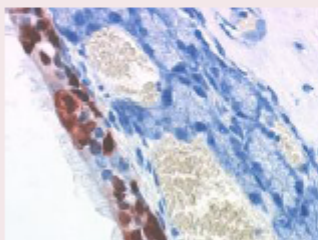
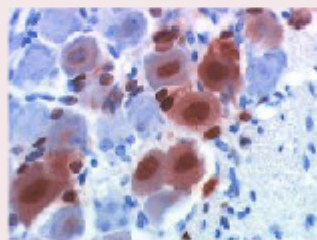


Molekulare und pathomorphologische Untersuchungen zur Bedeutung verschiedener Virusproteine für die Neuroinvasion des Pseudorabiesvirus

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



Robert Klopffleisch

Gießen 2005

Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie;
Detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Auflage 2005

© 2005 by Verlag: **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH**, Gießen
Printed in Germany

ISBN 3-938026-30-8

Verlag: DVG Service GmbH
Frankfurter Straße 89
35392 Gießen
0641/24466
geschaeftsstelle@dvb.net
www.dvb.net

**Molekulare und pathomorphologische Untersuchungen zur Bedeutung
verschiedener Virusproteine für die Neuroinvasion des
Pseudorabiesvirus**

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

Robert Klopffleisch

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen
und
dem Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für
Tiergesundheit, Institut für Infektionsmedizin, Greifswald

Betreuer: PD Dr. Jens Peter Teifke

**Molekulare und pathomorphologische Untersuchungen zur Bedeutung
verschiedener Virusproteine für die Neuroinvasion des
Pseudorabiesvirus**

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

Eingereicht von
Robert Klopffleisch
Tierarzt aus Suhl

Gießen 2005

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

Dekan Prof. Dr. Manfred Reinacher

Gutachter:

PD Dr. Jens P. Teifke

PD Dr. Paul Becher

Tag der Disputation: 11.04.2005

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 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.

Teile dieser Arbeit wurden publiziert:

Klopfleisch R, JP Teifke, W Fuchs, M Kopp, TC Mettenleiter (2004).

Influence of Tegument Proteins of Pseudorabies Virus on Neuroinvasion and Transneuronal Spread in the Nervous System of the Mice.

J Virol **78**: 2956-2966.

Klupp BG, H Granzow, R Klopfleisch, W Fuchs, M Kopp, M Lenk, TC Mettenleiter (2005).

Functional analysis of the Pseudorabies Virus UL51 Protein.

J Virol **79**: 3831-3840.

Die Anfertigung dieser Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft und die Studienstiftung des deutschen Volkes unterstützt.

Meinen Eltern und Constanze

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
2	LITERATURÜBERSICHT.....	2
2.1	Neurotropismus von Herpesviren.....	2
2.2	Das Pseudorabiesvirus (PrV)	5
2.2.1.	Die Aujeszky'sche Krankheit bei Haus- und Labortieren.....	5
2.2.2.	Morphologie des PrV	6
2.3	PrV-Infektion neuronaler Leitungsbahnen	7
2.3.1.	Neuronale Leitungsbahnen	7
2.3.2.	Innervation der Nasenhöhle und des Rachens	9
2.4	Neuroinvasion und Neurovirulenz.....	13
2.5	Neuronaler Zelltod.....	23
3	MATERIAL UND METHODEN	26
3.1	Methoden	26
3.1.1	Zellkulturen und Virusanzucht	26
3.1.1.1	Kultivierung von RK13-Zellen	26
3.1.1.2	Kalziumphosphat-Transfektion.....	26
3.1.1.3	Virusanzucht und Präparation von Virus-DNA	26
3.1.1.4	Virustitration	27
3.1.2	DNA-Klonierung	27
3.1.2.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen.....	27
3.1.2.2	DNA-Agarosegelelektrophorese	28
3.1.2.3	Klenow-Behandlung von Einzelstrangüberhängen.....	28
3.1.2.4	Ligation	28
3.1.2.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	29
3.1.2.6	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	30
3.1.3	Transformation von Bakterien	30
3.1.3.1	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien.....	30
3.1.3.2	Transformation chemisch kompetenter Bakterien	30

3.1.3.3	Herstellung elektrokompenter Bakterien	30
3.1.3.4	Transformation elektrokompenter Bakterien	31
3.1.3.5	Schnellpräparation von Plasmid-DNA.....	31
3.1.3.6	Präparation großer Mengen Plasmid-DNA.....	32
3.1.4	DNA-Analyse	32
3.1.4.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung	32
3.1.4.2	Southern-Blot-Hybridisierung	32
3.1.5	Proteinnachweis.....	34
3.1.5.1	Western-Blot	34
3.1.5.2	Indirekte Immunfluoreszenz (IIF).....	35
3.1.6	In-vitro-Charakterisierung von Deletionsmutanten.....	35
3.1.6.1	Ein-Schritt-Wachstumskinetik	35
3.1.6.2	Plaquetest	36
3.1.7	Geschwindigkeitsmessungen intraaxonalen Transports.....	36
3.1.7.1	Präparation, Kultur und Infektion primärer Neurone...	36
3.1.7.2	Zeitrafferaufnahmen.....	37
3.1.8	In-vivo-Infektionsexperimente	37
3.1.8.1	Versuchstiere.....	37
3.1.8.2	Viren.....	38
3.1.8.3	Intranasale Inokulation.....	38
3.1.8.4	Perfusionsfixierung	38
3.1.9	Histopathologische Untersuchungen	39
3.1.9.1	Herstellung von Paraffinschnitten.....	39
3.1.9.2	Herstellung von Kryostatschnitten.....	39
3.1.9.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	40
3.1.9.4	Luxol-Kresyl-Färbung	40
3.1.9.5	ABC-Methode.....	41
3.1.9.6	Nichtradioaktive In-situ-Hybridisierung (ISH).....	42
3.1.9.7	Konfokale Zwei-Farben-Immunfluoreszenz.....	44
3.2	Material	45

3.2.1	Virusstämme	45
3.2.2	Bakterienstämme	45
3.2.3	Zelllinien	46
3.2.4	Kits	46
3.2.5	Enzyme	46
3.2.6	Plasmide	46
3.2.7	Primer	47
3.2.8	Seren und Antiseren	47
3.2.9	Zellkulturmedien	48
3.2.10	Bezugsquelle für Chemikalien	48
3.2.11	Geräte	49
3.2.12	Verbrauchsmaterial	50
3.2.13	Stammlösungen und Puffer	50
4	ERGEBNISSE	61
4.1	Herstellung und In-vitro-Charakterisierung von PrV-Mutanten	61
4.1.1	Deletion des US9-Gens von PrV	61
4.1.2	Simultane Deletion der US9- und UL11-Gene von PrV	63
4.1.3	Herstellung von Rescuemutanten	66
4.1.4	In-vitro-Charakterisierung von PrV- Δ US9F und PrV- Δ UL11/US9K	67
4.1.5	Herstellung von Mutanten mit EGFP-UL35-Fusionsprotein	68
4.2	Infektionsexperimente in CD1-Mäusen	72
4.2.1	Bestimmung der mittleren Überlebenszeit	72
4.2.2	PrV-Kaplan	73
4.2.3	PrV- Δ UL46	75
4.2.4	PrV- Δ UL3	76
4.2.5	PrV- Δ US3	76
4.2.6	PrV- Δ UL47	77
4.2.7	PrV- Δ UL13	77

4.2.8	PrV- Δ gM.....	78
4.2.9	PrV- Δ UL51	78
4.2.10	PrV- Δ UL11	79
4.2.11	PrV- Δ UL41	79
4.2.12	PrV- Δ UL21	80
4.2.13	PrV- Δ US9F	80
4.2.14	PrV- Δ UL16	80
4.2.15	PrV- Δ UL16/UL11.....	80
4.2.16	PrV-Bartha	81
4.2.17	PrV- Δ UL11/gE	81
4.2.18	PrV- Δ UL11/US9K.....	82
4.2.19	PrV- Δ UL48	84
4.2.20	PrV- Δ UL16/UL21.....	84
4.2.21	PrV- Δ UL16/UL21/UL11	85
4.2.22	PrV- Δ UL17, PrV- Δ UL11/gM, PrV- Δ UL31	85
4.2.23	PrV- Δ UL34	85
4.2.24	PrV- Δ UL37	85
4.2.25	Rescuemutanten	86
4.3	Darstellung PrV-infizierter Zellen mittels nichtradioaktiver In-situ- Hybridisierung	90
4.4	Nachweis aktivierter Caspase 3	90
4.5	Untersuchung des intraaxonalen Transports von PrV.....	91
4.5.1	Geschwindigkeitsmessungen des intraaxonalen Transports EGFP-markierter Kapside.....	92
4.5.2	PrV-Kaplan	93
4.5.3	PrV- Δ UL11	94
4.5.4	PrV- Δ US9F	94
4.5.5	PrV- Δ UL48	95
4.5.6	PrV- Δ UL37	95

5	DISKUSSION	97
6	ZUSAMMENFASSUNG	112
6	SUMMARY	115
7	LITERATURVERZEICHNIS	117
	ANHANG	132

Die Vergrößerungsangaben zu den histologischen Abbildungen sind in der gedruckten Version um 30% zu reduzieren.

1 EINLEITUNG

Alphaherpesviren zeichnen sich in vielen Fällen durch einen ausgeprägten Neurotropismus aus (Sams et al. 1995, Enquist 1999). Die Infektion von Nervenzellen ist hierbei nicht nur wegen der damit verbundenen häufig schwerwiegenden klinischen Symptomatik von Bedeutung, sondern steht auch in engem Zusammenhang mit der Latenz dieser Viren (Roizman und Pellet 2001).

Das Pseudorabiesvirus (PrV) ist ein Alphaherpesvirus, das in zahlreichen Säugerspezies das Nervensystem zielgerichtet infiziert und aufgrund seiner spezifischen Neuroinvasion und transsynaptischen Ausbreitung inzwischen in den Neurowissenschaften einen hohen Stellenwert als Vektor oder Marker für neuronale Leitungsbahnen bei Labortieren einnimmt (Sams et al. 1995).

Für einige virale Glykoproteine konnte eine essentielle Bedeutung für die Infektion in Zellkultur und *in vivo* nachgewiesen werden, während andere Glykoproteine nur eine Rolle in der Neuroinvasion spielen (Babic et al. 1993, 1994, 1996a, 1996b, Masse et al. 1999, Flamand et al. 2001). Tegumentproteinen und Membranproteinen, die *in vitro* nichtessentiell sind, könnte ebenfalls für die Virusreplikation in Nervenzellen eine besondere Bedeutung zukommen. Neben ihrer Beteiligung an Virusmorphogenese und Virusfreisetzung sind diese vermutlich Voraussetzung für intrazelluläre Transportprozesse. Es stellt sich die Frage, welche Rolle insbesondere Tegumentproteine, die an das aus dem Zellkern austretende Kapsid unmittelbar angeheftet werden, beim axonalen Transport und damit bei der Neuroinvasion spielen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Bedeutung von Tegumentproteinen und Membranproteinen des PrV für Neuroinvasion und intraaxonalen Transport in der primären, murinen trigeminalen Neuronenkultur sowie hinsichtlich der Neurovirulenz und den daraus resultierenden pathogenetischen Folgen im Mausmodell zu untersuchen.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Neurotropismus von Herpesviren

Die Familie der Herpesviren wird auf der Basis biologischer und genetischer Unterschiede in die Unterfamilien der Alpha-, Beta- und Gammaherpesviren gegliedert (McGeoch und Cook 1994). Eine Vielzahl von Alphaherpesviren hat einen spezifischen Wirtstropismus, wie z.B. das Varicella-Zoster Virus (VZV), das bovine Herpesvirus 1 (BHV-1), das equine Herpesvirus 1 (EHV-1), das Marek's Disease Virus (MDV) oder entsprechende Herpesviren bei Katze und Hund. Andere, wie das humanpathogene Herpes simplex Virus Typ 1 (HSV-1) oder das Pseudorabiesvirus (PrV) des Schweines können eine produktive Infektion in einem wesentlich breiteren Wirtsspektrum etablieren.

Alphaherpesviren sind pantrop, d.h. sie infizieren verschiedene Zelltypen in Kultur und in ihren Wirten. Besonders ihr ausgeprägter Neurotropismus stand in der Vergangenheit im Zentrum des wissenschaftlichen Interesses (Babic et al. 1993, Sams et al. 1995, Enquist et al. 1998, Brideau et al. 2000b, Flamand et al. 2001). Die Fähigkeit der Alphaherpesviren, Gewebe zu infizieren und sich anschließend vom peripheren Nervensystem (PNS) zum zentralen Nervensystem (ZNS) auszubreiten, ist für die variable Ausprägung der von ihnen verursachten Krankheiten verantwortlich. So rufen HSV-1 und VZV im Menschen einerseits kutane Effloreszenzen und Exantheme wie Windpocken oder Gürtelrose hervor, können aber im ungünstigsten Fall auch fatale Enzephalitiden und Myelitiden verursachen. Eine ähnliche Variationsbreite in den pathogenetischen Eigenschaften besitzen auch tierpathogene Alphaherpesviren, wie EHV-1, EHV-4, BHV-1. Diese können durch ihren Endothelio- und Epitheliotropismus equine Rhinopneumonitis und Stutenabort bzw. infektiöse bovine Rhinotracheitis hervorrufen. Infolge ihres geringer ausgeprägten Neurotropismus können sie jedoch auch Enzephalitiden unterschiedlichen Schweregrades verursachen.

Neuropathologisch ist abhängig vom Weg der Infektion bei einer hämatogenen Erregerausbreitung ein panenzephalitisches und panmyelitisches Bild, wie es im Falle der natürlichen PrV-Infektion im Schwein im Vordergrund steht, zu erwarten. Bei einer neurogenen Ausbreitung, wie nach PrV-Infektion anderer Tierarten wird jedoch ein eng begrenztes, Leitungsbahn-assoziiertes Entzündungsmuster beobachtet. Histopathologisch finden sich eine ausgeprägte, vorwiegend lympho-plasmazelluläre Ganglioneuritis und Meningoenzephalitis. Degeneration von Neuronen mit typischen herpesviralen intranukleären Einschußkörperchen vom Typ Cowdry A, Kernwandhyperchromasie, Karyorrhesis und Karyolyse zeigt sich in den infizierten Ganglien und Kerngebieten. Diese wird gefolgt von einer neuroglialen Reaktion sowie von einer monozytären, lympho-plasmazellulären perivaskulären Infiltration. Im Gegensatz zu Astrozyten und Makrophagen, in denen eine limitierte virale Replikation ohne Entstehung infektiöser Partikel möglich ist, sind Mikrogliazellen ultrastrukturell und immunhistologisch nicht permissiv für PrV (Schijns et al. 1991). Zu diffusen Meningitiden kommt es meist in Verbindung mit panenzephalitischen Veränderungen, während ansonsten die entzündliche meningeale Reaktion eng an den Ort der Läsion im Neuropil gebunden ist.

