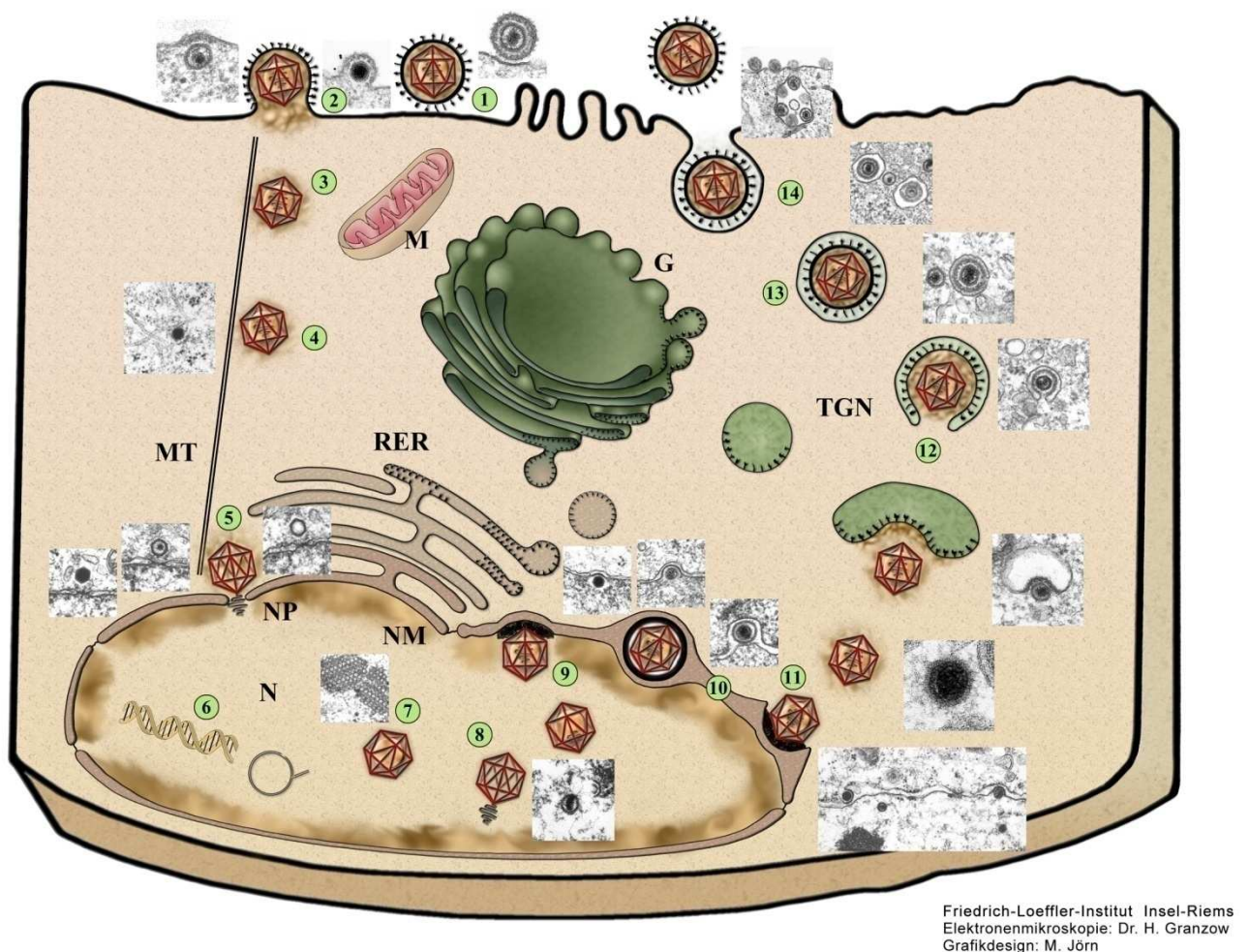


Abb. 4: Replikationszyklus der Alphaherpesviren. Schematischer Überblick des alphaherpesviralen Replikationszyklus: (1) Adsorption an die Zielzelle und glykoproteinvermittelte Verschmelzung der Virushülle mit der Plasmamembran (2). Nach Abtrennung großer Teile des Teguments (3) werden die Nukleokapside entlang der Mikrotubuli (4) zu den Kernporen transportiert (5), wo die virale DNA in den Zellkern entlassen wird. Im Zellkern findet die Transkription und Replikation der viralen DNA statt (6). Nach dem autokatalytischen Zusammenbau der Vorläuferkapside (7) und der Verpackung der

viralen DNA (8) kommt es zur primären Umhüllung an der inneren Kernmembran (9). Die primär umhüllten Nukleokapside gelangen nach Fusion mit der äußeren Kernmembran aus dem Kernspalt (10) in das Zytoplasma (11). Dort kommt es zur Anlagerung von Tegumentproteinen und zur sekundären Umhüllung (12) am Trans-Golgi-Netzwerk (TGN). Die reifen Virionen gelangen in Transportvesikeln (13) an die Plasmamembran, wo sie mittels Exozytose freigesetzt werden (14). (modifiziert nach Mettenleiter, 2008)

Adsorption

Der Infektionszyklus beginnt mit der Bindung (*attachment*, Adsorption) infektiöser Viruspartikel an Oberflächenrezeptoren der Wirtszelle [Abb. 4(1)], die durch die viralen Glykoproteine gC und gD vermittelt wird (Spear, 1993; Mettenleiter et al., 1990). Die Adsorption verläuft biphasisch: Zunächst erfolgt eine lockere Anlagerung des nicht-essentiellen Glykoproteins gC an Heparansulfatproteoglykane (HSPG) der Wirtszelle (Mettenleiter et al., 1990; Sawitzky et al., 1990; Karger & Mettenleiter, 1993) in einem Abstand von ca. 12-14nm (Granzow et al., 1997). Bei HSV-1 konnte zusätzlich zur gC-vermittelten Bindung auch eine produktive Interaktion des Glykoproteins gB mit HSPG gezeigt werden (Laquerre et al., 1998; Herold et al., 1994). Diese reversible Bindung beruht auf schwachen elektrostatischen Wechselwirkungen (Sawitzky et al., 1990; Flynn et al., 1993; Liang et al., 1993) und lässt sich durch Zugabe von Heparin, einem löslichen Analogon des HSPG, kompetitiv hemmen (Herold et al., 1991; Mettenleiter et al., 1990; Okazaki et al., 1991).

In einer zweiten Phase kommt es zu einer stärkeren Bindung der Virionen an die Wirtszelle, wobei sich der Abstand auf 6-8nm verkürzt (Granzow et al., 1997). Diese Bindung wird durch das Glykoprotein gD vermittelt (Karger & Mettenleiter, 1993; McClain & Fuller, 1994), das an verschiedene zelluläre Rezeptoren binden kann. Diese Rezeptoren werden als *herpes virus entry mediators (HveA-D)* bezeichnet (Montgomery et al., 1996). *HveA* aus der Superfamilie der Tumornekrosefaktor-Rezeptoren (TNF-Rezeptoren) vermittelt u.a. den Eintritt vieler HSV-1- und HSV-2-Stämme (Montgomery et al., 1996). *HveB*, *HveC* und *HvD* gehören zur Superfamilie der Immunglobuline und sind vor allem für die Bindung von PrV relevant (Geraghty et al., 1998; Nixdorf et al., 1999; Warner et al., 1998). *HveD* vermittelt nicht nur eine Interaktion mit Herpesviren, sondern wurde bereits vorher als Rezeptor für Polioviren beschrieben (Mendelsohn et al., 1989). Neben diesen Proteinen können auch bestimmte HSPG gD binden.

Darüber hinaus existieren weitere Rezeptoren, die durch herpesvirale Oberflächenmoleküle gebunden werden können, aber noch nicht identifiziert wurden. So wurde eine HSV-1 Mutante beschrieben, der alle bisher für die Adsorption relevanten HSV-1 Oberflächenmoleküle fehlen, die dennoch in der Lage ist, Zellen zu infizieren (Cocchi et al., 2004). Für PrV wurde in Abwesenheit von gD-Rezeptoren oder der Glykoproteine gC und gD eine Infektion gezeigt, jedoch mit geringerer Effizienz (Schmidt et al., 1997; Karger et al., 1998; Nixdorf et al., 1999).

Penetration

Nach der Adsorption des Viruspartikels verschmilzt die Virushülle mit der zellulären Plasmamembran in einem direkten, pH-unabhängigen Prozess, wobei die Nukleokapside und Tegumentbestandteile ins Zytoplasma freigesetzt werden (*entry*, Penetration) [Abb. 4(2)]. Ein Großteil der äußeren Tegumentproteine dissoziiert von dem Kapsid, lediglich die inneren Tegumentproteine pUL36, pUL37 sowie die Kinase pUS3 verbleiben am Kapsid [Abb. 4(3)] (Granzow et al., 2005; Luxton et al., 2005).

Die viralen Hüllproteine gD, gB und ein Komplex aus gH und gL sind für die Penetration essentiell, da entsprechende Negativmutanten zwar noch an Zellen binden, die Membranfusion jedoch unterbleibt (Spear, 1993; Mettenleiter, 2000; Mettenleiter & Spear, 1994).

Neben diesem Fusionsvorgang wurde für einige Zielzellen auch die Endozytose von Viruspartikeln und eine pH-abhängige Freisetzung der Kapside ins Zytoplasma beschrieben (Nicola et al., 2003).

Transport zum Zellkern

Nach dem Eintritt in das Zytoplasma gelangen die Nukleokapside entlang der Mikrotubuli [Abb. 4(4)] über zelluläre Motorproteine zu den Kernporen (Granzow et al., 1997; Kaelin et al., 2000; Sodeik et al., 1997; Sodeik, 2000). Nach Bindung der Nukleokapside an den Kernporenkomplex [Abb. 4(5)] wird die virale DNA durch einen der Vertices in das Kernplasma entlassen und die leeren Kapside verbleiben an der Kernpore (Granzow et al., 1997). Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Proteine pUL25 und pUL36 an der Freisetzung der viralen DNA beteiligt sind (Jovasevic et al., 2008; Preston et al., 2008). Sofort nach dem Eintritt in den Zellkern kommt es zur Zirkularisierung des viralen Genoms und danach zur Transkription der viralen Gene, Replikation der viralen DNA [Abb. 4(6)] und zur Neubildung der Nukleokapside [Abb. 4(7)].

Genexpression/DNA-Replikation

Während der Virusinfektion wird der zelluläre Proteinbiosyntheseapparat durch virale Proteine auf die Produktion vorwiegend viraler Genprodukte umgestellt. Die ins Zytosol freigesetzten Tegumentproteine spielen dabei eine besondere Rolle. Das bei den Alphaherpesviren konservierte, von UL41 kodierte *virus host shut off*-protein (vhs) beispielsweise besitzt eine RNase-Aktivität, die zum Abbau der zellulären mRNA führt (Kwong & Frenkel, 1989; Ward & Roizman, 1994) und so die zelluläre Proteinbiosynthese hemmt (Smiley, 2004). Im weiteren Verlauf der Infektion wirkt das UL48-Genprodukt (α -TIF, VP16) vermutlich regulierend auf das vhs und führt dadurch zu einem Schutz der viralen RNA (Lam et al., 1996; Smibert et al., 1994). Die RNase-Aktivität von UL41 fällt bei PrV gegenüber HSV-1 allerdings wesentlich geringer aus und ist auch deutlich verzögert (Ambagala et al., 2003).

Die zirkularisierte virale DNA dient als Matrize für die Transkription der viralen Gene. Die Transkription erfolgt dabei durch die zelluläre RNA-Polymerase II und ist wie bei allen Herpesviren kaskadenartig reguliert (Honess & Roizman, 1975; Feldman et al., 1979). Die Gene werden nach dem Zeitpunkt ihrer Expression in sehr frühe (*immediate early*, α), frühe (*early*, β) und späte (*late*, γ) Gene unterteilt, wobei letztere noch in *early late*- (γ -1) und *true late*- (γ -2) Gene untergliedert werden. Die Initiation der *immediate early*-Genexpression erfolgt direkt nach der Infektion und benötigt keine Neusynthese viraler Proteine, wird jedoch durch mitgebrachte virale Transaktivatoren wie z.B. das Tegumentprotein pUL48 stimuliert (Kwong & Frenkel, 1989). Bei HSV-1 konnten bisher sechs *immediate early*-Gene identifiziert werden (ICP0, ICP4, ICP22, ICP27, ICP47, pUS1.5), bei PrV sind zwei *immediate early*-Gene bekannt (IE180, US1), wobei IE180 homolog zu ICP4 und US1 homolog zu ICP22 ist (Cheung et al., 1990, Fuchs et al., 2000). Die Proteinprodukte der *immediate early*-Gene dienen u.a. als Transaktivatoren der *early*-Gene. Die frühen Gene kodieren hauptsächlich für Proteine des Nukleinsäurestoffwechsels (dUTPase, Thymidinkinase, Ribonukleotid-Reduktase) und der DNA-Synthese (DNA-bindendes Protein, DNA-Polymerase, Helikase/Primase-Komplex, ori-bindendes Protein, Polymerase-assoziiertes Protein) (Mettenleiter, 2000). Die Transkription der *early*-Gene beginnt vor der DNA-Replikation und ist durch Cycloheximid hemmbar. Die Replikation der herpesviralen DNA erfolgt ähnlich wie bei den Bakteriophagen T4 und λ nach dem *rolling-circle*-Prinzip (Ben Porat, 1981). Die Expression der späten Gene ist von der Replikation der viralen DNA abhängig und lässt sich durch

Phosphonoessigsäure, einem Inhibitor der viralen DNA-abhängigen DNA-Polymerase, hemmen. Die *early-late*-Gene, die zu geringen Mengen bereits vor der viralen DNA-Synthese exprimiert werden, erreichen im Unterschied zu den *early*-Genen das Maximum ihrer Expression erst nach dem Einsetzen der DNA-Replikation. Die *true-late*-Gene werden nach der Genomreplikation transkribiert und kodieren hauptsächlich für virale Strukturproteine (Ben Porat & Kaplan, 1985).

