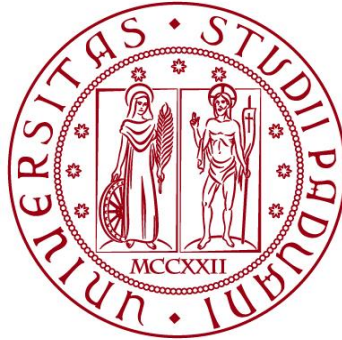


**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA**

Corso di Laurea in Biologia Molecolare



**ELABORATO DI LAUREA**

**IL FATTORE DI TRASCRIZIONE ICP4 DI HSV-1  
CONFERISCE PROPRIETA' SIMILI A QUELLE  
DEI LIQUIDI AI COMPARTIMENTI DI  
REPLICAZIONE VIRALE**

Tutor: Prof.ssa Frasson Ilaria  
Dipartimento di Medicina Molecolare

Laureanda: Angela Ruggero

**ANNO ACCADEMICO 2022/2023**



# INDICE

<b>ABSTRACT .....</b>	<b>5</b>
<b>STATO DELL'ARTE .....</b>	<b>7</b>
1. <i>I compartimenti di replicazione virale .....</i>	<i>7</i>
2. <i>HSV-1: caratteristiche e natura dei compartimenti di replicazione virale .....</i>	<i>8</i>
3. <i>ICP4: un possibile bersaglio contro l'infezione da HSV-1 .....</i>	<i>10</i>
<b>MATERIALI E METODI.....</b>	<b>11</b>
1. <i>Saggio delle placche di lisi.....</i>	<i>11</i>
2. <i>Trasfezione cellulare .....</i>	<i>11</i>
3. <i>Imaging 3D di cellule vive.....</i>	<i>12</i>
4. <i>Trattamento con 1,6-esandiolo.....</i>	<i>13</i>
5. <i>Recupero della fluorescenza dopo esperimenti di fotosbiancamento .....</i>	<i>13</i>
6. <i>Deplezione di ATP .....</i>	<i>13</i>
7. <i>Western Blot .....</i>	<i>14</i>
<b>APPROCCIO SPERIMENTALE E RISULTATI.....</b>	<b>15</b>
1. <i>Proteine di HSV-1 che formano condensati nucleari.....</i>	<i>15</i>
2. <i>Comportamento e dinamica dei condensati generati da ICP4 .....</i>	<i>16</i>
3. <i>I domini proteici di ICP4 che guidano la formazione dei condensati.....</i>	<i>17</i>
4. <i>ICP4 mantiene le sue proprietà nei compartimenti di replicazione.....</i>	<i>18</i>
<b>DISCUSSIONE .....</b>	<b>21</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>23</b>
<b>APPENDICE .....</b>	<b>25</b>



## **ABSTRACT**

Il virus Herpes Simplex di tipo 1 (HSV-1) forma progenie nel nucleo all'interno dei compartimenti di replicazione virale (VRC), dove si verificano l'espressione genica virale, la replicazione del DNA e l'assemblaggio. Qui, è dimostrato che il fattore di trascrizione virale essenziale ICP4 è una proteina intrinsecamente disordinata (IDP) in grado di guidare la condensazione proteica e la separazione di fase liquido-liquido (LLPS) nelle cellule trasfettate. I saggi di recupero della fluorescenza dopo fotosbiancamento (FRAP) hanno rivelato rapidi tassi di cambio della proteina di fusione EYFP-ICP4 tra condensati separati di fase e l'ambiente circostante, simili ad altri IDP virali che guidano LLPS. Allo stesso modo, i VRC HSV-1 rivelati da ICP4 con tag EYFP hanno mantenuto la loro natura liquida, suggerendo che sono condensati separati di fase. Insieme, i risultati di questo studio dimostrano che il fattore di trascrizione ICP4 di HSV-1 ha caratteristiche di un IDP virale, forma condensati nel nucleo cellulare tramite LLPS e può essere utilizzato come indicatore per VRC di HSV-1 con caratteristiche di condensati separati di fase liquido-liquido.



# STATO DELL'ARTE

## *1. I compartimenti di replicazione virale*

I virus sono parassiti intracellulari obbligati la cui moltiplicazione dipende dai meccanismi cellulari. In ogni ciclo replicativo, vengono create nuove sequenze genomiche virali nelle cellule infettate a causa delle mutazioni che avvengono durante la replicazione del genoma virale. La maggior parte di queste mutazioni produce virus non infettivi, ma alcune sono l'origine di nuove interazioni tra fattori virali e cellulari e possono generare nuove strategie per la replicazione del virus. Nel corso di questa costante evoluzione, potrebbero essere stati selezionati positivamente i segnali che innescano l'assemblaggio di compartimenti di replicazione virale, poiché queste strutture sono vantaggiose per il virus, infatti, la struttura che si genera in seguito alla formazione dei compartimenti di replicazione virale facilita un adeguato coordinamento spaziale della replicazione e dell'assemblaggio del genoma virale, massimizzando l'efficienza dell'utilizzo delle risorse cellulari. Inoltre, queste strutture specializzate, potrebbero anche fornire siti affinché i virus riescano ad eludere le difese antivirali attuate dalle cellule ospiti.<sup>1</sup>

Sebbene l'assemblaggio dei compartimenti di replicazione virale e dei loro componenti vari tra le diverse famiglie di virus, esistono somiglianze fondamentali tra i virus con genoma ad RNA e alcuni parallelismi possono essere fatti con i virus a DNA. Queste similitudini potrebbero derivare dalla necessità di controllare fattori cellulari comuni che partecipano: alla replicazione o alla trascrizione del genoma virale, alla capacità di interagire con le vie biosintetiche cellulari, nonché all'evasione dei meccanismi comuni della risposta antivirale cellulare.<sup>1</sup>

I virus a RNA e DNA che si replicano nel citoplasma formano fabbriche virali che richiedono la rilocalizzazione degli organelli, la riorganizzazione delle strutture endocellulari. Nel caso di virus a DNA che si replicano nel nucleo, la formazione di compartimenti di replicazione non sembra richiedere strutture provviste di membrana ma, piuttosto, una riorganizzazione delle componenti nucleari che accompagna la formazione di queste strutture. Questa riorganizzazione include la redistribuzione della cromatina e dei componenti dei domini nucleari.<sup>1</sup> Ci sono state evidenze che per i virus ad RNA i compartimenti di replicazione virale siano delle inclusioni che non presentano un confine con il citoplasma circostante. Un modo per generare compartimenti cellulari senza la necessità di utilizzare una membrana è attraverso la separazione di fase liquido-liquido.<sup>2</sup> Durante questo processo, i componenti citoplasmatici o nucleari si condensano in una fase distinta che presenta le proprietà dei fluidi. Le tre proprietà chiave di una fase liquida che possono essere

misurate nelle cellule sono: la fusione di due o più gocce in una singola goccia, una forma rotonda indotta dalla tensione superficiale e la rapida diffusione interna.<sup>2</sup>

È stato dimostrato che queste proprietà sono presenti in alcune proteine che formano il compartimento di replicazione virale, mentre il genoma, non contribuisce alla generazione di questi compartimenti, ma può formare un'impalcatura su cui poi le proteine possono generare queste fabbriche virali: ciò accade perché le proteine coinvolte nella formazione del compartimento di replicazione virale hanno domini che legano gli acidi nucleici.<sup>2</sup> Oltre alle evidenze per i virus ad RNA, recenti studi hanno dimostrato che anche i compartimenti di replicazione virale dell'*Herpes Simplex Virus di tipo 1* (HSV-1) possiedono diverse caratteristiche della separazione di fase liquido-liquido: la forma sferica, la capacità di fondersi e l'accumulo di proteine virali immediatamente precoci aventi regioni intrinsecamente disordinate.<sup>3</sup>

## ***2. HSV-1: caratteristiche e natura dei compartimenti di replicazione virale***

HSV-1 appartiene al genere *Simplexvirus* assieme all'*Herpes Simplex Virus di tipo 2* (HSV-2), e fa parte della sottofamiglia degli *Alphaherpesvirinae*, che è una delle tre sottofamiglie di *Herpesviridae* in grado di infettare l'uomo.<sup>4</sup> Gli *Herpesviridae* sono considerati virus antichi che si sono coevoluiti con i loro ospiti per un tempo lungo e per questo si sono generate complesse interazioni virus-ospite.<sup>3</sup>

Le infezioni da HSV-1 possono causare vesciche a livello oro-genitale e oculare, ma possono anche portare alla morte di individui immunocompromessi e neonati. L'infezione primaria nelle cellule epiteliali porta a un'infezione latente per tutta la vita dell'ospite e la latenza viene stabilita nei gangli sensoriali o autonomi, grazie al trasporto retrogrado attraverso gli assoni dei neuroni del virione o del suo nucleocapside. Lesioni al tessuto, stress fisico o emotivo, esposizione alla luce e altri fattori possono portare alla riattivazione della latenza, per cui il virus viene trasportato dal flusso assonale anterogrado alla regione dell'infezione primaria.<sup>3</sup>

HSV-1 è un virus a DNA a doppio filamento dotato di envelope che si replica nel nucleo delle cellule ospiti. L'envelope è costituito da un doppio strato lipidico, in cui sono ancorate circa 11 glicoproteine virali, quattro delle quali (gB, gD, gH e gL) sono essenziali per l'ingresso del virus nelle cellule: l'adsorbimento è infatti mediato dalle glicoproteine virali che si legano alle catene glicosaminoglicaniche, presenti sulla superficie cellulare, tra questi l'eparan solfato (HS) è considerato il principale recettore legante HSV-1, avendo un ruolo chiave nell'aderenza delle glicoproteine sulla superficie della cellula bersaglio. Tra il capsido e il pericapsido



si trova uno strato proteico amorfo chiamato tegumento, composto da proteine importanti nella regolazione del ciclo replicativo virale, tra cui  $\alpha$ -trans-inducing factor ( $\alpha$ -TIF), noto come VP16, coinvolto nella trascrizione di geni precoci immediati. Il genoma, dal peso molecolare di circa 150 kbp, è costituito da due componenti legate covalentemente, designate come L (lunga) e S (corta), ognuna delle quali è formata da sequenze uniche ( $U_L$  e  $U_S$ , rispettivamente) affiancate da regioni di sequenze ripetute e invertite che facilitano la replicazione del genoma.

Dopo la penetrazione nel citoplasma, il nucleocapside viene trasportato attraverso i microtubuli del citoscheletro ad un poro di membrana nucleare, dove il DNA virale viene rilasciato nel nucleo. Il ciclo litico di HSV-1 comporta l'espressione regolata in modo sequenziale e coordinato di tre serie di geni virali: immediatamente precoce, precoce e tardiva. Inizialmente, il DNA virale viene trascritto dalla RNA polimerasi II della cellula ospite e i primi geni ad essere trascritti sono i geni immediatamente precoci, e le prime proteine ad essere tradotte sono: ICP0, ICP4, ICP22, ICP27, ICP47 e una proteina codificata dal gene *Us1.5*. Una volta accumulate in quantità sufficiente, le proteine codificate dai geni immediatamente precoci ritornano al nucleo per attivare la trascrizione e la traduzione dei geni precoci, responsabili della replicazione dell'acido nucleico virale. Quando le proteine tradotte dai geni precoci sono espresse, diverse proteine cellulari migrano verso il nucleo e si riuniscono per formare il complesso di replicazione virale, dove inizia la sintesi del DNA del virus. Dopo la replicazione del genoma, viene espresso il terzo gruppo di geni, che codificano proteine tardive che formano le proteine strutturali costituenti il tegumento e il capsido. La formazione del capsido, in seguito, avviene attraverso proteine che vengono trasportate al nucleo.<sup>4</sup>

Ogni genoma di HSV-1 può formare il proprio compartimento di replicazione virale, ma un numero limitato di genomi di HSV-1 in arrivo inizia l'espressione e la replicazione all'interno di una determinata cellula. I compartimenti di replicazione virale formati durante l'infezione da HSV-1 sono stati originariamente identificati come siti nucleari contenenti DNA virale associato alla proteina virale legante il DNA a singolo filamento ICP8 e al fattore di trascrizione virale ICP4.<sup>3</sup>

Alcune proteine interagiscono specificamente con le sequenze genomiche virali, come la proteina virale ICP4 e la proteina virale 16 (VP16), mentre altre sono reclutate attraverso interazioni proteina-proteina. È perciò fondamentale porre chiarezza su quale sia effettivamente la proteina virale coinvolta nella genesi dei compartimenti di replicazione attraverso la separazione di fase liquido-liquido, in modo da comprendere nuovi aspetti sull'interazione virus-cellula, potenzialmente utili anche per lo sviluppo di una terapia antivirale.<sup>3</sup>

### ***3. ICP4: un possibile bersaglio contro l'infezione da HSV-1***

Come detto in precedenza, i compartimenti di replicazione virale svolgono un ruolo essenziale e centrale nella propagazione dei virus: lo studio di queste strutture senza membrana e come questa organizzazione cambi con il progredire dell'infezione, può essere la chiave per capire come i diversi processi virali sono efficacemente coordinati. Inoltre, capire come deve essere modificata l'architettura nucleare e come i processi biofisici possono essere utilizzati per guidare la formazione di queste fabbriche virali, può fornire ulteriori informazioni sui processi cellulari fondamentali. I virus a DNA che si replicano nel nucleo comprendono una gamma di virus ubiquitari e clinicamente importanti, dai patogeni acuti ai virus tumorali. In particolare, le infezioni da HSV-1 e HSV-2 sono distribuite in tutto il mondo. L'alta incidenza dell'infezione da HSV-1 deve essere presa in considerazione, promuovendo una campagna di prevenzione, essendo la malattia silenziosa e sessualmente trasmissibile, non avendo a disposizione un vaccino efficace.<sup>4</sup> Ad oggi, solo gli inibitori della polimerasi sono disponibili contro HSV-1 e l'aumento di ceppi resistenti di HSV-1 che possono essere estremamente pericolosi soprattutto nei pazienti trapiantati e immunocompromessi sollecita la scoperta di nuovi farmaci antivirali con un diverso meccanismo d'azione<sup>5</sup>, anche perché sono stati segnalati alcuni effetti collaterali tossici causati dai farmaci disponibili.<sup>4</sup>

Chiarire quindi che i compartimenti di replicazione virale siano condensati separati di fase, sarebbe molto importante, in modo da portare allo sviluppo di farmaci con attività ad ampio spettro contro futuri patogeni virali emergenti, prendendo di mira proteine che sono fondamentali per la formazione di condensati e siano conservate in tutta la famiglia di virus: per questo è fondamentale comprendere se il fattore di trascrizione ICP4 sia una guida alla formazione dei condensati separati di fase.

In uno studio sono stati proposte molecole selettive anti-ICP4, che sono in grado di legarsi a questo fattore di trascrizione in modo da ostacolare la progressione del ciclo virale in una fase molto precoce, prevenendo il danno neuronale legato all'infezione da HSV-1.<sup>5</sup>

L'importanza di sviluppare farmaci contro ICP4 sta anche nel fatto di poter contribuire allo sviluppo di una strategia antitumorale, in quanto è stato riscontrato che il fattore di trascrizione di ICP4 di HSV-1 interagisce con il fattore di crescita endoteliale vascolare in modo da sovraregolarne l'espressione e favorire quindi la formazione di nuovi vasi sanguigni. Questo processo è essenziale per la crescita tumorale e le metastasi perché fornisce ossigeno e nutrienti alle cellule tumorali proliferanti, favorendo così la progressione del tumore.<sup>5</sup>

# MATERIALI E METODI

## *1. Saggio delle placche di lisi*

Attraverso il saggio delle placche di lisi si può eseguire la titolazione di una soluzione contenente una concentrazione incognita di particelle virali. Questo metodo considera che ogni particella virale sia in grado di infettare e lisare una cellula bersaglio, perciò che ci sia una proporzionalità tra il numero di particelle virali infettive della soluzione e il numero di placche, corrispondenti alla lisi di una o più cellule.

Per effettuare questo esperimento, occorre inizialmente allestire diluizioni seriali della soluzione virale iniziale, in modo da diminuire il contenuto di particelle virali contenute in ogni soluzione allestita affinché venga ridotta la possibilità che più particelle virali infettino la stessa cellula, evento che altererebbe la titolazione. Successivamente le colture cellulari vengono infettate con le diverse soluzioni virali, avendo l'accortezza di non infettare una coltura che funge da controllo dell'infezione, e dopo un certo periodo di incubazione, le cellule vengono fissate, cioè ricoperte da una sostanza gelatinosa, in modo da evitare che la progenie virale diffonda nelle cellule vicine (al fine sempre di non alterare il conteggio) e in seguito viene aggiunto un colorante che evidenzia la presenza delle cellule e la loro assenza, dovuta alla lisi.