In der Mehrzahl natürlicher Infektionen findet jedoch nur eine Infektion von peripheren Ganglienzellen als Neurone erster Ordnung statt. Unter dem Einfluss der Immunreaktion des Wirtes kommt es in dieser Lokalisation sehr häufig zu einer latenten Infektion. So kann hier experimentell durch passive Immunisierung von Mäusen gegen PrV sehr effizient eine latente Infektion hervorgerufen werden (Osorio und Rock 1992). Die Latenz bei Alphaherpesviren ist bislang weitestgehend ungeklärt. Es konnte gezeigt werden, dass im latenten Status virale DNA zwar vorhanden ist, jedoch keine infektiösen Virusnachkommen produziert werden (Mettenleiter 2000). Die virale Genexpression ist dabei auf die Transkription weniger Genomabschnitte beschränkt, wodurch so genannte Latenz-assoziierte-Transkripte (LATs) entstehen (Priola et al. 1990, Priola und Stevens 1991). Für HSV-1 sind LATs für die Etablierung einer Latenz zwar nicht

essentiell, besitzen jedoch eine „Antisense“ Orientierung gegenüber mRNA des regulatorischen Genproduktes ICP0, welches aktivierende Eigenschaften sehr früh im Zyklus der viralen Replikation hat. Demnach können LATs zumindest die Reaktivierung beeinflussen. Stressinduzierte Reaktivierung führt zur Virusreplikation in Neuronen erster Ordnung und kann den Transport neu synthetisierter Virionen von der Ganglienzelle zurück zum innervierten peripheren Gewebe verursachen. Ähnliche latente Infektionen werden auch für nichtneuronales Gewebe vermutet (Enquist et al. 1998).

Die Fähigkeit von Alphaherpesviren, sich innerhalb neuronaler Leitungsbahnen über synaptisch verbundene Neuronen auszubreiten, hat ihnen große Bedeutung als neuronale Tracer und Vektoren verliehen (Enquist et al. 1998). Ein entscheidender Vorteil gegenüber konventionellen Markierungsmethoden besteht dabei im selbstperpetuierenden Charakter der Infektion und der hochspezifischen Ausbreitung innerhalb neuronaler Systeme. Obwohl in der Vergangenheit sowohl humane als auch animale neurotrope Herpesviren für diese Zwecke erfolgreich eingesetzt wurden, stellt PrV das am ausführlichsten beschriebene Virussystem dar (Buijs et al. 2003, Geerling et al. 2003, Bareyre et al. 2004). Dabei zeigte es sich, dass Mutanten des PrV mit reduzierter Virulenz, aber uneingeschränkter Fähigkeit zur Neuroinvasion die besten neuronalen Marker darstellen (Enquist 2002). Die zunehmende Identifizierung von Genprodukten, die Einfluss auf Neurovirulenz und intraneuronale sowie transsynaptische Ausbreitung haben, ist demzufolge von erheblicher Bedeutung sowohl für das grundsätzliche Verständnis herpesviraler Neuropathogenität als auch für die Entwicklung antiviraler Therapeutika. Das molekularpathologische Verständnis erlaubt schließlich die Konstruktion von Virusmutanten mit verbesserten Eigenschaften als Tracer und Vektor.

2.2 Das Pseudorabiesvirus (PrV)

2.2.1 Die Aujeszky'sche Krankheit bei Haus- und Labortieren

Die durch das Pseudorabiesvirus (PrV, Suid Herpesvirus 1) hervorgerufene Aujeszky'sche Krankheit (AK) oder „Pseudowut“ wurde erstmals 1902 von dem ungarischen Tierarzt Aladar Aujeszky beschrieben (Aujeszky 1902). Das breite Infektionsspektrum umfasst unter anderem Schweine als natürlichen Wirt, aber auch Rinder, kleine Wiederkäuer, Fleischfresser, Kaninchen und Nager. Primaten besitzen eine natürliche Resistenz gegenüber der Infektion mit PrV. Die AK verläuft in allen empfänglichen Tierarten, außer bei adulten Schweinen, perakut bis akut und geht mit schweren zentralnervösen Symptomen sowie Juckreiz einher, der zu Automutilation führt und als „Mad Itch“-Syndrom bezeichnet wird (Shope 1931, Fraser und Ramachandran 1969, 1971, McCracken et al. 1973, Schmidt et al. 1987). Die Infektion erfolgt überwiegend aerogen und oronasal, während beim Rind und vor allem bei Hund sowie Katze die alimentäre Erregeraufnahme im Vordergrund steht. Bei Mäusen beginnt die Erkrankung mit Anorexie und Apathie. Im weiteren Verlauf kommen respiratorische Symptome und Unruhe hinzu, die zu Ataxie und Lethargie führen. Dazwischen liegen Phasen mit anfallsartigem Pruritus. Die Tiere versterben gewöhnlich innerhalb weniger Tage post infectionem (pi) (Fraser und Ramachandran 1969, Field und Hill 1974, 1975).

Auf die initiale Virusvermehrung am Infektionsort folgt beim Schwein in der Regel eine virämische Phase mit ausgedehnter Organmanifestation, die durch Nekrosen in Lunge, Leber und Milz gekennzeichnet ist und mit einer Panenzephalitis einhergeht. Bei den übrigen Haustieren und auch bei den experimentell infizierbaren Mäusen, Ratten und Kaninchen steht die neurogene Virusausbreitung pathogenetisch im Vordergrund. Bei intranasal infizierten Mäusen erfolgt die primäre Virusreplikation in der respiratorischen Schleimhaut der Nase sowie im Rachenraum. Von hier aus verläuft der neurogene, d. h. axoplasmatische Infektionsweg zum einen über Äste des *Nervus (N.) trigeminus*,

sowie über parasympathische und sympathische Leitungsbahnen. Der die Riechschleimhaut der Nasenhöhle versorgende *N. olfactorius* und der *N. glossopharyngeus* spielen bei der Maus nur eine untergeordnete Rolle (Babic et al. 1994). Demzufolge manifestiert sich die Erkrankung als Ganglioneuritis im Bereich der genannten Nerven erster Ordnung mit konsekutiver Enzephalitis um die entsprechenden Kerngebiete.

Über die genaue Todesursache nach neurogener Virusausbreitung ist bisher wenig bekannt. Weil die Infektion des *N. trigeminus* mit großer Wahrscheinlichkeit ausschließlich für den starken Juckreiz verantwortlich ist, wird die Infektion zentralnervöser Zentren mit Einfluss auf die autonomen Zentren als Todesursache vermutet (Takahashi et al. 1993).

2.2.2 Morphologie des PrV

Die gesamte Familie der Herpesviridae zeigt eine weitgehend einheitliche Virionmorphologie (Honess und Watson 1977, Roizman 1996). Das doppelsträngige DNA-Genom von ca. 150 Kilobasenpaaren des PrV wird in eine „Unique Long“ (UL) und eine „Unique Short“ (US) Region unterteilt, wobei letztere von invertierten „Repeats“ flankiert ist (Klupp et al. 2004b). Es befindet sich im zentralen Kern, welcher von einem ikosaedrischen Kapsid umgeben wird. Das Kapsid des PrV besteht vorrangig aus dem Hauptkapsidprotein, dem Produkt des UL19-Gens, welches die Hexon- und Penton-Kapsomere bildet (Klupp et al. 1992). Das aus mindestens 15 Proteinen zusammengesetzte Tegument findet sich zwischen dem Kapsid und der das Virion umhüllenden glykoproteinhaltigen Lipidmembran (Mettenleiter 2000). Bei der Virusmorphogenese kommt diesen Tegumentproteinen besondere Bedeutung zu. Neben strukturellen Funktionen beeinflussen sie die virale Replikation und den zellulären Stoffwechsel (Batterson und Roizman 1983, Campbell et al. 1984, Berthomme et al. 1993, Fuchs et al. 2002a). Ihre Rolle bei der Virusreplikation *in vitro* ist zum großen Teil bekannt und gut charakterisiert. Da aber aus dem In-vitro-Phänotyp nur sehr eingeschränkt auf das Verhalten im Tier geschlossen werden kann und In-vivo-Daten bisher

fehlen, liegen nur begrenzte Informationen über ihre jeweilige pathogenetische Bedeutung vor.

Die Glykoproteine der Virushülle sind für die Neuroinvasion der Alphaherpesviren besonders bedeutsam. Sie sind für das erste Anheften an freie Nervenendigungen („Adsorption“), das Eindringen in die Zelle sowie die Virusfreisetzung („Egress“) und für eine effiziente Virusausbreitung („Cell-to-Cell-Spread“) verantwortlich. Für PrV sind heute 11 verschiedene Glykoproteine bekannt. Ihre Rolle im Zusammenhang mit der Neurovirulenz und der transneuronalen Ausbreitung im Mausmodell ist in den letzten Jahren intensiv untersucht worden (Campbell et al. 1984, Babic et al. 1993, 1996a, Flamand et al. 2001).

2.3 PrV-Infektion neuronaler Leitungsbahnen

2.3.1 Neuronale Leitungsbahnen

Das PNS umfasst die somatischen Gehirn- und Rückenmarksnerven sowie die prä- und postganglionären Fasern des vegetativen Nervensystems. Es vermittelt die Erregungsleitung zu den Erfolgsorganen über die motorischen, efferenten Nervenfasern und von den Rezeptoren der Peripherie zum Gehirn und Rückenmark über die sensiblen, afferenten Leitungsbahnen.

In die peripheren somatischen Gehirn- und Rückenmarksnerven sind Ansammlungen von Nervenzellen eingebettet, die als Ganglien bezeichnet werden. In ihnen befinden sich die Perikaryen somato-afferenter Neurone. Dabei handelt es sich um große, runde, pseudounipolare Nervenzellen, die von Neuroglia (Schwannsche Zellen, Satellitenzellen) und Nervenfasern umgeben sind (Paxinos 1994). Sie werden als Neurone erster Ordnung bezeichnet und besitzen nur einen Fortsatz, welcher sich perikaryonah in einen peripheren dendritischen und einen zentralen axonalen Zweig aufteilt (Kai-Kai 1989).

Zwei strukturelle Eigenschaften von Neuronen sind für das Verständnis der Zellbiologie der alphaherpesviralen Neuroinvasion von Bedeutung. So sind das polarisierte Zytoskelett und richtungsspezifische, Mikrotubuli-assoziierte Motorproteine kritisch für die neuronale Struktur und Polarität. Das Zytoskelett besteht zu ungefähr 10 % aus Mikrotubuli (Ginzburg 1991, Fuchs und Cleveland 1998). Mikrotubuli im Axon von Neuronen sind aufgrund ihrer polaren Struktur mit ihrem Plusende zur Synapse und ihrem Minusende zum Zellkörper hin orientiert. Das zum Plusende gerichtete Kinesin-Motorprotein und das zum Minusende weisende Dynein-Motorprotein liefern die molekulare Basis für den anterograden, d.h. zum Plusende gerichteten oder retrograden, zum Minusende führenden schnellen Transport innerhalb von Axonen (Hirokawa 1998) (Abb.1B). In der Neurovirologie wird häufig eine mit der Erregungsleitung verlaufende Virusausbreitung vom präsynaptischen zum postsynaptischen Neuron als anterograd bezeichnet (Brideau et al. 2000c) (Abb.1A). Als retrograde Bewegung gilt in diesem Zusammenhang eine Bewegung in die entgegengesetzte Richtung. Im Gegensatz zu multipolaren Neuronen zeigen beide Fortsätze pseudounipolarer Neurone eine nahezu identische Morphologie und gleiche Mikrotubulipolarität (Pannese et al. 1984, Kandel et al. 1991, Topp et al. 1994). Die Perikarya somatomotorischer Nerven finden sich in der grauen Substanz des ZNS oder in den Zerebrospinalganglien. Ihre Axone sind ohne weitere Umschaltung mit dem Erfolgsorgan verbunden.

Ein grundsätzlicher Unterschied zwischen somatischen und vegetativen Nerven findet sich in der unterschiedlichen Verschaltung efferenter Reize im Ganglion. Während eine efferente Erregung das somatische Ganglion ohne Unterbrechung durchläuft, findet in vegetativen Leitungsbahnen eine Umschaltung von einem präganglionären zentralen auf ein postganglionäres peripheres Neuron statt. Dabei ist zu beachten, dass zumindest der parasympathische Teil des vegetativen Nervensystems sich kurz nach seinem Ursprung in zentralnervösen Kerngebieten der Medulla oblongata den Hirn- und Rückenmarksnerven anschließt und in deren Ganglien umgeschaltet wird.

