

Aus dem Institut für Virusdiagnostik
des Friedrich-Loeffler-Instituts, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit,
Insel Riems

Angefertigt unter der Leitung von PD Dr. M. G. Beer,
Institutsleiter
des Instituts für Virusdiagnostik

Eingereicht über Prof. Dr. E. P. Märtlbauer,
komm. Vorstand des
Instituts für Medizinische Mikrobiologie
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Funktionelle Charakterisierung von Doppeldeletionsmutanten des
Bovinen Herpesvirus Typ 1
als Basis einer neuen Markervakzineformulierung

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der tiermedizinischen
Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Donata Kalthoff
aus Duisburg
München 2007

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer
Referent: Univ.- Prof. Dr. Märtlbauer
Korreferent/en: Univ.- Prof. Dr. Wolf
Univ.- Prof. Dr. Klee
Univ.- Prof. Dr. Kaspers
Priv. Doz. Dr. Wollanke

Tag der Promotion: 20. Juli 2007

Meiner Familie

Auch wenn alle einer Meinung sind, können alle unrecht haben.
Bertrand Russell

1	Einleitung.....	1
2	Schrifttum	2
2.1	Klassifizierung und Struktur des Bovinen Herpesvirus Typ 1	2
2.2	Replikation von Alphaherpesviren	3
2.3	Direkte Virusausbreitung von Zelle zu Zelle.....	7
2.4	Glykoprotein E bei BoHV-1 und anderen α -Herpesviren	8
2.5	UL49.5 bei BoHV-1 und anderen α -Herpesviren.....	9
2.6	UL49 bei BoHV-1 und anderen α -Herpesviren.....	9
2.7	Thymidinkinase bei BoHV-1 und anderen α -Herpesviren	10
2.8	BoHV-1 Bekämpfung	10
2.9	BAC-Mutagenese.....	12
3	Material und Methoden.....	14
3.1	Material	14
3.1.1	Zellen	14
3.1.2	Versuchstiere	14
3.1.3	Virusstämme	14
3.1.4	Bakterien und Plasmide	14
3.1.5	BAC (bacterial artificial chromosome).....	15
3.1.6	Antikörper, Antiseren und Markierungsreagenzien.....	15
3.1.7	Chemikalien	16
3.1.8	Enzyme	18
3.1.9	Lösungen und Puffer.....	19
3.1.10	Geräte, Laborhilfsmittel und Verbrauchsmaterialien	23
3.2	Methoden	25
3.2.1	Zellkultur und Virusanzucht	25
3.2.2	DNA.....	28
3.2.3	Herstellung rekombinanter Viren	34
3.2.4	Charakterisierung rekombinanter Viren <i>in vitro</i>	39
3.2.5	Proteinnachweis	40
3.2.6	Immunisierung von Kaninchen zur Antikörpergewinnung	43
3.2.7	Tierversuchsaufbau	44

3.2.8	Serologie.....	45
4	Ergebnisse	47
4.1	BoHV-1-Deletionsmutante UL49.5	47
4.1.1	Konstruktion der BoHV-1 Δ gE Δ UL49.5 Doppeldeletionsmutante	47
4.1.2	Konstruktion der Virusmutante BoHV-1 Δ UL49.5gErev.....	48
4.1.3	Genotypische Charakterisierung der BoHV-1 Δ gE Δ UL49.5 Doppeldeletionsmutante sowie der gE-Revertante.....	49
4.1.4	Vergleichende Untersuchung der BoHV-1 Δ UL49.5 Deletionsmutante im Western Blot	50
4.1.5	Charakterisierung von UL49.5 mittels konfokaler Laserskanmikroskopie	53
4.1.6	Wachstumsanalyse der Mutanten und Revertanten	55
4.2	BoHV-1-Doppeldeletionsmutante Glykoprotein E und UL49.....	58
4.2.1	Generierung eines spezifischen, polyklonalen Antiserum gegen das pUL49 des BoHV-1	58
4.2.2	Konstruktion der BoHV-1 Δ gE Δ UL49 Doppeldeletionsmutante	58
4.2.3	Konstruktion einer gE-Revertante von BoHV-1 Δ gE Δ UL49	58
4.2.4	Konstruktion einer UL49 –Revertante von BoHV-1 Δ gE Δ UL49.....	59
4.2.5	Genotypische Charakterisierung der BoHV-1 Δ gE Δ UL49 Doppeldeletionsmutante	59
4.2.6	Vergleich der BoHV-1- Δ gE Δ UL49 Mutanten und Revertanten im Western Blot	60
4.2.7	Charakterisierung des UL49 Proteins mittels konfokaler Laserscanmikroskopie	62
4.2.8	Vergleichende Wachstumsanalyse der BoHV-1 Δ gE Δ UL49 Mutante und der gE- und UL49-Revertanten	65
4.3	Doppeldeletionsmutante gE und Thymidinkinase	69
4.3.1	Herstellung eines TK-spezifischen polyklonalen Antiserums	69
4.3.2	Generierung der Doppeldeletionsmutante BoHV-1 Δ gE Δ TK	69
4.3.3	Genotypische Charakterisierung der BoHV-1 Δ gE Δ TK Doppeldeletionsmutante	71
4.3.4	Darstellung der gE/TK-Doppeldeletionsmutante im Western Blot	72
4.3.5	Konfokale Laserskanmikroskopie: Analyse der subzellulären Lokalisation von gE und TK	73

4.3.6	Wachstumsanalyse der Doppeldeletionsmutante BoHV-1- Δ gE Δ TK.....	76
4.3.7	Prüfung der BoHV-1 Δ gE Δ TK Mutante im Tierversuch	79
5	Diskussion.....	84
5.1	Charakterisierung der Deletionsmutante BoHV-1 UL49.5	84
5.2	Charakterisierung der Doppeldeletionsmutante BoHV-1- gE und UL49.....	86
5.3	Charakterisierung der Doppeldeletionsmutante BoHV-1 gE und TK	88
6	Zusammenfassung	92
7	Summary	94
8	Literatur	97
9	Anhang.....	111
9.1	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen.....	111
10	Lebenslauf.....	118
11	Danksagung	119

1 Einleitung

Das Bovine Herpesvirus 1 (BoHV-1) ist ein weit verbreiteter Infektionserreger in der Rinderpopulation. Es verursacht respiratorische Erkrankungsbilder, Beeinträchtigungen der Milch- und Mastleistung und Störungen der Reproduktionsraten. Es ist das kausative Agens der Infektiösen Bovinen Rhinotracheitis (IBR) und der Infektiösen Pustulären Vulvovaginitis/ Balanoposthitis (IPV/ IBP).

Der Infektionszyklus des BoHV-1 beginnt mit der Infektion des Respirations- bzw. Genitaltraktes. Hiervon ausgehend wandert das Virus über neuronale Zellen in die innervierenden Ganglienzentren. Hier geht der Erreger in Latenz, so dass ein einmal infiziertes Tier zu einem lebenslangen Virusträger wird. In der Folge kann das Virus unter bestimmten Umständen reaktiviert werden und wird vom infizierten Tier erneut ausgeschieden. Mit dieser potentiellen Virusausscheidung stellt das infizierte Tier eine nur schwer kontrollierbare Gefahr für nicht infizierte Kontakttiere oder andere, freie Bestände dar.

Für Herpesviren sind in der weiteren Folge des Infektionszyklus zwei verschiedene Ausbreitungsstrategien bekannt. Der klassische Ausbreitungsweg führt zu extrazellulär vorliegenden, infektiösen Viruspartikeln, die weitere Wirtstiere infizieren können. Der zweite Ausbreitungsweg findet innerhalb eines Wirtes statt, indem direkt benachbarte Zellen infiziert werden. Diese als „*cell-to-cell-spread*“ CTCS bezeichnete Ausbreitungsform scheint *in vivo* eine wichtige Rolle zu spielen, extrazelluläre Virionen treten nur sehr kurz in Erscheinung und neutralisierende Antikörper haben auf diese Verbreitung keinen Einfluss. Vor allem den viralen Glykoproteinen sind bisher Funktionen innerhalb des viralen CTCS zugewiesen worden. Allerdings führen Untersuchungen mit Hilfe von Einzel-Deletions-Mutanten oftmals nicht zu eindeutigen Aussagen, da die zahlreichen viralen Proteine redundant die Funktion anderer Proteine übernehmen können. Mit den neuen Methoden der herpesviralen Mutagenese auf Basis eines BAC-Systems (*Bacterial artificial chromosome*) besteht die Möglichkeit, mehrfach deletierte Virusmutanten zu erstellen und anschließend zu charakterisieren. Eine Virusmutante, welche nur noch zu einem eingeschränkten CTCS befähigt ist und damit immunologisch zugänglicher geworden ist und möglicherweise auch keine Latenz etabliert, stellt unter Umständen eine optimale Vakzine dar.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Deletion von einem Nicht-Struktur-Protein (Thymidinkinase), bzw. von einem Tegumentprotein (pUL49) oder einem im Heterokomplex mit einem Glykoprotein vorliegenden Protein (pUL49.5) im Zusammenhang mit einer bestehenden Deletion des Glykoprotein E zu realisieren. Die *in vitro*-Charakterisierung dieser Doppeldelentionsmutanten sollte dann das Verständnis für die Proteinfunktionen innerhalb des viralen Replikationszyklus erweitern, während *in vivo*-Experimente ihre Eignung als Vakzinekandidat bewerten sollten.

2 Schrifttum

2.1 Klassifizierung und Struktur des Bovinen Herpesvirus Typ 1

Das Bovine Herpesvirus 1 (BoHV-1) gehört zur Familie der *Herpesviridae*. Vertreter dieser Familie verfügen über einen grundsätzlich einheitlichen Aufbau. Das doppelsträngige, lineare DNA-Genom liegt mit dem Core-Protein assoziiert innerhalb des Kapsids. Dieses wird von 162, als Kapsomeren bezeichneten Untereinheiten (150 Hexone und 12 Pentone) gebildet und besitzt eine ikosaedrische Form. Als Nukleokapsid wird die Summe dieser drei Strukturen bezeichnet. Das Nukleokapsid liegt umgeben von einer Proteinmatrix, die im Elektronenmikroskop elektronendicht erscheint, dem sogenannten Tegument, innerhalb einer Lipidmembran. Die Lipidhülle stammt von der Wirtszelle und virale Glykoproteine sind ebenso wie virale, nicht glykosylierte Proteine in diese eingelagert (METTENLEITER, 2002).

Der aktuelle *Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses* nennt drei Herpesvirus-Subfamilien: die *Alphaherpesvirinae*, die *Betaherpesvirinae* und die *Gammaherpesvirinae*. Das BoHV-1 ist den Alphaherpesviren zugeordnet. Innerhalb dieser Subfamilie werden vier Genera unterschieden. Das BoHV-1 ist ebenso wie das Pseudorabiesvirus (SuHV-1), das Equine Herpesvirus 1 und 4 (EHV-1, EHV-4) und das namensgebende Varicella-Zoster Virus (HHV-3) im Genus *Varicellovirus* klassifiziert (FAUQUET ET AL., 2005). Die *Alphaherpesvirinae* zeichnen sich durch ein breites Wirtsspektrum aus, einen kurzen Replikationszyklus, eine schnelle Ausbreitung in der Zellkultur, eine deutliche Zerstörung der infizierten Zellen (cytopathischer Effekt cpE) und das Vermögen, besonders sensorische Ganglien latent zu infizieren (ROIZMAN ET AL., 2001).

Die Genomorganisation der Herpesviren lässt eine Einteilung in sechs Gruppen zu. Diese werden mit den Buchstaben A bis F bezeichnet. Das Genom des BoHV-1 entspricht der Organisation der Gruppe D. Singuläre UL („*Unique-Long*“)- und US („*Unique Short*“)-Regionen des 136 kbp großen Genoms werden durch eine IR („*Inverted Repeat*“)-Region getrennt (Abbildung 2-1). Diese Sequenz wiederholt sich am Ende des Genoms in umgekehrter Orientierung TR („*Terminal Repeat*“)-Region und ermöglicht die Umkehrung der US-Region relativ zu der festgesetzten UL-Region. Dadurch können zwei biologisch nicht unterscheidbare, isomere Genomformen auftreten (WIRTH ET AL., 1991; ROIZMAN ET AL., 2001).

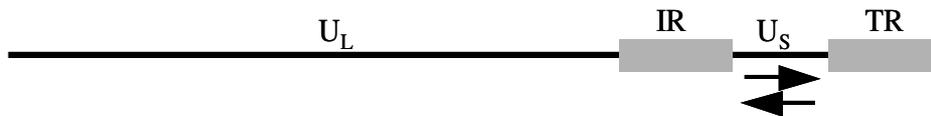


Abbildung 2-1: *Genomorganisation des BoHV-1*: Schematisch wird die genomische Organisation abgebildet. U_L = Unique Long-Region, U_S = Unique Short-Region, IR= Internal Repeats, TR= Terminal Repeats. Die Pfeile symbolisieren die gegensätzlichen Leserichtungen der Unique Short-Region, die zu äquimolaren Isoformen der Genome in einer Viruspopulation führen.

Abgeleitet vom Prototypen der *Alphaherpesvirinae*, dem Herpes Simplex Virus 1 (HHV-1) werden die homologen Gene innerhalb der Regionen durchnummeriert und auch im Folgenden so bezeichnet. (Damit entspricht der offene Leserahmen UL49 dem „49igsten“ Genlocus der *Unique Long-Region*). Das Genom des BoHV-1 besitzt einen GC-Gehalt von 72% und kodiert für über 70 virale Proteine. Davon wurden 33 als Strukturproteine und 15 als Nicht-Strukturproteine beschrieben. Als Strukturproteine werden solche Proteine bezeichnet, die in das Viruspartikel eingebaut werden, während Nicht-Strukturproteine zwar innerhalb des Replikationszyklus exprimiert werden, aber nicht Bestandteil des Virions sind. Sequenzvergleiche mit anderen Alphaherpesviren zeigen, dass die Anordnung der Gene weitgehend kolinear ist (MCGEOCH ET AL., 1995).

2.2 Replikation von Alphaherpesviren

Wie auch bei anderen Herpesviren unterscheidet man im Replikationszyklus des BoHV-1 die Adsorption an die Zelloberfläche, das sogenannte *Attachment* und die Penetration der zellulären Membran. Der Begriff „Viraler *Entry*“ bezeichnet die Summe beider Vorgänge, in deren Folge das Nukleokapsid mit angelagerten Tegumentproteinen in das Zytoplasma der Zelle gelangt. Die Adsorption des Viruspartikels an die Zelle erfolgt durch Glykoproteine auf viraler und durch Oberflächenproteine auf zellulärer Seite. Die Glykoproteine (g) sind in die virale Lipidhülle eingelagert und man kennt zehn offene Leserahmen (*open reading frames*, ORFs) bei BoHV-1, die für die Glykoproteine gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gK, gL und gM kodieren. Im Virion tritt gB als Homodimer auf, während gH/gL, gE/gI und gM/UL49.5 als Heterodimere auftreten (SCHWYZER UND ACKERMANN, 1996; WU ET AL., 1998). An der Adsorption beteiligt sind die Glykoproteine gB, gC und gD. Die initiale Bindung wird durch gC erreicht, indem dieses an Heparansulfat bindet, ein Teil des gB bindet Heparin selbst (LI ET AL., 1997). In der zweiten Phase der Adsorption bindet gD an Nectin-1 (teilweise auch *herpesvirus viral entry mediator C HveC* genannt), welches ein Zelloberflächenprotein aus der Superfamilie der Immunglobuline darstellt (STRUYF ET AL., 2002). Für BoHV-1 wurde außerdem HveD (auch Poliovirus-Rezeptor genannt) als Korezeptor identifiziert (GERAGHTY ET AL., 1998). Anschließend verschmilzt die virale Hüllmembran mit der zellulären Membran durch fusogene Vermittlung der Glykoproteine gD, gB und gH/gL

(MEYER ET AL., 1998; SCHRÖDER UND KEIL., 1999). Das erfolgreich penetrierte Nukleokapsid bindet an Mikrotubuli und wird entlang dieser zum Mikrotubuliorganisierenden Zentrum und zum Zellkern transportiert (SODEIK ET AL., 1997). Der Transport der viralen Kapside entlang der Mikrotubuli wird durch zytoplasmatisches Dynein und seinen Kofaktor Dynactin vermittelt. Am Zellkern bindet das Kapsid, welches seine Struktur bis zum Erreichen des Zellkerns beibehält, an die Kernporen und entlässt die virale DNA durch den Kernporenkomplex (NPC) in den Kern (BATTERSON ET AL., 1983, SODEIK ET AL., 1997, OJALA ET AL., 2000). Das DNA-Genom zirkularisiert und liegt dann als Episom im Kernplasma vor. Im Zellkern finden virale Replikation, Transkription und der Zusammenbau neuer Kapside statt (ROIZMAN UND KNIPE 2001). Die virale DNA-Synthese im Kern erfolgt nach dem Prinzip des *rolling circle*. Es bildet sich ein DNA-Strang, der mehrere Einzelgenome hintereinander in konkatamerer Anordnung enthält. Nachdem die DNA an Signalsequenzen innerhalb des IR-Bereichs geschnitten wurde, können die Monomere als genomische DNA in neusynthetisierte Kapside verpackt werden (VARMUZA UND SMILEY, 1985). Die Spaltung der konkatameren DNA ist dabei wahrscheinlich ein sequenzspezifischer Prozess. Im Zellkern wird die Transkription des viralen Genoms durch verschiedene Tegumentproteine, die durch die Fusion der viralen Hülle mit der Plasmamembran ins Zytosol gelangen und in den Zellkern transportiert werden, initiiert. Die Transkription und Expression viraler Proteine ist kaskadenartig aufgebaut, dabei existieren zahlreiche positive und negative Rückkopplungsmechanismen. Es werden α -, β - und γ -Gene unterschieden, wobei die Klasse der γ -Gene in die Subklassen γ_1 und γ_2 unterteilt wird. Die α - oder IE (*immediate early*)-Gene werden, unabhängig von der Synthese anderer viraler Proteine, als erstes exprimiert und kodieren vor allem für Proteine mit regulatorischen Funktionen bei der Transkription später Gene. Für die Expression der β - oder E (*early*)-Gene, deren Produkte im viralen DNA-Metabolismus eine Rolle spielen, wird ein Teil der α -Proteine, nicht aber die Synthese viraler DNS benötigt. Die Expression der für virale Strukturproteine kodierenden γ -Gene ist in unterschiedlichem Ausmaß abhängig von der viralen DNA-Synthese. γ_1 (*early-late*)-Gene werden durch die Synthese viraler DNA verstärkt exprimiert, γ_2 (*true-late*)-Gene werden bei Blockierung der DNA-Synthese nicht mehr gebildet (CAUGHMAN ET AL., 1985; ROIZMAN UND KNIPE, 2001; ROIZMAN UND PELLETT, 2001). Die Transkription erfolgt durch die wirtszelleigene RNA-Polymerase II. Zu den Proteinen, die als Bestandteil des Virions die Transkription beeinflussen, gehört das Tegumentprotein VP16, welches das Genprodukt des UL48 darstellt und auch als *α -Trans Inducing Factor* (α -TIF) bezeichnet wird, da es die Transkription der α -Gene induziert. Während der frühen Phase der Virusinfektion sorgt das Tegumentprotein UL41 (*virus-host-shut-off Faktor*, vhs) dafür, dass die zelluläre Proteinsynthese durch die Degradation der zellulären messenger-RNA deutlich verringert wird (KOPPERS-LALIC ET AL., 2001). Nach der viralen Genexpression und DNA-Synthese, translozieren die neusynthetisierten Kapsidproteine aus dem Zytoplasma in den Zellkern. Autokatalytisch formen sich sogenannte Prokapside entlang eines Gerüstproteins, bestehend aus den Genprodukten des UL26 und UL26.5. Das Genprodukt von UL6 (pUL6) verbringt als

sogenanntes Portalprotein die DNA in das geformte Kapsid, pUL15 und pUL28 entwickeln im Komplex eine spezifische Nuklease-Aktivität und spalten eine genomische Einheit der konkatameren DNA in das Kapsid (METTENLEITER, 2006).

Die nachfolgenden Schritte der Morphogenese eines Viruspartikels werden weiterhin diskutiert. Eine Theorie geht davon aus, dass die Ausschleusung der Nukleokapside aus dem Kern durch dilatierte Kernporen erfolgt (WILD ET AL. 2005). Die zweite Theorie beschreibt einen „*budding*“-Vorgang der Nukleokapside durch die innere Kernmembran in den perinukleären Spalt. An diesem Schritt des Ausschleusens aus dem Kern sind die Produkte der Gene UL31 und UL34 beteiligt. Die Deletion eines der beiden Gene bei SuHV-1 oder HHV-1 führt zu einer drastischen Reduktion des ersten Umhüllungsschrittes und zu einer Akkumulation von Nukleokapsiden im Zellkern (METTENLEITER, 2002). In einem weiteren Schritt verlieren diese primär umhüllten Virionen ihre Hülle, indem sie mit der äußeren Kernmembran fusionieren. Damit gelangen unbehüllte Nukleokapside in das Zytoplasma der Wirtszelle. Im Kernspalt liegende, primär umhüllte Virionen weisen eine differente Morphologie gegenüber reifen, extrazellulären, sekundär behüllten Virionen auf. So fehlen die für eine reife, glykoproteinreiche Lipidhülle typischen Protrusionen (GRANZOW ET AL., 1997). Immunelektronenmikroskopische Analysen zeigten, dass pUL31 und pUL34 Bestandteile des primär behüllten Virions sind, während reife Virionen diese Proteine nicht mehr aufweisen (FUCHS ET AL., 2002). Die Tegumentproteine pUL46 und pUL47 fehlen dagegen bei primär umhüllten Virusstadien, während reife Virionen diese enthalten (GRANZOW ET AL., 2004). Im Bereich des Zytoplasmas generieren die Nukleokapside ihre innere Tegumentschicht, diese scheint hinsichtlich ihrer Stöchiometrie festgelegt zu sein, während die äußere Tegumentation in ihrer quantitativen Proteinzusammensetzung variiert (MICHAEL ET AL., 2006). Zu der inneren Tegumentschicht gehören die Genprodukte von UL36 und UL37. Die äußere Tegumentschicht akquirieren sich die Viruspartikel bei dem nächsten Budding-Prozess. Dieser lokalisiert sich im Bereich des Trans-Golgi-Komplexes. Der zweiten Morphogenese-Theorie folgend wird dieser Vorgang als „*secondary envelopment*“ bezeichnet. Protein-Protein-Interaktionen ermöglichen diesen zweiten Umhüllungsschritt. In die Lipidmembran eingelagerte Glykoproteine interagieren mit Tegumentproteinen der äußeren Tegumentationsschicht. Für HHV-1 wurde die Interaktion des UL49 Genprodukts (auch als Virion Protein 22, VP22 bezeichnet) mit dem zytoplasmatischen Teil des Glykoprotein D gezeigt (CHI ET AL., 2005). Aktuelle Untersuchungen bestätigen dies und zeigen weiterhin die Interaktion von VP22 und gE (FARNSWORTH ET AL., 2006). Bei SuHV-1 scheint es eine Interaktion des VP22 mit den carboxyterminalen, intrazytoplasmatischen Domänen der Glykoproteine gE und gM zu geben (FUCHS ET AL., 2002). Zusätzlich interagiert VP22 mit dem UL48 Genprodukt (ELLIOTT ET AL., 1995). Bei BoHV-1 interagiert pUL48 wiederum mit dem Produkt von UL3.5 (LAM UND LETCHWORTH, 2000). Untersuchungen bei HHV-1 zeigten außerdem die Interaktion von pUL48 mit dem Glykoprotein H (GROSS ET AL., 2003). Dieser zweite Budding-Schritt führt dann zu behüllten Virionen innerhalb eines Golgi-Vesikels. Durch Fusion dieser Vesikel mit der

äußeren Zellmembran werden die Virionen in den extrazellulären Raum entlassen und der Replikationszyklus ist komplettiert. Teilweise treten auch nicht infektiöse, sogenannte L-Partikel (L steht hierbei für light, da sich diese Partikel in einem Zuckergradienten als „leichtere“ Bande im Vergleich zu kompletten Virionen erweisen) auf. Dabei handelt es sich um umhüllte, kapsidlose Tegumentproteine. Die Existenz dieser Partikel deutet an, dass die alleinige Anwesenheit von bestimmten Tegumentproteinen ausreicht, um den Schritt des *secondary envelopment* auszulösen. Eine schematische Verdeutlichung der beschriebenen Morphogenese-Schritte erfolgt in Abbildung 2-2.

Eine Besonderheit der Herpesviren ist ihr Vermögen, Zellen latent zu infizieren. Alphaherpesviren etablieren die Latenz vorzugsweise in neuronalen Zellen. Dabei wird die Expression der viralen Proteine, die während des lytischen Infektionszyklus erfolgt, durch die „*Latency related RNA*“ LR RNA inhibiert. Außerdem werden in den Zellen die Zellzyklusprogression und die Induktion von Apoptose inhibiert (PERNG ET AL., 2000, SCHANG ET AL., 1998). Die Reaktivierung tritt unter dem Einfluss exogener oder endogener Stressoren auf und neue Virionen werden in den Zellen synthetisiert. Reaktiviertes Virus wird in der Folge intraaxonal zurück in die Peripherie zur ursprünglichen Eintrittspforte transportiert und kann hier erneut zu klinischen Symptomen führen (ENGELS UND ACKERMANN, 1996).

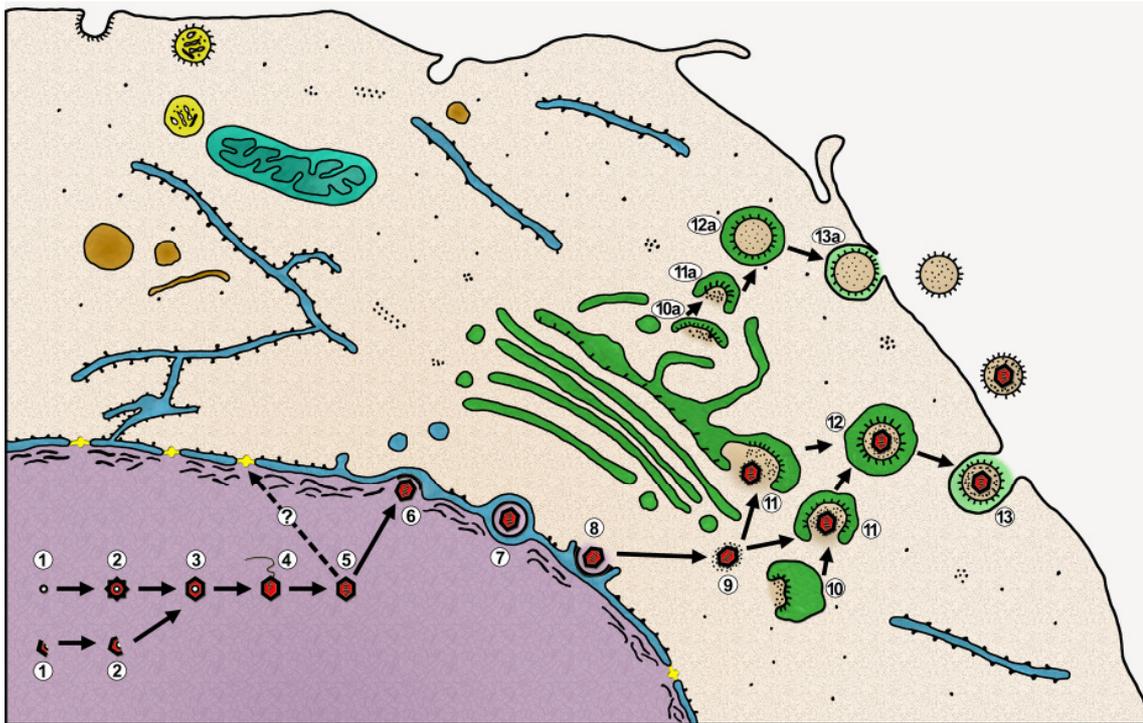


Abbildung 2-2 *Schematische Darstellung der herpesviralen Morphogenese: (modifiziert nach Mettenleiter, 2006.)* Intranukleäre Kapside formen sich um das Gerüstprotein (1-3), und das Genom wird eingebracht (4). Nukleokapside (5) kontaktieren die innere Nuklearmembran (6). Durch einen ersten Budding-Schritt entstehen primär umhüllte Virionen im perinukleären Spalt (7). Die primäre Hülle fusioniert mit der äußeren Kernmembran und „nackte“ Nukleokapside gelangen in das Zytoplasma (8). Tegumentproteine der inneren Tegumentschicht lagern sich an das Nukleokapsid (9). Die Proteine der äußeren Tegumentschicht und die sekundäre Hülle werden im Bereich des Golgi-Netzwerkes akquiriert (10,11). Neu geformte Virionen werden innerhalb von Vesikeln an die Plasmamembran transportiert und in den Extrazellularraum entlassen (12,13). (10a-13a) Bildung und Freisetzung von kapsidlosen Partikeln (sogen. L-Partikel).

2.3 Direkte Virusausbreitung von Zelle zu Zelle

Die direkte Ausbreitung von Zelle zu Zelle wird als „*cell-to-cell-spread*“, CTCS, bezeichnet. Neutralisierende Antikörper können diese Form der viralen Ausbreitung nicht beeinflussen (COREY AND SPEAR, 1986). Es wird angenommen, dass dies die hauptsächliche Ausbreitungsform *in vivo* darstellt (REBORDOSA ET AL., 1996). Bei einem klassischen Infektionsverlauf werden primär Epithelien und in der Folge sensorische und autonome Neuronen infiziert. Nach einer Reaktivierung erfolgt die Ausbreitung von den neuronalen Zellen zurück in die Epithelien. Während dieses Infektzyklus kommt es zu einem direkten, gerichteten Transport der Viruspartikel innerhalb der polarisierten Zellen. Charakteristisch für polarisierte Zellen v.a. Epithelien sind ihre ausgeprägten Zell-Zell-Kontakte und die damit verbundene Aufteilung in einen apikalen und einen basolateralen Membrananteil. Der CTCS von Herpesviren basiert auf der Interaktion mit zellulären Rezeptoren, die bevorzugt an diesen Zell-Zell-Kontakten akkumulieren (KRUMMENACHER ET AL., 2003, RICHART ET AL., 2003).

HHV-1 benötigt für diese Expansionsform die Glykoproteine gB, gD, und gH/gL, genauso wie für den klassischen *Entry* der extrazellulären Virionen (FARNSWORTH ET AL., 2006). Dagegen ist der Proteinkomplex gE/gI maßgeblich in den CTCS involviert, während ihm für den Entry von extrazellulären Viruspartikeln keine direkt ersichtliche Funktion zugeschrieben wird. Die Abläufe des CTCS sind ebenso wie die beteiligten Proteine nicht vollständig geklärt und stellen ein aktuelles Forschungsgebiet dar.

2.4 Glykoprotein E bei BoHV-1 und anderen α -Herpesviren

Untersuchungen bei HHV-1 lassen vermuten, dass gE/gI an den Membranen des TGN akkumuliert und das Budding in solche Vesikel fördert, die speziell zu den Zonula adhärens der polarisierten Zellen befördert werden. Diese Funktion, die dem Morphogenese-Schritt des *Secondary Envelopments* zugeordnet werden kann, wird auch durch das Glykoprotein D gewährleistet. So zeigt erst die gE und gD doppelt deletierte HHV-1 Mutante eine Ansammlung unbehüllter Nukleokapsid-Aggregate im Zytoplasma (FARNSWORTH ET AL., 2003). Der zytoplasmatische Teil des Transmembranproteins trägt einerseits ein Trans-Golgi-Network (TGN) Signal (FARNSWORTH UND JOHNSON, 2006), andererseits wird er für den Transport der Virusnachkommenschaft zu den Zell-Zell-Kontaktstellen benötigt. Eine Deletionsmutante, der dieser zytoplasmatische Proteinanteil fehlt, zeigt einen einseitigen Transport der Virusnachkommen an die apikale Plasmamembran (JOHNSON ET AL., 2001). Diese Mutante zeigt demzufolge eine geringere Ausprägung des CTCS als der Wildtyp. Der zytoplasmatische Teil des gE interagiert mit den Tegumentproteinen pUL11 und pUL49 bei HHV-1 (FARNSWORTH ET AL., 2006). Die Interaktion des gE mit pUL49 konnte zudem bei SuHV-1 mittels *Yeast-Two-Hybrid*-Untersuchungen gezeigt werden (FUCHS ET AL., 2002). Auch die extrazelluläre Domäne des gE weist eine Funktionalität im Sinne des CTCS auf, denn ein Virus, das Mutationen in diesem Bereich aufweist (dabei aber keine Beeinflussung der Komplexbildung mit gI, der Inkorporation von gE in das Virion oder der Oberflächenexpression von gE zeigt) verfügt über keinen effizienten CTCS mehr (POLCICOVA ET AL., 2005). Des Weiteren lässt sich der CTCS durch die Expression von gE *in trans* inhibieren (COLLINS UND JOHNSON, 2003). Diese Interferenz lässt vermuten, dass es einen zellulären Interaktionspartner des gE gibt, der im Bereich der Zell-Zell-Kontakte lokalisiert ist. Somit ist gE sowohl in den zweiten Budding-Schritt als auch in weitere -zu klärende- Schritte des CTCS involviert. Auch für BoHV-1 konnte die Beteiligung des gE/gI-Komplexes am CTCS gezeigt werden, indem gE -deletierte Virusmutanten phänotypisch deutlich verringerte Plaquegrößen ausprägten (REBORDOSA ET AL., 1996). Dieses veränderte Wachstumsverhalten von gE deletiertem BoHV-1 korreliert im Tier mit einer verminderten Virulenz und alle kommerziell verfügbaren Lebend-Marker-Vakzinen basieren auf solchen Viren (KAASHOEK ET AL., 1994; VAN ENGELENBURG ET AL., 1994).

2.5 UL49.5 bei BoHV-1 und anderen α -Herpesviren

Das BoHV-1 UL49.5 Protein ist ein Homolog des hoch konservierten Glykoprotein N (gN) bei anderen Herpesviren (DAVISON ET AL., 2002). Es handelt sich um ein Typ 1 Transmembran-Protein, dies bedeutet, dass die N-terminale Domäne extrazellulär, die C-terminale Domäne intrazytoplasmatisch mit einer zwischenliegenden Transmembran-region verbunden, vorliegen. Als Monomer besitzt pUL49.5 eine Molekulargewicht von 9 kDa und besteht aus 96 Aminosäuren, es existiert auch eine homodimere Form von 15 kDa (LIPINSKA ET AL., 2006). Das Protein kann auf der zellulären Oberfläche und in der Lipidhülle des Virions detektiert werden. Bei BoHV-1 ist dieses Protein nicht glykosyliert und wird daher nicht als gN bezeichnet (LIANG ET AL., 1996). Alle gN homologen Proteine, die bis dato untersucht wurden, formen einen Proteinkomplex mit dem Glykoprotein M (gM) (FUCHS UND METTENLEITER., 2005; JÖNS ET AL., 1998; WU ET AL., 1998). Dieser wird über eine kovalente Bindung der beiden Partner in Form einer Disulfidbrücke erreicht (WU ET AL., 1998). Wie auch bei EHV-1 (RUDOLPH ET AL., 2002) wird das Genprodukt des UL49.5 bei BoHV-1, hier in erster Linie die Transmembrandomäne, in Kombination mit der extrazellulären Domäne, für eine funktionelle Reifung des gM benötigt (LIPINSKA ET AL., 2006), dagegen verhält es sich bei SuHV-1 so, dass gN jeweils gM benötigt, um in das Viruspartikel eingebaut zu werden (JÖNS ET AL., 1998). BoHV-1 UL49.5 ist nicht essentiell; eine Mutante, der dieses Gen fehlt, kann in Zellkultur replizieren (LIANG ET AL., 1993), ebenso verhält es sich mit einer entsprechenden Mutante des SuHV-1 (JÖNS ET AL., 1998). Dagegen erweist sich im Falle des zum Genus Mardivirus gehörendem Gallid Herpesvirus 2 das UL49.5 Genprodukt als essentiell für ein Wachstum in Zellkultur (TISCHER ET AL., 2002). Sowohl für SuHV-1 als auch für BoHV-1 wurde eine Funktion im Sinne eines Immun-evasionsmechanismus für pUL49.5 nachgewiesen (KOPPERS-LALIC ET AL., 2005). Hierbei wird die Funktion des „*Transporter Associated with Antigen Processing*“ TAP durch pUL49.5 inhibiert. Kombinierte Deletionen des gE und des UL49.5 Homologs bei EHV-1 führen zu 190 fach reduzierten Titern und die Plaquegrößen sind um 63% gegenüber dem gE-deletierten Virus verringert (RUDOLPH ET AL., 2002). Dagegen entwickelt eine gE, gI, gN deletierte SuHV-1 Mutante Plaquegrößen, die kaum reduziert sind verglichen mit dem gE und gI deletierten Virus (BRACK ET AL., 1999).

2.6 UL49 bei BoHV-1 und anderen α -Herpesviren

Das pUL49 ist ein äußeres Tegumentprotein und vermutlich verbindet es die innere Tegumentschicht mit der Lipidhülle des Virus. Es ist ein innerhalb der Alpha-herpesviren konserviertes Protein. Interaktionsstudien lassen pUL48, gE, gD und gM (bei SuHV-1) als Proteipartner vermuten (ELLIOTT ET AL., 1995; O`REGAN ET AL., 2006; FARNSWORTH ET AL., 2006; CHI ET AL., 2005; FUCHS ET AL., 2002). Das UL49 Protein ist für das streng zellassozierte Gallid Herpesvirus 2 (Marek`s Disease Virus) GaHV-2 essentiell für das Viruswachstum in Zellkultur (DORANGE ET AL., 2002).

Dagegen zeigt eine Deletion des UL49-ORF bei SuHV-1 nur sehr geringe Auswirkungen auf die Replikation *in vitro*, so verhält sich die Mutante in einem Infektionsmodell am Nagerauge wie das Wildtypvirus (DEL RIO ET AL., 2002). Für HHV-1 konnte ebenso gezeigt werden, dass eine UL49 deletierte Mutante am Nagerauge eine verminderte Ausbreitungstendenz aufweist. *In vitro* zeigt sich allerdings eine deutliche Reduktion der Plaquegrößen (DUFFY ET AL., 2006). Eine BoHV-1 UL49 deletierte Virusmutante verhält sich avirulent im natürlichen Wirtstier (LIANG ET AL., 1997). Die Replikation eines solchen Virus ist geringgradig beeinflusst, so ist der Virustiter, der nach 24 stündiger Inkubation erreicht wird, um den Faktor 10 verringert (LIANG ET AL., 1995). Untersuchungen mit transfizierten Zellen, die das UL49-Genprodukt exprimieren zeigten eine interzelluläre Ausbreitung des Proteins von der transfizierten Zelle ausgehend. Dieses Phänomen wird als „*intercellular trafficking*“ bezeichnet. DNA-Vakzinen, die zusätzlich für pUL49 kodieren, führten zu einer verstärkten Immunantwort verglichen mit einer DNA-Vakzine ohne UL49-Sequenz (ZHENG ET AL., 2005).

2.7 Thymidinkinase bei BoHV-1 und anderen α -Herpesviren

Der ORF UL23 kodiert für das virale Enzym Thymidinkinase TK. Durch dieses Enzym wird die Phosphorylierung von Deoxythymidin innerhalb des Nukleinsäurestoffwechsels katalysiert. Sowohl für BoHV-1 als auch für EHV-1, wie auch für SuHV-1 konnte gezeigt werden, dass die Thymidinkinase der entsprechenden Viren nicht essentiell für die Replikation in Zellkultur ist (KIT UND QAVI, 1983; CORNICK ET AL., 1990, KIT ET AL., 1985). Die kombinierte Deletionsmutante BoHV-1 Δ gE Δ TK wurde von KAASHOEK ET AL., 1996 an Kälber intranasal appliziert. Mit dieser Mutante konnte eine protektive Immunität gegen eine Erkrankung hervorgerufen werden. Die Doppelmutante erwies sich als vergleichbar mit der einfach gE-deletierten Mutante. Auch für SuHV-1 wurde eine gE, TK- negative Vakzine getestet, immunisierte Schweine waren gegen eine klinische Erkrankung nach Belastungsinfektion mit einem virulenten SuHV-1-Stamm geschützt (KIMMAN, 1992).

2.8 BoHV-1 Bekämpfung

Grundlage der Bekämpfung in Deutschland ist die „Verordnung zum Schutz der Rinder vor einer Infektion mit dem Bovinen Herpesvirus Typ 1 (BHV1-Verordnung)“ in der aktuellen Fassung vom Dezember 2005. Die BoHV-1 Infektion gehört zudem seit 1996 zu den anzeigepflichtigen Tierseuchen. Ziel der Bekämpfung ist es, den Status eines BoHV 1 freien Landes zu erhalten, wie es z. B. den skandinavischen Staaten bereits gelungen ist. Da die aktuelle Seuchenlage der einzelnen Bundesländer stark differiert, sind die Bekämpfungsstrategien der Bundesländer ebenso different. Aus dem

bundesdeutschen Tiergesundheitsjahrbuch 2004 (Stand Mai 2005, TEUFFERT UND BEER, 2005) geht hervor, dass im Milchvieh und Mutterkuhbereich incl. Nachzucht bei einer bundesweiten Auswertung 70,8 % der Bestände BoHV-1 frei sind, 20,2 % der Bestände befinden sich in der Sanierungsphase und 9 % der Bestände sind der Kategorie „sonstige Betriebe“ zugeordnet. Im Bereich der Rindermastbestände waren 2004 14,5 % der Bestände BoHV-1 frei. Die Jungrinderaufzuchtbestände ergaben einen Prozentsatz von 61,8 %, welche als BoHV-1 frei gelten (TEUFFERT UND BEER, 2005). In Abhängigkeit von der bestehenden Prävalenz der Infektion können im wesentlichen zwei Sanierungskonzepte unterschieden werden. Bundesländer, deren Bestände eine niedrige Prävalenz aufweisen (z. B. Bayern), verfahren nach dem konventionellen Konzept und merzen seropositive Reagenten ohne Impfung. Andere Länder mit einem höheren Durchseuchungsgrad (z. B. Mecklenburg-Vorpommern) nutzen Impfungen nach dem Markerkonzept. Dieses Konzept basiert auf DIVA- (*differentiating infected from vaccinated animals*) Impfstoffen, bei denen das Glykoprotein E (gE) deletiert wurde (VAN OIRSCHOT, 1999). Dieser negative Markerimpfstoff erlaubt folglich die Unterscheidung geimpfter Tiere von Feldvirus-infizierten Tieren, da bei diesen auch der Nachweis von gE Antikörpern gelingt. Der Nachweis wird über sogenannte Blocking ELISA Tests geführt.

