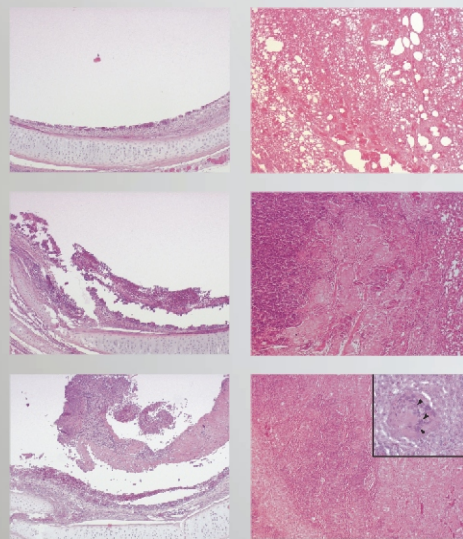


**IDENTIFIZIERUNG VON FÜNF TEGUMENTPROTEINEN  
(UL37, UL46, UL47, UL48, UL49) SOWIE VON ZWEI  
NICHTSTRUKTURPROTEINEN (UL31, gG) DES VIRUS  
DER INFEKTIÖSEN LARYNGOTRACHEITIS DER HÜHNER  
UND EVALUIERUNG EINER UL47-DELETIONSMUTANTE  
ALS POTENTIELLE LEBENDVIRUS-VAKZINE**



**DOROTHEE WIESNER**

**INAUGURAL-DISSERTATION**  
zur Erlangung des Grades  
eines Dr. med. vet. beim  
Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**édition scientifique**  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2006

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2006

© 2006 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. E. F. Kaleta

**und**

dem Institut für Molekularbiologie des Friedrich-Loeffler-Instituts,  
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Insel Riems  
Betreuer: Prof. Dr. T. C. Mettenleiter

**Identifizierung von fünf Tegumentproteinen  
(UL37, UL46, UL47, UL48, UL49) sowie von zwei  
Nichtstrukturproteinen (UL31, gG) des  
Virus der infektiösen Laryngotracheitis der Hühner  
und  
Evaluierung einer UL47-Deletionsmutante als potentielle  
Lebendvirus-Vakzine**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Dorothee Wiesner**

Tierärztin aus Leverkusen

Gießen 2005

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

Gutachter:

Prof. Dr. E. F. Kaleta

Prof. Dr. T. C. Mettenleiter

Tag der Disputation: 05. April 2006

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Burscheid, 05. April 2006

Dorothee Wiesner

*Meiner Familie und Thomas*

# INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1	1
2	4
2.1	4
2.1.1	4
2.1.2	5
2.1.3	6
2.1.4	7
2.1.4.1	7
2.1.4.2	8
2.1.4.3	9
2.1.5	11
2.2	12
2.3	15
3	18
3.1	18
3.1.1	18
3.1.2	18
3.1.3	18
3.1.4	18
3.1.5	18
3.1.6	19
3.1.7	19
3.1.8	20
3.1.9	22
3.1.10	30
3.1.10.1	30
3.1.10.2	30
3.1.10.3	31

	Seite	
2.1.10.4	Kits	31
2.1.10.5	Chemikalien	31
2.1.11	Geräte und Laborhilfsmittel	32
2.1.12	Verbrauchsmaterialien	33
3.2	Methoden	34
3.2.1	Zellkultur	34
3.2.1.1	Präparation von Primärzellen aus Hühnerembryonen	34
3.2.1.2	Vermehrung von LMH-Zellen	34
3.2.2	Virusvermehrung und -reinigung	34
3.2.2.1	Virusanzucht	34
3.2.2.2	Plaquetest	35
3.2.2.3	Wachstumskinetik	35
3.2.2.4	Reinigung von ILT-Virionen	35
3.2.3	Isolierung von Nukleinsäuren	36
3.2.3.1	Präparation von ILTV-DNA aus infizierten Zellen	36
3.2.3.2	Phenol-Extraktion und Ethanolpräzipitation	36
3.2.3.3	Präparation von RNA (Chomczynski und Sacchi, 1987)	37
3.2.3.4	Präparation von Plasmiden	37
3.2.3.5	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	38
3.2.4	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	38
3.2.5	Plasmid-Klonierung	38
3.2.5.1	Klenow-Behandlung	38
3.2.5.2	Phosphorylierung von PCR-Produkten	39
3.2.5.3	Phosphatase-Behandlung der Vektor-DNA	39
3.2.5.4	Ligation	39
3.2.5.5	Herstellung kompetenter Bakterien	39
3.2.5.6	Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA	40
3.2.6	Agarosegelelektrophorese und Membrantransfer von Nukleinsäuren	40
3.2.6.1	Neutrale Agarosegele (DNA-Gele)	40
3.2.6.2	Formaldehydgele (RNA-Gele)	40
3.2.6.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	41
3.2.6.3.1	Elution durch Phenolextraktion	41
3.2.6.3.2	Elution mit QIAquick Gel Extraction Kit (Quiagen)	41
3.2.6.4	Southern Blot	41
3.2.6.5	Northern Blot	41
3.2.6.6	Dot Blotting von Virus-DNA	42



	Seite	
3.2.7	Blot-Hybridisierung	42
3.2.7.1	Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren	42
3.2.7.1.1	„Oligo“-Markierung von DNA	42
3.2.7.1.2	<i>In vitro</i> -Synthese von cRNA	42
3.2.7.1.3	Abtrennung nicht eingebauter Radionukleotide	43
3.2.7.2	Hybridisierung	43
3.2.8	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	44
3.2.9	DNA-Sequenzierung	44
3.2.9.1	Thermo Sequenase labelled primer cycle sequencing kit (Amersham)	44
3.2.9.2	Thermo Sequenase cycle sequencing kit (Amersham)	45
3.2.10	Herstellung rekombinanter Viren und Zelllinien	45
3.2.10.1	Transfektion eukaryontischer Zellen	45
3.2.10.2	Herstellung rekombinanter Viren	46
3.2.10.3	Herstellung rekombinanter Zelllinien	47
3.2.11	Trennung von Proteinen	47
3.2.11.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	47
3.2.11.2	Coomassie-Färbung	48
3.2.12	Western Blot-Analysen	48
3.2.13	Radioimmunpräzipitation (RIP)	48
3.2.13.1	Metabolische Markierung	48
3.2.13.2	Immunpräzipitation	49
3.2.13.3	Fluorographie	49
3.2.14	Indirekter Immunfluoreszenztest (IFT)	50
3.2.15	<i>In vitro</i> -Translation	50
3.2.16	Deglykosylierung von Proteinen	50
3.2.16.1	Abspaltung von N-Glykanen	51
3.2.16.2	Abspaltung von O-Glykanen	51
3.2.16.3	TCA-Präzipitation	51
3.2.17	Herstellung monospezifischer Antisera	52
3.2.17.1	Expression und Reinigung bakterieller Fusionsproteine	52
3.2.17.1.1	pGEX-Expressionsplasmide	52
3.2.17.1.2	pET-Expressionsplasmide	52
3.2.17.2	Elektroelution der Fusionsproteine	53
3.2.17.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	53
3.2.17.4	Immunisierung von Kaninchen	53
3.2.18	Infektionsversuche an Hühnern	54

	Seite
4	56
4.1	56
4.1.1	58
4.2	59
4.3	63
4.3.1	63
4.3.2	64
4.3.3	69
4.3.4	71
4.3.5	72
4.4	74
4.4.1	74
4.4.2	81
4.4.3	82
4.4.4	84
4.4.5	85
4.4.6	87
4.5	89
4.5.1	89
4.5.2	91
4.5.3	94
4.5.4	96
5	98
5.1	98
5.1.1	98
5.1.2	99
5.1.3	99
5.1.4	101

---

		Seite
5.2	Herstellung rekombinanter ILT-Viren	102
5.2.1	<i>In vitro</i> -Charakterisierung UL47- und gG-negativer ILTV-Mutanten	104
5.2.2	Relevanz von ILTV UL47 für die Virulenz <i>in vivo</i>	105
6	ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY	109
7	LITERATURVERZEICHNIS	111
8	ABKÜRZUNGEN	138



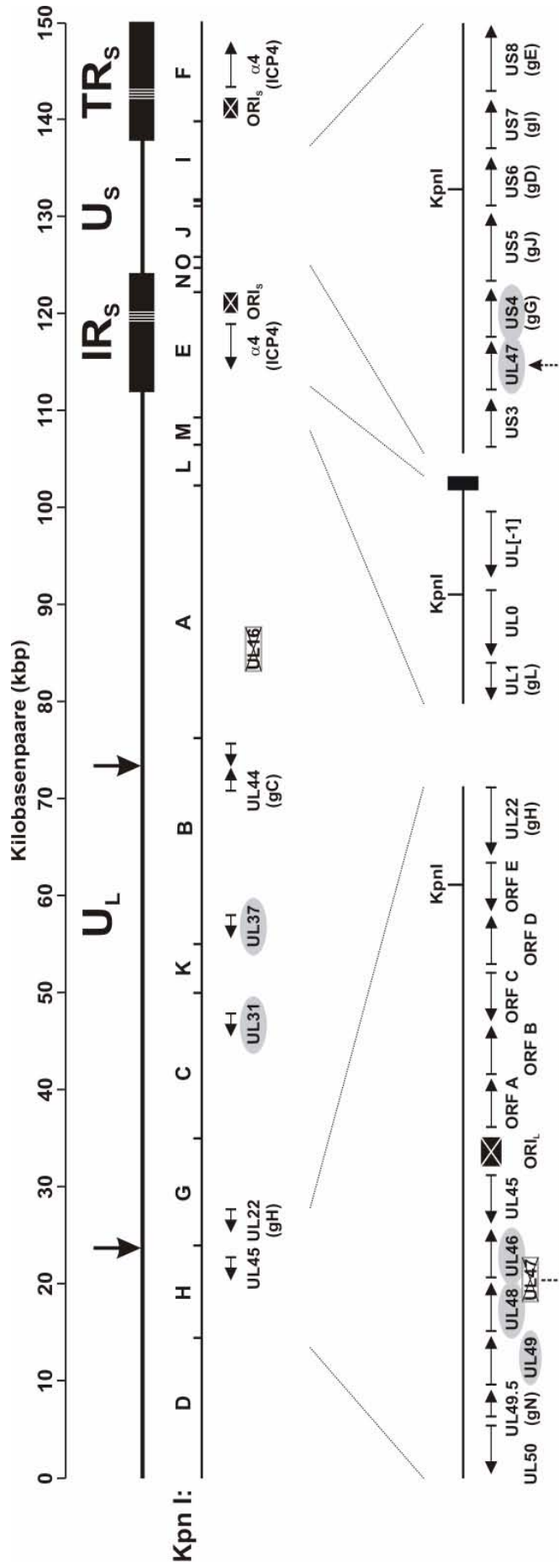
# 1 EINLEITUNG

Herpesviren sind mit mehr als 130 Spezies bei allen Vertebratenklassen verbreitet, und auch bei wirbellosen Tieren gibt es morphologisch ähnliche Viren. Allein beim Menschen wurden bislang acht verschiedene Vertreter der *Herpesviridae* gefunden. Außerdem werden durch Herpesviren einige bedeutende Tierseuchen verursacht, wie die Aujeszky'sche Krankheit der Schweine und die Infektiöse Rhinotracheitis der Rinder. Herpesvirale Erkrankungen der Vögel sind die Entenpest, die Marek'sche Krankheit sowie die Infektiöse Laryngotracheitis der Hühner (ILT). Die ILT ist eine weltweit auftretende akute Erkrankung des oberen Respirationstraktes, die durch ein Alphaherpesvirus (ILTV, Gallid Herpesvirus 1) verursacht wird und in infizierten Beständen zu erheblichen wirtschaftlichen Schäden aufgrund von Mortalität und reduzierter Legeleistung führen kann. Zur Bekämpfung der ILT werden klassisch attenuierte Lebendimpfstoffe eingesetzt, die jedoch häufig eine gewisse Restvirulenz aufweisen, welche sich durch Tierpassagen weiter steigern kann. Außerdem können sich Tiere durch die Impfung latent infizieren und das Impfvirus auf diese Weise verbreiten.

Um mittels gentechnischer Methoden möglicherweise verbesserte Impfstoffe herstellen zu können, sind genaue Kenntnisse des Virusgenoms sowie der immunrelevanten und die Virulenz determinierenden Genprodukte notwendig. Aus diesem Grund wurden bereits verschiedene Virionproteine des ILTV mit Hilfe monoklonaler Antikörper und monospezifischer Antiseren identifiziert. Außerdem wurde die Nukleotidsequenz des gesamten ILTV-Genoms ermittelt, und es wurden erste ILTV-Rekombinanten mit definierten Gendeletionen hergestellt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen können auch zur Bestimmung der phylogenetischen Verwandtschaft von ILTV mit anderen Herpesviren und zur Aufklärung des viralen Replikationszyklus beitragen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten die ILTV-Homologen von fünf Haupt-Tegumentproteinen (UL37, UL46, UL47, UL48 und UL49) sowie von zwei Nichtstrukturproteinen (UL31 und gG) anderer Alphaherpesviren identifiziert und funktionell charakterisiert werden (Abb. 1). Hierzu wurde zunächst die Transkription der entsprechenden Gene durch Northern Blot-Analysen ILTV-infizierter Zellen untersucht. Außerdem wurden gegen die als bakterielle Fusionsproteine exprimierten Leseraster monospezifische Antiseren in Kaninchen hergestellt, die zum Nachweis und zur Lokalisierung der viralen Proteine in infizierten Zellen und ggf. in ILT-Virionen durch Western Blot-Analysen, Immunpräzipitationen und Immunfluoreszenztests eingesetzt werden konnten. Darüber hinaus sollte versucht werden, rekombinante

ILT-Viren mit Deletionen der einzelnen Gene herzustellen, was jedoch bislang nur für das Glykoprotein G-Gen US4 sowie für UL47 gelang. Die Vermehrungseigenschaften der erhaltenen Deletionsmutanten in Zellkulturen wurden analysiert. Durch experimentelle Infektion von Hühnern wurde die Auswirkung der UL47-Deletion auf die Virulenz untersucht und durch nachfolgende Belastung mit pathogenem ILTV die mögliche Eignung UL47-negativer Viren als Lebendvakzine geprüft.



**Abb. 1: Karte des ILTV-Genoms**

Schematische Darstellung des ILTV-Genoms, das aus einem langen (U<sub>L</sub>) und einem von inversen repetitiven Sequenzen (IR<sub>s</sub>, TR<sub>s</sub>) flankierten kurzen (U<sub>s</sub>) singulären Abschnitt besteht. Die Positionen der KpnI-Schnittstellen und der Startpunkte der viralen DNA-Replikation (ORI<sub>L</sub>, ORI<sub>s</sub>) sind gezeigt. Lage und Orientierung ausgewählter Virusgene sind durch Pfeile dargestellt, wobei konservierte Leseraster entsprechend ihren Homologen bei HSV-1 bezeichnet wurden. Ein im Vergleich zum HSV-1-Genom invertierter Teil der U<sub>L</sub>-Region ist durch senkrechte Pfeile gekennzeichnet. Vergrößerte Ausschnitte zeigen die U<sub>s</sub>-Region und zwei Abschnitte der U<sub>L</sub>-Region, in denen ILTV-spezifische Gene (ORFA-E, UL0, UL[-1]) lokalisiert sind. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Gene (ORFA-E, UL0, UL[-1]) sind grau unterlegt. Durchgestrichene Kästen kennzeichnen bei anderen Alphaherpesviren vorhandene Leseraster, welche im ILTV-Genom nicht enthalten sind. Die Translokation von UL47 aus der U<sub>L</sub>- in die U<sub>s</sub>-Region ist durch einen

## 2 LITERATURÜBERSICHT

### 2.1 Herpesviren

#### 2.1.1 Taxonomie

Bis heute sind bei Wirbeltieren über 130 Vertreter der Familie *Herpesviridae* identifiziert worden (Davison et al., 2005a). Die Zuordnung zu dieser Familie erfolgt aufgrund einer ähnlichen Morphologie der Viruspartikel sowie gemeinsamer biologischer Eigenschaften. Strukturelle Charakteristika der Herpesviren sind ein doppelsträngiges DNA-Genom, ein ikosaedrisches Kapsid und eine äußere Hüllmembran. Kapsidbildung, DNA-Replikation und Verpackung finden im Kern der Wirtszellen statt. Eine produktive Infektion führt stets zur Lyse der betroffenen Zellen. Darüber hinaus können Herpesviren ihre Wirtsorganismen auch latent infizieren (Roizman und Pellet, 2001).

Da sich die einzelnen Herpesviren hinsichtlich ihres Wirtsspektrums und Zelltropismus sowie ihrer Vermehrungsgeschwindigkeit und Pathogenese zum Teil erheblich unterscheiden, wurde eine Unterteilung in die Unterfamilien *Alpha-*, *Beta-* und *Gammaherpesvirinae* vorgenommen (Davison et al., 2005a). Mittlerweile erfolgt die Klassifizierung von Herpesviren vor allem anhand der Daten aus Vergleichen der DNA-Sequenzen sowie der abgeleiteten Aminosäuresequenzen konservierter Gene (McGeoch et al., 2000), was in einigen Fällen zu einer Umgruppierung führte. Beispielsweise wurden die zunächst als Gammaherpesviren klassifizierten Erreger der Marek'schen Krankheit des Huhnes (MDV-1 und MDV-2) und das Putenherpesvirus (HVT) aufgrund von Sequenzdaten (Buckmaster et al., 1988) den Alphaherpesviren zugeordnet.

Für Alphaherpesviren sind ein breites Wirtsspektrum, kurze Replikationszyklen in Zellkulturen (< 24h) und die effektive Zerstörung infizierter Zellen kennzeichnend. Latente Infektionen werden vor allem in sensorischen Ganglien etabliert. Innerhalb der Alphaherpesviren wurden die humanpathogenen Herpes simplex Viren Typ 1 und 2 (HSV-1 und HSV-2) dem Genus *Simplexvirus* zugeordnet. Das Genus *Varicellovirus* umfasst neben dem humanpathogenen Varicella zoster Virus (VZV) auch einige bedeutende Tierpathogene wie das Pseudorabies Virus (PrV), das Bovine Herpesvirus 1 (BHV-1) und das Equine Herpesvirus 1 (EHV-1). Die aviären Alphaherpesviren weisen einen relativ großen phylogenetischen Abstand zu denen der Säuger auf. Deshalb wurden diese in den Genera *Mardivirus*, zu welchem die Marek's Disease Viren 1 und 2 (MDV-1 und MDV-2) sowie das Putenherpesvirus



(HVT) gehören, und *Iltovirus*, dessen bislang einziger Vertreter das ILTV ist, zusammengefasst (Davison et al., 2005a)

Betaherpesviren weisen ein enges Wirtsspektrum und lange Replikationszyklen (> 24h) auf, charakteristisch ist die Vergrößerung infizierter Zellen (Zytomegalie). Sie persistieren vor allem in sekretorischen Drüsen, lymphoretikulärem Gewebe und den Nieren, wo es zu latenten Infektionen kommen kann. Den Betaherpesviren werden die Genera *Zytomegalovirus*, zu dem das Humane Zytomegalievirus (HCMV) gehört, und *Muromegalovirus* mit dem Murinen Zytomegalievirus (MCMV) zugeordnet. Das Genus *Roseolovirus*, welches die Humanen Herpesviren Typ 6 und 7 (HHV-6 und HHV-7) umfasst, gehört ebenfalls in diese Subfamilie.

Auch Gammaherpesviren besitzen ein eng begrenztes Wirtsspektrum, replizieren jedoch vor allem in Lymphozyten. Latente Infektionen bilden sich ebenfalls in lymphatischen Zellen und Geweben aus, und einige der Viren sind häufig mit malignen Entartungen assoziiert. Die Gammaherpesviren werden in das Genus *Lymphocryptovirus* mit dem humanen Epstein-Barr-Virus (EBV), sowie das Genus *Rhadinovirus* mit dem Kaposi's Sarkom assoziierten Herpesvirus (KSHV) des Menschen eingeteilt (McGeoch et al., 2000; Roizman und Pellet, 2001; Davison et al., 2005a).

Zahlreiche Herpesviren konnten bislang nicht klassifiziert werden, weil sie entweder noch unzureichend charakterisiert sind, oder zu keiner der drei Unterfamilien signifikante Sequenzhomologien aufweisen. Letzteres gilt vor allem für die Herpesviren der Amphibien, Fische und Mollusken. So weisen das Channel Catfish Virus (CCV oder IchV-1; Davison, 1992), das Salmonid Herpesvirus 2 (SalHV-2; Bernard und Mercier, 1993), das Koi Herpesvirus (KHV oder CyHV-3; Waltzek et al., 2005) und ein Froschherpesvirus (RaHV-1; Davison et al., 1999) auf der Ebene der Aminosäuresequenzen viraler Proteine zwar Homologien zueinander auf, nicht aber zu den Herpesviren der Säuger und Vögel, obwohl sie diesen hinsichtlich ihrer Morphologie und Biologie ähneln. Bei wirbellosen Tieren wurde bislang nur das Austernherpesvirus (OsHV-1) charakterisiert, welches weder zu den Herpesviren der Säuger, Vögel und Reptilien, noch zu denen der Fische und Amphibien eine erkennbare Verwandtschaft zeigt (Davison et al., 2005b).

### 2.1.2 Genomstruktur

Das Genom von Herpesviren besteht aus einer doppelsträngigen linearen DNA mit einer Länge von 120 - 295 kbp, wobei aufgrund von Sequenzrepetitionen auch innerhalb einer Spezies Variationen von bis zu 10 kbp auftreten können (Roizman und Pellet, 2001). Die Basenzusammensetzung der viralen DNA variiert hinsichtlich des G/C-Gehaltes zwischen 31 und 75 %. Neben singulären Abschnitten enthalten viele herpesvirale Genome auch interne und terminale Sequenzrepetitionen, die sich

in gleicher oder umgekehrter Orientierung mehrfach wiederholen. Anhand der Anzahl und der Anordnung dieser Repetitionen lassen sich die Genome der Herpesviren in sechs Gruppen (A-F) einteilen (Roizman und Pellet, 2001), von welchen bei Alphaherpesviren nur die Typen D und E vorkommen. Genome vom Typ D bestehen aus zwei als „unique long“ ( $U_L$ ) und „unique short“ ( $U_S$ ) bezeichneten singulären Regionen, die durch einen Sequenzabschnitt ( $IR_S$ ) getrennt werden, welcher sich am anderen Ende der  $U_S$ -Region in inverser Anordnung wiederholt ( $TR_S$ ). Durch Rekombinationen zwischen den repetitiven Sequenzen entstehen bezüglich der Orientierung der  $U_S$ -Region zwei isomere Formen des Genoms. Diese Art der Genomorganisation findet sich vor allem bei Vertretern des Genus *Varicellovirus* und bei ILTV (Abb. 1). Die Typ E-Genome der Herpes-Simplex-Viren und der *Marek's Disease-like viruses* weisen zusätzliche inverse Sequenzrepetitionen auf, welche die  $U_L$ -Region umgeben ( $IR_L$ ,  $TR_L$ ), wodurch vier Genomisomere entstehen. Ausgehend von einem dieser Isomere wurden die identifizierten Protein-kodierenden Leseraster des HSV-1-Genoms vom linken Ende der  $U_L$ - bzw.  $U_S$ -Region beginnend durchnummeriert (McGeoch et al., 1988). Diese Nomenklatur wurde für viele andere Alphaherpesviren, die eine weitgehend kolineare Anordnung homologer Gene zeigen, übernommen. Insgesamt enthalten Alphaherpesvirusgenome etwa 70 bis 80 funktionelle Gene, während deren Zahl bei Betaherpesviren vermutlich bei über 200 liegt (Mocarski und Courcelle, 2001). Diese Gene kodieren für virale Strukturproteine sowie eine große Anzahl von Enzymen, welche am Nukleinsäurestoffwechsel, an der DNA-Synthese und -Verpackung sowie an der Proteinprozessierung beteiligt sind.

### 2.1.3 Virionstruktur

Herpesviruspartikel sind aus vier Strukturkomponenten aufgebaut. Das möglicherweise Protein-assoziierte DNA-Genom bildet den Kern (*core*). Dieser ist umgeben von einem ikosaedrischen Kapsid, welches sich aus 162 Capsomeren (150 Hexonen und 12 Pentonen) zusammensetzt und einen Durchmesser von ca. 100 - 110 nm aufweist. Core und Kapsid bilden zusammen das Nukleokapsid. Dieses ist in eine Matrix aus zahlreichen viralen Proteinen eingebettet, die als Tegument bezeichnet wird. Die äußere Virushülle (*envelope*) wird von einer Lipidmembran zellulären Ursprungs gebildet, in die virale Proteine eingelagert sind, welche zum Teil als „spikes“ nach außen ragen. Die Größe der Virionen ist abhängig von der Menge des eingelagerten Teguments und variiert zwischen 120 und 300 nm (Roizman und Pellet, 2001).

HSV-1-Partikel enthalten etwa 40 verschiedene virale Proteine, von denen 6 dem Kapsid, 19 dem Tegument und 15 der Virushülle zugeordnet werden (Roizman und Knipe, 2001; Mettenleiter, 2002). Während die Kapsidproteine relativ hoch konserviert sind, zeigen die Komponenten des Teguments und der Virushülle sowohl

in ihrer Anzahl als auch in ihren Aminosäuresequenzen eine beträchtliche Variabilität zwischen verschiedenen Herpesvirus-Spezies. Die Hüllproteine spielen eine wichtige Rolle im viralen Replikationszyklus (siehe unten), beeinflussen den Wirts- und Zelltropismus und sind Hauptangriffspunkte der zellulären und humoralen Immunantwort des Wirtes (Spear, 1985; Rajcani und Vojvodova, 1998; Whitton und Oldstone, 2001). Viele dieser Hüllproteine sind glykosyliert und wurden bei HSV-1 in der Reihenfolge ihrer Entdeckung als gB (UL27), gC (UL44), gD (US6), gE (US8), gG (US4), gH (UL22), gI (US7), gJ (US5), gK (UL53), gL (UL1) und gM (UL10) bezeichnet. Für die Replikation in Zellkulturen gelten jedoch nur gB, gD, gH und gL als essentiell (Roizman und Knipe, 2001). Bei vielen anderen Alphaherpesviren wurden homologe Proteine gefunden. Zusätzlich ist bei einigen Viren das Genprodukt von UL49.5 glykosyliert und wurde aus diesem Grund als gN bezeichnet (Jöns et al., 1996; Lake et al., 1998). Die Proteine gH/gL, gE/gI und gM/gN bilden heterodimere Komplexe (Johnson und Feenstra, 1987; Hutchinson et al., 1992; Jöns et al., 1998). Dagegen bildet gB bei vielen Herpesviren Homodimere, welche über Disulfidbrücken verbunden sind und deren Untereinheiten durch zelluläre Proteasen in zwei Fragmente gespalten werden (Montalvo und Grose, 1987; Whealy et al., 1991; Niikura et al., 1992). Eine Sonderstellung nimmt gG ein, welches unter anderem bei PrV, BHV-1 und EHV-4 nicht in Virionen eingebaut, sondern von infizierten Zellen sezerniert wird (Rea et al., 1985; Crabb et al., 1992; Keil et al., 1996).

## **2.1.4 Virusreplikation**

### **2.1.4.1 Eintritt in die Wirtszelle**

Der Replikationszyklus von Herpesviren beginnt mit der Anlagerung der umhüllten Virionen an die Zielzelle, wobei herpesvirale Glykoproteine mit zellulären Rezeptoren interagieren. Bei Alphaherpesviren läuft dieser als Adsorption oder *attachment* bezeichnete Vorgang in zwei Phasen ab. Die primäre Adsorption wird hauptsächlich über Interaktionen des Hüllglykoproteins gC mit Heparansulfatresten von Proteoglykanen der Wirtszellmembran vermittelt (Mettenleiter et al., 1990; Okazaki et al., 1991; Zhu et al., 1995), bei HSV-1 und BHV-1 zusätzlich über das Glykoprotein B (Laquerre et al., 1998; Li et al., 1995). Allerdings konnte durch Inhibition der Heparansulfat-Bindung bei HSV-1 und PrV ein Proteoglykan-unabhängiger Mechanismus der primären Adsorption nachgewiesen werden (Banfield et al., 1995; Karger et al., 1995). In der zweiten Phase der Adsorption erfolgt eine Stabilisierung durch Bindung des viralen Glykoproteins D an verschiedene Oberflächenproteine der Zelle, von denen einige der TNF (tumor necrosis factor)-Rezeptor-Superfamilie und

der Poliovirus-Rezeptor-Familie angehören (Karger und Mettenleiter, 1993; Montgomery et al., 1996; Geraghty et al., 1998).

Im Anschluss an die Adsorption erfolgt die Penetration durch Fusion der viralen Hüllmembran mit der Zellmembran, wodurch die Nukleokapside und Tegumentproteine ins Zytoplasma gelangen. An der Membranfusion sind die viralen Glykoproteine gB und gD sowie der gH/gL-Komplex beteiligt (Spear, 1993; Mettenleiter, 1994). Ein großer Teil des Teguments löst sich von den Nukleokapsiden, und einige der freigesetzten Tegumentproteine beeinflussen den Zellmetabolismus, um geeignete Bedingungen für die Virusreplikation zu schaffen. So werden zum Beispiel durch das viral host shutoff-Protein (UL41) von HSV-1 zelluläre mRNAs degradiert (Smiley, 2004). Eine gleichzeitige Degradation viraler RNAs wird offensichtlich durch Interaktionen des UL41-Proteins mit dem UL48-Genprodukt VP16 verhindert (Smibert et al., 1994; Lam et al., 1996). Durch Bindung an zelluläre Transkriptionsfaktoren induzieren die UL48-Proteine von HSV-1, PrV, BHV-1 und VZV außerdem die Transkription viraler *immediate-early*-Gene (siehe unten) und werden deshalb auch als  $\alpha$ -transinducing factors ( $\alpha$ -TIF) bezeichnet (Batterson und Roizman, 1983; Campbell et al., 1984; Moriuchi et al., 1993; Misra et al., 1994; Fuchs et al., 2002b). Bei HSV-1 wird diese Funktion durch die UL46- und UL47-Genprodukte moduliert (McKnight et al., 1987; Zhang et al., 1991; Zhang et al., 1993).

Die Nukleokapside werden im Zytoplasma entlang von Microtubuli zum Zellkern transportiert, in den das Virusgenom durch die Kernporen eingeschleust wird (Granzow et al., 1997; Sodeik et al., 1997). Der Transport der Kapside erfolgt vermutlich durch Interaktionen von Tegumentproteinen, die an das Kapsid gebunden bleiben, mit zellulären Motorproteinen (Sodeik et al., 2000).

#### **2.1.4.2 Genexpression und DNA-Replikation**

Nach Eintritt in den Zellkern zirkularisiert die virale DNA und wird vermutlich über einen „rolling circle“-Mechanismus repliziert. Auf diese Weise entstehen lineare Konkatemere des Genoms (Poffenberger und Roizman, 1985), welche während der Verpackung in die ebenfalls im Zellkern gebildeten Kapside an spezifischen Positionen in einzelne Virusgenome gespalten werden (Varmuza und Smiley, 1985). Während für die DNA-Replikation vor allem virale Enzyme verantwortlich sind, erfolgt die Transkription viraler Gene durch die zelluläre RNA-Polymerase II (Roizman und Knipe, 2001).

Die Genexpression ist bei allen Herpesviren kaskadenartig reguliert, wobei als Hauptgruppen sehr frühe (*immediate-early*,  $\alpha$ ), frühe (*early*,  $\beta$ ) und späte (*late*,  $\gamma$ ) Gene unterschieden werden (Honess und Roizman, 1974). Die Infektiosität

gereinigter Herpesvirus-DNA in Zellkulturen (Sheldrick et al., 1973) belegt, dass ungeachtet der oben erwähnten  $\alpha$ -TIF-Funktion des UL48-Genproduktes für die Initiation der Genexpression keine viralen Strukturproteine notwendig sind. Bei HSV-1 wurden sechs verschiedene  $\alpha$ -Gene beschrieben (ICP0, ICP4, ICP22, ICP27, ICP47 und U<sub>S</sub>1.5), die auch in Gegenwart von Inhibitoren der Proteinsynthese transkribiert werden und deren Produkte als Transkriptions-Aktivatoren und Regulatoren für die Expression nachfolgender viraler Gene dienen (Roizman und Knipe, 2001). Die Transkription der *early*-Gene, welche überwiegend für Enzyme des Nucleinsäurestoffwechsels und der DNA-Synthese kodieren, erfolgt noch vor Beginn der viralen DNA-Replikation. Zu ihnen gehören beispielsweise die Gene für die Ribonukleotid-Reduktase, dUTPase und Thymidinkinase sowie Helikase, Primase und DNA-Polymerase. Die *late*-Gene kodieren vor allem für virale Strukturproteine und werden in zwei Untergruppen unterteilt. Während die Expression der *early late* oder  $\gamma_1$ -Gene bereits vor der viralen Genomreplikation beginnt, werden *true late* oder  $\gamma_2$ -Gene erst nach der DNA-Replikation exprimiert (Roizman und Pellet, 2001). Nach der Proteinsynthese verbleibt ein Teil der viralen Genprodukte im Zytoplasma, während andere in den Zellkern gelangen oder als Membranproteine über das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat transportiert und gegebenenfalls prozessiert werden.

### 2.1.4.3 Virusmorphogenese

Im Zellkern werden die Kapside aus ihren Proteinbestandteilen autokatalytisch zusammengesetzt (Newcomb et al., 1999). Nach Verpackung der DNA gelangen die Nucleokapside durch Knospung an der inneren Kernmembran in den perinukleären Spalt, wobei sie eine primäre Lipidhülle erhalten. An diesem Prozess sind die Produkte der konservierten herpesviralen Gene UL31 und UL34 beteiligt. UL31 kodiert für ein nukleäres Phosphoprotein, welches möglicherweise ein primäres Tegumentprotein darstellt, während das von UL34 kodierte Typ-II-Membranprotein aller Wahrscheinlichkeit nach ein primäres Hüllprotein ist (Chang und Roizman, 1993; Klupp et al, 2000; Reynolds et al., 2001; Fuchs et al, 2002a; Mettenleiter, 2002). Im elektronenmikroskopischen Bild unterscheiden sich primär umhüllte Virionen im perinukleären Spalt von reifen extrazellulären Virionen dadurch, dass erstere eine weniger dicke, aber deutlich begrenzte Tegumentschicht und eine relativ glatte Hülle aufweisen, was auf das Fehlen von Glykoproteinen hindeutet (Granzow et al., 1997). Nach der Fusion der primären Virushülle mit der äußeren Kernmembran werden unbehüllte Kapside ins Zytoplasma entlassen, wo sich einige Tegumentproteine, darunter die UL36- und UL37-Genprodukte, anlagern. Das UL36-Genprodukt ist das größte Protein der Herpesviren. Es bildet durch Interaktionen mit

dem Hauptkapsidprotein (UL19) und dem UL37-Genprodukt die innerste Tegumentschicht (Zhou et al., 1999; Desai, 2000; Desai et al., 2001; Klupp et al., 2002; Fuchs et al., 2004). Während bei HSV-1 sowohl UL36 als auch UL37 für die produktive Virusreplikation essentiell sind, können UL37-negative PrV-Mutanten in Zellkulturen vermehrt werden, zeigen jedoch einen deutlichen Defekt bei der Virusreifung, welcher erheblich reduzierte Virustiter und Plaquegrößen zur Folge hat (Klupp et al., 2001).

Im Bereich des trans-Golgi-Netzwerks findet die sekundäre Umhüllung statt. Hierbei lagern sich Tegumentproteine und Nukleokapside an die mit viralen Glykoproteinen bestückten Membranen der Golgi-Vesikel an. Durch Einstülpung der Golgi-Membranen entstehen mit umhüllten Virionen gefüllte Vesikel, welche zur Zellmembran transportiert werden, wo die reifen Virionen über Exozytose freigesetzt werden (Whealy et al., 1991; Gershon et al., 1994; Browne et al., 1996; Fuchs et al., 1996; Granzow et al., 1997; Skepper et al., 2001). An diesem Prozess sind bei Alphaherpesviren unter anderem die von UL46, UL47, UL48 und UL49 kodierten Tegumentproteine, die Glykoproteine gE, gK und gM und die Membran-assoziierten UL11- und UL20-Proteine beteiligt (Mettenleiter, 2002). Obwohl UL46 und UL47 für zwei Hauptstrukturkomponenten reifer Virionen kodieren, sind sie bei keinem bislang untersuchten Virus essentiell für die Replikation in Zellkulturen (Zhang et al., 1991; Dorange et al., 2002; Kopp et al., 2002). Während die sekundäre Umhüllung von PrV-Partikeln durch Deletion von UL47 nur partiell gehemmt wird, ist sie in Abwesenheit des UL48-Proteins fast vollständig inhibiert (Fuchs et al., 2002b). Auch bei HSV-1 spielt das UL48-Genprodukt eine zentrale Rolle bei der Virusmorphogenese (Mossmann et al., 2000) und interagiert dabei möglicherweise mit dem Tegumentprotein VP22 (UL49) sowie den viralen Glykoproteinen gB, gD und gH (Zhu und Courtney, 1994; Elliott et al., 1995; Gross et al., 2003). Allerdings gilt UL48 nur bei HSV-1 als essentiell (Weinheimer et al., 1992), während UL48-negative PrV-, VZV- und MDV-Mutanten *in vitro* noch vermehrungsfähig sind (Cohen und Seidel, 1994; Dorange et al., 2002; Fuchs et al., 2002b). Hingegen ist bei MDV im Gegensatz zu anderen Alphaherpesviren das UL49-Protein essentiell für die Replikation in Zellkulturen (Dorange et al., 2002). Eine Besonderheit des UL49-Genproduktes von HSV-1 ist dessen Fähigkeit, sich Virus-unabhängig von Zelle zu Zelle auszubreiten (Elliott und O'Hare, 1997). Die biologische Relevanz dieser Eigenschaft ist allerdings noch unklar. Gleiches gilt auch für die gezeigten Interaktionen des UL49-Proteins von PrV mit den zytoplasmatischen Domänen der Glykoproteine gE und gM, da Deletionen von UL49 keinerlei Auswirkungen auf die *in vitro*-Replikation oder die Virulenz in Nagern haben (del Rio et al., 2002; Fuchs et al., 2002c). Diese Befunde deuten darauf hin, dass für die Morphogenese wichtige Funktionen redundant angelegt sind und außerdem bei verschiedenen Herpesviren unterschiedlichen Proteinen zufallen könnten (Mettenleiter, 2002).

Bei den meisten Herpesviren kann die Infektion neuer Wirtszellen entweder durch freigesetzte Virionen oder direkte Virusausbreitung von Zelle zu Zelle (*cell-to-cell-spread*) erfolgen. Hierbei sind die Infektionsmechanismen offenbar unterschiedlich, da beispielsweise das Glykoprotein gD von PrV zwar für die Bildung infektiöser Virionen, nicht aber für die Plaquebildung in Zellkulturen essentiell ist (Rauh und Mettenleiter, 1991). Einige Herpesviren wie VZV und MDV bilden *in vitro* keine infektiösen Partikel, sondern vermehren sich ausschließlich durch *cell-to-cell-spread* (Beyer, 1992).

### 2.1.5 Latenz

Bei latenten Herpesvirusinfektionen werden keine infektiösen Virionen gebildet. Die Virusgenome liegen in infizierten Zellen episomal in zirkulärer Form vor, und die virale Genexpression bleibt auf wenige Genomabschnitte beschränkt. Bei verschiedenen Alphaherpesviren wurden so genannte Latenz-assoziierte Transkripte (LAT) nachgewiesen, deren genaue Funktion bisher unklar ist (Rock et al., 1987; Cheung, 1989; Doerig et al., 1991; Chesters et al., 1997). Da einige der LAT komplementär zu den mRNAs der viralen „*immediate-early*“-Proteine ICP0 und ICP4 sind, wird eine Inhibition der viralen  $\alpha$ -Genexpression vermutet (Croen et al., 1987; Stevens et al., 1987; Cheung, 1991). Endogene und exogene Stressfaktoren wie Infektionen, Immunsuppression oder die Gabe von Corticosteroiden können zu einer Reaktivierung der produktiven Replikation und somit zur erneuten Virusausscheidung führen (Steiner, 1996; Wagner und Bloom, 1997; Jones, 2003).

## 2.2 Das Virus der infektiösen Laryngotracheitis (ILTV)

Das Virus der Infektiösen Laryngotracheitis der Hühner wird auch als *Gallides Herpesvirus 1* (GaHV-1) bezeichnet und gehört innerhalb der Familie *Herpesviridae* zur Subfamilie der *Alphaherpesvirinae*. Es stellt den bislang einzigen klassifizierten Vertreter des Genus *Iltovirus* dar (Davison et al., 2005a). ILT-Viruspartikel zeigen den für Herpesviren typischen Aufbau (Cruickshank et al., 1963; Watrach et al., 1963), weisen jedoch eine stark ausgeprägte Tegumentschicht auf, wodurch sie Durchmesser von bis zu 350 nm erreichen (Granzow et al., 2001). In Zellkulturen werden außerdem ungewöhnlich viele so genannte L-Partikel gebildet, welche zwar eine Virushülle und Tegument, aber kein Nukleokapsid enthalten (Guo et al., 1993; Granzow et al., 2001).

Entsprechend dem engen *in vivo*-Wirtsspektrum von ILTV (siehe unten) sind auch für dessen *in vitro*-Vermehrung nur Hühnerzellen geeignet (Bagust und Guy, 1997). In embryonierten Hühnereiern (Burnet, 1934; Brandy, 1935) bildet das Virus opake Plaques auf der Chorioallantoismembran. Für die Virusvermehrung geeignet sind außerdem die aus einem chemisch induzierten Leberzelltumor erhaltene permanente Zelllinie LMH (Kawaguchi et al., 1987; Scholz et al., 1993; Schnitzlein et al., 1994) sowie primäre Nieren- und Leberzellen von Küken oder Hühnerembryonen (Chang et al., 1960; Mayer et al., 1967; Hughes und Jones, 1988). In mit hohen Virustitern infizierten Zellkulturen erkennt man bereits nach 4 - 6 Stunden zytopathogene Effekte in Form von Synzytien mit großen zytoplasmatischen Vesikeln. Ungefähr 12 Stunden nach Infektion können in infizierten Zellen intranukleäre Einschlusskörperchen nachgewiesen werden, die nach 30 - 36 Stunden ihre höchste Konzentration erreichen (Reynolds et al., 1968). In Ein-Schritt-Vermehrungskinetiken werden die maximalen Virustiter zwischen 24 und 30 Stunden nach synchroner Infektion aller Zellen erreicht (Reynolds et al., 1968; Prideaux et al., 1992; Fuchs et al., 2000).

Das Genom von ILTV besteht aus einer ca. 150 kbp großen linearen doppelsträngigen DNA, die einen G/C-Gehalt von ca. 45 % aufweist (Lee et al., 1972; Johnson et al., 1991). ILTV besitzt ein herpesvirales Typ-D-Genom (Abb. 1), welches sich in eine U<sub>L</sub>-Region sowie eine U<sub>S</sub>-Region gliedert, die von zwei inversen repetitiven Sequenzen (IR<sub>S</sub>, TR<sub>S</sub>) flankiert wird (Leib et al., 1987; Johnson et al., 1991). Innerhalb der letzten 15 Jahre wurden für verschiedene ILTV-Stämme die DNA-Sequenzen zahlreicher Genomfragmente bestimmt (Griffin, 1990; Griffin und Boursnell, 1990; Griffin, 1991; Kingsley et al., 1994; Johnson et al., 1995a; Johnson et al., 1995b; Fuchs und Mettenleiter, 1996; Wild et al., 1996; Johnson et al., 1997; Ziemann et al., 1998a; Ziemann et al., 1998b; Fuchs und Mettenleiter, 1999; Johnson, 1999; Fuchs et al., 2000; Thureen et al., 2005). Vor kurzem wurden diese



Einzelsequenzen trotz einiger Unterschiede in den Überlappungsbereichen zu einer vorläufigen Gesamtsequenz des ILTV-Genoms zusammengefügt (Thureen et al., 2005). Da die meisten der hierbei gefundenen offenen Leserahmen Sequenzhomologien und eine ähnliche Anordnung wie in anderen Alphaherpesvirus-Genomen zeigten, wurden die für HSV-1 eingeführten Genbezeichnungen (McGeoch et al., 1988) weitgehend übernommen.

Das ILTV-Genom weist jedoch im Vergleich zu anderen Alphaherpesviren einige Besonderheiten auf. Die  $U_L$ -Region von ILTV liegt wie bei VZV, BHV-1, EHV-1 und PrV (Davison und Scott, 1986; Telford et al., 1992; Schwyzer und Ackermann, 1996; Klupp et al., 2004) in umgekehrter Orientierung zum prototypischen Genomisomer von HSV-1 vor (Abb. 1). Im Gegensatz zu den meisten anderen Alphaherpesviren enthält das Genom von ILTV eine interne Inversion im Bereich der  $U_L$ -Region (Abb. 1), welche ca. 48 kpb groß ist und die Leserahmen für die Gene UL22 bis UL44 umfasst (Ziemann et al., 1998a). Interessanterweise weist das Genom von PrV eine ähnliche Inversion der UL27 bis UL44-Genregion auf (Ben-Porat et al., 1983; Dezelee et al., 1996; Bras et al., 1999), was auf eine engere phylogenetische Verwandtschaft der beiden Viruspezies hindeuten könnte. Weitere Besonderheiten des ILTV-Genoms sind die Translokation des UL47-Gens aus der  $U_L$ - in die  $U_S$ -Region (Wild et al., 1996; Ziemann et al., 1998a; Abb. 1) und das Fehlen eines UL16-homologen Leserasters (Fuchs und Mettenleiter, 1999).

Darüber hinaus enthält das ILTV-Genom einige spezifische Leseraster, welche bei allen anderen untersuchten Herpesviren fehlen. An einem Ende der Inversion in der  $U_L$ -Region wurden fünf zusätzliche, möglicherweise im Zusammenhang mit der Genomumlagerung erworbene offene Leserahmen (ORF A bis ORF E) identifiziert (Abb. 1), welche von dem konservierten UL45-Gen durch einen Startpunkt der viralen DNA-Replikation ( $Ori_L$ ) getrennt sind (Ziemann et al., 1998a). Die Proteinprodukte von ORF A bis E konnten in infizierten Zellen nachgewiesen werden, und mit Hilfe von Deletionsmutanten wurde außerdem gezeigt, dass keines der fünf Gene für die Replikation in Zellkulturen essentiell ist (Veits et al., 2003b). Nahe dem linken Genomende wurden in der  $U_L$ -Region sechs weitere ILTV-spezifische offene Leserahmen lokalisiert, deren Expression und Funktion bisher jedoch nicht näher untersucht wurde (Johnson et al., 1997). Am rechten Ende der  $U_L$ -Region befinden sich die ILTV-spezifischen Gene UL0 und UL[-1] (Abb. 1), deren Produkte in infizierten Zellen als nukleäre Proteine nachgewiesen werden konnten. Signifikante Homologien zwischen den abgeleiteten Aminosäuresequenzen deuten darauf hin, dass die beiden Gene durch Duplikation eines einzelnen Genes entstanden sind (Ziemann et al., 1998b). Allerdings scheint nur UL[-1] für die Virusvermehrung in Zellkulturen relevant zu sein, da UL0-negative ILTV-Mutanten erfolgreich isoliert werden konnten und nur geringfügige Replikationsdefekte *in vitro* zeigten (Veits et al., 2003c).

Einige Leseraster im Genom von ILTV sind nur bei wenigen anderen Alphaherpesviren konserviert. Das in den IR- bzw. TR-Sequenzen lokalisierte ORF „SR1“ ist möglicherweise spezifisch für aviäre Herpesviren, da homologe Gene auch bei MDV und HVT gefunden wurden (Sakaguchi et al., 1992; Zelnik et al., 1993; Wild et al., 1996). Das als ORF5 bezeichnete Gen der U<sub>S</sub>-Region von ILTV kodiert wie die positionshomologen Gene US5 von HSV-1 und Gen 71 von EHV-1 ein Glykoprotein (gJ), das den meisten anderen Alphaherpesviren fehlt (Sun et al. 1994; Wild et al., 1996; Ghiasi et al., 1998; Veits et al. 2003a; Fuchs et al., 2005). Aminosäuresequenzhomologien sind lediglich zwischen den Proteinen von ILTV und EHV-1, nicht jedoch zum entsprechenden Genprodukt von HSV-1 erkennbar.