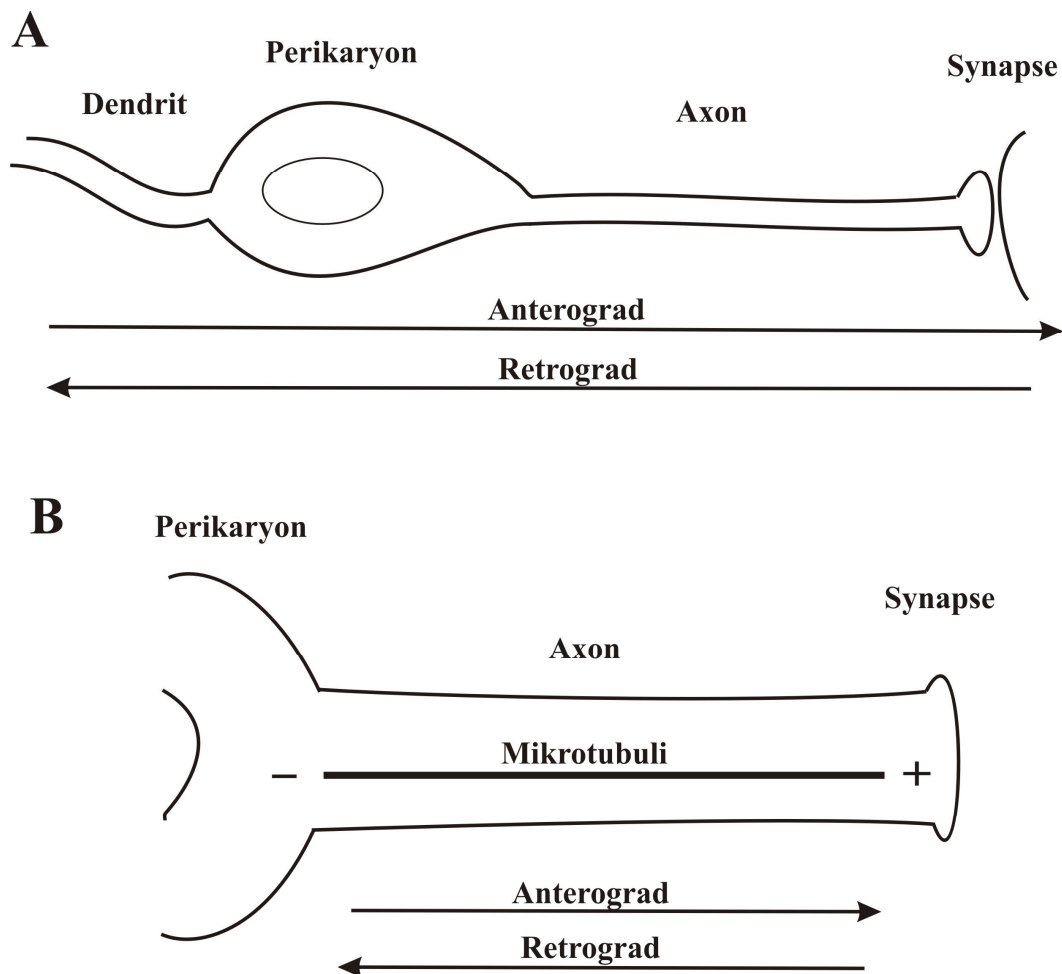


Abb.1. (A) Funktionelle Definition von axonalen Transportprozessen. Als anterograde Transport wird eine Bewegung mit dem Nervenimpuls (vom Dendrit zum Axon bzw. von prä- zum postsynaptischen Neuron) und als retrograde Transport eine Bewegung in entgegengesetzter Richtung bezeichnet. (B) Biochemische Definition von Transportprozessen. Eine Bewegung zum schnell wachsenden Plusende von Mikrotubuli (vom Zellkern weg) wird als anterograd, eine Bewegung zum Minusende (zum Zellkern) als retrograd bezeichnet.

2.3.2 Innervation der Nasenhöhle und des Rachens

Die somatische Innervation von Nasenhöhle und Rachen wird durch den *N. trigeminus*, den *N. facialis*, den *N. olfactorius*, den *N. glossopharyngeus* und den *N. vagus* gewährleistet (Abb.2,3).

Der *N. trigeminus* ist der Gehirnnerv mit dem größten sensiblen Innervationsfeld im Kopfbereich. Neben der motorischen Innervation des *Musculus (M.) masseter* und des *M. tensor veli palatini* sind somato-afferente Fasern für die

Wahrnehmung von Berührungs-, Temperatur- und Schmerzreizen im Bereich der Gesichtshaut, der Schleimhäute des Nasenrachenraumes und der intrakranialen Dura mater zuständig.

Die Perikarya sensibler trigeminaler Neuronen erster Ordnung finden sich im *Ganglion trigeminale* (TG), das in der Schädelhöhle basal des *Rhombenzephalons* gelegen ist. Die peripheren Fortsätze der Ganglienzellen bilden die drei Hauptäste des *N. trigeminus*: den *N. ophthalmicus*, den *N. maxillaris* und den *N. mandibularis*. Der rein sensible *N. ophthalmicus* verlässt zunächst zusammen mit dem ebenfalls ausschließlich sensiblen *N. maxillaris* die Schädelhöhle. Nach mehrfacher Verzweigung innerviert ersterer die Riechschleimhaut sowie den dorsalen Nasengang und die dorsale Nasenmuschel. Der *N. maxillaris* innerviert mit seinen vielfältigen Aufzweigungen die Schleimhäute des ventralen und mittleren Nasenganges, der Nasenmuscheln, des harten Gaumens und des Gaumensegels. Der *N. mandibularis* als dritter Abzweig des *N. trigeminus* führt sowohl sensorische also auch motorische Nervenfasern. Motorisch innerviert er durch seine vielfältigen Aufzweigungen u.a. den *M. tensor tympani*. Seine sensiblen Fasern versorgen die Schleimhaut der Mundhöhle.

Die zentralen Axone der trigeminalen Ganglienzellen treten lateral in den Pons ein, wo sie somatotopisch mit den Neuronen zweiter Ordnung in den sensorischen trigeminalen Kernen des *Nucleus sensibilis pontinus n. trigemini* (Pr5), des *Nucleus mesencephalici n. trigemini* (Me5) und des *Nucleus tractus spinalis n. trigemini* (Sp5) synaptisch in Kontakt treten. Zusammen formen sie einen Strang von Zellen, der vom Mittelhirn bis zum oberen zervikalen Rückenmark reicht (Darian-Smith 1973). Trigeminaler Afferenzen projizieren jedoch auch direkt zu anderen Arealen, wie dem *Nucleus tractus solitarius* (NTS), der *Formatio reticularis* (FR) und den kranialen Abschnitten des Rückenmarks. Sensible Fasern, die mit dem Sp5 in Verbindung stehen, bilden nach Eintritt in den Pons zusammen mit afferenten Fasern von vier weiteren Gehirnnerven (*N. facialis*, *N. glossopharyngeus*, *N. hypoglossus*, *N. vagus*) den *Tractus spinalis n. trigemini*.

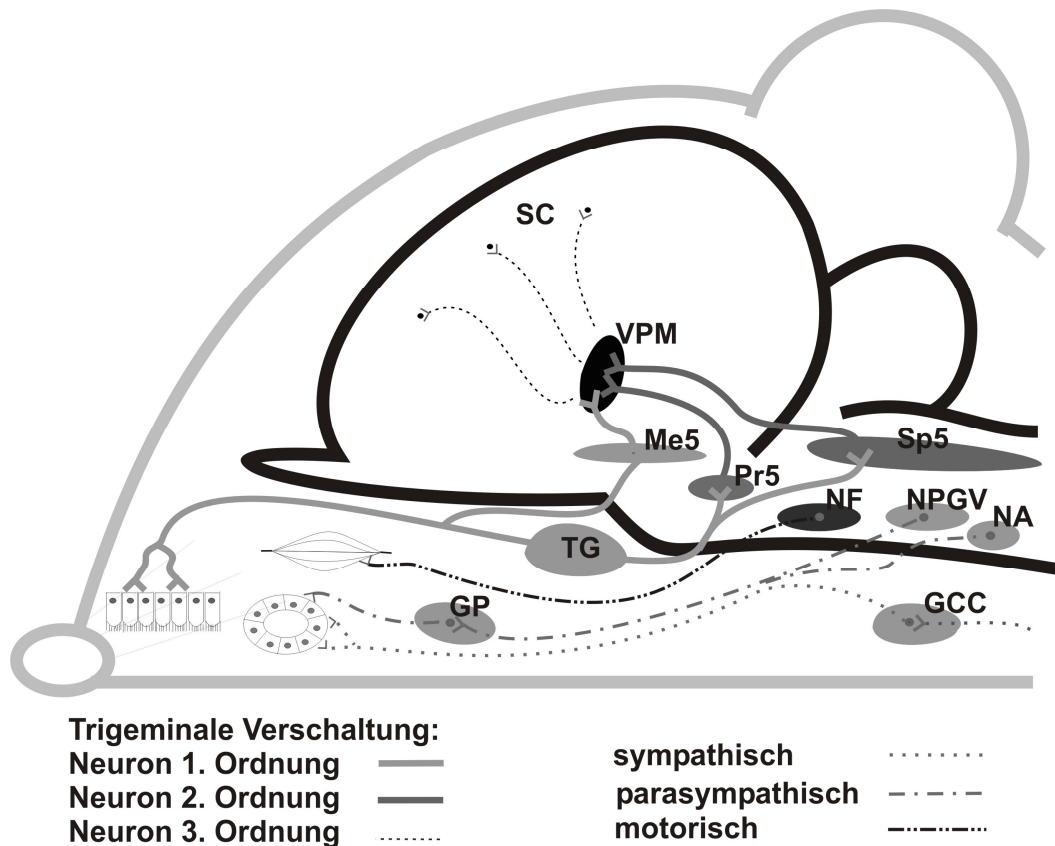


Abb.2. Schematische Darstellung der Innervation der Nasenhöhle bei der Maus. Neben der sensiblen Innervation durch den *N.trigeminus* finden sich auch Drüsen und Muskelgewebe innervierende, sympathische, parasymphatische und motorische Nervenfasern. GCC, *Ganglion cervicale craniale*; Me5, *Nucleus mesencephalici n.trigemini*; NA, *Nucleus ambiguus*; NF, *Nucleus motorius n. facialis*; NPGV, *Nucleus parasympathicus n. glossopharyngei et vagi*; GP, *Ganglion pterygopalatinum*; Pr5, *Nucleus sensibilis pontinus n. trigemini*; SC, somatosensorischer Kortex, Sp5, *Nucleus tractus spinalis n. trigemini*; TG, *Ganglion trigeminale*; Th, *Nucleus ventroposteriomedialis thalami*.

Der Sp5 wird weiterhin in einen oralen (Sp5O), interpolaren (Sp5I) und kaudalen Anteil (Sp5C) unterteilt. Er ist vorrangig für die Verschaltung von Temperatur- und vor allem im kaudalen Anteil von Schmerzreizen aus dem Schädelbereich von Bedeutung. Neurone des Sp5C projizieren zentral auf eine Reihe von weiteren Kerngebieten. Dominierend ist dabei eine Verschaltung in den *Nucleus ventroposteriomedialis thalami* (VPM) (Craig Jr. und Burton 1981, Dado und Giesler Jr. 1990, Yoshida et al. 1991). Dieser leitet wiederum einkommende trigeminale Signale zum somatosensorischen Kortex (SC) weiter. Weiterhin

projiziert das Sp5C auf den NTS, den *Nucleus motorius n. facialis* (NF) und zu allen weiteren rostral gelegenen trigeminalen Nuclei.

Der Pr5 erhält alle Arten von sensorischem Input. Die Verarbeitung von Berührungs- und Druckreizen scheint jedoch zu dominieren. Er projiziert hauptsächlich zum VPM. Eine schwache Verbindung besteht auch zum Kleinhirn und zum *Nucleus motorius n. hypoglossi* (NH).

Die pseudounipolaren Perikarya (Jacquin et al. 1983, Liem und Copray 1992) afferenter Nervenfasern des Me5 sind im Gegensatz zu anderen trigeminalen Neuronen erster Ordnung nicht im TG sondern im Mittelhirn lokalisiert. Ihre peripheren Fortsätze innervieren sensorisch die Kaumuskeln, die Mechanorezeptoren des Zahnfleisches sowie des harten Gaumens (Jerge 1963, Cody et al. 1972, Alvarado-Mallart et al. 1975,). Die zentralen Fortsätze projizieren auf *Nucleus motorius n. trigemini* (Mo5), Pr5 und den NTS (Zhang et al. 1991, Raappana und Arvidsson 1993). Ebenfalls ohne Umschaltung verlaufen die motorischen Fasern des Mo5 unter dem TG hindurch und bilden zusammen mit Axonen aus dem Me5 einen Reflexbogen, der die Intensität der Kaubewegungen moduliert.

Der *N. facialis* besteht aus zwei funktionell unterschiedlichen Anteilen, dem motorischen *N. facialis* und dem sensorischen und parasympathischen *N. intermedius*. Die motorischen Fasern des *N. facialis* entspringen dem NF und treten am hinteren Rand des Pons aus der *Medulla oblongata*. Sie innervieren über seine vielfältigen Aufzweigungen nahezu alle Muskeln des Gesichtsbereiches. Die pseudounipolaren afferenten Neuronen des *N. intermedius* (NI) liegen im *Ganglion geniculi* (GG) und innervieren als *N. lingualis* die Geschmacksknospen der vorderen zwei Drittel der Zunge. Sie stehen über ihre zentralen Fortsätze mit den Neuronen des NTS in Verbindung. Nach Austritt aus dem GG erhalten Zweige des NI über Äste des *N. vagus* (NV) parasympathische Fasern aus dem *Nucleus ambiguus* (NA) und sympathische Fasern vom *Ganglion cervicale craniale* (GCC) hinzu. Nach Umschaltung der parasympathischen Fasern im *Ganglion pterygopalatinum* (GP) werden die Drüsen der Nasen- und

Gaumenschleimhaut sowie die Tränendrüse vegetativ innerviert. Zentrale Signale erhält der NF aus verschiedenen Kernen, wie z.B. dem lateralen *Lemniscus* (Henkel und Edwards, 1978), der Olive, der FR (Panneton und Martin 1983), dem Pr5 (Erzurumlu und Killackey 1979) und dem Sp5C (Hiraoka und Shimamura 1977, Panneton und Martin 1983).

Der *N. glossopharyngeus* (NG) und der *N.vagus* stehen in enger funktioneller und anatomischer Verbindung. Ihre Ursprungskerne liegen im gleichen Bezirk der Medulla oblongata und kommunizieren peripher über verschiedene Geflechsbildungen. Die sensiblen Wurzelzellen von NG und NV liegen im *Ganglion distale n. glossopharyngei* bzw. *Ganglion distale n. vagi* (GD) außerhalb des Schädels und innervieren die Rachenschleimhaut, die Tonsillen sowie die Schleimhaut und Geschmacksknospen des hinteren Drittels der Zunge. Die in die *Medulla oblongata* eintretenden zentralen Fortsätze dieser Ganglienzellen stehen mit dem NTS und dem Sp5 in direkter Verbindung. Die parasympathischen efferenten Wurzelzellen beider Nerven innervieren die Drüsen der Backen-, Rachen- und Schlundkopfschleimhaut. Sie entspringen dem *Nucleus parasympathicus n. glossopharyngeus et n. vagi* (NPGV) und werden im jeweiligen *Ganglion distale* (GD) umgeschaltet. Ihre somato-motorischen Fasern innervieren den Schlundkopf und entspringen dem NA.