Die herpesvirale DNA-Replikation erfolgt im Zellkern in abgegrenzten Replikationskompartimenten. Nach der Zirkularisierung des Genoms werden ausgehend von den *oris* Theta-Strukturen gebildet, die als *template* für die DNA-Synthese dienen (Boehmer & Lehman, 1997). Dabei entstehen fortlaufende DNA-Stränge, sogenannte Konkatemere, die aus vielen Kopien des Genoms bestehen, welche in einer *head-to-tail*-Konfiguration miteinander verbunden sind (Ben-Porat&Kaplan, 1981). Diese Genomkonkatemere werden mit Hilfe der viralen Terminase (pUL15/pUL28/pUL33) an spezifischen Erkennungssignalen (*cleavage and encapsidation sites*) geschnitten, so dass in jedes Kapsid genau eine Genomkopie eingelagert wird (Wu et al., 1986).

Kapsidmorphogenese und Verpackung des Genoms

Sowohl die Kapsidmorphogenese als auch die Verpackung der neu replizierten viralen DNA ähneln den Prozessen in ds-DNA-haltigen Bakteriophagen, was auf eine gemeinsame Abstammung schließen lässt (Homa & Brown, 1997; Baines & Weller, 2005 (Catalano); McGeoch et al., 2006).

Die im Zytoplasma gebildeten Kapsidproteine werden in den Kern transportiert, wo sie sich in einem energieunabhängigen Prozess (*self assembly*) zu Vorläuferkapsiden zusammenlagern [Abb. 4(7)] (Newcomb et al., 1999), die, nachdem die DNA verpackt wurde [Abb. 4(8)], zu stabilen ikosaedrischen Kapsiden reifen. Dieser Reifungsprozess unterliegt einer energieabhängigen Konformationsänderung. Die Proteine pUL26 und pUL26.5 bilden die Gerüststruktur (*scaffold*), an die sich die Kapsidproteine zu einem sphärischen Prokapsid zusammenlagern (Newcomb et al., 1996). Dabei finden initiale Assoziationen zwischen dem Hauptkapsidprotein pUL19 und dem *scaffold*-Protein bereits im Zytoplasma statt. Auch die Triplexproteine pUL18 und pUL38 assoziieren im Zytoplasma und werden dann in den Kern transportiert, wo sie mit den pUL19-*scaffold*-Komplexen zu Vorläufer-Kapsiden assemblieren (Spencer et al., 1998). Durch Interaktion mit angrenzenden pUL19-Molekülen stabilisieren die Triplex-Proteine die Kapsidstruktur, wobei ein Triplex drei Kapsomere verbindet.

Für die Spaltung und Verpackung neu replizierter Virus-DNA in die Vorläuferkapside sind folgende konservierte Proteine essentiell: pUL6, pUL15, pUL17, pUL28, pUL32 und pUL33. Die Deletion eines dieser Gene führt zur Akkumulation von unreifen Kapsiden im Kern infizierter Zellen (Addison et al., 1990; Alkobaisi et al., 1991; Lamberti et al., 1996; Lamberti et al., 1998; Poon et al., 1993).

Zwölf Kopien des pUL6 bilden an einem der 12 *vertices* einen ringförmigen Kanal, durch den die DNA in das Viruskapsid transloziert wird (Newcomb et al., 2001; Trus et al., 2004). *In vitro* Versuche, in denen der Kapsidzusammenbau in zellfreien Systemen nachgestellt wurde, zeigten, dass das Portalprotein pUL6 nur dann in das Kapsid eingebaut wird, wenn es bereits zu Beginn der Reaktion zur Verfügung stand (Newcomb et al., 2005). Das führte zu der Annahme, dass pUL6 an der Initiation der Kapsidbildung beteiligt ist. Allerdings findet der Kapsidzusammenbau auch ohne pUL6 statt, wie Untersuchungen mit UL6-Deletionsmutanten und weitere *in vitro* Studien zeigen (Newcomb et al., 1994; Tatman et al., 1994; Thomsen et al., 1994; Weller et al., 1987; Fuchs et al., 2009). Kürzlich wurde beim HSV-1 *scaffold*-Protein pUL26.5 die Bindestelle für das Portal-Protein pUL6 identifiziert (Singer et al., 2005). pUL15, pUL28 und pUL33 bilden die Terminase (Adelman et al., 2001; Baines et al., 1994; Beard et al., 2002; Homa & Brown, 1997), einen Enzymkomplex, der spezifisch an die Genomenden bindet und die neu synthetisierte DNA beim Einbau in die Prokapside in Genomlänge schneidet. Es wurden zwei hoch konservierte Sequenzmotive (*pac1* und *pac2*) am Ende des Virusgenoms identifiziert, die essentiell für das Schneiden und Verpacken der DNA sind und spezifisch von der Terminase-Untereinheit pUL28 gebunden werden können (Adelman et al., 2001, Bogner et al., 1998; Yu et al., 1997). Dabei wird durch das Schneiden der Terminase an *pac2* vermutlich der Verpackungsvorgang initiiert und durch Schneiden an *pac1* das Genom vom Konkatermer getrennt und damit der Verpackungsvorgang beendet. Die Terminase-Untereinheiten pUL15 und pUL28 interagieren mit dem Portal-Protein pUL6, wodurch die Bindung der Terminase an das Kapsid vermittelt wird (Dittmer et al., 2005; White et al., 2003; Yang et al., 2007). Die ATPase-Aktivität des pUL15 liefert dabei durch Hydrolyse von ATP die notwendige Energie, um die DNA durch den Kanal in das Kapsid zu schleusen [Abb. 4(8)] (Baines & Duffy, 2006; Hwang and Bogner, 2002).

Während der DNA-Verpackung wird durch die Proteaseaktivität des pUL26 das Gerüst im Kapsidinneren von pUL19 getrennt, indem die C-terminalen 25 AS vom

scaffold abgeschnitten werden (Zhou et al., 1998). Dabei wird das *scaffold* entfernt und Platz für den Einbau der viralen DNA geschaffen (Gao et al., 1994). Gleichzeitig wird der Umbau des sphärischen Prokapsids zu einem stabilen ikosaedrischen Kapsid initiiert (Heymann et al., 2003; Roos et al., 2009; Steven et al., 2005). In Bakteriophagen ist diese Transformation mit einer Umorganisation der Kapsidproteine und der Anlagerung stabilisierender Proteine an die Kapsidoberfläche verbunden (Catalano, 2005).

pUL32 konnte sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma nachgewiesen werden, seine genaue Funktion ist jedoch noch unbekannt. Da pUL32 keine direkten Wechselwirkungen mit der Terminase oder pUL6 zeigt, ist es möglicherweise für den Transport der Vorläuferkapside zu den DNA-Replikationskompartimenten verantwortlich (Lamberti & Weller, 1998).

Als Resultat der Kapsidmorphogenese lassen sich im Kern infizierter Zellen ultrastrukturell vier verschiedene Kapsidformen finden: Prokapside enthalten ein interne *scaffold*-Struktur, sind noch rund und porös und stellen die Vorstufen der folgenden drei Kapsidformen dar. A-Kapside enthalten weder DNA noch *scaffold*-Proteine und erscheinen daher in elektronenmikroskopischen Aufnahmen leer. B-Kapside enthalten die ringförmige Gerüststruktur, jedoch keine DNA. Dagegen sind C-Kapside reife Nukleokapside, in die das Virusgenom nach Verlust des *scaffolds* vollständig eingelagert wurde. Sie sind durch einen elektronendichten Kern charakterisiert (Gibson & Roizman, 1972; Granzow et al., 1997; Trus et al., 2007).

Primäre Umhüllung

Der weitere Verlauf der Herpesvirusmorphogenese folgt dem *Envelopment-Deenvelopment-Reenvelopment*-Modell (Granzow et al., 2001; Skepper et al., 2001). Die reifen Nukleokapside gelangen durch einen Knospungsprozess (*budding*) an der inneren Kernmembran [Abb. 4(9)] in den Kernspalt [Abb. 4(10)] und erhalten so eine erste Hülle (*primary envelope*). Dazu wird zunächst das Laminnetzwerk des Zellkerns lokal aufgelöst bzw. aufgelockert, was wahrscheinlich durch Phosphorylierung von Lamin A/C und B durch virale und zelluläre Proteinkinasen vermittelt wird (Muranyi et al., 2002; Park & Baines, 2006). Für die primäre Umhüllung sind die zwei konservierten herpesviralen Proteine pUL31 und pUL34 notwendig, die durch Komplexbildung die Proteinkinase C zur Kernlamina rekrutieren (Bjerke & Roller, 2006; Reynolds et al., 2004). pUL34 ist ein Typ-II-Membranprotein, das in die Virushülle eingelagert wird, während das nukleäre Phosphoprotein pUL31 ein

primäres Tegumentprotein darstellt. Beide Proteine sind nur in primär umhüllten Virionen nachweisbar, nicht aber in reifen Viruspartikeln (Fuchs et al., 2002; Klupp et al., 2000). Für die primäre Umhüllung von Nukleokapsiden wird zusätzlich das kapsidassoziierte pUL25 benötigt (Klupp et al., 2006; Kuhn et al., 2008). Bei HSV-1 ist pUL25 wahrscheinlich in Assoziation mit pUL17 den Pentonen der reifen Nukleokapside aufgelagert. Dieser als CCSC (*C-capsid specific component*) bezeichnete Komplex kennzeichnet reife C-Kapside und könnte somit den primären *Budding*-Prozess initialisieren (Trus et al., 2007).

Die primäre Virushülle fusioniert anschließend mit der äußeren Kernmembran [Abb. 4(11)] und das Nukleokapsid wird in das Zytoplasma der Zelle freigesetzt. Hierbei scheint die virale Proteinkinase pUS3 von besonderer Bedeutung zu sein, da es in deren Abwesenheit zur Akkumulation von primär umhüllten Virionen im Kernspalt kommt (Klupp et al., 2001; Reynolds et al., 2002; Ryckman & Roller, 2004). Bei HSV-1 und PrV konnte gezeigt werden, dass für diesen Effekt die Kinase-Domäne von pUS3 verantwortlich ist (Ryckman & Roller, 2004; Gentner, persönliche Mitteilung). pUS3 ist sowohl in primär umhüllten als auch in reifen PrV- und HSV-1-Virionen Bestandteil des Teguments (Reynolds et al., 2002; Granzow et al., 2004). Bei HSV-1 wurde zusätzlich eine Beteiligung der Glykoproteine gB und gH an der Freisetzung aus dem Kernspalt nachgewiesen (Farnsworth et al., 2007; Wisner et al. 2009), wohingegen diese bei PrV bei der Freisetzung keine Rolle spielen (Granzow et al., 2001; Klupp et al., 2008).