Interessanterweise wurden die meisten der beschriebenen Besonderheiten des ILTV-Genoms vor kurzem auch im Genom eines Papageienherpesvirus (PsHV-1; Thureen et al., 2004) gefunden, weshalb dieses Virus vermutlich als zweiter Vertreter des Genus Iltovirus gelten darf.

Neben den Iltovirus-spezifischen Genen wurden bisher vor allem die konservierten Glykoproteingene des ILTV näher untersucht. Nicht nur zum gJ-Gen US5, sondern auch zu allen alphaherpesviralen Glykoproteingenen wurden im ILTV-Genom positionshomologe Leseraster gefunden. Einige der entsprechenden Genprodukte wurden bereits in infizierten Zellen oder Virionen identifiziert und charakterisiert. Gegen die Glykoproteine gC und gJ von ILTV stehen monoklonale Antikörper zur Verfügung (Veits et al., 2003a), während die gB-, gG-, gN- und gM-homologen Proteine mittels monospezifischer Antiseren nachgewiesen wurden (Kongsuwan et al., 1993; Poulsen und Keeler, 1997; Fuchs und Mettenleiter, 1999, 2005). Wie bei anderen Herpesviren wird gB durch zelluläre Proteasen gespalten und bildet einen über Disulfidbrücken verbundenen Proteinkomplex (Poulsen und Keeler, 1997). Im Gegensatz zu den homologen Proteinen anderer Alphaherpesviren besitzen die Glykoproteine gB und gC von ILTV jedoch keine Heparin-Bindungsdomänen, und die primäre Adsorption an die Zielzelle erfolgt deshalb offensichtlich ohne Bindung an Heparansulfatproteoglykane der Zelloberfläche (Kingsley und Keeler, 1999). Anders als das Glykoprotein gM anderer Herpesviren ist das homologe UL10-Genprodukt von ILTV nicht glykosyliert, bildet aber einen Proteinkomplex mit dem UL49.5-Genprodukt, das ebenso wie bei PrV O-glykosyliert ist und als gN bezeichnet wird (Fuchs und Mettenleiter, 2005). Das gG-homologe Protein von ILTV wird vermutlich wie die entsprechenden Genprodukte anderer Herpesviren von infizierten Zellen sezerniert (Kongsuwan et al., 1993). Eine Besonderheit stellen hingegen die unterschiedlichen Formen des Glykoproteins gJ von ILTV dar, die durch alternatives mRNA-splicing entstehen (Fuchs et al., 2005). Durch die Herstellung entsprechender Virusmutanten konnte gezeigt werden, das gJ, gN und das UL10-Protein für die Vermehrung des ILTV in Zellkulturen entbehrlich sind (Fuchs und Mettenleiter, 1999, 2005; Fuchs et al., 2005).

## 2.3 Infektiöse Laryngotracheitis (ILT)

Bei der infektiösen Laryngotracheitis handelt es sich um eine weltweit bei Hühnern auftretende akute Erkrankung des oberen Respirationstraktes, welche erstmals 1925 in den USA beschrieben und als deren Erreger wenig später ein Virus erkannt wurde (May und Tittler, 1925; Beach, 1930; Beaudette, 1930; Graham et al., 1930; Beach 1931). In Deutschland wurde die ILT erstmals 1932 diagnostiziert (Lerche, 1932). Nach anfänglich schweren Ausbrüchen mit hohen Morbiditäts- und Mortalitätsraten wurden bis in die sechziger Jahre immer häufiger mildere Verlaufsformen beobachtet (Woernle und Brunner, 1961; Mayr et al., 1964). Seit den achtziger Jahren traten jedoch wieder vermehrt schwere Krankheitsformen mit hohen Mortalitätsraten auf (Kaleta et al., 1981). Während der letzten fünf Jahre (Januar 2000 bis Juni 2005) wurden in Deutschland insgesamt 90 Fälle von ILT gemeldet (TSN-Datenbank; persönliche Mitteilung von Dr. K. Kroschewski, FLI Wusterhausen). Tatsächlich dürften ILTV-Infektionen aber weitaus häufiger vorkommen, da diese vor allem in geimpften Geflügelbeständen häufig unauffällig verlaufen und Untersuchungen auf ILTV lediglich in klinischen Verdachtsfällen oder zur differentialdiagnostischen Abklärung erfolgen. Außerdem ist zu beachten, dass in Bezug auf Impfungen die Bekämpfung der ILT in Deutschland nicht einheitlich erfolgt.

Natürliche Wirte für ILTV sind Hühner und Fasane (Bagust und Guy, 1997). Außerdem wurden eine Erregerisolierung beim Pfau (Crawshaw und Boycott, 1982) sowie experimentelle Infektionen von Puten (Winterfield und So, 1968) beschrieben. Empfänglich für die Infektion sind Hühner aller Altersstufen, jedoch sind Jungtiere im Alter von 3 Wochen bis 2 Jahren am stärksten betroffen. Die Virusübertragung erfolgt ausschließlich horizontal über Ausscheidung mit Sekreten und Kot. Die Infektion findet über die Konjunktiven oder orale Aufnahme statt (Schmidt, 1992). Das Virus vermehrt sich nur in den Epithelien des Respirationstraktes und der Konjunktiven. Eine Virämie ist in der Regel nicht zu beobachten (Chang et al., 1973; Robertson und Egerton, 1981).

Klinische Symptome treten bei natürlichen Infektionen von Hühnern im Allgemeinen nach 6 - 12 Tagen Inkubationszeit auf, experimentelle intratracheale Infektionen führen zu einer verkürzten Inkubationszeit von 2 - 4 Tagen. Die Ausprägung der klinischen Symptomatik ist vor allem von der Virulenz des Erregers abhängig. Bei milden Verlaufsformen sind Rhinitis, Sinusitis, Konjunktivitis oder eine reduzierte Legeleistung zu beobachten. Typisch für schwere Krankheitsverläufe dagegen sind hochgradige inspiratorische Dyspnoe und Auswurf von blutigem Schleim. Nach einigen Tagen kann es zum Tod der Tiere durch Erschöpfung oder Ersticken mit Mortalitätsraten von bis zu 70% kommen. Bei schweren Ausbrüchen werden oftmals auch Tiere tot aufgefunden, welche vorher keinerlei Krankheitsanzeichen gezeigt

hatten. Der Krankheitsverlauf beträgt gewöhnlich 7 - 14 Tage, in seltenen Fällen auch bis zu 4 Wochen (Bagust und Guy, 1997). Auch bei Fasanen ist der Krankheitsverlauf variabel. Einige Spezies entwickeln nach Infektion eine Laryngotracheitis, während Ring- oder Jagdfasanen an einer schweren Konjunktivitis und Sinusitis erkranken (Kaleta und Redmann, 1997).

Die produktive Virusvermehrung findet innerhalb der ersten sieben Tage nach Infektion statt. Während dieser Zeit konnte auch eine extratracheale Ausbreitung des Virus in die sensorischen Neuronen der Trigemininalganglien beobachtet werden (Bagust, 1986), wo eine reaktivierbare, latente Infektion etabliert wird (Bagust, 1986; Kaleta et al., 1986; Williams et al., 1992). Eine Reaktivierung kann durch verschiedene Stressfaktoren verursacht werden, wobei in der Regel keine klinischen Symptome auftreten. Die Tiere scheiden jedoch intermittierend Virus aus (Hughes et al., 1987; Hughes et al., 1989; Bagust und Johnson, 1995).

Die pathologischen Veränderungen beschränken sich fast ausschließlich auf den oberen Respirationstrakt. Bei leichten Krankheitsformen werden katarrhalische Entzündungen mit Ödemen und Hyperämie sowie eine vermehrte Schleimproduktion gefunden. Perakute Verlaufsformen führen dagegen zu fibrinös-hämorrhagischen Entzündungen, wobei infolge der Epitheldegeneration Blutungen und Nekrosen der tieferen Schleimhautschichten entstehen, und es bilden sich diphtheroide Membranen. Blutkoagula, Schleim und nekrotisches Gewebe können sich im Tracheallumen ansammeln und schließlich zu vollständigen Obstruktionen führen (Jordan, 1990).

Die Diagnose der ILT ist anhand des klinischen und pathologischen Bildes oft nicht eindeutig möglich, da andere Erkrankungen des Respirationstraktes ähnliche Symptome hervorrufen können. Daher werden spezifische Nachweismethoden zur Absicherung herangezogen, wie der histologische Nachweis intranukleärer Einschlusskörperchen (Seifried, 1938; Sevoian, 1960), die Elektronenmikroskopie (Van Kammen und Spradbrow, 1976) sowie die Virusanzucht auf der Chorioallantoismembran bebrüteter Hühnereier (Jordan, 1964) oder in Zellkulturen (Hughes und Jones, 1988). Virale DNA kann durch Hybridisierung (Key et al., 1994) oder PCR (Scholz et al., 1994) nachgewiesen werden. Die Differenzierung einzelner Virusisolate erfolgt durch Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen (Andreasen et al., 1990; Günther et al., 1997). Weitere Methoden zur Absicherung der Diagnose sind Agargel-Präzipitationstest (Jordan und Chubb, 1962), Neutralisationstest (Hitchner et al., 1958), Immunfluoreszenztest (Hitchner et al., 1977), Immunperoxidase-Test (Guy et al., 1992; Abbas und Andreasen, 1996) und ELISA (Meulemans und Halen, 1982; York und Fahey, 1988; Bauer et al., 1999), mit deren Hilfe virales Antigen oder ILT-spezifische Antikörper nachgewiesen werden können.

Zur Bekämpfung der ILT werden seit Beginn der dreißiger Jahre attenuierte Lebendimpfstoffe eingesetzt (Hudson und Beaudette, 1932; Clarke et al., 1980), da mit inaktivierten Impfstoffen kein ausreichender Schutz gegen die Erkrankung erzielt werden kann. Diese Impfstoffe besitzen jedoch häufig eine gewisse Restvirulenz (Hilbink et al., 1987; Guy et al., 1990), weshalb empfohlen wird, sie nur in endemischen Gebieten einzusetzen. Außerdem konnte experimentell nachgewiesen werden, dass sich die Virulenz von Impfstämmen nach *in vivo*-Passagen steigert (Guy et al., 1991; Kotiw et al., 1995). Durch die Vakzination kann es auch zur Etablierung latenter Infektionen und somit zur Erzeugung von Carrier-Tieren kommen, welche sporadisch Virus ausscheiden (Bagust, 1986; Hughes et al., 1991). Auf diese Weise ist das Virus in der Lage, bei gemeinsamer Haltung auf andere, nicht geimpfte Tiere überzugehen, weshalb einige Ausbrüche von ILT auf vorangegangene Vakzinierungen zurückgeführt werden (Guy et al., 1989; Andreasen et al., 1990; Guy et al., 1990). Die vorhandenen Impfstoffe sind ausschließlich für die Vakzination von Hühnern zugelassen. Eine Impfung von Fasanen und Pfauen, welche ebenfalls für ILTV-Infektionen empfänglich sind, kann zu schweren Erkrankungen bis hin zum Tod der Tiere führen. Die Ausprägung der Symptome ist hierbei wie auch bei der natürlichen Infektion speziesabhängig (Kaleta und Redmann, 1997).

Um sicherere ILT-Vakzinen zu erhalten, werden seit einiger Zeit rekombinante Viren hergestellt und in Tierversuchen erprobt. Hierbei handelt es sich unter anderem um avirulente Geflügelpockenviren, welche immunogene Proteine des ILTV exprimieren (Tong et al., 2001). Alternativ dazu wird versucht, durch gezielte Deletionen Virulenz-determinierender Gene stabil attenuierte ILT-Viren herzustellen. Während durch Deletion des viralen dUTPase-Gens die Pathogenität nur geringfügig reduziert werden konnte (Fuchs et al., 2000), erwiesen sich Thymidin-Kinase-, UL0- und gJ-negative ILT-Viren als weitgehend avirulent (Okamura et al., 1994; Schnitzlein et al., 1995; Veits et al., 2003c; Fuchs et al., 2005). Da alle hergestellten ILTV-Rekombinanten eine schützende Immunität gegen Belastungsinfektionen vermitteln, könnten sie als Lebendimpfstoffe geeignet sein. Darüber hinaus lassen sich rekombinante ILT-Viren auch als Vektoren für immunogene Proteine anderer Geflügelpathogene verwenden. Erste Versuche dieser Art zeigten, dass Hühner durch Immunisierung mit ILTV-Rekombinanten, welche das Influenzavirus-Hämagglutinin der Subtypen H5 oder H7 exprimieren, gegen letale Infektionen mit Geflügelpestviren der entsprechenden Typen geschützt werden können (Lüschow et al., 2001; Veits et al., 2003c).

## **3 MATERIAL UND METHODEN**

### **3.1 Material**

#### **3.1.1 Virusstämme**

- Virulenter Stamm ILTV A-489 (erhalten von D. Lütticken, Boxmeer, NL)

#### **3.1.2 Zellen**

- Primäre Nieren- (CEK) und Leberzellen (CEL) von Hühnerembryonen (aus bebrüteten SPF-Hühnereiern der Firma Lohmann Tierzucht, Cuxhaven)
- Permanente Hühnerhepatomzelllinie LMH (ATCC-Nummer: CRL-2117; Kawaguchi et al., 1987; erhalten von D.N. Tripathy, Urbana, Illinois, USA)

#### **3.1.3 Versuchstiere**

- White Leghorn Hühner (aus VALO SPF-Eiern der Firma Lohmann Tierzucht, Cuxhaven)
- Kaninchen (Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln)

#### **3.1.4 Bakterienstämme**

- *E. coli* XL1Blue MRF<sup>+</sup> (Stratagene)
- *E. coli* BL21pLysS (Novagen)

#### **3.1.5 Plasmide**

- pGex-4T-1 (Amersham)
- pET-23a (Novagen)
- pcDNA-3 (Invitrogen)
- pIRES1neo (Clontech)
- Klonierte DNA-Fragmente des ILTV-Stammes A489 (erhalten von W. Fuchs, J. Veits und K. Ziemann, FLI, Insel Riems)

### 3.1.6 Antikörper und Antiseren

- $\alpha$ -ILTV-Hühnerserum (erhalten von D. Lütticken, Boxmeer, NL)
- MAK gegen die ILTV-Glykoproteine gC und gJ (erhalten von J. Veits, FLI, Insel Riems)
- $\alpha$ -GST-Ziegenserum (Amersham)
- Ziegen- $\alpha$ -Kaninchen IgG, Peroxidase-konjugiert (Dianova)
- Maus- $\alpha$ -Ziege IgG, Peroxidase-konjugiert (Dianova)
- Kaninchen- $\alpha$ -Huhn IgY, FITC-konjugiert (Dianova)
- Alexa Fluor® 488 Ziege- $\alpha$ -Maus IgG (H+L) (Invitrogen)
- Alexa Fluor® 488 Ziege- $\alpha$ -Kaninchen IgG (H+L) (Invitrogen)

### 3.1.7 Medien und Lösungen für die Zellkultur

Zellkulturmedien und Versen-Trypsin-Lösung wurden von der Zellbank des FLI, Insel Riems, hergestellt.

#### Hanks Waschlösung

137 mM NaCl

22 mM Glucose

5,4 mM KCl

1,3 mM CaCl<sub>2</sub>

0,5 mM MgCl<sub>2</sub>

0,4 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

sterilfiltrieren; Lagerung bei 4 °C

#### ZB 5 Medium

5,32 g/l MEM Hanks (Sigma)

4,76 g/l MEM Earle (Invitrogen)

1,52 g/l NaHCO<sub>3</sub>

0,12 g/l NaPyruvat

10 ml/l Nichtessentielle Aminosäuren

0 - 10 % FKS (Invitrogen)

sterilfiltrieren; Lagerung bei 4 °C

ZB 21 Medium (für primäre Hühnerleberzellen)

10,63 g/l MEM Hanks (Sigma)

0,85 g/l NaHCO<sub>3</sub>

10 % FKS

sterilfiltrieren; Lagerung bei 4 °C

ZB 22 Medium (für primäre Hühnernierenzellen)

9,53 g/l MEM Earle (Invitrogen)

2,2 g/l NaHCO<sub>3</sub>

2 - 10 % FKS

sterilfiltrieren; Lagerung bei 4 °C

Methocelmedium

20 g/l Methylcellulose

9,4 g/l autoklavierbares MEM (Invitrogen)

autoklavieren

2,2 g/l NaHCO<sub>3</sub>

in 15 ml H<sub>2</sub>O lösen, sterilfiltriert zugeben

1 % Glutamax II (Invitrogen)

sterilfiltriert zugeben

Lagerung bei 4 °C

Gebrauchsverdünnung: 1:4 in ZB 5 mit 5% FKS

Versen-Trypsin-Lösung

4,0 g/l NaCl

1,25 g/l Trypsin

0,57 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0,25 g/l EDTA

0,1 g/l KCl

0,1 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

sterilfiltrieren, Lagerung bei -20 °C

### 3.1.8 Medien und Lösungen für die Bakterienkultur

Antibiotika

Ampicillin 10 mg/ml in H<sub>2</sub>O; Gebrauchskonzentration: 100 µg/ml

sterilfiltrieren, Lagerung bei -20 °C



Chloramphenicol 34 mg/ml in Ethanol; Gebrauchskonzentration: 34 µg/ml  
Lagerung bei -20 °C

### IPTG

100 mM IPTG in H<sub>2</sub>O  
sterilfiltrieren, Lagerung bei -20 °C

### 0,5 M K-MES (pH 6,3)

9,76 g MES in H<sub>2</sub>O lösen  
pH 6,3 mit konz. KCl einstellen  
Volumen auf 100 ml erhöhen  
sterilfiltrieren, Lagerung bei -20 °C

### Luria-Bertani-(LB)-Medium

10 g/l Casein-Hydrolysat  
10 g/l NaCl  
5 g/l Hefeextrakt  
20 g/l Agar (nur für Agarplatten)  
autoklavieren, Antibiotikazugabe nach Abkühlung auf ca. 50 °C  
Lagerung bei Raumtemperatur

### SOB-Medium

20 g/l Casein-Hydrolysat  
5 g/l Hefeextrakt  
10 mM NaCl  
2,5 mM KCl  
autoklavieren  
+ 10 mM MgCl<sub>2</sub> (separat autoklaviert)  
+ 10 mM MgSO<sub>4</sub> (separat autoklaviert)  
Lagerung bei Raumtemperatur

### SOC-Medium

SOB-Medium  
+ 20 mM Glucose (sterilfiltriert)  
Lagerung bei Raumtemperatur

TFB

100 mM KCl  
45 mM MnCl<sub>2</sub>  
10 mM CaCl<sub>2</sub>  
3 mM Hexamin-CoCl<sub>3</sub>  
10 mM K-MES (pH 6.3)  
sterilfiltrieren, Lagerung bei 4 °C

2 x YT-Medium

16 g/l Casein-Hydrolysat  
10 g/l Hefeextrakt  
5 g/l NaCl  
autoklavieren, Lagerung bei Raumtemperatur

**3.1.9 Sonstige Puffer und Lösungen**30 % Acrylamidlösung

290 g/l Acrylamid  
10 g/l N,N'-Methylen-bisacrylamid  
filtrieren (0,45 µm), Lagerung bei 4 °C

40 % Acrylamidlösung

380 g/l Acrylamid  
20 g/l N,N'-Methylen-bisacrylamid  
mit 50 g/l Serdolit MB-1  
30 min. rühren, filtrieren (0,45 µm), Lagerung bei 4 °C

0,8 % Agarose-Formaldehydgel

8 g/l Agarose  
in DEPC-H<sub>2</sub>O aufkochen, auf 60°C abkühlen lassen  
+ 3 % Formaldehydlösung (37 %)  
+ 10 % 10x MAE

BCA-Lösung

238 mM NaOH

161 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

25,8 mM Bicinchoninsäure

5,67 mM Kaliumnatriumtartrat

pH 11,25

Unmittelbar vor Gebrauch 2 % 160 mM CuSO<sub>4</sub> zugeben.

Lagerung bei Raumtemperatur

CBS

135 mM NaCl

40 mM Citronensäure

10 mM KCl

pH 3,0; sterilfiltrieren, Lagerung bei 4 °C

Coomassie-Färbelösung I

50 % Methanol

10 % Essigsäure

0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue

filtrieren (0,45 µm), Lagerung bei Raumtemperatur

Coomassie-Färbelösung II

20 % Methanol

0,5 % Essigsäure

0,2 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue

filtrieren (0,45 µm), Lagerung bei Raumtemperatur

Deionisiertes Formamid

1 l Formamid mit 40 g Serdolit MB-1 2 h rühren, filtrieren (0,45 µm)

Lagerung bei -20 °C

Denaturierte Heringssperma-DNA

10 mg/ml Heringssperma-DNA in H<sub>2</sub>O lösen, 15 min. kochen

Lagerung bei 4 °C

DEPC-H<sub>2</sub>O

0,1 % DEPC in H<sub>2</sub>O über Nacht rühren, autoklavieren

Lagerung bei Raumtemperatur

DNA-Hybridisierungslösung

4x SSPE

1 % (w/v) SDS

0,5 % (w/v) Magermilch

0,5 mg/ml denaturierte Heringssperma-DNA

vor Gebrauch 5 min kochen

DNA-Probenpuffer (10x)

30 % Glycerin

0,25 % (w/v) Bromphenolblau

0,25 % (w/v) Xylencyanol

Lagerung bei Raumtemperatur

Elutionspuffer

200 mM Glycin

25 mM Tris

10 % Methanol

0,1 % (w/v) SDS

entgasen

Fixierer für SDS-Polyacrylamidgele

40 % Methanol

10 % Essigsäure

Formamid-Dye

97,5 % deionisiertes Formamid

0,3 % (w/v) Bromphenolblau

0,3 % (w/v) Xylencyanol

10 mM EDTA (pH 7,5)

Lagerung bei -20 °C

Guanidin-Thiocyanatlösung

4 M Guanidin-Thiocyanat

0,1 M 2-Mercaptoethanol

0,025 M Natriumcitrat

0,5 % (w/v) Sarkosyl

Lagerung bei Raumtemperatur

HBS (2x)

280 mM NaCl

50 mM HEPES

1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

pH 7,13

sterilfiltrieren (0,2 µm), Lagerung bei -20 °C

IAC

96 % Chloroform

4 % Isoamylalkohol

Lagerung bei 4 °C

100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,2

71,7 ml 1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

28,3 ml 1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

900 ml H<sub>2</sub>O

Lagerung bei Raumtemperatur

Lösung I für Plasmidpräparation

50 mM Glucose

25 mM Tris-HCl (pH 8,0)

10 mM EDTA

Lagerung bei 4 °C

Lösung II für Plasmidpräparation

200 mM NaOH

1 % (w/v) SDS

Lagerung bei Raumtemperatur

Lösung III für Plasmidpräparation

3M Kaliumacetat

2M Essigsäure

Lagerung bei 4 °C

MAE (10x)

200 mM MOPS

50 mM Natriumacetat

10 mM EDTA

in DEPC-H<sub>2</sub>O, autoklavieren, Lagerung bei Raumtemperatur

PBS

140 mM NaCl

6,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

2,7 mM KCl

1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

pH 8,4

autoklavieren, Lagerung bei Raumtemperatur

4,8 % Polyacrylamid-Harnstoffgel (Sequenzgel 610 x 170 x 0,2mm)

24 g Harnstoff

21 ml H<sub>2</sub>O

6 ml 40 % Acrylamidlösung

5 ml 10x TBE

filtrieren (0,45 µm), entgasen, unmittelbar vor dem Gießen Zugabe von

400 µl 10 % APS

40 µl TEMED

Pronase (10 mg/ml)

100 mg in 10 ml 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) / 10 mM NaCl lösen

1 h bei 37°C inkubieren

Lagerung bei -20 °C

RITA (1x)

150 mM NaCl

10 mM Tris-HCl (pH 7,5)

2 mM Methionin

1 % Igepal CA-630

1 g/l Ovalbumin

0,2 g/l NaN<sub>3</sub>

1 g/l SDS

1 mM PMSF (aus 100 mM Lösung in Ethanol)

SDS und PMSF zuletzt zugeben

Lagerung bei 4 °C

RNA-Hybridisierungslösung

2x SSPE

60 % deionisiertes Formamid

7,5 % (w/v) Dextransulfat

1 % (w/v) SDS

0,5 % (w/v) Magermilch

0,1 % DEPC

vor Gebrauch 5 min kochen

RNA-Probenpuffer

1000 µl deionisiertes Formamid

354 µl Formaldehydlösung (37 %)

200 µl 10x MAE

100 µl Formamid-Dye

5 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml)

Lagerung bei -20 °C

RNaseA (10 mg/ml)

100 mg in 9 ml 10 mM Natriumacetat (pH 5,2) lösen

15 min kochen

+ 1 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,4)

Lagerung bei -20 °C

RNA-Vorhybridisierungslösung

2x SSPE

60 % deionisiertes Formamid

1 % (w/v) SDS

0,5 % (w/v) Magermilch

0,1 % DEPC

0,5 mg/ml denaturierte Heringssperma-DNA

vor Gebrauch 5 min kochen

Sarkosylpuffer

75 mM Tris-HCl (pH 8,0)

25 mM EDTA

10 % (w/v) Sarkosyl

Lagerung bei Raumtemperatur

SDS-Elektrophoresepuffer

200 mM Glycin

25 mM Tris

0,1 % (w/v) SDS

Lagerung bei Raumtemperatur

SDS-Polyacrylamidgelea) Trenngel (x %)

x/3 ml 30 % Acrylamidlösung

7,4 -x/3 ml H<sub>2</sub>O

2,5 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)

0,1 ml 10 % SDS

unmittelbar vor dem Gießen Zugabe von

50 µl 10 % APS

10 µl TEMED

b) Sammelgel (4%)

0,65 ml 30 % Acrylamidlösung

3,05 ml H<sub>2</sub>O

1,25 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)

0,05 ml 10% SDS

unmittelbar vor dem Gießen Zugabe von

25 µl 10 % APS

5 µl TEMED

Für Minigele (72 x 82 x 0,75 mm) wurden je 5 ml Trenngel und 2 ml Sammelgel, für große Gele (162 x 200 x 1 mm) je 30 ml Trenngel und 10 ml Sammelgel verwendet.

SDS-Probenpuffer

125 mM Tris-HCl (pH 6,8)

20 % Glycerol

4 % (w/v) SDS

0,01 % (w/v) Bromphenolblau

10 % 2-Mercaptoethanol (für reduzierende Puffer)

Lagerung bei Raumtemperatur



Sephadex G50-Suspension

in 10 mM TE (pH7,4) quellen lassen

Lagerung mit 0,02 % (w/v) NaN<sub>3</sub> bei 4 °C

SSC (20x)

3 M NaCl

0,3 M Natriumcitrat

Lagerung bei Raumtemperatur

SSPE (20x)

3,6 M NaCl

0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0,02 M EDTA

Lagerung bei Raumtemperatur

TAE (50x)

2 M Tris

0,25 M Natriumacetat

0,05 M EDTA

mit Essigsäure pH 7,8 einstellen

Lagerung bei Raumtemperatur

TBE (10x)

890 mM Tris

890 mM Borsäure

25 mM EDTA

Lagerung bei Raumtemperatur

TBS-T

150 mM NaCl

10 mM Tris-HCl (pH 8,0)

0,25 % Tween 20

Lagerung bei Raumtemperatur

TE

10 mM Tris-HCl (pH 7,4 - 8,0)

1 mM EDTA

Lagerung bei 4 °C

TEN

150 mM NaCl

20 mM Tris-HCl (pH 7,4)

1 mM EDTA

Lagerung bei Raumtemperatur

Transferpuffer

200 mM Glycin

25 mM Tris

20 % Methanol

0,01 % (w/v) SDS

Lagerung bei Raumtemperatur

**3.1.10 Reagentien**3.1.10.1 Nukleinsäuren und Nukleotide

DNA aus Heringssperma

DNA-Marker (1 kbp Leiter)

RNA-Marker (0,24 - 9,5 kb)

Oligonukleotid-Primer

dATP, dCTP, dGTP, dTTP, ATP

[ $\alpha^{32}\text{P}$ ]dCTP (10 mCi/ml, 3000 Ci/mmol)[ $\alpha^{32}\text{P}$ ]UTP (10 mCi/ml, 3000 Ci/mmol)[ $\gamma^{32}\text{P}$ ]ATP (10 mCi/ml, 4500 Ci/mmol)

Serva

Invitrogen

Invitrogen

Invitrogen, MWG,

Amersham

Roche

MP Biomedicals

MP Biomedicals

MP Biomedicals

3.1.10.2 Aminosäuren und ProteinePansorbin (inaktivierte *Staph. aureus*-Suspension)

Vorgefärbte Proteinmarker (ca. 10 – 200 kDa)

[ $^{14}\text{C}$ ]-methylierte Proteine (14 - 220 kDa)

Bovines Serumalbumin (BSA)

Ovalbumin

[ $^{35}\text{S}$ ]-Methionin (~10 mCi/ml, ~1000 Ci/mmol)Tran[ $^{35}\text{S}$ ]Label (~10 mCi/ml, ~1300 Ci/mmol)

Calbiochem

Invitrogen

Amersham

Promega

Sigma

MP Biochemicals

MP Biochemicals

3.1.10.3 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Roche
DNA-Polymerasen (Taq, Platinum <i>Pfx</i> )	Promega / Invitrogen
DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment)	NEB
Dnase I (RNase-frei)	Roche
Pronase	Roche
Restriktionsendonukleasen	Roche, Invitrogen, NEB, Promega
RNase A	Sigma
Rnasin	Promega
T4 DNA-Ligase	Roche
T4 Polynukleotidkinase	NEB
RNA-Polymerasen (T7, SP6)	Promega, Roche, Stratagene

3.1.10.4 Kits

SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce
Qiagen Plasmid Purification Kit	Qiagen
Rediprime DNA Labelling Kit	Amersham
RNA Transcription Kit	Stratagene
Thermo Sequenase cycle sequencing kit	Amersham
Thermo Sequenase labelled primer cycle sequencing kit	Amersham
TNT Coupled Reticulocyte Lysate System	Promega

3.1.10.5 Chemikalien

Agar	ICN
Agarose	Invitrogen
Amplify	Amersham
Bromphenolblau	Ferak Berlin
Casein-Hydrolysat	Invitrogen
Coomassie Brilliant Blue	Ferak Berlin
Ethidiumbromid	Roche
Glutamax II	Invitrogen
Hefeextrakt	MP Biochemicals
Igepal CA-630	MP Biochemicals

Ketamin	Sanofi
Magermilchpulver	Lasana
Methylcellulose	Fluka
Roentogen Entwickler und Fixierer	Tetenal
Sephadex G50	Amersham
TEMED	BioRad
Tris	Invitrogen
Xylacin (Rompun®)	Bayer

Alle weiteren Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Roth, Serva und Sigma bezogen.

### 3.1.11 Geräte und Laborhilfsmittel

Brutschränke für Bakterien und Zellen	Bachofer, Heraeus
Mehrfach-Filtrationsgerät SRC 96 D Minifold I	Schleicher & Schuell
Elektroblotapparatur Trans-Blot Semi-Dry	BioRad
Elektroelutionskammer Centrilutor	Amicon
Feinwaage	Sartorius
Gel-Dokumentationssystem HeroDoc II	Herolab
Gelelektrophoresekammern, horizontal	BioRad
Gelelektrophoresekammern, vertikal	BioRad
Geltrockner	SLG, BioRad
Heizblock Thermostat 5320	Eppendorf
Hybridisierungsbrutschränke	Biometra, GFL
Kühlwasserbad 2219 Multitemp II	Amersham
Kühlzentrifuge Centrifuge 5402	Eppendorf
Laborwaage	Vibra
Magnetrührer	Framo, Ika
Mikroskope:	
Fluoreszenzmikroskope	Nikon, Olympus, Zeiss
Lichtmikroskop TM	Nikon
Elektronenmikroskope 400T, Tecnai	Philips
pH-Meter	WTW
Flourescent Image Analyzer	Fuji
Pipetten	Eppendorf, Gilson
Röntgenfilmkassetten	Agfa
Schüttelheizblock Thermomixer 5436	Eppendorf
Schüttelinkubator G25	New Brunswick Scientific

Schüttelwasserbad	Köttermann
Sequenzapparatur Model SA	InvitrogenL
Sequenziererautomaten (Li-cor DNA-Analyzer)	MWG
Sicherheitswerkbank Uniflow UVUB 1200	Uniequip
Spannungsgeräte	Biometra, BioRad, Amersham-Pharmacia
Spectrophotometer DU 640	Beckman
Thermocycler Primus 96 <sup>plus</sup>	MWG
Transilluminator	Fotodyne
Ultraschallgerät Sonifier B 15	Branson
Ultrazentrifugen und Rotoren SW28, TLA45	Beckman
UV Crosslinker Stratalinker 1800	Stratagene
Vakuumentrifuge Univapo 150 H	Uniequip
Verstärkerfolie Curix MR 800	Agfa
Wasserbad	GFL
Vortex Genie	Scientific Industries
Zentrifugen Biofuge 15, Megafuge 1.0 R	Heraeus
Zentrifuge J2-HS (Rotor: JA-20)	Beckman
Zentrifugen 5415 D, 5403	Eppendorf

### 3.1.12 Verbrauchsmaterialien

Glasfaserfilter	Schleicher & Schuell
Nitrocellulosefilter (0,2 µm, 0,45 µm)	Schleicher & Schuell
Nitrocellulosemembran Protran	Schleicher & Schuell
Nylonmembran Hybond-N+	Amersham
Plastikware (Pipettenspitzen, Zentrifugenröhrchen, Zellkulturschalen, Reaktionsgefäße)	Costar, Greiner, Sarstedt, Eppendorf, Beckman
Röntgenfilme Hyperfilm MP	Amersham
Serumseparator Microtainer	Becton Dickinson
Spritzen und Kanülen	Becton Dickinson, Terumo
Ultrafiltrationsgefäße (MW cut-off 10 kDa)	Schleicher & Schuell

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Zellkultur**

#### **3.2.1.1 Präparation von Primärzellen aus Hühnerembryonen**

Befruchtete SPF-Hühnereier wurden bei 37 °C und 50 % Luftfeuchtigkeit für 19 Tage inkubiert und dabei regelmäßig gewendet. Nach Eröffnen der Eischale wurden die Embryonen steril entnommen und dekapitiert.

Zur Gewinnung von primären Nieren- (chicken embryo kidney, CEK) und Leberzellen (chicken embryo liver, CEL) wurden diese Organe präpariert und zerkleinert. Die Nieren wurden einmal, die Lebern zweimal mit Hanks Waschlösung gespült. Anschließend wurden die Gewebestücke zweimal für jeweils 30 min in auf 37 °C vorgewärmter Versen-Trypsin-Lösung unter Rühren inkubiert. Die Zellsuspensionen wurden durch Gaze filtriert, bei 250 g 5 min sedimentiert, in ZB 21 (CEL) bzw. ZB 22 (CEK) mit 10 % FKS resuspendiert und ausgesät. Um eine bessere Haftung der Zellen zu erreichen, wurden die verwendeten Kulturgefäße mit einer sterilen Gelatinelösung (0,5 % (w/v) in PBS<sup>-</sup>) bei 37 °C über Nacht vorinkubiert. Nachdem die Zellen nach 1 - 2 Tagen zu einem Monolayer ausgewachsen waren, wurde das Medium durch ZB 22 mit 2 % FKS ersetzt.

#### **3.2.1.2 Vermehrung von LMH-Zellen**

Die permanente Hühnerhepatomzelllinie LMH wurde in ZB 5 mit 10 % FKS kultiviert. Im Abstand von 3 - 4 Tagen wurden die Zellen durch fünfminütige Inkubation mit Versen-Trypsin-Lösung abgelöst. Die Umsetzung erfolgte auf mit steriler 0,5 % (w/v) Gelatine in PBS<sup>-</sup> vorinkubierte Zellkulturgefäße in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:6.

Die Inkubation aller eukaryontischen Zellen erfolgte in H<sub>2</sub>O-gesättigter Atmosphäre bei 37 °C und 2,5 % CO<sub>2</sub>.

### **3.2.2 Virusvermehrung und -reinigung**

#### **3.2.2.1 Virusanzucht**

Die Vermehrung von ILTV erfolgte in CEK- oder CEL-Zellen. Nach Ausbildung eines Monolayers wurden die Zellen mit einer MOI von ca. 0,01 infiziert und bei 37 °C inkubiert, bis nach 4 - 7 Tagen ein deutlicher CPE zu erkennen war. Anschließend wurde der Kulturüberstand geerntet, portioniert und bei -70 °C gelagert.

Bei Bedarf wurden die Überstände zur Erhöhung des Virustiters für 1 h bei 35.000 g und 4 °C zentrifugiert (Rotor JA-20) und das Sediment anschließend in ca. 10 % des ursprünglichen Medium-Volumens resuspendiert.

### **3.2.2.2 Plaquetest**

Zur Titerbestimmung der Virussuspensionen wurden Verdünnungsreihen in ZB 5 mit 5 % FKS hergestellt und auf zu Monolayern ausgewachsenen CEK-Zellen in 24well-Platten gegeben. Nach zweistündiger Bewegung bei Raumtemperatur wurde das Inokulum durch 0,25 x Methocelmedium ersetzt. Die weitere Inkubation erfolgte bei 37 °C. Zwei Tage nach Infektion wurden die Zellen mit PBS<sup>-</sup> gewaschen und dann mit 50 % Methanol/50 % Aceton für 15 min fixiert. Anschließend wurde ein indirekter Immunfluoreszenztest (3.2.14) mit monoklonalen Antikörpern gegen das IITV-Glykoprotein gJ durchgeführt. Durch Auszählung der grün fluoreszierenden Plaques wurden die Virustiter (pfu/ml) ermittelt.

### **3.2.2.3 Replikationskinetik**

Zur Bestimmung der Replikationskinetik verschiedener ILT-Viren wurden 24well-Platten mit zu Monolayern ausgewachsenen CEK-Zellen auf Eis vorgekühlt. Die Infektion erfolgte mit einer MOI von 5 für Ein-Schritt-Kinetiken bzw. mit einer MOI von 0,1 für Mehr-Schritt-Kinetiken. Nach einstündiger Virusadsorption bei 0 °C wurde vorgewärmtes Medium zugegeben und die Inkubation bei 37 °C fortgesetzt. Nach zwei Stunden wurden nicht penetrierte Viren durch eine zweiminütige Behandlung mit CBS (pH 3,0) inaktiviert, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit frischem Medium überschichtet. Zu verschiedenen Zeiten nach Infektion wurden die Zellen in einzelnen wells abgeschabt und mit dem Überstand bei -70 °C eingefroren. Anschließend wurden Plaquetests (3.2.2.2) zur Bestimmung der Virustiter durchgeführt.

### **3.2.2.4 Reinigung von ILT-Virionen**

Mit ILTV infizierte CEK- oder CEL-Zellen wurden zusammen mit dem Kulturüberstand nach Ausbildung eines deutlichen CPE geerntet und für 1 h bei 60000 g und 4 °C ultrazentrifugiert (Rotor SW28). Das Sediment wurde in PBS<sup>-</sup> (ca. 1/20 des ursprünglichen Volumens) aufgenommen. Nach Zentrifugation für 30 min bei 4500 g (Megafuge) und 4 °C wurde der Überstand aufbewahrt, das Sediment erneut in PBS<sup>-</sup> resuspendiert und durch drei Frier-Tau-Zyklen (-70 °C/37 °C) aufgeschlossen. Durch 10minütige Zentrifugation bei 4500 g wurden die Zellreste abgetrennt. Anschließend wurden die Virionen aus den vereinigten Überständen für

1 h bei 50000 g (Rotor SW28) durch ein Kissen aus 10 ml 30 %iger Saccharose in TE (pH 7,4) zentrifugiert. Das Sediment wurde durch Ultraschallbehandlung in 200 µl PBS<sup>-</sup> pro Zentrifugenröhrchen resuspendiert und auf einen Stufengradienten aus je 10 ml 50, 40 und 30 %iger Saccharose geschichtet. Nach Ultrazentrifugation für 2 h bei 50000 g und 4 °C (Rotor SW28) wurden die an der Grenze zwischen 40 und 50 %iger Saccharose konzentrierten Virionen mit einer Pipette abgenommen und in PBS<sup>-</sup> verdünnt. Anschließend erfolgte eine erneute Ultrazentrifugation für 1 h bei 60000 g und 4 °C. Danach wurden die Virionen in einem kleinen Volumen PBS<sup>-</sup> aufgenommen und der Proteingehalt bestimmt (3.2.17.3).

### **3.2.3 Isolierung von Nukleinsäuren**

#### **3.2.3.1 Präparation von ILTV-DNA aus infizierten Zellen**

CEK- oder CEL-Zellkulturen wurden mit ILTV infiziert. Nach Ausbildung eines deutlichen CPE wurden die Zellen und Virionen für 1 h bei 60000 g (Rotor SW28) sedimentiert. Das Sediment wurde in 1 ml TEN pro 10 ml Kulturvolumen resuspendiert und nach Zugabe von 500 µl Sarkosylpuffer für 15 min bei 65 °C lysiert. Anschließend wurde der Ansatz für 30 min bei 37 °C mit 10 µl Rnase A (10 mg/ml) und danach über Nacht bei 42 °C mit 100 µl Pronase (10 mg/ml) inkubiert. Die DNA wurde durch Phenol-Extraktion (3.2.3.3) gereinigt, mit Ethanol gefällt (3.2.3.3) und in TE (pH 8,0) resuspendiert.

#### **3.2.3.2 Phenol-Extraktion und Ethanolpräzipitation**

Zur Entfernung von Proteinen und anderen Verunreinigungen wurden DNA-Lösungen mit 1 Volumen TE (pH 8,0)-gesättigtem Phenol ausgeschüttelt, ca. 10 min auf Eis gekühlt und anschließend für 5 min bei 20.000 g (Biofuge) bzw. 3000 g (Megafuge) zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde abgenommen und mit 1 Volumen Phenol/IAC (1:1) und 1 Volumen IAC auf die gleiche Weise extrahiert.

Aus der zuletzt erhaltenen wässrigen Phase wurde die DNA durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 4,8) und 2,5 - 3 Volumina Ethanol für mindestens 1 h bei -70 °C bzw. über Nacht bei -20 °C gefällt. Durch Zentrifugation für 20 min bei 20000 g (Biofuge) bzw. 3000 g (Megafuge) wurde die DNA sedimentiert, mit 70 % Ethanol gewaschen und erneut für 5 min zentrifugiert. Das Sediment wurde getrocknet und in TE (pH 8,0) gelöst.



### 3.2.3.3 Präparation von RNA (Chomczynski und Sacchi, 1987)

CEK-Zellkulturen wurden mit ILTV ( $\text{MOI} \geq 5$ ) infiziert, nach zweistündiger Absorption bei 37 °C wurde die Virussuspension abgesaugt und durch MEM mit 2 % FKS ersetzt. Für die Anreicherung von  $\alpha$ - (immediate early-) bzw.  $\beta$ - (early-) RNA wurden die Virussuspension und das anschließend verwendete Erhaltungsmedium mit 100  $\mu\text{g/ml}$  Cycloheximid bzw. 250  $\mu\text{g/ml}$  PAA (Phosphonoessigsäure) versetzt. Zur Gewinnung von  $\gamma$ - (late-) RNA wurden keine Hemmstoffe eingesetzt. Die infizierten Zellkulturen wurden 6 h ( $\alpha$ ,  $\gamma_1$ ) bzw. 24 h ( $\beta$ ,  $\gamma_2$ ) bei 37 °C inkubiert, anschließend einmal mit PBS<sup>-</sup> gewaschen und mit Guanidin-Thiocyanatlösung (1 ml pro  $10^7$  Zellen) lysiert. Zur Kontrolle wurde auch RNA aus nicht infizierten Zellen präpariert. Die Lysate wurden in Zentrifugenröhrchen überführt und mit 1/10 Volumen 2 M Natriumacetat (pH 4,0), 1 Volumen Phenol und 1/5 Volumen IAC gemischt. Danach wurden die Ansätze 5 Minuten auf Eis gekühlt und anschließend 30 min bei 16000 g und 4 °C (Eppendorf-Zentrifuge 5402) zentrifugiert. Aus der wässrigen Phase wurde die RNA mit 1 Volumen Isopropanol für 1 h bei -20 °C präzipitiert und durch anschließende 30minütige Zentrifugation bei 16000 g und 4 °C sedimentiert. Das Sediment wurde nochmals in Guanidin-Thiocyanatlösung aufgenommen und erneut mit 1 Volumen Isopropanol präzipitiert. Schließlich wurde die RNA mit 70 % Ethanol gewaschen, bei 37 °C getrocknet, in DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen und bei -70 °C gelagert.

### 3.2.3.4 Präparation von Plasmiden

Plasmidtragende Bakterienklone wurden aus Einzelkolonien in 2,5 ml LB-Medium mit Antibiotika über Nacht bei 37 °C angezogen. Von diesen Kulturen wurden je 1,5 ml für 5 min bei 2000 g (Biofuge) zentrifugiert, die Bakterien nach Absaugen des Überstandes in 100  $\mu\text{l}$  Lösung I resuspendiert und für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  Lösung II wurden die Ansätze 5 min auf Eis gestellt und nach Zugabe von 150  $\mu\text{l}$  Lösung III weitere 20 min auf Eis gekühlt. Nach 5minütiger Zentrifugation bei 20000 g wurden die Überstände mit 400  $\mu\text{l}$  Phenol/IAC ausgeschüttelt und erneut zentrifugiert. Aus der wässrigen Phase wurden die Nukleinsäuren durch Zugabe von 1 ml 100 % Ethanol gefällt und durch 10minütige Zentrifugation bei 20000 g sedimentiert. Die Nukleinsäuren wurden mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet, in 50  $\mu\text{l}$  TE (pH8,0) mit 10 $\mu\text{g/ml}$  RNase A aufgenommen und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die erhaltene Plasmid-DNA (5 - 20  $\mu\text{g}$  pro Ansatz) wurde durch Restriktionsanalysen und Sequenzierung charakterisiert.

Zur Gewinnung größerer Plasmid-DNA-Mengen (0,5 - 1 mg) wurden die gewünschten Bakterienklone in 200 ml selektivem LB-Medium bei 37 °C über Nacht angezogen. Die DNA-Präparation erfolgte unter Verwendung des Plasmid Maxi Kits (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers.

### 3.2.3.5 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit wurden von den in H<sub>2</sub>O verdünnten Nukleinsäurelösungen in einem Photometer UV-Absorptionsspektren (220 - 320 nm) aufgenommen. Anhand der Extinktion bei 260 nm konnte die Konzentration wie folgt berechnet werden:

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

$OD_{260} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \mu\text{g/ml RNA}$

Die Reinheit der Nukleinsäurelösungen wurde über den Quotienten  $OD_{260}/OD_{280}$  bestimmt, wobei Werte unter 1,8 auf Verunreinigungen mit Proteinen hinweisen.

### 3.2.4 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zur Spaltung von 1 µg Virus- oder Plasmid-DNA wurden 5 - 20 U des gewünschten Restriktionsenzym sowie der vom Hersteller empfohlene Reaktionspuffer eingesetzt. Das Ansatzvolumen wurde so gewählt, dass der Anteil der glycerolhaltigen Enzymlösung nicht mehr als 10 % betrug. Die Inkubation erfolgte bei der empfohlenen Temperatur für 1 h bei Plasmid-DNA bzw. für 3 - 4 h bei Virus-DNA. Bei Doppelspaltungen wurde die DNA falls nötig zunächst in einem kleinen Volumen mit dem bei niedrigerer Salzkonzentration aktiven Enzym inkubiert. Das zweite Enzym wurde anschließend nach Erhöhung von Ansatzvolumen und Salzkonzentration zugegeben. Die gespaltene DNA wurde durch Agarosegelelektrophorese analysiert oder für die Plasmidklonierung weiterverarbeitet.

### 3.2.5 Plasmid-Klonierung

#### 3.2.5.1 Klenow-Behandlung

Für die Klonierung von DNA-Fragmenten mit nicht kompatiblen Einzelstrangüberhängen wurden diese durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli* aufgefüllt (5'-Überhänge) bzw. abgebaut (3'-Überhänge). Hierzu wurde die DNA unmittelbar nach der Spaltung mit 1 U Klenow-Polymerase

und 1 µl dNTP-Mix (je 2,5 mM) für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Enzym für 15 min bei 70 °C inaktiviert.

### **3.2.5.2 Phosphorylierung von PCR-Produkten**

PCR-Produkte (3.2.8), deren 5'-Enden keine Phosphatgruppen enthalten, mussten vor der Klonierung in Plasmidvektoren phosphoryliert werden. Hierzu wurden von der durch Phenolextraktion und Ethanolpräzipitation (3.2.3.3) gereinigten DNA ca. 5 pmol in einem Ansatz von 20 µl mit 2 µl 10 mM ATP und 10 U T4 Polynukleotidkinase im mitgelieferten Puffer für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach 10minütiger Inaktivierung des Enzyms bei 70 °C erfolgte eine Klenow-Behandlung.