A questo punto si procede con la conta delle placche di lisi nelle piastre in cui queste sono presenti in concentrazione non troppo elevata e non troppo bassa, perché la conta in piastre a concentrazione troppo elevata o troppo bassa di placche può compromettere la significatività statistica del risultato che si ottiene. Inoltre, per ridurre l'errore dovuto al caso è quello di infettare più piastre con la stessa soluzione virale, così da poter individuare un valore medio del numero di placche per diluizione di soluzione virale.

Infine si esegue un calcolo che permette di definire il titolo del virus in unità formanti placca, moltiplicando il numero di placche contate in una determinata condizione per il fattore di diluizione della soluzione virale utilizzata rispetto a quella iniziale: il numero che si ottiene, corrisponde quindi al numero di particelle virali in grado di formare una placca di lisi.

## *2. Trasfezione cellulare*

Nell'articolo oggetto della discussione, è stato usato il protocollo che prevede l'utilizzo di Lipofectamine LTX con reagente Plus per eseguire la trasfezione cellulare, che è un metodo per inserire acidi nucleici estranei nelle cellule eucariotiche. I reagenti utilizzati permettono un'efficace e veloce trasfezione plasmidica, dato che non è necessario cambiare il mezzo di reazione per condurla con successo.

In questo caso, le cellule trasfettate sono le cellule Vero, nelle quali è stato inserito una specifica tipologia di DNA plasmidico. A seconda di ciò che doveva essere verificato, il plasmide che esprime il fattore di trascrizione virale ICP4 fuso N-terminalmente con la proteina fluorescente gialla (pIE3-EYFP-ICP4) disponibile inizialmente, è stato modificato.

Inizialmente il plasmide è stato modificato in modo da generare un plasmide di controllo all'esperimento (pIE3-EYFP), in cui è stata eliminata la porzione che codificava per il fattore di trascrizione ICP4 tramite una reazione di digestione enzimatica e ligazione.

Il plasmide pIE3-EYFP-ICP4 è stato oggetto di ulteriori reazioni di digestione enzimatica e di ligazione in modo da generare dei costrutti che fossero privi di alcuni domini di ICP4 leganti il DNA: i domini NTA, DBD e CTA.

Un altro plasmide utilizzato è stato quello che esprime il fattore di trascrizione ICP27 C-terminalmente fuso a mCherry, ottenuto tramite clonaggio del gene ICP27 nel vettore disponibile mCherry2-N1. Come controllo è stato utilizzato un plasmide già disponibile che esprime solo mCherry.

Infine, sono stati trasfettati nelle cellule anche il plasmide ampliconico di HSV-1 che contiene la sequenza dell'operatore della tetraciclina e il plasmide reporter che ha al suo interno la sequenza del repressore della tetraciclina legata alla proteina fluorescente gialla: questo sistema è stato utilizzato per tracciare il DNA virale di HSV-1, dato che la proteina generata dal plasmide reporter fluorescente interagisce con il plasmide che contiene la sequenza dell'operatore tetraciclina.

### ***3. Imaging 3D di cellule vive***

Questa è una tecnica che permette di osservare i processi cellulari mentre stanno accadendo, tenere traccia delle strutture e delle biomolecole cellulari, osservare le interazioni tra cellule e studiare le strutture cellulari nel loro ambiente nativo, fornendo risultati più vicini a quanto può succedere *in vivo*. Per effettuare l'imaging tridimensionale delle strutture di interesse presenti nelle cellule vive, è necessario che le strutture siano rilevabili pur mantenendo le cellule nel loro stato fisiologico, senza che siano indotti effetti citotossici, soprattutto nel momento dell'acquisizione delle immagini.

Nell'articolo oggetto della discussione, grazie a questa tecnica e all'utilizzo di un microscopio confocale, sono state analizzate le strutture chiamate "gocce" formate dal fattore ICP4 e i compartimenti di replicazione virale permettendone la visualizzazione delle dinamiche spazio-temporali in tempo reale.

Attraverso questa tecnica è stato anche possibile generare il diagramma di fase di ICP4 nelle cellule vive. Le cellule Vero precedentemente trasfettate con diverse quantità di plasmidi che esprimono solo ICP4 o solo ICP27 (descritti precedentemente) sono state sottoposte a imaging 3D per capire quando si formassero dei condensati e quali dimensioni avessero in funzione delle concentrazioni di DNA plasmidico introdotto nelle cellule.

Infine, questa metodologia è stata utilizzata anche per rilevare la disgregazione dei condensati di ICP4 indotta dal trattamento con 1,6-esandiolo delle cellule trasfettate con il plasmide che contiene la sequenza di ICP4 e la proteina fluorescente gialla.

#### ***4. Trattamento con 1,6-esandiolo***

Il trattamento di cellule vive con l'alcol alifatico 1,6-esandiolo è un metodo usato per osservare le proprietà fisiche dei compartimenti privi di membrana, poiché permette di capire se questi compartimenti abbiano caratteristiche simili a quelle dei solidi o dei liquidi.

Questa tecnica si basa sul fatto che l'1,6-esandiolo riesce a dissolvere gli assemblaggi simili ai liquidi, sia *in vitro* che *in vivo*, mentre non riesce a dissolvere quelli con caratteristiche simili ai solidi.<sup>6</sup>

La funzione di questo alcol è quella di impedire la formazione della fase liquida interferendo tra le interazioni deboli tra proteine oppure tra proteine ed RNA coinvolti nella generazione di questa fase.

#### ***5. Recupero della fluorescenza dopo esperimenti di fotosbiancamento***

Il recupero di fluorescenza dopo il fotosbiancamento è una metodologia basata sulla microscopia per studiare le dinamiche delle molecole di interesse nelle cellule viventi.

Innanzitutto la molecola di interesse deve essere marcata con un fluoroforo e in seguito viene sbiancata in modo irreversibile attraverso un laser ad alta potenza.<sup>7</sup>

Il recupero della fluorescenza nel tempo all'interno della regione dove si collocava la molecola di interesse fornisce dettagli sulla dinamica di essa: la velocità di recupero della fluorescenza dipende dalla capacità di diffondere nell'ambiente in cui si colloca la molecola e del turnover di essa all'interno della cellula. Tale recupero può essere quantificato tracciando l'intensità della fluorescenza nel tempo in un intorno definito, prima, durante e dopo l'evento di sbiancamento. Ulteriori analisi matematiche, consentono quindi una valutazione dettagliata della dinamica di una molecola marcata con un fluoroforo all'interno delle cellule vive.<sup>7</sup>

Per valutare la mobilità della molecola di interesse, si può considerare il tempo impiegato dalla fluorescenza per raggiungere la metà della sua massima intensità di recupero. La velocità di recupero dipende, inoltre, dalla dimensione dei complessi molecolari considerati.

Gli esperimenti di recupero della fluorescenza dopo fotosbiancamento, possono essere condotti su microscopi confocali, come è stato eseguito nell'articolo oggetto della discussione per i compartimenti di replicazione virale, i compartimenti di replicazione dell'amplicone e le gocce generate da ICP4.

#### ***6. Deplezione di ATP***

Attraverso il kit commerciale CellTiter-Glo si può determinare il numero di cellule vitali presenti in coltura basandosi sulla quantità di ATP presente, indicatore delle cellule metabolicamente attive. Il reagente viene aggiunto alla coltura di cellule,

senza la necessità di essere rimosso e genera un segnale luminoso direttamente proporzionale alla quantità di ATP presente nella coltura, rilevabile con un luminometro.

Questa tecnica si basa sulle proprietà di una luciferasi termostabile, enzima che, in presenza di ioni magnesio, ossigeno molecolare e ATP, comporta l'ossidazione della luciferina liberando energia luminosa.

I reagenti presenti nel kit contengono sia luciferina, che l'enzima luciferasi e permettono di svolgere questo saggio in diverse condizioni.

Nell'articolo oggetto della discussione, l'ATP non veniva considerato un indicatore di vitalità cellulare, ma piuttosto un fattore che promuove la fluidità, perciò la sua riduzione nelle cellule, indotta grazie all'inibitore dell'ATP sintasi Oligomicina A, ne modificava la fluidità, in particolare dei condensati separati di fase.

La concentrazione ottimale di oligomicina A è stata determinata empiricamente, testando a diverse concentrazioni di Oligomicina A, quale fosse la diminuzione di ATP.

## **7. Western Blot**

Il principio del Western Blot si basa sull'identificazione di una determinata proteina presente all'interno di una miscela di proteine separate precedentemente attraverso un'elettroforesi in gel e poi immobilizzate su una membrana.

L'elettroforesi su gel permette la separazione delle proteine in base al loro peso molecolare, alla loro carica e alla loro struttura tridimensionale; tuttavia alla fine sono separate principalmente sulla base del loro peso molecolare, poiché l'elettroforesi viene effettuata su gel di poliacrilammide, che ha proprietà denaturanti, inoltre il gel contiene il sodio dodecil solfato, che conferisce alle proteine una carica negativa, permettendo di migrare più velocemente alle proteine con pesi molecolari inferiori dal polo negativo al polo positivo.

Conclusa la corsa elettroforetica, le proteine devono essere trasferite su una membrana (che solitamente è costituita da nitrocellulosa o da PVDF) per renderle accessibili alle fasi successive: il gel viene posto tra fogli assorbenti imbevuti in un buffer, che favorisce il trasferimento delle proteine, una membrana e altri fogli imbevuti di buffer, poi viene introdotto in uno strumento che genera un campo elettrico perpendicolare al gel, permettendo alle proteine di spostarsi sulla membrana.

Per individuare la proteina di interesse, è necessario favorire il riconoscimento tra questa e l'anticorpo specifico, tuttavia si deve prima agire bloccando eventuali siti aspecifici di legame: si procede quindi saturando la membrana con soluzioni proteiche, come l'albumina di siero bovino (BSA).

Dopo aver subito dei lavaggi, le proteine vengono messe in contatto con l'anticorpo primario, in grado di riconoscere in modo specifico la proteina di interesse e dopo un periodo di incubazione, seguito da opportuni lavaggi, la membrana viene incubata con l'anticorpo secondario, il quale ha la funzione di legarsi all'anticorpo primario e di amplificare il segnale generato da quest'ultimo, dato che l'anticorpo secondario è marcato con una molecola che ne permette la rilevazione e più anticorpi secondari possono legare un anticorpo primario.

## APPROCCIO SPERIMENTALE E RISULTATI

### *1. Proteine di HSV-1 che formano condensati nucleari*

Attraverso l'utilizzo di una piattaforma disponibile online, è stata valutata la percentuale complessiva di disordine di 71 proteine di HSV-1, e i valori sono stati confrontati con quelli noti generati da proteine intrinsecamente disordinate umane e virali che hanno rivelato la capacità di separare di fase nelle cellule. Da questa indagine, si è scoperto che tutte le proteine espresse dai geni immediatamente precoci di HSV-1 sono generalmente molto disordinate, perciò questa classe di proteine virali è stata presa in considerazione (Figura 1a dell'articolo in APPENDICE).

Al fine di restringere ulteriormente l'elenco, tra le proteine individuate si sono considerate quelle che fossero capaci di legare acidi nucleici, che si localizzassero nei compartimenti di replicazione virale e che fossero essenziali per la replicazione di HSV-1. Attraverso questi criteri, sono stati identificati due fattori virali che rendono possibile la generazione di separati di fase liquido-liquido: il principale fattore di trascrizione virale ICP4 e il fattore di processamento dell'RNA virale ICP27 (Figura 1a dell'articolo in APPENDICE). Entrambe le proteine sono essenziali per la replicazione del virus, possono legare gli acidi nucleici attraverso distinti motivi di binding del DNA o dell'RNA e comprendono grandi regioni intrinsecamente disordinate, che contengono amminoacidi aromatici altamente carichi in grado di guidare la separazione di fase liquido-liquido tramite la disposizione impilata degli anelli aromatici (Figura 1b dell'articolo in APPENDICE). Anche il fatto che le proteine ICP4 e ICP27 sono espresse già prima che avvenga la replicazione del DNA virale, rende queste molecole dei candidati ideali per la generazione dei compartimenti di replicazione virale.

Viene poi testata la capacità di ICP4 e ICP27 di indurre la formazione di condensati separati di fase nella cellula e in seguito viene valutato se questo processo dipende dalla concentrazione delle proteine, poiché è stato osservato che quando sono espressi in modo transiente in coltura cellulare, le proteine cellulari e virali intrinsecamente disordinate che guidano la formazione di separati di fase liquido-liquido sono inclini a de-miscelarsi e a formare condensati distinti in modo dipendente dalla concentrazione.

Le cellule Vero sono state trasfettate con una quantità bassa (0,01  $\mu\text{g}$ ) o alta (0,25  $\mu\text{g}$ ) di DNA plasmidico che esprime ICP4, che è N-terminalmente fuso con EYFP (pIE3-EYFICP4), o che esprime ICP27, C-terminalmente fuso a mCherry (mCherry2-ICP27). A 16 ore dopo la trasfezione, si è scoperto che ICP4 formava prevalentemente piccoli puntini distinti nel nucleo quando veniva utilizzata una bassa concentrazione di DNA plasmidico. Al contrario, quando un'elevata quantità di DNA plasmidico è stata trasfettata, la maggior parte delle cellule trasfettate ha mostrato condensati più grandi di ICP4, simili a gocce, nel nucleoplasma (Figura 1c dell'articolo in APPENDICE). Al fine di distinguere questi due pattern, sono stati definiti condensati ICP4 con un diametro di  $<1 \mu\text{m}$  come "punti" e condensati con un diametro di  $>1 \mu\text{m}$  come "gocce". ICP27, invece, non ha indotto la

formazione di alcun tipo di punti o strutture simili a gocce quando espresso da solo (Figura 1c dell'articolo in APPENDICE).

Dato che, all'inizio dell'infezione, ICP27 regola l'attività trascrizionale di ICP4 controllando il grado di fosforilazione di ICP4, è stato ipotizzato che possa svolgere un ruolo nella capacità di ICP4 di separarsi di fase, localizzandosi con le gocce di ICP4 nel nucleo attraverso i separati di fase indotti da ICP4. Per testare questa possibilità, le cellule Vero sono state trasfettate con entrambi i plasmidi e si è visto che ICP27 non co-localizzava con alcun punto o goccia indotti da ICP4 (Figura S1c dell'articolo in APPENDICE). Inoltre, la capacità di ICP4 di formare gocce non è stata alterata in presenza di ICP27, suggerendo che la separazione di fase di ICP4 è un processo indipendente da ICP27.

Il de-miscelamento dipendente dalla concentrazione è un segno distintivo delle proteine intrinsecamente disordinate e può essere dimostrato attraverso i diagrammi di fase *in vitro* e in colture cellulari. Per verificare se la separazione di fase di ICP4 segue le norme di un caratteristico diagramma di fase in coltura cellulare, le cellule Vero sono state trasfettate con diverse quantità di pIE3-EYFICP4 ed è stato valutato il numero di cellule trasfettate che mostrano punti o gocce di ICP4 o nessun pattern a 16 ore dopo l'infezione (Figura 1d dell'articolo in APPENDICE). Il numero di cellule che contengono gocce di ICP4 è cambiato a seconda della quantità di DNA plasmidico trasfettato, rappresentabile con una curva parabolica tipica per i diagrammi di fase delle proteine intrinsecamente disordinate che comportano la separazione di fase.

È stata eseguita un'analisi Western blot, che ha confermato i diversi livelli di proteina ICP4 nelle cellule trasfettate (Figura 1d dell'articolo in APPENDICE). Dopo l'interpolazione del diagramma di fase (Figura 1e dell'articolo in APPENDICE), è stato determinato che 0,112 µg di DNA plasmidico trasfettato ha determinato il maggior numero di cellule con gocce di ICP4 (Figura 1f dell'articolo in APPENDICE).

In conclusione, questi dati dimostrano che il fattore di trascrizione ICP4 di HSV-1 è una proteina virale intrinsecamente disordinata che può guidare la formazione di condensati nelle cellule trasfettate, probabilmente tramite la formazione di separati di fase liquido-liquido.

## ***2. Comportamento e dinamica dei condensati generati da ICP4***

Per avere una conferma dei risultati precedentemente ottenuti, si è voluto determinare se i condensati prodotti da ICP4 avessero proprietà simili ai liquidi attraverso l'indagine delle caratteristiche spazio-temporali come la fusione al contatto fisico, la crescita nel tempo o la forma sferica. Al fine di indagare queste caratteristiche, è stato eseguito l'imaging 3D di cellule vive utilizzando un microscopio a scansione laser confocale a disco rotante: le cellule Vero sono state trasfettate con pIE3-EYFICP4, colorate con Hoechst 33342 dopo 16 ore dall'infezione e sono state sottoposte a imaging 3D di cellule vive.

Gli impilamenti di tipo Z tra gli anelli aromatici sono stati catturati ogni 10 minuti per 3 ore (Figura 2a dell'articolo in APPENDICE). Durante il corso del tempo, le gocce più piccole di ICP4 tendevano a muoversi liberamente all'interno del nucleo e a subire la fusione, formando gocce più grandi.