Prinzipiell lassen sich auch bei BoHV-1 Lebend-Impfstoffe von inaktivierten Vakzinen unterscheiden. Letztere sind zur Replikation im Impfling nicht mehr in der Lage. Vergleichende Untersuchungen zwischen inaktivierten und Lebend-Impfstoffen haben gezeigt, dass der attenuierte Lebend-Impfstoff die Virusausscheidung nach einer Belastungsinfektion deutlich mehr reduziert, als die inaktivierte Vakzine (BOSCH ET AL., 1996). Eine Feldstudie aus den Niederlanden zur Effizienz der Lebend gE-negativen Markervakzine hatte einerseits zum Ergebnis, dass diese Vakzine die Inzidenz und die Transmission von BoHV-1 Infektionen im Feld reduziert, andererseits werden zusätzliche Massnahmen wie Quarantänezeiten für zugekaufte Tiere, sowie deren Impfung angeraten, da die Vakzination nicht den Eintrag von Feldvirus in Herden verhindern konnte (MARS ET AL. 2001). Des weiteren sind Lebend-Impfstoffe weniger sicher als inaktivierte Vakzinen, zum einen bezüglich der Kontamination mit Fremdviiren, zum anderen können auch diese Vakzineviren Latenz etablieren (BARKEMA ET AL., 2001; LEMAIRE ET AL., 2000). Subunit Vakzinen würden diese Schwierigkeiten ausräumen und könnten auch zur Differenzierung von geimpften versus Feldvirus-infizierten Tieren eingesetzt werden. Allerdings sind die Untersuchungen zur Effizienz dieses Vakzintyps meist basierend auf dem Glykoprotein D noch uneinheitlich und zur Marktreife ist ein solches Produkt bisher noch nicht gekommen (BOSCH ET AL. 1996). Eine weitere Problematik sind neugeborene Kälber, da diese häufig maternale BoHV-1-Antikörper besitzen, die mit dem Impfvirus interferieren können. Außerdem besitzt das neonatale Immunsystem noch nicht die Fähigkeit, eine mit adulten Tieren vergleichbare zelluläre Immunantwort aufzubauen (VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, 2006). Ein aktueller Ansatz, um wenigstens die letztgenannte Problematik zu überwinden, ist die Vakzination mit einer attenuierten Lebend-Vakzine in Kombination mit einem

Adjuvants. ZIMMERMAN ET AL. 2006 konnten zeigen, dass auch Kälber, die maternale Antikörper über Kolostrumaufnahme erhalten hatten und nachfolgend gegen das Virus der Bovine Diarrhoe Virus (BVD) mit einer adjuvierten Lebendvakzine im Alter von 5 Wochen immunisiert wurden, vor einer Belastungsinfektion geschützt waren.

2.9 BAC-Mutagenese

Die Mutagenisierung von herpesviralen Genomen wurde bisher durch die Einführung von Modifikationen der herpesviralen DNA mittels homologer Rekombination erreicht. Diese Methodik basiert auf der Eigenschaft herpesviraler DNA *per se* infektiös zu sein. Die Einschleusung des viralen Genoms in eukaryotische Zellen führt somit zu infektiösen Virusnachkommen. Die Problematik, die mit dieser Mutagenisierungstechnik einhergeht besteht darin, dass ein enormer Selektionsdruck innerhalb der Virusnachkommenschaft entsteht. Dies kann dazu führen, dass neben der gewünschten Modifikation des Genoms kompensatorische Mutationen auftreten (OSTERRIEDER ET AL., 2003). Außerdem entstehen in der Folge der homologen Rekombination immer gemischte Viruspopulationen (solche, bei denen die Rekombination erfolgt ist und solche, bei denen die Rekombination nicht erfolgt ist), die im weiteren Verlauf separiert werden müssen.

Die Entwicklung von BACs (*bacterial artificial chromosome*) ermöglicht die gezielte Mutagenisierung herpesviraler Genome im prokaryotischen System. Dazu wird das vollständige virale Genom als extrachromosomales, zirkuläres Plasmid in *Escherichia coli* (*E. coli*) vermehrt. Dies wird durch die Insertion einer mini F-Plasmid-Kassette in die herpesvirale DNA ermöglicht (Abb. 2-3, A). Die erste Klonierung und Mutagenese eines gesamten und infektiösen Herpesvirus-Genom in *E. coli* wurde 1997 von MESSERLE ET AL. vorgestellt. Die gewünschten Modifikationen des viralen Genoms erfolgen im Anschluss an der BAC-DNA. Zur Anwendung kommen hierbei bereits bestehende Mutagenisierungssysteme aus dem prokaryotischen System. Die Verwendung von Antibiotikaresistenzgenen gestatten die definierte Selektion der mutierten Genome (Abb. 2-3, B). Durch die Transfektion der mutagenisierten DNA in eukaryotische Zellen, werden Virennachkommen generiert, die die gewünschten Genomveränderungen aufweisen (Abb. 2-3, C).

Neben weiteren human- und veterinärmedizinisch relevanten Herpesviren wurde auch das Genom des BoHV-1 erfolgreich als BAC etabliert (MAHONY ET AL., 2002; TRAPP ET AL., 2003).

Die Mutagenisierungstechniken des BAC-Systems wurden im Zuge dieser Arbeit angewandt, um Doppeldeletionsmutanten des BoHV-1 zu generieren. Deren Charakterisierung *in vitro* trägt zum Verständnis der Proteinfunktionen innerhalb des Replikationszyklus bei. Die Vakzineignung wurde innerhalb einer *in vivo* Studie überprüft.

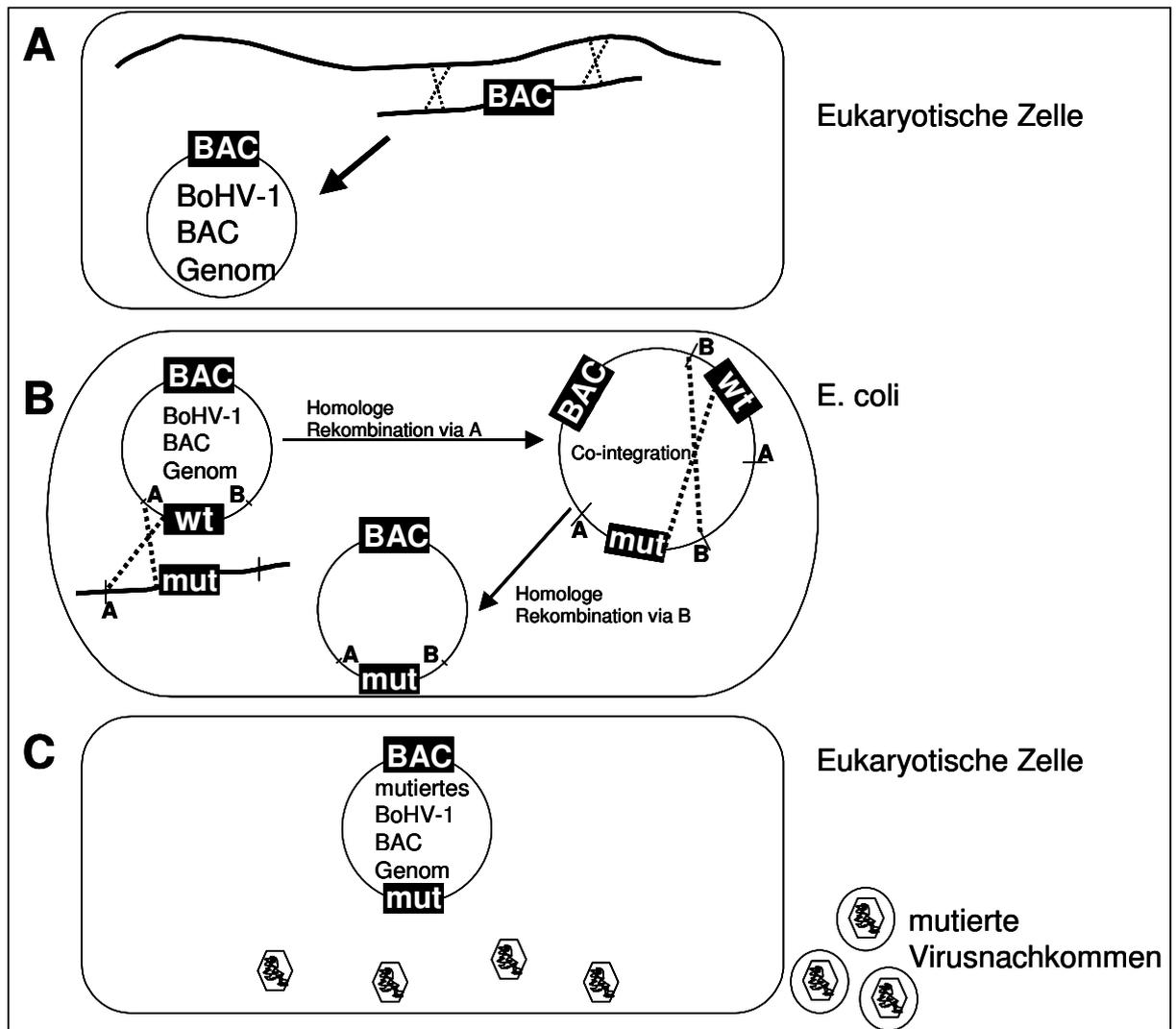


Abbildung 2-3: Schematische Darstellung der Klonierung und Mutagenese des BoHV-1-Genoms:

(Modifiziert nach Messerle et al., 1997)

(A) Virale DNA und ein Rekombinationsplasmid mit der BAC-Kassette werden in eukaryotische Zellen transfiziert. Nach Insertion der BAC-Kassette in das herpesvirale Genom, werden zirkuläre DNA-Stadien in *E. coli* elektroporiert. (B) Die Mutagenisierung des BAC-Genoms in *E. coli* vollzieht sich durch homologe Rekombination des mutierten Genomabschnitts. Die Selektion der veränderten Genome erfolgt im prokaryotischen System. (C) Nach Transfektion des mutierten BAC-Genoms resultiert eine Virusnachkommenschaft, mit den eingeführten genomischen Veränderungen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zellen

- MDBK; RIE261 (Rind, Niere; permanente Zelllinie; Zellbank für Zelllinien in der Veterinärmedizin [ZBV] Friedrich-Loeffler-Institut [FLI] Insel Riems)
- PT; RIE11 (Schafniere; permanente Zelllinie; ZBV FLI Insel Riems)
- KOP-R; RIE244 (Ösopharynxgewebe; diploide Zelllinie; ZBV FLI Insel Riems)

3.1.2 Versuchstiere

- Kaninchen, New Zealand White (Harlan Winkelmann, Borcheln)
- Rinder, Fleckvieh (Rinderzuchtservice Grub, Grub)

3.1.3 Virusstämme

- BoHV-1 Stamm Schönböken (Matheka und Straub, 1972; Virusbank FLI Insel Riems)
- BoHV-1 Stamm 2204 (Feldvirusisolat, Virusbank FLI Insel Riems)

3.1.4 Bakterien und Plasmide

- E. coli Stamm DH10B (One Shot[®] Electrocomp[™] Gene-Hogs[®], Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
- E.coli Stamm TOP10F (TOP10F One Shot[®], Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
- EL250 (LEE ET AL., 2001)
- pACYC177 (Fa. New England Biolabs, Frankfurt a. M.)
- pCR[®]2.1-TOPO[®] (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
- pKD46 (DATSENKO UND WANNER, 2001)
- pTZ18RflanksgE (TRAPP ET AL., 2003)
- pKD13 (LEE ET AL., 2001)

- pTgEr (TRAPP ET AL., 2003)

3.1.5 BAC (bacterial artificial chromosome)

- pBHV-1 Δ gE (enthält das Genom des BoHV-1 Stammes Schönböken, die genomische Information für das gE wurde partiell deletiert, TRAPP ET AL., 2003)

3.1.6 Antikörper, Antiseren und Markierungsreagenzien

- mAK 2-1 (anti-BoHV-1-gE; freundlicherweise von W. Fuchs und B. Köllner, FLI Insel Riems zur Verfügung gestellt)
- pAK gD (anti-BoHV-1-gD; freundlicherweise von G. Keil, FLI Insel Riems zur Verfügung gestellt)
- pAK gM (anti-BoHV-1-gM, freundlicherweise von K. Bienkowska-Szewczyk, Department of Molecular Virology, Faculty of Biotechnology, Gdansk University, Gdansk, Poland zur Verfügung gestellt)
- pAK UL49.5 (anti-BoHV-1-UL49.5-Genprodukt, freundlicherweise von K. Bienkowska-Szewczyk, Department of Molecular Virology, Faculty of Biotechnology, Gdansk University, Gdansk, Poland zur Verfügung gestellt)
- pAK UL49-Peptid (anti-BoHV-1-pUL49, selber produziert (siehe 3.2.8))
- pAK TK-Peptid (anti-BoHV-1-TK, selber produziert (siehe 3.2.8))
- Testkit zum Nachweis von gB-Antikörpern gegen das Virus der Infektiösen Bovinen Rhinotracheitis (BHV1); (Fa. IDEXX GmbH, Wörrstadt)
- Testkit zum Nachweis von gE-Antikörpern gegen das Virus der Infektiösen Bovinen Rhinotracheitis (BHV1); (Fa. IDEXX GmbH, Wörrstadt)
- anti-Maus IgG, Fluoreszenz-markiert (Alexa[®]Fluor[®]488, Alexa[®]Fluor[®]647 Fa. Molecular Probes, Eugene, USA)
- anti-Maus IgG, POD-markiert (Fa. Dianova, Hamburg)
- anti-Kaninchen IgG, Fluoreszenz-markiert (Alexa[®]Fluor[®]488, Fa. Molecular Probes, Eugene, USA)
- anti-Kaninchen IgG, POD-markiert (Fa. Dianova, Hamburg)
- Vybrant[™] Cell-Labeling Solutions DiI (Fa. Molecular Probes, Eugene, USA)

3.1.7 Chemikalien

- Aceton (Fa. Roth, Karlsruhe)
- Acrylamid (Fa. Sigma, Deisenhofen)
- Adjuvantien
komplettes Freund`s Adjuvant (Fa. Sigma, Deisenhofen),
inkomplettes Freund`s Adjuvant (Fa. Sigma, Deisenhofen)
Blockpolymer
- Agarose (Fa. Gibco BRL, Eggenstein)
0,7-1,5 % (w/v) in 1 x TAE-Puffer
- Ammoniumpersulfat (APS; Fa. Sigma, Deisenhofen)
10 % (w/v) in *A. dest.* (Stammlösung)
- Antibiotika für Zell- bzw. Bakterienkulturmedien
100 µg/ml Ampicillin (Endkonzentration; Fa. Sigma, Deisenhofen)
30 µg/ml Chloramphenicol (Endkonzentration; Fa. Sigma, Deisenhofen))
50 µg/ml Kanamycin (Endkonzentration; Fa. Sigma, Deisenhofen)
1% (v/v) Penicillin-Streptomycin Lsg. (Endkonzentration; Fa. Sigma, Deisenhofen)
- Bromphenolblau (Fa. Merck, Darmstadt)
- *Complete Mini, EDTA-free*, Protease inhibitor (Fa. Roche, Mannheim)
- Citronensäure (Fa. Roth, Karlsruhe)
- Desoxyribonukleotid-5`-Triphosphate (dNTPs; Fa. Promega, Mannheim)
- 1,4- Diazabicyclo[2,2,2]-octan (DABCO) (Fa. Sigma, Deisenhofen)
- Difco™ SelectAPS™ Super Broth (Fa. Becton, Dickinson and Company, Sparks USA)
- DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II™ (Fa. Roche, Mannheim)
- Essigsäure (Fa. Riedel-de Haen, Seelze)
- Ethidiumbromid (Fa. Sigma, Deisenhofen)
- Ethanol, absolut (Fa. Roth, Karlsruhe)
- EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure; Fa. Serva, Heidelberg)
- FKS (Fötale Kälberserum; Fa. Gibco BRL, Eggenstein)
- D-(+)-Glucose (Fa. Sigma, Deisenhofen)
- L-Glutamin (Fa. Sigma, Deisenhofen)
- Glycerin (Fa. Roth, Karlsruhe)
- Glycin (Fa. Roth, Karlsruhe)

- HEPES (N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N`-2-ethansulfonsäure; Fa. Serva, Heidelberg)
- IPTG (Isopropylthio- β -D-Galaktosid; Fa. Sigma, Deisenhofen)
100 mM in *A. dest.* (Gebrauchslösung)
- Isopropanol (2-Propanol; Fa. Roth, Karlsruhe)
- Kaliumchlorid, KCl (Fa. Merck, Darmstadt)
- Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4 (Fa. Roth, Karlsruhe)
- Kalziumchlorid, CaCl_2 (Fa. Roth, Karlsruhe)
- 1 kbp DNA Ladder + DNA Ladepuffer (6 x; Fa. Promega, Mannheim)
- Kodak GBX Entwickler (Fa. Sigma, Deisenhofen)
- Kodak GBX Fixierer (Fa. Sigma, Deisenhofen)
- Kristallviolett (Fa. Merck, Darmstadt)
- LB (Luria-Bertani) BROTH (Lennox L broth), Bouillon (Fa. Sigma, Deisenhofen)
- LB AGAR (Lennox L Agar; Fa. Sigma, Deisenhofen)
- Lipofectin[®] Transfektions-Reagenz (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
- Lithiumchlorid, LiCl (Fa. Merck, Darmstadt)
- Maleinsäure (Fa. Sigma, Deisenhofen)
- Magermilchpulver (Fa. Humana Milchunion, Herford)
- Magnesiumchlorid, MgCl_2 (Fa. Merck, Darmstadt)
- Mammalian Transfection Kit (Fa. Stratagene, Heidelberg)
- MEM (*Minimal Essential Medium*, mit Earle`s Salzen und Glutamin; Fa. Biochrom, Berlin)
- β -Mercaptoethanol (Fa. Serva, Heidelberg)
- Methanol, absolut (Fa. Roth, Karlsruhe)
- Methocel MC (Fa. Fluka, Buchs, Schweiz)
- Molekulargewichtsmarker BenchMark[™] Pre-Stained Protein Ladder (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
- MOPS (3-Morpholinopropansulfonsäure; Fa. Fluka, Buchs, Schweiz)
- Natriumacetat, Na-Acetat (Fa. Roth, Karlsruhe)
- Natriumchlorid, NaCl (Fa. Roth, Karlsruhe)
- Natriumdihydrogenphosphat, NaH_2PO_4 (Fa. Roth, Karlsruhe)
- Natriumhydrogenphosphat, Na_2HPO_4 (Fa. Roth, Karlsruhe)

- Natriumhydroxid, NaOH (Fa. Scharlau, Barcelona, Spanien)
- PCR DIG Probe Synthesis Kit TM (Fa. Roche, Mannheim)
- Peptide, Keyhole Limpet Hemicyanin (KLH)- konjugiert, (Fa. EMC micro-collections, Tübingen)
- Puregene[®] DNA Isolation Kit (Fa. Gentra Systems, Minneapolis, USA)
- QIAquick[®] Gel-Extraktions Kit (Fa. Qiagen, Hilden)
- QIAfilter[®] Midi oder Maxi Kit (Fa. Qiagen, Hilden)
- ReddyMix TM PCR Master Mix (Fa. Abgene, Surrey, Großbritannien)
- Roti[®]-Phenol (pH 8,0; Fa. Roth, Karlsruhe)
- Salzsäure, HCl (Fa. Roth, Karlsruhe)
- SOC Bouillon (Fa. Fluka, Buchs, Schweiz)
- SDS (*Sodium-Dodecylsulfat*; Fa. Merck, Darmstadt)
- Sucrose (Fa. Serva, Heidelberg)
- SuperSignal[®] West Pico Chemolumineszenz-Substrat (Fa. Pierce, Rockford, USA)
- NNN`N`-TEMED (Tetramethylethylendiamin; Fa. Sigma, Deisenhofen)
- TOPO TA Cloning[®] Kit (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
- Tris(2-amino-hydroxymethyl-1,3-propandiol; Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
- Triton X-100 (Fa. Serva, Heidelberg)
- Tween 20 (Fa. Serva, Heidelberg)
- X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactosid; Fa. Sigma, Deisenhofen)
40 mg/ml DMF (Gebrauchslösung)

3.1.8 Enzyme

- Platinum *Pfx*-DNA-Polymerase + 10 x Amplifikationspuffer (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
- Proteinase K (Fa. Boehringer, Mannheim)
20 mg/ml Tris-Cl (50mM, pH 8,0 Stammlösung)
- Restriktionsendonukleasen + 10 x Endonukleasepuffer, 100 x BSA (Bovines Serumalbumin; Fa. Boehringer, Mannheim; New England Biolabs, Schwalbach; Fa. Promega, Mannheim)

- Ribonuklease A (Fa. Sigma, Deisenhofen) 10 mg/ml TE (pH 8,0; Stammlösung) 15 min bei 100°C erhitzt, zur Inaktivierung von DNAsen
- *Taq*-DNA-Polymerase + 10 x Amplifikationspuffer (Fa. Promega, Mannheim)
- T4-DNA-Ligase + 10 x Ligationspuffer (Fa. Roche, Mannheim)
- *Thermal Ace*-DNA-Polymerase + 10 x Amplifikationspuffer (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
- Trypsin (Fa. Serva, Heidelberg)

3.1.9 Lösungen und Puffer

- Acrylamidlösung (30%) für SDS-PAGE
29,2 g Acrylamid
0,8 g Bisacrylamid in 100 ml *A. dest.* gelöst, filtriert
- Blocking-Puffer für *Western Blotting*
10 % Magermilchpulver in TBS-T
- CBS (*citrate-buffered saline*)
40 mM Citronensäure
10 mM KCl
135 mM NaCl mit NaOH auf pH 3,0 eingestellt
- Detektionspuffer für *Southern Blotting*
0,1 M Tris-HCl
0,1 M NaCl mit NaOH auf pH 9,5 eingestellt
- Difco™ SelectAPS™ Super Broth Medium
49,1 g Difco™ SelectAPS™ Super Broth Pulver
5 ml Glycerin
in 1l *A. dest.*, autoklavieren
- Ethidiumbromidfärbelösung
0,5 µg/ml Ethidiumbromid in *A. dest.*
- Fluoreszenzerhaltungsbuffer
2,5 g 1,4-Diazabicyclo[2,2,2]-octan (DABCO)
in 90 ml Glycerin lösen
10 ml PBS mit HCL auf pH 8,6 einstellen
- Gefriermedium für Bakterien
60% (v/v) SOB
40% (v/v) Glycerin
1/1 mit Bakterienkultur mischen
- Glycerinlösung für elektrokompente Bakterien
20% Glycerin, bei 120°C autoklaviert

- Glycerinschocklösung für Kalziumphosphat-Transfektion
20% einer 87%igen bei 120 °C autoklavierten Glycerinlösung
50% Hepeslösung 2x
30% A.dest
- Hepeslösung 2x für Glycerinschocklösung
50 mM Hepes
1,5 mM Na₂HPO₄
280mM NaCl
- LB-Agar-Platten
35 g LB AGAR in 1 l A. dest., bei 120°C autoklaviert
- LB-Medium
20 g LB BROTH in 1 l A. dest., bei 120°C autoklaviert
- LB-Selektions-Agar-Platten
LB-Agar
+ 100 µg Ampicillin/ml Agar
+ 30 µg Chloramphenicol/ ml Agar
+ 50 µg Kanamycin/ ml Agar
- LB-Selektions-Medium
LB-Medium
+ 100 µg Ampicillin/ml Medium
+ 30 µg Chloramphenicol/ ml Medium
+ 50 µg Kanamycin/ ml Medium
- LB-X-Gal-IPTG-Agar-Platten für Blau-Weiß Selektion
+ 40 µl X-Gal
+40 µl IPTG pro LB-Agar-Platte
- Lösung 1 für Plasmidpräparationen
25 mM Tris
10 mM EDTA
50 mM Glucose
- Lösung 2 für Plasmidpräparationen
0,2 M NaOH
1% SDS
- Lösung 3 für Plasmidpräparationen
3 M Na-Acetat mit Eisessig auf pH 4,3 eingestellt
- Maleinsäurepuffer
0,1 M Maleinsäure
0,15 M NaCl mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt, sterilfiltriert

- Methocel-Medium (1 x)
 - 10 g Methocel
 - 3,76 g MEM
 - in 400 ml *A. dest.* gelöst, bei 120°C autoklaviert
 - + 880 mg NaHCO₃ in 10 ml *A. dest.* gelöst, sterilfiltriert
 - + 4 ml L-Glutamin 200 mM (Stammlösung)
 - 1 x Methocel 1/4 mit Medium verdünnt (Gebrauchslösung)
- PBS (*phosphate buffered saline*; pH 7,4)
 - 137 mM NaCl
 - 2,7 mM KCl
 - 10 mM Na₂HPO₄
 - 2 mM KH₂PO₄
- Probenpuffer (4x), reduzierend
 - 4 ml SDS, 20% (*w/v*)
 - 1 ml Glycerin
 - 0,5 ml 1 M Tris-HCl (pH 6,8)
 - 0,1 ml Bromphenolblau
 - 5 % (*v/v*) β-Mercaptoethanol
 - mit *A. dest.* ad 25 ml
- Probenpuffer (4x), nicht reduzierend
 - 2ml 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)
 - 1,6 ml Glycerin
 - 3,2 ml 10% (*w/v*) SDS
 - 800 µl *A. dest.*
 - 400 µl Bromphenolblau, 2%
- RNaseA-Lösung
 - 20 µl RNaseA-Stammlösung in 10 ml TE (pH 8,0)
- SDS-PAGE-Elektrophorese-Puffer (10 x PAGE- Elektrophorese-Puffer)
 - 250 mM Glycin
 - 25 mM Tris
 - 1/10 mit *A. dest.* Verdünnt
 - + 0,1% (*w/v*) SDS
- SSC (*standard saline citrate*; 20 x)
 - 3 M NaCl
 - 0,3 M Natriumcitrat mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt
- Stripping Puffer für *Southern blotting*
 - 0,2 M NaOH
 - 0,1 % (*w/v*) SDS

- Stripping Puffer für *Western blotting*
0,2 M Glycin
1% (w/v) SDS mit HCl auf pH 2,0
- 35% (v/v) Sucroselösung in PBS
40% (v/v) Sucroselösung in PBS
60% (v/v) Sucroselösung in PBS
- TAE-Elektrophorese-Puffer (50 x) für Agarosegel-Elektrophorese
2 M Tris
0,25 M Na-Acetat
0,05 M EDTA mit Eisessig auf pH 7,8 eingestellt
- TBS (*Tris-buffered saline*; 10 x)
100 mM Tris-Cl (pH 7,4)
2 M NaCl
18 M CaCl₂
200mM MgCl₂
- TBS-T
TBS mit 0,1% (v/v) Tween 20
- TE (pH 8,0)
10 mM Tris
1 mM EDTA
- Transfer-Puffer für *Southern Blotting*
0,6 M NaCl
0,4 M NaOH
- Transfer-Puffer für *Western Blotting*
10% (v/v) Methanol
5% (v/v) PAGE-Puffer (10 x)
- Triton X-100 Lysispuffer für *Western Blotting*
0,02 M Na₂HPO₄
2 mM EDTA
0,15 M NaCl
1% (v/v) Triton X-100
in *A.dest*, pH 7,6
- Tris-Puffer für SDS-PAGE-Sammelgele
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)
- Tris-Puffer für SDS-PAGE-Trenngele
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)

- Trypsinlösung
136 mM NaCl
2,6 mM KCl
8 mM NaH₂PO₄
1,5 mM KH₂PO₄
3,3 mM EDTA
0,125% (w/v) Trypsin
- Waschpuffer I *Southern Blotting*
2 x SSC
0,1% (v/v) SDS
- Waschpuffer II *Southern Blotting*
0,5 x SSC
0,1% (v/v) SDS
- Waschpuffer III *Southern Blotting*
0,1 M Maleinsäurepuffer
0,3% (v/v) Tween 20

3.1.10 Geräte, Laborhilfsmittel und Verbrauchsmaterialien

- Bildbearbeitungssoftware Adobe Photoshop Version 6.0 (Fa. Adobe Systems, San Jose, USA)
- Bildverarbeitungssoftware analySIS (Fa. SoftImaging System GmbH, Münster)
- Brutschrank B6 (Fa. Heraeus, Hanau)
- CO₂-Brutschrank QMI300VBA (Fa. Nunc, Wiesbaden)
- Digitalkamera CAMEDIA C-3040ZOOM (3,3 Megapixel; Fa. Olympus, Hamburg)
- E.coli Pulser[®] Elektroporationsküvetten (Fa. Biorad, München)
- Elektroporator, Gene Pulser Xcell /CE Module/ PC Module (Fa. Biorad, München)
- Fluoreszenzeinrichtung IX-RFAC (Fa. Olympus, Hamburg)
- Fluoreszenz Mikroskop IX51 (Fa. Olympus, Hamburg)
- Gel-Blotting-Papier (Fa. Schleicher und Schuell, Dassel)
- Gel-Dokumentationssystem ICU-1 (Fa. Herolab, Wiesloch)
- Hybond[™] -N+, Nylonmembran (Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
- Inkubationsschüttler C25KC (Fa. New Brunswick Scientific, Nürtingen)
- Inversionsmikroskop TMS-F (Fa. Nikon, Düsseldorf)

- Konfokales Laserscannmikroskop LSM 510 (Fa. Carl Zeiss, Jena)
Laser: Argon Laser: 450 – 514 nm; Helium Neon Laser: 543 nm; Helium Neon Laser: 633 nm
- Magnetrührer RCT basic (Fa. IKA, Staufen)
- Mini Hybridisation Ofen (Fa. Biometra, Göttingen)
- Mini-PROTEAN[®] 3 Cell, Elektrophorese-Zelle (Fa. Biorad, München)
- Mini Trans-Blot[®] Elektrophorese-Transfer-Zelle (Fa. Biorad, München)
- Multipette[®] plus (Fa. Eppendorf, Hamburg)
- Parafilm (Fa. Alcan Packaging, Neenah, USA)
- pH-Meter 766 Calimatic (Fa. Knick, Berlin)
- Pipette Reference[®] (0,2-2 µl; 0,5-10 µl; 2-20 µl; 10-100 µl; 50-200 µl; 100-1000 µl; Fa. Eppendorf, Hamburg)
- Pipette Research[®] (0,5-10 µl; 2-20 µl; 10-100 µl; 100-1000 µl; Fa. Eppendorf, Hamburg)
- Pipettierhelfer accu jet[®] (Fa. Brand, Wertheim)
- PowerPac 200 Power Supply (Fa. Biorad, München)
- Präzisionswaage AP 110E (Fa. Ohaus, Florham Park, USA)
- Präzisionswaage SC 6010 (Fa. Ohaus, Florham Park, USA)
- Primer Analysis Software Oligo 4.1 (Fa. Biosciences, Plymouth, USA)
- Protran[®] Nitrocellulose Transfermembran (Fa. Schleicher und Schuell, Dassel)
- Röntgenfilm Hyperfilm[™] MP (Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
- Sequenzierautomat, Genetic Analyzer 3130 (Fa. Applied Biosystems, Foster City, USA)
- Sicherheitswerkbank (Fa. Heto-Holten, Allerød, Dänemark)
- Spektralphotometer GeneQuant *pro* (Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
- StratalinkerR UV-Crosslinker (Fa. Stratagene, Heidelberg)
- Sub-Cell[®] GT Agarosegel-Elektrophorese System (Fa. Biorad, München)
- Thermocycler Primus 96 *plus* (Fa. MWG-Biotech, Ebersberg)
- Thermomixer comfort (Fa. Eppendorf, Hamburg)
- Transferpette[®] (20-200 ml) (Fa. Brand, Wertheim)

- Ultraschallgerät Cell Disruptor B15 Branson (Fa. Heinemann, Schwäbisch-Gmünd)
- Ultrazentrifuge
Ultrazentrifuge LE 70 (Fa. Beckman, Palo Alto, USA) Ultrazentrifuge Optima TL (Fa. Beckman, Palo Alto, USA)
- Vortex-GenieTM (Fa. Scientific Industries, USA)
- Wasserbad (Fa. GFL, Burgwedel)
- Zellkulturplastikwaren (Fa. Costar, Cambridge, USA; Fa. Sarstedt, Nümbrecht)
Zellkulturflaschen (170 cm², 75 cm², 25 cm²) 6-, 24- und 96- Lochplatten
- Zentrifugen:
Kühlzentrifuge 5804R (Fa. Eppendorf, Hamburg)
Megafuge 1.0 R (Fa. Heraeus, Osterode)
mitteltourige Zentrifuge J2-HS (Fa. Beckman, Palo Alto, USA)
Spectrafuge 16M Microcentrifuge (Fa. Labnet, Nürtingen)
- Zentrifugenröhrchen (Fa. Beckman, Palo Alto, USA)
- Zentrifugenrotoren:
SW40; SW32 (Fa. Beckman, Palo Alto, USA)
- Zellschaber (Fa. Greiner, Frickenhausen)

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur und Virusanzucht

3.2.1.1 Zellkultur

Bei allen Untersuchungen wurden KOP-R-, PT- und MDBK-Zelllinien verwendet. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), welches mit 10% FKS (30 min bei 56°C hitzeinaktiviert) supplementiert wurde. In regelmäßigen Abständen wurden die Zellen, nach einmaligem Waschen mit PBS-Puffer, durch Zugabe einer Trypsin-haltigen Lösung von der Kulturflasche abgelöst und in frischem Medium resuspendiert. Ein Teil der Suspension wurde in der Flasche belassen, der Rest optional auf weitere Zellkulturgefäße verteilt oder verworfen. Auf diese Weise wurden die Zellen bis zu 15mal passagiert, dann wurde auf jüngere Passagen, welche durch die hauseigene Zellbank zur Verfügung stehen, zurückgegriffen. Die Zellen wurden unter Standardbedingungen bei 37°C in feuchter Atmosphäre mit einem CO₂-Anteil von 5% inkubiert.

3.2.1.2 Vermehren von Viren in Zellkultur

Konfluent gewachsene MDBK-Zellen wurden mit einer Virussuspension beimpft und bis zur Ablösung des Zellrasens, nach 24 bis 72h, unter Standardbedingungen inkubiert. Durch Zentrifugation mit 1500 rpm (Umdrehungen pro Minute) für 10 min wurde der Zell-Debris vom Überstand getrennt und Letzterer wurde für weitere Untersuchungen aliquotiert. Die Lagerung der Virusaliquots erfolgte bei -70°C . Nach dem Auftauen einzelner Aliquots auf Eis wurde deren Virustiter bestimmt.

3.2.1.3 Virustitration

MDBK-Zellen wurden zur Durchführung von Virustitrationen in 96-Loch-Mikrotiterplatten genutzt (MAYR ET AL., 1974). Hierzu wurden die infektiösen Virusaliquots in \log_{10} -Verdünnungsschritten verdünnt und auf die Zellen gegeben und nachfolgend für 3 Tage unter Standardbedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mikroskopisch auf die Ausbildung eines zpE (zytopathogener Effekt) hin untersucht. Der Gehalt an infektiösen Viruspartikeln wurde als $\text{KID}_{50}/\text{ml}$ (kulturinfektiöse Dosis 50% pro ml) nach der Methode von Spaerman und Kaerber (MAYR ET AL., 1974) berechnet.

3.2.1.4 Kontroll-Zellkulturüberstände (mock)

Um Einflüsse auf Infektionsexperimente durch Medienkomponenten ausschließen zu können, wurden virusfreie Kontrollüberstände bei der Bereitung der Virus-Stocks gewonnen. Hierzu wurden die Überstände nicht-infizierter Kulturen nach dem gleichen Muster wie die der infizierten Zellen behandelt. Die Virusfreiheit wurde durch Beimpfen permissiver MDBK-Zellen geprüft. Die Kontrollüberstände mit der Bezeichnung "mock" wurden bei -70°C gelagert.

3.2.1.5 Virionenaufreinigung

Um gereinigte Virionen zu generieren, wurden MDBK-Zellen in 12 TC175 Zellkulturflaschen so ausgesät, dass nach 24h ein annähernd geschlossener Zellrasen erreicht wurde. Diese Zellen wurden im Folgenden mit dem aufzureinigendem Virus 48h bei 37°C unter möglichst geringem Medium-Einsatz inkubiert. Die Zentrifugation des infektiösen Zellkulturüberstandes bei 3000 rpm für 15 min entfernt Zelldebris aus der Flüssigkeit. Der Überstand wurde in Zentrifugenröhrchen überführt und mit 6 ml einer 35% Sucroselösung unterschichtet. Dieser Ansatz wurde 1h bei 4°C und 20.000 rpm zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in ca. 150 ml PBS-Lösung aufgenommen und anschließend auf einen kontinuierlichen 40-60% Sucrosegradienten (10ml) gegeben. Der so beschickte Gradient wurde bei 25.000 rpm und 4°C für 1h zentrifugiert. Die Virionen stellen sich anschließend als weißliche Bande im Gradienten dar, diese Bande wurde isoliert und durch einen Waschschrift mit PBS-Lösung von

verbleibenden Sucroseresten befreit. Die so gewonnenen Virionen wurden bei -70°C gelagert (HAMPL ET AL., 1984).

3.2.1.6 Gewinnung von Zelllysaten

In einer Vertiefung (Well) einer Sechs-Well-Zellkultur-Schale wurden MDBK-Zellen (Anzahl $\sim 1 \times 10^6$) mit einer MOI (*multiplicity of infection*) von 5 infiziert und nach 16 h lysiert. Hierzu wurden die Zellen mit einem Zellschaber von ihrer Unterlage abgelöst und mit dem Medium in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zentrifugation (10 min, 6000 rpm) wurde der Zellkulturüberstand verworfen und das Zellpellet in $300 \mu\text{l}$ mit einem Protease-Inhibitor-Mix versetztem Lysis-Puffer Triton x100 aufgenommen. Die Lysate wurden $2 \times 10 \text{ sec}$ mit Ultraschall behandelt, um die DNA zu fragmentieren. Bis zur Verwendung in der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (siehe Kapitel 3.2.7.1) wurden die Zelllysate bei -70°C gelagert.

3.2.1.7 Präparation von Virus-DNA

Für die Präparation viraler DNA wurden MDBK-Zellen infiziert und unter Standardbedingungen bis zur Ablösung des Zellmonolayers inkubiert. Anschließend wurde die DNA mit Hilfe des Puregene® DNA Isolation Kits nach Herstellerangaben aufgereinigt. Wenn die virale DNA im Weiteren als Template-DNA in Cycle-Sequencing-Untersuchungen (siehe Kapitel 3.2.5.4) eingesetzt werden sollte, wurde die DNA mittels des QIAamp DNA Blood Mini Kit® nach Herstellerangaben isoliert.

3.2.1.8 DNA- Transfektion in eukaryotische Zellen

Die Transfektion dient dazu, DNA-Moleküle direkt in eukaryotische Zellen einzuschleusen. Die DNA verbleibt extrachromosomal in der Zelle wodurch eine transiente Expression erreicht wird. Bei Kotransfektionen werden zwei unterschiedliche DNA-Moleküle in dieselbe Zellkulturen transfiziert. Besitzen die DNA-Moleküle homologe Sequenzbereiche, so kann es dabei zur homologen Rekombination kommen.

Kalziumphosphat-Transfektion

Das Prinzip der Kalziumphosphat-Transfektion beruht auf der Bildung von DNA-Kalziumphosphat-Ko-Präzipitaten, welche an die Zelloberfläche adsorbieren. Durch Endozytose werden diese Präzipitate in die Zelle aufgenommen. Ursprünglich war dieses Verfahren zur Steigerung der Infektiosität viraler Nukleinsäuren entwickelt worden (GRAHAM UND VAN DER EB, 1974).