### **3.2.5.3 Phosphatase-Behandlung der Vektor-DNA**

Die 5'-Enden der linearisierten Plasmid-Vektoren wurden nach Spaltung mit geeigneten Restriktionsenzymen dephosphoryliert, um eine Religation ohne Insert-Fragment zu verhindern. Die Ansätze wurde dazu mit 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) / 0,1 mM EDTA auf 270 µl erhöht und nach Zugabe von 1 U alkalischer Phosphatase (CIP) für 30 min bei 37 °C sowie nach erneuter Zugabe von 1 U CIP für weitere 30 min bei 56 °C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte durch Zusatz von 30 µl 0,1 M EGTA und 10minütiges Erhitzen auf 65 °C. Anschließend wurde die DNA mit Phenol extrahiert und mit Ethanol präzipitiert (3.2.3.3).

### **3.2.5.4 Ligation**

Für die Ligation wurden ca. 200 ng der dephosphorylierten Vektor-DNA sowie eine äquimolare Menge des zu klonierenden DNA-Fragmentes eingesetzt. Die 20 µl-Ansätze wurden nach Zugabe von 0,5 U T4-DNA-Ligase im mitgelieferten Puffer 15 min bei 37 °C, 1 h bei RT und anschließend über Nacht bei 15 °C inkubiert.

### **3.2.5.5 Herstellung kompetenter Bakterien**

Um *E.coli*-Bakterien für die Aufnahme von Plasmid-DNA kompetent zu machen, wurden 100 ml SOB-Medium mit 2 ml einer frischen Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C bis zu einer  $OD_{660nm}$  von ca. 0,4 geschüttelt. Die Kultur wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 10 Minuten auf Eis gekühlt. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 3000 g und 4 °C (Megafuge) wurde das Sediment in 30 ml kaltem TFB resuspendiert, erneut für 10 min auf Eis gekühlt und zentrifugiert. Anschließend wurden die Bakterien in 3,4 ml kaltem TFB aufgenommen und mit 0,6 ml Glycerol

versetzt. Nach zweimaliger Zugabe von 140 µl DMSO wurden die Bakterien jeweils 15 min auf Eis inkubiert und in 200 µl-Portionen bei -70 °C gelagert.

### **3.2.5.6 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA**

Kompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, mit 1 - 100 ng der ligierten Plasmid-DNA gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Zur Steigerung der DNA-Aufnahme wurden die Bakterien einem 2minütigen Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt und anschließend 2 min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 800 µl SOC-Medium wurden die Bakterien für 1 h bei 37 °C geschüttelt, 5 min bei 1000 g (Biofuge) sedimentiert, in 100 ml SOC resuspendiert und auf selektiven LB-Agarplatten ausplattiert. Die Inkubation der Agarplatten erfolgte über Nacht bei 37 °C. Die erhaltenen Klone wurden angezogen und nach Präparation der Plasmid-DNA (3.2.3.5) charakterisiert.

## **3.2.6 Agarosegelelektrophorese und Membrantransfer von Nukleinsäuren**

### **3.2.6.1 Neutrale Agarosegele (DNA-Gele)**

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA erfolgte in horizontalen 0,7 % Agarosegelen. Die Agarose wurde in 1 x TAE durch Aufkochen gelöst, mit 0,3 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und zu ca. 5 mm starken Gelen gegossen, welche nach Erstarren in Elektrophoresekammern mit 1 x TAE bedeckt wurden. Die mit 1/10 Volumen DNA-Probenpuffer versetzten Proben wurden für 1 - 2 h bei 75 V (10 cm lange Gele) bzw. über Nacht bei 35 V (20 cm lange Gele) getrennt. Nach dem Lauf konnten die DNA-Fragmente aufgrund des eingelagerten Ethidiumbromids auf dem UV-Transilluminator als fluoreszierende Banden sichtbar gemacht werden. Die Größenbestimmung erfolgte anhand eines mitgeführten Standards (1 kbp DNA-Leiter).

### **3.2.6.2 Formaldehydgele (RNA-Gele)**

Die elektrophoretische Auftrennung viraler und zellulärer RNA erfolgte in horizontalen, denaturierenden Gelen, welche 0,8 % (w/v) Agarose und 1 % Formaldehyd in 1 x MAE enthielten. Zunächst erfolgte ein Vorlauf der in 1 x MAE getauchten Gele für 30 min bei 50 V. Die RNA-Proben wurden mit 5 Volumina RNA-Probenpuffer für 15 min bei 65 °C denaturiert und dann auf Eis abgekühlt. Pro Gelspur wurden 5 µg Gesamtzell-RNA und daneben ein Größen-Marker (0,24 - 9,5 kb RNA-Leiter) aufgetragen. Die Trennung erfolgte über Nacht bei 25 V. Das im

Probenpuffer enthaltene Ethidiumbromid ermöglichte die Prüfung der Gele auf einem UV-Transilluminator.

### **3.2.6.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

#### **3.2.6.3.1 Elution durch Phenolextraktion**

Nach der elektrophoretischen Trennung (3.2.6.1) wurden die gewünschten DNA-Fragmente auf einem langwelligen (312 nm) UV-Transilluminator aus dem Agarosegel ausgeschnitten, zerkleinert und mit dem gleichen Volumen an TE-gesättigtem Phenol homogenisiert. Dieses Gemisch wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und unmittelbar darauf für 25 min bei 20000 g (Biofuge) zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde mit dem gleichen Volumen IAC ausgeschüttelt und erneut 2 min zentrifugiert. Schließlich wurde eine Ethanolpräzipitation (3.2.3.3) durchgeführt und die DNA in TE (pH 8,0) aufgenommen.

#### **3.2.6.3.2 Elution mit QIAquick Gel Extraction Kit (Quiagen)**

Die Agarosegelstücke mit den gewünschten DNA-Fragmenten wurden in einem mitgelieferten Guanidin-Thiocyanatpuffer für 10 min bei 50 °C gelöst. Anschließend wurde die freigesetzte DNA nach den Angaben des Herstellers über eine Silikagelsäule gereinigt. Diese Methode war jedoch für große DNA-Fragmente (> 10 kbp) ungeeignet.

#### **3.2.6.4 Southern Blot**

Die mit Ethidiumbromid gefärbten DNA-Gele wurden vor dem Transfer mit angelegtem Lineal fotografiert, um spätere Hybridisierungssignale eindeutig zuordnen zu können. Vor dem Transfer wurden die Gele zunächst für 10 min in 0,25 M HCl bewegt, um große DNA-Moleküle zu fragmentieren. Anschließend wurde die DNA für zweimal 15 Min in 0,5 M NaOH/0,9 M NaCl denaturiert. Nach Neutralisation in 1 M Tris-HCl (pH 7,4)/0,9 M NaCl für zweimal 30 min wurde das Gel auf ein Blottingpapier gelegt, dessen Enden in 12 x SSC tauchten. Auf die Gele wurden nacheinander eine in H<sub>2</sub>O angefeuchtete Nylonmembran, drei feuchte Blottingfilter und schließlich mehrere Lagen Zellstoff gelegt, welche durch eine Masse von ca. 1 kg beschwert wurden. Nach kapillarem Transfer über Nacht wurde die DNA durch UV-Bestrahlung und einstündige Trocknung unter Vakuum bei 80 °C mit der Nylonmembran vernetzt.

### **3.2.6.5 Northern Blot**

Elektrophoretisch aufgetrennte RNA wurde auf die gleiche Weise auf Nylonmembranen transferiert wie DNA (3.2.6.4). Eine Vorbehandlung der Gele war hier jedoch nicht erforderlich. Als Transferpuffer wurde 20 x SSC verwendet. Das in die RNA eingelagerte Ethidiumbromid war unter UV-Licht auch auf der Membran erkennbar, was eine Kennzeichnung der Marker-Banden erlaubte.

### **3.2.6.6 Dot Blotting von Virus-DNA**

Auf 96well-Platten ausgesäte CEK-Zellen wurden mit ILTV infiziert (20 - 50 pfu/Platte), für 4 - 6 Tage bei 37 °C inkubiert und anschließend bei -70 °C gelagert. Für den Transfer der viralen DNA wurden ein Blottingpapier und eine Nitrocellulosemembran mit H<sub>2</sub>O befeuchtet in die Dot Blot-Apparatur eingelegt. Von der Gewebekulturplatte wurden 100 µl pro well in die dem Raster entsprechenden Bohrungen der Apparatur gegeben, unter Vakuum angesaugt und mit jeweils 200 µl PBS<sup>-</sup> gewaschen. Zur Denaturierung und anschließenden Neutralisierung wurden die Membranen für je 5 min auf Blotting-Papiere gelegt, die mit 0,5 N NaOH, 1 M Tris (pH 7,4)/0,6 M NaCl, 0,5 M Tris (pH 7,4)/1,5 M NaCl und 2x SSC getränkt waren. Abschließend wurden die Membranen für 2 h bei 80 °C im Vakuumofen getrocknet.

## **3.2.7 Blot-Hybridisierung**

### **3.2.7.1 Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren**

#### **3.2.7.1.1 „Oligo“-Markierung von DNA**

Für die radioaktive Markierung von DNA wurde der Rediprime DNA Labelling Kit (Amersham) verwendet. DNA-Synthese und Radionukleotid-Einbau erfolgte an denaturierter DNA durch Klenow-Polymerase, wobei ein Gemisch aus Nonanukleotiden als Zufallsprimer diente. Etwa 50 ng DNA wurden in 45 µl H<sub>2</sub>O für 5 min bei 100 °C denaturiert, auf Eis abgekühlt und zum Lösen des lyophilisierten Reaktionsmixes verwendet. Nach Zugabe von 5 µl [ $\alpha^{32}$ P]dCTP wurde der Ansatz 1h bei 37 °C inkubiert. Nicht eingebaute Radionukleotide wurden anschließend durch Gelfiltration (3.2.7.1.3) abgetrennt.

### 3.2.7.1.2 *In vitro*-Synthese von cRNA

Verschiedene Plasmid-Vektoren wie z.B. pcDNA3 enthalten T3-, T7- oder SP6-Phagenpromotoren, die es ermöglichen, von klonierten DNA-Fragmenten mittels der entsprechenden RNA-Polymerasen strangspezifische cRNA-Hybridisierungsproben herzustellen. Zur cRNA-Synthese wurde ein RNA Transcription Kit (Stratagene) verwendet. Die 25 µl Reaktionsansätze im mitgelieferten Puffer enthielten 1 - 2 µg Plasmid-DNA, je 1 µl 10 mM ATP, CTP und GTP, 1 µl 1 mM UTP, 5 µl [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]UTP, sowie 10 U RNA-Polymerase und wurden für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden zum Abbau der Template-DNA 10 U RNase-freie DNase I zugegeben, und die Inkubation bei 37 °C wurde für weitere 15 min fortgesetzt. Schließlich wurden nicht eingebaute Radionukleotide durch Gelfiltration (3.2.7.1.3) abgetrennt.

### 3.2.7.1.3 Abtrennung nicht eingebauter Radionukleotide

Die Abtrennung nicht eingebauter Radionukleotide erfolgte mittels Gelfiltration. Hierzu wurden mit Glasfaserfiltern abgedichtete 1 ml Spritzen sukzessive mit einer Sephadex G50-Suspension in TE (pH 7,4) gefüllt, in Zentrifugenröhrchen eingehängt und 2 min bei 700 g zentrifugiert (Megafuge), bis die Gelmatrix ein Volumen von ca. 1 ml erreicht hatte. Die Markierungsansätze wurden mit H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt und auf die Sephadex-Säule gegeben. Nach erneuter Zentrifugation für 2 min bei 700 g verblieben nicht eingebaute Radionukleotide in der Säule, die höhermolekularen markierten Nukleinsäuren befanden sich im Eluat. Die Radioaktivität der erhaltenen Proben wurde mit Hilfe eines Handmonitors gemessen.

### 3.2.7.2 Hybridisierung

Die mit Nukleinsäuren beladenen Membranen wurden zunächst 5 min in 2 x SSC getränkt und anschließend in Rollerflaschen für 4 - 24 h mit 15 ml DNA-Hybridisierungslösung bei 62 °C (DNA-Blots, 3.2.6.4; „Dot Blots“, 3.2.6.6) bzw. RNA-Vorhybridisierungslösung bei 54 °C (RNA-Blots, 3.2.6.5) inkubiert. Die [ $^{32}\text{P}$ ]-markierten Proben wurden in 15 ml DNA- bzw. RNA-Hybridisierungslösung für 5 min bei 100 °C denaturiert und über Nacht mit den Blots bei 62 °C bzw. 54 °C inkubiert. Nach der Hybridisierung wurden die Hybridisierungslösungen mit den radioaktiven Sonden abgenommen und zur Wiederverwendung bei 4 °C gelagert.

Die Blots wurden zur Entfernung unspezifisch gebundener Radioaktivität zweimal 30 min in 2 x SSC/0,5 % SDS bei 62 °C (DNA-Sonden) bzw. 65 °C (cRNA-Sonden) gewaschen. RNA-Blots wurden anschließend 15 min mit 2 x SSC gespült und für 30 min mit 1 µg/ml RNase A in 2 x SSC bei RT inkubiert. Abschließend wurden alle

Blots mindestens dreimal 20 min in 0,1 x SSC/0,5 % SDS bei 62 °C bzw. 65 °C gewaschen, bis in der Waschlösung keine Radioaktivität mehr nachweisbar war. Die Blots wurden getrocknet und in Haushaltsfolie verpackt. Nach Exposition von Bildfolien (1 - 24 h) wurden diese in einem Fluorescent Image Analyzer ausgewertet. Alternativ konnten Röntgenfilme verwendet werden, die für 1 - 14 Tage mit Verstärkerfolien bei -70 °C exponiert wurden.

### **3.2.8 Polymerase Kettenreaktion (PCR)**

Zur PCR-Amplifikation von DNA-Fragmenten aus dem ILTV-Genom wurden 0,1 fg - 10 ng Virus-DNA eingesetzt. Den 50 µl-Ansätzen wurden außerdem je 25 pmol der beiden gewünschten Oligonukleotid-Primer, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, je 300 µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, sowie 1 U Platinum Pfx DNA-Polymerase im zugehörigen Reaktionspuffer zugesetzt. Im Thermocycler wurde die Template-DNA für 3 min bei 95 °C denaturiert, darauf folgten mindestens 30 Zyklen von Denaturierung (15 sec bei 95 °C), Primer-Hybridisierung (30 sec bei 55 °C) und DNA-Synthese (1 min pro kbp Produktlänge bei 70 °C). Nach einem letzten DNA-Syntheseschritt (10 min bei 70 °C) wurden die Amplifikationsprodukte durch Agarosegelelektrophorese (3.2.6.1) analysiert und gegebenenfalls zur Weiterverwendung aus dem Gel isoliert (3.2.6.3), Phenol-extrahiert und mit Ethanol präzipitiert (3.2.3.3).

### **3.2.9 DNA-Sequenzierung**

DNA-Sequenzanalysen wurden mittels „Cycle sequencing“ mit kommerziell erhältlichen Reagentien und <sup>32</sup>P- oder Fluorochrom-markierten Oligonukleotidprimern durchgeführt, welche komplementär zu Vektor-Sequenzen oder bekannten Abschnitten der untersuchten viralen DNA-Fragmente waren. Die *in vitro*-Synthese der DNA erfolgte in vier parallelen Ansätzen. Diese enthielten neben allen vier Desoxynukleotiden jeweils ein Didesoxynukleotid in geringerer Molarität, dessen gelegentlicher Einbau zum Abbruch der DNA-Synthese an Positionen der entsprechenden Base führte (Sanger et al., 1977). Nach elektrophoretischer Auftrennung in Polyacrylamid-Harnstoffgelen konnte aus dem Bandenmuster unterschiedlich großer markierter Fragmente die DNA-Sequenz abgelesen werden.

#### **3.2.9.1 Thermo Sequenase labelled primer cycle sequencing kit (Amersham)**

Für die automatische Sequenzierung wurden 2 µg Plasmid-DNA sowie 2 pmol Fluorochrom-markierter (IRD700 oder IRD800) Primer eingesetzt. Nach Zugabe von 0,7 µl DMSO wurde das Ansatzvolumen mit H<sub>2</sub>O auf 21 µl erhöht, hiervon wurden je



4,5 µl mit 1,5 µl der A-, C-, G- und T-Reaktionsmixe gemischt. Im Thermocycler wurde die DNA für 5 min bei 95 °C denaturiert, anschließend erfolgte die DNA-Synthese in 30 Zyklen (je 30 sec 95 °C, 54 °C und 70 °C). Nach Zugabe von 6 µl Stopplösung und 5minütiger Denaturierung bei 95 °C wurden die Proben im Sequenzautomaten analysiert (Elektrophorese und Auswertung wurden von Herrn G. Strebelow am Institut für Virusdiagnostik des FLI, Insel Riems, durchgeführt).

### **3.2.9.2 Thermo Sequenase cycle sequencing kit (Amersham)**

Für die manuelle Sequenzierung wurden zunächst die 5'-Enden der eingesetzten Primer radioaktiv markiert. Hierzu wurden 2 pmol des Primers, 25 pmol [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]ATP und 10 U T4 Polynukleotidkinase im mitgelieferten Puffer in einem Ansatzvolumen von 20 µl 30 min bei 37 °C inkubiert, anschließend wurde das Enzym für 3 min bei 95 °C inaktiviert. Ca. 100 ng Template-DNA wurden in 11,5 µl H<sub>2</sub>O mit je 2 µl markiertem Primer, Reaktionspuffer und Thermo Sequenase DNA-Polymerase (4 U/µl) gemischt und davon jeweils 4 µl zu 4 µl der einzelnen Terminationsmixe gegeben. Die DNA-Synthese im Thermocycler erfolgte über 60 Zyklen (95 °C für 30 sec, 50 °C für 30 sec, 72 °C für 90 sec). Danach wurden je 4 µl Stopplösung zugegeben und die Proben vor dem Gelauftrag für 5 min bei 95 °C denaturiert.

Die Polyacrylamid-Harnstoffgele wurden zwischen zwei Glasplatten gegossen, von denen die eine mit einem Gemisch aus 30 µl Bindsilan, 10 ml Ethanol und 260 µl 10% Essigsäure und die andere mit 10 ml Repelsilan (2 % Dimethyldichlorsilan in 1,1,1-Trichlorethan) vorbehandelt worden war. Nach 30-minütigem Vorlauf der polymerisierten Gele bei 70 W in 1x TBE wurden je 2,5 µl der Reaktionsansätze nebeneinander aufgetragen. Um möglichst große Sequenzabschnitte (ca. 500 bp) erfassen zu können, wurden die Reaktionsansätze einmal für 2,5 h und einmal für 5 h bei 70 W aufgetrennt.

Im Anschluss an den Lauf wurden die Gele auf den Glasplatten für 20 min in 15 % Methanol/5 % Essigsäure fixiert, für 10 min gewässert und danach bei 60 °C getrocknet. Die Exposition von Röntgenfilmen erfolgte über Nacht bei RT.

### **3.2.10 Herstellung rekombinanter Viren und Zelllinien**

#### **3.2.10.1 Transfektion eukaryontischer Zellen**

Die Transfektion von LMH-Zellen mit Plasmiden oder viraler DNA erfolgte durch Kalziumphosphat-Coprazipitation (Graham und van der Eb, 1973). Hierzu wurden die Zellen auf 6well-Platten über Nacht zu subkonfluenten Monolayern angezogen. Kurz vor der Transfektion wurde das Medium durch 1 ml ZB5 mit 5 % FKS pro well ersetzt.

Die DNA (1 - 10 µg) wurde in 219 µl 10mM Tris-HCl (pH 7,4) gelöst. Anschließend wurden zunächst 31 µl 2 M CaCl<sub>2</sub> und dann 250 µl 2 x HBS langsam zugegeben. Nach 45 Minuten bei RT wurden die Ansätze auf die Zellen geträufelt und diese über Nacht bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen einmal mit Medium gewaschen und unter 2,5 ml ZB5 mit 5 % FKS weiter inkubiert.

### 3.2.10.2 Herstellung rekombinanter Viren

Zunächst wurden Transferplasmide konstruiert, welche beiderseits der gewünschten Veränderung (Deletion viraler Gene, Fremdgeninsertion) mindestens 1 kbp authentische ILTV-DNA-Sequenzen enthielten, um eine effiziente homologe Rekombination mit dem Virus-Genom zu ermöglichen. Für die Kotransfektion von LMH-Zellen wurden ca. 2 - 3 µg Virus-DNA und ca. 5 µg des Transferplasmides verwendet. Außerdem wurden je 2,5 µg der Expressionsplasmide pRc-UL48 und pRc-ICP4 eingesetzt, da frühere Untersuchungen gezeigt hatten, dass die Infektiosität isolierter ILTV-DNA durch diese viralen Transaktivatoren erheblich gesteigert wird (Fuchs et al., 2000). Nach Ausbildung von Virus-Plaques wurden die Zellen mit dem Überstand geerntet und bei -70 °C gelagert.

Die Selektion der ersten Generation von ILTV-Rekombinanten wurde durch Insertion einer Expressionskassette für das modifizierte grün fluoreszierende Protein (EGFP) erleichtert. Um jedoch unerwünschte Effekte dieses Reportergens auf die Virusvermehrung (Fuchs et al., 2000) auszuschließen, wurde es in einem zweiten Rekombinationsschritt wieder entfernt.

Zur Isolierung rekombinanter Viren aus der Transfektionsnachkommenschaft wurden Plaquetests auf CEK-Zellen in 24well-Gewebekulturplatten durchgeführt. Nach 3- bis 4-tägiger Inkubation wurden fluoreszierende bzw. nichtfluoreszierende Einzelplaques unter dem Inversmikroskop durch Markierung auf dem Plattenboden gekennzeichnet. Mit einer Plastik-Pipette wurden die infizierten Zellen in den markierten Bereichen vom Plattenboden abgeschabt, aufgezogen, in 500 µl ZB5 mit 5 % FKS gegeben und zur Infektion frischer Zellen verwendet.

Eine weitere Möglichkeit zur Isolierung von ILTV-Rekombinanten bestand darin, CEK-Zellen in 96well-Gewebekulturplatten mit 20 bis 50 pfu/Platte der heterogenen Virussuspensionen zu infizieren. Dadurch war es wahrscheinlich, dass die Viruspopulationen infizierter wells durch Vermehrung einzelner Viruspartikel entstanden waren. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden nach 4 - 6 Tagen die gewünschten Mutanten identifiziert, die Zellen mit dem Überstand aus den entsprechenden wells geerntet und bei -70 °C gelagert. Wenn kein Reportergen zur Unterscheidung von Ausgangsvirus und Rekombinanten vorhanden war, wurden die

Virusnachkommen auf den 96well-Platten durch Dot Blot-Hybridisierung (3.2.6.5.) analysiert.

Die Plaquereinigungen wurden so lange wiederholt, bis die isolierten Viruspopulationen phänotypisch homogen erschienen. Diese wurden angezogen (3.2.2.1) und durch DNA-Analysen (3.2.4, 3.2.6-3.2.7) charakterisiert.

### **3.2.10.3 Herstellung rekombinanter Zelllinien**

Für die Etablierung rekombinanter Zelllinien wurden einzelne ILTV-Gene in den Expressionsvektor pRES1neo kloniert, welcher ein Neomycin-Resistenzgen trägt, das mit dem inserierten Virusgen über eine „internal ribosomal entry site“ (IRES) verbunden wurde. Beide Gene konnten so über eine einzige bicistronische m-RNA unter Kontrolle des HCMV-„immediate-early“-Genpromotors konstitutiv exprimiert werden.

LMH-Zellen wurden mit den erhaltenen Plasmiden transfiziert (3.2.10.1), nach 48 h mit Versen-Trypsin-Lösung abgelöst, in MEM mit 10 % FKS und 250 µg/ml Geneticin verdünnt und auf 96well-Gewebekulturplatten ausgesät. Da die verwendeten Plasmide in eukaryontischen Zellen extrachromosomal nicht repliziert werden, entstanden nur nach deren stabiler Integration in das Zellgenom Neomycin-resistente Klone. Die erhaltenen Zelllinien wurden durch DNA-Hybridisierung (3.2.7.) auf Insertion der gewünschten Fremdgene und durch Western Blot-Analysen (3.2.12) und indirekte Immunfluoreszenztests (3.2.14) auf Expression der entsprechenden Proteine geprüft.

### **3.2.11 Trennung von Proteinen**

#### **3.2.11.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Trennung von Proteinen erfolgte mittels vertikaler Elektrophorese in denaturierenden, diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen (Laemmli, 1970). Zwischen zwei Glasplatten wurde zuerst das Trenngel gegossen, welches in Abhängigkeit von der Größe der untersuchten Proteine eine Acrylamid-Konzentration von 7,5 - 15 % enthielt. Nach der Polymerisation wurde das Trenngel mit einem ca. 2 cm hohen Sammelgel überschichtet, und durch Einsetzen eines Kammes wurden Gel-Taschen geformt. Vor dem Auftrag wurden die untersuchten Protein-Lösungen mit SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließend 5 min bei 20000 g (Biofuge) zentrifugiert. Um die molekularen Massen bestimmen zu können, wurden in einer Geltasche definierte Markerproteine aufgetragen. Die Auftrennung

erfolgte in SDS-Elektrophoresepuffer bei 200 V für ca. 45 min (analytische Minigele) bzw. bei 10 mA über Nacht (präparative Gele).

### **3.2.11.2 Coomassie-Färbung**

Nach der Elektrophorese wurden analytische Gele 20 Minuten in Coomassie-Färbelösung I bewegt und anschließend mehrmals für ca. 30 min in SDS-Polyacrylamidgel-Fixierer gewaschen, bis nur noch die Proteinbanden gefärbt waren. Für die Färbung präparativer Gele wurde Coomassie-Färbelösung II und zur Entfärbung 30 % Methanol verwendet.

### **3.2.12 Western Blot-Analysen**

Der Proteintransfer aus SDS-Polyacrylamidgelen (3.2.11.1) erfolgte in einer „Semi-dry“-Elektroblotkammer. Zwischen die Elektrodenplatten wurden übereinander 5 Lagen Blottingpapier, eine Nitrocellulosemembran, das Gel und 5 weitere Lagen Blottingpapier geschichtet, die zuvor in Transferpuffer getränkt worden waren. Der Transfer erfolgte bei 25 V über 120 min. Die Banden der vorgefärbten Markerproteine waren danach auf der Membran sichtbar und wurden gekennzeichnet.

Nach dem Transfer wurden die Nitrocellulosemembranen zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen zunächst für 1 h in TBS-T mit 5 % (w/v) Magermilchpulver bewegt. Daraufhin erfolgte die einstündige Inkubation mit den gewünschten Antikörpern, welche hierzu 1:1.000 bis 1:1.000.000 in TBS-T mit 0,5 % (w/v) Magermilchpulver verdünnt wurden. Die Blots wurden dreimal 10 min in TBS-T gewaschen, anschließend wurden sie für 30 min mit dem 1:20.000 in TBS-T verdünnten Peroxidase-konjugierten, speziesspezifischen Zweitantikörpern inkubiert. Nach erneutem sechsmaligem Waschen für je ca. 5 min konnten die gebundenen Antikörper nach einer Peroxidase-induzierten Chemilumineszenz-reaktion (Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce) durch Exposition von Röntgenfilmen nachgewiesen werden. Anhand der Markerbanden konnten die molekularen Massen der detektierten Proteine bestimmt werden.

### **3.2.13 Radioimmunpräzipitation (RIP)**

#### **3.2.13.1 Metabolische Markierung**

Für die radioaktive Markierung viraler Proteine wurden CEK-Zellkulturen mit ILTV infiziert (MOI ca. 1), nach 5 h einmal mit PBS<sup>-</sup> gewaschen und für 1 h unter MEM ohne Methionin und Cystein bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 100 µCi

Tran[<sup>35</sup>S]Label pro ml Medium wurden die Zellen für weitere 20 h bei 37 °C inkubiert, anschließend geerntet und 10 min bei 16000 g zentrifugiert (Biofuge). Außerdem wurden nicht infizierte Zellen auf die gleiche Art markiert und geerntet. Das Zellsediment wurde in 1 ml 1 x RITA pro 10<sup>6</sup> Zellen resuspendiert, nach Zugabe von 1 mM PMSF ultraschallbehandelt, 30 min bei RT lysiert und nach erneuter Ultraschallbehandlung 30 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurde das Lysat 30 min bei 86000 g und 4 °C ultrazentrifugiert (TLA45), der Überstand abgenommen und bei -70 °C gelagert.

### 3.2.13.2 Immunpräzipitation

Das in der Zellwand von *Staphylococcus aureus* enthaltene Protein A bindet an den F<sub>C</sub>-Teil der IgG-Antikörper verschiedener Spezies. Daher können inaktivierte Bakteriensuspensionen zur Fällung und Reinigung von Antigen-Antikörper-Komplexen verwendet werden (Kessler, 1975).

Die *Staph. aureus*-Suspension (Pansorbin) wurde zunächst 5 min bei 2000 g zentrifugiert (Biofuge), das Sediment zweimal mit 1 x RITA gewaschen, erneut zentrifugiert und schließlich in gleichem Volumen 1 x RITA resuspendiert.

Pro Ansatz wurden 50 µl des [<sup>35</sup>S]-markierten Zellysates mit 25 µl *Staph. aureus*-Suspension 30 min auf Eis vorinkubiert und dann 10 min bei 16000 g zentrifugiert, um unspezifisch an die Bakterien gebundene Proteine zu entfernen. Die Überstände wurden nun mit 50 µl des in 1 x RITA verdünnten Antikörpers oder Serums versetzt und für jeweils 1 h bei RT und auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Überstände nach 10minütiger Zentrifugation bei 16000 g erneut mit 25 µl *Staph. aureus*-Suspension gemischt und je 30 min bei RT und auf Eis inkubiert. Die Bakterien mit den gebundenen Antikörper-Antigen-Komplexen wurden für 1 min bei 4500 g sedimentiert (Biofuge), fünfmal mit jeweils 500 µl 1 x RITA gewaschen und schließlich für 2 min bei 16000 g durch eine Schicht aus 500 µl 30 % Saccharose in TE (pH 7,4) zentrifugiert. Anschließend wurden die Präzipitate in 30 µl 1 x SDS-Probenpuffer resuspendiert, für 5 min bei 95 °C denaturiert und für 5 min bei 16000 g (Biofuge) zentrifugiert. Die im Überstand gelösten Proteine wurden durch SDS-PAGE (3.2.11.1) getrennt. Zur Molekulargewichtsbestimmung dienten [<sup>14</sup>C]-methylierte Markerproteine.

### 3.2.13.3 Fluorographie

Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Trenngele zweimal 20 min in SDS-Polyacrylamidgel-Fixierer bewegt. Da die schwache β-Strahlung der verwendeten Isotope keine Autoradiographie erlaubte, wurden die Gele für 30 min mit einem

Fluorographie-Reagens (Amplify) imprägniert und anschließend kurz gewässert. Danach wurden die Gele auf Blottingpapier unter Vakuum bei 80 °C getrocknet. Die aufgelegten Röntgenfilme (Hyperfilm MP) wurden für 1 - 30 Tage bei -70 °C exponiert. Alternativ war auch die ein- bis dreitägige Exposition von Bildfolien für den Fluorescent Image Analyzer bei RT möglich.

### **3.2.14 Indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT)**

Für die indirekte Immunfluoreszenz wurden CEK-Zellen in Gewebekulturschalen oder auf eingelegten Deckgläsern zu Monolayern angezogen. Zwei Tage nach Infektion oder Transfektion wurden die Zellen mit PBS<sup>-</sup> gewaschen und anschließend 15 min mit Methanol/Aceton (1:1) oder reinem Aceton (Deckgläser) fixiert, getrocknet und bei -20 °C gelagert oder sofort weiter verwendet. Nach dreimaligem Spülen der Zellen mit PBS<sup>-</sup> für jeweils 5 min erfolgte die Inkubation mit den in PBS<sup>-</sup> verdünnten Antisera (1:50 - 1:100) für 1 h bei RT. Die Zellen wurden dreimal gewaschen, anschließend erfolgte der Nachweis von gebundenen Antikörpern durch 30minütige Inkubation mit Alexa Fluor 488- oder FITC-konjugierten speziesspezifischen Zweitantikörpern, die nach Empfehlung des Herstellers in PBS<sup>-</sup> verdünnt wurden. Zum Abschluß wurden die Zellen erneut gewaschen und mit Fluoreszenz-Erhaltungspuffer überschichtet, wobei die Zellkerne mit Propidium-Iodid gefärbt wurden. Die Auswertung der Tests erfolgte an konventionellen oder konfokalen Fluoreszenzmikroskopen.

### **3.2.15 *In vitro*-Translation**

Zur *in vitro*-Synthese von viralen Proteinen wurden die untersuchten offenen Leseraster zunächst hinter den T7-Promotor des Expressionsvektors pcDNA-3 kloniert und anschließend mit einem zellfreien Retikulozytenlysat-System (TNT coupled Reticulocyte Lysate System) inkubiert. Hierzu wurde 1 µg Plasmid-DNA in 8 µl DEPC-H<sub>2</sub>O mit 1 µl Reaktionspuffer, 0,5 µl Aminosäuremischung ohne Methionin, 2 µl [<sup>35</sup>S]-Methionin, 0,5 µl RNase-Inhibitor (Rnasin), 0,5 µl T7 RNA-Polymerase (10 U/µl) und 12,5 µl Kaninchen-Retikulozyten-Lysat gemischt. Nach 90minütiger Inkubation bei 30 °C wurden 5 µl des Ansatzes durch SDS-PAGE (3.2.11.1) aufgetrennt. Die Massenbestimmung der Translationsprodukte erfolgte nach Fixierung und Fluorographie (3.2.13.3) anhand [<sup>14</sup>C]-markierter Standardproteine.

### **3.2.16 Deglykosylierung von Proteinen**

Zur Untersuchung der Glykosylierung viraler Proteine wurden zu Monolayern ausgewachsene CEK-Zellen mit ILTV infiziert (MOI = 0,1), nach Ausbildung eines deutlichen CPE ins Medium geschabt, für 5 min bei 20000 g sedimentiert (Biofuge), einmal mit PBS<sup>-</sup> gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in einem möglichst kleinen Volumen PBS<sup>-</sup> aufgenommen. Die Zellsuspension wurde durch Ultraschallbehandlung homogenisiert und ihr Proteingehalt bestimmt (3.2.17.3). Anschließend erfolgte ein Verdau mit verschiedenen Glykosidasen, wobei als Kontrolle jeweils ein Parallelansatz auf die gleiche Art ohne Zusatz von Enzymen inkubiert wurde. Daraufhin wurden die viralen Proteine mit TCA gefällt (3.2.16.3), durch SDS-PAGE getrennt (3.2.11.1) und durch Western Blot-Analysen (3.2.12) charakterisiert.

#### **3.2.16.1 Abspaltung von N-Glykanen**

Vor der Deglykosylierung wurden 200 µg der Proteinsuspension mit 1,0 µl 10 % SDS versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Nach Erhöhung des Volumens auf 36 µl mit H<sub>2</sub>O wurden 100 µl 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,2), 20 µl 500 mM EDTA (pH 8,0), 40 µl 6 % (w/v) CHAPS und 4 µl Endoglykosidase H (5 U/ml) oder PNGase F (1 U/µl) zugegeben. Die Deglykosylierung erfolgte über Nacht bei 37 °C.

#### **3.2.16.2 Abspaltung von O-Glykanen**

Zur Entfernung O-glykosidisch verknüpfter Zuckerseitenketten wurden 200 µg der Probe mit H<sub>2</sub>O auf 188,8 µl aufgefüllt, mit 3,2 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2), 8 µl 100 mM CaCl<sub>2</sub>, und 4 µl Neuraminidase (1 U/ml) versetzt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 800 µl 20 mM Tris-Phosphat (pH 7,4) wurden die Proteine für 40 min bei 109000 g (TLA 45) sedimentiert und in 196 µl 20 mM Tris-Phosphat (pH 7,4) aufgenommen. Nach Zugabe von 4 µl O-Glycosidase (500 mU/ml) erfolgte die Deglykosylierung über Nacht bei 37 °C.

#### **3.2.16.3 TCA-Präzipitation**

Zur Proteinfällung wurden die Ansätze mit 1/10 Volumen 72 % TCA versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Bei geringen Proteinmengen wurden zusätzlich 40 µl 0,1% DOCA zugegeben. Die gefällten Proteine wurden durch Zentrifugation bei 20.000 g für 15 min sedimentiert und mit 250 µl 0,7 % TCA gewaschen. Nach

erneuter 15minütiger Zentrifugation bei 20.000 g wurden die Pellets mit 250 µl 90 % Ethanol gewaschen und anschließend in SDS-Probenpuffer aufgenommen.

### **3.2.17 Herstellung monospezifischer Antiseren**

#### **3.2.17.1 Expression und Reinigung bakterieller Fusionsproteine**

Für die Herstellung von monospezifischen Antiseren wurden die gewünschten viralen Genprodukte zunächst als Fusionsproteine in *E.coli* exprimiert. Die entsprechenden viralen Gene oder Genabschnitte wurden am 3'-Ende eines induzierbaren, vektorkodierten Gens in die verwendeten Plasmide inseriert, so daß ein durchgängiger Leserahmen entstand. Dazu wurden die Expressionsplasmidsysteme pGEX-4T-(1-3) und pET-23a-c verwendet, deren „multiple cloning sites“ jeweils um ein Nukleotid versetzt waren.

##### **3.2.17.1.1 pGEX-Expressionsplasmide**

In pGEX-4T1, -2 und -3 werden die Fremdgene als Fusionsproteine mit der Glutathion-S-Transferase von *Schistosoma japonicum* (GST; 220 Aminosäuren) unter Kontrolle eines modifizierten *lacZ*-Promotors exprimiert, welcher durch Glucose reprimierbar und durch IPTG induzierbar ist. Mit den pGEX-Expressionsplasmiden wurde der Bakterienstamm *E. coli* XL1 blue MRF' transformiert. Die Bakterienklone wurden in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 1 % Glucose bis zu einer OD<sub>660nm</sub> von 0,6 - 1 angezogen, für 10 min bei 2000 g (Megafuge) sedimentiert und anschließend in glukosefreiem Medium gleichen Volumens resuspendiert. Die Expression der Fusionsproteine wurde durch Zusatz von 1mM IPTG induziert. Nach 3 - 5 h bei 37 °C wurde die Kultur erneut zentrifugiert und das Bakteriensediment bei -20 °C gelagert.

Zur Kontrolle der Expression wurden vor und nach der Induktion Proben (0,1 OD<sub>660nm</sub>-Einheiten/Gelspur) lysiert und durch SDS-PAGE getrennt (3.2.11.1). Die Gele wurden mit Coomassie-Blau gefärbt (3.2.11.2) oder für Western Blot-Analysen (3.2.12) mit einem GST-spezifischen Antikörper verwendet.

##### **3.2.17.1.2 pET-Expressionsplasmide**

Im pET-System können Fremdgene als Fusionsproteine mit dem N-Terminus des *Gen 10*-Produktes des Bakteriophagen T7 (T7-Tag; 11 Aminosäuren) exprimiert werden. Das Gen steht unter Kontrolle des T7-Promotors und kann nur durch die T7-RNA-Polymerase transkribiert werden. Die Klonierung erfolgte zunächst im



T7-negativen *E. coli*-Stamm XL1Blue MRF', wodurch eine Expression der möglicherweise toxischen Fusionsproteine ausgeschlossen wurde.

Zur Expression wurden die Plasmide in den *E. coli*-Stamm BL21pLysS transformiert, welcher das Gen für die T7-RNA-Polymerase unter Kontrolle des durch IPTG induzierbaren lacUV5-Promotors trägt. Vor der Induktion wird die basale Aktivität des Enzyms durch ein von einem Chloramphenicolresistenz-Plasmid exprimiertes T7-Lysozym inhibiert. Aus diesem Grunde wurden die transformierten Bakterien zunächst in LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin und 34 µg/ml Chloramphenicol angezogen, anschließend sedimentiert und für die Induktion der Fusionsprotein-Expression in Medium mit 0,4 mM IPTG resuspendiert. Das weitere Vorgehen erfolgte wie oben beschrieben (3.2.17.1.1).

### **3.2.17.2 Elektroelution der Fusionsproteine**

Zur Isolierung der Fusionsproteine wurden die sedimentierten Bakterien einer 50 ml-Kultur in 4 ml SDS-Probenpuffer lysiert (Gesamtvolumen 4 ml) und in präparativen SDS-Polyacrylamidgelen getrennt (1 ml/Gel). Nach Coomassie-Färbung (3.2.11.2) wurde die Bande des Fusionsproteins aus dem Gel ausgeschnitten und in Ultrafiltrations-Gefäße in einer mit Elutionspuffer gefüllten Centrifuge-Kammer gegeben. Die Elektroelution erfolgte über Nacht bei 60 V. Anschließend wurden die Gelstücke entfernt. Die Eluate wurden in den Ultrafiltrations-Gefäßen durch Zentrifugation bei 3000 g (Eppendorf-Zentrifuge 5403) auf ein Volumen von ca. 50 µl eingengt und danach zweimal mit je 2 ml PBS<sup>-</sup> gewaschen. Abschließend wurde nach erneuter Einengung der Proteingehalt bestimmt (3.2.17.3) und das Eluat bei -20 °C gelagert.

### **3.2.17.3 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Der Proteingehalt von Lösungen wurde im „Bicichoninat“-Proteinassay (Stoschek, 1990) durch die Farbreaktion einer kupferhaltigen Lösung bestimmt. Bis zu 20 µl der Probe wurden mit 1 ml BCA-Lösung gemischt und 60 min bei 60 °C inkubiert. Anschließend wurde durch photometrische Messung der Extinktion bei 562 nm die Proteinkonzentration bestimmt. Als Standard diente eine parallel erstellte Eichreihe mit 0 - 20 µg BSA.

### **3.2.17.4 Immunisierung von Kaninchen**

Monospezifische Antiseren gegen bakterielle Fusionsproteine wurden durch Immunisierung von Kaninchen gewonnen. Für die erste Immunisierung wurden

100 µg des gereinigten Proteins mit PBS<sup>-</sup> auf ein Volumen von 500 µl verdünnt, mit 500 µl komplettem Freundschem Adjuvans emulgiert und intramuskulär appliziert. Nach 6 Wochen und dann im 4-Wochen-Abstand erfolgten weitere Immunisierungen. Hierzu wurde die gleiche Proteinmenge mit inkomplettem Freundschem Adjuvans verwendet.

Zur Kontrolle der Immunantwort wurden jeweils 3 Wochen nach Antigengabe Blutproben (ca. 6 ml) durch Punktion der Ohrvene entnommen. Zur Gerinnung wurde das Blut zunächst für 1 h bei RT und anschließend über Nacht bei 4 °C inkubiert. Der Überstand wurde entnommen und bei 1500 g für 10 min zentrifugiert (Megafuge), um Zellreste zu entfernen. Anschließend wurde das Serum zur Inaktivierung von Komplementfaktoren für 30 min bei 56 °C inkubiert.

Mittels Western Blot-Analysen (3.2.12) wurde die spezifische Serumreaktion nach jeder Blutentnahme überprüft. War keine weitere Steigerung zu erreichen, wurden die Kaninchen nach Injektionsnarkose mit 30 mg/kg Ketamin und 5 mg/kg Rompun entblutet. Das Blut wurde wie beschrieben aufbereitet und das erhaltene Antiserum bei -20 °C gelagert.

### **3.2.18 Infektionsversuche an Hühnern**

Aus SPF-Eiern wurden Hühner der Rasse „White Leghorn“ ausgebrütet und bis zu einem Alter von 8 Wochen aufgezogen. Drei Gruppen von je 12 Tieren wurden mit ILTV-A489, ILTV-ΔUL47 oder ILTV-UL47R intratracheal mit ca.  $2 \times 10^4$  pfu pro Tier infiziert. Die klinischen Symptome wurden über 10 Tage beobachtet, und der klinische Index wurde durch die Klassifizierung der Tiere als gesund (0), leicht krank (1), krank (2), schwer krank (3) oder tot (4) bestimmt. An Tag 3 und 4 nach Infektion wurde aus jeder Gruppe ein Tier seziiert und auf pathologische und histopathologische Veränderungen untersucht. Außerdem wurden zur Überprüfung der Virusausscheidung am 3., 4. und 5. Tag nach Infektion Tracheal-Tupferproben entnommen und in ZB5-Medium mit Antibiotikum-Zusatz für 2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben ultraschallbehandelt und nach einem Frier-Tau-Zyklus der Virustiter durch Plaquetests bestimmt (3.2.2.2). Zusätzlich wurden zur Gewinnung von Serum vor der Infektion sowie an Tag 17 und 24 nach Infektion Blutproben entnommen. In indirekten Immunfluoreszenztests (3.2.14) auf mit ILTV infizierten CEK-Zellen sowie auf mit UL47 transfizierten LMH-Zellen wurde die Ausprägung der Immunreaktion aller gewonnenen Seren untersucht.

28 Tage nach der Erstinfektion wurden alle überlebenden Tiere sowie fünf nicht immunisierte Kontrolltiere mit jeweils  $1 \times 10^5$  pfu des Wildtyp-Stammes A489 intratracheal infiziert. Die klinischen Symptome wurden wiederum über 10 Tage beobachtet, außerdem wurden ebenfalls Tracheal-Tupferproben an Tag 3, 4 und 5

nach Challenge-Infektion entnommen und entsprechend aufbereitet. An Tag 3 und 4 nach der zweiten Infektion wurde jeweils ein Tier jeder Gruppe seziiert, und am 28. Tag wurden alle überlebenden Tiere euthanasiert und pathologisch untersucht. Serumproben wurden am 11. und am 28. Tag nach der Challenge-Infektion gewonnen und ebenfalls in indirekten Immunfluoreszenztests überprüft.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Klonierung von UL31, UL37, UL46-49 und US4

Zur näheren Charakterisierung wurden die offenen Leseraster UL31, UL37, UL46, UL47, UL48, UL49 und US4 des ILTV-Genoms in den Plasmidvektor pcDNA3 kloniert. Dieser enthält Promotoren für die RNA-Polymerasen der Bakteriophagen T7 und SP6, die zur in vitro-Transkription von „sense“ und „antisense“ RNAs der klonierten Gene eingesetzt werden können. Darüber hinaus ermöglichen der *immediate-early*-Promotor des HCMV und ein Polyadenylierungssignal die Proteinexpression in eukaryontischen Zellen (Abb. 9 - 12). Mit Ausnahme von US4 wurden die viralen Gene zunächst mittels PCR aus genomischer ILTV-DNA amplifiziert, wobei die in Tabelle 1 angegebenen Primer verwendet wurden. Über diese wurden an den Enden der amplifizierten DNA-Fragmente artifizielle Restriktionsenzym-Schnittstellen eingeführt, welche die Klonierung erleichterten.

Die gespaltenen PCR-Produkte wurden isoliert und in den Vektor pcDNA3 inseriert, der mit den gleichen Enzymen oder solchen, die kompatible Fragmentenden erzeugten, verdaut worden war. Anschließend wurden die viralen Insertfragmente der erhaltenen Plasmide mit Hilfe T7- und SP6-Promotor-spezifischer Primer ansequenziert.

Während die Insertsequenzen von pcDNA-IUL46, -IUL47, -IUL48 und -IUL49 soweit lesbar mit den publizierten Daten übereinstimmen, wurden bei UL31 und UL37 signifikante Unterschiede zur veröffentlichten DNA-Sequenz des australischen ILTV-Stammes SA-2 (Johnson, 1999) festgestellt. Deshalb wurden die UL31- und UL37-Gene unseres ILTV-Stammes A489 vollständig sequenziert (GenBank-Accession No. AM083948 und AM083949), wobei jeweils zwei unabhängig voneinander generierte und klonierte PCR-Produkte verwendet wurden. Die festgestellten Unterschiede führen zu 5 bzw. 32 Austauschen in den abgeleiteten Aminosäuresequenzen von UL31 und UL37. UL31 ist außerdem infolge eines zusätzlichen Stopcodons von 332 auf 315 Codons verkürzt und UL37 durch eine Leserasterverschiebung von 891 auf 1023 Codons verlängert. Aus diesem Grund musste ein zweites, größeres PCR-Produkt des vollständigen UL37-ORFs (Tab. 1) in pcDNA3 kloniert werden. Das erhaltene Plasmid wurde als pcDNA-IUL37N bezeichnet (Abb. 10). Für einige Experimente wurde allerdings auch das zuerst hergestellte Plasmid pcDNA-IUL37A verwendet, welches ein C-terminal verkürztes UL37-Protein exprimiert (siehe 4.1.1, 4.3.1). Das gG-Gen (US4) wurde aus dem Plasmid pILT-K16 in pcDNA3 umklont. Hierzu wurde pILT-K16 zunächst mit NheI und EcoRI gespalten, Klenow-behandelt

und religiert. Hierdurch wurde das Insert auf die Nukleotide 7181 - 9519 der publizierten DNA-Sequenz der U<sub>S</sub>-Genomregion von ILTV (Wild et al., 1996) verkürzt. Die EcoRI-Schnittstelle blieb bei dieser Verkürzung erhalten, so dass US4 als 1565 bp großes EcoRI/HpaI-Fragment in das mit EcoRI und EcoRV gespaltene Plasmid pcDNA3 umkloniert werden konnte (Abb. 12).