A questo punto è stato testato l'effetto dell'1,6-esandiolo sui condensati di ICP4, poiché questo alcol alifatico interferisce con le deboli interazioni idrofobiche proteina-proteina e proteina-RNA e può dissolvere una varietà di condensati cellulari separati di fase: è stato scoperto che i condensati di fase indotti da ICP4 erano fortemente compromessi (Figura 2b dell'articolo in APPENDICE); rispetto al controllo non trattato, si è visto che i condensati hanno iniziato a dissolversi dopo 1 minuto di trattamento e sono quasi completamente scomparsi dopo 10 minuti.

Per valutare le dinamiche di diffusione di ICP4 nelle gocce (poiché un'altra proprietà caratteristica dei condensati separati di fase è la rapida cinetica di diffusione delle molecole presenti in essi), sono stati eseguiti esperimenti di recupero della fluorescenza dopo fotosbiancamento. La formazione di gocce di ICP4 è stata indotta trasfettando le cellule Vero con pIE3-EYFPICP4 ed effettuando l'analisi dopo 24 ore dall'infezione (figura 2c dell'articolo in APPENDICE) ed è stata riscontrata una rapida dinamica di diffusione di ICP4 nelle gocce: fino al 75% dell'intensità di fluorescenza normalizzata iniziale è stata ripristinata entro 3 minuti dal recupero con un tempo medio di recupero di 42,4 s (Figura 2d,e dell'articolo in APPENDICE).

Dato che l'ATP promuove la fluidità nei condensati separati di fase, si è voluto testare se la deplezione di ATP avrebbe avuto un impatto sulle dinamiche di diffusione di ICP4 nelle gocce. La deplezione di ATP cellulare altera le dinamiche di diffusione registrate negli esperimenti di recupero della fluorescenza dopo fotosbiancamento delle proteine intrinsecamente disordinate, perciò sono state indotte le gocce di ICP4 come riportato precedentemente e la deplezione di ATP è stata effettuata con l'inibitore dell'ATP-sintasi Oligomicina A per 30 minuti, seguita dall'analisi di recupero della fluorescenza dopo fotosbiancamento (Figura 2c–e dell'articolo in APPENDICE). Si nota che il recupero di fluorescenza di ICP4 nelle cellule scarse di ATP era significativamente diminuito e ha raggiunto un massimo di circa il 25% dell'intensità di fluorescenza normalizzata iniziale dopo 3 minuti e il tempo medio di recupero è aumentato a 84,01 s (Figura 2d,e dell'articolo in APPENDICE).

Complessivamente, questi risultati indicano che le gocce di ICP4 hanno proprietà simili a quelle dei liquidi, tipiche delle proteine che possono subire separazione di fase liquido-liquido.

### ***3. I domini proteici di ICP4 che guidano la formazione dei condensati***

Dato che le regioni intrinsecamente disordinate e i domini di legame con gli acidi nucleici possono controllare il comportamento simile ai liquidi delle macromolecole cellulari, si sono voluti identificare i domini proteici che guidano la formazione di condensati ICP4.

È stato quindi verificato se i domini di binding del DNA di ICP4 DBD, CTA o NTA fossero necessari per la formazione di questi condensati nelle cellule trasfettate.

Innanzitutto sono stati generati un insieme di costrutti mutanti partendo dal plasmide pIE3-EYFPICP4: privi dell'NTA (EYFP-ICP4 $\Delta$ NTA), oppure dell'NTA e del DBD (EYFP-ICP4 $\Delta$ NTA $\Delta$ DBD), o del CTA e del DBD (EYFP-ICP4-NTAnls) (Figura 3a dell'articolo in APPENDICE). Le cellule Vero sono state trasfettate con questi costrutti ed è stato osservato il comportamento di fase di

queste proteine mutanti (Figura 3b,c dell'articolo in APPENDICE). In primo luogo, è stato eseguito un confronto tra le cellule che sono state trasfettate con una quantità di DNA plasmidico bassa (0,01 µg) o alta (0,15 µg) utilizzando il microscopio confocale laser a scansione, trovando che nessun costrutto mutante ha formato alcun tipo di punti o gocce nelle cellule trasfettate con una bassa quantità di DNA plasmidico, ad eccezione di EYFP-ICP4ΔNTA, che sporadicamente formava un piccolo numero di punti in alcuni nuclei (Figura 3b dell'articolo in appendice).

Nelle cellule trasfettate con un'elevata quantità di DNA plasmidico, è stato invece osservato un gran numero di punti per EYFP-ICP4ΔNTA, ma nessuna goccia; mentre nelle cellule trasfettate con EYFP-ICP4ΔNTAΔDBD, sono state rilevate grandi gocce in più della metà delle cellule trasfettate, ma nessun punto.

La proteina EYFP-ICP4-NTAnls non ha formato punti o gocce in entrambe le condizioni di trasfezione.

Poiché la condensazione della proteina EYFP-ICP4 è dose-dipendente e segue le norme dei tipici diagrammi di fase delle proteine intrinsecamente disordinate, è stato esaminato se il comportamento di fase dei costrutti mutanti sia anch'esso dose-dipendente. A questo scopo, è stato valutato il numero di nuclei che mostrano punti, gocce o nessun pattern, per ciascun costrutto in cellule trasfettate con diverse quantità di DNA plasmidico (Figura 3c dell'articolo in APPENDICE).

Si riscontra che EYFP-ICP4ΔNTA non forma gocce in nessuna condizione di trasfezione, ma il numero di cellule trasfettate che presentavano punti aumentava proporzionalmente alla quantità di DNA plasmidico che veniva trasfettata, mentre il numero di cellule senza pattern diminuiva di conseguenza.

EYFP-ICP4ΔNTAΔDBD forma esclusivamente gocce e il numero di cellule che presentavano queste gocce aumentava all'aumentare della quantità di DNA plasmidico trasfettato.

Al contrario, né punti né gocce sono stati trovati nella trasfezione con il costrutto EYFP-ICP4-NTAnls.

Il plasmide pIE3-EYFP che esprime EYFP da solo è stato utilizzato come controllo negativo (Figura 3b,c dell'articolo in APPENDICE).

Al fine di controllare i livelli di espressione proteica dei diversi costrutti, è stata condotta un'analisi Western blot delle cellule trasfettate con diverse quantità di DNA plasmidico (Figura 3c dell'articolo in APPENDICE) e come previsto, tutti i costrutti hanno mostrato un gradiente comparabile di proteine rilevate in accordo con la quantità di DNA plasmidico trasfettato.

Questi risultati dimostrano che NTA svolge un ruolo fondamentale nel controllo delle caratteristiche dei condensati di ICP4 ma non guida la formazione dei condensati di per sé, mentre CTA o la regione del linker tra CTA e DBD sono probabilmente i principali driver che portano alla condensazione di ICP4. Analogamente ad NTA, DBD è molto probabilmente coinvolto nel controllo della condensazione proteica.

#### ***4. ICP4 mantiene le sue proprietà nei compartimenti di replicazione***

A questo punto si rende necessario verificare se ICP4 esibisca le sue proprietà simili ai liquidi anche all'interno dei compartimenti di replicazione di HSV-1. Per valutare

la cinetica di diffusione di ICP4, considerando che la rapida cinetica di diffusione è una delle proprietà simili ai liquidi, nei compartimenti di replicazione di HSV-1, sono stati svolti esperimenti di recupero della fluorescenza dopo fotosbiancamento in cellule Vero infettate da rHSV-EYFICP4, che è un virus ricombinante derivante da HSV-1 che esprime ICP4 N-terminalmente fuso con EYFP (Figura 4a–d dell'articolo in APPENDICE). I compartimenti di replicazione risultanti nelle cellule infette possono essere facilmente identificati poiché, naturalmente, ICP4 si trova esclusivamente al loro interno e questa configurazione permette di misurare la diffusione di ICP4 direttamente dentro ai compartimenti di replicazione. La cinetica di ICP4 attraverso l'esperimento di recupero della fluorescenza dopo fotosbiancamento si mostra essere rapida e il recupero della fluorescenza era quasi completo entro 2-3 minuti (Figura 4a,c,d dell'articolo in APPENDICE).

Anche nei compartimenti di replicazione di HSV-1, la deplezione di ATP ha influenzato la dinamica di diffusione di ICP4, come dimostrato dal trattamento con oligomicina A e dall'analisi del recupero della fluorescenza dopo fotosbiancamento, che ha indicato una riduzione del 50% del recupero massimo e un aumento di due volte del tempo medio di recupero rispetto alle cellule non trattate (Figura 4d dell'articolo in APPENDICE).

Dato che ICP4 si lega al DNA di HSV-1 nei compartimenti di replicazione virale, è plausibile che la diffusione del DNA virale, piuttosto che ICP4 stesso, rappresenti la rapida cinetica di ICP4 negli esperimenti di recupero della fluorescenza dopo fotosbiancamento.

Per verificare se il DNA di HSV-1 è in grado di diffondersi liberamente all'interno dei compartimenti di replicazione virale, viene utilizzato un sistema di ampliconi di HSV-1, che consente la marcatura fluorescente del DNA virale e, quindi, dei corrispondenti compartimenti di replicazione virale nelle cellule vive. Le cellule Vero sono state trasfettate con pHSV-TetO, un plasmide amplicone che comprende sia l'origine di replicazione del DNA di HSV-1 (oriS) che una cassetta comprendente una serie di 35 sequenze di operone tetraciclina disposte sequenzialmente (TetO). Insieme all'amplicone di HSV-1, è stato co-trasfettato pSV2-TetR-EYFP, un plasmide che esprime il repressore della tetraciclina (TetR) fuso con EYFP. A 16 ore dopo queste operazioni, le cellule trasfettate sono state infettate con HSV-1 wild-type al fine di fornire le proteine virali necessarie per la replicazione del DNA, dipendente da oriS.

Nelle cellule che sono state trasfettate e infettate con successo, la replicazione del plasmide amplicone di HSV-1 ha portato alla formazione di compartimenti di replicazione dell'amplicone, visualizzati dalla proteina di fusione TetR-EYFP (Figura 4b dell'articolo in APPENDICE).

Vengono effettuati quindi esperimenti di recupero della fluorescenza dopo fotosbiancamento nei compartimenti di replicazione dell'amplicone, in modo da stimare la cinetica di diffusione del DNA dell'amplicone all'interno di questi compartimenti. Il recupero della fluorescenza dell'area sbiancata all'interno dei compartimenti di replicazione dell'amplicone è stato molto più lento rispetto alle dinamiche di recupero di ICP4 nei compartimenti di replicazione virale precedentemente analizzati, il tempo medio di recupero della fluorescenza è stato significativamente prolungato (Figura 3b–d dell'articolo in APPENDICE).

Questi risultati sostengono la possibilità che i compartimenti di replicazione di HSV-1 abbiano proprietà di condensati separati di fase. Per confermare questa ipotesi, viene effettuato l'imaging 3D di cellule vive per valutare le tre proprietà distinte dei condensati separati di fase: la capacità di fondersi al contatto, di crescere nel tempo e di mantenere una forma sferica. Le cellule Vero sono state infettate con rHSV-EYFPICP4 e sottoposte a imaging 3D di cellule vive 6 ore dopo l'infezione (Figura 4 dell'articolo in APPENDICE). Le cellule infette sono state monitorate per 3 ore e gli impilamenti degli amminoacidi aromatici sono stati catturati ogni 10 minuti. I set di dati ottenuti sono stati elaborati (Figura 4e-g dell'articolo in APPENDICE). Attraverso l'imaging 3D di cellule vive è stato possibile visualizzare le dinamiche spazio-temporali dei compartimenti di replicazione di HSV-1 in tempo reale e quantificare le loro proprietà simili ai liquidi. È stato scoperto che questi compartimenti si muovevano liberamente nei nuclei e diventavano coalescenti quando posti a stretto contatto, confermando i risultati ottenuti in precedenza (Figura 4e dell'articolo in APPENDICE).

È stato notato anche che il numero di compartimenti di replicazione virale per nucleo è diminuito significativamente durante il corso dell'infezione (6-9 ore dopo l'infezione) mentre l'area dei singoli compartimenti è aumentata (Figura 4e-g dell'articolo in APPENDICE), suggerendo che i singoli compartimenti si siano fusi e abbiano formato inclusioni più grandi nel tempo.

Tuttavia, a differenza delle fabbriche di virus ad RNA, i compartimenti di replicazione di HSV-1 non hanno mantenuto una forma sferica dopo la fusione e la loro compattezza è notevolmente aumentata nel tempo (Figura 4g dell'articolo in APPENDICE).

Nel loro insieme, i dati di imaging 3D delle cellule vive delle cellule infette hanno rivelato che i compartimenti di replicazione virale di HSV-1 condividono proprietà spazio-temporali delle fabbriche virali e dei condensati cellulari, suggerendo che si creino per separazione di fase.

## DISCUSSIONE

Come descritto in precedenza, attraverso questa indagine, in particolare sulle proprietà molecolari del fattore di trascrizione virale ICP4, si è giunti alla conclusione che alcuni domini di questa proteina siano in grado di interagire con il DNA virale, ma anche che vi siano delle regioni di ICP4 in grado di guidare la condensazione, attraverso la separazione di fase liquido-liquido, dei compartimenti di replicazione virale.

Dai risultati ottenuti, si evince che queste strutture presentano alcune caratteristiche dei condensati separati di fase, ma non solo: si è visto che il genoma non diffonde liberamente, fungendo da impalcatura per la formazione dei compartimenti di replicazione virale, inoltre, ci sono state evidenze che la RNA-polimerasi cellulare non si diffonda con la stessa cinetica dei liquidi, anche se il suo dominio C-terminale può subire separazione di fase.<sup>8</sup>

Come conseguenza di questi fattori, sembra che ICP4 non sia l'unico responsabile della formazione e il mantenimento dei compartimenti di replicazione di HSV-1, ma aver individuato che questo fattore di trascrizione porti alla separazione di fase liquido-liquido è comunque molto importante per l'impatto che questo può avere a livello molecolare: attraverso ICP4 può essere studiato il fenomeno della condensazione in cellule vive ed è stato mostrato che HSV-1 è un buon modello per tali studi.

Inoltre, la maggior parte dei virus con genoma a DNA, formano compartimenti di replicazione nucleari nelle cellule infette tramite la separazione di fase liquido-liquido e lo studio di questa struttura può portare allo sviluppo di una efficace terapia antivirale: ad esempio è stata dimostrata l'efficacia di piccole molecole che riescono ad inibire la replicazione del virus *in vivo*, indurendo i compartimenti di replicazione virale.<sup>9</sup>

Recentemente, è stato osservato anche che i separati di fase liquido-liquido generati dal virus responsabile della malattia SARS-CoV-2 sono in grado di diminuire la risposta antivirale dell'organismo<sup>10</sup>, perciò ancora si rimarca l'importanza di considerare la formazione di condensati come un importante bersaglio per le terapie, portando allo sviluppo di farmaci ad ampio spettro, anche contro nuovi virus, prendendo di mira proteine fondamentali per la formazione di condensati e conservate in tutta la famiglia di una certa tipologia di virus.

Viene aperta quindi la possibilità di sviluppare terapie che abbiano come bersaglio i condensati, i quali non si formano solamente in seguito ad un'infezione virale, ma sono presenti anche in vari processi fisiologici come lo sviluppo embrionale, la risposta cellulare allo stress e l'aggregazione proteica patologica nelle malattie neurodegenerative e nel cancro: si potrà consentire la modulazione farmacologica di bersagli precedentemente non farmacologici.

In conclusione, questo studio ha contribuito alla comprensione di alcuni aspetti della natura dei compartimenti di replicazione virale, in particolar modo di HSV-1, tuttavia rimane ancora da chiarire se la separazione di fase causata da ICP4 sia l'unica forza trainante per la formazione e il mantenimento dei compartimenti di replicazione di HSV-1: indagare ulteriormente i meccanismi molecolari alla base di come si formano e si mantengono i compartimenti di replicazione virale all'interno

del nucleo, può portare ad una maggior comprensione dei processi di replicazione virale e riuscire ad intervenire evitando lo sviluppo di malattie.