Zellen des Typs MDBK und KOP-R wurden 24h vor der Transfektion in einer solchen Weise in eine Sechs-Well-Platte ausgebracht, dass die Zellen nach 24h eine Dichte von etwa 60-80% aufwiesen. Die Transfektion erfolgte mit dem *Mammalian Transfection Kit*® (Stratagene) nach Herstellerangaben. $5 \mu\text{g}$ der zu transfizierenden DNA wurden

mit A. dest. gemischt, so dass das Endvolumen 75 μ l betrug. Bei einer Kotransfektion wurden entsprechend von jeder DNA 2,5 μ g eingesetzt. Zu diesem Transfektionsansatz wurde 8,3 μ l Solution 1 gegeben und eine gründliche Durchmischung mittels vortexen erreicht. Nachfolgend wurden 83,3 μ l der Solution 2 dem Transfektionsansatz tropfenweise hinzugefügt. Nachdem dieser Ansatz 15 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde, wurde er den Zellen, die mit 2 ml frischem Medium versehen worden waren, tropfenweise zugegeben. Nach einer weiteren vierstündigen Inkubation unter Standardbedingungen erfolgte zusätzlich ein Glycerolschock, der vom Hersteller nicht angegeben ist. Dazu wurde der Zellkulturüberstand von den Zellen entfernt und diese mit serumfreien Waschmedium gewaschen und dieses serumfreie Medium ebenfalls entfernt. Anschließend wurde pro Well 1 ml der 4 °C kalten Glycerolschocklösung zugesetzt. Nach einer strikten Inkubation der Zellen von 2 min wurden der kalten Schocklösung 2 ml des Waschmediums zugesetzt. Ein weiterer Waschschrift mit serumfreiem Medium schloss sich an, bevor die Zellen mit 2 ml des ihnen zugeordneten Erhaltungsmediums versetzt wurden. Aus der DNA-Transfektion rekonstituierte Virussuspensionen wurden durch zweimaliges Gefriertauen gewonnen, titriert und auf permissiven MDBK-Zellen passagiert. Homogene, rekombinante Viruspopulationen wurden durch Plaquereinigung erhalten.

Lipofektion

Alternativ zur Kalziumphosphat-Transfektion wurde als biologische Transfektionsmethode die Lipofektion verwendet (FELGNER ET AL., 1987). Die Komplexbildung der DNA durch Liposomen aus dem kationischen 1,2-Dioleoyloxypropyl-3-trimethylammoniumbromid (DOTMA) und Dioleoylphosphatidyl-Ethanolamin (DOPE) durch eine ionische Bindung stellt das Wirkprinzip der Lipofektion dar. Die positiv geladenen DNA-Liposomen-Komplexe binden vermutlich negativ geladene Sialinsäurereste auf der Zelloberfläche und werden auf nicht exakt geklärte Weise in die Zelle und den Kern importiert. Mit Hilfe der Lipofectin®-Liposomensuspension wurden semikonfluente KOP-R-Zellen nach Herstellerangaben transfiziert. Für die Generierung rekombinanter Viren wurden 1 bis 5 μ g mutagenisierte, virale BAC-DNA transfiziert, oder 1 bis 5 μ g virale Wildtyp-DNA gemeinsam mit 5 bis 10 μ g Plasmid-DNA kotransfiziert. Bis zur Ausbildung von Virusplaques wurden die Zellen unter Standardbedingungen inkubiert.

3.2.2 DNA

3.2.2.1 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

DNA-Fragmente lassen sich mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) gezielt amplifizieren. Ein Zyklus einer Standard-PCR mit 30

bis 35 Reaktionszyklen (SAIKI ET AL., 1988) besteht aus drei Einzelschritten: Strangtrennung der Amplifikationsmatrize (Template) bei 95°C (Denaturierung), Hybridisierung der Primer an das einzelsträngige Template bei 54°C (*Annealing*), und schrittweise Addition von Desoxyribonukleotideinheiten (dNTPs) an das Primer-3'-Ende bei 72°C, durch eine hitzestabile DNA-Polymerase (Elongation). Primer sind synthetische Oligonukleotide, die komplementär zu den DNA-Sequenzen sein müssen, welche die gewünschte Sequenz flankieren. Primer mit 20 bis 30 sequenzspezifischen Basenpaaren (bp) für das Template wurden mit Hilfe der *Primer Analysis Software* OLIGO 4.1 abgeleitet, modifiziert und als Oligonukleotide (Fa. MWG-Biotech, Ebersberg) synthetisiert. Die Bedingungen für die PCR und die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes wurden spezifisch an die Primer und das Amplifikat angepasst.

Tabelle 3.1 Für die TK-Deletion verwendete Primer: Den Positionsangaben liegen online verfügbare BoHV-1 Sequenzdaten zugrunde (NCBI Sequence NC_001847). Unterstrichene Buchstaben bezeichnen pKD13-spezifische Sequenzen, die für das Kanamycinresistenzgen kodieren. BoHV-1 Sequenzen sind durch fett- und kursivgedruckte Buchstaben gekennzeichnet.

Position	Strang	Sequenz (5' → 3')
63682	positiv	<i>CTCTGCTACCCCTTCGCCCGCTACTGCCTC CGCGAGATCAACGCGGAAGATAGCGATTG TGTAGGCTGGAGC</i>
63975	negativ	<i>GCCATTTTGCATTCATCACAACTGGGGTCT GCGAGCGCGGCCAATGCATTTCGACCTGC AGTTCGAAGTTC</i>

Tabelle 3.2 Für die UL49-Deletion verwendete Primer: Den Positionsangaben liegen online verfügbare BoHV-1 Sequenzdaten zugrunde (NCBI Sequence NC_001847). Unterstrichene Buchstaben bezeichnen pACYC177-spezifische Sequenzen, die für das Kanamycinresistenzgen kodieren. BoHV-1 Sequenzen sind durch fett- und kursivgedruckte Buchstaben gekennzeichnet.

Position	Strang	Sequenz (5' → 3')
9325	positiv	<i>TCGCACTCGGCCCGACCCGCTTTGAGCTGC ACGCCCGCCGGCCCGCCGACCGATTTATTC AACAAAGCCACG</i>
10218	negativ	<i>CATCCCAAAGACAACGCAACTCGGCTTGGT GTGTTTAATTAACAAGCGTTGCCAGTGTTA CAACCAATTAACC</i>

Tabelle 3.3 Für die UL49.5-Deletion verwendete Primer: Den Positionsangaben liegen online verfügbare BoHV-1 Sequenzdaten zugrunde (NCBI Sequence NC_001847). Unterstrichene Buchstaben bezeichnen pACYC177-spezifische Sequenzen, die für das Kanamycinresistenzgen kodieren. BoHV-1 Sequenzen sind durch fett- und kursivgedruckte Buchstaben gekennzeichnet.

Position	Strang	Sequenz (5' → 3')
----------	--------	-------------------

9070	positiv	<i>CAATGGACTTTTGGAGCGCAGGCTGCTACG CGCGCGGGGTGCCGCTCTCGCGATTTATTC AACAAAGCCACG</i>
9271	negativ	<i>GGCAGCGGTCCCGGGACCGCGAGCTTTAT ATACAAGTTACTCCGCAGCGGCCAGTGTTA CAACCAATTAACC</i>

Tabelle 3.4 Für die Konstruktion der gE-Revertante verwendete Primer: Den Positionsangaben liegen online verfügbare BoHV-1 Sequenzdaten zugrunde (NCBI Sequence NC_001847).

Position	Strang	Sequenz (5' → 3')
121456	Positiv	GATCTCGCTCGCGTGTGTCTTGG
122553	negativ	GGTGCCTCGGGGTGGAAGATG

Tabelle 3.5 Für die Konstruktion der UL49 Revertante verwendete Primer: Den Positionsangaben liegen online verfügbare BoHV-1 Sequenzdaten zugrunde (NCBI Sequence NC_001847).

Position	Strang	Sequenz (5' → 3')
9196	Positiv	GGCTTTGCTTTAGGCTCATGGGCGCCAGCG
10375	Negativ	CCGCGAGCGGCGACCCGAGCAGGGAGTCAT

Tabelle 3.6 Reaktionsbedingungen und –ansatz: Amplifikation des Kanamycinresistenz-Gens für die TK bzw UL49 bzw. UL49.5-Deletion

Temperatur/ Zeit	Anzahl Zyklen	Reaktionsansatz
95°C /2 min	1 x	45 µl ReddyMix™ Reaction Mater Mix 25 pmol Primer (positiver Strang) 25 pmol Primer (negativer Strang) 100 ng Template DNA ad 50 µl A. dest.
95°C /20 sec	10 x	
65°C /30 sec		
72 C /90 sec	20 x	
95°C /10 sec		
72°C /120 sec		

3.2.2.2 Präparation von DNA-Fragmenten

PCR-Produkte sowie durch Restriktionsendonukleasen gespaltene Fragmente wurden elektrophoretisch aufgetrennt und nach einer Ethidium-Bromid-Färbung unter UV-Licht (302 nm) visualisiert. Die entsprechende DNA-Bande wurde im Größenvergleich mit einem DNA-Marker (1 kbp DNA Ladder) identifiziert und zügig zur Vermeidung von DNA-Strangbrüchen durch UV-Licht-Exposition mit einer Skalpellklinge aus dem Gel ausgeschnitten. Die DNA wurde dann mit Hilfe des QIAquick Gel-Extraktions Kits nach den Angaben des Herstellers extrahiert und in 30 μ l *A. dest.* gelöst.

3.2.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen mittels Absorptionsspektrometrie

Die Bestimmung der DNA-Konzentration in verdünnten DNA-Originallösungen erfolgte durch die Messung der optischen Dichte (OD) im Spektralphotometer GeneQuant *pro*. In ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß wurde Original-DNA-Lösung vorgelegt und je nach Verdünnungsansatz die entsprechende Menge steriles H₂O zugegeben, vorsichtig vermischt und der Inhalt in eine Präzisionsquarzküvette überführt. Die Extinktion wurde gegen einen H₂O-Leerwert bei einer Wellenlänge von 260 nm (Nukleinsäure) bzw. 280 nm (Protein) gemessen. Die Konzentration errechnet sich aus der OD bei 260 nm, dem Verdünnungsfaktor und einem für DNA, RNA, oder Oligonukleotide spezifischen Multiplikationsfaktor. Aus dem Verhältnis der OD₂₆₀ nm und der OD₂₈₀ nm erhält man außerdem eine Aussage über Proteinkontaminationen in der Lösung. Der Quotient aus OD₂₆₀ nm und OD₂₈₀ nm sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

3.2.2.4 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen (Restriktions-Längen-Polymorphismus RFLP)

Zur DNA-Spaltung mittels Restriktionsendonukleasen wurden 2 U (*units* / Einheiten) des entsprechenden Restriktionsenzym pro 1 μ g Plasmid-DNA oder 10-15 U pro 1 μ g gereinigte virale DNA eingesetzt. Der Spaltungsansatz wurde mit einem Restriktionsenzym-puffer (10 x) supplementiert, der nach Herstellerangaben eine optimale Aktivität des entsprechenden Restriktionsenzym garantiert, und mit *A. dest.* auf ein Gesamtvolumen von mindestens 20 μ l gebracht. Anschließend wurde der Spaltungsansatz für 1 bis 2 h (Plasmid-DNA) oder 3 bis 5 h (virale DNA) unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Die DNA-Spaltungsprodukte wurden nach ihrer Fragmentgröße elektrophoretisch aufgetrennt. Hierzu wurde der Spaltungsansatz in DNA-Ladepuffer (6 x) verdünnt, auf ein 0,7 bis 1,5%-iges Agarosegel aufgetragen und anschließend eine Gleichspannung von 40 bis 110 Volt über 1 bis 16 h in einer Sub-Cell GT Agarosegel-Elektrophoresekammer angelegt. 5 μ l eines DNA-Markers (1 kbp DNA Ladder) wurden zum Größenvergleich neben den Proben aufgetragen. Das Agarosegel wurde nach der Elektrophorese in einer DNA/RNA-färbenden Ethidium-Bromid-Lösung inkubiert. Die

DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht (302 nm) als fluoreszierende Banden visualisiert und photographisch dokumentiert.

3.2.2.5 Ligation

Für die Insertion eines DNA-Fragments (*Insert*) in einen Vektor wurde die T4-DNA-Ligase verwendet, die unter ATP-Verbrauch komplementäre 5'-Phosphat- und 3'-OH-Enden linearer DNA-Fragmente verbindet. Bei der Ligation wurden etwa fünfmal mehr *Insert*-, als Vektor-DNA eingesetzt und in Ligationspuffer mit 0,5 U T4 DNA Ligase 12 bis 18 h bei 16°C inkubiert.

3.2.2.6 TOPO TA-Cloning

Die *Taq*-Polymerase produziert während der PCR DNA-Fragmente mit unspezifischen Überhängen eines Nukleotids (CLARK, 1988), meist eines Adenins (HU, 1993). Bei der Methode des sogenannten *TA-Clonings* werden PCR-Produkte mit Adenin-Überhängen in einen linearisierten Vektor mit Thymin-Überhängen kloniert (Marchuk et al., 1991). Das *TOPO TA Cloning* ist eine Variante des *TA-Clonings* und ermöglicht eine Ligase-unabhängige Ligation eines PCR-Produktes mit einem Topoisomerase-aktivierten Vektor (SHUMAN, 1994). PCR-Amplifikate, die von einer Polymerase mit 3' > 5'-Exonuklease (*proofreading*)-aktivität (*Pfu*-, *Pfx*-, *Vent*TM-Polymerase) produziert wurden, eignen sich für das *TA-Cloning* erst, nachdem ihnen ein Adenosinrest angehängt wurde (*Tailing*). Für die Addition von 3'-Adenin-Überhängen wurde der PCR-Reaktionsansatz, nach einer Amplifikation mit der *Pfx*-Polymerase mit 1 U *Taq*-Polymerase versetzt und 10 min bei 72°C inkubiert. Das PCR-Produkt wurde nach Angaben des Herstellers in den aktivierten pCR.2.1-TOPO Vektor kloniert.

3.2.2.7 DNA-DNA-Hybridisierung (Southern Blot)

Ziel dieser Technik ist es DNA-Fragmente, die bereits mittels RFLP (3.2.2.4) entsprechend ihrer Länge im Agarosegel getrennt wurden, auf eine Membran zu fixieren. Durch Hybridisierung mit markierten Sonden können einzelne DNA-Fragmente spezifisch nachgewiesen werden (SOUTHERN, 1975).

Markierung von DNA mittels Digoxigenin

Zur Markierung bestimmter DNA-Fragmente wurde ein kommerzielles Kit (PCR DIG Probe Synthesis Kit, Roche) nach Anleitung des Herstellers verwendet. Dabei wird während einer Polymerase Kettenreaktion (PCR) Digoxigenin markiertes Desoxyuridin-triphosphat (DIG-dUTP) in das Amplifikat inseriert. Die Reaktionsbedingungen dieser PCR entsprechen den vom Hersteller empfohlenen. Die verwendeten Primer sind in den Tabellen 3.7 bis 3.11 aufgeführt. Die Ermittlung der günstigsten Verdünnung des als

Hybridisierungssonde eingesetzten Amplifikats wurde nach Herstellerangaben vorgenommen.

Tabelle 3.7 Für die Konstruktion einer Hybridisierungssonde gegen das gE verwendete Primer: Den Positionsangaben liegen online BoHV-1 Sequenzdaten zugrunde (NCBI Sequence NC_001847).

Position	Strang	Sequenz (5` → 3`)
121827	positiv	GCTTCGGTCGACACGGTCTT
122092	negativ	CTTTGTCGCCCGTTGAGTCG

Tabelle 3.8 Für die Konstruktion einer Hybridisierungssonde gegen die Thymidinkinase verwendete Primer: Den Positionsangaben liegen online BoHV-1 Sequenzdaten zugrunde (NCBI Sequence NC_001847).

Position	Strang	Sequenz (5` → 3`)
63712	positiv	CGAGATCAACGCGGAAGATCTGCT
63862	negativ	GCATTGCGCACAGCGACCAGAAAG

Tabelle 3.9 Für die Konstruktion einer Hybridisierungssonde gegen das Kanamycinresistenz-Gen verwendete Primer: Den Positionsangaben liegen online verfügbare pACYC177 Sequenzdaten zugrunde (NCBI Sequence NC_X06402)..

Position	Strang	Sequenz (5` → 3`)
1922	positiv	TATGAGCCATATTCAACGGGAAACG
2726	negativ	ATCGAGCATCAAAGTCAAT

Tabelle 3.10 Für die Konstruktion einer Hybridisierungssonde gegen das UL49-Gen verwendete Primer: Den Positionsangaben liegen online verfügbare BoHV-1 Sequenzdaten zugrunde (NCBI Sequence NC_001847).

Position	Strang	Sequenz (5` → 3`)
9364	positiv	GGCCCGCCGACTCGCTTGCCATGGC
10178	negativ	GCTGCTTAAGCCGCGCGTCGAAA

Tabelle 3.11 Für die Konstruktion einer Hybridisierungssonde gegen das UL49.5-Gen verwendete Primer: Den Positionsangaben liegen online BoHV-1 Sequenzdaten zugrunde (NCBI Sequence NC_001847).

Position	Strang	Sequenz (5` → 3`)
9070	positiv	CAATGGACTTTTGGAGCGCAGGCTG
9267	negativ	TATACAAGTTACTCCGCAGCGTTGC

3.2.2.8 Transfer der DNA durch *Southern blotting*

Als Vorbereitung auf den eigentlichen Blotting- Prozess wurde das Agarosegel, welches die elektrophoretisch aufgetrennte DNA enthält für 30 min in *A. dest* inkubiert. Dieser Schritt verringert die Ethidiumbromidbelastung für die im Folgenden genutzten Gerätschaften. Das Gel wurde weitere 10 min in 0,25 M HCL inkubiert. Durch diesen Inkubationsschritt werden die DNA-Fragmente teilweise depuriniert, welches einen positiven Effekt auf die Blotting-Effizienz größerer DNA-Fragmente hat. Der Aufbau des eigentlichen Blottens sieht vor, dass ein alkalischer Transfer-Puffer unter der Einwirkung von Kapillarkräften die DNA-Fragmente aus dem Agarosegel auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert. Hierzu wurde das Gel auf eine Filterpapier-Flüssigkeitsbrücke (Gel-Blotting-Papier) gelegt, deren Enden in die Transferlösung tauchten. Dem Agarosegel wurde luftblasenfrei die durch Transferpuffer angefeuchtete Nylonmembran aufgelegt. Die Ränder des Gels wurden mit Parafilmstreifen abgedeckt, um einen Kontakt des ober- und unterhalb des Gel-Membran-Komplexes befindlichen Filterpapiers zu vermeiden. Der Blotting-Aufbau wird nach oben vervollständigt durch zwei weitere, angefeuchtete Filterpapierelemente, bevor durch einen Stapel Zellstoffpapier die Aufrechterhaltung der Kapillarkräfte gewährleistet wird. Ein Gewicht oberhalb des Zellstoffpapiers sorgt für einen konstanten Druck und stabilisiert die Apparatur. Nach 16-24 h bei Raumtemperatur (RT) wurde die Nylonmembran zwischen zwei Papierfiltern getrocknet und anschließend in einem Stratalinker^R UV-Crosslinker mit UV-Licht bestrahlt, um die DNA kovalent an die Membran zu binden.

3.2.2.9 DNA-DNA Hybridisierung und Immunodetektion

Die Immunodetektion erfolgt nach Herstellerangaben mit Hilfe des DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit (Fa. Roche). Ebenfalls nach den Angaben des genannten Kits erfolgte die Lösung der markierten Sonde von der Membran (sogenanntes „Strippen“), um die gleiche Membran erneut mit einer differenten Sonde zu beproben.

3.2.3 Herstellung rekombinanter Viren

Die Generierung rekombinanter Viren erfolgte, indem mittels homologer Rekombination das zu deletierende Gen durch eine von homologen DNA-Sequenzen flankierte Fremdsequenz (hier ein Antibiotika-Resistenz-Gen) ersetzt wurde. Diese Manipulationen wurden in einem prokaryotischen System durchgeführt (BAC Mutagenese), um serielle Passagen der rekombinanten Viren in der Zellkultur zu vermeiden.

3.2.3.1 BAC Mutagenese mit Hilfe des RecET-Systems

Für diese Arbeiten wurde der BAC (*Bacterial artificial chromosome*) pBHV-1ΔgE verwendet (TRAPP ET AL., 2003). In diesem System liegt das Gesamtgenom des BoHV-1-Stammes *Schönböken* als extrachromosomales Plasmid in *E.coli* vor. Allein die

genomische Information des Glykoprotein E (gE) fehlt. Die nicht-viralen Sequenzen, welche eine Chloramphenicolresistenz, Sequenzen zur Aufrechterhaltung des BAC-Systems und die Expression des *Enhanced Green Fluorescence Protein* EGFP kodieren sind am Genlocus des gE lokalisiert. Die verwendeten Bakterien enthalten neben dem eigentlichen BAC-Plasmid das temperatursensitive, ampicillinresistente Plasmid pKD46 (*RED helper plasmid*), das für die Gene *gam*, *bet* und *exo* und für die Rekombinase des Bakteriophagen λ kodiert. Mittels dieser Rekombinase (*RED Rekombinase*) wird die homologe Rekombination zwischen linearen DNA-Sequenzen und dem viralen Genom vermittelt. Als lineares DNA-Fragment, welches als Rekombinationspartner dient, kam das Kanamycin-Resistenz-Gen des Plasmides pACYC177, welches mittels PCR amplifiziert und über ein entsprechendes Primerdesign mit viralen, flankierenden Sequenzen versehen worden war, zum Einsatz. Das PCR-Produkt wurde über eine Agarosegel-Aufreinigung (siehe Kapitel 3.2.2.2) gewonnen und nachfolgend mittels Elektroporation (siehe Kapitel 3.2.3.3) in die Bakterien transformiert. Anschließend können Klone, welche mutagenisierte Virus-DNA beinhalten, anhand ihrer Kanamycin-Resistenz selektioniert werden. Die Selektion geschieht zunächst bei 30 °C, anschließend wird die Temperatur auf 37 °C erhöht, um das Rekombinationsplasmid pKD46 zu eliminieren. Die verwendeten Primerdaten sind in den Tabellen 3.2 bis 3.5 des Kapitels 3.2.2.1 aufgeführt.

3.2.3.2 Herstellung elektrokompenter Bakterien/ RecET Mutagenese

Mit 2 ml einer Übernachtskultur (LB-Chloramphenicol/Ampicillin-Medium) eines Bakterienklons, der sowohl die virale DNA als BAC als auch das Rekombinations-Plasmid pKD46 beherbergte, wurden 200 ml LB-Chloramphenicol/Ampicillin-Medium beimpft. Durch die Supplementierung des Mediums mit 1 mM frisch angesetzter Arabinose wurde die Rekombinationskompetenz der Bakterien induziert, da die Expression der entsprechenden Gene unter einem Arabinose induzierbaren Promoter erfolgte. Nach der Induktion wurde die Bakterienkultur bei 30°C im Inkubationsschüttler inkubiert. Bei einer photometrisch ermittelten OD600 von 0,6 (nach 3 bis 4 h) wurde die Kultur 15 min auf Eis gestellt. Anschließend sind die Bakterienzellen zweimal hintereinander durch Zentrifugation pelletiert worden (10 min, 4 °C, 6000 rpm). Das Pellet wurde mit 200 ml einer eiskalten 10% Glycerinlösung gewaschen und nach dem zweiten Zentrifugationsschritt in der Residualflüssigkeit resuspendiert. In Aliquots zu jeweils 50 μ l wurden die Bakterien bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert.

3.2.3.3 BAC-Mutagenese mit Hilfe des EL250-Systems

Ein weiteres System zur Mutagenisierung von BACs wurde von LEE ET AL. 2001 vorgestellt. Dabei werden die Rekombinationsfunktionen durch einen defekten Prophagen zur Verfügung gestellt, während sie beim RecET-System über ein Plasmid exprimiert werden. Indem das *PL* Operon mit den Genen *gam* und den *red* Rekombinationsgenen *exo* und *bet* dem temperatur-sensitiven Repressor λ unterliegt,

kann die Rekombinationsfunktion durch einen Temperaturshift auf 42°C transient generiert werden. *Gam* inhibiert die E.coli eigene RecBCD Nuklease, welche ansonsten in der Folge die elektroporierte lineare DNA zerstören würde. *Exo* und *Beta* stellen die Rekombinationsfunktion. Das -durch Arabinose induzierbare- *flpe*-Gen ermöglicht den gezielten Verlust der eingeführten Antibiotikaresistenz über die diese flankierenden *FRT-Sites*. Im BAC Genom verbleibt eine der beiden *FRT-Sites*, wodurch das Antibiotikaresistenzgen erneut für Rekombinationen verwendet werden kann. Weitere Vorteile dieses Systems gegenüber dem RecET-System sind die 50-100 fache Effizienzsteigerung und da kein Plasmid benötigt wird, entfällt die Selektion anhand eines Antibiotikaresistenzgens, wodurch bei *Gen-Replacement* Experimenten ein weiteres Antibiotikum genutzt werden kann. Des weiteren werden *Gam* und *Red* immer zu einem gewissen Anteil exprimiert, was zu einem RecBCD-Defekt führt, welcher eine Plasmid-Instabilität und damit auch eine BAC-Instabilität zur Folge hat. Außerdem beeinträchtigt der RecBCD-Defekt die Lebensfähigkeit der Bakterien.

Indem der BoHV-1 BAC pBHV-1ΔgE in E.coli des Typs EL250 etabliert wurde, konnten in diesem System Mutagenisierungen durchgeführt werden. Dazu wurde mittels PCR eine lineare DNA generiert, die als Rekombinationspartner in die EL250 BAC tragenden Zellen elektroporiert (siehe Kapitel 3.2.3.5.) wurde. Dieses lineare DNA Fragment verfügt über BoHV-1 homologe Sequenzen, anhand derer die homologe Rekombination in das Genom des pBHV-1ΔgE erfolgte (Primerdaten siehe Kapitel 3.2.2.1). Das Kanamycinresistenzgen des Plasmides pKD13 wurde als Selektionsmarker innerhalb der *FRT-Sites* verwendet.

Nach erfolgreicher Selektion von kanamycinresistenten Bakterien wurde 1 ml einer Übernachtskultur in 49 ml Superbroth Medium bei 30°C bis zu einer photometrisch ermittelten OD600 von 0,5-0,7 inkubiert. 0,1% L-Arabinose wurde zugefügt und 1h bei 30°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Verdünnung der Bakteriensuspension 1:10 mit Arabinose-freiem Medium, erneut folgte eine Wachstumsphase von 1h bei 30°C. Nachfolgend wurden 500µl der Suspension auf Bakterienplatten, welche nur Chloramphenicol als Selektionsmarker enthielten, ausplattiert. Gewachsene Bakterienkolonien wurden hinsichtlich ihrer Kanamycinsensitivität getestet.

3.2.3.4 Herstellung elektrokompetenter Bakterien/ EL250-System

Zwei ml einer Übernachtskultur des BoHV-1BACs in den EL250-Bakterien wurden 100 ml LB Superbroth-Medium, welches mit Chloramphenicol versetzt wurde, zugesetzt. Es folgt ein Inkubationsschritt bei 30°C bis zu einer photometrisch ermittelten OD600 von 0,5-0,7. Die Bakteriensuspension wurde zu je 10 ml aliquotiert und 15 min bei 42°C inkubiert, damit die Rekombinationsfunktionen transient zur Verfügung gestellt wurden. Anschließend erfolgte ein 20 minütiger Inkubationsschritt auf Eis. Nach einer Zentrifugation bei 5500g, 4°C für 5 min und dreimaligem Waschen mit 4°C kaltem

sterilem A.dest mit entsprechenden Zentrifugationsschritten, wurden die Bakterien in 50µl, 4°C kaltem A. dest/ 10ml Bakteriensuspension resuspendiert.

3.2.3.5 Transformation in Bakterien

Transformation bedeutet das Verbringen von DNA in prokaryotische Systeme.

Transformation durch Elektroporation

Die rekombinationskompetenten Bakterien des Typs *E. coli* DH10B wurden gemeinsam mit 100-500 ng des aufgereinigten PCR-Produktes in eine eiskalte Elektroporationsküvette (Gene pulser[®] 0,1cm Küvette) pipettiert. Die Bakterien wurden in der Küvette mit Hilfe des Gene pulser[®] Elektroporationssystem bei Standardeinstellungen (1,25 kV[RecET-System], 1,75 kV[EL250-System], 200 Ω, und 25 µF) elektroporiert. Nach dem Puls wurden die Bakterien in 1ml SOC-Medium suspendiert und eine Stunde bei 37°C (RecET-System), 32°C (EL250-System) unter Schütteln (350 rpm) inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension auf LB-Chloramphenicol-Kanamycin-Selektions-Agarplatten ausplattiert, und bei 37°C (RecET-System), 30°C (EL250-System) inkubiert. Nach 24 bis 36 h wurden Chloramphenicol- und Kanamycin-resistente Kolonien selektioniert.

Transformation chemisch kompetenter Bakterien mit Plasmiden

Chemisch kompetente *E. coli* (TOP10F'One Shot)-Zellen wurden mit DNA mittels Hitzeschock transformiert. 50 µl kompetente Bakterien wurden mit 5 µl eines Ligationsansatzes oder 1 bis 100 ng Plasmid-DNA gemischt und für 30 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Bakterien 90 sec bei 42°C inkubiert und umgehend auf Eis abgekühlt. Die transformierten Bakterien wurden in 1000 ml SOC-Medium suspendiert und eine Stunde unter Schütteln (350 rpm) bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Bakteriensuspension auf LB-Selektions-Agarplatten ausplattiert und 12 bis 18 h bei 37°C inkubiert. Transformierte Bakterienklone wurden durch Koloniewachstum selektioniert. Einige Vektoren bieten die Möglichkeit, Bakterienkolonien durch das sogenannte *blue-white-screening* zu selektionieren. Durch die Insertion eines DNA-Fragments in die *multiple cloning site* eines entsprechenden Vektors (z. B. pCR.2.1-TOPO) wird ein lacZ-Gen, das für das N-terminale α-Fragment der β-Galaktosidase kodiert, inaktiviert. Für eine Aktivität der β-Galaktosidase muss das C-terminale ω-Fragment durch das α-Fragment komplementiert werden (α-Komplementierung). Transformierte Bakterien, in denen das lacZ-Gen durch die Klonierung eines DNA-Fragments in die *multiple cloning site* unterbrochen wird, wachsen bei einer Inkubation auf LB-X-Gal-IPTG-Agar-Platten zu weißen Kolonien heran, während Klone ohne eine Insertion das α-Fragment exprimieren und sich blau anfärben. Bakterienklone, die mit einem rekombinanten Vektor pCR.2.1- TOPO transformiert wurden, sind nach einer 12 bis 18stündigen Inkubation bei 37°C durch weißes Koloniewachstum selektioniert worden.

3.2.3.6 Schnelle („mini“-)Präparation bakterieller Plasmid-DNA

Selektionierte Bakterienklone wurden mit einer Pipettenspitze von der Agarplatte gepickt, in 3 ml LB-Selektionsmedium transferiert und 12 bis 16 h bei 37°C im Inkubationsschüttler inkubiert. 1,5 ml der dicht gewachsenen Bakterienkultur wurden in einer Eppendorf Kühlzentrifuge 3 min lang bei 4°C und 7000 rpm pelletiert. Der klare Überstand wurde abgesaugt, das Bakterienpellet in 100 µl Lösung 1 resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Bakterienzellen durch die Zugabe von 200 µl der alkalischen Lösung 2 (alkalische Lyse) lysiert und 5 min auf Eis gestellt. Der Ansatz wurde mit 150 µl der Lösung 3 neutralisiert, 5 min auf Eis gestellt und mit 400 µl Phenol versetzt. Die wässrige Phase und die Phenolphase wurden durch starkes Vortexen für 1 min durchmischt und zur Trennung 10 min in einer Kühlzentrifuge mit 14.000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Die wässrige Phase mit der darin gelösten Plasmid-DNA wurde mit einer Pipette vorsichtig von der Phenolphase abgesaugt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit 1/10 Volumen 4 M LiCl und 3 Volumen Ethanol (absolut) aus der Lösung gefällt und 30 min bei –70°C gelagert. Durch 10minütige Zentrifugation der Proben mit 14.000 rpm wurde die DNA pelletiert. Die DNA-Pellets wurden mit Ethanol (70%) gewaschen, getrocknet und in 50 µl TE-RNaseA-Lösung aufgenommen.

3.2.3.7 Präparation von Plasmid-DNA im großen Maßstab („Maxipräparation“)

Für die Maxipräparation von Plasmid-DNA wurden 100 ml (*high-copy* Plasmide: pTZ18RflanksgE, pCR.2.1-TOPO) oder 250 ml (*low-copy* Plasmide und BACs) LB-Selektionsmedium mit 0,5 ml einer Übernachtskultur beimpft. Nach den Angaben des Herstellers wurde mit Hilfe des QIAfilter Maxi Kits (Fa. Qiagen, Hilden) die Plasmid-DNA nach alkalischer Bakterienlyse mittels Anionenaustauscherchromatographie aufgereinigt. Die DNA wurde mit Isopropanol aus der Lösung gefällt und durch Zentrifugation (Beckman J2-H2, JA17, 11.000 rpm, 30 min, 4°C) pelletiert. Das DNA-Pellet wurde anschließend mit Ethanol (70%) gewaschen, getrocknet und in TE (pH 8,0) gelöst.

3.2.3.8 Anlegen einer Bakteriendauerkultur

750 µl einer frischen Übernachtskultur wurden mit der gleichen Menge Gefriermedium für Bakterien vermischt und sofort zur Lagerung bei -70°C tiefgefroren.

3.2.3.9 Plaquereinigung

MDBK-Zellen wurden mit den Transfektionsüberständen infiziert und eine Stunde lang unter Standardbedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen und mit semisolidem Methocel-Medium (0,25 x), einem sogenannten

overlay, überschichtet. Das semisolid Medium verhindert weitestgehend die Abgabe reifer Virionen in den Zellkulturüberstand, daher erfolgt die Ausbreitung des Virus dann allein durch die direkte Infektion von unmittelbaren Nachbarzellen. Durch diese „Trennung“ von Einzelplaques kann die Verunreinigung homogener, rekombinanter Virus-Plaques durch Ausgangsviren im Überstand weitgehend ausgeschlossen werden. Zellen rekombinanter Virus-Plaques wurden mit 20 µl Methocel-Medium aufgenommen und in 1 ml Medium verdünnt. 50 µl dieser infektiösen Suspension wurden auf MDBK-Zellen subpassagiert. Durch weitere Plaquereinigungsschritte wurde so eine homogene, rekombinante Viruspopulation subkloniert. Die Selektion der entsprechenden rekombinanten Viruspopulation erfolgte anhand der bestehenden (BoHV-1ΔgE, BoHV-1ΔgEΔUL49, BoHV-1ΔgEΔUL49.5, BoHV-1ΔgEUL49rev, BoHV-1ΔgEUL49.5rev), bzw. der nicht vorhandenen (BoHV-1ΔUL49gErev, BoHV-1ΔUL49.5gErev) Expression von EGFP. Das sogenannte *green fluorescent protein* (GFP) ist ein Quallen (*Aequorea victoria*)-Protein, das während UV-Licht-Anregung grün autofluoresziert (PRASHER ET AL., 1992). EGFP (*enhanced green fluorescent protein*, Fa. Clontech, Heidelberg), dessen Expression unter der Kontrolle des HCMV-*Immediate-Early*-Promotors steht, stellt eine Variante des Wildtypproteins mit einer etwa 35fach stärkeren Fluoreszenz dar.

3.2.4 Charakterisierung rekombinanter Viren *in vitro*

3.2.4.1 Plauegrößenbestimmung

Konfluente MDBK-Zellen wurden mit 100 PFU (*plaque forming units* / plaquebildende Einheiten) pro Well einer 6-Well-Zellkultur-Schale infiziert, nach einer Stunde mit semisolidem Methocel-Medium (*overlay*) überschichtet und 48 h unter Standardbedingungen inkubiert. Die Vermessung der Plaques erfolgte mittels des Bildverarbeitungsprogramms *analySIS®* (Fa. SoftImaging System GmbH, Münster), dabei wurden 150 Plaques pro Virus vermessen.

3.2.4.2 Ein-Schritt-Wachstumskinetik

MDBK-Zellen eines Wells einer 24-Well-Zellkulturschale wurden mit einer MOI von 1 (etwa 300.000 PFU) infiziert und eine Stunde lang unter Standardbedingungen inkubiert. Anschließend erfolgten zwei Waschschrte des infizierten Zellrasens mit PBS-Puffer. In der Folge wurde der Zellrasen für 2 min mit eiskaltem CBS-Puffer (pH 3,0) bedeckt, um oberflächlich adsorbierende Viruspartikel zu inaktivieren. Erneut wurden die Zellen zweimal mit PBS-Puffer gewaschen und anschließend mit 1 ml Medium (DMEM + 10% FKS), welches auf 37° C vorgewärmt wurde, versehen. Zur Bestimmung der Infektiosität im Zellkulturüberstand wurde nach 0h, 4h, 8h, 12h, 16h, 24h, 48h und 72h das Medium gewonnen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Bestimmung der zellgebundenen Infektiosität wurde der Zellrasen, wie oben beschrieben, mit CBS-Puffer (pH 3,0) bedeckt und mit PBS-Puffer gewaschen. An-

schließlich wurden die Zellen mit einer Pipettenspitze von der Kulturschale abgeschabt, in 1 ml Medium (s.o.) aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die beiden Proben jedes Zeitwerts wurden bis zur Bestimmung des Virustiters bei -70°C gelagert.

3.2.5 Proteinnachweis

3.2.5.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

SDS (Natriumdodecylsulfat) ist ein Detergens, das mit Ausnahme von Disulfidbrücken alle nichtkovalenten Wechselwirkungen in einem nativen Protein zerstört. Das anionische SDS bildet mit dem denaturierten Protein einen Komplex mit einer negativen Nettoladung, so dass bei der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese Proteine nach ihrer relativen Molekülmasse, unabhängig von ihrer ursprünglichen Ladung, aufgetrennt werden können (LAEMMLI, 1970). Polyacrylamidgele setzen sich aus zwei Komponenten, einem Trenn- und einem Sammelgel, zusammen. Die eigentliche Auftrennung der Proteine erfolgt in dem engporigen Trenngel, das relativ weitporige Sammelgel hat die Aufgabe das Proteingemisch vor seinem Eintritt in das Trenngel zu fokussieren. Die für die Polymerisierung der Trenn- bzw Sammelgele erforderlichen Reagenzien wurden in den in Tabelle 3.9 angegebenen Mengenverhältnissen miteinander vermischt. Mit Hilfe einer Mini-PROTEAN 3 Gel-Apparatur wurden Polyacrylamidgele mit einer Tiefe von 1,5 mm gegossen. Die Lysate infizierter Zellen (siehe 3.2.1.6) oder Präparationen aufgereinigter Virionen (siehe 3.2.1.5) wurden für die Reduktion von Disulfidbrücken mit reduzierendem Probenpuffer (4 x) vermischt, 3 min bei 95°C erhitzt und nach der Aushärtung der Trenn- und Sammelgele in die Taschen der Sammelgele pipettiert. Als Größenmarker wurde ein Molekulargewichtsstandard mitgeführt. Die Proteine wurden 100 min durch Anlegen von 100 V Gleichspannung nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Tabelle 3.12 Zusammensetzung von Polyacrylamidgelen für die SDS-PAGE:

Trenngel	10%	15%	Sammelgel	3%
Volumen	10 ml	10ml	Volumen	10ml
A. dest	8 ml	4,7 ml	A. dest	6,1 ml
1,5M Tris pH 8,8	5 ml	5 ml	0,5M Tris pH 6,8	5 ml
10% SDS	200 μl	200 μl	10% SDS	100 μl
Acrylamidlösung	6,66 ml	10 ml	Acrylamidlösung	1,3 ml
10 % APS	100 μl	100 μl	10 % APS	50 μl
TEMED	10 μl	10 μl	TEMED	10 μl

3.2.5.2 Elektrotransfer und Immunodetektion von Proteinen (*Western Blotting*)

Beim *Western Blotting* werden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine (3.2.7.1) nach dem Tankblotprinzip (TOWBIN ET AL., 1979) in einem elektrischen Spannungsfeld auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Das Polyacrylamidgel wurde auf eine zugeschnittene Nitrocellulosemembran gelegt. Die Gel-Membran-Schicht wurde ober- und unterseits mit einem Papierfilter sowie einem Kunststoffschwamm bedeckt und in eine Klammer eingespannt. Die Klammer wurde anschließend in eine mit eiskaltem Transferpuffer gefüllte Mini Trans-Blot- Elektrophorese-Transfer-Zelle eingesetzt. Bei einer 60minütigen Gleichspannung von 100 V wurden die anionischen Proteine auf die Nitrocellulosemembran übertragen. Nach dem Elektrotransfer der Proteine wurde die Membran zum Blocken unspezifischer Bindungen 12 bis 16 h in *Blocking*-Puffer (10% [w/v] Magermilchpulver in TBS-T) bei 4°C gebadet. Die geblockte Membran wurde zweimal kurz mit TBS-T gewaschen und eine Stunde bei RT mit einem in TBS-T verdünnten Antikörper inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal 10 min mit TBS-T gewaschen und eine Stunde bei RT mit einem Meerrettichperoxidase (POD)-markierten sekundären Antikörper, der 1/30.000 in TBS-T verdünnt wurde, inkubiert. Die Nitrocellulosemembran wurde nach drei weiteren TBS-T-Waschschritten mit einem chemoluminiszenten Substrat (SuperSignal.) überschichtet und 5 min bei RT inkubiert. Durch die Zugabe des Substrats wird, unter Katalyse der Meerrettichperoxidase, Licht emittiert, das einen Röntgenfilm schwärzt. Antigenspezifische Signale wurden anschließend durch 1 bis 15minütiges Auflegen eines Röntgenfilms detektiert. Diese wurden durch einen Scan-Vorgang digitalisiert und mit Adobe Photoshop Version 6.0 (Fa. Adobe Systems, San Jose, USA) bearbeitet.

