

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von

Univ.-Prof. Dr. Bernd Kaspers

**Etablierung eines *in vitro* Systems zur Infektion von  
B- und T-Zellen mit dem Virus der Marek'schen  
Krankheit**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde

der Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Julia Schermuly

aus Limburg an der Lahn

München, 2014

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

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

**Berichterstatter:** Univ.-Prof. Dr. Bernd Kaspers

**Korreferenten:** Univ.-Prof. Dr. Dr. Michael H. Erhard  
Univ.-Prof. Dr. Gerd Sutter  
Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Korbel  
Univ.-Prof. Dr. Holm Zerbe

Tag der Promotion: 08.02.2014

Für meine Familie

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2. LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Marek'sche Krankheit .....</b>	<b>3</b>
2.1.1 Geschichte der Marek'schen Krankheit.....	3
2.1.2 Das MD-Virus.....	4
2.1.3 Impfung und Kontrolle des MD-Virus .....	8
2.1.4 MDV heute.....	11
2.1.5 Diagnose .....	11
2.1.6 Klinische Erscheinungen .....	12
2.1.7 Pathogenese.....	13
2.1.8 Immunantwort auf eine MDV Infektion .....	17
2.1.9 MDV Zellkultursysteme .....	22
<b>2.2 Das adaptive Immunsystem des Huhns .....</b>	<b>24</b>
2.2.1 B-Zellsystem des Huhns .....	25
2.2.2 B-Zellkultursysteme.....	28
2.2.3 T-Zellsystem des Huhns .....	30
2.2.4 T-Zellkultursysteme .....	32
<b>3. ZIELSETZUNG .....</b>	<b>34</b>
<b>4. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>35</b>
<b>4.1 Tiere und Tierhaltung .....</b>	<b>35</b>
4.1.1 Hühner.....	35
<b>4.2 Gewinnung von primären Leukozyten .....</b>	<b>35</b>
4.2.1 Material .....	35
4.2.2 Gewinnung von Blutleukozyten .....	36
4.2.3 Gewinnung von Leukozyten aus Milz, Bursa und Thymus.....	36
4.2.4 Qualitative und quantitative mikroskopische Beurteilung der Leukozyten.	37
<b>4.3 Zellkultur.....</b>	<b>37</b>
4.3.1 Medien und Zusätze .....	37
4.3.2 Verwendete Zelllinien.....	38
4.3.3 Kultivierung von Zelllinien.....	38
4.3.4 Kultivierung primärer Zellen .....	39
4.3.5 Einfrieren von Zellen .....	39
4.3.6 Auftauen von Zellen .....	40
<b>4.4 Herstellung des rekombinanten chCD40L .....</b>	<b>40</b>
4.4.1 Proteinexpression in HEK 293-msCD8-chCD40L.....	40
4.4.2 Konzentrierung des rekombinanten chCD40L .....	40
4.4.3 Test des konzentrierten chCD40L im ELISA .....	41
4.4.4 Test des konzentrierten chCD40L im Proliferationsassay.....	43

---

<b>4.5</b>	<b><i>In vitro</i> Infektionsexperimente.....</b>	<b>44</b>
4.5.1	Verwendete MDV-Stämme .....	44
4.5.2	Gewinnung eines MD-Virusstocks .....	44
4.5.3	Titration des MD-Virusstocks.....	45
4.5.4	Fixierung und Plauefärbung der infizierten HEF.....	45
4.5.5	Infektion der primären Lymphozyten .....	47
4.5.6	Infektion von HEF mit infizierten B- und T-Zellen.....	48
4.5.7	Infektion von HEF mit der transformierten Zelllinie JS1 .....	49
<b>4.6</b>	<b>Durchflusszytometrische Untersuchungen.....</b>	<b>50</b>
4.6.1	Lebend/Tot-Färbung .....	52
4.6.2	Direkte Färbung mit Fluorochrom-markierten Antikörpern.....	53
4.6.3	Indirekte Färbung.....	53
4.6.4	Mehrfachfärbung mit Antikörpern des gleichen Isotyps .....	53
4.6.5	Fixierung .....	54
4.6.6	Zytoplasmatische Färbung .....	54
<b>4.7</b>	<b>Durchflusszytometrisches Sortieren infizierter Zellen.....</b>	<b>55</b>
4.7.1	Sortierung der infizierten B-Zellen .....	56
4.7.2	Sortierung der infizierten T-Zellen .....	56
4.7.3	Sortierung der infizierten Zellpopulationen für die RT-qPCR-Analyse.....	57
<b>4.8</b>	<b>Nachweis der Virusreplikation in B- und T-Zellen .....</b>	<b>58</b>
4.8.1	Quantitative RT-PCR.....	58
<b>4.9</b>	<b>RNA-Präparation für den Mikroarray .....</b>	<b>59</b>
4.9.1	RNA-Isolation.....	59
4.9.2	Reinheitsbestimmung der RNA im NanoDrop .....	60
4.9.3	Bestimmung der RNA Integrität im Agilent 2100 Bioanalyzer .....	61
<b>4.10</b>	<b>Mikroarray .....</b>	<b>61</b>
4.10.1	Agilent Mikroarray .....	61
4.10.2	cDNA Synthese.....	62
4.10.3	cRNA Synthese.....	62
4.10.4	Aufreinigung und Bestimmung der spezifischen Cy3 Aktivität.....	63
4.10.5	Fragmentierung der cRNA.....	63
4.10.6	Hybridisierung des Mikroarrays .....	63
4.10.7	Waschen und Scan des Mikroarrays .....	64
4.10.8	Programme zur Auswertung der Mikroarrays .....	65
<b>5.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>68</b>
<b>5.1</b>	<b>Herstellung von rekombinantem löslichem Hühner-CD40Ligand .....</b>	<b>68</b>
<b>5.2</b>	<b>Gewinnung eines MD-Virusstocks .....</b>	<b>69</b>
<b>5.3</b>	<b><i>In vitro</i> MDV Infektion von kultivierten B-Lymphozyten.....</b>	<b>71</b>
5.3.1	Infektion und Charakterisierung von Milz-B-Zellen .....	71
5.3.2	Infektion und Charakterisierung von Blut-B-Zellen.....	75
5.3.3	Infektion und Charakterisierung von Bursa-B-Zellen .....	78

---

<b>5.4</b>	<b><i>In vitro</i> MDV Infektion von kultivierten T-Lymphozyten.....</b>	<b>79</b>
5.4.1	Infektion und Charakterisierung von Milz-T-Zellen .....	80
5.4.2	Infektion und Charakterisierung von Blut-T-Zellen .....	82
5.4.3	Infektion und Charakterisierung von Thymus-T-Zellen.....	83
<b>5.5</b>	<b>Infektiösität der <i>in vitro</i> infizierten primären Lymphozyten .....</b>	<b>86</b>
5.5.1	Infektion von HEF mit UL47GFP infizierten B-Zellen.....	87
5.5.2	Infektion von HEF mit RB-1B MeqGFP-UL47RFP infizierten T-Zellen...	87
5.5.3	MDV-Genomkopien in infizierten B- und T-Zellen.....	88
5.5.4	Infektion von T-Zellen mit RB-1B MeqGFP-UL47RFP infizierten B-Zellen .....	89
<b>5.6</b>	<b>MDV transformierte lymphoblastoide Zelllinien .....</b>	<b>90</b>
5.6.1	Zytoplasmatische Färbung der Zelllinie JS1.....	91
5.6.2	Färbung der Oberflächenmarker der Zelllinie JS1.....	92
5.6.3	Infektiösität der Zelllinie JS1.....	92
5.6.4	Übersicht über weitere <i>in vitro</i> transformierte Zelllinien .....	93
<b>5.7</b>	<b>Genexpressionsanalyse der MDV infizierten B-Zellen .....</b>	<b>95</b>
5.7.1	Zellsortierung der infizierten und nicht infizierten Bursa-B-Zellen .....	95
5.7.2	Präparation der RNA für die Mikroarray-Analyse .....	96
5.7.3	Heatmap der MDV Gene .....	96
5.7.4	Heatmap der Hühnergene .....	98
5.7.5	Signifikant regulierte Gene MDV-infizierter B-Zellen .....	100
<b>6.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>107</b>
6.1	Voraussetzungen für die <i>in vitro</i> MDV-Infektion von B- und T-Zellen .....	108
6.2	MDV-Infektion von B-Zellen <i>in vitro</i> .....	109
6.3	MDV-Infektion von T-Zellen <i>in vitro</i> .....	112
6.4	Latenz und Transformation von T-Zellen <i>in vitro</i> .....	115
6.5	Anwendung des Infektionsmodells für primäre B-Zellen zur Erforschung der Wirt-Pathogen-Interaktion .....	117
6.6	Ausblick .....	120
<b>7.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>123</b>
<b>8.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>125</b>
<b>9.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>127</b>
<b>10.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>149</b>
<b>11.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>153</b>

**ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abbildung 1:	Die stufenweise Virulenzsteigerung des MDV .....	9
Abbildung 2:	Cornell-Modell der MDV Pathogenese.....	14
Abbildung 3:	Immunantwort auf eine MDV-Infektion .....	18
Abbildung 4:	B-Zellentwicklung beim Huhn.....	27
Abbildung 5:	Entwicklung der T-Zelle im Thymus .....	31
Abbildung 6:	Quantifizierung von rekombinantem chCD40L im ZKÜ .....	68
Abbildung 7:	Biologische Aktivität des chCD40L im Proliferationsassay.....	69
Abbildung 8:	Vergleich der Infektionsraten von Fibroblasten verschiedener Hühnerlinien	70
Abbildung 9:	Infektion von Milzleukozyten mit RB-1B UL47GFP.....	72
Abbildung 10:	Infektion von Milz-B-Zellen mit RB-1B UL47GFP.....	73
Abbildung 11:	Phänotypische Charakterisierung der infizierten Milzleukozyten .....	74
Abbildung 12:	Zytoplasmatische Färbung viraler Proteine in Milzleukozyten .....	75
Abbildung 13:	Infektion von Blutleukozyten mit RB-1B UL47GFP .....	76
Abbildung 14:	Phänotypische Charakterisierung der infizierten Blutleukozyten.....	77
Abbildung 15:	Infektion von Bursalymphozyten mit RB-1B UL47GFP.....	78
Abbildung 16:	Phänotypische Charakterisierung der infizierten Bursalymphozyten .....	79
Abbildung 17:	Phänotypische Charakterisierung der infizierten Milzleukozyten .....	81
Abbildung 18:	Phänotypische Charakterisierung der infizierten Blutleukozyten.....	82
Abbildung 19:	Phänotypische Charakterisierung der latent und lytisch infizierten Thymozyten.....	84
Abbildung 20:	Charakterisierung der infizierten T-Zellen mittels chCD4/chCD8 Doppelfärbung.....	86
Abbildung 21:	Infektion von HEF mit RB-1B UL47GFP infizierten B-Zellen.....	87
Abbildung 22:	Infektion von HEF mit RB-1B MeqGFP-UL47RFP infizierten T-Zellen .....	88
Abbildung 23:	Virusreplikation in B- und T-Zellpopulationen .....	89
Abbildung 24:	Infektion von Thymozyten mit RB-1B MeqGFP-UL47RFP infizierten B- Zellen.....	90
Abbildung 25:	<i>In vitro</i> transformierte Zelllinie JS1 .....	91
Abbildung 26:	Zytoplasmatische Färbung von JS1-Zellen mit Antigenen gegen virale Proteine.....	91
Abbildung 27:	Phänotypisierung der MDV transformierten Zelllinie JS1 .....	92
Abbildung 28:	Infektion von HEF mit der MDV transformierten Zelllinie JS1 .....	93
Abbildung 29:	Gewinnung reiner infizierter und nicht infizierter B-Zellpopulationen .....	96

---

Abbildung 30: Heatmap aller gespotteten MDV-Gene .....	97
Abbildung 31: Heatmap aller gespotteten Hühnergene.....	99
Abbildung 32: Heatmap aller signifikant regulierten Gene .....	101
Abbildung 33: Venn-Diagramme der Hühnergene und der MDV-Gene .....	103
Abbildung 34: Das Cornell-Modell <i>in vitro</i> .....	121

**TABELLENVERZEICHNIS**

Tabelle 1:	Übersicht über die Gattung Mardivirus ( modifiziert nach (Davison, 2010)) .....	4
Tabelle 2:	Klinische Erscheinungen der MD .....	13
Tabelle 3:	Übersicht über die im ELISA verwendeten Antikörper.....	42
Tabelle 4:	Verwendete MDV-Virusstämme .....	44
Tabelle 5:	Für die Plaquefärbung der viralen Proteine verwendete Antikörper .....	46
Tabelle 6:	In der Durchflusszytometrie eingesetzte Primärantikörper .....	52
Tabelle 7:	In der Durchflusszytometrie eingesetzte Sekundärantikörper .....	52
Tabelle 8:	In der zytoplasmatischen Färbung verwendete Antikörper .....	54
Tabelle 9:	Phänotypisierung der MDV transformierten Zelllinien .....	94
Tabelle 10:	Signifikant regulierte Gene nach MDV Infektion.....	102
Tabelle 11:	Immunrelevante Signalwege nach MDV-Infektion.....	105
Tabelle 12:	Signifikant regulierte Chemokine .....	105
Tabelle 13:	Signifikant regulierte Zytokine .....	106

**TABELLENVERZEICHNIS DER BEILIEGENDEN CD**

Tabelle 14:	Annotation
Tabelle 15:	Hühnergene auf Annotation
Tabelle 16:	MDV Gene auf Annotation
Tabelle 17:	Nach MDV Infektion signifikant regulierte Hühnerspots
Tabelle 18:	Nach MDV Infektion signifikant regulierte MDV-Spots
Tabelle 19:	Nach MDV Infektion signifikant regulierte Hühnergene
Tabelle 20:	Nach MDV Infektion signifikant regulierte MDV-Gene
Tabelle 21:	Gene im Venn-Diagramm
Tabelle 22:	Apoptosespots auf Annotation
Tabelle 23:	Apoptosegene auf Annotation
Tabelle 24:	Nach MDV Infektion signifikant regulierte Apoptosespots
Tabelle 25:	Nach MDV Infektion signifikant regulierte Apoptosegene
Tabelle 26:	Chemokine
Tabelle 27:	Zytokine
Tabelle 28:	IRGs
Tabelle 29:	Pathway Express

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

ADCC	<i>antibody dependent cellular cytotoxicity</i>
ADOL	<i>Avian Disease and Oncology Laboratory</i>
AID	<i>activation-induced cytidine deaminase</i>
Aqua bidest.	bidestilliertes Wasser
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AVL	aviäres Leukosevirus
BAC	<i>bacterial artificial chromosom</i>
BAFF	<i>B cell activating factor of the tumor necrosis factor family</i>
BCMA	<i>B cell maturation antigen</i>
BCR	B-Zellrezeptor, <i>B-cell receptor</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
BSL	Biosicherheitslevel
bZIP	<i>basic leucin Zipper</i>
bzw.	beziehungsweise
CAV	Hühner-Anämie-Virus
CCL	CC-Chemokin Ligand
CCR	CC-Chemokin-Rezeptor
CD40L	CD40Ligand
Ch	Hühner, <i>chicken</i>
CKC	Hühnernierenzellen, <i>chicken kidney cells</i>
Con A	Concanavalin A
CT	Caecaltonsille
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten, <i>Cytotoxic T-lymphocytes</i>
DEF	Entenembryofibroblasten, <i>duck embryo fibroblasts</i>
D <sub>H</sub>	<i>Diversity</i> - Segment der schweren Kette
DNA	Desoxyribonukleinsäure, <i>deoxyribonucleic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i>
EST	<i>Expressed-Sequence-Tag</i>
FBS	fötales Rinderserum, <i>fetal bovine serum</i>
FC	<i>Fold change</i>
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
FEE	Federfollikelepithel
FISH	<i>fluorescent in situ hybridization</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
GaHV2	<i>Gallid Herpesvirus 2</i>
GaHV3	<i>Gallid Herpesvirus 3</i>
gB	Glykoprotein B
GFP	grün fluoreszierendes Protein
HEF	Hühnerembryofibroblasten, <i>chicken embryo fibroblasten</i>
HEK	menschliche Embryonierenzellen, <i>human embryonic kidney cells</i>
IBDV	Infektiöse Bursitis der Hühner
ICP	Intrazelluläres Protein, <i>intracellular protein</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iNOS	<i>Inducible nitric oxid synthase</i>
INRA	<i>Institut national de la recherche agronomique</i>
IR <sub>L</sub>	<i>internal repeat long</i>

IR <sub>S</sub>	<i>internal repeat short</i>
J <sub>H</sub>	<i>Joining- Segment der schweren Kette</i>
J <sub>L</sub>	<i>Joining- Segment der leichten Kette</i>
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LAMP	<i>loop-mediated isothermal amplification</i>
LAT	<i>Latenz-assoziierte Transkripte</i>
LSL	<i>Lohmann's Selected Leghorn</i>
mAK	<i>monoklonaler Antikörper</i>
MATSA	<i>Marek's Disease tumor-associated surface antigen</i>
MD	<i>Marek'sche Krankheit, Marek's Disease</i>
MDV	<i>MD-Herpesvirus</i>
MeHV1/HVT	<i>Meleagrid Herpesvirus 1/ Turkey herpesvirus</i>
Meq	<i>MDV EcoQ</i>
MEV	<i>multi experiment viewer</i>
MEV SOTA	<i>Self Organizing Tree Algorithm</i>
MHC	<i>Haupthistokompatibilitätskomplex, Major Histocompatibility Complex</i>
mMDV	<i>Schwaches Marek's Disease Virus, mild Marek's Disease Virus</i>
MW	<i>Mittelwert</i>
NK-Zelle	<i>natürliche Killerzellen, natural killer cell</i>
NO	<i>Stickstoffmonoxid</i>
p.i.	<i>post infectionem</i>
PBL	<i>periphere Blutlymphozyten</i>
PBS	<i>Phosphatgepufferte Salzlösung, phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase-Kettenreaktion, Polymerase Chain Reaction</i>
pfu	<i>plaque forming unit</i>
PHA	<i>Phytohämagglutinin</i>
pp	<i>phosphorylierter Proteinkomplex</i>
PRR	<i>pattern-recognition-receptor</i>
qPCR	<i>Quantitative Echtzeit-PCR</i>
QTLR	<i>quantitative trait loci regions</i>
R	<i>Rezeptor</i>
RAG	<i>recombination-activating gene</i>
RCAS	<i>replication competent ASLV – LTR with a splice acceptor</i>
RECC	<i>REV-transformierte MHC-definierte lymphoblastoide Hühnerzelllinien, REV-transformed, MHC-defined lymphoblastoid chicken cell lines</i>
REO	<i>aviäres Reovirus</i>
REV	<i>Aviäres Retikuloendotheliose-Virus</i>
RFP	<i>rot fluoreszierendes Protein</i>
RNA	<i>Ribonukleinsäure, ribonucleic acid</i>
STABW	<i>Standardabweichung</i>
TACI	<i>transmembrane activator, calcium modulator and CAML interactor</i>
TAP	<i>Antigen-assoziiertes Transporterproteine, transporter proteins associated with antigen presentation</i>
Th	<i>T-Helferzelle</i>
TMB	<i>Tetramethylbenzidin</i>
TNF-Familie	<i>tumour necrosis factor family</i>
TR <sub>L</sub>	<i>Terminal repeat long</i>
TR <sub>S</sub>	<i>Terminal repeat short</i>
U <sub>L</sub>	<i>Unique long</i>

---

U <sub>S</sub>	<i>Unique short</i>
V <sub>H</sub>	<i>Variable</i> -Segment der schweren Kette
VIA	<i>viral internal antigen</i>
vIL-8	virales Interleukin-8
V <sub>L</sub>	<i>Variable</i> -Segment der leichten Kette
vMDV	virulentes Marek's Disease Virus, <i>virulent Marek's Disease Virus</i>
VN	Virus-neutralisierend
vv+MDV	Sehr virulentes plus Marek's Disease Virus, <i>very virulent plus Marek's Disease Virus</i>
vvMDV	Sehr virulentes Marek's Disease Virus, <i>very virulent Marek's Disease Virus</i>
WABG	<i>Well Above Background</i>
α	Alpha
β	Beta
γ	Gamma
δ	Delta

## 1. EINLEITUNG

Die Marek'sche Krankheit (MD) der Hühner ist eine neoplastische Erkrankung, die weltweit für große wirtschaftliche Verluste in der Geflügelindustrie verantwortlich ist. Verursacht wird diese durch ein lymphotropes und strikt zell-assoziiertes Alpha-Herpesvirus, das Marek's Disease Virus (MDV). Die Infektion ist durch eine Immunsuppression und dadurch bedingte Todesfälle in ihrer frühen Phase sowie neurologische Störungen und T-Zelltumore in Nervengewebe und viszeralen Organen in der späten Phase gekennzeichnet.

Auf molekularer Ebene ist das MDV in den letzten Jahren intensiv untersucht worden. Maßgeblich dazu beigetragen hat die Entwicklung der BAC-Technologie, welche das ganze Spektrum der reversen Genetik auch in der MDV-Forschung eröffnet hat. Wichtig im Kontext der hier vorliegenden Arbeit war dabei die Etablierung von genetisch modifizierten Viren, die in den verschiedenen Phasen der Infektion Fluorochrome exprimieren und so beispielsweise mit Methoden der Durchflusszytometrie einfach und schnell detektiert werden können (Osterrieder et al., 2006).

Die Pathogenese der MD ist äußerst komplex und unterteilt sich in eine zytolytische und eine latente Phase. Die natürliche Infektion erfolgt durch die Inhalation von infektiösem Federstaub, worauf es zur Infektion von Makrophagen und B-Zellen in der Lunge kommt. Diese transportieren das Virus in die lymphatischen Organe, wo es in B- und T-Zellen repliziert und in Folge der zytolytischen Infektion zu einer massiven Apoptose der Zellen führt. Infizierte Lymphozyten wandern zum Federfollikel-epithel, dem einzigen Ort an dem freies, infektiöses Virus gebildet und abgegeben wird. Etwa eine Woche nach der Infektion kommt es zur Phase der Latenz, die hauptsächlich in  $CD4^+ \alpha V\beta 1\text{-TCR}^+$  T-Zellen beobachtet wird. Nach der Reaktivierung des Virus in latent infizierten T-Zellen werden diese Zellen durch noch weitgehend unbekannte Mechanismen transformiert, was nach etwa vier bis sechs Wochen zur Bildung von  $CD4^+ \alpha V\beta 1\text{-TCR}^+$  T-Zelltumoren führt (Baigent and Davison, 2004).

Dieses, als Cornell-Modell bezeichnete Konzept der MD Pathogenese, wurde überwiegend durch *in vivo* Studien erarbeitet. Versuche B- und T-Lymphozyten *in vitro* zu infizieren und so die Interaktion von Virus und Wirt detailliert zu analysieren, sind bis heute erfolglos geblieben. Ursächlich hierfür war das Fehlen geeigneter Kultursysteme für Hühnerlymphozyten, die *ex vivo* sehr schnell in Apoptose gehen. Alle *in vitro* Studien werden daher auch über 40 Jahre nach der Entdeckung des MDV und trotz der Fortschritte der molekularen Virologie an primären Fibroblasten- oder Nierenzellkulturen durchgeführt.

Bemerkenswert ist, dass keiner dieser Zelltypen *in vivo* infiziert wird und diese Zellkulturen somit äußerst artifizielle Systeme darstellen. Sichtbar wird dies darin, dass keiner der Zelltypen durch das onkogene MDV transformiert wird, was Arbeiten zur Tumorgenese auf den Tierversuch beschränken.

Die Sequenzierung des Hühnergenoms hat in den letzten Jahren zu großen Fortschritten in der aviären Immunologie geführt. So wurden zahlreiche Zytokine und Wachstumsfaktoren identifiziert, kloniert und funktionell charakterisiert. Hierzu zählen auch mehrere B- und T-Zell spezifische Faktoren, die dazu beigetragen haben, dass Hühnerlymphozyten inzwischen über längere Zeit kultiviert werden können. Besonders eindrucksvoll ist dies für die B-Lymphozyten gelungen, die in den bisher verwendeten Kultursystemen binnen 24 Stunden starben. Durch die Zugabe von Zytokinen wie chBAFF, chCD40L, und chIL-10 kommt es zu einer Proliferation und Aktivierung der B-Zellen und sie können bis zu 14 Tage *in vitro* überleben (Ratcliffe and Härtle, 2013).

In dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, ob und welche der genannten Zellkultursysteme genutzt werden können, um erstmals B- und T-Lymphozyten *in vitro* zu infizieren. Solche Kultursysteme würden die Möglichkeit bieten, umfassende Untersuchungen zur Interaktion des MDV mit den natürlichen Zielzellen *in vitro* durchzuführen, eventuell *in vitro* transformierte lymphoblastoide Zelllinien zu generieren und so auch die Zahl der mit erheblichen Belastungen durch die Tumorbildung einhergehenden Tierversuche zu reduzieren.

## 2. LITERATURÜBERSICHT

### 2.1 MAREK'SCHE KRANKHEIT

Die Marek'sche Krankheit (*Marek's Disease*, MD) der Hühner ist eine neoplastische Erkrankung, die weltweit für große wirtschaftliche Verluste in der Geflügelindustrie verantwortlich ist. Verursacht wird MD durch das lymphotrope, zell-assoziierte MD-Herpesvirus (MDV).

#### 2.1.1 Geschichte der Marek'schen Krankheit

MD wurde zum ersten Mal 1907 von dem ungarischen Veterinärpathologen Józef Marek entdeckt und in seiner Publikationen als „Multiple Nervenentzündung (Polyneuritis) bei Hühnern“ beschrieben. Das Krankheitsbild bei Hähnen war durch Paresen in den Beinen und Flügeln, bedingt durch mononukleäre Infiltrationen der peripheren Nerven, gekennzeichnet (Marek, 1907).

Detaillierter wurde die Erkrankung 1909 von Ellermann *et al.* als Leukämie der Hühner charakterisiert, eine endemisch oder epidemisch auftretende Erkrankung mit leukämisch angeschwollener Leber und Milz, Knochenmarksveränderungen, einer mononukleären Leukozytose sowie polychromen Degeneration der Erythrozyten (Ellermann and Bang, 1909). Zu Beginn der Forschung ging man davon aus, dass die Erkrankung nur das Nervensystem betrifft (Van der Walle and Winkler-Junius, 1924). Weitergehende Studien beschrieben dann klinische Bilder wie ein- oder beidseitige Lahmheit, partielle Blindheit, Durchfall, komplette Paralyse und Todesfälle (Kaupp, 1921).

Pappenheimer *et al.* beschrieben erstmals das Auftreten von viszeralen Lymphomen und schlugen die Umbenennung der Erkrankung in „*Neuro-Lymphomatosis gallinarum*“ vor (Pappenheimer *et al.*, 1929a; Pappenheimer *et al.*, 1929b), ein Begriff der 1941 offiziell als „*lymphomatosis for fowl disease*“ mit der Unterteilung in eine neurale, okuläre und viszerale Form anerkannt wurde (Jungherr *et al.*, 1941).

Nachdem es im Verlauf der Jahre Unklarheiten mit der Begrifflichkeit der „Lymphomatose“ gab, wurde der von Marek und Pappenheimer beschriebene Krankheitskomplex durch Biggs und Campell 1961 in „Marek'sche Krankheit“ umbenannt. Die von Ellermann beschriebene Leukämie der Hühner wurde unter der Bezeichnung Leukose weitergeführt, sie fasste auch die lymphatische Form der lymphoiden Leukose ein (Campbell and Biggs, 1961).

Biggs und Payne wiesen 1967 eine Übertragung durch direkten und indirekten Kontakt zwischen infizierten und nicht-infizierten Hühnern nach (Biggs and Payne, 1967). Weitergehende Versuche gaben schließlich den Hinweis, dass es sich um einen zell-assoziierten Erreger in Blut- und Tumorzellen handelte (Churchill and Biggs, 1968). Der als Herpes-Typ-Virus beschriebene Erreger wurde durch Zellkulturexperimente näher charakterisiert und zeigte *in vitro* einen zytopathischen Effekt in Hühnernierenzellen (*chicken kidney cells*, CKC) (Churchill, 1968). Der Nachweis von vollständig behüllten und infektiösen Viren im Federfollikelepithel infizierter Tiere führte schließlich zur Klärung des bis dahin unbekanntes Infektionsweges (Calnek et al., 1970b; Calnek and Hitchner, 1969).

### 2.1.2 Das MD-Virus

Das MD-Virus gehört zu der Familie der *Herpesviridae*, die in die drei Subfamilien *Alpha*-, *Beta*- und *Gammaherpesvirinae* unterteilt wird. Lange Zeit wurde MDV aufgrund seiner lymphoproliferativen Eigenschaft zusammen mit dem Epstein-Barr-Virus den *Gammaherpesvirinae* zugeordnet (Roizman et al., 1981). Neue DNA-Sequenzierungen und Aminosäureanalysen weisen jedoch auf eine nähere Verwandtschaft zu den *Alphaherpesvirinae* hin, zu denen auch die Gattungen *Simplexvirus*, *Varicellovirus* und *Iltovirus* zählen. Innerhalb der *Alphaherpesvirinae* wird MDV der Gattung *Mardivirus* zugeordnet.

Innerhalb der Mardiviren gibt es drei Spezies, das *Gallid Herpesvirus 2* (GaHV2), das *Gallid Herpesvirus 3* (GaHV3) und das *Meleagrid Herpesvirus 1* (MeHV1/HVT). Vorübergehend wurde auch das *Columbid Herpesvirus 1* diesem Genus zugeordnet (Davison, 2010).

Spezie	Abkürzung	Frühere Bezeichnung	Pathotyp	Impfstoff
<b>Gallid Herpesvirus 2</b>	GaHV2	MDV Serotyp 1	• Sehr virulent+	Nein
			• Sehr virulent	Nein
			• Virulent	Nein
			• Mild	Nein
			• Attenuiert	Ja
<b>Gallid Herpesvirus 3</b>	GaHV3	MDV Serotyp 2	Nicht onkogen	Ja
<b>Meleagrid Herpesvirus 1</b>	MeHV1	Turkey herpesvirus (HVT)	Nicht onkogen	Ja

**Tabelle 1: Übersicht über die Gattung Mardivirus (modifiziert nach (Davison, 2010))**

GaHV2 wird aufgrund seiner Virulenz in vier Pathotypen unterteilt. Die Einstufung der

Pathotypen erfolgt anhand der sogenannten „*Avian Disease and Oncology Laboratory (ADOL) method*“ und basiert auf der Eigenschaft der verschiedenen Pathotypen, lymphoproliferative Läsionen in geimpften Tieren zu verursachen (Witter, 1997). Der Pathotyp der Virusstämme der 1950er Jahre wurde als mild (mMDV) eingestuft, während die Virusstämme aus den 1960er Jahren wie JM (Sevoian et al., 1962) und GA (Eidson and Schmittle, 1968) schon als virulente (vMDV) Pathotypen klassifiziert wurden. Gegen die vMDV-Stämme konnten die Hühnerbestände durch die Vakzinierung mit HVT geschützt werden. In den späten 1970er Jahren wurden Virusstämme wie Md5 (Witter, 1983) und RB-1B (Schat et al., 1982) aufgrund ihrer Pathogenität für HVT-geimpfte Tiere als sehr virulent (*very virulent*, vvMDV) eingestuft. Mitte der 1990er Jahre traten in bivalent, mit SB-1 und HVT, geimpften Hühnerbeständen erneut MD-Symptome auf. Witter *et al.* (Witter, 1997) klassifizierten diese noch virulenteren Stämme als vv+MDV.

Ein MD-Viruspartikel setzt sich aus einem Kern, dem Kapsid, dem Tegument und der Hülle zusammen. Der Viruskern wird von einem ikosaedrischen Kapsid, bestehend aus 162 zylindrischen Kapsomeren, umgeben und zusammen bilden sie das sogenannte Nukleokapsid (Nazerian and Burmester, 1968). Die Nukleokapside von Herpesviren haben eine Größe von 85-100nm und die behüllten Viruspartikel sind zwischen 150-200nm groß (Schat and Nair, 2008). MD-Kapside sind im Nukleus und einige wenige auch im Zytoplasma zu finden. Das Genom des MD-Virus besteht aus einer linearen doppel-strängigen DNA von 160-180kb (Lee et al., 1971) und es kodiert mehr als 100 Proteine (Osterrieder and Vautherot, 2004).

Mittlerweile wurden die kompletten Genomsequenzen von verschiedenen MDV Stämmen publiziert (Afonso et al., 2001; Izumiya et al., 2001; Lee et al., 2000; Tulman et al., 2000). Die genomische Struktur des MDV besteht, wie das aller Alpha-Herpesviren, aus einer *unique long* ( $U_L$ ) und einer *unique short* ( $U_S$ ) Sequenz. Beide werden von den *terminal und internal repeats long* ( $TR_L$  und  $IR_L$ ) und *short* ( $TR_S$  und  $IR_S$ ) Sequenzen flankiert (Cebrian et al., 1982).

Während die Gene der  $U_L$  und  $U_S$  größtenteils homolog zu denen des Herpes-Simplex-Virus-1 und Varizella-Zoster-Virus sind, weisen die Gene der terminalen und internalen repeat Region genus- und serotypspezifische Unterschiede auf. Die MDV spezifischen offenen Leserahmen enthalten unter anderem die Gene des Onkoproteins MDV EcoQ (Meq), das sogenannte virale Interleukin-8 (vIL-8 = vCXCL13), der phosphorylierte Proteinkomplex (pp) 38 und pp24 (Lee et al., 2000; Osterrieder et al., 2006; Tulman et al., 2000).

Die Gene von Herpesviren werden aufgrund ihrer Expressionskinetik in unmittelbar frühe,

frühe und späte Gene unterteilt und sind zum Großteil an der Virusreplikation beteiligt. Im Folgenden sollen insbesondere die für die hier vorliegende Arbeit relevanten Gene näher beschrieben werden.

Zu den unmittelbar frühen und frühen Genen gehören Transkriptionsregulatoren, wie die intrazellulären Proteine (ICP) 4, ICP22 und ICP27 (Schat and Nair, 2008). Besonders ICP4 ist ein potenter Transaktivator und bedingt die Transkription von pp24 und pp38 (Pratt et al., 1994). Die späten Gene umfassen die strukturellen Gene für Nukleokapsid-, Tegument- und Glykoproteine. Insbesondere die Glykoproteine (gB, gC, gH, gI, gK, gL, gM) spielen beim Eindringen des Virus in die Wirtszelle, aber auch beim Zell-Zelltransfer eine große Rolle (Schat and Nair, 2008). Das Glykoprotein B ist als Fusionsprotein entscheidend für das Eindringen in die Zelle. Bei gB-deletierten MDV-Mutanten kommt es zu einer gestörten Zell-Zellverbreitung und gegen gB vorhandene neutralisierende Antikörper können die zell-assoziierte Virämie verringern (Nazerian et al., 1992; Schumacher et al., 2000). Das zu den Haupttegumentproteinen gehörende UL47 (VP13/VP14) gehört zu den späten Genen, die in der zytolytischen Phase der Infektion exprimiert werden. *In vitro* Versuche mit UL47-deletierten Virusmutanten zeigten, dass UL47 keine essentielle Rolle bei der Infektion hat. Jedoch kommt es beim Fehlen von UL47 zu einem etwas beeinträchtigten Viruswachstum *in vitro* (Dorange et al., 2002).

Neben den Genen, die alle Alpha-Herpesviren gemeinsam haben, gibt es auch MDV spezifische Gene. Dies sind vor allem Gene, die mit ihrer Transkription die Latenz beeinflussen. Dazu gehören die Latenz-assoziierten Transkripte (LATs), eine Gruppe von ICP4 antisensen Transkripten. Diese werden von latent infizierten und transformierten Zellen exprimiert (Cantello et al., 1997; Li et al., 1994). Sind die LATs nicht vorhanden, so kommt es zwar zu einer lytischen Infektion, aber es entwickeln sich keine Tumore (Morgan et al., 2001b). Die Hochregulation von ICP4 und Runterregulation der LATs wird assoziiert mit der Reaktivierung der frühen und späten Gene in latent infizierten Zellen (Schat and Nair, 2008).

Das *basic leucin Zipper* (bZIP) Protein Meq ist das Hauptonkogen von MDV und wird nur von GaHV2 in der R<sub>L</sub> Region codiert. Es hat eine große Homologie zu den zellulären Proto-Onkogenen Jun und Fos und wird von allen MDV transformierten Zellen und Tumoren exprimiert (Jones et al., 1992; Qian et al., 1995). Meq-Deletionsversuche belegen seine Bedeutung in der Phase der Latenz sowie der Reaktivierung und zeigen, dass Meq die zytolytische Phase der Infektion nicht beeinflusst. Bei einer Infektion von empfänglichen Hühnern mit dem Meq-deletiertem Md5 Virus, kam es zu keinen MDV-spezifischen Veränderungen wie Tumore oder Todesfälle. Allerdings war eine massive Atrophie von Bursa

und Thymus zu erkennen. Daraus wurde geschlossen, dass es nicht aufgrund einer verminderten zytolytischen Infektion, sondern durch die fehlende onkogene Eigenschaft des Meq-Proteins zur gestörten Tumorbildung kommt (Lupiani et al., 2004). Für die Transformationsfähigkeit ist es essentiell, dass eine Homo- und Heterodimerisierung des Meq-Proteins mit c-Jun vorliegt (Suchodolski et al., 2009; Suchodolski et al., 2010), was wiederum zu einer Hochregulation von Genen des v-Jun Transformationspfades führt (Levy et al., 2005).

Mit der Identifizierung des vIL-8 wurde ein Homolog des Hühner Interleukin-8, ein CXC Chemokine, beschrieben, das in den IR<sub>L</sub> und TR<sub>L</sub> liegt und welche die U<sub>L</sub> Region flankieren. Jüngste Studien zeigen, dass es sich dabei genomisch und funktionell durch die Bindung an Chemokinrezeptor CXCR5, um ein CXCL13 Chemokin handelt (Kaiser et al., 2005; Sonja Härtle, 2012). Eine Deletion des vCXCL13 führte zu einer reduzierten Krankheitsentstehung und einer verminderten Tumorbildung. Es wird angenommen, dass vCXCL13 Lymphozyten, insbesondere B-Zellen und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen, anlockt und dadurch eine Rolle bei der Etablierung der Infektion durch die Weitergabe des Virus und der Latenz sowie der Tumorentstehung spielt (Engel et al., 2012; Parcells et al., 2001).

Des Weiteren gehören die MDV-Tumorantigene pp38/pp24 (Chen et al., 1992; Zhu et al., 1994), die 1.8 kb Genfamilie, die RNA Telomerase kodierenden Gene sowie die MDV kodierten MikroRNAs zu den MDV spezifischen Genen (Schat and Nair, 2008).

Die Manipulation und Charakterisierung der einzelnen Virusgene und –abschnitte war aufgrund des großen Genoms des Herpesvirus und seiner strikten Zellassoziation nur schwer möglich. Die *bacterial artificial chromosom* (BAC) Technologie brachte einen riesigen Fortschritt für die Erforschung von MDV. Dabei wird das komplette virale Genom in einen mini-F Vektor kloniert, der die Erhaltung des MDV Genoms in *E.coli* ermöglicht. (Schumacher et al., 2000). Mittlerweile gibt es BAC-Klone von avirulenten und virulenten Stämmen, darunter der vvMDV-Stamm RB-1B (Powell et al., 1983), sowie mutierte Viren dieser Stämme. Mit Hilfe der BAC und neuer Mutagenese Techniken ist eine gezielte Manipulation des MDV Genoms von 180kbp möglich und es kann eine schnelle und effiziente Produktion des Virus erreicht werden. Mit Hilfe der mutierten Virusstämme konnten die Funktionen der MDV Gene, wie zum Beispiel gB, UL47, vCXCL13 oder Meq, in den verschiedenen Phasen der Infektion näher charakterisiert werden (Dorange et al., 2002; Engel et al., 2012; Li et al., 2011; Schumacher et al., 2000).

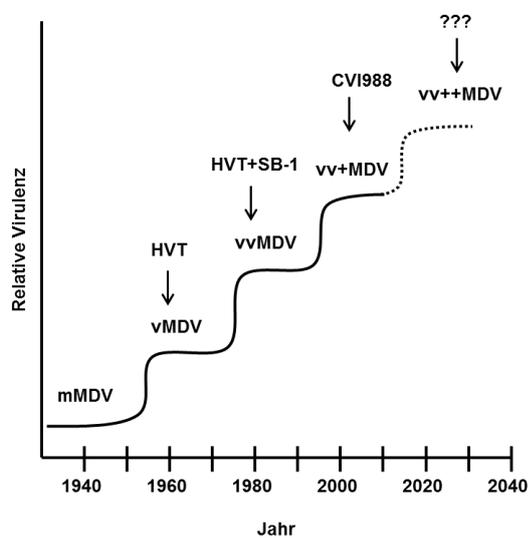
Des Weiteren konnten durch das BAC-System fluoreszierende Proteine mit viralen Proteinen

fusioniert werden (Reddy et al., 2002). Dies ermöglicht ein Nachverfolgen des Virus *in vivo*, sowie die Lokalisation der viralen Proteine in infizierten Zellen *in vitro* (Elliott and O'Hare, 1999; Jarosinski Kw et al., 2012). Allerdings führt die Fusion der fluoreszierenden Proteine mit den viralen Proteinen häufig zu einer attenuierten Replikation des rekombinanten Virus *in vivo* und *in vitro* (Jarosinski Kw et al., 2012). Jarosinski *et al.* gelang es, ein fluoreszenzmarkiertes MDV RB-1B zu generieren, bei dem das grün fluoreszierende Protein (GFP) an den C-Terminus des Tegumentproteins UL47 (VP13/14) fusioniert wurde. Dieses rekombinante Virus (RB-1B UL47GFP) replizierte *in vitro* vergleichbar mit dem Wildtyp, wobei das GFP-Expressionsniveau relativ schwach war. *In vivo* führte es zur Tumorbildung und auch eine Weitergabe des Virus an naive Tiere wurde nachgewiesen (Jarosinski Kw et al., 2012). Des Weiteren wurde ein rekombinantes Virus (RB-1B MeqGFP-UL47RFP) mit einem rot fluoreszierenden Protein (RFP) am C-Terminus des Proteins UL47 und einem grün fluoreszierende Protein am C-Terminus des Proteins Meq generiert. UL47, ein Protein, das in der zytolytischen Phase exprimiert wird, und Meq, ein Protein, das mit der Latenz und Transformation der Zellen assoziiert ist, dienen als Marker für die verschiedenen Phasen der Viruspathogenese. Das Virus zeigte *in vitro* eine mit dem parental Virus vergleichbare Replikation, verursachte jedoch bei der Infektion *in vivo* keine MD. Vermutlich kommt es durch die Fusion von GFP und Meq zu einer gestörten Transformation und Tumorgenese (Engel, 2012).

### 2.1.3 Impfung und Kontrolle des MD-Virus

Nach der Entdeckung der Marek'schen Krankheit 1907 wurde die MD sehr bald weltweit beschrieben. Das klinische Bild hat sich im Laufe der vergangenen hundert Jahren allerdings dramatisch verändert. Die frühere sporadisch auftretende Neuro-Lymphomatose wurde in den 1960iger Jahren durch perakute bis akute Krankheitsverläufe mit Tumoren in jungen Tieren und einer Mortalität von bis zu 60% ein ernsthaftes Problem für die wachsende Geflügelindustrie (Davison and Nair, 2004). Die Identifizierung des MDV als Ursache der Erkrankung, trieb die Entwicklung von Impfstoffen an. Seit 1969 kann die MD erfolgreich durch die Einführung einer Impfung kontrolliert werden. Dabei wurde erstmals ein attenuiertes HPRS-16 Isolate verimpft und der Impfschutz durch eine Infektion mit virulentem Virus bestätigt (Churchill et al., 1969). Gegen die vMDV-Stämme der 1960er Jahre konnten die Hühnerbestände durch die Vakzinierung mit attenuierten HPRS-16 Isolaten geschützt werden, die jedoch zwei Jahre nach Einführung durch die HVT Impfung ersetzt wurden (Davison and Nair, 2005). In den späten 1970er Jahre kam es zu den ersten

Impfdurchbrüchen durch vvMDV-Stämme, die durch die Einführung der bivalenten Impfung mit SB-1 und HVT (USA) oder der Impfung mit dem avirulenten MDV Serotyp-2 Stamm CVI988 (Europa, Süd-Amerika, Australien, Asien) unter Kontrolle gebracht wurden (Rispen et al., 1972). Mitte der 1990iger Jahre traten trotz Impfung erneut MD-Symptome auf und Witter *et al.* (Witter, 1997) klassifizierten die noch virulenteren Stämme als vv+MDV. Die Einführung von CVI988 in den USA konnte dort die Probleme der vv+MDV-Stämme kontrollieren. In den Ländern, in denen bereits CVI988 verimpft wurde, konnte die MD-Inzidenz nur durch besseres Hygiene-, Haltungs- und Impfmanagement verringert werden (Gimeno, 2008). Witter *et al.* vermuten dass die gesteigerte Virulenz in Verbindung mit der Einführung des HVT- bzw. der bivalenten Impfung steht (Witter, 1998).



**Abbildung 1: Die stufenweise Virulenzsteigerung des MDV**

Die Entwicklung des GaHV2 und das Auftreten von immer virulenteren Pathotypen werden mit der Einführung der verschiedenen Impfstoffe in Verbindung gebracht (modifiziert nach (Witter, 1998)).

Heute steht mit dem HVT-Impfstoff (Kawamura et al., 1969; Witter et al., 1970) der einzige zellfreie, lyophilisierte MDV-Impfstoff zur Verfügung. Der Impfschutz ist allerdings nur für Broilerherden oder als bivalente Impfung mit SB-1 ausreichend (Schat and Calnek, 1978). SB-1 ist ein apathogener MDV-Stamm, der als Impfstoff zugelassen wurde und in Kombination mit HVT eine belastbare Immunität herstellt (Witter and Lee, 1984; Witter et al., 1984). Der heutige Goldstandard ist die Impfung mit dem attenuierten CVI988-Stamm (Bülow, 1977), was zu einem Impfschutz vor hochvirulenten Stämmen führt. Allerdings vermittelte keine der eingesetzten Impfungen einen Schutz gegen eine Superinfektion mit pathogenem MDV.

Sollte sich die Pathogenitätssteigerung der MD-Viren weiter fortsetzen, müssen dringend potentere Impfstoffe entwickelt werden. Ein erfolgsversprechender Ansatz bei der

Entwicklung von zukünftigen Impfstoffen ist die Generierung von rekombinanten Impfstoffen. Ein Ansatz dafür ist das Ausschalten des Onkogens Meq beim vvMDV-Stamm Md5. Das Meq-deletierte Virus repliziert *in vivo* in den lymphoiden Organen und im Federfollikel-epithel (FFE), allerdings ist es für das Tier apathogen. Für einen Vakzine-Versuch wurden Hühner mit dem Meq-deletierten Md5 Virus geimpft und mit Wildtyp-Md5 oder dem vv+Stamm 648A belastet. Es kam in beiden Versuchen zu einer verringerten Virämie und einem Schutz vor Tumorbildung und Todesfällen (Lee et al., 2008).

Bis heute sind die Impfdurchbrüche durch vv+MDV-Isolate weitgehend durch die Impfung mit CVI988 unter Kontrolle (Davison and Nair, 2004). Diese erfolgt zumeist an Embryonaltag 18 als *in ovo*-Impfung oder am ersten Tag nach dem Schlupf als intramuskuläre oder subkutane Applikation. Die Vorteile der *in ovo*-Impfung sind die reduzierte Kosten und eine zuverlässigere Impfstoffapplikation (Witter, 1998). Auch die Impfmunität nach der *in ovo*-Vakzinierung ist im Vergleich zu der späteren Impfung nach dem Schlupf verbessert (Zhang and Sharma, 2001). Für die *in ovo*-Impfung eignen sich besonders HVT- Stämme, da diese am besten *in ovo* replizieren (St Hill and Sharma, 2000). Sollte es in Hühnerbeständen Probleme mit vv+MDV-Stämmen geben, kann die Impfmunität durch eine *in ovo*-Impfung, gefolgt von einer Revakzinierung der Tiere nach dem Schlupf, noch weiter verbessert werden (Gimeno et al., 2012). Lege- und Zuchtbestände werden zu 100% geimpft und dies fast immer mit einer Kombination aus HVT und CVI988. Bei den Broilerherden werden nur 1/3 der Bestände geimpft und die Impfung erfolgt zumeist mit HVT alleine (Dunn and Gimeno, 2013).

Heutzutage liegen die Gründe für einen MD-Ausbruch zum einen in der Virulenzsteigerung des Virus. Zum anderen kann die komplikationsanfällige Impfung bei fehlerhafter Handhabung zu einer nicht belastbaren Impfmunität führen. Alle Impfstoffe, bis auf HVT, enthalten zell-assoziiertes Virus und sind dadurch sehr instabil. Es bedarf einer Lagerung bei -196°C und der Impfstoff muss zeitnah vor dem Verimpfen aufgetaut werden. Besonders in Entwicklungsländern kommt es zu Problemen in der Bereitstellung und im Umgang mit dem zell-assoziierten Virus. Ein erhöhter MD-Infektionsdruck kann auch die Folge von unzureichend gereinigten Ställen oder das Halten verschiedener Altersstufen auf einer Farm sein. Sekundärinfektionen, wie die infektiöse Bursitis der Hühner (IBDV), die aviäre Leukose (ALV), das aviäre Reovirus (REO) und das Hühner-Anämie-Virus (CAV) führen zu einer Immunsuppression des Huhnes und können den Verlauf der MD verschlimmern. Auch Faktoren wie haltungsbedingter Stress supprimieren das Immunsystem und begünstigen so die MDV-Infektion (Davison and Nair, 2004).

### 2.1.4 MDV heute

Die ökonomische Bedeutung der MDV Infektion ist bis heute enorm groß. Der durch die MDV-Infektion bedingte Verlust, verursacht durch Todesfälle und Immunsuppression der Tiere, wird weltweit auf jährlich 1-2 Milliarden US Dollar geschätzt (Morrow and Fehler, 2004). Durch eine Umfrage aus dem Jahr 2011, an der 116 Länder teilnahmen, konnte der aktuelle Stand der MD weltweit erfasst werden. Dabei wurde von gelegentlichen bis häufigen MD-Diagnosen in den französisch-sprechenden Teilen Afrikas, Osteuropa, Ost-Asien und Australien berichtet. Auch Deutschland meldet einen Anstieg des MD-Vorkommens um 26-50%. Bis 2012 verringerte sich die MD-Inzidenz in 22% der Staaten weltweit, unter anderem in den USA. Der Rückgang ist vermutlich durch die Einführung der Impfung mit CVI988 und ein verbessertes Hygienemanagement bedingt. Konnte durch die Impfung mit CVI988 kein ausreichender Impfschutz erreicht werden, wurde in 10% der Länder die Impfdosis verdoppelt oder es fand eine Revakzinierung der *in ovo* geimpften Hühner nach dem Schlupf statt (Dunn and Gimeno, 2013). Auf diesem Weg gelang es bisher die MD zu kontrollieren.

### 2.1.5 Diagnose

Im Feld basiert die Diagnose hauptsächlich auf dem Nachweis der klinischen Erscheinungen, wie verdickte periphere Nerven, viszerale lymphoide Tumore, Iris- oder Pupillenveränderungen und die Atrophie von Bursa und Thymus. Ergänzend werden pathologische/histopathologische Untersuchungen der betroffenen Organe durchgeführt.

Ansonsten kann der Nachweis über Virione, DNA, MDV-Antigen oder von MDV-spezifischen Antikörpern erfolgen. Als Proben eignen sich heparinisiertes Blut, isolierte Lymphozyten, Organgewebe, Federfollikel, Haut und Federstaub.

Die Isolierung des MD-Virus erfolgt dabei meist aus Zellkultursystemen mit CKC, Hühnerembryo-Fibroblasten (HEF) oder Entenembryo-Fibroblasten (*duck embryo fibroblasts*, DEF). Ohne das Virus zu isolieren, lässt es sich mittels viraler Marker im Gewebe bestimmen. Hierbei kann man virales Antigen durch fluoreszierende Antikörper (Spencer and Calnek, 1970), durch einen indirekten *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) (Scholten et al., 1990) oder mittels des Agargelpräzipitationstest nachweisen (Haider et al., 1970).

Der Nachweis mittels Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) oder der quantitativen Echtzeit-PCR (qPCR) ermöglicht sogar eine Unterscheidung zwischen

Impf- und Feldisolaten (Handberg et al., 2001). Als Probenmaterial eignen sich Blut und Federfollikel, wobei im Federfollikel eine höhere Viruslast nachweisbar ist und es bei den Serotypen 2 und 3 zu weniger falsch negativ detektierten Proben führt (Cortes et al., 2011). Die Detektion des MDV-Antigens Meq eignet sich als Marker in der Diagnose um nachzuweisen, dass es sich um MDV induzierte Tumore und nicht um aviäre Leukose oder Retikuloendotheliose induzierte Tumore MDV vakzinierter Tiere handelt (Gimeno et al., 2005).

Die schnelle und einfache Nachweismethode mittels *der loop-mediated isothermal amplification* (LAMP), lässt eine Unterscheidung zwischen den Serotypen 1, 2 und 3 zu (Wozniakowski et al., 2013).

### **2.1.6 Klinische Erscheinungen**

Das klinische Erscheinungsbild der MDV Infektion ist vielfältig und vom Serotyp, Pathotyp, dem Immunstatus und dem genetischen Hintergrund der Hühner abhängig. In Broilerbeständen ist die Mortalität auf Grund der kurzen Mastdauer deutlich geringer als in Legetierherden, bei denen eine Mortalität von bis zu 60% vorkommen kann. Die klinischen und pathologischen Syndrome können in lymphoproliferative und lymphodegenerative Syndrome unterschieden werden.

Symptom	Klinik	Organ	Prävalenz	
			Legehennen	Broiler
<b>Lymphome und nervale Läsionen</b>	Depression, Paralyse, Tod	Viszerale Organe und periphere Nerven	häufig	häufig
<b>Geflügellähme (Nervale Läsionen)</b>	Asymmetrische Paralyse, Tod	Periphere Nerven	gelegentlich	selten-nie
<b>Hautleukose</b>	Geschwollene Federfollikel	Haut	selten-nie	häufig
<b>Okuläre Läsionen</b>	Iridozyklitis, Blindheit	Iris, Cornea, Vergrößerung des N.opticus	selten	selten-nie
<b>Transiente Paralyse</b>	Transiente Paralyse, Torticollis, Tod	Gehirn (Ödeme)	selten	gelegentlich (ungeimpfte Tiere)
<b>Frühes Sterblichkeitssyndrom</b>	Depression, Kümmeren, erhöhte Infektanfälligkeit, Tod	Bursa, Thymus, Milz (Atrophie)	selten	selten

**Tabelle 2: Klinische Erscheinungen der MD**

Die klinischen Erscheinungen können in ein lymphoproliferatives und ein lymphodegeneratives Syndrom unterteilt werden (zusammengefasst von (Schat and Nair, 2008)).

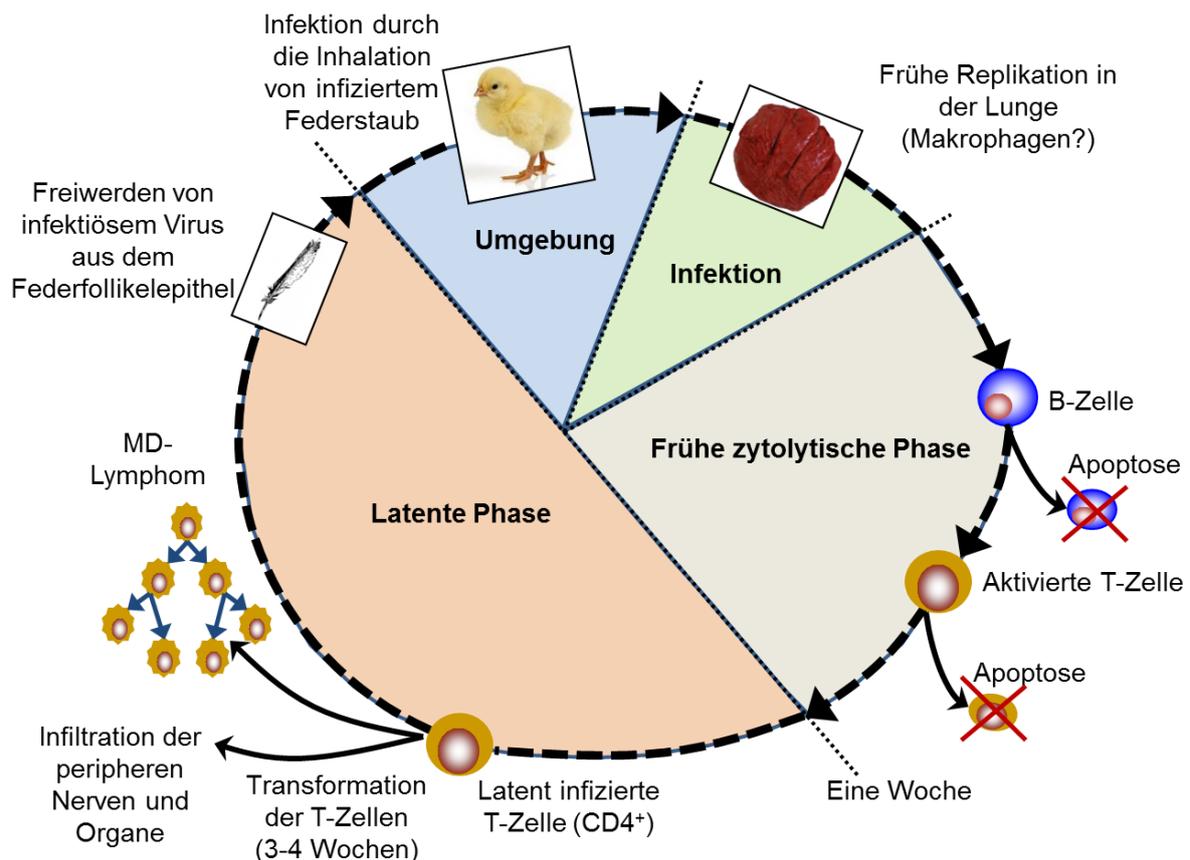
Das lymphoproliferative Syndrom umfasst die Lymphome der viszeralen Organe, die nervalen Läsionen und die dadurch bedingte Paralyse, die Hautleukose sowie Augenveränderungen. Die lymphodegenerativen Syndrome sind das frühe Sterblichkeitssyndrom, gekennzeichnet durch die Atrophie der lymphatischen Organe, die durch Hirnödeme verursachte transiente Paralyse und Arteriosklerose (zusammengefasst von (Gimeno et al., 1999; Schat and Nair, 2008)).