## BIBLIOGRAFIA

1. de Castro IF, Volonté L, Risco C. Virus factories: biogenesis and structural design. *Cell Microbiol.* **2013** Jan;15(1):24-34.  
doi: 10.1111/cmi.12029. Epub 2012 Oct 4. PMID: 22978691; PMCID: PMC7162364.
2. Heinrich BS, Maliga Z, Stein DA, Hyman AA, Whelan SPJ. Phase Transitions Drive the Formation of Vesicular Stomatitis Virus Replication Compartments. *mBio.* **2018** Sep 4;9(5):e02290-17.  
doi: 10.1128/mBio.02290-17. PMID: 30181255; PMCID: PMC6123442.
3. Kobiler O, Weitzman MD. Herpes simplex virus replication compartments: From naked release to recombining together. *PLoS Pathog.* **2019** Jun 3;15(6):e1007714.  
doi: 10.1371/journal.ppat.1007714. PMID: 31158262; PMCID: PMC6546242.
4. Rechenchoski DZ, Faccin-Galhardi LC, Linhares REC, Nozawa C. Herpesvirus: an underestimated virus. *Folia Microbiol (Praha).* **2017** Mar;62(2):151-156.  
doi: 10.1007/s12223-016-0482-7. Epub 2016 Nov 17. Erratum in: *Folia Microbiol (Praha).* 2017 Jul 28;: PMID: 27858281.
5. Frasson, I., Soldà, P., Nadai, M. *et al.* Parallel G-quadruplexes recruit the HSV-1 transcription factor ICP4 to promote viral transcription in herpes virus-infected human cells. *Commun Biol* 4, 510 (2021).  
<https://doi.org/10.1038/s42003-021-02035-y>
6. Kroschwald S., Maharana S., Simon A. Hexanediol: A chemical probe to investigate the material properties of membrane-less compartments. *Matters.* **2017**;3:10.  
doi: 10.19185/matters.201702000010.
7. Carisey A, Stroud M, Tsang R, Ballestrem C. Fluorescence recovery after photobleaching. *Methods Mol Biol.* **2011**;769:387-402.  
doi: 10.1007/978-1-61779-207-6\_26. PMID: 21748690.
8. Guo YE, Manteiga JC, Henninger JE, Sabari BR, Dall'Agnese A, Hannett NM, Spille JH, Afeyan LK, Zamudio AV, Shrinivas K, Abraham BJ, Boija A, Decker TM, Rimel JK, Fant CB, Lee TI, Cisse II, Sharp PA, Taatjes DJ, Young RA. Pol II phosphorylation regulates a switch between transcriptional and splicing condensates. *Nature.* **2019** Aug;572(7770):543-548.  
doi: 10.1038/s41586-019-1464-0. Epub 2019 Aug 7. PMID: 31391587; PMCID: PMC6706314.
9. Risso-Ballester, J., Galloux, M., Cao, J. *et al.* A condensate-hardening drug blocks RSV replication in vivo. *Nature* 595, 596–599 (2021).  
<https://doi.org/10.1038/s41586-021-03703-z>
10. Wang, S., Dai, T., Qin, Z. *et al.* Targeting liquid–liquid phase separation of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein promotes innate antiviral immunity by elevating MAVS activity. *Nat Cell Biol* 23, 718–732 (2021).  
<https://doi.org/10.1038/s41556-021-00710-0>





## APPENDICE

Di seguito viene allegato l'articolo oggetto della precedente discussione.

Michael Seyffert, Fanny Georgi, Kurt Tobler, Laurent Bourqui, Michela Anfossi, Kevin Michaelsen, Bernd Vogt, Urs F Greber, Cornel Fraefel. The HSV-1 Transcription Factor ICP4 Confers Liquid-Like Properties to Viral Replication Compartments. *Int J Mol Sci.* **2021** Apr 24;22(9):4447.  
doi: 10.3390/ijms22094447. PMID: 33923223; PMCID: PMC8123221





Article

# The HSV-1 Transcription Factor ICP4 Confers Liquid-Like Properties to Viral Replication Compartments

Michael Seyffert <sup>1,\*</sup>, Fanny Georgi <sup>2</sup>, Kurt Tobler <sup>1</sup>, Laurent Bourqui <sup>3</sup>, Michela Anfossi <sup>1,4</sup>, Kevin Michaelsen <sup>1</sup>, Bernd Vogt <sup>1</sup>, Urs F. Greber <sup>2</sup> and Cornel Fraefel <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Virology, University of Zurich, CH-8057 Zurich, Switzerland; kurt.tobler@uzh.ch (K.T.); michela.anfossi@edu.unito.it (M.A.); kevin.michaelsen@uzh.ch (K.M.); bernd.vogt@uzh.ch (B.V.); cornel.fraefel@uzh.ch (C.F.)

<sup>2</sup> Department of Molecular Life Sciences, University of Zurich, CH-8057 Zurich, Switzerland; fanny.georgi@uzh.ch (F.G.); urs.greber@uzh.ch (U.F.G.)

<sup>3</sup> Institute of Anatomy, University of Zurich, CH-8057 Zurich, Switzerland; laurent.bourqui@anatomy.uzh.ch

<sup>4</sup> Molecular, Cellular and Developmental Biology (MCD), Center for Integrative Biology (CBI), University of Toulouse, National Center for Scientific Research (CNRS), 31055 Toulouse, France

\* Correspondence: michael.seyffert@uzh.ch; Tel.: +41-44-635-8708

**Abstract:** Herpes Simplex Virus Type-1 (HSV-1) forms progeny in the nucleus within distinct membrane-less inclusions, the viral replication compartments (VRCs), where viral gene expression, DNA replication, and packaging occur. The way in which the VRCs maintain spatial integrity remains unresolved. Here, we demonstrate that the essential viral transcription factor ICP4 is an intrinsically disordered protein (IDP) capable of driving protein condensation and liquid–liquid phase separation (LLPS) in transfected cells. Particularly, ICP4 forms nuclear liquid-like condensates in a dose- and time-dependent manner. Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) assays revealed rapid exchange rates of EYFP-ICP4 between phase-separated condensates and the surroundings, akin to other viral IDPs that drive LLPS. Likewise, HSV-1 VRCs revealed by EYFP-tagged ICP4 retained their liquid-like nature, suggesting that they are phase-separated condensates. Individual VRCs homotypically fused when reaching close proximity and grew over the course of infection. Together, the results of this study demonstrate that the HSV-1 transcription factor ICP4 has characteristics of a viral IDP, forms condensates in the cell nucleus by LLPS, and can be used as a proxy for HSV-1 VRCs with characteristics of liquid–liquid phase-separated condensates.

**Keywords:** Herpes Simplex Virus Type-1; viral transcription factor; ICP4; intrinsically disordered proteins; liquid–liquid phase separation; viral replication compartments



**Citation:** Seyffert, M.; Georgi, F.; Tobler, K.; Bourqui, L.; Anfossi, M.; Michaelsen, K.; Vogt, B.; Greber, U.F.; Fraefel, C. The HSV-1 Transcription Factor ICP4 Confers Liquid-Like Properties to Viral Replication Compartments. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 4447. <https://doi.org/10.3390/ijms22094447>

Academic Editor: Russell J. Diefenbach

Received: 3 March 2021

Accepted: 22 April 2021

Published: 24 April 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Replication of DNA viruses, such as herpesvirus, parvovirus, papillomavirus, or adenovirus, occurs in distinct inclusions within the nucleus. These inclusions are called viral replication compartments (VRCs) and constitute membrane-less, spherical domains where viral transcription, viral DNA (vDNA) replication, virion assembly, and genome packaging occur (reviewed in [1–4]).

Differently from DNA viruses, most RNA viruses replicate in the cytoplasm of susceptible cells, where they form membrane-bound or membrane-less viral assemblies. Such membrane-less viral compartments in the cytoplasm are called viral factories or viroplasm and, similarly to DNA viruses, constitute distinct domains where genome replication and packaging occur (reviewed in [5]). Recently, two independent studies reported that the viral factories of vesicular stomatitis virus (VSV) and rabies virus (RabV) share biophysical properties of liquid–liquid phase-separated condensates in the cell, and have liquid-like characteristics, such as fusion upon close contact or rapid growth over time [6,7]. Furthermore, several viral factors that directly or indirectly account for the liquid-like nature of

these viral factories were identified. Apparently, the formation of VSV factories is driven by the condensation of the viral phosphoprotein (P) together with the nucleocapsid protein (N) and the multifunctional large protein (L) via liquid–liquid phase separation (LLPS) [6]. RabV factories, on the other hand, are formed by the N and P proteins alone [7]. Importantly, the P proteins of both viruses comprise large intrinsically disordered regions (IDRs) capable of establishing weak hydrophobic interactions with other IDRs and RNA. It was demonstrated that this characteristic feature of intrinsically disordered proteins (IDPs) is a major driver of LLPS and the subsequent condensation of macromolecules in the cell [8,9]. In addition, RNA-binding proteins harboring classical RNA-binding motifs, such as the K homology (KH) or RNA recognition motif (RRM) domains, play an important role in the formation and maintenance of phase-separated condensates [10]. In fact, VSV N and L proteins can bind RNA through RNA-binding domains and hence may contribute to the formation of phase-separated viral factories by recruiting cellular or viral RNA.

In accordance, it is tempting to speculate that nuclear VRCs of DNA viruses such as HSV-1 are phase-separated condensates as well [2,3,11]. Several characteristics of HSV-1 VRCs support this hypothesis, including their spherical shape early in infection, the capability to fuse upon physical contact, and the fact that many HSV-1 proteins are predicted to be highly disordered [12–15]. Here, we provide experimental data demonstrating that the HSV-1 transcription factor (TF) ICP4 is a viral IDP capable of driving protein condensation and that ICP4 confers its liquid-like properties to VRCs.

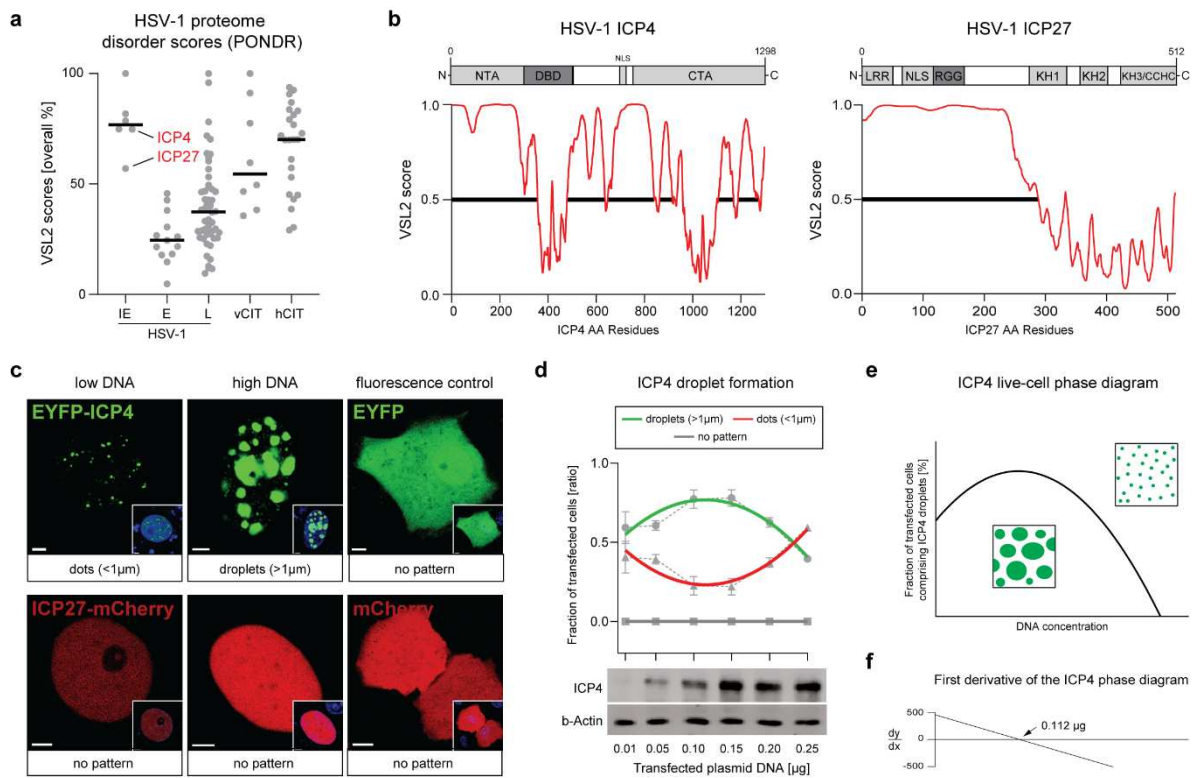
## 2. Results

### 2.1. The HSV-1 Transcription Factor ICP4 Is a Viral IDP That Drives the Formation of Nuclear Condensates

The formation and maintenance of liquid-like viral factories from RNA viruses in the cytoplasm is promoted by viral IDPs (vIDPs) that drive protein condensation via LLPS, such as the phosphoproteins (P) of RabV or VSV (Table S1) [6,7]. Thus, it is feasible that also DNA virus VRCs have liquid-like properties and that their formation and maintenance is driven by vIDPs that can phase-separate. In order to interrogate the liquid-like properties of HSV-1 VRCs, we sought to identify and characterize candidate vIDPs that can drive LLPS. Here, we used the VSL2 algorithm provided by the online platform PONDR to evaluate the overall percentage disorder of 71 HSV-1 proteins *in silico* and compared them with known viral and human IDPs that have been shown to phase-separate in cells (Figure 1a and Tables S1–S3). Confirming the previous findings of McSwiggen et al. [13], we found that all HSV-1 IE proteins are generally highly disordered, rendering this class of viral proteins ideal candidate vIDPs. In order to narrow down the list of candidate HSV-1 IDPs, we considered hallmarks of phase-separating vIDPs, including the capability to bind nucleic acids (DNA or RNA), the localization within VRCs, and the essentiality for virus replication (Table S2). Using these criteria, we identified two viral factors as potential drivers of LLPS: the major viral TF ICP4 and the viral RNA-processing factor ICP27 (Figure 1a,b and Table S2). Either protein is essential for virus replication, can bind nucleic acids through distinct DNA or RNA-binding motifs, and comprises large IDRs that include a compositional bias of highly charged aromatic amino acids (AAs) capable of driving LLPS via  $\pi$ - $\pi$  stacking (Figure 1b and Figure S1a,b). Because ICP4 and ICP27 proteins both localize in HSV-1 VRCs [16–18] and are expressed already before vDNA replication occurs [19,20], they are ideal candidate vIDPs.

When transiently expressed in cell culture, cellular and viral IDPs that drive LLPS are prone to spontaneously de-mix and form distinct condensates in a concentration-dependent manner. We tested the ability of ICP4 and ICP27 to induce the formation of phase-separated condensates in the cell and assessed whether this process is concentration-dependent. Vero cells were transfected with a low (0.01  $\mu$ g) or a high (0.25  $\mu$ g) amount of plasmid DNA expressing either ICP4, which is N-terminally fused to EYFP (pIE3-EYFICP4), or ICP27, which is C-terminally fused to mCherry (mCherry2-ICP27). We found that at 16 h post transfection (hpt), ICP4 predominantly formed small distinct puncta (dots) in the nucleus when a low concentration of plasmid DNA was used (Figure 1c). In contrast, when a high

amount of plasmid DNA was transfected, the majority of transfected cells exhibited larger ICP4 droplet-like condensates in the nucleoplasm (Figure 1c). In order to distinguish these two patterns in subsequent experiments, we determined ICP4 condensates with a diameter of  $<1\ \mu\text{m}$  as dots and condensates with a diameter of  $>1\ \mu\text{m}$  as droplets.



**Figure 1.** The HSV-1 transcription factor ICP4 is a viral IDP that drives the formation of nuclear condensates. **(a)** HSV-1 proteome screening for intrinsically disordered proteins (IDPs). A total of 71 HSV-1 proteins were screened for the presence of intrinsically disordered regions (IDRs) using the VSL2 algorithm from the online platform PONDR (see also Table S2). VSL2 scores of each protein are plotted as overall percentage disorder. The HSV-1 proteins are separated according to their kinetic expression profile: immediate-early (IE), early (E), and late (L) proteins. A selection of cited viral (vCIT) and human (hCIT) IDPs that phase-separate are shown as a reference (see also Tables S1 and S3). The two essential IE proteins, ICP4 and ICP27, are highlighted. Black bars represent the mean overall percentage VSL2 scores. **(b)** The VSL2 disorder score profiles of ICP4 and ICP27. The relevant protein domains of both proteins are shown above the corresponding VSL2 profiles. The IDRs are highlighted with horizontal black lines. Abbreviations: NTA, N-terminal activation domain; CTA, C-terminal activation domain; DBD, DNA-binding domain; NLS, nuclear localization signal; LRR, Leucine-rich region; RGG, Arg-Gly-Gly box; KH1/2/3, K-Homology domains 1/2/3; CCHC, Cys/Cys/His/Cys Zn-finger domain; **(c)** ICP4 but not ICP27 forms condensates in the nuclei of transfected cells. Vero cells were transfected with either pIE3-EYFICP4 or mCherry2-ICP27 using two different plasmid DNA concentrations: 0.01 (low DNA) and 0.15  $\mu\text{g}$  (high DNA). At 16 hpt, the cells were counterstained with Hoechst 33342 and processed for live cell imaging using a CLSM. Single z-scans of representative cell nuclei are shown. The plasmids expressing EYFP or mCherry (0.15  $\mu\text{g}$  each) were used as negative controls. Scale bars: 3  $\mu\text{m}$  (ICP4 and ICP27), 5  $\mu\text{m}$  (EYFP), and 10  $\mu\text{m}$  (mCherry); **(d)** The formation of ICP4 droplets is dose-dependent. Vero cells were transfected with different amounts of pIE3-EYFICP4 (0.01, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, and 0.25  $\mu\text{g}$ ). At 16 hpt, the fraction of cells comprising ICP4 droplets, dots, or no pattern was determined for each transfection (dashed grey line). The graph represents data from three independent experiments where 50–100 transfected cells were counted. Regression curves for each category (green, red, or grey lines) were evaluated using Prism (GraphPad). Western blot analysis was performed in order to confirm the different ICP4 protein levels in transfected cells. The EYFP-ICP4 fusion protein was detected with a monoclonal antibody against ICP4 (ICP4). The beta-actin protein levels served as a loading control (b-Actin); **(e)** The droplets regression curve from panel **(d)** was used to derive the complete ICP4 live-cell phase diagram. The region below the curve represents the conditions that favor de-mixing of ICP4 into droplets. **(f)** The first derivative of the ICP4 phase diagram revealed that the summit of the curve is defined at the DNA amount 0.112  $\mu\text{g}$ .