3.2.5.3 Indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT)

Konfluente MDBK-Zellen wurden in einer 35 mm Kultur-Schale mit 100 PFU infiziert, nach einer Stunde mit Methocel-Medium überschichtet und 48 h unter Standardbedingungen inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS-Puffer gewaschen und auf Eis 5 min mit eiskaltem Aceton (80%) bedeckt. Nach der Aceton-Fixierung wurde der Zellrasen dreimal mit PBS-Puffer gewaschen und 30 min bei RT mit einem in PBS-Puffer verdünnten Antikörper inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS-Puffer gewaschen, 30 min mit einem sekundären, Fluoreszenz-markierten Antikörper (Alexa.Fluor.488) inkubiert, erneut dreimal mit PBS-Puffer gewaschen und schließlich mit 1 ml PBS-Puffer bedeckt. Antigenspezifische Fluoreszenz wurde fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen und photographisch dokumentiert.

Tabelle 3.13 Antikörper-Verdünnungen für Western Blotting und IIFT

Antikörper	Verdünnung in TBS-T für <i>Western Blotting</i>	Verdünnung in PBS für IIFT
mAK 2-1 (gE)	1:100	1:100
pAK UL49	1:400	1:250
pAK TK	1:400	1:400
pAK UL49.5	1:800	1:800
pAK gD	1:200	
pAK gM	1:800	1:800
mAK anti-mouse Alexa		1:2000
mAK anti-mouse POD	1:35000	
mAK anti-rabbit Alexa		1:2000
mAK anti-rabbit POD	1:35000	

3.2.5.4 Konfokale Immunfluoreszenzanalyse mittels Laserscanmikroskopie (LSM)

Beim konfokalen Mikroskop wird Licht, das nicht aus der Brennebene des Objektivs kommt, ausgeblendet. Im Unterschied zum konventionellen Mikroskop erzeugt das konfokale Mikroskop zunächst nur einen Bildpunkt, der allerdings genau einen Punkt aus der Brennebene des Objektivs darstellt. Um ein vollständiges Bild des Objekts zu erhalten, muss das Objekt Punkt für Punkt gerastert (gescannt) werden. Dazu wird ein Laserstrahl Punkt für Punkt über das Objekt geführt, und das Bild entsteht durch digitale Verarbeitung im Rechner. Konfluent auf Deckgläschen gewachsene MDBK Zellen wurden mit Virus infiziert und nach einer Inkubation von 24h bei 37°C gegen drei differente Strukturen gefärbt. Zuerst erfolgte die Färbung gegen BoHV-1-Glykoproteine an den lebenden Zellen. Dazu wurde der entsprechende Primär-Antikörper in serumfreien Medium verdünnt und für 30 min auf die Zellen gegeben. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurden die Zellen zweimal mit serumfreien Medium gewaschen, bevor der Sekundär-Antikörper für das gleiche Zeitintervall auf die Zellen gegeben wurde. Anschließend an zwei weitere Waschschrte wurden die Zellen für 40 min mit serumfreien Medium inkubiert, dem in einer Verdünnung von 1:2000 VybrantTM Cell-Labeling Solutions DiI (Fa. Molecular Probes, Eugene, USA) zugegeben worden war. Diese hoch lipophile Substanz markiert Biomembranen. Um in der Folge intrazellulär gelegene virale Proteine zu markieren, wurden die Zellen nun mit 80% Aceton fixiert. Die nachfolgenden Färbeschritte erfolgten analog zu den bei der indirekten Immunfluoreszenz Angegebenen. Nach Beendigung der Färbephase wurden die Deckgläschen auf Objektträger geklebt, hierbei

wurde ein Fluoreszenzerhaltungspuffer eingesetzt, und sie konnten so mittels konfokaler Laserscanmikroskopie analysiert werden.

3.2.6 Immunisierung von Kaninchen zur Antikörpergewinnung

Vier weibliche Kaninchen der Rasse *New Zealand White* mit einem Gewicht von 1,5 bis 2,0 kg wurden mit Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH)-konjugierten Peptiden immunisiert, um ein spezifisches, polyklonales Antiserum gegen pUL49 zu erzeugen. Weitere zwei weibliche Kaninchen wurden mit zwei unterschiedlichen KLH-konjugierten Peptiden zur Generierung eines Serums gegen die Thymidinkinase des BoHV-1 immunisiert. In Tabelle 3.11 sind die Aminosäuresequenzen und deren Position im Ausgangsprotein aufgezeigt. Die Peptidsequenzen wurden nach Analyse durch ein online verfügbares „*antigen prediction tool*“ der Firma GenScript Corporation ausgewählt. Dieses arbeitet mit einer antigenetischen Skala, die auf physikochemischer Eigenschaften von Aminosäureresten und der Frequenz ihres Auftretens in bekannten segmentalen Epitopen basiert (KOLASKAR UND TONGAONKAR, 1990; MARGALIT UND SPOUGE 1987; JAMESON UND WOLF 1988). Die konjugierten Peptide wurden von der Firma EMC microcollections GmbH (Tübingen) produziert. In der Folge wurde 1 mg des KLH-konjugierten Peptides in 250 µl *A. dest* aufgenommen und für 10 sec mit Ultraschall behandelt. 250 µl PBS und 500 µl kompletten Freund's Adjuvants wurden dem Ansatz hinzugefügt und den Tieren zur Hälfte intramuskulär (i.m.) bzw. subkutan (s.c.) verabreicht. Das Adjuvants (ein Gemisch aus mykobakteriellen Zellwandbestandteilen und Mineralöl) bewirkt eine intensivere Stimulierung des Immunsystems. Zur Auffrischung der Immunantwort wurde den Tieren nach 3, 6 und 9 Wochen erneut oben beschriebenes Gemisch, bei dem das komplette Freund's Adjuvant durch inkomplettes Freund's Adjuvant ersetzt wurde s.c. injiziert. Sowohl vor der Grundimmunisierung als auch 10 Tage nach jeder Immunisierung wurde den Tieren Blut aus der Ohrvene entnommen. Das gewonnene Blut wurde bis zur vollständigen Abtrennung des Blutserums bei 4°C verwahrt. Anschließend erfolgte bei 3000 rpm, 15 min, 4°C die Separierung des Serums. Bis zur weiteren Verwendung wurde das Serum aliquotiert und bei – 20 °C gelagert.

Tabelle 3.14 Aminosäuresequenz und Position im pUL49/TK

Bezeichnung	Aminosäure-Sequenz	Positionen der Aminosäuren
UL49-1	KLH-Konjugat (ARFHRPSEDEDDYEYS)	2-16
UL49-2	KLH-Konjugat (APARRSSSRASSRPPRAAA)	89-107
UL49-3	KLH-Konjugat (DSDPPKSNERLDRMLKS)	194-210
UL49-4	KLH-Konjugat (ARGSTSGGESRLRGERARP)	240-258
TK1	KLH-Konjugat (AEQQRRLAARARPGDRAD)	182-199
TK2	KLH-Konjugat (GSARGAGGPAHRAD)	75-88

3.2.7 Tierversuchsaufbau

Zwölf Fleckviehrinder im Alter von neun Monaten wurden im Versuch eingesetzt. Die serologische Überprüfung der Tiere vor Versuchsbeginn konnte keine BoHV-1 Antikörper nachweisen. Vier der Tiere wurden als Kontrolltiere allein einer Belastungsinfektion ausgesetzt, während die vier Tiere der Vakzinegruppe 1 zweimalig intramuskulär mit dem Lebendvirus BoHV-1 Δ gE Δ TK in Kombination mit einer neuartigen Adjuvantssubstanz immunisiert wurden. Weitere vier Tiere wurden mit derselben Virusdosis ohne Adjuvants immunisiert. 21 Tage nach der zweiten Immunisierung wurde intranasal eine Belastungsinfektion mit dem virulenten BoHV-1-Wildtypstamm 2204 vorgenommen, in deren Folge von den Tieren täglich Nasentupfer und wöchentlich Blut gewonnen wurden. Abbildung 3-1 verdeutlicht den zeitlichen Ablauf des Infektionsexperimentes.

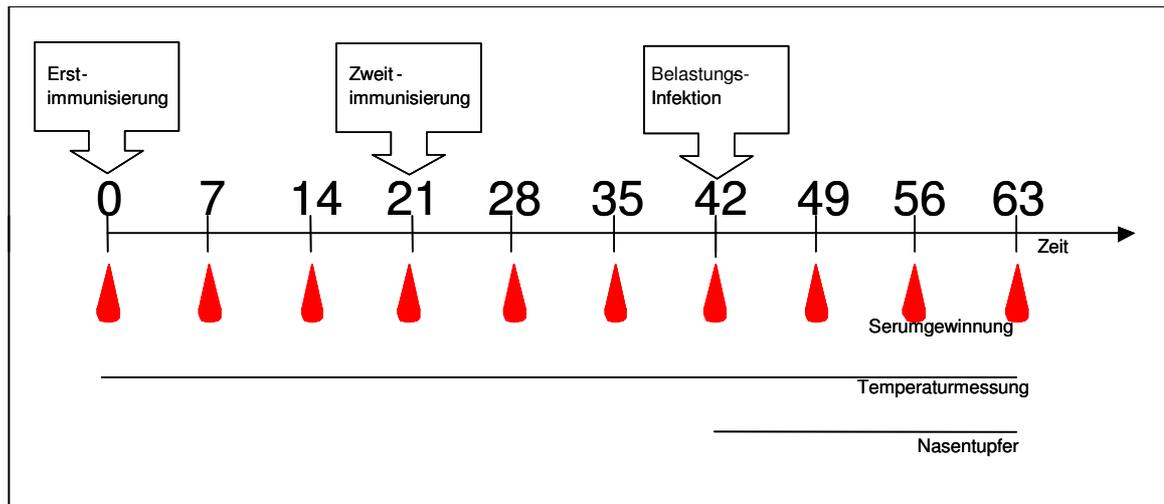


Abbildung 3-1: *Zeitliche Abfolge des Tierversuches*: Schematisch wird hier der Versuchsablauf dargestellt, mit durchgezogenen Linien wird die kontinuierliche Probengewinnung symbolisiert, Einzelobjekte markieren diskontinuierliche Beprobungen (hier Serumgewinnung)

Die Vakzinierungsdosis betrug 1×10^7 KID₅₀ pro Tier. Die Vakzine wurde in die Halsmuskulatur verimpft. Die Dosis der Belastungsinfektion betrug 1×10^7 KID₅₀ pro Nasenloch eines jeden Tieres. Die Tiergruppen wurden im Isolierstallgebäude des FLI unter gleichen Bedingungen gehalten.

3.2.8 Serologie

3.2.8.1 gB-blocking-ELISA

Bei der serologischen Untersuchung auf gB-Antikörper wurde der kommerzielle Testkit der Firma IDEXX verwendet. Die Testdurchführung erfolgte nach den Herstellerangaben. Es handelt sich hierbei um ein kompetitives Testsystem, d.h. wenn in der unbekanntenen Probe gB-Antikörper vorhanden sind, wird ein vom Test vorgegebenes Antigen blockiert und kann von dem Testsystem nicht mehr detektiert werden. Eine Probe gilt demnach als positiv, wenn die Blockierung durch die Probe $\geq 55\%$ beträgt. Liegt der Blockierungswert zwischen 45% und 55%, gilt die Probe als fraglich. Als negativ werden Proben bewertet, deren Blockierungswert unterhalb von 45% liegt.

3.2.8.2 gE-blocking-ELISA

Zur Ermittlung des gE-Antikörperstatus einer Serumprobe wurde der gE-ELISA der Firma IDEXX eingesetzt. Die Testdurchführung erfolgte den Angaben des Herstellers entsprechend. Das Testprinzip dieses ELISAs entspricht dem des gB-ELISAs. Die Auswertung des Tests wird mittels Spektralphotometrie bei einer Wellenlänge von 650nm durchgeführt. In den Herstellerangaben erfolgt eine Bewertung direkt anhand der gemessenen Absorptionswerte. Davon abweichend, haben wir die Absorptionswerte in Blockierungs-Prozent umgerechnet.

3.2.8.3 Serumneutralisationstest (SNT)

Zur Vorbereitung der Seren wurden diese 30 min bei 56°C im Wasserbad inaktiviert. Anschließend wurden die Serumproben ebenso wie Referenzseren (Positiv, Negativserum) in log₂-Verdünnungsschritten -jeweils 3 Proben pro Verdünnungsschritt (50µl/Well)- auf eine 96 Well-Platte gebracht. Das Testvirus wurde in einer Konzentration von 10² KID₅₀/50 µl verwendet. 50 µl dieses Testvirus wurden den Serumverdünnungen zugesetzt und nachfolgend für 24h bei 37°C und 5%CO₂ inkubiert. Zur weiteren Validierung des Testsystems erfolgte jeweils eine Rücktitration des eingesetzten Testvirus. Im Anschluss an die Inkubation wurden 100 µl einer MDBK Zellsuspension (30000 Zellen/100 µl) zu allen Vertiefungen gegeben. Die Bewertung des Tests wurde nach 4 tägiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ durchgeführt. Dabei wurde der Neutralisationstiter anhand der Formel $(-\log_2) = a/b + c$ berechnet, wobei a der Anzahl der Vertiefungen ohne Virusvermehrung entspricht, b gibt die Anzahl der Vertiefungen pro Verdünnungsstufe wieder und c entspricht $-\log_2$ einer eventuell Vorverdünnung der eingesetzten Testseren.

4 Ergebnisse

4.1 BoHV-1-Deletionsmutante UL49.5

4.1.1 Konstruktion der BoHV-1 Δ gE Δ UL49.5 Doppeldeletionsmutante

Um den Einfluss einer gleichzeitigen Deletion der BoHV-1-Proteine gE und des durch UL49.5 determinierten Proteins auf das Viruswachstum in Zellkultur beurteilen zu können, wurde eine gE-UL49.5-negative BoHV-1-BAC-Mutante erstellt. Dazu wurde mittels RecET-Mutagenese (siehe Kapitel 3.2.3.1) die UL49.5-spezifische Sequenz in rekombinationskompetenten Bakterien durch ein Kanamycinresistenzgen ersetzt (Abbildung 4-1). Die verwendeten Primerdaten sind in der Tabelle 3.3 angegeben. Das mit diesen Primern generierte PCR-Produkt wurde wie unter 3.2.3.5 beschrieben in *E.coli*-DH10B-Zellen elektroporiert. Nach dem elektrischen Puls wurden die Bakterien für die Doppelselektion auf LB-Chloramphenicol-Kanamycin Agarplatten ausplattiert und bei 37°C inkubiert. BAC-DNA doppelresistenter Bakterien wurde isoliert (Kapitel 3.2.3.7) und in eukaryotische Zellen transfiziert (siehe Kapitel 3.2.1.8).

Viruswachstum konnte für diese Doppelmutante selbst nach wiederholter Transfektion in keinem Fall nachgewiesen werden. Die Doppeldeletion von gE und UL49.5 war somit letal für das verwendete BoHV-1.

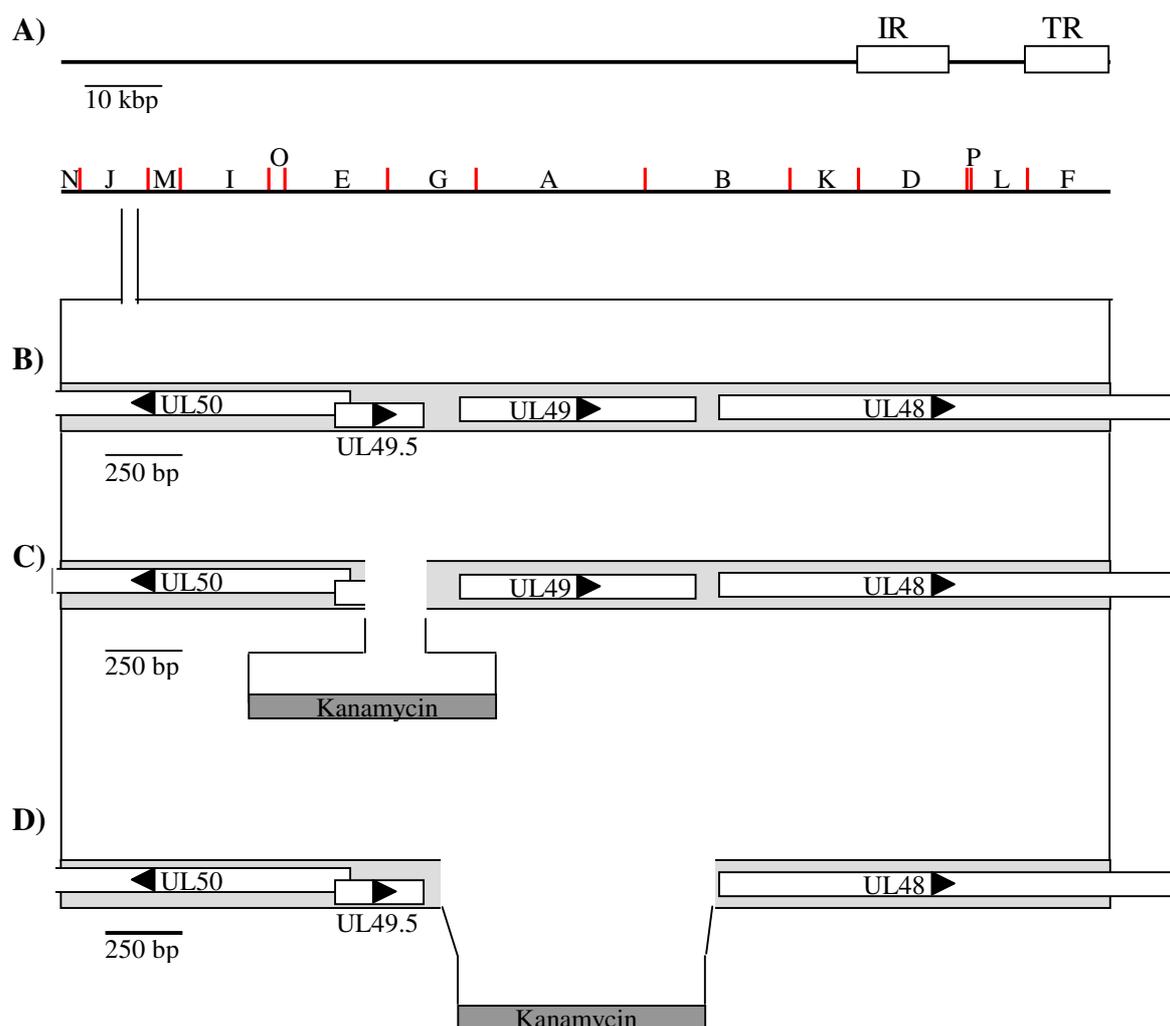


Abbildung 4-1: Schematische Darstellung der Konstruktion von BoHV-1ΔgEAUL49 und BoHV-1ΔgEAUL49.5

(A) zeigt den schematischen Genomaufbau von BoHV-1, zusätzlich ist die HindIII-Restriktionsfragmentkarte dargestellt. In (B) ist die Lage der Genorte von UL49 und UL49.5 (ebenso wie unmittelbar benachbarte Genorte) innerhalb der HindIII-Fragmente J und M vergrößert dargestellt. (C) verdeutlicht die Deletion von UL49.5, während (D) die Deletion des UL49-ORFs wiedergibt.

4.1.2 Konstruktion der Virusmutante BoHV-1ΔUL49.5gErev

Um ein Virus zu charakterisieren, welches allein im UL49.5 Locus deletiert ist, wurde eine Kotransfektion (siehe Kapitel 3.2.1.8) von BAC-DNA ΔgEAUL49.5 und pTgEr-Plasmid-DNA durchgeführt. Die pTgEr-DNA (TRAPP ET AL., 2003) beinhaltet u.a. den gE-Leserahmen, so dass es zu einer homologen Rekombination dieser DNA mit der BAC-DNA ΔgEAUL49.5 kommen konnte, welche dann in einem einfach UL49.5-deletiertem Virus resultierte, das im Folgenden als BoHV-1ΔUL49.5gErev bezeichnet wurde.

4.1.3 Genotypische Charakterisierung der BoHV-1 Δ gE Δ UL49.5 Doppeldeletionsmutante sowie der gE-Revertante

Zur Genotypisierung wurde virale DNA eingesetzt, mit Ausnahme des doppeldeletierten BoHV-1 Δ gE Δ UL49.5, bei dem BAC-DNA eingesetzt werden musste, da kein vermehrungsfähiges Virus nach Transfektion dieser DNA gewonnen werden konnte. Das Genom wurde in *HindIII*-Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP)- und Southern Blot-Analysen mit der DNA von BoHV-1, BoHV-1 Δ gE und BoHV-1 Δ UL49.5gErev verglichen (Abbildung 4-2). Durch die Insertion des Kanamycinresistenzgens in den UL49.5-ORF wurde eine zusätzliche *HindIII*-Erkennungssequenz in das 8,8kbp große (*HindIII*-J-) Fragment eingeführt, so dass die BoHV-1 Δ gE Δ UL49.5- und BoHV-1 Δ UL49.5gErev-Genome in der RFLP-Analyse anstelle einer 8,8kbp DNA-Bande zwei zusätzliche 7,1kbp und 2,2 kbp Banden aufwiesen (Abbildung 4-2, weiße Pfeile). Damit weist BoHV-1 Δ gE Δ UL49.5 wie das Wildtypvirus das 7,6kbp große K-Fragment auf, welches mit dem 7,1kbp großen Fragment des Kanamycinresistenzgens eine Doppelbande in Abbildung 4-2 darstellt. Das Genom der einfach deletierten Mutante BoHV-1 Δ UL49.5gErev zeigt ebenfalls das 7,6kbp große K-Fragment, das 7,1kbp große Fragment des Antibiotikaresistenzgens und durch die Reversion des gE-ORF läßt sich das 7,2kbp große L-Fragment erneut darstellen. Auf der Abbildung 4-2 läßt sich diese Trippelbande nachvollziehen. Durch Southern Blot Hybridisierung mit einer UL49.5-spezifischen (Primerdaten Tabelle 3.10) und einer Kanamycin-spezifischen Sonde (Primerdaten Tabelle 3.8) wurde die korrekte Insertion des Kanamycinresistenzgens in das Genom von BoHV-1 Δ gE Δ UL49.5 sowie der Revertante überprüft. Dabei reagierte die Kanamycin-Sonde wie vorhergesagt mit einem 7,1kbp und einem 2,2kbp großem Fragment (Abbildung 4-2, schwarze Pfeile), während die UL49.5 Sonde nur beim Wildtyp-Virus und bei BoHV-1 Δ gE ein 8,8kbp großes Fragment detektieren konnte (Abbildung 4-2, schwarze Pfeilspitzen).

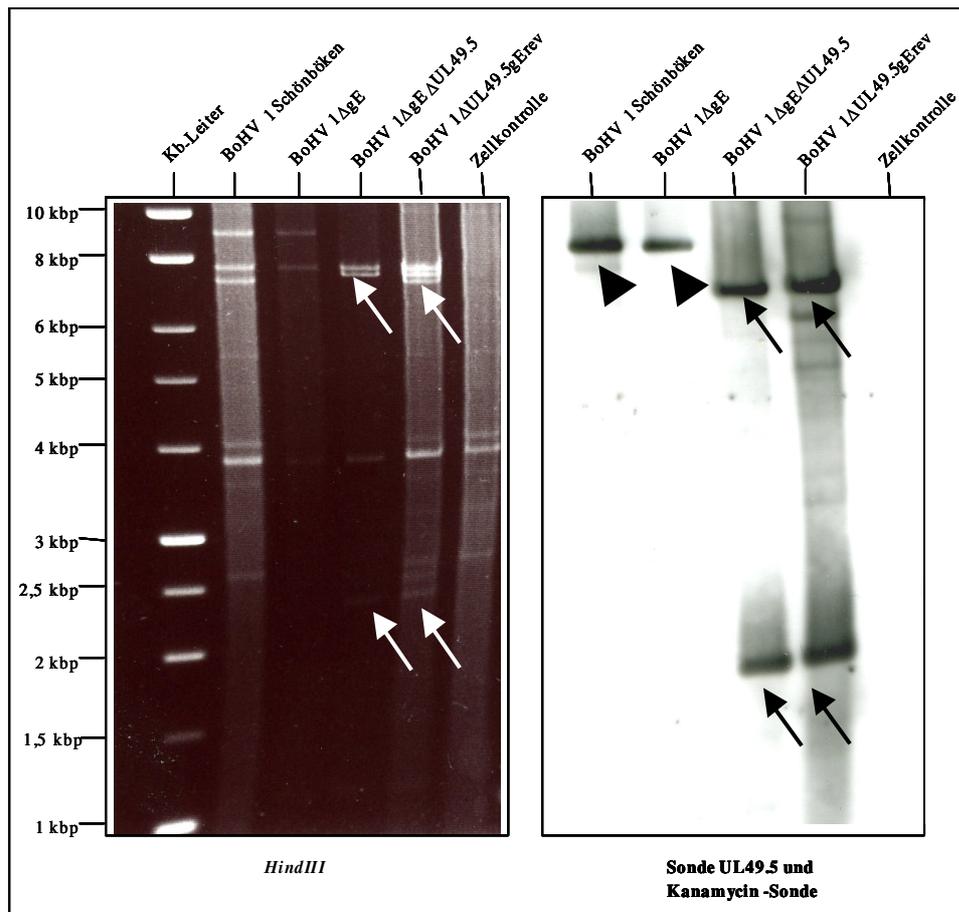


Abbildung 4 -2: RFLP und Southern Blot Analyse der BoHV-1 Δ gE Δ UL49.5- und BoHV-1 Δ UL49.5gErev Genome: Virale DNA im Falle von BoHV-1, BoHV-1 Δ gE und BoHV-1 Δ UL49.5gErev und bakterielle DNA im Falle von BoHV-1 Δ gE Δ UL49.5 wurde mit HindIII gespalten und in einem 0,7% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Eine 1kbp DNA-Leiter wurde als Größenmarker aufgetragen. Die Größe der Marker-Banden in kbp ist am linken Rand der Abbildung angegeben. Weiße Pfeile weisen auf die durch die Manipulation des Genoms entstandenen Banden von 2,2 kbp und 7,1 kbp hin. Die auf eine Nylonmembran übertragenen DNA-Fragmente wurden für den Nachweis des Kanamycinresistenzgens, ebenso wie für den Nachweis von UL49.5 Sequenzen mit einer Digoxigenin markierten Sonde hybridisiert. Schwarze Pfeile bezeichnen mit der Kanamycin-Sonde reagierende Sequenzen des viralen Genoms. Mit schwarzen Pfeilspitzen werden die Sequenzen angezeigt, die mit der UL49.5-Sonde reagiert haben.

4.1.4 Vergleichende Untersuchung der BoHV-1 Δ UL49.5 Deletionsmutante im Western Blot

Zum Nachweis der Deletion des UL49.5 Genprodukts, wurde eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Dazu wurden Zelllysate von infizierten MDBK Zellen jeweils nach 16stündiger Inkubation gewonnen. BoHV-1 Δ UL49.5gErev wurde mit den Ausgangsviren BoHV-1 Schönböcken und BoHV-1 Δ gE verglichen. Die Probenaufbereitung erfolgte sowohl unter reduzierenden wie auch unter nicht reduzierenden Bedingungen. Ein ca. 18kDa großes Protein wurde unter nicht reduzierenden

Bedingungen (Abbildung 4-3 A), ein ca. 9kDa großes unter reduzierenden Bedingungen (Abbildung 4-3 B) nur beim Wildtypvirus BoHV-1 Schönböken und bei dem einfach gE deletierten Virus mit einem polyklonalen Antiserum gegen pUL49.5 detektiert. Das als BoHV-1 Δ UL49.5gErev bezeichnete Virus zeigte hingegen keine spezifischen Banden im angegebenen Größenbereich. Da pUL49.5 als Heterodimer mit gM vorkommt, wurde auch eine Western Blot-Analyse der genannten Zellysate mit einem polyklonalen gM Antikörper durchgeführt. Dabei erfolgte der Nachweis des gM sowohl nicht reduzierend (Abbildung 4-3 C) wie auch reduzierend (Abbildung 4-3 D) nur beim Wildtypvirus (wt) und beim einfach gE-deletierten Virus. Dabei wurde unter nicht reduzierenden Bedingungen mit dem gM-Antiserum eine Doppelbande von 43 und 48 kDa detektiert. Unter der Einwirkung reduzierender Agenzien wurde nur die Bande mit einer Größe von etwa 43kDa gefunden. Die Mutante hingegen, welche pUL49.5 nicht exprimiert, zeigte auch keinerlei spezifische Reaktion mit dem gM Antikörper (Abbildung 4-3 C und D). Abbildung 4-3 C weist schwache Banden (gepunktete Pfeile) auf, die mit den Banden der Abbildung 4-3 A konkruent sind und somit als Reaktionsreste nach erfolgtem Stripping-Schritt angesehen werden. Weiterhin wurden die Expression des Glykoprotein E sowie die Expression von pUL49 überprüft. Das Glykoprotein E wurde wie erwartet sowohl beim Wildtyp als auch bei der einfach UL49.5-deletierten Virusmutante detektiert (Abbildung 4-3 E). Die Detektion von pUL49 gelang bei allen eingesetzten Zellysaten, was auf die Intaktheit des Leserahmens, auch nach der Deletion des angrenzenden Leserahmens UL49.5, hinweist (Abbildung 4-3 F).

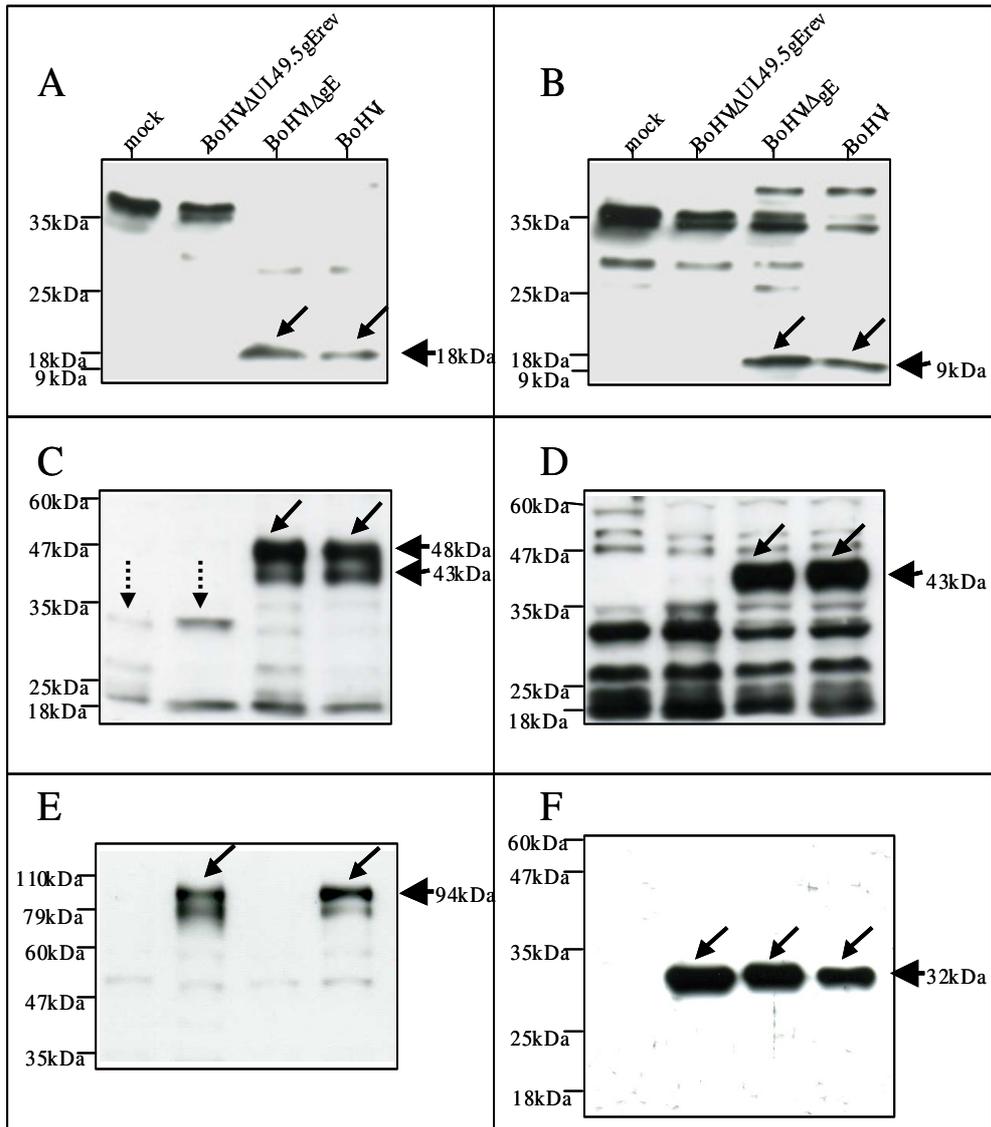


Abbildung 4-3: Vergleichende Western Blot Analyse der BoHV-1 Δ UL49.5 Deletionsmutante: Um die Proteinexpression der Deletionsmutante im Vergleich zu dem Ausgangsvirus und zum Wildtypvirus darzustellen, wurden Lysate infizierter MDBK-Zellen im Western Blot analysiert. Aufgetragen sind jeweils von links nach rechts: nicht infizierte Kontrollzellen (mock), BoHV-1 Δ UL49.5, BoHV-1 Δ gE und BoHV-1 wt. Am linken Rand der Abbildung ist jeweils der Größenmarker eingetragen. (A) Analyse der pUL49.5 Expression unter nicht reduzierenden Bedingungen. Pfeile markieren die spezifische Proteinbande von ca. 18kDa (Pfeilspitze), welche dem als Homodimer vorliegendem pUL49.5 entspricht. (B) zeigt die Reaktion der Zelllysate mit einem pUL49.5 Antikörper unter reduzierenden Bedingungen, mit ca. 9kDa (Pfeilspitze) wurden bei BoHV-1 Δ gE und BoHV-1 wt spezifische Banden (Pfeile) detektiert, die dem Monomeren pUL49.5 entsprechen. (C) Unter nicht reduzierenden Bedingungen wurden durch ein gM-Antiserum spezifische Banden von ca. 43kDa und 48kDa (Pfeilspitze) nur bei BoHV-1 Δ gE und BoHV-1 wt gefunden (Pfeile). Mit gepunkteten Pfeilen sind Banden markiert, die auf derselben Größenebene liegen, wie Banden der Abbildung A und die als unvollständig „gestrippt“ interpretiert werden.(D) Bei reduzierenden Bedingungen wurden spezifische Proteinbanden (Pfeile) einer Größe von ca. 43kDa (Pfeilspitze) ebenfalls nur bei BoHV-1 Δ gE und BoHV-1 wt detektiert. (E) Überprüfung der Expression von gE unter reduzierenden Bedingungen, spezifische Banden (Pfeile) wurden bei BoHV-1 wt und bei BoHV-1 Δ UL49.5gErev bei einer Größe von ca. 94kDa nachgewiesen. (F) pUL49 Expressionsmuster: unter reduzierenden Bedingungen wurde bei allen Virus infizierten Zelllysaten die Expression des Genproduktes von UL49 bei einer Größe von ca. 32kDa (Pfeilspitze) spezifisch markiert (Pfeile).

4.1.5 Charakterisierung von UL49.5 mittels konfokaler Laserskanmikroskopie

Es wurde mit einer Dreifach-Färbung gearbeitet, wobei die Zellen erst nach allen Färbeschritten fixiert wurden, so dass die vorgestellten Markierungssignale jeweils von nicht permeabilisierten Zellen stammen. Wie in Kapitel 3.2.5.4 beschrieben, wurden die Zellen vorbereitet und anschließend mit BoHV-1 wt und BoHV-1 Δ UL49.5gErev inokuliert. Infizierte Zellen - wie auch nicht infizierte Kontrollzellen- wurden nach 24stündiger Inkubation bei 37°C und 5%CO₂ gefärbt. Blau dargestellt (Abbildung 4-4, C) ist das durch den Sekundär-Antikörper Alexa[®]Fluor[®]647 markierte gE. Eine grüne Fluoreszenz wird durch den Sekundär-Antikörper Alexa[®]Fluor[®]488 hervorgerufen, der den gegen pUL49.5 gerichteten Primär-Antikörper detektiert (Abbildung 4-4, A). Biomembranen werden durch Vybrant[™] Cell-Labeling Solutions DiI rot (Abbildung 4-4 B) dargestellt.

Die Analysen mittels Laserskanmikroskop zeigten eine Kolo-kalisation des pUL49.5 mit dem gE an Biomembranen von nicht permeabilisierten Zellen (Abbildung 4-4, D, Pfeile). Die Kontrollzellen zeigten allein die Markierung der Biomembranen, die virusun-spezifisch ist. Bei den MDBK Zellen, welche mit BoHV-1 Δ UL49.5gErev infiziert wurden, zeigte sich neben der roten Biomembranmarkierung auch blaue Fluoreszenz, da dieses Virus wieder in der Lage ist gE zu exprimieren, dabei ergab sich erneut die Kolo-kalisation des gE mit zellulären Biomembranen.

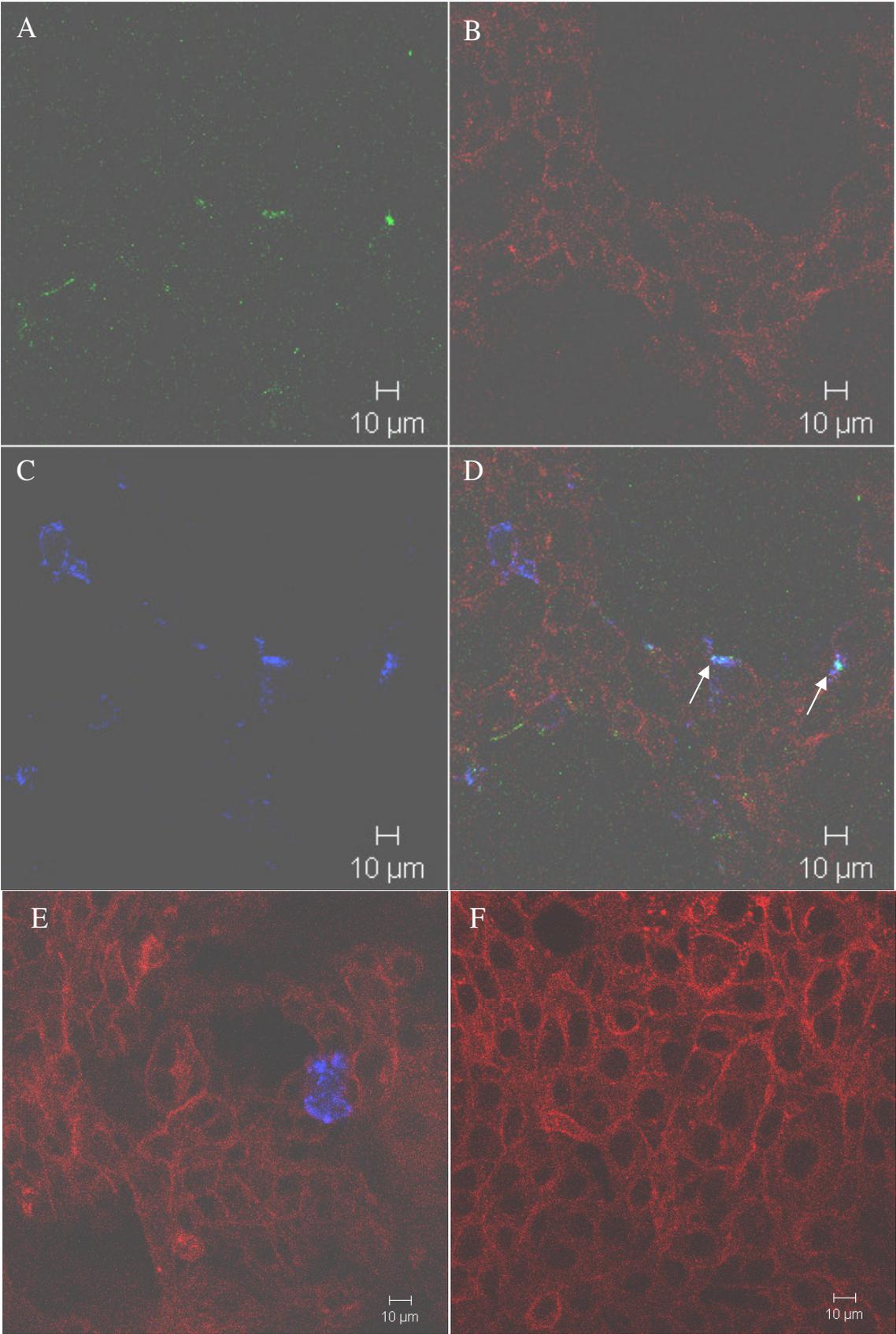


Abbildung 4-4: Indirekte Immunfluoreszenz mittels konfokaler Laserscannmikroskopie
Aufnahme (A), (B), (C) und (D) geben denselben Bildausschnitt Wildtyp-infizierter MDBK Zellen wieder. (A) Detektion von pUL49.5 durch einen polyklonalen Antikörper, visualisiert durch den Sekundär-Antikörper anti-Kaninchen Alexa[®] Fluor[®] 488. (B) Markierungsmuster von Lipiddoppelmembranen anhand von Vybrant[™] Cell-Labeling Solutions DiI. (C) Darstellung des gE-Expressionsmusters durch einen monoklonalen Primär-Antikörper, welcher mit dem Sekundär-Antikörper anti-Maus Alexa[®] Fluor[®] 647 markiert wurde. (D) Überlagerung („merge“) der drei erstgenannten Aufnahmen, grüne und blaue Fluoreszenz wurde bei Überlagerung türkisfarben dargestellt (Pfeile). (E) MDBK Zellen nach Infektion mit BoHV-1 Δ UL49.5gErev, neben der Markierung von Biomembranen werden infizierte Zellen mit gE-Expression gezeigt. (F) Nicht infizierte MDBK Kontrollzellen, bei denen allein die Biomembranmarkierung zu erkennen ist. Messbalken innerhalb der Abbildungen: 10 μ m

4.1.6 Wachstumsanalyse der Mutanten und Revertanten

4.1.6.1 Ein-Schritt-Wachstumskinetik

Zur Untersuchung der Replikationseigenschaften des rekombinanten Virus BoHV-1 Δ UL49.5gErev wurden Ein-Schritt-Wachstumskinetiken (siehe Kapitel 3.2.4.2) durchgeführt. Dabei wurde die Replikationseffizienz der Deletionsmutante mit der des Ausgangsvirus BoHV-1 Δ gE und dem Wildtypvirus BoHV-1 Schönböken verglichen. Konfluente MDBK Zellen wurden mit den zu untersuchenden Viren mit einer MOI von 1 infiziert und die in den Überständen und Zellen enthaltene Infektiosität 0, 4, 8, 12, 16, 24 und 72 h p.i. getrennt bestimmt. Sowohl die intrazellulär wie auch die extrazellulär ermittelten Virustiter von BoHV-1 Δ UL49.5gErev waren gegenüber den angegebenen Vergleichstitern der Viren BoHV-1 Δ gE und dem Wildtypvirus Schönböken um etwa den Faktor 10 verringert (Abbildung 4-5). Bereits die morphogenetisch zuerst auftretende Population der intrazellulären Viren zeigte die etwas reduzierten Titerwerte zu den einzelnen Zeitpunkten. Demgegenüber zeigten die extrazellulär erhobenen Messwerte keine weitere Reduktion. Damit liegt der für die Titerreduktion ursächliche Schritt wahrscheinlich vor dem *Egress* der intrazellulären Virionen.