ORF	Nukleotid-position	Primer	Nukleotid-position	Sequenz	Schnittstellen	Produktgröße
UL31	7203 - 8222(r) <sup>a</sup>	IUL31-F	8209 - 8228 (r) + 8	<u>CAGGATCCCTCGATAT</u> GTCTGACTTCCG	BamHI	1080 bp
		IUL31-R	8 + 7165 - 7182	<u>CACTCGAGCGGTGAT</u> GCAAAAACAGC	XhoI	
UL37	19948 - 22620 (r) <sup>a</sup>	IUL37-F	22609 - 22626(r)+8	<u>CAGGATCCGAAACCAT</u> GCAGGCCATC	BamHI	3130 bp (2730 bp)
		IUL37-R	5+19908 - 19930	<u>CAGCGGCCGCGCCAA</u> TAACTTTAACTAC	NotI	
		IUL37-R2	7+19512 - 19532	<u>CAGCGGCCGCGATAA</u> ATACACACCACTC	NotI	
UL46	3723 - 5396 <sup>b</sup>	IUL46-F	7 + 3713 - 3730	<u>CAAGATCTGCCCTAAA</u> CATGACCGC	BglII	1731 bp
		IUL46-R	5409 - 5428 (r) + 8	<u>CACTCGAGTGGCGAT</u> GCATTTACTGTAC	XhoI	
UL47	5210 - 7081 <sup>c</sup>	IUL47-F	8 + 5210 - 5232	<u>CAGAATTCATGACCTT</u> GCCCCATCGATAAC	EcoRI	1890 bp
		IUL47-R	7061 - 7081 (r) + 10	<u>CAGCGGCCGTCATAT</u> TTCCGATTTCCGGCG	NotI	
UL48	2530 - 3720 <sup>b</sup>	IUL48-F	8 + 2521 - 2539	<u>CAGAATTCGCGAGAAC</u> CATGGAAGAAG	EcoRI	1225 bp
		IUL48-R	3710 - 3730 (r) + 7	<u>CACTCGAGCGGTCATG</u> TTTAGGGCATAG	XhoI	
UL49	1584 - 2384 <sup>b</sup>	IUL49-F	8 + 1572 - 1595	<u>CAGAATTCAGCTCGAA</u> CACTATGTCTTACTAC	EcoRI	875 bp
		IUL49-R	2407 - 2430 (r) + 8	<u>CACTCGAGTGTTACAA</u> ATATGGCGAGGAACAC	XhoI	

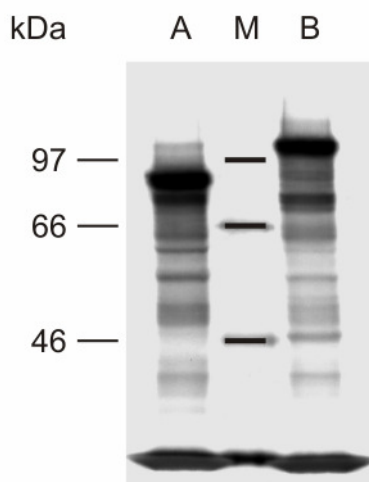
**Tab. 1: Oligonukleotidprimer zur PCR-Amplifikation von UL37 und UL46-49**

Die angegebenen Nukleotidpositionen der offenen Leseraster und Primer beziehen sich auf die GenBank-Sequenzen <sup>a</sup>AF168792 (Johnson, 1999), <sup>b</sup>Y14300 (Ziemann et al., 1998a) und <sup>c</sup>U28832 (Wild et al., 1996). Vom Gegenstrang abgeleitete Sequenzen sind mit „r“ gekennzeichnet. Die eingeführten Restriktionsenzym-Schnittstellen sind unterstrichen und Start- sowie Stopcodons der untersuchten Gene kursiv dargestellt.

#### 4.1.1 *In vitro*-Translation

Um zu zeigen, dass die untersuchten Leserahmen des ILTV-Genoms in Proteine übersetzbar sind, wurden die pcDNA-Expressionsplasmide von UL31, UL37, UL46 bis UL49 und gG (siehe Abb. 9 - 12) durch die T7 RNA-Polymerase transkribiert und unter Einbau von [<sup>35</sup>S]-Methionin im zellfreien System translatiert. Im Falle von UL37 wurden beide Plasmide, also pcDNA-IUL37N und pcDNA-IUL37A, verwendet (Abb. 2). Die *in vitro*-Translationsprodukte wurden in SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend durch Fluorographie sichtbar gemacht. In Tabelle 2 sind die anhand mitgeführter Standards bestimmten Größen der markierten Proteine den errechneten Massen der aus der DNA-Sequenz abgeleiteten viralen Genprodukte gegenübergestellt. In den meisten Fällen entsprechen die apparenten Proteinmassen annähernd den Berechnungen. Lediglich die Translationsprodukte von UL47 und US4 zeigen ein deutlich abweichendes elektrophoretisches Laufverhalten und erscheinen fast 10 kDa kleiner bzw. größer als erwartet (Tab. 2).

Die molekulare Masse des Translationsproduktes von pcDNA-IUL37N ist mit ca. 110 kDa deutlich größer als die des Produktes von pcDNA-IUL37A, welches eine Größe von ca. 90 kDa besitzt (Abb. 2). Dies bestätigt, dass der UL37-Leserahmen unseres ILTV-Stammes tatsächlich länger als ursprünglich angenommen ist.



**Abb. 2: *In vitro*-Translationsprodukte von UL37**

Die Expressionsplasmide pcDNA-IUL37A (A) und pcDNA-IUL37N (B) wurden durch T7-RNA-Polymerase transkribiert und anschließend unter Einbau von [<sup>35</sup>S]-Methionin *in vitro* translatiert. Die erhaltenen Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Fluorographie nachgewiesen. Zur Bestimmung der molekularen Massen wurden Markerproteine mitgeführt (M).

ILTV-Gen	UL31	UL37	UL46	UL47	UL48	UL49	US4
Abgeleitetes Protein As	314	1022	557	623	396	266	292
Errechnete Masse kDa	35,4	113,0	62,68	70,09	44,59	30,36	31,7
Apparente Masse kDa	34,7	109,2 (90)	59,1	61,0	43,0	33,4	40,2

**Tab. 2: *In vitro*-Translationsprodukte**

Die errechneten molekularen Massen der UL31-, UL37-, UL46 - UL49- und US4-Proteine sowie die apparenten Massen der *in vitro*-Translationsprodukte sind vergleichend dargestellt. Die Größe des Translationsproduktes von pcDNA-IUL37A, welches nicht das vollständige Gen enthält, ist in Klammern angegeben.

## 4.2 Identifizierung der viralen mRNAs von UL31, UL37, UL46-49 und US4

Die Expression von UL31, UL37, UL46-49 und US4 in ILTV-infizierten Zellkulturen wurde zunächst durch Northern Blot-Analysen überprüft (Abb. 3). Zur Anreicherung von *immediate-early* ( $\alpha$ ) und *early* ( $\beta$ ) Transkripten wurden die Zellkulturen in Gegenwart von Inhibitoren der Proteinsynthese oder der DNA-Replikation inkubiert. Späte virale Transkripte wurden nach sechsständiger ( $\gamma_1$ ) bzw. vierundzwanzigständiger ( $\gamma_2$ ) Inkubation ohne Hemmstoffe detektiert. Die Gesamt-RNA aus infizierten und nicht infizierten Zellen wurde elektrophoretisch getrennt und auf Membranen transferiert. Die Northern Blots wurden mit radioaktiv markierten gen- und strangspezifischen cRNA-Sonden hybridisiert, welche von den pcDNA-Expressionsplasmiden der einzelnen viralen Gene (Abb. 9 - 12) mit Hilfe der SP6 RNA-Polymerase *in vitro* synthetisiert worden waren. Da das Plasmid pcDNA-IgG neben dem gG-Gen auch Teile des folgenden gJ-Gens enthält (Abb. 12), mussten diese zusammen mit dem 3'-Ende des gG-Gens durch Spaltung mit XbaI und Religation entfernt werden. Das resultierende Plasmid pcDNA-IgGX enthält nur noch die Nukleotide 7181 - 7792 der publizierten DNA-Sequenz der U<sub>S</sub>-Genomregion (Wild et al., 1996) und konnte deshalb für die *in vitro*-Transkription einer ausschließlich gG-spezifischen cRNA-Sonde genutzt werden. Als Kontrolle wurde eine cRNA-Sonde des Expressionsplasmides pRc-ICP4 (Fuchs et al., 2000)

eingesetzt, welche die bekannte 4,5 kb mRNA des *immediate-early*-Proteins ICP4 von ILTV detektiert (Abb. 3).

Da die DNA-Sequenzen der untersuchten Gene bekannt sind, konnten anhand der Positionen von möglichen Startcodons bzw. TATA-Box-Elementen und Polyadenylierungssignalen die Größen der erwarteten mRNAs bestimmt werden. Diese sind in Tabelle 3 den Größen der durch Northern Blot-Hybridisierung (Abb. 3) nachgewiesenen Transkripte gegenüber gestellt, wobei sich eine gute Übereinstimmung zeigt. Allerdings sind die nachgewiesenen mRNAs aufgrund ihrer Polyadenylierung in den meisten Fällen etwas größer als berechnet. Einige der eingesetzten Sonden markieren mehrere virale Transkripte, was auf die 3'-koterminale Transkription benachbarter Gene zurückzuführen ist (Abb. 3, Tab. 3). So werden für die mRNAs von UL46 und UL48 sowie von US4 und UL47 die gleichen Polyadenylierungssignale genutzt (Abb. 11, Abb. 12). Außerdem detektieren die UL31- und UL49-spezifischen Sonden zusätzlich die koterminalen mRNAs der jeweils vorangehenden Gene UL32 bzw. UL49.5 (Abb. 9, Abb. 11). Auf einigen Blots sind darüber hinaus schwache Reaktionen mit größeren viralen Transkripten erkennbar, wie sie durch das gelegentliche Überlesen von Polyadenylierungssignalen entstehen können.

ILTV-Gen	UL31	UL37	UL46	UL47	UL48	UL49	US4
<b>Erwartete mRNA</b>	≥ 1,07 (≥ 2,85)	≥ 3,20	≥ 1,71 (≥ 2,97)	≥ 3,03	≥ 2,97	≥ 0,85 (≥ 1,33)	≥ 1,05 (≥ 3,03)
<b>Nachgewiesene Transkripte</b>	1,3 (3,2)	3,5	1,9 (3,2)	3,0	3,2	1,2 (1,65)	1,2 (3,0)

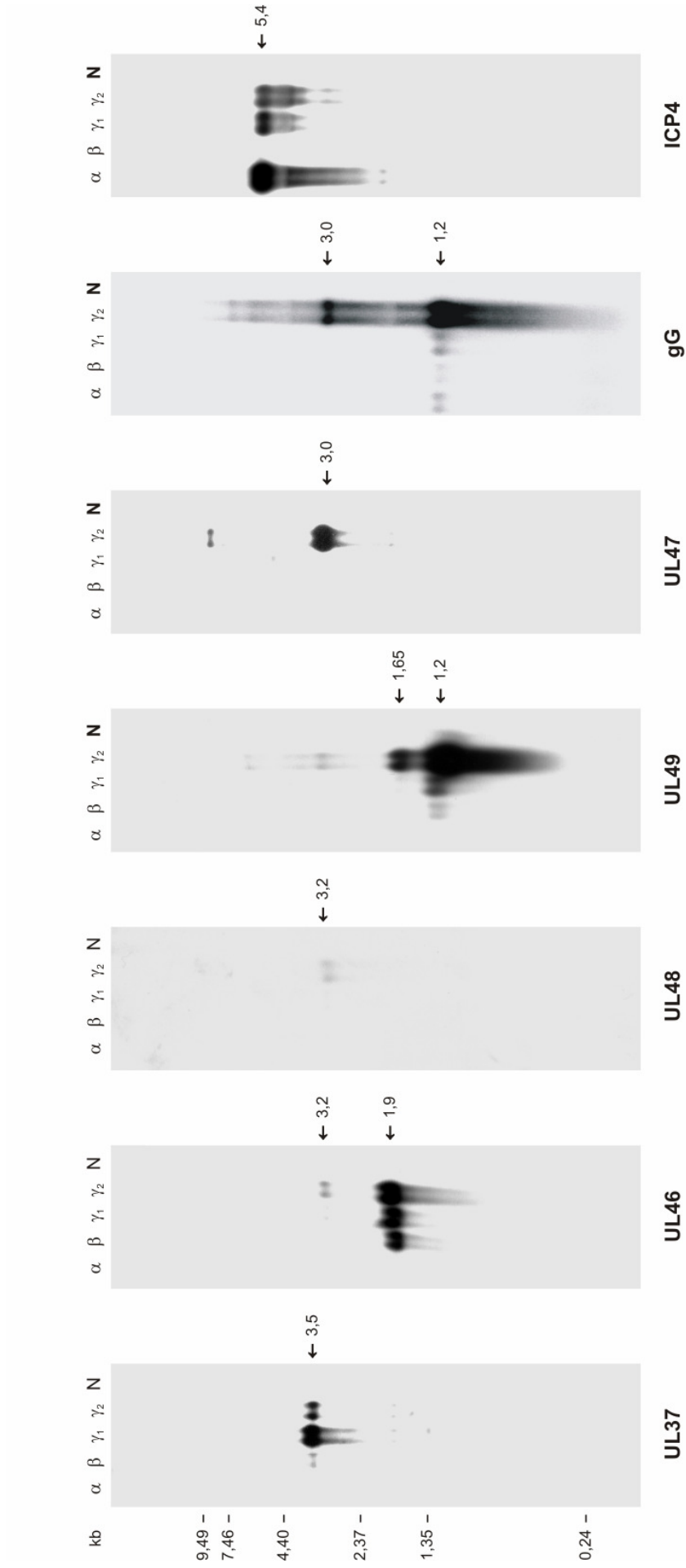
**Tab. 3: Erwartete und nachgewiesene Transkripte**

Die Größen der erwarteten mRNAs wurden aus den Abständen zwischen TATA-Box-Elementen und Polyadenylierungssignalen in der DNA-Sequenz berechnet. Die Größen der nachgewiesenen Transkripte wurden aus den in Abb. 3 dargestellten Northern Blots anhand eines mitgeführten RNA-Längenstandards ermittelt. 3'-koterminale Transkripte vorangehender Gene sind in Klammern angegeben (siehe Text).

Hinsichtlich der Expressionskinetik bestehen deutliche Unterschiede zwischen den untersuchten Genen (Abb. 3). Wie beschrieben (Ziemann et al., 1998b) akkumuliert die ICP4-mRNA von ILTV unter *immediate-early*-Bedingungen ( $\alpha$ ), also in Abwesenheit jeglicher Proteinsynthese, während das Gen in den folgenden Replikationsphasen kaum noch transkribiert wird. In geringen Mengen werden auch die Transkripte von UL46 und US4 (gG) bereits unter *immediate-early*-Bedingungen



gefunden. Die Transkription von UL31 und UL32 (nicht gezeigt), sowie von UL37, UL48, UL49 und UL49.5 beginnt in der frühen Phase ( $\beta$ ) des viralen Replikationszyklus, während die UL47-mRNA erst nach erfolgter DNA-Replikation in der späten Phase ( $\gamma_2$ ) nachweisbar ist (Abb. 3). Die schwachen Hybridisierungssignale der UL48-mRNA deuten darauf hin, dass dieses Gen zu keiner Zeit abundant exprimiert wird (Abb. 3). Die UL31- und UL32-mRNAs von ILTV werden offensichtlich in noch geringeren Mengen transkribiert, da die entsprechenden Hybridisierungssignale erst nach langer Exposition der Northern Blots erkennbar waren. Deshalb wurde auf eine bildliche Darstellung verzichtet.



**Abb. 3: Northern Blot-Analysen**

CEK-Zellkulturen wurden mit ILTV infiziert (MOI = 5) und für 6 h in Gegenwart von Cycloheximid (α), für 24 h in Gegenwart von PAA (β) oder für 6 h (γ1) bzw. 24 h (γ2) ohne Hemmstoffe inkubiert. Die Gesamt-RNA aus infizierten und nicht infizierten (N) Zellkulturen wurde in 0,8 % Agarosegelen aufgetrennt, auf Membranen transferiert und mit genspezifischen cRNA-Sonden hybridisiert. Die Größen der nachgewiesenen Transkripte sind angegeben.

## 4.3 Identifizierung der viralen Proteine

### 4.3.1 Herstellung monospezifischer Antiseren

Um die von UL31, UL37, UL46 bis UL49 und US4 kodierten Proteine in ILTV-infizierten Zellen nachweisen zu können, wurden monospezifische Antiseren benötigt. Die genannten Leseraster wurden hierzu in die Vektoren pGex4T1 oder pET23a kloniert (Tab. 4), welche eine Expression von Fusionsproteinen mit der GST von *Schistosoma japonicum* bzw. einem Fragment des Gen 10-Proteins des Bakteriophagen T7 in *E. coli* erlauben. Diese wurden zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt.

Mit Ausnahme von UL46 und US4 (gG) wurden alle viralen Gene aus den beschriebenen pcDNA-Expressionsplasmiden (Kap. 4.1) umkloniert. UL46 wurde als BglII/XhoI-verdautes PCR-Produkt (Tab. 1) in den mit BamHI und XhoI gespaltenen Vektor pET23a kloniert (Abb. 11). In den gleichen Vektor wurden auch UL47 und UL48 als BamHI/NotI- bzw. EcoRI/XhoI-Fragmente inseriert (Abb. 11, 12). Die 5'-terminalen 905 Codons von UL37 wurden als BamHI/NotI-Fragment aus pcDNA-IUL37A in den entsprechend gespaltenen Vektor pGex4T1 umkloniert (Abb. 10), in welchen auch die vollständigen UL31- und UL49-Leseraster als BamHI/XhoI- bzw. EcoRI/XhoI-Fragmente inseriert wurden (Abb. 9, 11). Aus dem Plasmid pILT-K16 wurde der 3'-terminale Teil des gG-Gens (US4) als 1085 bp großes XhoI/EcoNI-Fragment isoliert und nach Auffüllung der nicht kompatiblen Enden mit dem XhoI/Tth111-gespaltenen Vektor pGex4T1 ligiert (Abb. 12). Das erhaltene Plasmid kodiert lediglich für die Aminosäuren 33 - 292 von gG. Der für das N-terminale Signalpeptid kodierende Genabschnitt war entfernt worden, da hydrophobe Aminosäuresequenzen häufig die Proteinexpression in Bakterien behindern.

Aufgrund der unbefriedigenden Expression der vollständigen UL31-, UL46- und UL47-Leseraster in *E. coli* mussten die Inserts der entsprechenden Expressionsplasmide verkürzt werden. Von dem UL31-Leseraster wurde durch NsiI/XhoI-Spaltung, Klenow-Behandlung und Religation ein 502 bp großer Teil entfernt, UL46 wurde durch Spaltung mit SstI/XhoI um 710 bp und UL47 durch Spaltung mit XhoI um 1397 bp verkürzt (Abb. 9, 11, 12). Die in den Plasmiden enthaltenen Codonbereiche der einzelnen ILTV-Gene sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Alle Expressionsplasmide wurden durch Restriktionsenzymanalysen charakterisiert und die korrekte Fusion der bakteriellen und viralen Leseraster durch Sequenzierung überprüft. Nach Transformation von Bakterien mit den erhaltenen Plasmiden wurde die Expression der Fusionsproteine induziert. Diese konnte nach elektrophoretischer Trennung von Lysaten induzierter und nicht induzierter Kulturen durch Coomassie-Färbung sowie Western Blot-Analysen mit GST- bzw. T7-Tag-spezifischen

Antikörpern nachgewiesen werden. Die apparenten Größen der Fusionsproteine entsprechen in allen Fällen annähernd den aus den Aminosäuresequenzen berechneten molekularen Massen (Tab. 4). Durch präparative SDS-PAGE wurden die Fusionsproteine aus den induzierten Bakterienkulturen aufgereinigt und zur Immunisierung von Kaninchen verwendet. Hierzu wurden den Tieren in vierwöchigem Abstand 100 µg des gereinigten Antigens intramuskulär injiziert, bis nach 4 - 6maliger Immunisierung in Western Blot-Analysen keine Steigerung der spezifischen Reaktion der gewonnenen Antiseren mit den entsprechenden Fusionsproteinen mehr erkennbar war. Die nach der Entblutung der Tiere erhaltenen Antiseren können in Verdünnungen von 1:50.000 bis 1:100.000 eingesetzt werden, und für das gG-spezifische Serum ist eine Verdünnung bis 1:1.000.000 möglich.

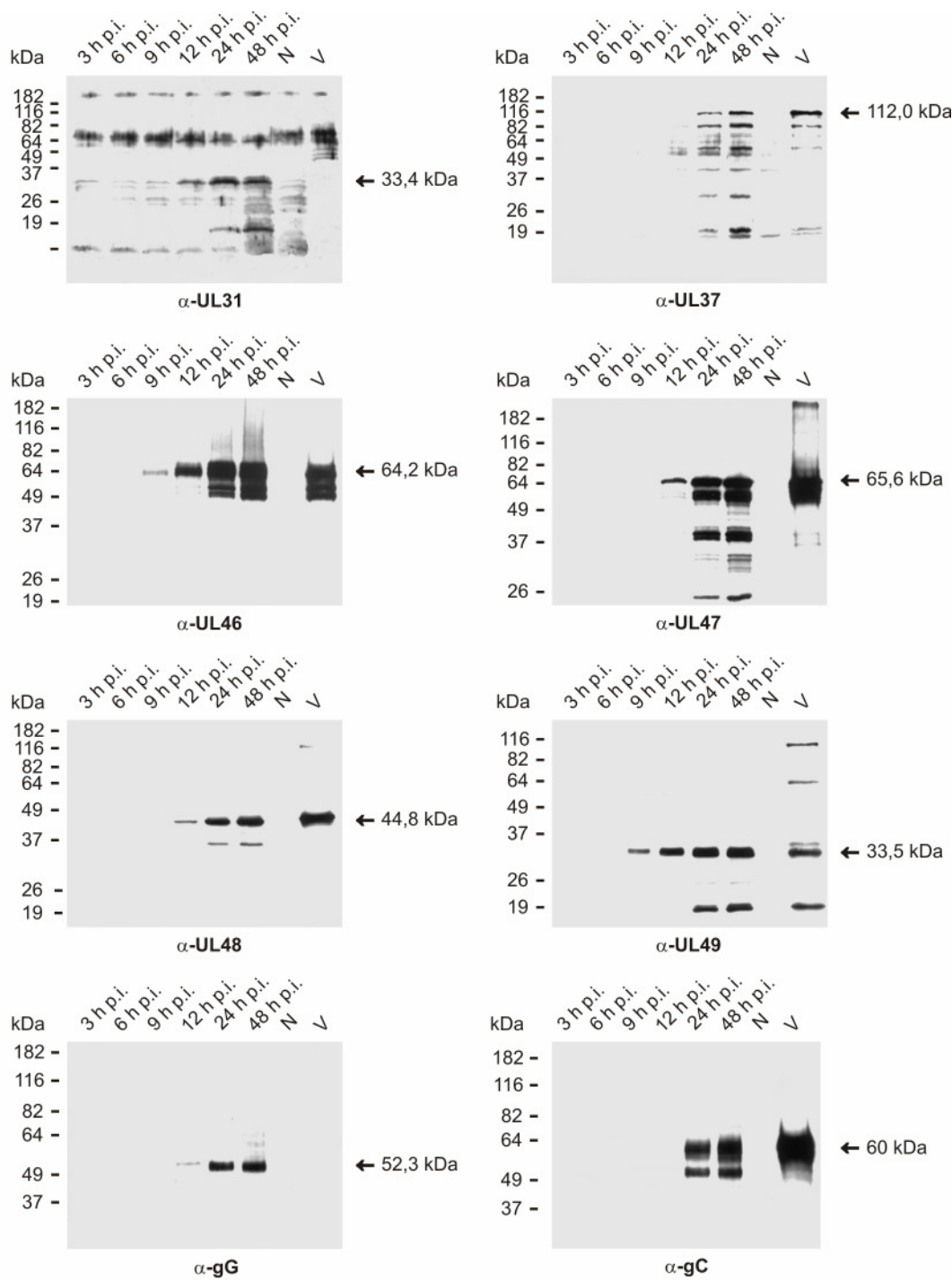
ILTV-Gen	UL31	UL37	UL46	UL47	UL48	UL49	US4
<b>Codons</b>	1 - 186	1 - 904	1 - 332	1 - 163	1 - 396	1 - 266	33 - 292
<b>Expressionsvektor</b>	pGex-4T1	pGex-4T1	PET23a	pET23a	pET23a	pGex-4T1	pGex-4T1
<b>Fusionsprotein</b>	GST	GST	T7-Tag	T7-Tag	T7-Tag	GST	GST
<b>Errechnete Masse (kDa)</b>	47,71	127,06	40,53	21,39	46,67	57,43	55,63
<b>Apparente Masse (kDa)</b>	47	129	43	24	49	59	61

**Tab. 4: Fusionsproteine**

Die angegebenen Codonbereiche der viralen Leseraster wurden 3'-terminal an das GST-Gen oder ein Fragment des Gens 10 von T7 (T7-Tag) angehängt. Die berechneten und die durch SDS-PAGE bestimmten Massen der in *E. coli* exprimierten Fusionsproteine sind angegeben.

#### 4.3.2 Nachweis der viralen Proteine in infizierten Zellkulturen und ILT-Virionen

Zum Nachweis der viralen UL31-, UL37- und UL46- bis UL49-Genprodukte sowie des Glykoproteins gG wurden die erhaltenen Antiseren zunächst in Western Blot-Analysen ILTV-infizierter und nicht infizierter CEK-Zellkulturen eingesetzt (Abb. 4). Zur Bestimmung der Expressionskinetik der einzelnen Proteine wurden die Zellen 3, 6, 9, 12, 24 und 48 Stunden nach Infektion geerntet. Neben den Zelllysaten wurden auch gradientengereinigte ILT-Virionen untersucht, um festzustellen, ob es sich bei den untersuchten Genprodukten um virale Strukturproteine handelt.



**Abb. 4: Western Blot-Analysen**

CEK-Zellen wurden 3, 6, 9, 12, 24 und 48 h nach Infektion mit ILTV (MOI = 1) geerntet. Die Lysate infizierter und nicht infizierter Zellen (N) sowie gereinigter ILTV-Partikel (V) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulosemembranen transferiert und mit monospezifischen Kaninchen-Antisera ( $\alpha$ -UL31,  $\alpha$ -UL37,  $\alpha$ -UL46 bis  $\alpha$ -UL49 und  $\alpha$ -gG) bzw. einem gC-spezifischen MAK ( $\alpha$ -gC) inkubiert. Die Bindung speziesspezifischer, Peroxidase-konjugierter Sekundärantikörper wurde durch eine Chemilumineszenzreaktion nachgewiesen. Die molekularen Massen von Markerproteinen sind angegeben (kDa). Pfeile zeigen die in Bezug auf ihre Größe den jeweils vorausberechneten Molekulargewichten ähnlichen Proteine an.

Als Positivkontrolle wurde ein monoklonaler Antikörper gegen das Glykoprotein gC von ILTV eingesetzt (Veits et al., 2003a). Dieser zeigt ebenso wie alle Antiseren spezifische Reaktionen mit Proteinen aus infizierten Zellkulturen, die in nicht infizierten Zellkulturen fehlen (Abb. 4). Mit den entsprechenden Präimmunsereen konnten die viralen Proteine dagegen erwartungsgemäß nicht detektiert werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Zur weiteren Charakterisierung der Antiseren wurden auch Radioimmunpräzipitationen aus ILTV-infizierten Zellen durchgeführt, die jedoch nur mit den UL37-, UL47- und gG-spezifischen Seren zu eindeutig positiven Ergebnissen führten (nicht gezeigt). Dagegen zeigen alle Antiseren spezifische Reaktionen in indirekten Immunfluoreszenztests, deren Auswertung durch konfokale Laserscan-Mikroskopie eine relativ genaue Lokalisierung der untersuchten Proteine in ILTV-infizierten Zellen ermöglicht (Abb. 5). Alle Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefasst und nachfolgend für die einzelnen viralen Genprodukte erläutert.

#### UL31:

Das Anti-UL31-Serum zeigt in Western Blot-Analysen eine schwache spezifische Reaktion mit einem viralen Protein, dessen Größe mit 34 kDa ungefähr der berechneten Masse von 35,4 kDa entspricht (Tab. 5). Das Protein ist in ILTV-infizierten Zellkulturen ab 9 h p.i. nachweisbar, nicht jedoch in gereinigten Virionen (Abb. 4). Indirekte Immunfluoreszenztests zeigen eine deutliche Akkumulation des UL31-Proteins an den Kernmembranen ILTV-infizierter Zellen (Abb. 5), wie sie auch für die homologen Genprodukte anderer Herpesviren beschrieben wurde (Fuchs et al., 2002; Reynolds et al., 2001).

#### UL37:

Das Anti-UL37-Serum reagiert in Western Blot-Analysen (Abb. 4) mit einem ca. 110 kDa großen Protein, das damit annähernd die erwartete Masse von 113 kDa aufweist. Daneben werden auch kleinere Proteine gefunden, die möglicherweise Degradationsprodukte darstellen. Die UL37-Genprodukte können ab 12 h p.i. in infizierten Zellkulturen und auch in ILTV-Virionen nachgewiesen werden. Die Immunfluoreszenzreaktion zeigt eine überwiegend zytoplasmatische Lokalisierung des UL37-Proteins in den ILTV-induzierten Synzytien (Abb. 5).

#### UL46:

Das gegen UL46 gerichtete Serum detektiert in Western Blot-Analysen ebenfalls reproduzierbar mehrere virale Proteine mit apparenten molekularen Massen von 50 bis 64 kDa (Abb. 4). Die stärkste Proteinbande entspricht in etwa der berechneten Masse des UL46-Translationsproduktes von 62,7 kDa. Es bleibt unklar, ob es sich bei den zusätzlich gefundenen UL46-Genprodukten um unterschiedlich prozessierte, funktionelle Formen, oder nur um Abbauprodukte handelt. UL46 kodiert für ein virales

Strukturprotein, dessen Expression in Zellkultur ab 9 h p.i. nachgewiesen (Abb. 4) und das im Zytoplasma lokalisiert werden kann (Abb. 5).

#### UL47:

Das größte in Western Blot-Analysen nachweisbare UL47-Genprodukt von ILTV hat eine apparente molekulare Masse von etwa 68 bis 70 kDa (Abb. 4), was annähernd mit der berechneten Masse von 70,1 kDa übereinstimmt. Allerdings deutet die Vergrößerung des viralen Proteins gegenüber dem entsprechenden *in vitro*-Translationsprodukt auf posttranslationale Modifikationen hin (Tab. 5). Das UL47-Protein ist erst 12 h nach Infektion von CEK-Zellkulturen nachweisbar und stellt eine Virionkomponente dar (Abb. 4). Indirekte Immunfluoreszenztests infizierter Zellen zeigen neben einer diffusen zytoplasmatischen Verteilung auch lokale Akkumulationen des UL47-Proteins in den Zellkernen (Abb. 5).

#### UL48:

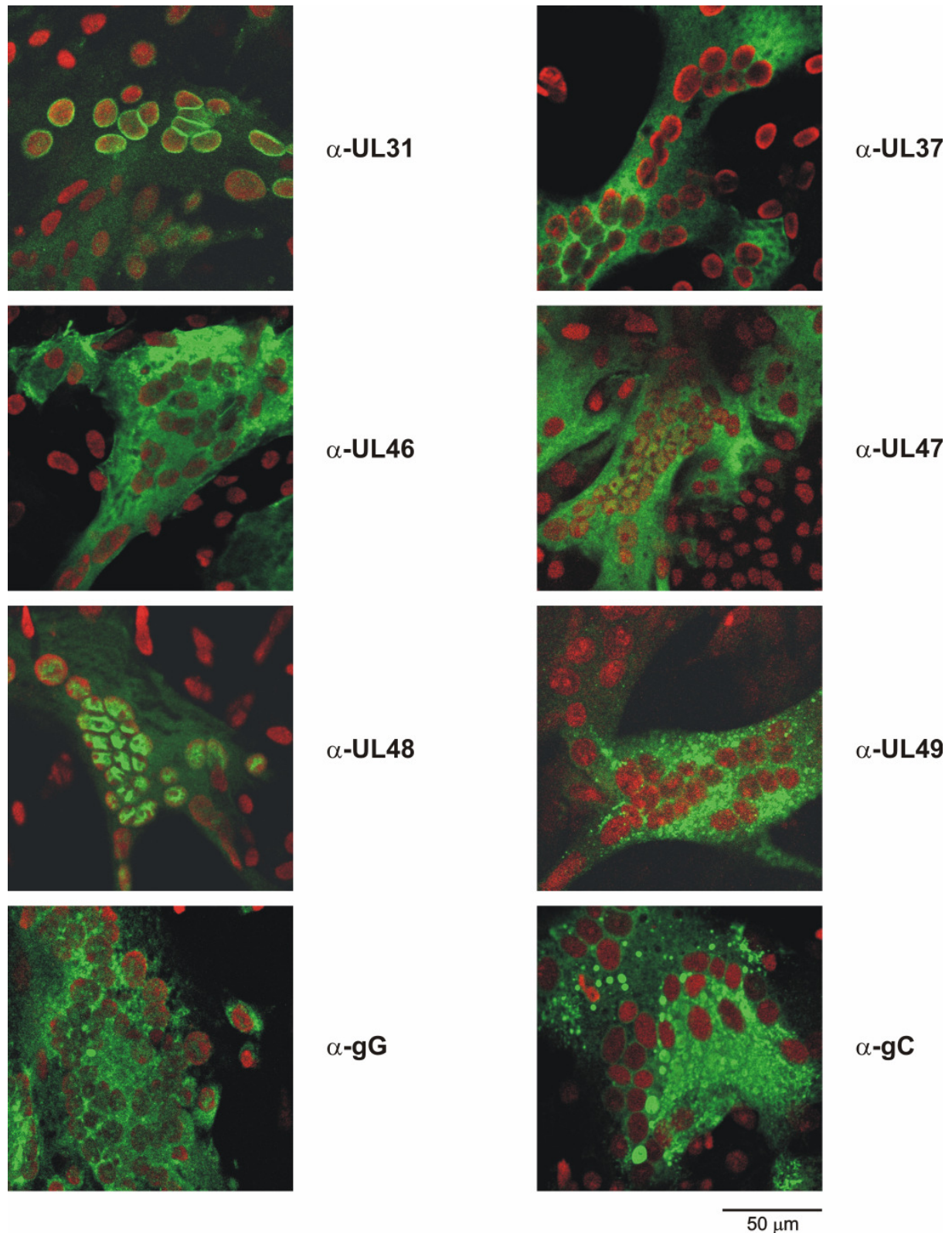
Das mit Hilfe des monospezifischen Antiserums in ILTV-infizierten Zellkulturen und ILT-Virionen detektierte UL48-Protein weist eine apparente Masse von ca. 45 kDa auf (Abb. 4), was genau der erwarteten Masse (44,6 kDa) entspricht. Das Protein ist ab 9 h p.i. in infizierten Zellkulturen nachweisbar und kann sowohl im Zytoplasma als auch in den Zellkernen lokalisiert werden (Abb. 5).

#### UL49:

Das ebenfalls in Virionen eingebaute UL49-Protein zeigt in Western Blot-Analysen eine Hauptbande mit einer apparenten Masse von 33,5 kDa und erscheint somit geringfügig größer als berechnet (30,4 kDa). Daneben wird eine zweite Bande mit einer apparenten Masse von 20 kDa detektiert. Das Protein kann ab 12 h p.i. im Zytoplasma infizierter Zellen nachgewiesen werden (Abb. 4, Abb. 5).

#### gG:

In Western Blot-Analysen weist die Hauptform des Glykoprotein gG-homologen US4-Genproduktes von ILTV (Abb. 4) eine molekulare Masse von ca. 52 kDa auf. Die gefundene Proteingröße liegt somit erheblich über der berechneten Masse des primären Translationsproduktes von 31,7 kDa und auch über der apparenten Masse des *in vitro*-Translationsproduktes von pcDNA-IgG (Tab. 5). Das US4-Protein wird ab 12 h p.i. im Zytoplasma infizierter Zellen gefunden, fehlt jedoch im Gegensatz zu den meisten anderen untersuchten Proteinen in gereinigten ILT-Virionen.



**Abb. 5: Indirekte Immunfluoreszenzreaktionen der Antiseren**

CEK-Zellkulturen wurden mit ILTV infiziert (ca. 100 pfu/well), nach 24h mit Aceton fixiert und mit den 1:200 bis 1:1000 verdünnten Antiseren ( $\alpha$ -UL31,  $\alpha$ -UL37,  $\alpha$ -UL46-49 und  $\alpha$ -gG) inkubiert. Der Nachweis der Serum-Reaktionen erfolgte durch Alexa-Fluor 488-konjugierte  $\alpha$ -Kaninchen IgG-Antikörper. Nach Propidiumiodid-Färbung des Chromatins wurden die Präparate durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet. Als Kontrolle wurde ein MAK gegen das virale Glykoprotein C eingesetzt ( $\alpha$ -gC).



Gen	Abgeleitete Proteine		<i>In vitro</i> - Translation kDa	Nachgewiesene Proteine Infizierte Zellen		Virionen kDa
	AS	kDa		kDa	K / P	
<b>UL31</b>	314	35,4	34,7	33,4	++ / +	-
<b>UL37</b>	1022	113,0	109,2	112,0	+ / ++	+
<b>UL46</b>	557	62,7	59,1	64,2	- / ++	+
<b>UL47</b>	623	70,1	61,0	65,6	++ / ++	+
<b>UL48</b>	396	44,6	43,0	44,8	++ / +	+
<b>UL49</b>	266	30,4	33,4	33,5	- / ++	+
<b>US4</b>	292	31,7	40,2	52,3	- / ++	-

**Tab. 5: Nachweis und Lokalisierung der UL31-, UL37-, UL46- bis 49- und US4-Genprodukte**

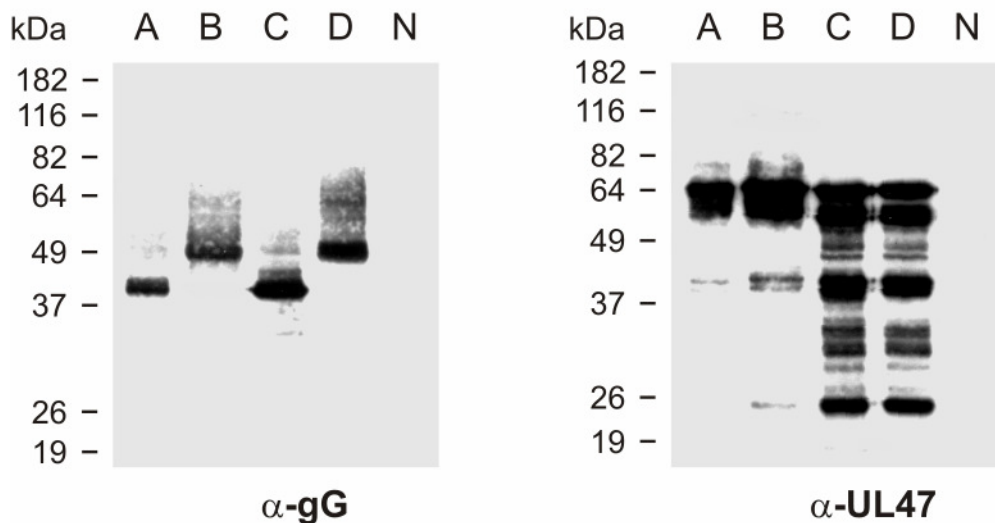
Mit Hilfe monospezifischer Antiseren wurden die viralen Genprodukte durch Western Blot-Analysen in infizierten Zellen und zum Teil auch in gereinigten ILT-Virionen nachgewiesen. Die apparenten Proteinmassen sind angegeben und werden mit den aus der Aminosäuresequenz berechneten und nach *in vitro*-Translation gefundenen Massen verglichen. Die durch indirekte Immunfluoreszenztests bestimmte Verteilung der Proteine in Kern (K) und/oder Zytoplasma (P) infizierter Zellen ist semiquantitativ dargestellt.

#### 4.3.3 Glykosylierung des US4-Genproduktes von ILTV

Das abgeleitete US4-Genprodukt von ILTV weist 4 potentielle N-Glykosylierungsstellen auf (Asn-X-Thr; Kornfeld & Kornfeld, 1985), und auch die homologen Proteine anderer Alphaherpesviren wurden als Glykoproteine charakterisiert (Crabb et al., 1992; Dall'Olio et al., 1987; Keil et al., 1996; McGeoch et al., 1987; Rea et al., 1985). Um zu prüfen, ob auch das ILTV-Protein post-translational auf diese Weise modifiziert wird, wurden infizierte CEK-Zellkulturen zunächst parallel für 24 h in Gegenwart oder Abwesenheit von 2 µg/ml Tunicamycin inkubiert, welches die N-Glykosylierung inhibiert. Western Blot-Analysen der Zelllysate mit dem hergestellten Antiserum zeigen, dass in Gegenwart des Hemmstoffs nur ein ca. 40 kDa großes US4-Protein exprimiert wird. Die reife Form hingegen weist wie oben beschrieben eine Masse von ≥ 52 kDa auf (Abb. 6). Außerdem wurden Lysate der in Abwesenheit von Tunicamycin mit ILTV infizierten

Zellen mit verschiedenen Glykosidasen inkubiert und anschließend ebenfalls im Western Blot getestet. Hierbei zeigt sich, dass durch Behandlung mit N-Glykosidase F (PNGase F), die alle N-glykosidisch verknüpften Zuckerseitenketten entfernt, die apparente Masse eines Großteils des nachgewiesenen US4-Proteins ebenfalls auf ca. 40 kDa reduziert wird (Abb. 6).

Die Behandlung der Lysate mit Endoglykosidase H, die nur N-glykosidisch verknüpfte Zuckerketten vom „high-Manose“-Typ entfernt, führt zu einer partiellen Verkürzung des US4-Proteins (nicht gezeigt). Erste Versuche zu den möglichen Effekten von Neuraminidasen und O-Glykosidasen waren nicht auswertbar. Durch Inkubation eines Kontroll-Blots mit dem UL47-spezifischen Antiserum zeigte sich, dass Expression und apparente Masse dieses ILTV-Proteins durch Tunicamycin oder Glykosidasebehandlung nicht beeinflusst werden (Abb. 6). Allerdings ist nach Übernacht-Inkubation mit oder ohne PNGase F ein vermehrter unspezifischer Abbau des Proteins zu verzeichnen (Abb. 6). Somit konnte bewiesen werden, dass das US4-Protein von ILTV N-glykosyliert ist und deshalb wie die homologen Genprodukte als Glykoprotein G bezeichnet werden kann.



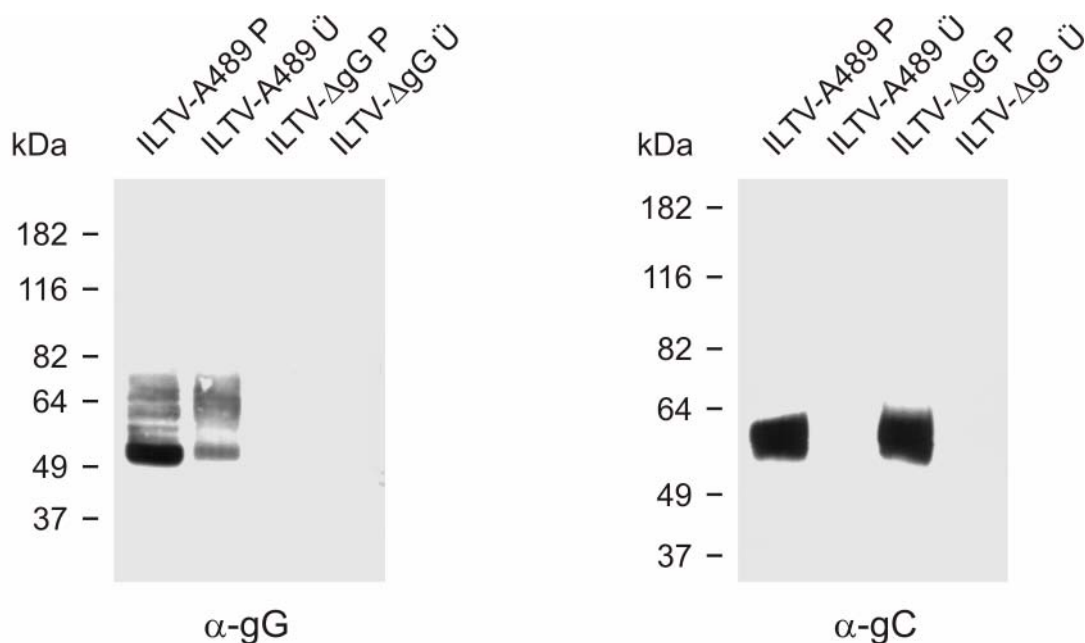
**Abb. 6: Western Blot-Analysen zum Nachweis der Glykosylierung von gG**

ILTV-infizierte (MOI = 2) CEK-Zellkulturen wurden für 24 h in Gegenwart (A) oder Abwesenheit (B - D) von Tunicamycin inkubiert. Anschließend wurde ein Teil der Lysate für weitere 24 h mit (C) oder ohne (D) PNGase F inkubiert. Die Lysate infizierter und nicht infizierter (N) Zellen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und es wurden Western Blot-Analysen mit gG- und UL47-spezifischen Antisera durchgeführt.

#### 4.3.4 Sezernierung des Glykoproteins gG von ILTV

Schon vor längerer Zeit wurde gezeigt, dass das früher als gX bezeichnete gG-homologe Protein von PrV nicht in Virionen eingebaut, sondern in den Überstand infizierter Zellkulturen sezerniert wird (Rea et al., 1985). Um zu prüfen, ob das gG von ILTV, welches ebenfalls in gereinigten Virionen nicht nachgewiesen werden kann (s.o.), auch in den Zellkulturüberstand gelangt, wurden CEK-Zellkulturen mit ILTV-Wildtypvirus bzw. einer gG-Deletionsmutante (s.u.) infiziert. Nach Ausbildung eines erkennbaren CPE wurden Zellen und Überstände getrennt voneinander geerntet und in Western Blots analysiert. Hierbei zeigte sich, dass gG sowohl in den mit Wildtyp-ILTV infizierten Zellen als auch im entsprechenden Zellkulturüberstand vorhanden ist (Abb. 7).

Im Gegensatz dazu ist das mit Hilfe eines MAK (Veits et al., 2003a) detektierte Hüllglykoprotein gC von ILTV nur in den infizierten Zellen, nicht jedoch im Kulturüberstand nachweisbar (Abb. 7). Die im Folgenden beschriebene Deletionsmutante ILTV- $\Delta$ gG (4.4) exprimiert wie erwartet kein gG, während die Expression von gC nicht beeinträchtigt ist (Abb. 7).