### 2.1.7 Pathogenese

Das Cornell-Modell ist eine von Calnek und seinen Kollegen aufgestellte und allgemein angenommene Hypothese der MDV-Infektion *in vivo*. Der Ablauf der Infektion wird dabei in

vier Phasen unterteilt. Die erste Phase ist die frühe zytolytische Phase, gefolgt von der latenten Phase. Danach kommt eine späte zytolytische und immunsuppressive Phase und letztlich die proliferative Phase, in der es zur Ausbildung von Tumoren kommt (Calnek, 1986).

Die zytolytische Infektion beinhaltet ein aktives Eindringen in den Organismus und die Weitergabe und Replikation des Virus in den Zielzellen. Allerdings kommt es in der frühen zytolytischen Phase nur zu einer semi-produktiven Infektion (abortiv), da das Virus nur zell-assoziiert übertragen werden kann und kein freies Virus produziert wird. Nur das Federfollikel­epithel ist zur Bildung und Abgabe von zellfreiem Virus fähig und damit der einzige Ort, an dem eine vollständig-produktive Infektion stattfindet. Während der persistierenden latenten Infektion ist das virale Genom in den infizierten Zellen nachweisbar, es findet allerdings nur eine geringe virale Genexpression und keine Replikation statt (Calnek, 1986).



**Abbildung 2: Cornell-Modell der MDV Pathogenese**

Pathogenese der natürlichen MDV Infektion *in vivo* (modifiziert nach (Schat and Nair, 2008))

Die Infektion des Tieres erfolgt durch Einatmen von abgeschilferten Federfollikel­epithel und freiem Virus im Federstaub von infizierten Tieren (Carrozza et al., 1973; Kenzy and Cho,

1969). Nach der Infektion durch die Inhalation des MD-Virus kann eine Infiltration der Lunge mit Makrophagen beobachtet werden und der Nachweis einer MDV-Replikation ist bereits an Tag 1 *post infectionem* (p.i.) möglich (Abdul-Careem et al., 2009). Baaten *et al.* konnten MDV in pulmonalen B-Zellen nachweisen und stellten fest, dass die infizierten Zellen in der Lunge von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen umgeben waren. Zudem kam es zu einem Anstieg der CD8<sup>+</sup> Zellen im Lungengewebe (Baaten et al., 2009).

### **Frühe zytolytische Phase**

MDV gelangt, vermutlich aufgenommen von Makrophagen oder B-Zellen in der Lunge (Barrow et al., 2003), über das Blut in die sekundären lymphatischen Organe. Bereits 18 Stunden p.i. ist das Virus in Blutleukozyten nachweisbar (Addinger and Calnek, 1973). Nach ein bis zwei Tagen p.i. ist das Virus in Milz, Bursa und Thymus zu finden und die produktiv-restriktive Infektion kann etwa drei Tage p.i. durch den Nachweis viralen Antigens in den Organen festgestellt werden (Calnek, 1986). Die zytolytische Infektion erreicht nach fünf bis sieben Tagen p.i. ihren Höhepunkt (Payne and Rennie, 1973). Charakteristisch für diese Phase ist eine inflammatorische Immunantwort, gekennzeichnet durch das Einwandern von Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen in die lymphoiden Organe. Es folgt eine Rückbildung von Bursa und Thymus, bedingt durch die Zytolyse der Lymphozyten (Payne and Rennie, 1973). Sowohl in der Milz, als auch im Thymus, ist die B-Zelle die vorrangige Zielzelle (Shek et al., 1983), aber es wird auch eine kleine Population an aktivierten T-Zellen infiziert (Calnek et al., 1984b). Mittels einer durchflusszytometrischen Untersuchung der pp38<sup>+</sup> Milzlymphozyten, konnten die infizierten Zellen weiter phänotypisiert werden. Dabei zeigt sich, dass es sich bei den infizierten Milzlymphozyten während der zytolytischen Infektion zu 95% um B-Zellen und zu 4% um CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> αβTCR<sup>+</sup> T-Zellen handelt (Baigent et al., 1996, 1998).

Calnek *et al.* konnten zeigen, dass die Atrophie von Bursa und Thymus abhängig von der Virulenz der Virusstämme ist. Bei einer Infektion mit vv+MDV kam es nur zu einer geringen Erholung der Organe, während nach der Infektion mit vMDV eine signifikante Erholung bis zum Normalzustand nach 14 Tagen erkennbar war (Calnek et al., 1998).

### **Latente Infektion**

Die latente Infektion tritt sechs bis sieben Tage nach der Infektion ein und ist durch ein Abklingen der Zytolyse und das Fehlen von Tumorantigenen gekennzeichnet. Die Zelle trägt also virale DNA in sich, es kommt aber zu keiner Transkription. Bei den latent infizierten Zellen handelt es sich hauptsächlich um CD4<sup>+</sup> T-Zellen, aber auch einige wenige B-Zellen

und CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind latent infiziert (Calnek et al., 1984b; Lee et al., 1999). Es kommt zur Apoptose von CD4<sup>+</sup> Blut-T-Zellen und der Runterregulation des CD8-Moleküls auf zytotoxischen T-Zellen (*cytotoxic T-lymphocytes*, CTL), wodurch vermutlich die T-Zell-Immunsuppression bedingt wird (Morimura et al., 1995). Es wird angenommen, dass die latent infizierte Zelle die Zelle ist, die später transformiert (Baigent and Davison, 2004). In resistenten Tieren persistiert die latente Infektion in Milz und Blut, während es in empfänglichen, immunsupprimierten oder vvMDV infizierten Tieren zum Aufleben der zytolytischen Infektion kommt. Insgesamt gestaltet sich die Untersuchung der Latenz relativ schwierig, da es bis heute kein adäquates Zellkulturmodell gibt.

### **Späte zytolytische Infektion**

Die späte zytolytische Infektion tritt 14 bis 21 Tage p.i. ein und betrifft insbesondere Bursa, Thymus und epitheliale Gewebe, wie das FFE und die Niere. Es kommt zur Nekrose der Lymphozyten und inflammatorischen Veränderungen durch die Infiltration von mononukleären Zellen. Häufig ist eine permanente Immunsuppression durch die Atrophie von Bursa und Thymus die Folge (Calnek, 1986).

Auch im Federfollikel epithel findet eine zytolytische Infektion statt. Nach vier bis vierzehn Tagen repliziert das Virus im FFE und die Viruslast steigt vier bis zehn Tage p.i. deutlich an (Abdul-Careem et al., 2008). Das FFE zeigt initial eine entzündliche Lymphozyteninfiltration und später proliferative Veränderungen (Moriguchi et al., 1982; Moriguchi et al., 1987). Es konnte gezeigt werden, dass zehn Tage p.i. vermehrt CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen einwandern (Abdul-Careem et al., 2008). Letztlich kommt es im FFE zu einer vollständig-produktiven Infektion und zum Freiwerden von behüllten, infektiösen Viruspartikeln (Calnek et al., 1970a).

### **Transformation**

Kennzeichnend für die MDV Infektion ist die Transformation der latent infizierten Lymphozyten und die Bildung von lymphoblastoiden Tumoren. Drei bis vier Wochen p.i. wandern die latent infizierten Zellen in die viszerale Organe und peripheren Nerven ein, wo sie durch noch nicht bekannte Einflüsse transformieren (Baigent and Davison, 2004). Die Zusammensetzung der Tumore in den verschiedenen Organen und Nerven ist sehr ähnlich und die lymphoide Zellpopulation besteht zum Großteil aus T-Zellen, aber auch zu einem geringen Teil aus B- Zellen (Payne and Rennie, 1976). Später konnte gezeigt werden, dass es sich bei den transformierten Zellen zumeist um CD4<sup>+</sup> T-Zellen handelt, die die T-Zellrezeptoren (*T-cell receptor*, TCR)  $\alpha\text{V}\beta\text{1}$  oder  $\alpha\text{V}\beta\text{2}$  und

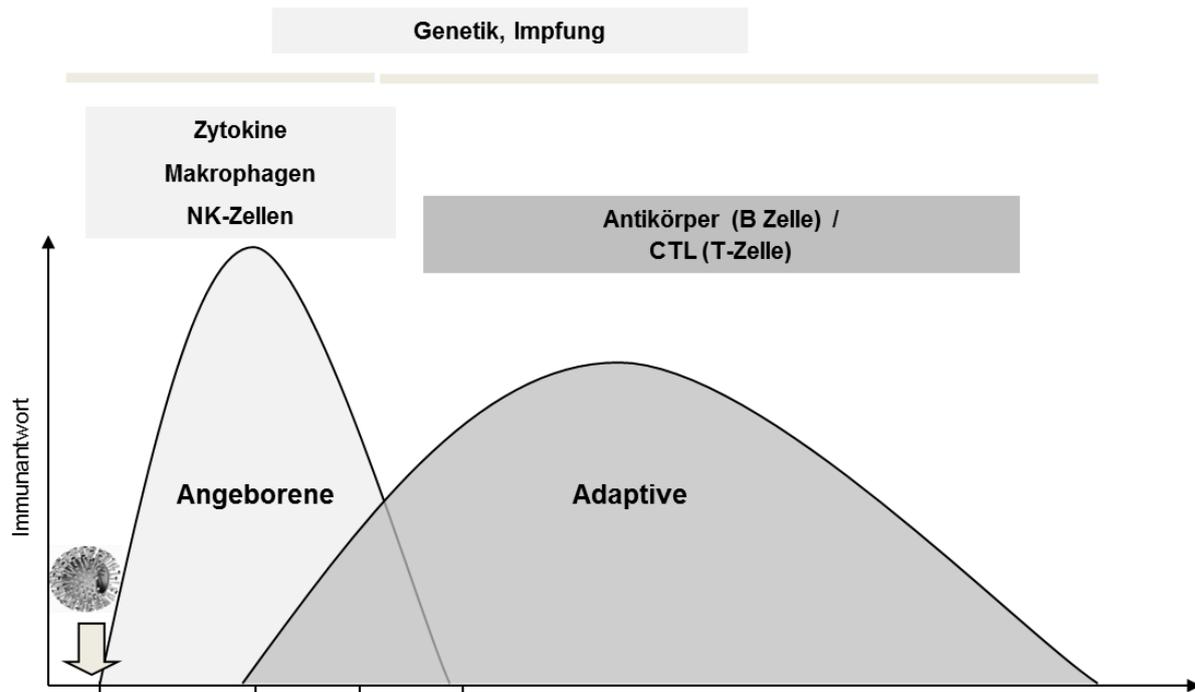
Haupthistokompatibilitätskomplex (*Major Histocompatibility Complex*, MHC)-Klasse-II-Moleküle auf der Oberfläche exprimieren. Aber auch CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> Tumore sind zu finden (Schat et al., 1991). Die weitere Phänotypisierung der Tumore durch Burgess *et al.* ergab, dass sie sich zumeist aus CD4<sup>+</sup> MHC-Klasse-I<sup>hoch</sup>, MHC-Klasse-II<sup>hoch</sup>, Interleukin-2-Rezeptor  $\alpha$ -Kette<sup>+</sup> (CD25<sup>+</sup>), CD28<sup>niedrig/-</sup>,  $\alpha\beta$ -TCR<sup>+</sup>, CD30<sup>hoch</sup> exprimierenden Zellen zusammensetzen (Burgess and Davison, 2002). Das non-Hodgkin Antigen CD30 ist ein Mitglied der Tumor-Nekrose-Rezeptor-Superfamilie und wird durch den Antikörper AV37 detektiert. Das von Witter *et al.* als *Marek's Disease tumor-associated surface antigen* (MATSA) deklarierte Antigen (Witter et al., 1975) wird nicht nur von MDV transformierten Zellen exprimiert, sondern auch von aktivierten T-Zellen nach Mitogenstimulation (McColl et al., 1987). Transformierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen exprimieren Meq und SAR, eine kleine RNA antisense zu ICP4. Eine geringe Zahl an Tumoren exprimiert pp38 und gB und es wird vermutet, dass dies in der frühen Phase der Reaktivierung von latent infizierten Zellen passiert (Ross et al., 1997).

Die frühere Annahme, dass MDV Tumore monoklonal sind (Delecluse and Hammerschmidt, 1993; Payne and Rennie, 1976), wurde durch die Untersuchung der TCR- $\nu\beta$  Genexpression in Frage gestellt. Die Vielfältigkeit der Genexpression legt mehrere neoplastische Transformationen und daher einen oligoklonalen Ursprung nahe (Burgess and Davison, 2002). Dies konnte sowohl für CD4<sup>+</sup> als auch für die, den Tumor infiltrierenden, CD8<sup>+</sup> Zellen durch die Analyse des TCR $\beta$ -Repertoire nachgewiesen werden (Mwangi et al., 2011).

Der Verlauf der MDV-Infektion ist abhängig von verschiedenen Faktoren. Der Serotyp und die Virulenz des Virus beeinflussen insbesondere das Ausmaß der Immunsuppression und Tumorentwicklung (Witter, 1983). Der Genotyp des Wirtes, das Vorhandensein von maternalen Antikörpern, der Impfstatus, das Alter zum Zeitpunkt der Infektion und der Status der Immunabwehr sind für den Verlauf der Infektion entscheidend (Davison and Nair, 2004).

### **2.1.8 Immunantwort auf eine MDV Infektion**

Die Immunantwort auf Infektionen wird aus didaktischen Gründen in eine unspezifische (angeborene) und eine spezifische (adaptive) Immunantwort unterteilt. Die Reaktionen der unspezifischen Immunantwort sind kurz nach der Infektion nachweisbar, während das adaptive Immunsystem vermittelt durch Antikörper und CTL erst fünf bis sieben Tage nach der Infektion greift.



**Abbildung 3: Immunantwort auf eine MDV-Infektion**

Neben dem nach der Infektion schnell aktivierten angeborenen Immunsystem ist nach fünf bis sieben Tagen auch das adaptive Immunsystem an der Bekämpfung der Infektion beteiligt.

Die Immunantwort ist besonders für den Verlauf der frühen und späten zytolytischen Infektion von Bedeutung. Die Stärkung des adaptiven Immunsystems durch die Impfung hat vor allem einen Einfluss auf die zytolytische Infektion, indem sie die massive Infektion und Apoptose von Lymphozyten vermindert und dadurch zu einer geringeren Zahl an latent infizierten Zellen führt. Es wurde schon früh deutlich, dass neben der Impfung vielfältige genetische Faktoren einen Einfluss auf den Verlauf der MD haben (Biely et al., 1933; Cole, 1968). Besonders der Hühner MHC oder B-Komplex beeinflusst die Resistenz gegen MDV. Die MHC Haplotypen B<sup>1</sup>, B<sup>4</sup>, B<sup>5</sup>, B<sup>12</sup>, B<sup>13</sup>, B<sup>15</sup> und B<sup>19</sup> (z.B. die Inzuchthühner der P-Line) sind besonders empfänglich. Dagegen weisen B<sup>2</sup>, B<sup>6</sup> und B<sup>14</sup> Tiere eine moderate Resistenz auf und B<sup>21</sup>-Tiere (z.B. die Inzuchthühner der N-Line) sind gegen MD resistent (Bumstead and Kaufman, 2004). Die genauen Mechanismen sind noch unklar, aber eine Vermutung ist, dass das Expressionsniveau der MHC-Moleküle auf der Zelloberfläche eine Rolle spielt (Kaufman and Salomonsen, 1997; Kaufman et al., 1995). Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass nur bei B<sup>21</sup> und nicht bei B<sup>19</sup> Hühnern CTL gegen das unmittelbar frühe Protein ICP4 vorhanden sind (Omar and Schat, 1996, 1997). Es wird auch ein Zusammenhang zwischen der Aktivität natürlicher Killerzellen (*natural killer cell*, NK-Zelle) und den MHC-limitierten CTL-Reaktion vermutet, die besonders in den ersten zwei Wochen nach der Infektion bei resistenten und empfänglichen Hühnern entscheidend ist (Garcia-Camacho et

al., 2003).

Des Weiteren gibt es drei Nicht-MHC-Loci, *TH1*, *LY4* und *BUI*, die mit der MDV-Resistenz und Empfänglichkeit in Verbindung stehen (Bacon et al., 2001). Zusätzlich spielen 21 chromosomale Regionen (*quantitative trait loci regions*, QTLR) bei der Ausbildung der MDV-Resistenz eine Rolle (Heifetz et al., 2009; Heifetz et al., 2007).

### **Unspezifische Immunantwort**

Nach der MDV Infektion über die Lunge, kommt es in der frühen Phase zur Aktivierung der unspezifischen Immunantwort. Neben der Phagozytose und Lyse spielen auch die Antigenerkennung durch *pattern-recognition-receptors* (PRRs) und die Modulation der Immunabwehr eine Rolle. Hierbei kommt auf zellulärer Ebene den Makrophagen und NK-Zellen eine besondere Bedeutung zu.

Lange ist man davon ausgegangen, dass Viruspartikel oder MD-Tumorzellen von Makrophagen *in vivo* und *in vitro* aufgenommen werden können, jedoch das Virus in den Zellen nicht repliziert (Haffer et al., 1979). In einer neuen Studie konnte jedoch nachgewiesen werden, dass Milzmakrophagen lytische Antigene wie pp38, gB und ICP4 exprimieren. Durch einen elektronenmikroskopischen Nachweis wurde gezeigt, dass die Expression der MDV Antigene nicht durch die Phagozytose infizierter Zellen bedingt ist (Barrow et al., 2003). Ob Makrophagen abortiv oder produktiv infiziert sind, konnte auf Grund eines fehlenden *in vitro* Zellkultursystem bisher nicht geklärt werden.

Makrophagen haben einen inhibitorischen Effekt auf die Plaquebildung von infizierten Embryo-CKC. Dieser ist besonders stark, wenn die Makrophagen von MDV infizierten oder geimpften Tieren gewonnen wurden (Kodama et al., 1979). Der Mechanismus hinter dem inhibitorischen Effekt der Makrophagen konnte bisher noch nicht geklärt werden. Er beruht aber vermutlich auf der Phagozytose infizierter Zellen und der Freisetzung von toxischen Effektormolekülen, wie dem Stickstoffmonoxid (NO $\cdot$ ). *In vitro* wurden bei infizierten HEF-Kulturen sechs bis fünfzehn Tage p.i. erhöhte *inducible nitric oxid synthase* (iNOS) mRNA-Niveaus festgestellt (Xing and Schat, 2000a). Es konnte zudem gezeigt werden, dass die MDV Replikation in HEF-Kulturen durch die Zugabe einer NO $\cdot$  freisetzenden Substanz oder LPS und rekombinantem Interferon (IFN)- $\gamma$  verringert werden kann. Dabei zeigten HEF der resistenten N-Linie eine frühere und stärkere Produktion von NO $\cdot$  als die empfängliche P-Linie (Xing and Schat, 2000b). Auch *in vivo* konnte bestätigt werden, dass sich die Produktion von NO $\cdot$  bei resistenten und empfänglichen Hühnern unterscheidet. Bei resistenten Hühnern waren die NO $\cdot$ -Niveaus höher, sie wurden früher induziert und es wurde eine höhere

Makrophagenanzahl in der Milz beobachtet. Zudem unterscheidet sich die NO-Produktion abhängig von der Virulenz des Virusstamms und korreliert vermutlich mit der viralen Replikation (Djeraba et al., 2002; Jarosinski et al., 2002). Makrophagen von resistenten Hühnerlinien weisen außerdem eine höhere Phagozytoseaktivität auf als die der empfänglichen Hühner (Powell et al., 1983).

Neben den Makrophagen sind die NK-Zellen insbesondere wichtig bei der Bekämpfung von Tumorzellen und virusinfizierten Zellen. NK-Zellen repräsentieren eine dritte lymphoide Zelllinie, sie werden heute den sogenannten *innate lymphoid cells* zugeordnet, und sind als große Lymphozyten mit Granula und ähnlichen Eigenschaften wie zytotoxische T-Zellen charakterisiert. Sie sind in der Lage, durch die Freisetzung von Granzymen und Perforinen Tumor- und virusinfizierte Zellen zu lysieren (Gobel et al., 1996). In einem Testsystem, in dem die Lyse der Tumorzelllinie LSCC-RP9 durch Milzzellen, die keine B- oder T-Zellen waren, quantifiziert wurden, fanden Sharma und Okazaki heraus, dass bei Zugabe von MDV die NK-ähnliche Zytotoxizität zunahm (Sharma and Okazaki, 1981). *In vivo* konnte zudem gezeigt werden, dass MDV infizierte Hühner besonders in den ersten drei Wochen p.i. eine höhere NK-Zellzahl als nicht infizierte Hühner aufweisen (Sharma, 1981). Auch die Impfung von Küken mit HVT/SB-1 führt zu einer erhöhten NK-Zell Aktivität mit einem Höhepunkt nach sieben Tage p.i. (Heller and Schat, 1987). Auf mRNA Ebene konnte gezeigt werden, dass Granzym A in der Milz der empfänglichen P-Linie und der resistenten N-Linie exprimiert wird, wobei es nach einer MDV Infektion bei beiden Hühnerlinien hochreguliert (Sarson et al., 2008b).

Die Zytokinantwort bei einer MDV Infektion ist bis heute noch wenig untersucht. Nach der MDV-Infektion kommt es zu einer Hochregulierung einer Reihe von proinflammatorischen Zytokinen, die zu einer T-Helferzell-1 Immunantwort führen. Neben der Produktion von chIFN- $\gamma$  wird auch chIL-1 $\beta$ , chIL-8 (Jarosinski et al., 2005; Xing and Schat, 2000a) und von empfänglichen Tieren zudem chIL-6 und chIL-18 produziert (Kaiser et al., 2003). Die Hühner Typ I Interferone chIFN- $\alpha$  und - $\beta$  werden von vielen Zellen produziert, während chIFN- $\gamma$  hauptsächlich von NK Zellen und Th1-Zellen produziert wird. chIFN- $\gamma$  ist ein Hühner Typ II IFN und führt zu einer erhöhten Induktion der iNOS und der chMHC-Klasse-I und II-Moleküle. Zudem kann es Makrophagen aktivieren (Weining et al., 1996; Yeh et al., 1999). *In vivo* kam es nach MDV-Infektion zu einem Anstieg der chIFN- $\gamma$ -Expression von Tag 3 bis Tag 15 p.i. (Xing and Schat, 2000a). IFN- $\gamma$  stimulierte HEF zeigten eine verminderte virale Replikation und produzierten vermehrt NO (Djeraba et al., 2000; Harlin, 2003; Xing and Schat, 2000b). Rekombinantes IFN- $\alpha$  konnte *in vitro* und *in vivo* die Replikation von MDV

vermindern (Harlin, 2003; Jarosinski et al., 2001).

### **Spezifische Immunantwort**

Eine essentielle Rolle bei der Bekämpfung von Herpesvirusinfektionen spielt die Glykoprotein-abhängige Immunantwort von B- und T-Zellen (Haq et al., 2013; Mester and Rouse, 1991). Die Bedeutung der humoralen Immunantwort ist vermutlich relativ gering, da es sich beim MDV-Virus um ein zell-assoziiertes Virus handelt. Durch die Bindung von nicht-neutralisierenden Antikörpern werden infizierte Zellen gekennzeichnet, um dann durch Antikörper vermittelte zelluläre Toxizität (*antibody dependent cellular cytotoxicity*, ADCC) eliminiert zu werden und somit die Zell-Zellinfektion zu verhindern (Schat and Markowski-Grimsrud, 2001). Virus-neutralisierende (VN) und präzipitierende Antikörper konnten in MDV infizierten Tieren nach sechs bis vierzehn Tagen p.i. nachgewiesen werden. Der Peak an IgM-Antikörpern nach sieben bis neun Tagen nach der Infektion wird durch einen ansteigenden Spiegel an IgG-Antikörpern ab dem zehnten Tag p.i abgelöst (Higgins and Calnek, 1975). Higgins *et al.* konnten die Neutralisation von zellfreiem und intrazellulärem Virus *in vivo* durch die passive Immunisierung mittels MDV-spezifischer Antikörper an Küken ohne maternalen Antikörperschutz nachweisen. Durch die vorhandenen VN-Antikörper kommt es zu einer verringerten Mortalität, verspäteten Latenz, geringeren proliferativen und degenerativen Veränderungen und einer reduzierten Anzahl an virusinfizierten Zellen (Burgoyne and Witter, 1973). Ebenso weisen Küken ohne den Schutz maternaler Antikörper eine vermehrte Tumorbildung (Chubb and Churchill, 1969), sowie eine erhöhte Sterblichkeit durch die massive Depletion der Lymphozyten in Bursa und Thymus auf (Jakowski et al., 1970). Es konnten eine Vielzahl an Antikörpern gegen MDV Proteine wie beispielsweise die Glykoproteine gB, gE, gI oder gC nachgewiesen werden, von denen besonders die gB-bindenden, neutralisierenden Antikörper verhindern, dass das Virus in die Zelle eindringen kann (Parvizi et al., 2010). Genetisch resistente Tiere entwickeln Antikörper gegen das von Lymphomen exprimierte CD30-Molekül, was vermutlich die Regression der Tumore beeinflusst (Burgess et al., 2004).

Bei der zell-vermittelten Immunität spielen besonders die zytotoxischen T-Zellen eine bedeutende Rolle. Erste Hinweise auf die Bedeutung des Schutzes durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen gaben Infektionsversuche mit Hühnern, deren CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen depletiert wurden (Morimura et al., 1998). CD8<sup>+</sup> Zellen erkennen durch MHC-Klasse-I-Moleküle präsentierte Peptidfragmente, wobei die Effektor- und Zielzellen das gleiche Antigen präsentieren müssen (Schat and Nair, 2008). Ross *et al.* fanden schon früh heraus, dass *in vitro* die Anzahl an MDV infizierten CKC durch die Zugabe von T-Zellen, die von geimpften oder infizierten

Tieren gewonnen wurden, verringert werden konnte (Ross, 1977).

Durch das Fehlen von *in vitro* Assays konnte die zell-vermittelte Immunantwort nicht hinreichend untersucht werden. Erst mit dem System der REV-transformierten MHC-definierten lymphoblastoiden Hühnerzelllinien (RECC), die stabil verschiedenste MDV Gene exprimieren, war es möglich, den Einfluss der MDV Proteine auf die CTL Antwort hin zu untersuchen (Pratt et al., 1992). Es wurde gezeigt, dass es sich bei den Effektorzellen um  $CD8^+$ ,  $TCR\alpha V\beta 1^+$  CTL handelt (Omar and Schat, 1997). Dabei stellte man fest, dass ICP4 exprimierende RECC nur von CTL der genetisch resistenten Hühner lysiert werden können. Meq, pp38 und gB exprimierende RECC wurde dagegen von CTL resistenter und empfänglicher Tiere lysiert (Omar and Schat, 1996). *In vivo* konnten die *in vitro* gewonnenen Ergebnisse bestätigen werden, indem man Küken mit einem Vogelpocken-Virus, welches das MDV Glykoprotein B exprimiert, geimpft hat. Auch hier schützten die  $CD8^+$   $TCR\alpha V\beta 1^+$  CTL und neutralisierende AK gegen eine Belastungsinfektion mit virulenten MDV-Stämmen (Omar et al., 1998). Auf mRNA-Ebene konnte in infizierten Tieren in der frühen Phase der Infektion eine erhöhte Expression von Perforin und Granzym A im Milzgewebe nachgewiesen werden (Sarson et al., 2008a).

### 2.1.9 MDV Zellkultursysteme

Für die *in vitro* Kultivierung von MDV stehen verschiedene Zellkultursysteme zur Verfügung. Am besten eignen sich DEF oder CKC von ein bis zwei Wochen alten Tieren (Churchill and Biggs, 1967; Solomon et al., 1968). Das Virus kann auch in HEF oder embryonalen CKC kultiviert werden, jedoch ist die Infektion nicht so effizient und führt abhängig vom Virus ab einer bestimmten Passage zur Attenuierung (Schat, 2005; Schat et al., 1985). Der genetische Hintergrund der Hühner, von denen die CKC gewonnen wurden, beeinflusst die Infizierbarkeit der Zellen jedoch nicht (Spencer, 1969).

Infizierte HEF bilden drei bis sieben Tage nach der Infektion mit Serotyp 1-Stämmen Foci oder Plaques aus runden, degenerierten Zellen, die sich mikroskopisch und durch Plaquefärbungen darstellen lassen (Schat and Nair, 2008).

Des Weiteren konnten Hühnerembryohautzellen (Prasad and Spradbrow, 1977), tracheale Explantate vom Huhn (Ramachandra et al., 1978) und Embryofibroblasten-Kulturen verschiedenen Ursprungs beispielsweise aus der Taube, Wachtel, Gans und Pute mit MDV infiziert werden (Purchase et al., 1971). Die Infektion in all diesen Zellen ist semi-produktiv, so dass kein freies Virus vorhanden ist. Lediglich ein varianter HVT-Stamm ist in der Lage

HEF zu infizieren und in großen Mengen zellfreies Virus ins Medium abzugeben. Das freigegebene Virus hat allerdings einen Replikationsdefekt bei der Infektion von Hühnern *in vivo* (Yachida et al., 1986).

Zudem gibt es einige kontinuierliche HEF-Linien wie MDV OU2.2, OU2.2 und DF-1, in denen eine zytolytische, semi-produktive MDV-Infektion stattfindet und eine Langzeitkultivierung möglich ist (Abujoub and Coussens, 1995; Himly et al., 1998).

Das einzige *in vitro* Infektionssystem für Lymphozyten, den primären Zielzellen von MDV, wurde 1984 von Calnek *et al.* beschrieben. Da die primären Lymphozyten in diesem Kultursystem nicht lange überlebten, erfolgte alle ein bis zwei Tage eine Zugabe von frischen Lymphozyten. Infizierte Lymphozyten konnten in Kulturen aus der Milz, Bursa und dem Thymus durch den Nachweis von viralem Antigen detektiert werden. Allerdings war die Überlebensspanne von Bursazellen trotz stetiger Zugabe so kurz, dass die gewonnenen Daten im Vergleich zu Milz und Thymus nicht aussagekräftig waren. Die Expression von VIA (*viral internal antigen*) und die Isolation von Virus war noch nach 40 Passagen in Milzlymphozyten möglich (Calnek et al., 1982). In weiteren Arbeiten mit diesem Infektionssystem konnte durch eine Doppelfärbung von Oberflächenmolekülen und VIA gezeigt werden, dass T- und B-Zellen infiziert wurden. Allerdings war die Anzahl der infizierten T-Zellen deutlich geringer als die der B-Zellen. Auch in Milzkulturen von bursektomierten Hühnern konnten infizierte Lymphozyten nachgewiesen werden. Bei der Infektion der Milzlymphozyten im Vergleich von empfänglichen und resistenten Tieren, waren die B-Zellen zwei Tage p.i. im gleichen Ausmaß infiziert. Ein Unterschied zeigte sich allerdings bei der Anzahl der infizierten T-Zellen, von denen nach vier bis fünf Tagen p.i. bei den empfänglichen Tieren mehr infizierte T-Zellen nachweisbar waren (Calnek et al., 1984a). Dieses Kultursystem für die primären Zielzellen der MDV-Infektion wurde jedoch aufgrund der unpraktikablen Kulturbedingungen seitdem für keine weiteren Studien verwendet.

Für die Etablierung und Verwendung von MDV transformierten lymphoblastoiden Zelllinien gibt es zahlreiche Nachweise. So gibt es viele Zelllinien, die aus *ex vivo* Tumoren generierten wurden, wie MSB-1 oder HPRS-1 (Akiyama and Kato, 1974; Akiyama et al., 1973; Powell et al., 1974). Darunter sind Tumore jeglichen Ursprungs, von Leber, Niere, Muskel, Gonaden, Milz, Lymphomen und PBL (Nazerian, 1987). Besonders durch verbesserte Methoden wie die Agar-Kultur-Technik ist die Generierung von neuen Tumorzelllinien erleichtert worden, jedoch immer noch nicht trivial (Payne et al., 1981).

Die Gewinnung von *in vitro* transformierten Zelllinien wurde nur in zwei Fällen beschrieben.

Ikuta *et al.* isolierten 1987 die T-lymphoblastoide Zelllinie MDCC-MTB1, indem sie Hühnerembryo-Lymphozyten aus dem Blut mit humanem IL-2 stimulierten und mit einem onkogenen MDV-Stamm infizierten (Ikuta *et al.*, 1987). Calnek *et al.* versuchten mit der von Ikuta beschriebenen Methode die *in vitro* Transformation von Hühnerembryo-Lymphozyten zu wiederholen. Es gelang ihnen jedoch nicht, die Ergebnisse zu replizieren. Allerdings konnten sie nachweisen, dass humanes IL-2 keinen Effekt auf Hühner-Lymphozyten hat. In einem neuen Ansatz versuchten sie die T-Zellen durch eine gemischte Lymphozytenreaktion zu aktivieren, wofür Milzlymphozyten von zwei verschiedenen MHC-Haplotypen zu gleichen Teilen vermischt wurden. Alternativ fand eine Aktivierung der Lymphoblasten *in vivo* durch die Applikation von CKC mittels Wing-web-Methode statt. Die aktivierten Milzzellen wurden gewonnen und *in vitro* mit dem Virusstamm RB-1B infiziert und weiter kultiviert. Nach neun bis fünfzehn Tagen proliferierten in drei von 122 Ansätzen einige Zellen in Gruppen. Diese sich stetig teilenden lymphoblastoiden Zellen waren zu 30% positiv für virales Antigen. Eine der Zelllinien war eine CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> und  $\alpha$ V $\beta$ 1-TCR<sup>+</sup> T-Zelllinie, die anderen beiden waren CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> und  $\gamma$  $\delta$ -TCR<sup>+</sup> T-Zellen. Allerdings gingen alle drei Zelllinien nach 45 bis 176 Tagen in Kultur zugrunde (Calnek and Schat, 1991). Einige Jahre später gelang Buranathai *et al.* die *in vitro* Transformation einer primären Fibroblasten-Zelllinie (Buranathai *et al.*, 1997).

Bemerkenswert ist, dass seit diesen über 15 Jahre zurückliegenden Studien keine Berichte über erfolgreiche *in vitro* Transformationen publiziert wurden und bis heute ein adäquates Modell zur Untersuchung der T-Zelllatenz und Transformation fehlt. Neueste Modelle nutzen die Integration des MDV-Genoms in REV-transformierte T-Zellen, um damit die Latenz und deren Auswirkung auf Proliferation, Apoptose und die Expression von Oberflächenmolekülen zu untersuchen (Arumugaswami *et al.*, 2009a, b).

## 2.2 DAS ADAPTIVE IMMUNSYSTEM DES HUHNS

Das Immunsystem des Huhns ist täglich einer Vielzahl von intrazellulären und extrazellulären Erregern ausgesetzt. Um eingedrungene Pathogene zu bekämpfen, gibt es die angeborene (unspezifische) und die adaptive (spezifische) Immunantwort. Die spezifische Immunität setzt sich aus der zell-vermittelten und der humoralen Immunantwort zusammen. Mit ihr ist auch ein immunologisches Gedächtnis verbunden, das für eine schnelle und spezifische Immunantwort bei erneuten Infektionen sorgt. B-Zellen sind für die humorale Immunantwort verantwortlich und entwickeln sich nach Antigenkontakt zu antikörper-sezernierenden

Plasmazellen. T-Zellen sind ein Teil der zell-vermittelten Immunantwort und unterteilen sich in die CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Die zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind in der Lage infizierte Zellen oder Tumorzellen durch ihre zytotoxische Granula direkt zu töten. Die CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen regulieren durch die Freisetzung von Zytokinen die Effektorzellen wie B-Zellen oder Makrophagen (Davison, 2003).

Die B- und T-Lymphozyten entwickeln und differenzieren sich in spezialisierten, primären lymphatischen Organen. Die B-Zelle entwickelt sich nicht wie bei Mensch und Maus im Knochenmark, sondern in einem der Klasse der Aves eigenen Organ, der Bursa Fabricii. Die T-Zellentwicklung findet ähnlich wie bei Mensch und Maus im Thymus statt. Da Hühner keine Lymphknoten besitzen, zählen zu den peripheren lymphatischen Organen die Milz, die Caecaltonsille (CT), das darmassoziierte lymphatische Gewebe, wie die Peyer'schen Platten, das paranasale lymphatische Gewebe, wie die Harder'sche Drüse, und das bronchusassoziierte lymphatische Gewebe in der Lunge (Oláh and Vervelde, 2008).

### 2.2.1 B-Zellsystem des Huhns

Schon im frühen 16ten Jahrhundert wurde die Bursa durch Hieronymus Fabricius von Acquapendente beschrieben (Adelmann, 1942). Die Bursa ist ein haselnussgroßes Divertikel in der Dorsalwand des Proctodaeum und stellt sich als Gewebefalten dar, die ein zentrales Lumen umschließen (Ratcliffe, 1985). Sie ist ein Teil des darmassoziierten lymphatischen Gewebes und ist in der Lage, lösliche Substanzen wie zum Beispiel Antigen aus dem Lumen des Enddarms aufzunehmen (Schaffner et al., 1974). Lange Zeit war die Funktion der Bursa Fabricii nicht näher bekannt. Erst durch Infektionsversuche mit bursektomierten Hühnern konnte die Rolle der Bursa als primäres lymphatisches Organ näher charakterisiert werden. Die bursektomierten Tiere konnten nach der Impfung mit einem *Salmonella typhimurium* Antigen nur eine sehr geringe Menge Antikörper produzieren (Glick et al., 1956). Die Erkennung der Antigene vermittelt der spezifische B-Zellrezeptor (*B-cell receptor*, BCR), ein membrangebundenes Immunglobulin (Ig) auf der Zelloberfläche der B-Zelle. Die aviären Immunglobuline bestehen, analog zu denen der Säuger, aus jeweils zwei identischen leichten Ketten und schweren Ketten. Der variable Teil ist für die Erkennung verschiedenster Antigene verantwortlich und der isotypspezifische Teil vermittelt die Effektorfunktion (Davison et al., 2008). Beim Huhn gibt es drei Immunglobulinklassen, IgM, IgG (IgY) und IgA. Das aviäre IgM zeigt eine große Ähnlichkeit zum Säuger IgM. Es kommt als Pentamer im Serum vor und wird als erster Antikörper nach einer Infektion gebildet. Zudem wird IgM als Hauptklassen-

Immunglobulin auf der B-Zelle exprimiert. IgG wurde lange Zeit als IgY bezeichnet und wird hauptsächlich während der sekundären Immunantwort gebildet. Die Funktionen des aviären IgG entsprechen denen des Säuger IgG. IgA kommt im Serum und in sezernierter Form in der Galle vor und entspricht dem Säuger IgA. Bisher wurden kein IgD oder IgE beim Huhn gefunden, wobei manche Funktionen des Säuger IgEs durch das Hühner IgG übernommen werden (zusammengefasst von (Ratcliffe, 2006)).

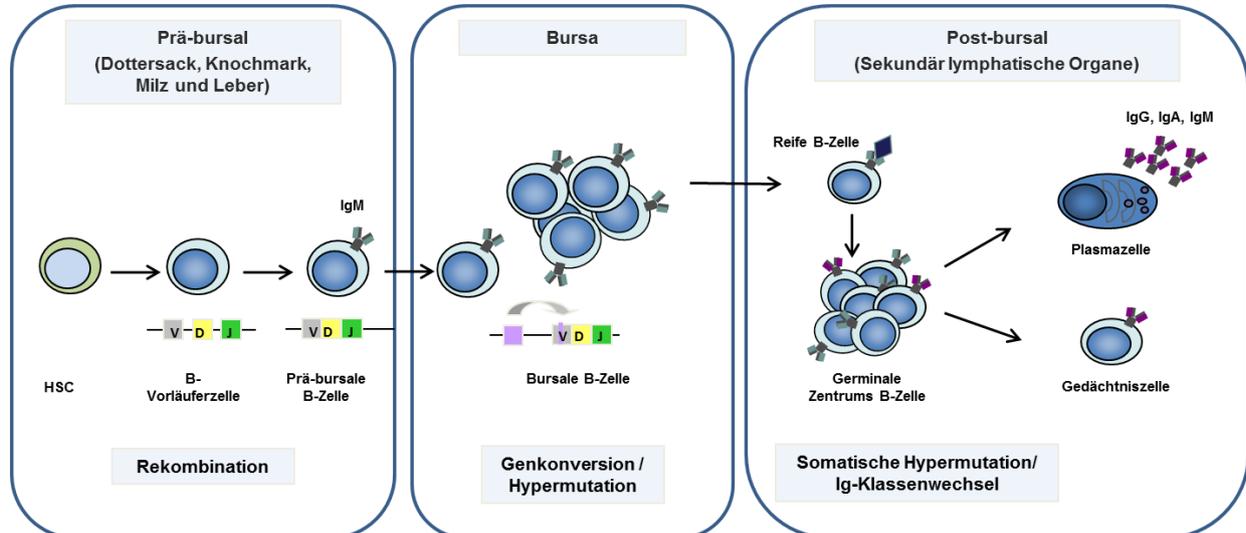
Die Diversität der Antikörper wird nach der V-(D)-J-Rekombination durch anschließende Genkonversion sichergestellt. Allerdings verfügt das Huhn nur über eine sehr limitierte Anzahl an V-(D)-J-Segmenten, sodass die Rekombination nur zu einer geringen Rezeptordiversität führt (Reynaud et al., 1985; Reynaud et al., 1987; Reynaud et al., 1989; Thompson and Neiman, 1987). Da Hühner für den variablen Teil der leichten Kette nur ein *Variable* ( $V_L$ ) und ein *Joining* ( $J_L$ )-Segment besitzen, kommt es bei der Rekombination der leichten Kette zu keiner Diversität des Rezeptors. Der variable Teil der schweren Kette wird durch drei Gensegmente codiert, das *Variable* ( $V_H$ ), das *Diversity* ( $D_H$ ) und *Joining* ( $J_H$ )-Segment. Für die Rekombination von den einzelnen  $V_H$  und  $J_H$  Gensegmenten stehen 15  $D_H$  Elemente zur Verfügung. Dabei spielen wie beim Säuger das *recombination-activating gene* (RAG) RAG-1 und RAG-2 eine zentrale Rolle bei der Bildung des Rekombinase-Komplexes (Reynaud et al., 1992).

Die V(D)J-Rekombination findet am Locus der leichten und schweren Kette gleichzeitig statt und für die Bildung des Pre-BCR ist eine produktive Rekombination beider Ketten notwendig (Pike and Ratcliffe, 2002). Nur die in die Bursa eingewanderten B-Zellen mit einem Pre-BCR werden durch Proliferation vermehrt (McCormack et al., 1989).

Um eine möglichst große Anzahl an Antigen spezifisch erkennen zu können, ist es aber notwendig, über eine große Vielfalt an Antigenrezeptoren zu verfügen. Die Ig-Diversität wird beim Vogel durch die somatische Genkonversion erreicht. Bei der Genkonversion werden funktionell rekombinierte  $VJ_L$  oder  $VDJ_H$ -Sequenzen durch  $V_L$ - oder  $V_H$  Pseudogene ersetzt (Reynaud et al., 1987). Notwendig für die Genkonversion ist das Enzym *activation-induced cytidine deaminase* (AID) (Arakawa et al., 2002).

Beim Huhn unterscheidet man in der B-Zellentwicklung eine präbursale, bursale und postbursale Phase (Ratcliffe, 1985). Die Entwicklung der B-Zellen beginnt bereits ab dem fünften Tag der Embryonalentwicklung und findet in Dottersack, Knochenmark, Milz und Leber statt. Diese Vorläuferzellen können bereits mit dem Immunglobulin-Rearrangement begonnen haben und IgM auf der Oberfläche exprimieren (Reynaud et al., 1992). Die bursale

Anlage ist ab dem viertem Embryonaltag (Moore and Owen, 1966) zu finden und zwischen dem achten und fünfzehnten Tag wandern die präbursalen Stammzellen in die Bursa ein (Houssaint et al., 1976). Zwischen dem 13. und 15. Embryonaltag findet eine massive Proliferation der eingewanderte Zellen statt (Houssaint et al., 1983). Die embryonale Bursa enthält ca. 8000-12.000 Follikel (Oláh and Glick, 1978), deren medulläre Regionen Lymphozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und eine geringe Anzahl an T-Zellen enthalten (Masteller et al., 1997). Die bursale Umgebung ist in dieser Zeit eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung der Diversität mittels Genkonversion (McCormack et al., 1991). Zum Zeitpunkt des Schlupfes besteht die Bursa zu 90-95% aus reifen B-Zellen mit Ig auf der Oberfläche. Durch migrierende und proliferierende B-Zellen bildet sich die Follikelrinde. Ab dem 18. Embryonaltag verlassen die reifen B-Zellen aus der Follikelrinde heraus die Bursa (Korte et al., 2013; Paramithiotis and Ratcliffe, 1994; Ratcliffe, 1985). Diese Zellen sind charakterisiert durch eine hohe Oberflächenexpression von Ig, MHC-Klasse-II und chL-12 (Paramithiotis and Ratcliffe, 1994). Jedoch emigrieren lediglich 5% der gebildeten B-Zellen in die Peripherie und wandern über das Blut in Milz, Thymus und Caecaltonsille (Lassila, 1989). Die übrigen Zellen, gekennzeichnet durch eine sehr geringe Ig-Expression auf der Oberfläche, gehen apoptotisch zu Grunde (Paramithiotis et al., 1995).



**Abbildung 4: B-Zellentwicklung beim Huhn**

Dargestellt ist die B-Zellentwicklung beim Huhn, die sich in eine präbursale, bursale und postbursale Phase unterteilt (modifiziert nach (Kohonen et al., 2007)).

Antigenkontakt die germinalen Zentren. In diesen findet die Affinitätsreifung des Immunglobulin-Rezeptors durch Genkonversion und somatische Hypermutation und der Klassenwechsel von IgM zu IgA und IgG statt (Arakawa et al., 1996; Leslie and Clem, 1969; Yasuda et al., 2003).

Der Höhepunkt der bursalen Entwicklung wird zwei bis drei Monate nach dem Schlupf erreicht. Nach der Rückbildung der Bursa in der Geschlechtsreife, wird der periphere B-Zellpool durch die noch schlecht charakterisierten postbursalen Stammzellen erhalten (Toivanen and Toivanen, 1973a; Toivanen et al., 1974).

### 2.2.2 B-Zellkultursysteme

Die Kultivierung von primären B-Lymphozyten war lange Zeit aufgrund von fehlenden Wachstumsfaktoren unmöglich. Funktionelle Versuche mit primären Milzlymphozyten waren wegen der geringen Überlebensdauer der Lymphozyten nur über ein bis zwei Tage möglich (Calnek et al., 1982). Das Kultivieren von primären Lymphozyten aus der Bursa war so gut wie gar nicht möglich, da die bursalen B-Zellen nach der Entnahme aus dem Gewebeverband innerhalb kurzer Zeit starben. Bei Versuchen einer *in vitro* Kultivierung waren nach 16 Stunden nur noch 10% der Bursalymphozyten am Leben (Jacobsen et al., 1996). Compton *et al.* zeigten, dass nach zwei Stunden bereits 45% und nach sechs Stunden 80% der Bursalymphozyten apoptotisch zu Grunde gingen (Compton and Waldrip, 1998).

Durch die Etablierung der *Expressed-Sequence-Tag* (EST)-Datenbanken und der Sequenzierung des Hühnergenoms war es möglich, einige als B-Zellwachstumsfaktoren bekannte Zytokine vom Säuger auch beim Huhn zu klonieren und ihre funktionellen Eigenschaften als B-Zellwachstumsfaktoren beim Huhn zu identifizieren.

BAFF (*B cell activating factor of the tumor necrosis factor family*) ist ein B-Zell spezifisches Zytokin und chBAFF wird besonders stark in der Bursa exprimiert. Lösliches chBAFF interagiert mit den humanen Oberflächenrezeptoren TACI (*transmembrane activator, calcium modulator and CAML interactor*), BCMA (*B cell maturation antigen*) und BAFF-Rezeptor. Es bindet ausschließlich an B-Zellen, da der Rezeptor nur auf reifen und unreifen B-Zellen exprimiert wird. Gebildet wird es hauptsächlich von B-Zellen der peripheren lymphoiden Organe und der Bursa Fabricii. Bei einer *in vitro* Stimulation von Milz-B-Zellen führt es zu einem verlängerten Überleben der Zellen (Kothlow et al., 2007; Schneider et al., 2004). Durch *in vivo* Studien konnte gezeigt werden, dass eine stabile Überexpression von chBAFF, mittels des retroviralen Gentransfersystems RCAS, zu einer signifikant erhöhten B-Zellfrequenz und einem erhöhten Antikörperspiegel führt. Wird endogenes chBAFF allerdings durch einen humanen Rezeptor geblockt, kommt es zu einer Reduktion der B-Zellzahl in der Milz und zu einer hochgradigen Hemmung der B-Zellfollikelentwicklung in der Bursa (Kothlow et al., 2010).

CD40Ligand (CD40L) gehört wie BAFF zur *tumour necrosis factor family* (TNF-Familie) und das CD40-CD40L-System spielt eine essentielle Rolle in der B-Zellentwicklung und Affinitätsreifung (Allen et al., 1993; Fiedler et al., 1980; Hehlhans and Mannel, 2002). ChCD40L wird von aktivierten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert. Der Rezeptor chCD40 wird von allen reifen und unreifen B-Zellsubtypen in Bursa, Caecaltonsille, PBL und Thymus exprimiert. Auch Monozyten aus Milz und Blut, Makrophagen und Thrombozyten exprimieren chCD40 auf ihrer Zelloberfläche (Tregaskes et al., 2005). Neben einem verlängerten Überleben nach Stimulation *in vitro* (Tregaskes et al., 2005) konnte auch eine Proliferation und Differenzierung der B-Zellen nachgewiesen werden. Insbesondere Milzzellen können durch Zugabe von chCD40L über einen langen Zeitraum von bis zu 18 Tagen kultiviert werden. Die kultivierten B-Zellen zeigten einen zum Plasmablasten hin veränderten Phänotyp. Dafür spricht auch die Herunterregulation von chBu1, die sowohl auf Protein- als auch auf Transkriptionsebene nachgewiesen werden konnte. Zudem wurde nach Langzeitkultivierung auch das Oberflächen-IgM herunterreguliert. Bereits nach 24-48 Stunden wurde das MHC-Klasse-II-Molekül hochreguliert. Nach der Stimulation mit chCD40L kam es zu einer erhöhten Produktion von IgM und IgG, was auf einen Immunglobulin-Klassenwechsel hindeutet, wie er auch nach Antigen-spezifischer T-Zellhilfe erfolgen würde. Auch Bursalymphozyten können durch die Stimulation von chCD40L länger kultiviert werden, allerdings kann die massive Apoptose nicht verhindert werden (Kothlow et al., 2008).

ChIL-10 ist das namensgebende Mitglied der IL-10-Zytokinfamilie, zu der auch chIL-19, chIL-22 und chIL-26 beim Huhn gehören. chIL-10 mRNA ist auf einem hohen Niveau in Bursa und Caecaltonsille und niedrig auch in Thymus, Leber und Lunge nachweisbar. Im Gegensatz zu Mensch und Maus wird es nicht in Milz und Knochenmark exprimiert und ist in diesen Geweben auch nicht durch Mitogen-Aktivierung induzierbar (Rothwell et al., 2004). chIL-10 ist, wie auch IL-10 beim Menschen, zuständig für die Regulierung der Th1/Th2 Antwort während einer Protozoeninfektion. Dabei verhindert es die starke, pro-inflammatorische IFN- $\gamma$  vermittelte Th1 Immunantwort (Rothwell et al., 2004). *In vitro* Stimulationsversuche mit Milz-B-Zellen zeigten, dass chIL-10 alleine auf die Proliferation von B-Zellen keinen Einfluss hat. Die gleichzeitige Gabe von chIL-10 und chCD40L hat einen synergistischen Effekt und führt zu einer verstärkten Proliferation. Die gleichzeitige Gabe von chIL-10 und chCD40L führt zudem nach sechs Tagen zu einer gesteigerten Sekretion von Immunglobulinen und zum Klassenwechsel (Schuhmacher, 2010).

Auch ein IL-6-Homolog konnte beim Huhn kloniert werden (Schneider et al., 2001) und es

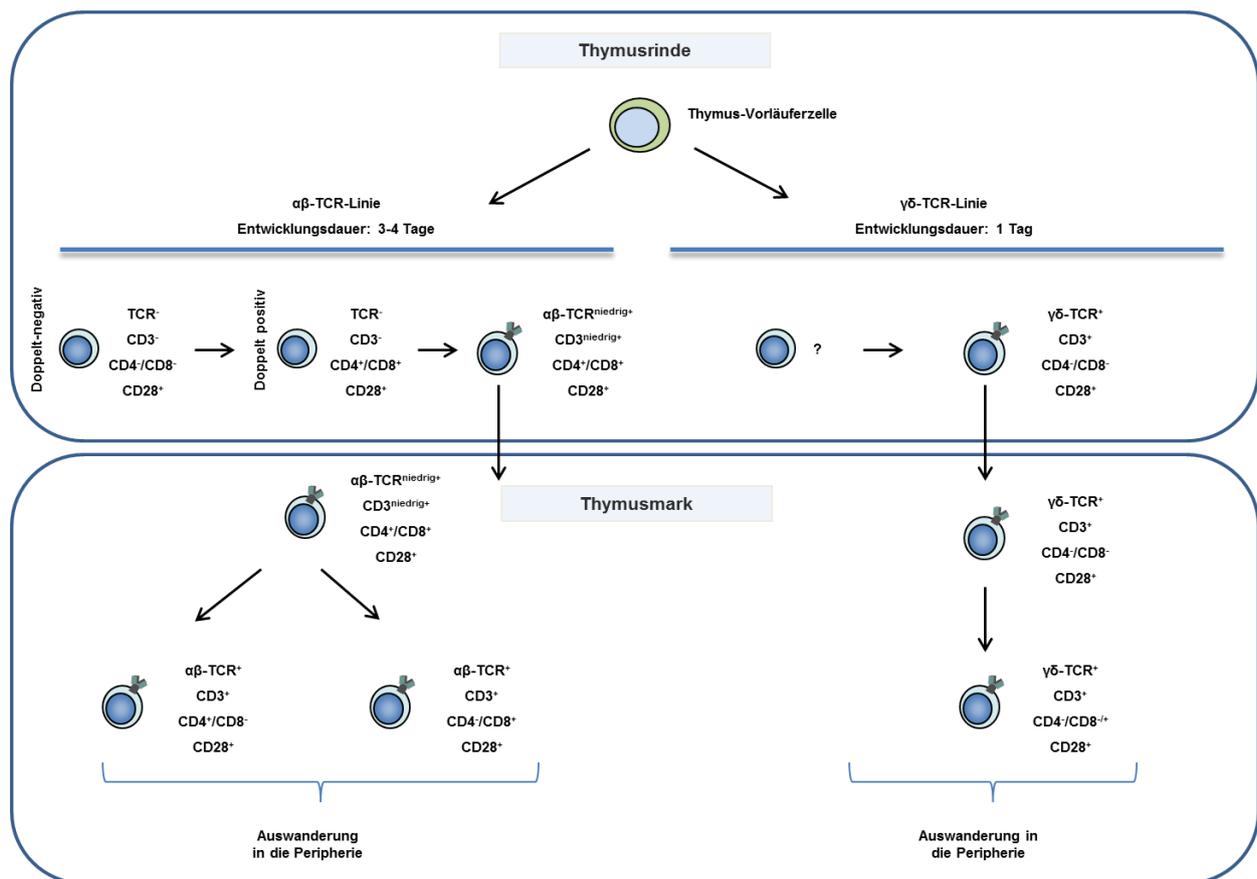
wurde gezeigt, dass es auf RNA Ebene sehr stark in der Caecaltonsille, Milz, Bursa und isolierten Milz-B-Zellen exprimiert wird. In Thymus, Lunge und Gehirn kommt es allerdings nur zu einer schwachen Expression. Das deckt sich mit den Ergebnissen beim Säuger, die zudem einen Einfluss von IL-6 auf die B-Zelldifferenzierung nachgewiesen konnten (Burdin et al., 1995; Schumacher, 2009). Die *in vitro* Stimulation von Milz-B-Zellen mit chIL-6 führte allerdings zu einer aktiven Inhibition der Proliferation. Auch eine gleichzeitige Gabe von chIL-10 oder chCD40L zusammen mit chIL-6 führt nicht zur Verminderung des inhibitorischen Effekts. Es wurde auch kein Effekt auf die Bildung von Immunglobulinen oder einen Immunglobulin-Klassenwechsel festgestellt (Schuhmacher, 2010).