Tegumentierung und Sekundäre Umhüllung

Im Zytoplasma erfolgt die Anlagerung von Tegumentproteinen an die freigesetzten Nukleokapside, die anschließend durch Knospung in glykoproteinhaltige Vesikel [Abb. 4(12)] des trans-Golgi-Netzwerkes (TGN) eine weitere Tegumentschicht und eine finale (sekundäre) Hülle erhalten (*secondary envelopment*) (Granzow et al., 1997; Mettenleiter, 2006; Whealy et al., 1991). Dieser sehr komplexe Prozess ist erst in Ansätzen bekannt (Mettenleiter, 2006). Konserviert ist dagegen der erste Schritt der Tegumentierung, die Komplexbildung der Tegumentproteine pUL36 und pUL37 (Bechtel & Shenk, 2002; Klupp et al., 2002; Harmon & Gibson, 1996; Mijatov et al., 2007; Vittone et al., 2005). pUL36, das größte herpesvirale Protein, wird wahrscheinlich als erstes Tegumentprotein an die Kapside angelagert (Spear & Roizman, 1972), indem es mit dem Hauptkapsidprotein pUL19 (McNabb & Courtney,

1992) und/oder dem kapsidassoziierten pUL25 interagiert (Coller et al., 2007). pUL37 bindet an pUL36 und bildet mit diesem die kapsidnahe Tegumentschicht, die auch die Proteinkinase pUS3 enthält (Fuchs et al., 2002; Granzow et al., 2004). Die weitere Tegumentierung beruht auf einem komplexen Netzwerk aus zahlreichen Protein-Protein-Interaktionen (Mettenleiter, 2006), die möglicherweise durch Phosphorylierungen reguliert werden (Morrison et al., 1998; Spengler et al., 2001). Dabei unterscheiden sich die Zusammensetzung des Teguments und die Funktion der Proteine innerhalb der Herpesviren zum Teil erheblich. Die partiell tegumentierten Nukleokapside erhalten schließlich an den Membranen des trans-Golgi-Netzwerkes eine sekundäre Hülle (Gershon et al., 1994; Homman-Loudiyi et al., 2003; Mettenleiter, 2006), an die ebenfalls Tegumentproteine angelagert sind. Diese Umhüllung wird durch Interaktionen zwischen Tegumentproteinen und den zytoplasmatischen Domänen der in die Membran eingelagerten viralen Glykoproteine vermittelt. So konnte bei HSV-1 gezeigt werden, dass das Tegumentprotein pUL48 mit den viralen Glykoproteinen gB, gD und gH (Zhu & Courtney, 1994; Gross et al., 2003) sowie mit dem Tegumentprotein pUL49 (Elliot et al., 1995) interagiert. Daneben interagiert das Tegumentprotein pUL49 mit gE und gD (Farnsworth et al., 2007; O'Reagan et al., 2007). Bei PrV vermitteln die Glykoproteine gE und gM die Verbindung von Envelope und Tegument, wobei das Tegumentprotein pUL49 mit den C-Termini von gE und gM interagiert (Fuchs et al., 2002b). Diese Glykoproteine spielen eine wesentliche Rolle bei der sekundären Umhüllung, da dieser Prozess in Abwesenheit von gD und gE bei HSV-1 bzw. gM und gE/gI bei PrV nahezu vollständig blockiert ist (Brack et al., 1999; Brack et al., 2000; Farnsworth et al., 2003). Das Tegumentprotein pUL11 weist eine hohe Affinität zu Golgi-Membranen auf (Bowzard et al., 2000; Kopp et al., 2003; Schimmer & Neubauer, 2003) und ist über seine Interaktionen mit den Tegumentproteinen pUL16 und pUL21 (Klupp et al., 2005; Loomis et al., 2003), sowie mit den Glykoproteinen gD und gE (Farnsworth et al., 2006) möglicherweise ebenfalls an der sekundären Umhüllung von tegumentierten Kapsiden beteiligt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das Glykoprotein gM virale und zelluläre Membranproteine im Trans-Golgi-Netzwerk anreichern kann (Crump et al., 2004; Klupp et al., 2004), was seine Beteiligung an der sekundären Umhüllung erklären könnte (Kopp et al., 2004).

Freisetzung

Die umhüllten Virionen gelangen in Transportvesikeln [Abb. 4(13)] zur Plasmamembran und werden dort sehr wahrscheinlich durch Exozytose [Abb. 4(14)] freigesetzt (Granzow et al., 2001; Mettenleiter, 2004). Bei PrV ist dabei das putative Membranprotein pUL20 für den Transport der reifen Virionen zur Zytoplasmamembran essentiell. In Abwesenheit dieses Proteins kommt es zur Akkumulation großer, virushaltiger Vesikel im Zytoplasma (Fuchs et al., 1997). Für die Virusfreisetzung ist das Glykoprotein gK notwendig, für dessen Prozessierung pUL20 benötigt wird (Dietz et al., 2000). Es verhindert eine erneute Fusion freigesetzter Viruspartikel mit der Plasmamembran der bereits infizierten Zelle (Klupp et al., 1998). Für HSV-1 und EHV-1 wurde gezeigt, dass gK und pUL20 einen Komplex bilden (Foster et al., 2008; Guggemoos et al., 2006).

Neben infektiösen Virionen werden auch sogenannte L(*Light*)-Partikel freigesetzt, die nur aus Tegumentproteinen und einer Hüllmembran bestehen, jedoch keine Nukleokapside enthalten (McLauchlan&Rixon, 1992; Szilagyi&Cunningham, 1991).

Ausbreitung

Die Virusausbreitung erfolgt über freigesetzte Virionen oder aber durch direkte Zell-Zell-Ausbreitung (*cell-to-cell spread*) (Zsak et al., 1992). Der Mechanismus des *cell-to-cell spread* scheint dem Penetrationsprozess ähnlich, jedoch nicht identisch zu sein. So werden bei PrV für die Penetration die Glykoproteine gB, gD und der gH/gL Komplex benötigt, während für den *cell-to-cell spread* gB und der gH/gL-Komplex ausreichen (Rauh & Mettenleiter, 1991; Peeters et al., 1992). Dagegen ist bei HSV-1 auch gD für den *cell-to-cell spread* essentiell (Browne et al., 2001). Im Gegensatz zur Penetration ist der gE/gI-Komplex bei der Zell-Zell-Ausbreitung involviert. Er reagiert mit zellulären Proteinen, wie z.B. β -Catenin, um die Virionen zu Zell-Zell-Kontakten zu rekrutieren (Dingwell & Johnson, 1998; Enquist et al., 2002; Farnsworth et al., 2006; Johnson et al., 2001).

Diese Art der Ausbreitung spielt besonders bei den neurotrophen Alphaherpesviren eine große Rolle, da sich die Viren *in vivo* zwischen epithelialen und neuronalen Zellen ausbreiten können, ohne durch neutralisierende Antikörper inhibiert zu werden, wodurch eine effiziente Ausbreitung im zentralen Nervensystem ermöglicht wird (Johnson & Huber, 2002).

Im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Genprodukte

Die Kapsid-assoziierten Proteine pUL25 und pUL17

pUL25 ist ein für die Virusreplikation essentielles Strukturprotein und innerhalb der *Herpesviridae* konserviert. In allen drei Subfamilien wurden pUL25 Homologe identifiziert (Baer et al., 1984, Chee et al., 1990, McGeoch et al., 1991).

Die veröffentlichte Kristallstruktur einer N-terminal verkürzten HSV1-pUL25-Variante (AS 134-580) offenbart einen stabilen Kern aus kompakten α -Helices, der von zahlreichen *Loops* umgeben ist. Auffallend sind vier große, flexible und unstrukturierte Schleifen, die sich hervorragend für Protein-Protein-Interaktionen eignen (Bowman et al., 2006). Leider gibt es keine strukturellen Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen, so dass eine Ableitung der Funktion von der Struktur schwierig ist.

HSV-1 pUL25 interagiert mit dem Triplexprotein pUL38 und dem Hauptkapsidprotein pUL19 (Ogasawara et al., 2001), und ist an der Oberfläche des Kapsids lokalisiert (Conway et al., 2010; Klupp et al., 2006; Newcomb et al., 2006). Die Verteilung des pUL25 auf den verschiedenen Kapsidformen scheint dabei innerhalb der Herpesviren zu differieren. Während in PrV pUL25 nur auf den reifen, DNA-haltigen C-Kapsiden detektierbar ist (Klupp et al., 2006), lässt sich HSV-1 pUL25 auf allen Kapsidformen nachweisen, wobei der pUL25-Anteil mit steigendem Reifegrad von Prokapsid zu B-, A-, C-Kapsid zunimmt (Newcomb et al., 2006). So könnte der Prozess der DNA-Verpackung zu Konformationsänderungen der Kapsidproteine führen, wodurch vermehrt pUL25-Bindestellen offengelegt werden (Trus et al., 2007). Eine Beteiligung von pUL25 an der Kapsidstabilisierung nach der DNA-Verpackung wird diskutiert. Unterstützt wird diese Vermutung durch Untersuchungen, die zeigten, dass die ersten 50 AS des pUL25 mit dem Kapsid interagieren und der C-Terminus essentiell für die Verpackung der viralen DNA ist (Cockrell et al., 2008).

Die exakte Funktion des pUL25 ist aber noch weitgehend unklar, wobei pUL25 als multifunktionales Protein möglicherweise an verschiedenen Stellen während der Virusreplikation eingreift.

In Abwesenheit des pUL25 von HSV-1 wurden zunächst keine reifen Nukleokapside gefunden, stattdessen akkumulierten unreife Vorläuferkapside und unverpackte DNA im Kern, was als Hinweis auf eine direkte Beteiligung von pUL25 an der Verpackung des Virusgenoms gewertet wurde (McNab et al., 1998). In späteren Untersuchungen mit derselben Virusmutante konnten jedoch verpackte Virusgenome nachgewiesen

werden, wenn auch in verminderter Zahl (Stow et al., 2001). In PrV zeigte sich ein ähnlicher Phänotyp. In Abwesenheit von pUL25 wurden ebenfalls Nukleokapside in reduziertem Maße im Kern gebildet. Allerdings zeigte sich hier zusätzlich das Phänomen, dass sich die C-Kapside zwar an die innere Kernmembran lagerten, jedoch nicht in den Kernspalt knospen, und somit weder Nukleokapside im Kernspalt noch im Zytoplasma detektierbar waren, was auf eine essentielle Funktion des pUL25 bei Kapsidtranslokation aus dem Zellkern in das Zytoplasma hinwies (Klupp et al., 2006). Interaktionen zwischen pUL25 und dem Tegumentprotein pUL36 zeigten darüber hinaus mögliche Funktionen während der Tegumentierung von Kapsiden im Zytoplasma (Coller et al., 2007).

In neueren Untersuchungen wurde gezeigt, dass pUL25 sowohl mit Nukleoporinen als auch mit dem Portalprotein pUL6 und dem Tegumentprotein pUL36 interagiert und somit ein Bindeglied zwischen den Nukleokapsiden im Zytoplasma und dem Kernporenkomplex darstellen könnte (Pasdeloup et al., 2009). pUL25 könnte demnach eine wesentliche Rolle bei der Infektionsinitiation durch Freisetzung der DNA in das Kernplasma spielen (Jovasevic et al., 2008; Preston et al., 2008).

Das UL17 Genprodukt ist ebenfalls für die Replikation der Herpesviren essentiell. Untersuchungen an einer PrV-UL17-Deletionsmutante zeigten einen ähnlichen Phänotyp wie in HSV-1. In infizierten Zellen fehlten DNA-haltige Kapside und in Genomlänge geschnittene Virus-DNA, was darauf hinwies, dass pUL17 für das Schneiden und Verpacken der viralen DNA notwendig ist (Klupp et al., 2005; Salmon et al., 1998). Die genaue Funktion von pUL17 ist jedoch noch unklar.

Kürzlich wurde gezeigt, dass in Abwesenheit von pUL17 viel weniger pUL25 in die B-Kapside eingebaut wurde. Umgekehrt enthielten B-Kapside, denen pUL25 fehlt, nur halb soviel pUL17. Das führte zu der Annahme, dass pUL17 den Einbau von pUL25 in das Kapsid vermittelt und pUL25 für die Stabilisierung von pUL17 im Kapsid von Bedeutung ist (Thurlow et al., 2006). Außerdem wurde in elektronenmikroskopischen Studien eine zusätzliche Strukturkomponente auf reifen DNA-haltigen Kapsiden nachgewiesen, die als C-Kapsid-spezifische Komponente (*C-capsid-specific component*, CCSC) bezeichnet wurde und vermutlich aus einem pUL17/pUL25 Heterodimer besteht. Dieses Signal könnte ein Qualitätsmerkmal der C-Kapside darstellen, die bereit sind, den Kern zu verlassen (Trus et al., 2007).

Das Tegumentprotein pUL36

pUL36 ist das größte Genprodukt der Herpesviren und bildet den inneren Teil der Tegumentschicht (McGeoch et al., 1988; Zhou et al., 1999; Klupp et al., 2001, Möhl et al., 2010). Eine Interaktion mit dem Hauptkapsidprotein pUL19 konnte in HSV-1 identifiziert werden (McNabb&Courtney, 1992). Ob eine Anlagerung an das Kapsid bereits im Zellkern erfolgt, ist noch unklar, da widersprüchliche Ergebnisse zur Präsenz von pUL36 auf intranukleären Kapsiden vorliegen (Bucks et al., 2007; Möhl et al., 2010; Trus et al., 2007). pUL36 ist sowohl für die HSV-1- als auch für die PrV-Replikation essentiell. In Abwesenheit von pUL36 ist die sekundäre Umhüllung im Zytoplasma blockiert, nichtumhüllte Kapside akkumulieren und es werden keine infektiösen Viruspartikel freigesetzt (Desai et al., 2000; Fuchs et al., 2004). In *Yeast-Two-Hybrid*-Analysen und Koimmunpräzipitationen wurde das Tegumentprotein pUL37 als Bindungspartner für pUL36 von PrV nachgewiesen (Klupp et al., 2002). Diese pUL36/pUL37-Interaktion konnte auch für HSV-1 (Mijatov et al., 2007; Vittone et al., 2005) und HCMV (Bechtel & Shenk, 2002; Harmon & Gibson, 1996) nachgewiesen werden. Die Wechselwirkung dieser beiden Tegumentproteine nimmt zwar eine wichtige Rolle während der Replikation von PrV ein, ist aber nicht essentiell für die Virusmorphogenese (Fuchs et al., 2004).