On the other hand, ICP27 did not induce the formation of any kind of dots or droplet-like structures when expressed alone (Figure 1c). Of note, early in infection, ICP27 regulates the transcriptional activity of ICP4 by controlling the degree of ICP4 phosphorylation, which may play a role in the ability of ICP4 to phase-separate [21]. Therefore, we hypothesized that ICP27 may co-localize with ICP4 droplets in the nucleus via ICP4-induced LLPS. To test this possibility, we co-transfected cells with both plasmids and found that ICP27 did not co-localize with any ICP4-induced dots or droplets (Figure S1c). Moreover, the ability of ICP4 to form droplets was not altered in the presence of ICP27, suggesting that ICP4 phase separation is a process independent of ICP27.

Concentration-dependent de-mixing is a hallmark of IDPs and can be demonstrated by phase diagrams *in vitro* and in cell cultures. To test whether ICP4 phase separation follows the norms of a characteristic phase diagram in cell culture, we transfected different amounts of pIE3-EYFICP4 into Vero cells and evaluated the number of transfected cells exhibiting ICP4 droplets, dots, or no patterns at 16 hpt (Figure 1d). The number of cells harboring ICP4 droplets changed depending on the amount of transfected plasmid DNA, resulting in a parabolic curve typical for phase diagrams of phase-separating IDPs. Western blot analysis confirmed the different ICP4 protein levels in transfected cells (Figure 1d, lower panel). Following interpolation of the phase diagram (Figure 1e), we determined that 0.112  $\mu\text{g}$  of transfected plasmid DNA resulted in the highest number of cells with ICP4 droplets when using our transfection setting, as seen in the plots representing the phase diagram and its first-order derivative (Figure 1f).

These data demonstrate that HSV-1 ICP4 is a vIDP that can drive the formation of condensates in transfected cells, possibly via LLPS. In order to confirm these results, we next aimed at determining whether ICP4 condensates have liquid-like properties.

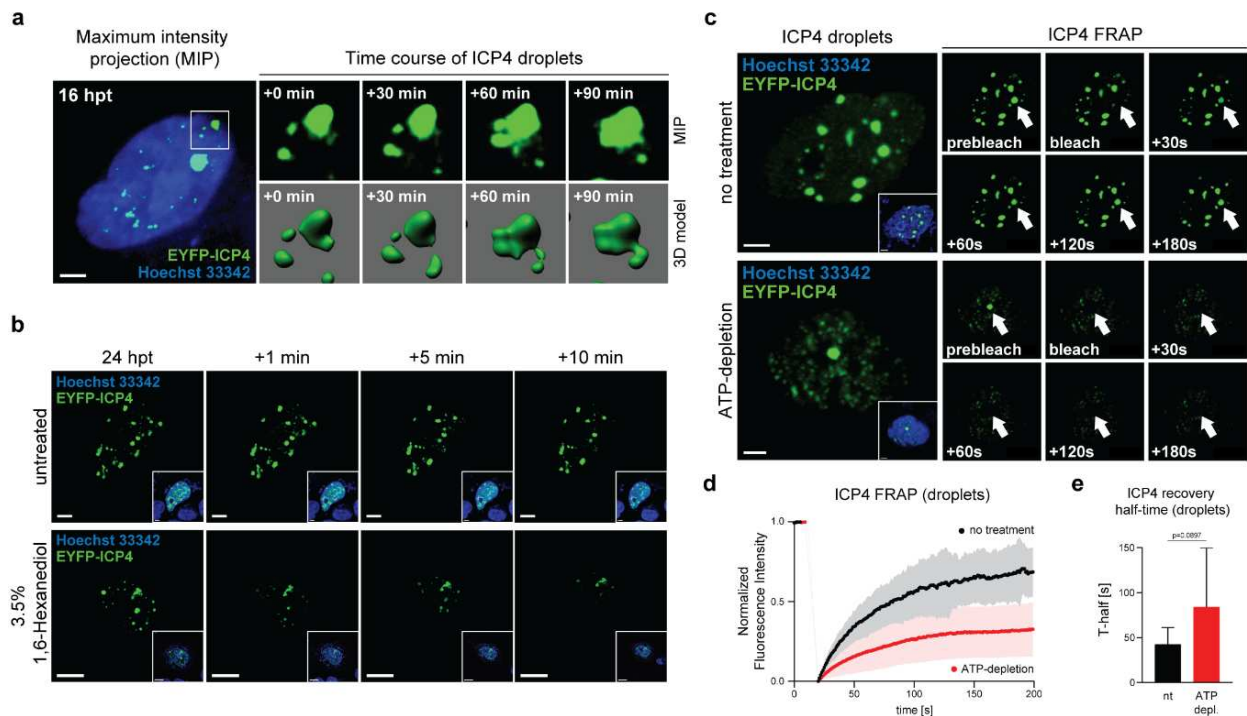
## 2.2. ICP4 Condensates Have Liquid-Like Properties

The properties of liquid-like condensates in the cell include spatio-temporal features, such as fusion upon physical contact, growth over time, or a spherical shape. In order to investigate the liquid-like behavior and the spatio-temporal dynamics of ICP4 condensates, we performed 3D live-cell imaging using a spinning-disc confocal laser scanning microscope (CLSM). Vero cells were transfected with pIE3-EYFICP4, stained with Hoechst 33342 at 16 hpt [22], and subjected to live-cell imaging. Z-stacks of the specimen were captured every 10 min for 3 h. Maximum-intensity projections (MIP) and the rendered 3D images of a representative nucleus displaying EYFP-ICP4 dots and droplets are shown in Figure 2a (see also Movies S1a,b). During the time course, smaller ICP4 droplets tended to freely move within the nucleus and undergo fusion, resulting in the formation of droplets.

The aliphatic alcohol 1,6-Hexanediol interferes with weak hydrophobic protein–protein and protein–RNA interactions and can dissolve a variety of cellular phase-separated condensates [23]. We tested the effect of 1,6-Hexanediol on EYFP-ICP4 condensates and found that they were heavily compromised (Figure 2b). Compared to the untreated control, ICP4 condensates started to dissolve after 1 min of treatment and almost completely disappeared after 10 min.

Another characteristic property of phase-separated condensates is the rapid diffusion kinetics of the phase-separated molecules. We used fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) experiments to assess the diffusion dynamics of ICP4 in ICP4-induced droplets established by transfecting pIE3-EYFICP4 and analyses at 24 hpt (Figure 2c–e and Movie S2). We found rapid ICP4 diffusion dynamics in ICP4 droplets where up to 75% of the initial normalized fluorescence intensity (NFI) was restored within 3 min of recovery at a mean recovery half-time (T-half) of 42.4 s (Figure 2d,e). We next tested whether ATP depletion had an impact on the ICP4 diffusion dynamics in ICP4 droplets. ATP acts a hydrotrope and promotes fluidity in phase-separated condensates. Depletion of cellular ATP alters the FRAP dynamics of phase-separating IDPs [24,25]. ICP4 droplets in Vero cells were established as described above and ATP depletion was accomplished with the ATP synthase inhibitor Oligomycin A for 30 min, followed by FRAP analysis (Figure 2c–e

and Movie S3). We found that the fluorescence recovery of ICP4 in ATP-depleted cells was significantly decreased and reached a maximum of approximately 25% NFI after 3 min and the average T-half was increased to 84.01 s (Figure 2d,e).



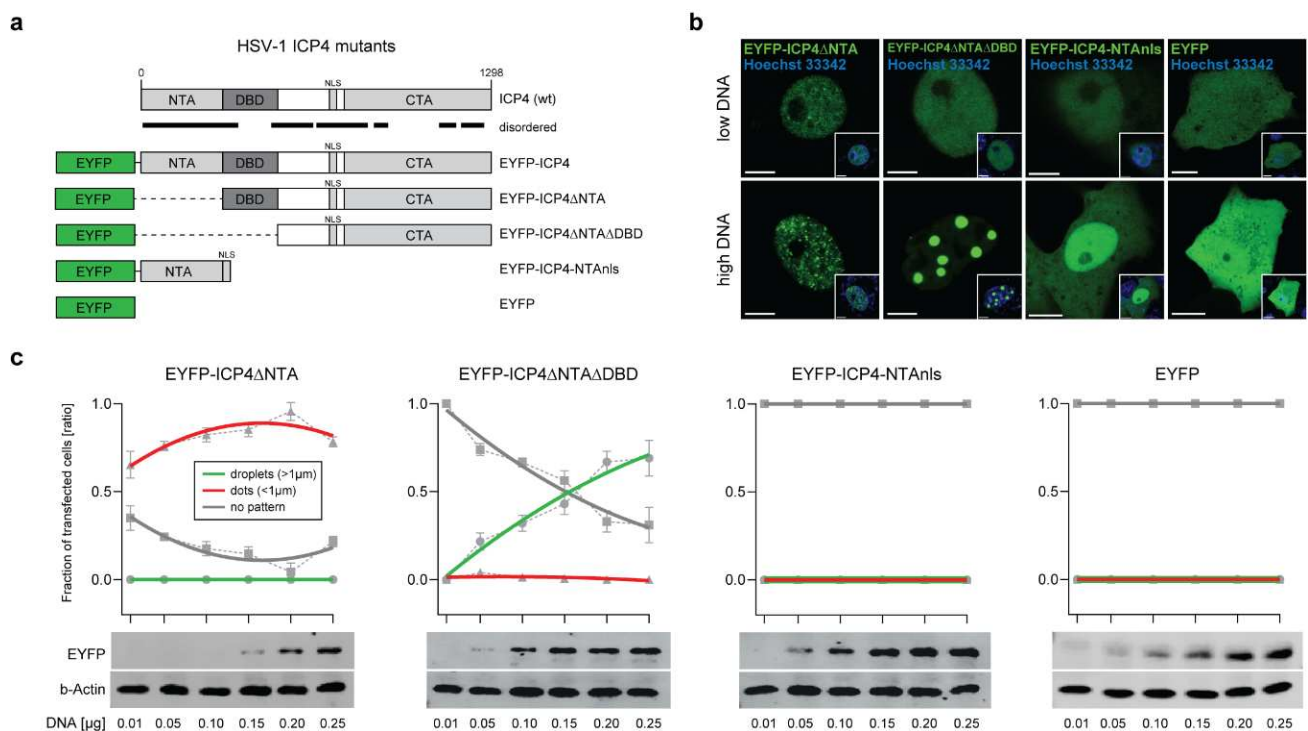
**Figure 2.** ICP4 condensates have liquid-like properties. (a) 3D live-cell imaging of ICP4 condensates. Vero cells were transfected with 0.3  $\mu\text{g}$  of pIE3-EYFPICP4. At 16 hpt, the cells were counterstained with Hoechst 33342 and monitored for 3 h using a spinning disk CLSM (see also Movies S1a,b). A representative cell nucleus displaying ICP4 droplets was selected for 3D modeling using the Imaris software (Bitplane). ICP4 droplet fusion events are indicated in maximum intensity projection (MIP) and rendered 3D images. Scale bar: 10  $\mu\text{m}$ . (b) ICP4 condensate integrity is compromised by 1,6-Hexanediol. Vero cells were transfected with 0.15  $\mu\text{g}$  of pIE3-EYFPICP4 and counterstained with Hoechst 33342 at 24 hpt followed by live-cell microscopy using CLSM. The cells were treated with 3.5% 1,6-Hexanediol and fluorescence images were taken at indicated times. Untreated cells were used as a negative control. Scale bars: 10  $\mu\text{m}$  (1,6-Hexanediol) and 3  $\mu\text{m}$  (untreated). (c) ICP4 droplets exhibit rapid FRAP kinetics. Vero cells were transfected with 0.15  $\mu\text{g}$  of pIE3-EYFPICP4 and counterstained with Hoechst 33342 at 24 hpt (inset images) followed by FRAP analysis using CLSM. A single ICP4 droplet was bleached (white arrow) and then monitored for 3 min capturing an image every second (see also Movie S2). ATP depletion was performed 2 h before the FRAP experiment (see also Movie S3). Scale bar: 5  $\mu\text{m}$ . (d) Quantification and analysis of FRAP experiments. For FRAP analysis, 6–12 individual ICP4 droplets were used. The raw FRAP data were normalized with easyFRAP and analyzed with Prism (GraphPad). The normalized fluorescence intensity is plotted over time (s). (e) ICP4 recovery half-times (T-half) were evaluated using the FRAP data from panel (2d) with easyFRAP. Bar plots represent mean values with standard deviations (SDs). Statistical significance was determined using a Welch's *t*-test.

Altogether, these results indicate that ICP4 droplets have liquid-like properties typical of proteins that can undergo LLPS.

### 2.3. The ICP4 NTA and DBD Control the Protein Phase Behavior

In order to better understand the liquid-like behavior of ICP4, we sought to identify the protein domains that drive the formation of ICP4 condensates. Protein IDRs and RNA- or DNA-binding domains can control the liquid-like behavior of macromolecules in the cell [10]. We tested whether the ICP4 DBD, the CTA, or the NTA were required for the formation of ICP4 droplets in transfected cells. A set of mutant pIE3-EYFPICP4 constructs were generated lacking either the NTA (EYFP-ICP4 $\Delta$ NTA), the NTA and the DBD (EYFP-ICP4 $\Delta$ NTA $\Delta$ DBD), or the CTA and the DBD (EYFP-ICP4-NTA $\Delta$ ns) (Figure 3a). We then

evaluated the phase behavior of these mutant EYFP-ICP4 proteins in transfected Vero cells (Figure 3b,c). First, we compared cells that were transfected with a low (0.01  $\mu\text{g}$ ) or a high (0.15  $\mu\text{g}$ ) plasmid DNA amount using CLSM. No mutant EYFP-ICP4 construct formed any kind of dots or droplets in cells transfected with a low amount of plasmid DNA, except EYFP-ICP4 $\Delta$ NTA, which sporadically formed a small number of dots in certain nuclei (Figure 3b). In cells transfected with a high amount of plasmid DNA, we observed a large number of dots for EYFP-ICP4 $\Delta$ NTA, but no droplets, whereas in cells transfected with EYFP-ICP4 $\Delta$ NTA $\Delta$ DBD, we found large droplets in more than half of transfected cells, but no dots. The EYFP-ICP4-NTAnls protein did not form any dots or droplets at either transfection condition.



**Figure 3.** The ICP4 NTA and DBD control the protein phase behavior. (a) Schematic representation of the mutant HSV-1 ICP4 constructs used in this study. The plasmid expressing EYFP-ICP4 was used as a positive control and the plasmid expressing EYFP alone was used as a negative control. Disordered regions are indicated with black lines. (b) Phase behavior of the mutant ICP4 constructs. Vero cells were transfected with either 0.01  $\mu\text{g}$  (low DNA) or 0.15  $\mu\text{g}$  (high DNA) plasmid DNA expressing the ICP4 constructs described in panel 3a. The cells were counterstained with Hoechst 33342 at 16 hpt (small inset) and subjected to live-cell imaging using CLSM. Representative images for each construct are shown. Scale bars: 5  $\mu\text{m}$  (EYFP-ICP4 constructs) and 10  $\mu\text{m}$  (EYFP). (c) Live-cell phase diagrams of the mutant ICP4 constructs. The generation of the protein phase diagrams was performed as described for the EYFP-ICP4 construct (see Figure 1d). The Western blot analysis to detect all mutant ICP4 constructs was performed using a monoclonal antibody against GFP (JL-8) that is capable of detecting EYFP (EYFP). The beta-actin protein levels served as a loading control (b-Actin).

Since EYFP-ICP4 protein condensation is dose-dependent and follows the norms of typical IDP phase diagrams, we examined whether the phase behavior of the mutant EYFP-ICP4 constructs is also dose-dependent. For this purpose, we evaluated the number of nuclei displaying either dots, droplets, or no particular EYFP-ICP4 features (no pattern) for each construct in cells transfected with different amounts of plasmid DNA (Figure 3c). We found that EYFP-ICP4 $\Delta$ NTA did not form droplets at any transfection condition, but the number of transfected cells with dots increased in proportion with the plasmid DNA amount that was transfected, while the number of cells with no pattern decreased accordingly. Interestingly, EYFP-ICP4 $\Delta$ NTA $\Delta$ DBD formed droplets exclusively and the number of cells with droplets continuously increased the more plasmid DNA was transfected, while



no cells displayed any dots. On the contrary, neither dots nor droplets were found in any transfection with the EYFP-ICP4-NTA<sub>n</sub>s construct. The plasmid pIE3-EYFP expressing EYFP alone was used as a negative control (Figure 3b,c). In order to control for the protein expression levels of the different constructs, we performed a Western blot analysis of cells transfected with different plasmid DNA amounts (Figure 3c, lower panels). As expected, all constructs showed a comparable gradient of detected proteins according to the amount of transfected plasmid DNA.