### 2.2.3 T-Zellsystem des Huhns

Im Gegensatz zur B-Zelle hat die Hühner T-Zelle hinsichtlich ihrer Entwicklung, Differenzierung und Rezeptoren eine große Ähnlichkeit zur Säuger T-Zelle. Dabei vermittelt der T-Zell-Rezeptor die Antigenerkennung und ist äußerst sensitiv und hoch polymorph. Jede T-Zelle exprimiert ein einzigartiges TCR-Heterodimer, das mit dem spezifischen Antigen-Peptid-MHC-Komplex reagiert (BLACKMAN et al., 1988; Boehmer, 1988). Die T-Zellreifung und die Generierung des TCRs finden im Thymus statt. Dieser heterodimere TCR besteht aus zwei Immunglobulin-Superfamilien, die ihre Diversität durch somatische DNA-Rekombination generieren (Tonegawa, 1983). Er wird durch 2 Glykoproteinketten,  $\alpha\beta$  und  $\gamma\delta$ , gebildet, die eine antigen-bindende, variable Region und eine konstante Region aufweisen. Beim Huhn gibt es 2  $\alpha\beta$ -TCR Subpopulationen, die  $\alpha\beta 1$ -TCR<sup>+</sup> und die  $\alpha\beta 2$ -TCR<sup>+</sup> T-Zellen. Zusammen mit dem CD3-Komplex bildet der TCR den funktionellen TCR-Komplex auf der T-Zelloberfläche (Ashwell and Klausner, 1990; Char et al., 1990).

Zur Entwicklung der T-Zelle wandern hämatopoetische Vorläuferzelle in drei Wellen an Embryonaltagen 6, 12 und 18 in den Thymus ein. Im Thymus entwickeln sich aus den Vorläuferzellen zuerst die  $\gamma\delta$ -T-Zellen, etwas später gefolgt von den  $\alpha\beta 1$ -T-Zellen und den  $\alpha\beta 2$ -T-Zellen (Coltey et al., 1989). In der gleichen Reihenfolge wandern diese Zellen in die Peripherie aus. Das Huhn besitzt im Unterschied zum Menschen bis zu 50%  $\gamma\delta$ -T-Zellen (Six et al., 1996). Anhand der Expression von weiteren Zelloberflächenmolekülen können die T-Zellen in verschiedene Subpopulationen unterteilt werden. Dazu gehören neben dem TCR auch die Moleküle CD4 und CD8. Während der Entwicklung im Thymus durchläuft die T-Zelle verschiedene Stadien. Von der unreifen T-Zelle, die kein CD3 oder TCR exprimiert und CD4/CD8 doppelt-negativ oder doppelt-positiv ist, bis hin zur reifen CD3<sup>+</sup>, TCR<sup>+</sup> und

CD4 oder CD8 einfach-positiven T-Zelle (siehe Abbildung 5) (Davidson and Boyd, 1992).



**Abbildung 5: Entwicklung der T-Zelle im Thymus**

Darstellung der T-Zellentwicklung im Thymus entlang der  $\gamma\delta$ -TCR und  $\alpha\beta$ -TCR-T-Zelllinie. Während der T-Zellentwicklung im Thymus können die T-Zellen in  $CD3^-$  (Vorläufer-T-Zellen),  $CD3^{\text{niedrig}}$  (unreife T-Zellen) und  $CD3^{\text{hoch}}$  positive Zellen (reife T-Zellen) unterschieden werden. Zudem treten im Laufe der T-Zellentwicklung  $CD3^+$ ,  $CD4^+$ ,  $CD8^-$  und  $CD3^+$ ,  $CD4^+CD8^+$  T-Zellen auf, die vermutlich Vorläuferzellen zu den doppelt-positiven  $CD4^+CD8^+$  T-Zellen sind. Zudem gibt es auch  $CD3^{\text{niedrig}+}$  Zellen, die  $CD4^+CD8^-$ ,  $CD4^-CD8^+$  oder  $CD4^-CD8^-$  T-Zellen sind. Die späteren T-Zellen sind  $CD3^{\text{hoch}+}$  und entweder  $CD4^+CD8^-$ ,  $CD4^-CD8^+$ ,  $CD4^-CD8^-$  oder  $CD4^+CD8^+$  und gehören der  $\alpha\beta$  oder  $\gamma\delta$ -TCR Linie an (Davidson and Boyd, 1992). Man geht davon aus, dass T-Zellen, die CD4 und CD8 gleichzeitig exprimieren, noch unreif sind. Exprimieren sie nur noch einen der beiden Rezeptoren, sind es reife T-Zellen. (modifiziert nach (Goebel, 1996)).

$CD4^+CD8^-$  T-Zellen sind T-Helferzellen (Th), auch inflammatorische T-Zellen genannt, die durch MHC-Klasse-II präsentierte exogenes Antigen erkennen. (Erf et al., 1998). Die T-Helferzellen unterteilen sich beim Säuger in weitere Subpopulationen, wie zum Beispiel Th1, Th2, Th17 oder die folliculären Th-Zellen (Murphy, 2012). In Mäusen kommt es bei einer Infektion mit intrazellulären Erregern zu einer  $IFN-\gamma$ , IL-12, IL-18 vermittelten Th1-Antwort. Die Th2-Antwort dagegen, durch IL-4, IL-5, IL-6, und IL-13 vermittelt, wird assoziiert mit einer Antikörperproduktion und der Immunantwort gegen Helminthen (Davison, 2003). Auch beim Huhn gibt es Hinweise, dass eine Th1/Th2 Polarisation bei

Immunantworten auftritt (Degen et al., 2005; Gobel et al., 2003; He et al., 2011; St Paul et al., 2012).  $CD4^+CD8^+$  T-Zellen sind zytotoxische T-Zellen, die durch MHC-Klasse-I präsentierte endogenes Antigen erkennen (Erf et al., 1998).

Im Blut beläuft sich die T-Zellanzahl auf 80-90%, die zu 15%  $\gamma\delta$ -TCR<sup>+</sup>, 50%  $\alpha V\beta 1$ -TCR<sup>+</sup> und 10%  $\alpha V\beta 2$ -TCR<sup>+</sup> sind. Die Milzleukozyten bestehen zu 50-60% aus T-Zellen, die zu 25-30%  $\gamma\delta$ -TCR<sup>+</sup>, 40-55%  $\alpha V\beta 1$ -TCR<sup>+</sup> und 12%  $\alpha V\beta 2$ -TCR<sup>+</sup> T-Zellen sind (Chen et al., 1988; Chen et al., 1986; Cooper et al., 1991). Zudem exprimieren alle peripheren  $\alpha\beta$ -TCR<sup>+</sup> Zellen das co-stimulierende Molekül CD28, während nur eine kleine Subpopulation der  $\gamma\delta$ -TCR<sup>+</sup> Zellen CD28 exprimieren. Während der T-Zellentwicklung sind alle T-Zellen CD28<sup>+</sup> (Vainio et al., 1991).

## 2.2.4 T-Zellkultursysteme

T-Zellen können *in vitro* durch pflanzliche Lektine, Zytokine oder TCR-Quervernetzung aktiviert werden, was zu einer Proliferation und dem Überleben der T-Zellen führt. Als eines der ersten T-Zellmitogene wurde das Phytohämagglutinin (PHA) beschrieben (Greaves et al., 1968). Einige Jahre später wurde die Stimulation von T-Zellen durch Concanavalin A (Con A) beschrieben (Toivanen and Toivanen, 1973b).

Ein essentieller T-Zellwachstumsfaktor ist chIL-2, das von der T-Zelle selbst gebildet werden kann. chIL-2 bindet an den chIL-2R, welcher von aktivierten T-Zellen und NK-Zellen exprimiert wird (Sundick and Gill-Dixon, 1997). Die leichte Kette des chIL-2 Rezeptors wird von dem mAk chCD25 erkannt (Feddecka-Bruner et al., 1991). *In vitro* induziert rekombinant hergestelltes chIL-2 eine Proliferation von Milzleukozyten (Stepaniak et al., 1999). Dabei proliferieren durch die chIL-2-Stimulation hauptsächlich  $CD8^+$  T-Zellen (Gobel et al., 2003). Bei einer Gabe von chIL-2 *in vivo* kommt es zu einer Proliferation der  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen im Blut (Hilton et al., 2002).

Schneider *et al.* klonierten chIL-18 und zeigten, dass chIL-18 stimulierte Milzleukozyten eine erhöhte IFN- $\gamma$ -Produktion aufweisen (Schneider et al., 2000). Eine Aktivierung der Milz-T-Zellen durch chIL-18 führt zu einer erhöhten T-Zellproliferation, wobei größtenteils  $CD4^+$  T-Zellen proliferieren. Weitere Effekte des chIL-18 *in vitro* sind die Hochregulation des MHC-Klasse-II-Moleküls und eine erhöhte IFN- $\gamma$ -Sekretion durch  $CD4^+$  T-Zellen (Gobel et al., 2003).

Der mAK CT-3 gegen den CD3-Komplex wurde 1988 durch Chen *et al.* generiert. An

Sepharose gekoppelt führt der AK *in vitro* zur Proliferation von T-Zellen aus dem Blut. Bei einer Gabe in löslicher Form kommt es nur zu einer äußerst geringen Proliferation (Chen et al., 1986).

1988 wurde durch Cihak *et al.* ein mAK gegen den Hühner-TCR beschrieben (Cihak et al., 1988). Dieser erkennt einen Großteil der T-Zellen und wurde etwas später als mAK gegen  $\alpha\beta$ 1-TCR (TCR-2) charakterisiert (Chen et al., 1988). An Sepharose gebunden, führt er zur Proliferation von Blut-T-Zellen, während dessen der lösliche Antikörper zu keiner Proliferation führt (Cihak et al., 1988).

Der mAk gegen den  $\gamma\delta$ - TCR wurde TCR-1 genannt, da die Gene der  $\gamma/\delta$  Ketten vor den  $\alpha/\beta$  Ketten rearrangiert werden. *In vitro* führt der an Sepharose gekoppelte Antikörper zur Proliferation von T-Zellen aus dem Blut. Allerdings ist die Proliferation im Vergleich zum anti-CD3-mAK etwas geringer (Sowder et al., 1988).

Char *et al.* charakterisierten einen weiteren Antikörper, der eine dritte T-Zelllinie erkannte, die weder  $\gamma\delta$ - noch  $\alpha\beta$ 1 TCR<sup>+</sup> war. Durch den mAK wird der  $\alpha\beta$ 2-TCR (TCR-3) erkannt.

Eine Stimulation mit dem mAK gegen chCD28 führt bei gleichzeitiger Stimulation durch Mitogene oder TCR-Quervernetzung zu einer verstärkten Proliferation, indem es als co-stimulatorisches Molekül die vollständigen T-Zellaktivierung bewirkt (Vainio et al., 1991). Gewisse mAk gegen chCD28 können auch alleine eine T-Zellproliferation bewirken und führen zur IFN- $\gamma$  Produktion (Smith and Göbel, 2013)

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Stimulation von T-Zellen auf verschiedensten Wegen möglich ist. Neben der generellen Aktivierung von T-Zellen durch Mitogene ist auch eine gezielte Stimulation der einzelnen T-Zellsubpopulationen möglich. Die spezifische Stimulation der TCR-Subpopulation ist durch den Einsatz mAK möglich, der zu einer Quervernetzung des entsprechenden TCRs führt und auf diesem Wege zur gezielten Aktivierung der entstehenden T-Zellpopulation. Des Weiteren kann die Stimulation durch Zytokine erfolgen, die zu einer vermehrten Proliferation von entweder CD4<sup>+</sup>- oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen führen.

### **3. ZIELSETZUNG**

Ziel dieser Arbeit war es, ein *in vitro* Infektionssystem für die primären Zielzellen der MDV-Infektion zu etablieren. Damit sollte die Pathogenese der natürlichen Infektion, insbesondere die zytolytische und latente B- und T-Zellinfektion, in der Zellkultur nachvollzogen und eine Phänotypisierung der infizierten Lymphozyten durchgeführt werden.

## 4. MATERIAL UND METHODEN

Die Hochzahlen beziehen sich auf die im Anhang alphabetisch aufgeführten Bezugsquellen.

### 4.1 TIERE UND TIERHALTUNG

#### 4.1.1 Hühner

Für die Versuche mit primären Zellen wurden Blutproben und Organe verschiedener Hühnerlinien entnommen. Dafür wurden Eier der Hühnerlinie M11 (B<sup>2/2</sup>-Haplotyp) vom Institut für Tierzucht in Mariensee zur Verfügung gestellt. Eier der Linie 0 (*Compton subline*) kamen vom *Institute for Animal Health in Compton, UK*. Die Eier der Linie LSL (*Lohmann's Selected Leghorn*) wurden von der Firma LSL-Rhein-Main Geflügelvermehrung GmbH in Dieburg bereitgestellt.

Alle Eier wurden am Institut für Tierphysiologie der LMU München unter Standardbedingungen bebrütet und die Tiere wurden nach dem Schlupf in Kleingruppen von vier bis acht Tieren in Volieren gehalten. Die Hühner erhielten handelsübliches Alleinfuttermittel für Legehennen und Wasser ad libitum. Die Genehmigung für die Blutentnahme erfolgte unter dem Aktenzeichen 55.2-1-54- 2532.6-12-09 durch die Regierung von Oberbayern.

### 4.2 GEWINNUNG VON PRIMÄREN LEUKOZYTEN

#### 4.2.1 Material

##### **Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), pH 7,2**

8,00g Natriumchlorid (NaCl)<sup>1</sup>

1,45g Di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x2H<sub>2</sub>O)<sup>1</sup>

0,2g Kaliumchlorid (KCl)<sup>1</sup>

0,2g Kaliumhydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sup>1</sup>

ad 1000ml Aqua dest.

Einstellen des pH-Werts mit HCl und NaOH auf 7,2. Für die Arbeiten in der Zellkultur wurde die Lösung autoklaviert.

##### **Biocoll Separating Solution<sup>2</sup>**

**Trypanblau-Lösung<sup>2</sup>****Zählkammer, modifiziert nach Neubauer<sup>3</sup>****Heparinlösung (500IU/ml)**

5ml Heparin-Natrium (25.000IU/5ml) <sup>4</sup>

45ml RPMI 1640 mit Glutamax <sup>5</sup>

Die Lösung wurde aliquotiert und bei 4°C gelagert.

**4.2.2 Gewinnung von Blutleukozyten**

Für die Blutentnahme an der rechtsseitigen V. jugularis wurden mit Heparinlösung beschichtete Spritzen und Kanülen der Größe 0,7 x 40mm verwendet. Das heparinisierte Vollblut wurde anschließend in einem 15ml Zentrifugenröhrchen 15 Minuten lang bei Raumtemperatur und 60xg zentrifugiert. Die nach der Zentrifugation den Erythrozyten aufliegenden Lymphozyten wurden vorsichtig mit einer Pasteur-Pipette aufgewirbelt. Anschließend wurde die obere Phase abgenommen und in ein neues Probenröhrchen überführt. Das zellreiche Plasma wurde zweimalig mit PBS durch Zentrifugation bei 4°C und 225xg für 10 Minuten gewaschen.

**4.2.3 Gewinnung von Leukozyten aus Milz, Bursa und Thymus**

Zur Organentnahme wurden die Hühner nach Betäubung durch Blutentzug getötet. Die Entnahme der Organe erfolgte mit sterilem Besteck und die entnommenen Organe wurden in 4°C kaltes, steriles PBS gegeben und auf Eis gelagert.

Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension wurden die Organe mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein in PBS stehendes Metallsieb (Maschenweite 0,75 x 0,75mm) gedrückt und homogenisiert. Die erhaltene Zellsuspension wurde in einem 50ml Zentrifugenröhrchen zur Sedimentation von größeren Gewebestücken für 10 Minuten auf Eis gestellt. Der sedimentfreie Überstand wurde abgenommen und bei 4°C und 225xg für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet abhängig von der Organgröße in 10 oder 20ml PBS resuspendiert. 10ml der Zellsuspension wurden auf 10ml der Biocoll Separating Solution geschichtet. Nach 12-minütiger Dichtezentrifugation bei RT mit 600xg, konnten die an der Interphase befindlichen Leukozyten mit einer Pipette vorsichtig abgenommen werden sie wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen.

## 4.2.4 Qualitative und quantitative mikroskopische Beurteilung der Leukozyten

Nach der Gewinnung der Leukozyten wurde jeweils eine Lebend/Tot-Färbung mittels Trypanblau durchgeführt. Hierfür wurden 10µl der Zellsuspensionen mit 10µl Trypanblau-Lösung gemischt und die Anzahl, sowie die Viabilität der Zellen in einer modifizierten Zählkammer nach Neubauer bestimmt.

## 4.3 ZELLKULTUR

### 4.3.1 Medien und Zusätze

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Medien und Zusätze bei 4°C gelagert.

#### **RPMI 1640 mit Glutamax<sup>5</sup>**

##### **Standardmedium**

445ml RPMI 1640<sup>5</sup>

50ml fötales Rinderserum (*fetal bovine serum*, FBS)<sup>2</sup>

5ml Penicillin/Streptomycin-Lösung (Penicillin 100 IU/ml und Streptomycin 100µg/ml)<sup>2</sup>

Lagerung des FBS und der Penicillin/Streptomycin-Lösung als Aliquots bei -20°C.

##### **HEF-Medium**

460ml IMDM<sup>2</sup>

25ml FBS<sup>2</sup>

10ml Hühnerserum<sup>4</sup>

5ml Penicillin/Streptomycin-Lösung<sup>2</sup>

##### **HEF-Medium reduziert**

480ml IMDM<sup>2</sup>

5ml FBS<sup>2</sup>

10ml Hühnerserum<sup>4</sup>

5ml Penicillin/Streptomycin-Lösung<sup>2</sup>

### **Hühnerleukozyten-Medium**

445ml IMDM<sup>2</sup>

40ml FBS<sup>2</sup>

10ml Hühnerserum<sup>4</sup>

5ml Penicillin/Streptomycin-Lösung<sup>2</sup>

### **Einfriermedium**

9ml FBS<sup>2</sup>

1ml DMSO (Dimethylsulfoxid, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO)<sup>1</sup>

Lagerung als Aliquot bei -20°C.

### **1x Trypsin-EDTA, pH 7,2**

5ml 10x Trypsin-EDTA-Lösung<sup>2</sup>

45ml Aqua bidest., steril

Lagerung des Trypsin-EDTA als Aliquot bei -20°C.

### **Puromycin<sup>1</sup>, 2µg/ml**

### **chCD40L<sup>9</sup>**

### **αVβ1 TCR (TCR-2) gereinigt**

## **4.3.2 Verwendete Zelllinien**

Zur Gewinnung des chCD40L wurde die mit FuGene transformierte Zelllinie HEK (*human embryonic kidney cells*)-293-msCD8-chCD40L in Standardmedium kultiviert (Schuhmacher, 2010).

## **4.3.3 Kultivierung von Zelllinien**

Für das Ausdünnen der adhärent wachsenden HEK 293-msCD8-chCD40L wurden die Zellen

sorgfältig abgeklopft und anschließend 1:5 geteilt. Das entnommene Volumen wurde durch frisches Medium ersetzt und die Zellen bei 37°C bei 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Bei jeder dritten Passage wurde den Zellen zur Selektion 2µg/ml Puromycin zugegeben.

#### 4.3.4 Kultivierung primärer Zellen

Bei der Kultivierung primärer Leukozyten aus Blut, Milz, Bursa und Thymus wurden die fertig präparierten Zellen (siehe 4.2) in Hühner-Leukozyten-Medium aufgenommen und in einer Dichte von  $1 \times 10^7$  Zellen/Delle in sterilen 24-Loch-Flachbodenplatten bei 40°C inkubiert. Die Stimulation der B-Zellkulturen mit chCD40L erfolgte in einer Konzentration von 2µg/ml oder mit dem chCD40L Zellkulturüberstand (ZKÜ) in einer 1:10 Verdünnung. Für die T-Zellkulturen wurden die Leukozyten durch Kreuzvernetzung des  $\alpha V\beta 1$  TCR mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers (mAK) TCR-2 stimuliert. Dazu wurden die sterilen 24-Loch-Flachbodenplatten am Tag zuvor mit dem TCR-2 Antikörper in einer Konzentration von 1µg/ml beschichtet.

Die adhärent wachsenden HEF wurden in HEF Medium in 10cm Petrischalen kultiviert. Zum Teilen der Zellen wurde das Medium abgenommen und zur Entfernung der FBS-Reste mit warmen PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen bei 40°C für 5 Minuten mit 1x Trypsin-EDTA-Lösung inkubiert. Durch die Zugabe von FBS-haltigem Medium wurde das Trypsin neutralisiert und die Zellsuspension mit PBS gewaschen und bei 225xg für 10 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in der benötigten Menge an HEF-Medium resuspendiert und bei 37°C kultiviert.

#### 4.3.5 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen in einer Einzelzellsuspension abzentrifugiert und die Zelldichte wurde auf  $5 \times 10^6$  Zellen/ml in kaltem Einfriermedium eingestellt. Die Zellsuspension wurde in Aliquots von 1,8ml in Gefrierhörchen eingefroren. Die Gefrierhörchen wurden für mindestens 12 Stunden in einer isopropanolhaltigen<sup>12</sup> Einfrierbox, mit einer Kühlrate von 1°C/min, bei -80°C eingefroren. Nach spätestens drei Monaten wurden die Zellen zur Langzeit-Lagerung in einen Tank mit flüssigem Stickstoff<sup>13</sup> überführt.

### **4.3.6 Auftauen von Zellen**

Die eingefrorenen Zellen wurden unter Schwenken im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und möglichst rasch in ein 50ml Zentrifugenröhrchen überführt. Zum Verdrängen des zytotoxischen DMSO wurde zunächst tropfenweise kaltes RPMI unter Schwenken des Röhrchens zugegeben. Ab einer Füllmenge von etwa 20ml wurde das Röhrchen zügig mit RPMI aufgefüllt und bei 225xg und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Danach wurden die Zellen in PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Zur weiteren Kultivierung wurde das Zellpellet in entsprechendem Medium aufgenommen und in eine Petrischale oder Zellkulturflasche angemessener Größe überführt.

## **4.4 HERSTELLUNG DES REKOMBINANTEN CHCD40L**

### **4.4.1 Proteinexpression in HEK 293-msCD8-chCD40L**

Der Zellkulturüberstand der stabil transfizierten Zelllinie wurde alle zwei bis drei Tage gewonnen und für 10 Minuten bei 225xg abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und in einem sterilen Gefäß bei 4°C aufbewahrt.

### **4.4.2 Konzentrierung des rekombinanten chCD40L**

#### **Material**

**400ml Amicon Rührzelle<sup>6</sup>**

**Filter Diaflo Ultrafiltration Membranen, 10.000Da, 76mm<sup>6</sup>**

**Spritzenvorsatzfilter für Sterilfiltration 0,22µm<sup>29</sup>**

#### **Durchführung**

Für die Konzentrierung wurden zwei Liter des HEK 293-msCD8-chCD40L Zellkulturüberstandes gesammelt. Die Filtermembran wurde vor Beginn für eine Stunde in Aqua dest. eingelegt und anschließend nach Herstellerangaben in die Rührzelle eingebaut. Dann wurden jeweils 300ml Zellkulturüberstand eingefüllt und die Rührzelle verschlossen. Die Rührzelle wurde unter einer N<sub>2</sub> Atmosphäre bei 3,5bar betrieben. Dabei wurde die Rührzelle auf den Magnetrührer gestellt und unter langsamem und gleichmäßigem Rühren konnten Ablagerungen auf dem Filter verringert werden. Dieser Vorgang wurde mehrfach durchgeführt und der Durchfluss in einem sterilen Becherglas gesammelt. Der

Zellkulturüberstand wurde auf 200ml (1:10) konzentriert und durch einen 0,22µm Filter steril filtriert.

#### **4.4.3 Test des konzentrierten chCD40L im ELISA**

Zur Konzentrationsbestimmung des rekombinanten CD40L im konzentrierten Zellkulturüberstand wurde ein *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) verwendet.

##### **Material**

##### **NUNC-Maxisorp Polystyren 96-Lochplatten<sup>7</sup>**

##### **Beschichtungspuffer pH 9,6**

3,11g Natriumcarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )<sup>1</sup>

6g Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )<sup>1</sup>

ad 1000ml Aqua bidest.

Der pH-Wert wurde auf 9,6 eingestellt, die Lagerung erfolgte bei 4°C.

##### **Magermilchlösung 4%**

4g Magermilchpulver<sup>1</sup>

ad 100ml PBS

kurz vor Gebrauch ansetzen

##### **PBS-T (0,05% Tween20)**

0,5ml Tween20<sup>1</sup>

ad 1000ml PBS

##### **TMB-Puffer**

8,2g Na-Azetat ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ )<sup>1</sup>

3,15g Zitronensäure-Monohydrat ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{xH}_2\text{O}$ )<sup>1</sup>

ad 1000ml Aqua bidest

Lagerung bei 4°C

##### **TMB-Stammlösung**

6mg 3,3',5,5' Tetramethylbenzidin (TMB)<sup>1</sup>

ad 1ml DMSO<sup>8</sup>

Lagerung lichtgeschützt bei Raumtemperatur

### **TMB Gebrauchslösung**

10ml TMB-Puffer 37°C

332µl TMB Stammlösung

3,0µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>1</sup>

kurz vor Gebrauch ansetzen und sofort verwenden

### **Schwefelsäure 1M<sup>1</sup>**

### **Proben**

chCD40L ZKÜ

chCD40L ZKÜ konzentriert

chCD40L gereinigt<sup>9</sup> (Positivkontrolle)

<b>Antikörper</b>	<b>Gebundenes Antigen</b>	<b>Isotyp</b>	<b>Tierart</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Hersteller</b>
<b>AV71</b>	chCD40L	IgG2a	Maus	5µg/ml	9
<b>anti-muCD8a-Biotin</b>	muCD8a	IgG2a	Ratte	5µg/ml	10
<b>Streptavidin-POD</b>	Biotin			1:4000	11

**Tabelle 3: Übersicht über die im ELISA verwendeten Antikörper**

### **Durchführung**

Die angegebenen Volumina beziehen sich auf die einzelne Kavität einer Nunc Maxisorb 96-Lochplatte. Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten wurden die Platten mit Hilfe eines ELISA-Washers dreimal mit PBS-T gewaschen. Die Inkubationen erfolgten für 60 Minuten bei 37°C im Wärmeschrank. Alle Verdünnungen erfolgten in PBS-T.

Die Beschichtung der Platten erfolgte am Vortag durch Aufbringen von 100µl des in Beschichtungspuffer verdünnten Antikörpers AV71 und anschließender Inkubation bei 4°C. Am darauffolgenden Tag wurde der nicht gebundene Beschichtungs-Antikörper durch

Waschen der Platte entfernt und die freien Bindungsstellen durch Aufbringen von 200µl einer 4%igen Magermilchlösung blockiert. Nach einer einstündigen Inkubation im Wärmeschrank bei 37°C wurden 100µl der zu testenden Proben aufgetragen. Die Proben wurden vorher in einer  $\log_3$  Titration auf einer separaten Platte verdünnt. Im Anschluss daran folgte die Inkubation mit 50µl des anti-muCD8a-Biotin-Antikörpers für maximal 60 Minuten. Danach wurden 50µl des Streptavidin-POD-Antikörpers hinzugegeben. Die Entwicklung wurde durch die Zugabe von 100µl einer auf 37°C vorgewärmten TMB-Gebrauchslösung und anschließender Inkubation für 5-10 Minuten in Dunkelheit bei Raumtemperatur gestartet. Bei Bindung des chCD40L kam es zu einer Blaufärbung der Probe. Zum Abstoppen der Peroxidasereaktion wurden ohne weiteren Waschschrift 50µl einer 1M Schwefelsäurelösung zugegeben, wodurch sich ein Farbumschlag von blau nach gelb ergab. Die Quantifizierung erfolgte durch Messung bei  $\lambda=450\text{nm}$  im Plattenphotometer.

#### **4.4.4 Test des konzentrierten chCD40L im Proliferationsassay**

Die Proliferation chCD40L stimulierter sowie unstimulierter Zellen wurde durch den Einbau des radioaktiv markierten DNA-Bausteins [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin in sich teilende Zellen quantifiziert.

##### **Material**

**Standardmedium**

**chCD40L ZKÜ konzentriert**

**chCD40L gereinigt<sup>9</sup>**

**[ $^3\text{H}$ ]-Thymidin<sup>14</sup>**

##### **Durchführung**

Die Verdünnung der zu untersuchenden Wachstumsfaktoren wurde in einer 96-Lochplatte mit Standardmedium vorgelegt. Gereinigter chCD40L wurde in einer Konzentration von 5µg/ml und der konzentrierte chCD40L ZKÜ wurde in einer 1:10 Verdünnung verwendet. Alle Proben wurden  $\log_2$  titriert und als Duplikate angesetzt. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. Die Milzleukozytensuspension wurde in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen in einem Volumen von 100µl in Standardmedium pro Delle zu den vorverdünnten Proben hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte für 48 Stunden bei 40°C und 5%CO<sub>2</sub> im Brutschrank. Das Markieren der Zellen erfolgte durch Zugabe von 20µl [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin pro Delle, was einer Aktivität von 0,5µCi/ml bzw. 18,5kBq pro Delle entspricht. Nach einer weiteren

Inkubation für 16 Stunden bei 40°C und 5%CO<sub>2</sub> wurde die Platte bis zur Messung bei -20°C eingefroren. Für die Messung wurden die Zellen mit Hilfe des Harvester-Modells auf einen Glasfilter überführt, bei 70°C getrocknet und schließlich in eine Multiscreen-Platte eingespannt. Pro Delle wurden 20µl der Szintillationsflüssigkeit („Microscint“) aufgetragen und die Platte mit einer Klebefolie abgedichtet. Die Radioaktivität des [<sup>3</sup>H]-Thymidin wurde in einem Beta-Counter mit einer Zählzeit von 1 Minute pro Delle gemessen. Die Proliferation wurde als Funktion der Radioaktivität in cpm dargestellt.

## 4.5 IN VITRO INFEKTIONSEXPERIMENTE

### 4.5.1 Verwendete MDV-Stämme

Name	Serotyp	Vektor	Klassifizierung	Herkunft
MDV (RB-1B UL47-GFP)	GaHV2	pHA2 (pBeloBac)	BSL2	(Jarosinski Kw et al., 2012)
MDV (RB-1B Meq-GFP UL47-RFP)	GaHV2	pHA2 (pBeloBac)	BSL2	(Engel, 2012)

Tabelle 4: Verwendete MDV-Stämme

### 4.5.2 Gewinnung eines MD-Virusstocks

#### Material

**HEF in Einzelzellsuspension**

**Infizierte HEF aus dem Stickstoff**

**HEF-Medium**

**HEF-Medium reduziert**

**PBS**

#### Durchführung

Für die nachfolgenden Arbeiten wurde für beide Virusvarianten ein großer Virusstock angelegt. Dafür wurden HEF in einer Dichte von  $3 \times 10^6$  Zellen/ml in HEF-Medium verdünnt. Ein Gefrierrohrchen der infizierten HEF wurden nach 4.3.6 aufgetaut und das Pellet in 6ml der HEF-Suspension resuspendiert. Die HEF-Suspension aus infizierten und nicht infizierten Zellen wurde auf sechs 10cm-Zellkulturpetrischalen verteilt und mit HEF-Medium auf

10ml/Schale aufgefüllt. Nach sorgfältigem Resuspendieren wurden die Platten bei 40°C für 12-24 Stunden inkubiert und durch einmaliges Waschen mit warmen PBS wurden alle nicht adhärenen Zellen entfernt. Zur weiteren Kultivierung wurde reduziertes HEF-Medium verwendet.

Die infizierten HEF wurden für fünf Tage p.i. kultiviert und eingefroren, wenn mikroskopisch gut sichtbare, große Plaques zu sehen waren. Nach dem einmaligen Waschen wurden die HEF abtrypsiniert und bei 225xg für 5 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet einer Schale wurde in 5,4ml Einfriermedium resuspendiert und auf drei Gefrier Röhrchen verteilt.

Für die großen Virusstocks wurden jeweils 70x 10cm-Petrischalen infiziert. Zum Einfrieren wurden die Zellen aller infizierten Schalen gepoolt und erst dann auf die Gefrier Röhrchen verteilt.

### **4.5.3 Titration des MD-Virusstocks**

#### **Material**

**HEF-Medium**

**HEF in Einzelzellsuspension**

**PBS**

**MD-Virusstock**

#### **Durchführung**

Von einem frisch aufgetauten Gefrier Röhrchen des generierten MDV-Stocks wurden die Verdünnung 1:200, 1:600 und 1:1800 in HEF-Medium angelegt. Diese wurden in einem Doppelansatz auf eine 6-Lochplatte gegeben und pro Delle  $0,7 \times 10^6$  nicht infizierte HEF zugefügt. Nach sorgfältigem Resuspendieren wurden die Platten bei 40°C für 12-24 Stunden inkubiert und dann durch einmaliges Waschen mit warmen PBS alle nicht adhärenen Zellen entfernt. Danach wurde die Platte für weitere vier Tage mit reduziertem HEF-Medium inkubiert, bis eine deutliche Plauebildung erkennbar war.

### **4.5.4 Fixierung und Plauefärbung der infizierten HEF**

#### **Material**

**Infizierte Zellen****Paraformaldehyd (PFA) 4%**<sup>17</sup>

20g Paraformaldehyd

Add 450ml Aqua bidest

Im Wasserbad bei 60°C rühren. Durch die Zugabe von einigen Tropfen NaOH kann das nicht gelöste PFA in Lösung gebracht werden. Lagerung bei 4°C.

**PBS****Triton® X-100**<sup>15</sup>**Bovines Serum Albumin (BSA)**<sup>15</sup>**PBS- Triton 0,5%**

250ml PBS

1,25ml Triton X-100

**PBS- Triton 0,1%**

250ml PBS

0,25ml Triton X-100

**PBS- Triton 0,1% + 1%BSA**

250ml PBS

0,25ml Triton X-100

2,5g BSA

**Vector® ImmPACT NovaRED™, Peroxidase Substrate**<sup>16</sup>

Antigen	Klon	Isotyp	Fluorochrom	Konzentration	Hersteller/Referenz
<b>VP22</b>	B12 (Aszites)	IgG2b	/	1:1000	(Dorange et al., 2000)
<b>gB</b>	K11 (Aszites)	IgG1	/	1:1000	(Blondeau et al., 2007)
<b>muIgG</b>	Anti-muIgG		POD	1:500	20

**Tabelle 5: Für die Plaquetfärbung der viralen Proteine verwendete Antikörper**

## Durchführung

Nach dem Entfernen des Mediums wurden die Zellen durch die Zugabe von 1ml 4%PFA für 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden 1,5ml PBS-Triton 0,5% pro Delle zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Dellen zweimal mit PBS-Triton 0,1% gewaschen und 1,5ml PBS-Triton 0,1% + 1%BSA pro Delle hinzugegeben. Dieser Inkubationsschritt erfolgte für ein Minimum von 30 Minuten oder über Nacht im Kühlschrank. Im nächsten Schritt wurde 1ml des primären Antikörpergemisches (VP22/gB) in den entsprechenden Verdünnungen in PBS-Triton 0,1% + 1%BSA hinzugegeben und für 1 Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Triton 0,1% + 1%BSA wurde der sekundäre Antikörper in PBS-Triton 0,1% + 1%BSA verdünnt und die Dellen mit 1ml der Verdünnung für 1 Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reste des Antikörpers wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS-Triton 0,1% + 1%BSA entfernt. Anschließend wurden 700µl der frisch hergestellten Vector® ImmPACT NovaRED Peroxidase-Lösung hinzugegeben und nach einer Inkubationszeit von 10-15 Minuten wurde die Reaktion durch Waschen mit Aqua dest. gestoppt. Die roten Plaques konnten zur Bestimmung der *plaque-forming-unit* (pfu) makroskopisch gezählt werden.

### 4.5.5 Infektion der primären Lymphozyten

#### Material

**Infizierte HEF (RB-1B UL47GFP, RB-1B MeqGFP-UL47RFP)**

**Primäre Lymphozyten (siehe 4.2)**

**chCD40L gereinigt<sup>9</sup>**

**chCD40L konzentriert**

**TCR-2 ( $\alpha V\beta 1$ ) Antikörper**

**PBS**

#### Durchführung

Die primäre Lymphozytensuspension wurde auf eine Dichte von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt. Nachdem die infizierten HEF, wie in 4.3.6 beschrieben, aufgetaut wurden, wurde das Zellpellet eines Gefrier Röhrchens in 5ml der Lymphozytensuspension sorgfältig resuspendiert.

Für das B-Zellkultursystem wurden die Zellen durch die Zugabe von konzentriertem chCD40L in einer Verdünnung von 1:10 oder von gereinigtem chCD40L in einer Konzentration von 2µg/ml stimuliert.

Die T-Zellstimulation erfolgte durch vorheriges Beschichten der Platten mit dem TCR-2 ( $\alpha V\beta 1$ ) Antikörper in einer Konzentration von 1µg/ml. Bevor die Zellsuspension ausplattiert wurde, wurde der nichtgebundene Antikörper durch einmaliges Waschen mit PBS entfernt.

Die HEF-Leukozytensuspension wurde mit 1ml pro 24-Flachlochplatte oder 500µl pro 48-Flachlochplatte pro Kavität ausplattiert und im Brutschrank bei 40°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Das Medium wurde nach Bedarf durch vorsichtiges Abpipettieren und Zugabe von frischem Medium gewechselt.

Für die Langzeit-Transformationsversuche wurden die Zellen nach Bedarf mit frischem Medium versorgt und auf eine neue 24-Lochplatte umgesetzt, sobald die Kavität mit proliferierenden Zellen dicht bewachsen war.

Für alle Infektionsversuche wurde immer eine nicht infizierte Leukozytenkontrolle mitgeführt, die unter gleichen Bedingungen kultiviert wurde.

#### **4.5.6 Infektion von HEF mit infizierten B- und T-Zellen**

##### **Material**

**HEF-Medium**

**HEF-Medium reduziert**

**HEF in Einzelzellsuspension**

**Sortierte B- und T-Zellen**

**Infizierte HEF (Virusstock)**

**PBS**

##### **Durchführung**

Die nicht infizierten HEF wurden in einer Dichte von  $5 \times 10^5$  Zellen/Delle ausgesät und für vier Stunden bei 37°C inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die infizierten B- und T-Zellen wie in 4.7.1 und 4.7.2 beschrieben durchflusszytometrisch sortiert. Die sortierten infizierten B- bzw. T-Zellen wurden in einer Dichte von  $5 \times 10^4$  Zellen/Kavität in Hühner-Lymphozyten-

Medium auf die bereits adhärenen HEF ausplattiert. Als Negativkontrolle wurden nicht infizierte B-Zellen in einer Dichte von  $5 \times 10^4$  Zellen/Kavität verwendet und als Positivkontrolle dienten infizierte HEF in einer Verdünnung von 1:200. Nach Zugabe der infizierten Zellen wurden die Platten für 30 Sekunden bei 225xg anzentrifugiert. Anschließend wurden die Platten bei 40°C für 12-24 Stunden inkubiert und durch einmaliges Waschen mit warmen PBS alle nicht adhärenen Zellen entfernt. Zur weiteren Kultivierung wurde reduziertes HEF-Medium verwendet. Nach sechs Tagen war eine deutliche Plaquebildung erkennbar und die HEF wurden wie in 4.5.4 beschrieben fixiert und gefärbt.

#### **4.5.7 Infektion von HEF mit der transformierten Zelllinie JS1**

##### **Material**

**HEF-Medium**

**HEF-Medium reduziert**

**HEF in Einzelzellsuspension**

**JS1-Zellen**

**Infizierte HEF (Virusstock)**

**PBS**

##### **Durchführung**

Die HEF wurden in einer Dichte von  $5 \times 10^5$  Zellen/Kavität ausgesät und für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. In der Zwischenzeit wurden Zellen der Linie JS1 in PBS gewaschen und das Pellet in HEF-Medium resuspendiert. Die Zelldichte der lebenden Zellen wurde bestimmt und anschließend wurden sie in einer Dichte von  $2 \times 10^4$ ,  $4 \times 10^3$  und  $8 \times 10^2$  Zellen/Kavität ausplattiert. Als Negativkontrolle dienten nicht infizierte HEF. Nach Zugabe der transformierten Zellen wurden die Platten für 30 Sekunden anzentrifugiert. Anschließend wurden sie bei 40°C für 12-24 Stunden inkubiert und dann durch einmaliges Waschen mit warmen PBS alle nicht adhärenen Zellen entfernt. Zur weiteren Kultivierung wurde reduziertes HEF-Medium verwendet. Nach vier Tagen war eine deutliche Plaquebildung erkennbar und die HEF wurden wie in 4.5.4 beschrieben fixiert und gefärbt.

## 4.6 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN

Die Messungen wurden am FACS CantoII und FACSAriaIIIu durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Programme *BD FACS DIVA Version 3.0* und *FlowJo 7.6.1*.

### Material

#### Fluo-Puffer:

5g Bovines Serum Albumin (BSA)<sup>15</sup>

50mg Natrium Azid (NaN<sub>3</sub>)<sup>1</sup>

Add 500ml PBS pH 7,2, Lagerung bei 4°C

**Normal-Mausserum**<sup>5</sup>: In einer Verdünnung von 1:20 in Fluo-Puffer

**Lebend/Tot-Färbung**: Fixable Viability Dye eFluor 780<sup>18</sup>

**Primäre und sekundäre AK** verdünnt in Fluo-Puffer

**Paraformaldehyd (PFA) 4%**

**PBS**

**Zellen in Einzelzellsuspension**

Für die Färbungen wurden die Zellen in einer 96-Rundlochplatte mit einer Dichte von  $5 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^6$  Zellen/Kavität ausplattiert und durch die kurze Zentrifugation von 1 Minute bei 716xg pelletiert.

Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind der Tabelle 6 und Tabelle 7 zu entnehmen.

Für alle Färbungen wurden die entsprechenden Isotypkontrollen mitgeführt.

Antigen	Klon	Isotyp	Fluochrom (Direktkonjugat)	Konzentration/ Verdünnung	Referenz
chBAFF-R	2C4	IgG1	/	1:5	Selbst
chBu1(B6)	AV20	IgG1	Alexa Fluor 647	2µg/ml	(Rothwell et al., 1996)
chBu1(B6)	AV20	IgG1	RPE	1:100	(Rothwell et al., 1996)
chCD4	2-6	IgG1	/	unverdünnt	(Luhtala et al., 1993)
chCD8	3-298	IgG2b	/	1:2	(Luhtala et al., 1995)

<b>chCD25</b>	AV142	IgG1	/	5µg/ml	19
<b>chCD28</b>	2-4	IgG2a	/	unverdünnt	(Young et al., 1994)
<b>CD30</b>	AV37	IgG2a	/	unverdünnt	(Burgess and Davison, 2002)
<b>chCD40</b>	AV79	IgG2a	/	0,5µg/ml	9
<b>chCD45</b>	16-6	IgG2a	/	unverdünnt	(Viertlboeck and Gobel, 2007)
<b>chCD45</b>	16-6	IgG2a	Alexa Fluor 647	1:400	(Viertlboeck and Gobel, 2007)
<b>chCD80</b>	IAH:F864:DC7	IgG2a	/	0,2µg/ml	19
<b>chCD300</b>		IgG2a	/	unverdünnt	21
<b>chCXCR4</b>	9D9	IgG2a	/	1:10	Selbst
<b>chCXCR5</b>	6D9	IgG2b	/	unverdünnt	Selbst
<b>chIL7-Ra</b>	8F10E11	IgM	/	1:20	22
<b>chL12 (OV-Antigen)</b>	11A9	IgM	/	10µg/ml	(Paramithiotis and Ratcliffe, 1994)
<b>chL-Kette</b>	2G1	IgG1	/	unverdünnt	(Chen et al., 1982)
<b>chL-Kette</b>	2G1	IgG1	Alexa Fluor 647	1:800	(Chen et al., 1982)
<b>chIgM</b>	M1 Techno	IgG1	/	0,5µg/ml	23
<b>chMHCI (β-2-Mikroglobulin)</b>	F21-21	IgG1	/	unverdünnt	(Skjodt et al., 1986)
<b>chMHCI</b>	C6B12	IgG2a	/	1:100	24
<b>chMHCII</b>	2G11	IgG1	/	1:40	11
<b>chMHCII</b>	chIa (Cla)	IgM	RPE	1:1000	23
<b>chTCRγδ</b>	TCR1	IgG1	/	unverdünnt	(Sowder et al., 1988)
<b>chTCRαVβ1</b>	TCR2	IgG1	/	1:5	(Cihak et al., 1988)
<b>chTCRαVβ2</b>	TCR3	IgG1	/	unverdünnt	(Char et al., 1990)
<b>CD15</b>	Anti-huCD15	IgG1	/	2,5µg/ml	25

<b>CD15s</b>	Anti-huCD15s	IgM	/	5µg/ml	25
<b>Isotypkontrollen</b>					
<b>Hapten</b>	F71D7	IgG1	/	1:10	Selbst
<b>mIgG2a</b>			/	5µg/ml	25
<b>duCD8</b>	Anti-duCD8-1	IgG2b	/	unverdünnt	Selbst
<b>mIgM</b>	Anti-mIgM	IgM	/	5µg/ml	5

Tabelle 6: In der Durchflusszytometrie eingesetzte Primärantikörper

<b>Antigen</b>	<b>Klon</b>	<b>Fluorochrom</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Hersteller</b>
<b>muIgG1</b>	anti-muIgG1	APC	1:1000	20
<b>muIgG1</b>	anti-muIgG1	PerCP	1:100	20
<b>muIgG1</b>	anti-muIgG1	RPE	1:300	11
<b>muIgG2a</b>	anti-muIgG2a	AlexaFluor647	1:2000	5
<b>muIgG2a</b>	anti-muIgG2a	APC-CY7	1:250	11
<b>muIgG2a</b>	anti-muIgG2a	RPE	1:300	11
<b>muIgG2b</b>	anti-muIgG2b	APC	1:200	20
<b>muIgG2b</b>	anti-muIgG2b	RPE	1:300	11
<b>muIgGM</b>	anti-muIgM	APC	1:600	11
<b>muIgGM</b>	anti-muIgM	RPE	1:2000	11

Tabelle 7: In der Durchflusszytometrie eingesetzte Sekundärantikörper

#### 4.6.1 Lebend/Tot-Färbung

Für die Lebend/Tot-Färbung wurde das Zellpellet in 200µl PBS resuspendiert und bei 716xg abzentrifugiert, um vorhandene Proteinrückstände auszuwaschen. Dann wurde 1µl Fixable Viability Dye eFluor 780 mit 1ml PBS verdünnt und je  $1 \times 10^6$  Zellen/Kavität wurden in 100µl der Verdünnung resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten auf Eis wurden

die Zellen einmal mit PBS gewaschen und bei 716xg zentrifugiert.

#### **4.6.2 Direkte Färbung mit Fluorochrom-markierten Antikörpern**

Das Zellpellet der bereits Lebend/Tot gefärbten Zellen wurde in 40µl der Antikörper-Lösung resuspendiert und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen durch die Zugabe von 150µl Fluo-Puffer und Zentrifugation bei 716xg, wurde das Zellpellet in 200µl Fluopuffer resuspendiert und in ein Messröhrchen überführt.

Bei Mehrfachfärbungen wurde die 40µl Antikörper-Lösung so angesetzt, dass die verwendeten Antikörper gemeinsam in ihrer Endkonzentration darin enthalten waren.

#### **4.6.3 Indirekte Färbung**

Hierbei wurden die Zellen in 50µl der primären Antikörper-Lösung für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen durch die Zugabe von 150µl Fluo-Puffer und Zentrifugation bei 716xg, wurden die Zellen in 40µl der sekundären, fluoreszenzmarkierten Antikörper-Lösung für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde das Zellpellet in 200µl Fluo-Puffer resuspendiert und in ein Messröhrchen überführt.

Für die Doppelfärbungen, bei denen die betreffenden Antikörper unterschiedliche Isotypen hatten, wurden die jeweiligen primären Antikörper in einer gemeinsamen Antikörper-Lösung in der jeweiligen Endkonzentration verdünnt. Auch die fluoreszenzmarkierten, sekundären Antikörper wurden in einer gemeinsamen Antikörper-Lösung verdünnt.

Wurden bei Mehrfachfärbungen Direktkonjugate und unkonjugierte Antikörper verwendet, so wurden die Direktkonjugate stets mit den Sekundärantikörpern zugegeben.

#### **4.6.4 Mehrfachfärbung mit Antikörpern des gleichen Isotyps**

Bei Mehrfachfärbungen mit Antikörpern des gleichen Isotyps wurde stets der unkonjugierte Primärantikörper mit dem anschließenden fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper zuerst gefärbt (siehe 4.6.3). Nach Abschluss der indirekten Färbung wurden die Zellen in 50µl Normal-Mausserum zum Blockieren für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einmaligem Waschen wurde der zweite Antikörper des gleichen Isotyps als Direktkonjugat eingesetzt.

### 4.6.5 Fixierung

Im Anschluss an die Fluoreszenzfärbung wurden zu den im Messröhrchen befindlichen 200µl Zellsuspension weitere 100µl Fluo-Puffer und 100µl PFA 4% hinzugegeben. Die Lagerung der Proben bis zur Messung erfolgte im Dunkeln bei 4°C.

### 4.6.6 Zytoplasmatische Färbung

#### Material

**BD Cytofix/Cytoperm Kit<sup>25</sup>**

**Fluopuffer**

**PBS**

**Lebend/Tot gefärbte Zellen (siehe 4.6.1)**

Antigen	Klon/Name	Isotyp	Fluorochrom	Konzentration	Hersteller/Referenz
<b>ICP4</b>	E21	IgG1	/	1:1000	(Blondeau et al., 2007)
<b>gB</b>	K11	IgG1	/	1:1000	(Blondeau et al., 2007)
<b>Meq</b>	FD7	IgG1	/	1:100	(Brown et al., 2006)
<b>Hapten</b>	F71D7	IgG1	/	1:10	Selbst
<b>muIgG (H+L)</b>	Anti-muIgG	/	RPE	1:500	11
<b>muIgG1</b>	Anti-muIgG1	/	APC	1:1000	20

**Tabelle 8: Für die zytoplasmatische Färbung verwendete Antikörper**

#### Durchführung

Die zytoplasmatische Färbung erfolgte mithilfe des BD *Cytofix/Cytoperm Kit*. Dafür wurden  $1 \times 10^6$  Lebend/Tot gefärbte Zellen mit PBS gewaschen und zentrifugiert. Anschließend wurden 100µl der *Cytofix/Cytoperm*-Lösung zugegeben. Darin wurden die Zellen 20 Minuten bei 4°C inkubiert und nach einmaligem Waschen mit *Perm/Wash*-Lösung zentrifugiert. Für die Färbung wurden die Zellen in 50µl der *Perm/Wash*-Lösung mit dem primären Antikörper in der entsprechenden Verdünnung für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach dreimaligen Waschen mit *Perm/Wash*-Lösung wurde der sekundäre, fluoreszenzmarkierte

Antikörper in 50µl *Perm/Wash*-Lösung verdünnt und für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln dazugegeben. Nach erneutem dreimaligem Waschen in *Perm/Wash*-Lösung wurden die Zellen in 200µl resuspendiert und in ein Messröhrchen mit weiteren 200µl Fluopuffer überführt.

#### **4.7 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHES SORTIEREN INFIZIERTER ZELLEN**

Das durchflusszytometrische Sortieren wurde am FACSAriaIIIu, ausgestattet mit einem 488nm, 635nm und 562nm Laser, durchgeführt.

##### **Material**

*Biocoll Separating Solution*<sup>2</sup>

**Fluopuffer, steril filtriert**

**70% Ethanol, steril filtriert**

700ml Ethanol<sup>1</sup>

300ml Aqua dest.

##### **Lebend/Tot-Färbung:**

Propidium Iodid (PI), 2,5µg/ml

200µg Propidium Iodid<sup>2</sup>

ad 1ml PBS

7-Actinomycin-D (7-AAD)<sup>15</sup>, 2,5µg/ml

1mg 7-AAD in 50µl Methanol<sup>1</sup> lösen, ad 5ml PBS pH 7,2

Die Lagerung erfolgt in 1ml-Aliquots bei -20°C.

**15ml Zentrifugenröhrchen mit 1ml Hühner-Leukozyten-Medium**

**PBS**

**Antikörper (siehe Tabelle 6)**

**Infizierte und nicht infizierte Leukozyten**

Die 15ml Zentrifugenröhrchen wurden mit dem Hühner-Leukozyten-Medium für etwa eine

Stunde auf dem Rotator gedreht, damit auf der Innenfläche eine gleichmäßige Benetzung der Oberfläche erreicht wurde.

#### 4.7.1 Sortierung der infizierten B-Zellen

Die mit chCD40L stimulierten Bursalymphozyten wurden mit RB-1B UL47GFP infizierten HEF co-kultiviert (siehe 4.5.5). Am ersten Tag nach der Infektion wurden pro Färbung die Lymphozyten von 2,5 24-Lochplatten entnommen, mit PBS gewaschen und bei 225xg für 10 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 5ml PBS resuspendiert und auf 5ml einer *Biocoll Separating Solution* geschichtet. Nach 12-minütiger Dichtezentrifugation bei RT mit 600xg, konnten die an der Interphase befindlichen Leukozyten mit einer Pipette vorsichtig abgenommen werden. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurde das Pellet in 3ml sterilem Fluopuffer resuspendiert. Es erfolgte eine B-Zellfärbung mit dem Alexa Fluor 647 konjugierten anti-chBu1-Antikörper (siehe 4.6.2) und anschließend wurde zur Diskriminierung der toten Zellen PI zugegeben. Für die Mikroarray-Experimente wurden pro Probe insgesamt Lymphozyten von fünf 24-Lochplatten präpariert.

Die Sortierung der infizierten B-Zellen (UL47GFP<sup>+</sup> Proben) aus der Bursalymphozytenpopulation erfolgte auf chBu1<sup>+</sup>, UL47GFP<sup>+</sup> lebende B-Zellen. Für die UL47GFP<sup>-</sup> Proben wurden die infizierten Bursalymphozyten auf chBu1<sup>+</sup>, UL47GFP<sup>-</sup> lebende B-Zellen sortiert.

Als Kontrolle wurden chCD40L stimulierte, nicht-infizierte Bursalymphozyten mit chBu1 und PI gefärbt. Bei diesen Proben wurden die chBu1<sup>+</sup>, UL47GFP<sup>-</sup> lebenden B-Zellen herausortiert. Die sortierten Zellen wurden bis zur weiteren Verarbeitung in einem mit Medium beschichteten Röhrchen kühl aufbewahrt.

Für die MDV-Infektionsversuche der T-Zellen, die mit infizierten B-Zellen infiziert werden sollten, wurden wie oben beschrieben die B-Zellen mit RB-1B MeqGFP-UL47RFP infiziert. Herausortiert wurden Bu1<sup>+</sup>, UL47RFP<sup>+</sup> lebende B-Zellen.

Im Anschluss an die Sortierung erfolgte eine durchflusszytometrische Reanalyse der sortierten Proben.

#### 4.7.2 Sortierung der infizierten T-Zellen

Die mit dem chTCR-2 Antikörper stimulierten Thymozyten wurden mit RB-1B

MeqGFP-UL47RFP infizierten HEF co-kultiviert (siehe 4.5.5). Am dritten Tag nach der Infektion wurden pro Färbung die Lymphozyten von zwei 24-Lochplatten entnommen, mit PBS gewaschen und bei 225xg für 10 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 3ml sterilem Fluopuffer resuspendiert, worauf eine Leukozytenfärbung mit dem APC konjugiertem anti-chCD45-Antikörper und eine B-Zellfärbung mit dem PE konjugierten anti-chBu1-Antikörper folgte (siehe 4.6.2). Anschließend wurde zur Diskriminierung der toten Zellen 7-AAD zugegeben. Die Sortierung der infizierten T-Zellen innerhalb der Thymozyten erfolgte auf MeqGFP<sup>+</sup>, chCD45<sup>+</sup>, chBu1<sup>-</sup> lebende Lymphozyten.