II ZIELSTELLUNG

Herpesviren bestehen aus mehr als 30 Strukturproteinen, die sich während der Virusmorphogenese zu reifen infektiösen Viruspartikeln zusammenlagern. Die Charakterisierung dieser Proteine sowie die Identifizierung von Wechselwirkungen zwischen den Strukturproteinen sind Gegenstand zahlreicher Untersuchungen, die dazu beitragen sollen, Schlüsselfunktionen der herpesviralen Replikation aufzuklären. Um Hinweise auf die Funktionen der verschiedenen Proteine zu bekommen, werden einzelne bzw. auch mehrere virale Gene deletiert und die Auswirkungen auf die Virusvermehrung untersucht. Die meisten Erkenntnisse zum heutigen Verständnis der Reifung von Herpesviren resultieren dabei aus Untersuchungen an Alphaherpesviren, insbesondere von HSV-1 und PrV. Beide Viren sind eng verwandt und molekularbiologisch gut untersucht. Allerdings fehlen vergleichende Untersuchungen entsprechender Virusmutanten in homologen Genen in parallelen, standardisierten experimentellen Systemen.

Aus diesem Grund lag der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit zunächst in der Aufklärung funktioneller Gemeinsamkeiten und Unterschiede des konservierten UL25 Genprodukts, für das kontroverse Ergebnisse für HSV-1 und PrV in der Literatur beschrieben waren (Klupp et al., 2006; McNab et al., 1998; Stow et al., 2001). Hierzu sollte eine HSV-1 Virusmutante, die das UL25 Gen fehlt, sowie eine Zelllinie, die das deletierte virale Gen stabil exprimiert, hergestellt und charakterisiert werden und in einem standardisierten System parallel mit der vorhandenen PrV-Deletionsmutante verglichen werden. Das notwendige Antiserum zur Detektion des HSV-1 pUL25 sollte ebenfalls hergestellt werden. Darüber hinaus sollte die Frage geklärt werden, inwieweit das pUL25 des einen Virus die Funktionen des homologen Genproduktes des anderen Virus übernehmen kann, also die Defekte der Deletionsmutanten heterolog komplementiert werden können.

Bei diesen Untersuchungen zeigte es sich, dass zwar pUL25 von HSV-1 PrV- Δ UL25 zumindest partiell komplementieren kann, jedoch nicht umgekehrt. Parallel dazu wurde für HSV-1 ein spezifischer Komplex auf DNA-haltigen Kapsiden bestehend aus einem pUL25 und pUL17 Heterodimer beschrieben (*C-capsid specific component*, CCSC), der eine wichtige Rolle bei der Virusreifung spielt (Trus et al., 2007). Daher sollten in weitergehenden Studien entsprechende PrV und HSV-1 Virusmutanten durch gleichzeitige Deletion beider Gene und entsprechende Zelllinien, die beide Proteine des Komplexes exprimieren, hergestellt und

charakterisiert werden. Auch hier sollte die Transkomplementierung durch die heterologen Proteine analysiert werden.

Neben dem oben genannten Schwerpunkt sollte die vorliegende Arbeit zur näheren Charakterisierung eines weiteren für die Virusreplikation essentiellen Proteins beitragen. Das große Tegumentprotein pUL36 des PrV ist an der Virusmorphogenese im Zytoplasma beteiligt und interagiert mit seinem C-Terminus mit pUL25. Mit Hilfe von pUL25-Konstrukten sollte die Funktionalität der Kernlokalisierungssequenzen (NLS) von pUL36 überprüft werden. Des Weiteren sollte durch die Herstellung eines Antiserums gegen den hoch konservierten C-Terminus ein Beitrag zur Aufklärung der intrazellulären Lokalisierung des pUL36 geleistet werden.

III Zusammenfassende Darstellung und Diskussion der Ergebnisse

(1) „Partial Functional Complementation of a Pseudorabies Virus UL25 Deletion Mutant by Herpes Simplex Virus Type 1 pUL25 indicates overlapping Functions of Alphaherpesvirus pUL25 Proteins“

Für das innerhalb der *Herpesviridae* konservierte Kapsid-assoziierte pUL25 Protein wurden funktionelle Unterschiede während der Morphogenese von HSV-1 und PrV im Zellkern beschrieben (Klupp et al., 2006; McNab et al., 1998; Stow et al., 2001). Aminosäuresequenzvergleiche der UL25 Homologen zeigten jedoch einen hohen Grad an Konservierung. Die Proteine weisen antigene Ähnlichkeiten auf, da das PrV pUL25-spezifische Antiserum auch das homologe HSV-1 Protein detektiert.

Um die Funktionen der homologen Genprodukte im jeweiligen Virushintergrund in parallelen, standardisierten experimentellen Systemen vergleichen zu können, wurde zu der beschriebenen PrV Mutante eine vergleichbare UL25-deletierte HSV-1 Rekombinante durch Mutagenese des als *bacterial artificial chromosome* (BAC-) vorliegenden HSV-1 Genoms hergestellt. Dazu wurden die Kodons 55 bis 516 des HSV-1 UL25 Gens deletiert und durch eine kurze Fremdsequenz ersetzt. Außerdem wurde eine RK13-Zelllinie etabliert, die das HSV-1 pUL25 exprimiert und mit der die Vermehrung der HSV-1 Deletionsmutante ermöglicht wurde. Auf nicht komplementierenden RK13-Zellen fand keine produktive Virusvermehrung statt, was die essentielle Funktion des pUL25 für die HSV-1 Replikation bestätigte.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen HSV1- Δ UL25 infizierter RK13-Zellen zeigten einen zu der beschriebenen PrV Mutante (Klupp et al., 2006) sehr ähnlichen Phänotyp. Im Gegensatz zu früher publizierten Daten für HSV- Δ UL25 (McNab et al., 1998; Stow et al., 2001) konnte eine Vielzahl von DNA-haltigen Nukleokapsiden im Zellkern nachgewiesen werden, was zeigt, dass weder PrV noch HSV-1 pUL25 für die Verpackung der genomischen DNA in die vorgeformten Kapside notwendig ist. Dagegen zeigte sich in Abwesenheit von pUL25 ein Defekt in der primären Umhüllung der reifen Nukleokapside, der in einer fehlenden Translokation der HSV-1 und PrV Nukleokapside durch die Kernmembran ins Zytoplasma resultierte. Die

Bildung von primären Virushüllen schien dagegen nach wie vor möglich zu sein, da abgeschnürte Membranvesikel im Kernspalt beobachtet werden konnten.

Zellen, die HSV-1 pUL25 exprimierten, komplementierten nicht nur HSV-1- Δ UL25 sondern auch, zumindest teilweise, den Defekt von PrV- Δ UL25 was auf überlappende Funktionen der homologen Proteine hinweist. Dabei konnte HSV-1 pUL25 auch in gereinigten PrV- Δ UL25 Virionen nachgewiesen werden.

Eine reziproke Komplementierung der UL25-negativen HSV-1 Mutante durch das PrV-Protein wurde dagegen nicht beobachtet. Möglicherweise besitzt pUL25 des HSV-1 zusätzliche Funktionen, die pUL25 des PrV nicht übernehmen kann.

(2) „Analysis of pseudorabies and herpes simplex virus recombinants simultaneously lacking the pUL17 and pUL25 components of the C-capsid specific complex“

HSV-1 pUL25 und pUL17 treten auf reifen C-Kapsiden als Komplex auf (Thurlow et al., 2006; Trus et al., 2007). Um zu testen, ob die bereits gezeigte Transkomplementierung der PrV- Δ UL25 Mutante durch das homologe HSV-1 Protein (Kuhn et al., 2008) durch den gleichzeitigen Austausch beider Komplexpartner verbessert wird, wurden RK13-Zelllinien, die PrV oder HSV-1 pUL25 und pUL17 koexprimierten, und mittels BAC-Mutagenese entsprechende Virusmutanten mit Doppeldelationen hergestellt. Zum Vergleich wurden auch die entsprechenden Einzeldelationsmutanten in die Untersuchungen einbezogen. Die Doppeldelationsmutanten wurden auf den Zelllinien, die die homologen Komplexpartner koexprimierten, analysiert. Beide Zelllinien komplementierten im homologen Ansatz den Defekt der Einzel- und Doppel-Mutanten und ermöglichten eine produktive Virusvermehrung. Während die Virustiter und die Plaquegrößen der HSV-1 Einzel- und Doppelmутanten auf den entsprechenden Zelllinien Wildtypniveau erreichten, replizierte PrV- Δ UL17/UL25 zu 10fach reduzierten Titern und 30% kleineren Plaques. Dagegen wurde der Defekt der PrV Einzelmutanten voll kompensiert, was darauf schließen lässt, dass die Zelllinie die entsprechenden Proteine in ausreichender Menge exprimiert. Möglicherweise sind durch die komplexe Doppelmутagenese erworbene Defekte Ursache für die eingeschränkte Virusvermehrung.

Ultrastrukturanalysen HSV- oder PrV- Δ UL17/UL25 infizierter RK13 Zellen zeigten einen der UL17-Deletionsmutanten ähnlichen Phänotyp. Im Kern infizierter Zellen

akkumulierten B-Kapside, wohingegen reife C-Kapside nicht beobachtet wurden, was darauf hindeutet, dass die DNA-Verpackung blockiert ist. Das Fehlen von A-Kapsiden dagegen ist ein Hinweis darauf, dass die Verpackungsreaktion in Abwesenheit von pUL17 noch nicht begonnen hat. Außerdem konnten keine Genomend-spezifischen Fragmente nachgewiesen werden, was zeigt, dass auch keine Spaltung der konkatemeren Virus-DNA in Genomlängen in Abwesenheit von pUL17 stattfindet.

Für die zu testende Transkomplementierung durch die heterologen Proteine wurden die koexprimierenden Zellen sowohl mit den jeweiligen Doppel- als auch mit den Einzeldelentionsmutanten infiziert. Dabei konnte bestätigt werden, dass HSV-1 pUL25 den Defekt der PrV pUL25 Deletionsmutante teilweise komplementierte, aber eine reziproke Komplementierung nicht stattfand. Allerdings ließ sich auch keine effizientere Virusvermehrung für PrV- Δ UL25 bei gleichzeitigem Austausch von pUL25 und pUL17 nachweisen und keine der UL17 Einzel- oder Doppelmутanten konnte durch das heterologe Protein komplementiert werden. Die Übereinstimmung zwischen PrV und HSV-1 pUL17 auf Aminosäureebene beträgt weniger als 44%, im Gegensatz zu 54% bei pUL25, was ein Grund für die fehlende heterologe Transkomplementation sein könnte. Möglicherweise ist der Einbau der heterologen Proteine in das Kapsid beeinträchtigt oder aber die einzelnen Komplexpartner üben verschiedene Funktionen aus. Unterstützt wird diese Annahme durch die offenbar unterschiedliche Lokalisierung des HSV-1 und PrV pUL17 im Viruspartikel (Klupp et al., 2005; Thurlow et al., 2005), die auch einen Einfluss auf den Kapsideinbau des pUL25 haben könnte. Zusätzlich könnte die unterschiedliche Verteilung des pUL25 auf den reifen Nukleokapsiden und den unreifen Vorstufen (Klupp et al., 2006; Sheaffer et al., 2001; Thurlow et al., 2005) auf verschiedene Funktionen der sequenzzhomologen Proteine hindeuten.

(3) „Intracellular Localization of the Pseudorabies Virus Large Tegument Protein pUL36“

Für das essentielle Tegumentprotein pUL36, das größte herpesvirale Protein, existieren widersprüchliche Berichte, in welchen Zellkompartimenten es während der Infektion lokalisiert ist und wo es sich an die Nukleokapside anlagern könnte (Bucks et al., 2007; Möhl et al., 2010; Trus et al., 2007).

In allen pUL36 Homologen konnten putative Kernlokalisierungssignale (NLS) identifiziert werden (Abaitua & O'Hare, 2008; Böttcher et al., 2006; Ojala et al., 2000), davon drei in PrV pUL36 (Böttcher et al., 2006). Zwei aneinandergrenzende NLS sind im N-terminalen Bereich des pUL36 (NLS1, NLS2), eine dritte in der C-terminalen Hälfte (NLS3) gelegen. Transient exprimiertes pUL36 ist in der Immunfluoreszenz teilweise im Kern lokalisiert, was wahrscheinlich durch seine NLS vermittelt wird. Mittels Fusion der NLS1/2 an GFP-getaggttes UL25 konnte gezeigt werden, dass NLS1 und NLS2 in der Lage waren, GFP-UL25 in den Kern zu translozieren, während GFP-UL25 allein ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert war. Damit wurde die Funktionalität des Kernlokalisierungssignals von pUL36 demonstriert.