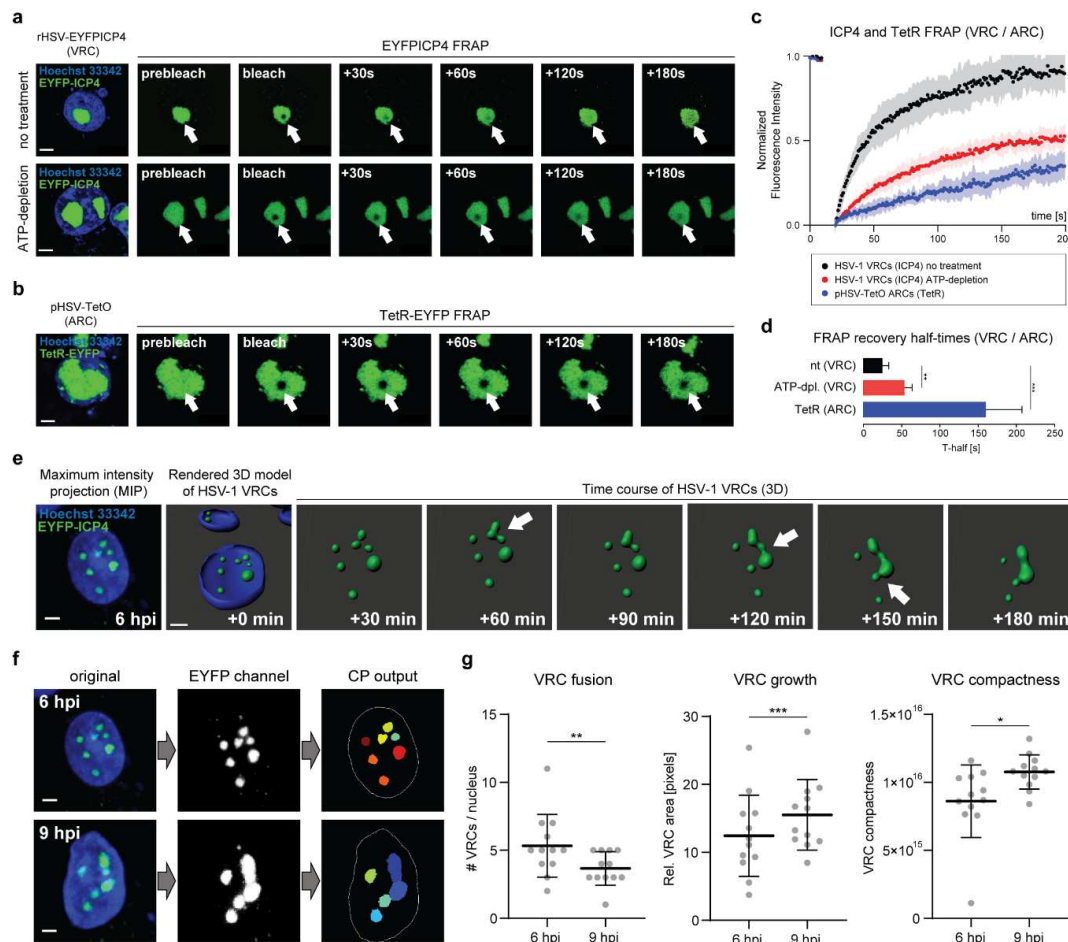
These results demonstrate that the NTA plays a pivotal role in controlling ICP4 condensate features but does not drive the formation of ICP4 condensates per se, whereas the CTA or the linker region between the CTA and the DBD possibly are the main drivers of ICP4 condensation. Similar to the NTA, the DBD is most likely involved in controlling protein condensation.

#### 2.4. ICP4 Retains Its Liquid-Like Properties in HSV-1 VRCs

We next tested whether ICP4 exhibits its liquid-like properties, such as the rapid diffusion dynamics, also within HSV-1 VRCs. To assess the ICP4 diffusion kinetics in HSV-1 VRCs, we performed FRAP experiments in Vero cells infected with rHSV-EYFP-ICP4, a recombinant HSV-1 expressing ICP4 N-terminally fused to EYFP (Figure 4a–d). The resulting VRCs in infected cells can be readily identified since, naturally, ICP4 is exclusively located in VRCs [26,27]. This setup allowed us to measure ICP4 diffusion directly in VRCs. We found that ICP4 FRAP kinetics were again rapid and fluorescence recovery was almost complete within 2–3 min (Figure 4a,c,d and Movie S4). ATP depletion also impacted the ICP4 diffusion dynamics in HSV-1 VRCs, as shown by Oligomycin A treatment and FRAP analysis, which indicated a 50% reduction in the maximum recovery and a two-fold increase in the mean T-half compared to untreated cells (Figure 4d).

Given the fact that ICP4 binds to the HSV-1 DNA in VRCs, it is plausible that the diffusion of the viral DNA rather than ICP4 itself accounts for the rapid ICP4 FRAP kinetics. Indeed, heterochromatin of eukaryotic cells is phase-separated from euchromatin by the heterochromatin protein 1 (HP1) via LLPS [28,29]. Similarly, the HSV-1 DNA might be phase-separated from cellular chromatin via LLPS, akin to heterochromatin. To test whether HSV-1 DNA is able to freely diffuse within VRCs, we utilized an HSV-1 amplicon system, which allows fluorescent labeling of the vDNA and, hence, the corresponding VRCs in live cells [30–32]. Vero cells were transfected with pHSV-TetO, an amplicon plasmid comprising both the HSV-1 origin of DNA replication (oriS) and a cassette comprising a series of 35 sequentially arranged tetracycline operon (TetO) sequences. Together with the HSV-1 amplicon, we co-transfected pSV2-TetR-EYFP, a plasmid expressing the tetracycline repressor (TetR) fused to EYFP. At 16 hpt, transfected cells were infected with wild-type (wt) HSV-1 in order to provide the viral proteins necessary for oriS-dependent DNA replication. In cells that were successfully transfected and infected, the replication of the HSV-1 amplicon DNA plasmid leads to the formation of amplicon replication compartments (ARCs) visualized by the TetR-EYFP fusion protein (Figure 4b). We then utilized these ARCs for FRAP experiments in order to estimate the diffusion kinetics of the amplicon DNA within ARCs. Interestingly, the fluorescence recovery of the bleached TetR-EYFP area within ARCs was much slower compared to the recovery dynamics of ICP4 in VRCs, reaching a maximum of approximately ~35% after 3 min, and the mean T-half was significantly prolonged (Figure 3b–d and Movie S6).

In summary, these results argue towards the possibility that HSV-1 VRCs have properties of phase-separated condensates.



**Figure 4.** ICP4 retains its liquid-like properties in HSV-1 VRCs. (a) ICP4 exhibits rapid diffusion kinetics within HSV-1 VRCs. Vero cells were infected with rHSV-EYFPICP4 at a multiplicity of infection (MOI) of 1. At 12 hpi, the cells were counterstained with Hoechst 33342 and processed for FRAP using CLSM (SP8 Falcon, Leica). A circular area of 1  $\mu\text{m}$  in diameter was bleached within the HSV-1 VRC using 10 iterations of 100% laser power. The bleached area was then monitored for 3 min and an image was captured every second (see also Movie S4). ATP depletion was performed at 10 hpi for 2 h and FRAP was performed as described above (see also Movie S5). Scale bars: 5  $\mu\text{m}$ . (b) FRAP kinetics of HSV-1 amplicon DNA within amplicon replication compartments (ARCs). Vero cells were transfected with 0.5  $\mu\text{g}$  of pHSV-TetO and 0.01  $\mu\text{g}$  of pSV2-EYFP-TetR. At 16 hpt, the cells were infected with wt HSV-1 at a MOI of 2. FRAP experiments were performed at 12 hpi and analyzed as described in panel (4a) (see also Movie S6). (c) Quantification of the FRAP experiments. For FRAP analysis, 6–12 individual VRCs were used. The raw FRAP data were normalized with easyFRAP and analyzed with Prism (GraphPad). The normalized fluorescence intensity is plotted over time (s). (d) ICP4 recovery half-times ( $T_{\text{half}}$ ) were evaluated with the FRAP data from panel (4c) using easyFRAP. Bar plots represent mean values with SDs. Statistical significance was determined using a Welch's *t*-test;  $p < 0.005$  (\*\*), and  $p < 0.0005$  (\*\*\*). (e) 3D live-cell imaging of Vero cells infected with rHSV-EYFPICP4 (MOI 1). At 6 hpi, the nuclei were counterstained with Hoechst 33342 and processed for live imaging with a spinning disk confocal laser scanning microscope (CLSM). Z-stacks of the specimen were taken every 10 min for 3 h. A representative z-stack of an infected nucleus at 6 hpi is shown as a maximum-intensity projection (MIP) (left) and used for time-course 3D imaging using the Imaris software (Bitplane). Fusion events during the course of infection are indicated with white arrows. Images were taken from Movie S7 every 30 min; Scale bar: 5  $\mu\text{m}$ . (f) Cell Profiler (CP) processing procedure for the quantification of the HSV-1 VRC phase behavior. MIP images of the representative cell nucleus from panel (4e) are shown as an example at 6 and 9 hpi. Scale bar: 5  $\mu\text{m}$ . (g) Quantification of the HSV-1 VRCs phase behavior. A total of 12 infected cell nuclei were processed using the customized CP pipeline from panel (f). The number of VRCs per nucleus, the relative VRC size, and compactness were assessed at 6 and 9 hpi for each candidate nucleus. Horizontal bars represent mean values with error bars showing SD values. Statistical significance was determined with a Welch's *t*-test;  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.005$  (\*\*), and  $p < 0.0005$  (\*\*\*).

To corroborate the hypothesis that HSV-1 VRCs are liquid–liquid phase-separated condensates, we used 3D live-cell imaging to assess three distinct properties of phase-separated condensates: the ability to fuse upon contact, to grow over time, and to maintain a spherical shape. Vero cells were infected with rHSV-EYFPICP4 and subjected to 3D live-cell imaging 6 h post infection (hpi) (Figure 4e). The infected cells were monitored for 3 h and z-stacks were captured every 10 min. The obtained datasets were processed for 3D re-modeling of representative VRCs and analyzed using Cell Profiler (Figure 4e–g). This 3D live-cell imaging setup allowed us to visualize the spatio-temporal dynamics of HSV-1 VRCs in real time and to quantify their liquid-like properties. We found that HSV-1 VRCs freely moved in the nuclei and coalesced upon close contact, confirming our previous findings (Figure 4e and Movie S7). The number of VRCs per nucleus significantly decreased during the course of infection (6–9 hpi) while the area of individual VRCs increased (Figure 4e–g). This suggests that individual VRCs merged (VRC fusion) and formed bigger inclusions (VRC growth) over time. However, unlike factories of RNA viruses, HSV-1 VRCs did not maintain a spherical shape after fusing and the compactness of VRCs markedly increased over time (Figure 4g).

Taken together, the 3D live-cell imaging data of infected cells revealed that HSV-1 VRCs share spatio-temporal properties of viral factories and cellular condensates, suggesting that they occur by phase separation.

### 3. Discussion

Compartments in cells can form by phase separation, as originally observed in *C. elegans* germline P granules by Brangwynne et al. [33]. The concept of LLPS has been extended to other organelles, such as the nucleolus, promyelocytic leukemia protein nuclear-bodies (PML NBs), stress granules (SGs), or Cajal bodies, to name a few (reviewed in [8,34–36]). Cell biological processes are driven by the de-mixing of macromolecules and nucleic acids at distinct sites, such as transcriptional hubs, splicing foci, or DNA repair loci [37–42]. Recently, it became clear that membrane-less viral factories in the cytoplasm that are formed by RNA viruses, such as VSV or RabV, share similarities with phase-separated compartments [6,7]. In particular, the spatio-temporal behavior of viral factories and the fact that they are formed by de-mixing of distinct vIDPs suggest that these assemblies are phase-separated condensates.

DNA viruses, including HSV-1, replicate in nuclear membrane-less VRCs with properties of viral factories and cellular condensates. It has been proposed recently in a handful of studies that HSV-1 VRCs might be phase-separated condensates as well [2,11] and that many HSV-1 proteins are vIDPs, such as the IE proteins (e.g., ICP4 or ICP27) and many L proteins (e.g., UL11) [13,43].

Here, we demonstrated that the essential viral TF ICP4 is a vIDP that can drive the formation of condensates in the nucleus via LLPS. Live-cell imaging and FRAP data indicated that ICP4 condensates share spatio-temporal properties with phase-separated condensates. Furthermore, we identified the ICP4 protein domains that drive LLPS (e.g., CTA) and also found that the NTA or the DBD control the liquid-like behavior of ICP4. Essentially, FRAP experiments showed that ICP4 retains its liquid-like nature also in HSV-1 VRCs, suggesting that they share this biophysical property with ICP4 condensates. A careful interrogation of the liquid-like characteristics of VRCs revealed that those membrane-less nuclear inclusions have many other liquid-like properties, such as the capability to fuse and grow over time. Our results corroborate the hypothesis that HSV-1 VRCs are liquid–liquid phase-separated condensates akin to viroplasm of RNA viruses.

Interestingly, evidence that fusion of HSV-1 VRCs might be an event that underlies liquid-like dynamics was reported almost ten years ago. Chang et al. found that HSV-1 VRCs freely move within the nucleus and coalesce particularly at nuclear speckles [12]. These membrane-less organelles (MLOs) are hubs for mRNA processing and, more importantly, they are phase-separated condensates (reviewed in [44,45]). Although convincing arguments from earlier studies and the results presented in this work together suggest

that HSV-1 VRCs are phase-separated condensates, the biophysical properties of these viral assemblies do not fully comply with the liquid-like nature of cellular condensates. First, HSV-1 VRCs do not relax into spherical inclusions after fusion (see Figure 4g). This observation is in accordance with previous studies that found that the genomic content does not freely diffuse among fusing VRCs but rather maintains the original territory also at the fusion site [11,15]. It has been demonstrated that small areas at such fusion sites are the locations where vDNA recombination occurs, a process that is very typical for herpesviruses and a driving force for viral evolution [15]. In this respect, we found that the genomic content of VRCs also did not follow typical liquid-like FRAP dynamics, suggesting that the DNA within VRCs and VRCs acts as a scaffolding molecule rather than a driver of LLPS (see Figure 4a–d). Second, McSwiggen et al. described that the motion dynamics of the cellular RNA polymerase II (RNA-PolII) within HSV-1 VRCs do not follow liquid-like diffusion kinetics and concluded that HSV-1 VRCs may not be phase-separated condensates [13]. However, given the possibility that the HSV-1 DNA acts as a spatial scaffold rather than a phase-separating molecule, and that the RNA-PolII C-terminal domain (CTD) can undergo phase separation [38], we suggest that HSV-1 VRCs are liquid-like condensates that are likely formed, at least in part, via LLPS. However, whether ICP4 phase separation is the only driving force for the formation and maintenance of HSV-1 VRCs remains to be investigated.

Co-activator and TF condensation is a process required for gene control and is driven by their intrinsically disordered activation domains [37]. The formation of phase-separated ICP4 droplets in transfected cells is likely driven by the CTA or the linker region between the CTA and the DBD, whereas the NTA and the DBD are likely involved in controlling the protein phase behavior (see Figure 3). It has been shown by Dremel et al. that early in infection, ICP4 can bind to well-defined consensus sequences present at certain transcriptional start sites (TSS) on the host cell genome, likely via its DBD [46]. This explains, on one hand, why we did not observe any dots in addition to droplets with the ICP4 construct that lacks the NTA and the DBD. On the other hand, it reveals why we did not find any dots or droplets with the ICP4 construct that lacks the CTA and the DBD as this construct lost both capabilities, DNA binding and phase separation.