Als Negativkontrolle wurden nicht infizierte, chTCR-2 stimulierte Thymozyten genauso wie die infizierten Thymozyten gefärbt und die chCD45<sup>+</sup>, chBu1<sup>-</sup> lebenden Lymphozyten heraussortiert.

Im Anschluss an die Sortierung erfolgte eine durchflusszytometrische Reanalyse der sortierten Proben und die Zellen wurden bis zur weiteren Verarbeitung in einem mit Medium beschichteten Röhrchen kühl aufbewahrt.

### **4.7.3 Sortierung der infizierten Zellpopulationen für die RT-qPCR-Analyse**

Die mit chCD40L stimulierten Bursalymphozyten wurden mit RB-1B UL47GFP infizierten HEF co-kultiviert und die mit chTCR-2 stimulierten Thymozyten wurden mit RB-1B MeqGFP-UL47RFP infizierten HEF co-kultiviert (siehe 4.5.5).

Die durchflusszytometrische Sortierung der Zellen erfolgte 4, 24, 48 und 72 Stunden nach der Infektion. Allerdings wurden 72 Stunden nach der Infektion nur noch Thymozyten sortiert. Als Negativkontrolle wurden nicht infizierte Bursa- und Thymuslymphozyten 24 Stunden nach Kultivierung sortiert. Für alle Zeitpunkte erfolgte eine gleiche Präparation der Lymphozytenkulturen. Es wurden im Schnitt  $3 \times 10^6$  Zellen pro Probe sortiert.

Pro Färbung wurden die Lymphozyten von einer halben 24-Lochplatte entnommen, mit PBS gewaschen und bei 225xg für 10 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2ml sterilem Fluopuffer resuspendiert.

Für die Bursalymphozyten erfolgte eine B-Zellfärbung mit dem Alexa Fluor 647 konjugierten anti-chBu1-Antikörper im Röhrchen (siehe 4.6.2) und anschließend wurde zur Diskriminierung der toten Zellen PI zugegeben. Die Sortierung der B-Zellenpopulation erfolgt auf chBu1<sup>+</sup> lebende B-Zellen. Als Negativkontrolle erfolgt die gleiche Färbung auf

nicht infizierten, chCD40L stimulierten Bursalymphozyten und es wurde die chBu1<sup>+</sup> lebende B-Zellpopulation herausortiert.

Die Thymozyten wurden mittels des APC konjugiertem anti-chCD45-Antikörper und dem PE konjugierten anti-chBu1-Antikörper (siehe 4.6.2) gefärbt. Anschließend wurde zur Diskriminierung der toten Zellen 7AAD zugegeben. Die Sortierung der T-Zellpopulation erfolgte auf chCD45<sup>+</sup>, chBu1<sup>-</sup> lebende Lymphozyten. Für die Negativkontrolle erfolgt die gleiche Färbung auf nicht infizierten chTCR-2 stimulierten Thymozyten und es wurde eine chCD45<sup>+</sup>, chBu1<sup>-</sup> lebende Zellpopulation herausortiert.

Im Anschluss an die Sortierung erfolgte eine Reanalyse der sortierten Proben. Zur weiteren Aufbewahrung wurden alle Proben nach dem Sortieren bei 470xg zentrifugiert und abhängig von der Zellzahl in 100-400µl PBS resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

## 4.8 NACHWEIS DER VIRUSREPLIKATION IN B- UND T-ZELLEN

Die Analyse der Virusreplikation erfolgte durch den Nachweis von ICP4-Kopien mittels RT-qPCR.

### 4.8.1 Quantitative RT-PCR

#### Material

**DNA extraction: E-Z96 96-well blood DNA isolation kit<sup>30</sup>**

**iNOS probe 5'- FAM - CTCTGCCTGCTGTTGCCAACATGC-TAMRA -3'**

**iNOS qPCR for 5'- GAGTGGTTTAAGGAGTTGGATCTGA -3'**

**iNOS qPCR rev 5'- TTCCAGACCTCCCACCTCAA -3'**

**ICP4 probe 5'- FAM - CCCCCACCAGGTGCAGGCA -TAMRA -3'**

**ICP4 qPCR for 5'- CGTGTTTTCCGGCATGTG -3'**

**ICP4 qPCR rev 5'- TCCCATACCAATCCTCATCCA -3'**

**qPCR master mix: SensiFAST™ Lo-ROX Kit<sup>31</sup>**

#### Durchführung

Für die Quantifizierung der MDV Genomkopien in den infizierten B und T-Zellen zu

bestimmen wurden zunächst die Gesamt DNA präpariert. Die Präparation der DNA erfolgte nach Herstellerangaben. Die Kopien des MDV ICP4 Gen wurde mittels quantitativer PCR (qPCR) mit spezifischen Primern und Sonden detektiert. Die MDV Genom Kopien wurden gegen die Kopien des zellulären iNOS Gen normalisiert. Der qPCR Reaktionsmix setzte sich aus 9,5µl DNA, 10µl SensiFAST™ Master Mix, jeweils 25pmol der genspezifischen Primer und 10pmol der genspezifischen Sonde zusammen. Jede Probe wurde mittels qPCR in Duplikaten durchgeführt. Die qPCR wurde unter den folgenden Bedingungen durchgeführt: Die initiale Denaturierung erfolgt bei 95°C für 20 Sekunden, gefolgt von 40 Zyklen mit der Denaturierung bei 95°C für 3 Sekunden sowie der Annealing- und Elongationsphase bei 60°C für 30 Sekunden. Die Messungen erfolgten mit einem ABI Prism 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) und anschließend mit der *Sequence Detection Systems* Software (Version 1.4, Applied Biosystems) analysiert. Für die exakte Quantifizierung der viralen ICP4 und zellulären iNOS Genen wurde eine Standardkurve erstellt. Die MDV-Genomkopien wurden gegen die zellulären Genomkopien normalisiert.

## **4.9 RNA-PRÄPARATION FÜR DEN MIKROARRAY**

### **4.9.1 RNA-Isolation**

Zur Isolierung der RNA wurde eine Guanidinisothiocyanat-Phenol-Chloroform Extraktion durchgeführt.

#### **Material**

**PeqGold Trifast Reagenz (Trizol)<sup>26</sup>**

Lagerung bei 4°C

**Chloroform ad analysis<sup>1</sup>**

**Aqua bidest, nukleasefrei**

**Isopropanol<sup>1</sup>**

**DNA PrecipitAid<sup>1</sup> (lineares Polyacrylamid)**

**70% Ethanol**

70 ml Ethanol absolut<sup>1</sup>

30ml Aqua bidest, nukleasefrei

## 10% SDS-Lösung<sup>1</sup>

### Durchführung

Alle Arbeiten wurden mit RNAase freiem Einwegmaterial und Handschuhen durchgeführt und jegliches Arbeitsmaterial sowie die Arbeitsflächen wurden mit einer 10%igen SDS-Lösung behandelt.

Die sortierten B-Zellen wurden für 10 Minuten bei 225xg und 4°C zentrifugiert und der Überstand wurde vorsichtig und fast vollständig abgenommen. Je nach Zellzahl wurde das Pellet in der entsprechenden Menge gekühltem Trizol vorsichtig resuspendiert und in ein 1,5ml Gefäß überführt. Lag die Zellzahl bei unter  $1 \times 10^6$  Zellen wurde das Pellet in 300µl Trizol gelöst, bei  $3 \times 10^6$  Zellen in 500µl Trizol. Die folgenden Volumenangaben beziehen sich auf eine Trizolmenge von 500µl.

Nach Zugabe von 100µl Chloroform wurde die Probe 15 Sekunden stark geschüttelt und anschließend für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Mischung für 20 Minuten bei 16.000xg und 6°C zentrifugiert, während in frische 2ml Eppendorf-Gefäße je 250µl Isopropanol vorgelegt wurde. Nach der Zentrifugation wurde die wässrige Phase vorsichtig abgenommen und zum vorgelegten Isopropanol gegeben. Anschließend wurden 4µl lineares Polyacrylamid als Präzipitationshilfe zugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten bei Raumtemperatur zur Fällung der RNA wurden die Proben für 60 Minuten 16.000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt, das Pellet in 1ml 70% Ethanol gewaschen und für 5 Minuten bei 6°C mit 16.000xg zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde insgesamt drei Mal wiederholt. Nach vollständigem Entfernen des Überstandes nach dem letzten Waschschrift wurde das RNA-Pellet getrocknet und in 20µl nukleasefreiem Aqua bidest. aufgenommen. Zum Lösen des Pellets stand es für 10 Minuten bei Raumtemperatur und wurde für 10 Minuten bei 58°C und 300rpm geschüttelt.

Die Lagerung erfolgte kurzfristig bei -20°C.

### 4.9.2 Reinheitsbestimmung der RNA im NanoDrop

Da es sich hier um die Isolation von RNA aus kleinen Zellmengen handelt, wurden als Grenzwert nicht die üblichen mit einem 260/280 Verhältnis von 1,9-2,0 und einem 260/230 Wert von über 2,0 angenommen, sondern es wurde auch Proben mit geringeren 260/280 bzw. 260/230 Verhältnissen zur weiteren Analyse akzeptiert (siehe 5.7.2).

### 4.9.3 Bestimmung der RNA Integrität im Agilent 2100 Bioanalyzer

#### Material

RNA 6000 Nano-Kit<sup>27</sup>

#### Durchführung

Die Proben der isolierten RNA wurden nach Herstellerangaben aufgetragen und analysiert. Für weiter verarbeitete RNA wurde eine RIN von mindestens 8,1 vorausgesetzt.

## 4.10 MIKROARRAY

### 4.10.1 Agilent Mikroarray

Für die Analyse der Proben wurde der Agilent Oligonukleotid Mikroarray „Agilent 8x60k chicken-Genom“ Katalog-Array verwendet. Dieser ermöglicht die gleichzeitige Analyse von acht Mikroarrays auf einem Glasträger mit jeweils 60.000 Spots. Jeder Spot repräsentiert eine aus 60 Nukleotiden bestehende Sequenz, die mit einem speziellen Druckverfahren auf einen Glasträger synthetisiert wurde. Auf dem „Agilent 8x60k chicken-Genom“ Katalog-Mikroarray ist ein Querschnitt aller bekannten Hühnergene zu finden. Zusätzlich bietet Agilent die Möglichkeit, weitere Gene auf dem Mikroarray analysieren zu lassen. Die GenIDs oder Nukleotidsequenzen der Gene wurden in das online verfügbare Programm „eArray“ geladen und durch spezielle Algorithmen wurden für das Gen spezifische Oligonukleotide berechnet. Dadurch konnten zu den bereits von Agilent gespotteten Genen weitere 4.650 Gene analysiert werden. Dazu zählten 1.637 Hühnergene, die spezielle Funktionen im Bereich des Immunsystems erfüllen, und 3.013 MDV-Gene/Genabschnitte. Mängel in der Annotation wurden im Rahmen von früheren Dissertationen über eine eigens für das Projekt AvImmun entwickelte Software „AvI-Blast“ und im Internet verfügbare *ID-Converter* wie *DAVID*, *Babelomics* und *g:Profiler* stark verbessert. Durch diese Arbeiten konnten den 60.000 Spots auf dem Mikroarray 47.142 Proben zugeordnet werden. Da einige Gene wiederholt als Spots auf den Mikroarray geladen wurden, entspricht dies 13.160 Genen, die mit Hilfe des Mikroarrays detektiert werden können. Die Durchführung erfolgte mit Hilfe von Dr. Stefan Schmieder und Dr. Susanne Röhl.

## 4.10.2 cDNA Synthese

### Material

**Low-Input Quick Amp Labeling Kit<sup>27</sup>**

**RNA Spike-In-Kit, one Color<sup>27</sup>**

**RNeasy Mini Kit<sup>27</sup>**

**RNA-Proben**

### Durchführung

Den RNA-Proben wurden als Positivkontrolle sogenannte *Spike-In-RNAs* zugesetzt. Diese bestehen aus zehn definierten Transkripten, die nur minimal selbst- und kreuzhybridisieren. Bei der Hybridisierung binden die *Spike-In-RNAs* an *Spike-In*-Proben. Diese *Spike-In*-Proben weisen keine komplementäre Sequenz zu biologischen Replikaten auf.

Bei der cDNA Synthese wurden 50ng RNA nach Herstellerangaben mit einer rekombinanten Reversen Transkriptase 1:1 in cDNA umgeschrieben. Als Primer für die reverse Transkriptase wurden T7-Promotor-Primer eingesetzt. Diese Primer binden an poly-Adenosin-RNA Abschnitte (poly-A-Schwanz der mRNA), wodurch nur der mRNA-Anteil in cDNA umgeschrieben wird. Gleichzeitig enthalten diese Primer auch eine Promotorsequenz für die in der cRNA-Synthese verwendete T7-RNA Polymerase.

## 4.10.3 cRNA Synthese

### Material

**Low-Input Quick Amp Labeling Kit<sup>27</sup>**

**Cyanine 3 CTP Dye Pack<sup>27</sup>**

### Durchführung

Während der cRNA Synthese kam es neben der Umschreibung von cDNA in cRNA auch zu einer Amplifikation durch die T7-RNA Polymerase. Dabei wurden in die neu synthetisierte cRNA spezielle Nukleotide eingebaut, die zuvor mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert wurden. In unserem Versuch wurden Cytosintriphosphate (CTP) verwendet, die mit einem Polymethin-Farbstoff, dem Cyanine3 (Cy3), gekoppelt wurden. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

#### 4.10.4 Aufreinigung und Bestimmung der spezifischen Cy3 Aktivität

##### Material

**RNeasy Mini Kit<sup>28</sup>**

##### Durchführung

Die Silikatmembran basierte Aufreinigung der cRNA wurde nach Herstellerangaben durchgeführt, um Rückstände aus den bisher durchgeführten Reaktionen aus den Proben zu entfernen. Die Proben wurden im NanoDrop gemessen, um die Gesamt-cRNA Ausbeute und die spezifische Cy3-Aktivität zu bestimmen. Dafür wurde das Verhältnis der Cy3 Konzentration (pmol/μl) zur Menge der Gesamt cRNA (μg) berechnet. Für die weitere Verwendung musste eine cRNA Gesamtmenge von mindestens 0,825μg und eine spezifische Cy3 Aktivität von mehr als 6,0 pmol Cy3 pro μg RNA vorliegen.

#### 4.10.5 Fragmentierung der cRNA

##### Material

**Gene Expression Hybridisation Kit<sup>27</sup>**

##### Durchführung

Zur Optimierung der Hybridisierungskinetik mussten die cRNA Stränge fragmentiert werden. Dafür wurde zu 600ng cRNA 1μl 25x Fragmentarisierungspuffer zugegeben. Diese Mischung wurde exakt 30 Minuten bei 60°C inkubiert. Durch die anschließende Zugabe des Hybridisierungspuffers wurde die Fragmentation gestoppt und die Probe in ein geeignetes Medium für die Hybridisierung überführt.

#### 4.10.6 Hybridisierung des Mikroarrays

##### Material

**8x60k Mikroarray Slides<sup>27</sup>**

**Gasketslides<sup>27</sup>**

##### Durchführung

Zur Hybridisierung wurden 40μl der Hybridisierungsflüssigkeit mit dem Mikroarray inkubiert.

Für alle Arbeitsschritte mit Mikroarray- oder Gasketslides galten hohe Ansprüche an Sauberkeit und Präzision. Alle Arbeitsschritte wurden mit puderfreien Handschuhen durchgeführt, die Slides durften nur seitlich berührt werden und die Luftexposition der Arrays wurde durch rasches Arbeiten minimiert.

Zunächst wurde in eine Hybridisierungskammer ein Gasketslide eingelegt. Dabei handelt es sich um einen Glasträger, auf dem ringförmige Gummidichtungen aufgebracht sind und entsprechend des Mikroarrayformats acht Mikroarrays pro Slide möglich sind. Die Hybridisierungsflüssigkeit wurde mittig in diesen Gummiring pipettiert. Nachdem dies für alle acht Mikroarrays auf dem Gasketslide durchgeführt wurde, entstand durch das Auflegen eines Arrayslides zwischen den beiden Glasträgern ein durch den Gummiring abgedichteter Raum (Gasket-Array-Sandwich). Nach dem Schließen der Hybridisierungskammer wurde kontrolliert, ob die gesamte Arrayfläche vollständig benetzt war und keine Luftblasen die gleichmäßige Hybridisierung behinderten. Die Arrays wurden für 17 Stunden in einem Hybridisierungsofen bei 65°C und 10rpm inkubiert. Dabei wurde die kontinuierliche Durchmischung der Hybridisierungsflüssigkeit durch eine einzelne mobile Luftblase und die gleichmäßige Drehung der Arrays während der Hybridisierung gewährleistet.

#### **4.10.7 Waschen und Scan des Mikroarrays**

##### **Material**

**Gene Expression Wash Buffer 1<sup>27</sup>**

**Gene Expression Wash Buffer 2<sup>27</sup>**

**Triton X-102<sup>27</sup>**

##### **Durchführung**

Nach der Hybridisierung wurden die Mikroarray-Gasketslide-Sandwiches in einem Bad mit 500ml Waschpuffer 1 gewaschen, um die nicht gebundenen cRNA Fragmente zu entfernen. Die Trennung des Mikroarray vom Gasketslide erfolgte mit Hilfe einer Pinzette. Anschließend wurden die Mikroarrays erneut in ein Bad mit Waschpuffer 1 gestellt und dort gesammelt, bis alle bearbeiteten Mikroarrayslides in Waschpuffer 1 standen. Daraufhin kamen die Mikroarrayslides für 1 Minute in Waschpuffer 2 (31°C) und wurden langsam herausgezogen, damit die Flüssigkeit gleichmäßig abfließen konnte. Schließlich wurden die Mikroarrays in einem Agilent G2505C Scanner bei einer Auflösung von 3µm gescannt.

## 4.10.8 Programme zur Auswertung der Mikroarrays

### Agilent Feature Extraction Software Version 10.5.1.1

Die *Agilent Feature Extraction Software* diente zum Einlesen und Prozessieren der Bilddatei des Scans. Dadurch konnten die Daten weiter analysiert werden. Jedem *Feature* bzw. Spot auf dem Mikroarray wurde über ein ausgelegtes Raster eine *Probe-ID* zugeordnet. Außerdem rechnete die Software die Signalintensität jedes *Features* in einen Zahlenwert um. Zeigte ein *Feature* Abnormitäten, wurde es von der Software erkannt und entfernt. Ein Qualitätsreport wurde anhand der mitanalysierten *Spike-In-Proben* erstellt. Außerdem wurde von der Software über die *Spike-In-Proben* der lineare Bereich der Quantifikation, die Nachweisgrenze und der Punkt der Sättigung bestimmt.

### Microarray Pipeline

Zur weiteren Auswertung der Mikroarray Daten wurde das von Alexander Graf programmierte Programm „*Microarray Pipeline*“ verwendet. Dieses bedient sich des Programms Bioconductor „R“ Version 2.12.1 und „*limma*“ (*Linear Models for Microarray Data*) Version 3.6.9 zur Normalisierung und statistischen Auswertung der Daten. Die „*Microarray Pipeline*“ benötigt eine Eingabedatei als tabstop getrennte Textdatei, aus der das Programm die Probenzugehörigkeit erkennt. In dieser Datei wurde der Programmpfad zum Speicherort der extrahierten Arraydaten und den Dateinamen der Datei, in der die Fluoreszenz Intensitäts-Werte der einzelnen Arrays zu finden sind, untereinander gelistet. In einer weiteren Zeile wurde jedem Array eine Probenzugehörigkeit (*Condition*) zugewiesen. Hatte man beispielsweise 15 Arrays in 3 Gruppen mit jeweils 5 Teilnehmern und hat diese in der Textdatei nacheinander gelistet, steht in der erwähnten Zeile: Conditions: a, a, a, a, a, b, b, b, b, b, c, c, c, c, c. In einer weiteren Zeile wurden dem Programm die gewünschten Vergleiche vorgeben (*Comparisons*). Bei einem Vergleich aller Gruppen miteinander, müsste für oben genanntes Beispiel folgendes angegeben werden: *Comparisons*: a-b, a-c, b-c. Des Weiteren konnte der WABG (*Well Above Background*) Wert festgelegt werden, von wie vielen Proben einer Gruppe ein Fluoreszenzsignal eines Spots gemessen werden konnte. Es wurde festgelegt, dass bei fünf Proben pro Gruppe mindestens bei vier der fünf Proben ein Fluoreszenzsignal messbar sein sollte. Nun errechnete das Programm die signifikant regulierten Gene anhand der manuell eingegebenen Grenzen. Für die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Experimente wurden Gene mit einem mindestens zweifachen Expressionsunterschied zwischen zwei Gruppen und einer FDR (*False Discovery Rate*) von

weniger als oder gleich 1%, bzw. einem *adjusted p-value* von kleiner gleich 0,01 als signifikant reguliert betrachtet. Das Programm stellte verschiedene Ausgabedateien zur Verfügung. Zum einen die Qualitätskontrollen mit einer graphischen Darstellung der Daten vor und nach der Normalisierung (*raw\_data\_boxplot*, *mean\_Sd\_plot*, *\_normalized\_data\_boxplot* und *heatmap*) und einer Textdatei mit VSN (*Variance Stabilization and Normalization*) normalisierten Werten. Zudem erhielt man eine durch *limma* generierte Textdatei, aus der man alle Expressionswerte und die FDR, bzw. den *adjusted p-value*, ersehen kann. Diese kann man nun wiederum anhand des gewünschten Signifikanzniveaus filtern und mit den verbliebenen signifikant regulierten Genen manuell weiterarbeiten. Zusätzlich erhielt man verschiedene Graphiken in Form von .pdf Dateien. Aus einer dieser Dateien kann man in Form von Venn-Diagrammen die Schnittmengen an Genen zwischen den Gruppen erkennen. Zwei weitere .pdf Dateien stellen die Gene in Form einer MeV (*Multi experiment Viewer*) Analyse als *heatmap* bzw. in Form einer MeV SOTA (*Self Organizing Tree Algorithm*) Analyse als Clusteranalyse dar. Zur Generierung der *heatmap* wurden die gespotteten Gene mit dem Programm *heatmap.2* aus dem Paket *clValid* geplottet. Dazu wurden die Expressionswerte mit Hilfe der Reihenmittelwerte normalisiert, um den gleichen dynamischen Bereich zwischen den einzelnen Genen zu erhalten. Zur Distanzberechnung wurde die euklidische Distanzmatrix verwendet. Die Distanzwerte werden dann heuristisch geclustert und in einer *heatmap* dargestellt. Die Clusteranalyse wurde ebenfalls mit dem Paket *clValid* durchgeführt. Dazu wurden wiederum die Expressionswerte mit Hilfe der Reihenmittelwerte normalisiert und anschließend die Matrix mit der SOTA Funktion geplottet. Auch hier wurden die Distanzen mit der euklidischen Distanzmatrix berechnet. Diese Art der Analyse diente der Darstellung dynamischer Expressionsverläufe zwischen den Gruppen. Für beide Analysen erhielt man zudem noch Textdateien mit den Genen, die in den verschiedenen Clustern zu finden sind.

### **Berechnung der Expressionsänderung (fold change)**

Mit dem *fold change* (FC) können Expressionsänderungen zwischen zwei Gruppen errechnet werden. Dafür wurden in einer Excel Tabelle die Probe-IDs der einzelnen Spots und deren durch die „Microarray Pipeline“ errechnete Koeffizient der einzelnen Vergleiche gelistet. Dieser Koeffizient gibt den logarithmierten FC jedes Spots der verschiedenen Gruppenvergleiche wider. Der FC wurde errechnet, indem man diesen Koeffizienten zur Basis 2 exponenziert hat. Werte über 1 bedeuten, dass ein Spot in Gruppe 2 eine höhere Expression als in Gruppe 1 hat. Werte zwischen 0 und 1 bedeuten, dass ein Spot in Gruppe 2

eine weniger starke Expression als in Gruppe 1 hat. Ein Wert von 1 bedeutet, dass es keinen Expressionsunterschied zwischen Gruppe 1 und Gruppe 2 gibt. Zur vereinfachten Darstellung und besseren Interpretationsmöglichkeit der herunterregulierten FC-Werte wurden diese in negative Zahlenwerte umgerechnet. Dafür wurde folgende Excel Funktion durchgeführt: =WENN(FC<1;-1/FC;FC). So ergab sich aus einem FC von 0,5 vor der Umrechnung ein Wert von -2, also eine 2-fach schwächere Regulation/Herunterregulation des Spots.

## Microsoft Office Access Datenbanksystem

Zur vergleichenden Analyse verschiedener Datensätze wurde Microsoft Access 2010 verwendet.

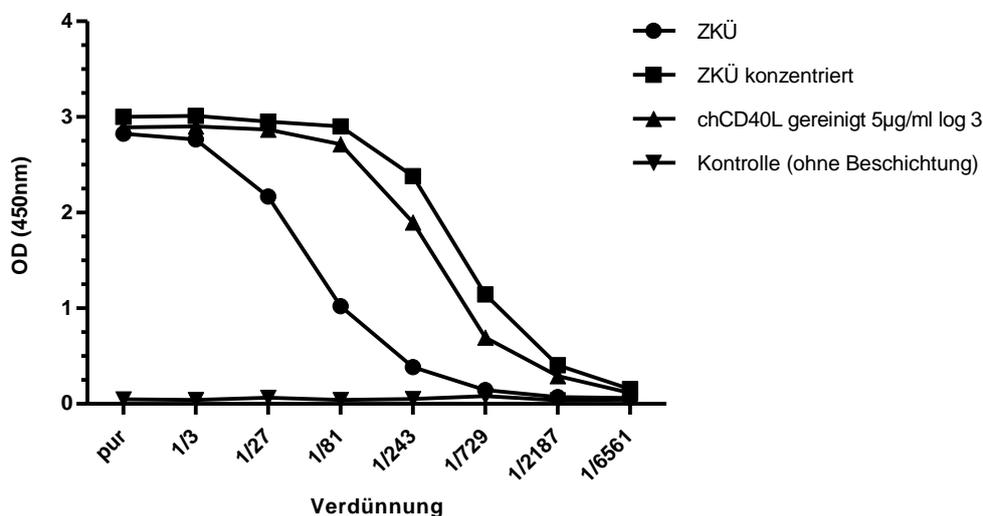
## Pathway Express

Die Datensätze mit signifikant regulierten *Spots* aus den Mikroarray Experimenten wurden mit dem online Programm „Pathway Express“ (*Intelligent Systems and Bioinformatic Laboratory*) analysiert. Mit diesem Programm können die für die Analyse biologisch relevanten Signalwege identifiziert werden. Dabei bedient sich das Programm der KEGG Datenbank (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). Für die Analyse mit „Pathway Express“ müssen eine Eingabedatei und eine Referenzdatei als Textdateien erstellt werden. Die Eingabedatei enthält die Gensymbole der signifikant regulierten Spots und die entsprechenden FCs. Die Referenzdatei enthält alle orthologen Gensymbole, die auf dem Mikroarray zu finden sind. Als Ergebnis der Analyse erhält man ein Datenblatt mit den identifizierten Signalwegen und einigen weiteren Parametern. Außerdem erhält man eine Graphikdatei mit dem entsprechenden Signalweg. Zu den Parametern gehört der *Impact* Faktor, der *p-value* des Signalwegs und der *corrected gamma p-value*. Der *Impact* Faktor repräsentiert die Eindeutigkeit der enthaltenen Gene und deren Lage im Signalweg. Der *p-value* die Signifikanz des Signalwerts. Der *corrected gamma p-value* wird aus dem *Impact* Faktor, dem FC und dem *p-value* errechnet. Er spiegelt die biologische Relevanz des Signalwegs wider. Als Grenzwert für die biologische Relevanz des Signalwegs wurde ein *corrected gamma p-value* von kleiner als 0,25 festgelegt.

## 5. ERGEBNISSE

### 5.1 HERSTELLUNG VON REKOMBINANTEM LÖSLICHEM HÜHNER-CD40LIGAND

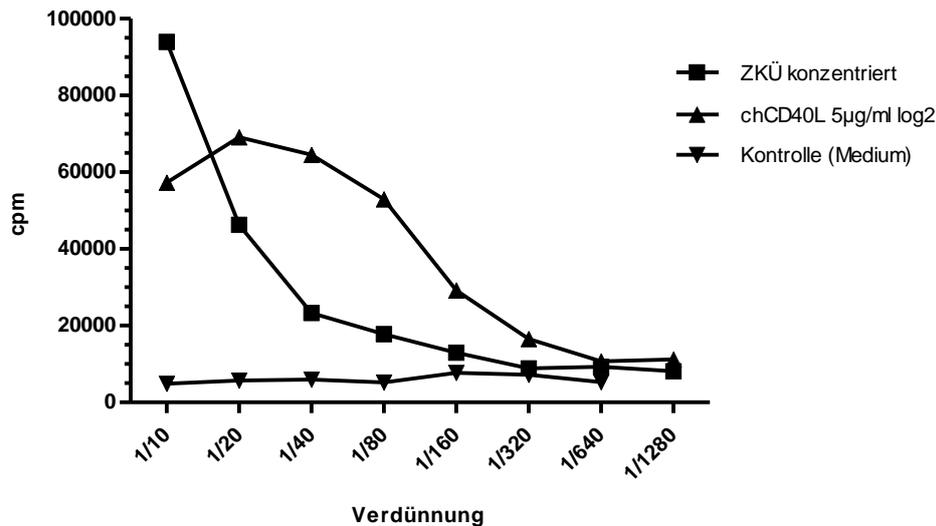
Bisherige Versuche primäre Lymphozyten *in vitro* mit MDV zu infizieren, waren weitgehend erfolglos (siehe 2.2.2 und 2.2.4.). Voraussetzung zur Etablierung eines *in vitro* Infektionssystems für B-Zellen ist daher die Langzeitkultivierung von Hühner-B-Zellen. Frühere Arbeiten haben insbesondere den Effekt von chCD40L auf eine verlängerte Überlebenszeit in Kultur, sowie die Differenzierung und Proliferation der kultivierten B-Zellen aufgezeigt (Kothlow et al., 2008). Für die Etablierung eines B-Zellinfektionssystems wurde daher chCD40L zur Stimulation der primären Lymphozyten benötigt. Hierzu wurde rekombinanter chCD40L im Zellkulturüberstand (ZKÜ) der stabil transfizierten Zelllinie HEK 293-msCD8-chCD40L gewonnen und mit Hilfe einer Amicon Rührzelle 10-fach konzentriert. Um den Gehalt an chCD40L zu quantifizieren, wurden die Proben im ELISA, wie unter 4.4.3 beschrieben, titriert. Wie die Abbildung 6 zeigt, wurde chCD40L in den ZKÜ sezerniert und konnte erfolgreich konzentriert werden. Als Standard wurde gereinigter chCD40L in einer Konzentration von 5µg/ml verwendet.



**Abbildung 6: Quantifizierung von rekombinatem chCD40L im ZKÜ**

Der Überstand stabil transfizierter HEK 293-msCD8-chCD40L-Zellen wurde im ELISA auf den Gehalt von chCD40L getestet. Verglichen wurde ZKÜ mit dem in einer Amicon Rührzelle konzentrierten ZKÜ. Als Standard diente gereinigter chCD40L in reiner Konzentration von 5 µg/ml.

Um die biologische Aktivität des chCD40L zu testen, wurde die proliferative Wirkung des konzentrierten ZKÜ und des gereinigten chCD40L auf Milzleukozyten durch den Einbau des radioaktiv markierten DNA-Bausteins [<sup>3</sup>H]-Thymidin bestimmt. Abbildung 7 zeigt die Proliferation der Milzleukozyten als Reaktion auf die Stimulation mit chCD40L im Vergleich zu gereinigtem chCD40L. Es konnte eine klare Dosis-Wirkungsbeziehung nachgewiesen werden.



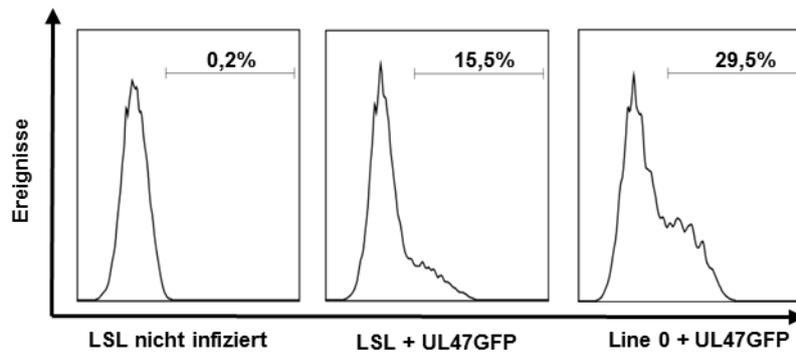
**Abbildung 7: Biologische Aktivität des chCD40L im Proliferationsassay**

Der konzentrierte Überstand von stabil transfizierten HEK 293-msCD8-chCD40L wurde im Proliferationsassay auf primären Milzleukozyten getestet. Die Zellproliferation wurde durch die Quantifizierung des [<sup>3</sup>H]-Thymidineinbaus bestimmt.

Für die weiteren Arbeiten wurde chCD40L in einer 1:10 Verdünnung oder gereinigter chCD40L in einer Konzentration von 2µg/ml verwendet.

## 5.2 GEWINNUNG EINES MD-VIRUSSTOCKS

Um einen ausreichend großen Virusstock an MDV-infizierten HEF für die nachfolgenden Infektionsversuche zu generieren, wurden HEF von zwei Hühnerlinien verglichen. Verwendet wurden HEF der LSL-Linie und der retrovirusfreien Linie „Line 0“. Beide HEF-Linien wurden mit RB-1B UL47GFP Virus infizierten HEF co-kultiviert und nach sechs Tagen p.i. wurden die abtrypsinierten Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Dabei zeigte sich, dass der Anteil an UL47GFP<sup>+</sup> Zellen bei den Line 0-HEF etwa doppelt so hoch war wie bei den LSL-HEF (Abbildung 8).

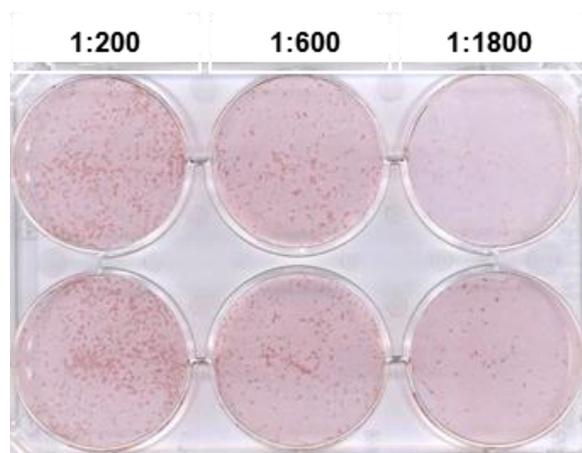


**Abbildung 8: Vergleich der Infektionsraten von Fibroblasten verschiedener Hühnerlinien**

Primäre Line 0-HEF und primäre LSL-HEF wurden mit RB-1B UL47GFP infizierten Fibroblasten co-kultiviert und sechs Tage p.i. wurde der Anteil an UL47GFP positiven HEF durchflusszytometrisch bestimmt.

Für die Generierung eines großen Virusstocks wurden daher Line 0-HEF verwendet. Nachdem die infizierten Kulturen fünf Tage p.i. deutlich sichtbare Plaques zeigten, wurden die Fibroblasten abtrypsiniert, eingefroren und in Flüssigstickstoff gelagert.

Um den Anteil der infizierten Zellen und damit die *plaque forming unit* (pfu) des angelegten Virusstocks zu bestimmen, wurden Line 0-HEF mit drei Verdünnungsstufen eines Gefrier Röhrchens des MDV-Stocks co-kultiviert (siehe Abbildung 9). Nach sechs Tagen p.i. wurden die Zellen fixiert und die Plaques mit den mAKs gegen das gB- und VP22-Antigen gefärbt.



**Abbildung 9: Titerbestimmung des MDV-Stocks auf Line 0-HEF**

Line 0-HEF wurden mit dem RB-1B UL47GFP Virusstock in den angegebenen Verdünnungen infiziert. Sechs Tage p.i. wurden die Plaques mit mAKs gegen das gB- und VP22-Antigen gefärbt und mit Hilfe eines Peroxidase-Färbekits sichtbar gemacht.

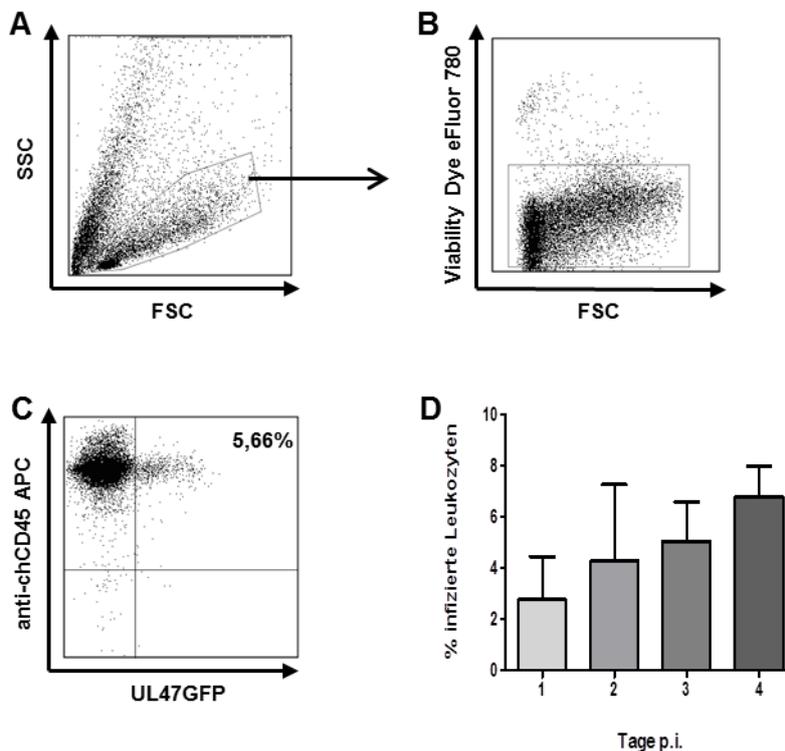
Ab einer Verdünnungsstufe von 1:1800 waren Einzelplaques zählbar und die Plaquezahl pro Delle lag bei 64 bzw. 67 Plaques. Damit lag die pfu bei 188800 pro Gefrier Röhrchen des Virusstocks.

## **5.3 IN VITRO MDV INFEKTION VON KULTIVIERTEN B-LYMPHOZYTEN**

### **5.3.1 Infektion und Charakterisierung von Milz-B-Zellen**

Mit der Herstellung von rekombinantem chCD40L und der Generierung eines MD-Virusstocks waren die wichtigsten Vorarbeiten zur Erarbeitung eines *in vitro* B-Zellkultursystems erbracht.

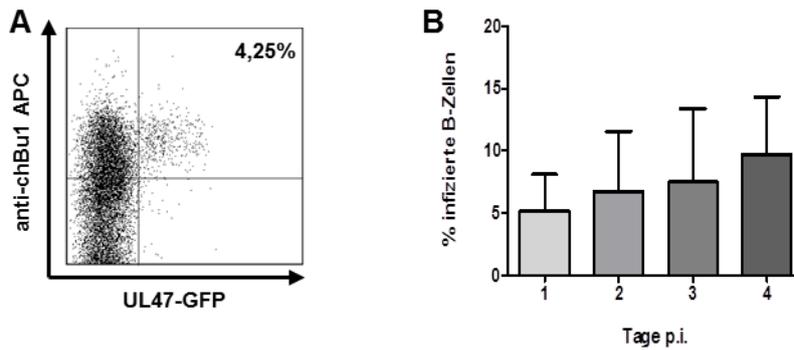
In einer ersten Versuchsreihe wurden primäre Milzleukozyten durch Zugabe von chCD40L stimuliert und mit RB-1B UL47GFP infizierten HEF co-kultiviert. Um festzustellen, ob die Zellen der Milzleukozytenkultur infiziert waren, wurden sie durchflusszytometrisch analysiert (Abbildung 9). Zunächst wurde ein Leukozytengate gesetzt (Abbildung 9A) und anschließend anhand der Lebend-Tot-Färbung die toten Zellen von der Analyse ausgeschlossen (Abbildung 9B). Diese Gatingstrategie wurde im Folgenden für alle durchflusszytometrischen Messungen dieser Arbeit angewandt. Da sich innerhalb der analysierten Zellpopulation auch noch infizierte HEF befanden, wurde die Leukozytenpopulation durch die Färbung mit einem anti-chCD45 Antikörper abgegrenzt (Abbildung 9C). Dadurch konnte verhindert werden, dass die co-kultivierte HEF falsch-positiv als infizierte Leukozyten gezählt wurden. Die Analyse der lebenden Milzleukozytenpopulation zeigte, dass an Tag 3 p.i. 5,66% der Zellen das grün fluoreszierende UL47GFP exprimierten. In der durchgeführten Kinetik von Tag 1 bis Tag 4 p.i. war ein deutlicher Anstieg infizierter Leukozyten zu erkennen (Abbildung 9D).



**Abbildung 9: Infektion von Milzleukozyten mit RB-1B UL47GFP**

Milzleukozyten wurden mit chCD40L stimuliert und mit RB-1B UL47GFP infizierten HEF co-kultiviert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion wurde der Anteil an infizierten Leukozyten durchflusszytometrisch bestimmt. Hierzu wurde zunächst ein Leukozytengate gesetzt (A) und aus diesem die toten Zellen mittels einer Lebend/Tot-Färbung ausgeschlossen (B). Die Milzleukozyten wurden weiterhin durch die Färbung mit dem pan-Leukozytenmarker chCD45 von den Inokulum-Fibroblasten unterschieden. Die infizierten Milzleukozyten konnten anhand der UL47GFP-Expression identifiziert werden (C). Die Anzahl der infizierten Milzleukozyten wurde in vier unabhängigen Versuchen ( $MW \pm STABW$ ) über einen Zeitraum von vier Tagen gemessen (D).

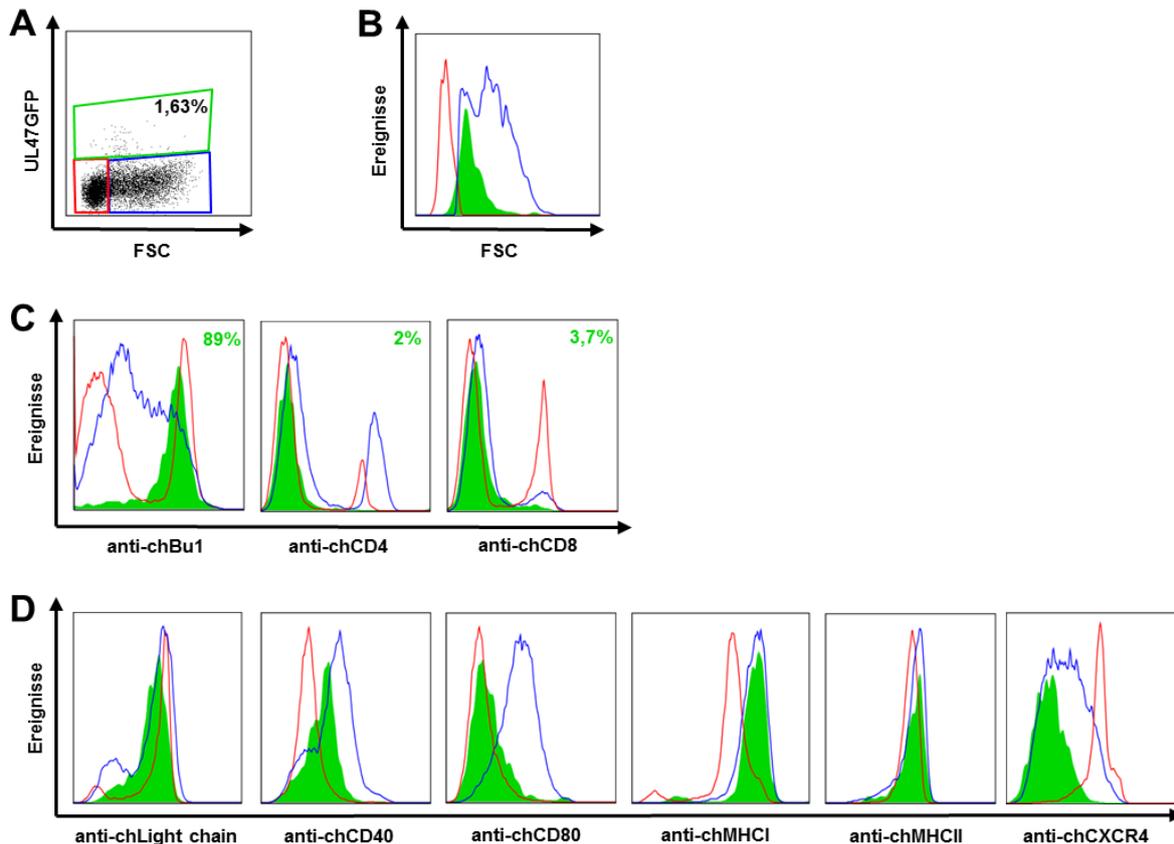
Um nachzuweisen, dass wie unter *in vivo* Bedingungen Milz-B-Zellen infiziert werden, wurden die Milzleukozyten mit dem pan-B-Zellmarker chBu1 gefärbt (Abbildung 10A). Die Versuche zeigten, dass der Großteil der infizierten Milzleukozyten tatsächlich B-Zellen sind. In der Kinetik über vier Tage wurde der relative Anteil infizierter B-Zellen innerhalb der B-Zellpopulation analysiert (Abbildung 10B), wobei ein kontinuierlicher Anstieg der Infektionsrate über den Untersuchungszeitraum zu erkennen war.



**Abbildung 10: Infektion von Milz-B-Zellen mit RB-1B UL47GFP**

Die Milzleukozyten wurden mit chCD40L stimuliert und mit RB-1B UL47GFP infizierten HEF co-kultiviert. Um den Prozentsatz der infizierten B-Zellen innerhalb der lebenden Milzleukozytenpopulation zu bestimmen, wurde die Milzleukozytensuspension mit dem pan-B-Zellmarker chBu1 gefärbt (A). Die relative Anzahl der infizierten B-Zellen wurde über einen Zeitraum von vier Tagen p.i. aus vier unabhängigen Versuchen ( $MW \pm STABW$ ) bestimmt (B).

Zur weiteren Phänotypisierung der infizierten B-Zellen, wurde die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle durchflusszytometrisch analysiert (Abbildung 11). Anhand der Zellgröße und der Expression von UL47GFP konnten drei Zellpopulationen diskriminiert werden (Abbildung 11A). Zum einen konnten die nicht infizierten Leukozyten in kleine Leukozyten und große, blastoide Leukozyten unterteilt werden, während die infizierten Leukozyten eine intermediäre Zellgröße aufwiesen (Abbildung 11B). Um den Phänotyp der infizierten B-Zellen näher zu charakterisieren, wurden die gewählten Oberflächenantigene jeweils in einer Doppelfärbung mit dem B-Zellmarker chBu1 gefärbt. In einer ersten Analyse zeigte sich, dass praktisch alle infizierten Zellen B-Zellen waren, während nur eine sehr kleine Population an  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen eine UL47GFP-Fluoreszenz aufwiesen (Abbildung 11C).



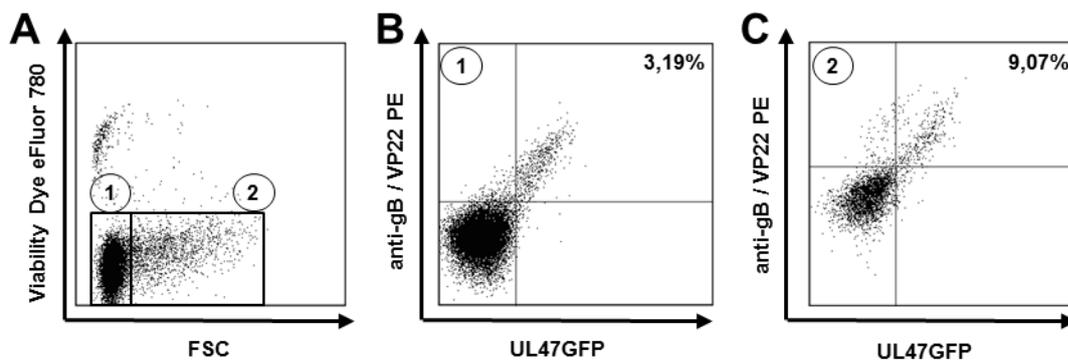
**Abbildung 11: Phänotypische Charakterisierung der infizierten Milzleukozyten**

chCD40L stimulierte Milzzellkulturen wurden mit RB-1B UL47GFP infizierten HEF co-kultiviert und drei Tage p.i. nach Mehrfachfärbung durchflusszytometrisch analysiert (A). Nicht infizierte kleine (rote Linie) und große, blastoide B-Zellen (blaue Linie) konnten von GFP+ infizierten B-Zellen (grüne Linie) durch intermediäre FSC Charakteristika unterschieden werden (B). Durch die Färbung mit B- und T-Zellmarkern wurden die unterschiedlichen Zellpopulationen bestimmt (C). Die Expression der verschiedenen Oberflächenmoleküle auf den drei B-Zellpopulationen ist in Abbildung D dargestellt.

Die infizierten Milz-B-Zellen unterschieden sich hinsichtlich der Expression einiger Oberflächenmoleküle, wie der leichten Kette des BCR (*chLight chain*) oder dem chMHC-Klasse-II-Molekül (*chMHCII*), nicht von den nicht infizierten, kleinen oder blastoiden B-Zellen. Andere Oberflächenmoleküle zeigten bei den infizierten B-Zellen das gleiche Expressionsmuster wie bei den blastoiden B-Zellen, z.B. das chMHC-Klasse-I-Molekül (*chMHCI*) oder *chCXCR4*. Die dritte Gruppe beinhaltete das Oberflächenmolekül *chCD80*, das auf den infizierten B-Zellen eine ähnliche Expression zeigte wie auf den kleinen, nicht infizierten B-Zellen, während auf den Blasten *chCD80* hochreguliert wurde. *chCD40* zeigte auf den infizierten B-Zellen ein ähnliches Expressionsmuster wie auf den blastoiden B-Zellen, allerdings war es dort schwächer exprimiert.

Um die Infektion der primären Leukozyten durch eine zweite Nachweismethode zu

bestätigen, wurden mit infizierten HEF für drei Tage co-kultivierte Milzleukozyten zytoplasmatisch mit mAKs gegen die viralen Proteine gB und VP22 gefärbt. Bei der durchflusszytometrischen Analyse konnten die Milzleukozyten in eine kleine und eine blastoide Zellpopulation unterteilt werden (Abbildung 12A). Innerhalb beider Populationen zeigte sich, dass fast alle UL47GFP<sup>+</sup> Leukozyten auch zytoplasmatisch gB/VP22 exprimierten. Nur eine kleine Population der blastoiden Zellen erschien UL47GFP<sup>niedrig/-</sup> zu sein. Der Anteil der infizierten Zellen war innerhalb der Blastenpopulation dreimal so hoch wie in der Population kleiner Leukozyten (Abbildung 12B und C). Aufgrund des Nachweises, dass alle UL47GFP<sup>+</sup> Zellen auch die viralen Proteine gB und VP22 exprimieren, wurde im folgendem ausschließlich die UL47GFP Expression als Nachweis der MDV-Infektion der Zellen genutzt.

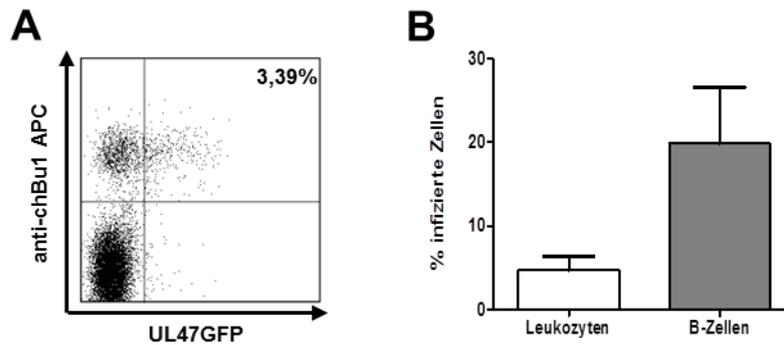


**Abbildung 12: Zytoplasmatische Färbung viraler Proteine in Milzleukozyten**

chCD40L stimulierte Milzleukozyten wurden mit RB-1B UL47GFP infizierten HEF co-kultiviert. Die durchflusszytometrische Analyse drei Tage p.i. zeigt eine kleine (1) und eine blastoide (2) Population (A). Beide Populationen beinhalten infizierte Zellen, die durch die gleichzeitige Expression von UL47GFP und die zytoplasmatische Färbung mit den mAKs gegen die viralen Proteine gB und VP22 identifiziert werden konnten (B, C).

### 5.3.2 Infektion und Charakterisierung von Blut-B-Zellen

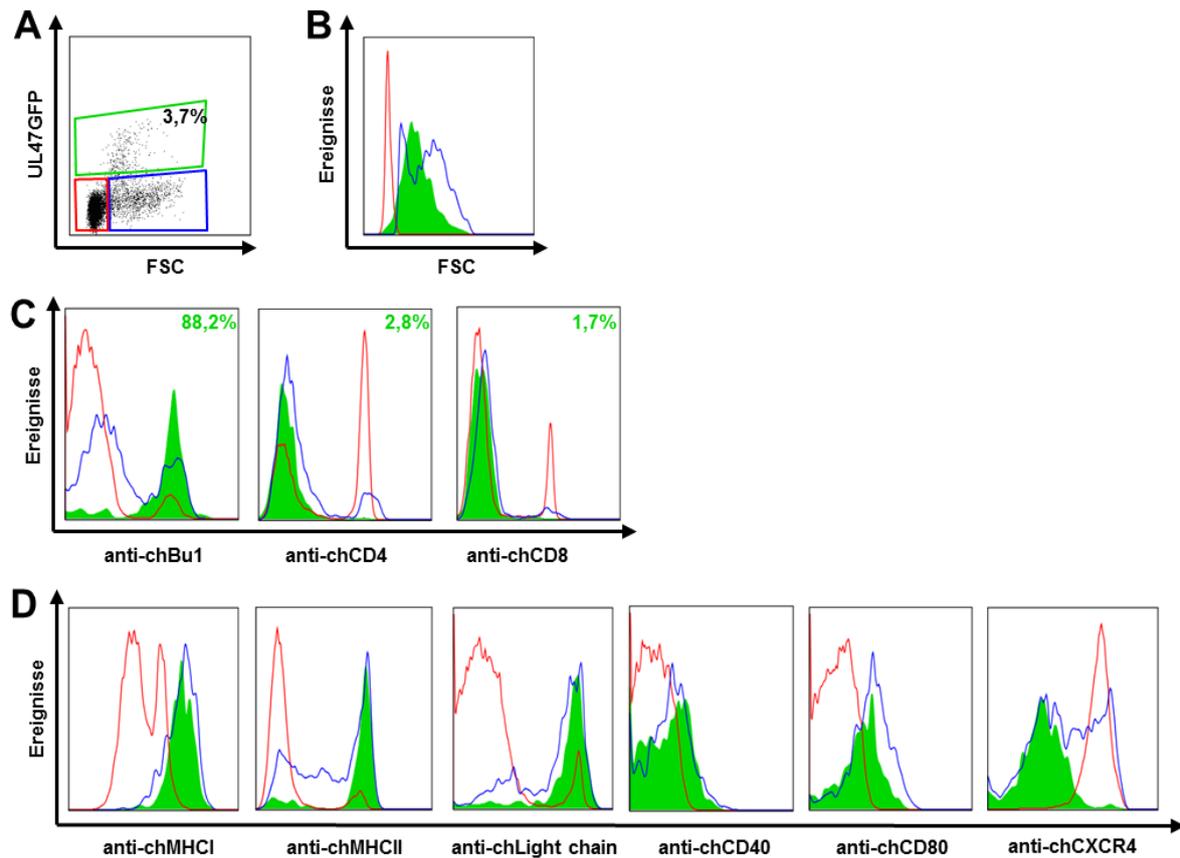
Nachdem Milzleukozyten *in vitro* infiziert werden konnten und die infizierten B-Zellen näher charakterisiert wurden, stellte sich die Frage, ob auch Blutleukozyten infizierbar sind. Dafür wurden mit Hilfe der sogenannten *Slowspeed-Zentrifugation* (4.2.2) gewonnene Blutleukozyten mit RB-1B UL47GFP infizierten HEF co-kultiviert. Drei Tage p.i. wurden die Leukozyten durchflusszytometrisch analysiert und die lebenden B-Lymphozyten mit dem pan-B-Zellmarker chBu1 dargestellt (Abbildung 13A). Innerhalb der Leukozytenpopulation waren ca. 4% der Zellen infiziert. Der Anteil der infizierten B-Zellen innerhalb der B-Zellpopulation lag mit ca. 20% deutlich höher (Abbildung 13B).