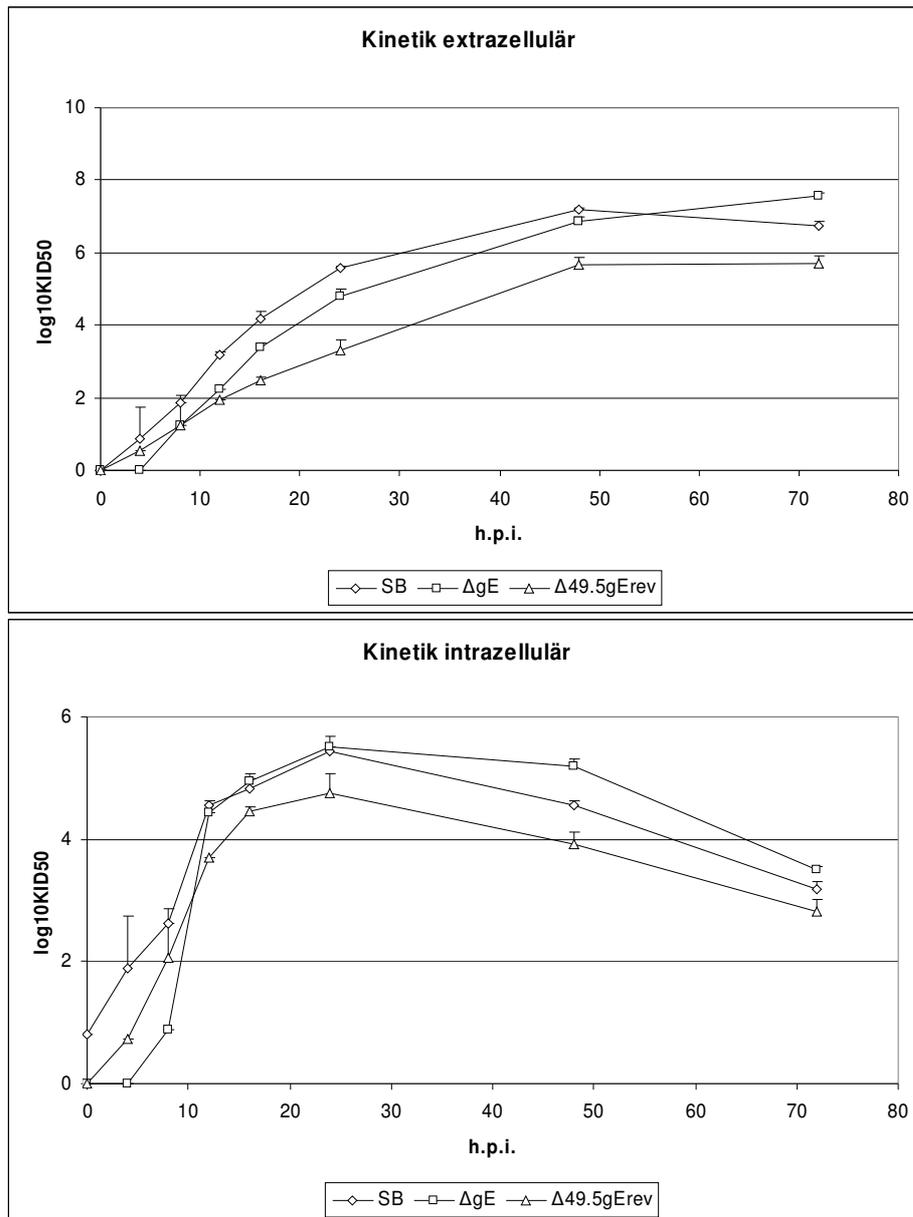


Abbildung 4-5: Ein-Schritt-Wachstumskinetik der UL49.5 Deletionsmutante:

MDBK Zellen wurden mit den Viren BoHV-1SB (wt), BoHV-1ΔgE und BoHV-1ΔUL49.5gErev infiziert, die MOI betrug hierbei 1. Zu den Zeitpunkten 0, 4, 8, 12, 16, 24, 48 und 72 h nach Infektion wurden die extra- und intrazellulären Virustiter bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte zweier Messungen. Striche über den Messwerten bezeichnen die Standardabweichung. Das UL49.5- deletierte Virus erreichte im Vergleich mit den Ausgangsviren BoHV-1SB (wt) und BoHV-1ΔgE etwa um den Faktor 10 reduzierte Messwerte.

4.1.6.2 Plaquegrößenbestimmung

Zur Charakterisierung des Zellkulturverhaltens bezüglich des *CTCSs* wurde eine Plaquegrößenmessung des Virus BoHV-1 Δ UL49.5gErev durchgeführt. Der berechnete Mittelwert von 150 vermessenen Plaques, welcher nach 48stündiger Inkubation unter Methylcellulose auf MDBK-Zellen gebildet wurde, war gegenüber dem zu 100% gesetzten Mittelwert des Wildtypvirus um 64% reduziert. Damit beeinträchtigt der Verlust des UL49.5 Locus den *CTCS* mehr als der Verlust des gE-Genortes, welcher eine 53% Reduktion der mittleren Plaquegröße gegenüber dem Wildtyp aufwies (Abbildung 4-6). Die Standardabweichung der Mittelwerte lag bei den einzelnen Viren in ähnlichen Größenordnungen, so dass von einer Vergleichbarkeit der Ergebnisse ausgegangen werden kann.

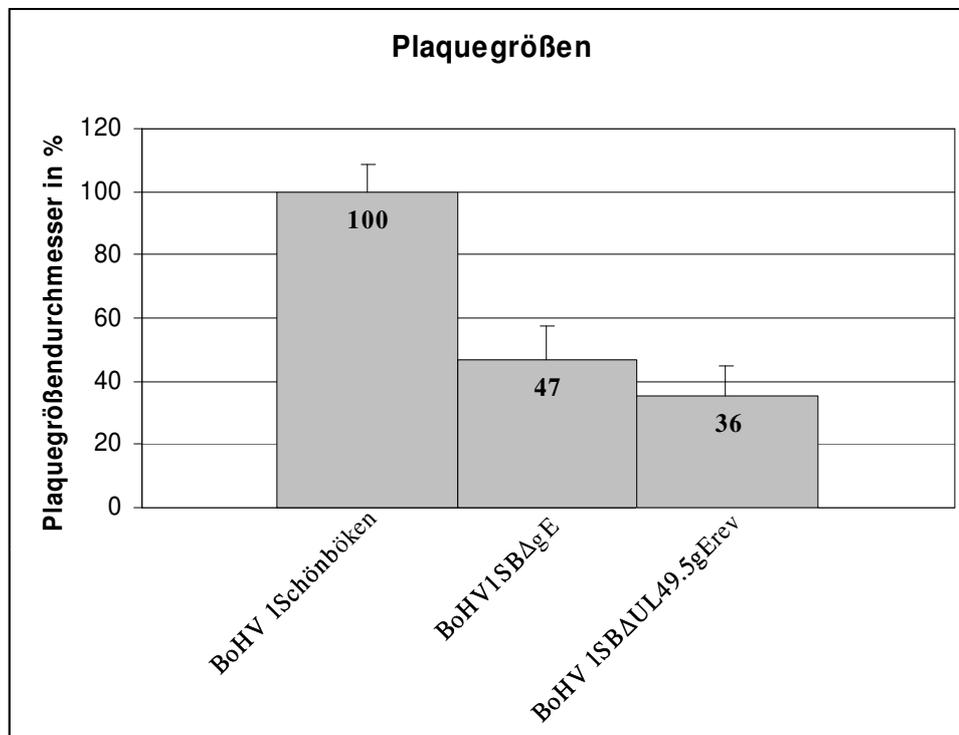


Abbildung 4-6: Relative Plaquegrößenanalyse der Viren BoHV-1, BoHV-1 Δ gE und BoHV-1 Δ UL49.5gErev. Nach 48h Inkubation infizierter MDBK-Zellen unter semisolidem Medium wurde die Plaquegröße vermessen. Der Mittelwert von 150 vermessenen Plaques pro Virus und die berechnete Standardabweichung (Striche über den Balken) sind ebenfalls dargestellt. Der Mittelwert des Elternvirus BoHV-1 Schönböken (wt) wurde ad 100% gesetzt. Verglichen mit dem Wildtyp ergab sich für BoHV-1 Δ UL49.5gErev eine Reduktion der mittleren Plaquegröße um 64%. Die mittlere Plaquegröße des BoHV-1 Δ gE betrug 47%.

4.2 BoHV-1-Doppeldeletionsmutante Glykoprotein E und UL49

4.2.1 Generierung eines spezifischen, polyklonalen Antiserum gegen das pUL49 des BoHV-1

Vier KLH-konjugierte Peptide, deren Antigenität mittels online verfügbarer Vorhersagemethoden bestimmt wurde, fanden bei der Immunisierung von vier weiblichen Kaninchen der Rasse *New Zealand White* Verwendung. Die Tiere wurden dem unter 3.2.6 genannten Immunisierungsschema folgend behandelt. Unter den gewonnenen Antiseren zeigte insbesondere das nach Immunisierung mit dem Peptid UL49-1 gewonnene Serum spezifische positive Signale im Western Blot wie auch in der indirekten Immunfluoreszenz (siehe Abbildungen 4-8 und 4-9).

4.2.2 Konstruktion der BoHV-1 Δ gE Δ UL49 Doppeldeletionsmutante

Zur funktionellen Charakterisierung des UL49-Genproduktes im besonderen Bezug zu einer gE-Deletion wurden rekombinante Viren des BoHV-1 Stammes Schönböken hergestellt. Der gesamte UL49 Leserahmen wurde dabei nach dem Prinzip der homologen Rekombination über BAC-RecET-Mutagenese deletiert (siehe 3.2.3.1). Dabei kamen die unter Kapitel 3.2.2.1. Tabelle 3-2 genannten Primer zur Amplifikation des Kanamycinresistenzgens zum Einsatz. Das so generierte Virus trägt im Folgenden die Bezeichnung BoHV-1 Δ gE Δ UL49. Abbildung 4-1 verdeutlicht schematisch die durchgeführten Manipulationen.

4.2.3 Konstruktion einer gE-Revertante von BoHV-1 Δ gE Δ UL49

Zur Charakterisierung eines alleinig im UL49 Genort deletierten BoHV-1, wurde in der Mutante BoHV-1 Δ gE Δ UL49 der gE Locus rekonstruiert. Verwendung fand hierzu ein Rekombinationsplasmid mit der Bezeichnung pTgEr (TRAPP ET AL., 2003). Durch Kointransfektion der Plasmid-DNA mit genomischer DNA des BoHV-1 Δ gE Δ UL49 wurde infektiöser Kulturüberstand gewonnen. Aus diesem konnte durch Plaquereinigung (siehe 3.2.3.7) ein revertantes Virus isoliert werden, welches einen restaurierten Genort gE und weiterhin eine Deletion des UL49-Gens aufwies. Die Selektion erfolgte hierbei anhand der in Folge der Reversion fehlenden *EGFP* Expression. Für diese gE-Revertante wird im Folgenden die Abkürzung BoHV-1 Δ UL49gErev verwendet.

4.2.4 Konstruktion einer UL49 –Revertante von BoHV-1 Δ gE Δ UL49

Um auszuschließen, dass der Phänotyp des neu konstruierten BoHV-1 Δ gE Δ UL49 auf andere Mutationen als die beschriebenen zurückzuführen ist, wurde auch der ORF des UL49 rekonstruiert. Dazu wurde der komplette Leserahmen von UL49 mittels PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde anschließend durch TOPO TA Klonierung in den Vektor pCR2.1-TOPO[®] überführt. DNA des entstandenen Plasmids wurde in Zellen des Typs KOP-R mit genomischer DNA von BoHV-1 Δ gE Δ UL49 kotransfiziert (siehe 3.2.1.8). Mittels Plaquereinigung auf MDBK Zellen erfolgte abschließend die Isolierung eines Virus, welches weiterhin über eine gE-Deletion verfügte, aber im UL49 Genort restauriert worden war (UL49-Revertante). Der Nachweis des pUL49 erfolgte dann über indirekte Immunfluoreszenzfärbung mit dem bereits beschriebenen polyklonalen UL49-Antiserum. Dieses Virus wird im Weiteren als BoHV-1 Δ gEUL49rev bezeichnet. Diese UL49-Revertante verhielt sich innerhalb ihrer Charakterisierung *in vitro* wie das einfach gE-deletierte Virus (Daten nicht gezeigt).

4.2.5 Genotypische Charakterisierung der BoHV-1 Δ gE Δ UL49 Doppeldeletionsmutante

Die genotypische Charakterisierung der Doppeldeletionsmutante BoHV-1 Δ gE Δ UL49 und der entsprechenden einfach deletierten Mutanten BoHV-1 Δ gE und BoHV-1 Δ UL49gErev erfolgte mittels Southern Blot. Die DNA des Elternvirus und die DNA der neu generierten Mutanten wurden mit der Restriktionsendonuklease *HindIII* gespalten und in einem 0,7%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (Abbildung 4-7). Durch die Deletion des UL49-ORFs verkürzte sich das 8,8kbp große J-Fragment, welches beim Wildtypvirus ebenso wie bei BoHV-1 Δ gE gefunden wurde (Abbildung 4-7, Pfeile) um 893 Basenpaare. In einer spezifischen Reaktion detektierte eine Digoxigenin markierte Sonde, welche komplementär zu der UL49 Sequenz von 9364 bis 10178 innerhalb des BoHV-1 Genoms ist, nur bei der DNA des wt-Virus und bei der DNA des einfach gE-deletierten Virus das J-Fragment des *HindIII* Verdau (Abbildung 4-7, Pfeilspitzen). Somit konnte durch die genotypische Charakterisierung die Deletion des UL49-ORFs bei BoHV-1 Δ gE Δ UL49 und BoHV-1 Δ UL49gErev bestätigt werden.

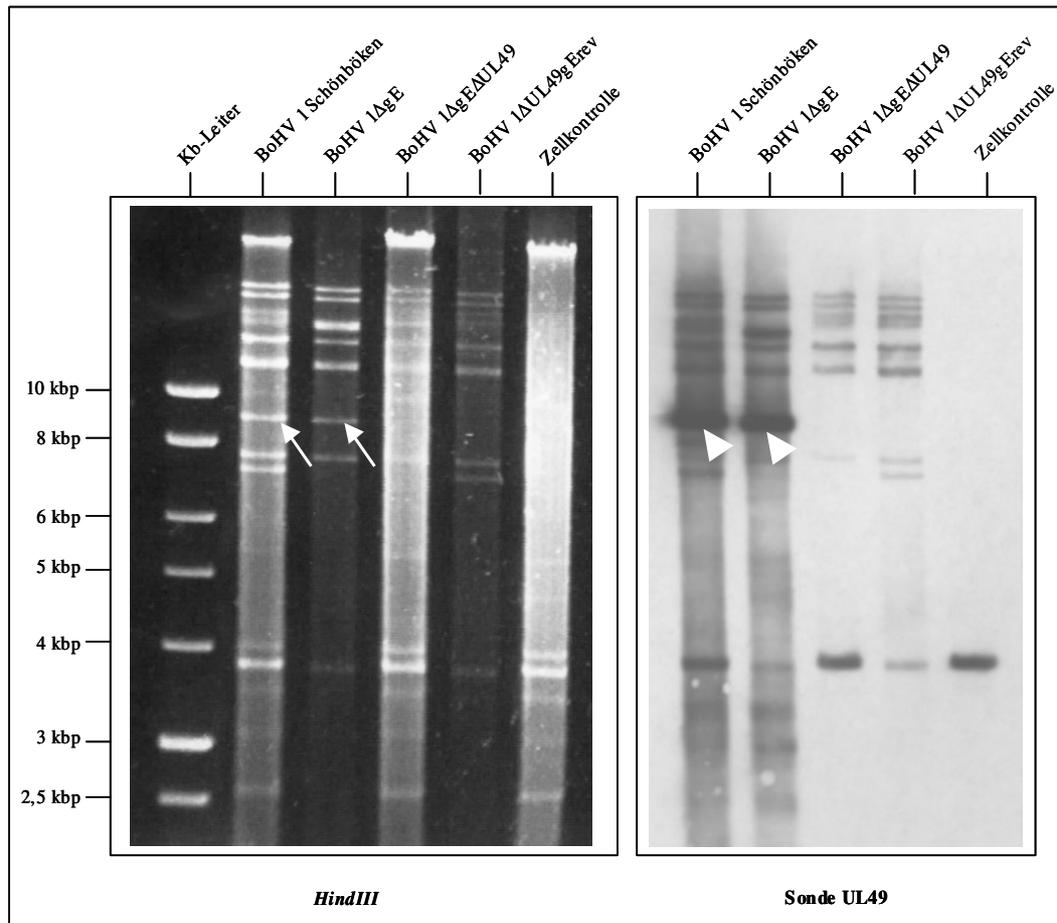


Abbildung 4-7: *RFLP- und Southern Blot Analyse*: Genomische DNA des BoHV-1wt Schönböken und der Virusmutanten BoHV-1ΔgE, BoHV-1ΔgEΔUL49, BoHV-1ΔUL49gErev sind hier nach Restriktionsenzymverdau mit HindIII und Auftrennung im Agarosegel abgebildet. Das 8,8 kbp große J-Fragment wird nur bei BoHV-1wt Schönböken und bei BoHV-1ΔgE gefunden (Pfeile). Eine Hybridisierungssonde gegen UL49 detektiert im Southern Blot, der auf Basis des Agarosegels generiert wurde, ein 8,8kbp großes DNA-Fragment nur innerhalb der wt-DNA und innerhalb der BoHV-1ΔgE-DNA (siehe Pfeilspitzen).

4.2.6 Vergleich der BoHV-1-ΔgEΔUL49 Mutanten und Revertanten im Western Blot

Lysate von MDBK-Zellen, die mit BoHV-1, BoHV-1ΔgE, BoHV-1ΔgEΔUL49 und BoHV-1ΔUL49gErev oder Mock (siehe Kapitel 3.2.1.4) infiziert worden waren, sind mittels Western-Blot-Analyse (siehe Kapitel 3.2.5.2) auf die Expression der Proteine gE, gD und UL49 geprüft worden (Abbildung 4-8). Dabei wurden für die Immundetektion mit Hilfe von verschiedenen Antikörpern stets dieselbe Membran nach einem stringenten Waschvorgang erneut verwendet. Ebenso wurden aufgereinigte Virionen (siehe Kapitel 3.2.1.5) der genannten Virusmutanten im SDS-Page-Gel separiert und mit den entsprechenden Antikörpern im Western Blot untersucht (Abbildung 4-8, D). Hierbei konnten auf einer Membran alle genannten Proteine mit einem Antikörpermisch detektiert werden. Abbildung 4-8 A gibt das Expressionsmuster der

Lysate nach Immundetektion durch einen monoklonalen Antikörper gegen gE wieder. Eine spezifische Bande der Größe von ca. 94kDa (Pfeilspitze) wurde bei BoHV-1wt Schönböken und bei BoHV-1 Δ UL49gErev nachgewiesen. Bei der Überprüfung des Expressionsmusters von pUL49 (Abbildung 4-8, B) wurde eine spezifische Bande bei BoHV-1wt und BoHV-1 Δ gE einer ungefähren Größe von 32kDa (Pfeilspitze) nachgewiesen. Schwächere Banden in demselben Größenbereich, die bei BoHV-1 Δ gE Δ UL49 und BoHV-1 Δ UL49gErev gefunden wurden, sind nicht spezifisch und finden sich auch bei Lysaten nicht infizierter Zellen. Der Einsatz aufgereinigter Virionen mit demselben Antikörper detektierte nur noch bei BoHV-1wt und BoHV-1 Δ gE die spezifischen Banden von ca. 32kDa (Abbildung 4-8, D). Als Beladungskontrolle wurde die verwendete Nylonmembran mit einem Antikörper gegen gD inkubiert (Abbildung 4-8, C). Spezifische Banden von ca. 72kDa (Pfeilspitze) wurden in allen virus-infizierten Zellysatspräparationen wiedergefunden. Der Einsatz der genannten Antikörper zur Ermittlung des Proteinexpressionsmusters aufgereinigter Virionen detektierte bei BoHV-1wt gE (94kDa), gD (72kDa) und pUL49 (32kDa), während BoHV-1 Δ gE spezifische Banden für gD und pUL49 aufwies. BoHV-1 Δ gE Δ UL49 reagierte nur mit dem Antikörper des gD mit einer spezifischen Bande von 72kDa. Die Detektion der Glykoproteine E und D führte bei aufgereinigten Virionen von BoHV-1 Δ UL49gErev zu spezifischen Banden der Größe 94kDa und 72kDa.

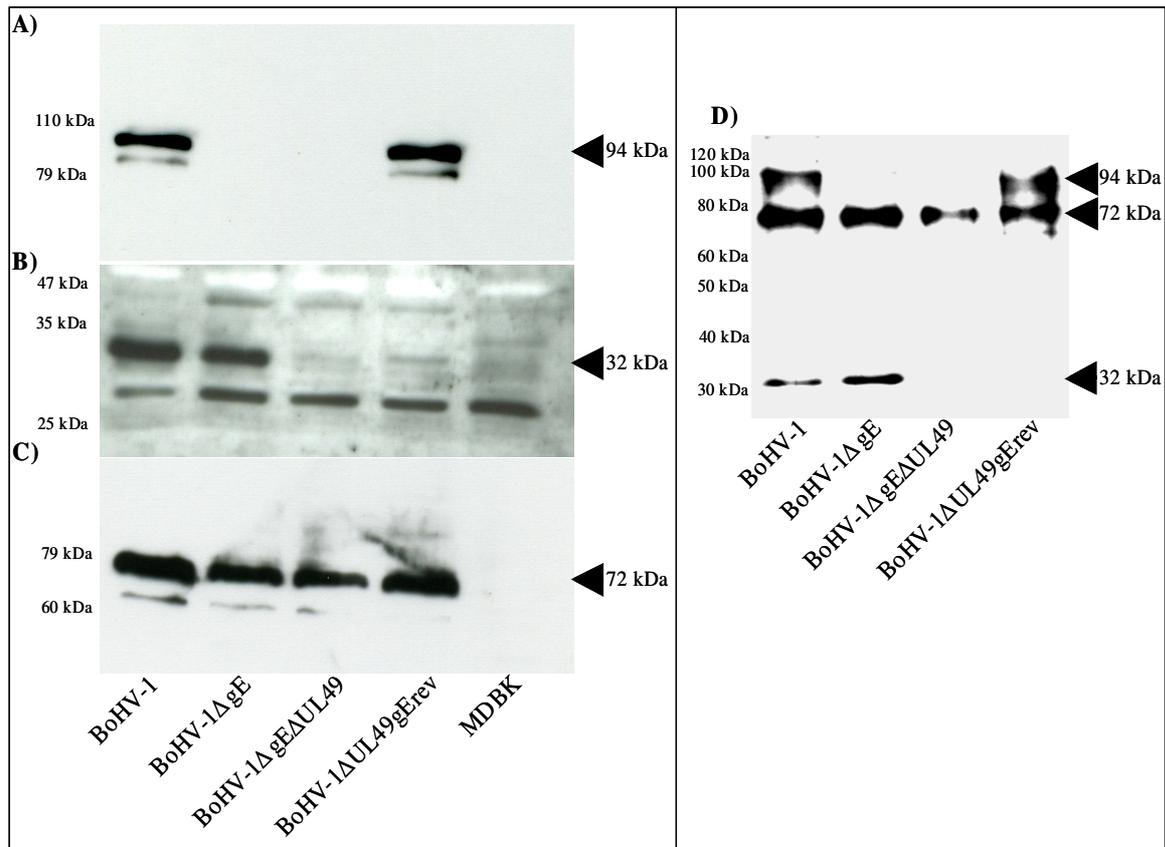


Abbildung 4-8: Western Blot Analyse der gE/UL49 Deletionsmutanten und Revertanten mit Zelllysaten: Um die Proteinexpression in der Doppeldeletionsmutante BoHV-1ΔgEΔUL49 und den jeweiligen Revertanten im Vergleich zum Ausgangsvirus darzustellen, wurden Lysate infizierter MDBK-Zellen im Western Blot analysiert. Von links nach rechts wurden aufgetragen: BoHV-1wt Schönböken, BoHV-1ΔgE, BoHV-1ΔgEΔUL49, BoHV-1ΔUL49gErev und nicht infizierte Kontrollzellen (mock). Jeweils links ist ein Größenmarker angegeben. (A) Spezifische Banden in der Größe von ca. 94kDa (Pfeilspitze) wurden mit dem monoklonalen Antikörper gegen gE beim Wildtypvirus und bei BoHV-1ΔUL49gErev gefunden. (B) Spezifische Banden der ungefähren Größe von 32kDa (Pfeilspitze) wurden nach Inkubation mit dem generierten pUL49-Serum bei BoHV-1wt und BoHV-1ΔgE detektiert. (C) Alle Zelllysate wiesen einen gleichen Gehalt des Glykoprotein D auf, welches als Beladungskontrolle verwendet wurde. (D) Virionen des wt-Virus zeigten spezifische Banden der Größen 94kDa, 72kDa und 32kDa nach Immundetektion der Proteine gE, gD und pUL49. BoHV-1ΔgE reagierte mit den Seren gegen gD und pUL49. Die Doppeldeletionsmutante BoHV-1ΔgEΔUL49 detektierte allein die spezifische Bande des gD, während BoHV-1ΔUL49gErev spezifische Reaktionen mit den Antikörpern des gE und des gD aufwies.

4.2.7 Charakterisierung des UL49 Proteins mittels konfokaler Laserscanmikroskopie

Um die subzelluläre Lokalisation des UL49 Proteins darzustellen, wurde mit einem konfokalen Laserscanmikroskop gearbeitet. Dabei sollte insbesondere die Möglichkeit einer Kolo-kalisation des Tegumentproteins mit dem Glykoprotein E evaluiert werden. MDBK Zellen wurden mit dem Wildtyp-Virus (wt) BoHV-1 Schönböken infiziert.

Nach einer Inkubation von 24 h bei Standardbedingungen wurden die infizierten Zellen genauso wie die Kontrollzellen gefärbt (siehe Kapitel 3.2.5.4). An den lebenden, nicht permeabilisierten Zellen wurde die Färbung gegen gE (blau) vorgenommen, genauso wurden Biomembranen (rot) angefärbt. Nach Fixation mit 80% Aceton erfolgte schließlich die Färbung gegen pUL49 (grün). Auf die gleiche Art und Weise wurden nicht infizierte Kontrollzellen und mit der Doppeldeletionsmutante BoHV-1 Δ gE Δ UL49 infizierte Zellen gefärbt. Während die Kontrollzellen ebenso wie die mit BoHV-1 Δ gE Δ UL49 infizierten Zellen nur eine positive Fluoreszenz an den Biomembranen (rot) aufwiesen (Abbildung 4-9, E und F), konnten beim Wildtyp-Virus auch die beiden weiteren Proteine dargestellt werden. Dabei zeigte gE erneut eine eindeutige Kollokalisierung mit der zellulären Plasmamembran (Abbildung 4-9, C). Das pUL49 zeigte hingegen verschiedene Färbemuster, einerseits in der Nähe der Kernmembran (Abbildung 4-9, A*) und andererseits im inneren Bereich der Plasmamembran (Abbildung 4-9, A Pfeil). Tatsächlich existieren aber auch Bereiche, in denen gE und pUL 49 kollokalisieren (Abbildung 4-9, D Überlagerungsbild, Pfeile).

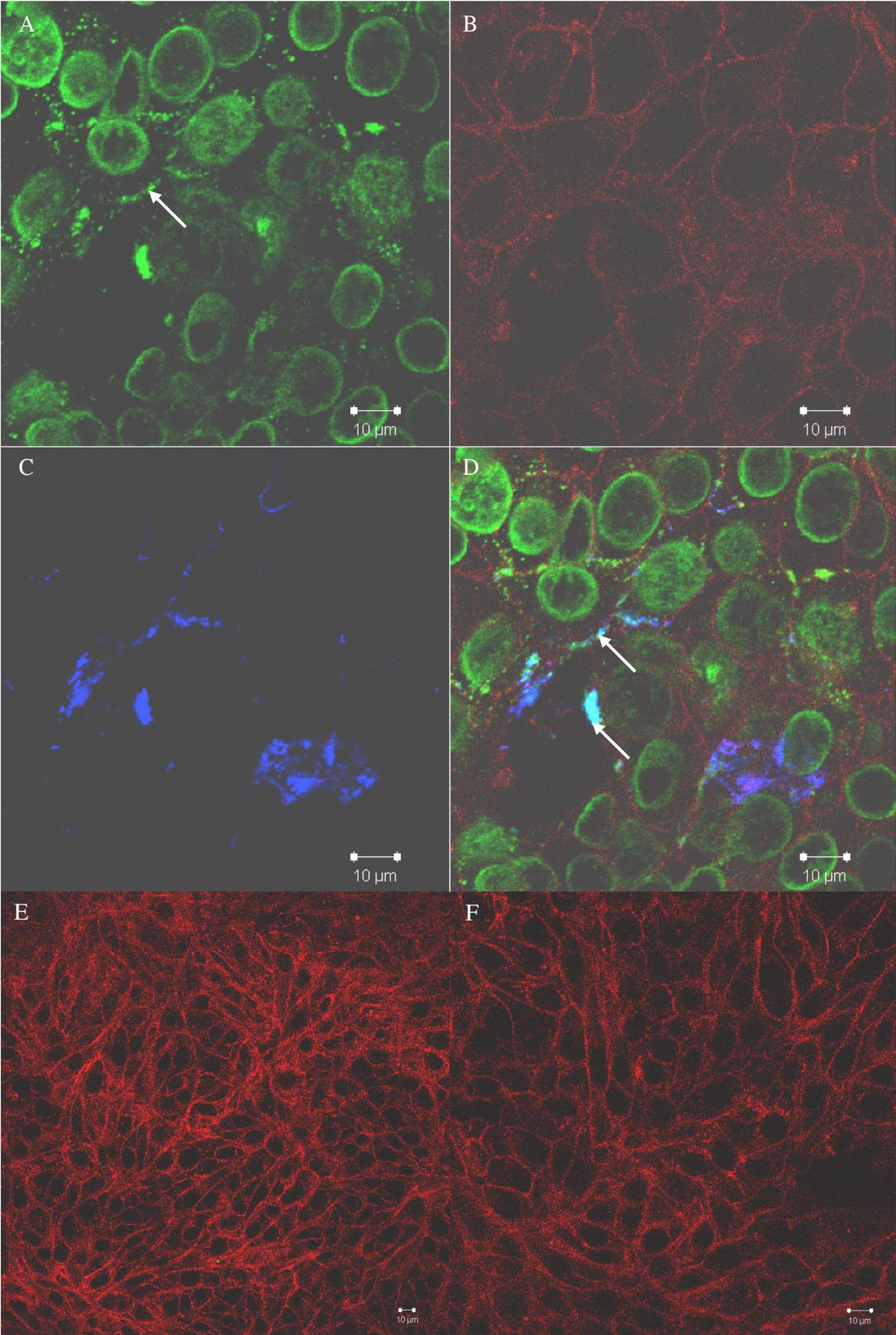


Abbildung 4-9: Indirekte Immunfluoreszenz mittels konfokaler Laserscannmikroskopie
Aufnahme (A), (B), (C) und (D) stellen den gleichen Bildausschnitt von BoHV-1wt infizierten Zellen dar. (A) Fluoreszenzmarkierung des pUL49 durch einen polyklonalen Primärantikörper, der mittels anti-Kaninchen Alexa[®] Fluor[®] 488 detektiert wurde. Der Stern verweist auf positive Signale an der Kernmembran, während der Pfeil auf positive Signale an der Plasmamembran deutet. (B) Visualisierung von Biomembranen durch Vybrant[™] Cell-Labeling Solutions Dil. (C) Mit einem monoklonalen Antikörper detektiertes gE, das dann mit anti-Maus Alexa[®] Fluor[®] 647 angefärbt wurde. (D) Überlagerung („merge“) der drei erstgenannten Aufnahmen, klare Kolo-kalisation von grün (pUL49) und blau (gE) markierten Strukturen (Pfeil). (E) Mit BoHV-1ΔgEΔUL49 infizierte MDBK Zellen; hier reagierte allein die Biomembran markierende Substanz. (F) Ebenso verhält es sich mit nicht infizierten Kontrollzellen. Die Messbalken innerhalb der Abbildungen entsprechen einer Länge von 10 μm.

4.2.8 Vergleichende Wachstumsanalyse der BoHV-1ΔgEΔUL49 Mutante und der gE- und UL49-Revertanten

4.2.8.1 Ein-Schritt-Wachstumskinetik

Zur Charakterisierung der Replikationseigenschaften der generierten Viren wurde eine Ein-Schritt-Wachstumskinetik erstellt. Zu den Zeitpunkten 0, 4, 8, 12, 16, 24, 48 und 72 h p.i. wurden die intra- und extrazelluläre Infektiosität durch Titration (siehe Kapitel 3.2.4.1) ermittelt. Hierzu wurden MDBK-Zellen mit einer MOI von 1 mit BoHV-1, BoHV-1ΔgE, BoHV-1ΔgEΔUL49, BoHV-1ΔUL49gErev und BoHV-1ΔgEUL49rev infiziert. Die Experimente wurden jeweils einmal wiederholt, der Mittelwert gebildet und die Standardabweichung berechnet (Abbildung 4-10). Die extrazellulär ermittelten Messwerte zeigten, dass sich die Viren bis zum Zeitpunkt 24 h p.i. kaum voneinander unterschieden, dann aber der Titer der Mutante BoHV-1ΔgEΔUL49 in etwa um den Faktor 10 niedriger bleibt als die Titer der Vergleichsviren. Bei der Beurteilung der intrazellulär gemessenen Virustiter zeigte sich zudem, dass das BoHV-1 Wildtyp-Virus den niedrigsten End-Titer aufwies und auch den Scheitelpunkt seiner Wachstumsphase früher als die Virusmutanten erreichte. Die weiteren gemessenen Virustiter unterschieden sich jedoch nicht wesentlich voneinander. Somit wird die hier quantifizierte Replikationseffizienz durch die Einzeldelation des gE bzw. UL49 nicht und durch die Deletion beider Gene nur geringgradig beeinflusst.

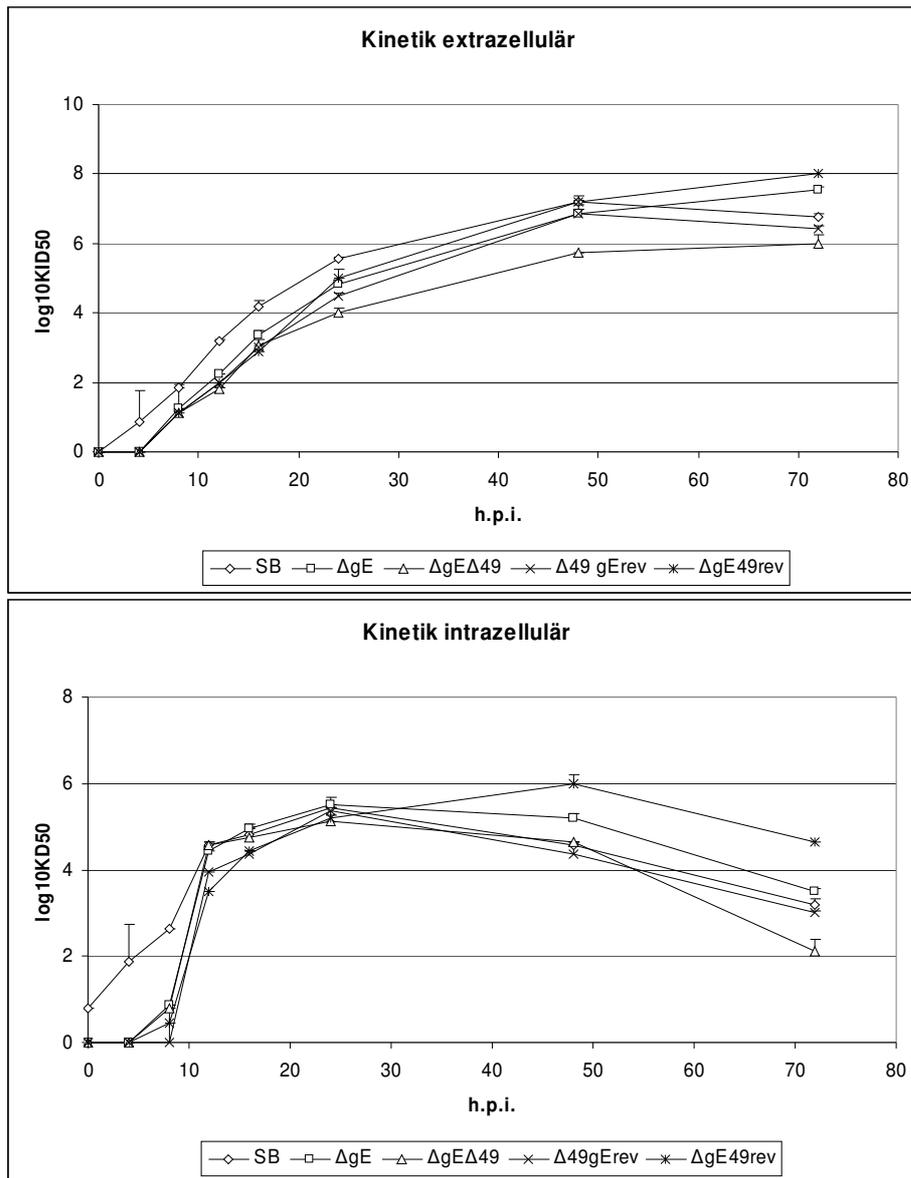


Abbildung 4-10: Vergleichende Wachstumsanalyse der BoHV-1ΔgEΔUL49 Mutante und der gE- und UL49-Revertanten: Mit einer MOI von 1 wurden MDBK-Zellen mit BoHV-1SB (wt), BoHV-1ΔgE, BoHV-1ΔgEΔUL49, BoHV-1ΔUL49gErev und BoHV-1ΔgEUL49rev infiziert. Zu den Zeitpunkten 0, 4, 8, 12, 16, 24, 48 und 72 Stunden nach Infektion wurden die intra- und extrazellulären Virustiter jeweils als KID_{50}/ml bestimmt. Striche über den Messwerten bezeichnen die Standardabweichung. BoHV-1ΔgEΔUL49 erreichte extrazellulär einen um eine \log_{10} -Stufe verringerten End-Titer verglichen mit den übrigen getesteten Viren. Die intrazelluläre Kinetik des Wildtyp-Virus SB zeigte eine deutlich frühere Überschreitung des Scheitelpunktes der Wachstumskurve und in der Folge im Vergleich einen niedrigeren Endtiter.

4.2.8.2 Vergleichende Plaquegrößenbestimmung der BoHV-1 Δ gE Δ UL49 Mutante sowie der gE- und UL49-Revertanten

Um die Beeinflussung der Deletion des UL49-ORFs sowie der Doppeldeletion gE und UL49 hinsichtlich der Plaquegrößenentwicklung zu untersuchen, wurden jeweils 150 Plaques für die einzelnen Viren vermessen (Abbildung 4-11). MDBK-Zellen wurden mit BoHV-1, BoHV-1 Δ gE, BoHV-1 Δ gE Δ UL49, BoHV-1 Δ UL49gErev und BoHV-1 Δ gEUL49rev infiziert, mit Methylcellulose überschichtet und für 48h inkubiert. Der maximale Plaque-Durchmesser wurde nach Anfärbung vitaler Zellen mittels Kristallviolett bestimmt. Es wurden jeweils Mittelwerte und die Standardabweichung errechnet. Die Werte wurden zu dem für BoHV-1 ermittelten Messwert (100%) in Relation gesetzt. Dabei wurde für die Doppeldeletionsmutante BoHV-1 Δ gE Δ UL49 eine um 83% verminderte Plaquegröße registriert. Die alleinige Deletion des UL49 ORF resultierte in einer um 52% reduzierten Plaquegröße und gleicht damit der berechneten Plaquegröße der BoHV-1- Δ gE-Mutante, ebenso wie BoHV-1 Δ gEUL49rev. Die Doppeldeletion beeinträchtigte somit den *CTCS* erheblich und liegt mehr als 50% unterhalb der Plaquegrößen der singulären pUL49 und gE-Deletionsmutanten. Auffällig ist außerdem, dass der Schwankungsbereich der Plaquegrößen, hier wiedergegeben durch die Standardabweichung bei der Doppeldeletionsmutante BoHV-1 Δ gE Δ UL49 am geringsten ausfällt.