Dagegen konnte mit Hilfe von spezifischen Antiseren, die gegen verschiedene Bereiche des pUL36 gerichtet waren, gezeigt werden, pUL36 während einer PrV-Infektion zu keiner Zeit im Kern detektiert werden. Es ist daher denkbar, dass die NLS während der PrV-Infektion maskiert ist.

IV Literatur

Addison, C., Rixon, F.J., and Preston, V.G. 1990. Herpes simplex virus type 1 UL28 gene product is important for the formation of mature capsids. *J. Gen. Virol.* **71**: 2377-2384.

Adelman, K., B. Salmon und J. D. Baines. 2001. Herpes simplex virus DNA packaging sequences adopt novel structures that are specifically recognized by a component of the cleavage and packaging machinery. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**:3086-3091.

Alkobaisi, M.F., Rixon, F.J., Mcdougall, I. and Preston, V.G. 1991. The herpes-simplex virus U_L33 gene-product is required for the assembly of full capsids. *Virology* **180**:380–388.

Ambagala AP, Gopinath RS and Srikumaran S. 2003. Inhibition of TAP by pseudorabies virus is independent of its vhs activity. *Virus Res.* **96**:37-48.

Asai, R., T. Ohno, A. Kato and Y. Kawaguchi. 2007. Identification of proteins directly phosphorylated by UL13 protein kinase from herpes simplex virus 1. *Microbes Infect.* **9**:1434-1438.

Aujeszky, A. 1902. Über eine neue Infektionskrankheit bei Haustieren. *Zbl. F. Bakt. Abt. 1*, 353-357.

Baines, J.D., Poon, A.P., Rovnak, J., and Roizman, B. 1994. The herpes simplex virus 1 UL15 gene encodes two proteins and is required for cleavage of genomic viral DNA. *J. Virol.* **68**:8118-8124.

Baines, J.D. and Weller, S.K. 2005. Cleavage and packaging of herpes simplex virus 1 DNA, In Catalano, C.E. (ed.), *Viral Genome Packaging Machines: Genetics, Structures, and Mechanism*. Landes Biosciences, Georgetown, TX, USA, pp. 135-150.

Baines, J.D. and Duffy, C. 2006. Nucleocapsid assembly and envelopment of Herpes Simplex Virus. In: R. Sandri-Goldin, Editor, *Alpha Herpesviruses: Molecular and Cell Biology*, Horizon Press, Norwich, UK.

Bear, S.E., Colberg-Poley, A.M., Court, D.L., Carter, B.J., and Enquist, L.W. 1984. Analysis of two potential shuttle vectors containing herpes simplex virus defective DNA. *J. Mol. Appl. Genet.* **2**:471-484.

Beard, P. M., N. S. Traus und J. D. Baines. 2002. DNA cleavage and packaging proteins encoded by genes UL28, UL15, and UL33 of herpes simplex virus type 1 form a complex in infected cells. *J. Virol.* **76**:4785-4791.

Bechtel, J. T. and T. Shenk. 2002. Human cytomegalovirus UL47 tegument protein functions after entry and before immediate-early gene expression. *J. Virol.* **76**:1045-1050.

- Bechtel, J. T., R. C. Winant and D. Ganem.** 2005. Host and viral proteins in the virion of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J. Virol.* **79**:4952-4964.
- Ben-Porat, T. and Kaplan, A. S.** 1981. Organization and replication of pseudorabies virus DNA. Martinus Nijhoff Publishers, The Hague, Boston, London.
- Ben-Porat, T. and A. S. Kaplan.** 1985. Molecular biology of pseudorabies virus, p. 105–173. *In*: B. Roizman (Hrsg.) The herpesviruses. Vol. 3. Plenum Press, New York, N.Y.
- Bjerke, S. L. and R. J. Roller.** 2006. Roles for herpes simplex virus type 1 UL34 and US3 proteins in disrupting the nuclear lamina during herpes simplex virus type 1 egress. *Virology.* **347**:261-276.
- Boehmer PE and Lehman IR.** 1997. Herpes simplex virus DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.* **66**:347-84.
- Bogner, E., Radsak, K., and Stinski, M.F.** 1998. The gene product of human cytomegalovirus open reading frame UL56 binds the pac motif and has specific nuclease activity. *J. Virol.* **72**:2259-2264.
- Bowman, B.R., Welschhans, R.L., Jayaram, H., Stow, N.D., Preston, V.G., and Quiocho, F.A.** 2006. Structural characterization of the UL25 DNA-packaging protein from herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* **80**:2309-2317.
- Bowzard, J. B., R. J. Visalli, C. B. Wilson, J. S. Loomis, E. M. Callahan, R. J. Courtney und J. W. Wills.** 2000. Membrane targeting properties of a herpesvirus tegument proteinretrovirus Gag chimera. *J. Virol.* **74**:8692-8699.
- Brack, A. R., J.M. Dijkstra, H. Granzow, B.G. Klupp und T.C. Mettenleiter.** 1999. Inhibition of virion maturation by simultaneous deletion of glycoprotein E, I, and M of pseudorabies virus. *J. Virol.* **73**:5364-5372.
- Brack, A. R., B. G. Klupp, H. Granzow, R. Tirabassi, L. W. Enquist und T. C. Mettenleiter.** 2000. Role of the cytoplasmic tail of pseudorabies virus glycoprotein E in virion formation. *J. Virol.* **74**:4004-4016.
- Bras F, Dezelee S, Simonet B, Nguyen X, Vende P, Flamand A and Masse MJ.** 1999. The left border of the genomic inversion of pseudorabies virus contains genes homologous to the UL46 and UL47 genes of herpes simplex virus type 1, but no UL45 gene. *Virus Res.* **60**:29-40.
- Browne, H., Bruun, B., and Minson, T.** 2001. Plasma membrane requirements for cell fusion induced by herpes simplex virus type 1 glycoproteins gB, gD, gH and gL. *J. Gen. Virol.* **82**:1419-1422.
- Bucks, M. A., K. J. O'Regan, M. A. Murphy, J. W. Wills und R. J. Courtney.** 2007. Herpes simplex virus type 1 tegument proteins VP1/2 and UL37 are associated with intranuclear capsids. *Virology.* **361**:316-324.

- Catalano, C.E.** 2005. Viral Genome packaging machines: an overview. In Catalano, C. E 482 (ed.), *Viral Genome Packaging Machines: Genetics, Structures, and Mechanism*. Landes 483 Biosciences, Georgetown, TX, USA, pp. 1-4.
- Chee, M., and Barrell, B.** 1990. Herpesviruses: a study of parts. *Trends Genet.* **6**:86-91.
- Cheung, A. K.** 1989. DNA nucleotide sequence analysis of the immediate early gene of pseudorabies virus. *Nucleic Acids Res.* **17**:4637-4646.
- Cocchi, F., Menotti, L., Di Ninni, V., Lopez, M., and Campadelli-Fiume, G.** 2004. The herpes simplex virus JMP mutant enters receptor-negative J cells through a novel pathway independent of the known receptors nectin1, HveA, and nectin2. *J. Virol.* **78**:4720-4729.
- Cockrell, S.K., Sanchez, M.E., Erazo, A., and Homa, F.L.** 2009. Role of the UL25 protein in herpes simplex virus DNA encapsidation. *J. Virol.* **83**:47-57.
- Coller, K. E., J. I. Lee, A. Ueda und G. A. Smith.** 2007. The capsid and tegument of the alphaherpesviruses are linked by an interaction between the UL25 and VP1/2 proteins. *J. Virol.* **81**:11790-11797.
- Conway, J.F., Cockrell, S.K., Copeland, A.M., Newcomb, W.W., Brown, J.C., and Homa, F.L.** 2010. Labeling and localization of the herpes simplex virus capsid protein UL25 and its interaction with the two triplexes closest to the penton. *J. Mol. Biol.* **397**: 575-586.
- Crandell, R. A.** 1985. Selected animal herpesviruses: new concepts and technologies. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* **29**:281-327.
- Crump, C. M., B. Bruun, S. Bell, L. E. Pomeranz, T. Minson und H.M. Browne.** 2004. Alphaherpesvirus glycoprotein M causes the relocalization of plasma membrane proteins. *J. Gen. Virol.* **85**:3517-3527.
- Davison AJ, Dargan DJ, Stow ND.** 2002. Fundamental and accessory systems in herpesviruses. *Antiviral Res.* **56**:1-11. Review.
- Davison, A.J., Eberle, R., Ehlers, B., Hayward, G.S., McGeoch, D.J., Minson, A.C., Pellett, P.E., Roizman, B., Studdert, M.J., and Thiry, E.** 2009. The order Herpesvirales. *Arch. Virol.* **154**, 171-177.
- Davison, A.J.** 2010. Herpesvirus systematics. *Vet. Microbiol.* **143**, 52-69.
- del Rio, T., C. J. Decoste und L. W. Enquist.** 2005. Actin Is a Component of the Compensation Mechanism in Pseudorabies Virus Virions Lacking the Major Tegument Protein VP22. *J. Virol.* **79**:8614-8619.
- Desai, P., N. DeLuca und S. Person.** 1998. Herpes simplex virus type 1 VP26 is not essential for replication in cell culture but influences production of infectious virus in the nervous system of infected mice. *Virology.* **247**:115-124.

Desai, P. J. 2000. 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.* **74**:11608-11618.

Dezelee S, Bras F, Vende P, Simonet B, Nguyen X, Flamand A, Masse MJ. 1996. The BamHI fragment 9 of pseudorabies virus contains genes homologous to the UL24, UL25, UL26, and UL 26.5 genes of herpes simplex virus type 1. *Virus Res.* **42**: 27-39.

Dietz, P., B. G. Klupp, W. Fuchs, B. Köllner, E. Weiland und T. C. Mettenleiter. 2000. Pseudorabies virus glycoprotein K requires the UL20 gene product for processing. *J. Virol.* **74**:5083-5090.

Dingwell, K. S. und D. C. Johnson. 1998. The herpes simplex virus gE-gI complex facilitates cell-to-cell spread and binds to components of cell junctions. *J. Virol.* **72**:8933-8942.

Dittmer, A., Drach, J.C., Townsend, L.B., Fischer, A., and Bogner, E. 2005. Interaction of the putative human cytomegalovirus portal protein pUL104 with the large terminase subunit pUL56 and its inhibition by benzimidazole-D-ribonucleosides. *J. Virol.* **79**:14660-14667.

Elliott, G., G. Mouzakis und P. O'Hare. 1995. VP16 interacts via its activation domain with VP22, a tegument protein of herpes simplex virus, and is relocated to a novel macromolecular assembly in coexpressing cells. *J. Virol.* **69**:7932-7941.

Engels, M., and Ackermann, M. 1996. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. *Vet. Microbiol.* **53**:3-15.

Enquist, L. W. 2002. Exploiting circuit-specific spread of pseudorabies virus in the central nervous system: insights to pathogenesis and circuit tracers. *J. Infect. Dis.* **186**:209-21.

Farnsworth, A., K. Goldsmith und D. C. Johnson. 2003. Herpes simplex virus glycoproteins gD and gE/gI serve essential but redundant function during acquisition of the virion envelope in the cytoplasm. *J. Virol.* **77**:8481-8494

Farnsworth, A. und D. C. Johnson. 2006. Herpes simplex virus gE/gI must accumulate in the trans-Golgi network at early times and then redistribute to cell junctions to promote cell-to-cell spread. *J. Virol.* **80**:3167-3179.

Farnsworth, A., T. W. Wisner und D. C. Johnson. 2007. Cytoplasmic residues of herpes simplex virus glycoprotein gE required for secondary envelopment and binding of tegument proteins VP22 and UL11 to gE and gD. *J. Virol.* **81**:319-331.

Feldman, L., Rixon, F.J., Jean, J-H., Ben-Porat, T. and Kaplan, A. 1979. Transcription of the genome of pseudorabies virus (a herpesvirus) is strictly controlled. *Virology* **97**:316–327.

Flynn SJ, Burgett BL, Stein DS, Wilkinson KS, Ryan P. 1993. The amino-terminal onethird of pseudorabies virus glycoprotein gIII contains a functional attachment domain, but this domain is not required for the efficient penetration of Vero cells. *J. Virol.* **67**: 2646-54.

Foster, T. P., V. N. Chouljenko und K. G. Kousoulas. 2008. Functional and Physical Interactions of the Herpes Simplex Virus Type-1 (HSV-1) UL20 Membrane Protein with Glycoprotein K (gK). *J. Virol.* **82**:6310-6323

Fuchs, W., B. G. Klupp, H. Granzow und T. C. Mettenleiter. 1997. The UL20 gene product of pseudorabies virus functions in virus egress. *J. Virol.* **71**:5639-5646.