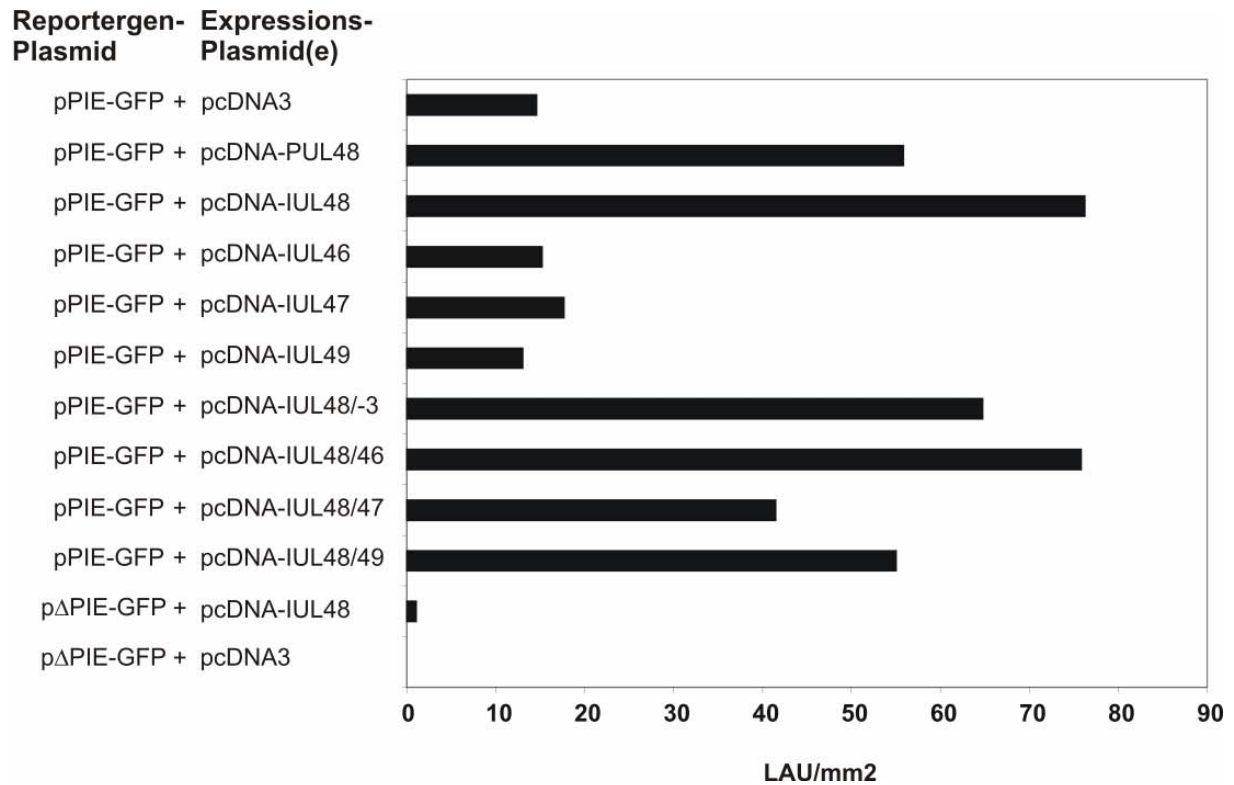
#### Abb. 7: Western Blot-Analysen zum Nachweis der Sezernierung von gG

Mit Wildtypvirus (ILTV-A489) bzw. einer gG-Deletionsmutante (ILTV- $\Delta$ gG) infizierte CEK-Zellen (P) und die entsprechenden Zellkulturüberstände (Ü) wurden 24 h p.i. separat geerntet und die enthaltenen Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurden Western Blot-Analysen zum Nachweis von gG und von gC durchgeführt.

#### 4.3.5 $\alpha$ -TIF-Funktion des UL48-Proteins von ILTV

Das UL48-Genprodukt von HSV-1 (VP16,  $\alpha$ -TIF) ist in der Lage, die Expression viraler *immediate-early*-Gene durch Interaktion mit zellulären Transkriptionsfaktoren zu stimulieren (Campbell et al., 1984). Auch bei anderen Alphaherpesviren wurde eine entsprechende Funktion der UL48-homologen Proteine nachgewiesen (Moriuchi et al., 1993; Misra et al., 1994; Fuchs et al., 2002b). Die UL46- und UL47-Genprodukte von HSV-1 sollen darüber hinaus modulierend auf die Funktion von VP16 einwirken (McKnight et al., 1987). Um festzustellen, ob die entsprechenden Genprodukte von ILTV ähnliche Eigenschaften haben, wurden Transaktivierungsstudien in LMH-Zellkulturen mit den hergestellten pcDNA3-Expressionsplasmiden (siehe 4.1) durchgeführt. Als Indikatorplasmid diente hierbei pPIE-GFP (erhalten von W. Fuchs, FLI Insel Riems), von dem das EGFP unter Kontrolle eines induzierbaren *immediate-early*-Genpromotors des PrV exprimiert werden kann. Als Kontrollen dienten ein promotorloses EGFP-Reportgenplasmid (p $\Delta$ PIE-GFP), der leere Vektor pcDNA3 und ein Expressionsplasmid für das UL48-Protein von PrV (pcDNA-PUL48). Die Zellkulturen wurden mit definierten Mengen der Plasmide in unterschiedlichen Kombinationen kotransfiziert, und nach zwei Tagen wurde die EGFP-Expression mit Hilfe eines Fluorescent Image Analyzers quantifiziert (Abb. 8).

Nach Kotransfektion von LMH-Zellkulturen mit dem Plasmid pPIE-GFP und dem Vektor pcDNA3 kann eine schwache basale EGFP-Expression festgestellt werden. Durch Koexpression des UL48-Genproduktes von PrV lässt sich diese etwa verdreifachen. Eine noch deutlichere Transaktivierung wird durch das UL48-Protein von ILTV erzielt, wohingegen die UL46-, UL47- und UL49-Genprodukte von ILTV alleine keinen Effekt zeigen (Abb. 8). Um mögliche modulatorische Wirkungen der UL46-, UL47- und UL49-Proteine von ILTV zu untersuchen, wurden die entsprechenden Expressionsplasmide zusammen mit pPIE-GFP und pcDNA-IUL48 in LMH-Zellkulturen gebracht. Hierbei zeigte sich, dass im Vergleich zum leeren Vektor pcDNA3 lediglich pcDNA-IUL46 zu einer leichten Steigerung der UL48-induzierten EGFP-Expression führt, während die UL47- und UL49-Genprodukte anscheinend hemmend wirken (Abb. 8). Zur Absicherung der Signifikanz dieser Effekte sind allerdings umfangreichere Studien notwendig. Die eindeutig nachgewiesene Induktion der EGFP-Expression durch das UL48-Protein von ILTV beruht dagegen auf einer spezifischen Interaktion mit dem *immediate-early*-Genpromotor von PrV, da Transkription und Translation des Kontrollplasmides p $\Delta$ PIE-GFP nicht signifikant beeinflusst werden (Abb. 8). Somit konnte gezeigt werden, dass auch das UL48-Protein von ILTV als Transaktivator der herpesviralen  $\alpha$ -Genexpression fungiert.



**Abb. 8: Transaktivierung des PrV-*immediate-early*-Promotors (PIE180) durch ILTV-Tegumentproteine**

LMH-Zellkulturen wurden in 6well-Platten mit den EGFP-Reportergenplasmiden pPIE-GFP oder pΔPIE-GFP und pcDNA3-Expressionsplasmiden für die UL46-, UL47-, UL48- oder UL49-Gene von ILTV kotransfiziert (2 μg DNA pro Plasmid). Als Kontrollen dienten der Vektor pcDNA3 und ein Expressionsplasmid für das UL48-Protein von PrV (pcDNA-PUL48). Nach 48 h wurde die EGFP-Expression durch Messung der relativen Fluoreszenzintensität (LAU/mm<sup>2</sup>) quantifiziert. Gezeigt sind die Durchschnittswerte aus vier unabhängig voneinander durchgeführten Transfektionsexperimenten.

## 4.4 Herstellung und Charakterisierung von Virusmutanten

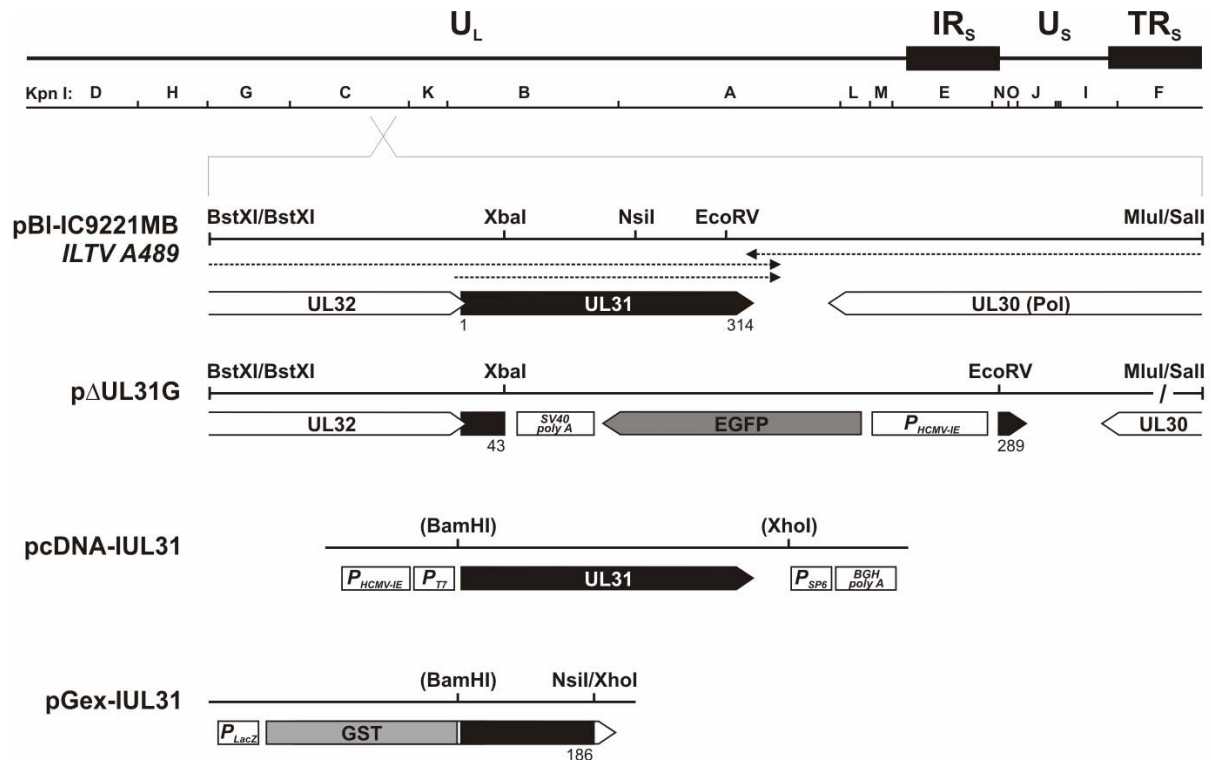
Um die Funktionen der von UL31, UL37, UL46, UL47, UL48, UL49 und US4 kodierten Proteine untersuchen zu können, sollten Virusmutanten mit Deletionen der einzelnen Gene hergestellt werden. Hierzu wurden Transferplasmide konstruiert, in welchen jeweils ein oder mehrere benachbarte Leseraster teilweise oder vollständig entfernt wurden. Diese wurden durch eine Reporter genkassette für das grün fluoreszierende Protein (EGFP) unter Kontrolle des HCMV-*immediate-early*-Genpromotors ersetzt (Abb. 10 - 13). Beiderseits des Reportergens enthalten die Plasmide mindestens 1 kbp virale DNA-Sequenzen, um eine effiziente Rekombination mit dem ILTV-Genom zu ermöglichen. Nach Kotransfektion permissiver Zellkulturen mit den Plasmiden und infektiöser Virion-DNA sollte eine schnelle Selektion und Isolation der entstandenen Virusrekombinanten durch Fluoreszenzmikroskopie infizierter Zellkulturen möglich sein. Anschließend sollten aus diesen Rekombinanten unter Verwendung weiterer Transferplasmide Deletionsmutanten ohne Fremdgeninsertion sowie Virusrevertanten hergestellt werden. Mit deren Hilfe sollte geprüft werden, ob beobachtete Replikationsdefekte tatsächlich auf die Deletion der untersuchten Gene zurückzuführen waren. Leider gelang die Isolierung von Deletionsmutanten und entsprechenden Revertanten bislang nur für die ILTV-Gene UL47 und US4 (gG).

### 4.4.1 Konstruktion der Transferplasmide

Die zur leichteren Identifizierung der gewünschten Virusmutanten eingesetzte EGFP-Expressions-kassette wurde im Falle des Deletionsplasmides für die benachbarten UL47- und US4-Leseraster als 1634 bp großes AflIII/AseI-Fragment aus dem Vektor pEGFP-N1 isoliert. Für alle anderen Konstrukte wurde ein 1623 bp großes EcoRV/XbaI-Fragment aus dem Plasmid pBI-GFP (Fuchs & Mettenleiter, 1999) verwendet. Vor der Insertion in die klonierte ILTV-DNA wurden nicht kompatible Einzelstrangüberhänge der Restriktionsfragmente durch Klenow-Behandlung aufgefüllt beziehungsweise abgedaut. Dies war auch bei einigen der vorangehenden Klonierungsschritte notwendig.

Für die Konstruktion eines UL31-Deletionsplasmids wurde zunächst ein ca. 9,2 kbp großes ClaI-Fragment des ILTV-Genoms in pBluescript SK(-) kloniert. Um unerwünschte Restriktionsenzym-Schnittstellen zu entfernen, musste das Insert des erhaltenen Plasmids beidseitig verkürzt werden. Hierzu wurde pBI-IC9221 (Abb.9) zunächst mit MluI und Sall doppelgespalten und religiert. Durch anschließenden Verdau mit BstXI und erneute Religation wurde das Insert schließlich auf 3250 bp verkürzt. Zur Herstellung des Transferplasmides p $\Delta$ UL31G wurden aus dem

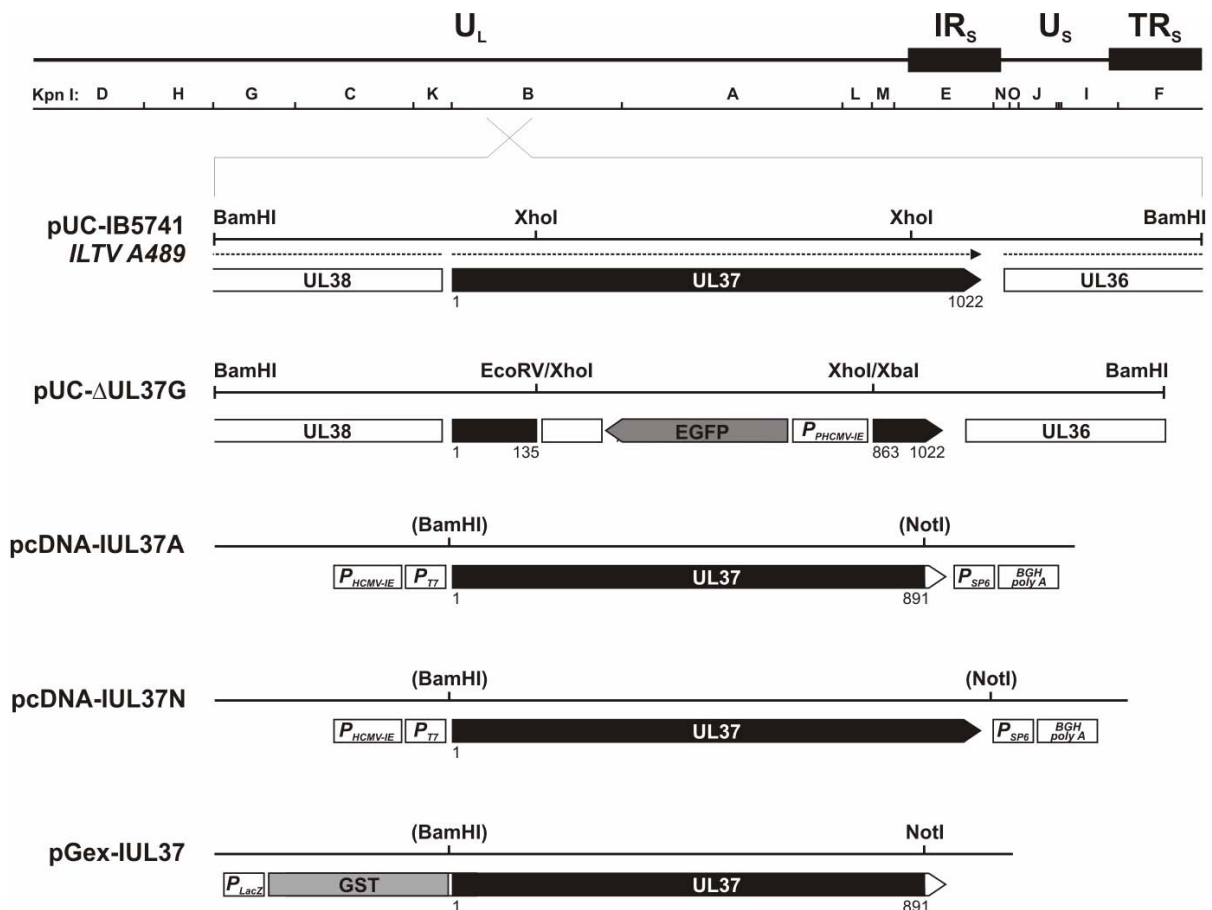
erhaltenen Plasmid pBI-IC9221MB die UL31-Codons 44 bis 288 als 728 bp großes EcoRV/XbaI-Fragment entfernt und durch die erwähnte Reporterengenkassette ersetzt (Abb. 9).



**Abb. 9: Herstellung von UL31-Deletions- und -Expressionsplasmiden**

In pBI-IC9221MB sind das UL31- sowie Teile der UL30- und UL32-Leseraster des ILTV-Genoms enthalten (Blockpfeile). Die erwarteten und zum Teil durch Northern Blot-Analysen nachgewiesenen viralen Transkripte sind dargestellt (gestrichelte Pfeile). Zur Herstellung des Transferplasmides pΔUL31G wurde das Leseraster fast vollständig entfernt und durch eine EGFP-Expressionskassette ersetzt. Außerdem wurden nach PCR-Amplifikation des UL31-Gens Expressionsplasmide (pcDNA-IUL31, pGex-IUL31) hergestellt. Das von pGex-IUL31 exprimierte GST-Fusionsprotein wurde zur Immunisierung eines Kaninchens eingesetzt. Relevante Restriktionsenzym-Schnittstellen, Promotoren ( $P_{\text{HCMV-IE}}$ ,  $P_{\text{T7}}$ ,  $P_{\text{SP6}}$ ,  $P_{\text{LacZ}}$ ) und Polyadenylierungssignale (SV40 PolyA, BGH PolyA) sowie Aminosäurepositionen im UL31-Protein sind eingezeichnet.

Als Ausgangsplasmid für die Deletion von UL37 diente pUC-IB5741, das durch Klonierung eines 5741 bp großen BamHI-Fragmentes der ILTV-DNA in pUC-19 erhalten wurde (Abb. 10). In das Transferplasmid pΔUL37G wurde die EGFP-Kassette anstelle eines 2177 bp großen XhoI-Fragmentes inseriert, das die UL37-Codons 136 - 862 umfasste (Abb. 10).



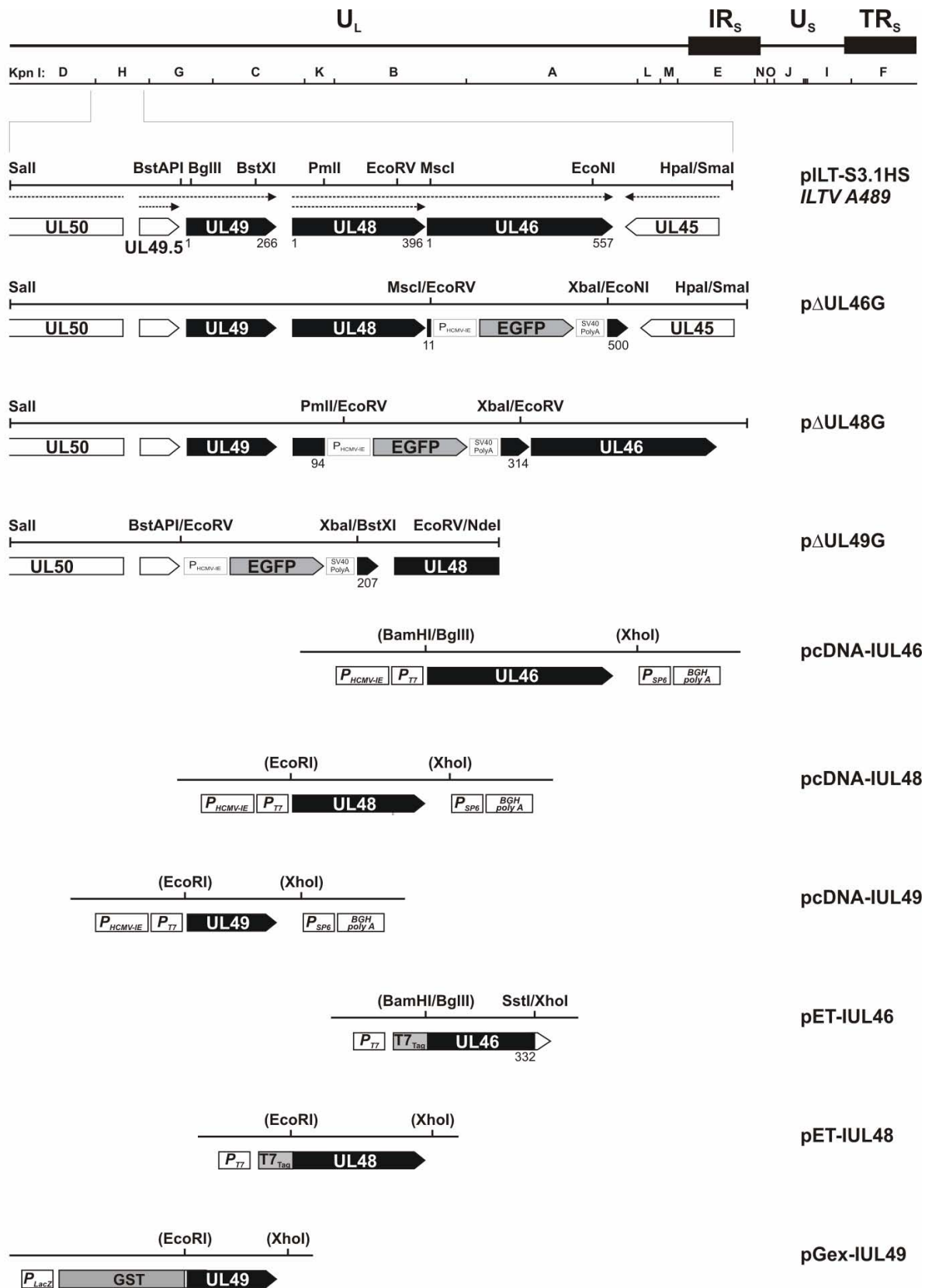
**Abb. 10: Herstellung von UL37-Deletions- und -Expressionsplasmiden**

Das in pUC-IB5741 klonierte Fragment des ILTV-Genoms enthält das UL37-Gen sowie Teile der UL36- und UL38-Leseraster (Blockpfeile). Position und Orientierung der viralen mRNAs sind dargestellt (gestrichelte Pfeile). Im Transferplasmid pΔUL37G wurden die Codons 136 - 862 des UL37-Leserasters deletiert und durch eine EGFP-Expressionskassette ersetzt. Das Expressionsplasmid pcDNA-IUL37A enthält nur die Codons 1 - 891 des UL37-Gens, während das Leseraster in pcDNA-IUL37N und pGex-IUL37 vollständig enthalten ist. Die verwendeten Restriktionsenzym-Schnittstellen sind gezeigt.



Zur Konstruktion der Transferplasmide für die Deletionen von UL46, UL48 und UL49 wurde pILT-S3.1 verwendet, welches ein 13868 bp großes Sall-Fragment des ILTV-Genoms enthält (Ziemann, 1998). Dieses wurde zunächst durch HpaI/Smal-Doppelspaltung und anschließende Religation auf 6456 bp verkürzt. Aus dem resultierenden Plasmid pILT-S3.1HS (Abb. 11) konnten die Codons 12 - 499 von UL46 als 1463 bp großes MscI/EcoNI-Fragment und die Codons 95 - 313 von UL48 als 655 bp großes PmlI/EcoRV-Fragment entfernt werden (Abb. 11). Um ein Plasmid mit geeigneten singulären Schnittstellen für die Deletion von UL49 zu erhalten, musste das Insert von pILT-S3.1 durch Doppelspaltung mit EcoRV und NdeI und anschließende Religation auf 3466 bp verkürzt werden.

Durch Verdau mit BstAPI und BstXI wurde ein 672 bp großes Fragment entfernt, das die Codons 1 - 206 des UL49-Leserasters umfasst. Anstelle der deletierten Fragmente enthalten die Transferplasmide p $\Delta$ UL46G, p $\Delta$ UL48G und p $\Delta$ UL49G die als EcoRV/XbaI-Fragment aus pBI-GFP isolierte Reportergen-kassette (Abb. 11).



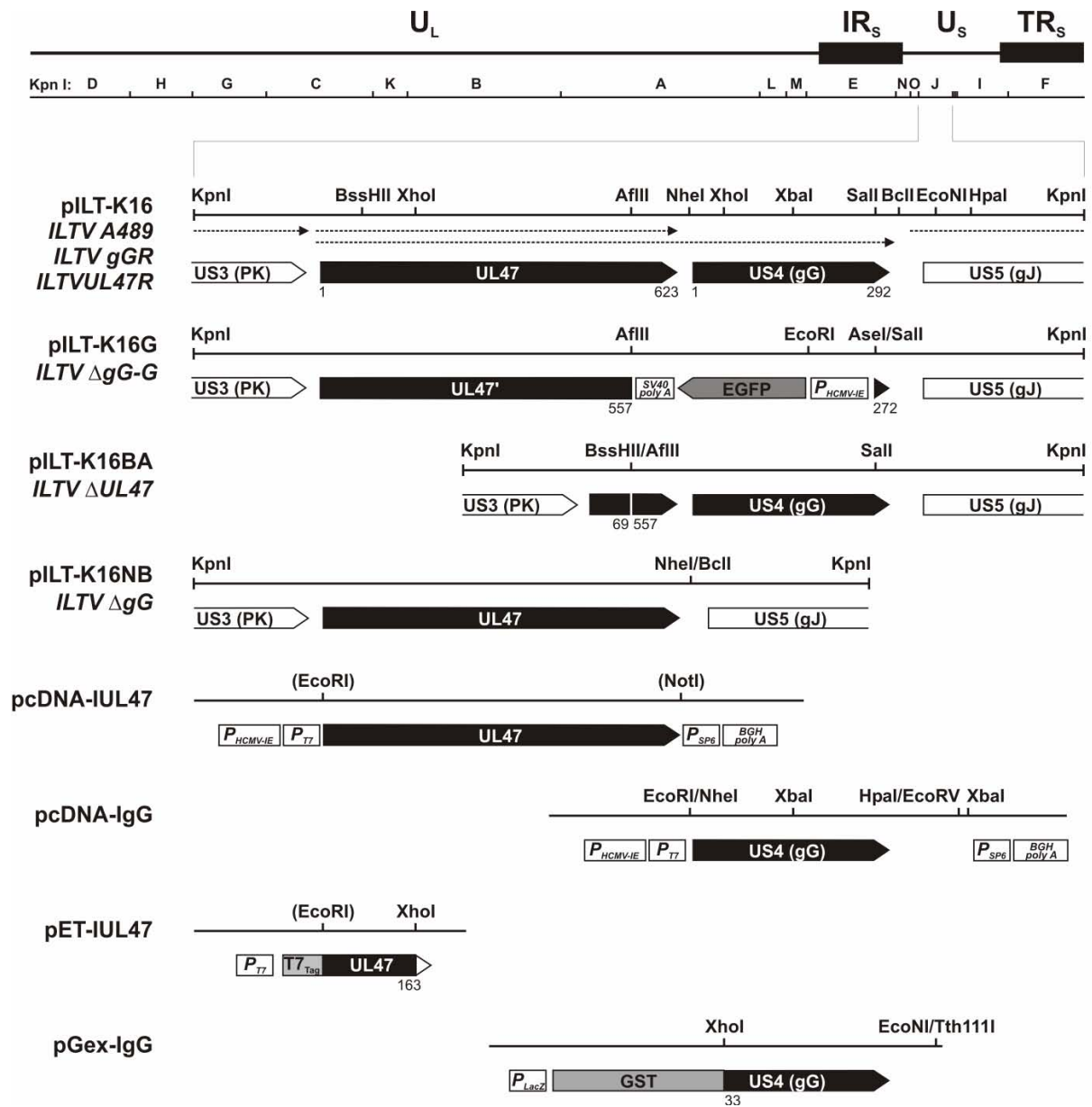
**Abb. 11: Herstellung von Deletions- und Expressionsplasmiden für UL46, UL48 und UL49**

Die in pILT-S3.1HS klonierten Leseraster des ILTV-Genoms (Blockpfeile) sowie deren Transkripte (gestrichelte Pfeile) sind dargestellt. Zur Herstellung der Transferplasmide p $\Delta$ UL46G, p $\Delta$ UL48G und p $\Delta$ UL49G wurden Teile der jeweiligen Leseraster entfernt und durch eine EGFP-Expressionskassette ersetzt. Die Expressionsplasmide pcDNA-IUL46, pcDNA-IUL48, pcDNA-IUL49, pET-IUL46, pET-IUL48 und pGex-IUL49 wurden durch Klonierung der PCR-amplifizierten Virusgene erhalten. Die in *E. coli* exprimierten T7-Tag- und GST-Fusionsproteine wurden zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt. Relevante Restriktionsenzym-Schnittstellen, Promotoren und Polyadenylierungssignale, sowie Aminosäurepositionen in den abgeleiteten ILTV-Proteinen sind eingezeichnet.

Die Transferplasmide für die UL47- und US4-Deletionsmutanten wurden aus pILT-K16 hergestellt. Aus diesem wurde zunächst ein 2656 bp großes AflIII/SalI-Fragment entfernt, das die Codons 558 - 623 von UL47 sowie die Codons 1 - 271 von US4 umfasst. Dieses wurde durch die als AflIII/Asel-Fragment aus pEGFP-N1 isolierte Expressionskassette ersetzt (Abb. 12). Um aus der mit Hilfe des erhaltenen Plasmids pILT-K16G gewonnenen ILTV-Rekombinante weitere Virusmutanten herstellen zu können, die separate Deletionen von UL47 oder US4 aufweisen, wurden zwei weitere Transferplasmide ohne Reporter-Gen-Insertion konstruiert.

Zur Herstellung des UL47-Deletionsplasmids pILT-K16BA (Abb. 12) wurde pILT-K16 in zwei getrennten Ansätzen mit AflIII bzw. BssHII gespalten, Klenow-behandelt und im Anschluß mit EcoRI verdaut. Aus dem BssHII/EcoRI-gespaltenen Plasmid wurde ein 1077 bp großes Fragment isoliert und mit dem AflIII/EcoRI-gespaltenen Plasmid ligiert. Diese Reklonierung war notwendig, da der erhaltene rechte Teil des pILT-K16-Inserts weitere BssHII-Schnittstellen aufwies. Während von UL47 nur die Codons 70 - 556 deletiert wurden, konnte das gG-Gen US4 durch Deletion eines 996 bp großen BclI/NheI-Fragmentes aus pILT-K16 vollständig entfernt werden (Abb. 12).

Die Charakterisierung der Transferplasmide erfolgte durch Restriktionsenzym-Analysen, wobei auch die Orientierung der EGFP-Expressionskassette überprüft wurde. Für die Deletionen von UL46, UL48 und UL49 wurden jeweils zwei Transferplasmide konstruiert, welche die Kassette in unterschiedlicher Orientierung enthalten. Die verwendeten UL31-, UL37- und UL47/US4-Deletionsplasmide tragen das EGFP-Leseraster in antiparalleler Orientierung zu den untersuchten ILTV-Genen (Abb. 9, 10, 12).



**Abb. 12: Herstellung von Deletionsmutanten und Expressionsplasmiden für UL47 und US4 (gG)**

In einem vergrößerten Ausschnitt der  $U_S$ -Genomregion von ILTV sind die viralen Leseraster (Blockpfeile) sowie die nachgewiesenen mRNAs (gestrichelte Pfeile) gezeigt. Durch verschiedene Modifikationen des aus pILT-K16 klonierten Genomfragmentes wurden die Transferplasmide pILT-K16G, pILT-K16BA und pILT-K16NB erhalten. Mit Hilfe von pILT-K16G wurde die Virusrekombinante ILTV- $\Delta$ gG-G hergestellt, in deren Genom Teile der UL47- und US4-Leseraster durch eine EGFP-Expressionskassette ersetzt sind. Dieses Virus wurde zur Gewinnung der Deletionsmutanten ILTV- $\Delta$ UL47 und ILTV- $\Delta$ gG, sowie der Revertanten ILTV-gGR und ILTV-UL47R verwendet. Die Plasmide pcDNA-IgG und pcDNA-IUL47 wurden für die *in vitro* Transkription und Translation eingesetzt, und mit den von pET-IUL47 und pGex-IgG exprimierten Fusionsproteinen wurden Kaninchen immunisiert. Relevante Restriktionsenzym-Schnittstellen und die in den Plasmiden enthaltenen Codonbereiche von UL47 und US4 sind dargestellt.

#### 4.4.2 Isolierung der Virus-Rekombinanten

Zur Herstellung EGFP-exprimierender ILTV-Rekombinanten wurden LMH-Zellkulturen mit den oben vorgestellten Transferplasmiden und genomischer DNA des Wildtypstammes ILTV-A489 kotransfiziert. Außerdem wurden den Ansätzen Expressionsplasmide für ICP4 und/oder das UL48-Protein von ILTV zugesetzt, da frühere Studien zeigten, dass diese die virale Genexpression aktivierenden Proteine zu deutlich erhöhten Virusausbeuten nach Transfektion führen (Fuchs et al., 2000). In fast allen Transfektionsexperimenten wurden wie erwartet infektiöse Virusnachkommen erhalten. In etwa 20 % der Versuche mit jedem der EGFP-exprimierenden Transferplasmide konnte auch ein geringer Anteil rekombinanter Viren in der Viruspopulation nachgewiesen werden, welche in infizierten Zellkulturen grün fluoreszierende Synzytien induzieren. Diese wurden geerntet, und es wurde versucht, durch Grenzverdünnungen der Viren auf in Mikrotiterplatten angezogenen CEK-Zellkulturen phänotypisch homogene ILTV-Rekombinanten zu isolieren. Während nach Kotransfektion mit dem US4- und UL47-Deletionsplasmid pILT-K16G relativ schnell die Mutante ILTV- $\Delta$ gG-G isoliert werden konnte (Abb. 12), gelang in allen anderen Fällen auch nach wiederholten Versuchen lediglich eine gewisse Anreicherung der Virusrekombinanten, jedoch keine Trennung vom parentalen Wildtypvirus. Dies deutet darauf hin, dass die UL31-, UL37-, UL46-, UL48- und UL49-Gene von ILTV eine essentielle oder zumindest sehr wichtige Rolle bei der Virusreplikation spielen könnten, so dass in Abwesenheit der entsprechenden Proteine keine effiziente Virusvermehrung mehr möglich ist.

Um mögliche Effekte der EGFP-Expression auf die Virusreplikation (Fuchs et al., 2000) auszuschließen, und um eine separate Untersuchung der UL47- und US4-Genfunktionen zu ermöglichen, wurde Virion-DNA von ILTV- $\Delta$ gG-G präpariert und zur Kotransfektion mit den Deletionsplasmiden pILT-K16BA und pILT-K16NB eingesetzt (Abb. 12). Aus den Virusnachkommenschaften konnten die Rekombinanten ILTV- $\Delta$ UL47 und ILTV- $\Delta$ gG isoliert werden. Im Gegensatz zum Ausgangsvirus exprimieren diese kein EGFP und induzieren deshalb nicht fluoreszierende Synzytien.

Die Gewinnung von Virusrevertanten erfolgte durch Kotransfektion von LMH-Zellkulturen mit genomischer DNA von ILTV- $\Delta$ gG-G oder ILTV- $\Delta$ UL47 und dem Plasmid pILT-K16, welches die authentischen UL47- und gG-Gene enthält (Abb. 12). Während die Isolierung von ILTV-gGR durch den Verlust des Reportergens erleichtert wurde, war im Falle von ILTV-UL47R eine solche Selektion nicht möglich, da ILTV- $\Delta$ UL47 kein EGFP exprimierte. Aus diesem Grund musste die nach Transfektion erhaltene Viruspopulation verdünnt, in Mikrotiterplatten vermehrt und durch Dot-Blot-Hybridisierung auf das Vorhandensein von UL47 geprüft werden. Die

Viren aus positiven Vertiefungen wurden geerntet, wieder ausgesät und getestet, bis alle Nachkommen in der Hybridisierung positiv reagierten. Auf die Herstellung einer Virusrevertante von ILTV- $\Delta$ gG wurde verzichtet, da diese Deletionsmutante keine signifikanten *in vitro*-Replikationsdefekte zeigt (s.u.).

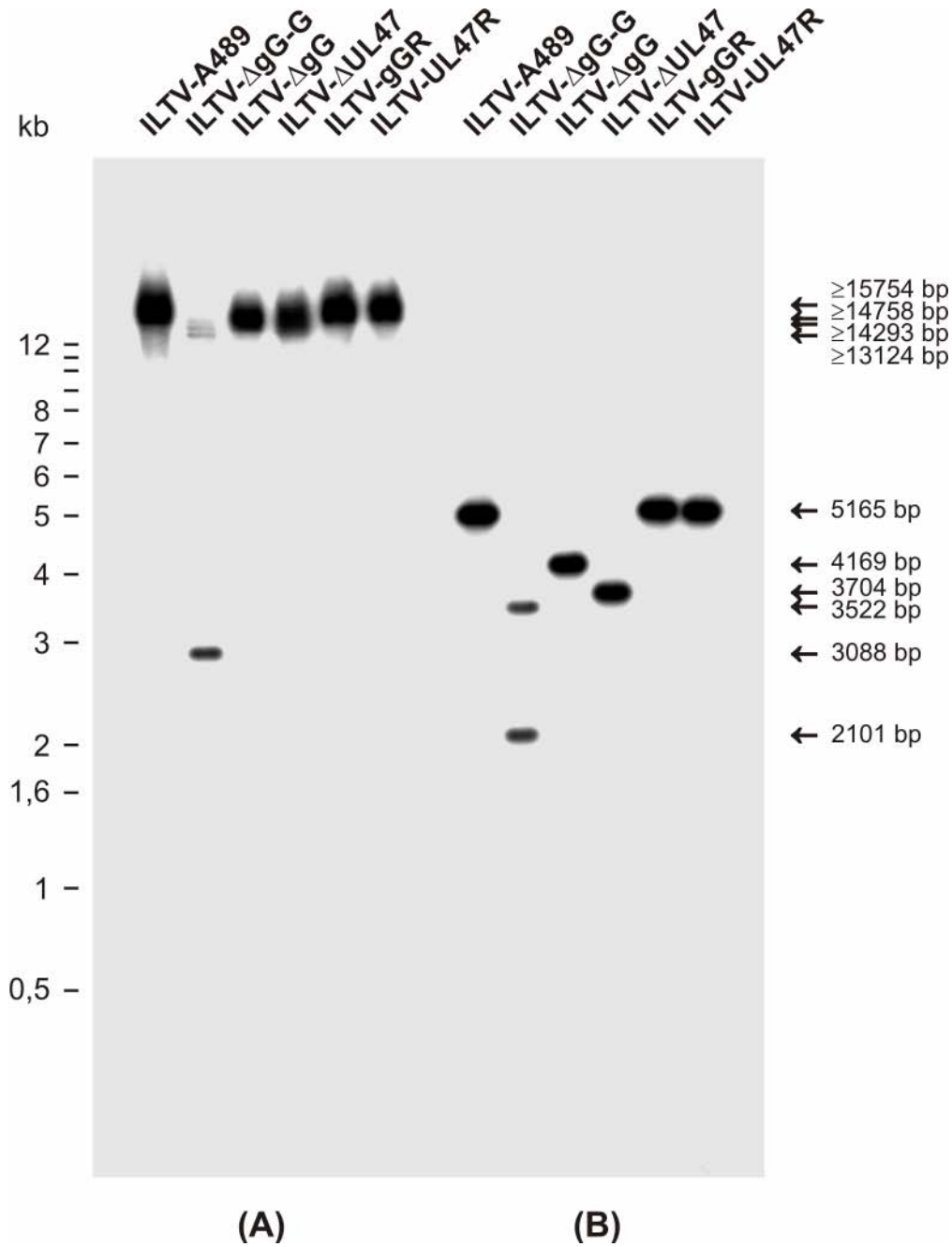
#### 4.4.3 DNA-Analysen der Virus-Rekombinanten

Jeweils ein Plaueisolat der erhaltenen Deletionsmutanten ILTV- $\Delta$ gG-G, ILTV- $\Delta$ UL47 und ILTV- $\Delta$ gG sowie der Revertanten ILTV-gGR und ILTV-UL47R wurde angezogen und weiter untersucht. Genomische DNA aller Mutanten und des parentalen Wildtypvirus wurde durch EcoRI-, BamHI- und KpnI-Restriktionsanalysen und Southern Blot-Hybridisierung charakterisiert (Abb. 13). Als Sonde diente pILT-K16 (Abb. 12), welches die vollständigen UL47- und US4-Leseraster enthält und deshalb alle relevanten Genomveränderungen der Virusmutanten detektiert. Aus der verfügbaren DNA-Sequenz (Wild et al., 1996) konnten unter Berücksichtigung der eingeführten Mutationen die erwarteten Restriktionsfragmentgrößen berechnet werden.

Erwartungsgemäß reagiert nach EcoRI-Spaltung ein sehr großes Fragment ( $\geq 15754$  bp) der Wildtypvirus-DNA mit der Sonde. Es enthält variable Kopienzahlen eines repetitiven Sequenzelementes (Wild et al., 1996) und erscheint deshalb als diffuse Bande (Abb. 13). Die detektierten EcoRI-Fragmente der beiden Revertanten weisen gleiche Größen auf wie das Fragment des Wildtypvirus. Bei den Deletionsmutanten ILTV- $\Delta$ gG und ILTV- $\Delta$ UL47 hingegen sind die Fragmente geringfügig auf berechnete  $\geq 14758$  bzw.  $\geq 14293$  bp verkürzt. Das Genom von ILTV- $\Delta$ gG-G weist eine zusätzliche EcoRI-Schnittstelle in der EGFP-Reportergen-kassette auf (Abb. 12), weshalb wie erwartet zwei Fragmente von  $\geq 13124$  bp und 3088 bp detektiert werden (Abb. 13).

Nach Spaltung der DNAs mit KpnI reagiert beim Wildtypvirus ebenso wie bei den Revertanten ein einzelnes 5165 bp großes Fragment mit der Sonde. Dagegen sind die detektierten Banden von ILTV- $\Delta$ gG und ILTV- $\Delta$ UL47 auf 4169 bzw. 3704 bp verkürzt. Bei der Rekombinante ILTV- $\Delta$ gG-G ist in dem inserierten Reportergen eine zweite KpnI-Schnittstelle enthalten, weshalb zwei kürzere Banden mit 3522 und 2101 bp nachgewiesen werden.

Die gefundenen Veränderungen in den Spaltmustern der drei Deletionsmutanten entsprechen somit genau den Erwartungen, während bei den Revertanten ILTV-gGR und ILTV-UL47R identische Restriktionsfragmente wie beim Wildtypvirus gefunden werden. Alle ILTV-Rekombinanten erscheinen genetisch homogen und zeigen keine Hinweise auf Verunreinigungen mit den jeweiligen Ausgangsviren.

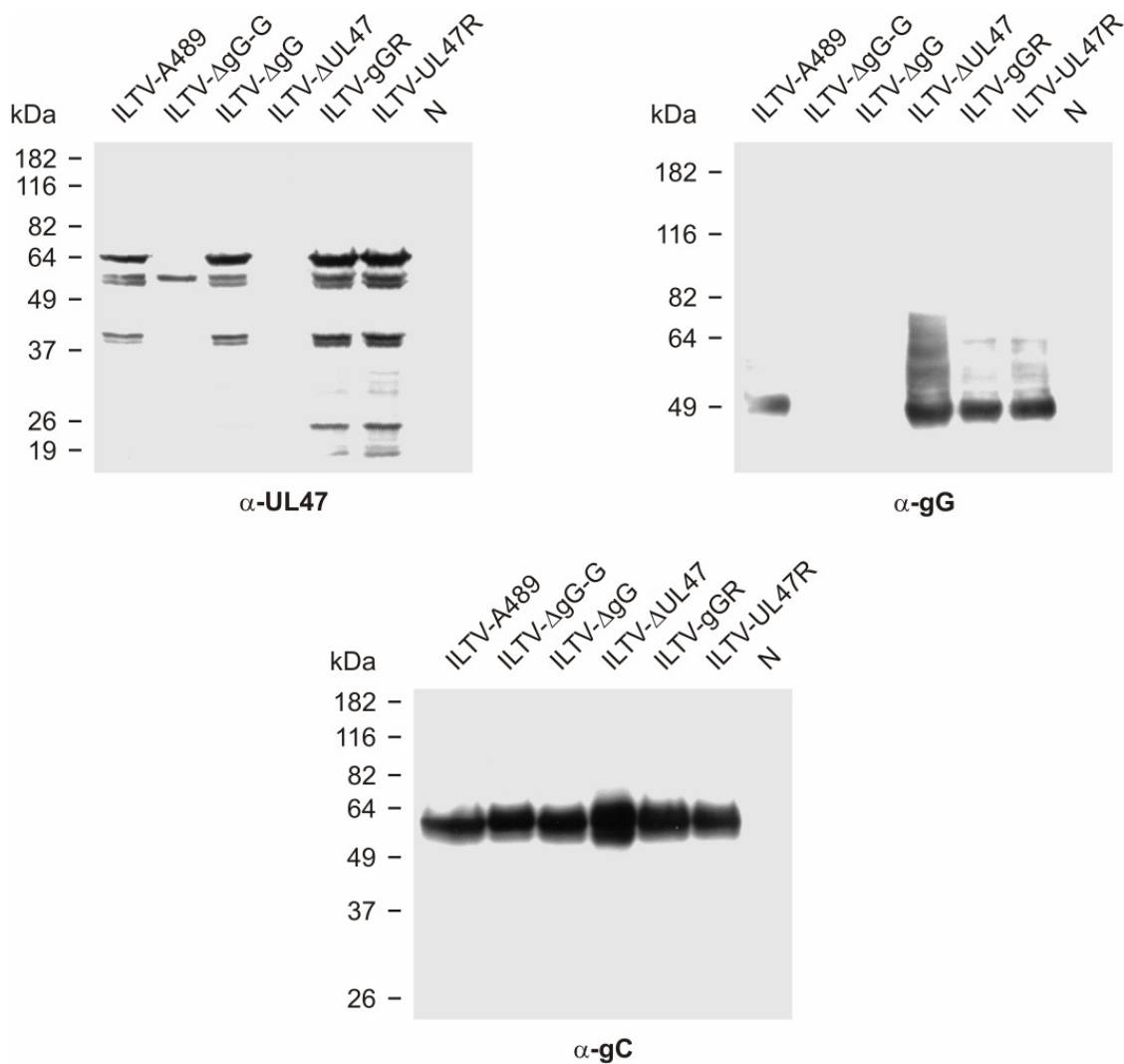


**Abb. 13: DNA-Analyse der ILTV-Rekombinanten**

DNA des Wildtypvirus (ILTV-A489) sowie der Virus-Rekombinanten (ILTV-ΔgG-G, ILTV-ΔUL47, ILTV-ΔgG, ILTV-UL47R und ILTV-gGR) wurde mit EcoRI (A) bzw. KpnI (B) gespalten und in einem 0,7% Agarosegel aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nylonmembran wurde die DNA mit dem [<sup>32</sup>P]-markierten Plasmid pILT-K16 hybridisiert. Die Größen einer mitgeführten DNA-Leiter sowie die erwarteten Größen der nachgewiesenen Restriktionsfragmente sind angegeben (kbp).

#### 4.4.4 Proteinexpression der Virus-Rekombinanten

Um die Auswirkungen der eingeführten Mutationen auf die virale Genexpression zu prüfen, wurden CEK-Zellkulturen mit Wildtypvirus oder den verschiedenen Rekombinanten infiziert und Western Blot-Analysen durchgeführt. Hierbei wurden die gegen das UL47-Protein und gG gerichteten monospezifischen Kaninchenseren verwendet (siehe 4.3.1). Als Kontrolle diente ein gC-spezifischer monoklonaler Antikörper (Veits et al., 2003a).