**Abbildung 13: Infektion von Blutleukozyten mit RB-1B UL47GFP**

PBL wurden mit chCD40L stimuliert und mit RB-1B UL47GFP infizierten HEF co-kultiviert. Um den Prozentsatz der infizierten B-Zellen innerhalb der lebenden Leukozyten mittels der durchflusszytometrischen Analyse zu bestimmen, wurde die Blutleukozytensuspension mit dem pan-B-Zellmarker chBu1 gefärbt (A). Die relative Anzahl der infizierten B-Zellen (chBu1<sup>+</sup>) und die Anzahl der infizierten Leukozyten (chCD45<sup>+</sup>) wurde in drei unabhängigen Experimenten (MD±STABW) an Tag 3 p.i. bestimmt (B).

Um die infizierten Blutleukozyten weitergehend zu charakterisieren, wurden die Blutleukozyten drei Tage p.i. nach Fluoreszenzfärbung verschiedener Oberflächenmarker durchflusszytometrisch analysiert. Anhand der UL47GFP-Expression und der Zellgröße konnten die Blutleukozyten in drei Populationen unterteilt werden. Die nicht infizierten Leukozyten ließen sich anhand des FSC (*Forward Scatter*) in kleine und blastoide Leukozyten unterscheiden (Abbildung 14A). Die infizierten Blutleukozyten zeigten, wie in Abbildung 14B dargestellt wird, analog zu den infizierten Milzleukozyten, eine intermediäre Zellgröße. Bei den infizierten Zellen handelte es sich zum überwiegenden Teil (>88%) um B-Zellen, während nur ein kleiner Teil aus CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Abbildung 14C) bestand.



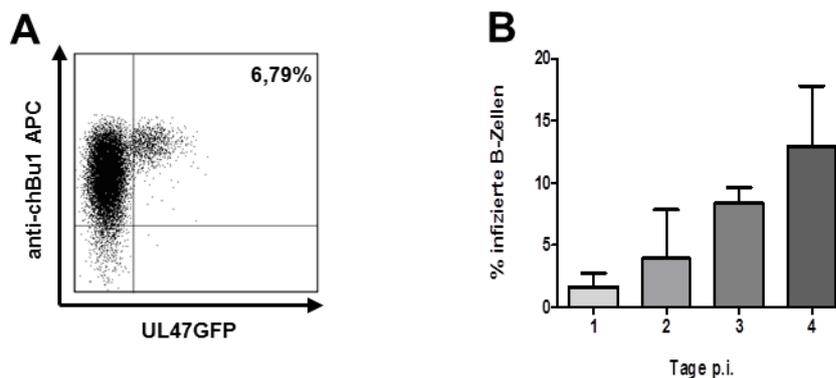
**Abbildung 14: Phänotypische Charakterisierung der infizierten Blutleukozyten**

Die Blutleukozyten wurden mit chCD40L stimuliert und mit RB-1B UL47GFP infizierten HEF co-kultiviert. Lebende nicht infizierte, kleine (rote Linie), nicht infizierte, blastoide (blaue Linie) und infizierte Leukozyten (grün gefüllte Linie) konnten anhand der Expression von UL47GFP unterschieden werden (A). Die Zellgröße aller Populationen (B) und die Zellart der infizierten Population (C) wurde drei Tage p.i. durchflusszytometrisch bestimmt. Die Expression der dargestellten Oberflächenantigen (D) wurde zwischen den drei Populationen verglichen. Dargestellt ist eines von drei unabhängigen Experimenten.

Die weitere Phänotypisierung der infizierten Zellen erfolgte durch die Fluoreszenzfärbung verschiedener Oberflächenmoleküle (Abbildung 14D). Dabei wurde die infizierte Zellpopulation mit den nicht infizierten kleinen und blastoiden Leukozyten verglichen. Für die Oberflächenmarker chMHCI, chCD40 und chCD80 glich das Expressionsmuster dem der blastoiden Leukozyten. Das chMHC-Klasse-II-Molekül wurde von den meisten infizierten Zellen hoch exprimiert, jedoch war eine kleine Population chMHC-II<sup>+</sup>. chCXCR4 wurde nur sehr gering auf der Zelloberfläche von infizierten Blutleukozyten exprimiert, während alle kleinen und etwa die Hälfte der blastoiden Leukozyten ein höheres chCXCR4-Niveau exprimierten.

### 5.3.3 Infektion und Charakterisierung von Bursa-B-Zellen

Nachdem Milz- und Blut-B-Zellen infiziert werden konnten, wurde im Weiteren die B-Zellen der Bursa Fabricii mit chCD40L stimuliert und mit RB-1B UL47GFP infizierten HEF co-kultiviert. Durch die chBu1 Färbung zeigte sich, dass 97% der gesamten Bursaleukozyten B-Zellen waren, von denen an Tag 2 p.i. 6,79% infiziert waren (Abbildung 15A). Die Kinetik über einen Zeitraum von vier Tagen p.i. zeigte einen Anstieg des Anteils der infizierten B-Zellen von etwa 2,5% an Tag 1 auf 16% an Tag 4 p.i. (Abbildung 15B).



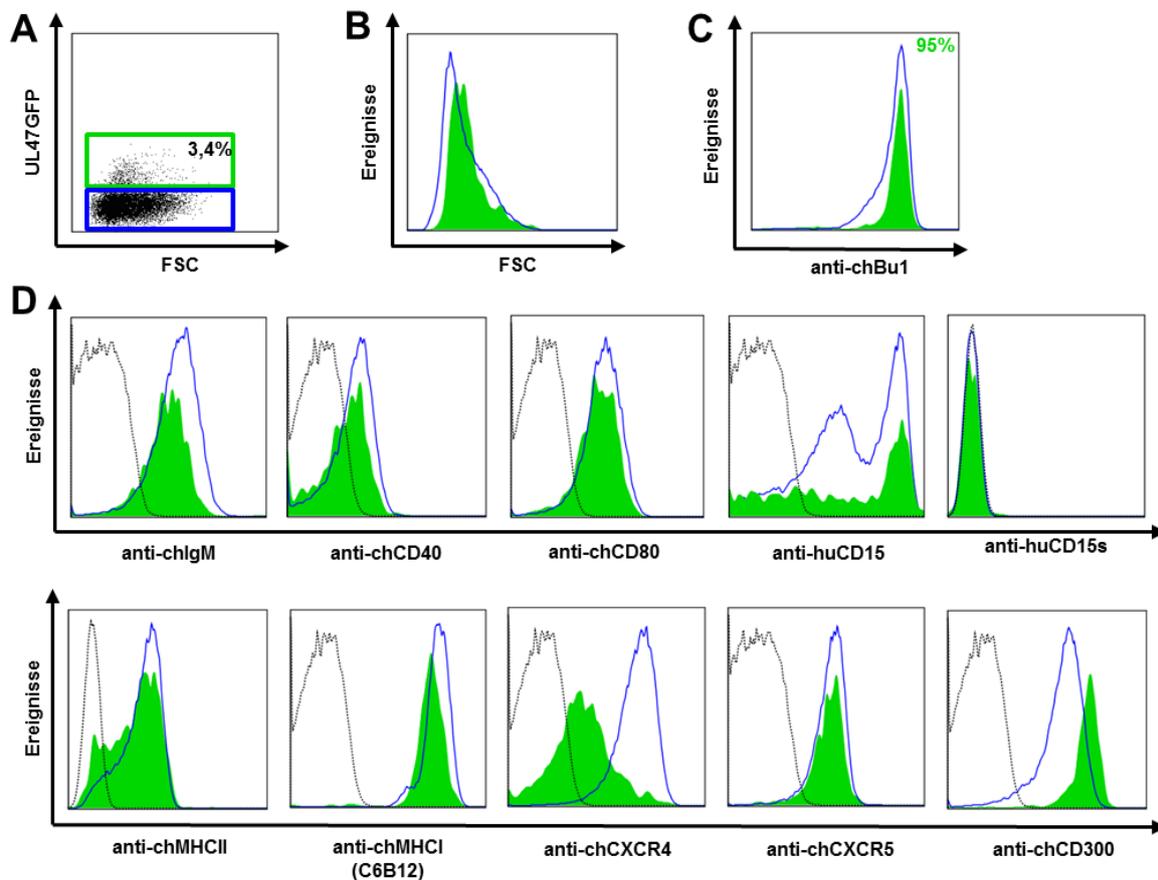
**Abbildung 15: Infektion von Bursalymphozyten mit RB-1B UL47GFP**

Bursalymphozyten wurden mit chCD40L stimuliert und mit RB-1B UL47GFP infizierten HEF co-kultiviert. Um den Prozentsatz der infizierten B-Zellen innerhalb der lebenden Lymphozyten mittels Durchflusszytometrie zu bestimmen, wurde die Bursaleukozytensuspension mit dem pan-B-Zellmarker chBu1 gefärbt (A). Die relative Anzahl der infizierten B-Zellen wurde über einen Zeitraum von vier Tagen p.i. in drei unabhängigen Experimenten ( $MW \pm STABW$ ) bestimmt (B).

Der Phänotyp der infizierten Bursa-B-Zellen wurde nach der Fluoreszenzfärbung von verschiedenen Oberflächenmarkern durchflusszytometrisch charakterisiert.

Wie in Abbildung 16A dargestellt, konnte anhand der UL47GFP Expression eine infizierte und eine nicht infizierte Lymphozytenpopulation unterschieden werden. Die Zellgröße der infizierten Zellen entsprach in etwa der der nicht infizierten Bursalymphozyten (Abbildung 16B) und die infizierten Zellen waren zu 95% B-Zellen (Abbildung 16C). Durch die Färbung mit verschiedenen Oberflächenmarkern (Abbildung 16D) wurde der Phänotyp der infizierten B-Zellen im Vergleich zu den nicht infizierten B-Zellen analysiert. Beide B-Zellpopulationen waren chIgM, chCD40, chCD80, chMHCI, chMHCII und chCXCR5 positiv. Bei der Expression von CD15 zeigte sich bei beiden Populationen eine  $CD15^{hoch+}$  und eine kleinere  $CD15^{niedrig+}$  Population. Beide Populationen zeigten keine Expression von CD15s auf der Oberfläche. Im Gegensatz zu den  $chCXCR4^{hoch+}$ , nicht infizierten B-Zellen waren die infizierten B-Zellen  $CXCR4^{niedrig+}$ . Das immunmodulatorische Molekül chCD300 war auf

infizierten B-Zellen, im Vergleich zu nicht infizierten B-Zellen, höher exprimiert.



**Abbildung 16: Phänotypische Charakterisierung der infizierten Bursalymphozyten**

Bursalymphozyten wurden mit chCD40L stimuliert und mit RB-1B UL47GFP infizierten HEF co-kultiviert und ein Tag p.i. analysiert. Lebende nicht infizierte (blaue Linie) und infizierte (grün gefüllte Linie) B-Zellen konnten durch die Expression von UL47GFP (A) unterschieden werden. Die Zellgröße (B) und der B-Zellanteil (C) beider Population wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die Expression der verschiedenen Oberflächenantigene (D) wurde zwischen den zwei Populationen und den entsprechenden Isotypkontrollen (schwarz gepunktete Linie) verglichen. Dargestellt ist eine repräsentativer von drei unabhängigen Versuchen.

## 5.4 *IN VITRO* MDV INFEKTION VON KULTIVierten T-LYMPHOZyTEN

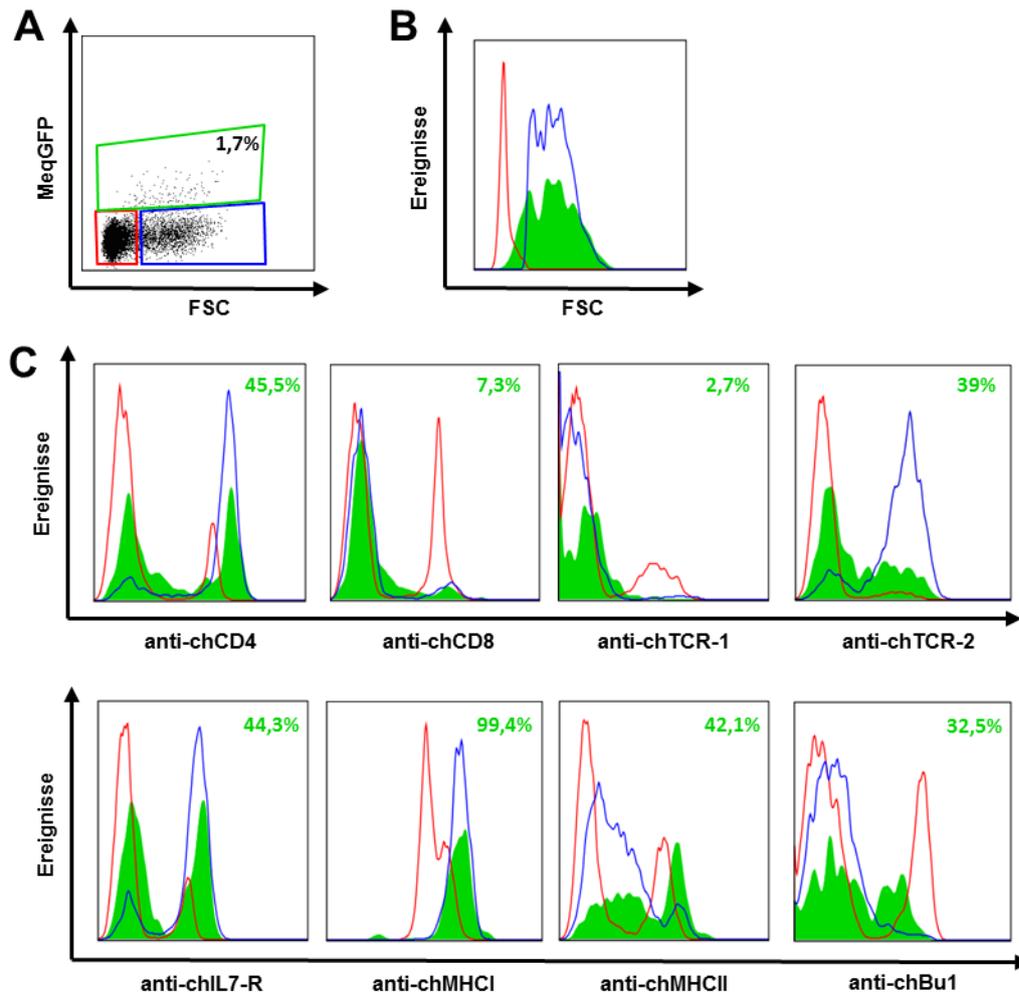
Nachdem es gelungen war chCD40L stimulierte B-Zellen *in vitro* zu infizieren, sollte im Weiteren ein Zellkultursystem zur Infektion von T-Zellen entwickelt werden. Die in Abbildung 11 und 14 dargestellten Ergebnisse deuteten bereits darauf hin, dass auch T-Lymphozyten in Kultur infizierbar sein könnten. Die weiteren Arbeiten sollten sich nun auf spezifisch aktivierte T-Zellen konzentrieren. Dafür wurden Milz-, Blut- und Thymuslymphozyten durch die Kreuzvernetzung des  $\alpha\text{V}\beta\text{1}$ -TCR mittels des mAK TCR-2

stimuliert (Cihak et al., 1988). Infiziert wurden die stimulierten Leukozyten durch die Co-Kultivierung mit RB-1B MeqGFP-UL47RFP positiven HEF, wie unter 4.5.5 beschrieben.

#### **5.4.1 Infektion und Charakterisierung von Milz-T-Zellen**

TCR-2 stimulierte Milzleukozyten wurden mit RB-1B MeqGFP-UL47RFP positiven HEF infiziert. Drei Tage p.i. wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert, um den Phänotyp der infizierten Zellen näher zu bestimmen.

Durch die Expression von MeqGFP und anhand des FSC konnten drei Populationen innerhalb der lebenden Zellpopulation abgegrenzt werden (Abbildung 17A). Anhand der Zellgröße konnten nicht infizierte kleine und blastoide Leukozyten unterschieden werden. Die Zellgröße der infizierten MeqGFP<sup>+</sup> Leukozyten entsprach der, der nicht infizierten blastoiden Leukozyten (Abbildung 17B).



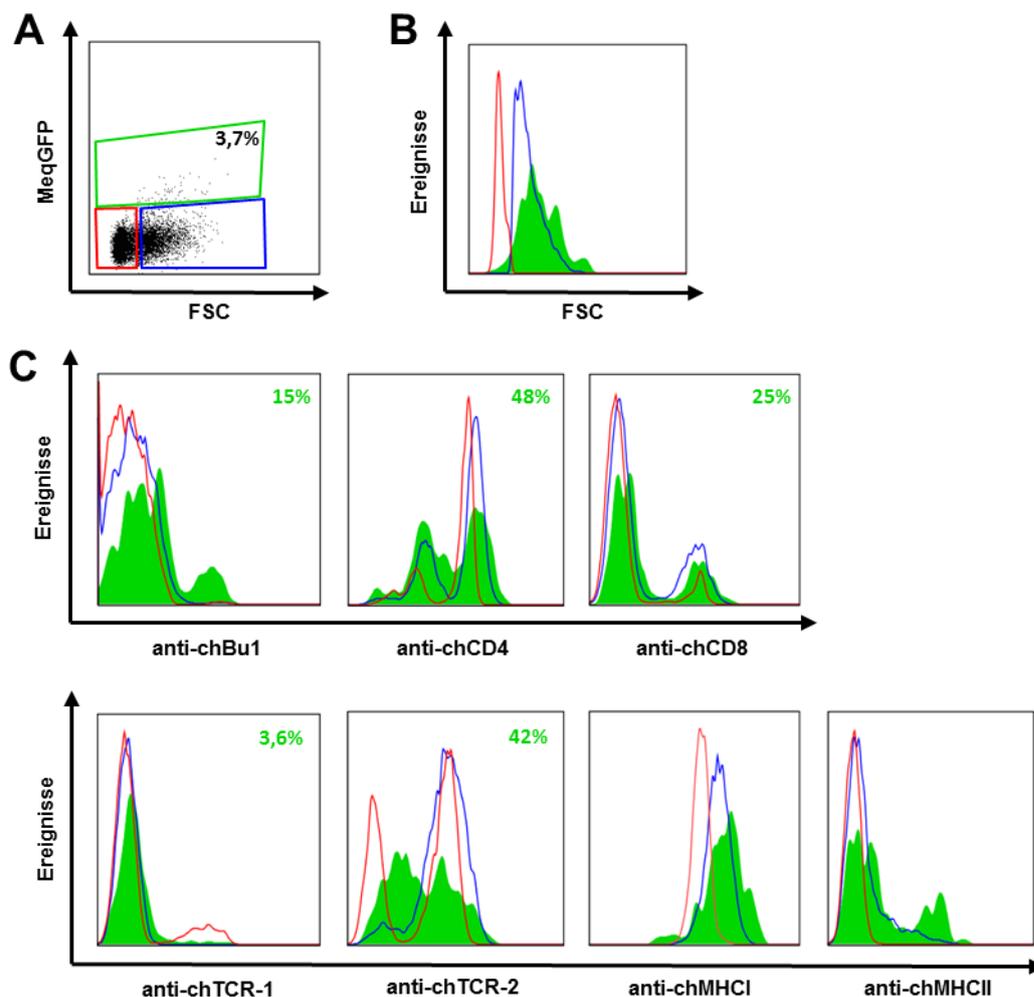
**Abbildung 17: Phänotypische Charakterisierung der infizierten Milzleukozyten**

Milzleukozyten wurden durch  $\alpha\text{V}\beta 1\text{-TCR}$  Kreuzvernetzung stimuliert und mit RB-1B MeqGFP-UL47RFP infizierten HEF co-kultiviert. Nicht infiziert kleine (rote Linie), nicht infizierte blastoide (blaue Linie) und infizierte (grüne Linie) lebende Leukozyten konnten drei Tage p.i. durch die Expression von MeqGFP unterschieden werden (A). Die Zellgröße (B) und die Expression von den in der Abbildung C aufgeführten Oberflächenantigenen wurden zwischen den drei Populationen verglichen. Dargestellt ist eine repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten.

Bei den infizierten Zellen handelte es sich zu 46% um  $\text{CD4}^+$  T-Zellen und zu 7% um  $\text{CD8}^+$  T-Zellen. Die T-Zellsubpopulationen setzten sich aus 2,6%  $\gamma\delta\text{-TCR}^+$  T-Zellen und 39%  $\alpha\text{V}\beta 1\text{-TCR}^+$  T-Zellen zusammen und waren zu 44%  $\text{IL7R}^+$ . Ansonsten waren 32,5% der infizierten Leukozyten B-Zellen ( $\text{chBu1}^+$ ) und 42% aller Leukozyten waren  $\text{chMHCII}^{\text{hoch+}}$ , wobei die übrigen Leukozyten  $\text{chMHCII}^{\text{niedrig+}}$  waren. Alle Leukozyten exprimierten chMHCI, während die infizierten und nicht infizierten blastoiden Zellen ein höheres Expressionsniveau aufwiesen (Abbildung 17C).

## 5.4.2 Infektion und Charakterisierung von Blut-T-Zellen

Nachdem TCR-2 stimulierte Milzleukozyten infiziert werden konnten, wurden als nächstes TCR-2 stimulierte Blutleukozyten mit RB-1B MeqGFP-UL47RFP infizierten HEF co-kultiviert. Drei Tage nach Infektion wurden die Zellen nach Fluoreszenzfärbung durchflusszytometrisch analysiert. Wieder konnten anhand der MeqGFP Expression und des FSC-Profiles drei Populationen unterschieden werden (Abbildung 18A). Die Zellgröße der infizierten MeqGFP<sup>+</sup> Leukozyten war größer als die der anderen beiden Populationen (Abbildung 18B).



**Abbildung 18: Phänotypische Charakterisierung der infizierten Blutleukozyten**

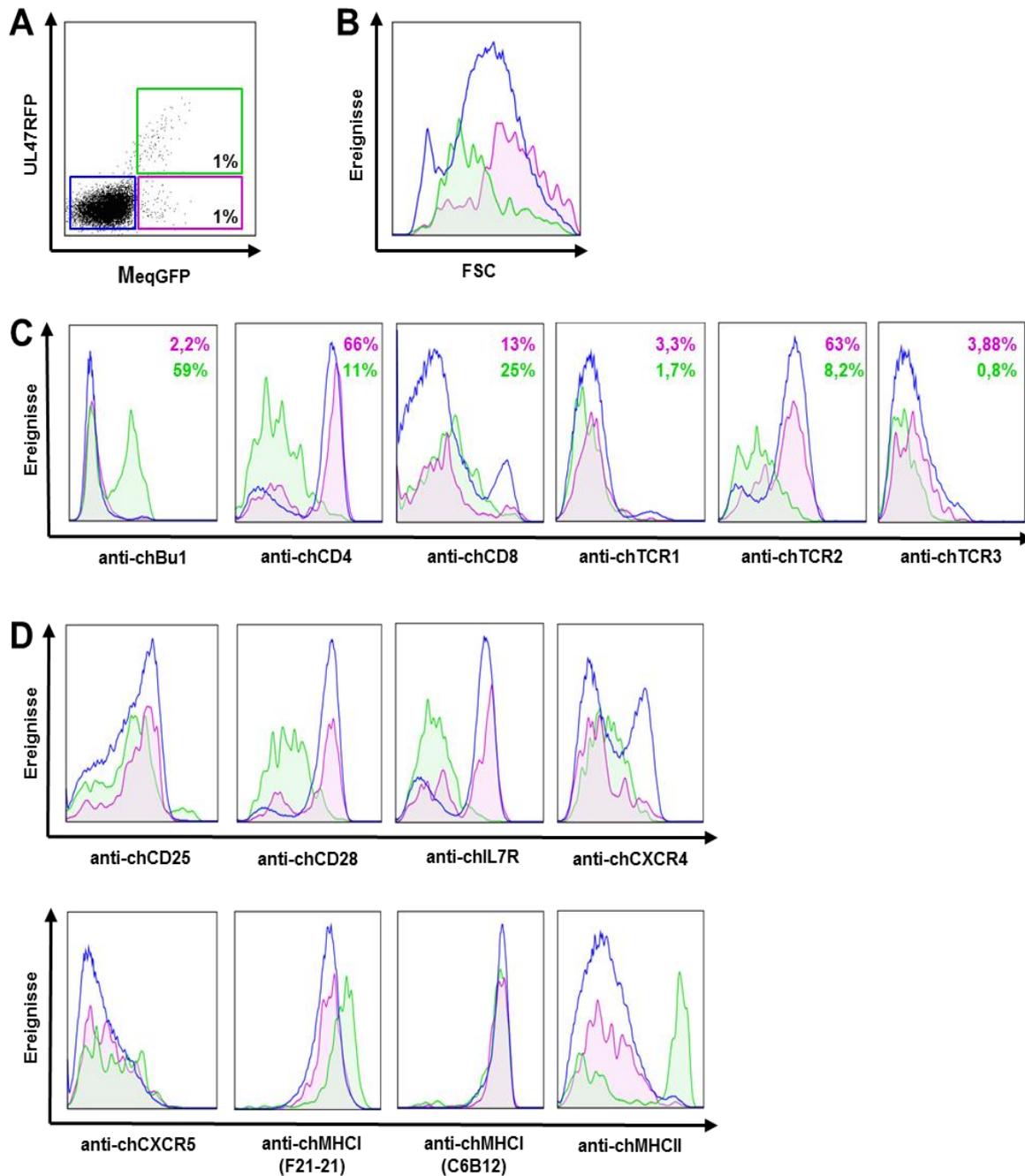
Blutleukozyten wurden durch TCR-2 Kreuzvernetzung stimuliert und mit RB-1B MeqGFP-UL47RFP infizierten HEF co-kultiviert. Lebende nicht infizierte kleine (rote Linie), nicht infizierte blastoide (blaue Linie) und infizierte (grüne Linie) Leukozyten konnten drei Tage p.i. durch die Expression von MeqGFP unterschieden werden (A). Die Zellgröße (B) und die Expression von den in der Abbildung C aufgeführten Oberflächenantigenen wurde zwischen den drei Populationen verglichen. Dargestellt ist ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten.

Die infizierten Blutleukozyten waren zu 15% B-Zellen, zu 48% CD4<sup>+</sup> T-Zellen und zu 25% CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Die T-Zellen waren zu 3,6%  $\gamma\delta$ -TCR (chTCR-1)<sup>+</sup> T-Zellen und zu 42%  $\alpha\beta$ 1-TCR (chTCR-2)<sup>+</sup> T-Zellen. 23% der infizierten Leukozyten waren chMHCII<sup>+</sup> und alle Leukozyten exprimierten chMHCI auf der Zelloberfläche, wobei die infizierten Zellen das höchste Expressionsniveau aufwiesen (Abbildung 18C).

### 5.4.3 Infektion und Charakterisierung von Thymus-T-Zellen

Thymozyten wurden durch Quervernetzung des TCR-2 stimuliert und mit RB-1B MeqGFP-UL47RFP infizierten HEF co-kultiviert. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgt drei Tage p.i. am FACS AriaIIIu.

Wie in Abbildung 19A dargestellt, konnten anhand der Expression der viralen Proteine MeqGFP und UL47RFP innerhalb der lebenden Thymozyten drei Populationen unterschieden werden. Neben den nicht infizierten Thymozyten gab es eine MeqGFP-UL47RFP doppelt-positive und eine MeqGFP einfach-positive Population. Die Zellgröße der MeqGFP einfach-positiven Population lag über der Zellgröße der doppelt-positiven Zellpopulation (Abbildung 19B). Um den Anteil der jeweiligen Zellpopulation zu bestimmen, wurden Prozentsätze verwendet. Die MeqGFP-UL47RFP doppelt-positiven Zellen waren zu 59% B-Zellen, 11% CD4<sup>+</sup> T-Zellen, 25% CD8<sup>+</sup> Zellen und 8,2% TCR-2<sup>+</sup> T-Zellen. Die MeqGFP einfach-positiven Zellen waren nur zu 2,2% B-Zellen und ansonsten mit ca. 64% zum Großteil CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup>, TCR-2<sup>+</sup> T- Zellen (Abbildung 19C). Anhand des infizierten Zelltyps und der Expression der viralen Proteine ist davon auszugehen, dass es sich bei den doppelt-positiven Zellen um lytisch infizierte Zellen handelt, während die Meq einfach-positive Population vermutlich latent infizierte Zellen sind.



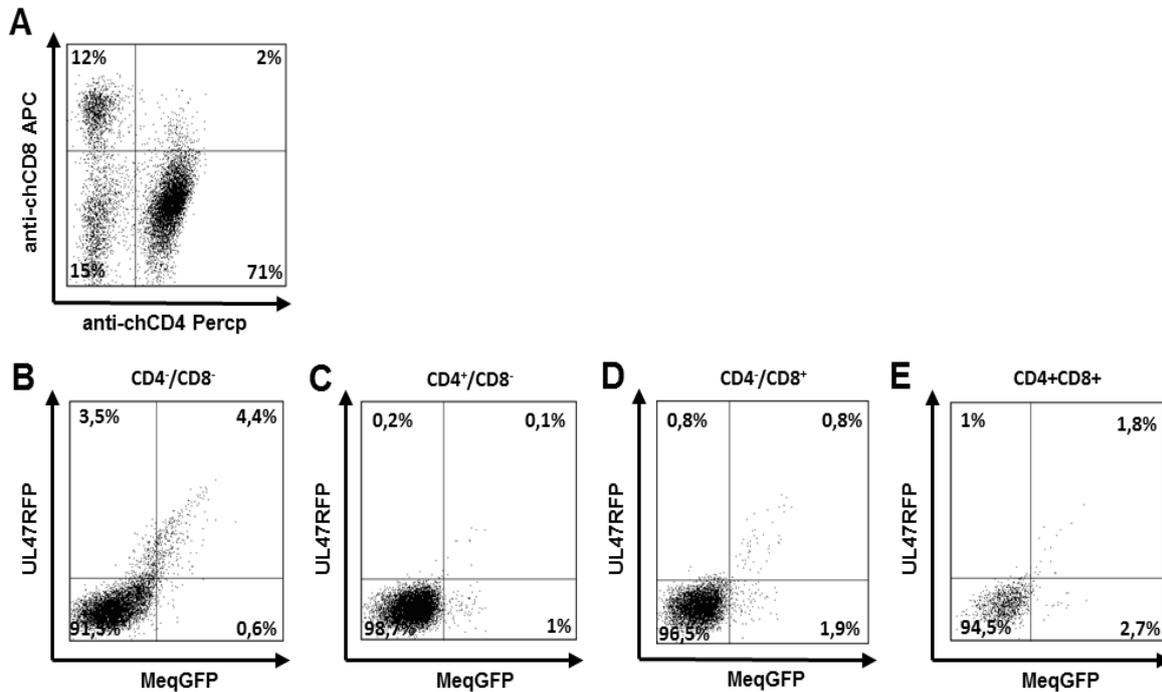
### Abbildung 19: Phänotypische Charakterisierung der latent und lytisch infizierten Thymozyten

Thymozyten wurden durch  $\alpha V\beta 1$ -TCR Kreuzvernetzung stimuliert und mit RB1-B MeqGFP-UL47RFP infizierten HEF co-kultiviert. Dabei konnten drei Tage p.i. lebende nicht infizierte (blaue Linie), latent infizierte MeqGFP-UL47RFP doppelt-positive (grüne Linie) und lytisch infizierte MeqGFP einfach-positive (pinke Linie) Thymozyten durch die Expression viraler Proteine unterschieden werden (A). Durchflusszytometrisch wurde die Zellgröße (B) und Zellart (C) der drei verschiedenen Populationen verglichen. Die Prozentzahlen wurden anhand der Isotypkontrolle ermittelt, die grünen Zahlen beziehen sich auf die MeqGFP-UL47RFP doppelt-positiven Thymozyten und die pinken Zahlen auf die MeqGFP einfach-positiven Thymozyten. Die Expression der dargestellten Oberflächenantigene wurde zwischen den drei Populationen verglichen (D).

Der Phänotyp der drei Populationen wurde durchflusszytometrisch analysiert und ist in Abbildung 19D dargestellt. Die Expression von chMHCII machte deutlich, dass unter der MeqGFP-UL47RFP doppelt-positiven Population Zellen sind, die sowohl chMHCII positiv als auch negativ waren. Ebenso waren nur einige wenige Zellen chCD28<sup>+</sup>. Die MeqGFP einfach-positiven Zellen waren chMCHII<sup>+</sup> und chCD28<sup>+</sup>. Die Expression von chCD25 und chIL7R war auf den MeqGFP einfach-positiven Zellen höher als auf der MeqGFP-UL47RFP doppelt-positiven Population. Für die Oberflächenmoleküle chMHCI (C6B12) und chCXCR5 zeigten alle drei Populationen das gleiche Expressionsmuster. chCXCR4 dagegen wurde auf beiden Populationen der infizierten Zellen nicht exprimiert, während sich die nicht infizierten Zellen in eine positive und eine negative Population teilten. Die Expression der  $\beta$ -Kette des MHCI-Moleküls (F21-21) war auf den MeqGFP einfach-positiven Thymozyten etwas höher als auf den anderen beiden Populationen exprimiert.

Anhand dieser Charakterisierung ist davon auszugehen, dass es sich bei den MeqGFP-UL47RFP doppelt-positiven Zellen mehrheitlich um B-Zellen und einige wenige T-Zellen handelte. Die MeqGFP einfach-positiven Zellen waren dagegen nahezu ausschließlich T-Zellen.

Da es im Thymus nicht nur CD4 einfach-positive oder CD8 einfach-positive T-Zellen, sondern auch chCD4/chCD8 doppelt-positive sowie doppelt-negative T-Zellen gibt, wurde eine CD4/CD8 Doppelfärbung zur genaueren Phänotypisierung der T-Zellen durchgeführt. Bei den meisten Leukozyten im Thymus handelte es sich um CD4<sup>+</sup> einfach-positive T-Zellen (Abbildung 20A). Unter den CD4/CD8 doppelt-negativen Zellen befanden sich zum einem doppelt-negative T-Zellen, aber vermutlich auch einige B-Zellen (Abbildung 20B)



**Abbildung 20: Charakterisierung der infizierten T-Zellen mittels chCD4/chCD8 Doppelfärbung**

TCR-2 stimulierte Thymozyten wurden mit RB-1B MeqGFP-UL47RFP infizierten HEF co-kultiviert und die lebenden Lymphozyten durchflusszytometrisch nach einer chCD4/chCD8 Doppelfärbung untersucht (A). In Abbildung B-E ist die Expression von MeqGFP und UL47RFP in den vier verschiedenen Zellsubpopulationen dargestellt.

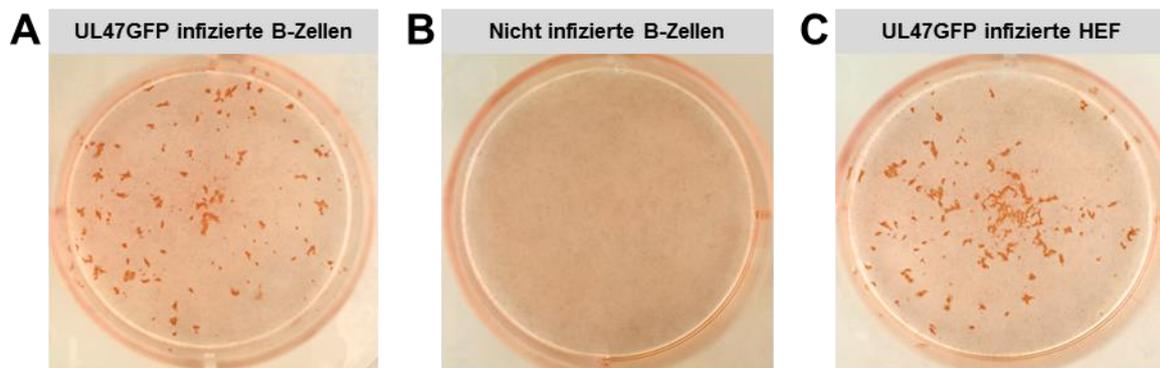
In Abbildung 20B-E werden die T-Zellpopulationen anhand ihrer Expression von MeqGFP und UL47RFP analysiert. Die CD4/CD8 doppelt-negativen T-Zellen und B-Zellen waren zum größten Teil MeqGFP-UL47RFP doppelt-positiv (Abbildung 20B), während es unter den CD4/CD8 doppelt-positiven T-Zellen eine MeqGFP-UL47RFP doppelt-positiv und eine MeqGFP einfach-positiv Population gab (Abbildung 20E). Bei den CD4 einfach-positiven T-Zellen handelte es sich fast ausschließlich um MeqGFP einfach-positiv T-Zellen (Abbildung 20C). Unter den CD8 einfach-positiven T-Zellen befanden sich doppelt so viele MeqGFP einfach-positiv wie MeqGFP-UL47RFP doppelt-positiv Zellen (Abbildung 20D).

## 5.5 INFEKTIÖSITÄT DER *IN VITRO* INFIZIERTEN PRIMÄREN LYMPHOZYTEN

Nachdem erfolgreich ein *in vitro* Infektionssystem für primäre Hühner B- und T-Zellen etabliert werden konnte, sollte in den folgenden Experimenten geklärt werden, ob die infizierten B- und T-Zellen infektiös sind und somit das MD-Virus auf HEF-Kulturen übertragen werden kann.

### 5.5.1 Infektion von HEF mit UL47GFP infizierten B-Zellen

Dazu wurden chCD40L stimulierte Bursaleukozyten mit RB-1B UL47GFP infizierten HEF co-kultiviert. Am ersten Tag p.i. wurden aus diesem Ansatz nach einer Lebend/Tot- und chBu1-Färbung UL47GFP exprimierende infizierte, lebende B-Zellen heraussortiert. Als Negativkontrolle wurden lebende B-Zellen aus einer nicht infizierten Kultur durchflusszytometrisch heraussortiert (Reinheit über 95%). Als Positivkontrolle dienten RB-1B UL47GFP infizierte HEF des Virusstocks. Die Zellen wurden auf einem HEF-Monolayer ausplattiert und für fünf Tage kultiviert (siehe 4.7.1 und 4.5.6). Nach der Plauefärbung wurde deutlich, dass die infizierten B-Lymphozyten den HEF-Monolayer infizieren konnten (Abbildung 21).



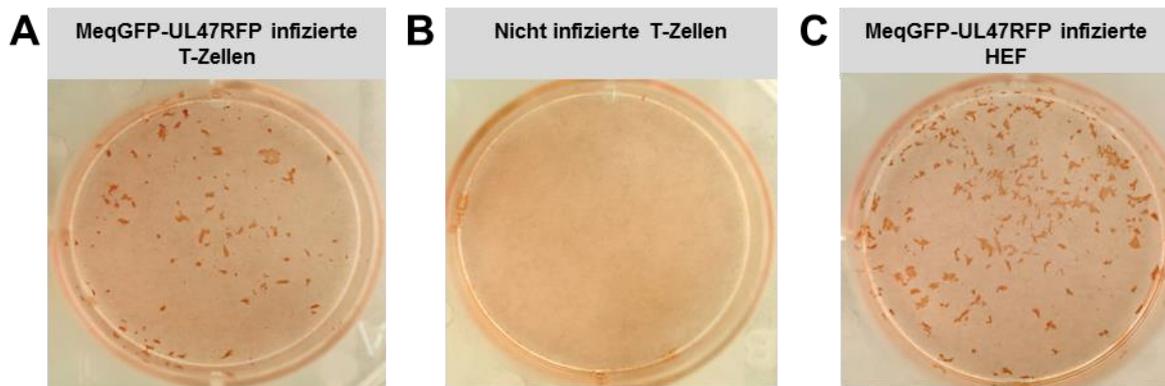
**Abbildung 21: Infektion von HEF mit RB-1B UL47GFP infizierten B-Zellen**

chCD40L stimulierte Bursalymphozyten wurden mit RB-1B UL47GFP infiziert. An Tag 1 p.i. wurden die lebenden infizierten UL47GFP<sup>+</sup> und chBu1<sup>+</sup> positiven B-Zellen (A) und nicht infizierte B-Zellen als Kontrolle (B) durchflusszytometrisch sortiert. Die sortierten Zellen wurden in einer Dichte von  $5 \times 10^4$  Zellen pro 6-Lochkavität auf einen HEF-Monolayer ausgesät. Als Positivkontrolle wurden RB-1B UL47GFP infizierte HEF verwendet (C). Nach fünf Tagen p.i. wurden die Plaques mit mAKs gegen die viralen Proteine gB und VP22 gefärbt und mit einem Peroxidase-Färbekit sichtbar gemacht.

### 5.5.2 Infektion von HEF mit RB-1B MeqGFP-UL47RFP infizierten T-Zellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die *in vitro* infizierten B-Zellen infektiös sind, wurde der Versuch ebenfalls mit Thymozyten durchgeführt. Dafür wurden Thymozyten mit TCR-2 stimuliert und mit RB-1B MeqGFP-UL47RFP infizierten HEF co-kultiviert. Drei Tage p.i. wurden lebende, chBu1<sup>-</sup>, chCD45<sup>+</sup>, MeqGFP<sup>+</sup> infizierte Thymozyten durchflusszytometrisch sortiert. Als Negativkontrolle dienten nicht infizierte Thymozyten und als Positivkontrolle

RB-1B MeqGFP-UL47RFP infizierte HEF des Virusstocks. Auch hier konnte eine Infektion des HEF-Monolayer durch eine Co-Kultivierung mit infizierten Thymozyten nach der Plauefärbung nachgewiesen werden (Abbildung 22).



**Abbildung 22: Infektion von HEF mit RB-1B MeqGFP-UL47RFP infizierten T-Zellen**

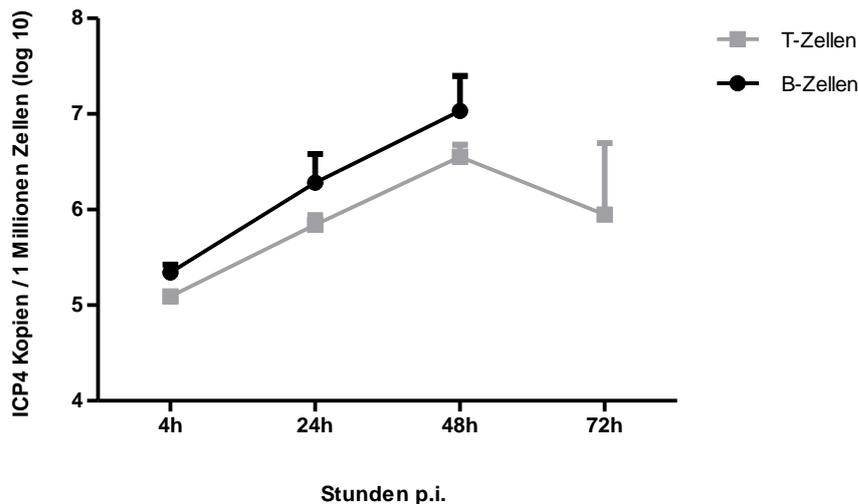
TCR-2 stimulierte Thymozyten wurden mit RB-1B MeqGFP-UL47RFP infizierten HEF co-kultiviert. An Tag 3 p.i. wurden die lebenden, MeqGFP<sup>+</sup>, chBu1<sup>-</sup>, chCD45<sup>+</sup> infizierten Thymozyten (A) und nicht infizierte Thymozyten als Kontrolle (B) durchflusszytometrisch sortiert. Die sortierten Zellen wurden in einer Dichte von  $5 \times 10^4$  Zellen pro 6-Lochkavität auf einen HEF-Monolayer ausgesät. Als Positivkontrolle wurden RB-1B MeqGFP-UL47RFP infizierte HEF verwendet (C). Nach fünf Tagen p.i. wurden die Plaques mit mAKs gegen die viralen Proteine gB und VP22 gefärbt und mit einem Peroxidase-Färbekit sichtbar gemacht.

### 5.5.3 MDV-Genomkopien in infizierten B- und T-Zellen

Nachdem die *in vitro* Infektion von B- und T-Zellen bestätigt werden konnte, sollte die MDV Genomreplikation in den infizierten Zellen analysiert werden.

Dafür wurden B- und T-Zellen mit MDV infiziert und 4h, 24h, 48h und 72h nach der Infektion  $3 \times 10^6$  lebende B-Zellen bzw. T-Zellen heraussortiert (siehe 4.7.3). Die Gesamt-DNA wurde isoliert und die MDV Genom Kopien mittels qPCR spezifisch für das virale ICP4 Gen detektiert. Die Daten wurden relativ zu den zellulären Genomkopien dargestellt (Abbildung 23).

Die Daten zeigten, dass sowohl in B-Zellen als auch in T-Zellen virale ICP4 Kopien nachweisbar waren und MDV effizient in den infizierten Zellen repliziert. Über den Untersuchungszeitraum hinweg konnte ein Anstieg an infizierten Zellen und ein Anstieg der viralen Kopien beobachtet werden. Allerdings wiesen die B-Zellen ein höheres Niveau viraler ICP4 Kopien auf.

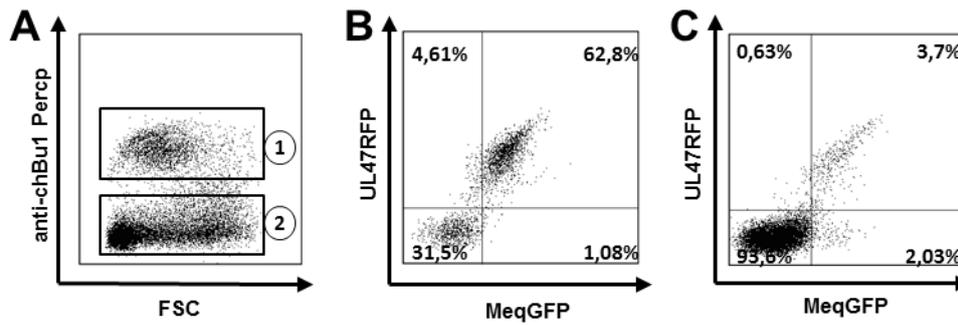


**Abbildung 23: Virusreplikation in B- und T-Zellpopulationen**

chCD40L stimulierte Bursalymphozyten wurden mit RB-1B UL47GFP infiziert und 4h, 24h, und 48h p.i. lebende, chBu1<sup>+</sup> B-Zellen herausortiert. TCR-2 stimulierte Thymozyten wurden mit RB-1B MeqGFP-UL47RFP infiziert und 4h, 24h, 48h und 72h p.i. lebende chCD45<sup>+</sup>, chBu1<sup>-</sup> Thymuszellen herausortiert. In diesen Zellpopulationen wurde anschließend mittels qPCR die Anzahl der viralen ICP4 Kopien bestimmt. Die ICP4 Kopien sind relative zu den zellulären Kopien dargestellt. Die Daten sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten mit der Standardabweichung (*error bars*).

### 5.5.4 Infektion von T-Zellen mit RB-1B MeqGFP-UL47RFP infizierten B-Zellen

Das als Cornell-Modell bezeichnete Konzept der MDV Pathogenese postuliert eine Übertragung des Virus von primär infizierten B-Zellen auf aktivierte T-Zellen *in vivo*. Dementsprechend sollte mit dem folgenden Experiment die Frage geklärt werden, ob ein Virustransfer von infizierten B-Zellen zu aktivierten T-Zellen auch *in vitro* möglich ist. Hierfür wurden infizierte lebende, bursale B-Zellen 24 Stunden p.i. durchflusszytometrisch sortiert und mit TCR-2 stimulierten syngenen Thymuszyten co-kultiviert. Drei Tage p.i. wurden die Thymozyten nach Fluoreszenzfärbung durchflusszytometrisch untersucht. Wie in Abbildung 24A gezeigt wird, konnten innerhalb der Thymozytenpopulation die B-Zellen (Abbildung 24A(1)) durch eine chBu1-Percep Färbung abgegrenzt werden. Innerhalb der B-Zellen waren etwa 63% der Zellen infiziert (Abbildung 24B), wozu vor allem die inokulierten Bursa-B-Zellen zählten. Bei der Analyse der T-Zellen anhand der Expression von MeqGFP und UL47RFP fanden sich infizierte T-Zellen, die zu 3,7% MeqGFP-UL47RFP doppelt-positiv waren und eine T-Zell-Population von 2%, die MeqGFP einfach-positiv war.



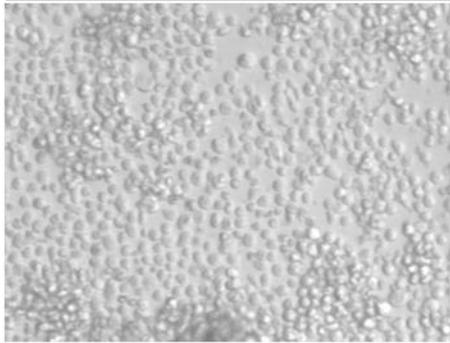
**Abbildung 24: Infektion von Thymozyten mit RB-1B MeqGFP-UL47RFP infizierten B-Zellen**

chCD40L stimulierte Bursalymphozyten wurden mit RB-1B MeqGFP-UL47RFP infizierten HEF co-kultiviert. An Tag 1 p.i. wurden die UL47RFP<sup>+</sup>, chBu1<sup>+</sup> lebenden B-Zellen durchflusszytometrisch sortiert und in einem Verhältnis von 1:10 mit syngenem TCR-2 stimulierten Thymozyten co-kultiviert. Zwei Tage p.i. wurde die Kultur anti-chBu1 gefärbt, um die zum Teil inokulierten B-Zellen (1) von den T-Zellen (2) zu unterscheiden (A). Anhand der MeqGFP und UL47RFP Expression konnte der Anteil der infizierten Zellen innerhalb der B-Zellpopulation (B) und der T-Zellpopulation bestimmt werden (C).

## 5.6 MDV TRANSFORMIERTE LYMPHOBLASTOIDE ZELLINIEN

Ein Charakteristikum der Marek'schen Erkrankung ist die Entstehung von T-Zelllymphomen. Die bisher verfügbaren *in vitro* Systeme basierten auf der Infektion von HEF, weshalb Studien zur Onkogenese bis heute auf *in vivo* Infektionsmodellen beruhen. Da durch die bisher beschriebene Arbeit nun erstmals die *in vitro* Infektion von B- und T-Zellen effizient und reproduzierbar gelungen ist, sollten im Weiteren die Möglichkeiten einer *in vitro* Transformation von T-Zellen bearbeitet werden.

Dafür wurden wiederum Thymozyten durch Quervernetzung des  $\alpha\text{V}\beta 1$ -TCR aktiviert und mit RB-1B UL47GFP infizierten HEF co-kultiviert. Drei Tage nach der Infektion wurden durchflusszytometrisch UL47GFP<sup>+</sup> infizierte Zellen nachgewiesen. Die Thymozyten wurden weiterhin über einen Zeitraum von fünf Wochen kultiviert und regelmäßig mit frischem Medium versorgt. Zuerst bildeten sich kleine Gruppen von proliferierenden Zellen und nach fünf Wochen konnten in einigen Kavitäten einer 96-Lochplatte mikroskopisch eine homogene, sich teilende Zellpopulation beobachtet werden (Abbildung 25). Die nicht infizierten Kontrollthymozyten waren zu diesem Zeitpunkt apoptotisch zu Grunde gegangen.

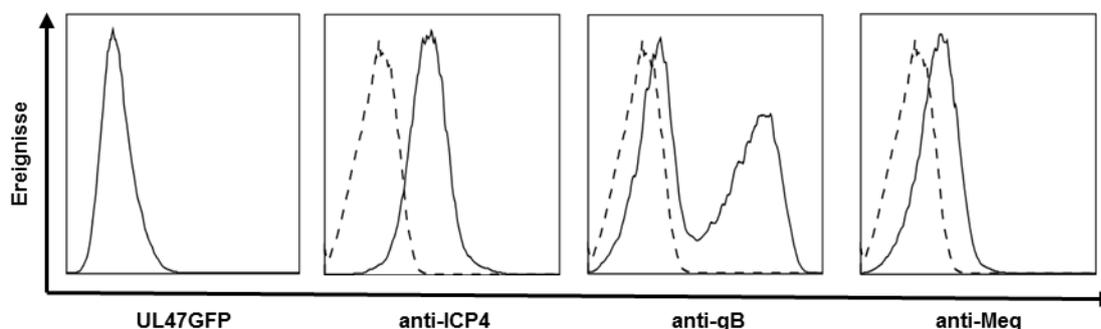
**MDV transformierte Zelllinie JS1****Abbildung 25: *In vitro* transformierte Zelllinie JS1**

TCR-2 stimulierte Thymozyten wurden mit RB-1B UL47GFP infizierten HEF co-kultiviert. Nach fünf Wochen wurde eine mikroskopisch homogen aussehende, proliferierende Lymphozytenpopulation beobachtet (10-fach vergrößert).

Diese Kultur wurde subkultiviert und musste zur Erhaltung alle drei Tage im Verhältnis 1:3 geteilt werden. Die lymphoblastoide Zelllinie konnte in den folgenden Wochen expandiert, eingefroren und erneut in Kultur genommen werden. Nach ca. fünf Monaten in Kultur sistierte das Wachstum und die Zellen starben. Ein neu aufgetautes Aliquot, welches vier Wochen nach Etablierung der Linie eingefroren worden war, zeigte das bekannte Zellteilungsverhalten und ist seit dem Auftauen über fünf Monate in Kultur. Die Zelllinie wurde während der ersten fünf Monate in Kultur weitergehend charakterisiert.

### 5.6.1 Zytoplasmatische Färbung der Zelllinie JS1

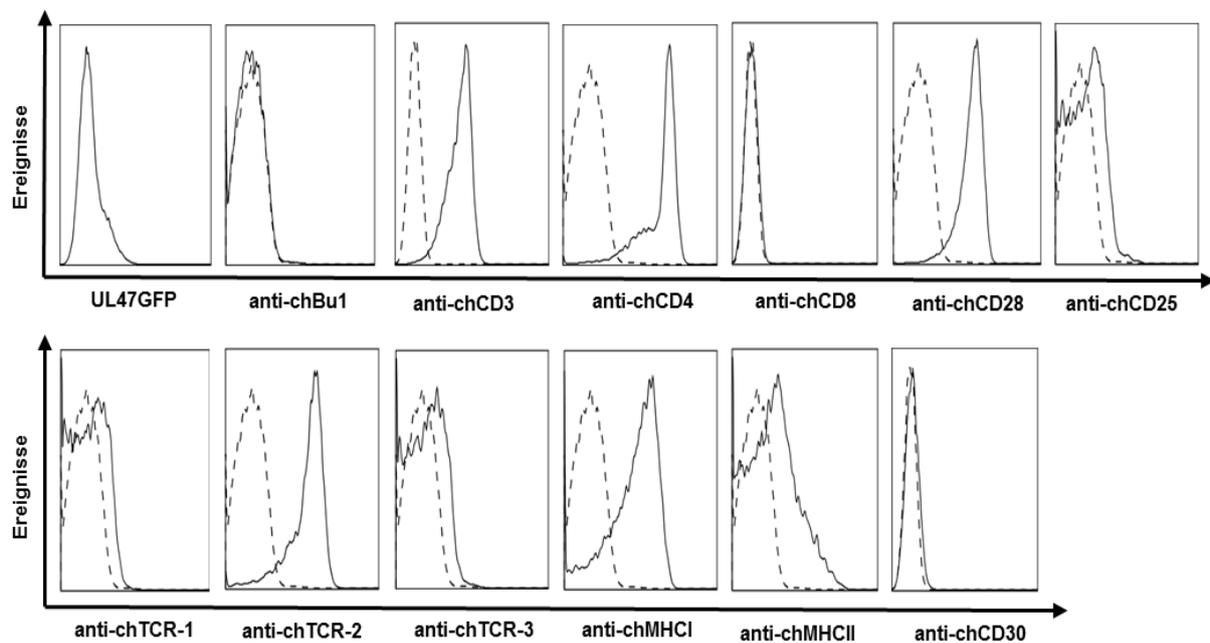
Um zu bestätigen, dass es sich um eine MDV transformierte lymphoblastoide Zelllinie handelt, wurde zunächst eine zytoplasmatische Färbung der in Abbildung 26 aufgeführten viralen Proteine durchgeführt. Die Zelllinie JS1 war ICP4<sup>+</sup> und Meq<sup>+</sup>. Das Glykoprotein B dagegen wurde lediglich in der Hälfte der Zellen deutlich und in der anderen Hälfte schwach exprimiert (Abbildung 26). Ein Teil der Zellen zeigte zudem eine schwache UL47GFP-Fluoreszenz.

**Abbildung 26: Zytoplasmatische Färbung von JS1-Zellen mit Antigenen gegen virale Proteine**

JS1 Zellen wurden zytoplasmatisch mit den dargestellten mAKs gegen virale Proteine gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt sind die jeweiligen mAKs gegen MDV-Proteine (durchgezogene Linie) und die entsprechenden Isotypkontrollen (gestrichelte Linie).

### 5.6.2 Färbung der Oberflächenmarker der Zelllinie JS1

Zur Phänotypisierung der Zelllinie wurde die Expression verschiedener Oberflächenmarker durchflusszytometrisch untersucht (Abbildung 27). Bei den JS1-Zellen handelte es sich um  $CD4^+$ ,  $CD28^+$  und  $\alpha V\beta 1$ - $TCR^+$  (TCR-2) T-Zellen. Von diesen T-Zellen exprimierten 73% chMHCI, 24% chMHCII und 5,2% chCD25 auf der Zelloberfläche. Die Zellen waren negativ für den B-Zellmarker chBu1, den  $ch\gamma\delta$ -TCR und chCD8. Damit entspricht der Phänotyp dem von *in vivo* transformierten MDV-Lymphomen. Interessanterweise konnte keine Expression des Tumorantigens CD30 gezeigt werden.