Fuchs, W., C. Ehrlich, B. G. Klupp und T. C. Mettenleiter. 2000. Characterization of the replication origin (Ori(S)) and adjoining parts of the inverted repeat sequences of the pseudorabies virus genome. *J. Gen. Virol.* **81**:1539–1543.

Fuchs, W., B. G. Klupp, H. Granzow, N. Osterrieder und T. C. Mettenleiter. 2002. 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.* **76**:364–378.

Fuchs, W., H. Granzow, B. G. Klupp, M. Kopp und T. C. Mettenleiter. 2002a. The UL48 tegument protein of pseudorabies virus is critical for intracytoplasmic assembly of infectious virions. *J. Virol.* **76**:6729-6742.

Fuchs, W., B. G. Klupp, H. Granzow, C. Hengartner, A. Brack, A. Mundt, L. W. Enquist und T. C. Mettenleiter. 2002b. Physical interaction between envelope glycoproteins E and M of pseudorabies virus and the major tegument protein UL49. *J. Virol.* **76**:8208–8217.

Fuchs, W., B. G. Klupp, H. Granzow und T. C. Mettenleiter. 2004. Essential function of the pseudorabies virus UL36 gene product is independent of its interaction with the UL37 protein. *J. Virol.* **78**:11879-11889.

Fuchs, W., Klupp, B.G., Granzow, H., Leege, T., and Mettenleiter, T.C. 2009. Characterization of pseudorabies virus (PrV) cleavage-encapsidation proteins and functional complementation of PrV pUL32 by the homologous protein of herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* **83**:3930-3943.

Furlong D, Swift H, Roizman B. 1972. Arrangement of herpesvirus deoxyribonucleic acid in the core. *J. Virol.* **10**:1071-4.

Gao, M., Matusick-Kumar, L., Hurlburt, W., DiTusa, S.F., Newcomb, W.W., Brown, J.C., McCann, P.J., 3rd, Deckman, I., and Colonno, R.J. 1994. The protease of herpes simplex virus type 1 is essential for functional capsid formation and viral growth. *J. Virol.* **68**:3702-3712.

Geraghty RJ, Krummenacher C, Cohen GH, Eisenberg RJ, Spear PG. 1998. Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor. *Science.* **280**: 1618-20.

Gershon, A. A., D. L. Sherman, Z. Zhu, C. A. Gabel, R. T. Ambron und M. D. Gershon.1994. Intracellular transport of newly synthesized varicella-zoster virus: final envelopment in the trans-Golgi network. *J. Virol.* **68**:6372-6390.

Gibson W and Roizman B. 1972. Proteins specified by herpes simplex virus. 8. Characterization and composition of multiple capsid forms of subtypes 1 and 2. *J Virol.* **10**:1044-52.

Ginsberg, H.S. 1988. Herpesviruses. In: *Virology*, edited by Dulbecco, R., and Ginsberg, H.S. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 161-179.

Granzow H, Weiland F, Jons A, Klupp BG, Karger A, Mettenleiter TC. 1997. Ultrastructural analysis of the replication cycle of pseudorabies virus in cell culture: a reassessment. *J. Virol.* **71**: 2072-82.

Granzow, H., Klupp, B. G., Fuchs, W., Veits, J., Osterrieder, N. & Mettenleiter, T. C. 2001. Egress of alphaherpesviruses: comparative ultrastructural study. *J. Virol.* **75**:3675-3684.

Granzow, H., Klupp, B. G. und T. C. Mettenleiter. 2004. The pseudorabies virus US3 protein is a component of primary and of mature virions. *J. Virol.* **78**:1314-1323.

Granzow, H., B. G. Klupp und T. C. Mettenleiter. 2005. Entry of pseudorabies virus: an immunogold-labeling study. *J. Virol.* **79**:3200-3205.

Gray, W.L., Starnes, B., White, M.W., and Mahalingam, R. 2001. The DNA sequence of the simian varicella virus genome. *Virology* **284**:123-130.

Gross, S., C. Harley und D. W. Wilson. 2003. The cytoplasmic tail of herpes simplex virus glycoprotein H binds to the tegument protein VP16 in vitro and in vivo. *Virology.* **317**:1-12.

Guggemoos, S., F. T. Just und A. Neubauer. 2006. The equine herpesvirus 1 UL20 product interacts with glycoprotein K and promotes egress of mature particles. *J. Virol.* **80**:95-107.

Harmon, M.-E. und W. Gibson. 1996. High molecular weight virion protein of human cytomegalovirus forms complex with product of adjacent open reading frame, Abstr. W35-4,p.144. *Proc. Am. Soc. Virol.*

Harper, A.L., Meckes, D.G., Jr., Marsh, J.A., Ward, M.D., Yeh, P.C., Baird, N.L., Wilson, C.B., Semmes, O.J., and Wills, J.W. 2010. Interaction domains of the UL16 and UL21 tegument proteins of herpes simplex virus. *J. Virol.* **84**:2963-2971.

Herold BC, WuDunn D, Soltys N, Spear PG. 1991. Glycoprotein C of herpes simplex virus type 1 plays a principal role in the adsorption of virus to cells and in infectivity. *J. Virol.* **65**:1090-8.

- Herold, B.C., Visalli, R.J., Susmarski, N., Brandt, C.R., and Spear, P.G.** 1994. Glycoprotein C-independent binding of herpes simplex virus to cells requires cell surface heparan sulphate and glycoprotein B. *J. Gen. Virol.* **75**:1211-1222.
- Heymann, J.B., Cheng, N., Newcomb, W.W., Trus, B.L., Brown, J.C., and Steven, A.C.** 2003. Dynamics of herpes simplex virus capsid maturation visualized by time-lapse cryo-electron microscopy. *Nat. Struct. Biol.* **10**:334-341.
- Homa, F.L., and Brown, J.C.** 1997. Capsid assembly and DNA packaging in herpes simplex virus. *Rev. Med. Virol.* **7**:107-122.
- Homman-Loudiyi, M., K. Hultenby, W. Britt und C. Söderberg-Nauclér.** 2003. Envelopment of human cytomegalovirus occurs by budding into Golgi-derived vacuole compartments positive for gB, Rab 3, trans-golgi network 46, and mannosidase II. *J. Virol.* **77**:3191-3203.
- Honess, R. W und B. Roizman.** 1974. Regulation of Herpesvirus Macromolecular Synthesis I. Cascade Regulation of the Synthesis of Three Group of Viral Proteins *J. Virol.* **14**:8-19.
- Hutoran, M., Ronen, A., Perelberg, A., Ilouze, M., Dishon, A., Bejerano, I., Chen, N., and Kotler, M.** 2005. Description of an as yet unclassified DNA virus from diseased *Cyprinus carpio* species. *J. Virol.* **79**:1983-1991.
- Hwang, J.S., and Bogner, E.** 2002. ATPase activity of the terminase subunit pUL56 of human cytomegalovirus. *J. Biol. Chem.* **277**:6943-6948.
- Johannsen, E, M. Luftig, M. R. Chase, S. Weicksel, E. Cahir-McFarland, D. Illanes, D. Sarracino und E. Kieff.** 2004. Proteins of purified Epstein-Barr virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**:16286-16291.
- Johnson, D. C., M. Webb, T. W. Wisner und C. Brunetti.** 2001. Herpes simplex virus gE/gI sorts nascent virions to epithelial cell junctions, promoting virus spread. *J. Virol.* **75**:821–833.
- Johnson, D. C. und M. T. Huber.** 2002. Directed egress of animal viruses promotes cell-to-cell spread. *J. Virol.* **76**:1-8.
- Jovasevic, V., L. Liang und B. Roizman.** 2008. Proteolytic cleavage of VP1-2 is required for release of herpes simplex virus 1 DNA into the nucleus. *J. Virol.* **82**:3311- 3319.
- Kaelin, K., S. Dezelee, M. J. Masse, F. Bras und A. Flamand.** 2000. The UL25 protein of pseudorabies virus associates with capsids and localizes to the nucleus and to microtubules. *J. Virol.* **74**:474–482.
- Karger A, Mettenleiter TC.** 1993. Glycoproteins gIII and gp50 play dominant roles in the biphasic attachment of pseudorabies virus. *Virology.* **194**: 654-64.
- Karger A, Schmidt J, Mettenleiter TC.** 1998. Infectivity of a pseudorabies virus mutant lacking attachment glycoproteins C and D. *J. Virol.* **72**:7341-8.

Kato, A., M. Yamamoto, T. Ohno, M. Tanaka, T. Sata, Y. Nishiyama und Y. Kawaguchi. 2006. Herpes simplex virus 1-encoded protein kinase UL13 phosphorylates viral Us3 protein kinase and regulates nuclear localization of viral envelopment factors UL34 and UL31. *J. Virol.* **80**:1476-1486.

Kattenhorn, L. M., R. Mills, M. Wagner, A. Lomsadze, V. Makeev, M. Borodovsky, H. L. Ploegh und B. M. Kessler. 2004. Identification of proteins associated with murine cytomegalovirus virions. *J. Virol.* **78**:11187-11197.

Klupp, B. G., J. Baumeister, P. Dietz, H. Granzow und T. C. Mettenleiter. 1998. Pseudorabies virus glycoprotein gK is a virion structural component involved in virus release but is not required for entry. *J. Virol.* **72**:1949-1958.

Klupp, B. G., H. Granzow und T. C. Mettenleiter. 2000. Primary envelopment of pseudorabies virus at the nuclear membrane requires the UL34 gene product. *J. Virol.* **74**:10063-10073.

Klupp, B. G., H. Granzow und T. C. Mettenleiter. 2001. Effect of the pseudorabies virus US3 protein on nuclear membrane localization of the UL34 protein and virus egress from the nucleus. *J. Gen. Virol.* **82**:2363-2371.

Klupp B. G., H. Granzow, E. Mundt und T. C. Mettenleiter. 2001a. Pseudorabies virus UL37 gene product is involved in secondary envelopment. *J. Virol.* **75**:8927- 8936.

Klupp, B. G., W. Fuchs, H. Granzow, R. Nixdorf und T. C. Mettenleiter. 2002. Pseudorabies virus UL36 tegument protein physically interacts with the UL37 protein. *J. Virol.* **76**:3065-3071.

Klupp, B. G., C. J. Hengartner, T. C. Mettenleiter und L. W. Enquist. 2004. Complete, annotated sequence of the pseudorabies virus genome. *J. Virol.* **78**:424-440.

Klupp, B. G., S. Böttcher, H. Granzow, M. Kopp und T. C. Mettenleiter. 2005. Complex Formation between the UL16 and UL21 Tegument Proteins of Pseudorabies Virus. *J. Virol.* **79**:1510-1522.

Klupp, B. G., H. Granzow, A. Karger und T. C. Mettenleiter. 2005a. Identification, subviral localization, and functional characterization of the pseudorabies virus UL17 protein. *J. Virol.* **79**:13442-13453.

Klupp, B. G., H. Granzow, G. M. Keil und T. C. Mettenleiter. 2006. The capsid-associated UL25 protein of the alphaherpesvirus pseudorabies virus is nonessential for cleavage and encapsidation of genomic DNA but is required for nuclear egress of capsids. *J. Virol.* **80**:6235-6246.

Klupp, B. G, J. Altenschmidt, H. Granzow, W. Fuchs und T. C. Mettenleiter. 2008. Glycoproteins required for entry are not necessary for egress of pseudorabies virus. *J. Virol.* **82**:6299-6309.

Kopp, M., H. Granzow, W. Fuchs, B. G. Klupp, E. Mundt, A. Karger und T. C. Mettenleiter. 2003. The pseudorabies virus UL11 protein is a virion component involved in secondary envelopment in the cytoplasm. *J. Virol.* **77**:5339–5351.

Kopp, M., H. Granzow, W. Fuchs, B. G. Klupp und T. C. Mettenleiter. 2004. Simultaneous deletion of pseudorabies virus tegument protein UL11 and glycoprotein M severely impairs secondary envelopment. *J. Virol.* **78**:3024-3034.

Krautwald, M., Maresch, C., Klupp, B.G., Fuchs, W., and Mettenleiter, T.C. 2008. 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.* **89**:346-1351.

Kuhn, J., T. Leege, B. G. Klupp, H. Granzow, W. Fuchs und T. C. Mettenleiter. 2008. Partial functional complementation of a pseudorabies virus UL25 deletion mutant by pUL25 of herpes simplex virus 1 indicates overlapping functions of alphaherpesvirus pUL25 proteins. *J. Virol.* **82**:5725-5734.

Kwong, A. und N. Frenkel. 1989. The herpes simplex virus virion host shutoff function. *J. Virol.* **63**:4834-4839.

Laquerre S, Argnani R, Anderson DB, Zucchini S, Manservigi R, Glorioso JC. 1998. 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.* **72**:6119-30.