#### Abb. 14: Western Blot-Analysen der Virus-Rekombinanten

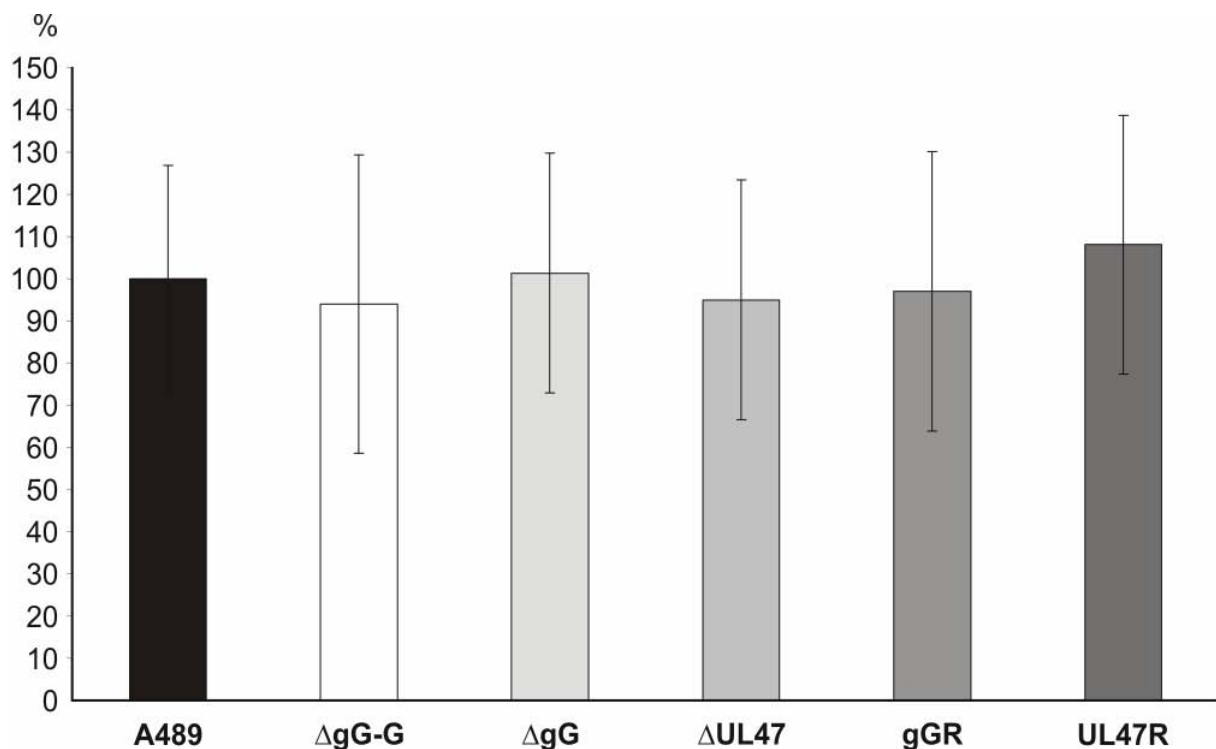
CEK-Zellkulturen wurden 24 h nach Infektion (MOI = 2) mit Wildtypvirus (ILTV-A489), den Deletionsmutanten ILTV-ΔgG-G, ILTV-ΔUL47 und ILTV-ΔgG oder den Revertanten ILTV-UL47R und ILTV-gGR geerntet. Die Lysate infizierter und nicht infizierter Zellen (N) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembranen transferiert. Die Bindung UL47-, gG- bzw. gC-spezifischer Antikörper wurde durch Inkubation mit Peroxidase-konjugierten Zweitantikörpern und anschließende Chemilumineszenzreaktion nachgewiesen. Die molekularen Massen von Markerproteinen sind angegeben (kDa).



ILTV- $\Delta$ UL47 exprimiert wie erwartet kein UL47-Protein (Abb. 14), während die Expression der anderen beiden Proteine nicht beeinträchtigt ist. Ebenso kann bei ILTV- $\Delta$ gG und ILTV- $\Delta$ gG-G keine Expression des entsprechenden Glykoproteins nachgewiesen werden, wohingegen gC unverändert exprimiert wird (Abb. 14). Während ILTV- $\Delta$ gG ein authentisches UL47-Protein bildet, wird bei ILTV- $\Delta$ gG-G aufgrund der Deletion des 3'-Endes des UL47-Leserasters (Abb. 12) ein kleineres Protein mit einer Größe von etwa 56 kDa detektiert (Abb. 14). Die Proteinexpressionsmuster der Revertanten sind nicht von denen des Wildtyps unterscheidbar.

#### 4.4.5 Plaquegrößen und Replikationskinetiken

Um die Auswirkungen der Deletionen von UL47 und US4 auf die Replikationseigenschaften von ILTV in Zellkulturen zu prüfen, wurden CEK-Zellkulturen mit dem parentalen Wildtypvirusstamm ILTV-A489, den Deletionsmutanten ILTV- $\Delta$ gG-G, ILTV- $\Delta$ UL47 und ILTV- $\Delta$ gG oder den entsprechenden Revertanten ILTV-UL47R und ILTV-gGR infiziert.



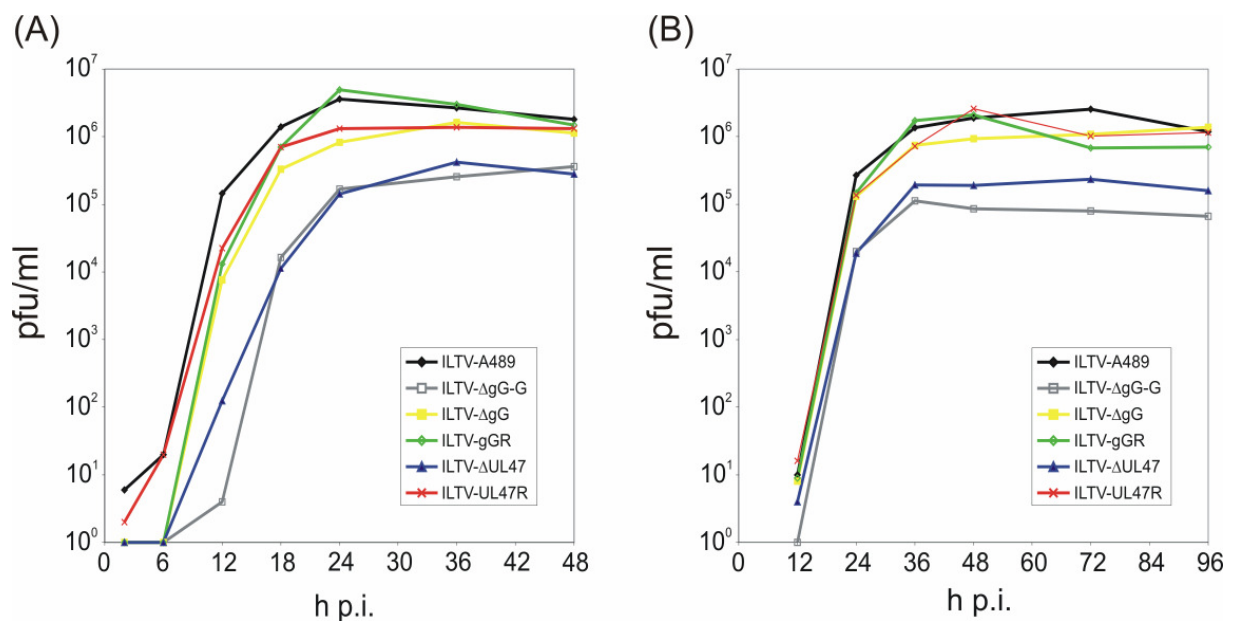
**Abb. 16: Bestimmung der Plaquedurchmesser**

CEK-Zellkulturen wurden mit Wildtyp-ILTV (A489) oder den Rekombinanten (ILTV- $\Delta$ gG-G, - $\Delta$ UL47, - $\Delta$ gG, -UL47R und -gGR) infiziert und für 2 Tage unter Methocelmedium inkubiert. Die mittleren Durchmesser von 50 Plaques pro Virus wurden bestimmt und als Prozentwerte der Wildtyp-Größe dargestellt. Die Standardabweichungen sind ebenfalls gezeigt.

Um die Plaquegrößen zu bestimmen, wurden die infizierten Zellkulturen für zwei Tage unter Methocel-haltigem Medium inkubiert und dann fixiert. Anschließend wurden die Plaques durch die indirekte Immunfluoreszenzreaktion eines gJ-spezifischen monoklonalen Antikörpers (Veits et al., 2003a) sichtbar gemacht. Im Falle von ILTV- $\Delta$ gG-G konnte die Fluoreszenz des EGFP genutzt werden. Mit Hilfe eines Meßokulares wurden die Durchmesser von 50 Einzelplaques pro Virus mikroskopisch bestimmt und die Durchschnittswerte berechnet.

Dabei zeigt sich, dass die Plaquedurchmesser der Deletionsmutanten ILTV- $\Delta$ gG-G und ILTV- $\Delta$ UL47 geringfügig auf etwa 95 % der Wildtyp-Größe reduziert sind (Abb. 16). Bei ILTV- $\Delta$ gG und den beiden Revertanten dagegen können keine signifikanten Unterschiede zum Wildtypvirus festgestellt werden (Abb. 16).

Zur Bestimmung der Ein-Schritt-Replikationskinetik wurden die Zellkulturen mit einer MOI von 5 infiziert, während für die Mehr-Schritt-Kinetik eine MOI von 0,1 gewählt wurde. Nach zweistündiger Inkubation bei 37 °C wurden nicht penetrierte Virionen durch Säurebehandlung inaktiviert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion wurden die Zellen in den Überstand geschabt und durch einen Frier-Tau-Zyklus lysiert. Anschließend wurden die Virustiter durch Plaquetests bestimmt (Abb. 17).



### Abb. 17: Replikationskurven

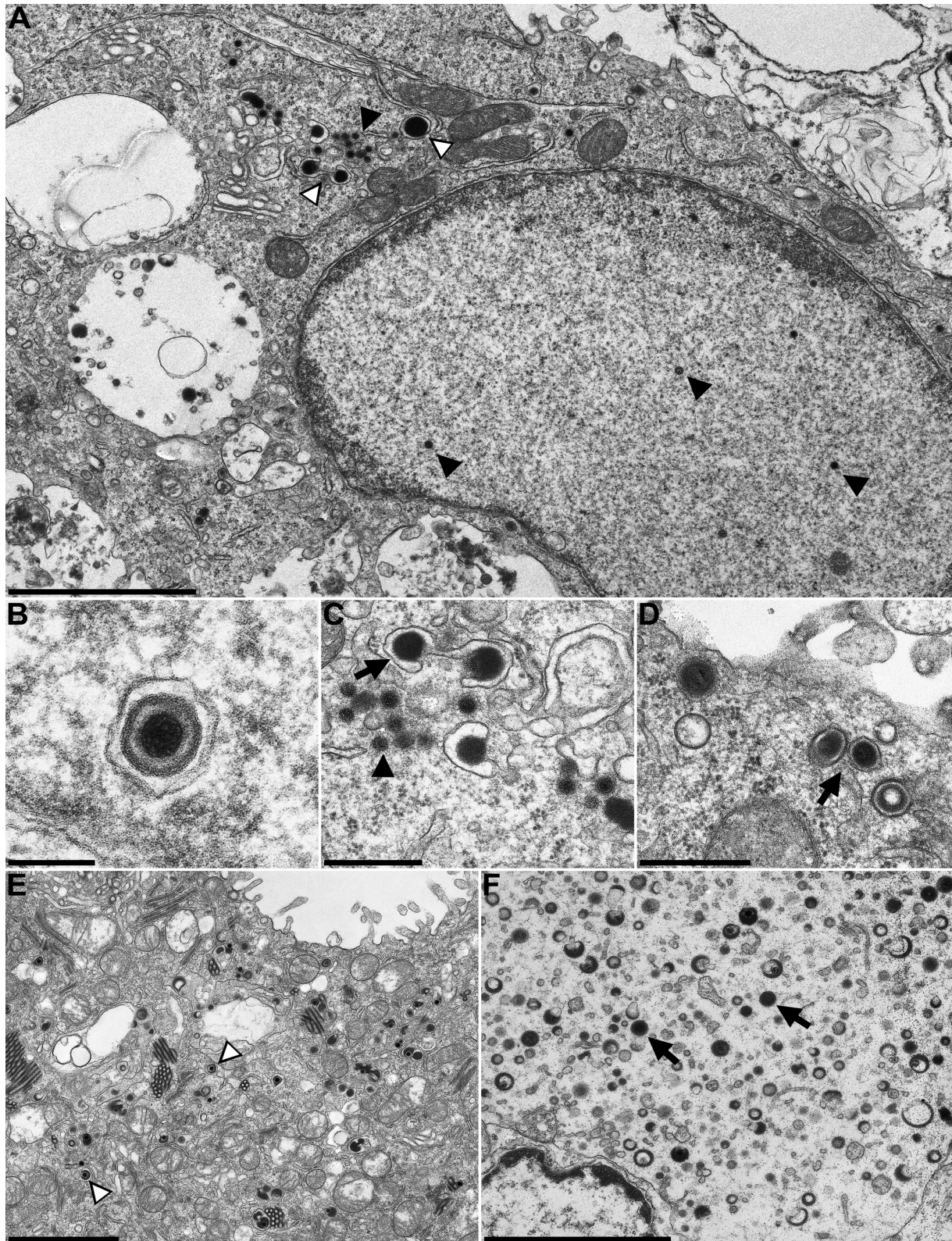
Zur Bestimmung der Einschritt- (A) und Mehrschritt-Replikationskinetik (B) des ILT-Wildtypvirus (A489) und der Rekombinanten (ILTV- $\Delta$ gG-G, - $\Delta$ UL47, - $\Delta$ gG, -UL47R und -gGR) wurden CEK-Zellkulturen mit einer MOI von 5 (A) bzw. 0,1 (B) infiziert. Nicht penetrierte Viren wurden nach 2 h inaktiviert, und nach 2, 6, 12, 18, 24, 36 und 48 h (A) bzw. nach 12, 24, 36, 48, 72 und 96 h (B) wurden die infizierten Zellen mit dem Zellkulturüberstand geerntet und durch einen Frier-Tau-Zyklus lysiert. Durch Plaquetests auf CEK-Zellkulturen wurden die Virustiter bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte aus jeweils zwei unabhängigen Versuchen.

Sowohl in den Einschritt- als auch in den Mehrschritt-Replikationskinetiken weisen die Deletionsmutanten ILTV- $\Delta$ UL47 und ILTV- $\Delta$ gG-G eine verlangsamte Replikation gegenüber dem Wildtyp-Virus auf. Auch die Endtiter dieser beiden Mutanten sind um etwa eine Zehnerpotenz reduziert. Die Deletionsmutante ILTV- $\Delta$ gG sowie die beiden Revertanten dagegen zeigen ein Wildtyp-ähnliches Replikationsverhalten (Abb. 17). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass UL47 für die *in vitro*-Replikation von ILTV relevant ist, während das gG-Gen US4 keine erkennbare Rolle spielt.

#### 4.4.6 Elektronenmikroskopische Untersuchung von ILTV- $\Delta$ UL47

LMH-Zellkulturen wurden parallel mit ILTV- $\Delta$ UL47 oder ILTV-UL47R (MOI = 2) infiziert und für 18 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, entwässert und in Epoxid-Harz eingebettet (Granzow et al., 2001). Von den Präparaten wurden Ultradünnschnitte angefertigt und im Elektronenmikroskop ausgewertet. Diese Arbeitsschritte wurden im Labor für Elektronenmikroskopie (Dr. Harald Granzow, FLI Insel Riems) durchgeführt.

In den mit ILTV- $\Delta$ UL47 infizierten Zellen ist die Neubildung von Nukleokapsiden im Zellkern und deren Ausschleusung ins Zytoplasma erkennbar (Abb. 18A), wobei primär umhüllte Virionen in Anschnitten des perinukleären Spaltes gefunden werden (Abb. 18B). Die meisten zytoplasmatischen Nukleokapside von ILTV- $\Delta$ UL47 liegen unbehüllt in der Nähe des Golgi-Apparates, und nur wenige Nukleokapside werden durch Knospung (*budding*) an Golgimembranen zu reifen Virionen umhüllt (Abb. 18A, C). Auffällig ist außerdem die Bildung zahlreicher L-Partikel in der *Trans*-Golgi-Region, welche Tegument, aber keine Kapside enthalten (Abb. 18C, D). Insgesamt erscheint die Morphogenese von ILTV- $\Delta$ UL47 in allen Stadien deutlich ineffizienter als die der Revertante ILTV-UL47R, von der zahlreiche reife Virionen in zytoplasmatischen Vesikeln gefunden werden (Abb. 18E, F). Das Replikationsverhalten von ILTV-UL47R entspricht damit dem des ILT-Wildtypvirus A489 in früheren Untersuchungen (Granzow et al., 2001).



**Abb. 18: Elektronenmikroskopische Untersuchung von ILTV- $\Delta$ UL47 und ILTV-UL47R**

LMH-Zellkulturen wurden mit ILTV- $\Delta$ UL47 (A - D) oder ILTV-UL47R (E - F) infiziert (MOI=2), 18 h bei 37 °C inkubiert und anschließend für Ultradünnschnittuntersuchungen präpariert. Unbehüllte Nukleokapside sind durch schwarze Pfeilköpfe gekennzeichnet. Weiße Pfeilköpfe markieren Umhüllungsstadien im Zytoplasma, Pfeile weisen auf L-Partikel im Zytoplasma. Balkenlängen: 2,5  $\mu$ m (A, E, F), 500 nm (C, D), 150 nm (B).

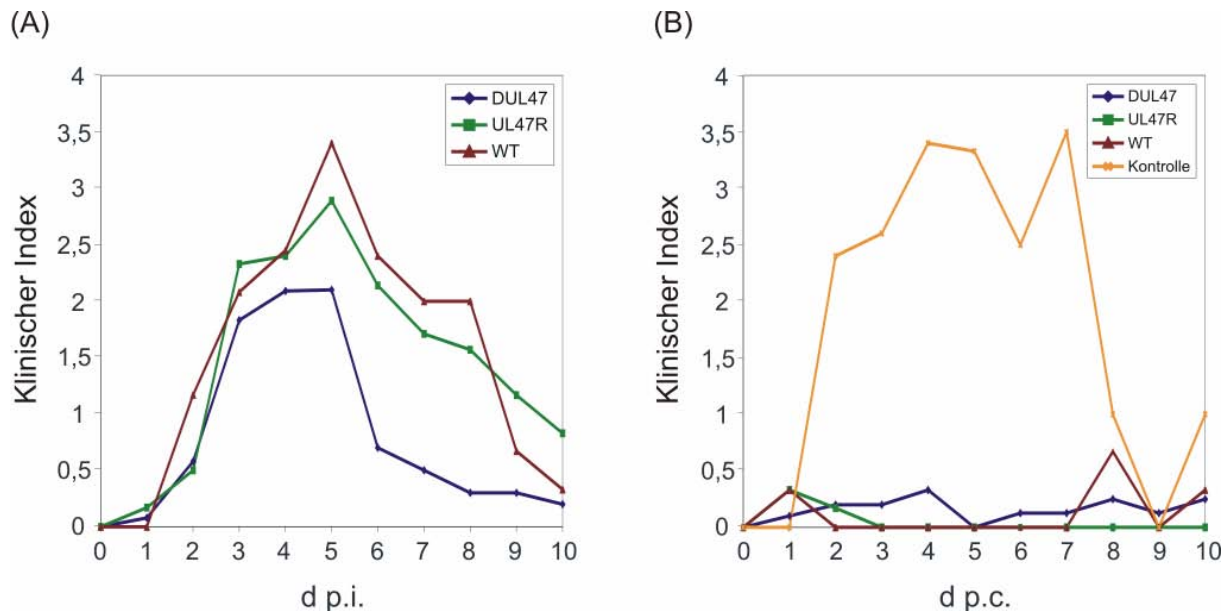
## 4.5 Charakterisierung der Rekombinante ILTV- $\Delta$ UL47 *in vivo*

Da die Deletionsmutante ILTV- $\Delta$ UL47 in den *in vitro*-Analysen deutliche Replikationsdefekte aufweist, wurde in einem Tierversuch geprüft, ob die Mutante auch *in vivo* attenuiert und UL47 somit für die Virulenz von ILTV in seinem natürlichen Wirt relevant ist. Zu diesem Zweck wurden je 12 Hühner im Alter von 8 Wochen mit  $2 \times 10^4$  pfu/ Tier des Wildtyp-Virus ILTV-A489, der Deletionsmutante ILTV- $\Delta$ UL47 oder der Revertante ILTV-gGR intratracheal infiziert. Diese Virusrevertante wurde ausgewählt, weil sie wie die eingesetzte Deletionsmutante von ILTV- $\Delta$ gG-G abstammt. Eine von ILTV- $\Delta$ UL47 abgeleitete Revertante stand zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung noch nicht zur Verfügung. Über einen Zeitraum von zehn Tagen nach Infektion wurden die klinischen Symptome der Tiere täglich beobachtet und bewertet. Am 3., 4. und 5. Tag p.i. wurden Tracheal-Tupferproben zur Bestimmung der Virusausscheidung genommen. Außerdem wurde am 3. und 4. Tag p.i. ein Tier pro Gruppe seziiert und auf pathologische und histopathologische Veränderungen hin untersucht. Die humorale Immunantwort wurde durch Blutproben vom 17. und 24. Tag p.i. kontrolliert. Um zu prüfen, ob die durch eine Infektion mit ILTV- $\Delta$ UL47 induzierte Immunantwort einen ausreichenden Schutz gegen eine folgende Infektion mit virulentem Wildtyp-Virus bietet, erfolgte 28 Tage nach der Immunisierung eine intratracheale Belastungsinfektion mit  $1 \times 10^5$  pfu ILTV-A489 pro Tier. Als Kontrolle wurden fünf nicht immunisierte Hühner auf die gleiche Weise infiziert. Wiederum wurden die klinischen Symptome über zehn Tage hinweg beobachtet und bewertet, und es wurden am 3., 4. und 5. Tag Trachealtupfer- sowie am 11. Tag Blutproben entnommen. Am 3. und 4. Tag nach der Belastungsinfektion wurde ein Tier pro Gruppe euthanasiert und pathologisch untersucht, und nach 28 Tagen erfolgte die Tötung und Sektion aller überlebenden Tiere. Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengestellt.

### 4.5.1 Klinische Bewertung

Durch Klassifizierung der innerhalb von zehn Tagen nach Erstinfektion bzw. Belastungsinfektion beobachteten Krankheitssymptome wurde ein klinischer Index erstellt. Gesunde Tiere wurden mit 0, leicht kranke Tiere mit 1, kranke mit 2, schwer kranke mit 3 und gestorbene Tiere mit 4 Punkten bewertet, und für jede Gruppe wurden täglich die Mittelwerte errechnet. Leicht erkrankte Tiere zeigten gelegentliches Husten, das Allgemeinbefinden war jedoch nicht beeinträchtigt. Bei kranken Tieren konnten ständige respiratorische Störungen, Rhinitis und allgemeine Depression beobachtet werden. Als schwer krank beurteilte Tiere zeigten schwere Dyspnoe mit geöffnetem Schnabel und blutigem Auswurf, ihr Allgemeinbefinden war

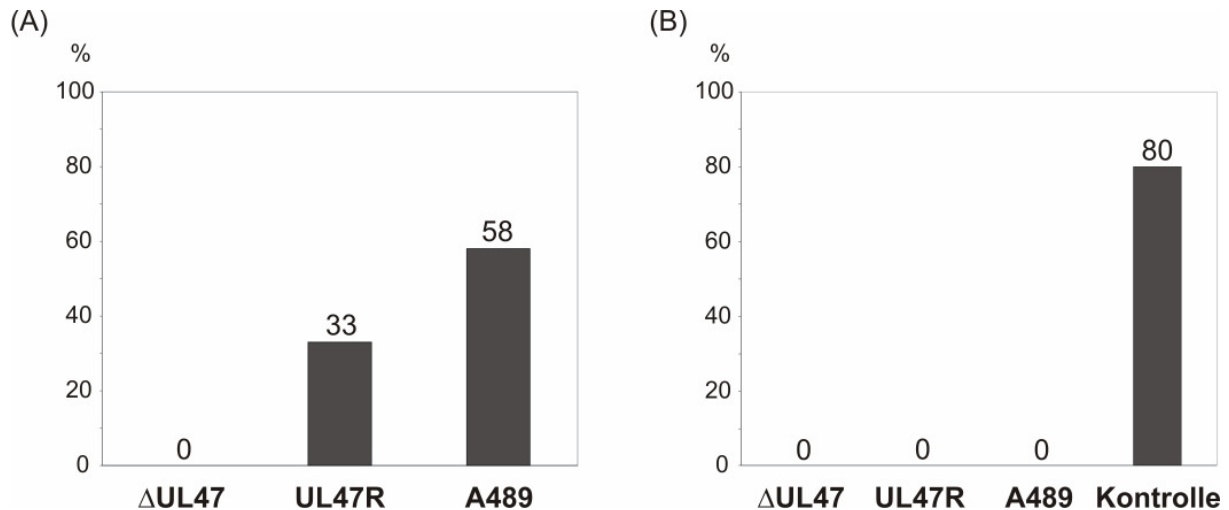
stark beeinträchtigt. Für die in Abbildung 19 dargestellten Verlaufsdiagramme wurden verendete Tiere nach dem Tag ihres festgestellten Todes nicht mehr in die Wertung einbezogen, während sie zur Ermittlung der kumulativen Indices (Tab. 6) bis zum Ende des Beobachtungszeitraums täglich weiter berücksichtigt wurden.



### Abb. 19: Klinische Bewertung

Die klinischen Symptome wurden über zehn Tage nach Infektion von Hühnern mit ILTV-A489, ILTV- $\Delta$ UL47 oder ILTV-gGR (A) sowie nach Belastungsinfektion der immunisierten Tiere und nicht immunisierter Kontrolltiere mit ILTV-A489 (B) beobachtet. Die Tiere wurden täglich als gesund (0 Punkte), leicht krank (1 Punkt), krank (2 Punkte), schwer krank (3 Punkte) oder tot (4 Punkte) klassifiziert. In den Graphiken sind die durchschnittlichen Indices für die einzelnen Tiergruppen dargestellt.

Nach der Erstinfektion erkrankten alle mit dem Wildtyp-Virus oder der Virusrevertante infizierten Tiere schwer (Abb. 19A), und die Mortalitätsraten betragen 58 bzw. 33 % (Abb. 20A). Die mit der UL47-Deletionsmutante infizierten Tiere hingegen zeigten mildere Krankheitssymptome und erholten sich rascher. Todesfälle waren hier nicht zu verzeichnen. Unabhängig von dem zur Immunisierung verwendeten Virus waren nach Belastungsinfektion der Hühner mit einer hohen Dosis des virulenten ILTV-Wildtypstammes keine nennenswerten klinischen Symptome zu beobachten, und alle immunisierten Tiere überlebten die Infektion. Dagegen erkrankten die nicht immunisierten Kontrolltiere schwer, und 4 von 5 Tieren starben (Abb. 19B, 20B). Diese Ergebnisse zeigen, dass UL47-negatives ILTV *in vivo* attenuiert ist, aber dennoch eine schützende Immunität vermitteln kann.

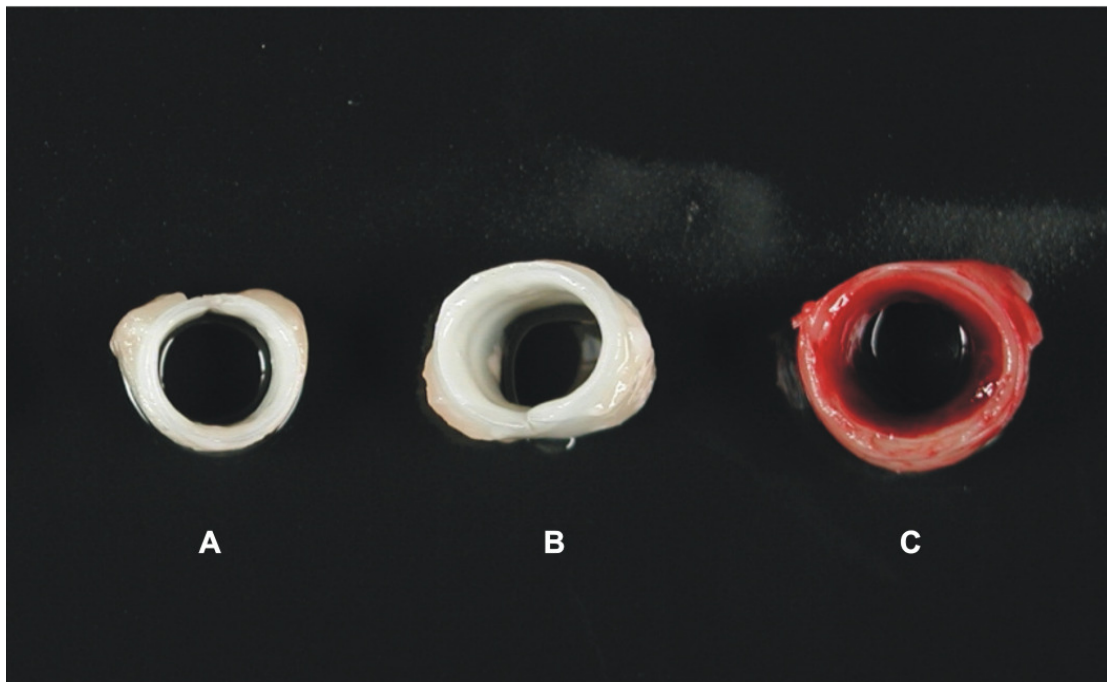


#### Abb. 20: Mortalitätsraten

Dargestellt sind die Mortalitätsraten (%) nach Infektion von Hühnern mit ILTV-A489, ILTV- $\Delta$ UL47 oder ILTV-gGR (A), sowie nach Belastungsinfektion der immunisierten Tiere und naiver Kontrolltiere mit ILTV-A489 (B).

#### 4.5.2 Pathologische und histopathologische Untersuchungen

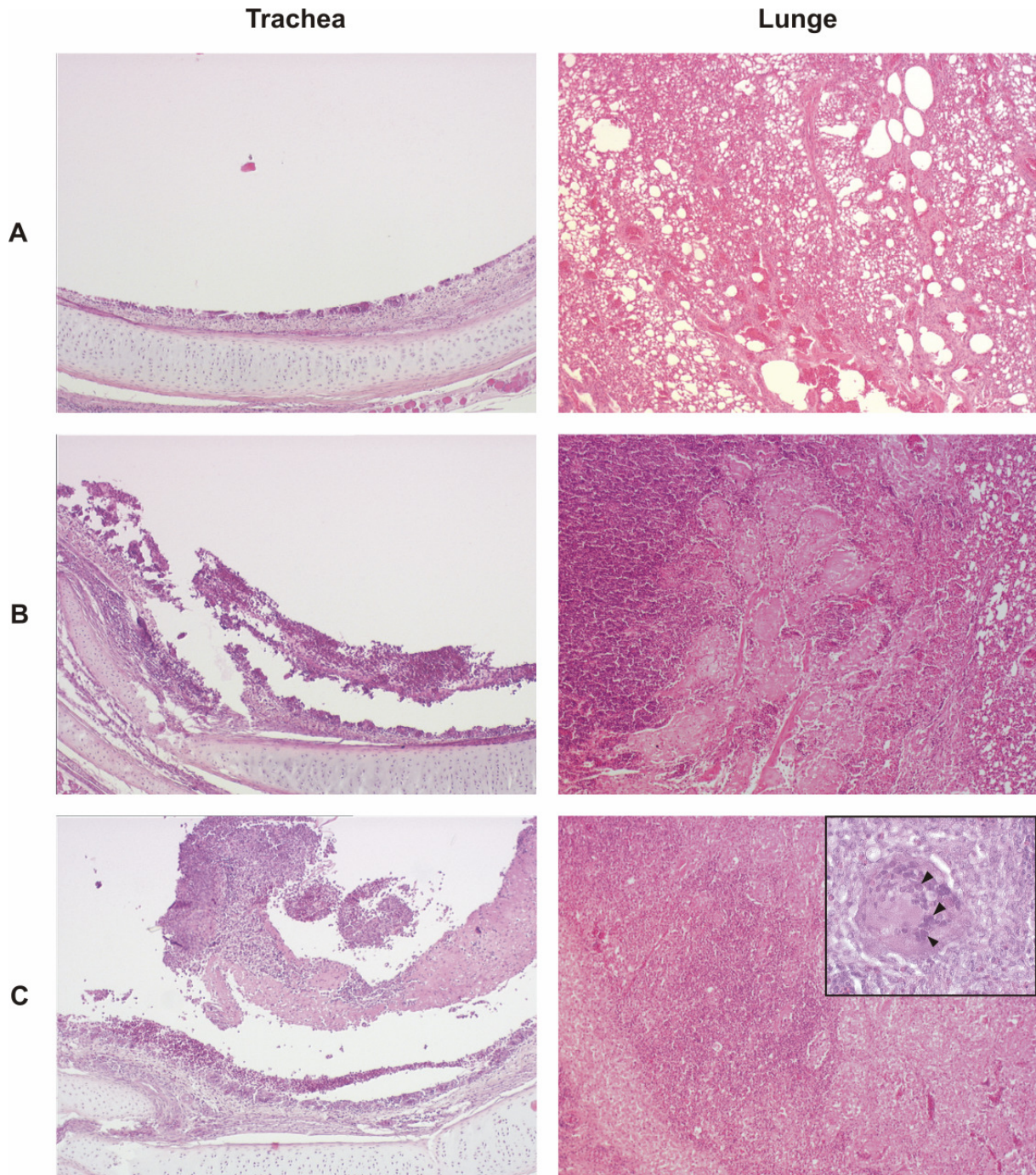
Gestorbene und getötete Hühner wurden pathologisch-anatomisch und histopathologisch untersucht. Hierbei wurden insbesondere Augenlider, Schnabelhöhle, Larynx, Trachea und Lungen beurteilt. Erkrankte Tiere zeigten gerötete Augenlider sowie Schleim und teilweise Blut in der Schnabelhöhle. Larynx und Trachea waren katarrhalisch bis hämorrhagisch entzündet, das Tracheallumen war mit Schleim und vor allem bei verstorbenen Tieren mit Blutkoagula gefüllt. Häufig waren die Lungen verändert, wobei Parenchymlutungen und fibrinös-nekrotisierende Bronchopneumonien gefunden wurden. Bei fast allen Tieren waren die Zäkaltonsillen geschwollen und gerötet. Die mit der Rekombinante ILTV- $\Delta$ UL47 infizierten Tiere zeigten weniger ausgeprägte Veränderungen, jedoch wurden auch bei ihnen katarrhalische, teils hämorrhagische Entzündungen von Larynx und Trachea gefunden. Auch in der Lunge konnten Pneumonieherde mit Parenchymlutungen festgestellt werden. Nach der Belastungsinfektion zeigten die nicht immunisierten Kontrolltiere ebenfalls die oben beschriebenen Veränderungen (Abb 21C). Bei den immunisierten Tieren hingegen wurden in wenigen Fällen geringe Mengen an Schleim in Schnabel und Trachea sowie herdförmige Emphyseme in der Lunge beobachtet.



**Abb. 21: Pathologisch-anatomische Befunde nach Belastungsinfektion, Trachea, Huhn**  
3 Tage nach der Belastungsinfektion immunisierter und nicht immunisierter Tiere mit ILT-Wildtypvirus wurden gestorbene oder getötete Hühner pathologisch untersucht. In der Trachea der mit ILTV- $\Delta$ UL47 (A) oder ILTV-UL47R (B) immunisierten Tiere finden sich keine Läsionen, während die Trachea eines nicht immunisierten Kontrolltieres (C) eine diffuse hämorrhagische Nekrose der Schleimhaut aufweist.

Die histopathologischen Untersuchungen wurden im Labor von Prof. Dr. Jens P. Teifke (FLI Insel Riems) durchgeführt. Aus formalinfixiertem Gewebe wurden Paraffin-Schnitte von Trachea und Lunge angefertigt und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt (Abb. 22). In den Präparaten waren häufig Ödeme in der Submukosa der Trachea erkennbar. In den Luftwegen von Lunge und Trachea wurden gelegentlich Muzin und Fibrin gefunden, ferner diphtheroide Beläge und Nekrosen der Schleimhäute. Darüber hinaus zeigte sich besonders bei den mit Wildtypvirus oder der Revertante immunisierten Tieren Epithelhyperplasie mit Synzytienbildung und Desquamation der Trachealschleimhaut (Abb. 22). Viele der untersuchten Tiere zeigten herdförmige bis ausgedehnte Lungenödeme, häufig in Verbindung mit einer Hyperämie (Abb. 22). In den meisten Fällen fanden sich unterschiedlich starke Infiltrationen von Lymphozyten, Plasmazellen, Makrophagen und Heterophilen. Während die Lungen der mit ILTV- $\Delta$ UL47 infizierten Tiere nur geringgradige Veränderungen aufwiesen, fanden sich bei den mit Wildtypvirus oder der Revertante infizierten Tieren ausgedehnte Pneumonieherde (Abb. 22). Vielfach konnten im Tracheal- und Lungenepithel die für ILT typischen intranukleären Seifriedschen Einschlusskörperchen (Seifried, 1938) gefunden werden.



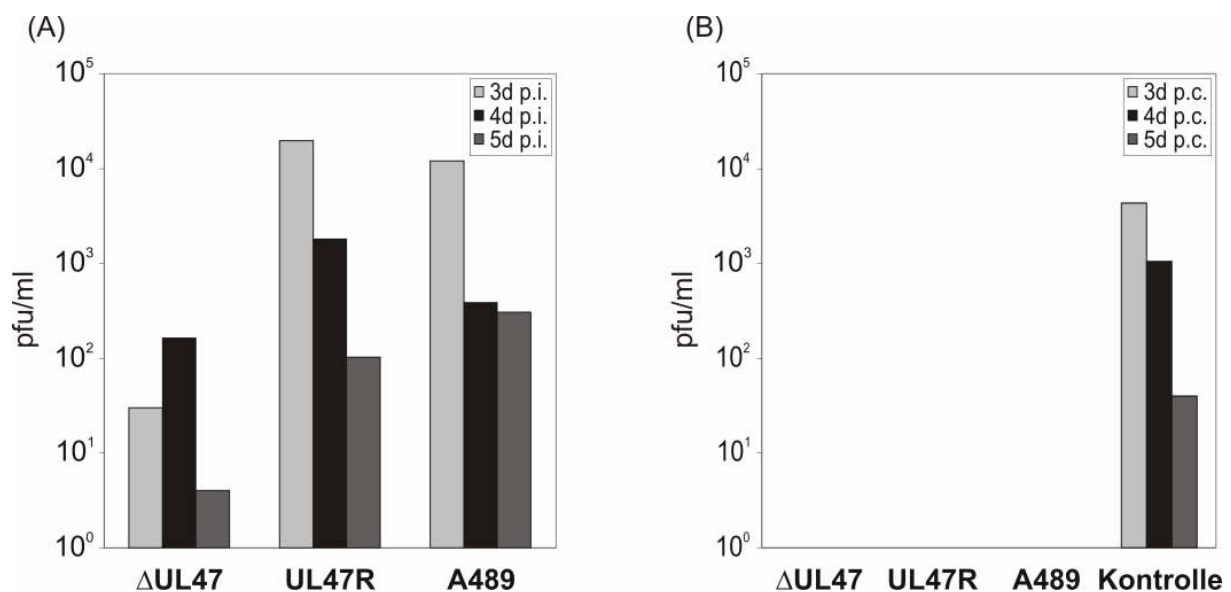


### Abb. 22: Histopathologische Befunde

Aus formalinfixiertem Gewebe wurden nach Einbettung in Paraffin Schnitte für die histopathologische Untersuchung angefertigt und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Abgebildet sind die Schnitte von Trachea und Lunge jeweils eines 4 Tage nach Primärinfektion mit ILTV- $\Delta$ UL47 (A), ILTV-UL47R (B) oder ILTV-A489 (C) getöteten Tieres. In einem vergrößerten Bildabschnitt sind Synzytien dargestellt. Pfeilköpfe weisen auf Seifriedsche Einschlusskörperchen hin.

### 4.5.3 Virusausscheidung

Zur Quantifizierung der Virusausscheidung wurden am 3., 4. und 5. Tag nach Infektion bzw. nach Belastung der Hühner Trachealtupferproben entnommen und aufbereitet. Anschließend wurden die Virustiter durch Plaque-Tests bestimmt (Abb. 23). Nach der Erstinfektion waren die Titer der UL47-Deletionsmutante etwa 100fach niedriger als die des Wildtypvirus und der Revertante. Während letztere von allen infizierten Tieren ausgeschieden wurden, konnte bei zwei der mit ILTV- $\Delta$ UL47 infizierten Tiere kein Virus in den Tupfern nachgewiesen werden. Weiterhin fällt auf, dass die maximale Virusausscheidung von ILTV- $\Delta$ UL47 im Vergleich zu den anderen Viren um einen Tag verzögert ist (Abb. 23A), was auf eine verlangsamte Replikation der Deletionsmutante hindeutet. Nach der Belastungsinfektion konnte in den Tupfern von keinem der vorher immunisierten Tiere infektiöses Virus nachgewiesen werden. In der Kontrollgruppe wurden dagegen ähnliche Virustiter wie nach Erstinfektion mit dem Wildtypvirus erreicht (Abb. 23B).

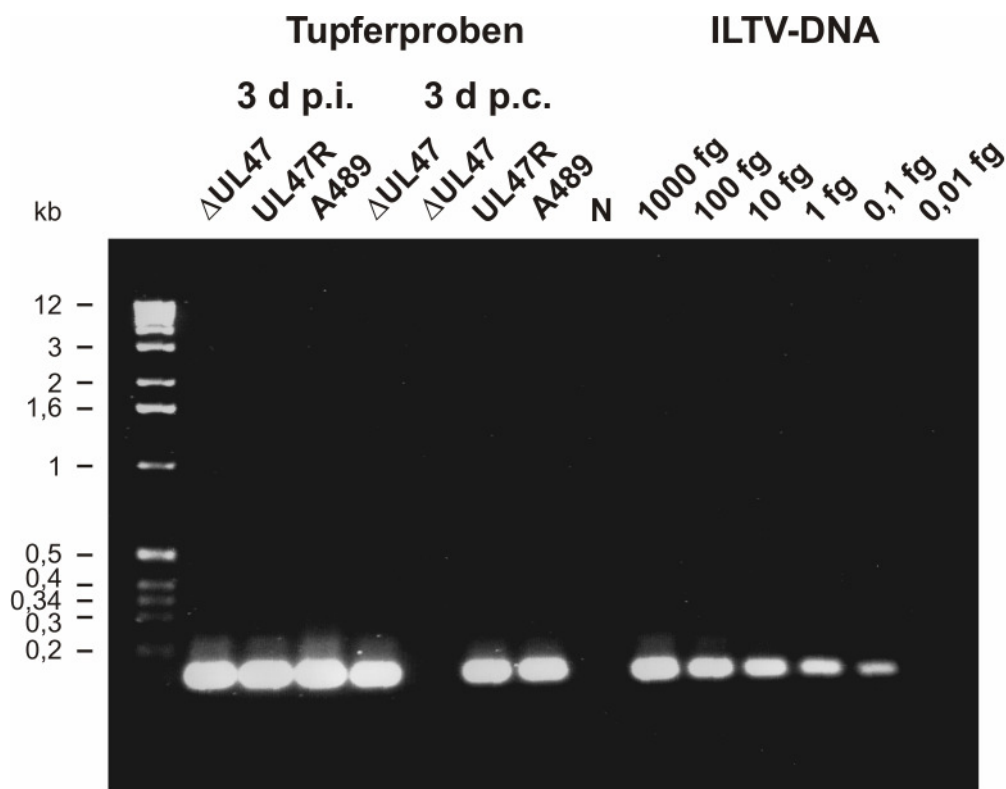


#### Abb. 23: Virusausscheidung

Am 3., 4. und 5. Tag nach Infektion von Hühnern mit ILTV-A489, ILTV- $\Delta$ UL47 oder ILTV-gGR (A) sowie nach Belastung derselben Tiere und nicht immunisierter Kontrolltiere mit ILTV-A489 (B) wurden Trachealtupferproben entnommen und durch Plaquetests auf CEK-Zellkulturen geprüft. Dargestellt sind die durchschnittlichen Virustiter (pfu/ml) für die einzelnen Tiergruppen.

Mit Hilfe einer PCR wurde überprüft, ob in den im Plaquetest negativen Tupferproben tatsächlich kein ILT-Virus vorhanden war. Hierzu wurde aus den aufbereiteten

Proben DNA präpariert und eine PCR-Reaktion mit den Primern IgL-NF (CCTGTGCGTAAACACGGAAG) und IgL-NR (TCAACAAGTCCACGAGCCAAG) durchgeführt, wodurch ein 149 bp großes Fragment aus dem gL-Gen (UL1; Fuchs & Mettenleiter, 1996) von ILTV amplifiziert werden konnte. Kontrollversuche mit verdünnter Virion-DNA zeigen, dass diese PCR äußerst sensitiv ist und bereits eine Genomkopie zu detektieren vermag (Abb. 24). Während in Negativkontrollen kein Amplifikationsprodukt zu finden war, erwiesen sich die untersuchten Tupferproben fast ausnahmslos als positiv. Lediglich in einer Probe aus der mit ILTV- $\Delta$ UL47 immunisierten Tiergruppe war nach Belastungsinfektion kein Virus nachweisbar (Abb. 24).



**Abb. 24: PCR-Nachweis des ILTV-Genoms in Tupferproben**

Aus den im Tierversuch gewonnenen Tupferproben wurde DNA präpariert und durch eine PCR mit den ILTV-spezifischen Primern IgL-NF und IgL-NR getestet. Die Template-DNA wurde für 3 min bei 95 °C denaturiert, anschließend folgten 60 Zyklen von Denaturierung (20 sec 95 °C), Primer-Hybridisierung (30 sec 55 °C) und DNA-Synthese (30 sec 70 °C), sowie ein abschließender Syntheseschritt für 10 min bei 70 °C. Die PCR-Produkte wurden in einem 1,5 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Gezeigt sind die Amplifikate einer Auswahl von Tupferproben aus den mit ILTV- $\Delta$ UL47, -UL47R und -A489 infizierten Tiergruppen, die 3 Tage nach Immunisierung (p.i.) bzw. Belastungsinfektion (p.c.) gewonnen wurden. Zum Nachweis der Sensitivität und Spezifität wurden verschiedene Mengen genomischer ILTV-DNA (1000 - 0,01 fg) sowie die Tupferprobe eines nicht infizierten Tieres (N) eingesetzt. Die Größen mitgeführter DNA-Marker sind angegeben (bp).

#### 4.5.4 Antikörperbildung gegen ILTV

Am 17. und 24. Tag nach Erstinfektion sowie am 11. und 28. Tag nach der Belastungsinfektion wurden Serumproben gewonnen, um die Antikörperbildung gegen ILTV zu überprüfen. Hierzu wurden indirekte Immunfluoreszenztests auf ILTV-infizierten CEK-Zellkulturen durchgeführt. Bereits am 17. Tag nach Erstinfektion zeigten alle Seren positive Reaktionen, allerdings war die Fluoreszenz bei den Seren der mit ILTV- $\Delta$ UL47 infizierten Tiergruppe etwas schwächer als bei den Seren der mit Wildtyp-Virus oder der Revertante infizierten Tiere. Nach der Belastungsinfektion waren solche Unterschiede zwischen den Tiergruppen nicht mehr feststellbar (Tab. 6).

Um zu prüfen, ob das bei ILTV- $\Delta$ UL47 deletierte Genprodukt für die Antikörperbildung relevant ist, wurden indirekte Immunfluoreszenztests auf LMH-Zellkulturen durchgeführt, welche zuvor mit pcDNA-IUL47 (Abb. 12) transfiziert worden waren. Während das oben beschriebene UL47-spezifische Kaninchenserum (siehe 4.3.1) eine deutliche Reaktion mit diesen Zellen zeigt, konnte mit keinem der Hühnerseren aus dem Infektionsversuch ein Signal erhalten werden. Im Gegensatz dazu zeigen fast alle Seren eine spezifische Fluoreszenzreaktion mit LMH-Zellen, die mit einem Expressionsplasmid für das immundominante Glykoprotein gJ von ILTV (Veits et al., 2003a; Fuchs et al., 2005) transfiziert worden sind (Ergebnisse nicht gezeigt). Offensichtlich spielt also das UL47-Protein im Verlauf der natürlichen ILTV-Infektion keine erkennbare Rolle für die humorale Immunantwort.