2.4 Neuroinvasion und Neurovirulenz

Neurovirulenz bezeichnet die Fähigkeit von Alphaherpesviren, eine Krankheit im Nervensystem zu verursachen. Der Grad der Neurovirulenz wird im Falle des PrV durch die durchschnittliche Überlebenszeit, die in den meisten Fällen auch mit dem ersten Auftreten von Krankheitssymptomen korreliert, bestimmt (Card und Enquist 1995). Ein neurovirulenter Phänotyp ist das Produkt aus zwei Eigenschaften eines Virus: der Neuroinvasivität und der Zytopathogenität. Unter

Neuroinvasion versteht man die Fähigkeit eines Virus, nach Infektion bis in das ZNS vorzudringen. Die Zytopathogenität, d.h. die Fähigkeit zur Zellschädigung

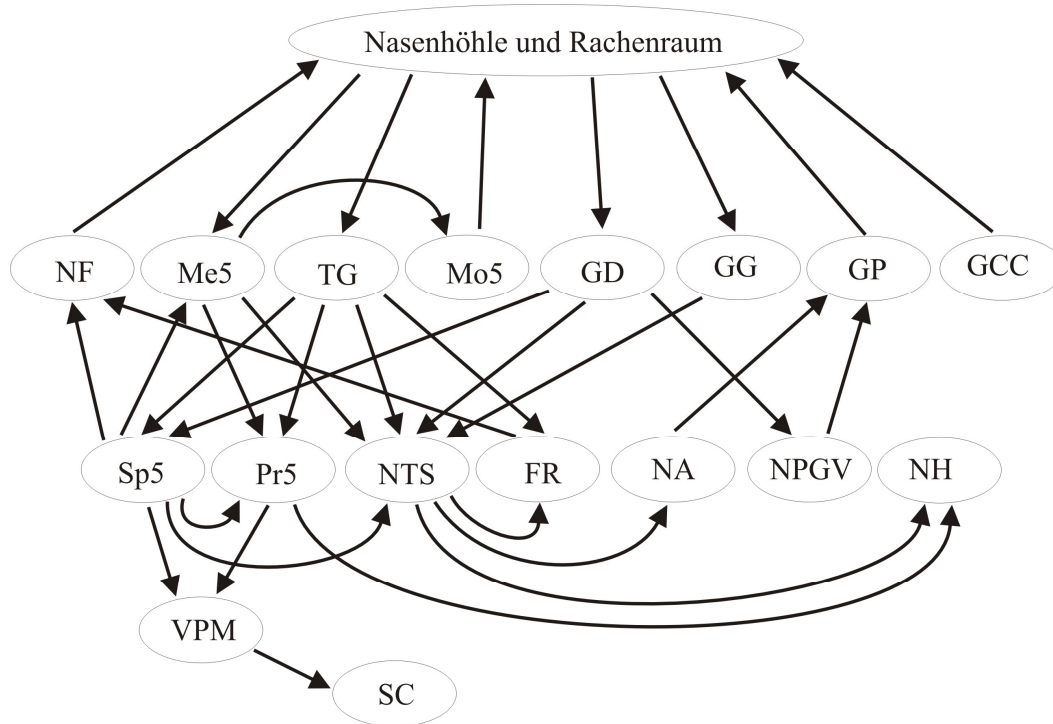


Abb.3. Schematische Darstellung der zentralnervösen Verschaltung der an der Innervation der Nasenhöhle beteiligten Nerven. Pfeilrichtungen entsprechen der Richtung des Nervenimpulses. FR, *Formatio reticularis*; GCC, *Ganglion cervicale craniale*; GD, *Ganglion distale*; GG, *Ganglion geniculi*; GP, *Ganglion pterygopalatinum*; Me5, *Nucleus mesencephalici n. trigemini*; Mo5, *Nucleus motorius n. trigemini*; NA, *Nucleus ambiguus*; NF, *Nucleus motorius n. facialis*; NH, *Nervus NTS, nucleus tractus solitarius*; NPGV, *Nucleus parasympathicus n. glossopharyngei et vagi*; Pr5, *Nucleus sensibilis pontinus n. trigemini*; SC, *somatosensorischer Kortex*; Sp5, *Nucleus tractus spinalis n. trigemini*; TG, *Ganglion trigeminale*; VPM, *Nucleus ventroposteriomedialis thalami*.

wird größtenteils durch die Expression viraler Gene, in geringerem Umfang aber auch durch indirekte zytopathische Effekte der reaktiven Gliose oder als Folge der Rekrutierung von Leukozyten zum Ort der Schädigung mit nachfolgender Freisetzung von freien Radikalen oder NO beeinflusst (Pfister et al. 2002).

Die Neuroinvasion der Alphaherpesviren verläuft analog zur Infektion von epithelialen Zellen in vier Etappen: (1) Adsorption und Eindringen in das Neuron, (2) Transport des viralen Kapsids zum Zellkern, (3) Replikation im Zellkern und (4) Zusammenbau und gerichteter Transport der Virusbestandteile zum Austrittsort.

Tab.1. Übersicht über Verhalten von PrV-Deletionsmutanten in RK13-Zellkultur und bisher bekannte Funktionen der deletierten Proteine

Name der Mutante	rel. Plaquegröße /Titerreduktion	Funktion des Proteins	Quelle
Δ gE	70 % / 0	<i>E</i> , Typ I Membranprotein, Komplex mit gI,	Fuchs et al. 2002b
Δ gM	90 % / 50	<i>E</i> , Typ III Membranprotein, Komplex gM/gN	Fuchs et al. 2002b
Δ US3	100 % / 10	<i>T</i> , Proteinkinase, Strukturprotein	Granzow et al. 2004
Δ US9	100 % / 0	<i>E</i> , intraaxonaler Transport	Tomishima und Enquist 2001
Δ UL3	100 % / 0	<i>NS</i>	Klupp et al. 2004a
Δ UL11	40 % / 10	<i>T</i> , sekundäre Umhüllung,	Kopp et al. 2003
Δ UL13	100 % / 0	<i>T</i> , Protein-Serin/Threonin-Kinase (HSV)	Coulter et al. 1993
Δ UL16	40 % / 0	<i>T</i> , Verbindung Kapsid und Hülle	Klupp et al. 2005a
Δ UL17	Foci/10 ⁴	DNA-Spaltung und -Verpackung	Klupp et al. 2005b
Δ UL19	keine Replikation	<i>C</i> , Hauptkapsidprotein	Klupp et al. 1992
Δ UL21	40 % / 0	<i>T</i> , kapsidassoziiert, Interaktion mit UL16	Klupp et al. 1995
Δ UL31	20 % / 5x10 ³	<i>T*</i> , Interaktion mit UL34	Fuchs et al. 2002c
Δ UL34	0 % / 10 ³	<i>E*</i> , Typ-II-Membranprotein	Klupp et al. 2000
Δ UL37	60 % / 10 ³	<i>T</i> , interagiert mit UL36	Klupp 2001 & 2002
Δ UL41	100 % / 0	<i>T</i> , Genregulation, "Viral Host Cell Shutoff"	Berthomme et al. 1993
Δ UL46	70 % / 0	<i>T</i> , Haupttegumentprotein	Kopp et al. 2003
Δ UL47	70 % / 10	<i>T</i> , sekundäre Umhüllung	Kopp et al. 2002
Δ UL48	50 % / 500	<i>T</i> , Transaktivator "Immediate-Early"-Gene,	Fuchs et al. 2002a
Δ UL51	30 % / 5	<i>T</i> , sekundäre Umhüllung	Klupp et al. 2005c
Δ UL11/US9	35 % / 10	Verbindung Tegument und Kapsid?	
Δ UL11/gE	10 % / 10	Akkumulation von Tegumentproteinen	Kopp et al. 2004
Δ UL11/gM	5 % / 10 ⁴	Interaktion Tegument und Hülle	Kopp et al. 2004
Δ UL16/11	30 % / 10	Verbindung Nukleokapsid und Hülle	Klupp et al. 2005a
Δ UL16/21	40 % / 0	Verbindung Nukleokapsid und Hülle	Klupp et al. 2005a
Δ UL16/21/11	30 % / 10	Verbindung Nukleokapsid und Hülle	Klupp et al. 2005a
Bartha-Stamm	keine Angaben	keine anterograde Ausbreitung	Enquist 2002

E: Hüllprotein, *E**: Hüllprotein primär umhüllter Virionen, *C*: Kapsidprotein, *NS*: Nichtstrukturprotein, *T*: Tegumentprotein, *T**: Tegumentprotein primär umhüllter Virionen

(1) Adsorption und Eindringen in das Neuron

Die Infektion beginnt mit dem Kontakt des Virions mit der Zielzelle (Adsorption) und der darauf folgenden Fusion der Virushülle mit der Plasmamembran (Penetration). Für diesen Fusionsprozeß sind mindestens vier virale Glykoproteine notwendig: gB, gD und gH/gL (Mettenleiter 1994). Glykoproteine B und H sind sowohl für die primäre Neuroinvasion als auch für die transsynaptische Ausbreitung essentiell (Babic et al. 1996b, Mettenleiter 2003, Spear 2004). Im Gegensatz dazu ist die Interaktion von Glykoprotein D mit seinen Liganden zwar von Bedeutung für die primäre Neuroinvasion, aber nicht an der sekundären, transsynaptischen Zell-zu-Zell-Ausbreitung beteiligt (Babic et al. 1993, Karger und Mettenleiter 1993, Peeters et al. 1993). Das Glykoprotein C ist als Bindungsprotein an der Adsorption beteiligt, kann aber nach Deletion durch die Wirkung von gD ersetzt werden (Spear 2004).

(2) Transport des viralen Kapsids zum Zellkern

Nach Eintritt der hüllenlosen Kapside in das Zytosol dissoziieren verschiedene Tegumentproteine vom Kapsid. So ist zum Beispiel das Produkt des UL41-Gens in den so genannten viralen „Host Cell Shutoff“ einbezogen, bei dem der zelleigene Metabolismus nahezu vollständig auf die virale Replikation umgestellt wird (Berthomme et al. 1993). Das UL48-Protein wirkt als potenter Transaktivator der viralen „Immediate-Early“ Gene (Batterson und Roizman 1983, Campbell et al. 1984). Innerhalb der Neuronen werden unbehüllte HSV-1-Kapside retrograd entlang der Mikrotubuli mittels Dynein-Motorproteinen zu den Kernporen transportiert (Granzow et al. 1997, Sodeik et al. 1997).

(3) Replikation im Zellkern

Nach Eintritt der viralen DNA in den Zellkern beginnt die kaskadenartig regulierte herpesvirale Transkription. Es werden dabei je nach Transkriptionszeitpunkt „Immediate-Early“- , „Early“- und „Late“-Gene unterschieden (Cheung 1989, Sodeik et al. 1997). Der Replikationszyklus wird

mit der Transkription und Translation der späten viralen Gene abgeschlossen, die hauptsächlich für virale Strukturproteine kodieren. So werden nach der Synthese im Zytoplasma Kapsidproteine, wie die Produkte von UL19 und UL35, in den Kern transportiert und formieren sich hier zu Kapsiden (Mettenleiter 2000). Sowohl für HSV-1 als auch für PrV hat das Genprodukt von UL17 einen essentiellen Einfluss auf Kapsidbildung und die DNA-Spaltung (Salmon et al. 1998, Taus et al. 1998, Klupp pers. Mitteilung).

(4) Zusammenbau und Transport der Virusbestandteile zum Austrittsort

Der Austritt von PrV aus dem Zellkern beginnt wie bei anderen Herpesviren mit einer Knospung von Kapsiden an der inneren Kernmembran in den perinukleären Spalt. An diesem Prozess sind die Genprodukte von UL31 und UL34 beteiligt. Beide Proteine finden sich in PrV-infizierten Zellen in der inneren und äußeren Kernmembran (Klupp et al. 2000, Fuchs et al. 2002c). Die In-vitro-Analyse von Deletionsmutanten ergab, dass die physikalische Interaktion beider Proteine von essentieller Bedeutung für die primäre Umhüllung ist. So zeigten die Deletionsmutanten PrV- Δ UL31 und PrV- Δ UL34 einen drastischen Replikationsdefekt in der Zellkultur, dessen morphologische Basis eine Retention von Kapsiden im Zellkern ist (Tab.1, (Fuchs et al. 2002c, Klupp et al. 2000)). Durch Fusion der primären Virushülle mit der äußeren Kernmembran verlassen die nunmehr wieder unbehüllten Kapside den perinukleären Spalt. Über die molekularen Mechanismen dieses Prozesses ist bisher wenig bekannt. Ultrastrukturelle Untersuchungen zeigen, dass die US3-kodierte Proteinkinase bei PrV die Fusion von primärer Virushülle mit der äußeren Kernmembran und die Lokalisation des UL34-Proteins in dieser Membran beeinflusst. Dieser Phänotyp kann jedoch, zumindest bei PrV, nicht durch Phosphorylierung von UL34 erklärt werden (Klupp et al. 2001a, Reynolds et al. 2001), da Deletion von US3 *in vitro* nur einen geringgradigen Replikationsdefekt hat (Wagenaar et al. 1995, Klupp et al. 2001a).

Im Zytoplasma angekommen, erhalten die Kapside ihr Tegument. Die „Tegumentation“ ist ein komplexer Prozess, der auf Protein-Protein-Interaktionen mit hoher Redundanz beruht (Mettenleiter 2002b). Die innerste Schicht des Teguments wird durch das UL36-Protein gebildet, welches physikalisch sowohl mit UL19, dem Hauptkapsidprotein, und UL37-Tegumentprotein interagiert (McNabb und Courtney 1992, Klupp et al. 2001b, Klupp et al. 2002). Diese Wechselwirkung ist für den Einbau weiterer Tegumentproteine von großer Bedeutung. So konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit von UL37 in RK13-Zellen zur Bildung intrazytoplasmatischer Kapsidaggregate und zu einem erheblichen Replikationsdefekt führt (Tab.1, Klupp et al. 2001b). Die weiteren Schritte der Tegumentation sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Redundante Funktionen verschiedener Tegumentproteine könnten die Ursache für eine, teilweise geringgradig behinderte, prinzipiell jedoch ablaufende In-vitro-Morphogenese von Deletionsmutanten in US3, UL11, UL13, UL16, UL21, UL41, UL46, UL47, UL51 sein (für Referenzen siehe Tabelle 1).

Die UL46- und UL47-Proteine stellen quantitativ Hauptkomponenten des Teguments dar. Die Deletion von UL47 führt zu geringgradig verringerten Virustitern und intrazytoplasmatischen Aggregaten tegumentierter Kapside. Die Deletion von UL46 führte zu keiner Veränderung der Virustiter, jedoch wie auch die Deletion von UL47 zu reduzierten Plaquegrößen (Tab.1, Kopp et al. 2002). Damit zeigt sich, dass zumindest UL47 an der Virusmorphogenese beteiligt ist.

Deletionsmutanten der Proteinkinase UL13, für die noch keine Funktionen bei PrV bekannt sind, zeigten in der Zellkultur einen nur unwesentlichen Replikationsdefekt (De Wind et al. 1992). Das US3 des PrV ist ebenfalls eine Proteinkinase und ein Tegumentprotein primärer und reifer Virionen, das Fusionsprozesse an der Kernmembran moduliert (Granzow et al. 2004).