Lam, Q. C., Smibert, A., Koop, K. E., Lavery, C., Capone, J. P., Weinheimer, S. P. and Smiley, J. R. 1996. Herpes simplex VP16 rescues viral m-RNA from destruction by the virion host shutoff function. *EMBO J.* **15**:2575-2581.

Lamberti, C., and Weller, S.K. 1996. The herpes simplex virus type 1 UL6 protein is essential for cleavage and packaging but not for genomic inversion. *Virology* **226**: 403-407.

Lamberti C and Weller SK. 1998. The herpes simplex virus type 1 cleavage/packaging protein, UL32, is involved in efficient localization of capsids to replication compartments. *J. Virol.* **72**:2463-73.

Liang X, Babiuk LA, Zamb TJ. 1993. Mapping of heparin-binding structures on bovine herpesvirus 1 and pseudorabies virus gIII glycoproteins. *Virology.* **194**: 233-43.

Loomis, J. S., R. J. Courtney and J. W. Wills. 2003. Binding partners for the UL11 tegument protein of herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* **77**:11417–11424.

Loret, S., G. Guay and R. Lippé. 2008. Comprehensive characterization of extracellular HSV-1 virions. *J. Virol.* **82**:8605-8618

Luxton, G.W., Haverlock, S., Collier, K.E., Antinone, S.E., Pincetic, A., and Smith, G.A. 2005. Targeting of herpesvirus capsid transport in axons is coupled to

association with specific sets of tegument proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **102**: 5832-5837.

McClain DS, Fuller AO. 1994. Cell-specific kinetics and efficiency of herpes simplex virus type 1 entry are determined by two distinct phases of attachment. *Virology*. **198**: 690-702.

McGeoch D.J., M.A. Dalrymple, A.J. Davison, A. Dolan, M.C. Frame, D. McNab, L.J. Perry, J.E. Scott und P. Tayler. 1988. The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *J. Gen. Virol.* **69**:1531-1574.

McGeoch, D.J. 2001. Molecular evolution of the gamma-Herpesvirinae. *Philos Trans R. Soc. Lond. B. Bio.l Sci.* **356**:421-435.

McGeoch, D. J., F. J. Rixon und A. Davison. 2006. Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Research*. **117**:90-104.

McLauchlan, J. und F. J. Rixon. 1992. Characterization of enveloped tegument structures (L-particles) produced by alphaherpesviruses: integrity of the tegument does not depend on the presence of capsid or envelope. *J. Gen. Virol.* **73**:269-276.

McNabb, D. S. und R. J. Courtney. 1992. Characterization of the large tegument protein (ICP1/2) of Herpes-Simplex Virus Type-1. *Virology* **190**:221-232.

McNabb, A. R., P. Desai, S. Person, L. L. Roof, D. R. Thomsen, W, W. Newcomb, J. C. Brown und F. L. Homa. 1998. The product of the herpes simplex virus type 1 UL25 gene is required for encapsidation but not for cleavage of replicated viral DNA. *J. Virol.* **72**:1060-1070.

Mendelsohn, C.L., Wimmer, E., and Racaniello, V.R. 1989. Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell* **56**:855-865.

Mettenleiter TC, Zsak L, Zuckermann F, Sugg N, Kern H, Ben-Porat T. 1990. Interaction of glycoprotein gIII with a cellular heparinlike substance mediates adsorption of pseudorabies virus. *J Virol.* **64**:278-86.

Mettenleiter, T. C. 1994. Initiation and spread of herpesvirus infections, *Trends Microbiol.* **2**:2-4.

Mettenleiter, T.C., and Spear, P.G. 1994. Glycoprotein gB (gII) of pseudorabies virus can functionally substitute for glycoprotein gB in herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* **68**:500-504.

Mettenleiter, T. C. 2000. Aujeszky's disease (pseudorabies) virus: the virus and molecular pathogenesis—state of the art. *Vet. Res.* **31**:99-115.

Mettenleiter, T. C. 2004. Budding events in herpesvirus morphogenesis. *Virus Resarch.* **106**:167-180.

- Mettenleiter, T. C.** 2006. Intriguing interplay between viral proteins during herpesvirus assembly or: the herpesvirus assembly puzzle. *Vet. Microbiol.* **113**:163-169.
- Michael, K., B. G. Klupp, T. C. Mettenleiter und A. Karger.** 2006. Composition of pseudorabies virus particles lacking tegument protein US3, UL47, or UL49 or envelope glycoprotein E. *J. Virol.* **80**:1332-13339.
- Mijatov, B., A. L. Cunningham und R. J. Diefenbach.** 2007. Residues F593 and E596 of HSV-1 tegument protein pUL36 (VP1/2) mediate binding of tegument protein pUL37. *Virology.* **368**:26-31.
- Minson AC, Davison AJ, Desrosiers C, Fleckenstein B, McGeoch J, Pellet PE, Roizman B, Studdert DMJ.** 2000. Family Herpesviridae, 203-225. In M. H. Van Regenmortel, C.M. Fauquet, D.L. Bishop, E.B. Carstens, M.K. Estes, S.M. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle, and R.B. Wickner (eds.), *Virus taxonomy.* Academic Press, New York, N.Y.
- Mohl, B.S., Bottcher, S., Granzow, H., Kuhn, J., Klupp, B.G., and Mettenleiter, T.C.** 2009. Intracellular localization of the pseudorabies virus large tegument protein pUL36. *J. Virol.* **83**:9641-9651.
- Mohl, B.S., Bottcher, S., Granzow, H., Fuchs, W., Klupp, B.G., and Mettenleiter, T.C.** 2010. Random transposon-mediated mutagenesis of the essential large tegument protein pUL36 of Pseudorabies Virus. *J. Virol.*
- Montgomery RI, Warner MS, Lum BJ, Spear PG.** 1996. Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell.* **87**:427-36.
- Morrison, E. E., Y. F. Wang und D. M. Meredith.** 1998. Phosphorylation of structural components promotes dissociation of the herpes simplex virus type 1 tegument. *J. Virol.* **72**:7108-7114.
- Muller, T., Batza, H.J., Schluter, H., Conraths, F.J., and Mettenleiter, T.C.** 2003. Eradication of Aujeszky's disease in Germany. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health* **50**:207-213.
- Muranyi, W., J. Haas, M. Wagner, G. Krohne und U. H. Koszinowski.** 2002. Cytomegalovirus recruitment of cellular kinases to dissolve the nuclear lamina. *Science* **297**:854–857.
- Newcomb, W.W., Homa, F.L., Thomsen, D.R., Ye, Z., and Brown, J.C.** 1994. Cell-free assembly of the herpes simplex virus capsid. *J. Virol.* **68**:6059-6063.
- Newcomb, W. W., F. L. Homa, D. R. Thomsen, F. P. Booy, B. L. Trus, A. C. Steven, J. V. Spencer und J. C. Brown.** 1996. Assembly of the herpes simplex virus capsid: characterization of intermediates observed during cell-free capsid formation. *J. Mol. Biol.* **263**:432-446

Newcomb WW, Homa FL, Thomsen DR, Trus BL, Cheng N, Steven A, Booy F, Brown JC. 1999. Assembly of the herpes simplex virus procapsid from purified components and identification of small complexes containing the major capsid and scaffolding proteins. *J. Virol.* **73**:4239-50.

Newcomb, W. W., R. M. Juhas, D. R. Thomsen, F. L. Homa, A. D. Burch, S. K. Weller und J. C. Brown. 2001. The UL6 gene product forms the portal for entry of DNA into the herpes simplex virus capsid. *J. Virol.* **75**:10923-10932.

Newcomb, W.W., Homa, F.L., and Brown, J.C. 2005. Involvement of the portal at an early step in herpes simplex virus capsid assembly. *J. Virol.* **79**:10540-10546.

Newcomb, W. W., F. L. Homa und J. C. Brown. 2006. Herpes simplex virus capsid structure: DNA packaging protein UL25 is located on the external surface of the capsid near the vertices. *J. Virol.* **80**:6286-6294.

Nicola, A.V., McEvoy, A.M., and Straus, S.E. 2003. Roles for endocytosis and low pH in herpes simplex virus entry into HeLa and Chinese hamster ovary cells. *J. Virol.* **77**:5324-5332.

Nixdorf R, Schmidt J, Karger A, Mettenleiter TC. 1999. Infection of Chinese hamster ovary cells by pseudorabies virus. *J. Virol.* **73**: 8019-26.

Ogasawara, M., Suzutani, T., Yoshida, I., and Azuma, M. 2001. Role of the UL25 gene product in packaging DNA into the herpes simplex virus capsid: location of UL25 product in the capsid and demonstration that it binds DNA. *J. Virol.* **75**:1427-1436.

Okazaki, K., Matsuzaki, T., Sugahara, Y., Okada, J., Hasebe, M., Iwamura, Y., Ohnishi, M., Kanno, T., Shimizu, M., Honda, E., et al. 1991. BHV-1 adsorption is mediated by the interaction of glycoprotein gIII with heparinlike moiety on the cell surface. *Virology* **181**:666-670.

O'Regan, K. J., M. A. Bucks, M. A. Murphy, J. W. Wills und R. J. Courtney. 2007. A conserved region of the herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22 facilitates interaction with the cytoplasmic tail of glycoprotein E (gE). *Virology.* **358**:192-200.

Park, R. and J.D. Baines. 2006. Herpes simplex virus type 1 infection induces activation and recruitment of protein kinase C to the nuclear membrane and increased phosphorylation of lamin B. *J. Virol.* **80**:3167-3179.

Pasdeloup, D., Blondel, D., Isidro, A.L., and Rixon, F.J. 2009. Herpesvirus capsid association with the nuclear pore complex and viral DNA release involve the nucleoporin CAN/Nup214 and the capsid protein pUL25. *J. Virol.* **83**:6610-6623.

Pellet, P. E. and B. Roizman. 2007. The Family Herpesviridae: A Brief Introduction. In: *Fields, Virology.* Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. Fünfte Edition. Kapitel **66**:2479-2499.

- Pensaert, M. und J. Kluge.** 1989. Pseudorabies virus (Aujeszky's disease). In: Pensaert, M (Hrsg.): Virusinfections of porcines. Elsevier science Publ., Amsterdam.
- Pensaert, M., and Morrison, R.B.** 2000. Challenges of the final stages of the ADV eradication program. *Vet. Res.* **31**:141-145.
- Perelygina, L., Zhu, L., Zurkuhlen, H., Mills, R., Borodovsky, M., and Hilliard, J.K.** 2003. Complete sequence and comparative analysis of the genome of herpes B virus (Cercopithecine herpesvirus 1) from a rhesus monkey. *J. Virol.* **77**:6167-6177.
- Peeters B, de Wind N, Hooisma M, Wagenaar F, Gielkens A, Moormann R.** 1992. Pseudorabies virus envelope glycoproteins gp50 and gII are essential for virus penetration, but only gII is involved in membrane fusion. *J. Virol.* **66**:894-905.
- Poon, A.P., and Roizman, B.** 1993. Characterization of a temperature-sensitive mutant of the UL15 open reading frame of herpes simplex virus 1. *J. Virol.* **67**:4497-4503.
- Preston, V. G., J. Murray, C. M. Preston, I. M. McDougall und N. D. Stow.** 2008. The UL25 gene product of herpes simplex virus type 1 is involved in uncoating of the viral genome. *J. Virol.* **82**:6654-6666.
- Rauh, I. und T. C. Mettenleiter.** 1991. Pseudorabies virus glycoproteins gII and gp50 are essential for virus penetration. *J. Virol.* **65**:5348-5356.
- Renault, T., Le Deuff, R.M., Cochennec, N., Chollet, B., and Maffart, P.** 1995. Herpes-like viruses associated with high mortality levels in larvae and spat of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*: a comparative study, the thermal effects on virus detection in hatchery-reared larvae, reproduction of the disease in axenic larvae. *Vet. Res.* **26**:539-543.
- Reynolds, A., E.G. Wills, R.J. Roller, B.J. Ryckman und J.D. Baines.** 2002. 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.* **78**:8939-8952.
- Reynolds, A. E., L. Liang und J. D. Baines.** 2004. Conformational changes in the nuclear lamina induced by herpes simplex virus type 1 require genes U(L)31 and U(L)34. *J. Virol.* **78**:5564-5575.
- Roizman, B. , Furlong, D.** 1974. The replication of herpesviruses. In: Fraenkel-Conrat, H., Wagner, R.R. (eds.) *Comprehensive Virology*, Vol. 3, New York: Plenum, 229-403.
- Roizman, B.** 1982. The family Herpesviridae: a general description, taxonomy and classification. In: B. Roizman (Hrsg.); *The Herpesviruses*, Vol. 2, Plenum press, London, 1-23.
- Roizman, B., and Baines, J.** 1991. The diversity and unity of Herpesviridae. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **14**:63-79.

Roizman, B., Desrosiers, R., Fleckenstein, B., Lopez, C., Minson, A.C., Studdert, M. J. 1992. The family herpesviridae: an update. *Arch. Virol.* **123**:425-449.