<b>Erstinfektion</b>	0 d p.i.	<b>ILTV-A489</b>	<b>ILTV-ΔUL47</b>	<b>ILTV-UL47R</b>	<b>Kontrolle</b>
<b>pfu/Tier</b>		2 x 10 <sup>4</sup>	2 x 10 <sup>4</sup>	2 x 10 <sup>4</sup>	-
<b>Morbidität</b>	1 - 10 d p.i.	12/12	12/12	12/12	-
<b>Mortalität</b>	3 - 8 d p.i.	7/12	0/12	4/12	-
<b>Klinischer Index</b>	1 - 10 d p.i.	2,38	0,88	1,98	-
<b>Virusausscheidung pfu/ml</b>	3, 4, 5 d p.i.	9/9 4,3 x 10 <sup>3</sup>	7/9 6,5 x 10 <sup>1</sup>	9/9 7,2 x 10 <sup>3</sup>	- -
<b>ILTV-spezif. AK</b>	17 d p.i.	+++	++	+++	-
	24 d p.i.	+++	++	+++	-
<b>Belastungsinfektion</b>	28 d p.i.		<b>ILTV-A489</b>		
<b>pfu/Tier</b>			1 x 10 <sup>5</sup>		
<b>Morbidität</b>	1 - 10 d p.c.	1/3	7/10	3/6	5/5
<b>Mortalität</b>	4 - 7 d p.c.	0/3	0/10	0/6	4/5
<b>Klinischer Index</b>	1 - 10 d p.c.	0,07	0,17	0,06	2,92
<b>Virusausscheidung pfu/ml</b>	3, 4, 5 d p.c.	0/3 -	0/8 -	0/5 -	4/4 1,8 x 10 <sup>3</sup>
<b>ILTV-spezif. AK</b>	11 d p.c.	+++	+++	+++	++
	28 d p.c.	+++	+++	+++	+++

**Tab. 6: Zusammenfassung des Tierversuchs**

Drei Gruppen 8 Wochen alter Hühner wurden intratracheal mit ILTV-A489, ILTV-ΔUL47 oder ILTV-UL47R infiziert. Nach 28 Tagen wurden die immunisierten Tiere und naive Kontrolltiere mit virulentem ILTV-A489 belastet. In den angegebenen Zeiträumen nach Primär- (p.i.) und Belastungsinfektion (p.c.) wurden Morbidität und Mortalität beobachtet und durch Ermittlung eines klinischen Index erfasst (siehe Text). Die Virusausscheidung wurde durch Plaquetests von Trachealtupferproben auf CEK-Zellkulturen quantifiziert. Angegeben sind die Durchschnittswerte aus allen Tupferproben der Tage 3, 4 und 5 p.i. und p.c. ILTV-spezifische Serumantikörper wurden durch indirekte Immunfluoreszenztests auf infizierten CEK-Zellkulturen nachgewiesen.

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Charakterisierung der UL31-, UL37-, UL46-UL49- und US4-Gene und Genprodukte von ILTV

In der vorliegenden Arbeit wurden Transkription und Translation von sieben offenen Leserastern des ILTV-Genoms untersucht, deren abgeleitete Produkte Homologien zu funktionellen Proteinen anderer Alphaherpesviren aufweisen. Bei HSV-1 und den meisten anderen bislang untersuchten Viren sind vier dieser Gene, UL46, UL47, UL48 und UL49, zueinander benachbart in der  $U_L$ -Genomregion lokalisiert und kodieren für Hauptbestandteile des Teguments (McGeoch, 2000; Roizman und Knipe, 2001). Im Gegensatz dazu findet man bei ILTV im entsprechenden Genomabschnitt nur die UL46-, UL48- und UL49-Homologen (Ziemann et al., 1998a), während UL47 aus der  $U_L$ - in die  $U_S$ -Region verlagert ist, wo es vor dem hier ebenfalls untersuchten Gen des Glykoproteins gG (US4) liegt (Wild et al., 1996). Eine ähnliche Translokation wurde bislang nur im Genom des Papageien-Herpesvirus PsHV-1 gefunden (Thureen et al., 2004). Des Weiteren wurden im Rahmen dieser Arbeit die Produkte der UL31- und UL37-homologen Leseraster von ILTV (Johnson, 1999) charakterisiert, die nicht nur bei Alpha-, sondern auch bei Beta- und Gammaherpesviren konserviert sind (Roizman und Pellet, 2001).

#### 5.1.1 DNA-Sequenzierung der Leseraster

Bei der Ansequenzierung der hergestellten Expressionsplasmide für UL46 bis UL49 und US4 wurden keinerlei Unterschiede zu den veröffentlichten DNA-Sequenzen (Wild et al., 1996; Ziemann et al., 1998a) gefunden. Im Falle von UL31 und UL37 hingegen wurden deutliche Abweichungen von der vorliegenden GenBank-Sequenz (Johnson, 1999) festgestellt, welche auch zu gravierenden Unterschieden zwischen den abgeleiteten Aminosäuresequenzen führen. Neben zahlreichen Aminosäureaustauschen ist UL31 infolge eines zusätzlichen Stopcodons um 17 Aminosäuren kürzer und UL37 aufgrund einer Leserasterverschiebung um 132 Codons länger als beschrieben. Um Klonierungsartefakte als Ursache für diese Abweichungen auszuschließen, wurden in der vorliegenden Arbeit jeweils zwei unabhängig voneinander generierte Plasmidklone untersucht, deren DNA-Sequenzen sich als identisch erwiesen. Außerdem entsprechen die nach Translation im zellfreien System sowie in Plasmid-transfizierten und ILTV-infizierten Zellkulturen gefundenen Massen der UL31- und UL37-Genprodukte den neu bestimmten Größen der Leseraster. Diese Ergebnisse belegen deutliche Unterschiede zwischen den Genomsequenzen des hier untersuchten virulenten ILTV-Stammes A489 aus den

USA und des australischen ILTV-Vakzinestammes SA-2 (Johnson, 1999), wie sie auch schon bei vergleichenden Untersuchungen von Teilen der U<sub>S</sub>-Region und der IR- und TR-Sequenzen zwischen SA-2 und einem amerikanischen ILTV-Stamm festgestellt wurden (Kongsuwan et al., 1993; Wild et al., 1996). Allerdings sollten insbesondere angesichts der Leserasterverschiebungen innerhalb eines hoch konservierten und wichtigen herpesviralen Gens wie UL37 auch Fehler in der früher publizierten DNA-Sequenz nicht völlig ausgeschlossen werden.

### 5.1.2 Nachweis der viralen mRNAs

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden erstmals die viralen mRNAs von UL31, UL37, UL46 bis UL49 und US4 mit Hilfe spezifischer cRNA-Sonden in ILTV-infizierten Zellen nachgewiesen. Darüber hinaus wurden auch die mit den Transkripten von UL31 bzw. UL49 koterminalen mRNAs von UL32 und UL49.5 identifiziert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass UL48 und UL46 sowie UL47 und gG ebenfalls 3'-koterminale Transkriptionseinheiten bilden. Diese Befunde korrelieren ebenso wie die Größen der Transkripte mit den Positionen potentieller TATA-Box-Elemente und Polyadenylierungssignale in den beschriebenen DNA-Sequenzen (Wild et al., 1996; Ziemann et al., 1998a; Johnson, 1999). Während die HSV-1-Homologen aller hier untersuchten Gene während der späten ( $\gamma$ -) Phase der Virusreplikation transkribiert werden (Roizman und Knipe, 2001), zeigen Studien zur Expressionskinetik bei ILTV ein differenzierteres Bild. Lediglich bei UL47 handelt es sich um ein „true late“ Gen, da die Transkripte ausschließlich in Abwesenheit von Hemmstoffen der DNA- oder Proteinsynthese nachweisbar sind. Im Gegensatz dazu kann die Transkription von UL31, UL37, UL48 und UL49 durch Phosphonoessigsäure und die von US4 und UL46 darüber hinaus auch durch Cycloheximid nicht vollständig inhibiert werden. Allerdings muß vor einer endgültigen Klassifizierung dieser viralen Transkripte als „early“ oder „immediate-early“ RNAs noch geprüft werden, ob die eingesetzten, für Säugerzellen optimierten Hemmstoffkonzentrationen auch für primäre Hühnerzellkulturen ausreichen.

### 5.1.3 Identifizierung und Lokalisierung der Proteine

Nach Klonierung in geeignete Expressionsvektoren konnte durch *in vitro*-Transkription und Translation gezeigt werden, dass alle untersuchten Leseraster des ILTV-Genoms in stabile Proteine übersetzt werden. In den meisten Fällen entsprechen die apparenten molekularen Massen der *in vitro*-Translationsprodukte in etwa den aus der Aminosäuresequenz berechneten Größen der Proteine. Lediglich das UL47-Genprodukt erscheint nach SDS-PAGE etwa 10 kDa kleiner als erwartet,

während das US4-Protein um 8,5 kDa zu groß erscheint. Die Ursachen für das abweichende elektrophoretische Laufverhalten der beiden Translationsprodukte bleiben unklar, zumal die Proteinsynthese in Abwesenheit von Mikrosomen erfolgte, sodass posttranslationale Modifikationen weitgehend ausgeschlossen werden können.

Des Weiteren wurden die untersuchten Gene in *E. coli* exprimiert und monospezifische Antiseren gegen die erhaltenen Fusionsproteine hergestellt. Mit Hilfe dieser Antiseren konnten die entsprechenden Genprodukte durch indirekte Immunfluoreszenztests, Western Blot-Analysen und teilweise auch durch Radioimmunpräzipitationen sowohl in ILTV-infizierten CEK-Zellkulturen als auch in Plasmid-transfizierten LMH-Zellkulturen, welche die Proteine transient exprimierten, nachgewiesen werden.

Während die molekularen Massen der viralen UL31-, UL37- und UL49-Proteine annähernd mit denen der entsprechenden *in vitro*-Translationsprodukte übereinstimmen, sind die reifen UL46-, UL47-, UL48- und US4-Genprodukte erkennbar vergrößert, was auf Modifikationen z. B. durch Phosphorylierung, Acylierung, Nukleotidylierung oder Glykosylierung hindeutet. Diese Modifikationen erfolgen offensichtlich überwiegend durch zelluläre Enzyme, da keine signifikanten Unterschiede zwischen in transfizierten oder in infizierten Zellen exprimierten Genprodukten erkennbar sind. In den Western Blot-Analysen erkennen die spezifischen Antiseren neben den Hauptformen der meisten untersuchten Genprodukte auch kleinere Proteine, bei denen es sich vermutlich um Degradationsprodukte handeln dürfte. Allerdings könnten einige dieser Proteine auch funktionelle Prozessierungsprodukte darstellen.

Durch Inkubation infizierter Zellen in Gegenwart des spezifischen Hemmstoffs Tunicamycin sowie durch die Behandlung der Zelllysate mit PNGase F konnte nachgewiesen werden, dass das US4-Genprodukt von ILTV N-glykosyliert ist. Hinweise auf eine solche Modifikation dieses ILTV-Proteins wurden bereits früher gefunden (Kongsuwan et al., 1993), allerdings wichen die dabei festgestellten Proteingrößen deutlich von den hier beschriebenen ab. Auch die US4-homologen Genprodukte anderer Alphaherpesviren wie PrV, HSV-2, EHV-4 und BHV-1 wurden als Glykoproteine identifiziert und als gX oder gG bezeichnet (Rea et al., 1985; McGeoch et al., 1987; Crabb et al., 1992; Keil et al., 1996). Es ist daher naheliegend, die Bezeichnung gG auch für das US4-Genprodukt von ILTV zu übernehmen. Die posttranslationalen Modifikationen der anderen hier untersuchten ILTV-Proteine wurden bislang nicht näher charakterisiert. Für die homologen UL31-, UL37-, UL46-, UL47-, UL48- und UL49-Genprodukte von HSV-1 konnte nachgewiesen werden, dass sie in infizierten Zellen phosphoryliert werden (McLean et al., 1990; Albright und Jenkins, 1993; Chang und Roizman, 1993; Zhang und McKnight, 1993; Morrison et al., 1998). Die Produkte von UL47 und UL49 sind außerdem nukleotidyliert (Blaho et



al., 1994), und das UL47-Protein darüber hinaus O-glykosyliert (Meredith et al., 1991).

Indirekte Immunfluoreszenztests ILTV-infizierter Zellen zeigen eine überwiegend zytoplasmatische Lokalisierung der UL37-, UL46- und UL49-Proteine sowie des Glykoproteins gG. Dagegen wird vor allem das UL48-, aber auch das UL47-Genprodukt zusätzlich im Zellkern gefunden. Dies könnte auf eine Funktion dieser Proteine bei der Regulation der viralen Genexpression hindeuten, wie sie für deren Homologe bei HSV-1 und anderen Alphaherpesviren beschrieben sind (s.u.). Das UL31-Genprodukt von ILTV akkumuliert ebenso wie seine Homologen bei anderen Herpesviren an der Kernmembran und dürfte daher ebenfalls eine wichtige Rolle beim Export der neu gebildeten Nukleokapside ins Zytoplasma spielen (Reynolds et al., 2001; Fuchs et al., 2002a; Muranyi et al., 2002).

Bis auf gG und das UL31-Genprodukt können alle untersuchten Proteine nicht nur in infizierten Zellen, sondern auch in gereinigten ILTV-Virionen nachgewiesen werden. Analog dazu wurden die UL37- und UL46- bis UL49-Proteine anderer Herpesviren als Bestandteile der Tegumentschicht reifer Virionen identifiziert (Roizman und Knipe, 2001), während das US4-Genprodukt gG und das UL31-Protein zumindest bei PrV eindeutig als Nichtstrukturproteine charakterisiert wurden (Rea et al., 1985; Fuchs et al., 2002a). Für das Glykoprotein G konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass es wie die homologen Genprodukte anderer Alphaherpesviren in den Überstand infizierter Zellkulturen sezerniert wird (Rea et al., 1985; Crabb et al., 1992; Keil et al., 1996). Während dies jedoch bei einigen anderen Viren vermutlich erst nach Abspaltung der hydrophoben Transmembrandomäne geschehen kann (Bennett et al., 1986; Su et al., 1987), fehlt eine solche Domäne im abgeleiteten ILTV-Protein vollständig (Wild et al., 1996).

#### 5.1.4 $\alpha$ -TIF-Funktion des UL48-Genproduktes von ILTV

Für verschiedene Alphaherpesviren wie HSV-1, BHV-1, VZV und PrV wurde gezeigt, dass deren UL48-Tegumentproteine nicht nur eine Funktion während der Virusmorphogenese besitzen, sondern darüber hinaus im Zusammenwirken mit zellulären Transkriptionsfaktoren die Expression viraler *immediate-early*-Gene in infizierten Zellen stimulieren, weshalb sie auch als *alpha transinducing factors* ( $\alpha$ -TIF) bezeichnet werden (Batterson und Roizman, 1983; Campbell et al., 1984; Zhang et al., 1991; Moriuchi et al., 1993; Misra et al., 1994; Fuchs et al., 2002b). In der vorliegenden Arbeit konnte durch Transfektionsversuche mit Expressionsplasmiden auch für das UL48-Protein von ILTV eine transaktivierende Wirkung auf einen alphaherpesviralen *immediate-early*-Promotor nachgewiesen werden. Da die entsprechenden Promotoren von ILTV bislang nicht genau charakterisiert sind, wurde

in den vorgestellten Studien ein EGFP-Reportergenplasmid verwendet, welches den bekannten Promotor für das Gen des Haupt-*immediate-early*-Proteins IE180 von PrV (Vlcek et al., 1990) enthält. Es ist jedoch anzunehmen, dass durch das UL48-Protein von ILTV auch autologe Gene aktiviert werden, da nach Transfektion von Zellen mit genomischer ILTV-DNA die Zugabe eines UL48-Expressionsplasmides zu deutlich erhöhten Virusausbeuten führt (Fuchs et al., 2000). Während bei HSV-1 Hinweise darauf gefunden wurden, dass die  $\alpha$ -TIF-Funktion des UL48-Proteins durch die Genprodukte von UL46 und UL47 moduliert wird (McKnight et al., 1987; Zhang et al., 1991; Zhang et al., 1993), lässt sich dies für ILTV bislang nicht eindeutig bestätigen. Die hergestellten UL46- und UL47-Expressionsplasmide zeigen alleine keine Transkriptions-aktivierende Wirkung und führen in Kombination mit dem UL48-Plasmid nur zu einer geringfügigen Steigerung (UL46) oder sogar zu einer Hemmung (UL47) der EGFP-Expression. Die Signifikanz dieser Effekte bleibt jedoch zu prüfen, da in den durchgeführten Transfektionsexperimenten zwar definierte Plasmid-DNA-Mengen eingesetzt wurden, aber keine Quantifizierung der DNA-Aufnahme und Proteinexpression durchgeführt wurde.

## 5.2 Herstellung rekombinanter ILT-Viren

Zur funktionellen Charakterisierung der untersuchten Gene sollten rekombinante ILT-Viren mit Deletionen der einzelnen Gene hergestellt werden, was bisher jedoch nur für UL47 und US4 gelang. Offenbar sind diese beiden Gene für die Virusreplikation entbehrlich, da Isolierung und Vermehrung der Deletionsmutanten auf nicht komplementierenden Zellen erfolgten. Im Gegensatz dazu war die Isolierung von UL31-, UL37-, UL46-, UL48- oder UL49-Deletionsmutanten nicht möglich. Nach Kotransfektion von LMH-Zellen mit den entsprechenden Transferplasmiden und genomischer ILTV-DNA wurden zwar rekombinante, EGFP-exprimierende Virusnachkommen erhalten, jedoch konnten diese trotz zahlreicher Plaque-Reinigungsversuche niemals vom parentalen Virus getrennt werden. Dies deutet darauf hin, dass die ILTV-Rekombinanten ohne Helferviren nicht vermehrungsfähig sind oder zumindest erhebliche Replikationsnachteile gegenüber dem Wildtypvirus aufweisen.

Auch bei anderen Herpesviren sind die Homologen einiger der untersuchten Gene sehr wichtig für die Replikation. Das Produkt des bei Alpha-, Beta- und Gammaherpesviren konservierten UL31-Gens spielt eine wichtige Rolle bei der primären Umhüllung von Nukleokapsiden an der inneren Kernmembran, die Voraussetzung für den Transport der Kapside ins Zytoplasma ist (Reynolds et al., 2001; Fuchs et al., 2002a; Muranyi et al., 2002). Bei HSV-1 gilt das UL31-Genprodukt als essentiell für die Virusreplikation (Chang et al., 1997; Reynolds et al.,

2001), und auch bei PrV führt die Deletion von UL31 zu schweren Replikationsdefekten (Fuchs et al., 2002a). Auch das UL37-Gen ist innerhalb der Familie der Herpesviren konserviert und wurde als essentiell für die Replikation von HSV-1 beschrieben (Desai et al., 2001), während eine UL37-Deletion bei PrV zu erheblich reduzierten Virustitern und Plaquegrößen in Zellkultur führt (Klupp et al., 2001). Sowohl bei PrV als auch bei HSV-1 stellt das UL37-Protein eine Tegumentkomponente dar, deren Einbau Voraussetzung für eine effiziente Umhüllung zytoplasmatischer Nukleokapside ist (Desai et al., 2001; Klupp et al., 2001). Die UL46-, UL47-, UL48- und UL49-Gene kodieren ebenfalls für Tegumentproteine, sind jedoch nur bei den Alphaherpesviren konserviert (Roizman und Pellet, 2001). Bei PrV ist keines der vier Gene für die Replikation in Zellkultur essentiell, wenngleich das UL48-Genprodukt nicht nur als Transaktivator für die Expression von *immediate-early*-Genen, sondern auch während der Virusmorphogenese im Zytoplasma eine zentrale Rolle spielt (Fuchs et al., 2002b, Fuchs et al., 2003). Eine entsprechende Doppelfunktion wurde auch bei HSV-1 gefunden, wo das UL48-Protein als essentiell für die Virusreplikation gilt (Weinheimer et al., 1992; Mossmann et al., 2000). Bei VZV und MDV-1 ist das UL48-Genprodukt dagegen entbehrlich (Cohen und Seidel, 1994; Dorange et al., 2002). Interessanterweise bilden diese beiden Viren *in vitro* keine infektiösen Partikel, sondern vermehren sich ausschließlich durch direkte Ausbreitung von Zelle zu Zelle (Beyer, 1992; Cohen und Straus, 2001). Da sich ILTV dagegen über freie Virionen vermehrt, ist eine ähnlich wichtige Funktion des UL48-Proteins wie bei HSV-1 und PrV zu erwarten.

Das UL49-Genprodukt wird bei HSV-1, BHV-1 und PrV nicht für die Bildung infektiöser Viren benötigt (Liang et al., 1995; Pomeranz und Blaho, 2000; del Rio et al., 2002; Fuchs et al., 2002c). Für die Replikation von MDV-1 dagegen ist das Protein essentiell (Dorange et al., 2002), und da bislang auch die Isolierung UL49-negativer ILTV-Rekombinanten nicht gelang, könnte dieses Gen bei aviären Herpesviren eine wichtigere Rolle spielen als bei den Alphaherpesviren der Säugetiere.

UL46 und UL47 sind sowohl bei HSV-1 (Zhang und McKnight, 1993) und PrV (Kopp et al., 2002), als auch bei MDV (Dorange et al., 2002) für die *in vitro*-Replikation entbehrlich. Somit ist ILTV das erste Alphaherpesvirus, bei dem Hinweise auf eine essentielle Funktion des UL46-Genproduktes gefunden wurden. Allerdings ist es auch vorstellbar, dass die entsprechende ILTV-Rekombinante nur deshalb nicht isoliert werden konnte, weil durch die Reporterinsertion im UL46-Gen auch die Expression des mit diesem koterminale transkribierten UL48-Gens beeinträchtigt ist. Um dies zu klären, müßten für die Isolation der ILTV-Mutanten rekombinante Zelllinien hergestellt werden, welche die einzelnen Virusproteine *in trans* zur Verfügung stellen.

### 5.2.1 *In vitro*-Charakterisierung UL47- und gG-negativer ILTV-Mutanten

In Übereinstimmung mit den Befunden bei anderen Herpesviren ist das UL47-Gen auch bei ILTV nicht essentiell für die Virusvermehrung in Zellkultur. Ähnlich wie eine UL47-negative PrV-Mutante (Kopp et al., 2002) zeigt die UL47-Deletionsmutante von ILTV jedoch erkennbare Replikationsdefekte, die im Vergleich zum Wildtypvirus zu etwa zehnfach reduzierten Virustitern führen. Anders als bei PrV ist bei der ILTV-Mutante jedoch keine signifikante Reduktion der Plaquegrößen zu beobachten. Das UL47-Protein von ILTV ist also nur für die effiziente Produktion reifer Virionen von Bedeutung, nicht aber für die direkte Virusausbreitung von Zelle zu Zelle. Offenbar sind die Bildung infektiöser Herpesviruspartikel und der *cell-to-cell spread* zwei unterschiedliche Prozesse, für die teilweise unterschiedliche Virusproteine benötigt werden, was beispielsweise auch durch die Entbehrlichkeit des essentiellen Glykoproteins gD für die Plaquebildung von PrV gezeigt wurde (Rauh und Mettenleiter, 1991). Im Gegensatz zu den moderaten Auswirkungen der UL47-Deletion auf die ILTV-Replikation in CEK-Zellkulturen zeigen elektronenmikroskopische Untersuchungen infizierter LMH-Zellkulturen gravierendere Unterschiede zum Wildtypvirus. So werden in den Kernen der mit ILTV- $\Delta$ UL47 infizierten Zellen nur sehr wenige Nukleokapside gefunden, was auf eine Funktion des UL47-Genproduktes während der frühen Phase der Replikation hindeuten könnte. Mit einer solchen Funktion stünde auch die partiell intranukleäre Lokalisierung des Proteins im Einklang. Allerdings wurden anders als bei HSV-1 keine Hinweise auf eine direkte oder indirekte Aktivierung der viralen *immediate-early*-Genexpression durch das UL47-Protein von ULTV gefunden (s.o.). Ebenso wie in mit ILTV-Wildtypvirus infizierten Zellen gelangen auch die in Abwesenheit von UL47 gebildeten Nukleokapside ins Zytoplasma, wo vereinzelt auch deren sekundäre Umhüllung beobachtet werden kann. Für PrV wurde gezeigt, dass dieser Schritt der Virusmorphogenese durch die Deletion von UL47 beeinträchtigt wird (Kopp et al., 2002). Gegenwärtig ist unklar, ob das homologe ILTV-Protein eine entsprechende Funktion hat, da die geringen Partikelzahlen von ILTV- $\Delta$ UL47 in den vorliegenden elektronenmikroskopischen Aufnahmen hierüber keine zuverlässigen Aussagen zulassen.

Anders als ILTV- $\Delta$ UL47 weist die Glykoprotein gG-negative Rekombinante ILTV- $\Delta$ gG in Zellkultur keinerlei Replikationsnachteile gegenüber dem Wildtypvirus auf. Auch die homologen Genprodukte aller anderen darauf untersuchten Alphaherpesviren wie HSV-1, PrV und BHV-1 erwiesen sich als nicht essentiell, und entsprechende Deletionsmutanten zeigten keine oder allenfalls mäßige *in vitro*-Replikationsdefekte (Thomsen et al., 1987; Balan et al., 1994; Nakamichi et al., 2000; Trapp et al., 2003).

Wie oben erwähnt, werden die gG-Proteine von ILTV und den meisten anderen Alphaherpesviren nicht in Virionen eingebaut, sondern sezerniert. Die Funktionen dieser löslichen Glykoproteine sind bislang weitgehend unklar. Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass das sezernierte gG-Fragment von HSV-2 proinflammatorische Eigenschaften besitzt, die zu einer Hemmung der angeborenen Immunantwort („innate immune response“) auf eine Virusinfektion führen könnten (Bellner et al., 2005). Außerdem wurde gezeigt, dass die gG-Proteine verschiedener Alphaherpesviren Chemokine binden (Bryant et al., 2003), was *in vivo* ebenfalls eine Störung der Immunabwehr nach sich ziehen könnte. Im Falle von PrV konnten durch *in vivo*-Studien allerdings keine signifikanten Auswirkungen einer gG-Deletion auf die Virulenz festgestellt werden (Thomsen et al., 1987; Pensaert et al., 1990; Kimman et al., 1992; Mettenleiter et al., 1994), wogegen gG-negative BHV-1 Mutanten attenuiert waren (Kaashoeck et al., 1998). Tierversuche zur Klärung der *in vivo*-Funktionen des Glykoproteins gG von ILTV wurden bislang nicht durchgeführt.

Neben ILTV- $\Delta$ gG wurde in der vorliegenden Arbeit eine weitere, als ILTV- $\Delta$ gG-G bezeichnete Virusrekombinante charakterisiert, der neben dem gG-Gen auch der 3'-terminale Teil von UL47 fehlt und die statt dessen eine EGFP-Expressionskassette trägt. Obwohl nachgewiesen werden konnte, dass dieses Virus ein verkürztes UL47-Protein stabil exprimiert, zeigt es ähnliche Replikationsdefekte wie die UL47-negative Mutante ILTV- $\Delta$ UL47. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die bei ILTV- $\Delta$ gG-G fehlenden, C-terminalen Aminosäuren 556-623 des UL47-Proteins für dessen Funktion relevant sein könnten. Allerdings kann auch nicht völlig ausgeschlossen werden, dass die beobachtete Titerreduktion auf die Reporterinsertion von ILTV- $\Delta$ gG-G zurückzuführen ist. Frühere Studien zeigten nämlich, dass die Überexpression von Fremdproteinen die Vermehrung von ILTV beeinträchtigen kann (Fuchs et al., 2000; Veits et al., 2003b).

### 5.2.2 Relevanz von ILTV UL47 für die Virulenz *in vivo*

Da nach Deletion von UL47 die Replikation des ILTV in Zellkultur beeinträchtigt war, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch geprüft, ob dieser *in vitro*-Phänotyp mit einer Attenuierung *in vivo* korreliert. Infektionsversuche an Hühnern zeigen, dass ILTV- $\Delta$ UL47 im Vergleich zum parental Wildtypvirus und einer UL47-Revertante deutlich geringere klinische Symptome verursacht, die in keinem Fall zum Tode führten. Offensichtlich ist ILTV- $\Delta$ UL47 stärker attenuiert als beschriebene ILTV-Rekombinanten, die eine Deletion des viralen dUTPase-Gens UL50 aufweisen und dennoch eine beträchtliche Virulenz zeigen (Fuchs et al., 2000; Lüschow et al., 2001). Allerdings ist ILTV- $\Delta$ UL47 etwas pathogener als eine in Parallelversuchen getestete gJ-negative Virusmutante (Fuchs et al., 2005). Um zu klären, ob die früher

untersuchten Deletionen des viralen Thymidinkinasegens UL23 (Okamura et al., 1994; Schnitzlein et al., 1995) oder des ILTV-spezifischen UL0-Gens (Veits et al., 2003c) zu einer stärkeren oder schwächeren Attenuierung führen als die hier vorgestellte UL47-Deletion, sollten vergleichende Studien mit gleichaltrigen Tieren derselben Rasse unter identischen Infektionsbedingungen durchgeführt werden.

Durch experimentelle Immunisierung mit ILTV- $\Delta$ UL47 können Hühner ebenso zuverlässig gegen Belastungsinfektionen mit pathogenem Wildtypvirus geschützt werden wie mit allen anderen bislang geprüften ILTV-Rekombinanten (Schnitzlein et al., 1995; Lüschoff et al., 2001; Veits et al., 2003c; Fuchs et al., 2005). Im Hinblick auf eine praktische Nutzung als Lebendvakzinen bleibt jedoch für alle bislang gentechnisch hergestellten ILTV-Mutanten zu klären, ob sie für die übliche Eye-drop-Vakzinierung oder eventuell für eine Massenapplikation über Aerosol oder Trinkwasser geeignet sind. Möglicherweise vermitteln einige der auch nach intratrachealer Verabreichung hoher Virusdosen apathogenen ILTV-Mutanten in geringeren Dosen keine belastbare Immunität mehr. Effizienter replizierende und deshalb noch schwach pathogene Rekombinanten wie ILTV- $\Delta$ UL47 könnten sich unter Praxisbedingungen daher als wirksamer erweisen.

Bis heute werden zur Bekämpfung der ILT ausschließlich klassisch attenuierte Lebendvakzinen eingesetzt (Clarke et al., 1980), bei denen die genetischen Ursachen für den Virulenzverlust unbekannt sind. Offensichtlich weisen einige dieser Impfviren lediglich reversible Punktmutationen auf, da sie nach Tierpassage eine gesteigerte Virulenz zeigten und zu vakzinebedingten Krankheitsausbrüchen führten (Guy et al., 1991; Kotiw et al., 1995). Auch einige der beschriebenen gentechnisch hergestellten ILTV-Rekombinanten stellen keine wirklich sicheren Vakzinen dar, da sie lediglich Reportergeninsertionen im viralen Thymidinkinasegen enthalten (Okamura et al., 1994; Schnitzlein et al., 1995), deren spontane Deletion zu einer Reaktivierung des Enzyms und damit zur Virulenzsteigerung führen könnte. Dagegen weist die in der vorliegenden Arbeit hergestellte Mutante ILTV- $\Delta$ UL47 eine fast vollständige Deletion des entsprechenden Leserasters und keine Insertion von Fremdsequenzen auf. Durch die gentechnische Herstellung einer pathogenen Revertante wurde außerdem gezeigt, dass die Attenuierung von ILTV- $\Delta$ UL47 ausschließlich auf die unter natürlichen Bedingungen irreversible Deletion zurückzuführen ist. Zu der Sicherheit einer möglichen UL47-negativen ILTV-Lebendvakzine trägt auch der Umstand bei, dass sie von immunisierten Tieren in deutlich geringeren Mengen ausgeschieden wird als das Wildtyp-Virus und ILTV-Rekombinanten, die Deletionen des dUTPase- oder gJ-Gens aufweisen (Fuchs et al., 2000, 2005). Die geringe Ausscheidung von ILTV- $\Delta$ UL47 reduziert das Risiko einer Virusausbreitung von geimpften auf nicht oder anders vakzinierte Tiere, in denen es

zu unerwünschten Rekombinationen mit ILT-Feldviren oder heterologen ILT-Impfviren kommen könnte.

Allerdings müssen vor der Zulassung gentechnisch hergestellter ILTV-Lebendimpfstoffe weitere Untersuchungen zu deren Verträglichkeit durchgeführt werden. So ist bisher nicht geprüft worden, ob es durch die Immunisierung zu einer Beeinträchtigung der Eibildung kommt. Ebenso sollten die Auswirkungen der Vakzinierung bei Hühnern mit anderen Atemwegsinfektionen, z. B. durch Mykoplasmen, untersucht werden. Da konventionelle ILTV-Lebendimpfstoffe bei Fasanen zu schweren, teilweise tödlich verlaufenden Erkrankungen führen können (Kaleta und Redmann, 1997), sollte auch geprüft werden, ob gentechnisch hergestellte ILTV-Mutanten zur Immunisierung dieser Tierart möglicherweise besser geeignet sind.

Um eine Eradikation der ILT zu erleichtern, wären Lebendvirus-Vakzinen wünschenswert, die nicht nur eine ausreichende Immunität vermitteln, sondern auch eine serologische Unterscheidung zwischen immunisierten und mit Feldvirus infizierten Tieren erlauben. Für die animalen Herpesviren PrV und BHV-1 wurden solche Marker- oder DIVA- (differentiating infected from vaccinated animals) Vakzinen bereits entwickelt und erfolgreich eingesetzt (van Oirschot et al., 1986; Kaashoek et al., 1995). Diese Impfviren weisen Deletionen antigener Virusproteine auf, so dass immunisierte Tiere im Gegensatz zu natürlich infizierten Tieren gegen diese Proteine keine Antikörper bilden können. Im Falle von ILTV könnten gJ-negative Rekombinanten als DIVA-Vakzinen geeignet sein, da dieses Glykoprotein als ein dominantes Ziel der humoralen Immunantwort gegen ILTV identifiziert wurde (Veits et al., 2003a; Fuchs et al., 2005). Durch indirekte Immunfluoreszenztests auf Zellen, die mit entsprechenden Expressionsplasmiden transfiziert worden waren, konnten in den Seren Wildtypvirus-infizierter Hühner stets gJ-spezifische, aber niemals UL47-spezifische Antikörper nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Aus diesem Grunde ist ILTV- $\Delta$ UL47 zwar möglicherweise als attenuierte Lebendvakzine, nicht jedoch als Markervakzine geeignet. Eine solche wäre allerdings durch die zusätzliche Deletion eines zweiten Gens, das für ein antigenes Virusprotein kodiert, herstellbar. Hierfür könnte außer dem gJ-Gen auch das gG-Gen von ILTV geeignet sein. Es wurde gezeigt, dass die homologen gG-Proteine anderer Alphaherpesviren eine Antikörperantwort induzieren, und es wurden auch verwendbare PrV-Lebendvakzinen hergestellt, die durch Deletion des Thymidinkinasegens attenuiert und durch Deletion von gG markiert waren (Marchioli et al., 1987). Eine ähnliche Markervakzine könnte möglicherweise durch die gleichzeitige vollständige Deletion der benachbarten UL47- und gG-Gene aus dem ILTV-Genom gewonnen werden. Die Herstellung einer solchen Doppelmutante sollte ohne größere Schwierigkeiten möglich sein, da im Rahmen der vorliegenden Arbeit

sowohl UL47- als auch gG-negative ILTV-Rekombinanten erfolgreich isoliert werden konnten.



## 6 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden die ILTV-Homologen von sieben konservierten alphaherpesviralen Genen untersucht. Durch Northern Blot-Analysen wurden die viralen mRNAs identifiziert und deren Expressionskinetik in infizierten Zellen bestimmt. Mit Hilfe monospezifischer Antiseren, die nach Immunisierung von Kaninchen mit bakteriellen Fusionsproteinen erhalten wurden, konnten die entsprechenden viralen Proteine nachgewiesen werden. Diese zeigten in Western Blot-Analysen apparente Massen von 33,4 kDa (UL31), 112 kDa (UL37), 64,2 kDa (UL46), 65,6 kDa (UL47), 44,8 kDa (UL48), 33,5 kDa (UL49) und 52,3-70,7 kDa (US4). Die Massen der UL31-, UL37-, UL48- und UL49-Genprodukte entsprachen den Erwartungen. Die UL46-, UL47- und US4-Proteine hingegen waren gegenüber den *in vitro*-Translationsprodukten deutlich vergrößert, was auf posttranslationale Modifikationen hinwies. Studien mit Hemmstoffen und Glykosidasen ergaben, dass das US4-Genprodukt von ILTV N-glykosyliert ist und deshalb wie seine Homologen als gG bezeichnet werden kann. Wie einige der homologen Glykoproteine wird das gG von ILTV von infizierten Zellen sezerniert, aber nicht in Virionen eingebaut. Auch das UL31-Genprodukt ist offensichtlich ein Nichtstrukturprotein, während die UL37-, UL46-, UL47-, UL48- und UL49-Genprodukte wie die entsprechenden Tegumentproteine anderer Herpesviren in reifen ILTV-Partikeln nachweisbar waren. Durch indirekte Immunfluoreszenztests konnte gezeigt werden, dass die Genprodukte von UL31 und UL48 vor allem im Kern, die von UL37, UL46, UL47, UL49 und US4 überwiegend im Zytoplasma infizierter Zellen lokalisiert sind. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass die Kernlokalisierung des UL48-Proteins mit einer transaktivierenden Wirkung auf die virale *immediate-early*-Genexpression korreliert. In zahlreichen Versuchen gelang es nicht, UL31-, UL37-, UL46-, UL48- oder UL49-negative ILTV-Rekombinanten zu isolieren, was auf wichtige Funktionen dieser Gene hindeutete. Dagegen konnte durch die Herstellung von UL47- und US4-Deletionsmutanten gezeigt werden, dass die entsprechenden Proteine für die Virusreplikation in Zellkultur entbehrlich sind. Während die Deletion des gG-Gens US4 keine erkennbaren Auswirkungen hatte, war die Replikation von UL47-negativem ILTV deutlich verlangsamt, und die maximalen Virustiter waren gegenüber dem Wildtypvirus und einer UL47-Revertante etwa zehnfach reduziert. Durch einen Tierversuch konnte gezeigt werden, dass ILTV- $\Delta$ UL47 auch *in vivo* attenuiert ist und dass mit dieser Rekombinante immunisierte Hühner gegen eine Belastungsinfektion mit pathogenem Wildtypvirus geschützt sind. Die hergestellte Mutante könnte deshalb als Lebendvirus-Vakzine zur Bekämpfung der ILT geeignet sein.

## 6 SUMMARY

In the present study the ILTV-homologues of seven conserved alphaherpesvirus genes were investigated. The viral mRNAs were detected, and their expression kinetics in infected cells were determined by Northern blot analyses. The viral proteins were identified using monospecific antisera obtained after immunization of rabbits with bacterial fusion proteins. In Western blot analyses the viral proteins exhibited apparent masses of 33.4 kDa (UL31), 112 kDa (UL37), 64.2 kDa (UL46), 65.6 kDa (UL47), 44.8 kDa (UL48), 33.5 kDa (UL49) and 52.3-70.7 kDa (US4). While the masses of the UL31, UL37, UL48 and UL49 gene products agreed with the expectations, the UL46, UL47 and US4 proteins were larger than the corresponding *in vitro* translation products indicating posttranslational modifications. Treatment with glycosylation inhibitors and glycosidases demonstrated that the US4 gene product of ILTV is N-glycosylated and, therefore, like its homologues, should be named Glycoprotein G. Like several of the homologous glycoproteins, ILTV gG is secreted by infected cells, but not incorporated in virions. UL31 encodes a non-structural protein, whereas the UL37 and UL46 - UL49 gene products were detectable in mature ILT virions, like the corresponding tegument proteins of other herpesviruses. Indirect immunofluorescence tests revealed that the UL31 and UL48 proteins accumulated in the nuclei of infected cells, whereas the UL37, UL46, UL47, UL49 and US4 proteins were predominantly located in the cytoplasm. Coinciding with its nuclear localisation the UL48 protein of ILTV was characterised as a trans-activator of viral *immediate-early* gene expression.

Several attempts to isolate UL31, UL37, UL46, UL48 or UL49 negative ILTV recombinants failed, indicating that these genes possess important functions. In contrast, successful isolation of UL47 and US4 deletion mutants demonstrated that the respective proteins are dispensable for virus replication in cell culture. Whereas deletion of the gG gene US4 had no detectable effects, replication of UL47 negative ILTV was significantly delayed, and maximum virus titers were reduced nearly tenfold compared to wild-type virus and a UL47 rescue mutant. An animal trial demonstrated that ILTV- $\Delta$ UL47 was attenuated *in vivo*, and able to protect immunised chickens against subsequent challenge infection with pathogenic wild-type virus. Thus, the generated virus mutant might be suitable as a live virus vaccine to combat ILT.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

**Abbas F. and Andreasen J. R. Jr. (1996):**

Comparison of diagnostic tests for infectious laryngotracheitis.  
Avian Dis. 40: 290-295

**Albright A. G. and Jenkins F. J. (1993):**

The herpes simplex virus UL37 protein is phosphorylated in infected cells.  
J. Virol. 67: 4842-4847

**Andreasen J. R. Jr., Glisson J. R. and Villegas P. (1990):**

Differentiation of vaccine strains and Georgia field isolates of infectious laryngotracheitis virus by their restriction endonuclease fragment patterns.  
Avian Dis. 34: 646-656

**Bagust T. J. (1986):**

Laryngotracheitis (gallid-1) herpesvirus infection in the chicken. 4. Latency establishment by wild and vaccine strains of ILT virus.  
Avian Pathol. 15: 581-595

**Bagust T. J. and Johnson M. A. (1995):**

Avian infectious laryngotracheitis: virus-host interactions in relation to prospects for eradication.  
Avian Pathol. 24: 373-391

**Bagust T. J. and Guy J. S. (1997):**

Laryngotracheitis.  
In: Calnek B. W., Barnes H. J., Beard C. W., McDougald L. R. and Saif Y. M. (Hrsg.):  
Diseases of poultry. 10. Aufl.  
Iowa State University Press, Ames, S. 527-539

**Balan P., Davis-Poynter N., Bell S., Atkinson H., Browne H. and Minson T. (1994):**

An analysis of the in vitro and in vivo phenotypes of mutants of herpes simplex virus type 1 lacking glycoproteins gG, gE, gI or the putative gJ.  
J. Gen. Virol. 75 : 1245-1258

**Banfield B. W., Leduc Y., Esfold L., Schubert K. and Tufaro F. (1995):**

Sequential isolation of proteoglycan synthesis mutants by using herpes simplex virus as a selective agent: evidence for a proteoglycan-independent virus entry pathway.  
J. Virol. 69: 3290-3298

**Batterson W. and Roizman B. (1983):**

Characterization of the herpes simplex virion-associated factor responsible for the induction of alpha genes.

J. Virol. 46: 371-377

**Bauer B., Lohr J. E. and Kaleta E. F. (1999):**

Comparison of commercial ELISA test kits from Australia and the USA with the serum neutralization test in cell cultures for the detection of antibodies to the infectious laryngotracheitis virus.

Avian Pathol. 28: 65-72

**Beach J. R. (1930):**

The virus of laryngotracheitis of fowls.

Science 72: 633-634

**Beach J. R. (1931):**

A filterable virus, the cause of infectious laryngotracheitis of chickens.

J. Exp. Med. 54: 809-816

**Beaudette F. R. (1930):**

Infectious bronchitis.

N. J. Agr. Exp. Sta. Annu. Rep. 51: 286

**Bellner L., Thoren F., Nygren E., Liljeqvist J. A., Karlsson A. and Eriksson K. (2005):**

A proinflammatory peptide from herpes simplex virus type 2 glycoprotein G affects neutrophil, monocyte, and NK cell functions.

J. Immunol. 174: 2235-2241

**Bennett L. M., Timmins J. G., Thomsen D. R. and Post L. E. (1986):**

The processing of pseudorabies virus glycoprotein gX in infected cells and in an uninfected cell line.

Virology 155: 707-715

**Ben-Porat T., Veach R. A. and Ihara S. (1983):**

Localization of the regions of homology between the genomes of herpes simplex virus type 1 and pseudorabies virus.

Virology 127: 194-204

**Bernard J. and Mercier A. (1993):**

Sequence of two Eco RI fragments from salmonis herpesvirus 2 and comparison with ictalurid herpesvirus 1.

Arch. Virol. 132: 437-442

**Beyer J. (1992):**

Mareksche Krankheit.

In: Heider G. und Monreal G. (Hrsg.): Krankheiten des Wirtschaftsgeflügels Band I.  
Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart, S. 450-473

**Blaho J. A., Mitchell C. and Roizman B. (1994):**

An amino acid sequence shared by the herpes simplex virus 1 alpha regulatory proteins 0, 4, 22 and 27 predicts the nucleotidylation of the UL21, UL31, UL47 and UL49 gene products.

J. Biol. Chem. 269: 17401-17410

**Brandly C. A. (1935):**

Some studies on infectious laryngotracheitis. The continued propagation of the virus upon the CAM of the hen's egg.

J. Infect. Dis. 57: 201-206

**Bras F., Dezelee S., Simonet B., Nguyen X., Vende P., Flamand A. and Masse M. J. (1999) :**

The left border of the genomic inversion of pseudorabies virus contains genes homologous to the UL46 and UL47 genes of herpes simplex virus type 1, but no UL45 gene.

Virus Res. 60: 29-40

**Browne H., Bell S., Minson T. and Wilson D. W. (1996):**

An endoplasmic reticulum-retained herpes simplex virus glycoprotein H is absent from secreted virions: evidence for reenvolvement during egress.

J. Virol. 70: 4311-4316

**Bryant N. A., Davis-Poynter N., Vanderplasschen A. and Alcami A. (2003):**

Glycoprotein G isoforms from some alphaherpesviruses function as broad-spectrum chemokine binding proteins.

EMBO J. 22: 833-846

**Buckmaster A. E., Scott S. D., Sanderson M. J. S., Bourns M. E. G., Ross N. L. J. and Binns M. M. (1988):**

Gene sequence and mapping data from Marek's disease virus and herpesvirus of turkeys: implications for herpesvirus classification.

J. Gen. Virol. 69: 2033-2042

**Burnet F. M. (1934):**

The propagation of the virus of infectious laryngotracheitis on the CAM of the developing egg.

Br. J. Exp. Pathol. 15: 52-55

**Campbell M. E. M., Palfreyman J. W. and Preston C. M. (1984):**

Identification of herpes simplex virus DNA sequences which encode a trans-acting polypeptide responsible for stimulation of immediate early transcription.

J. Mol. Biol. 180: 1-19

**Chang P. W., Yates V. J., Dardiri A. H. and Fry D. E. (1960):**

Some observations of the propagation of infectious laryngotracheitis virus in tissue culture.

Avian Dis. 4: 384-390

**Chang P. W., Jasty V., Fry D. and Yates V. J. (1973):**

Replication of a cell-culture-modified infectious laryngotracheitis virus in experimentally infected chickens.

Avian Dis. 17: 683-689

**Chang Y. E. and Roizman B. (1993):**

The product of the UL31 gene of herpes simplex virus 1 is a nuclear phosphoprotein, which partitions with the nuclear matrix.

J. Virol. 67: 6348-6356

**Chang Y. E., Van Sant C., Krug P. W., Sears A. E. and Roizman B. (1997):**

The null mutant of the U(L)31 gene of herpes simplex virus 1: construction and phenotype in infected cells.

J. Virol. 71: 8307-8315

**Chesters P. M., Allsop R., Purewal A. and Edington N. (1997):**

Detection of latency-associated transcripts of equid herpesvirus 1 in equine leukocytes but not in trigeminal ganglia.

J. Virol. 71: 3437-3443

**Cheung A. K. (1989) :**

Detection of pseudorabies virus transcripts in trigeminal ganglia of latently infected swine.

J. Virol. 63: 2908-2913

**Cheung A. K. (1991):**

Cloning of the latency gene and the early protein 0 gene of pseudorabies virus.

J. Virol. 65: 5260-5271

**Chomczynski P. and Sacchi N. (1987):**

Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.