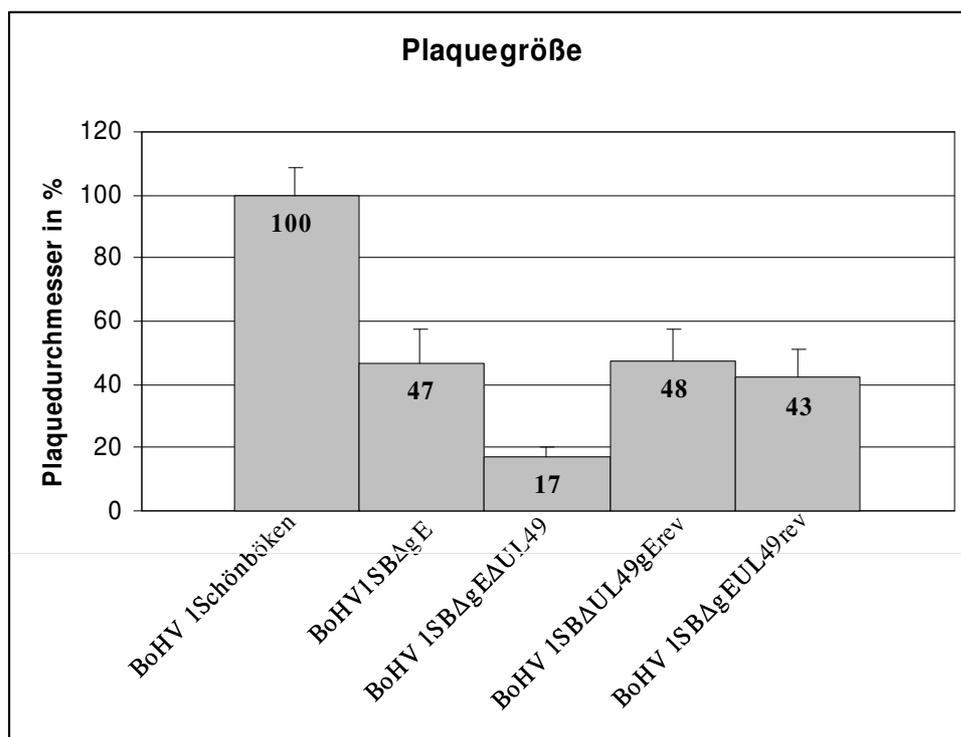


Abbildung 4-11: Relative Plaquegrößen von BoHV-1ΔgEΔUL49 und der zugehörigen Revertanten: 48h p.i. wurde der maximale Durchmesser von je 150 BoHV-1-, BoHV-1ΔgE-, BoHV-1ΔgEΔUL49-, BoHV-1ΔUL49gErev und BoHV-1ΔgEUL49rev-spezifischen Plaques bestimmt. Der für BoHV-1 ermittelte durchschnittliche Messwert wurde auf 100% gesetzt. Striche über den Balken bezeichnen die Standardabweichung. BoHV-1ΔgEΔUL49-spezifische Plaques waren im Mittel um 83%, BoHV-1ΔUL49gErev-spezifische Plaques um 52% und BoHV-1ΔgEUL49rev-spezifische Plaques um 57% kleiner als die Plaques des Wildtyp-BoHV-1.

4.3 Doppeldeletionsmutante gE und Thymidinkinase

4.3.1 Herstellung eines TK-spezifischen polyklonalen Antiserums

Zur Identifizierung der BoHV-1 exprimierten Thymidinkinase wurde ein spezifisches polyklonales Serum hergestellt. Dazu wurden KLH-konjugierte antigene Peptidsequenzen zwei Kaninchen zur Immunisierung verabreicht. Die Vorhersage der Antigenität von Peptidsequenzen wurde wie unter 3.2.6 beschrieben ermittelt. Dem unter 3.2.6 gezeigten Immunisierungsschema folgend, wurden die Tiere behandelt. Mit dem Antiserum, welches nach Immunisierung mit TK1 gewonnen wurde, konnten sowohl in der indirekten Immunfluoreszenz (Abbildung 4-15) als auch im Western Blot (Abbildung 4-14) spezifische Reaktionen hervorgerufen werden.

4.3.2 Generierung der Doppeldeletionsmutante BoHV-1 Δ gE Δ TK

Mit Hilfe der BAC-Mutagenese auf Basis des EL250-Systems wurde ein Virus generiert, welches sowohl im gE-Genort, als auch im Genort UL23, der für das Enzym Thymidinkinase des BoHV-1 kodiert, partiell deletiert ist. Dazu wurde das Genom des BoHV-1 pBHV-1 Δ gE (TRAPP ET AL.) in elektrokompetente *E. coli* des Typs EL250 (LEE ET AL., 2001) elektroporiert (siehe Kapitel 3.2.3.4). Hierbei werden durch einen defekten Prophagen Funktionen vermittelt, die zur Protektion und Rekombination von transformierter DNA beitragen. Durch Aktivierung der Arabinose induzierbaren *flpe*-Rekombinase, wurde das inserierte Kanamycinresistenzgen schließlich bis auf eine sogenannte *FRT-Site* von 35 bp aus dem Genom wieder entfernt. In Abbildung 4-12 sind die Schritte der Mutagenisierung des pBHV-1 Δ gE in *E. coli* schematisch dargestellt. Der genomische Aufbau des Wildtypvirus und die Restriktionsfragmentkarte desselben verdeutlicht Abbildung 4-12, A. Das Genumfeld der zu deletierenden Thymidinkinase ist in Abbildung 4-12, B vergrößert dargestellt. Abbildung 4-12, C stellt die Insertion des Kanamycinresistenzgens dar, während in Abbildung 4-12, D der Genomaufbau nach Elimination des Resistenzgens gegen das Antibiotikum wiedergegeben ist.

Der ORF der Thymidinkinase (Position bp63260 - bp64339 im BoHV-1-Genom) konnte nicht komplett entfernt werden, da ein wichtiger Promotor für benachbarte, essentielle Gene innerhalb dieses ORF gelegen ist. Aus diesem Grund wurden 293 bp, von Nukleotid 63683 – 63975 deletiert. Das doppelt deletierte Virus sollte auch *in vivo* in Rindern getestet werden. Um möglichst wenig Fremdsequenzen innerhalb des Virusgenoms mitzuführen, wurde die BAC-Sequenz innerhalb des gE-Locus wieder entfernt. Dazu wurde eine Kotransfektion mit der DNA des doppelt deletierten Virus und der Plasmid-DNA pTZ18RflanksgE durchgeführt. Die Plasmid-DNA pTZ18RflanksgE beinhaltet dabei zwei 1,4 kbp große BoHV-1 homologe Sequenzen, die den gE-ORF bis auf einen Bereich von 281 bp (bp121694 - bp121975) darstellen. Nach der Kotransfektion in Zellen des Typs MDBK entwickelten sich zwei Viruspop-

ulationen: eine entsprach der transfizierten DNA, beinhaltete also noch die BAC-Sequenz und ließ sich durch die Expression von *EGFP* identifizieren. Die zweite Viruspopulation exprimierte dagegen kein EGFP mehr und hatte die inserierte BAC-Sequenz durch homologe Rekombination mit den Sequenzen der Plasmid-DNA pTZ18RflanksgE verloren. Diese Viruspopulation wurde durch Subpassagen unter semisolidem Medium (siehe Kapitel 3.2.3.9) aufgereinigt.

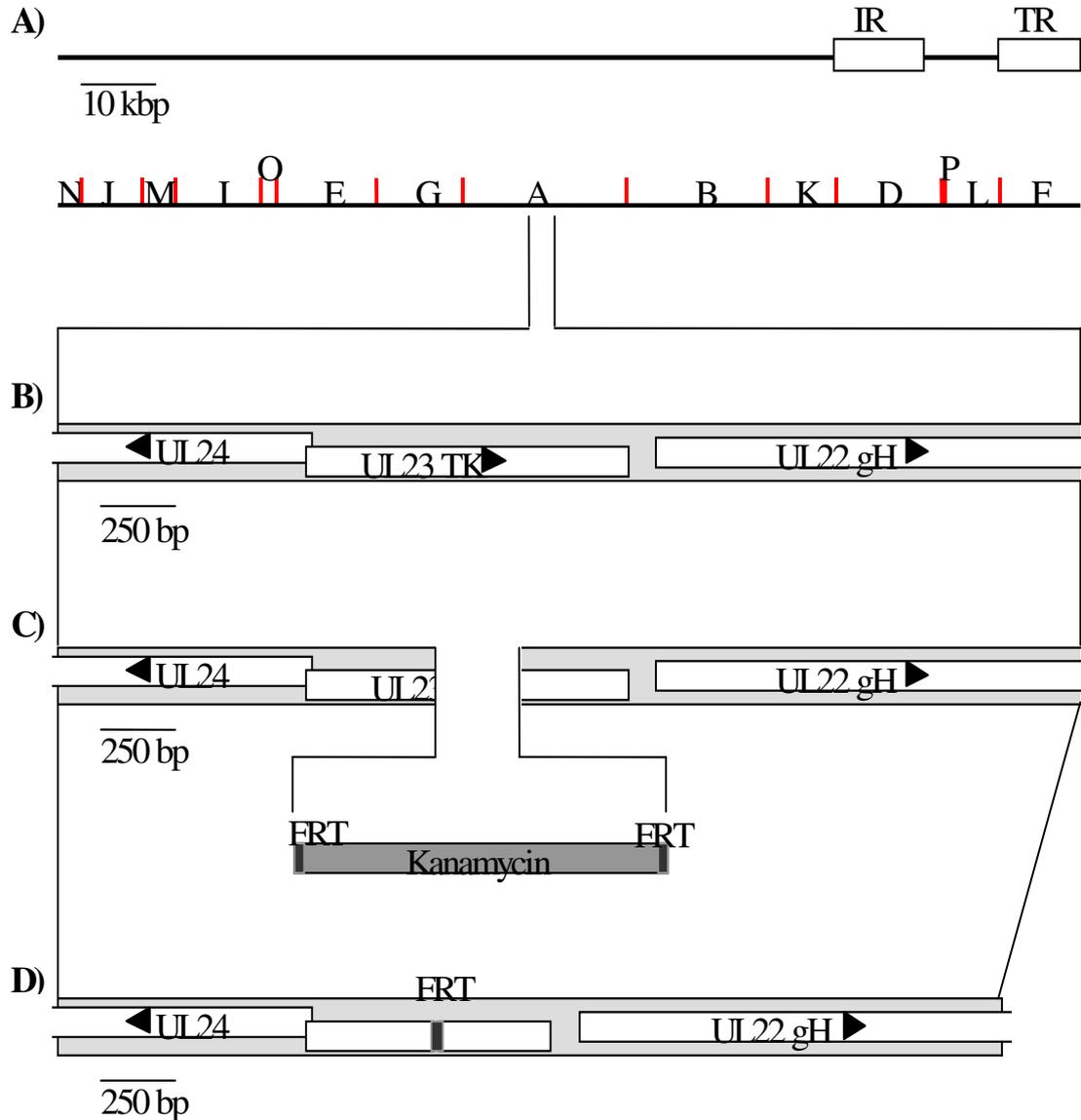


Abbildung 4-12: Konstruktion der Δ TK-Deletionsmutante durch gezielte BAC-Mutagenese: (A) zeigt die Genomorganisation von BoHV-1 und die HindIII-Restriktionsfragmentkarte. In (B) ist die Lage des UL23 TK ORFs und seiner benachbarten Leserahmen dargestellt. (C) zeigt die Deletion innerhalb des TK ORFs und die Insertion des Kanamycinresistenzgens und (D) den Genomabschnitt nach Elimination des Resistenzgens.

4.3.3 Genotypische Charakterisierung der BoHV-1 Δ gE Δ TK Doppeldeletionsmutante

Um die Deletion des Glykoprotein E-Leserahmens ebenso wie die partielle Deletion des Leserahmens der Thymidinkinase zu überprüfen, wurde ein Southern Blot angefertigt. Dabei wurde der Genotyp des mutierten Virus BoHV-1SB Δ gE Δ TK mit dem des Ausgangsvirus BoHV-1 Schönböken verglichen. Die DNA der entsprechenden Viren wurde isoliert und mit dem Restriktionsenzym *HindIII* gespalten (siehe Kapitel 3.2.2.4). Die Fragmente wurden in einem 0,7% Agarosegel aufgetrennt. Im Unterschied zum Ausgangsvirus wies die DNA des BoHV-1 Δ gE Δ TK kein DNA-Fragment von 7,2 kbp auf (Abbildung 4-13 weißer Pfeil), durch die Insertion der BAC-Sequenz ist dieses Fragment auf 15,8kbp vergrößert worden (TRAPP ET AL., 2003). Durch die partielle Deletion des TK-ORF verringerte sich die Größe des A-Fragments (21,2kbp) um 293 bp. Diese Größenminderung ist allerdings zu geringfügig, als dass sie eindeutig im Agarosegel nachweisbar ist. Spezifische Sequenzen wurden daher durch Hybridisierung der DNA mit Digoxigenin-markierten DNA-Sonden detektiert. Eine Sonde, die gegen eine Sequenz gerichtet ist, die innerhalb der gesetzten Deletion des TK-Locus liegt, detektierte allein das Elternvirus (Abbildung 4-13, schwarze Pfeilspitze). Dagegen detektierte eine Sonde, die eigentlich gE-spezifische Sequenzen hybridisierte, sowohl DNA des Ausgangsvirus, als auch DNA der gE-deletierten Mutante, außerdem wird DNA von nicht infizierten MDBK Zellen detektiert. In der Fragmentgröße von 7,2kbp, die den gE-ORF beinhaltet, ergeben sich aber eindeutige Unterschiede zwischen Elternvirus und BoHV-1 Δ gE Δ TK (Abbildung 4-13, schwarzer Pfeil). Damit konnte durch die genotypische BoHV-1 Δ gE Δ TK-Charakterisierung die Deletion der gE- und TK-ORFs bestätigt werden.

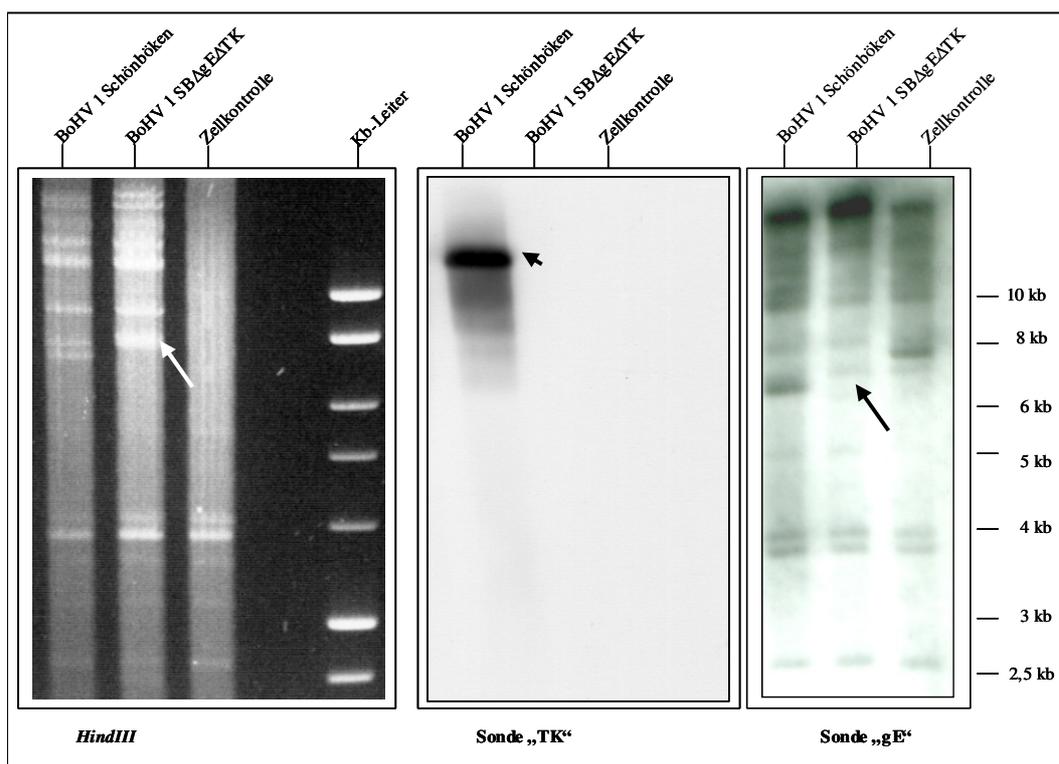


Abbildung 4-13: *RFLP- und Southern Blot Analyse der DNA von BoHV-1 SB und BoHV-1SBΔgEΔTK: Die Genotypen des Elternvirus und des gE/TK-deletierten Virus wurden nach Restriktionsenzymverdau mit HindIII im Agarosegel dargestellt. Eine 1 kbp DNA-Ladder wurde als Größenmarker aufgetragen. Die Southern Blot Membran wurde einerseits mit einer Sonde, welche gegen TK-Sequenzen gerichtet ist, behandelt und andererseits mit einer Sonde, die gE-Sequenzen detektieren soll. Mit Hilfe von Pfeilen wird auf den Verlust des 7,2kbp-Fragments hingewiesen. TK-Sequenzen werden nur innerhalb des Wildtypvirus-Genoms (Pfeilspitze) gefunden.*

4.3.4 Darstellung der gE/TK-Doppeldeletionsmutante im Western Blot

MDBK-Zellen wurden mit BoHV-1, BoHV-1ΔgEΔTK oder mock (siehe Kapitel 3.2.1.4) infiziert. Zelllysate wurden nach einer Infektionszeit von 16h gewonnen (siehe Kapitel 3.2.1.6) und durch Western Blot-Analyse (siehe Kapitel 3.2.5.2) mit BoHV-1 spezifischen Antikörpern auf die Expression von einerseits gE und andererseits TK getestet. Erwartungsgemäß detektierte das polyklonale Kaninchenserum pAK-TK1 eine Proteinbande von 37 kDa nur im Proteinmuster des Wildtypvirus BoHV-1 Schönböcken (Abb 4-14 A, Pfeil). Der monoklonale Antikörper mAk 2-1 reagierte spezifisch mit einer ca. 94 kDa großen Proteinbande in Lysaten des Elternvirus (Abbildung 4-14 B, Pfeil), während eine solche Reaktion bei dem deletierten Virus nicht nachweisbar war. Damit reagierte das doppelt deletierte Virus auch auf Proteinebene wie es korrekte Deletionen erwarten lassen würden. Die Immundetektion von gE und TK erfolgte jeweils an denselben Proben auf derselben Membran. Dies wurde durch einen als „Stripping“ bekannten Schritt möglich, der der Behandlung mit dem Antikörper -dessen Antigen als zweites detektiert wurde-, vorausgegangen war.

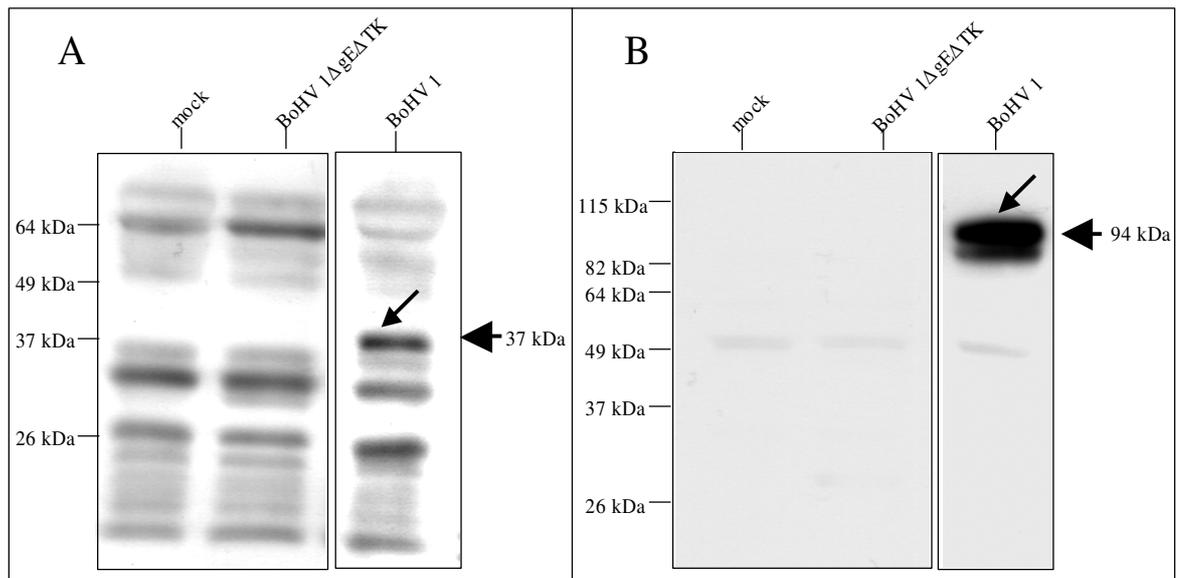


Abbildung 4-14: *Western Blot Analyse von BoHV-1ΔgEΔTK*: Die Überprüfung der Proteinexpression von gE und TK erfolgte mittels SDS-(10%)-Polyacrylamid-Elektrophorese und anschließendem Immunoblotting. Links neben den Abbildungen ist jeweils ein Größenmarker dargestellt. (A) Zur Untersuchung der Zelllysate (von links nach rechts: uninfizierte Kontrollzellen, BoHV-1ΔgEΔTK und BoHV-1 wt) wurde der polyklonale Antikörper TK1 eingesetzt: nur beim Wildtypvirus gelang die Detektion einer spezifischen Bande (Pfeil) von einer ungefähren Größe von 37kDa (Pfeilspitze). (B) Der Nachweis einer spezifischen Bande (Pfeil) nach Einsatz des monoklonale Antikörpers gegen gE von ca. 94kDa (Pfeilspitze) erfolgte ebenso nur beim Wildtypvirus. Die fehlende Expression der von den Antikörpern detektierten Proteine bei der Doppeldeletionsmutante konnte so verifiziert werden.

4.3.5 Konfokale Laserskanmikroskopie: Analyse der subzellulären Lokalisation von gE und TK

MDBK Zellen wurden mit dem Wildtyp-Virus Schönböken und mit der Doppeldeletionsmutante BoHV-1SBΔgEΔTK infiziert. Wie unter 3.2.5.4 beschrieben, wurden infizierte, ebenso wie nicht infizierte, Kontrollzellen verwendet. Die Oberfläche unfixierter Zellen wurde jeweils gegen gE gefärbt (Abbildung 4-15 C). Als Sekundär-Antikörper wurde anti-Maus Alexa[®]Fluor[®]647 eingesetzt, dessen Fluoreszenz blau wiedergegeben wird. Die Plasmamembran selbst wurde mit Vybrant[™] Cell-Labeling Solutions DiI gefärbt. Diese hochgradig lipophile Substanz lässt sich durch Licht der Wellenlänge 549 nm anregen und die Fluoreszenz dieses Membranmarkers ist auf allen folgenden Bildern rot dargestellt (Abbildung 4-15 B). Nach der Fixation der Zellen durch 80% Aceton wurden auch intrazelluläre Antigene durch entsprechende Antikörper detektierbar. Entsprechend wurde der polyklonale Antikörper zur Detektion von TK eingesetzt. Mit anti-Kaninchen Alexa[®]Fluor[®]488 wurde der TK-Antikörper markiert und die aufgenommenen Fluoreszenzsignale sind im Folgenden grün dargestellt (Abbildung 4-15, A). Mit diesen drei Farbspektren lassen sich die subzellulären Lokalisationen der entsprechenden Strukturen bzw. Proteine sichtbar machen. Wie in Abbildung 4-15 gezeigt, gelingt bei den Wildtyp-infizierten Zellen die Oberflächenfärbung gegen das gE (Abbildung 4-15 C). Diese Färbung verdeutlicht eine

weitestgehende Kollokalisierung mit der Plasmamembran der Zelle (Abbildung 4-15, D). Dagegen liefert die Markierung von TK ein punktförmiges Verteilungsmuster, welches zudem vorrangig intrazytoplasmatisch in Erscheinung tritt (Abbildung 4-15, A). Erwartungsgemäß reagieren Zellkulturen, die mit dem doppelt deletierten Virus BoHV-1SB Δ gE Δ TK infiziert worden waren (Abbildung 4-15, E) ebenso wie die uninfizierten Kontrollzellen (Abbildung 4-15, F) allein mit der Markierungssubstanz für Biomembranen.

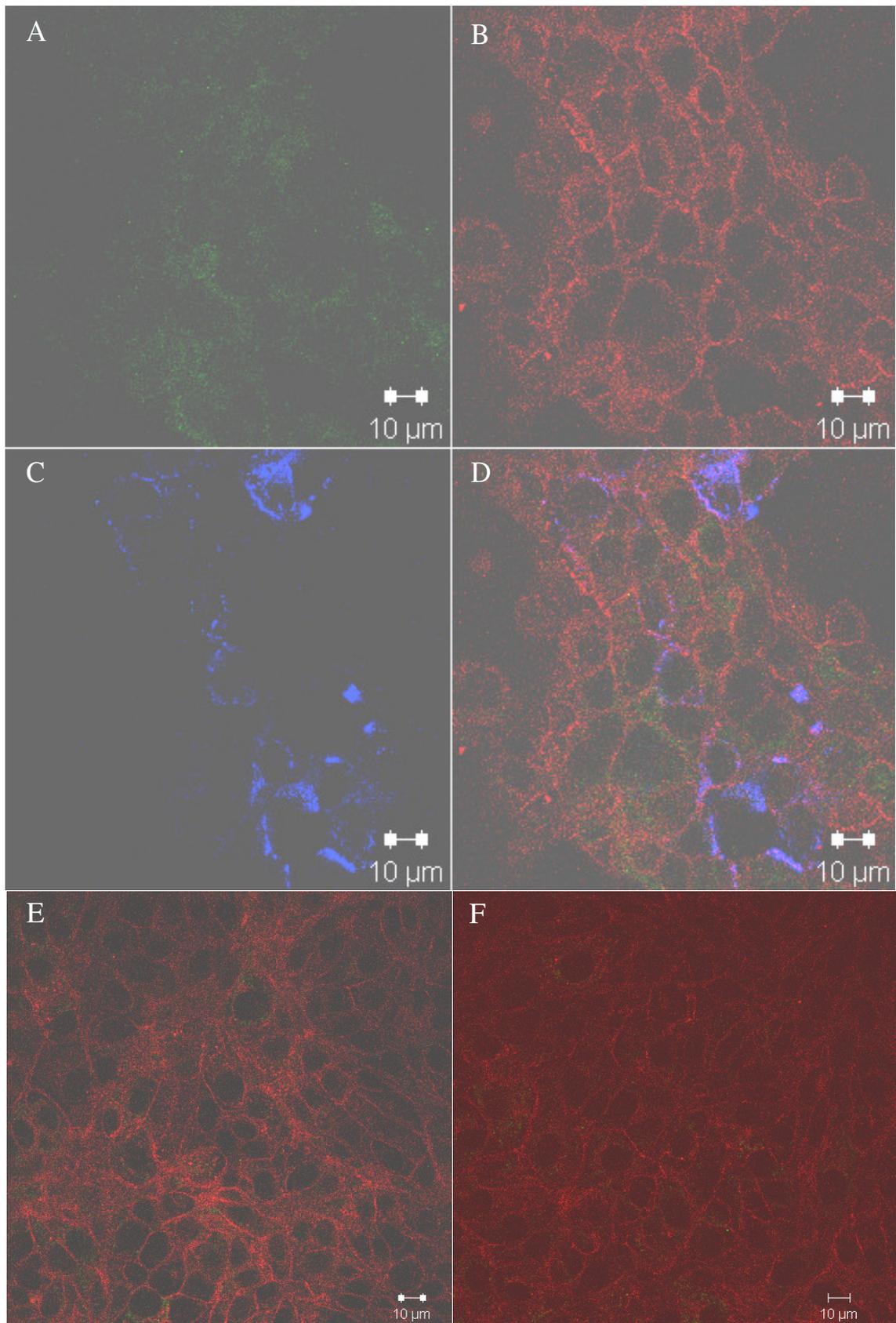


Abbildung 4-15: Indirekte Immunfluoreszenz mittels konfokaler Laserskannmikroskopie: (A), (B), (C) und (D) zeigen den gleichen Bildausschnitt BoHV-1wt infizierter Zellen. (A) punktförmiges Verteilungsmuster der TK-Detektion durch das spezifisches Antiserum. Als Sekundär-Antikörper wurde anti-Kaninchen Alexa[®] Fluor[®] 488 verwendet. (B) Rot dargestellt sind die durch Vybrant[™] Cell-Labeling Solutions DiI markierte Lipiddoppelmembranen. (C) Nach Lebend-Zell-Färbung mit einem monoklonalen Antikörper gegen das virale Glykoprotein E markiert der Sekundär-Antikörper anti-Maus Alexa[®] Fluor[®] 647 den gebundenen Primär-Antikörper. (D) ist die Kombination der drei Erstgenannten; die Kolokalisation des gE mit Biomembranen wird hier deutlich. (E) Anfärbung von Zellen, die mit der Doppeldeletionsmutante BoHV-1SBΔgEΔTK infiziert wurden, wobei allein die Biomembranen markiert wurden. (F) Das gleiche gilt für nicht infizierte Kontrollzellen. Messbalken jeweils 10 μm.

4.3.6 Wachstumsanalyse der Doppeldeletionsmutante BoHV-1-ΔgEΔTK

4.3.6.1 Ein-Schritt-Wachstumskinetik

Zur Untersuchung von Replikationseigenschaften des generierten BoHV-1ΔgEΔTK wurden Ein-Schritt-Wachstumskinetiken (siehe Kapitel 3.2.4.2) durchgeführt. Dabei wurde die Replikationseffizienz des generierten Virus mit der des Ausgangsvirus verglichen. Dazu wurden MDBK-Zellen mit BoHV-1, BoHV-1ΔgE und BoHV-1ΔgEΔTK infiziert und 0, 4, 8, 12, 16, 24, 48 und 72 h p.i. die intra- und extrazellulären Virustiter bestimmt (siehe Kapitel 3.2.4.1). Der Mittelwert zweier Experimente wurde ebenso wie die Standardabweichung bestimmt (Abbildung 4-16). Die virusspezifischen Titer unterschieden sich intra- wie auch extrazellulär kaum voneinander und alle Viren replizierten zu beinahe identischen Endtitern. Somit hat die Deletion des Glykoproteins E in Kombination mit der Deletion der Thymidinkinase auf die hier quantifizierte BoHV-1-Replikation keinen messbaren Einfluss.

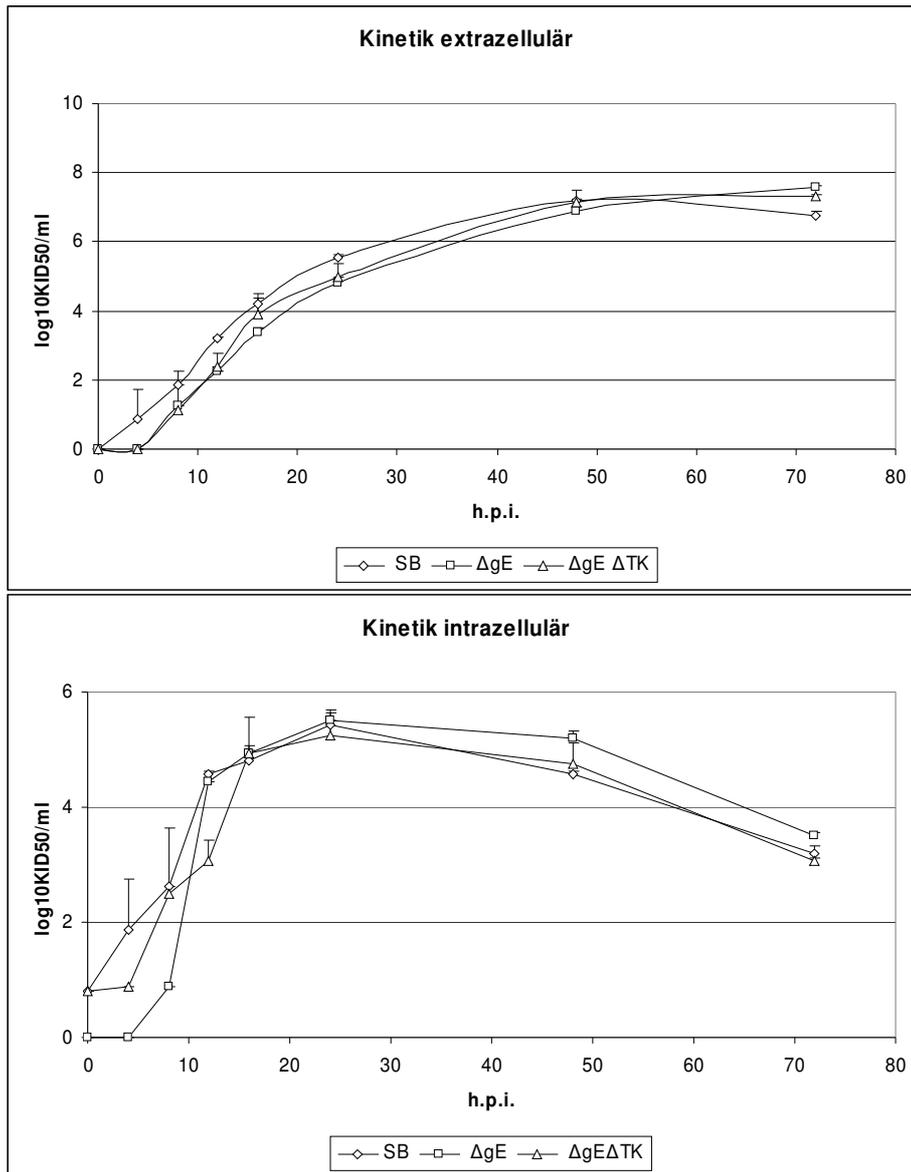


Abbildung 4-16: Ein-Schritt-Wachstumskinetik der Doppeldeletionsmutante BoHV-1ΔgEΔTK: MDBK Zellen wurden mit BoHV-1 Schönböken (wt), BoHV-1ΔgE und BoHV-1ΔgEΔTK (MOI 1) infiziert. 0, 4, 8, 12, 16, 24, 48 und 72 h nach der Inokulation wurden die intra- und extrazellulären Virustiter als KID_{50}/ml bestimmt. Striche über den Messwerten bezeichnen die Standardabweichung. Es konnten keine deutlichen Wachstumsunterschiede zwischen dem Wildtyp und den deletierten Viren festgestellt werden.

4.3.6.2 Plaquegrößenbestimmung

Kulturschalen mit konfluenten MDBK-Zellen wurden den Angaben von Kapitel 3.2.4.1 folgend infiziert und nach 48h Inkubationszeit bei Überschichtung mit einem semisolidem Medium fixiert und mittels Kristallviolettfärbung ausgewertet. Der Mittelwert der Plaquegröße des Wildtypvirus wurde als Vergleichswert auf 100% gesetzt. Das einfach gE-deletierte Virus erreichte 47% der Vergleichsgröße, während

die Plaquegrößen des gE sowie TK doppelt deletierten Virus bei etwa 37% der Plaquegröße der Wildtypviren lagen. (Abbildung 4-17). Die Schwankungsbreite der Mittelwerte -hier von der Standardabweichung repräsentiert- ist bei den analysierten Viren nahezu identisch.

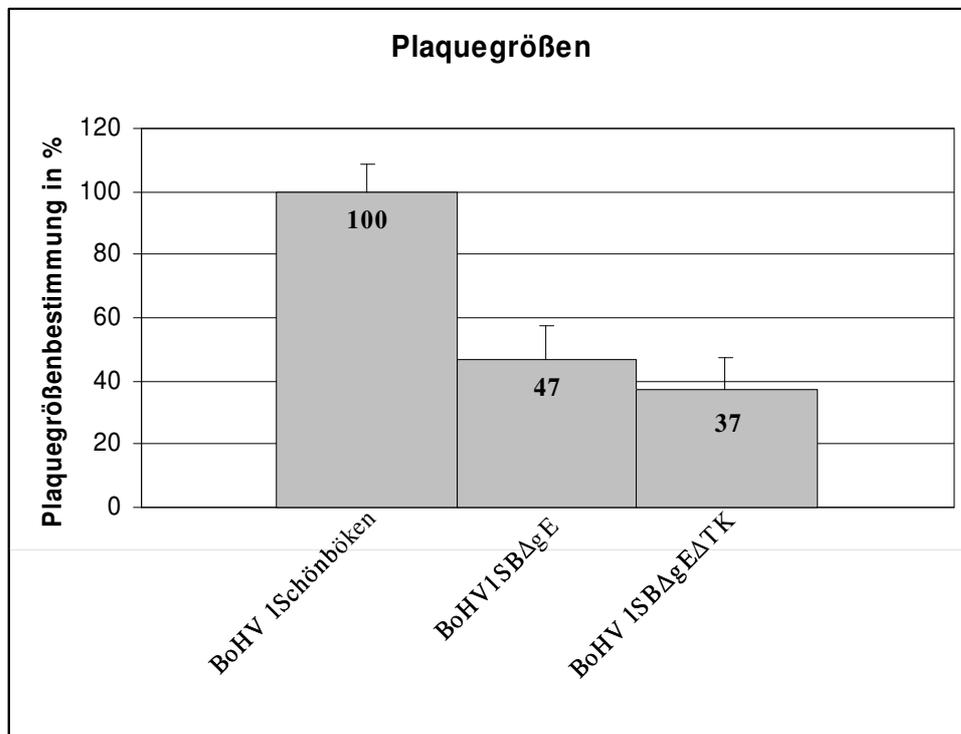


Abbildung 4-17: Plaquegrößenbestimmung: Zur funktionellen Überprüfung des CTCS wurden die Plaquegrößen des Wildtyp-Virus mit dem einfach gE-deletierten und dem gE/TK-doppelt deletierten Virus verglichen. Dabei erwiesen sich die einfach gE-deletierten Plaques im Mittel um 53%, die BoHV-1ΔgEΔTK-spezifischen Plaques um 63% reduziert. Striche über den Messbalken stellen die Standardabweichung dar.

4.3.7 Prüfung der BoHV-1 Δ gE Δ TK Mutante im Tierversuch

Das von uns -wie oben beschrieben- konstruierte Virus BoHV-1 Δ gE Δ TK wurde nach seiner Charakterisierung *in vitro* auch hinsichtlich seiner Vakzineeignung *in vivo* getestet. In der Zellkultur zeigte das Virus kaum veränderte Wachstumscharakteristika verglichen mit der einfach gE-deletierten Mutante (siehe Kapitel 4.3.6). Um die Fragen der verbleibenden Pathogenität und der induzierbaren Immunität zu klären, wurden Rinder intramuskulär mit der Mutante inokuliert (siehe Kapitel 3.2.7). Hierbei sollte insbesondere auch die Eignung als Lebendvakzine geprüft werden. Des Weiteren sollte die Eignung eines neuartigen Adjuvants (aus der Gruppe der Blockpolymere) als Zusatz zu einer Lebendvakzine auf Basis der gE/TK-Doppeldeletionsmutante getestet werden.

Mit Hilfe des Serumneutralisationstests wurde der Titer virusneutralisierender Antikörper in den Serumproben bestimmt (Abbildung 4-19). Alle Serumproben, die aus dem Tierversuch gewonnen wurden, wurden ebenso mittels ELISA-Technik (Abbildung 4-20 und Abbildung 4-21) untersucht. Nach der Belastungsinfektion wurden täglich Nasentupferproben entnommen und auf permissiven MDBK-Zellen titriert, um die Virusausscheidung exakt zu quantifizieren (Abbildung 4-22).

Die Mittelwerte der im SNT gemessenen, neutralisierenden Antikörper der beiden Vakzinegruppen unterschieden sich insofern, dass die Tiergruppe, welche die adjuvierte Lebendvakzine erhalten hatte, fast durchgehend vor der Belastungsinfektion höhere BoHV-1-Titer aufwies (Abbildung 4-19). Nach der Belastungsinfektion glichen sich die Titer der Tiere der beiden Gruppen an. Die Kontrolltiere entwickelten erst hier neutralisierende Antikörper. Die Kurven der Messwerte, die für die vakzinierten Tiere ermittelt wurden, zeigten zudem deutlich die Stimulation der Antikörperantwort durch die Boosterimmunisierung wie auch die Belastungsinfektion.

Im gE-ELISA wurden bereits eine Woche nach der Immunisierung Werte gemessen, die zu einer positiven Bewertung des Testes führten (Abbildung 4-20).

Der in der Markerdiagnostik eingesetzte gE-ELISA reagierte mit konstant negativen Messwerten bei der Untersuchung der Serumproben aller vakzinierten Tiere vor der Belastungsinfektion. Zwei Wochen nach der Wildtypvirus-Infektion wurden die höchsten Messwerte für die Kontrolltiere im gE-ELISA ermittelt. Die gE-ELISA-Werte der Tiergruppe, die mit der adjuvierten Lebendvakzine immunisiert wurden, überschritten den Grenzwert des Testes hin zu einer positiven Bewertung hingegen erst drei Wochen nach der Belastungsinfektion (Abbildung 4-21).