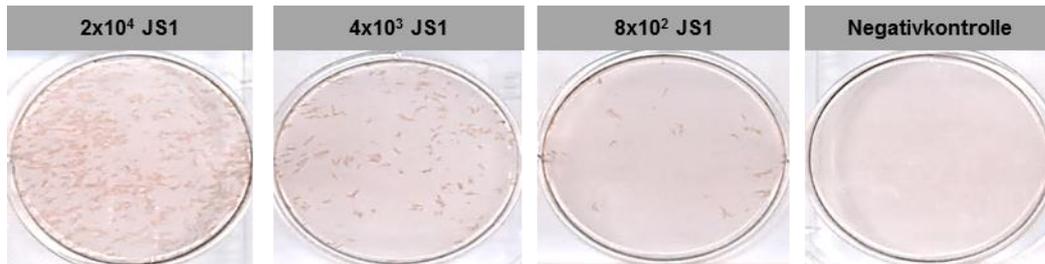


**Abbildung 27: Phänotypisierung der MDV transformierten Zelllinie JS1**

JS1-Zellen wurden mit den aufgeführten mAKs gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt ist die Expression der jeweiligen mAKs (durchgezogene Linie) und der entsprechenden Isotypkontrollen (gestrichelte Linie). Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von zwei unabhängigen Experimenten.

### 5.6.3 Infektiosität der Zelllinie JS1

Der Nachweis der viralen Proteine in JS1-Zellen deutet an, dass die Zellen möglicherweise infektiöses Virus produzieren. Um dies zu überprüfen wurden JS1-Zellen auf einen HEF-Monolayer titriert und für fünf Tage kultiviert. Durch die Plauefärbung fünf Tage p.i. konnte eine Infektion der HEF durch die JS1-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 28). Mit steigender Verdünnung der inokulierten JS1-Zellen konnte eine Abnahme der Plauezahlen nachgewiesen werden. Bei einer zugegebenen Anzahl von  $2 \times 10^4$  JS1-Zellen war ein Auszählen der Plaues nicht möglich, während  $4 \times 10^3$  JS1-Zellen zu 123 Plaues und  $8 \times 10^2$  JS1-Zellen zu 31 Plaues führten.



**Abbildung 28: Infektion von HEF mit der MDV transformierten Zelllinie JS1**

Ein HEF-Monolayer wurde mit JS1-Zellen in den angegebenen Zellzahlen co-kultiviert. An Tag 1 p.i. wurden die zugegebenen JS1-Zellen abgewaschen und die infizierten HEF für weitere vier Tage kultiviert. Fünf Tage p.i. wurden die Plaques durch eine Färbung mit den mAKs gegen die viralen Proteine gB/VP22 und mit einem Peroxidase-Färbekit sichtbar gemacht.

### 5.6.4 Übersicht über weitere *in vitro* transformierte Zelllinien

In mehreren unabhängigen Experimenten wurden insgesamt Thymozyten in 77 Kavitäten einer 24-Lochplatte mit RB-1B UL47GFP infiziert. Daraus konnten vier transformierte Zelllinien generiert werden. Alle Zelllinien wurden durch die Färbung mit verschiedenen Oberflächenmarkern phänotypisiert (Tabelle 9). Die Zelllinien JS1, JS2 und JS4 waren CD4<sup>+</sup>, TCR-2<sup>+</sup> und CD28<sup>+</sup> T-Zelllinien. JS3 dagegen war chCD4<sup>-</sup>, zu 10% chCD8<sup>+</sup>, chTCR-2<sup>+</sup> und chTCR-3<sup>+</sup>. Alle Zelllinien exprimierten ein mittelgradiges bis hohes Niveau an chMHC I und chMHC II, mit Ausnahme von JS4, die chMHC II<sup>-</sup> war. Die Zelllinien JS2 und JS4 waren zudem hoch positiv für den chIL7R. Keine der Zelllinien exprimierte den klassischen Hodgkin-Tumorzellmarker CD30.

Für die Zelllinien JS1, JS2 und JS4 wurden zytoplasmatisch die viralen Proteine ICP4, gB und Meq gefärbt. Alle drei Zelllinien zeigten eine mäßige Expression von ICP4. gB wurde mit der Ausnahme von JS1 nur schwach exprimiert. Meq zeigte ein schwaches Expressionsniveau und war in JS4 nicht nachweisbar.

Die Zelllinien waren (zum Zeitpunkt der Abgabe der Dissertation) zwischen 92 und 172 Tage in Kultur. Bis auf die Zelllinie JS4 sind bis zum jetzigen Zeitpunkt alle Zelllinien zu Grunde gegangen. Es konnten jedoch von allen Zelllinien bis auf JS3 Zellen eingefroren werden, die bis auf JS1 bisher nicht wieder aufgetaut wurden.

Zelllinie	JS1	JS2	JS3	JS4
<b>Zeit in Zellkultur (Tage)</b>	167	99	92	172
<b>chCD4</b>	+++	+++	-	+++
<b>chCD8</b>	-	-	+ (10%)	-
<b>chTCR-1</b>	-	-	-	-
<b>chTCR-2</b>	++	+++	+++	+++
<b>chTCR-3</b>	-	-	++	-
<b>chCD25</b>	+	-	-	+
<b>chCD28</b>	+++	ND	ND	+++
<b>chMHCI</b>	++	++	+++	++
<b>chMHCII</b>	+	++	+	-
<b>chCD30</b>	-	-	ND	-
<b>chIL7R</b>	-	+++	-	+++
<b>chBu1</b>	-	-	ND	-
<b>UL47</b>	+ (20%)	+ (10%)	+ (3%)	-
<b>ICP4</b>	++	++	ND	++
<b>gB</b>	+++ (50%)	+	ND	+
<b>Meq</b>	+	+	ND	-

**Tabelle 9: Phänotypisierung der MDV transformierten Zelllinien**

Die Zelllinien JS1-JS4 wurden durch oberflächen- und zytoplasmatische Färbungen mit den angegebenen mAKs durchflusszytometrisch phänotypisiert.

Legende:

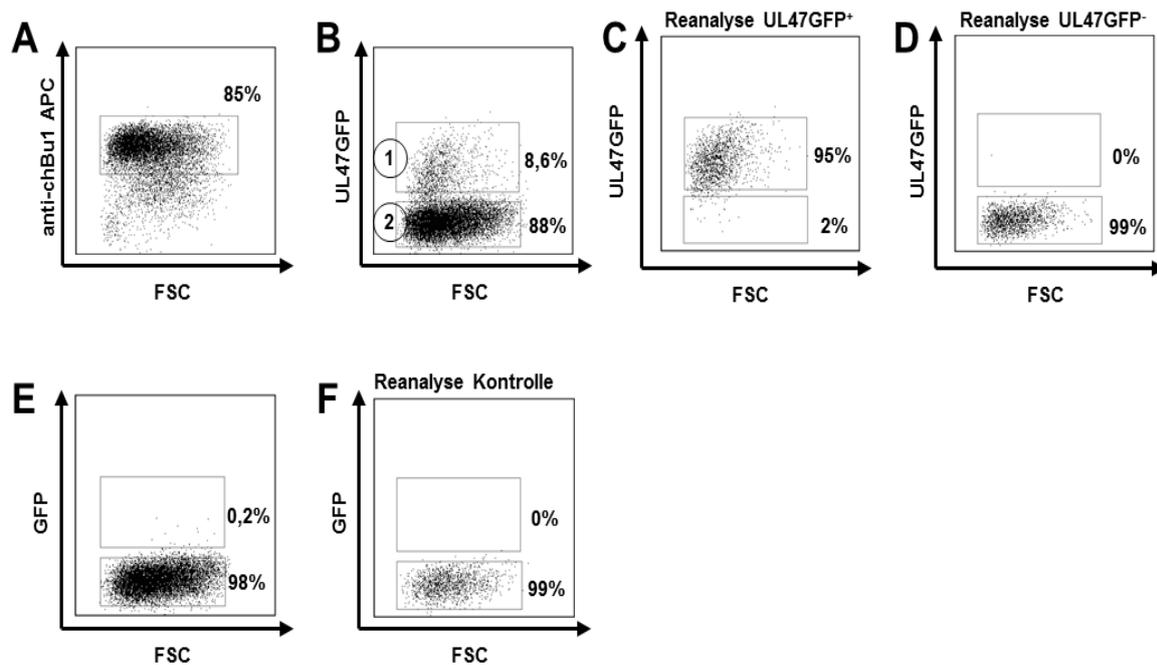
- bei einem Shift aller Zellen: +: schwaches Expressionsniveau, ++: mittelgradiges Expressionsniveau, +++: hohes Expressionsniveau, -: nicht exprimiert
- bei deutlich abgrenzbaren Populationen: Angabe der positiven Zellen in Prozent
- ND: nicht detektiert

## 5.7 GENEXPRESSIONSANALYSE DER MDV INFIZIERTEN B-ZELLEN

Nachdem erstmals *in vitro* MDV Infektionssysteme für B- und T-Zellen etabliert werden konnten, sollte in einer ersten Studie dieses System zur weiteren Charakterisierung der Wirt-Pathogen-Interaktion genutzt werden. Die beschriebenen Kultursysteme bieten die Möglichkeit die Regulation sowohl zellulärer als auch viraler Gene zu analysieren. In dieser Arbeit wurden zunächst die B-Zellen untersucht, um ein Beispiel für die sich eröffnenden Möglichkeiten aufzuzeigen und zugleich erste Daten zur Reaktion der infizierten B-Zellen zu gewinnen. Die Genexpressionsanalyse wurde mit Hilfe des Agilent „*customized*“ 8x60k *chicken*-Genom Mikroarrays durchgeführt, der wie unter 4.10.1 beschrieben modifiziert wurde. Insbesondere wurden neben Immungenen des Huhns die Gensequenzen und Gensequenzabschnitten des MDV-Genoms auf den Mikroarrays aufgetragen.

### 5.7.1 Zellsortierung der infizierten und nicht infizierten Bursa-B-Zellen

Für die Gewinnung der Proben zur Genexpressionsanalyse wurden Bursalymphozyten mit chCD40L stimuliert und mit RB-1B UL47GFP infizierten HEF co-kultiviert. An Tag 1 p.i. wurden die Bursalymphozyten Lebend/Tot und mit dem pan-B-Zellmarker chBu1 gefärbt und durchflusszytometrisch sortiert (Abbildung 29A). Anhand der UL47GFP Expression konnte innerhalb der lebenden B-Zellen eine UL47GFP<sup>+</sup> (1) und die UL47GFP<sup>-</sup> (2) Population unterschieden werden (Abbildung 29B). Durch die Reanalyse der Proben nach der Sortierung wurde die Reinheit der jeweiligen Population bestimmt (Abbildung 29C,D). Als Kontrolle wurden chCD40L stimulierte Bursaleukozyten ohne Zugabe von infizierten HEF kultiviert und ein Tag nach Inkulturnahme auf chBu1<sup>+</sup> B-Zellen sortiert und reanalysiert. (Abbildung 29E,F).



**Abbildung 29: Gewinnung reiner infizierter und nicht infizierter B-Zellpopulationen**

chCD40L stimulierte bursale Lymphozyten wurden mit RB-1B UL47GFP infizierten HEF co-kultiviert. An Tag 1 p.i. konnte aus den lebenden Lymphozyten mittels einer anti-chBu1 Färbung (A) und der UL47GFP-Fluoreszenz (B) infizierte (1) und nicht infizierte (2) B-Zellen identifiziert und sortiert werden. Beide Zellpopulationen wurden zur Bestimmung des Anreicherungsgrads reanalysiert (C, D). Als Negativkontrolle wurden chCD40L stimulierte Bursalymphozyten an Tag 1 nach Inkulturnahme auf lebende chBu1<sup>+</sup>, GFP<sup>-</sup> Zellen sortiert (E). Die sortierte Probe wurde anschließend reanalysiert (F).

### 5.7.2 Präparation der RNA für die Mikroarray-Analyse

Die RNA wurde wie unter 4.9.1 beschrieben isoliert. Für das Mikroarray Experiment wurden anhand der RIN (>8,1, mit Ausnahme von einer Probe) und der RNA-Reinheit (260/280>1,71, 260/230>1,71, mit Ausnahme von jeweils einer Probe) die qualitativ besten Replikate ausgewählt. Für die Gruppe UL47GFP<sup>-</sup> wurden sechs Proben, UL47GFP<sup>+</sup> fünf Proben und für die Kontrollgruppe fünf Proben ausgewählt. Die Hybridisierung der RNA-Proben erfolgte auf den „customized“ Agilent 8x60k *chicken*-Genom Mikroarray.

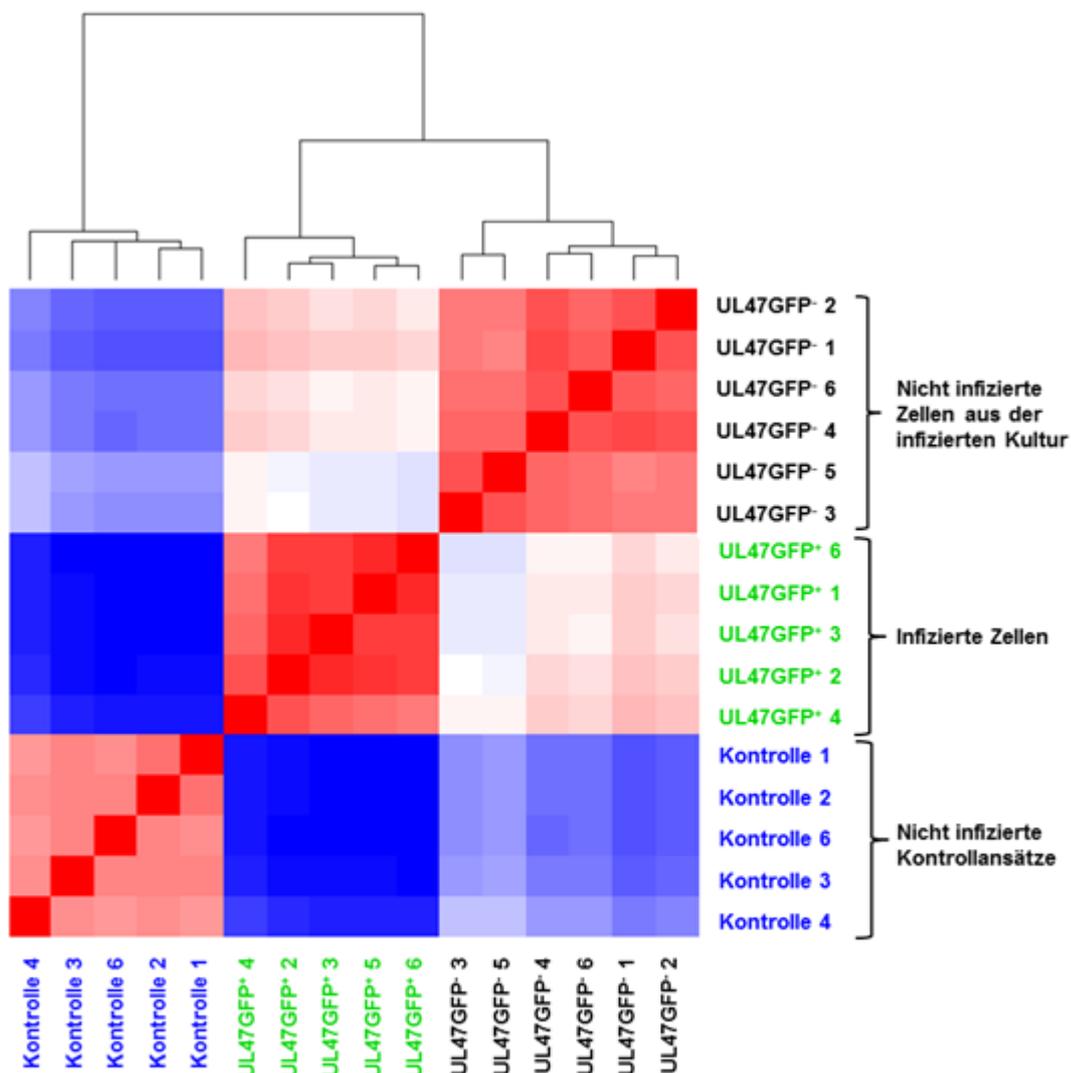
### 5.7.3 Heatmap der MDV Gene

Die Mikroarraydaten wurden mittels des Biconductor „R“-Pakets *GENPLOTTER* (Version 3.0.1 *The R Foundation for Statistical Computing*) normalisiert und in einer Heatmap mit einem *Distance Plot* und einem Dendrogramm graphisch dargestellt.

Dies ermöglichte erste Aussagen über die Homologie der verschiedenen Proben zueinander.

Diese Homologie wird in der Heatmap über eine Farbskala dargestellt. Die Farbskala variiert von rot, für Proben mit identischen Genexpressionsverhalten, bis tief blau, für Proben mit einem sehr unterschiedlichen Genexpressionsmuster. Die Zuordnung der Proben zu einer Gruppe erfolgte durch das Programm anhand der Homologie der Signalintensität der gespotteten Gene.

Mit Hilfe des Dendrogramms wird die verwandtschaftliche Beziehung der zugeordneten Probengruppen dargestellt. Je näher die Knotenpunkte zueinander liegen desto ähnlicher sind die Gruppen.



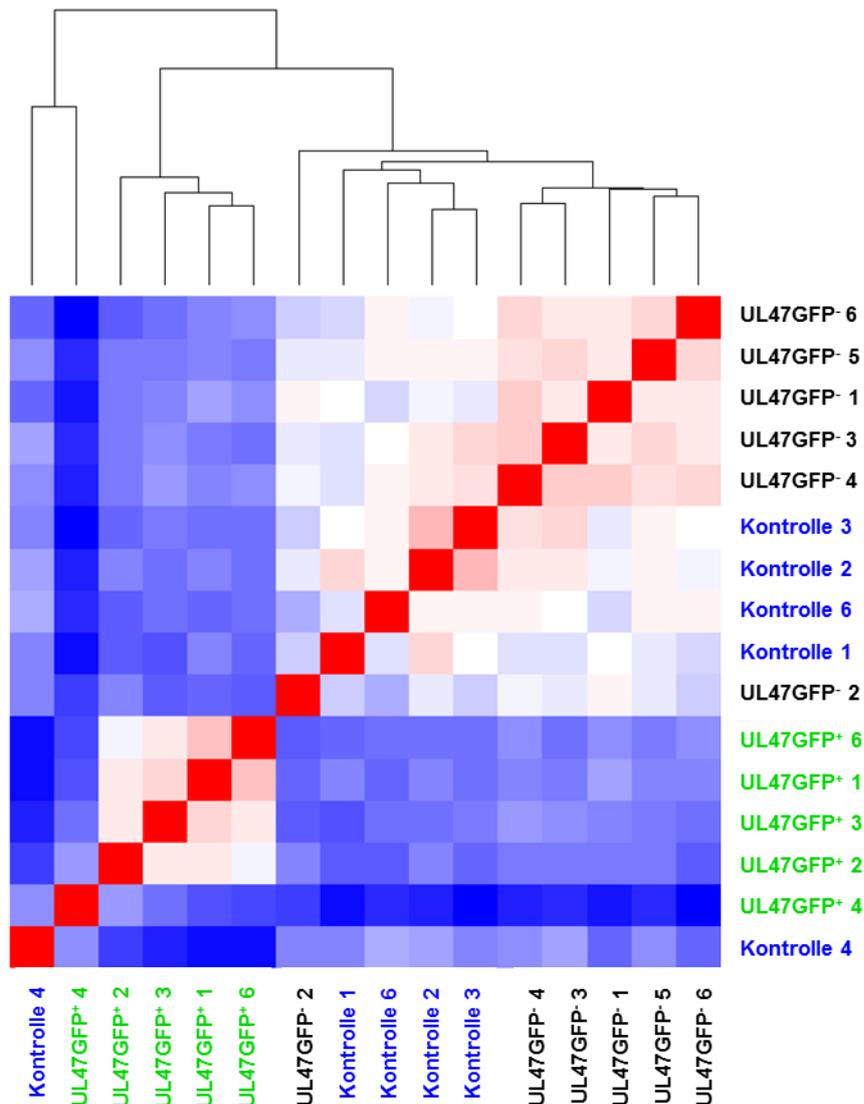
**Abbildung 30: Heatmap aller gespotteten MDV-Gene**

Dargestellt ist eine Heatmap des Mikroarrays, die mittels „R“-Paket Genplotter für alle gespotteten MDV Gene generiert wurde. Die Einzelproben wurden gegeneinander aufgetragen. Je unterschiedlicher das Genexpressionsmuster einer Probe ist, desto blauer sind die Felder. Je ähnlicher die Genexpression der Proben ist, umso roter sind die Felder. Dunkelrote Felder entsprechen identischen Proben, die mit sich selbst verglichen werden.

Die Abbildung 30 zeigt alle auf den Mikroarray gespotteten MDV-Gene. Zu erkennen ist, dass die einzelnen Proben vom Programm den entsprechenden Gruppen zugeordnet wurden und sich innerhalb einer Gruppe sehr ähneln. Es wurde deutlich, dass sich UL47GFP<sup>+</sup> (infizierte B-Zellen) und UL47GFP<sup>-</sup> (nicht infizierte B-Zellen) in ihrem Expressionsmuster ähneln und sich von der nicht infizierten Kontrolle deutlich abgrenzen.

#### **5.7.4 Heatmap der Hühnergene**

In Abbildung 31 sind alle auf den Mikroarray gespotteten Hühnergene dargestellt. Im Vergleich zu Abbildung 30 ist zu erkennen, dass die Einteilung anhand der Ähnlichkeit der Genexpression nicht zu einer eindeutigen Clusterbildung geführt hat.



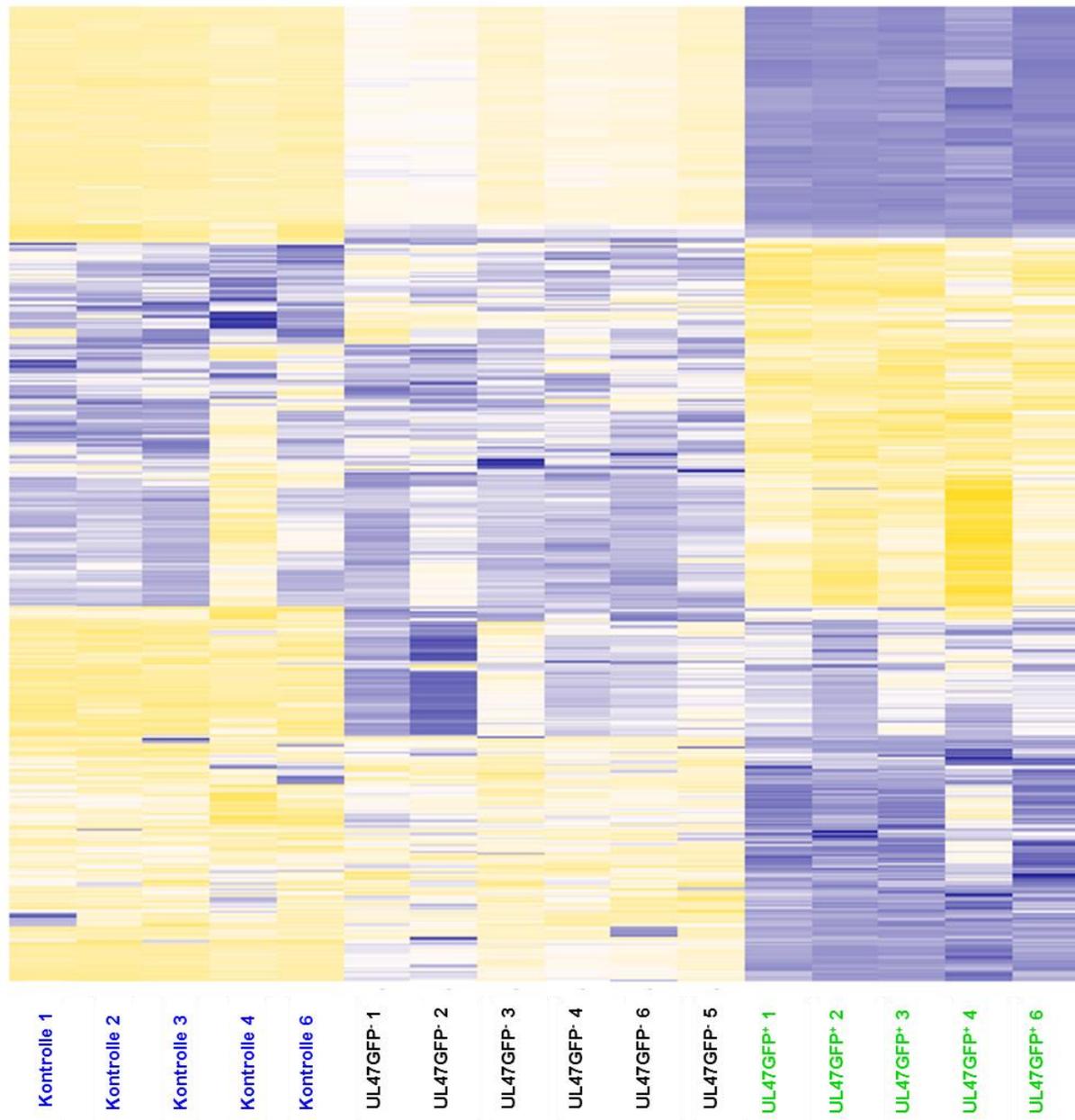
**Abbildung 31: Heatmap aller gespotteten Hühnergene**

Dargestellt ist eine Heatmap des Mikroarrays, die mittels „R“-Paket Genplotter für alle gespotteten Hühnergene generiert wurde. Die Einzelproben wurden gegeneinander aufgetragen. Je unterschiedlicher das Genexpressionsmuster einer Probe ist, desto blauer sind die Felder. Je ähnlicher die Genexpression der Proben ist, umso roter sind die Felder. Dunkelrote Felder entsprechen identischen Proben, die mit sich selbst verglichen werden.

Die Proben „Kontrolle 4“ und „UL47GFP<sup>+</sup>4“ zeigten ein Genexpressionsmuster, das sich von dem der anderen Proben abgrenzte. Dies wurde besonders durch die Darstellung im Dendrogramm deutlich. Werden diese beiden Proben bei der Betrachtung des Arrays zunächst nicht berücksichtigt, ist eine klare Eingruppierung der Proben innerhalb der Gruppen erkennbar. In ihrem Genexpressionsmuster glichen sich die Kontrolle und nicht infizierten B-Zellen (UL47GFP<sup>-</sup>) deutlich und grenzten sich klar von den infizierten B-Zellen (UL47GFP<sup>+</sup>) ab. Dies wurde sowohl durch die Farbgebung als auch durch das Dendrogramm deutlich.

### 5.7.5 Signifikant regulierte Gene MDV-infizierter B-Zellen

Nach der Normalisierung der Daten wurde mit Hilfe des Programm *Microarray Pipeline* mit Hilfe statistischer Analysen eine Liste der signifikant regulierten Gene erstellt und graphisch dargestellt (Abbildung 32 und Tabelle 10). Ein Gen wurde als signifikant reguliert betrachtet, wenn es eine FDR (*false discovery rate*) von kleiner gleich 1% und einen Expressionsunterschied FC (*fold change*) von mindestens +/-2 aufwies. Ein Gen zwischen zwei Gruppen musste also mindestens zweifach hoch- bzw. herunterreguliert sein. In Abbildung 32 ist eine von der *Microarray Pipeline* generiert Heatmap dargestellt, die die Genexpressionsmuster der signifikant regulierten Gene verdeutlicht.



**Abbildung 32: Heatmap aller signifikant regulierten Gene**

Zu sehen ist eine von der *Microarray pipeline* generierte Heatmap, die über farbliche Unterschiede die Genexpressionsunterschiede der analysierten Proben darstellt. Eine blaue Farbe weist auf eine starke Genexpression hin, während eine gelbe Farbe auf eine eher schwache Genexpression hinweist. Farbnuancen dazwischen spiegeln eine intermediäre Genexpression wider. Dabei entspricht eine Spalte einer einzelnen analysierten Probe, eine Linie entspricht einem Gen.

Für eine eingehende Genexpressionsanalyse wurden die FCs aus den Vergleichen aller analysierter Gruppen errechnet, so dass drei Vergleiche möglich wurden: UL47GFP<sup>+</sup> vs. Kontrolle, UL47GFP<sup>+</sup> vs. UL47GFP<sup>-</sup> und UL47GFP<sup>-</sup> vs. Kontrolle. Einige Gene befinden sich in Replikaten auf dem Mikroarray, aus diesen wurde der Mittelwert des FCs errechnet. Die entstandene Genliste wurde anschließend nach auf dem Mikroarray befindlichen Hühnergenen und viralen MDV-Gene bzw. Genabschnitte aufgetrennt. In Tabelle 10 sind die

Anzahl der signifikant regulierten Gene und die Anzahl der hoch- bzw. herunterregulierten Gene der verschiedenen Gruppenvergleiche zu sehen.

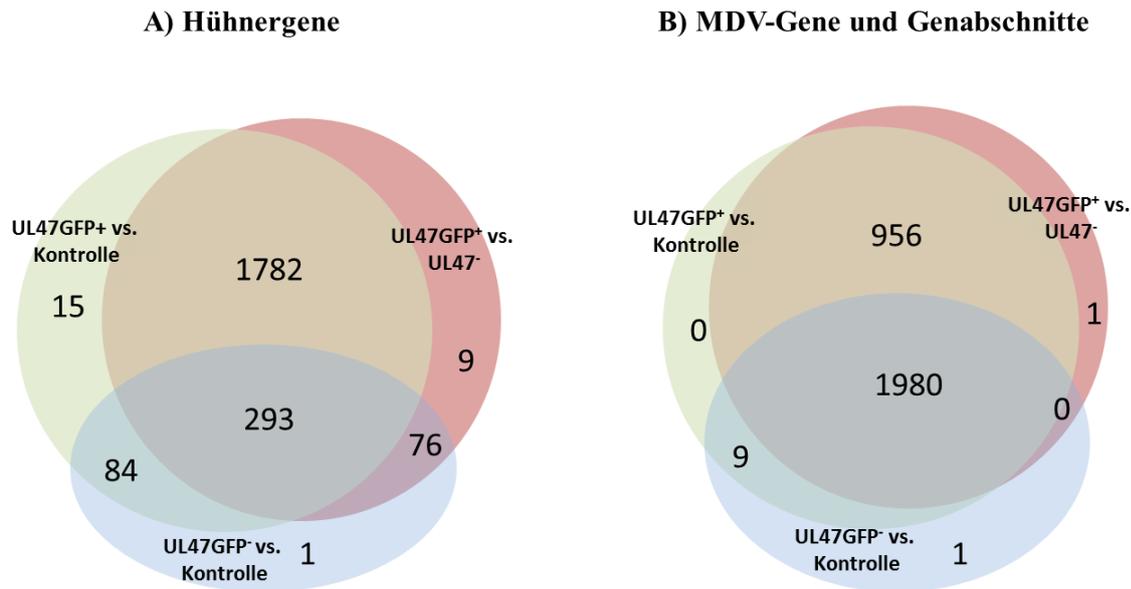
		Gesamtzahl der signifikant regulierten Gene		
<b>Hühnergene</b>	UL47GFP <sup>+</sup> vs. Kontrolle	2189	+	800
			-	1389
	UL47GFP <sup>+</sup> vs. UL47GFP <sup>-</sup>	2172	+	706
			-	1466
	UL47GFP <sup>-</sup> vs. Kontrolle	458	+	292
			-	166
<b>MDV-Gene und Genabschnitte</b>	UL47GFP <sup>+</sup> vs. Kontrolle	2958	+	2957
			-	1
	UL47GFP <sup>+</sup> vs. UL47GFP <sup>-</sup>	2950	+	2947
			-	3
	UL47GFP <sup>-</sup> vs. Kontrolle	1998	+	1978
			-	20

**Tabelle 10: Signifikant regulierte Gene nach MDV Infektion**

Zu sehen ist die Gesamtzahl der signifikant regulierten Gene der verschiedenen Gruppenvergleiche nach einer MDV Infektion und der Anteil an hoch- bzw. herunterregulierten Gene, aufgeteilt nach Hühnergengen und viralen MDV-Genen. In diesen Vergleichen bedeutet eine Hochregulation (+), dass ein Gen in der erstgenannten Gruppe signifikant stärker exprimiert wurde als in der zweitgenannten Gruppe. Eine Herunterregulation (-) bedeutet, dass ein Gen in der erstgenannten Gruppe signifikant schwächer exprimiert wurde als in der zweitgenannten Gruppe (FDR≤1%; FC mindestens +/-2).

Wie in der Tabelle 10 zu sehen ist, wurden eine Vielzahl von Hühnergengen und fast alle der MDV-Gene und Genabschnitte, die mit Hilfe der Mikroarray Technologie analysiert wurden, nach MDV Infektion signifikant reguliert. Dabei wurden die MDV-Gene in der Gruppe UL47GFP<sup>+</sup> fast ausschließlich hochreguliert. Interessanterweise wurden auch ein Großteil dieser Gene in der Gruppe UL47GFP<sup>-</sup> hochreguliert, obwohl diese nicht mit MD Virus infiziert waren, wie Abbildung 29D zeigte. Innerhalb der Hühnergene wurden ebenfalls sehr viele Gene signifikant reguliert. Dabei wurden in den Vergleichen UL47GFP<sup>+</sup> vs. Kontrolle und UL47GFP<sup>-</sup> vs. Kontrolle mehr Gene signifikant schwächer exprimiert als hoch exprimiert.

Um dieses Ergebnis besser zu veranschaulichen, wurden die Genüberschneidungen innerhalb der Hühnergene und MDV-Gene getrennt in einem Venn Diagramm (Abbildung 33) dargestellt. Eine Liste aller signifikant regulierten Gene und ihrer FCs ist auf beiliegender CD in Mappe 1, Tabelle 17 (Hühner- Gene) und Tabelle 18 (MDV- Gene) zu finden.



**Abbildung 33: Venn-Diagramme der Hühnergene und der MDV-Gene**

Dargestellt sind die Genüberschneidungen der signifikant regulierten Gene innerhalb der Hühnergene (A) und MDV-Gene (B). Hierfür wurden die signifikant regulierten Gene in den dargestellten Gruppen analysiert.

Das in Abbildung 33 dargestellte Venn-Diagramm veranschaulicht die Überschneidungen hinsichtlich der signifikant regulierten Gene zwischen den einzelnen Vergleichen. Innerhalb der signifikant regulierten Hühnergene gibt es 1782 Gene, die sowohl beim Vergleich von UL47GFP<sup>+</sup> vs. Kontrolle als auch von UL47GFP<sup>+</sup> vs. UL47GFP<sup>-</sup> signifikant reguliert waren. Zudem gibt es 293 Gene, die innerhalb aller drei Vergleiche signifikant reguliert waren. Beim Vergleich UL47GFP<sup>-</sup> vs. Kontrolle gab es lediglich ein Gen, was innerhalb der anderen beiden Vergleiche nicht reguliert wurde. 15 Gene wurden ausschließlich zwischen UL47GFP<sup>+</sup> vs. Kontrollgruppe und nur 9 Gene wurden alleine zwischen UL47GFP<sup>+</sup> vs. UL47GFP<sup>-</sup> signifikant exprimiert. Zudem gibt es 84 Gene, die sowohl im Vergleich von UL47GFP<sup>+</sup> vs. Kontrolle als auch bei UL47GFP<sup>-</sup> vs. Kontrolle signifikant reguliert wurden. Zwischen UL47GFP<sup>+</sup> vs. UL47GFP<sup>-</sup> als auch bei UL47GFP<sup>-</sup> vs. Kontrolle wurden 76 Gene signifikant reguliert, die im Vergleich von UL47GFP<sup>+</sup> vs. Kontrolle nicht exprimiert werden.

Bei Betrachtung der MDV-Gene fällt auf, dass mit 1980 Genen und Genabschnitten der Großteil der signifikant regulierten Gene bzw. Genabschnitte in allen drei Vergleich differenziell reguliert wurde. Zudem gibt es 956 Gene bzw. Genabschnitte, die sowohl im Vergleich von UL47GFP<sup>+</sup> vs. Kontrolle als auch von UL47GFP<sup>+</sup> vs. UL47GFP<sup>-</sup> 1782 signifikant differenziell reguliert wurden, jedoch nicht im Vergleich von UL47GFP<sup>-</sup> vs. Kontrolle. Eine Liste der Gene in den unterschiedlichen Vergleichen ist auf der beiliegenden

CD in Mappe 1, Tabelle 21 zu finden.

Des Weiteren sollte untersucht werden, an welchen Signalwegen die durch die MDV-Infektion regulierten Gene beteiligt sind. Zur Identifikation der biologisch relevanten Signalwege wurden die signifikant regulierten Gene des Vergleichs UL47GFP<sup>+</sup> vs. Kontrolle mittels *Kegg Pathway Express* analysiert. Dabei zeigte sich, dass von 89 Signalwegen 39 biologisch relevant sind (*corrected gamma p-value*  $\leq 0,25$ ). Je niedriger der *corrected gamma p-value* ist, umso biologisch relevanter erscheinen die Signalwege. Um die durch die MDV-Infektion induzierte Immunantwort näher betrachten zu können, wurden im Weiteren die 21 immunrelevanten Signalwege herausgefiltert (Tabelle 11). Diese Signalwege spielen insbesondere eine Rolle bei der Zell-Zellinteraktion, der Zellmigration, der Zellaktivierung, der Pathogenerkennung, des Zellzyklus und bei der Apoptose eine Rolle. Insgesamt reflektieren die immunologisch relevanten Signalwege das, was nach einer MDV-Infektion *in vivo* zu erwarten wäre.

Signalweg	Corrected gamma p-value
Cell adhesion molecules (CAMs)	$1,85 \times 10^{-56}$
Leukocyte transendothelial migration	$3,29 \times 10^{-46}$
Antigen processing and presentation	$1,37 \times 10^{-7}$
B cell receptor signaling pathway	$1,38 \times 10^{-5}$
Cell cycle	$8,81 \times 10^{-5}$
Toll-like receptor signaling pathway	$3,12 \times 10^{-4}$
Phosphatidylinositol signaling system	$6,12 \times 10^{-4}$
Natural killer cell mediated cytotoxicity	0,0014
Primary immunodeficiency	0,0044
Cytokine-cytokine receptor interaction	0,0057
p53 signaling pathway	0,0074
Jak-STAT signaling pathway	0,0209
Fc epsilon RI signaling pathway	0,0227
Apoptosis	0,0369
T cell receptor signaling pathway	0,1124
Tight junction	0,1998
Hematopoietic cell lineage	0,2155
DNA replication	0,2348

Adherens junction	0,2446
Complement and coagulation cascades	0,2501
MAPK signaling pathway	0,2539

**Tabelle 11: Immunrelevante Signalwege nach MDV-Infektion**

Dargestellt sind die immunologisch relevanten Signalwege nach der MDV-Infektion. Analysiert wurden die signifikant regulierten Gene des Vergleichs UL47GFP<sup>+</sup> vs. Kontrolle.

Im Detail wurden immunologisch relevante Zytokine und Chemokine betrachtet. Dabei wurde wieder die UL47GFP<sup>+</sup>-Gruppe mit der Kontrollgruppe verglichen. Insgesamt waren von 28 annotierten Chemokinen 15 nach der MDV-Infektion signifikant reguliert. Von den 97 annotierten Zytokinen waren 30 signifikant reguliert. Bei Betrachtung der signifikant regulierten Zytokine und Chemokine fällt auf, dass nur sehr wenig Zytokine oder Chemokine in UL47<sup>+</sup> B-Zellen hochreguliert sind. Der Großteil der Zytokine und Chemokine sowie deren Rezeptoren weist bei den infizierten B-Zellen eine signifikant geringere RNA-Abundanz auf als in der Kontrollgruppe. Insgesamt wurden sechs hoch- bzw. runterregulierte Gene aufgeführt (Tabelle 12 und Tabelle 13). Allerdings waren innerhalb der signifikant regulierten Chemokine insgesamt nur fünf Chemokine hochreguliert.

Chemokine	FC		
	UL47GFP <sup>+</sup> vs. Kontrolle	UL47GFP <sup>+</sup> vs. UL47GFP <sup>-</sup>	UL47GFP <sup>-</sup> vs. Kontrolle
<b>IL-8</b>	44	-2	87
<b>K203</b>	26	-2	41
<b>CCL20</b>	3	3	1
<b>CCL4</b>	3	-1	5
<b>XCL1</b>	2	-4	7
<b>CXCL13L3</b>	-34	-27	-1
<b>CCR8</b>	-17	-10	-2
<b>CCR7</b>	-14	-12	-1
<b>CCR5</b>	-13	-36	3
<b>CCL4</b>	-11	-13	1
<b>CCR6</b>	-8	-5	-2

**Tabelle 12: Signifikant regulierte Chemokine**

Dargestellt sind die fünf am stärksten hoch- bzw. sechs am stärksten runterregulierten Chemokine nach MDV-Infektion. Die Einordnung erfolgte nach dem Vergleich der UL47GFP<sup>+</sup> vs. Kontrolle.

Zytokine	FC		
	UL47GFP <sup>+</sup> vs. Kontrolle	UL47GFP <sup>+</sup> vs. UL47GFP <sup>-</sup>	UL47GFP <sup>-</sup> vs. Kontrolle
Tumor-necrosis factor alpha-induced protein 6 (TNFAIP6)	28	-2	94
2'-5'-oligoadenylate synthetase-like protein (OASL)	3	-8	27
IL-6	3	2	2
IL-10R $\beta$	2	2	1
IFN- $\beta$	2	3	-1
eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2 (EIF2AK2)	2	-2	4
IL-18	-18	-17	-1
IL-2R	-14	-11	-1
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (TNFRSF11B)	-13	-9	-1
IL-21R	-11	-10	-1
IL-7R	-9	-10	-1
IFN- $\gamma$	-8	-29	4

**Tabelle 13: Signifikant regulierte Zytokine**

Dargestellt sind die sechs am stärksten hoch- bzw. runterregulierten Zytokine nach MDV-Infektion. Die Einordnung erfolgte nach dem Vergleich der UL47GFP<sup>+</sup> vs. Kontrolle.

## 6. DISKUSSION

Die Marek'sche Krankheit ist bis heute eine der bedeutendsten Erkrankungen in der stetig wachsenden Geflügelindustrie. Alleine in Deutschland wurden im Jahr 2012 36,6 Millionen Legehennen und knapp 596,1 Millionen Jungmasthühner gehalten, die alle zum Schutz vor dem MD *in ovo* oder per Hand am Tag des Schlupfes vakziniert werden müssen (Statistisches Bundesamt, 2012). Im Moment kann die Erkrankung durch die Impfung mit der CVI988 Vakzine und den entsprechenden Hygiene- und Managementmaßnahmen kontrolliert werden. Bereits hier ergeben sich erhebliche Probleme, da viele Zweite und Dritte Weltländer nicht über eine ausreichende Infrastruktur verfügen. Zudem stellt sich die Frage, wie sich die Virulenzsteigerung der Pathotypen weiter entwickeln wird und wann zum ersten Mal vv++MDV-Stämme auftreten. Bis heute gibt es nur wenige vielversprechende Ansätze zur Entwicklung effektiverer neuer Impfstoffe, die jedoch zur Kontrolle virulenter MDV-Stämme dringend benötigt werden. Fortschritte auf diesem Gebiet setzen ein umfassendes Verständnis der MD Pathogenese und somit der Wirt-Pathogen-Interaktion voraus.

Die bisherigen Erkenntnisse zur Wirt-Pathogen-Interaktion stammen zum Großteil aus *in vivo* und *in vitro* Studien, wobei letztere auf der Nutzung von Zellkultursystemen basieren, die die natürliche Infektion in keiner Weise widerspiegeln. Infektionsversuche mit Fibroblasten (HEF, DEF) und Nierenepithelzellen haben nur eine sehr begrenzte Aussagekraft, da diese Zellen *in vivo* nicht infiziert werden. Wie einleitend dargestellt, sind Lymphozyten die primären Zielzellen. Bis heute fehlen aber praktikable Zellkultursysteme für Hühner B- und T-Zellen. Solche Systeme wären besonders für die Erforschung der frühen zytolytischen Phase und der Phase der Latenz und insbesondere der Transformation wichtig.

Die Fortschritte in der reversen Genetik des MDV ermöglichen heute das Virusgenom vielfältig zu manipulieren und eine große Zahl an Virusmutanten zu generieren. Die Erforschung dieser Virusmutanten erfolgte bislang *in vitro* mit HEF/CKC-Kulturen, ganz überwiegend in Tierexperimenten, die durch die Tumorbildung mit erheblichen Belastungen für die Tiere einhergehen. Funktionelle *in vitro* Untersuchungen dieser Virusmutanten an B- und T-Zellkulturen könnten die Anzahl der *in vivo* Tierexperimente verringern und einen erheblichen Beitrag zum Tierschutz im Sinne des 3R-Konzepts (*reduce, refine, replace*) leisten. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, erstmals ein solches System zu etablieren und der MDV-Forschungsgemeinschaft zur Verfügung zu stellen.

## 6.1 VORAUSSETZUNGEN FÜR DIE *IN VITRO* MDV-INFEKTION VON B- UND T-ZELLEN

Obwohl Calnek *et al.* vor 30 Jahren die Infektion von primären Lymphozyten *in vitro* gelang, gab es seither keine weiteren Berichte zur Nutzung der Methode. Ein Grund dafür ist sicherlich, dass das von Calnek *et al.* verwendete Infektionssystem nicht wirklich praktikabel war. Da primäre Hühnerlymphozyten nur eine kurze Überlebensdauer *in vitro* haben, erfolgte im Calnek-System alle ein bis zwei Tage eine Zugabe von frisch isolierten primären Lymphozyten (Calnek *et al.*, 1984a; Calnek *et al.*, 1982).

Die wichtigste Voraussetzung für die Entwicklung eines *in vitro* MDV-Infektionssystem für primäre Lymphozyten war daher die Etablierung von Langzeit-Kultursystemen für Hühner-B- und T-Zellen. Die Arbeiten der letzten Jahre durch Kothlow *et al.* brachten hier erhebliche Fortschritte. Durch die Stimulation der primären Lymphozyten-Zellkulturen aus Blut und Milz mit rekombinanten chCD40L konnte ein Überleben der B-Zellen von bis zu 18 Tagen erreicht werden. Besonders detailliert wurde die Stimulation von Milz-B-Zellen durch chCD40L und dessen Einfluss auf die kultivierten B-Zellen charakterisiert (Kothlow *et al.*, 2008).

Die Kultivierung von primären T-Zellen ist mit Hilfe zahlreicher T-Zellwachstumsfaktoren möglich. Neben den schon lange bekannten Mitogenen wie PHA und Con A zur allgemeinen T-Zellaktivierung, gibt es auch einige T-Zellwachstumsfaktoren, die spezifische Subpopulationen der T-Zellen stimulieren. Während der MDV-Infektion sind sowohl in der zytolytischen Phase, als auch in der latenten Phase bis hin zur Transformation die CD4<sup>+</sup> αβ-TCR<sup>+</sup> T-Zellen die primären Zielzellen (Baigent *et al.*, 1998; Schat *et al.*, 1991). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die T-Zellstimulation durch an die Zellkulturplatte gebundenen mAK gegen den αVβ1-TCR (TCR-2) untersucht. Dieser führt durch die Quervernetzung des αVβ1-TCR zur Aktivierung der T-Zelle, ein Ansatz, der sich als erfolgreich erwiesen hat.

Da es sich bei MD um ein strikt zell-assoziiertes Virus handelt, musste die Infektion der Lymphozytenkulturen durch die Co-Kultivierung mit MDV infizierten HEF erfolgen. Es wurde ein großer MD-Virusstock angelegt, um gleiche Voraussetzungen für die geplanten Versuche zu gewährleisten. Dabei zeigte sich, dass HEF der retrovirusfreien Hühnerlinie Linie-0 im Vergleich zu LSL-HEF bessere Infektionsergebnisse aufwies (30% vs. 16% infizierte HEF). Zudem war es besonders für die Transformations-Experimente mit Lymphozyten wichtig, dass eine gleichzeitige Transformation durch eine retrovirale Infektion der HEF sicher ausgeschlossen werden konnte. Da die Virusstocks nur zu 30% aus infizierten

HEF bestehen, war eine initiale Befürchtung, dass die zugegebenen nicht infizierten HEF die primären Lymphozyten überwuchern. Dies trat allerdings nur als Problem in den Langzeitkulturen für die T-Zelltransformation auf und konnte durch vorsichtiges Resuspendieren der Lymphozyten und Überführen auf eine neue Zellkulturplatte vermieden werden.

Eine weitere wichtige Voraussetzung für die Etablierung der hier beschriebenen MDV-Infektionssysteme waren die durch die BAC-Technik manipulierten Virusstämme. Die Virusstämme RB-1B UL47GFP und RB-1B MeqGFP-UL47RFP ermöglichen eine einfache Detektion des Virus ohne aufwendige zytoplasmatische Färbung (Engel, 2012; Jarosinski Kw et al., 2012). Sobald eine infizierte Zelle das Protein UL47 in der zytolytischen Phase oder Meq in der Latenz exprimiert, war dies durch die gleichzeitige Expression des grünen bzw. roten Fluoreszenzfarbstoffes erkennbar. Somit dient das Virus als Markervirus für die jeweilige Phase der MDV-Infektion. Dies war besonders für die detaillierte Phänotypisierung der infizierten Zellen von Vorteil, da die durchflusszytometrische Analyse von Mehrfach-Oberflächenfärbungen bei gleichzeitiger Detektion von GFP/RFP möglich war. Zudem konnten so infizierte von nicht infizierten Zellen unterschieden werden, ohne die Zellen für eine Antikörper-basierte Färbung zu permeabilisieren, was weiterführende Arbeiten ermöglichte.

## **6.2 MDV-INFEKTION VON B-ZELLEN *IN VITRO***

In einem ersten Ansatz für die Infektion von primären B-Zellen wurden Milzlymphozyten verwendet, da diese im Vergleich zur bursalen B-Zelle eine geringe Apoptoserate nach Inkulturnahme und eine längere Überlebensdauer aufweisen. Um herauszufinden, in welchem Verhältnis Milzleukozyten und infizierte HEF co-kultiviert werden sollten, wurden drei Verdünnungen ( $37 \times 10^3$  pfu/ $10^7$  Zellen,  $13 \times 10^3$  pfu/ $10^7$  Zellen,  $4 \times 10^3$  pfu/ $10^7$  Zellen) verwendet (unveröffentlichte Ergebnisse). Für die weiteren Arbeiten wurde die geringste Verdünnungsstufe als optimal ermittelt, was einer fünf-fachen Verdünnung eines Gefrier Röhrchens des Virusstocks entsprach.

Die Infektionsversuche über einen Zeitraum von vier Tagen zeigten, dass die Zahl der infizierten Leukozyten innerhalb der lebenden Leukozytenpopulation stetig anstieg. Auch die Anzahl der infizierten B-Zellen stieg mit der Zeit an. An Tag 4 p.i. waren im Schnitt 13% aller B-Zellen infiziert. Dabei waren zu ca. 90% B-Zellen in der Milz-Zellkultur infiziert, jedoch fanden sich auch knapp 6% T-Zellen in der infizierten Leukozytenpopulation. Dies

entspricht überraschend gut den Befunden der *in vivo* Untersuchungen, bei denen sich vier Tage p.i. unter den 0,43% infizierten Milzleukozyten 95% infizierte B-Zellen und 4% infizierte T-Zellen befanden (Baigent et al., 1996).

Eine Frage, die sicherlich durch zukünftige Arbeiten geklärt werden muss, ist die der Infektionsdynamik in den Kulturen. Die Ergebnisse der Infektionskinetik könnten dadurch erklärt werden, dass über die Zeit die Infektion von B-Zelle zu B-Zelle weitergegeben wird. Alternativ könnten die infizierten B-Zellen länger überleben und sich daher das Verhältnis innerhalb der lebenden B-Zellpopulation verschieben. Denn von Tag 1 bis Tag 4 p.i. nimmt nicht nur die Anzahl der infizierten Zellen zu, sondern auch die Anzahl der lebenden Zellen stark ab. Erste Hinweise zur Unterstützung der zweiten Annahme lieferten Zellzyklusanalysen an sortierten infizierten B-Zellen, die in Zusammenarbeit mit den Projektpartnern am INRA (*Institut national de la recherche agronomique*, Nouzilly, Frankreich) erstellt wurden. Dabei konnte gezeigt werden, dass die MDV-Infektion in infizierten B-Zellen im Vergleich zu nicht infizierten B-Zellen zu einem unerwarteten Verbleib der Zellen in der postmitotischen Phase (G1) oder Ruhephase (G0) führt. In Fibroblasten dagegen führt die MDV-Infektion zu einer verzögerten Synthesephase (S-Phase) (persönliche Mitteilung Laëtitia Trapp-Fragnet, Equipe Biologie des Virus Aviaires, INRA).

Bei den infizierten Milz-B-Zellen handelt es sich um eine intermediär große Zelle, die vermutlich bedingt durch die chCD40L Stimulation proliferiert, jedoch keine blastoide Zellgröße aufweist. Auch in Bezug auf die Expression der Oberflächenmarker entsprechen die infizierten Zellen zu unterschiedlichen Prozentsätzen sowohl den kleinen B-Zellen als auch den proliferierenden blastoiden B-Zellen.

In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass sich auch Blutleukozyten mit MDV infizieren lassen. Die geringe Anzahl an infizierten Leukozyten an Tag 3 p.i. im Vergleich zur hohen Anzahl an infizierten B-Zellen lässt sich damit erklären, dass der Gesamt-B-Zellanteil im Blut nur bei etwa 10-15% liegt. Interessanter Weise zeigt sich, dass an Tag 3 p.i. im Vergleich zur Milz fast doppelt so viele Blut-B-Zellen infiziert sind. Es stellt sich daher die Frage, ob die B-Zellpopulation im Blut grundsätzlich empfänglicher für die MDV-Infektion ist, als die B-Zellpopulation in der Milz. Um sich der Frage zu nähern und zu klären, ob es sich bei den infizierten Zellen um eine spezifische B-Zellsubpopulation handelt, die die vorrangige Zielzelle der MDV-Infektion darstellt, wurde der Phänotyp der infizierten B-Zellen in Milz und Blut charakterisiert. Vergleicht man die infizierten B-Zellen hinsichtlich der Größe und der exprimierten Oberflächenmoleküle zeigte sich, dass infizierte B-Zellen im Blut und in der Milz sehr ähnlich sind. Es handelt sich bei beiden B-Zellpopulation

insbesondere um chCXCR4<sup>niedrig/-</sup> B-Zellen.

Die Bursa Fabricii ist, als Reifungsorgan der B-Zelle, auch bei der natürlichen MDV-Infektionen ein wichtiges Zielorgan. Auch bei der Infektion von kultivierten Bursa-B-Zellen zeigte sich über einen Zeitraum von vier Tagen, dass ab dem ersten Tag p.i. eine große Anzahl an B-Zellen infiziert waren. Über den Verlauf der Zeit stieg diese massiv an, während die Zahl lebender Zellen schon nach dem ersten Tag p.i. stark abnahm. Auch hier entsprach der Phänotyp der infizierten B-Zelle meist dem der nicht infizierten B-Zellen. Ein deutlicher Unterschied zeigte sich hinsichtlich der chCXCR4 Expression, die hier, wie auch in Milz und Blut, reduziert war. Eine verminderte Expression von chCXCR4 bei gleichzeitiger Expression von chL12 (OV-Antigen) in der Bursa repräsentiert nach bisherigem Wissen eine reife, die Bursa verlassende B-Zelle (Busalt, 2013). Auch das Oberflächenexpressionsmuster von Sialyl-Lewis-X (CD15s) und Lewis-X (CD15) ist bei den Migrationsprozessen der B-Zelle von Bedeutung. Während die Expression von CD15s schon kurz nach dem Einwandern in die Bursa herunterreguliert wird, kommt es gleichzeitig zur Hochregulation der CD15 Expression. Zum Zeitpunkt des Schlupfes wird die Expression von CD15 herunterreguliert, was vermutlich die Emigration aus der Bursa erleichtert (Masteller et al., 1995). Die geringe chCXCR4 und CD15-Expression der infizierten B-Zellen legt die Vermutung nahe, dass es sich bei der Zielzelle der MDV-Infektion um eine reife B-Zelle handelt, die bereit ist über die Blutbahn die Bursa zu verlassen und in die lymphatischen Organe einzuwandern.

Des Weiteren ist auffallend, dass chCD300L-B1, ein immunmodulatorisches Molekül, deutlich stärker auf der Zelloberfläche von infizierten Zellen als von nicht infizierten Zellen exprimiert wird. Die biologische Funktion von chCD300 beim Huhn, was auf B-Zellen, Monozyten und NK-Zellen zu finden ist (unveröffentlichte Daten, Prof. Dr. med. vet Göbel/Priv.-Doz. Dr. med. vet. Viertelboeck, Institut für Tierphysiologie, LMU München), sind bislang nicht weiter geklärt, weshalb zum jetzigen Zeitpunkt die Bedeutung dieser Beobachtung noch unklar bleibt (Clark et al., 2009; Viertelboeck et al., 2006).