Anal. Biochemistry 162: 156-159

**Clarke J. K., Robertson G. M. and Purcell D. A. (1980):**

Spray vaccination of chickens using infectious laryngotracheitis virus.  
Aust. Vet. J. 56: 424-428

**Cohen J. I. and Seidel K. (1994):**

Varizella-zoster virus (VZV) open reading frame 10 protein, the homolog of the essential herpes simplex virus protein VP16, is dispensable for VZV replication in vitro.  
J. Virol. 68: 7850-7858

**Cohen J. I. and Straus S. E. (2001):**

Varizella-zoster virus and its replication.  
In: Knipe D. M. and Howley P. M. (Hrsg.): Fields Virology. 4. Aufl.  
Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, S. 2399-2459

**Crabb B. S., Nagesha H. S. and Studdert M. J. (1992):**

Identification of equine herpesvirus 4 glycoprotein G: a type-specific, secreted glycoprotein.  
Virology 190: 143-154

**Crawshaw G. J. and Boycott B. R. (1982):**

Infectious laryngotracheitis in peafowl and pheasants.  
Avian Dis. 26: 397-401

**Croen K. D., Ostrove J. M., Dragovic L. J., Smialek J. E. and Straus S. E. (1987):**

Latent herpes simplex virus in human trigeminal ganglia. Detection of an immediate early gene "anti-sense" transcript by in situ hybridization.  
N. Engl. J. Med. 317: 1427-1432

**Cruickshank J. G., Berry D. M. and Hay B. (1963):**

The fine structure of infectious laryngotracheitis virus.  
Virology 20: 376-378

**Dall'Olio F., Malagolini N., Campanelli-Fiume G. and Serafini-Cessi F. (1987):**

Glycosylation pattern of herpes simplex virus type 2 glycoprotein G from precursor species to the mature form.  
Arch. Virol. 97: 237-249

**Davison A. J. (1992):**

Channel catfish virus: a new type of herpesvirus.  
Virology 186: 9-14

**Davison A. J. and Scott J. E. (1986):**

The complete DNA sequence of varicella-zoster virus.  
J. Gen. Virol. 67: 1759-1816

**Davison A. J., Sauerbier W., Dolan A., Addison C. and McKinnell R. G. (1999):**

Genomic studies of the Lucke tumor herpesvirus (RaHV-1).

J. Cancer Res. Clin. Oncol. 125 : 232-238

**Davison A. J., Eberle R., Hayward G. S., McGeoch D. J., Minson A. C., Pellet P. E., Roizman B., Studdert M. J. and Thiry E. (2005a):**

Family Herpesviridae.

In: Fauquet C. M., Mayo M. A., Maniloff J., Desselberger U. und Ball L. A. (Hrsg.): Virus taxonomy.

Academic press, New York, N. Y., S. 193-212

**Davison A. J., Trus B. L., Cheng N., Steven A. C., Watson M. S., Cunningham C., Le Deuff R. M. and Renault T. (2005b):**

A novel class of herpesvirus with bivalve hosts.

J. Gen. Virol. 86: 41-53

**del Rio T., Werner H. C. and Enquist L. W. (2002):**

The pseudorabies virus VP22 homologue (UL49) is dispensable for virus growth in vitro and has no effect on virulence and neuronal spread in rodents.

J. Virol. 76: 774-782

**Desai P. (2000):**

A null mutation in the UL36 gene of herpes simplex virus type 1 results in accumulation of unenveloped DNA-filled capsids in the cytoplasm of infected cells.

J. Virol. 74: 11608-11618

**Desai P., Sexton G., McCaffery J. and Person S. (2001):**

A null mutation in the gene encoding the UL37 polypeptide of herpes simplex virus type 1 abrogates virus maturation.

J. Virol. 75: 10259-10271

**Dezelee S., Bras F., Vende P., Simonet B., Nguyen X., Flamand A. and Masse M. J. (1996) :**

The BamHI fragment 9 of pseudorabies virus contains genes homologous to the UL24, UL25, UL26 and UL26,5 genes of herpes simplex virus type 1.

Virus Res. 42: 27-39

**Doerig C., Pizer L. I. and Wilcox C. L. (1991):**

Detection of the latency-associated transcript in neuronal cultures during the latent infection with herpes simplex virus type 1.

Virology 183: 423-426



**Dorange F., Tischer 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 is indispensable for virus growth.

J. Virol. 76: 1959-1970

**Elliott G., Mouzakis G. and O'Hare P. (1995):**

VP16 interacts via its activation domain with VP22, a tegument protein of herpes simplex virus, and is relocated to a novel macromolecular assembly in coexpressing cells.

J. Virol. 69: 7932-7941

**Elliott G. and O'Hare P. (1997):**

Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein.

Cell 88: 223-233

**Fuchs W. and Mettenleiter T. C. (1996):**

DNA sequence and transcriptional analysis of the UL1 to UL5 gene cluster of infectious laryngotracheitis virus.

J. Gen. Virol. 77: 2221-2229

**Fuchs W. and Mettenleiter T. C. (1999):**

DNA sequence of the UL6 to UL20 genes of infectious laryngotracheitis virus and characterization of the UL10 gene product as a nonglycosylated and nonessential virion protein.

J. Gen. Virol. 80: 2173-2182

**Fuchs W. and Mettenleiter T. C. (2005):**

The nonessential UL49.5 gene of infectious laryngotracheitis virus encodes an O-glycosylated protein which forms a complex with the non-glycosylated UL10 gene product.

Virus Research; Article in press.

**Fuchs W., Klupp B. G., Granzow H., Rhiza H. J. and Mettenleiter T. C. (1996):**

Identification and characterization of the pseudorabies virus UL3.5 protein, which is involved in virus egress.

J. Virol. 70: 3517-3527

**Fuchs W., Ziemann K., Teifke J. P., Werner O. and Mettenleiter T. C. (2000):**

The non-essential UL50 gene of avian infectious laryngotracheitis virus encodes a functional dUTPase which is not a virulence factor.

J. Gen. Virol. 81: 627-638

**Fuchs W., Klupp B. G., Granzow H., Osterrieder N. and Mettenleiter T. C. (2002a):**

The interacting UL31 and UL34 gene products of pseudorabies virus are involved in egress from the host-cell nucleus and represent components of primary enveloped but not of mature virions.

J. Virol. 71: 364-378

**Fuchs W., Granzow H., Klupp B. G., Kopp M. and Mettenleiter T. C. (2002b):**

The UL48 tegument protein of pseudorabies virus is critical for intracytoplasmic assembly of infectious virions.

J. Virol. 76: 6729-6742

**Fuchs W., Klupp B. G., Granzow H., Hengartner C., Brack A., Mundt E., Enquist L. W. and Mettenleiter T. C. (2002c):**

Physical interaction between envelope glycoproteins E and M of pseudorabies virus and the major tegument protein UL49.

J. Virol. 76: 8208-8217

**Fuchs W., Granzow H. and Mettenleiter T. C. (2003):**

A pseudorabies virus recombinant simultaneously lacking the major tegument proteins encoded by the UL46, UL47, UL48, and UL49 genes is viable in cultured cells.

J. Virol. 77: 12891-12900

**Fuchs W., Klupp B. G., Granzow H. and Mettenleiter T. C. (2004):**

Essential function of the pseudorabies virus UL36 gene product is independent of its interaction with the UL37 protein.

J. Virol. 78: 11879-11889

**Fuchs W., Wiesner D., Veits J., Teifke J. P. and Mettenleiter T. C. (2005):**

In vitro and in vivo relevance of infectious laryngotracheitis virus gJ proteins that are expressed from spliced and nonspliced mRNAs.

J. Virol. 79: 705-716

**Geraghty R. J., Krummenacher C., Cohen G. H., Eisenberg R. J. and Spear P. G. (1998):**

Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor.

Science 280: 1618-1620

**Gershon A. A., Sherman D. L., Zhu Z., Gabel C. A., Ambron R. T and Gershon M. D. (1994):**

Intracellular transport of newly synthesized varicella-zoster virus: final envelopment in the trans-golgi network.

J. Virol. 68: 6372-6390

**Ghiasi H., Nesburn A. B., Cai S. and Wechsler S. L. (1998):**

The US5 open reading frame of herpes simplex virus type 1 does encode a glycoprotein (gJ).  
Intervirology 41: 91-97

**Graham F. L. and van der Eb A. J. (1973):**

Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5.  
Virology 54: 536-539

**Graham R., Throp F. and James W. A. (1930):**

Subacute or chronic infectious avian laryngotracheitis.  
J. Infect. Dis. 47: 87-91

**Granzow H., Weiland F., Jöns A., Klupp B. G., Karger A. and Mettenleiter T. C. (1997):**

Ultrastructural analysis of the replication cycle of pseudorabies virus in cell culture: a reassessment.  
J. Virol. 71: 2072-2082

**Granzow H., Klupp B. G., Fuchs W., Veits J., Osterrieder N. and Mettenleiter T. C. (2001):**

Egress of alphaherpesviruses: comparative ultrastructural study.  
J. Virol. 75: 3675-3684

**Griffin A. M. (1990):**

The complete sequence of the capsid p40 gene from infectious laryngotracheitis virus.  
Nucleic Acids Res. 18: 3664

**Griffin A. M. (1991):**

The nucleotide sequence of the glycoprotein gB of infectious laryngotracheitis virus: analysis and evolutionary relationship to the homologous gene from other herpesviruses.  
J. Gen. Virol. 72: 393-398

**Griffin A. M. and Bourns M. E. G. (1990):**

Analysis of the nucleotide sequence of DNA from the region of the thymidine kinase gene of infectious laryngotracheitis virus; potential evolutionary relationships between the herpesvirus subfamilies.  
J. Gen. Virol. 71: 841-850

**Gross S., Harley C. and Wilson D. W. (2003):**

The cytoplasmic tail of herpes simplex virus glycoprotein H binds to the tegument protein VP16 in vitro and in vivo.  
Virology 317: 1-12

**Günther B. M., Klupp B. G., Gravendyck M., Lohr J. E., Mettenleiter T. C. and Kaleta E. F. (1997):**

Comparison of the genome of 15 avian herpesvirus isolates by restriction endonuclease analysis.

Avian Pathology 26: 305-316

**Guo P., Scholz E., Turek J., Nodgreen R. and Maloney B. (1993):**

Assembly pathway of avian infectious laryngotracheitis virus.

Am. J. Vet. Res. 54: 2031-2039

**Guy J. S., Barnes H. J., Munger L. L. and Rose L. (1989):**

Restriction endonuclease analysis of infectious laryngotracheitis viruses: comparison of modified-live vaccine viruses and North Carolina field isolates.

Avian Dis. 33: 316-323

**Guy J. S., Barnes H. J. and Morgan L. M. (1990):**

Virulence of infectious laryngotracheitis viruses: comparison of modified-live vaccine viruses and North Carolina field isolates.

Avian Dis. 34: 106-113

**Guy J. S., Barnes H. J. and Smith L. G. (1991):**

Increased virulence of modified-live infectious laryngotracheitis vaccine virus following bird-to-bird passage.

Avian Dis. 35: 348-355

**Guy J. S., Barnes H. J. and Smith L. G. (1992):**

Rapid diagnosis of infectious laryngotracheitis using a monoclonal antibody-based immunoperoxidase procedure.

Avian Pathol. 21: 77-86

**Hilbink F.W., Oei H. L. and van Roozelaar D. J. (1987):**

Virulence of five live vaccines against avian infectious laryngotracheitis and their immunogenicity and spread after eyedrop or spray application.

Vet. Q. 9: 215-225

**Hitchner S. B., Fabricant J. and Bagust T. J. (1977):**

A fluorescent-antibody study of the pathogenesis of infectious laryngotracheitis.

Avian Dis. 21: 185-194

**Hitchner S. B., Shea C. A. and White P. G. (1958):**

Studies on a serum neutralization test for the diagnosis of laryngotracheitis in chickens.

Avian Dis. 2: 258-269

**Honess R. W. and Roizman B. (1974):**

Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins.

J. Virol. 14: 8-19

**Hudson C. B. and Beaudette F. R. (1932):**

The susceptibility of cloacal tissues to the virus of infectious bronchitis.

Cornell Vet. 23: 63-65

**Hughes C. S., Jones R. C., Gaskell R. M., Jordan F. T. W. and Bradbury J. M. (1987):**

Demonstration in live chickens of the carrier state in infectious laryngotracheitis.

Res. Vet. Sci. 42: 407-410

**Hughes C. S. and Jones R. C. (1988):**

Comparison of cultural methods for primary isolation of infectious laryngotracheitis virus from field material.

Avian Pathol. 17: 295-303

**Hughes C. S., Gaskell R. M., Jones R. C., Bradbury J. M. and Jordan F. T. W. (1989):**

Effects of certain stress factors on the re-excretion of infectious laryngotracheitis virus from latently infected carrier birds.

Res. Vet. Sci. 46: 274-276

**Hughes C. S., Williams R. A., Gaskell R. M., Jordan F. T. W., Bradbury J. M., Bennett M. and Jones R. C. (1991):**

Latency and reactivation of infectious laryngotracheitis vaccine virus.

Arch. Virol. 121: 213-218

**Hutchinson L., Browne H., Wargent V., Davis-Poynter N., Primorac S., Goldsmith K., Minson A. C. and Johnson D. C. (1992):**

A novel herpes simplex virus glycoprotein, gL, forms a complex with glycoprotein H (gH) and affects normal folding and surface expression of gH.

J. Virol. 66: 2240-2250

**Jöns A., Granzow H., Kuchling R. and Mettenleiter T. C. (1996):**

The UL49.5 gene of pseudorabies virus codes for an O-glycosylated structural protein of the viral envelope.

J. Virol. 70: 1237-1241

**Jöns A., Dijkstra J. M. and Mettenleiter T. C. (1998):**

Glycoproteins M and N of pseudorabies virus form a disulfide-linked complex.

J. Virol. 72: 550-557

**Johnson D. C. and Feenstra V. (1987):**

Identification of a novel herpes simplex virus type 1-induced glycoprotein which complexes with gE and binds immunoglobulin.

J. Virol. 61: 2208-2216

**Johnson M. A. (1999):**

GenBank Accession No. AF168792, unpublished

**Johnson M. A., Prideaux C. T., Kongsuwan K., Sheppard M. and Fahey K. J. (1991):**

Gallid herpesvirus 1 (infectious laryngotracheitis virus): cloning and physical maps of the SA-2 strain.

Arch. Virol. 119: 181-198

**Johnson M. A., Prideaux C. T., Kongsuwan K., Tyack S. G. and Sheppard M. (1995a):**

ICP27 immediate early gene, glycoprotein K (gK) and DNA helicase homologues of infectious laryngotracheitis virus (gallid herpesvirus 1) SA-2 strain.

Arch. Virol. 140: 623-634

**Johnson M. A., Tyack S. G., Prideaux C. T., Kongsuwan K., and Sheppard M. (1995b):**

Nucleotide sequence of infectious laryngotracheitis virus (gallid herpesvirus 1) ICP4 gene.

Virus Res. 35: 193-204

**Johnson M. A., Tyack S. G., Prideaux C. T., Kongsuwan K., and Sheppard M. (1997):**

Nucleotide sequence of the left-terminus of infectious laryngotracheitis virus (Gallid herpesvirus 1) SA-2 strain.

Arch. Virol. 142: 1903-1910

**Jones C. (2003):**

Herpes simplex virus type 1 and bovine herpesvirus 1 latency.

Clin. Microbiol. Rev. 16: 79-95

**Jordan F. T. W. (1964):**

Diagnosis of infectious laryngotracheitis by chick embryo inoculation.

J. Comp. Pathol. 74: 119-128

**Jordan F. T. W. (1990):**

Infectious Laryngotracheitis (ILT).

In: Jordan F. T. W. (Hrsg.): Poultry Diseases. 3. Aufl.

Bailliere Tindall Press, London, S. 154-158

**Jordan F. T. W. and Chubb R. C. (1962):**

The agar gel diffusion technique in the diagnosis of infectious laryngotracheitis (I.L.T.) and its differentiation from fowl pox.

Res. Vet. Sci. 3: 245-255

**Kaashoek M. J., Moerman A., Madic J., Weerdmeester K., Maris-Veldhuis M., Rijsewijk F. A. and van Oirschot J. T. (1995):**

An inactivated vaccine based on a glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus 1 induces protective immunity and allows serological differentiation.

Vaccine 13: 342-346

**Kaashoek M. J., Rijsewijk F. A., Ruuls R. C., Keil G. M., Thiry E., Pastoret P. P. and van Oirschot J. T. (1998):**

Virulence, immunogenicity and reactivation of bovine herpesvirus 1 mutants with a deletion in the gC, gG, gI, gE, or in both the gI and gE gene.

Vaccine 16: 802-809

**Kaleta E. F., Janssen W. und Khalaf S. E. D. (1981):**

Zum erneuten Auftreten der akuten Form der infektiösen Laryngotracheitis (ILT) des Huhnes in Norddeutschland.

Dtsch. tierärztl. Wschr. 88: 309-313

**Kaleta E. F. und Redmann T. (1997):**

Die infektiöse Laryngotracheitis bei Huhn, Pfau und Fasan sowie Möglichkeiten und Grenzen ihrer Bekämpfung durch attenuierte Lebendimpfstoffe.

Tierärztl. Prax. 25: 605-610

**Kaleta E. F., Redmann T. Heffels-Redmann U. und Frese K. (1986):**

Zum Nachweis der Latenz des attenuierten Virus der infektiösen Laryngotracheitis des Huhnes im Trigemini-Ganglion.

Dtsch. tierärztl. Wschr. 93: 40-42

**Karger A. and Mettenleiter T. C. (1993):**

Glycoproteins gIII and gp50 play dominant roles in the biphasic attachment of pseudorabies virus.

Virology 7: 394-407

**Karger A., Saalmüller A., Tufaro F., Banfield B. W. and Mettenleiter T. C. (1995):**

Cell surface proteoglycans are not essential for infection by pseudorabies virus.

J. Virol. 69: 3482-3489

**Kawaguchi T., Nomura K., Hirayama Y. and Kitagawa T. (1987):**

Establishment and characterization of a chicken hepatocellular carcinoma cell line, LMH.  
Cancer Res. 47: 4460-4464

**Keil G. M., Engelhardt T., Karger A. and Enz M. (1996):**

Bovine herpesvirus 1 U(s) open reading frame 4 encodes a glycoproteoglycan.  
J. Virol. 70: 3032-3038

**Kessler S. W. (1975):**

Rapid isolation of antigens from cells with a staphylococcal protein A-antibody adsorbent: parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein A.  
J. Immunol. 115: 1617-1624

**Key D. W., Gough B.C., Derbyshire J. B. and Nagy E. (1994):**

Development and evaluation of a non-isotopically labelled DNA probe for the diagnosis of infectious laryngotracheitis.  
Avian Dis. 38: 467-474

**Kimman T. G., de Wind N., Oei-Lie N., Pol J. M., Berns A. J. and Gielkens A. L. (1992):**

Contribution of single genes within the unique short region of Aujeszky's disease virus (suid herpesvirus type 1) to virulence, pathogenesis and immunogenicity.  
J. Gen. Virol. 73 : 243-251

**Kingsley D. H., Hazel J. W. and Keeler C. L. Jr. (1994):**

Identification and characterization of the infectious laryngotracheitis virus glycoprotein C gene.  
Virology 203: 336-343

**Kingsley D. H. and Keeler C. L. Jr. (1999):**

Infectious laryngotracheitis virus, an alpha herpesvirus that does not interact with cell surface heparan sulfate.  
Virology 256: 213-219

**Klupp B. G., Granzow H. and Mettenleiter T. C. (2000):**

Primary envelopment of pseudorabies virus at the nuclear membrane requires the UL34 gene product.  
J. Virol. 74: 10063-10071

**Klupp B. G., Granzow H., Mundt E. and Mettenleiter T. C. (2001):**

Pseudorabies virus UL37 gene product is involved in secondary envelopment.  
J. Virol. 75: 8927-8936



**Klupp B. G., Fuchs W., Granzow H., Nixdorf R. and Mettenleiter T. C. (2002):**

The pseudorabies virus UL36 tegument protein physically interacts with the UL37 protein.  
J. Virol. 76: 3065-3071

**Klupp B. G., Hengartner C. J., Mettenleiter T. C. and Enquist L. W. (2004):**

Complete, annotated sequence of the pseudorabies virus genome.  
J. Virol. 78: 424-440

**Kongsuwan K., Johnson M. A., Prideaux C. T. and Sheppard M (1993):**

Identification of an infectious laryngotracheitis virus gene encoding an immunogenic protein with a predicted  $M_r$  of 32 kilodaltons.  
Virus Research 29: 125-140

**Kopp M., Klupp B. G., Granzow H., Fuchs W. and Mettenleiter T. C. (2002):**

Identification and characterization of the pseudorabies virus tegument proteins UL46 and UL47: role for UL47 in virion morphogenesis in the cytoplasm.  
J. Virol. 76: 8820-8833

**Kornfeld R. and Kornfels S. (1985):**

Assembly of asparagine-linked oligosaccharides.  
Annu. Rev. Biochem. 54: 631-664

**Kotiw M., Wilks C. R. and May J. T. (1995):**

The effect of serial in vivo passage on the expression of virulence and DNA stability of an infectious laryngotracheitis virus strain of low virulence.  
Vet. Microbiol. 45: 71-80

**Laemmli U. K. (1970):**

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.  
Nature 15: 680-685

**Lake C. M., Molesworth S. J. and Hutt-Fletcher L. M. (1998):**

The Epstein-Barr virus (EBV) gN homolog BLRF1 encodes a 15-kilodalton glycoprotein that cannot be authentically processed unless it is coexpressed with the EBV gM homolog BBRF3.  
J. Virol. 72: 5559-5564

**Lam Q., Smibert C. A., Koop K. E., Lavery C., Capone J. P., Weinheimer S. P. and Smiley J. R. (1996):**

Herpes simplex virus VP16 rescues viral mRNA from destruction by the virion host shutoff function.  
EMBO J. 15: 2575-2581

**Laquerre S., Argnani R., Anderson D. B., Zucchini S., Manservigi R. and Glorioso J. C. (1998):**

Heparan sulfate proteoglycan binding by herpes simplex virus type 1 glycoproteins B and C, which differ in their contributions to virus attachment, penetration, and cell-to-cell spread.  
J. Virol. 72: 6119-6130

**Lee L. F., Armstrong R. L. and Nazerian K. (1972):**

Comparative studies of six avian herpesviruses.  
Avian Dis. 16: 799-805

**Leib D. A., Bradbury J. M., Hart C. A. and McCarthy K. (1987):**

Genome isomerism in two alphaherpesviruses: herpesvirus saimiri-1 (herpesvirus tamarinus) and avian infectious laryngotracheitis virus.  
Arch. Virol. 93: 287-294

**Lerche M. (1932):**

Infektiöse Laryngotracheitis beim Huhn auch in Deutschland.  
Berl. tierärztl. Wschr. 48: 145-150

**Li Y., van Drunen Littel-van den Hurk S., Babiuk L. A. and Liang X. (1995):**

Characterization of cell-binding properties of bovine herpesvirus 1 glycoproteins B, C, and D: identification of a dual cell-binding function of gB.  
J. Virol. 69: 4758-4768

**Liang X., Chow B., Li Y., Raggo C., Yoo D., Attah-Poku S. and Babiuk L. A. (1995):**

Characterization of bovine herpesvirus 1 UL49 homolog gene and product: bovine herpesvirus 1 UL49 homolog is dispensable for virus growth.  
J. Virol. 69: 3863-3867

**Lüschow D., Werner O., Mettenleiter T. C. and Fuchs W. (2001):**

Protection of chickens from lethal avian influenza A virus infection by live-virus vaccination with infectious laryngotracheitis virus recombinants expressing the hemagglutinin (H5) gene.  
Vaccine 19: 4249-4259

**Marchioli C. C., Yancey R. J. Jr., Wardley R. C., Thomsen D. R. and Post L. E. (1987):**

A vaccine strain of pseudorabies virus with deletions in the thymidine kinase and glycoprotein X genes.  
Am. J. Vet. Res. 48: 1577-1583

**May H. G. and Tittsler R. P. (1925):**

Tracheo-laryngitis in poultry.  
J. Am. Vet. Med. Assoc. 67: 229-231

**Mayer V. M., Hetrick F. M., Keenum W. D. and DeVolt H. M. (1967):**

Replication of infectious laryngotracheitis virus in chicken kidney cell culture.  
Am J. Vet. Res. 28: 825-832

**Mayr A., Dorn P. und Mahnel H. (1964):**

Über eine atypische, milde Verlaufsform der infektiösen Laryngotracheitis des Geflügels mit besonderer Berücksichtigung der Diagnose und Differentialdiagnose.  
Zbl. Vet. Med. 11: 572-583

**McGeoch D. J., Moss H. W., McNab D. and Frame M. C. (1987):**

DNA sequence and genetic content of the HindIII I region in the short unique component of the herpes simplex virus type 2 genome: identification of the gene encoding glycoprotein G, and evolutionary comparisons.  
J. Gen. Virol. 68 : 19-38

**McGeoch D. J., Dalrymple M. A., Davison A. J., Dolan A., Frame M. C., McNab D., Perry L. J., Scott J. E. and Taylor P. (1988):**

The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1.  
J. Gen. Virol. 69: 1531-1574

**McGeoch D. J., Dolan A. and Ralph A. C. (2000):**

Toward a comprehensive phylogeny for mammalian and avian herpesviruses.  
J. Virol. 74: 10401-10406

**McKnight J. L. C., Pellett P. E., Jenkins F. J. and Roizman B. (1987):**

Characterization and nucleotide sequence of two herpes simplex virus 1 genes whose products modulate  $\alpha$ -trans-inducing factor-dependent activation of  $\alpha$  genes.  
J. Virol. 61: 992-1001

**McLean G., Rixon F., Langeland N., Haarr L. and Marsden H. (1990):**

Identification and characterization of the virion protein products of herpes simplex virus type 1 gene UL47.  
J. Gen. Virol. 71 : 2953-2960

**Meredith D. M., Lindsay J. A., Halliburton I. W. and Whittaker G. R. (1991):**

Post-translational modification of the tegument proteins (VP13 and VP14) of herpes simplex virus type 1 by glycosylation and phosphorylation.  
J. Gen. Virol. 72: 2771-2775

**Mettenleiter T. C. (1994):**

Initiation and spread of  $\alpha$ -herpesvirus infections.  
Trends Microbiol. 2: 2-4

**Mettenleiter T. C. (2002):**

Herpesvirus assembly and egress.  
J. Virol. 76: 1537-1547

**Mettenleiter T. C., Zsak L., Zuckermann F., Sugg N., Kern H. and Ben-Porat T. (1990):**

Interaction of glycoprotein gIII with a cellular heparinlike substance mediates adsorption of pseudorabies virus.  
J. Virol. 64: 278-286

**Mettenleiter T. C., Klupp B. G., Weiland F. and Visser N. (1994):**

Characterization of a quadruple glycoprotein-deleted pseudorabies virus mutant for use as a biologically safe live virus vaccine.  
J. Gen. Virol. 75: 1723-1733

**Meulemans G. and Halen P. (1982):**

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting infectious laryngotracheitis viral antibodies in chicken serum.  
Avian Pathol. 11: 361-368

**Misra M., Bratanich A. C., Carpenter D. and O'Hare P. (1994):**

Protein and DNA elements involved in transactivation of the promoter region of the bovine herpesvirus 1 immediate early 1 ( $\alpha$ -1) transcription unit by the  $\alpha$  gene trans-inducing factor (BHV- $\alpha$  TIF).  
J. Virol. 68: 4898-4909

**Mocarski E. S. Jr. and Courcelle C. T. (2001):**

Cytomegaloviruses and their replication.  
In: Knipe D. M. and Howley P. M. (Hrsg.): Fields Virology. 4. Aufl.  
Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, S. 2399-2459

**Montalvo E. A. and Grose C. (1987):**

Assembly and processing of the disulfide-linked varicella-zoster virus glycoprotein gpII(140).  
J. Virol. 61: 2877-2884

**Montgomery R. I., Warner M. S., Lum B. J. and Spear P. G. (1996):**

Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family.  
Cell 87: 427-436

**Moriuchi H., Moriuchi M., Straus S. E. and Cohen J. I. (1993):**

Varicella-zoster virus open reading frame 10 protein, the herpes simplex virus VP16 homolog, transactivates herpesvirus immediate-early gene promoters.

J. Virol. 67: 2739-2746

**Morrison E. E., Wang Y.-F. and Meredith D. M. (1998):**

Phosphorylation of structural components promotes dissociation of the herpes simplex type 1 tegument.

J. Virol. 72: 7108-7114

**Mossman K., Sherburne R., Lavery C., Duncan J. and Smiley J. (2000):**

Evidence that herpes simplex virus VP16 is required for viral egress downstream of the initial envelopment event.

J. Virol. 74: 6287-6299

**Muranyi W., Haas J., Wagner M., Krohne G. and Koszinowski U. H. (2002):**

Cytomegalovirus recruitment of cellular kinases to dissolve the nuclear lamina.

Science 297: 854-857

**Nakamichi K., Ohara K., Kuroki D. and Otsuka H. (2000):**

Bovine herpesvirus 1 glycoprotein G is required for viral growth by cell-to-cell infection.

Virus Res. 68: 175-181

**Newcomb W. W., Homa F. L., Thomsen D. R., Trus B. L., Cheng N., Steven A., Booy F. and Brown JC. (1999):**

Assembly of the herpes simplex virus procapsid from purified components and identification of small complexes containing the major capsid and scaffolding proteins.

J. Virol. 73: 4239-4250

**Niikura M., Matsuura Y., Endoh D., Onuma M. and Mikami T. (1992):**

Expression of the Marek's disease virus (MDV) homolog of glycoprotein B of herpes simplex virus by a recombinant baculovirus and its identification as the B antigen (gp100, gp60, gp49) of MDV.

J. Virol. 66: 2631-2638

**Okamura H., Sakaguchi M., Honda T., Taneno A., Matsuo K. And Yamada S. (1994):**

Construction of recombinant infectious laryngotracheitis virus expressing the LacZ gene of *E. coli* with thymidine kinase gene.

J. Vet. Med. Sci. 56: 799-801

**Okazaki K., Matsuzaki T., Sugahara Y., Okada J., Hasebe M., Iwamura Y., Ohnishi M., Kanno T., Shimizu M., Honda E. and Kono Y. (1991):**

BHV-1 adsorption is mediated by the interaction of glycoprotein gIII with heparinlike moiety on the cell surface.

Virology 181: 666-670

**Pensaert M. B., De Smet K. and De Waele K. (1990) :**

Extent and duration of virulent virus excretion upon challenge of pigs vaccinated with different glycoprotein-deleted Aujeszky's disease vaccines.

Vet. Microbiol. 22: 107-117

**Prideaux C. T., Kongsuwan K., Johnson M. A., Sheppard M. and Fahey K. J. (1992):**

Infectious laryngotracheitis virus growth, DNA replication, and protein synthesis.

Arch. Virol. 123: 181-192

**Poffenberger K. L. and Roizman B. (1985):**

A noninverting genome of a viable herpes simplex virus 1: presence of head-to-tail linkages in packaged genomes and requirements for circularization after infection.

J. Virol. 53: 587-595

**Pomeranz L. E. and Blaho J. A. (2000):**

Modified VP22 localizes to the cell nucleus during synchronized herpes simplex virus type 1 infection.

J. Virol. 73: 6769-6781

**Poulsen D. J. and Keeler C. L. Jr. (1997):**

Characterization of the assembly and processing of infectious laryngotracheitis virus glycoprotein B.

J. Gen. Virol. 78: 2945-2951

**Rajcani J. and Vojvodova A. (1998):**

The role of herpes simplex virus glycoproteins in the virus replication cycle.

Acta Virol. 42: 103-118

**Rauh I. and Mettenleiter T. C. (1991):**

Pseudorabies virus glycoproteins gII and gp50 are essential for virus penetration.

J. Virol. 65: 5348-5356

**Rea T. J., Timmins J. G., Long G. W. and Post L. E. (1985):**

Mapping and sequence of the gene for the pseudorabies virus glycoprotein which accumulates in the medium of infected cells.

J. Virol. 54: 21-29

**Reynolds A., Ryckman B., Baines J., Zhou Y, Liang L. and Roller R. (2001):**

UL31 and UL34 proteins of herpes simplex virus type 1 form a complex that accumulates at the nuclear rim and is required for envelopment of nucleocapsids.

J. Virol. 75: 8803-8817

**Reynolds H. A., Watrach A. M. and Hanson L. E. (1968):**

Development of the nuclear inclusion bodies of infectious laryngotracheitis.

Avian Dis. 12: 332-347

**Robertson G. M. and Egerton J. R. (1981):**

Replication of infectious laryngotracheitis virus in chickens following vaccination.

Austr. Vet. J. 57: 119-123

**Rock D. L., Beam S. L. and Mayfield J. E. (1987):**

Mapping bovine herpesvirus type 1 latency-related RNA in trigeminal ganglia of latently infected rabbits.

J. Virol. 61: 3827-3831

**Roizman B. and Knipe D.M. (2001):**

Herpes simplex viruses and their replication.

In: Knipe D. M. and Howley P. M. (Hrsg.): Fields Virology. 4. Aufl.

Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, S. 2399-2459

**Roizman B. and Pellett P. E., (2001):**

The family *Herpesviridae*: A brief introduction.

In: Knipe D. M. and Howley P. M. (Hrsg.): Fields Virology. 4. Aufl.

Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, S. 2381-2397

**Sakaguchi M., Urakawa T., Hirayama Y., Miki N., Yamamoto M. and Hirai K. (1992):**

Sequence determination and genetic content of an 8.9-kb restriction fragment in the short unique region and the internal inverted repeat of Marek's disease virus type 1 DNA.

Virus Genes 6: 365-378

**Sanger F., Nicklen S. and Coulson A. R. (1977):**

DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.

Biotechnology 24: 104-108

**Schmidt U. (1992):**

Infektiöse Laryngotracheitis.

In: Heider G. und Monreal G. (Hrsg.): Krankheiten des Wirtschaftsgeflügels.

Gustav Fischer Verlag, Jena, Bd. 1, S. 419-427

**Schnitzlein W. M., Radzevicius J. and Tripathy D. N. (1994):**

Propagation of infectious laryngotracheitis virus in an avian liver cell line.  
Avian Dis. 38: 211-217

**Schnitzlein W. M., Winans R., Ellsworth S. and Tripathy D. N. (1995):**

Generation of thymidine kinase-deficient mutants of infectious laryngotracheitis virus.  
Virology 209: 304-314

**Scholz E., Welniak E., Nyholm T. and Guo P. (1993):**

An avian hepatoma cell line for the cultivation of infectious laryngotracheitis virus and for the expression of foreign genes with a mammalian promoter.  
J. Virol. Methods 43: 273-286

**Scholz E., Porter R. E. and Guo P. (1994):**

Differential diagnosis of infectious laryngotracheitis from other avian respiratory diseases by a simplified PCR procedure.  
J. Virol. Methods 50: 313-322

**Schwyzler M. and Ackermann M. (1996):**

Molecular virology of ruminant herpesviruses.  
Vet. Microbiol. 53: 17-29

**Seifried O. (1938):**

Einfluß von Virusvirulenz und Infektionsart auf den anatomischen Charakter der sog. Laryngotracheitis der Hühner.  
Zschr. Infkrh. Haust. 52: 108-123

**Sevoian M. (1960):**

A quick method for the diagnosis of avian pox and infectious laryngotracheitis.  
Avian Dis. 4: 474-477

**Sheldrick P., Laithier M., Lando D. and Ryhiner M. L. (1973):**

Infectious DNA from herpes simplex virus: infectivity of double-stranded and single-stranded molecules.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70: 3621-3625

**Skepper J. N., Whiteley A., Browne H. and Minson A. (2001):**

Herpes simplex virus nucleocapsids mature to progeny virions by an envelopment → deenvelopment → reenvelopment pathway.  
J. Virol. 75: 5697-5702



**Smibert C. A., Popova B., Xiao P., Capone J. P. and Smiley J. R. (1994):**

Herpes simplex virus VP16 forms a complex with the virion host shutoff protein vhs.  
J. Virol. 68: 2339-2346

**Smiley J. R. (2004):**

Herpes simplex virus virion host shutoff protein: immune evasion mediated by a viral RNase?  
J. Virol. 78: 1063-1068

**Sodeik B. (2000):**

Mechanisms of viral transport in the cytoplasm.  
Trends Microbiol. 8: 465-472. Review.

**Sodeik B., Ebersold M. W. and Helenius A. (1997):**

Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus  
J. Cell Biol. 136: 1007-1021

**Spear P. G. (1985):**

Glycoproteins specified by herpes simplex viruses.  
In: B. Roizman (Hrsg.), The herpesviruses. 3. Aufl.  
Plenum Press, New York, N.Y.: 315-356

**Spear P. G. (1993):**

Entry of alphaherpesviruses into cells.  
Semin. Virol. 4: 167-180

**Steiner I. (1996):**

Human herpes viruses latent infection in the nervous system.  
Immunol. Rev. 152: 157-173

**Stevens J. G., Wagner E. K., Devi-Rao G. B., Cook M. L. and Feldman L. T. (1987):**

RNA complementary to a herpes virus alpha gene mRNA is prominent in latently infected neurons.  
Science 235: 1056-1059

**Stoschek C. M. (1990):**

Quantitation of protein.  
Meth. Enzym. 182: 50-68

**Su H. K., Eberle R. and Courtney R. J. (1987):**

Processing of the herpes simplex virus type 2 glycoprotein gG-2 results in secretion of a 34,000-Mr cleavage product.  
J. Virol. 61: 1735-1737

**Sun Y., MacLean A. R., Dargan D. and Brown S. M. (1994):**

Identification and characterization of the protein product of gene 71 in equine herpesvirus 1.  
J. Gen. Virol. 75: 3117-3126

**Telford E. A., Watson M. S., McBride K. and Davison A. J. (1992):**

The DNA sequence of equine herpesvirus-1.  
Virology 189: 304-316

**Thomsen D. R., Marchioli C. C., Yancey R. J. Jr. and Post L. E. (1987):**

Replication and virulence of pseudorabies virus mutants lacking glycoprotein gX.  
J. Virol. 61: 229-232

**Thureen D. R., Keeler C. L. Jr. and Dolan M. (2004):**

Pacheco's disease virus and infectious laryngotracheitis virus: Comparative analysis of two avian alpha herpesviruses.  
GenBank Accession No. NC005264, unpublished

**Thureen D. R. and Keeler C. L. Jr. (2005):**

Psittacid herpesvirus 1 and infectious laryngotracheitis virus: Comparative analysis of two avian alpha herpesviruses.  
GenBank Accession No. NC006623, unpublished

**Tong G. Z., Zhang S. J., Meng S. S., Wang L., Qiu H. J., Wang Y. F., Yu L. and Wang M. (2001):**

Protection of chickens from infectious laryngotracheitis with a recombinant fowlpox virus expressing glycoprotein B of infectious laryngotracheitis virus.  
Avian Pathol. 30: 143-148

**Trapp S., Osterrieder N., Keil G. M. and Beer M. (2003):**

Mutagenesis of a bovine herpesvirus type 1 genome cloned as an infectious bacterial artificial chromosome: analysis of glycoprotein E and G double deletion mutants.  
J. Gen. Virol. 84: 301-306

**van Kammen A. and Spradbrow P. B. (1976):**

Rapid diagnosis of some avian virus diseases.  
Avian Dis. 20: 748-751

**van Oirschot J. T., Rziha H. J., Moonen P. J., Pol J. M. and van Zaane D. (1986):**

Differentiation of serum antibodies from pigs vaccinated or infected with Aujeszky's disease virus by a competitive enzyme immunoassay.  
J. Gen. Virol. 67: 1179-1182

**Varmuza S. L. and Smiley J. R. (1985):**

Signals for site-specific cleavage of HSV DNA: maturation involves two separate cleavage events at sites distal to the recognition sequences.

Cell 41: 793-802

**Veits J., Köllner B., Teifke J. P., Granzow H., Mettenleiter T. C. and Fuchs W. (2003a):**

Isolation and characterization of monoclonal antibodies against structural proteins of infectious laryngotracheitis virus.

Avian Dis. 47: 330-342

**Veits J., Mettenleiter T. C. and Fuchs W. (2003b):**

Five unique open reading frames of infectious laryngotracheitis virus are expressed during infection but are dispensable for virus replication in cell culture.

J. Gen. Virol. 84: 1415-1425

**Veits J., Lüscho D., Kindermann K., Werner O., Teifke J. P., Mettenleiter T. C. and Fuchs W. (2003c):**

Deletion of the non-essential UL0 gene of infectious laryngotracheitis (ILT) virus leads to attenuation in chickens, and UL0 mutants expressing influenza virus haemagglutinin (H7) protect against ILT and fowl plague.

J. Gen. Virol. 84: 3343-3352

**Vlcek C., Kozmik Z., Paces V., Schirm S. and Schwyzer M. (1990):**

Pseudorabies virus immediate-early gene overlaps with an oppositely oriented open reading frame: characterization of their promoter and enhancer regions.

Virology 179: 365-377

**Wagner E. K. and Bloom D. C. (1997):**

Experimental investigation of herpes simplex virus latency.

Clin. Microbiol. Rev. 10: 419-443

**Waltzek T. B., Kelley G. O., Stone D. M., Way K., Hanson L., Fukuda H., Hirono I., Aoki T., Davison A. J. and Hedrick R. P. (2005):**

Koi herpesvirus represents a third cyprinid herpesvirus (CyHV-3) in the family Herpesviridae.

J. Gen. Virol. 86 : 1659-1667

**Watrach A. M., Hanson L. E. and Watrach M. A. (1963):**

The structure of infectious laryngotracheitis virus.

Virology 21: 601-608

**Weinheimer S. P., Boyd B. A., Durham S. K., Resnick J. L. and O'Boyle D. R. 2d (1992):**  
Deletion of the VP16 open reading frame of herpes simplex virus type 1.

J. Virol. 66: 258-269

**Whealy M. E., Card J. P., Meade R. P., Robbins A. K. and Enquist L. W. (1991):**  
Effect of brefeldin A on alphaherpesvirus membrane protein glycosylation and virus egress.

J. Virol. 65: 1066-1081

**Whitton J. L. and Oldstone M. B. A. (2001):**

The immune response to viruses.

In: Knipe D. M. and Howley P. M. (Hrsg.): Fields Virology. 4. Aufl.

Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, S. 2381-2397

**Wild M. A., Cook S. and Cochran M. (1996):**

A genomic map of infectious laryngotracheitis virus and the sequence and organization of genes present in the unique short and flanking regions.

Virus Genes 12: 107-116

**Williams R. A., Bennett M., Bradbury J. M., Gaskell R. M., Jones R. C. and Jordan F. T. W. (1992):**

Demonstration of sites of latency of infectious laryngotracheitis virus using the polymerase chain reaction.

J. Gen. Virol. 73: 2415-2420

**Winterfield R. W. and So I. G. (1968):**

Susceptibility of turkeys to infectious laryngotracheitis.

Avian Dis. 12: 191-202

**Woernle H. und Brunner A. (1961):**

Präzipitationstest zur Diagnose der infektiösen Laryngotracheitis des Huhnes.

Tierärztl. Umsch. 16: 245-246

**York J. J. and Fahey K. J. (1988):**

Diagnosis of infectious laryngotracheitis using a monoclonal antibody ELISA.

Avian Pathol. 17: 173-182

**Zelnik V., Darteil R., Audonnet J. C., Smith G. D., Riviere M., Pastorek J. and Ross L. J. N. (1993):**

The complete sequence and gene organization of the short unique region of herpesvirus of turkeys.

J. Gen. Virol. 74: 2151-2162

**Zhang Y., Sirko D. and McKnight J. L. C. (1991):**

Role of herpes simplex virus type 1 UL46 and UL47 in  $\alpha$ TIF-mediated transcriptional induction: characterization of three viral deletion mutants.

J. Virol. 65: 829-841

**Zhang Y. and McKnight J. L. C. (1993):**

Herpes simplex virus type 1 UL46 and UL47 deletion mutants lack VP11 and VP12 or VP13 and VP14, respectively, and exhibit altered viral thymidine kinase expression.

J. Virol. 67: 1482-1492

**Zhou Z., Chen D., Jakana J., Rixon F. J. and Chiu W. (1999):**

Visualization of tegument-capsid interactions and DNA in intact herpes simplex virus type 1 virions.

J. Virol. 73: 3210-3218

**Zhu W. and Courtney R. (1994):**

Chemical cross-linking of virion envelope and tegument proteins of herpes simplex virus type 1.

Virology 204: 590-599

**Zhu Z., Gershon M. D., Ambron R., Gabel C. and Gershon A. A. (1995):**

Infection of cells by varicella zoster virus: inhibition of viral entry by mannose 6-phosphate and heparin.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 3546-3550

**Ziemann K., Mettenleiter T. C. and Fuchs W. (1998a):**

Gene arrangement within the unique long genome region of infectious laryngotracheitis virus is distinct from that of other alphaherpesviruses.

J. Virol. 72: 847-852

**Ziemann K., Mettenleiter T. C. and Fuchs W. (1998b):**

Infectious laryngotracheitis herpesvirus expresses a related pair of unique nuclear proteins which are encoded by spilt genes located at the right end of the U<sub>L</sub> genome region.

J. Virol. 72: 6867-6874

## 8 ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
b(p)	Basen(paare)
BHV	Bovines Herpesvirus
BSA	Bovines Serumalbumin
CCV	channel catfish virus
CEK	chicken embryo kidney
CEL	chicken embryo liver
CPE	Cytopathogener Effekt
cRNA	Komplementäre RNA
d	Tag(e)
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
EBV	Eppstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHV	Equines Herpesvirus
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
G	Relative Zentrifugationsbeschleunigung
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HCMV	Humanes Cytomegalievirus
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaciny]-ethan-sulfonsäure
HHV	Humanes Herpesvirus
HSV	Herpes-Simplex-Virus
HVT	Putenherpesvirus
IAC	Isoamylalkohol/Chloroform
IFT	Immunfluoreszenztest
ILT	Infektiöse Laryngotracheitis
ILTV	Virus der Infektiösen Laryngotracheitis

---

IR	Interne Repetition
KHV	Koi Herpesvirus
KSHV	Kaposi's Sarkom assoziiertes Herpesvirus
LAT	Latenz-assoziiertes Transkript
LB	Luria-Bertani
LMH	Hühnerhepatomzelllinie
MAK	Monoklonaler Antikörper
MCMV	Murines Zytomegalievirus
MDV	Marek's Disease Virus
MEM	minimum essential medium
min	Minute
MOI	multiplicity of infection
mRNA	messenger RNA
OD	Optische Dichte
ORF	open reading frame
Ori	origin of DNA replication
OsHV	Austernherpesvirus
p.i.	post infectionem
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pfu	plaque forming unit
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
polyA	Polyadenylierungssignal
PrV	Pseudorabiesvirus
RaHV	Froschherpesvirus
RIP	Radioimmunpräzipitation
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SalHV	Salmonid Serpesvirus
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SPF	Spezifisch pathogenfrei
Tab.	Tabelle
TCA	
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TIF	Transinduzierender Faktor
TNF	Tumor-Nekrosefaktor
TR	Terminale Repetition
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan

---

U	unit
U <sub>L</sub>	unique long
U <sub>S</sub>	unique short
VZV	Varicella-Zoster-Virus
w/v	weight/volume
WT	Wildtyp



## DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Prof. E. F. Kaleta vielmals für die Begutachtung dieser Arbeit und die Bereitschaft, sie vor dem Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen zu vertreten.

Herrn Prof. Dr. T. C. Mettenleiter danke ich sehr herzlich für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Institut durchzuführen, sowie für die Unterstützung und Betreuung, seine Anregungen und Diskussionsbereitschaft.

Bei Herrn Dr. W. Fuchs möchte ich mich ganz besonders herzlich bedanken für die ausführliche und geduldige Einführung in die Welt der Molekularbiologie. Seine hervorragende Betreuung und ständige Unterstützung sowie die gründliche Durchsicht des Manuskriptes haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ein Dankeschön auch an Fr. Ehrlich für die tatkräftige Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor.

Sehr herzlich danke ich Fr. Dr. J. Veits für die Hilfe bei der Durchführung des Tierversuchs und der Gewinnung der Antiseren, und besonders für ihre freundschaftliche Unterstützung.

Bei Herrn Prof. Dr. J. Teifke bedanke ich mich sehr für die Anfertigung und Auswertung der histologischen Präparate und für die Überlassung der Aufnahmen.

Herrn Dr. E. Mundt danke ich sehr für die Hilfe bei der Gewinnung der Antiseren.

Bei Herrn Dr. H. Granzow bedanke ich mich für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Präparate und die Bereitstellung der Aufnahmen.

Ein großes Dankeschön gilt Fr. Dr. B. Klupp, die mir mit viel Ausdauer bei der Anfertigung der Aufnahmen am konfokalen Laser-Scan-Mikroskop geholfen hat.

Ich bedanke mich sehr herzlich bei den Mitarbeitern der Zellbank unter Leitung von Herrn Dr. R. Riebe, und ganz besonders bei Fr. Voß für die Anfertigung der primären Zellkulturen und die Einarbeitung in diese Arbeitsmethode.

Allen Kollegen und Mitarbeitern am Friedrich-Loeffler-Institut danke ich für die Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit in freundschaftlicher Atmosphäre.

Bei meiner Familie möchte ich mich dafür bedanken, dass sie mir das aufwendige Studium der Veterinärmedizin ermöglicht und mich immer mit allen Kräften unterstützt hat. Thomas danke ich für seine liebevolle Unterstützung und sein Verständnis, für unsere schöne Zeit an der Ostsee und für die unzähligen gefahrenen Kilometer.



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5032-0



9 783835 950320

®