The notion that HSV-1 VRCs likely are phase-separated condensates and that the viral TF ICP4 is an IDP driving LLPS may have an impact on biomedical and molecular applications. On one hand, ICP4 can be utilized to study TF condensation in live cells without altering cellular genes and cell homeostasis. In addition, HSV-1 VRCs provide an accessible model system to study the liquid-like nature of phase-separated condensates in live cells. Furthermore, the majority of DNA viruses, such as adenoviruses, parvoviruses, papillomaviruses, or polyomaviruses, form nuclear VRCs in infected cells and the concept of LLPS may apply for the VRCs of these viruses as well (reviewed in [1–4]). By further exploring the molecular mechanisms behind how phase-separated VRCs are formed and maintained within the nucleus, we may also better understand viral replication processes and diseases.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Cells and Viruses

African green monkey kidney cells (Vero, ATCC) were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Gibco, Fisher Scientific AG, Reinach, Switzerland, Cat. No. 31885-023) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, AMIMED, BioConcept, Allschwil, Switzerland, Cat. No. 2-01F30-I) and 1% Antibiotic–Antimycotic (Streptomycin, Amphotericin B, Penicillin), Gibco, Fisher Scientific AG, Reinach, Switzerland, Cat. No. 15240-062). The cells were kept at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> and passaged every 3–4 days at a confluency of <80% using 0.05% Trypsin–EDTA (Gibco, Fisher Scientific AG, Reinach, Switzerland, Cat. No. 25300-054). The recombinant HSV-1 expressing ICP4 which is N-terminally fused with the enhanced yellow fluorescent protein (rHSV-EYFPICP4) was a kind gift from Roger D. Everett and is described elsewhere [20]. The rHSV-EYFPICP4

and wt HSV-1 (F-strain) virus stocks were produced and titrated in Vero cells. Briefly, Vero cells were grown in a 75 cm<sup>2</sup> cell culture flask at a confluency of 90% and then infected with rHSV-EYFPICP4 or wt HSV-1 at a MOI of 0.01 in 10 mL DMEM with 0% FBS and 0% Antibiotic–Antimycotic. The cells were then incubated at 4 °C for 30 min to establish virus attachment, followed by an incubation at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> for 2 h. The infection medium was then replaced with DMEM supplemented with 2% FBS and 1% Antibiotic–Antimycotic and incubated at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> for 4–5 days until the cytopathic effect (CPE) reached >90%. The supernatant was then removed and stored at 4 °C while the cells were harvested, pelleted, and subjected to three freezing and thawing cycles. The cell pellet was combined with the previously harvested supernatant and the virus stock was centrifuged for 10 min at 1900× g and kept at 4 °C. The cleared lysate was aliquoted and stored at –80 °C. The virus stocks were titrated by plaque assay as described elsewhere [47,48].

#### 4.2. Plasmid and Amplicon Constructs

The plasmid expressing ICP4 that is N-terminally fused to EYFP (pIE3-EYFP-ICP4) was a kind gift from Roger D. Everett and is described elsewhere [20]. This plasmid was used to generate the EYFP control plasmid (pIE3-EYFP) expressing EYFP alone as follows: The ICP4 gene sequence was cut from the vector at the *Hind*III and *Kpn*I restriction sites and replaced with a duplex DNA oligomer (5'-gct caa gct tcg aat tct gca gtc gac taa cct cta gag gat ccc cgg gta ccg cgg-3') that was cut with *Hind*III and *Kpn*I. The same pIE3-EYFPICP4 plasmid was used to generate the EYFP-ICP4 mutant constructs pIE3-EYFP-ICP4ΔNTA, pIE3-EYFP-ICP4ΔNTAΔDBD, and pIE3-EYFP-ICP4-NTAnls. pIE3-EYFP-ICP4ΔNTA was cloned by cutting the NTA from the plasmid using *Eco*NI and *Xho*I restriction sites. The resulting gap in the plasmid was sealed by ligating a duplex DNA strand with corresponding restriction site overhangs (5'-ctc gag ctc aag ctt cga att ctg cag tcg aca tgc ccc tct ccg agg-3'). pIE3-EYFP-ICP4ΔNTAΔDBD was cloned by inserting the duplex DNA (5'-ctc gag ctc aag ctt cga att ctg cag tcg aca tgc aga agg gct tc-3') between the *Xho*I and *Xmn*I sites of pIE3-EYFP-ICP4. pIE3-EYFP-ICP4-NTAnls was generated by inserting the duplex DNA (5'-cct ctc cga ggc cgc gcc caa gcc ccg ggc ggc gag gac ccg gga ggg gcg caa gcg caa gag tta agg cgc ccc cgg agg gtt tgg atc ctc tag agg atc ccc ggg tac c-3') between the *Eco*NI and *Kpn*I sites of pIE3-EYFP-ICP4. All inserts were generated by annealing the corresponding ssDNA strands that were designed in order to have necessary restriction site overhangs already present. The ssDNA oligos were acquired from Microsynth (Balgach, Switzerland). The plasmid expressing ICP27 that is C-terminally fused to mCherry (mCherry2-ICP27) was a kind gift from Lucas Pelkmans and was constructed as follows: the ICP27 gene sequence was amplified from the plasmid pEBHICP27 [49] with the primers (5'-agc gaa ttc cgc cac cat ggc gac tga cat tga tat gct aat tg-3') and (5'-gct ggt acc cca aac agg gag ttg caa taa aaa tat ttg ccg-3') and the resulting ICP27 gene sequence was cloned between the *Eco*RI and *Kpn*I sites of mCherry2-N1 (Addgene Plasmid #54517). The plasmid pCI-mCherry expressing mCherry alone was a kind gift from Catherine Eichwald and is described elsewhere [50]. The TetO-TetR-based HSV-1 amplicon system that comprises the amplicon plasmid pHSV-TetO and the reporter plasmid pSV2-TetR-EYFP has been utilized in several studies in the past and is described elsewhere [30,31,51,52].

#### 4.3. 3D Live-Cell Imaging

For the imaging of EYFPICP4 droplets,  $1.5 \times 10^5$  Vero cells were seeded in a 2-well microslide with a 0.17 mm glass bottom ( $\mu$ -slide, 2 wells, ibidi, Vitaris AG, Baar, Switzerland, Cat.No. 80287) and incubated overnight. The next day, cells were transfected with 0.3  $\mu$ g of pIE3-EYFPICP4 or pIE3-EYFP using Lipofectamine<sup>TM</sup> LTX and PLUS<sup>TM</sup> reagents (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Zurich, Switzerland, Cat.No. 15338-100) according to the manufacturer's instructions. The next day, cell nuclei were counterstained with Hoechst 33342 and subjected to 3D live-cell imaging using a spinning disc confocal microscope (ImageXpress Micro Confocal (IXM-C), Molecular Devices, LLC., San Jose, CA, USA) equipped with a 40x objective (NA 0.95). For the imaging of rHSV-EYFPICP4 viral

replication compartments (VRCs),  $1.5 \times 10^5$  Vero cells were seeded in a 2-well microslide with a 0.17 mm glass bottom ( $\mu$ -slide, 2 wells, ibidi, Vitaris AG, Baar, Switzerland, Cat.No. 80287) and incubated overnight. The next day, cells were infected with rHSV-EYFPICP4 at a MOI of 1. At 6 hpi, the nuclei were counterstained with Hoechst 33342 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Zurich, Switzerland, Cat.No. H3570) according to the manufacturer's instructions. For live-cell imaging, the cell medium was replaced with 1 mL FluoroBrite DMEM (Gibco, Fisher Scientific AG, Reinach, Switzerland, Cat.No. A18967-01) supplemented with 2% FBS. For both transfection and infection experiments, the DAPI channel was acquired for Hoechst-stained nuclei and the GFP/FITC channel was acquired for the EYFPICP4 fusion proteins. Cells were imaged for 3 h and 50 z-stacks were acquired for the GFP/FITC channel at 10 min intervals, whereas only a single confocal image was acquired for the DAPI channel in order to reduce phototoxicity. At the beginning and the end of each live-cell imaging experiment, 50 z-stacks were taken for both channels (DAPI and GFP/FITC). The resulting datasets were used to calculate maximum-intensity projections (MIPs) of z-stacks and background-subtracted 3D reconstruction/rendering of nuclei and VRCs using Imaris v9.5 (Bitplane, Oxford Instruments, Bitplane AG, Zurich, Switzerland). Spatio-temporal analysis of VRCs was performed using customized Cell Profiler (v3.1.8) pipelines [53].

#### 4.4. ICP4 Live-Cell Phase Diagrams

The EYFP-ICP4 live-cell phase diagrams were generated using a confocal laser scanning microscope (SP8, Leica, Leica Microsystems, Heerbrugg, Switzerland) equipped with a 63x objective (NA 1.4). Briefly,  $1.2 \times 10^5$  Vero cells were seeded in a 24-well tissue culture plate with a 0.17 mm glass bottom (Cellvis, Mountain View, CA, USA, Cat.No. P24-1.5H-N) and incubated overnight. The next day, different amounts (0.01, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, or 0.25  $\mu$ g) of pIE3-EYFPICP4 or ICP27-mCherry constructs were transfected in biological triplicates using Lipofectamine™ LTX and PLUS™ reagents (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Zurich, Switzerland, Cat.No. 15338-100) as described above. The cells were counterstained with Hoechst 33342 and subjected to live-cell imaging at 16 hpt. Randomly, 50–100 transfected cell nuclei from each biological triplicate were counted and categorized according to their fluorescence pattern: dots, droplets, or no pattern, where dots were defined as puncta with a diameter of  $<1 \mu$ m and droplets with a diameter of  $>1 \mu$ m. The nuclei where at least one droplet was found were considered as positive for droplets. The resulting datasets for all constructs were plotted and used to calculate second-order polynomial regression curves. The ICP4 regression curve for droplets was interpolated into a live-cell phase diagram using Prism 9 (GraphPad, San Diego, CA, USA) with the following equation:

$$Q = 1973 \times [\text{DNA}]^2 + 455.2 \times [\text{DNA}] + 50.58$$

where Q is the fraction of transfected cells comprising ICP4 droplets, and [DNA] is the concentration of transfected DNA in  $\mu$ g.

Representative single z-scans were acquired from cells transfected with either EYFP-ICP4 or ICP27-mCherry constructs. The DAPI channel was acquired for Hoechst-stained nuclei, the EYFP channel was acquired for the EYFPICP4 fusion or EYFP proteins, and the mCherry channel was acquired for the ICP27mCherry fusion or mCherry proteins.

#### 4.5. 1,6-Hexanediol Treatment

ICP4 droplet formation was induced in Vero cells as described above (see Section 4.4. ICP4 Live-Cell Phase Diagrams). Briefly, 0.25  $\mu$ g of pIE3-EYFPICP4 plasmid DNA was transfected in Vero cells and at 24 hpt, the cells were counterstained with Hoechst 33342 and treated with 3.5% 1,6-Hexanediol (Merck, Schaffhausen, Switzerland, Cat.No. 8.04308.0100) in FluoroBrite DMEM (Gibco, Fisher Scientific AG, Reinach, Switzerland, Cat.No. A18967-01) supplemented with 2% FBS for 15 min. Fluorescence images of the blue (Hoechst 33342) and yellow (EYFP-ICP4) channels were acquired at indicated times using a SP8 CLSM (Leica,

Leica Microsystems, Heerbrugg, Switzerland) with a 63x objective (NA 1.4). The cells were kept at constant conditions of 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> throughout the experiment.

#### 4.6. FRAP Experiments

Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) experiments on rHSV-EYFPICP4 VRCs and pHSV-TetO amplicon replication compartments (ARCs) was performed on a SP8 CLSM (Leica, Leica Microsystems, Heerbrugg, Switzerland) with a 63x objective (NA 1.4). The FRAP experiments on EYFPICP4 droplets were performed using the SP8 Falcon CLSM (Leica, Leica Microsystems, Heerbrugg, Switzerland) equipped with a 63x objective (NA 1.4). The generation of rHSV-EYFPICP4 VRCs was achieved as described above. Briefly, Vero cells were infected with rHSV-EYFPICP4 at a MOI of 1, and at 12 hpi, the cells were counterstained with Hoechst 33342 and subjected to FRAP analysis. The generation of pHSV-TetO ARCs was achieved as follows:  $1.5 \times 10^5$  Vero cells were seeded in a 2-well microslide with a 0.17 mm glass bottom ( $\mu$ -slide, 2 wells, ibidi, Vitaris AG, Baar, Switzerland, Cat.No. 80287) and incubated overnight. The next day, 0.2  $\mu$ g of pHSV-TetO and 0.02  $\mu$ g of pSV2-TetREYFP were transfected using Lipofectamine™ LTX and PLUS™ reagents (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Zurich, Switzerland, Cat.No. 15338-100) as described above. At 16 hpt, the cells were infected with wt HSV-1 (F-strain) at a MOI of 2. The cells were screened for the development of ARCs starting at 12 hpi and were counterstained with Hoechst 33342 for FRAP analysis at approx. 20 hpi. EYFPICP4 droplets were generated by transfecting Vero cells with 0.15  $\mu$ g of pIE3-EYFPICP4 as described above and subjected to FRAP analysis at 24 hpt. All FRAP experiments were conducted in FluoroBrite DMEM (Gibco, Fisher Scientific AG, Reinach, Switzerland, Cat.No. A18967-01). FRAP experiments were performed using the FRAP function of the LasX software (Leica) as follows: a circular area of 1  $\mu$ m in diameter was bleached by applying 10 iterations with the 405 nm laser at 100% laser power. The fluorescent recovery was monitored by taking fluorescence images of the EYFP channel at a 1 s interval for 3 min. For each FRAP dataset, a circular area of 1  $\mu$ m was used as the fluorescent control and a squared area of  $5 \times 5 \mu$ m was chosen as background. The resulting FRAP datasets were analyzed using the easyFRAP-web interface [54]. Fully normalized data were used to generate FRAP diagrams and calculate recovery half-times (T-half) from 6–12 independent measurements. Representative images were taken and processed for each FRAP experiment using the Imaris software v9.5 (Bitplane, Oxford Instruments, Bitplane AG, Zurich, Switzerland). Fluorescent intensities of FRAP movies were normalized using a customized Fiji pipeline [55].

#### 4.7. ATP Depletion

Depletion of cellular ATP levels was accomplished by culturing the cells with glucose-free DMEM (Gibco, Fisher Scientific AG, Reinach, Switzerland, Cat.No. 11966-025) for 2 h followed by a treatment with 500 nM Oligomycin A (Tocris Bioscience, Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA, Cat.No. 4110) for 30 min. The optimal Oligomycin A concentration was determined empirically and tested using a commercially available ATP detection system (CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay, Promega, Dübendorf, Switzerland, Cat.No. G7570) according to the manufacturer's instructions.

#### 4.8. Western Blot Analysis

To confirm the molecular size and estimate the different expression levels of the mutant and wt EYFP-ICP4 constructs, a Western blot analysis was performed as follows: The day before infection,  $1.2 \times 10^5$  Vero cells/well were seeded in 24-well plates. Transfections were carried out as described for 3D live-cell imaging. At 24 hpi, the cells were washed with PBS and lysed in 100  $\mu$ L protein loading buffer (62 mM Tris base, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 5% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol, and 0.005% bromphenol blue). The resulting cell lysates were boiled for 10 min and stored at  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  for further analysis. A total of 20  $\mu$ L lysates per sample were separated in an 8% SDS–polyacrylamide gel and transferred to nitrocellulose membranes (Whatman, Fisher Scientific AG, Reinach, Switzerland). The

membranes were then blocked with 5% nonfat dry milk in PBS-T (PBS supplemented with 0.3% Tween 20) for 1 h at RT. Incubation with antibodies was carried out in PBS-T supplemented with 2.5% dry milk. The following primary antibodies were used: for the detection of EYFP-ICP4, we used the ms mAb to HSV-1 ICP4 (10F1) from Abcam (Cat.No. ab6514) at a dilution of 1:500. To detect the mutant EYFP-ICP4 constructs, we used the ms mAb to GFP (JL-8) from Clontech (Clontech, Takara Bio Europe SAS, Saint-Germain-en-Laye, France, Cat.No. 632380) at a concentration of 1:10,000, and finally, for b-Actin, we used the ms mAb to b-Actin from Sigma (Merck, Schaffhausen, Switzerland, Cat.No. A2228) at a concentration of 1:10,000. In order to detect the primary antibodies, we used the gt x ms IRDye 800CW antibody from Licor (LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg, Germany, Cat.No. 926-32210) at a concentration of 1:5000. The secondary antibodies were visualized using an Odyssey<sup>®</sup> Fc Imaging System from Licor (LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg, Germany).

#### 4.9. Prediction Algorithms

The total percentage disorder scores of each protein analyzed in this study was calculated using the various, short, and long 2 (VSL2) algorithm from the predictor of natural disordered regions (PONDR) platform (Molecular Kinetics, La Pas Trail, Indianapolis, IN, USA, [www.pondr.com](http://www.pondr.com) (accessed on October 1st 2020)). The net charge per residue (NCPR) scores/graphics were obtained from the online tool Classification of Intrinsically Disordered Ensemble Regions (CIDER, [56]). The pi–pi interaction prediction was performed using the python script from Vernon et al. [57]. All raw output data were processed with Prism 9 (GraphPad, San Diego, CA, USA).

#### 4.10. Statistical Analysis

Statistical significance was assessed for all datasets using an unpaired *t*-test with Welch's correction. All statistical analysis was performed using Prism 9 (GraphPad, San Diego, CA, USA).

**Supplementary Materials:** Supplementary materials can be found at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms22094447/s1>.