Wenig ist über die Funktion der UL3- und UL51-Proteine bekannt. Für UL51 konnte bisher lediglich die Lokalisation als Kapsid-assoziiertes Tegumentprotein und seine Beteiligung an der sekundären Umhüllung nachgewiesen werden. Die Deletionsmutante zeigte einen milden Replikationsdefekt in Zellkultur

(Baumeister et al. 1995, Lenk et al. 1997, Klupp et al. 2005c). Das Genprodukt des UL3 stellt ein *in vitro* nicht essentielles Nichtstrukturprotein dar (Klupp et al. 2004a).

Einen weitaus größeren Effekt auf die Replikation von PrV hat die Abwesenheit der Produkte von UL11 und UL48. Beide sind möglicherweise an einem späten Schritt der Tegumentbildung oder an der sekundären Umhüllung der tegumentierten Kapside beteiligt (Fuchs et al. 2002a, Kopp et al. 2003).

Die homologen UL11-Proteine des HSV-1 (MacLean et al. 1989, Baines und Roizman 1992), des VZV (Harper und Kangro 1990) und des humanen Zytomegalievirus (HCMV) (Sanchez et al. 2000) sind myristoyliert und das HSV-1-UL11-Protein auch palmitoyliert (Loomis et al. 2001). Dies lässt auf eine Membranaffinität schließen (Kopp et al. 2003). Die Deletion von UL11 führt in der Zellkultur zu einem mäßigen Abfall der Virustiter und einer Reduktion der Plaquegrößen. Ultrastrukturell konnten große, intrazytoplasmatische Aggregate tegumentierter Kapside in Assoziation mit Membranen beobachtet werden (Kopp et al. 2003).

Noch deutlichere Auswirkungen auf die Replikationsfähigkeit von PrV in Zellkultur hat die Deletion des UL48-Gens (Fuchs et al. 2002a). Neben seiner transaktivierenden Funktion in der frühen Phase der Virusreplikation konnte für das UL48-Protein auch eine strukturelle Rolle in der späten Phase der Virusreplikation nachgewiesen werden (Batterson und Roizman 1983, Campbell et al. 1984, Berthomme et al. 1993, Zhu und Courtney 1994, Fuchs et al. 2002a). Ultrastrukturell zeigt die Deletionsmutante eine Ansammlung von hüllenlosen Kapsiden im Zytoplasma, was auf eine fehlende Wechselwirkung mit Glykoproteinen der Virushülle und damit eine verbindende Funktion zwischen tegumentiertem Kapsid und viraler Hülle schließen lässt (Zhu und Courtney 1994, Fuchs et al. 2002a). Weiterhin verhindert Deletion von UL48 auch den Einbau von UL41, dem viralen „Host Cell Shutoff“ Faktor (Read et al. 1993).

Die finale Umhüllung beinhaltet auch eine Interaktion von UL48 mit UL49 und nicht essentiellen Glykoproteinen gE/I und gM (Brack et al. 1999, 2000, Fuchs et

al. 2002b). In der Hülle von PrV-Virionen sind gM und gE in heterodimeren Komplexen mit gN und gI vorhanden (Zuckermann et al. 1988, Jöns et al. 1998). Die gleichzeitige Deletion von gM, gE und gI führt zu einem nahezu kompletten Block der späten Virusmorphogenese mit einem der UL11-Deletionsmutante gleich ausgeprägten Phänotyp (Brack et al. 1999, Kopp et al. 2003). Weiterhin konnten Kopp et al. (2004) zeigen, dass eine Deletion in gM und UL11 *in vitro* die sekundäre Umhüllung von PrV nahezu vollständig blockierte, während eine Doppelmutante in gE und UL11 einen der UL11-Mutante vergleichbaren Phänotyp zeigte (Kopp et al. 2004). Somit sind möglicherweise UL11 und gM an unterschiedlichen Schritten der sekundären Umhüllung beteiligt, wobei gleichzeitiges Fehlen dieser Proteine beide Prozesse unterbricht und damit den drastischen Defekt in der Virusmorphogenese verursacht (Kopp et al. 2004). Weitere Interaktionspartner des PrV-UL11-Proteins stellt das Genprodukt von UL16 dar (Loomis et al. 2003, Klupp et al. 2005a). Vermutlichen existiert ein Tegumentprotein-Komplex aus den UL21-, UL16- und UL11-Genprodukten, der eine Brücke zwischen Nukleokapsid und Virushülle bilden könnte (Klupp et al. 2005a). Eine UL21-Deletionsmutante zeigte eine reduzierte Virulenz im Schwein (Klupp et al. 1995). Für das UL16-Protein deuten ultrastrukturelle Untersuchungen nichtneuronaler Zellen auf eine Rolle bei der effizienten sekundären Umhüllung hin (Klupp pers. Mitteilung).

Die sekundäre Umhüllung tegumentierter Kapside in Vesikel des *trans*-Golgi-Netzwerkes führt in nichtneuronalen Zellen zur Entstehung von Vesikeln, welche nach Fusion von Vesikel und Plasmamembran behüllte, infektiöse Virionen freisetzen. Ein weiterer Mechanismus der viralen Ausbreitung ist die direkte Zell-zu-Zell-Ausbreitung ohne Bildung umhüllter extrazellulärer Virionen.

Während der Eintritt von Herpesviren in die Zielzelle und der Transport zum Zellkern in allen Zellen weitgehend identisch sind, bleiben der Ort der sekundären Umhüllung und die Mechanismen der Freisetzung von Virionen in Neuronen unklar. Verschiedene Arbeiten unterstützen die Ansicht, dass im Axonende eine Reifung von Virionen nach getrenntem axonalen Transport von Kapsiden und

Hüllproteinen erfolgt (Penfold et al. 1994, Holland et al. 1999, Miranda-Saksena et al. 2000, Tomishima et al. 2001). Gegen einen ausschließlichen Austritt von Herpesviren an axonalen Termini sprechen allerdings Beobachtungen, dass infektiöse Virionen aus Nerven isoliert werden können und Gliazellen in Nerven infiziert sind (Kritas et al. 1994, Shimeld et al. 2001). Drei Modelle des herpesviralen Egress wurden entwickelt, um diese Beobachtungen zu erklären (zusammengefasst in Tomishima und Enquist 2002). Zum einen ist es denkbar, dass eine Reifung von Herpesvirionen entlang des Axons und nicht vorrangig im Bereich der Synapse erfolgt (Shimeld et al. 2001). Andererseits wurde als Modell für eine Ausbreitung über kurze Distanzen eine sequentielle Infektion benachbarter nichtneuronaler Zellen, verbunden mit einer interzellulären Diffusion von extrazellulären Virionen im extraneuronalen Spalt vorgeschlagen (Ohara et al. 2001). Als dritte Hypothese wurde eine interzelluläre Ausbreitung von Herpesviren sowohl entlang des Axons, jedoch vor allem im Bereich der Synapse postuliert, wobei auch ein gD-unabhängiger „Cell-to-Cell Spread“ zu nichtneuronalen Zellen und transsynaptisch zu Neuronen möglich sein soll (Babic et al. 1993, Tomishima und Enquist 2002). Der Mechanismus des „Cell-to-Cell Spread“ ist bisher allerdings nicht bekannt. Möglicherweise rufen virale Membranproteine eine transiente Porenbildung hervor, die einen Transfer von Kapsiden von Zelle zu Zelle ermöglicht. Hierbei scheint Glykoprotein E bedeutsam für die Reifung von Herpesvirionen in der Nähe der Synapse zu sein (Mettenleiter 2003). Unterstützt wird diese These durch Beobachtungen, dass gE-deletierte Mutanten des PrV nur eine eingeschränkte transsynaptische Ausbreitung zeigten (Babic et al. 1996a).

Wie Smith et al. (2001) zeigen konnten, bewegen sich Alphaherpesviren in Neuronen mittels eines bidirektionalen, schnellen axonalen Transports. Sie konstruierten dafür eine PrV-Mutante, die ein Fusionsprotein aus dem „Green Fluorescent Protein“ (GFP) und dem UL35-Kapsidprotein exprimiert (Desai und Person 1998). Diese Markierung erlaubte es, Kapside in Axonen dorsaler Wurzelganglien in Zellkultur mittels Zeitrafferaufnahmen in der konfokalen

Mikroskopie darzustellen. Mit dieser Methode ist es möglich, einzelne Kapside zu visualisieren, die sich mit einer Geschwindigkeit von etwa 1,97 $\mu\text{m/s}$ über Strecken von durchschnittlich 13 μm anterograd durch Motoren wie Kinesin und mit ca. 1,28 $\mu\text{m/s}$ durchschnittlich 6,8 μm weit retrograd durch Motoren wie Dynein bewegen. Welche Proteine für die direkte Wechselwirkung zwischen Kapsid und zellulären Mikrotubuli-assoziierten Motoren verantwortlich sind, ist bisher jedoch nicht abschließend geklärt.

Für das US11-Genprodukt des HSV-1 wurde eine Interaktion mit dem Kinesin-Motorprotein gezeigt (Diefenbach et al. 2002). Frühere Untersuchungen zeigten jedoch, dass das HSV-1-US11-Protein, für das kein Homolog in PrV existiert (Klupp et al. 2004b), nicht essentiell für die virale Replikation in Zellkultur ist (Umene 1986, Brown und Harland 1987, Longnecker und Roizman 1987), und keine Auswirkungen auf die Neurovirulenz hat (Nishiyama et al. 1993).

Es konnte weiterhin festgestellt werden, dass HSV-1 in primärer neuronaler Kultur sein Tegument im Zytoplasma des Perikaryons erhält (Tomishima et al. 2001, Miranda-Saksena et al. 2002). Dies führte zu der Hypothese, dass möglicherweise eine Wechselwirkung von Tegumentproteinen mit den zellulären Transportern Kinesin und Dynein für den schnellen axonalen Transport von Kapsiden verantwortlich ist. Im Gegensatz dazu stehen die Untersuchungen von Douglas et al. (2004), die für HSV-1 eine Wechselwirkung des Kapsidproteins VP26, dem Produkt des UL35-Gens, mit der leichten Kette des Dynein beim Viruseintritt in die Zelle postulierten (Sodeik et al. 1997, Douglas et al. 2004,).

Der anterograde axonale Transport von PrV-Membranproteinen vom Golgi-Apparat zur Synapse ist in primärer Zellkultur sympathischer Neuronen möglicherweise abhängig vom US9-Protein (Tomishima und Enquist 2001, Enquist et al. 2002). Das Produkt des US9-Gens wurde erstmals als Tegumentprotein des HSV-1 beschrieben (Frame et al. 1986). Das US9-Protein des PrV wurde als 98 Aminosäuren großes, Typ-II-Membranprotein identifiziert, das möglicherweise mit Tegument- oder Kapsidproteinen interagiert (Brideau et al. 1998). Obwohl nicht essentiell in epithelialer Zellkultur, scheint das US9-

Protein am intraaxonalen Transport von PrV-Glykoproteinen in Neuronen beteiligt zu sein. So zeigten PrV US9-Deletionsmutanten einen Defekt in der anterograden, transsynaptischen Ausbreitung nach intravitrealer und intrakranialer Infektion der Ratte (Brideau et al. 2000a,b). Wegen seiner attenuierten Virulenz und seiner ausgeprägten Fähigkeit zur retrograden Ausbreitung in neuronalen Systemen ist der PrV-Bartha ein häufig genutzter neuronaler Marker in der Neurophysiologie und Neuroanatomie (Enquist 2002). Zusätzlich zu einer Us9-Deletion, trägt der PrV-Bartha Deletionen der Gene für gE, gI sowie Mutationen im UL21, gM und gC. Während Deletionsmutanten des PrV in gE, US9 und UL21 in der nichtneuronalen Zellkultur so gut wie keinen Replikationsdefekt zeigen, wird der bei diesem Stamm beobachtete Defekt in der anterograden Ausbreitung in neuronalen Systemen auf die Deletion des US9-Proteins zurückgeführt (Enquist 2002). Card et al. (1991) zeigten jedoch, dass sich PrV-Bartha nach intravitrealer Injektion bei der Ratte in einer kleinen Population von retinalen Ganglienzellen anterograd ausbreiten kann. Die reduzierte Virulenz wird durch das Fehlen des zytoplasmatischen Anteils des gE begründet (Tirabassi und Enquist 1999).

2.5 Neuronaler Zelltod

Die Konsequenz einer produktiven PrV-Infektion von Neuronen ist der Zelltod. Dabei lässt sich zwischen Nekrose, bedingt durch den Zusammenbruch des zellulären Stoffwechsels und dem programmierten Zelltod, Apoptose, unterscheiden. In PrV-infizierten RK13-Zellen scheint Nekrose die dominierende Form des Zelluntergangs zu sein (pers. Mitteilung Granzow), obwohl ein PrV-induzierter programmierter Zelltod in epithelialer Zellkultur, nicht jedoch in infiziertem Nervengewebe, nachgewiesen wurde (Cheung et al. 2000, Aleman et al. 2001). Für HSV-1 bzw. HCMV konnte ein apoptotischer Untergang von infizierten Neuronen im ZNS gezeigt werden (DeBiasi et al. 2002).

Apoptose ist die Folge eines kaskadenartig ablaufenden biochemischen Prozesses, der zur Eindämmung einer viralen Infektion im Organismus führen soll. Das Apoptoseprogramm kann sowohl durch intrinsische (mitochondrienabhängig) als auch extrinsische (Death-Rezeptor-vermittelte) Einflüsse ausgelöst werden (zusammengefasst in Benedict et al. 2002). Virusinfektionen aktivieren in der Regel interne Sensoren, was letztendlich zum Verlust der Integrität der Mitochondrien führt. Über pro-apoptotische Proteine der Bcl-2-Familie (z.B. Bax) kommt es zur Freisetzung von Cytochrom C, welches zusammen mit Apaf-1 und Pro-Caspase 9 das Apoptosom bildet. Die proteolytische Aktivierung von Pro-Caspase 9 wiederum aktiviert Pro-Caspase 3, die u.a. durch Aktivierung einer DNase und damit zur Apoptose der Zelle führt. Im Gegensatz dazu wird der extrinsische Weg durch die Rezeptoren der Tumor Nekrose Faktor (TNF) Rezeptor Superfamilie ausgelöst. Diese werden durch Faktoren wie FasL oder TNF, welche von dendritischen Zellen, natürlichen Killerzellen und zytotoxischen T-Zellen in der Nähe der infizierten Zelle freigesetzt werden, aktiviert. Die Bindung solcher Liganden führt zu einer schrittweisen Rekrutierung von Adaptoren und Initiatorcaspasen (Caspase 2, 8, 10), was letztlich ebenfalls zur proteolytischen Aktivierung von Caspase 3 führt, die damit eine zentrale Rolle im Apoptosegeschehen einnimmt.