Bei der Analyse der infizierten B-Zellen wurde besonderes Augenmerk auf die Expression des MHC-Klasse-I-Moleküls gelegt. Hunt *et al.* wiesen in ihren Versuchen mit der Fibroblastenlinie OU2 nach, dass es nach einer MDV-Infektion zur verminderten Expression des MHC-Klasse-I-Moleküls während der frühen Phase der Infektion und bei einer Reaktivierung aus der Latenz kommt. Dabei wird die Oberflächenexpression nach der Infektion mit HVT um 88% und mit dem Virusstamm Md11 um 68% verringert. Die verminderte MHC-Klasse-I-Expression ist vermutlich durch eine gestörte Funktion der

Antigen-assoziierten Transporterproteine (*transporter proteins associated with antigen presentation*, TAP) bedingt. Diese Herunterregulation von chMHC-Klasse-I konnte bisher nur mit dem mAK C6B12, der gegen die schwere Kette des chMHC-Klasse-I-Moleküls gerichtet ist, gezeigt werden (Hunt et al., 2001). Infizierte Bursa-B-Zellen zeigen keine Herunterregulation des  $\beta$ -2-Mikroglobulins, eine Proteinuntereinheit des MHC-Klasse-I-Moleküls. Nach Färbung der eigenen B-Zellkulturen mit dem mAK C6B12 gegen die schwere Kette des chMHCI-Moleküls lässt sich bestenfalls eine leicht verminderte Expression erkennen. Diese ist allerdings nicht vergleichbar mit der von Hunt *et al.* beschriebenen Regulation. Zudem ist auch im Mikroarray auf mRNA-Ebene keine verminderte Transkription der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette des chMHCI-Moleküls nachweisbar. Dieses Beispiel zeigt deutlich, dass Fibroblasten bzw. Fibroblastenlinien ein nur eingeschränkt geeignetes Zellkultursystem zur Untersuchung der Wirt-Pathogen-Interaktion sind.

Um die Frage zu klären, ob die infizierten B-Zellen aus dem *in vitro* System in der Lage sind infektiöses Virus zu bilden und das zell-assoziierte Virus weiterzugeben, wurde ein Co-Kultivierungsexperiment mit Fibroblasten durchgeführt. Dafür wurden aus *in vitro* infizierten Bursalymphozytenkulturen die infizierten B-Zellen heraussortiert. Die erste Befürchtung, dass die schnell apoptotisch zugrunde gehenden B-Zellen den Vorgang des Sortierens nicht überleben, bestätigte sich nicht. Es machte vielmehr den Anschein, als ob die infizierten Zellen besser überleben als nicht infizierte Bursazellen, denn während des Sortiervorgangs von vier bis sechs Stunden sank die Anzahl der lebenden Zellen im Analyseansatz, wohingegen der Anteil der infizierten B-Zellen stieg. In den Co-Infektionsversuchen mit infizierten B-Zellen zeigte sich, dass diese infektiös waren.

### **6.3 MDV-INFEKTION VON T-ZELLEN IN VITRO**

Nachdem ein *in vitro* Infektionssystem für B-Zellen verschiedenen Ursprungs entwickelt werden konnte, das reproduzierbar zu einer verhältnismäßig hohen Anzahl an lebenden, infizierten B-Zellen führt, sollte dies auch für T-Zellen etabliert werden. Das zuvor bereits diskutierte Cornell-Modell postuliert, dass es sich bei den infizierten T-Zellen um durch die B-Zellinfektion aktivierte T-Zellen handelt und ruhende T-Zellen nicht infiziert werden können (Calnek et al., 1984a; Calnek et al., 1984b). Daher wurden die Lymphozytenkulturen von Milz, Blut und Thymus mit dem mAK TCR-2 gegen den  $\alpha$ V $\beta$ 1-TCR stimuliert. Abgesehen von den unterschiedlichen Stimulationsprotokollen der Leukozyten unterscheiden sich die Infektionssysteme für die B- und die T-Zellen im Aufbau nicht weiter.

Da die T-Zelle die Hauptzielzelle der latenten Infektion darstellt (Baigent et al., 1998; Shek et al., 1983), wurde für die Infektionsversuche der RB-1B MeqGFP-UL47RFP Virusstamm verwendet. Dieses Viruskonstrukt erlaubt es, zytolytisch und latent infizierte Lymphozyten zu unterscheiden.

Ebenso wie für die infizierten Milz-B-Zellen wurde der Phänotyp der infizierten Milz-T-Zellen drei Tage p.i. näher charakterisiert. Hinsichtlich der Zellgröße hat die infizierte T-Zelle keinen intermediären Phänotyp, vielmehr lässt sie sich deutlich von den nicht proliferierenden kleinen Lymphozyten abgrenzen. Die infizierte Zelle gleicht hinsichtlich ihrer Größe den proliferierenden, und somit aktivierten, T-Zellen, was übereinstimmt mit den *in vitro* gewonnenen Daten.

Interessanter Weise besteht ein deutlicher Anteil der infizierten Zellpopulationen in diesen Kulturen aus B-Zellen und dies, obwohl keine gezielte Aktivierung der B-Zellen erfolgte. Möglicher Weise führt die Aktivierung der T-Zellen zur Sekretion von B-Zellzytokinen, die ein Überleben in der Kultur erlauben. Unter den infizierte T-Zelle sind hauptsächlich  $CD4^+ \alpha\beta1\text{-TCR}^+$  T-Zellen, aber auch einige wenige  $CD8^+$  T-Zellen. Es zeigt sich, dass die *in vitro* infizierte Zellpopulation eine ähnliche Zellzusammensetzung aufweist, wie sie nach *in vivo* Infektionen beobachtet werden (Baigent et al., 1996, 1998).

Die infizierten Milz-T-Zellen exprimieren alle das  $\beta$ -2-Mikroglobulin des chMHC-Klasse-I-Moleküls und dies auf dem gleichen Niveau wie proliferierende nicht infizierte Zellen. Die Expression von chMHC-Klasse-II lässt sich in zwei Population unterteilen. Bei den chMHC-Klasse-II<sup>hoch</sup> exprimierenden Zellen handelt es sich vermutlich um B-Zellen, während die chMHC-Klasse-II<sup>niedrige</sup> Population T-Zellen sind.

Blutlymphozyten lassen sich nach TCR-2 Stimulation gleichermaßen mit MDV infizieren, auch hier werden wieder die proliferierenden, großen Lymphozyten infiziert. Interessanter Weise sind fast alle in der Kultur enthaltenen B-Zellen infiziert. Wie in der Milz ist die Hauptzielzelle der Infektion die  $CD4^+ \alpha\beta1\text{-TCR}^+$  T-Zelle, wobei der Anteil der infizierten  $CD8^+$  T-Zellen höher ist. Zudem weisen die infizierten Blutleukozyten ein höheres chMHC-Klasse-I Niveau auf. Die chMHC-Klasse-II Expression unterteilt sich wieder in zwei Populationen.

Schließlich konnten auch die aus dem Thymus gewonnenen Lymphozyten mit Hilfe des Infektionssystems mit MDV infiziert werden. Mittels des FACSaria Zellsortierers konnten die infizierten Thymozyten hinsichtlich ihrer Expression von UL47RFP und MeqGFP vergleichend analysiert werden. Im infizierten Thymus zeigten sich zwei etwa gleich große

Populationen an infizierten Zellen. Die eine Population war MeqGFP-UL47RFP doppelt-positiv und die andere Meq einfach-positiv. Bei der MeqGFP-UL47RFP doppelt-positiven Population handelt es sich vermutlich um zytolytisch infizierte Zellen, da sie beide Virusproteine gleichzeitig exprimieren. Diese Population besteht zu über 60% aus infizierten B-Zellen. Dies deckt sich mit *in vivo* Studien, in denen die Hauptzielzelle der zytolytischen Infektion im Thymus, der nur etwa 3-5% B-Zellen enthält, die B-Zelle ist (Payne and Rennie, 1973; Shek et al., 1983). Neben den B-Zellen waren auch CD8<sup>+</sup> und einige wenige CD4<sup>+</sup> meist  $\alpha$ V $\beta$ 1-TCR<sup>+</sup> T-Zellen zytolytisch infiziert.

Die MeqGFP einfach-positiv Population besteht zu 66% aus CD4<sup>+</sup>  $\alpha$ V $\beta$ 1-TCR<sup>+</sup> T-Zellen und nur zu 2% aus B-Zellen. Vermutlich spiegelt diese Population latent infizierte Zellen wider, die keine Expression des mit der zytolytischen Phase assoziierten Virusprotein UL47 aufweisen. Dies entspricht den *in vivo* Experimenten, die gezeigt haben, dass nur ein äußerst geringer Anteil an infizierten B-Zellen in Latenz geht und der Großteil der latent infizierten Zellen CD4<sup>+</sup>  $\alpha$ V $\beta$ 1-TCR<sup>+</sup> T-Zellen sind (Baigent and Davison, 2004).

Bei der näheren Betrachtung des Phänotyps der infizierten Thymozyten fällt auf, dass diese, wie die infizierten B-Zellen, eine niedrige chCXCR4 Expression aufweisen. Die Expression des chMHC-Klasse-I Moleküls, ist wie auch bei den bursalen B-Zellen, abhängig vom verwendeten mAK. Die  $\beta$ -2-Kette des chMHC-Klasse-I-Moleküls ist auf der MeqGFP einfach-positiven Population leicht erhöht, während die schwere Kette des chMHC-Klasse-I-Moleküls bei allen drei Population das gleiche Expressionsniveau aufweist. Im Falle der infizierten T-Zellen kann man feststellen, dass es zu keiner verminderten Expression von chMHC-Klasse-I auf der Zelloberfläche kommt. Diese Beispiele zeigen erneut, dass es bei der Wirt-Pathogen-Interaktion sowohl Unterschiede zwischen Fibroblasten und Lymphozyten, als auch zwischen den infizierten B- und T-Zellen gibt. Um die Besonderheiten der zell-spezifischen MDV-Infektion erforschen zu können, ist die Entwicklung von Kultursystem für die jeweiligen Zielzellen entscheiden.

Die Expression des MHC-Klasse-II-Moleküls unterteilt sich bei den MeqGFP-UL47RFP positiven Thymozyten wieder in zwei Populationen. Auch hier stellen die infizierten B-Zellen vermutlich die chMHC-Klasse-II-Molekül<sup>hoch</sup> exprimierende Population dar.

Nachdem die T-Zellinfektion durch die Co-Kultivierung mit infizierten RB-1B MeqGFP-UL47RFP gelungen war, sollte nun in Anlehnung an das Cornell-Modell die Hypothese der Virusübertragung von infizierten B-Zellen auf aktivierte T-Zellen *in vitro* überprüft werden. Dafür mussten Thymus und Bursa von ein und demselben Tier verwendet

werden, um MHC-TCR Interaktion zu gewährleisten. Die infizierten Bursa-B-Zellen wurden einen Tag p.i. sortiert und mit den bereits durch TCR-2 stimulierten Thymozyten desselben Tieres co-kultiviert. Die Analyse der infizierten Thymozyten drei Tage p.i. wurde durch mehrere Faktoren erschwert. Zum einen waren die T-Zellen im Thymus durch ihre verschiedenen Entwicklungsstufen und die fehlende Expression von Oberflächenmarkern während der Entwicklung schwierig zu detektieren. Zum anderen waren die B-Zellen durch die für die Sortierung notwendige Oberflächenfärbung immer noch chBu1APC<sup>+</sup>, da der Rezeptor nicht internalisiert wurde. Daher sollte die Diskriminierung von B-Zellen und T-Zellen durch die chBu1Percp Färbung erfolgen, mit der die B-Zellen aus dem Thymus und die zugegebenen infizierten B-Zellen detektiert werden konnten. Bei Betrachtung der infizierten B-Zellen wird deutlich, dass fast alle B-Zellen lytisch infiziert sind und MeqGFP-UL47RFP gleichzeitig exprimieren. Die infizierte nicht B-Zellpopulation in der Thymozytenkultur repräsentiert die infizierten T-Zellen. Diese unterteilen sich wieder in eine zytolytisch infizierte Population und in eine etwas kleinere latent infizierte Population. Mit diesem Versuch konnte nachgewiesen werden, dass eine Übertragung des Virus *in vitro* auch von der B-Zelle auf die T-Zelle möglich ist. Dies ist der erste Nachweis überhaupt, der die von Calnek *et al.* aufgestellte Hypothese bestätigt (Calnek, 1986).

Der Nachweis, dass auch T-Zellen infektiös und in der Lage sind das Virus weiterzugeben, wurde durch die erfolgreiche Infektion von HEF erbracht. Eine Hypothese ist, dass das Virus über infizierte CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen zum FFE gelangt (Abdul-Careem et al., 2008). Mit Hilfe des in dieser Arbeit etablierten Modells wären nun Studien mit infizierten T-Zellen und B-Zellen an Dünnschnitten von FFE möglich, die auch den letzten Schritt im Infektionszyklus der MD nachbilden würden. Alternativ müssten FFE-Zellkultursysteme aufgebaut werden, die analog zu den hier beschriebenen Versuchen die Übertragung des Virus und die Infektion direkt untersuchen.

#### **6.4 LATENZ UND TRANSFORMATION VON T-ZELLEN *IN VITRO***

Nachdem die erfolgreiche Infektion von B- und T-Zellen möglich war und auch latent infizierte T-Zellen nachgewiesen werden konnten, stand die Frage im Raum, ob eine *in vitro* Transformation dieser Zellen möglich ist. Die Transformation von primären Lymphozyten *in vitro* gelang erstmals vor über 15 Jahren, jedoch gibt es seitdem keine weiteren Berichte darüber, wie oft nachfolgende Versuche (Calnek and Schat, 1991; Ikuta et al., 1987).

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden TCR-2 stimulierte Thymozyten

mit RB-1B UL47GFP infizierten HEF co-kultiviert. Leider konnte für diese Versuche nicht der RB-1B MeqGFP-UL47RFP Virusstamm verwendet werden, obwohl MeqGFP der optimale Marker für transformierte T-Zellen ist. Da es aber in *in vivo* Experimenten mit diesem modifizierten Virusstamm zum Ausbleiben einer Tumorbildung kam, ist davon auszugehen, dass das MeqGFP-Konstrukt mit der Transformation interferiert (Engel, 2012). Daher wurden die weiteren Arbeiten mit dem auch *in vivo* zur Tumorbildung führenden RB-1B UL47GFP durchgeführt.

Die fünf Wochen nach Infektion herausgewachsene Zelllinie JS1 stellte sich als homogene Lymphozytenpopulation dar und wuchs am besten, solange ein enger Zell-Zellkontakt gegeben war. Die Phänotypisierung zeigte, dass es sich bei der Zelllinie einheitlich um eine  $CD4^+ \alpha V\beta 1\text{-TCR}^+$  T-Zelle handelt. Dieser Phänotyp entspricht exakt dem, was von *in vivo* transformierten Zellen bekannt ist (Schat et al., 1991). Betrachtet man die Phänotypisierung aller *in vitro* transformierten Zelllinien, entspricht nur eine der Zelllinien nicht diesem Phänotyp. Allerdings wurde auch *in vivo* die Transformation von  $CD8^+ \alpha V\beta 2\text{-TCR}^+$  T-Zellen beschrieben, wie sie hier für die Linie JS4 gefunden wurde (Schat et al., 1991).

In den Phasen der zytolytischen und latenten Infektion werden verschiedene Virusproteine von den infizierten Zellen exprimiert. Die zytolytischen Phase ist durch die Expression von einer Vielzahl an Glyko-, Tegument- und anderer Virusproteinen wie zum Beispiel gB, ICP4, vCXCL13 oder UL47 und einer massiven Virusreplikation gekennzeichnet. In der latenten Phase bis zur Transformation kommt es nur zu einer geringen bis fehlenden Replikation des Virus und es werden nur eine geringe Anzahl an Latenz assoziierten MDV-Genen wie Meq oder die LATs exprimiert (Baigent and Davison, 2004; Osterrieder et al., 2006). Um die Expression der verschiedenen MDV-Proteine näher zu betrachten, wurden die Zelllinien mittels einer zytoplasmatischen Färbung näher charakterisiert. Betrachtet man die Expression der Virusproteine, so machte es den Anschein, als ob es sich um eine transformierte lymphoblastoide Zelllinie handelt, bei der ein Teil der Zellen reaktiviert wurde. Die Expression von Virusgenen und deren Bedeutung wird kontrovers diskutiert und die Erforschung ist aufgrund der Reaktivierbarkeit vieler lymphoblastoider Zelllinien schwierig. Es lässt sich jedoch sagen, dass die Expression von Meq bei einem gleichzeitigen Fehlen von zytolytischen Virusproteinen für eine Latenz und Transformation der Zelle spricht (zusammengefasst nach (Osterrieder et al., 2006; Ross, 1999)). Allerdings ist auch eine gleichzeitige sehr geringe Expression von ICP4-Transkripten möglich (persönliches Gespräch mit Prof. K.A. Schat, Cornell University, NY, USA). Die gB und UL47GFP exprimierenden Zellen sind womöglich reaktivierte T-Zellen, da es in der frühen Phase der Reaktivierung zur Expression von

zytolytischen Virusproteinen kommen kann (Ross et al., 1997). Da es in einer latent infizierten bzw. transformierten Zellen nicht zur Bildung von Viruspartikeln kommt, ist die Infektiosität der Zelllinie JS1 vermutlich durch den relativ hohen Anteil an reaktivierten Zellen zu erklären. Auch die von Calnek *et al.* *in vitro* transformierten lymphoblastoiden Zelllinien exprimierten im Verlauf der Zeit zu 25-30% *viral internal antigen* (Calnek and Schat, 1991).

Zukünftige Analysen der Zelllinien sollen die Integration des MDV Genoms ins Wirtsgenom klären. Dafür soll mittels *fluorescent in situ hybridization* (FISH) in Chromosomen der Metaphase nach den MDV-Integrationsstellen geschaut werden (Delecluse and Hammerschmidt, 1993; Delecluse et al., 1993; Kaufer et al., 2011).

Da es nach einigen Monaten zu einem Absterben der Zelllinien kommt, ist es fraglich, ob es sich wirklich um permanente MDV transformierte lymphoblastoide Zelllinien handelt. Denn auch bei der Gewinnung von lymphoblastoiden Zelllinien *ex vivo* kann es zu einer transienten Proliferation kommen, die sich nicht in allen Fällen zu einer permanenten lymphoblastoiden Zelllinie weiterentwickelt (Payne et al., 1981). Hierfür müssen Langzeitkulturen durchgeführt werden, die über den Untersuchungszeitraum dieser Arbeit hinausgehen.

## **6.5 ANWENDUNG DES INFEKTIONSMODELLS FÜR PRIMÄRE B-ZELLEN ZUR ERFORSCHUNG DER WIRT-PATHOGEN-INTERAKTION**

Die bisher diskutierten Arbeiten haben zur erfolgreichen Etablierung eines neuen *in vitro* Infektionssystemen für die Zielzellen des MDV geführt. Damit eröffnet sich erstmals ein Weg, die Interaktion von B-Zellen und Virus, bzw. T-Zelle und Virus detailliert und zu definierten Zeitpunkten zu untersuchen. Derartige Studien sind nach einer *in vivo* Infektion kaum möglich. Die sich durch dieses Zellkultursystem ergebenden Möglichkeiten sollten an Hand eines Beispiels veranschaulicht werden. Dazu wurde die Infektion von B-Zellen, der ersten MDV-Zielzelle, gewählt und zudem ein früher Zeitpunkt der Infektion analysiert, um die Untersuchung bereits lytischer Zellen zu vermeiden. Da Bursa B-Zellen *in vivo* früh infiziert werden und sich diese Zellen *in vitro* sehr gut und reproduzierbar infizieren ließen, wurden Bursalymphozyten für die weiteren Arbeiten gewählt.

Zunächst stellte sich die Frage hinsichtlich einer geeigneten Kontrolle. Nicht infizierte B-Zellen aus einer nicht infizierten Kultur wachsen unter anderen Kulturbedingungen als die

nicht infizierten B-Zellen (UL47GFP<sup>-</sup>) aus der infizierten Kultur. Ein wichtiger Unterschied ist das Fehlen von infizierten Fibroblasten in der nicht infizierten Kultur. Die Zugabe von nicht infizierten Fibroblasten zu den Kulturen erwies sich als problematisch, da diese die B-Zellen überwachsen. Die nicht infizierten B-Zellen aus der infizierten Kulturen haben demgegenüber den Vorteil, dass sie ähnlich wie bei einer *in vivo* Infektion neben den infizierten Zellen liegen und dementsprechend auch auf die virale Infektion in der Umgebung reagieren. Allerdings sind diese Zellen als alleiniger Vergleich nicht optimal, da nicht sicher ausgeschlossen werden kann, dass sich unter diesen Zellen infizierte Zellen in einem frühen Infektionsstadium befinden. Diese Zellen sind möglicher Weise zum Untersuchungszeitpunkt schon infiziert, exprimieren jedoch noch kein UL47GFP. Die Ergebnisse der Mikroarray-Analyse spiegeln dies tatsächlich wider. Hier war deutlich zu erkennen, dass die Expression der MDV-Gene und Genabschnitte der UL47GFP<sup>-</sup> Population denen der UL47GFP<sup>+</sup> Population ähnlicher war als der nicht infizierten Kontrolle. Vergleicht man jeweils die UL47GFP<sup>+</sup> und die UL47GFP<sup>-</sup> Population mit der nicht infizierten Kontrolle, zeigen sich deutliche Unterschiede in der MDV-Genexpression. So ist beispielsweise ICP4 im Vergleich UL47GFP<sup>+</sup> vs. Kontrolle 3967-fach hochreguliert, während es im Vergleich UL47GFP<sup>-</sup> vs. Kontrolle nur 38-fach hochreguliert ist. Da in dem Vergleich UL47GFP<sup>+</sup> vs. Kontrolle alle MDV-Gene bzw. Genabschnitte mit der Ausnahme einiger wenigen Gene hochreguliert sind, ist in diesem Fall eine Betrachtung der Intensität der Genexpression von erheblicher Bedeutung. Die weiteren Analysen der Regulation des viralen Genoms werden im Rahmen des Verbundprojekts „MADISPREAD“ durch Univ.-Prof. Dr. Klaus Osterrieder und Prof. Dr. Benedikt Kaufer am Institut für Virologie der FU Berlin durchgeführt. Der Fokus dieser Arbeit ist daher auf die Reaktion der B-Zelle gerichtet.

Bei Betrachtung des Genexpressionsmusters der Hühnergene ist deutlich zu erkennen, dass die Population der UL47GFP<sup>-</sup> Zellen den Zellen der Kontrolle ähnlicher ist als der UL47GFP<sup>+</sup> Population, die ein völlig anderes Genexpressionsmuster aufweist. Insgesamt zeigen zwei der Proben (UL47GFP<sup>-</sup> und Kontrolle von Sort 4) ein von allen anderen Proben abweichendes Expressionsmuster auf.

Bei der Betrachtung der signifikant regulierten Gene wird deutlich, dass bei der Analyse der UL47GFP<sup>+</sup>-Gruppe der Vergleich mit der Kontrolle näher liegt, da diese beiden Gruppen sich stärker unterscheiden. Für die weitere Analyse der B-Zellinfektion wird daher der Vergleich der signifikant regulierten Gene zwischen der UL47GFP<sup>+</sup> Population und der nicht infizierten Kontrolle verwendet.

Um weitere Informationen über die Reaktion der B-Zelle nach der Infektion zu gewinnen,

wurden signifikant regulierte Hühnergene des Vergleichs UL47GFP<sup>+</sup> vs. Kontrolle mittels Kegg *Pathway Express* analysiert. Bei Betrachtung der 21 immunrelevanten Signalwege sticht heraus, dass besonders die Signalwege biologisch relevant sind, welche die Leukozytenmigration, Zelladhäsion, Antigenerkennung und Apoptose vermitteln. Bei näherer Analyse wird deutlich, dass fast alle an diesen Signalwegen beteiligten Moleküle eine reduzierte Expression gegenüber der nicht infizierten Kontrolle aufweisen.

Um dieses Phänomen detaillierter zu betrachten, wurden die signifikant regulierten Chemokine und Chemokinrezeptoren sowie der Zytokine und Zytokinrezeptoren analysiert. Diese sind von besonderer Bedeutung in den zwei am stärksten regulierten Signalwegen, dem *cell adhesion molecules* und dem *leukocyte transendothelial migration* Signalweg. Bei den proinflammatorischen Molekülen wie chIL-8, chK203, chCCL20, oder chIL-6 wird eine Hochregulation in den infizierten Zellen festgestellt. Die meisten Chemokine und Zytokine sowie deren Rezeptoren werden in diesen Zellen jedoch schwächer exprimiert. Dazu zählen Zytokine wie chIL-18, chIFN- $\gamma$  oder Zytokinrezeptoren wie der chIL-21R oder chIL-2R. Aber auch die Migration beeinflussenden Chemokinrezeptoren wie chCCL4, chCCR5, chCCR6, chCCR7 und chCCR8 werden deutlich schwächer exprimiert. Die Beobachtung, dass die überwiegende Mehrzahl der zellulären Gene schwächer exprimiert war, kann im einfachsten Fall mit einem durch das Virus induzierten Protein *shut-off* erklärt werden. Dagegen spricht, dass einige Gene in den infizierten Zellen deutlich hochreguliert waren. Offensichtlich kommt es zu einer, möglicher Weise durch das Virus induzierten, differentiellen Genexpression, die eine effiziente Virusreplikation und Übertragung auf die T-Zelle fördert.

So deutet das Muster der reduzierten Expression mehrerer Chemokinrezeptoren an, dass infizierte B-Zellen nicht oder nur in reduzierten Maße migrieren. Zugleich exprimieren diese Zellen eine Reihe von Chemokinen wie chIL-8, chK203 und chCCL4 und chCCL20, die die Migration verschiedener Leukozytenpopulationen regulieren. Drei dieser Faktoren (chK203 und chCCL4 und chCCL20) sind potente Chemokine für T-Lymphozyten. chK203 bindet an eine Subpopulation von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen beim Huhn (persönliches Gespräch mit Melanie Reger, Institut für Tierphysiologie, LMU München). chCCL4 und chCCL20 sind aus dem Säugersystem ebenfalls als T-Zellchemokine bekannt, die überwiegend CD4<sup>+</sup> T-Zellen anlocken. Voraussetzung für die Infektion von T-Zellen durch MDV ist ein Kontakt der infizierten B-Zellen und T-Zellen, welcher möglicherweise durch die Chemokinsekretion induziert wird. Für das ebenfalls in infizierten B-Zellen stark hochregulierte virale Chemokin vCXCL13 konnte bereits gezeigt werden, dass dieses B-Zellen und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen anlockt (Engel et al., 2012; Kaiser et al., 2005). Gleichzeitig verhindert das MDV die

Kontrolle der Infektion durch nur sehr schwach exprimierte Th1-Zytokine wie chIFN- $\gamma$  und chIL-18 (Davison, 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch chIL-21 (Rothwell et al., 2012) in B-Zellstimulationsversuchen verwendet. Besonders in der Bursa führt die Co-Stimulation von chIL-21 und chCD40L zu einer verringerten Apoptose und einem verlängerten Überleben *in vitro*. Allerdings lassen sich die so stimulierten B-Zellen im Vergleich zu chCD40L stimulierten B-Zellen deutlich schlechter infizieren (eigene Beobachtungen). Daher ist davon auszugehen, dass chIL-21 die MDV-Infektion in bisher unbekannter Weise beeinträchtigt, so dass die schwach regulierte Expression des IL-21R die logische Konsequenz des MDV ist.

Bisherige Arbeiten haben sich auf Transkriptionsanalysen von infizierten Fibroblasten sowie auf Milz und Thymus von *in vivo* infizierten Tieren konzentriert (Haq et al., 2010; Hu et al., 2013; Kaiser et al., 2003; Morgan et al., 2001a). Dabei wurden für die benötigte mRNA die Organe der infizierten Tiere verwendet. Da es in der Milz nur einen sehr geringen Prozentsatz infizierter Zellen gibt, spiegelt das Ergebnis nunmehr alle immunologischen Geschehen im Organ wider. Es lässt sich daher nicht sagen, ob zum Beispiel IFN- $\gamma$  in infizierten Leukozyten stärker oder schwächer exprimiert ist und was in den umliegenden oder fernen Bereichen der Infektion passiert. Heidari *et al.* untersuchten die Genexpression von immunrelevanten Genen fünf und fünfzehn Tage nach der MDV Infektion. Mit dem neuen Infektionssystem für B- und T-Zellen ist eine Untersuchung der infizierten Zellen bereits Stunden nach der Infektion als auch Tage später möglich. Zudem lässt sich die Immunreaktion der infizierten Zellen und der die infizierten Zellen umgebenden, nicht infizierten Zellen getrennt analysieren.

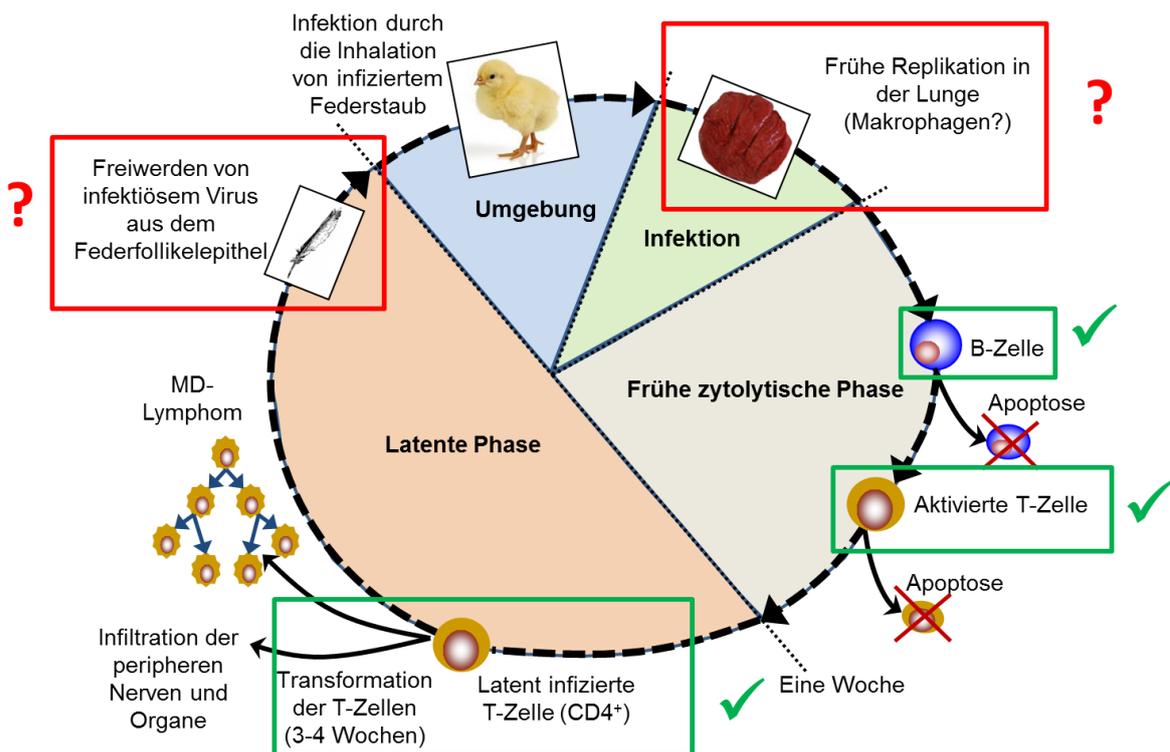
Die bisher gewonnenen Ergebnisse belegen in vielfältiger Hinsicht, dass das verwendete Zellkultursystem sich optimal zur Wirt-Pathogen-Interaktion-Studie eignet. Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse sind allerdings nur die Spitze des Eisberges und dienen als Übersicht für weitere Analysen.

## 6.6 AUSBLICK

Mit der vorliegenden Arbeit konnten erstmals Zellkultursysteme etabliert werden, die wesentliche Schritte der Pathogenese der MD nachvollziehen. Diese Techniken eröffnen neue Möglichkeiten zur Untersuchung der Wirt-Pathogen-Interaktion, wie hier durch die initialen Genexpressionsstudie exemplarisch dargestellt. So kann erstmals die zelluläre Reaktion der tatsächlichen MDV-Zielzelle zu definierten Zeitpunkten analysiert werden. Das durch die durchflusszytometrische Sortierung von infizierten und nicht infizierten Zellen gewonnene

Material kann sowohl auf transkriptomischer (Mikroarray, *Next-Generation-Sequencing*), als auch auf proteomischer Ebene, umfassend und zelltypspezifisch analysiert werden. Darüber hinaus eröffnet dieses System Studienansätze zur Rolle der Apoptose, des Zellzyklus, der Zellaktivierung, der viralen Latenz und der Virusreaktivierung, wie sie bis heute nicht durchgeführt werden konnten. Es ist zu hoffen, dass die beschriebenen Methoden schnell von der Gemeinschaft der MDV-Forscher übernommen werden und damit auch ein wesentlicher Beitrag zum Tierschutz geleistet werden kann.

Viele der bisher im Tier durchgeführten Versuche können zukünftig *in vitro* durchgeführt werden. Dies gilt insbesondere für die ersten Analysen von genetisch veränderten MDV Viren. Wirklich leistungsfähig wird die durch die BAC-Technologie eingeführte reverse Genetik bei MDV erst mit der Möglichkeit viele Mutanten *in vitro* zu testen und erst mit vielversprechenden Kandidaten in den Tierversuch zu gehen.



**Abbildung 34: Das Cornell-Modell *in vitro***

Die in dieser Arbeit *in vitro* nachvollzogenen Phasen des Infektionszyklus sind mit einem grünen Kasten und Häkchen dargestellt. In rot und mit Fragezeichen sind die noch weitgehend offenen Fragestellungen bezüglich der MDV-Infektion gekennzeichnet. Diese betreffen insbesondere die Abläufe in der Lunge und im FFE (modifiziert nach (Schat and Nair, 2008)).

Es bleiben aber immer noch viele das Cornell-Modell betreffende Fragestellungen offen. Es bleibt zu klären, wie es zur Infektion der B-Zellen durch das MDV kommt. Bisherige

Überlegungen gingen davon aus, dass die nach der Infektion schnell in die Lunge einwandernden Makrophagen das inhalierte Virus aufnehmen und in die lymphatischen Organe transportieren (Abdul-Careem et al., 2009). Baaten *et al.* konnten jedoch zeigen, dass es bereits in der Lunge und nicht erst in der Milz zur Infektion der B-Zelle kommt (Baaten et al., 2009). Zukünftige *in vitro* Versuche sollten daher die Infektion von primären Makrophagen mit MDV untersuchen. Wenn das gelingt, könnten Infektionsversuche mit infizierten Makrophagen und B- und T-Zellen erfolgen. Des Weiteren würde die Entwicklung einer FFE-Zelllinie hilfreich sein, um diese Phase der Infektion weiter zu untersuchen. Damit wäre eine detaillierte Studie an der Infektion von FFE möglich, worüber bisher nur sehr wenig bekannt ist. Zudem ist das FFE der einzige Ort, an dem vollständig-infektiöses Virus gebildet werden kann. Die Etablierung einer *in vitro* FFE-Zelllinie könnte zudem die Möglichkeit der Herstellung von freiem Virus für die Impfstoffproduktion bieten.

Im Hinblick auf die Entwicklung der GaHV2 Viren in den letzten Jahrzehnten muss befürchtet werden, dass es zum Auftreten von vv++MDV-Virusstämmen kommen kann. Dies wäre für die Geflügelindustrie weltweit ein enormes Problem. Ein belastbarer Impfschutz ist besonders für die Legehennenbestände von großer Bedeutung. Ein virulenterer Virusstamm würde zu massiven Verlusten zum einen in der frühen Aufzucht durch Wachstumsdepression und Immunsuppression als auch in späten Phasen durch die Tumorbildung führen. Die bisherigen Versuche zur Herstellung eines verbesserten Impfstoffes waren leider noch nicht erfolgreich. Das in dieser Arbeit entwickelte MDV-Infektionssystem für die primären Zielzellen der MDV-Infektion kann in vielfältiger Art und Weise für Wirt-Pathogen-Studien eingesetzt werden. Die dabei gewonnenen Erkenntnisse können wichtige Hinweise für die Entwicklung von effektiveren Impfstoffen oder die Züchtung resistenterer Hühnerlinien zu liefern.

## 7. ZUSAMMENFASSUNG

Die Marek'sche Erkrankung (MD) ist weltweit eines der bedeutendsten Probleme in der Geflügelindustrie und verantwortlich für erhebliche wirtschaftliche Schäden. Die MD wird durch ein lymphotropes und strikt zell-assoziiertes  $\alpha$ -Herpesvirus (MDV) verursacht, das immunsuppressiv wirkt und regelmäßig T-Zelltumore induziert. B- und T-Zellen sind die primären Zielzellen des MDV *in vivo*. In B-Zellen kommt es zu einer lytischen Infektion und zum massiven Untergang der infizierten Zellen. Dagegen wird eine latente Infektion primär in  $CD4^+ \alpha\beta TCR^+$  T-Zellen beobachtet, welche nach Reaktivierung des Virus auch transformieren und Lymphome bilden können. Bis heute basieren alle Untersuchungen zur MD Pathogenese entweder auf *in vivo* Versuchen oder aber auf Zellkultursystemen, die mit Fibroblasten oder Nierenzellen arbeiten. Ein *in vitro* Infektionssystem für B- und T-Zellen, den primären Zielzellen des Virus, konnte bis heute nicht etabliert werden. Ursächlich hierfür war das Fehlen geeigneter Zellkultursysteme für diese Zellen, die *ex vivo* nur eine sehr kurze Überlebenszeit und einen schnellen apoptotischen Zelltod zeigen.

Fortschritte in der aviären Immunologie haben zur Charakterisierung zahlreicher Zytokinen und Wachstumsfaktoren geführt, die B- und T-Zellen *in vitro* aktivieren, zur Proliferation anregen und erhöhte Überlebensraten induzieren. Diese Zytokine wurden in der vorliegenden Arbeit genutzt, um neue Kultursysteme für Hühner-Lymphozyten zu etablieren, mit deren Hilfe *in vitro* MDV Infektionsmodelle für B- und T-Zellen aufgebaut werden konnten. Die erfolgreiche Infektion der Zellen wurde mit Hilfe genetisch modifizierten MDV-Reporterviren (MDV RB-1B UL47GFP und RB-1B MeqGFP-UL47RFP) nachgewiesen.

Die aus der Milz, dem Blut und der Bursa Fabricii isolierten B-Zellen wurden mit löslichem chCD40L stimuliert und mit MDV RB-1B UL47GFP infizierten Fibroblasten co-kultiviert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion konnten infizierte B-Zellen durch die Expression von UL47GFP durchflusszytometrisch identifiziert werden. Die Infektion wurde zusätzlich durch die zytoplasmatische Färbung der MDV-Proteine ICP4 und gB bestätigt. Der Anteil infizierter Bursa-B-Lymphozyten stieg von 2,5% am ersten Tag nach der Infektion (p.i.) bis auf ca. 15% an Tag 4 p.i. Vergleichbare Werte wurden auch für B-Zellkulturen aus der Milz und dem Blut gefunden. Die durchflusszytometrische Charakterisierung der infizierten Zellpopulation erfolgte mit Hilfe zahlreicher Hühner-spezifischer monoklonaler Antikörper. Infizierte B-Zellen sind chBu1<sup>+</sup> und zeigen einen distinkten Phänotyp sowie eine intermediäre Zellgröße. Für die weitere Charakterisierung wurden infizierte und nicht infizierte Bursa-B-Zellen durchflusszytometrisch sortiert (> 95% Reinheit) und

Mikroarray-basierten Genexpressionsanalysen unterzogen.

Auch T-Zellen aus der Milz, dem Blut und dem Thymus konnten nach  $\alpha V\beta 1$ -TCR (TCR-2) Stimulation auf dieselbe Weise mit RB-1B MeqGFP-UL47RFP infiziert werden. Der Hauptteil der infizierten T-Zellen zeigte einen  $CD4^+ \alpha V\beta 1$ -TCR<sup>+</sup> Phänotyp, allerdings fanden sich auch einige infizierte  $CD8^+$  T-Zellen. Durch die alleinige Expression von MeqGFP oder die gleichzeitige Expression von UL47RFP und MeqGFP konnten die infizierten Thymozyten in eine latent und eine zytolytisch infizierte Population unterteilt werden. Während die zytolytisch infizierte Population primär aus B-Zellen und  $CD8^+$  T-Zellen bestand, waren die latent infizierten T-Zellen zum Großteil  $CD4^+$  T-Zellen.

Erstmals gelang es in dieser Arbeit die Übertragung des Virus von der B-Zelle auf die T-Zellen durch Co-Kultivierung mit durchflusszytometrisch sortierten infizierten B-Zellen direkt nachzuweisen. Darüber hinaus konnten aus Langzeitkulturen infizierter Thymozyten vier lymphoblastoide Zelllinien (JS1 –JS4) isoliert werden. Alle vier Linien zeigten ein homogenes, lymphoblastoides Erscheinungsbild und waren  $CD4^+$ ,  $\alpha V\beta 1$ -TCR<sup>+</sup>, MHC I<sup>+</sup> und MHC II<sup>+</sup>. Dieser Phänotyp entspricht exakt dem von *in vivo* transformierten T-Zelllymphomen.

Das in dieser Arbeit etablierte Infektionssystem ist das erste Kultursystem, mit dem eine reproduzierbare und effiziente MDV Infektion von Lymphozyten *in vitro* erreicht wird. Es spiegelt die verschiedenen Phasen des natürlichen Infektionszyklus wider. Damit eröffnet sich erstmals ein Weg, die Interaktion von B-Zellen und Virus, bzw. T-Zellen und Virus detailliert und zu definierten Zeitpunkten zu analysieren. Hervorzuheben ist, dass die hier beschriebenen Methoden nicht nur verbesserte Untersuchungsmöglichkeiten bieten, sondern auch dazu beitragen können, die Zahl der bisher notwendigen Tierversuche in der MDV-Forschung deutlich zu reduzieren.

## 8. SUMMARY

### Establishment of an *in vitro* culture system for Marek's Disease Virus infection of B- and T-cells

Marek's disease (MD) is a leading problem in the poultry industry causing significant economic losses worldwide. MD is caused by the Marek's disease virus (MDV), an alphaherpesvirus that induces immunosuppression and T-cell lymphomas. B- and T-lymphocytes are the primary target cells of the virus *in vivo* and B-lymphocytes undergo cell death in the early cytolytic phase of infection. Latent MDV infection is primarily established in CD4<sup>+</sup> αβTCR T-cells, which can also be transformed after virus reactivation leading to lymphoma formation. MDV research has either used *in vivo* infections or utilized fibroblast and kidney cell cultures for *in vitro* studies. Thus far, no *in vitro* infection systems for B- and T-cells, the primary target cells of MDV have been established due to the rapid apoptotic cell death of cultured primary lymphocytes.

Recent progress in avian immunology has led to the identification of numerous cytokines promoting survival, proliferation and activation of cultured chicken B- and T-cells. These cytokines were utilized to establish new lymphocyte culture systems and *in vitro* B- and T-cell infection models using the genetically modified MDV reporter strains MDV RB-1B UL47GFP and RB-1B MeqGFP-UL47RFP.

B-cells isolated from spleen, bursa and blood were cultured in the presence of soluble chCD40L for extended periods of time and successfully infected by co-culturing with MDV infected chicken embryo cells (CEC) as demonstrated by GFP expression. Infection was confirmed by cytoplasmic staining with monoclonal antibodies (mabs) to the viral proteins ICP4 and gB. Infection rates increased from 2.5 to 15% in bursal lymphocyte cultures between day one and day four post infection and similarly in blood and spleen derived B-cells. Cell surface staining with a range of mabs revealed that infected cells represented a subpopulation of chBu1<sup>+</sup> cells with a unique phenotype and an intermediate cell size. Further phenotypic characterization of these cells was achieved by microarray based gene expression analysis on infected and no infected B-cells enriched to more than 95% purity by fluorescence activated cell sorting.

In addition, T-cells isolated from spleen, blood and thymus activated by cross-linking of the αVβ1-TCR (TCR-2) could be infected in the same way. The vast majority of infected T-lymphocytes were CD4<sup>+</sup> whereas only a small number of CD8<sup>+</sup> cells were positive for viral

genes. Expression of MeqGFP or MeqGFP plus UL47RFP indicated that latent and lytic infections occurred in T-cell cultures. T-cell infection was not only achieved with infected CEC but also with infected B-cells enriched through fluorescence activated cell sorting.

By maintaining activated thymocytes for up to five weeks without further stimulation, four transformed lymphoblastoid cell lines termed JS1 to JS4 were successfully established *in vitro*. These cell lines represented CD4<sup>+</sup>,  $\alpha$ V $\beta$ 1-TCR<sup>+</sup>, MHC I<sup>+</sup> and MHC II<sup>+</sup> cells, thus reflecting the typical phenotype of MDV lymphomas observed in chickens.

For the first time, this work describes the establishment of a reproducible and efficient *in vitro* infection system which precisely reflects the *in vivo* life cycle of MDV. This system will help to shed new light on the interaction between MDV and its target cells by providing lymphocytes at defined stages of infection at high purity. Of equal importance, it should help to reduce the number of animal experiments by providing a reliable *in vitro* alternative.

## 9. LITERATURVERZEICHNIS

Abdul-Careem, M.F., Hunter, B.D., Sarson, A.J., Parvizi, P., Haghghi, H.R., Read, L., Heidari, M., and Sharif, S. (2008). Host responses are induced in feathers of chickens infected with Marek's disease virus. *Virology* 370, 323-332.

Abdul-Careem, M.F., Javaheri-Vayeghan, A., Shanmuganathan, S., Haghghi, H.R., Read, L.R., Haq, K., Hunter, D.B., Schat, K.A., Heidari, M., and Sharif, S. (2009). Establishment of an aerosol-based Marek's disease virus infection model. *Avian diseases* 53, 387-391.

Abujoub, A., and Coussens, P.M. (1995). Development of a sustainable chick cell line infected with Marek's disease virus. *Virology* 214, 541-549.

Adelmann, H.B. (1942). The embryological treatises of Hieronymus Fabricius of Aquapendente: The formation of the egg and of the chick De formatione ovi et pulli The formed fetus De formato foetu, Vol 1 (Cornell University Press).

Addinger, H.K., and Calnek, B.W. (1973). Pathogenesis of Marek's disease: early distribution of virus and viral antigens in infected chickens. *Journal of the National Cancer Institute* 50, 1287-1298.

Afonso, C.L., Tulman, E.R., Lu, Z., Zsak, L., Rock, D.L., and Kutish, G.F. (2001). The genome of turkey herpesvirus. *J Virol* 75, 971-978.

Akiyama, Y., and Kato, S. (1974). Two cell lines from lymphomas of Marek's disease. *Biken journal* 17, 105-116.

Akiyama, Y., Kato, S., and Iwa, N. (1973). Continuous cell culture from lymphoma of Marek's disease. *Biken journal* 16, 177-179.

Allen, R.C., Armitage, R.J., Conley, M.E., Rosenblatt, H., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Bedell, M.A., Edelhoff, S., Disteche, C.M., and Simoneaux, D.K. (1993). CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome. *Science* 259, 990-993.

Arakawa, H., Furusawa, S., Ekino, S., and Yamagishi, H. (1996). Immunoglobulin gene hyperconversion ongoing in chicken splenic germinal centers. *The EMBO journal* 15, 2540-2546.

Arakawa, H., Hauschild, J., and Buerstedde, J.M. (2002). Requirement of the activation-induced deaminase (AID) gene for immunoglobulin gene conversion. *Science* 295, 1301-1306.

Arumugaswami, V., Kumar, P.M., Konjufca, V., Dienglewicz, R.L., Reddy, S.M., and Parcells, M.S. (2009a). Latency of Marek's disease virus (MDV) in a reticuloendotheliosis virus-transformed T-cell line. I: uptake and structure of the latent MDV genome. *Avian diseases* 53, 149-155.

Arumugaswami, V., Kumar, P.M., Konjufca, V., Dienglewicz, R.L., Reddy, S.M., and Parcells, M.S. (2009b). Latency of Marek's disease virus (MDV) in a reticuloendotheliosis virus-transformed T-cell line. II: expression of the latent MDV genome. *Avian diseases* 53, 156-165.

Ashwell, J.D., and Klausner, R.D. (1990). Genetic and mutational analysis of the T-cell antigen receptor. *Annual review of immunology* 8, 139-167.

Baaten, B.J., Staines, K.A., Smith, L.P., Skinner, H., Davison, T.F., and Butter, C. (2009). Early replication in pulmonary B cells after infection with Marek's disease herpesvirus by the respiratory route. *Viral immunology* 22, 431-444.

Bacon, L., Hunt, H., and Cheng, H. (2001). Genetic resistance to Marek's disease. In *Marek's Disease* (Springer), pp. 121-141.

Baigent, S.J., and Davison, F. (2004). Marek's disease virus: biology and life cycle. *Marek's disease, an evolving problem*, 62-77.

Baigent, S.J., Ross, L.J., and Davison, T.F. (1996). A flow cytometric method for identifying Marek's disease virus pp38 expression in lymphocyte subpopulations. *Avian pathology : journal of the WVPA* 25, 255-267.

Baigent, S.J., Ross, L.J., and Davison, T.F. (1998). Differential susceptibility to Marek's disease is associated with differences in number, but not phenotype or location, of pp38+ lymphocytes. *The Journal of general virology* 79 ( Pt 11), 2795-2802.

Barrow, A.D., Burgess, S.C., Baigent, S.J., Howes, K., and Nair, V.K. (2003). Infection of macrophages by a lymphotropic herpesvirus: a new tropism for Marek's disease virus. *The Journal of general virology* 84, 2635-2645.

Biely, J., Palmer, V.E., Lerner, I.M., and Asmundson, V.S. (1933). INHERITANCE OF RESISTANCE TO FOWL PARALYSIS (NEUROLYMPHOMATOSIS GALLINARUM). *Science* 78, 42.

Biggs, P., and Payne, L. (1967). Studies on Marek's disease. I. Experimental transmission. *Journal of the National Cancer Institute* 39, 267-280.

BLACKMAN, M.R., WEINTRAUB, B.D., ROSEN, S.W., and HARMAN, S.M. (1988). Comparison of the effects of lung cancer, benign lung disease, and normal aging on pituitary-gonadal function in men. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 66, 88-95.

Blondeau, C., Chbab, N., Beaumont, C., Courvoisier, K., Osterrieder, N., Vautherot, J.F., and Denesvre, C. (2007). A full UL13 open reading frame in Marek's disease virus (MDV) is dispensable for tumor formation and feather follicle tropism and cannot restore horizontal virus transmission of rRB-1B in vivo. *Veterinary research* 38, 419-433.

Boehmer, H. (1988). The developmental biology of T lymphocytes. *Annual review of immunology* 6, 309-326.

- Brown, A.C., Baigent, S.J., Smith, L.P., Chattoo, J.P., Petherbridge, L.J., Hawes, P., Allday, M.J., and Nair, V. (2006). Interaction of MEQ protein and C-terminal-binding protein is critical for induction of lymphomas by Marek's disease virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 1687-1692.
- Bülow, V.V. (1977). Further characterisation of the CVI 988 strain of Marek's disease virus. *Avian Pathology* *6*, 395-403.
- Bumstead, N., and Kaufman, J. (2004). Genetic resistance to Marek's disease. Marek's disease, an evolving problem F Davison, and V Nair, eds Elsevier Academic Press Amsterdam, 112-125.
- Buranathai, C., Rodriguez, J., and Grose, C. (1997). Transformation of primary chick embryo fibroblasts by Marek's disease virus. *Virology* *239*, 20-35.
- Burdin, N., Van Kooten, C., Galibert, L., Abrams, J.S., Wijdenes, J., Banchereau, J., and Rousset, F. (1995). Endogenous IL-6 and IL-10 contribute to the differentiation of CD40-activated human B lymphocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* *154*, 2533-2544.
- Burgess, S.C., and Davison, T.F. (2002). Identification of the neoplastically transformed cells in Marek's disease herpesvirus-induced lymphomas: recognition by the monoclonal antibody AV37. *J Virol* *76*, 7276-7292.
- Burgess, S.C., Young, J.R., Baaten, B.J., Hunt, L., Ross, L.N., Parcels, M.S., Kumar, P.M., Tregaskes, C.A., Lee, L.F., and Davison, T.F. (2004). Marek's disease is a natural model for lymphomas overexpressing Hodgkin's disease antigen (CD30). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 13879-13884.
- Burgoyne, G.H., and Witter, R.L. (1973). Effect of passively transferred immunoglobulins on Marek's disease. *Avian diseases* *17*, 824-837.
- Busalt, F.C. (2013). Untersuchungen zur Rolle von CXCR4 und CXCR5 in der B-Zellentwicklung beim Huhn. In Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät der Ludwigs-Maximilians-Universität München.
- Calnek, B., Adldinger, H.K., and Kahn, D.E. (1970a). Feather follicle epithelium: a source of enveloped and infectious cell-free herpesvirus from Marek's disease. *Avian diseases*, 219-233.
- Calnek, B.W. (1986). Marek's disease--a model for herpesvirus oncology. *Critical reviews in microbiology* *12*, 293-320.
- Calnek, B.W., Adldinger, H.K., and Kahn, D.E. (1970b). Feather follicle epithelium: a source of enveloped and infectious cell-free herpesvirus from Marek's disease. *Avian diseases* *14*, 219-233.
- Calnek, B.W., Harris, R.W., Buscaglia, C., Schat, K.A., and Lucio, B. (1998). Relationship between the immunosuppressive potential and the pathotype of Marek's disease virus isolates.

Avian diseases *42*, 124-132.

Calnek, B.W., and Hitchner, S.B. (1969). Localization of viral antigen in chickens infected with Marek's disease herpesvirus. *Journal of the National Cancer Institute* *43*, 935-949.

Calnek, B.W., and Schat, K.A. (1991). Proliferation of chicken lymphoblastoid cells after in vitro infection with Marek's disease virus. *Avian diseases* *35*, 728-737.

Calnek, B.W., Schat, K.A., Ross, L.J., and Chen, C.L. (1984a). Further characterization of Marek's disease virus-infected lymphocytes. II. In vitro infection. *International journal of cancer Journal international du cancer* *33*, 399-406.

Calnek, B.W., Schat, K.A., Ross, L.J., Shek, W.R., and Chen, C.L. (1984b). Further characterization of Marek's disease virus-infected lymphocytes. I. In vivo infection. *International journal of cancer Journal international du cancer* *33*, 389-398.

Calnek, B.W., Schat, K.A., Shek, W.R., and Chen, C.L. (1982). In vitro infection of lymphocytes with Marek's disease virus. *Journal of the National Cancer Institute* *69*, 709-713.

Campbell, J.G., and Biggs, P.M. (1961). A proposed classification of the leucosis complex and fowl paralysis. *The British veterinary journal* *117*, 316-334.

Cantello, J.L., Parcels, M.S., Anderson, A.S., and Morgan, R.W. (1997). Marek's disease virus latency-associated transcripts belong to a family of spliced RNAs that are antisense to the ICP4 homolog gene. *J Virol* *71*, 1353-1361.

Carrozza, J.H., Fredrickson, T.N., Prince, R.P., and Luginbuhl, R.E. (1973). Role of desquamated epithelial cells in transmission of Marek's disease. *Avian diseases* *17*, 767-781.

Cebrian, J., Kaschka-Dierich, C., Berthelot, N., and Sheldrick, P. (1982). Inverted repeat nucleotide sequences in the genomes of Marek disease virus and the herpesvirus of the turkey. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *79*, 555-558.

Char, D., Sanchez, P., Chen, C.L., Bucy, R.P., and Cooper, M.D. (1990). A third sublineage of avian T cells can be identified with a T cell receptor-3-specific antibody. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* *145*, 3547-3555.

Chen, C.I.H., Cihak, J., Lösch, U., and Cooper, M.D. (1988). Differential expression of two T cell receptors, TcR1 and TcR2, on chicken lymphocytes. *European journal of immunology* *18*, 539-544.

Chen, C.L., Ager, L.L., Gartland, G.L., and Cooper, M.D. (1986). Identification of a T3/T cell receptor complex in chickens. *The Journal of experimental medicine* *164*, 375-380.

Chen, C.L., Lehmeier, J.E., and Cooper, M.D. (1982). Evidence for an IgD homologue on chicken lymphocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* *129*, 2580-2585.