Die nasale Virusausscheidung erreichte bei den Kontrolltieren den höchsten mittleren Titer mit $10^{7,375}$ KID₅₀/ml am dritten Tag nach der Belastungsinfektion und konnte bei dieser Tiergruppe im Mittel über elf Tage beobachtet werden. Die Tiergruppe, die alleine das Impfvirus zur Immunisierung erhalten hatte, schied über neun Tage nasal Virus aus, wobei die Virustiter mindestens um eine, maximal um vier log-Stufen reduziert waren. Die mittleren Messwerte der Tiergruppe, die mit Lebendvirus und

Adjuvants immunisiert worden war, zeigte eine minimale Titerreduktion von zwei log₁₀-Stufen und eine maximale von sechs log₁₀-Stufen. Die Virusausscheidung war verkürzt und konnte im Mittel über acht Tage nachgewiesen werden (Abbildung 4-22).

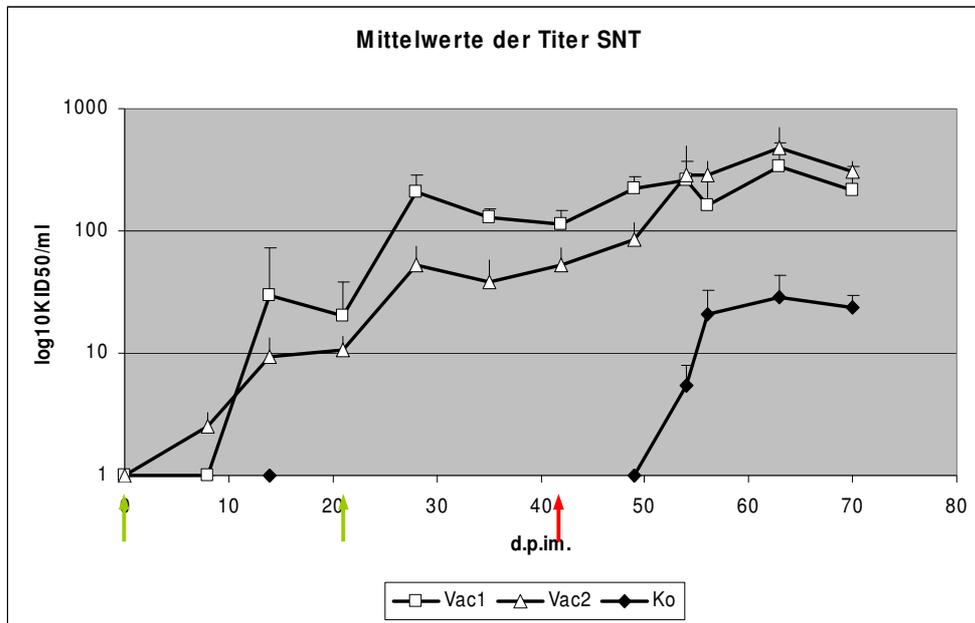


Abbildung 4-19: Mittelwerte SNT-Titer: dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte der Gruppen zu je vier Tieren. Striche über den Messwerten symbolisieren die Standardabweichung. Der Tag, an dem die Belastungsinfektion erfolgte, ist mit einem roten Pfeil gekennzeichnet. Grüne Pfeile markieren die Tage, an denen die Tiere immunisiert wurden. Vac1 bezeichnet die Tiergruppe, die die Lebendvakzine inklusive Adjuvants erhalten hat. Vac2 steht für die Mittelwerte der Tiere, die allein das Impfvirus zur Immunisierung appliziert bekommen hatten. Mit Ko wird die Kontrolltiergruppe abgekürzt.

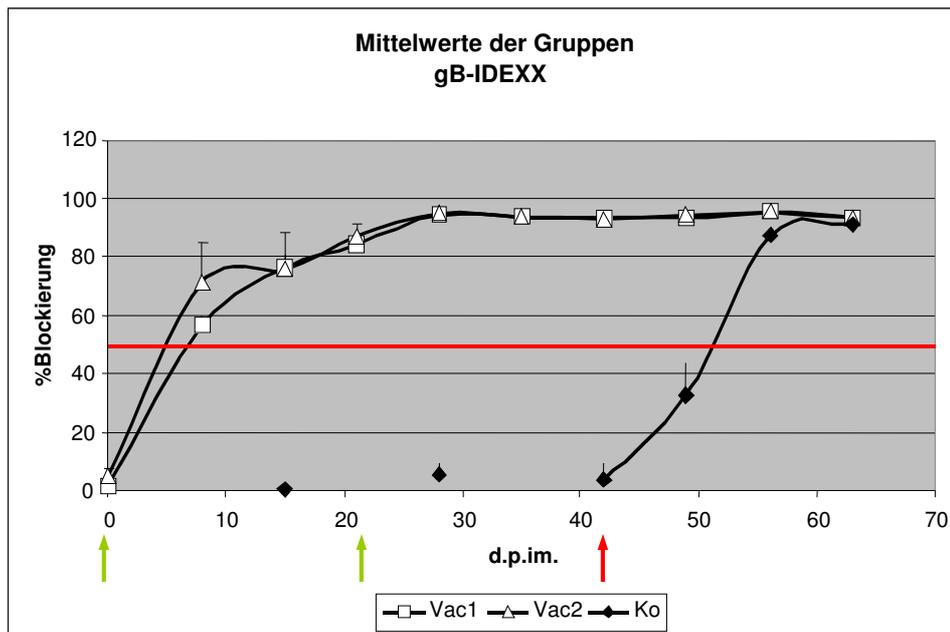


Abbildung 4-20: Ergebnisse der Gruppen im gB-IDEXX ELISA: Das arithmetische Mittel der prozentualen Blockierung durch die Testseren der einzelnen Tiergruppen wird hier in Abhängigkeit von dem Zeitpunkt nach der Erstimmunisierung aufgetragen. Die rote Linie stellt den Cut-Off Wert des Testes dar. Striche über den Messwerten zeigen jeweils die Standardabweichungen. Der rote Pfeil kennzeichnet den Tag der Belastungsinfektion, während die grünen Pfeile die Immunisierungstage markieren. Abkürzungen wie in Abb. 4-19.

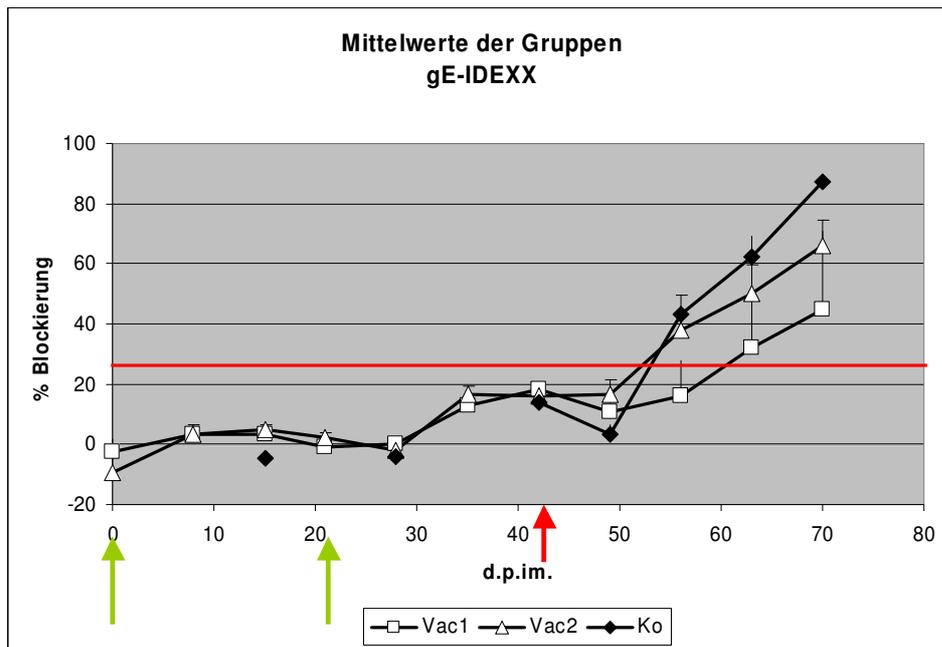


Abbildung 4-21: *Mittelwerte der Gruppen im gE-IDEXX ELISA (Markertest): Die arithmetischen Mittelwerte jeder Tiergruppe nach Erstimmunisierung sind dargestellt. Mit der roten Linie wird der Cut-Off-Wert für diesen Test angegeben. Die Standardabweichung der Mittelwerte wird durch Striche über den Messwerten dargestellt. Grüne Pfeile markieren die Immunisierung an Tag 0 und die Boosterung an Tag 21. Der rote Pfeil kennzeichnet den Tag an dem die Belastungsinfektion durchgeführt wurde. Abkürzungen wie in Abb. 4-19.*

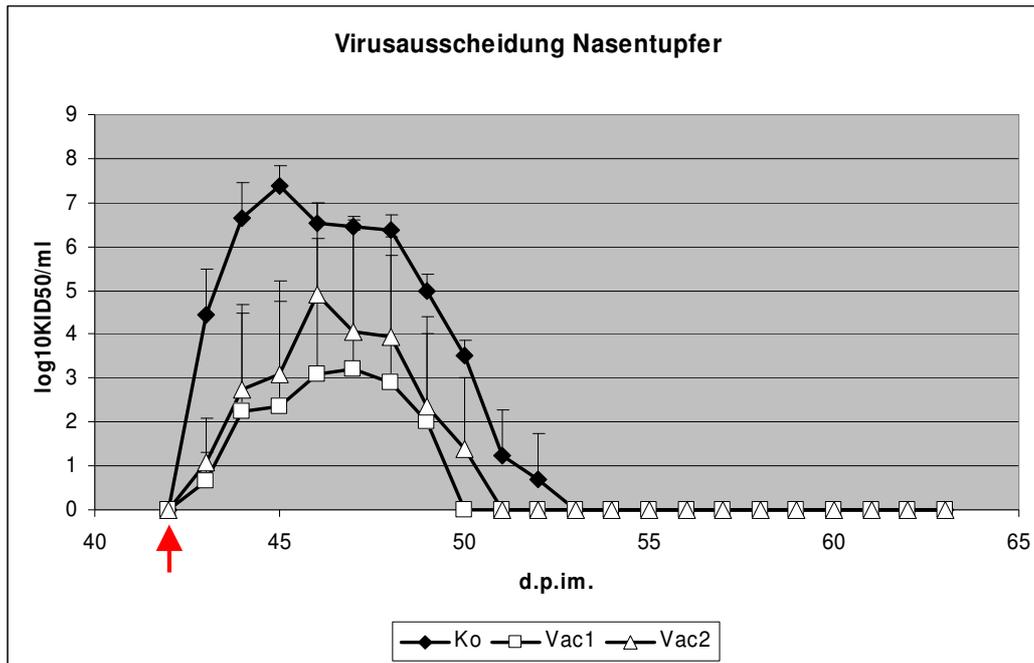


Abbildung 4-22: Virusausscheidung nach Belastungsinfektion: Dargestellt sind die durch Titration auf permissiven MDBK-Zellen erreichten Virustiter aus den täglich bis Tag 63 nach Immunisierung entnommenen Nasentupferproben. Der Tag der Belastungsinfektion wird durch eine rote Pfeilspitze markiert. Standardabweichungen der Mittelwerte werden durch Striche über den Messwerten visualisiert. Abkürzungen wie in Abb. 4-19.

5 Diskussion

Die funktionelle Charakterisierung der viralen Proteine pUL49.5, pUL49 und TK in einem bereits gE-deletierten BoHV-1 sowie die vergleichende Analyse mit den Einzel-deletierten Virusmutanten und dem Wildtypvirus, war ein zentrales Ziel dieser Arbeit.

Kürzlich wurde zudem von MUYLKENS ET AL. (2006) festgestellt, dass gE-deletierte Markerimpfstoffe bei *in vitro*-Experimenten mit Feldvirus rekombinieren können und dabei eine deutliche Virulenzsteigerung erfahren. Es erscheint daher notwendig doppelt deletierte Markerimpfstoffe zu entwickeln, bei denen eine mögliche Rückgewinnung von Virulenzfaktoren durch einmalige Rekombinationsereignisse nicht droht. Daher wurde eine gE/TK-Doppeldeletionsmutante auch *in vivo* charakterisiert.

5.1 Charakterisierung der Deletionsmutante BoHV-1 UL49.5

Das UL49.5 Protein des BoHV-1 bildet einen heterodimeren Komplex mit dem Glykoprotein M (WU ET AL., 1998). LIANG ET AL. (1993) identifizierten das UL49.5-Gen von BoHV-1 und erstellten eine Deletionsmutante, bei der zusätzlich die Sequenz des dUTPase-Gens, das für die virale Deoxyuridinphosphatase kodiert, deletiert worden war. Diese Mutante wurde als replikationsfähig *in vitro* beschrieben. *In vivo* Studien einer Mutante, der neben UL49.5 auch UL49 und UL50 deletiert worden waren, haben gezeigt, dass ein solches Virus i.m. appliziert gegen eine intranasale Infektion mit einem Feldvirus schützt (LIANG ET AL., 1997). Erst kürzlich wurde auch für BoHV-1 gezeigt, dass die Reifung des gM essentiell von der Anwesenheit des pUL49.5 abhängt (LIPINSKA ET AL., 2006). Dies wurde auch in dieser Arbeit bestätigt, da Zellysate eines UL49.5-deletierten Virus in Western Blot Analysen kein gM aufwies (siehe Kapitel 4.1.4). Somit ist ein UL49.5-deletiertes Virus funktionell auch gM deletiert. Dies ist der wahrscheinlichste Grund dafür, dass es nicht gelingt ein gE und UL49.5 doppelt deletiertes Virus zu generieren. Bereits für SuHV-1 war gezeigt worden, dass die kombinierte Deletion von gE und gM ein Letalfaktor ist (BRACK ET AL., 1999). Allerdings wird in derselben Untersuchung ein SuHV-1 Δ gE Δ gN vorgestellt: Erklärbar wird dies durch die Tatsache, dass SuHV-1 auch ohne gN ein funktionelles gM exprimieren kann (JÖNS ET AL., 1998). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit allein die Revertante BoHV-1 Δ UL49.5gErev charakterisiert. Genotypisch konnte dabei gezeigt werden, dass der UL49.5-ORF durch ein Kanamycinresistenzgen ersetzt und somit erfolgreich deletiert worden war (siehe Kapitel 4.1.3). Mit der Überprüfung der Proteinexpression im Western Blot wurde außerdem demonstriert, dass die Deletion des UL49.5-ORF die Expression von pUL49 nicht beeinflusst (siehe Kapitel 4.1.4), während pUL49.5 nicht nachgewiesen wurde. Daraus kann gefolgert werden, dass der beobachtete Phänotyp des BoHV-1 Δ UL49.5gErev mit hoher Sicherheit aus der alleinigen Deletion des UL49.5-ORF resultiert. Während streng zellassoziierte Viren

wie GaHV-2 essentiell auf das pUL49.5-Homolog angewiesen sind (TISCHER ET AL., 2002), ist eine singulär pUL49.5-deletierte BoHV-1-Mutante *in vitro* in der Lage zu replizieren. Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mit einem konfokalen Laserskanmikroskop konnten die Lokalisation des gE und des UL49.5-Proteins an der Plasmamembran infizierter Zellen auch optisch belegen (siehe Kapitel 4.1.5). Die Wachstumseigenschaften der BoHV-1 Δ UL49.5gErev-Mutante wurden im Weiteren durch die Bestimmung der Wachstumskinetiken und der Plaquegrößen (siehe Kapitel 4.1.6) ermittelt. Hierbei wurden für BoHV-1 Δ UL49.5gErev spezifische Virusplaques vermessen, die im Vergleich mit dem Wildtyp-Virus im Mittel um 64% ihrer Größe reduziert waren. Da BoHV-1 Δ UL49.5gErev funktionell ohne den Komplex gM/pUL49.5 repliziert, ist diese deutliche Reduktion der Plaquegröße nicht überraschend. KÖNIG ET AL., (2002) konnten zeigen, dass eine BoHV-1 Mutante mit einer singulären gM Deletion Plaques bildet, deren Durchmesser im Vergleich mit einem Wildtypvirus (BoHV-1-AUS12) um etwa 55% reduziert waren. Die zusätzliche Deletion von UL49.5 führte damit zu einer weiteren Reduktion der Plaquegröße, allerdings nur um etwa 9%. Damit konnte mit unseren Daten der Einfluss des heterodimeren Proteinkomplexes gM/pUL49.5 auf den CTCS des BoHV-1 belegt werden. Die von KÖNIG ET AL. (2002) beschriebene verzögerte Freisetzung der singulär gM deletierten Virusmutante konnte für das hier beschriebene singulär pUL49.5 - funktionell gM deletierte Virus- allerdings nicht nachvollzogen werden. Die Analyse der Kinetikdaten für BoHV-1 Δ UL49.5gErev zeigte eine konstante etwa 10fache Titerreduktion gegenüber dem Wildtypvirus. Die Diskrepanz dieser Daten könnte damit erklärt werden, dass KÖNIG ET AL. (2002) ein anderes Vergleichsvirus einsetzten. Dabei handelt es sich um ein zellkulturadaptiertes BoHV-1 Virus (Stamm AUS12) und es muss von genetischen Divergenzen zu dem hier eingesetzten Wildtypvirus ausgegangen werden, die dann auch zu anderen Wachstumseigenschaften führen. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten sprechen somit dem gM/pUL49.5 Komplex eine Funktion beim CTCS zu. Dagegen ist der *Egress* von extrazellulären Virionen von diesem Komplex nur mäßig beeinflusst, solange nicht auch gE deletiert wurde. Die Reduktionen im CTCS bei der UL49.5 Deletionsmutante sind jedoch unabhängig von der Funktionalität von gE, da die Doppelmutante nicht mehr zur Replikation befähigt ist. Auch für BoHV-1 wird damit bestätigt, dass die Proteinkomplexe gE/gI und gM/pUL49.5 ähnliche, wenn auch nicht genaue Funktions-Überlappungen aufweisen. Diese Vermutung war bereits für weitere Alphaherpesviren geäußert worden (BRACK ET AL., 1999, 2000; SEYBOLDT ET AL., 2000; RUDOLPH ET AL., 2002).

Die weitere Untersuchung der BoHV-1 Δ UL49.5gErev-Mutante hinsichtlich einer Vakzineeignung wurden nicht durchgeführt, da dieses Virus dem z.Z. eingesetzten Markerprinzip nicht entspricht. Ein Vakzinevirus darf das Glykoprotein E nicht exprimieren, da die kommerziellen Markertests anhand von gE-Antikörpern zwischen vakzinierten und Feldvirus-infizierten Tieren diskriminieren.

5.2 Charakterisierung der Doppeldeletionsmutante BoHV-1- gE und UL49

Um die Bedeutung des UL49-Proteins von BoHV-1 für die Virusreplikation in Zellkultur zu untersuchen, wurden UL49-negative Virusmutanten konstruiert. Außerdem wurde die kombinierte Deletionsmutante BoHV-1 Δ gE Δ UL49 hergestellt, die aufgrund der gE-Deletion der Markerdiagnostik der BoHV-1 Bekämpfung gerecht werden würde. LIANG ET AL., 1995 haben beschrieben, dass pUL49 bei BoHV-1 nicht essentiell für die Virusreplikation *in vitro* ist. Die intramuskuläre Applikation eines pUL49 deletierten Virus an Rinder schützte zudem die Tiere gegen eine intranasale Belastungsinfektion (LIANG ET AL., 1997).

Genotypische Charakterisierung und Überprüfung der Proteinexpression des BoHV-1 Δ gE Δ UL49 und der konstruierten Revertanten haben gezeigt, dass die Deletionen wie vorgesehen erreicht wurden (siehe Kapitel 4.2.5, 4.2.6). Daher kann angenommen werden, dass der *in vitro* beobachtete Phänotyp der jeweiligen BoHV-1-Mutanten ausschließlich oder vorrangig auf der kombinierten Deletion von gE und UL49 bzw. auf den jeweiligen Einzeldelationen basierte. Die Replikationseigenschaften des BoHV-1 Δ gE Δ UL49 und der Revertanten-Viren wurden auf nicht komplementierenden Zellen untersucht. Bemerkenswert ist dabei, dass auch das doppelt deletierte Virus BoHV-1 Δ gE Δ UL49 bis 24 h nach Infektion mit den Einzeldelationsmutanten vergleichbare Titer aufwies und auch die Messwerte nach 48 und 72 h nur um den Faktor 10 verringert waren. Der deutlich frühere Abfall der intrazellulären Virustiter des Wildtyp-Virus ist charakteristisch und resultiert aus einem ausgeprägten Zellverlust durch cpE. Diese relativ unveränderten Wachstumskinetiken lassen den Schluss zu, dass die Replikation und der *Egress* von extrazellulären Virionen auch bei den untersuchten Mutanten weitgehend ungestört verlief.

Als Bestandteil der äußeren Tegumentschicht interagiert pUL49 mit den zytoplasmatischen Bestandteilen von Glykoprotein E und D (für HHV-1 gezeigt, FARNSWORTH ET AL., 2006), welche in die entstehende Lipidhülle zellulären Ursprungs eingelagert sind. Damit ist das UL49-Protein in den Morphogenese-Schritt des sogenannten *Secondary Envelopment* involviert. Trotz der Nicht-Expression zweier beteiligter Proteine ist es dem Virus möglich, infektiöse extrazelluläre Partikel mit hohen Titern zu bilden. Folglich werden die Funktionen der beiden deletierten Proteine, den zweiten *Budding*-Prozess betreffend, von anderen Proteinen übernommen. Hinweise darauf, dass auch bei BoHV-1 eine direkte Interaktion des UL49-Proteins mit gE existiert, liefern die immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen. Hier konnten zelluläre Bereiche dargestellt werden, in denen eine Kolokalisation von pUL49 und gE beobachtet wurde. Diese Interaktion bzw. Kolokalisation fand in Arealen in unmittelbarer Umgebung der zellulären Plasmamembran statt. Bei der Detektion des pUL49 an der Kernmembran fixierter Zellen handelt es sich dagegen vermutlich um das Golgi-Netzwerk, an dessen Membranen pUL49, allerdings ohne Nachbarschaft zu gE, nachgewiesen wurde. Die weitere Markierung mittels eines Golgi-Markers könnte diese

Vermutung zukünftig noch präzisieren. Des Weiteren wurde durch LIANG ET AL., 1995 beschrieben, dass pUL49 mit der nukleären Matrix assoziiert ist, was in dieser Arbeit bestätigt werden konnte. Der Versuch die Interaktion von gE und pUL49 bei BoHV-1 durch den Einsatz von Antikörper-markierten magnetischen Beads zu zeigen schlug fehl. Wie auch von FARNSWORTH ET AL., 2006 für HHV-1 beschrieben zeigte pUL49 unspezifische Reaktionen mit den Beads (Daten nicht gezeigt).

Um zu untersuchen, ob das UL49- Protein allein oder in Kombination mit dem gE auch eine funktionelle Rolle beim *cell-to-cell-spread* spielt, wurden die Plaquegrößen der Deletionsmutanten mit denen des Elternvirus und der Revertanten verglichen. Die Plaques des doppelt deletierten Virus BoHV-1 Δ gE Δ UL49 waren sehr klein und erreichten nur 17% der Plaquegröße des Wildtypvirus. Die Einfach-gE- bzw. Einfach-UL49-deletierten Viren zeigten eine jeweils etwa 50%ige Reduktion der Plaquegröße. Damit kann für die Doppeldeletionsmutante BoHV-1 Δ gE Δ UL49 ein synergistischer Effekt bezogen auf die Plaquegrößenreduktion geschlussfolgert werden. Dies deutet zudem eine zumindest partielle Abhängigkeit der Proteine bezüglich ihrer Funktion beim CTCS an. Die singuläre Deletion von gE oder UL49 hat außerdem nach dieser Studie einen etwa gleich großen inhibierenden Einfluss auf den CTCS. MICHAEL ET AL., 2006 konnten für SuHV-1 zeigen, dass ein gE-deletiertes Virus nur noch 50% der Quantität des Wildtypvirus an pUL49 inkorporiert. Nimmt man an, dass dies auch für BoHV-1 gilt, dann könnte argumentiert werden, dass schon der eingeschränkte CTCS des gE-deletierten Virus aus der gE-Deletion und einer partiellen Funktionsstörung des pUL49 resultiert.

Ferner ist zu berücksichtigen, dass das Glykoprotein D mit Nectin 1 einer nicht infizierten Nachbarzelle an den *Adherent junctions* der Zell-Zell-Kontakte von epithelialen Zellen interagiert (KRUMMENACHER ET AL., 2003). Die Autoren vermuten, dass die Interaktion des gD mit dem zellulären Liganden die Aktivierung von Transduktionskaskaden in der noch nicht infizierten Zelle verhindert. In der infizierten Zelle wird demnach Nectin 1 von den *Adherent junctions* abgezogen und durch gD ersetzt. Es handelt sich somit um eine Form der Mimikry. Der Glykoproteinkomplex gE/gI ist in der Folge wichtig für die Sortierung der neugebildeten Virionen zu den Zell-Zell-Kontakten epithelialer Zellen (JOHNSON ET AL., 2001). Außerdem wurde auch für gE/gI ein zellulärer Ligand als Bestandteil der *Adherent Junctions* vermutet, dieser konnte bisher jedoch nicht identifiziert werden (COLLINS ET AL., 2003; DINGWELL ET AL., 1998). Die gemessene massive Beeinträchtigung des CTCS durch die Abwesenheit des pUL49 lässt die begründete Vermutung zu, dass pUL49 hierbei eine zentrale Funktion besitzt. Ein weiterer Hinweis auf den Zusammenhang zwischen viraler Ausbreitung durch CTCS und pUL49 liefert die Eigenschaft des Proteins, von transfizierten oder infizierten Zellen in nicht-infizierte Nachbarzellen einzuwandern (HARMS ET AL., 2000).

Als Ergebnis der vorgestellten Daten muss pUL49, neben gE, als zweiter wichtiger, von gE unabhängiger zugleich aber synergistisch mit gE-interagierender Faktor des CTCS angesehen werden.

5.3 Charakterisierung der Doppeldeletionsmutante BoHV-1 gE und TK

KAASHOEK ET AL. (1996) konnten zeigen, dass BoHV-1 Δ gE Δ TK i.n. an Kälber appliziert, diese vor einer Erkrankung durch Wildtypvirus schützt. Die erreichte Schutzwirkung überstieg dabei nicht die, welche von einem einfach gE deletierten Impfvirus generiert wurde.

Erstmals wurde in dieser Arbeit zur Konstruktion des BoHV-1 Δ gE Δ TK eine BoHV-1-BAC-Mutante sowie das Mutagenese-System auf Basis von EL250-*E. coli* wie von LEE ET AL. (2001) beschrieben angewendet (siehe Kapitel 4.3.2). Auf DNA-Ebene (siehe Kapitel 4.3.3) - wie auch auf Proteinebene (siehe Kapitel 4.3.4) - konnte gezeigt werden, dass die eingeführten Deletionen bei dem generierten Virus wie erwartet vorlagen. Nach der Untersuchung im konfokalen Laserskanmikroskop wurde für TK eine intrazytoplasmatische, punktförmige Verteilung festgestellt (siehe Kapitel 4.3.5). Ein weiteres am Nukleinsäurestoffwechsel beteiligtes Enzym, die Deoxyuridin-triphosphatase, wurde ebenfalls im Zytoplasma infizierter Zellen detektiert (LIANG ET AL., 1993). Vermutlich wird nur eine Teilpopulation des Enzyms in den Kern rekrutiert, während der Großteil im Zytoplasma und damit an seinem Translationsort verbleibt. Die weitere *in vitro*-Charakterisierung von BoHV-1 Δ gE Δ TK zeigte für die Wachstumskinetiken keine relevanten Unterschiede zum gE-einzeldeletierten Virus (siehe Kapitel 4.3.6.1). Auch der Vergleich der Plaquegrößen zeigte kaum Unterschiede zwischen dem doppelt deletierten BoHV-1 Δ gE Δ TK und dem einzel deletierten BoHV-1 Δ gE (siehe Kapitel 4.3.6.2). Das Virus BoHV-1 Δ gE Δ TK verhielt sich *in vitro* nahezu wie ein einzel gE-deletiertes BoHV-1. Dieser Phänotyp der Toleranz einer TK-Deletion entspricht dem für zahlreiche Vertreter der Alphaherpesviren gezeigten Wachstumverhalten (VAN ENGELBURG ET AL., 1994; SLATER ET AL., 1993; KIMMAN ET AL., 1994) und hat insbesondere für den Einsatz als Vakzinevirus Vorteile. So können in Zellkultur einfach hohe Virustiter erreicht werden und trotz doppelter Attenuierung (TK und gE) sind ausreichende Immunantworten zu erwarten.

Dieses somit voll replikationskompetente Virus wurde zur weiteren *in vivo*-Charakterisierung in einem Tierversuch an 8 Kälbern als Vakzinekandidat eingesetzt (siehe Kapitel 4.3.7). Vergleichend wurde dieselbe Virusdosis an jeweils 4 Tiere i.m. appliziert, wobei der als „Vac1“ bezeichneten Tiergruppe das Impfvirus in Kombination mit einem Adjuvants verabreicht wurde. Die Kombination eines Lebend-Impfvirus mit einem Adjuvants hat sich bisher nicht durchgesetzt, obwohl teilweise positive

Ergebnisse erzielt worden waren (VISSER, 1997). Das eingesetzte Adjuvants gehört zu der Gruppe der Blockpolymere und war vorab als nicht viruzid für BoHV-1 getestet worden (Daten hier nicht gezeigt). Drei Wochen nach der Erstimmunisierung erfolgte die Zweitimmunisierung und drei weitere Wochen später wurden die Tiere einer Belastungsinfektion ausgesetzt. Dieses Impfschema entspricht den Prüfanforderungen, die durch die europäische Pharmakopoe an einen BoHV-1 Lebendimpfstoff gestellt werden (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 1997). Die Zweitimmunisierung wurde nach drei Wochen gesetzt, da zu diesem Zeitpunkt eine anamnestiche Immunantwort durch B-Lymphozyten geleistet werden kann (BABIUK ET AL., 1996). Das eingesetzte Lebendvirus erwies sich als vollkommen avirulent in beiden Tiergruppen, was mit den von KAASHOEK ET AL. (1996) erhobenen Daten übereinstimmt. Die intramuskuläre Immunisierung führte außerdem zu keiner nachweisbaren Replikation des Impfvirus in der nasalen Mukosa. Daher wird angenommen, dass gE-deletierte BoHV-1-Virionen nicht in der Lage sind, sich über eine Virämie nach i.m. Applikation im Organismus auszubreiten. Ob das Impfvirus nach der Immunisierung in neuronalen Ganglien eine Latenz etablieren kann, muss allerdings erst in weiteren Tests überprüft werden. Für gE-einzel deletierte Vakzineviren konnte die Etablierung von Latenz und nachfolgend die Reaktivierung des Impfvirus gezeigt werden, allerdings handelte es sich bei diesen Untersuchungen um neonatale Kälber, die vakziniert wurden (LEMAIRE ET AL., 2001). WHETSTONE ET AL. (1992) infizierten Rinder epithelial und intravenös bzw. nur intravenös mit einer TK-negativen BoHV-1 Mutante. Beide Infektionsrouten führten zu nasaler Virusexkretion. Der Nachweis des TK-negativen Virus nach Reaktivierung war in beiden Tiergruppen erfolgreich, wobei bei den epithelial infizierten Tieren vier von vier Tieren reaktiviertes Virus ausschieden, während bei den nur intravenös infizierten Tieren ein Tier von vier Tieren nasal das Virus ausschied. Die Autoren kommen zu dem Fazit, dass je länger die Virusausscheidung nach Infektion anhält, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass nach Reaktivierung erneut Virusexkretion detektiert wird. Da nach Immunisierung -in dem in dieser Arbeit vorgestellten Tierversuch- keinerlei Virusexkretion nachweisbar war, besteht die Möglichkeit, dass durch das Impfvirus keine Zellen latent infiziert wurden. Dazu trägt neben den gesetzten Deletionen auch die explizit nicht epitheliale Immunisierungsrouten bei. Weitere Versuche hierzu, die auch Reaktivierungsexperimente umfassen, sind geplant.

Nach der intranasalen Belastungsinfektion zeigten beide vakzinierten Tiergruppen deutlich verringerte Virustiter in den Proben der Nasentupfer und die Dauer der Virusausscheidung über die Nase war erheblich verkürzt, verglichen mit den nicht vakzinierten Kontrolltieren. Die Daten, die zur Antikörperentwicklung und zu der nasalen Virusausscheidung von der Tiergruppe, welche allein das Lebendvirus zur Immunisierung appliziert bekommen hatte, erhoben wurden, stimmen mit den Daten von KAASHOEK ET AL. (1996) größtenteils überein. Die immunologisch günstigere Entwicklung hinsichtlich der Antikörpertiter und nasale Virusexkretion in der Tiergruppe Vac1 lässt sich daher mit hoher Sicherheit auf den zusätzlichen Einsatz des Adjuvants zurückführen. Reaktivierungsuntersuchungen von KAASHOEK ET AL. (1996)

konnten bei einem von sechs BoHV-1 Δ gE Δ TK immunisierten Kälbern das Wildtypvirus, welches zur Belastungsinfektion eingesetzt worden war, reisolieren. Ob die Immunität nach Applikation des hier vorgestellten Virus BoHV-1 Δ gE Δ TK inklusive Adjuvants ausreicht, um eine latente Infektion von Wildtypvirus zu verhindern, muss noch überprüft werden.

Die Tiere der Tiergruppe Vac1 entwickelten eine derart protektive Immunitätslage, dass die Belastungsinfektion frühestens drei Wochen nach Testinfektion durch den Markertest (gE-Antikörper-ELISA) detektiert werden konnte. Eines der immunisierten Tiere wurden bis Versuchsabschluss nicht im Markertest erkannt. Diese Problematik der eingeschränkten Antikörperentwicklung gegen das gE bei geimpften Tieren wurde bereits von BEER ET AL. (2003) diskutiert. Die gE-Antikörper-Reaktion kann somit auch als Maß für die Schutzwirkung einer gE-deletierten BoHV-1-Vakzine herangezogen werden. Die hier vorgestellten Daten sprechen dabei für eine besonders ausgeprägten Schutz vor einer Belastungsinfektion mit virulentem BoHV-1. In Vergleichsexperimenten mit kommerziellen BoHV-1-Markervakzinen sind auch verspätete Serokonversionen beschrieben worden, allerdings in geringerem Maß als mit der hier entwickelten Virusmutante (KÖNIG ET AL., 2003)

KIMMAN ET AL. (1994) hatten für ein SuHV-1 Δ gE Δ TK-Virus im Vergleich zu den Einzelmutanten eine Abnahme der Immunogenität *in vivo* festgestellt. Dieses Phänomen wurde von den Autoren mit der Vermutung erklärt, dass SuHV-1 Δ gE Δ TK *in vivo* eine reduzierte Replikationskapazität und damit sehr starke Attenuierung aufweise. Für BoHV-1 war nur im Vergleich mit der TK-einzel deletierten Mutante eine Abnahme der Immunogenität festgestellt worden, nicht im Vergleich zu der gE-einzel deletierten Vakzine. Dabei erwies sich dieses TK-einzel deletierte Virus als weiterhin krankheitsauslösend (VAN ENGELBURG ET AL., 1994). Wenn zu Lasten der Replikationseffizienz ein avirulentes Impfvirus konstruiert wird, kann die verringerte Immunogenität durch die Zugabe eines Adjuvants ausgeglichen werden. Durch die verzögerte Freisetzung der Antigene und der verbesserten Zugänglichkeit für antigen-präsentierende Zellen, wird mit Hilfe des Adjuvants die reduzierte Replikationseffizienz kompensiert. Diese Erkenntnis ist auch auf andere Infektionskrankheiten übertragbar. Die hier vorgestellten Immunisierungsergebnisse mit einer BoHV-1-TK und gE Doppel-deletionsmutante stützen diese Erkenntnisse eindrucksvoll und erstmalig auch für einen Herpesvirusimpfstoff.

KERKHOFS ET AL. (2003) untersuchten zudem verschiedene Impfschemata mit kommerziell erhältlichen gE-deletierten Vakzinen. Dabei wurde eine attenuierte Lebendvakzine und eine inaktivierte Vakzine eingesetzt. Die Kombination des intranasal applizierten Lebendimpfstoffes mit einer nachfolgenden subkutanen Boosterung durch das inaktivierte Präparat, führte zu einer effizienten humoralen und zellulären Immunantwort. Die zweimalige, subkutane Injektion der inaktivierten Vakzine verhinderte hingegen die Virusausscheidung nach Belastungsinfektion am effektivsten. Dieses Phänomen weist darauf hin, dass durch Viruspartikel

neutralisierende Antikörper induziert werden, die dann mit der Virusausscheidung des Belastungsinfectionsvirus interferieren. TOUSSAINT ET AL. (2004) konnten zeigen, dass die Interferon- γ -Produktion, als Ausdruck der zellulären Immunantwort, nach Vakzinierung mit attenuiertem Lebendvirus und anschließender Boosterung mit der inaktivierten Vakzine signifikant höher ausfiel, als nach zweimaliger Immunisierung mit der Tot-Vakzine. Nachteilig ist dabei die Tatsache, dass sich eine attenuierte Vakzine bei Kälbern, die über maternale Antikörper verfügen, nur sehr eingeschränkt einsetzen lässt. Die maternalen Antikörper würden das eingesetzte Vakzinevirus neutralisieren und es würde unter Umständen von dem Jungtier keine „eigene“ Immunität aufgebaut.

Zusätzlich zeigen Neonaten die Tendenz einer Th2 polarisierten Immunität (MOREIN ET AL., 2002). Th2-Zellen steuern die humorale Immunantwort und führen zum Klassenwechsel der Immunglobuline. Gleichzeitig ergibt sich eine relative Defizienz der Th1 und zytotoxischen T-Zell Antwort. Ausgelöst wird diese Polarisierung des funktionell unreifen Immunsystems während der Trächtigkeit des Muttertieres. Diese Phase ist charakterisiert durch die erhöhte Kapazität des angeborenen Teil des Immunsystems und der gesteigerten humoralen Immunreaktion. Ausgelöst wird dies durch die erhöhte Progesteron- und Prostaglandin E₂- Ausschüttung. Die Folge daraus ist die Neigung der neonatalen Jungtiere, Th2 basierte Immunreaktionen zu zeigen. Die Anforderung an eine virale Vakzine, die an neonatale Patienten appliziert werden soll, lautet daher, die Th1 basierte Immunität zu fördern. Erreichbar wird diese Forderung durch den Einsatz von besonderen T-Cell-stimulierenden Adjuvantien und den Einsatz von Lebend-Impfstoffen. Anders als bei der Maus wird beim Rind durch bakterielle DNA-Vakzinen vor allem der Th2-Weg stimuliert (ESTES UND BROWN, 2002). Daher erscheint die Verwendung dieses Vakzinetyps zumindest bei Jungtieren zweifelhaft. MENA ET AL. (2002) konnten zeigen, dass Adjuvantien die Th1 basierte Immunität beeinflussen können und kommen zu dem Schluss, dass der Wahl des Adjuvants eine eminente Rolle zu kommt.

Im Infektionsmodell Maus konnte gezeigt werden, dass der Einsatz eines Block-polymers als Adjuvants die Th1 basierte Immunantwort begünstigt. LUTSIK ET AL. (2006) konnten bei Mäusen eine solche Immunantwort gegen das Hepatitis B Virus induzieren. PATTERSON ET AL. (2000) generierten eine solche Immunantwort bei Mäusen gegen den Parasiten *Plasmodium yoelii*.

Der hier vorgestellte Vakzinekandidat, ein doppelt deletiertes BoHV-1- Δ gE Δ TK, vereint somit erstmals die Forderungen nach einer wirksamen BoHV-1-Vakzine, welche sowohl die T-Cell-Immunität stimuliert (replikatives Virus) als auch hohe Antikörpertiter induziert (Immunstimulation durch Zusatz eines nicht-viruziden Adjuvants). Sollte sich zudem das -als Teil dieser Arbeit- generierte Virus BoHV-1 Δ gE Δ TK in der Formulierung mit dem Adjuvants als so effektiv erweisen, dass selbst die latente Infektion von Rindern weitgehend verhindert werden kann, dann wird

die BoHV-1-Eradikation mit einer solchen Vakzine in sehr viel kürzerer Zeit erreicht werden. Dem Wildtypvirus würde ein entscheidendes epidemiologisches Reservoir entzogen. Auch für humanpathogene herpesvirale Erkrankungen könnten dann Impfstoff-Formulierungen gefunden werden, die zur endgültigen Bekämpfung dieser Infektionskrankheiten führen könnten.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es BoHV-1 Doppeldeletionsmutanten zu generieren, zu charakterisieren und bezüglich ihrer Vakzineeignung zu bewerten.

Die vorgestellten Studien zur Charakterisierung eines gE und UL49.5 deletierten Virus (BoHV-1- Δ gE Δ UL49.5) konnten belegen, dass diese Deletionskombination als letal für BoHV-1 anzusehen ist. Ein UL49.5 deletiertes Virus verhielt sich dagegen funktionell wie ein Virus ohne UL49.5/gM-Komplex. Ähnlich wie bei anderen Alpha-Herpesviren war hier wahrscheinlich der zweite Umhüllungsschritt im Zytoplasma der infizierten Zelle gestört, so dass keine infektiöse Virusnachkommenschaft gebildet wurde.