Um den apoptotischen Prozess zu blockieren oder zu verlangsamen und somit die Produktion von viralen Nachkommen zu maximieren oder eine latente Infektion zu ermöglichen, haben Herpesviren eine Reihe unterschiedlicher Mechanismen entwickelt (Teodoro und Branton 1997, O'Brien 1998). Das Genprodukt des US3 von HSV-1, Latenz-assoziierte Transkripte von HSV-1 und BHV-1 sowie ICP27 und ICP22 von HSV-1 spielen offenbar eine Rolle bei der Verhinderung der Apoptose (Leopardi et al. 1997, Aubert und Blaho 1999, Hata et al. 1999, Jerome et al. 1999, Perng et al. 2000, Aubert et al. 2001). So kann die US3-Proteinkinase des HSV-1 Bax-induzierte Apoptose blockieren (Ogg et al. 2004). Aleman et al. (2001) postulierten aufgrund einer fehlenden histopathologischen und immunhistologischen Nachweisbarkeit von Apoptose in infizierten trigeminalen

Ganglienzellen eine Inhibition des neuronalen programmierten Zelltodes durch PrV. Hinweise für einen Einfluss von PrV auf das Apoptosegeschehen fanden sich auch nach cDNA-Analyse infizierter Zellen mittels Microarray. Die dabei beobachtete allgemein verminderte Genexpression auf RNA-Ebene, die ebenfalls Apoptose induzierte Gene betrifft, wurde dabei in erster Linie auf den vhs-Faktor UL41 des PrV zurückgeführt (Ray und Enquist 2004).

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Methoden

3.1.1 Zellkulturen und Virusanzucht

3.1.1.1 Kultivierung von RK13-Zellen

RK13-Zellen wurden in feuchter Atmosphäre bei 37°C und 5 % CO₂ in MEM (*Minimum Essential Medium*). In regelmäßigen Abständen wurden die Zellen nach einmaligem Waschen mit PBS-Puffer durch die Zugabe einer Versen-Trypsin-Lösung bei 37°C inkubiert, bis sie sich abgelöst hatten. Ein Viertel der Zellsuspension wurde dann in ein Kulturgefäß gleicher Fläche ausgesät.

3.1.1.2 Kalziumphosphat-Transfektion

Zur Transfektion von Plasmid-DNA wurde die Kalziumphosphat-Methode genutzt. Dazu wurden jeweils 5 µg der zu transfizierenden Plasmide in 10 mM Tris-HCl-Puffer (ad 219 µl, pH 7,4) gelöst und mit 31 µl CaCl₂ (1 M) und 250 µl 2x HBS (Hepes Buffered Saline) vermischt, so dass die Gesamtmenge 500 µl ergab. Nach 45 min Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurde das Präzipitat auf Zellkultur gegeben und für 4 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zur Erhöhung der Transfektionseffizienz mit 15 % Glycerol in HBS behandelt und dann mit Zellkulturmedium bei 37°C inkubiert.

3.1.1.3 Virusanzucht und Präparation von Virus-DNA

Infizierte RK13-Zellen (T150-Flasche) wurden nach vollständiger Lyse des Zellrasens für 1 h bei -70° eingefroren. Nach dem Auftauen wurde für 15 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde als infektiöse Virussuspension aufbewahrt und das Pellet in 10 ml TEN-Puffer resuspendiert, mit 5 ml Sarkosylpuffer versetzt und für 15 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension mit 100 µl RNase A (10 mg/ml) für 30 min bei 37°C und mit 1 ml

Pronase (10 mg/ml) über Nacht bei 42°C behandelt. Die DNA-Extraktion erfolgte mit Phenol/Chloroform. Nach Zugabe von 15 ml Phenol und Zentrifugation für 10 min bei 4000 rpm wurde die obere, wässrige Phase in 15 ml eines Phenol/Chloroform-Gemischs (1:1) pipettiert und wiederum für 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Die obere Phase wurde in 15 ml Chloroform und nach anschließender Zentrifugation in ein Gemisch aus 35 ml Ethanol (96 %) und 1,5 ml 3 M Natriumazetat überführt und die DNA über Nacht bei -20°C gefällt. Nach Zentrifugation für 20 min bei 6000 rpm wurde das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl TE-Puffer gelöst. Die Konzentration und Reinheit der DNA wurden spektrophotometrisch sowie auf einem Agarosegel bestimmt.

3.1.1.4 Virustitration

Virustitrationen wurden in 24-Loch-Mikrotiterplatten mit RK13-Zellen durchgeführt. Hierzu wurden die infektiösen Zellkulturüberstände in 10er Verdünnungsstufen auf die Zellen gegeben, für 2 h auf dem Schüttler bei RT und für weitere 2 Tage unter Methocel-Medium bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mikroskopisch auf die Ausbildung von Plaques durch einen zytopathogenen Effekt geprüft. Der Gehalt an infektiösen Viruspartikeln wurde als „Plaque Forming Units“ (pfu)/ml angegeben.

3.1.2 DNA-Klonierung

3.1.2.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Spaltungen mit Restriktionsenzymen orientierten sich bezüglich Temperatur, Dauer, Zusatz von Bovinem Serumalbumin (BSA) und verwendetem Puffer nach den Herstellerangaben. Für die Spaltungen wurden jeweils 2-10 U Enzym pro 1 µg DNA eingesetzt. Das Ansatzvolumen wurde so gewählt, dass der Anteil der glyzerolhaltigen Enzymlösung nicht mehr als 10 % betrug.

3.1.2.2 DNA-Agarosegelelektrophorese

Für die Auswertung von Restriktionsenzymspaltungen, die Analyse von PCR-Produkten und für die elektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten für nachfolgende Klonierungsschritte wurden 0,6-1,5 % (w/v) Agarosegele verwendet. Hierzu wurde die Agarose in 1 x TAE-Puffer gelöst, mit 0,3 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und zu 5 mm starken Gelen gegossen, die nach Erstarrung in Elektrophoresekammern mit 1 x TAE-Puffer bedeckt wurden. Die Auftrennung der Fragmente fand nach Zugabe von 10 % Probenpuffer bei 35-80 V statt. Als Längenstandard diente ein 1 kbp-Marker. Die Darstellung und Dokumentation der fluoreszierenden DNA-Banden erfolgte unter UV-Licht (256 nm).

3.1.2.3 Klenow-Behandlung von Einzelstrangüberhängen

Die 5'→3'-Polymerase- und die 3'→5'-Exonuklease-Aktivität des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase I aus *E.coli* wurde genutzt, um durch Restriktionsenzymspaltung entstandene, nicht kompatible 5'- und 3'-überstehende DNA-Enden von Vektor- und Insert-DNA zu glatten Doppelstrangenden aufzufüllen bzw. abzubauen. Zum Auffüllen überstehender 5'-Enden wurden zunächst 1 µl dNTP-Mix (je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP) und dann 0,5 µl (5 U/µl) Klenow-Polymerase zum Spaltansatz (5 µg DNA) zugegeben. Für die Herstellung von glatten Enden durch Abbau von überhängenden 3'-Enden wurden 0,5 µl Klenow-Polymerase zum Spaltansatz gegeben, gemischt, abzentrifugiert und sofort 1 µl dNTP-Mix zugegeben. Die Klenow-Behandlung wurde für 30 min bei RT durchgeführt. Zum Beenden der Reaktion wurde der Ansatz für 10 min bei 70°C inkubiert.

3.1.2.4 Ligation

Die T4-DNA-Ligase verknüpft unter ATP-Verbrauch 5'-Phosphatenden mit 3'-OH-Gruppen von DNA-Fragmente. Für einen 20 µl Ligationsansatz wurden linearisierte Vektor-DNA und das zu ligierende DNA-Fragment im Verhältnis 1:5

eingesetzt. Weiterhin wurden 0,5 U T4-Ligase, 4 µl 5x T4-Ligase-Puffer zugegeben und für 10 min bei 37°C, 1 h bei RT und über Nacht bei 15°C inkubiert.

3.1.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde zur gezielten Amplifikation von DNA-Fragmenten eingesetzt. Dazu wurden Oligonukleotide (Primer) benutzt, welche in gegenläufiger Richtung an flankierende Sequenzen an Strang und Gegenstrang des gewünschten DNA-Fragmentes hybridisieren. Die Proben wurden in 33-40 Zyklen amplifiziert. Der 50 µl Standard PCR-Ansatz bestand aus 100 ng Template-DNA, 10 µl 10x PCR-Puffer, 2,5 µl eines jeden Primers (40 pmol/µl), 0,2 mM dNTP-Mix, 0,5 mM MgCl₂, 1 U Taq-Polymerase und H₂O. Einer einmaligen Denaturierungszeit von 2 min bei 95°C folgten Zyklen mit je 30 s bei 95°C (DNA-Denaturierung), 45 s Primer-Annealing (Temperatur abhängig von GC-Gehalt der Primer) und 60 s bei 72°C (DNA-Synthese). Zum Abschluss folgte nach den Zyklen für 5-7 min ein Inkubationsschritt bei 72°C zum Vervollständigen der DNA-Synthese. Als Kontrolle wurde eine Wasserprobe mitgeführt. Für die Überprüfung der PCR-Reaktion wurden 5 µl der Proben in einem 1,5 % Agarosegel getrennt.

3.1.2.6 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

PCR-Produkte sowie durch Restriktionsenzyme gespaltene DNA-Fragmente (siehe Kapitel 3.1.2.1) wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Die für die weiteren Präparationen gewünschte Bande wurde mittels Skalpell unter UV-Licht (366 nm) aus dem Gel ausgeschnitten. Die Präparation von DNA erfolgte mittels QIAquick Gelextraktions-Kit[®] nach Angaben des Herstellers. Die DNA wurde schließlich in 50 µl H₂O eluiert. Zur Kontrolle wurde 1 µl auf ein 0,6 % Agarosegel aufgetragen.

3.1.3 Transformation von Bakterien

3.1.3.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

100 ml LB⁺-Medium wurden mit 2 ml *E.coli* (XL 1Blue MRF⁺) einer frischen Kultur angeimpft und bis zu einer OD₆₆₀ von 0,3 auf dem Schüttler bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden danach 10 min auf Eis gekühlt und für 10 min bei 1500 g und 4°C zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 30 ml eiskaltem TFB aufgenommen und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien wieder zentrifugiert (10 min, 6000 rpm, 4°C) und nochmals in 4 ml TFB resuspendiert, nach zweimaliger Zugabe von 140 µl DMSO auf Eis inkubiert, und schließlich in 200 µl Portionen bei -70°C gelagert.

3.1.3.2 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Je 5 µl eines Ligationsansatzes wurden mit 200 µl einer Suspension kompetenter Bakterien versetzt und 30 min auf Eis, 2 min bei 42°C und wiederum 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 800 µl SOC-Medium zugegeben und für 60 min bei 37°C inkubiert. Die Suspension wurde weiterhin auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Kolonien wurden in jeweils 2,5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin aufgenommen und über Nacht bei 37°C geschüttelt.

3.1.3.3 Herstellung elektrokompenter Bakterien

Für die Herstellung elektrokompenter Bakterien wurden Einzelkolonien von *E.coli* (XL1Blue MRF⁺), die pPrV-ΔgB und pKD46 enthielten (Kopp et al. 2003), in 10 ml LB-Medium mit 30 µg/ml Chloramphenicol über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Kulturen wurden 1:100 in SOA mit 30 µg/ml Chloramphenicol und 2,5 mM Arabinose verdünnt und bei 37°C bis zu einer OD₅₅₀ von ca. 0,8 auf dem Schüttler inkubiert. Diese Suspension wurde 10 min auf Eis gekühlt und 10 min bei 4500 rpm zentrifugiert. Das Sediment wurde in einem Kulturvolumen von 10 % Glycerol resuspendiert und bei 4500 rpm zentrifugiert. Dieser Waschschritt

wurde zweimal wiederholt. Danach wurde das Sediment wiederum in einem kleinen Volumen von ca. 400 µl 10 % Glycerol pro 100 ml Kultur resuspendiert. Nach Portionierung in 50 µl Aliquots wurden die Bakterien entweder sofort verwendet oder bei -70°C schnell eingefroren.

3.1.3.4 Transformation elektrokompenter Bakterien

Zur Elektrotransformation von Bakterien wurde eine Elektroporationsküvette (1 mm) auf Eis vorgekühlt. Elektrokompente Bakterien wurden auf Eis getaut. Anschließend wurden die Bakterien mit der in H₂O gelösten DNA in die Küvetten gefüllt und durch Elektroschock (1250 V, 25 µF, 200 Ω, 5 ms) transformiert. Nach dem Spülen aus der Küvette mit SOC wurden die Bakterien in 1 ml SOC 1 h bei 37°C geschüttelt. 100 µl dieses Ansatzes wurden auf Agarplatten mit 30 µg/ml Chloramphenicol und 50 µg/ml Kanamycin ausplattiert. Die restlichen Bakterien wurden für 3 min bei 6000 rpm sedimentiert, in etwas SOC resuspendiert und auf einer zweiten Agarplatte über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.1.3.5 Schnellpräparation von Plasmid-DNA

Von einer *E.coli*-Übernachtskultur wurden 1,5 ml Suspension in ein Eppendorfgefäß überführt und für 3 min bei 10 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Bakterienpellet in 200 µl der Lösung I resuspendiert. Anschließend wurden 200 µl der Lösung II zugegeben und gut gemischt. Nach Zugabe von 300 µl Natriumazetat (3 M, pH 4,8), wurden die Ansätze für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend für 10 min mit 14 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 450 µl Isopropanol gemischt und wiederum für 15 min mit 14 000 rpm zentrifugiert. Das dabei entstandene Pellet wurde mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen und anschließend nochmals für 5 min bei 14 000 rpm zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet bei 56°C getrocknet und schließlich in 40 µl TE-Puffer + RNase A (50 µg/ml) gelöst. Ein Teil der DNA wurde für eine Kontrollspaltung zur Identifizierung von rekombinanten Klonen eingesetzt und in einem 0,6 % Agarosegel getrennt.

3.1.3.6 Präparation großer Mengen Plasmid-DNA

Für die Präparation großer Mengen Plasmid-DNA wurde das QIAGEN Plasmid-Maxi Kit[®] verwendet. Zu diesem Zweck wurden Einzelkolonien der gewünschten Klone in 2 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika für 6 h bei 37°C geschüttelt. Von dieser Bakteriensuspension wurden 200 µl in 200 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika über Nacht bei 37°C geschüttelt. Damit wurden 200 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht geschüttelt. Die Vorgehensweise zur Präparation von Plasmid-DNA erfolgte nach Angaben des Herstellers. Das DNA-Pellet wurde schließlich in 125 µl TE-Puffer (pH 7,4) gelöst. Nach photometrischer Konzentrationsbestimmung wurden 500 ng DNA für eine Kontrollspaltung eingesetzt.