Roizman, B., Sears, A. 1996. Herpes simplex viruses and their replication. In: B.N. Field, B. N., Knipe, D. M., Howley, P. M. (Hrsg.): *Fields Virology*. 3. Aufl. Lippincott-Raven Press, Philadelphia, New York, 2231-2295.

Roizman, B. and Pellett, P. E. 2001. The family *Herpesviridae*: a brief introduction. Chapter 71 In: DM Knipe, PM Howley, eds *Fields' Virology*, Edition 4, Volume 2 Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2381-2397.

Roos, W.H., Radtke, K., Kniesmeijer, E., Geertsema, H., Sodeik, B., and Wuite, G.J. 2009. Scaffold expulsion and genome packaging trigger stabilization of herpes simplex virus capsids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **106**:9673-9678.

Ryckman B.J. and R.J. Roller. 2004. Herpes simplex virus type 1 primary envelopment: UL34 protein modification and the US3-UL34 catalytic relationship. *J. Virol.* **78**:399-412

Sabo, A., Rajcani, J. & Blaskovic, D. 1969. Studies on the pathogenesis of Aujeszky's disease. 3. The distribution of virulent virus in piglets after intranasal infection. *Acta. Virol.* **13**:407-414.

Salmon, B., Cunningham, C., Davison, A.J., Harris, W.J., and Baines, J.D. 1998. The herpes simplex virus type 1 U(L)17 gene encodes virion tegument proteins that are required for cleavage and packaging of viral DNA. *J. Virol.* **72**:3779-3788.

Sawitzky D, Hampl H, Habermehl KO. 1990. Comparison of heparin-sensitive attachment of pseudorabies virus (PRV) and herpes simplex virus type 1 and identification of heparin-binding PRV glycoproteins. *J. Gen. Virol.* **71**:1221-5.

Schimmer, C. und A. Neubauer. 2003. The equine herpesvirus 1 UL11 gene product localizes to the trans-golgi network and is involved in cell-to-cell spread. *Virology.* **308**:23-36.

Schmidt, J, Klupp, BG, Karger, A, Mettenleiter TC. 1997. Adaptability in herpesviruses: Glycoprotein D-independent infectivity of pseudorabies virus. *J. Virol.* **71**:17-24.

Sheaffer, A.K., Newcomb, W.W., Gao, M., Yu, D., Weller, S.K., Brown, J.C., and Tenney, D.J. 2001. Herpes simplex virus DNA cleavage and packaging proteins associate with the procapsid prior to its maturation. *J. Virol.* **75**:687-698.

Singer, G.P., Newcomb, W.W., Thomsen, D.R., Homa, F.L., and Brown, J.C. 2005. Identification of a region in the herpes simplex virus scaffolding protein required for interaction with the portal. *J. Virol.* **79**:132-139.

Skepper, J. N., A. Whiteley, H. Browne und A. Minson. 2001. Herpes simplex virus nucleocapsids mature to progeny virions by an envelopment · deenvelopment · reenvelopment pathway. *J. Virol.* **75**:5697-5702.

- Smibert CA, Popova B, Xiao P, Capone JP, Smiley JR.** 1994. Herpes simplex virus VP16 forms a complex with the virion host shutoff protein vhs. *J. Virol.* **68**: 2339-46.
- Smiley JR.** 2004. Herpes simplex virus virion host shutoff protein: immune evasion mediated by a viral RNase? *J. Virol.* **78**:1063-8.
- Sodeik, B., M. W. Ebersold und A. Helenius.** 1997. Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J. Cell Biol.* **136**:1007-1021.
- Sodeik, B.** 2000. Mechanisms of viral transport in the cytoplasm. *Trends Microbiol.* **8**:465-472.
- Spear, P. G.** 1993. Entry of alphaherpesviruses into cells. *Sem. Virol.* **4**:167-180.
- Spear, P. G. und B. Roizman.** 1972. Proteins specified by Herpes-Simplex Virus, V. purification and structural proteins of herpesvirion. *J. Virol.* **9**:143-159.
- Spencer, J.V., Newcomb, W.W., Thomsen, D.R., Homa, F.L., and Brown, J.C.** 1998. Assembly of the herpes simplex virus capsid: preformed triplexes bind to the nascent capsid. *J. Virol.* **72**:3944-3951.
- Spengler, M., N. Niesen, C. Grose, W. T. Ruyechan und J. Hay.** 2001. Interactions among structural proteins of varicella zoster virus. *Arch. Virol. (Suppl.)*. **17**:71–79.
- Steiner, I.** 1996. Human herpes viruses latent infection in the nervous system. *Immunol. Rev.* **152**:57-173.
- Steven, A. C. & Spear, P. G.** 1997. Herpesvirus capsid assembly and envelopment. *Structural biology of viruses*, 312-351.
- Steven, A.C., Heymann, J.B., Cheng, N., Trus, B.L., and Conway, J.F.** 2005. Virus maturation: dynamics and mechanism of a stabilizing structural transition that leads to infectivity. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**:227-236.
- Stow, N.** 2001. Packaging of genomic and amplicon DNA by the herpes simplex virus type 1 UL25-null mutant KUL25NS. *J. Virol.* **75**:10755-10765.
- Szilágyi, J. F. und C. Cunningham.** 1991. Identification and characterization of a novel non-infectious herpes simplex virus-related particle. *J. Gen. Virol.* **72**:661-668.
- Tatman, J.D., Preston, V.G., Nicholson, P., Elliott, R.M., and Rixon, F.J.** 1994. Assembly of herpes simplex virus type 1 capsids using a panel of recombinant baculoviruses. *J. Gen. Virol.* **75**:1101-1113.
- Thomsen, D.R., Roof, L.L., and Homa, F.L.** 1994. Assembly of herpes simplex virus (HSV) intermediate capsids in insect cells infected with recombinant baculoviruses expressing HSV capsid proteins. *J. Virol.* **68**:2442-2457.

Thurlow, J.K., Rixon, F.J., Murphy, M., Targett-Adams, P., Hughes, M., and Preston, V.G. 2005. The herpes simplex virus type 1 DNA packaging protein UL17 is a virion protein that is present in both the capsid and the tegument compartments. *J. Virol.* **79**:150-158.

Thurlow, J. K., M. Murphy, N. D. Stow und V. G. Preston. 2006. Herpes simplex virus type 1 DNA-packaging protein UL17 is required for efficient binding of UL25 to capsids. *J. Virol.* **80**:2118-2126.

Trus, B. L., F. P. Booy, W. W. Newcomb, J. C. Brown, F. L. Homa, D.R. Thomsen und A. C. Steven. 1996. The herpes simplex virus procapsid: structure, conformational changes upon maturation, and roles of the triplex proteins VP19c and mVP23 in assembly. *J. Mol. Biol.* **263**:447-462.

Trus, B. L., N. Cheng, W. W. Newcomb, F. L. Homa, J. C. Brown und A.C. Steven. 2004. Structure and Polymorphism of the UL6 Portal Protein of Herpes Simplex Virus Type 1. *J. Virol.* **78**:12668-12671.

Trus, B. L., W. W. Newcomb, N. Cheng, G. Cardone, L. Marekov, F.L. Homa, J.C. Brown und A.C. Steven. 2007. Allosteric signaling and a nuclear exit strategy: binding of UL25/UL17 heterodimers to DNA-filled HSV-1 capsids. *Mol. Cell* **26**:479-489.

Turcotte, S., J. Letellier und R. Lippé. 2005. Herpes simplex virus type 1 capsids transit by the trans-Golgi network, where viral glycoproteins accumulate independently of capsid egress. *J. Virol.* **79**:8847-8860.

Varnum, S. M., D. N. Streblow, M. E. Monroe, P. Smith, K. J. Auberry, L. Pasa-Tolic, D. Wang, D. G. Camp, K. Rodland, S. Wiley, W. Britt, T. Shenk, R. D. Smith und J. A. Nelson. 2004. Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *J. Virol.* **78**:10960-10966.

Vittone, V., E. Diefenbach, D. Triffett, M. W. Douglas, A. L. Cunningham und R. J. Diefenbach. 2005. Determination of interactions between tegument proteins of herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* **79**:9566-9571.

Ward, P. L. and Roizman, B. 1994. Herpes simplex genes: the blueprint of a successful human pathogen. *Trends Genet.* **10**:267-274.

Warner MS, Geraghty RJ, Martinez WM, Montgomery RI, Whitbeck JC, Xu R, Eisenberg RJ, Cohen GH, Spear PG. 1998. A cell surface protein with herpesvirus entry activity (HveB) confers susceptibility to infection by mutants of herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2, and pseudorabies virus. *Virology.* **246**:179-89.

Weller, S.K., Carmichael, E.P., Aschman, D.P., Goldstein, D.J., and Schaffer, P.A. 1987. Genetic and phenotypic characterization of mutants in four essential genes that map to the left half of HSV-1 UL DNA. *Virology* **161**:198-210.

- Whealy, M.E., J.P. Card, R.P. Meade, A.K. Robbins und L.W. Enquist.** 1991. Effect of brefeldin A on alphaherpesvirus membrane protein glycoylation and virus egress. *J. Virol.* **65**:1066-1081.
- White CA, Stow ND, Patel AH, Hughes M, Preston VG.** 2003. Herpes simplex virus type 1 portal protein UL6 interacts with the putative terminase subunits UL15 and UL28. *J. Virol.* **77**:6351-8.
- Whitley R.** 1996. Herpes simplex virus. In: Fields BN, et al, editors. *Fields virology.* Vol 2, 3rd edition. New York: Lippencott-Raven. 2297-2342.
- Whitley R.** 2004. Neonatal herpes simplex virus infection. *Curr Opin Infect.* **17**:243-246.
- Wisner, T.W., C.C. Wright, A. Kato, Y. Kawaguchi, F. Mou, J.D. Baines, R.J. Roller und D.C. Johnson.** 2009. Herpesvirus gB-induced fusion between the virion envelope and outer nuclear membrane during virus egress is regulated by the viral US3 kinase. *J. Virol.* **83**:3115-3126.
- Wittmann, G.** 1984. State and control of Aujeszky's disease in West Germany. *Tierarztl. Prax.* **12**:141-147.
- Wittmann, G. and Rziha, H. J.** 1989. Aujeszky's disease (Pseudorabies) in pigs. In: Wittmann, G. (Hrsg.): *Herpesvirus diseases of cattle, horses, and pigs.* Kluwer Academic Publishers, Boston / Dordrecht / London, 163-174.
- Wittmann, G.** 1991. Spread and control of Aujeszky's disease. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* **14**:165-174.
- Wu, C. A., L. Harper und T. Ben-Porat.** 1986. cis Functions involved in replication and cleavage-encapsidation of pseudorabies virus. *J. Virol.* **59**:318-327.
- Yang, K., Homa, F., and Baines, J.D.** 2007. Putative terminase subunits of herpes simplex virus 1 form a complex in the cytoplasm and interact with portal protein in the nucleus. *J. Virol.* **81**:6419-6433.
- Yu, D., A. K. Sheaffer, D. J. Tenney und S. K. Weller.** 1997. Characterization of ICP6::lacZ insertion mutants of the UL15 gene of herpes simplex virus type 1 reveals the translation of two proteins. *J. Virol.* **71**:6419-6433.
- Zhu, Q. und R.J. Courtney.** 1994. Chemical cross-linking of virion envelope and tegument proteins of herpes simplex virus type 1. *Virology* **204**:590-599.
- Zhu, Z., M. D. Gershon, Y. Hao, R. T. Ambron, C. A. Gabel und A. A. Gershon.** 1995. Envelopment of varicella-zoster virus: targeting of viral glycoproteins to the trans-Golgi network. *J. Virol.* **69**:7951-7959.
- Zhou, Z.H., Macnab, S.J., Jakana, J., Scott, L.R., Chiu, W., and Rixon, F.J.** 1998. Identification of the sites of interaction between the scaffold and outer shell in herpes simplex virus-1 capsids by difference electron imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **95**:2778-2783.

Zhou, Z. H., D. H. Chen, J. Jakana, F. J. Rixon und W. Chiu. 1999. Visualization of tegument-capsid interactions and DNA in intact herpes simplex virus type 1 virions. *J. Virol.* **73**:3210-3218.

Zhou, Z.H., Dougherty, M., Jakana, J., He, J., Rixon, F.J., and Chiu, W. 2000. Seeing the herpesvirus capsid at 8.5 Å. *Science* **288**:877-880.

Zsak, L., F. Zuckermann, N. Sugg und T. Ben-Porat. 1992. Glycoprotein gI of pseudorabies virus promotes cell fusion and virus spread via direct cell-to-cell transmission. *J. Virol.* **66**:2316-2325.

V Partial Functional Complementation of a Pseudorabies Virus UL25 Deletion Mutant by Herpes Simplex Virus Type 1 pUL25 indicates overlapping Functions of Alphaherpesvirus pUL25 proteins