Ein Virus mit Deletionen der Genorte UL49 und gE (BoHV-1- Δ gE Δ UL49) zeigte hingegen fast keine Beeinträchtigungen im Hinblick auf die Replikationsfähigkeit. Dagegen war die Ausbreitungsmöglichkeit von Zelle-zu-Zelle (*cell-to-cell-spread* CTCS) einer solchen Mutante im Vergleich zu den entsprechenden einzel-deletierten Viren erheblich verringert. Da es sich hierbei um eine synergistische Verstärkung gegenüber den Einzelmutanten handelte, wurde geschlussfolgert, dass beide Proteine an derselben Funktionskette des CTCS beteiligt sind. Da die doppelt UL49 und gE deletierte Mutante allerdings weiterhin extrazelluläre, infektiöse Virusnachkommenschaften bildete, ist der CTCS als unabhängige Ausbreitungsform offensichtlich durch andere Funktionen bedingt als der klassische Weg der Virusausschleusung. Hinweise darauf, dass gE auch bei BoHV-1 mit pUL49 interagiert konnten dabei durch Kollokalisationsstudien im Laserscanmikroskop abgeleitet werden.

Allerdings ließ keine dieser BoHV-1-Mutanten eine besondere Eignung als Vakzinestamm erkennen. Ein gE und TK doppelt deletiertes Virus zeigte hingegen *in vitro* kaum veränderte Wachstumseigenschaften verglichen mit dem einfach gE-deletierten Virus. Diese Deletionskombination sollte zudem gegenüber einer Virulenzsteigerung durch Rekombination mit Feldviren unempfindlicher sein, als die derzeit erhältlichen Lebendvakzinen. Zur Steigerung der immunogenen Wirkung des Lebendvirus wurde dieser neue Stamm (BoHV-1 Δ gE Δ TK) in Kombination mit einem adjuvierenden, nicht viruziden, Blockpolymer eingesetzt. Dieser Ansatz wurde in einem Tierversuch an Kälbern im Vergleich zu der Immunisierung mit dem nicht adjuventierten Lebendvirus getestet. Im Ergebnis dieses Tierversuches schieden die Tiere, welche adjuventiert immunisiert wurden, weniger Virus und zudem für eine kürzere Zeit aus. Dies galt im Vergleich mit den nicht immunisierten Kontrolltieren wie auch im Vergleich mit den Tieren, die allein das Lebendvirus zur Immunisierung appliziert bekommen hatten. Auch die Quantifizierung der neutralisierenden Antikörper verdeutlichte eine gesteigerte Immunogenität der Kombination des doppelt deletierten Lebendvirus mit dem Adjuvants. Die sehr gute Immunitätslage der Tiere nach Impfung führte allerdings nach Belastungsinfektion auch zu einer zeitlich verzögerten

Serokonversion im Markertest auf Basis des Nachweises von gE-spezifischen Antikörpern. Auch dies muss als Beleg für die hervorragende, immunisierende Leistung der neuen Präparation angesehen werden, da offensichtlich bei einigen der immunisierten Tiere die Virusreplikation soweit unterdrückt wird, dass keine gE-spezifische Antikörperantwort mehr erfolgt.

Die vorgestellte Kombination eines genetisch überattenuierten Lebendvirus und die Verstärkung der immunogenen Eigenschaften durch Zusatz eines nicht viruziden, potenten Adjuvants können die Grundlage für eine zukünftige Vakzinestrategie zur Bekämpfung der BoHV-1 oder anderer herpesviraler Infektionskrankheiten bilden.

7 Summary

Functional characterisation of double deletion mutants of Bovine Herpesvirus Type 1 as basis of a novel marker vaccine preparation

Aim of this study was the generation and characterization of BoHV-1 double-deletion-mutants and the evaluation of their applicability as a modified live vaccine.

The presented characterization studies showed, that a combined deletion of gE and UL49.5 (BoHV-1 Δ gE Δ UL49.5) was lethal for BoHV-1. A virus with a single deletion of UL49.5 exhibited similar functional characteristics as the UL49.5/gM-complex deleted mutant. Most likely the “secondary-envelopment-morphogenesis-step” in the cytoplasm of infected cells was disturbed and hence -in analogy to other alpha-herpesviruses- no infectious virus progeny could be propagated.

However, a mutant with deletions at the genloci of UL49 and gE (BoHV-1 Δ gE Δ UL49) showed no impairment regarding the capability of replication. In contrast, the direct *cell-to-cell-spread* (CTCS) of this mutant was severely reduced compared to the corresponding single deletion mutants. Because of their synergistic effect on reduction of the size of viral plaques, it could be concluded that both proteins are involved in the pathway of CTCS. Indeed these UL49 and gE-deleted mutants still propagated extracellular infectious viral progeny, leading to the conclusion that CTCS is an independent way of spreading and obviously limited by other factors than the classical way of viral egress. An indication of the interaction of gE and pUL49 of BoHV-1 could be derived from studies of co-localization using a laserscanning microscope.

However, none of these above mentioned BoHV-1-mutants showed a sufficient applicability to be used as a BoHV-1 marker vaccine strain. In contrast, a gE and TK double-deleted viral mutant (BoHV-1 Δ gE Δ TK) showed only marginally modified *in vitro* growth characteristics in comparison to the gE single-deleted virus. Furthermore, this combination of deletions should be non-sensitive to an enhancement of virulence due to recombination with wildtype virus. The new double mutant was combined with a non-virocidal adjuvant blockpolymer in order to increase the immunogenic impact and was tested in comparison to an adjuvant-free modified live virus preparation in an immunization/challenge experiment with calves. As a main result of this experiment the calves immunised with the virus/adjuvant combination excreted less challenge virus for a shorter period of time compared to both other groups of animals (i.e. control group and calves immunised with the adjuvant-free modified live virus preparation). In addition, quantification of neutralising antibody titres implied that the combination of the modified live vaccine with the adjuvant referred to an increased immunogenicity. Nevertheless, this excellent BoHV-1-specific immunity status of the calves after vaccination caused a delay in seroconversion after challenge infection tested in a commercially available diagnostic marker test based on gE-antibody detection. This

observation is an indication for the high immunogenicity of the new preparation, being also obvious by the markedly reduced viral replication in some of the immunized animals.

The presented combination of a genetically attenuated modified live vaccine (e.g. BoHV-1 Δ gE Δ TK) with a non-viruzid potent adjuvant increasing the immunogenic properties has a promising potential to become the basic principle for prospective vaccine strategies against BoHV-1 or other infectious diseases caused by herpesviruses.

8 Literatur

Babiuk, L. A., Van Drunen Littel-Van Den Hurk, S., Tikoo, S. K. (1996). Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. *Vet Microbiol.* **53**, 31 – 42.

Barkema, H. W., Barteld, C. J., van Wuijckhuise, L., Hesslink, J. W., Holzhauser, M., Weber, M. F., Franken, K. P. A., Brusckhe, C. J., Zimmer, G. M. (2001). Outbreak of bovine virus diarrhoea virus on Dutch dairy farms induced by a bovine herpesvirus-1 marker vaccine contaminated with bovine diarrhoea virus type 2. *Tijdschr Diergeneeskd.* **126**, 158 – 165.

Batterson, W., Furlong, D., Roizman, B. (1983). Molecular genetics of herpes simplex virus. VIII. further characterization of a temperature-sensitive mutant defective in release of viral DNA and in other stages of the viral reproductive cycle. *J Virol.* **45**, 397 – 407.

Beer, M., König, P., Schielke, G., Trapp, S. (2003). Markerdiagnostik in der Bekämpfung des Bovinen Herpesvirus vom Typ1: Möglichkeiten und Grenzen. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* **116**, 183 - 191.

Bosch, J. C., Kaashoek, M. J., Kroese, A. H., van Oirschot, J. T. (1996). An attenuated bovine herpesvirus 1 marker vaccine induces a better protection than two inactivated marker vaccines. *Vet Microbiol.* **52**, 223 – 224.

Brack, A. R., Dijkstra, J. M., Granzow, H., Klupp, B. G., Mettenleiter, T. C. (1999). Inhibition of virion maturation by simultaneous deletion of glycoproteins E, I, and M of pseudorabies virus. *J Virol.* **73**, 5364 - 5372.

Brack, A. R., Klupp, B. G., Granzow, H., Tirabassi, R., Enquist, L. W., Mettenleiter, T. C. (2000). Role of the cytoplasmic tail of pseudorabies virus glycoprotein E in virion formation. *J. Virol.* **74**, 4004 – 4016.

Caughman, G. B., Staczek, J., O'Callaghan, D. J. (1985). Equine herpesvirus type 1 infected cell polypeptides: evidence for immediate early/early/late regulation of viral gene expression. *Virology*. 145, 49-61.

Chi, J. H., Harley, C. A., Mukhopadhyay, A., Wilson, D. W. (2005). The cytoplasmic tail of herpes simplex virus envelope glycoprotein D binds to the tegument protein VP22 and to capsids. *J Gen Virol*. **86**, 253 – 261.

Clark, J. M. (1988). Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res*. **16**, 9677 – 9686.

Collins, W. J., Johnson, D. C. (2003). Herpes simplex virus gE/gI expressed in epithelial cells interferes with cell-to-cell spread. *J Virol*. **77**, 2686 - 2695.

Corey, L., Spear, P. G. (1986). Infection with herpes simplex viruses (1). *N. Engl. J. Med*. **314**, 686 – 691.

Cornick, J., Martens, J., Martens, R., Crandell, R., McConnell, S., Kit, S. (1990). Safety and efficacy of a thymidine kinase negative equine herpesvirus-1 vaccine in young horses. *Can J Vet Res*. **54**, 260 – 266.

Datsenko, K. A., Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **97**, 6640 – 6645.

Davison, A. J. (2002). Evolution of the herpesviruses. *Vet Microbiol*. **86**, 69 – 88.

del Rio, T., Werner, H. C., Enquist, L. W. (2002). The pseudorabies virus VP22 homologue (UL49) is dispensable for virus growth in vitro and has no effect on virulence and neuronal spread in rodents. *J Virol*. **76**, 774 - 782.

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

Dorange, F., Tischer, B. K., Vautherot, J. F., Osterrieder, N. (2002). Characterization of Marek's disease virus serotype 1 (MDV-1) deletion mutants that lack UL46 to UL49 genes: MDV-1 UL49, encoding VP22, is indispensable for virus growth. *J Virol.* **76**, 1959 - 1970.

Duffy, C., Lavail, J. H., Tauscher, A. N., Wills, E. G., Blaho, J. A., Baines, J. D. (2006). Characterization of a UL49-null mutant: VP22 of herpes simplex virus type 1 facilitates viral spread in cultured cells and the mouse cornea. *J Virol.* **80**, 8664 – 8675.

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

Engels, M., Ackermann, M. (1996). Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. *Vet Microbiol.* **53**, 3 – 15.

Estes, D. M., Brown, W. C. (2002). Type 1 and type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle. *Vet Immunol Immunopathol.* **90**, 1 – 10.

European Pharmacopoeia, 3rd Edition (1997). Monograph 0696: Live freeze dried vaccine for infectious bovine rhinotracheitis. *Council of Europe*, Strasbourg, France

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

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

Farnsworth, A., Wisner, T. W., Johnson, D. C. (2006). HSV glycoprotein gE Cytoplasmic Residues Required for Secondary Envelopment and Binding of Tegument Proteins VP22 and UL11 to gE and gD. *J Virol.* 2006 Oct 11; [Epub ahead of print]

Fauquet, C. M., Majo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L. (2005). Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses. 8th Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. *Academic Press* 193pp.

Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M., Danielsen, M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA*. **84**, 7413 – 7417.

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

Fuchs, W., Klupp, B. G., Granzow, H., Osterrieder, N., Mettenleiter, T. C. (2002). The interacting UL31 and UL34 gene products of pseudorabies virus are involved in egress from the host-cell nucleus and represent components of primary enveloped but not mature virions. *J Virol*. **76**, 364 - 378.

Fuchs, W., Mettenleiter, T. C. (2005). The nonessential UL49.5 gene of infectious laryngotracheitis virus encodes an O-glycosylated protein which forms a complex with the non-glycosylated UL10 gene product. *Virus Res*. **112**, 108 - 114.

Geraphy, R. J., Krummenacher, C., Eisenberg, R. J., Cohen, G. H., Spear, P. G. (1998). Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor related protein 1 and polio virus receptor. *Science* **280**, 1618 – 1620.

Graham, F. L., van der Eb, A. J. (1974). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**, 456 – 467.

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

Granzow, H., Weiland, F., Jons, A., Klupp, B. G., Karger, A., Mettenleiter, T. C. (1997). Ultrastructural analysis of the replication cycle of pseudorabies virus in cell culture: a reassessment. *J. Virol*. **71**, 2072 – 2082.

Gross, S. T., Harley, C. A., Wilson, D.W. (2003). The cytoplasmic tail of Herpes simplex virus glycoprotein H binds to the tegument protein VP16 in vitro and in vivo. *Virology*. **317**, 1 – 12.

Hampl, H., Ben-Porat, T., Ehrlicher, L., Habermehl, K. O., Kaplan, A. S. (1984). Characterization of the envelope proteins of pseudorabies virus. *J. Virol.* **52**, 583 – 590.

Harms, J.S., Ren, X., Oliveira, S. C., Splitter, G. A. (2000). Distinctions between bovine herpesvirus 1 and herpes simplex virus type 1 VP22 tegument protein subcellular associations. *J Virol.* **74**, 3301 – 3312.

Jameson, B. A., Wolf, H. (1988). The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. *Comput Appl Biosci.* **4**, 181-186.

Johnson, D. C., Webb, M., Wisner, T. W., Brunetti, C. (2001). Herpes simplex virus gE/gI sorts nascent virions to epithelial cell junctions, promoting virus spread. *J Virol.* **75**, 821 - 833.

Jöns, A., Dijkstra, J. M., Mettenleiter, T. C. (1998). Glycoproteins M and N of pseudorabies virus form a disulfide-linked complex. *J Virol.* **72**, 550 – 557.

Kaashoek, M. J., Moerman, A., Madic, J., Rijsewijk, F. A., Quak, J., Gielkens. A. L., van Oirschot, J. T. (1994). A conventionally attenuated glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus type 1 is an efficacious and safe vaccine. *Vaccine.* **12**, 439 - 444.

Kaashoek, M. J., van Engelenburg, F. A., Moerman, A., Gielkens, A. L., Rijsewijk, F. A., van Oirschot, J. T. (1996). Virulence and immunogenicity in calves of thymidine kinase- and glycoprotein E-negative bovine herpesvirus 1 mutants. *Vet Microbiol.* **48**, 143 - 153.

Kerkhofs, P., Renjifo, X., Toussaint, J.F., Letellier, C., Vanopdenbosch, E., Wellemans, G. (2003). Enhancement of the immune response and virological protection of calves against bovine herpesvirus type 1 with an inactivated gE-deleted vaccine. *Vet. Rec.* **152**, 681 - 686.

Kimman, T. G. (1992). Comparative efficacy of three doses of the genetically engineered Aujeszky's disease virus vaccine strain 783 in pigs with maternal antibodies. *Vaccine*. **10**, 363 - 365.

Kimman, T. G., De Wind, N., De Bruin, T., De Visser, Y., Voermans, J. (1994). Inactivation of Glycoprotein gE and Thymidine Kinase or the US3-Encoded Protein Kinase Synergistically Decreases in Vivo Replication of Pseudorabies Virus and the Induction of Protective Immunity. *Virology*. **205**, 511 – 518.

Kit S., Qavi, H. (1983). Thymidine kinase (TK) induction after infection of TK-deficient rabbit cell mutants with bovine herpesvirus type 1 (BHV-1): isolation of TK-BHV-1 mutants. *Virology*. **130**, 381 – 389.

Kit S., Qavi, H., Gaines, J. D., Billingsley, P., McConnell, S. (1985), Thymidine kinase-negative bovine herpesvirus type 1 mutant is stable and highly attenuated in calves. *Arch Virol*. **86**, 63 – 83.

Kolaskar, A. S., Tongaonkar, P. C. (1990). A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett*. **276**, 172 – 174.

König, P., Giesow, K., Keil, G. M. (2002). Glycoprotein M of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) is nonessential for replication in cell culture and is involved in inhibition of bovine respiratory syncytial virus F protein induced syncytium formation in recombinant BHV-1 infected cells. *Vet Microbiol*. **86**, 37 – 49.

König, P., Beer, M., Makoschey, B., Teifke, J.P., Polster, U., Giesow, K., Keil, G.M. (2003). Recombinant virus-expressed bovine cytokines do not improve efficacy of a bovine herpesvirus 1 marker vaccine strain. *Vaccine*. **22**, 202 - 12.

Koppers-Lalic, D., Reits, E. A., Rensing, M. E., Lipinska, A. D., Abele, R., Koch, J., Marcondes Rezende, M., Admiraal, P., van Leeuwen, D., Bienkowska-Szewczyk, K., Mettenleiter, T. C., Rijsewijk, F. A., Tampe, R., Neefjes, J., Wiertz, E. J. (2005). Varicelloviruses avoid T cell recognition by UL49.5-mediated inactivation of the transporter associated with antigen processing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **102**, 5144 – 5149.

Koppers-Lalic, D., Rijsewijk, F. A. , Verschuren, S. B., van Gaans-Van den Brink, J. A., Neisig, A., Rensing, M. E., Neefjes, J., Wiertz, E. J. (2001). The UL41-encoded virion host shutoff (vhs) protein and vhs-independent mechanisms are responsible for down-regulation of MHC class I molecules by bovine herpesvirus 1. *J Gen Virol.* **82**, 2071 – 2081.

Krummenacher, C., Baribaud, I., Eisenberg, R. J., Cohen, G. H. (2003). Cellular localization of nectin-1 and glycoprotein D during herpes simplex virus infection. *J Virol.* **77**, 8985 – 8999.

Kwong, A. D., Kruper, J. A., Frenkel, N. (1988). Herpes simplex virus virion host shutoff function. *J Virol.* **62**, 912 – 921.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680 – 685.

Lam, N., Letchworth, G. J. (2000). Bovine herpesvirus 1 U(L)3.5 interacts with bovine herpesvirus 1 alpha-transinducing factor. *J Virol.* **74**, 2876 – 2684.

Lee, E. C., Yu, D., Martinez de Velasco, J., Tessarollo, L., Swing, D. A., Court, D. L., Jenkins, N. A., Copeland, N. G. (2001). A highly efficient Escherichia coli-based chromosomal engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA. *Genomics.***73**, 56 – 65.

Lemaire, M., Meyer, M., Baranowski, E., Schynts, F., Wellemans, G., Kerhofs, P., Thiry, E., (2000). Production of bovine herpesvirus type 1-seonegative latent carriers by administration of a live-attenuated vaccine in passively immunized calves. *J Clin Microbiol.* **38**, 4233 – 4238.

Lemaire, M., Schynts, F., Meyer, G., Georgin, J.P., Baranowski, E., Gabriel, A., Ros, C., Belak, S., Thiry, E. (2001). Latency and reactivation of a glycoprotein E negative bovine herpesvirus type 1 vaccine: influence of virus load and effect of specific maternal antibodies. *Vaccine.* **19**, 4795 – 4804.

Li, Y., van Drunen Littel-van den Hurk, S., Liang, X., Babiuk, L. A. (1997). Functional analysis of the transmembrane anchor region of bovine herpesvirus 1 glycoprotein gB. *Virology*. **228**, 39 – 54.

Liang, X., Tang, M., Manns, B., Babiuk, L. A., Zamb, T. J. (1993). Identification and deletion mutagenesis of the bovine herpesvirus 1 dUTPase gene and a gene homologous to herpes simplex virus UL49.5. *Virology*. **195**, 42 – 50.

Liang, X., Chow, B., Li, Y., Raggio, C., Yoo, D., Attah-Poku, S., Babiuk, L. A. (1995). Characterization of bovine herpesvirus 1 UL49 homolog gene and product: bovine herpesvirus 1 UL49 homolog is dispensable for virus growth. *J Virol*. **69**, 3863 – 3867.

Liang, X., Chow, B., Raggio, C., Babiuk, L. A. (1996). Bovine herpesvirus 1 UL49.5 homolog gene encodes a novel viral envelope protein that forms a disulfide-linked complex with a second virion structural protein. *J Virol*. **70**, 1448 – 1454.

Liang, X., Chow, B., Babiuk, L. A. (1997). Study of immunogenicity and virulence of bovine herpesvirus 1 mutants deficient in the UL49 homolog, UL49.5 homolog and dUTPase genes in cattle. *Vaccine*. **15**, 1057 – 1064.

Lipinska, A. D., Koppers-Lalic, D., Rychlowski, M., Admiraal, P., Rijsewijk, F. A., Bienkowska-Szewczyk, K., Wiertz, E. J. (2006). Bovine herpesvirus 1 UL49.5 protein inhibits the transporter associated with antigen processing despite complex formation with glycoprotein M. *J Virol*. **80**, 5822 – 5832.

Lutsiak, M.E., Kwon, G.S., Samuel, J. (2006). Biodegradable nanoparticle delivery of a Th2-biased peptide for induction of Th1 immune responses. *J Pharm Pharmacol*. **58**, 739 – 747.

Mahony, T.J., McCarthy, F.M., Gravel, J.L., West, L., Young, P.L. (2002). Construction and manipulation of an infectious clone of the bovine herpesvirus 1 genome maintained as a bacterial artificial chromosome. *J Virol*. **13**, 6660 - 6668.

Margalit, H., Spouge, J. L., Cornette, J. L., Cease, K. B., Delisi C., Berzofsky, J. A. (1987). Prediction of immunodominant helper T cell antigenic sites from the primary sequence. *J Immunol.* **138**, 2213 – 2229.

Mars, M. H., de Jong, M. C. M., Franken, P., van Oirschot, J. T. (2001). Efficacy of a live glycoprotein E-negative bovine herpesvirus 1 vaccine in cattle in the field. *Vaccine* **19**, 1924 – 1930.

Matheka, H. D., Straub, O. C. (1972). Weitere Untersuchungen zur Differenzierung des Virus der Rhinotracheitis (IBR) vom Virus des Bläschenausschlages (IPV) durch die trägerfreie Zonenelektrophorese in einem Glukose-Dichtegradienten. *Archiv für die gesamte Virusforschung* **39**, 265 – 273.

Mayr, A., Bachmann, P. A., Bibrack, B., Wittmann, G. (1974). Virologische Arbeitsmethoden Band I. *Gustav Fischer Verlag, Stuttgart*

McGeoch, D. J., Cook, S., Dolan, A., Jamieson, F. E., Telford, E. A. (1995). Molecular phylogeny and evolutionary timescale for the family of mammalian herpesviruses. *J Mol Biol.* **247**, 443 – 458.

Mena, A., Ioannou, X.P., Van Kessel, A., Van Drunen Little-Van Den Hurk, S., Popowych, Y., Babiuk, L.A., Godsonm D.L. (2002). Th1/Th2 biasing effects of vaccination in cattle as determined by real-time PCR. *J Immunol Methods.* **263**, 11 – 21.

Messerle, M., Crnkovic, I., Hammerschmidt, W., Ziegler, H., Koszinowski, U. H. (1997). Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**, 14759 - 14763.

Mettenleiter, T. C. (2002). Herpesvirus assembly and egress. *J Virol.* **76**, 1537 – 1547.

Mettenleiter, T. C. (2006). Intriguing interplay between viral proteins during herpesvirus assembly or: the herpesvirus assembly puzzle. *Vet Microbiol.* **113**, 163 – 169.

Mettenleiter, T. C., Klupp, B. G., Granzow, H. (2006) Herpesvirus assembly: A tale of two membranes. *Curr Opin Microbiol.* **9**, 423 – 429.

Meyer, G., Hanon, E., Georgette, D., Pastoret, P. P., Thiry, E. (1998). Bovine herpesvirus type 1 glycoprotein H is essential for penetration and propagation in cell culture. *J Gen Virol.* **79**, 1983 – 1987.

Michael, K., Klupp, B. G., Mettenleiter, T. C., Karger, A. (2006). Composition of pseudorabies virus particles lacking tegument protein US3, UL47, or UL49 or envelope glycoprotein E. *J Virol.* **80**, 1332 – 1339.

Morein, B., Abusugra, I., Blomqvist, G. (2002). Immunity in neonates. *Vet Immunol Immunopathol.* **87**, 207 - 213.

Muylkens, B., Meurens, F., Schynts, F., Farnir, F., Pourchet, A., Bardiau, M., Gogev, S., Thiry, J., Cuisenaire, A., Vanderplasschen, A., Thiry, E. (2006). Intraspecific bovine herpesvirus 1 recombinants carrying glycoprotein E deletion as a vaccine marker are virulent in cattle. *J Gen Virol.* **87**, 2149 - 2154.

Ojala, P. M., Sodeik, B., Ebersold, M. W., Kutay, U., Helenius, A. (2000). Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro. *Mol Cell Biol.* **20**, 4922 – 4931.

O'regan, K. J., Bucks, M. A., Murphy, M. A., Wills, J.W., Courtney, R. J. (2006). A conserved region of the herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22 facilitates interaction with the cytoplasmic tail of glycoprotein E (gE). *Virology.* 2006 Sep 22; [Epub ahead of print]

Osterrieder, N., Schumacher, D., Trapp, S., Beer, M., von Einem, J., Tischer, K. (2003). Establishment and use of infectious bacterial artificial chromosome (BAC) DNA clones of animal herpesviruses. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* **116**, 373 - 80.

Patterson, P. S., Bosshardt, S. C., Udhayukumar, V., Xiao, L., Kidd, M., Hunter, R. L., Lal, A. A. (2000). Prolonged expression of IFN γ induced by protective blood-stage immunization against *Plasmodium yoelii* malaria. *Vaccine.* **18**, 173 - 180.

Perng, G. C., Jones, C., Ciacci-Zanella, J., Stone, M., Henderson, G., Yukht, A., Slanina, S. M., Hofman, F. M., Ghiasi, H., Nesburn, A. B., Wechsler, S. L. (2000). Virus-induced neuronal apoptosis blocked by the herpes simplex virus latency-associated transcript. *Science*. **287**, 1500 - 1503.

Polcicova, K., Goldsmith, K., Rainish, B. L., Wisner, T. W., Johnson, D. C. (2005). The extracellular domain of herpes simplex virus gE is indispensable for efficient cell-to-cell spread: evidence for gE/gI receptors. *J Virol*. **79**, 11990 - 12001.

Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G., Cormier, M. J. (1992). Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein. *Gene* **111**, 229 - 233.

Rebordosa, X., Pinol, J., Perez-Pons, J. A., Lloberas, J., Naval, J., Serra-Hartmann, X., Espuna, E. und Querol, E. (1996). Glycoprotein E of bovine herpesvirus type 1 is involved in virus transmission by direct cell-to-cell spread. *Virus Res*. **45**, 59 - 68.

Richart, S. M., Simpson, S. A., Krummenacher, C., Whitbeck, J. C., Pizer, L. I., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J., Wilcox, C. L. (2003). Entry of herpes simplex virus type 1 into primary sensory neurons in vitro is mediated by Nectin-1/HveC. *J Virol*. **77**, 3307 - 3311.

Roizman, B., Knipe, D. M. (2001). Herpes Simplex Viruses and Their Replication, in: Knipe, D. M., Howley, M. D. (eds): Fields Virology, 4th ed, Lipincott Williams & Wilkins, Philadelphia

Roizman, B., Pellett, P. E. (2001). The Family Herpesviridae: A brief Introduction, in: Knipe, D. M., Howley, M. D. (eds): Fields Virology, 4th ed, Lipincott Williams & Wilkins, Philadelphia

Rudolph, J., Seyboldt, C., Granzow, H., Osterrieder, N. (2002). The gene 10 (UL49.5) product of equine herpesvirus 1 is necessary and sufficient for functional processing of glycoprotein M. *J Virol*. **76**, 2952 - 2963.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Ehrlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487 – 491.

Schang, L. M., Phillips, J., Schaffer, P. A. (1998). Requirement for cellular cyclin-dependent kinases in herpes simplex virus replication and transcription. *J Virol.* **72**, 5626 – 5637.

Schröder, C., Keil, G. M. (1999). Bovine herpesvirus 1 requires glycoprotein H for infectivity and direct spreading and glycoproteins gH(W450) and gB for glycoprotein D-independent cell-to-cell spread. *J Gen Virol.* **80**, 57 – 61.

Schwyzer, M., Ackermann, M. (1996). Molecular virology of ruminant herpesviruses. *Vet Microbiol.* **56**, 17 – 29.

Seyboldt, C., Granzow, H., Osterrieder, N. (2000) Equine herpesvirus 1 (EHV-1) glycoprotein M: effect of deletions of transmembrane domains. *Virology.* **278**, 477 – 489.

Shumann, S. (1994). Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J Biol Chem.* **269**, 32678 – 32684.

Slater, J. D., Gibson, J. S., Field, H. J. (1993). Pathogenicity of a thymidine kinase-deficient mutant of equine herpesvirus 1 in mice and specific pathogen-free foals. *J Gen Virol.* **74**, 819 – 828.

Sodeik B, Ebersold M. W., Helenius A. (1997). Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J Cell Biol.* **136**, 1007 – 1021.

Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J.Mol.Biol.* **98**, 503 – 517.

Struyf, F., Martinez, W. M., Spear, P. G. (2002). Mutations in the N-terminal domains of nectin-1 and nectin-2 reveal differences in requirements for entry of various alphaherpesviruses and for nectin-nectin interactions. *J Virol.* **76**, 12940 – 12950.

Teuffert, J. und Beer, M. (2005). 8. Bovine Herpesvirus Typ1-Infektion (BHV1)-Infectious bovine rhinotracheitis/ infectious pustular vulvovaginitis. *Tiergesundheitsjahresbericht 2004*, **5. Jahrgang 2005**, 38 – 41.

TierSG (idF v. 25.06.2004) §10 Abs. I Satz 1 [Grundlage für die “Verordnung zum Schutz der Rinder vor einer Infektion mit dem Bovinen Herpesvirus 1 (BHV1-Verordnung)“ idF v. 20.12.2005]

Tischer, B. K., Schumacher, D., Messerle, M., Wagner, M., Osterrieder, N. (2002). The products of the UL10 (gM) and the UL49.5 genes of Marek's disease virus serotype 1 are essential for virus growth in cultured cells. *J Gen Virol.* **83**, 997 – 1003.

Toussaint, J.F., Rziha, H.J., Bauer, B., Letellier, C., Kerkhofs, P. (2004). Effects of hypervaccination with bovine herpesvirus type 1 gE-deleted marker vaccines on the serological response and virological status of calves challenged with wild-type virus. *Vet Rec.* **155**, 553 - 558.

Trapp, S., Osterrieder, N., Keil, G. M., Beer, M. (2003). Mutagenesis of a Bovine Herpesvirus Type 1 genome cloned as an infectious artificial chromosome: Analysis of glycoprotein E and G double deletion mutants. *J.Gen.Virol.* **84**, 301 – 306.

van Drunen Little-van den Hurk, S. (2006). Rationale and perspectives on the success of vaccination against bovine herpesvirus-1. *Vet Microbiol.* **113**, 275 – 282.

van Engelenburg, F. A., Kaashoek, M. J., Rijsewijk, F. A., van den Burg, L., Moerman, A., Gielkens, A. L., van Oirschot, J. T. (1994). A glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus 1 is avirulent in calves. *J Gen Virol.* **75**, 2311 - 2318.

van Oirschot, J. T. (1999). Diva vaccines that reduce virus transmission. *J Biotechnol.* **73**, 195 – 205.

Varmuza, S. L., Smiley, J. R. (1985). Signals for site-specific cleavage of HSV DNA: maturation involves two separate cleavage events at sites distal to the recognition sequences. *Cell.* **41**, 793 – 802.

Visser, N. (1997). Vaccination strategies for improving the efficacy of programs to eradicate Aujeszky's disease virus. *Vet Microbiol.* **55**, 61 – 74.

Wagner, M., Ruzsics, Z., Koszinowski, U. H.(2002). Herpesvirus genetics has come of age. *Trends Microbiol.* **10**, 318 - 24.

Whetstone, C. A., Miller, J. M., Seal, B. S., Bello, L. J., Lawrence, W. C. (1992). Latency and reactivation of a thymidine kinase-negative bovine herpesvirus 1 deletion mutant. *Arch Virol.* **122**, 207 – 214.

Wild, P., Engels, M., Senn, C., Tobler, K., Ziegler, U., Schraner, E. M., Loepfe, E., Ackermann, M., Mueller, M., Walther, P. (2005). Impairment of nuclear pores in bovine herpesvirus 1-infected MDBK cells. *J Virol.* **79**, 1071 – 1083.

Wirth, U. V., Vogt, B., Schwyzer, M. (1991). The three major immediate-early transcripts of bovine herpesvirus 1 arise from two divergent and spliced transcription units. *J.Virol.* **65**, 195 - 205.

Wu, S. X., Zhu, X. P., Letchworth, G. J. (1998). Bovine herpesvirus 1 glycoprotein M forms a disulfide-linked heterodimer with the U(L)49.5 protein. *J.Virol.* **72**, 3029 – 3036.

Zheng, C., Babiuk, L. A., van Drunen Littel-van den Hurk, S. (2005). Bovine herpesvirus 1 VP22 enhances the efficacy of a DNA vaccine in cattle. *J Virol.* **79**, 1948 – 1953.

Zimmerman, A. D., Boots, R. E., Valli J. L., Chase, C. C. L. (2006) Evaluation of protection against virulent bovine viral diarrhea virus type 2 in calves that had maternal antibodies and were vaccinated with a modified-live vaccine. *JAVMA.* **228**, 1757 – 1761.

9 Anhang

9.1 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

A	Adenin
Abs.	Absatz
A. dest.	<i>Aqua destillata</i>
Amp.	Ampicillin
Arch Virol.	Archives of virology; ISSN: 0304-8608
Archiv für die gesamte Virusforschung	Archiv für die gesamte Virusforschung; ISSN: 0003-9012
AS	Aminosäure
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
Berl Munch Tierärztl Wschr	Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift; ISSN: 0005-9366
bp	Basenpaare
BoHV-1	Bovines Herpesvirus 1
BVDV	Bovines Virus Diarrhoe Virus
C	Cytosin
ca.	circa
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
Can J Vet Res.	Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche vétérinaire; ISSN: 0830-9000
CBS	Citrat-gepufferte Saline
Cell	Cell; ISSN: 0092-8674
CO ₂	Kohlendioxid
Comput Appl Biosci	Computer applications in the biosciences: CABIOS; ISSN: 0266-7061

cpE	cytopathischer Effekt
CTCS	<i>cell-to-cell-spread</i>
Curr Opin Microbiol	Current opinion in microbiology; ISSN: 1369-5274
Da	Dalton
d.h.	das heißt
DIVA	<i>differentiating infected from vaccinated animals</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosid-5` - Triphosphat
d.p.c.	<i>days post challenge</i> , Tage nach der Belastungsinfektion
d.p.im.	<i>days post immunization</i> , Tage nach der Immunisierung
dUTPase	Deoxyuridinriphosphatase
E-Gene	Early-Gene
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
EGFP	enhanced green fluorescent protein
EHV-1	Equines Herpesvirus 1
EHV-4	Equines Herpesvirus 4
ELISA	enzyme linked immunoassay
ER	endoplasmatisches Retikulum
et al.	et alia, und andere Autoren
F	Farad
Fa.	Firma
FEBS Lett.	FEBS letters; ISSN: 0014-5793
FKS	fötales Kälberserum
FLI	Friedrich Loeffler Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
FRT	FLP-recognition target

g	Gramm
G	Guanin
g(p)	Glykoprotein
Gene	Gene; ISSN: 0378-1119
Genomics	Genomics; ISSN: 0888-7543
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GHV-2	Gallides Herpesvirus 2, (früher MDV Marek Disease Virus)
h	Stunde
HBS	Hepes gepufferte Saline
HCl	Salzsäure
HEPES	N-(2- Hydroxyethyl)-piperazin-N`-2-äthansulfonsäure
HHV-1	Humanes Herpesvirus 1, (früher HSV 1 Herpes simplex Virus)
HHV-3	Humanes Herpesvirus 3, (früher VZV Varicella Zoster Virus)
h.p.i.	<i>hours post infection</i> , Stunden nach Infektion
HveC	<i>herpesvirus entry mediator C</i>
HveD	<i>herpesvirus entry mediator D</i>
IBP	Infektiöse Balanoposthitis
IBR	Infektiöse Rhinotracheitis
ICP	infected cell protein
idF v.	in der Fassung vom
IE-Gene	Immediate Early-Gene
IIFT	indirekter Immunfluoreszenztest
i.m.	intramuskulär
IPTG	Isopropyl-â-D-thiogalaktopyranosid
IR	inverted repeats
JAVMA	Journal of the American Veterinary Medical Association; ISSN: 0003-1488
J Biol Chem	The Journal of biological chemistry; ISSN: 0021-9258

J Biotechnol	Journal of biotechnology; ISSN: 0168-1656
J Cell Biol	The Journal of cell biology; ISSN: 0021-9525
J Clin Microbiol	Journal of clinical microbiology; ISSN: 0095-1137
J Gen Virol	The Journal of general virology; ISSN: 0022-1317
J Immunol	Journal of immunology; ISSN: 0022-1767
J Immunol Methods	Journal of immunological methods; ISSN: 0022-1759
J Mol Biol	Journal of molecular biology; ISSN: 0022-2836
J Pharm Pharmacol	The Journal of pharmacy and pharmacology; ISSN: 0022-3573
J Virol	Journal of virology; ISSN: 0022-538X
k	Kilo
kan	Kanamycinresistenzgen
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KID ₅₀ /ml	kulturinfektiöse Dosis 50 pro ml
KOP-R	diploide Ösopharynxgewebe, bovinen Ursprungs
l	Liter
LB	Luria Bertoni
LiCl	Lithiumchlorid
Log	Logarithmus
m	Milli
μ	Mikro
M	molar
MDBK	<i>Madin Bovine Kidney</i>
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
Mg ²⁺	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
mind.	mindestens
MOI	multiplicity of infection
Mol Cell Biol	Molecular and cellular biology; ISSN: 0270-7306

mRNS	messenger RNS
nm	Nanometer
N	normal
Nature	Nature; ISSN: 0028-0836
N Engl J Med	The New England journal of medicine; ISSN: 0028-4793
NPC	<i>nuclear pore complex</i>
Nucleic Acids Res	Nucleic acids research; ISSN: 0305-1048
Ω	Ohm
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PbE	Plaque-bildende Einheiten
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	potentia hydrogenium
p.i.	post infectionem
Proc Natl Acad Sci USA	Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America; ISSN: 0027-8424
PT	permanente Kälbernierenzelllinie
pUL..	das Proteinprodukt des Genlocus UL..
RFLP	Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
RNS	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
Science	Science; ISSN: 0036-8075
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
SSC	<i>standard saline citrate</i>

SuHV-1	Suides Herpesvirus 1, (früher PrV, Pseudorabiesvirus)
α TIF	<i>alpha-trans inducing factor</i>
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBS-T	Tris-gepufferte Saline mit Tween20
TEMED	Tetramethyläthylendiamin
Th1	T-Helfer-Zellen 1
Th2	T-Helfer-Zellen 2
TierSG	Tierseuchengesetz
Tijdschr Diergeneeskd	Tijdschrift voor diergeneeskunde; ISSN: 0040-7453
TK	Thymidinkinase
TR	<i>Terminal Repeat</i>
U	Unit (Einheit)
UL	<i>Unique long</i> - Region
US	<i>Unique short</i> - Region
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
v.a.	vor allem
Vaccine	Vaccine; ISSN: 0264-410X
Vet Microbiol	Veterinary microbiology; ISSN: 0378-1135
Vet Immunol Immunopathol	Veterinary immunology and immunopathology; ISSN: 0165-2427
vhs	<i>virus-host-shut-off</i>
Virology	Virology; ISSN: 0042-6822
Virus Res.	Virus research; ISSN: 0168-1702
VP22	Virion Protein 22 = Genprodukt des UL49
W	Watt
wt	Wildtyp Virus im Falle dieser Arbeit BoHV-1 Schönböken
w/v	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit

X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl- β -D-Galactosid
z.B.	zum Beispiel
ZBV	Zellbank für Zelllinien in der Veterinärmedizin
zpE	zytopathischer Effekt

10 Lebenslauf

Donata Kalthoff

Geburtsdatum 27.08.1976

Geburtsort Duisburg

Familienstand verheiratet

Staatsangehörigkeit deutsch

Schullaufbahn

1983 - 1987 Dorsterfeldgrundschule, Moers

1987 – 1996 Gymnasium in den Filder Benden, Moers

1996 Abitur

Universitäre Ausbildung

1996 – 1998 Studium der Veterinärmedizin
Rijksuniversitair Centrum Antwerpen

1998 – 2003 Studium der Veterinärmedizin
Tierärztliche Hochschule Hannover

2003 Approbation als Tierärztin

Arbeitsverhältnisse

10/2003 – 12/2003 Riemser Arzneimittel AG, Greifswald- Insel
Riems

seit 2004 FLI, Greifswald- Insel Riems

11 Danksagung

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Märtlbauer und den weiteren Gutachtern für die Bewertung dieser Arbeit.

Besonderer Dank gebührt Dr. Martin Beer, der mich immer unterstützt hat und dessen stete Motivation und Diskussionsbereitschaft zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre des BHV-1 Referenzlabors auf dem Riems und die stets entgegengebrachte Hilfe aller Mitarbeiter möchte ich mich herzlichst bedanken. Doreen Reichelt, Birgit Goerl und Mareen Grawe steht besonderer Dank für die labortechnische Unterstützung zu.

Dr. Patricia König gebührt der besondere Dank für die Bereitstellung von tierexperimenteller Erfahrung.

Der Firma Riemser Arzneimittel AG bin ich für die finanzielle Unterstützung zu Dank verpflichtet.