3.1.4 DNA-Analysen

3.1.4.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch über Absorptionsspektren (220-320 nm) bestimmt. Die Nukleinsäurekonzentration konnte aus der Extinktion bei 260 nm wie folgt errechnet werden:

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

Für die Überprüfung der Reinheit gilt, dass der Quotient $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte.

3.1.4.2 Southern-Blot-Hybridisierung

Transfer auf Nylon-Membran

Vor dem Transfer der elektrophoretisch getrennten DNA-Fragmente wurde das Ethidiumbromid-gefärbte 0,7 % Agarosegel (20 cm) mit Lineal auf dem Transilluminator fotografiert. Anschließend wurde das Gel für 10 min mit 0,25 N HCl behandelt, dreimal mit H₂O gewaschen und schließlich zur Denaturierung der DNA 2 x 15 min in 0,5 M NaOH/0,9 M NaCl geschwenkt, dreimal mit H₂O gespült und anschließend für 2 x 30 min in 0,9 M NaCl/1 M Tris-HCl (pH 7,4). Für den Transfer wurden in eine Wanne 250 ml 12x SSC gefüllt und auf diese

eine Glasplatte mit einem Filterpapier gelegt, dessen Enden in die Lösung reichten. Auf das Filterpapier wurden das Gel und darauf eine auf Gelgröße geschnittene gewässerte Nylonmembran sowie 3 feuchte Filterpapiere positioniert. Luftblasen wurden entfernt. Ein ca. 10 cm hoher Zellstoffstapel wurde darüber gelegt, mit einem Gewicht beschwert und über Nacht für den Kapillartransfer stehen gelassen. Am nächsten Tag wurde die Nylonmembran auf einem Filterpapier getrocknet und die übertragenen Nukleinsäuren unter UV-Licht mit der Membran quervernetzt (Stratalinker).

Herstellung ^{32}P -markierter DNA-Sonden

Die Markierung von DNA-Fragmenten erfolgte mit dem „Rediprime II Random Prime Labeling System“ nach Angaben des Herstellers. Bei dieser Methode werden 50 ng Template-DNA in 45 μl H_2O 5 min bei 100°C gekocht, 5 min auf Eis gekühlt und anschließend 5 μl ^{32}P markierte dCTPs zum Reaktionsgemisch zugegeben. Zur Herstellung einer *Bam*HI-Fragment 1-spezifischen Sonde wurde das Plasmid pPrVUL11-Mut (Kopp et al. 2003) und für die Herstellung einer *Bam*HI-Fragment 7-spezifischen Sonde ein Insert von pUC- ΔUs9KF amplifiziert (Primer M13 (-47), M13 revers (-48); vergleiche Kapitel 3.1.2.5). Die Abtrennung nicht eingebauter Radionukleotide erfolgte durch Gelfiltration in durch Glasfilter abgedichteten 1 ml-Spritzen, die wiederholt mit einer Sephadex G50-Suspension in TE (pH 7,4) gefüllt und jeweils für 2 min bei 2000 rpm zentrifugiert wurden, bis die Gelmatrix ein Volumen von etwa 1 ml erreicht hatte. Die Markierungsansätze wurden mit TE (pH 7,4) auf 100 μl gebracht und auf die Säule gegeben. Nach 2 min Zentrifugation bei 2000 rpm verblieben nicht eingebaute Radionukleotide in der Säule, während sich die höhermolekularen markierten Nukleinsäuren im Eluat befanden. Die eluierte Radioaktivität der so erhaltenen Sonde konnte mit Hilfe eines Handmonitors gemessen werden. Die markierte DNA-Sonde wurden für 5 min bei 100°C denaturiert und zur Hybridisierung eingesetzt.

Hybridisierungen von Nukleinsäuren

Die an der Nylonmembran gebundene virale DNA wurde mit einer ^{32}P -markierten Sonde hybridisiert. Zunächst wurde die in 2 x SSC getränkte Membran im Hybridisierungsröhr mit 15 ml der Hybridisierungslösung für 4-5 h bei 68°C inkubiert. Danach wurde die radioaktive, denaturierte Sonde zugegeben und bei 68°C über Nacht im Hybridisierungsofen gedreht. Nach der Hybridisierung wurde die Membran bei 72°C 2 x 30 min mit 2 x SSC-Puffer / 0,5% SDS und 3x 20 min mit 0,1 x SSC / 0,5% SDS im Hybridisierungsröhr zur Entfernung unspezifisch gebundener Radioaktivität gewaschen und auf einem Filterpapier getrocknet. Die Membran wurde dann in einer Kassette mit Bildplatte für 3 h exponiert und gebundene Radioaktivität mittels eines Phospho-Imagers dargestellt.

3.1.5 Proteinnachweise

3.1.5.1 Western-Blot

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Gewinnung von Proteinen wurden infizierte und nicht infizierte Zellen eines Loches einer 6-Loch-Mikrotiterplatte in 200 µl SDS-Probenpuffer mit 5% Mercaptoethanol für 5 min bei 95°C denaturiert und 10 µl/Gelspur in diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt. Diese bestanden aus einem 10 % Trenngel und einem 3 % Sammelgel. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in SDS-Elektrophoresepuffer für 45 min bei 200 V in einer Gelapparatur, bis der Bromphenolblaumarker das Gel vollständig durchlaufen hatte.

Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Die in einem SDS-10%-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteinproben wurden anschließend durch Elektroblothing in einer Semidry-Western-Blot-Apparatur auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Dazu wurde auf fünf in Transferpuffer getränkte Filterpapiere die ebenfalls in Transferpuffer äquilibrierte Nitrozellulosemembran gelegt. Darauf wurden das Gel und weitere fünf in

Transferpuffer getränkte Filterpapiere geschichtet. Der Transfer wurde 90 min bei 25 V konstanter Spannung durchgeführt.

Inkubation mit Antikörper und Chemilumineszenz-Nachweisreaktion

Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Nitrozellulosemembran 1 h in 5 % Magermilch (w/v) in TBS-T-Puffer inkubiert und für 1 h mit dem in TBS-T verdünnten Primärantikörper inkubiert. Anschließend folgten drei Waschschrte à 10 min in TBS-T, bevor für 1 h mit einem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert wurde. Nach weiteren fünf Waschschrten in TBS-T wurde die gebundene Peroxidase unter Verwendung des Super Signal® West Pico Chemiluminescent Kits nachgewiesen. Für die Dokumentation wurde Hyperfilm™ verwendet.

3.1.5.2 Indirekter Immunfluoreszenztest (IIF)

Für den indirekten Immunfluoreszenztest wurden die infizierten Zellen zunächst mit PBS gewaschen und dann mit 3 % Paraformaldehyd (PFA) in TBS-T für 20 min fixiert. Anschließend wurde der Primärantikörper für 1 h zugegeben. Nach 3x Waschen mit TBS-T wurde die Kultur mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Nach 1 h Inkubation im Dunkeln wurde wiederum 3 x mit TBS-T gewaschen. Zur Erhaltung der Immunfluoreszenz wurden die Zellen mit DABCO überschichtet und das Ergebnis der Immunfluoreszenz mittels Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

3.1.6 In-vitro-Charakterisierung von Deletionsmutanten

3.1.6.1 Ein-Schritt-Wachstumskinetik

Zur Bestimmung der Wachstumskinetik verschiedener Virusmutanten wurde Virussuspension bekannten Titters auf eine auf 0°C gekühlte 24-Loch Zellkulturplatte mit konfluenter RK13-Zellkultur gegeben. Nach dem Auftragen aller Verdünnungsstufen wurden die Zellen zur Virusadsorption für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend mit Zitratpuffer (pH 3,0) behandelt, um alle noch vorhandenen extrazellulären Virionen zu inaktivieren. Zu den Zeitpunkten 0, 4, 8,

12, 24 und 36 hpi wurden jeweils von zwei Vertiefungen der Überstand abgenommen und bei -70°C eingefroren und anschließend die Virustiter wie unter 3.1.4.4 bestimmt. Die Bestimmung der Wachstumskinetik wurde in drei voneinander unabhängigen Experimenten durchgeführt.

3.1.6.2 Plaquetest

Für die Quantifizierung infektiöser Virionen wurden die verschiedenen PrV-Mutanten titriert. Dafür wurde die zu untersuchende Virussuspension für 1 h bei -70° eingefroren, aufgetaut und intensiv gemischt, um Zellen oder vorhandene Aggregate aufzulösen. Eine Verdünnungsreihe in DMEM wurde angelegt und in doppelter Ausführung auf konfluente RK13-Zellen gegeben. Nach 4 h wurde das Inokulum abgenommen und durch Methocel-Medium ersetzt. Methylzellulose verhindert die Diffusion der Viren im Medium, so dass nur direkte Ausbreitung von Zelle zu Zelle möglich ist. Durch diesen Schritt wird sichergestellt, dass nach weiterer Inkubation für 2 d bei 37°C nur primäre Plaques entstehen. Nach Fixation mit 4 % PFA für 1 h wurden die Zellen für 15 min mit 1 % Kristallviolett gefärbt und unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufe der Virustiter (pfu/ml) berechnet. Anschließend wurden pro Verdünnungsreihe 100 Plaques mikroskopisch vermessen. Die Bestimmung der Plaquegrößen wurde in drei voneinander unabhängigen Experimenten durchgeführt.

3.1.7 Geschwindigkeitsmessungen des intraaxonalen Transports

3.1.7.1 Präparation, Kultur und Infektion primärer Neurone

Für die neuronale Zellkultur wurden Trigeminalganglien von CD1 Mäusen (Charles River) im Alter von 2-4 d verwendet. Die Tiere wurden dekapitiert und die Ganglien unter einem Binokular präpariert (2 Tiere/5 Deckgläschen (Ø 15 mm), in PBS gewaschen und in kaltem Leibovitz-Medium (L15) gesammelt. Nach Zerkleinerung mit einer Schere wurden die Gewebstücke für 45 min in DMEM mit 0,25 % Kollagenase (Typ 1A) bei 37° C inkubiert und anschließend nach mehrmaligem vorsichtigen Pipettieren mit einer abgerundeten Pasteurpipette

für 8 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das dabei erhaltene Pellet wurde in DMEM/F-12 Medium (1:1, +10 % Fetales Kälberserum, FKS) resuspendiert. Danach wurden 50 µl auf poly-L-Lysin (0,01 %, für 1 h RT) behandelten Deckgläschen in Ø 3cm großen Petrischalen für 1 h inkubiert. Anschließend wurden 2 ml DMEM/F12-Medium hinzugegeben und die Neuronen für 1 bis 3 d kultiviert. Die Kulturen wurden mit ca. 1×10^4 pfu der verschiedenen Virusmutanten für ca. 2 h inkubiert. Nichtgebundenes Virus wurde anschließend durch Mediumwechsel entfernt. Dies führte abhängig von der jeweiligen Virusmutante zu einer Infektion von 70-90 % der kultivierten Neurone.

Für den IIFT und die Hämatoxylin/Eosin-Färbung (HE) neuronaler Zellkulturen wurden, wie in Kapitel 3.1.5.2 bzw. 3.1.9.1 (ab Schritt 3) beschrieben, verfahren.

3.1.7.2 Zeitrafferaufnahmen

Für die Zeitrafferaufnahmen an lebenden Neuronen wurden die Deckgläschen mit den infizierten Zellen mit Vaseline auf einer mit Ringerlösung gefüllten Aluminiumzellkammer (von C. Wetzel, Bochum, freundlicherweise bereitgestellt) befestigt. Die GFP-Emission der Kapside wurde dann bei Raumtemperatur mit einem 63 x 1,4 Ölimmersionsobjektiv eines Konfokalen Mikroskopes nach Exzitation mit einem Argonlaser (488 nm) aufgezeichnet. Neuronen wurden anhand ihrer Morphologie identifiziert. Es wurden zwischen 500 und 1500 Aufnahmen (1,6-2/s) ausschließlich von eindeutig mit einem infizierten Perikaryon verbundenen Axonen gemacht.

3.1.8 In-vivo-Infektionsexperimente

3.1.8.1 Versuchstiere

Für die Infektionsversuche wurden 6-8 Wochen alte Mäuse der Inzuchtlinie CD1 (Charles River), eingesetzt. Zur Bestimmung der durchschnittlichen Überlebenszeiten wurden für jede zu untersuchende Mutante und den Wildtyp 10 Mäuse und für die jeweilige Revertante drei Mäuse inokuliert. Die Tiere wurden zweimal am Tag über einen Zeitraum von 14 d beobachtet und beim Auftreten

von hochgradiger klinischer Symptomatik mit schweren Exzitationen und Automutilation euthanasiert. Zur Untersuchung der Kinetik der Neuroinvasion wurden alle 24 hpi drei Mäuse euthanasiert und für einen optimalen Gewebserhalt, wie unter 3.1.8.4 beschrieben, perfundiert.

3.1.8.2 Viren

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Virusmutanten basieren auf PrV-Kaplan. Die Deletionsmutanten in UL11, UL46, UL47 und UL11/gM wurden freundlicherweise von Martina Kopp, in UL31 und UL48 von Dr. Walther Fuchs und in UL3, UL13, UL16, UL17, UL16/UL11, UL21, UL16/UL21, UL11/UL16/UL21, UL37, UL41, UL51 und US3 von Dr. Barbara Klupp zur Verfügung gestellt. Zusätzlich wurde die Neurovirulenz des Vakzinestammes PrV-Bartha untersucht. Der In-vitro-Phänotyp der verschiedenen Mutanten ist aus Tabelle 1 ersichtlich. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Deletionsmutanten in den Genen US9 und UL11/US9 angefertigt. Die Mutanten in den Genen UL17, UL31, UL34, UL37 und UL11/gM wurden auf komplementierenden Zelllinien angezüchtet, während die anderen Virusstämme auf nichtkomplementierenden RK13 Zellen vermehrt wurden.

3.1.8.3 Intranasale Inokulation

Für die intranasale Inokulation wurden die Tiere intraperitoneal mit einem Gemisch von 60 mg/kg Ketamin und 3 mg/kg Xylazin anästhesiert. Nach 3-4 min befanden sich die Tiere in einer leichten Narkose. In Seitenlage wurden im Abstand von 10 min in beide Nasenlöcher jeweils 5 µl des Virus/Zellkulturmedium-Mix (10^6 pfu/ml) mit einer Eppendorfpipette appliziert.