- Chen, X.B., Sondermeijer, P.J., and Velicer, L.F. (1992). Identification of a unique Marek's disease virus gene which encodes a 38-kilodalton phosphoprotein and is expressed in both lytically infected cells and latently infected lymphoblastoid tumor cells. *J Virol* *66*, 85-94.
- Chubb, R.C., and Churchill, A.E. (1969). Effect of maternal antibody on Marek's disease. *The Veterinary record* *85*, 303-305.
- Churchill, A.E. (1968). Herpes-type virus isolated in cell culture from tumors of chickens with Marek's disease. I. Studies in cell culture. *Journal of the National Cancer Institute* *41*, 939-950.
- Churchill, A.E., and Biggs, P.M. (1967). Agent of Marek's disease in tissue culture. *Nature* *215*, 528-530.
- Churchill, A.E., and Biggs, P.M. (1968). Herpes-type virus isolated in cell culture from tumors of chickens with Marek's disease. II. Studies in vivo. *Journal of the National Cancer Institute* *41*, 951-956.
- Churchill, A.E., Payne, L.N., and Chubb, R.C. (1969). Immunization against Marek's disease using a live attenuated virus. *Nature* *221*, 744-747.
- Cihak, J., Ziegler-Heitbrock, H.W., Trainer, H., Schraner, I., Merkenschlager, M., and Losch, U. (1988). Characterization and functional properties of a novel monoclonal antibody which identifies a T cell receptor in chickens. *European journal of immunology* *18*, 533-537.
- Clark, G.J., Ju, X., Tate, C., and Hart, D.N. (2009). The CD300 family of molecules are evolutionarily significant regulators of leukocyte functions. *Trends in immunology* *30*, 209-217.
- Cole, R.K. (1968). Studies on genetic resistance to Marek's disease. *Avian diseases* *12*, 9-28.
- Coltey, M., Bucy, R., Chen, C., Cihak, J., Löscher, U., Char, D., Le Douarin, N., and Cooper, M. (1989). Analysis of the first two waves of thymus homing stem cells and their T cell progeny in chick-quail chimeras. *The Journal of experimental medicine* *170*, 543-557.
- Compton, M.M., and Waldrip, H.M. (1998). Endogenous activation of apoptosis in bursal lymphocytes: inhibition by phorbol esters and protein synthesis inhibitors. *Cellular immunology* *184*, 143-152.
- Cooper, M.D., Chen, C., Bucy, R.P., and Thompson, C.B. (1991). Avian T cell ontogeny. *Adv Immunol* *50*, 117.
- Cortes, A.L., Montiel, E.R., Lemiere, S., and Gimeno, I.M. (2011). Comparison of blood and feather pulp samples for the diagnosis of Marek's disease and for monitoring Marek's disease vaccination by real time-PCR. *Avian diseases* *55*, 302-310.
- Davidson, N.J., and Boyd, R.L. (1992). Delineation of chicken thymocytes by CD3-TCR complex, CD4 and CD8 antigen expression reveals phylogenically conserved and novel

thymocyte subsets. *International immunology* 4, 1175-1182.

Davison, A.J. (2010). Herpesvirus systematics. *Veterinary microbiology* 143, 52-69.

Davison, F., Magor, K.E., Kaspers, B., Fred, D., and Karel, A. (2008). Structure and evolution of avian immunoglobulins. *Avian Immunology* 1, 107-127.

Davison, F., and Nair, V. (2004). Marek's disease: an evolving problem (Academic Press).

Davison, F., and Nair, V. (2005). Use of Marek's disease vaccines: could they be driving the virus to increasing virulence? *Expert review of vaccines* 4, 77-88.

Davison, T.F. (2003). The immunologists' debt to the chicken. *British poultry science* 44, 6-21.

Degen, W.G., Daal, N.v., Rothwell, L., Kaiser, P., and Schijns, V.E. (2005). Th1/Th2 polarization by viral and helminth infection in birds. *Veterinary microbiology* 105, 163-167.

Delecluse, H.J., and Hammerschmidt, W. (1993). Status of Marek's disease virus in established lymphoma cell lines: herpesvirus integration is common. *J Virol* 67, 82-92.

Delecluse, H.J., Schuller, S., and Hammerschmidt, W. (1993). Latent Marek's disease virus can be activated from its chromosomally integrated state in herpesvirus-transformed lymphoma cells. *The EMBO journal* 12, 3277-3286.

Djeraba, A., Bernardet, N., Dambrine, G., and Quere, P. (2000). Nitric oxide inhibits Marek's disease virus replication but is not the single decisive factor in interferon-gamma-mediated viral inhibition. *Virology* 277, 58-65.

Djeraba, A., Musset, E., Bernardet, N., Le Vern, Y., and Quere, P. (2002). Similar pattern of iNOS expression, NO production and cytokine response in genetic and vaccination-acquired resistance to Marek's disease. *Veterinary immunology and immunopathology* 85, 63-75.

Dorange, F., El Mehdaoui, S., Pichon, C., Coursaget, P., and Vautherot, J.F. (2000). Marek's disease virus (MDV) homologues of herpes simplex virus type 1 UL49 (VP22) and UL48 (VP16) genes: high-level expression and characterization of MDV-1 VP22 and VP16. *The Journal of general virology* 81, 2219-2230.

Dorange, F., Tischer, B.K., Vautherot, J.F., and 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.

Dunn, J.R., and Gimeno, I.M. (2013). Current status of Marek's disease in the United States and worldwide based on a questionnaire survey. *Avian diseases* 57, 483-490.

Eidson, C.S., and Schmittle, S.C. (1968). Studies on acute Marek's disease. I. Characteristics of isolate GA in chickens. *Avian diseases* 12, 467-476.

Ellermann, V., and Bang, O. (1909). Experimentelle Leukämie bei Hühnern. II. Medical Microbiology and Immunology 63, 231-272.

Elliott, G., and O'Hare, P. (1999). Live-cell analysis of a green fluorescent protein-tagged herpes simplex virus infection. J Virol 73, 4110-4119.

Engel, A.T. (2012). Role of the Marek's disease virus (MDV) interleukin-8 (vIL-8) in lymphoma formation and recruitment of target cells. In FU Berlin Department of Veterinary Medicine.

Engel, A.T., Selvaraj, R.K., Kamil, J.P., Osterrieder, N., and Kaufer, B.B. (2012). Marek's disease viral interleukin-8 promotes lymphoma formation through targeted recruitment of B cells and CD4+ CD25+ T cells. J Virol 86, 8536-8545.

Erf, G.F., Bottje, W.G., and Bersi, T.K. (1998). CD4, CD8 and TCR defined T-cell subsets in thymus and spleen of 2- and 7-week old commercial broiler chickens. Veterinary immunology and immunopathology 62, 339-348.

Fedecka-Bruner, B., Penninger, J., Vaigot, P., Lehmann, A., and Kroemer, G. (1991). Developmental expression of IL-2-receptor light chain (CD25) in the chicken embryo. Clinical and Developmental Immunology 1, 237-242.

Fiedler, H., Losch, U., and Hala, K. (1980). Establishment of a B-compatible chicken line with normogammaglobulinaemia and dysgammaglobulinaemia (IgM/IgG). Folia biologica 26, 17-25.

Garcia-Camacho, L., Schat, K.A., Brooks, R., Jr., and Bounous, D.I. (2003). Early cell-mediated immune responses to Marek's disease virus in two chicken lines with defined major histocompatibility complex antigens. Veterinary immunology and immunopathology 95, 145-153.

Gimeno, I.M. (2008). Marek's disease vaccines: a solution for today but a worry for tomorrow? Vaccine 26 Suppl 3, C31-41.

Gimeno, I.M., Cortes, A.L., Witter, R.L., and Pandiri, A.R. (2012). Optimization of the protocols for double vaccination against Marek's disease by using commercially available vaccines: evaluation of protection, vaccine replication, and activation of T cells. Avian diseases 56, 295-305.

Gimeno, I.M., Witter, R.L., Fadly, A.M., and Silva, R.F. (2005). Novel criteria for the diagnosis of Marek's disease virus-induced lymphomas. Avian pathology : journal of the WVPA 34, 332-340.

Gimeno, I.M., Witter, R.L., and Reed, W.M. (1999). Four distinct neurologic syndromes in Marek's disease: effect of viral strain and pathotype. Avian diseases 43, 721-737.

Glick, B., Chang, T.S., and Jaap, R.G. (1956). The bursa of Fabricius and antibody production. Poultry science 35, 224-225.

Gobel, T.W., Chen, C.H., and Cooper, M.D. (1996). Avian natural killer cells. *Current topics in microbiology and immunology* 212, 107-117.

Gobel, T.W., Schneider, K., Schaerer, B., Mejri, I., Puehler, F., Weigend, S., Staeheli, P., and Kaspers, B. (2003). IL-18 stimulates the proliferation and IFN-gamma release of CD4+ T cells in the chicken: conservation of a Th1-like system in a nonmammalian species. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 171, 1809-1815.

Goebel, T. (1996). The T-dependent immune system. *POULTRY SCIENCE SYMPOSIUM*, 24; 31-46

Greaves, M.F., Roitt, I.M., and Rose, M.E. (1968). Effect of bursectomy and thymectomy on the responses of chicken peripheral blood lymphocytes to phytohaemagglutinin. *Nature* 220, 293-295.

Haffer, K., Sevoian, M., and Wilder, M. (1979). The role of the macrophages in Marek's disease: in vitro and in vivo studies. *International journal of cancer Journal international du cancer* 23, 648-656.

Haider, S.A., Lapen, R.F., and Kenzy, S.G. (1970). Use of feathers in a gel precipitation test for Marek's disease. *Poultry science* 49, 1654-1657.

Handberg, K.J., Nielsen, O.L., and Jørgensen, P.H. (2001). The use of serotype 1-and serotype 3-specific polymerase chain reaction for the detection of Marek's disease virus in chickens. *Avian Pathology* 30, 243-249.

Haq, K., Brisbin, J.T., Thantrige-Don, N., Heidari, M., and Sharif, S. (2010). Transcriptome and proteome profiling of host responses to Marek's disease virus in chickens. *Veterinary immunology and immunopathology* 138, 292-302.

Haq, K., Schat, K.A., and Sharif, S. (2013). Immunity to Marek's disease: where are we now? *Developmental & Comparative Immunology*.

Harlin, O. (2003). Die Bedeutung von Interferon alpha und Interferon gamma auf den Verlauf der Marekschen Krankheit beim Haushuhn.

He, H., Genovese, K.J., and Kogut, M.H. (2011). Modulation of chicken macrophage effector function by T(H)1/T(H)2 cytokines. *Cytokine* 53, 363-369.

Hehlgans, T., and Mannel, D.N. (2002). The TNF-TNF receptor system. *Biological chemistry* 383, 1581-1585.

Heifetz, E.M., Fulton, J.E., O'Sullivan, N.P., Arthur, J.A., Cheng, H., Wang, J., Soller, M., and Dekkers, J. (2009). Mapping QTL affecting resistance to Marek's disease in an F6 advanced intercross population of commercial layer chickens. *BMC genomics* 10, 20.

Heifetz, E.M., Fulton, J.E., O'Sullivan, N.P., Arthur, J.A., Wang, J., Dekkers, J.C., and Soller, M. (2007). Mapping quantitative trait loci affecting susceptibility to Marek's disease virus in a

backcross population of layer chickens. *Genetics* 177, 2417-2431.

Heller, E.D., and Schat, K.A. (1987). Enhancement of natural killer cell activity by Marek's disease vaccines. *Avian pathology : journal of the WVPA* 16, 51-60.

Higgins, D.A., and Calnek, B.W. (1975). Fowl immunoglobulins: quantitation and antibody activity during Marek's disease in genetically resistant and susceptible birds. *Infection and immunity* 11, 33-41.

Hilton, L.S., Bean, A.G., Kimpton, W.G., and Lowenthal, J.W. (2002). Interleukin-2 directly induces activation and proliferation of chicken T cells in vivo. *Journal of interferon & cytokine research* 22, 755-763.

Himly, M., Foster, D.N., Bottoli, I., Iacovoni, J.S., and Vogt, P.K. (1998). The DF-1 chicken fibroblast cell line: transformation induced by diverse oncogenes and cell death resulting from infection by avian leukosis viruses. *Virology* 248, 295-304.

Houssaint, E., Belo, M., and Le Douarin, N.M. (1976). Investigations on cell lineage and tissue interactions in the developing bursa of Fabricius through interspecific chimeras. *Developmental biology* 53, 250-264.

Houssaint, E., Torano, A., and Ivanyi, J. (1983). Ontogenic restriction of colonization of the bursa of Fabricius. *European journal of immunology* 13, 590-595.

Hu, X., Qin, A., Miao, J., Xu, W., Yu, C., Qian, K., and Shao, H. (2013). Transcriptional profile of Marek's disease virus genes in chicken thymus during different phases of MDV infection. *Archives of virology* 158, 1787-1793.

Hunt, H.D., Lupiani, B., Miller, M.M., Gimeno, I., Lee, L.F., and Parcells, M.S. (2001). Marek's disease virus down-regulates surface expression of MHC (B Complex) Class I (BF) glycoproteins during active but not latent infection of chicken cells. *Virology* 282, 198-205.

Ikuta, K., Nakajima, K., Kanamori, A., Maotani, K., Mah, J.S., Ueda, S., Kato, S., Yoshida, M., Nii, S., Naito, M., *et al.* (1987). Establishment and characterization of a T-lymphoblastoid cell line MDCC-MTB1 derived from chick lymphocytes infected in vitro with Marek's disease virus serotype 1. *International journal of cancer Journal international du cancer* 39, 514-520.

Izumiya, Y., Jang, H.K., Ono, M., and Mikami, T. (2001). A complete genomic DNA sequence of Marek's disease virus type 2, strain HPRS24. *Current topics in microbiology and immunology* 255, 191-221.

Jacobsen, K.A., Paramithiotis, E., Ewert, D.L., and Ratcliffe, M.J. (1996). Apoptotic cell death in the chicken bursa of Fabricius. *Advances in experimental medicine and biology* 406, 155-165.

Jakowski, R.M., Fredrickson, T.N., Chomiak, T.W., and Luginbuhl, R.E. (1970). Hematopoietic destruction in Marek's disease. *Avian diseases* 14, 374-385.

Jarosinski Kw, Arndt S, K., Benedikt B., and N, O. (2012). Fluorescently tagged pUL47 of Marek's disease virus reveals differential tissue expression of the tegument protein in vivo. *J Virol* 86, 2428-2436.

Jarosinski, K.W., Jia, W., Sekellick, M.J., Marcus, P.I., and Schat, K.A. (2001). Cellular responses in chickens treated with IFN-alpha orally or inoculated with recombinant Marek's disease virus expressing IFN-alpha. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 21, 287-296.

Jarosinski, K.W., Njaa, B.L., O'Connell, P.H., and Schat, K.A. (2005). Pro-inflammatory responses in chicken spleen and brain tissues after infection with very virulent plus Marek's disease virus. *Viral immunology* 18, 148-161.

Jarosinski, K.W., Yunis, R., O'Connell, P.H., Markowski-Grimsrud, C.J., and Schat, K.A. (2002). Influence of genetic resistance of the chicken and virulence of Marek's disease virus (MDV) on nitric oxide responses after MDV infection. *Avian diseases* 46, 636-649.

Jones, D., Lee, L., Liu, J.L., Kung, H.J., and Tillotson, J.K. (1992). Marek disease virus encodes a basic-leucine zipper gene resembling the fos/jun oncogenes that is highly expressed in lymphoblastoid tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 4042-4046.

Jungherr, E., Doyle, P., and Johnson, E. (1941). Tentative pathologic nomenclature for the disease and/or for the disease complex variously designated as fowl leucemia, fowl leucosis, etc. *Am J Vet Res* 2, 544.

Kaiser, P., Poh, T.Y., Rothwell, L., Avery, S., Balu, S., Pathania, U.S., Hughes, S., Goodchild, M., Morrell, S., Watson, M., *et al.* (2005). A genomic analysis of chicken cytokines and chemokines. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 25, 467-484.

Kaiser, P., Underwood, G., and Davison, F. (2003). Differential cytokine responses following Marek's disease virus infection of chickens differing in resistance to Marek's disease. *Journal of virology* 77, 762-768.

Kaufner, B.B., Jarosinski, K.W., and Osterrieder, N. (2011). Herpesvirus telomeric repeats facilitate genomic integration into host telomeres and mobilization of viral DNA during reactivation. *The Journal of experimental medicine* 208, 605-615.

Kaufman, J., and Salomonsen, J. (1997). The "minimal essential MHC" revisited: both peptide-binding and cell surface expression level of MHC molecules are polymorphisms selected by pathogens in chickens. *Hereditas* 127, 67-73.

Kaufman, J., Volk, H., and Wallny, H.J. (1995). A "minimal essential Mhc" and an "unrecognized Mhc": two extremes in selection for polymorphism. *Immunological reviews* 143, 63-88.

Kaupf, B. (1921). Paralysis of the domestic fowl. *Poultry science* 2, 25-31.

Kawamura, H., King Jr, D., and Anderson, D. (1969). A herpesvirus isolated from kidney cell culture of normal turkeys. *Avian diseases* 13, 853-863.

Kenzy, S.G., and Cho, B.R. (1969). Transmission of classical Marek's disease by affected and carrier birds. *Avian diseases* 13, 211-214.

Kodama, H., Mikami, T., Inoue, M., and Izawa, H. (1979). Inhibitory effects of macrophages against Marek's disease virus plaque formation in chicken kidney cell cultures. *Journal of the National Cancer Institute* 63, 1267-1271.

Kohonen, P., Nera, K.P., and Lassila, O. (2007). Avian model for B-cell immunology--new genomes and phylotranscriptomics. *Scandinavian journal of immunology* 66, 113-121.

Korte, J., Frohlich, T., Kohn, M., Kaspers, B., Arnold, G.J., and Hartle, S. (2013). 2D DIGE analysis of the bursa of Fabricius reveals characteristic proteome profiles for different stages of chicken B-cell development. *Proteomics* 13, 119-133.

Kothlow, S., Morgenroth, I., Graef, Y., Schneider, K., Riehl, I., Staeheli, P., Schneider, P., and Kaspers, B. (2007). Unique and conserved functions of B cell-activating factor of the TNF family (BAFF) in the chicken. *International immunology* 19, 203-215.

Kothlow, S., Morgenroth, I., Tregaskes, C.A., Kaspers, B., and Young, J.R. (2008). CD40 ligand supports the long-term maintenance and differentiation of chicken B cells in culture. *Developmental and comparative immunology* 32, 1015-1026.

Kothlow, S., Schenk-Weibhauser, K., Ratcliffe, M.J., and Kaspers, B. (2010). Prolonged effect of BAFF on chicken B cell development revealed by RCAS retroviral gene transfer in vivo. *Mol Immunol* 47, 1619-1628.

Lassila, O. (1989). Emigration of B cells from chicken bursa of Fabricius. *European journal of immunology* 19, 955-958.

Lee, L.F., Kieff, E.D., Bachenheimer, S.L., Roizman, B., Spear, P.G., Burmester, B.R., and Nazerian, K. (1971). Size and composition of Marek's disease virus deoxyribonucleic acid. *J Virol* 7, 289-294.

Lee, L.F., Lupiani, B., Silva, R.F., Kung, H.J., and Reddy, S.M. (2008). Recombinant Marek's disease virus (MDV) lacking the Meq oncogene confers protection against challenge with a very virulent plus strain of MDV. *Vaccine* 26, 1887-1892.

Lee, L.F., Wu, P., Sui, D., Ren, D., Kamil, J., Kung, H.J., and Witter, R.L. (2000). The complete unique long sequence and the overall genomic organization of the GA strain of Marek's disease virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 6091-6096.

Lee, S.I., Ohashi, K., Morimura, T., Sugimoto, C., and Onuma, M. (1999). Re-isolation of Marek's disease virus from T cell subsets of vaccinated and non-vaccinated chickens. *Archives of virology* 144, 45-54.

- Leslie, G.A., and Clem, L.W. (1969). Phylogen of immunoglobulin structure and function. 3. Immunoglobulins of the chicken. *The Journal of experimental medicine* 130, 1337-1352.
- Levy, A.M., Gilad, O., Xia, L., Izumiya, Y., Choi, J., Tsalenko, A., Yakhini, Z., Witter, R., Lee, L., Cardona, C.J., *et al.* (2005). Marek's disease virus Meq transforms chicken cells via the v-Jun transcriptional cascade: a converging transforming pathway for avian oncoviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 14831-14836.
- Li, D.S., Pastorek, J., Zelnik, V., Smith, G.D., and Ross, L.J. (1994). Identification of novel transcripts complementary to the Marek's disease virus homologue of the ICP4 gene of herpes simplex virus. *The Journal of general virology* 75 ( Pt 7), 1713-1722.
- Li, Y., Sun, A., Su, S., Zhao, P., Cui, Z., and Zhu, H. (2011). Deletion of the Meq gene significantly decreases immunosuppression in chickens caused by pathogenic Marek's disease virus. *Virology journal* 8, 2.
- Luhtala, M., Koskinen, R., Toivanen, P., and Vainio, O. (1995). Characterization of chicken CD8-specific monoclonal antibodies recognizing novel epitopes. *Scandinavian journal of immunology* 42, 171-174.
- Luhtala, M., Salomonsen, J., Hirota, Y., Onodera, T., Toivanen, P., and Vainio, O. (1993). Analysis of chicken CD4 by monoclonal antibodies indicates evolutionary conservation between avian and mammalian species. *Hybridoma* 12, 633-646.
- Lupiani, B., Lee, L.F., Cui, X., Gimeno, I., Anderson, A., Morgan, R.W., Silva, R.F., Witter, R.L., Kung, H.J., and Reddy, S.M. (2004). Marek's disease virus-encoded Meq gene is involved in transformation of lymphocytes but is dispensable for replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 11815-11820.
- Marek, J. (1907). Multiple Nervenentzündung (Polyneuritis) bei Hühnern. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 15, 417-421.
- Masteller, E.L., Lee, K.P., Carlson, L.M., and Thompson, C.B. (1995). Expression of sialyl Lewis(x) and Lewis(x) defines distinct stages of chicken B cell maturation. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 155, 5550-5556.
- Masteller, E.L., Pharr, G.T., Funk, P.E., and Thompson, C.B. (1997). Avian B cell development. *International reviews of immunology* 15, 185-206.
- McCull, K.A., Calnek, B.W., Harris, W.V., Schat, K.A., and Lee, L.F. (1987). Expression of a putative tumor-associated surface antigen on normal versus Marek's disease virus-transformed lymphocytes. *Journal of the National Cancer Institute* 79, 991-1000.
- McCormack, W.T., Tjoelker, L.W., Barth, C.F., Carlson, L.M., Petryniak, B., Humphries, E.H., and Thompson, C.B. (1989). Selection for B cells with productive IgL gene rearrangements occurs in the bursa of Fabricius during chicken embryonic development. *Genes & development* 3, 838-847.

- McCormack, W.T., Tjoelker, L.W., and Thompson, C.B. (1991). Avian B-cell development: generation of an immunoglobulin repertoire by gene conversion. *Annual review of immunology* 9, 219-241.
- Mester, J.C., and Rouse, B.T. (1991). The mouse model and understanding immunity to herpes simplex virus. *Reviews of infectious diseases* 13 *Suppl 11*, S935-945.
- Moore, M., and Owen, J. (1966). Experimental studies on the development of the bursa of Fabricius. *Developmental biology* 14, 40-51.
- Morgan, R.W., Sofer, L., Anderson, A.S., Bernberg, E.L., Cui, J., and Burnside, J. (2001a). Induction of host gene expression following infection of chicken embryo fibroblasts with oncogenic Marek's disease virus. *J Virol* 75, 533-539.
- Morgan, R.W., Xie, Q., Cantello, J.L., Miles, A.M., Bernberg, E.L., Kent, J., and Anderson, A. (2001b). Marek's disease virus latency. *Current topics in microbiology and immunology* 255, 223-243.
- Moriguchi, R., Fujimoto, Y., and Izawa, H. (1982). Chronological observations of feather pulp lesions in chickens inoculated with Marek's disease virus. *Avian diseases*, 375-388.
- Moriguchi, R., Yoshida, H., Fujimoto, Y., Mikami, T., and Izawa, H. (1987). Feather-pulp lesions in chickens with naturally occurring Marek's disease lymphomas. *Avian diseases*, 156-168.
- Morimura, T., Hattori, M., Ohashi, K., Sugimoto, C., and Onuma, M. (1995). Immunomodulation of peripheral T cells in chickens infected with Marek's disease virus: involvement in immunosuppression. *The Journal of general virology* 76 ( Pt 12), 2979-2985.
- Morimura, T., Ohashi, K., Sugimoto, C., and Onuma, M. (1998). Pathogenesis of Marek's disease (MD) and possible mechanisms of immunity induced by MD vaccine. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science* 60, 1-8.
- Morrow, C., and Fehler, F. (2004). Marek's disease: a worldwide problem. *Marek's disease, An Evolving Problem*, 49-61.
- Murphy, K.M. (2012). *Janeway's Immunobiology* 8th Ed (Garland Science).
- Mwangi, W.N., Smith, L.P., Baigent, S.J., Beal, R.K., Nair, V., and Smith, A.L. (2011). Clonal structure of rapid-onset MDV-driven CD4+ lymphomas and responding CD8+ T cells. *PLoS pathogens* 7, e1001337.
- Nazerian, K. (1987). An updated list of avian cell lines and transplantable tumours. *Avian pathology : journal of the WVPA* 16, 527-544.
- Nazerian, K., and Burmester, B. (1968). Electron microscopy of a herpes virus associated with the agent of Marek's disease in cell culture. *Cancer research* 28, 2454-2462.

- Nazerian, K., Lee, L.F., Yanagida, N., and Ogawa, R. (1992). Protection against Marek's disease by a fowlpox virus recombinant expressing the glycoprotein B of Marek's disease virus. *J Virol* 66, 1409-1413.
- Oláh, I., and Glick, B. (1978). The number and size of the follicular epithelium (FE) and follicles in the bursa of Fabricius. *Poultry science* 57, 1445-1450.
- Oláh, I., and Vervelde, L. (2008). Structure of the avian lymphoid system. *Avian immunology*, 13.
- Omar, A.R., and Schat, K.A. (1996). Syngeneic Marek's disease virus (MDV)-specific cell-mediated immune responses against immediate early, late, and unique MDV proteins. *Virology* 222, 87-99.
- Omar, A.R., and Schat, K.A. (1997). Characterization of Marek's disease herpesvirus-specific cytotoxic T lymphocytes in chickens inoculated with a non-oncogenic vaccine strain of MDV. *Immunology* 90, 579-585.
- Omar, A.R., Schat, K.A., Lee, L.F., and Hunt, H.D. (1998). Cytotoxic T lymphocyte response in chickens immunized with a recombinant fowlpox virus expressing Marek's disease herpesvirus glycoprotein B. *Veterinary immunology and immunopathology* 62, 73-82.
- Osterrieder, K., and Vautherot, J. (2004). The genome content of Marek's disease-like viruses. *Marek's disease, An Evolving Problem*, 17-31.
- Osterrieder, N., Kamil, J.P., Schumacher, D., Tischer, B.K., and Trapp, S. (2006). Marek's disease virus: from miasma to model. *Nat Rev Micro* 4, 283-294.
- Pappenheimer, A.M., Dunn, L.C., and Cone, V. (1929a). STUDIES ON FOWL PARALYSIS (NEUROLYMPHOMATOSIS GALLINARUM) : I. CLINICAL FEATURES AND PATHOLOGY. *The Journal of experimental medicine* 49, 63-86.
- Pappenheimer, A.M., Dunn, L.C., and Seidlin, S.M. (1929b). STUDIES ON FOWL PARALYSIS (NEUROLYMPHOMATOSIS GALLINARUM) : II. TRANSMISSION EXPERIMENTS. *The Journal of experimental medicine* 49, 87-102.
- Paramithiotis, E., Jacobsen, K.A., and Ratcliffe, M.J. (1995). Loss of surface immunoglobulin expression precedes B cell death by apoptosis in the bursa of Fabricius. *The Journal of experimental medicine* 181, 105-113.
- Paramithiotis, E., and Ratcliffe, M.J. (1994). B cell emigration directly from the cortex of lymphoid follicles in the bursa of Fabricius. *European journal of immunology* 24, 458-463.
- Parcells, M.S., Lin, S.F., Dienglewicz, R.L., Majerciak, V., Robinson, D.R., Chen, H.C., Wu, Z., Dubyak, G.R., Brunovskis, P., Hunt, H.D., *et al.* (2001). Marek's disease virus (MDV) encodes an interleukin-8 homolog (vIL-8): characterization of the vIL-8 protein and a vIL-8 deletion mutant MDV. *J Virol* 75, 5159-5173.

- Parvizi, P., Abdul-Careem, M.F., Haq, K., Thanthrige-Don, N., Schat, K.A., and Sharif, S. (2010). Immune responses against Marek's disease virus. *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases 11*, 123-134.
- Payne, L.N., Howes, K., Rennie, M., Bumstead, J.M., and Kidd, A.W. (1981). Use of an agar culture technique for establishing lymphoid cell lines from Marek's disease lymphomas. *International journal of cancer Journal international du cancer 28*, 757-766.
- Payne, L.N., and Rennie, M. (1973). Pathogenesis of Marek's disease in chicks with and without maternal antibody. *Journal of the National Cancer Institute 51*, 1559-1573.
- Payne, L.N., and Rennie, M. (1976). The proportions of B and T lymphocytes in lymphomas, peripheral nerves and lymphoid organs in Marek's disease. *Avian pathology : journal of the WVPA 5*, 147-154.
- Pike, K.A., and Ratcliffe, M.J. (2002). Cell surface immunoglobulin receptors in B cell development. *Seminars in immunology 14*, 351-358.
- Powell, P.C., Hartley, K.J., Mustill, B.M., and Rennie, M. (1983). Studies on the role of macrophages in Marek's disease of the chicken. *Journal of the Reticuloendothelial Society 34*, 289-297.
- Powell, P.C., Payne, L.N., Frazier, J.A., and Rennie, M. (1974). T lymphoblastoid cell lines from Marek's disease lymphomas. *Nature 251*, 79-80.
- Prasad, L.B., and Spradbrow, P.B. (1977). Multiplication of turkey herpes virus and Marek's disease virus in chick embryo skin cell cultures. *Journal of comparative pathology 87*, 515-520.
- Pratt, W.D., Cantello, J., Morgan, R.W., and Schat, K.A. (1994). Enhanced expression of the Marek's disease virus-specific phosphoproteins after stable transfection of MSB-1 cells with the Marek's disease virus homologue of ICP4. *Virology 201*, 132-136.
- Pratt, W.D., Morgan, R., and Schat, K.A. (1992). Cell-mediated cytolysis of lymphoblastoid cells expressing Marek's disease virus-specific phosphorylated polypeptides. *Veterinary microbiology 33*, 93-99.
- Purchase, H.G., Burmester, B.R., and Cunningham, C.H. (1971). Responses of cell cultures from various avian species to Marek's disease virus and herpesvirus of turkeys. *American journal of veterinary research 32*, 1811-1823.
- Qian, Z., Brunovskis, P., Rauscher, F., 3rd, Lee, L., and Kung, H.J. (1995). Transactivation activity of Meq, a Marek's disease herpesvirus bZIP protein persistently expressed in latently infected transformed T cells. *J Virol 69*, 4037-4044.
- Ramachandra, R., Raghavan, R., and Keshavamurthy, B. (1978). Propagation of Marek's disease virus in chicken tracheal explants [India]. *Indian Journal of Animal Sciences 48*.

Ratcliffe, M.J. (1985). The ontogeny and cloning of B cells in the bursa of Fabricius. *Immunology Today* 6, 223-227.

Ratcliffe, M.J. (2006). Antibodies, immunoglobulin genes and the bursa of Fabricius in chicken B cell development. *Developmental & Comparative Immunology* 30, 101-118.

Ratcliffe, M.J., and Härtle, S. (2013). B cells, the Bursa of Fabricius and the Generation of Antibody Repertoires (Elsevier).

Reddy, S.M., Lupiani, B., Gimeno, I.M., Silva, R.F., Lee, L.F., and Witter, R.L. (2002). Rescue of a pathogenic Marek's disease virus with overlapping cosmid DNAs: use of a pp38 mutant to validate the technology for the study of gene function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 7054-7059.

Reynaud, C.A., Anquez, V., Dahan, A., and Weill, J.C. (1985). A single rearrangement event generates most of the chicken immunoglobulin light chain diversity. *Cell* 40, 283-291.

Reynaud, C.A., Anquez, V., Grimal, H., and Weill, J.C. (1987). A hyperconversion mechanism generates the chicken light chain preimmune repertoire. *Cell* 48, 379-388.

Reynaud, C.A., Dahan, A., Anquez, V., and Weill, J.C. (1989). Somatic hyperconversion diversifies the single Vh gene of the chicken with a high incidence in the D region. *Cell* 59, 171-183.

Reynaud, C.A., Imhof, B.A., Anquez, V., and Weill, J.C. (1992). Emergence of committed B lymphoid progenitors in the developing chicken embryo. *The EMBO journal* 11, 4349-4358.

Rispens, B.H., van Vloten, H., Mastenbroek, N., Maas, H.J., and Schat, K.A. (1972). Control of Marek's disease in the Netherlands. I. Isolation of an avirulent Marek's disease virus (strain CVI 988) and its use in laboratory vaccination trials. *Avian diseases* 16, 108-125.

Roizman, B., Carmichael, L.E., Deinhardt, F., de-The, G., Nahmias, A.J., Plowright, W., Rapp, F., Sheldrick, P., Takahashi, M., and Wolf, K. (1981). Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature, and taxonomy. The Herpesvirus Study Group, the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology* 16, 201-217.

Ross, L.J. (1977). Antiviral T cell-mediated immunity in Marek's disease. *Nature* 268, 644-646.

Ross, N., O'Sullivan, G., Rothwell, C., Smith, G., Burgess, S.C., Rennie, M., Lee, L.F., and Davison, T.F. (1997). Marek's disease virus EcoRI-Q gene (meq) and a small RNA antisense to ICP4 are abundantly expressed in CD4+ cells and cells carrying a novel lymphoid marker, AV37, in Marek's disease lymphomas. *The Journal of general virology* 78 ( Pt 9), 2191-2198.

Ross, N.L. (1999). T-cell transformation by Marek's disease virus. *Trends in microbiology* 7, 22-29.

Rothwell, C.J., Vervelde, L., and Davison, T.F. (1996). Identification of chicken Bu-1

alloantigens using the monoclonal antibody AV20. *Veterinary immunology and immunopathology* 55, 225-234.

Rothwell, L., Hu, T., Wu, Z., and Kaiser, P. (2012). Chicken interleukin-21 is costimulatory for T cells and blocks maturation of dendritic cells. *Developmental and comparative immunology* 36, 475-482.

Rothwell, L., Young, J.R., Zoorob, R., Whittaker, C.A., Hesketh, P., Archer, A., Smith, A.L., and Kaiser, P. (2004). Cloning and characterization of chicken IL-10 and its role in the immune response to *Eimeria maxima*. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 173, 2675-2682.

Sarson, A.J., Abdul-Careem, M.F., Read, L.R., Brisbin, J.T., and Sharif, S. (2008a). Expression of cytotoxicity-associated genes in Marek's disease virus-infected chickens. *Viral immunology* 21, 267-272.

Sarson, A.J., Parvizi, P., Lepp, D., Quinton, M., and Sharif, S. (2008b). Transcriptional analysis of host responses to Marek's disease virus infection in genetically resistant and susceptible chickens. *Animal genetics* 39, 232-240.

Schaffner, T., Mueller, J., Hess, M.W., Cottier, H., Sordat, B., and Ropke, C. (1974). The bursa of Fabricius: a central organ providing for contact between the lymphoid system and intestinal content. *Cellular immunology* 13, 304-312.

Schat, K., and Markowski-Grimsrud, C. (2001). Immune responses to Marek's disease virus infection. In *Marek's Disease* (Springer), pp. 91-120.

Schat, K., and Nair, V. (2008). Marek's disease. *Diseases of poultry* 12, 452-514.

Schat, K.A. (2005). Isolation of Marek's disease virus: revisited. *Avian pathology : journal of the WVPA* 34, 91-95.

Schat, K.A., and Calnek, B.W. (1978). Characterization of an apparently nononcogenic Marek's disease virus. *Journal of the National Cancer Institute* 60, 1075-1082.

Schat, K.A., Calnek, B.W., and Fabricant, J. (1982). Characterisation of two highly oncogenic strains of Marek's disease virus. *Avian pathology : journal of the WVPA* 11, 593-605.

Schat, K.A., Calnek, B.W., Fabricant, J., and Graham, D.L. (1985). Pathogenesis of infection with attenuated Marek's disease virus strains. *Avian pathology : journal of the WVPA* 14, 127-146.

Schat, K.A., Chen, C.L., Calnek, B.W., and Char, D. (1991). Transformation of T-lymphocyte subsets by Marek's disease herpesvirus. *J Virol* 65, 1408-1413.

Schneider, K., Klaas, R., Kaspers, B., and Staeheli, P. (2001). Chicken interleukin-6. cDNA structure and biological properties. *European journal of biochemistry / FEBS* 268, 4200-4206.

Schneider, K., Kothlow, S., Schneider, P., Tardivel, A., Gobel, T., Kaspers, B., and Staeheli, P. (2004). Chicken BAFF--a highly conserved cytokine that mediates B cell survival. *International immunology* *16*, 139-148.

Schneider, K., Puehler, F., Baeuerle, D., Elvers, S., Staeheli, P., Kaspers, B., and Weining, K.C. (2000). cDNA cloning of biologically active chicken interleukin-18. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* *20*, 879-883.

Scholten, R., Hilgers, L.A., Jeurissen, S.H., and Weststrate, M.W. (1990). Detection of Marek's disease virus antigen in chickens by a novel immunoassay. *Journal of virological methods* *27*, 221-226.

Schuhmacher, M. (2010). Untersuchungen zum Einfluss der Zytokine CD40L, IL-6 und IL-10 auf die terminale Differenzierung der B-Lymphozyten des Haushuhns. In *Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät der Ludwigs-Maximilians-Universität München*.

Schumacher, D., Tischer, B.K., Fuchs, W., and Osterrieder, N. (2000). Reconstitution of Marek's disease virus serotype 1 (MDV-1) from DNA cloned as a bacterial artificial chromosome and characterization of a glycoprotein B-negative MDV-1 mutant. *J Virol* *74*, 11088-11098.

Schumacher, M. (2009). Untersuchungen zum Einfluss der Zytokine CD40L, IL-6 und IL-10 auf die terminale Differenzierung der B-Lymphozyten des Haushuhns.

Sevoian, M., Chamberlain, D.M., and Counter, F. (1962). Avian lymphomatosis. I. Experimental reproduction of the neural and visceral forms. *Vet Med* *57*, 500-501.

Sharma, J.M. (1981). Natural killer cell activity in chickens exposed to Marek's disease virus: inhibition of activity in susceptible chickens and enhancement of activity in resistant and vaccinated chickens. *Avian diseases* *25*, 882-893.

Sharma, J.M., and Okazaki, W. (1981). Natural killer cell activity in chickens: target cell analysis and effect of antithymocyte serum on effector cells. *Infection and immunity* *31*, 1078-1085.

Shek, W.R., Calnek, B.W., Schat, K.A., and Chen, C.H. (1983). Characterization of Marek's disease virus-infected lymphocytes: discrimination between cytolytically and latently infected cells. *Journal of the National Cancer Institute* *70*, 485-491.

Six, A., Rast, J.P., McCormack, W.T., Dunon, D., Courtois, D., Li, Y., Chen-lo, H.C., and Cooper, M.D. (1996). Characterization of avian T-cell receptor  $\gamma$  genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *93*, 15329-15334.

Skjodt, K., Welinder, K.G., Crone, M., Verland, S., Salomonsen, J., and Simonsen, M. (1986). Isolation and characterization of chicken and turkey beta 2-microglobulin. *Mol Immunol* *23*, 1301-1309.

Smith, A.L., and Göbel, T.W. (2013). Avian T cells: Antigen recognition and lineages. *Avian Immunology*, 91.

Solomon, J.J., Witter, R.L., Nazerian, K., and Burmester, B.R. (1968). Studies on the etiology of Marek's disease. I. Propagation of the agent in cell culture. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY)* 127, 173-177.

Sonja Härtle, A.E., Florian Busalt, Bernd Kaspers, Pete Kaiser, Benedikt Kaufer (2012). Marek's Disease viral interleukin-8 (vIL-8) is a CXCL13 homologue. *Avian Immunology Research Group Meeting 2012, Roslin Institute, Edinburgh, UK.*

Sowder, J.T., Chen, C.L., Ager, L.L., Chan, M.M., and Cooper, M.D. (1988). A large subpopulation of avian T cells express a homologue of the mammalian T gamma/delta receptor. *The Journal of experimental medicine* 167, 315-322.

Spencer, J.L. (1969). Marek's disease herpesvirus: in vivo and in vitro infection of kidney cells of different genetic strains of chickens. *Avian diseases* 13, 753-761.

Spencer, J.L., and Calnek, B.W. (1970). Marek's disease: application of immunofluorescence for detection of antigen and antibody. *American journal of veterinary research* 31, 345-358.

St Hill, C.A., and Sharma, J.M. (2000). Viral pathogenesis in chicken embryos and tumor induction in chickens after in ovo exposure to serotype 1 Marek's disease virus. *Avian diseases* 44, 842-852.

St Paul, M., Paolucci, S., and Sharif, S. (2012). Treatment with ligands for toll-like receptors 2 and 5 induces a mixed T-helper 1- and 2-like response in chicken splenocytes. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 32, 592-598.

Statistisches Bundesamt (2012). *Fachserie 3, Reihe 4.2.3, Geflügel 2012.*

Stepaniak, J.A., Shuster, J.E., Hu, W., and Sundick, R.S. (1999). Production and in vitro characterization of recombinant chicken interleukin-2. *Journal of interferon & cytokine research* 19, 515-526.

Suchodolski, P.F., Izumiya, Y., Lupiani, B., Ajithdoss, D.K., Gilad, O., Lee, L.F., Kung, H.-J., and Reddy, S.M. (2009). Homodimerization of Marek's disease virus-encoded Meq protein is not sufficient for transformation of lymphocytes in chickens. *Journal of virology* 83, 859-869.

Suchodolski, P.F., Izumiya, Y., Lupiani, B., Ajithdoss, D.K., Lee, L.F., Kung, H.J., and Reddy, S.M. (2010). Both homo and heterodimers of Marek's disease virus encoded Meq protein contribute to transformation of lymphocytes in chickens. *Virology* 399, 312-321.

Sundick, R.S., and Gill-Dixon, C. (1997). A cloned chicken lymphokine homologous to both mammalian IL-2 and IL-15. *The Journal of Immunology* 159, 720-725.

- Thompson, C.B., and Neiman, P.E. (1987). Somatic diversification of the chicken immunoglobulin light chain gene is limited to the rearranged variable gene segment. *Cell* 48, 369-378.
- Toivanen, P., and Toivanen, A. (1973a). Bursal and postbursal stem cells in chicken. Functional characteristics. *European journal of immunology* 3, 585-595.
- Toivanen, P., and Toivanen, A. (1973b). Selective activation of chicken T lymphocytes by concanavalin A. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 111, 1602-1603.
- Toivanen, P., Toivanen, A., and Tamminen, P. (1974). Bursal and postbursal cells in chicken. Occurrence of postbursal cells in bone marrow, thymus and spleen. *European journal of immunology* 4, 405-410.
- Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302, 575-581.
- Tregaskes, C.A., Glansbeek, H.L., Gill, A.C., Hunt, L.G., Burnside, J., and Young, J.R. (2005). Conservation of biological properties of the CD40 ligand, CD154 in a non-mammalian vertebrate. *Developmental and comparative immunology* 29, 361-374.
- Tulman, E.R., Afonso, C.L., Lu, Z., Zsak, L., Rock, D.L., and Kutish, G.F. (2000). The genome of a very virulent Marek's disease virus. *J Virol* 74, 7980-7988.
- Vainio, O., Riwar, B., Brown, M.H., and Lassila, O. (1991). Characterization of the putative avian CD2 homologue. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 147, 1593-1599.
- Van der Walle, N., and Winkler-Junius, E. (1924). De neuritis-epizoötie bij kippen te Barneveld in 1921.
- Viertlboeck, B.C., and Gobel, T.W. (2007). Chicken thrombocytes express the CD51/CD61 integrin. *Veterinary immunology and immunopathology* 119, 137-141.
- Viertlboeck, B.C., Schmitt, R., and Gobel, T.W. (2006). The chicken immunoregulatory receptor families SIRP, TREM, and CMRF35/CD300L. *Immunogenetics* 58, 180-190.
- Weining, K.C., Schultz, U., Munster, U., Kaspers, B., and Staeheli, P. (1996). Biological properties of recombinant chicken interferon-gamma. *European journal of immunology* 26, 2440-2447.
- Witter, R. (1998). Control strategies for Marek's disease: a perspective for the future. *Poultry science* 77, 1197-1203.
- Witter, R., Nazerian, K., Purchase, H., and Burgoyne, G. (1970). Isolation from turkeys of a cell-associated herpesvirus antigenically related to Marek's disease virus. *American journal of veterinary research* 31, 525-538.
- Witter, R.L. (1983). Characteristics of Marek's disease viruses isolated from vaccinated commercial chicken flocks: association of viral pathotype with lymphoma frequency. *Avian*

diseases 27, 113-132.

Witter, R.L. (1997). Increased virulence of Marek's disease virus field isolates. *Avian diseases* 41, 149-163.

Witter, R.L., and Lee, L.F. (1984). Polyvalent Marek's disease vaccines: safety, efficacy and protective synergism in chickens with maternal antibodies. *Avian pathology : journal of the WVPA* 13, 75-92.

Witter, R.L., Sharma, J.M., Lee, L.F., Opitz, H.M., and Henry, C.W. (1984). Field trials to test the efficacy of polyvalent Marek's disease vaccines in broilers. *Avian diseases* 28, 44-60.

Witter, R.L., Stephens, E.A., Sharma, J.M., and Nazerian, K. (1975). Demonstration of a tumor-associated surface antigen in Marek's disease. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 115, 177-183.

Wozniakowski, G., Samorek-Salamonowicz, E., and Kozdrun, W. (2013). Comparison of loop-mediated isothermal amplification and PCR for the detection and differentiation of Marek's disease virus serotypes 1, 2, and 3. *Avian diseases* 57, 539-543.

Xing, Z., and Schat, K. (2000a). Expression of cytokine genes in Marek's disease virus-infected chickens and chicken embryo fibroblast cultures. *Immunology* 100, 70-76.

Xing, Z., and Schat, K.A. (2000b). Inhibitory effects of nitric oxide and gamma interferon on in vitro and in vivo replication of Marek's disease virus. *J Virol* 74, 3605-3612.

Yachida, S., Kondo, T., Hirai, K., Izawa, H., and Mikami, T. (1986). Establishment of a variant type of turkey herpesvirus which releases cell-free virus into the culture medium in large quantities. *Archives of virology* 91, 183-192.

Yasuda, M., Kajiwara, E., Ekino, S., Taura, Y., Hirota, Y., Horiuchi, H., Matsuda, H., and Furusawa, S. (2003). Immunobiology of chicken germinal center: I. Changes in surface Ig class expression in the chicken splenic germinal center after antigenic stimulation. *Developmental and comparative immunology* 27, 159-166.

Yeh, H.Y., Winslow, B.J., Junker, D.E., and Sharma, J.M. (1999). In vitro effects of recombinant chicken interferon-gamma on immune cells. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 19, 687-691.

Young, J.R., Davison, T.F., Tregaskes, C.A., Rennie, M.C., and Vainio, O. (1994). Monomeric homologue of mammalian CD28 is expressed on chicken T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 152, 3848-3851.

Zhang, Y., and Sharma, J.M. (2001). Early posthatch protection against Marek's disease in chickens vaccinated in ovo with a CVI988 serotype 1 vaccine. *Avian diseases* 45, 639-645.

Zhu, G.S., Iwata, A., Gong, M., Ueda, S., and Hirai, K. (1994). Marek's disease virus type 1-

---

specific phosphorylated proteins pp38 and pp24 with common amino acid termini are encoded from the opposite junction regions between the long unique and inverted repeat sequences of viral genome. *Virology* 200, 816-820.

## 10. ANHANG

### A Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Die Bezugsquellen wurden als Hochzahlen entsprechend nachfolgender Tabelle in Kapitel 4 (Material und Methoden) integriert:

1. Applichem, Darmstadt
2. Biochrom, Berlin
3. Brand, Wertheim
4. Rotexmedica, Trittau
5. Invitrogen GmbH, Karlsruhe
6. Amicon Corporation, Witten
7. Nunc, Wiesbaden
8. Sigma, Deisenhofen
9. freundlicherweise von Dr. J. Young, Institute of Animal Health, Compton/UK zur Verfügung gestellt
10. BioLegend, Fell
11. Southern Biotechnologies, Birmingham/USA
12. CLN GmbH, Freising
13. AIR LIQUIDE Deutschland GmbH, Düsseldorf
14. Amersham/GE Healthcare, München
15. Sigma Aldrich, Saint Louis/USA
16. Linaris, Wertheim
17. Merck, Darmstadt
18. eBioscience, Frankfurt
19. Bio-Rad AbD Serotec GmbH, Puchheim
20. Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., New Market/UK

- 
21. freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Prof. Dr. Thomas Göbel, Institut für Tierphysiologie, LMU München
  22. freundlicherweise von Dr. L. Vervelde, Department of Infectious Diseases and Immunology, Utrecht/Netherlands zur Verfügung gestellt
  23. Beckmann Coulter GmbH, Krefeld
  24. Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, Iowa
  25. Becton Dickinson GmbH/BD Biosciences, Heidelberg
  26. Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
  27. Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen
  28. Qiagen GmbH, Hilden
  29. Sarstedt, Nümbrecht
  30. Omega Bio-tek, Norcross, GA
  31. Bionline GmbH, Luckenwalde

**B. Laborgeräte in alphabetischer Reihenfolge**

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Herstellerfirma</b>
Absaugpumpe	HLC, AF204	Heap Labor Consult, Bovenden
Analysewaage	Mettler PJ400	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Beta-Counter	Topcount NXT Scintillation Counter	Packard, USA
Bioanalyzer	Agilent 2100 Bioanalyzer	Applied Biosciences, Darmstadt
Brüter	BSS 200/8203	Grumbach Brutgeräte GmbH, Aslar
Brüter (Stall)	BSS 300/8203	Grumbach Brutgeräte GmbH, Aslar
Brutschrank	CO <sub>2</sub> -Auto-Zero	Heraeus Instruments, München
Brutschrank für die Zellkultur	MCO-5AC	Sanyo, München
Brutschrank für die Zellkultur	MCO-20AIC	Sanyo, München
Brutschrank für die Zellkultur	Galaxy R	Nunc, Wiesbaden
Chromatographie-Anlage	Bio-Rad BiolLogic LP mit Model2100 Fraction Collector	Bio-Rad, München
Dampfsterilisator	Varioklav Typ 500E	Thermo Scientific, München
Durchflusszytometer	FACSCantoII	Becton Dickinson, Heidelberg
Durchflusszytometer/Zellsortierer	FACSAriaIIIu	Becton Dickinson, Heidelberg
ELISA-Washer	Tecan M8/4R Columbus plus	SLT Labinstruments, Crailsheim
Flockeneisbereiter	Scotsman AF100	Scotsman Ice Systems, Mailand, Italien
Gel Dokumentation Software: Image Quant Capture 300	Image Quant 300	GE Healthcare, Garching
Handzentrifuge	Rotilabo®-Mini-Zentrifuge	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
Horizontalschüttler	KL-2	Edmund Bühler GmbH
Hybridisierungssofen	G2545A	Sheldon Manufacturing, Inc., Cornelius/USA
Magnetrührer	IKAMAG®RCT	IKA®Werke GmbH + Co.KG, Staufen
Microarrayscanner	Agilent G2505C Scanner	Agilent, Böblingen
Mikroskop	Axioskop	Zeiss, Jena
Mikroskop	Leica DMIL Kamera DF340XF	Leica, Bensheim
Mikrowelle S2	MS1987U	LG Electronics, Ratingen

Mikrozentrifuge	5415R	Eppendorf Hamburg	AG,
Mikrozentrifuge	Centrifuge 5415R	Eppendorf, Köln	
PCR-Workstation	Ultraviolet Sterilizing PCR Workstation	Peqlab, Erlangen	
Peristaltische Pumpe	Peristaltic Pump P-1	GE	Healthcare, Garching
pH-Meter	Sartorius PB-11 mit Glaselektrode PY-P10		
Platten-Photometer	Sunrise-Remote	Tecan, Crailsheim	
Power Supply	Power Pac 300	Bio-Rad, München	
Power Supply Pumpe	Power Pac	Bio-Rad, München	
qPCR System	7300 Real-Time PCR System	Applied Biosciences,	Darmstadt
Schüttelinkubator	Schüttler KS15A mit Inkubatorhaube TH15	Edmund Bühler GmbH, Hechingen	
Schüttler	Kombischüttler KL-2	Johanna-Otto GmbH,	Hechingen
Sicherheitswerkbank	Mikroflow	Nunc, Wiesbaden	
Softiste: x-read Plus			
Stickstofftank	Locator 6 Plus	Barnstead Thermolyne,	Dubuque/USA
Taumel-Rollenmischer	RM5	neoLab, Heidelberg	
Thermocycler	MJ Mini	Bio-Rad, München	
Thermoschüttler	TS 1 Thermoshaker	Biometra, Göttingen	
Ultrazentrifuge	Avanti J-25	Beckmann Coulter,	Krefeld
Vakuumentrifuge	Speed Vac Concentrator	Bachofer, Reutlingen	
Vortex-Mixer	GVLab®	Gilson Inc., Middleton, USA	
Waage			
Wärmeschrank	neoLab Universal Wärmeschrank Basic 39l	neoLab Migge Laborbedarfs-Gm	
Wasserbad	GFL1004	GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel	
Zählkammer	Modifizierte Zählkammer nach Neubauer	Brand, Wertheim	
Zentrifuge	Sigma 4K15C	Sigma, Deisenhofen	
Zentrifuge	4K15	Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz	
Zentrifuge	Centrifuge 5810	Eppendorf, Köln	

## 11. DANKSAGUNG

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Bernd Kaspers für die Überlassung dieses spannenden Dissertationsthemas und die ausgezeichnete, stets freundliche und hervorragende wissenschaftliche und persönliche Unterstützung. Vielen Dank für die vielen spannenden Diskussionen rund um meine Arbeit und die Geflügelwelt.

Ein ganz besonderer Dank gebührt der Priv.-Doz Dr. Sonja Härtle für die hervorragende wissenschaftliche und persönliche Unterstützung während der ganzen Dissertation. Ohne dich und deine Leidenschaft für die Durchflusszytometrie wäre diese Arbeit nicht das, was sie heute ist.

Bei Herrn Prof. Dr. M. Stangassinger möchte ich mich für den am Institut zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz bedanken.

Für die stete Hilfsbereitschaft und das tolle Arbeitsklima möchte ich mich ganz herzlich bei Marina Kohn, Beatrice Schaerer und Ingrid Riehl bedanken. Vielen Dank, dass ihr euch für jedes noch so kleine Problem so viel Zeit genommen habt.

Besonders möchte ich mich noch einmal bei Marina Kohn bedanken, ohne deren ausdauernde Hilfe die langen Sorts nicht möglich gewesen wären.

Herzlichen Dank an die AG Göbel, insbesondere Prof. Dr. Thomas Göbel, für die tolle Zusammenarbeit am Institut und die enge wissenschaftliche Kooperation.

Besonderer Dank gilt auch den Projektpartnern Prof. Dr. Benedikt Kaufer, Univ.-Prof. Dr. Klaus Osterrieder und Annachiara Greco für die tolle Zusammenarbeit und die exzellente wissenschaftliche Unterstützung sowie die Bereitstellung der fluoreszierenden Viren, die diese Arbeit erst ermöglicht haben. Viele Dank auch an Dr. J.F. Vautherot und sein Team am INRA in Nouzilly, für die enge wissenschaftliche Kooperation.

Für die Betreuung der Tiere danke ich Herrn Fritz Meggendorfer, Hedi Opitz, Andreas Schöffmann und Thomas Hoschka.

Für die Betreuung aller Verwaltungsangelegenheiten bedanke ich mich herzlich bei Frau Crass und Frau Summer.

Vielen Dank auch an die Rechnerbetriebsgruppe, Dr. Susanne Schwarz und Dr. Frank Ahrens, die mir bei den technischen Problemen rund um Geräte und Computer stets geholfen haben.

Bei Dr. Susanne Röhl möchte ich mich herzlich für die Unterstützung und Hilfe rund um den

---

Mikroarray bedanken.

Ein ganz besonderer Dank geht an alle meine Mitdoktoranden für die Unterstützung, das Zuhören, die Kaffee-Pausen und die schönen Stunden am Institut. Barbara, Christian, Eva-Maria, Florian, Maria, Marie-Luise, Melanie, Sarah und Suse, es war einfach eine tolle Zeit mit euch!

Vielen Dank an Maria und Christian für die tolle Unterstützung und Zusammenarbeit in der „heißen Phase“.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei Hannes für die liebevolle und unermüdliche Unterstützung. Deine aufmunternden und motivierenden Worte in unseren unzähligen Gesprächen haben mir sehr geholfen.

Unendlich dankbar bin ich meinen Eltern, die mich in allen Höhen und Tiefen mit Liebe unterstützt haben. Auch bei Louisa, Svenja, Brigitte und Manfred möchte ich mich ganz herzlich bedanken. Ihr alle wart die besten Zuhörer, habt mich motiviert, unterstützt und immer an mich geglaubt.