**Author Contributions:** Conceptualization, M.S. and C.F.; methodology, M.S., F.G., K.T., L.B., K.M., M.A. and B.V.; software, M.S., F.G., K.T. and K.M.; validation, M.S. and K.T.; formal analysis, M.S., K.T., L.B., K.M. and M.A.; investigation, M.S., F.G., K.T., L.B. and M.A.; resources, B.V., U.F.G. and C.F.; data curation, M.S., F.G., K.T., L.B. and M.A.; writing—original draft preparation, M.S.; final version of text by M.S., F.G., K.T., U.F.G. and C.F.; visualization, M.S.; supervision, U.F.G. and C.F.; project administration, M.S.; funding acquisition, M.S. and C.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the Swiss National Science Foundation (SNSF), grant number 310030\_184766/1, to C.F., and the Research Committee of the University of Zurich, grant number FK-18-062, to M.S., U.F.G. acknowledges support from the SNSF (31003A\_179256/1).

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to internet access restrictions of our data servers.

**Acknowledgments:** We would like to thank Roger Everett (University of Glasgow), Catherine Eichwald as well as Lucas Pelkmans, Maija Pietilä and Arpan Kumar Rai (University of Zurich) for providing reagents.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.



## References

1. Schmid, M.; Speiseder, T.; Dobner, T.; Gonzalez, R.A. DNA virus replication compartments. *J. Virol.* **2014**, *88*, 1404–1420. [[CrossRef](#)]
2. Charman, M.; Weitzman, M.D. Replication Compartments of DNA Viruses in the Nucleus: Location, Location, Location. *Viruses* **2020**, *12*, 151. [[CrossRef](#)]
3. Hidalgo, P.; Gonzalez, R.A. Formation of adenovirus DNA replication compartments. *FEBS Lett.* **2019**, *593*, 3518–3530. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Wang, I.H.; Suomalainen, M.; Andriasyan, V.; Kilcher, S.; Mercer, J.; Neef, A.; Luedtke, N.W.; Greber, U.F. Tracking viral genomes in host cells at single-molecule resolution. *Cell Host Microbe* **2013**, *14*, 468–480. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. de Castro, I.F.; Volonte, L.; Risco, C. Virus factories: Biogenesis and structural design. *Cell. Microbiol.* **2013**, *15*, 24–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Heinrich, B.S.; Maliga, Z.; Stein, D.A.; Hyman, A.A.; Whelan, S.P.J. Phase Transitions Drive the Formation of Vesicular Stomatitis Virus Replication Compartments. *mBio* **2018**, *9*, e02290-17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Nikolic, J.; Le Bars, R.; Lama, Z.; Scrima, N.; Lagaudriere-Gesbert, C.; Gaudin, Y.; Blondel, D. Negri bodies are viral factories with properties of liquid organelles. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Mitrea, D.M.; Kriwacki, R.W. Phase separation in biology; functional organization of a higher order. *Cell Commun. Signal.* **2016**, *14*, 1–20. [[CrossRef](#)]
9. van der Lee, R.; Buljan, M.; Lang, B.; Weatheritt, R.J.; Daughdrill, G.W.; Dunker, A.K.; Fuxreiter, M.; Gough, J.; Gsponer, J.; Jones, D.T.; et al. Classification of intrinsically disordered regions and proteins. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 6589–6631. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Kato, M.; Han, T.W.; Xie, S.; Shi, K.; Du, X.; Wu, L.C.; Mirzaei, H.; Goldsmith, E.J.; Longgood, J.; Pei, J.; et al. Cell-free formation of RNA granules: Low complexity sequence domains form dynamic fibers within hydrogels. *Cell* **2012**, *149*, 753–767. [[CrossRef](#)]
11. Kobiler, O.; Weitzman, M.D. Herpes simplex virus replication compartments: From naked release to recombining together. *PLoS Pathog.* **2019**, *15*, e1007714. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Chang, L.; Godinez, W.J.; Kim, I.H.; Tektonidis, M.; de Lanerolle, P.; Eils, R.; Rohr, K.; Knipe, D.M. Herpesviral replication compartments move and coalesce at nuclear speckles to enhance export of viral late mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, E136–E144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. McSwiggen, D.T.; Hansen, A.S.; Teves, S.S.; Marie-Nelly, H.; Hao, Y.; Heckert, A.B.; Umemoto, K.K.; Dugast-Darzacq, C.; Tjian, R.; Darzacq, X. Evidence for DNA-mediated nuclear compartmentalization distinct from phase separation. *eLife* **2019**, *8*, 8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Taylor, T.J.; McNamee, E.E.; Day, C.; Knipe, D.M. Herpes simplex virus replication compartments can form by coalescence of smaller compartments. *Virology* **2003**, *309*, 232–247. [[CrossRef](#)]
15. Tomer, E.; Cohen, E.M.; Drayman, N.; Afriat, A.; Weitzman, M.D.; Zaritsky, A.; Kobiler, O. Coalescing replication compartments provide the opportunity for recombination between coinfecting herpesviruses. *FASEB J.* **2019**, *33*, 9388–9403. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Corbin-Lickfett, K.A.; Chen, I.H.; Cocco, M.J.; Sandri-Goldin, R.M. The HSV-1 ICP27 RGG box specifically binds flexible, GC-rich sequences but not G-quartet structures. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 7290–7301. [[CrossRef](#)]
17. Hernandez, F.P.; Sandri-Goldin, R.M. Herpes simplex virus 1 regulatory protein ICP27 undergoes a head-to-tail intramolecular interaction. *J. Virol.* **2010**, *84*, 4124–4135. [[CrossRef](#)]
18. Everett, R.D.; Sourvinos, G.; Leiper, C.; Clements, J.B.; Orr, A. Formation of nuclear foci of the herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP4 at early times of infection: Localization, dynamics, recruitment of ICP27, and evidence for the de novo induction of ND10-like complexes. *J. Virol.* **2004**, *78*, 1903–1917. [[CrossRef](#)]
19. Honess, R.W.; Roizman, B. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis: Sequential transition of polypeptide synthesis requires functional viral polypeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1975**, *72*, 1276–1280. [[CrossRef](#)]
20. Everett, R.D.; Sourvinos, G.; Orr, A. Recruitment of herpes simplex virus type 1 transcriptional regulatory protein ICP4 into foci juxtaposed to ND10 in live, infected cells. *J. Virol.* **2003**, *77*, 3680–3689. [[CrossRef](#)]
21. Panagiotidis, C.A.; Lium, E.K.; Silverstein, S.J. Physical and functional interactions between herpes simplex virus immediate-early proteins ICP4 and ICP27. *J. Virol.* **1997**, *71*, 1547–1557. [[CrossRef](#)]
22. Yakimovich, A.; Gumpert, H.; Burckhardt, C.J.; Lutschg, V.A.; Jurgent, A.; Sbalzarini, I.F.; Greber, U.F. Cell-free transmission of human adenovirus by passive mass transfer in cell culture simulated in a computer model. *J. Virol.* **2012**, *86*, 10123–10137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Kroschwald, S.; Maharana, S.; Simon, A. Hexanediol: A chemical probe to investigate the material properties of membrane-less compartments. *Matters* **2017**, *3*, 10. [[CrossRef](#)]
24. Brangwynne, C.P.; Mitchison, T.J.; Hyman, A.A. Active liquid-like behavior of nucleoli determines their size and shape in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 4334–4339. [[CrossRef](#)]
25. Patel, A.; Malinowska, L.; Saha, S.; Wang, J.; Alberti, S.; Krishnan, Y.; Hyman, A.A. ATP as a biological hydrotrope. *Science* **2017**, *356*, 753–756. [[CrossRef](#)]
26. Wagner, L.M.; Lester, J.T.; Sivrich, F.L.; DeLuca, N.A. The N terminus and C terminus of herpes simplex virus 1 ICP4 cooperate to activate viral gene expression. *J. Virol.* **2012**, *86*, 6862–6874. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

27. Tunnicliffe, R.B.; Lockhart-Cairns, M.P.; Levy, C.; Mould, A.P.; Jowitt, T.A.; Sito, H.; Baldock, C.; Sandri-Goldin, R.M.; Golovanov, A.P. The herpes viral transcription factor ICP4 forms a novel DNA recognition complex. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, 8064–8078. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Larson, A.G.; Elnatan, D.; Keenen, M.M.; Trnka, M.J.; Johnston, J.B.; Burlingame, A.L.; Agard, D.A.; Redding, S.; Narlikar, G.J. Liquid droplet formation by HP1 $\alpha$  suggests a role for phase separation in heterochromatin. *Nature* **2017**, *547*, 236–240. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Strom, A.R.; Emelyanov, A.V.; Mir, M.; Fyodorov, D.V.; Darzacq, X.; Karpen, G.H. Phase separation drives heterochromatin domain formation. *Nature* **2017**, *547*, 241–245. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Glauser, D.L.; Strasser, R.; Laimbacher, A.S.; Saydam, O.; Clement, N.; Linden, R.M.; Ackermann, M.; Fraefel, C. Live covisualization of competing adeno-associated virus and herpes simplex virus type 1 DNA replication: Molecular mechanisms of interaction. *J. Virol.* **2007**, *81*, 4732–4743. [[CrossRef](#)]
31. Seyffert, M.; Glauser, D.L.; Schraner, E.M.; de Oliveira, A.P.; Mansilla-Soto, J.; Vogt, B.; Buning, H.; Linden, R.M.; Ackermann, M.; Fraefel, C. Novel Mutant AAV2 Rep Proteins Support AAV2 Replication without Blocking HSV-1 Helpervirus Replication. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0170908. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Sourvinos, G.; Everett, R.D. Visualization of parental HSV-1 genomes and replication compartments in association with ND10 in live infected cells. *EMBO J.* **2002**, *21*, 4989–4997. [[CrossRef](#)]
33. Brangwynne, C.P.; Eckmann, C.R.; Courson, D.S.; Rybarska, A.; Hoege, C.; Gharakhani, J.; Julicher, F.; Hyman, A.A. Germline P granules are liquid droplets that localize by controlled dissolution/condensation. *Science* **2009**, *324*, 1729–1732. [[CrossRef](#)]
34. Banani, S.F.; Lee, H.O.; Hyman, A.A.; Rosen, M.K. Biomolecular condensates: Organizers of cellular biochemistry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, *18*, 285–298. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Hyman, A.A.; Simons, K. Cell biology. Beyond oil and water—phase transitions in cells. *Science* **2012**, *337*, 1047–1049. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Hyman, A.A.; Weber, C.A.; Julicher, F. Liquid-liquid phase separation in biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2014**, *30*, 39–58. [[CrossRef](#)]
37. Boija, A.; Klein, I.A.; Sabari, B.R.; Dall’Agnese, A.; Coffey, E.L.; Zamudio, A.V.; Li, C.H.; Shrinivas, K.; Manteiga, J.C.; Hannett, N.M.; et al. Transcription Factors Activate Genes through the Phase-Separation Capacity of Their Activation Domains. *Cell* **2018**, *175*, 1842–1855.e1816. [[CrossRef](#)]
38. Guo, Y.E.; Manteiga, J.C.; Henninger, J.E.; Sabari, B.R.; Dall’Agnese, A.; Hannett, N.M.; Spille, J.H.; Afeyan, L.K.; Zamudio, A.V.; Shrinivas, K.; et al. Pol II phosphorylation regulates a switch between transcriptional and splicing condensates. *Nature* **2019**, *572*, 543–548. [[CrossRef](#)]
39. Kilic, S.; Lezaja, A.; Gatti, M.; Bianco, E.; Michelena, J.; Imhof, R.; Altmeyer, M. Phase separation of 53BP1 determines liquid-like behavior of DNA repair compartments. *EMBO J.* **2019**, *38*, e101379. [[CrossRef](#)]
40. Oshidari, R.; Huang, R.; Medghalchi, M.; Tse, E.Y.W.; Ashgriz, N.; Lee, H.O.; Wyatt, H.; Mekhail, K. DNA repair by Rad52 liquid droplets. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 695. [[CrossRef](#)]
41. Sabari, B.R.; Dall’Agnese, A.; Boija, A.; Klein, I.A.; Coffey, E.L.; Shrinivas, K.; Abraham, B.J.; Hannett, N.M.; Zamudio, A.V.; Manteiga, J.C.; et al. Coactivator condensation at super-enhancers links phase separation and gene control. *Science* **2018**, *361*, eaar3958. [[CrossRef](#)]
42. Zamudio, A.V.; Dall’Agnese, A.; Henninger, J.E.; Manteiga, J.C.; Afeyan, L.K.; Hannett, N.M.; Coffey, E.L.; Li, C.H.; Oksuz, O.; Sabari, B.R.; et al. Mediator Condensates Localize Signaling Factors to Key Cell Identity Genes. *Mol. Cell* **2019**, *76*, 753–766.e756. [[CrossRef](#)]
43. Metrick, C.M.; Koenigsberg, A.L.; Heldwein, E.E. Conserved Outer Tegument Component UL11 from Herpes Simplex Virus 1 Is an Intrinsically Disordered, RNA-Binding Protein. *mBio* **2020**, *11*. [[CrossRef](#)]
44. Weber, S.C. Evidence for and against Liquid-Liquid Phase Separation in the Nucleus. *Noncoding RNA* **2019**, *5*, 50. [[CrossRef](#)]
45. Galganski, L.; Urbanek, M.O.; Krzyzosiak, W.J. Nuclear speckles: Molecular organization, biological function and role in disease. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, 10350–10368. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Dremel, S.E.; DeLuca, N.A. Herpes simplex viral nucleoprotein creates a competitive transcriptional environment facilitating robust viral transcription and host shut off. *Elife* **2019**, *8*, 8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Glauser, D.L.; Seyffert, M.; Strasser, R.; Franchini, M.; Laimbacher, A.S.; Dresch, C.; de Oliveira, A.P.; Vogel, R.; Buning, H.; Salvetti, A.; et al. Inhibition of Herpes Simplex Virus Type 1 Replication by Adeno-Associated Virus Rep Proteins Depends on Their Combined DNA-Binding and ATPase/Helicase Activities. *J. Virol.* **2010**, *84*, 3808–3824. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Seyffert, M.; Glauser, D.L.; Tobler, K.; Georgiev, O.; Vogel, R.; Vogt, B.; Agúndez, L.; Linden, M.; Büning, H.; Ackermann, M.; et al. Adeno-Associated Virus Type 2 Rep68 Can Bind to Consensus Rep-Binding Sites on the Herpes Simplex Virus 1 Genome. *J. Virol.* **2015**, *89*, 11150–11158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Saeki, Y.; Fraefel, C.; Ichikawa, T.; Breakefield, X.O.; Chiocca, E.A. Improved Helper Virus-Free Packaging System for HSV Amplicon Vectors Using an ICP27-Deleted, Oversized HSV-1 DNA in a Bacterial Artificial Chromosome. *Mol. Ther.* **2001**, *3*, 591–601. [[CrossRef](#)]
50. Eichwald, C.; Arnoldi, F.; Laimbacher, A.S.; Schraner, E.M.; Fraefel, C.; Wild, P.; Burrone, O.R.; Ackermann, M. Rotavirus Viroplasm Fusion and Perinuclear Localization Are Dynamic Processes Requiring Stabilized Microtubules. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e47947. [[CrossRef](#)]

51. Fraefel, C.; Bittermann, A.G.; Bueler, H.; Heid, I.; Bachi, T.; Ackermann, M. Spatial and temporal organization of adeno-associated virus DNA replication in live cells. *J. Virol.* **2004**, *78*, 389–398. [[CrossRef](#)]
52. Glauser, D.L.; Saydam, O.; Balsiger, N.A.; Heid, I.; Linden, R.M.; Ackermann, M.; Fraefel, C. Four-Dimensional Visualization of the Simultaneous Activity of Alternative Adeno-Associated Virus Replication Origins. *J. Virol.* **2005**, *79*, 12218–12230. [[CrossRef](#)]
53. Carpenter, A.E.; Jones, T.R.; Lamprecht, M.R.; Clarke, C.; Kang, I.H.; Friman, O.; Guertin, D.A.; Chang, J.H.; Lindquist, R.A.; Moffat, J.; et al. CellProfiler: Image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biol.* **2006**, *7*, R100. [[CrossRef](#)]
54. Koulouras, G.; Panagopoulos, A.; Rapsomaniki, M.A.; Giakoumakis, N.N.; Taraviras, S.; Lygerou, Z. EasyFRAP-web: A web-based tool for the analysis of fluorescence recovery after photobleaching data. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, W467–W472. [[CrossRef](#)]
55. Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B.; et al. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 676–682. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Holehouse, A.S.; Das, R.K.; Ahad, J.N.; Richardson, M.O.; Pappu, R.V. CIDER: Resources to Analyze Sequence-Ensemble Relationships of Intrinsically Disordered Proteins. *Biophys. J.* **2017**, *112*, 16–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Vernon, R.M.; Chong, P.A.; Tsang, B.; Kim, T.H.; Bah, A.; Farber, P.; Lin, H.; Forman-Kay, J.D. Pi-Pi contacts are an overlooked protein feature relevant to phase separation. *eLife* **2018**, *7*, e31486. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]