3.1.8.4 Perfusionsfixierung

Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden die infizierten Mäuse euthanasiert und perfundiert. Dazu erfolgte zunächst eine tiefe Narkose mit 100 mg/kg Ketamin und 5 mg/kg Xylazin. Nach Ausfall des Zwischenzehenreflexes wurden

die Tiere nach Eröffnen des Brustkorbes und Katheterisierung der linken Herzkammer durch Eröffnen des rechten Vorhofes entblutet und für 3 min mit PBS perfundiert. Anschließend wurden die Tiere für 10 min mit eiskaltem 4 % PFA durch Perfusion fixiert. Daraufhin wurde der Kopf abgetrennt und entweder komplett oder das Gehirn mit Nervus trigeminus und Ganglion trigeminale für mindestens weitere 48 h mit 4 % PFA nachfixiert.

3.1.9 Histopathologische Untersuchungen

Die Lokalisation (Bregma) der infizierten Kerngebiete erfolgte anhand des Anatomischen Atlas von Paxinos und Franklin (2000). Als Bregma wird der kraniometrische Punkt der Vereinigung von sagittalen und koronaren Suturen auf dem höchsten Punkt des Schädeldaches bezeichnet.

3.1.9.1 Herstellung von Paraffinschnitten

Für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE), die immunhistologischen Färbungen und die In-situ-Hybridisierung wurden die formalinfixierten Gewebe in Paraffin-Paraplast® eingebettet und Serienschnitte mit einer Schnittdicke von 4-5 µm hergestellt. Diese wurden in einem Wasserbad bei 40°C geglättet, auf elektrostatisch geladene Superfrost plus®-Objektträger aufgezogen und 2 h bei 40°C getrocknet.

3.1.9.2 Herstellung von Kryostatschnitten

Zur Herstellung von Kryostatschnitten wurden infizierte Tiere nach Anästhesie dekapitiert und das unfixierte Gehirn in -70°C kaltem n-Heptan schockgefroren und entweder bei dieser Temperatur bis zur Herstellung bei dieser Temperatur gelagert und dann in „Tissue Freezing Medium“ eingebettet und transversale Serienschnitte von ca. 10 µm angefertigt. Die Schnitte wurden auf Objektträger (Super frost®) aufgenommen und für 10 min mit -20°C kaltem Aceton fixiert.

3.1.9.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

1. Entparaffinieren der Schnitte in Xylol 2 x 5 min, danach Isopropanol 2 x 3 min.
2. Rehydrieren der Schnitte über eine absteigende Ethanolreihe (96 - 80 - 70 - 50 %, je 3 min).
3. Spülen der Schnitte in H₂O 2 x 3 min.
4. Färben mit Hämalaun und fließendes Wässern für 10 min.
5. Färben mit Eosin/Phloxin für 2 min und kurzes Spülen in H₂O.
6. Kurzes Spülen mit 70, 80 und 90 % n-Propanol.
7. Inkubieren in 100 % n-Propanol für 1 min.
8. Inkubieren in Roti-Histol[®] für 2 x 5 min.
9. Eindecken der Schnitte mit Corbit-Balsam (Eukitt[®]).

3.1.9.4 Luxol-Kresyl-Färbung

1. Entparaffinieren der Schnitte siehe (Kapitel 3.1.9.1 Schritte 1-3)
2. Inkubation in 1 % Luxol über Nacht bei 57°C.
3. Auswaschen der überschüssigen Farbe durch Eintauchen in 95 % Ethanol.
4. Waschen in H₂O.
5. Differenzieren durch rasches Eintauchen in 0,005% Lithiumcarbonat.
6. Weiteres Differenzieren durch Wechsel zwischen 70 % Ethanol und Lithiumcarbonat bis Unterschied zwischen Blau und Weiß erkennbar.
7. Waschen in H₂O.
8. Inkubieren für 2 min in Kresylechtviolett bei RT.
9. Kurzes Waschen in mehrfach gewechseltem 95 % Ethanol.
10. Aufhellen in Xylol.
11. Eindecken mit Corbit-Balsam (Eukitt[®]).

3.1.9.5 ABC-Methode

Der immunhistologische Nachweis der verschiedenen Antigene erfolgte in Anlehnung an das von Hsu et al. (1981) beschriebene Protokoll. Wenn nicht anders beschrieben erfolgten die Inkubationsschritte bei Raumtemperatur.

1. Entparaffinieren der Schnitte in Xylol 2 x 5 min, danach Isopropanol 2 x 3 min und 96 % Ethanol 3 min.
2. Inaktivierung der endogenen Peroxidase 30 min in 0,5 % Methanol/H₂O₂ (30 %), danach 96 % Ethanol 3 min und über eine absteigende Ethanolreihe (80 -70 - 50 %, je 1 min) rehydrieren.
3. Spülen der Schnitte in TBS 2 x 3 min.
4. Für den immunhistologischen Nachweis von aktiver Caspase 3 wurden die Schnitte zusätzlich für 10 min in 10 mM Zitratpuffer (pH 6,0) in der Mikrowelle mit 800 W gekocht und anschließend in TBS abgekühlt.
6. Inkubation mit unverdünntem Ziegenserum für 30 min in feuchter Kammer.
7. Absaugen des Ziegenserums und Auftragen des primären Antikörpers oder des Kontrollserums. Inkubation in feuchter Kammer 1 h.
8. Absaugen des primären Antikörpers und Waschen der Schnitte in TBS 3 x 3 min.
9. Inkubation der Schnitte mit dem sekundären Antikörper in feuchter Kammer 30 min.
10. Absaugen des sekundären Antikörpers und Waschen der Schnitte in TBS 3 x 3 min.
11. Auftragen des ABC-Komplexes. Hierzu wurden beide Komponenten, Avidin DH und biotinylierte Meerrettichperoxidase, mindestens 30 min vor Gebrauch in TBS nach Herstellerangaben angesetzt. Inkubation der Schnitte in feuchter Kammer 30 min.
12. Absaugen des ABC und Waschen der Schnitte in TBS 3 x 3 min.
13. Abgeschlossen wird die Färbung mit dem Auftropfen der Ready-to-use Lösung vom AEC-staining reagent.

14. Waschen der Schnitte in Aqua dest. für 5 min.
15. Gegenfärben in Hämalaun, anschließend Bläuen in Leitungswasser für 10 min.
17. Eindecken der Schnittpräparate mit Aquatex[®].

3.1.9.6 Nichtradioaktive In-situ-Hybridisierung (ISH)

Die nichtradioaktive ISH zum Nachweis von genomischer UL19-DNA wurde an Paraffinschnitten formalinfixierter Gehirne durchgeführt. Nicht infizierte Kerngebiete wurden als interne Negativkontrolle verwendet. Die Spezifität der Signale wurde an Folgeschnitten der untersuchten Gehirne, die mit Hybridisierungspuffer ohne Sonde inkubiert wurden, überprüft. Zur Herstellung der Digoxigenin-markierten UL19-DNA-Sonde für die In-situ-Hybridisierung wurde das in Kapitel 3.1.2.5 beschriebene PCR Protokoll mit den Primern UL19F und UL19R befolgt, jedoch Digoxigenin-markierte dNTPs eingesetzt. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Schritte bei Raumtemperatur durchgeführt.

1. Die Entparaffinierung der Schnitte erfolgte wie in 3.1.9.1 (Schritte 1-3) beschrieben.
2. Hierauf schloss sich die proteolytische Verdauung (5 µg/ml Proteinase K) für 30 min bei 37°C auf den Schnitten an.
3. Anschließend wurde die Proteolyse durch zweimaliges Spülen in H₂O beendet, die Schnitte für 5 min in 96 % Ethanol überführt und luftgetrocknet.
4. Zur Hybridisierung wurden etwa 50 µl Puffer pro Gewebsschnitt aufgetragen. Der Hybridisierungspuffer bestand aus 2,5 µl Heringssperma-DNA (10 mg/ml), die zusammen mit 3,5 µl Formamid zunächst bei 96°C für 5 min denaturiert und anschließend auf Eis schockgekühlt wurden. Hinzu kamen 1,0 µl der DNA-Sonde (ca. 25 ng/µl), 21,5 µl Formamid, 10,0 µl 20 x SSC, 1,0 µl 50x Denhardts-Lösung, 5,0 µl 50 % Dextransulfat und 5,5 µl Aqua dest. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 40°C in einer feuchten Kammer.

5. Die doppelsträngige PrV-UL19-Sonde musste zuvor denaturiert werden. Hierzu wurden die Objektträger auf einer Metallschale für 6 min in ein auf 98°C erhitztes Wasserbad verbracht und anschließend auf die Hybridisierungstemperatur abgekühlt.
6. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Sonde wurden zwei Stringenzwaschungen (zuerst 2 x SSC, danach 0,1 x SSC) zu je 10 min durchgeführt.
7. Zum immunologischen Nachweis der Hybride erfolgte zunächst eine 30 min Inkubation in Äquilibrierungspuffer (5 % NSS und 0,3 % Triton X 100 in Puffer I). Anschließend wurde das Schaf-Anti-Digoxigenin-Alkalische Phosphatase-Konjugat in einer 1:100 Verdünnung auf die Schnitte aufgetragen und die Schnitte für 2 h inkubiert.
8. Auf das Spülen (2 x 15 min) in Puffer I und die Äquilibrierung in Puffer III folgte die Farbreaktion. 4,5 µl NBT, 3,5 µl X-Phosphat und 2,5 µl Levamisol (96 mg/ml) wurden mit 1000 µl Puffer III vermischt und auf die Gewebsschnitte aufgetragen. Die Farbentwicklung war meist erst nach 12- bis 16-stündiger Inkubation abgeschlossen. Durch Spülen in Aqua dest. und 10 min Inkubation in TE (pH 8,0) wurde die Farbreaktion beendet. Die Schnitte wurden 30 s in Hämatoxylin gegengefärbt und mit Aquatex® eingedeckt.

Für die Doppelmarkierungen mit In-situ-Hybridisierung und Immunhistologie wurde an den In-situ-markierten Schnitten die ABC-Methode mit den entsprechenden Primärantikörpern durchgeführt.

3.1.9.7 Konfokale Zwei-Farben-Immunfluoreszenz

Fixierte Kryostatschnitte wurden nach einem Blockierungsschritt mit 5 % BSA in PBS für 30 min mit einem Gemisch der primären Antikörper in einer feuchten Kammer für 1 h inkubiert. Anschließend, nach 3x Waschen mit PBS für 5 min wurden die Schnitte wiederum für 1 h mit einem Gemisch der Sekundärantikörper inkubiert. Nach weiteren Waschschritten in PBS wurden die Schnitte mit DABCO bedeckt. Lunge, Leber, Muskulatur, Schnitte nicht infizierter Gehirne sowie ein Maus-anti-Desmin-Antikörper wurden als Kontrollen verwendet.

Am Konfokalen Laser Scan Mikroskop wurde FITC mit einer Lichtwellenlänge 488 nm angeregt und mit einem 505-530 nm Filter nachgewiesen, während Cy3 mit 543 nm angeregt und mit einem 585 nm Filter dargestellt wurde. Der „Pinhole“-Durchmesser der Kanäle wurde auf 100 μm gesetzt. Zwei-Kanal-„Multitracking“ wurde zur Vermeidung von Interferenzen genutzt. Die verschiedenen Bilder wurden separat mit der laut Hersteller geeigneten Installation des optischen Weges für die Extinktion und Emission gescannt.

3.2 Material

3.2.1 Virusstämme

PrV-ΔUL11	Martina Kopp, FLI Riems
PrV-ΔUL46	Martina Kopp, FLI Riems
PrV-ΔUL47	Martina Kopp, FLI Riems
PrV-ΔUL11/gM	Martina Kopp, FLI Riems
PrV-ΔUL11/gE	Martina Kopp, FLI Riems
PrV-ΔUL31	Walter Fuchs, FLI Riems
PrV-ΔUL48	Walter Fuchs, FLI Riems
PrV-ΔUL3	Barbara Klupp, FLI Riems
PrV-ΔUs3	Barbara Klupp, FLI Riems
PrV-ΔUL13	Barbara Klupp, FLI Riems
PrV-ΔUL16	Barbara Klupp, FLI Riems
PrV-ΔUL17	Barbara Klupp, FLI Riems
PrV-ΔUL21	Barbara Klupp, FLI Riems
PrV-ΔUL34	Barbara Klupp, FLI Riems
PrV-ΔUL37	Barbara Klupp, FLI Riems
PrV-ΔUL41	Barbara Klupp, FLI Riems
PrV-ΔUL51	Barbara Klupp, FLI Riems
PrV-ΔUL16/UL21	Barbara Klupp, FLI Riems
PrV-ΔUL16/UL11	Barbara Klupp, FLI Riems
PrV-ΔUL16/UL21/UL11	Barbara Klupp, FLI Riems
PrV-Kaplan	Barbara Klupp, FLI Riems
PrV-Bartha	Barbara Klupp, FLI Riems

pUC-B1BclI	Fuchs, FLI Riems
pBl-GFP	Fuchs, FLI Riems
pKD13	Datsenko und Wanner 2000

3.2.7 Primer

Kan950NewFW (TCCGGATCCCGATTATTCAACAAAGCCACG)	MWG Biotech
Kan950NewRV (TTCGAATTCGCCAGTGTTACAACCAATTAACC)	MWG Biotech
M13, M13rev	NEB
PUL35M-F1 (TGATGTCGGTGAGCTGCTTCGTGC)	MWG Biotech
PUL35M-R1 (GCTGGTGGCGAACATGGGCTG)	MWG Biotech
PUL35M-F2 (GAGCCACCATGGTGTACACCTTCGACCCGAACAATCCC)	MWG Biotech
PUL35M-R2 (CGAAGGTGTACACCATGG TGGCTCGGCGGGGAGCGC)	MWG Biotech
UL19F (CAACTACTACGCCACGGTGC)	MWG Biotech
UL19R (GAAGAGGTTCTGCGGCAG GT)	MWG Biotech

3.2.8 Seren und Antiseren

Ziegenserum: Frischblut wurde zur Spontangerinnung bei Zimmertemperatur 3 h stehengelassen, anschließend 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert und das Serum abgesaugt.

PrV UL19-Antiserum: Der Nachweis des PrV-Hauptkapsidantigens UL19 erfolgte mittels eines von B. Klupp, FLI Riems zur Verfügung gestellten Kaninchen-anti-PrV-UL19-Antiserum (1:500).

PrV-Us9-Antiserum: Zum Nachweis des PrV-Us9 wurde als Primärantikörper ein von L. Enquist, Princeton zur Verfügung gestelltes Maus-anti-PrV-Us9-Antiserum (1:10 000 für Western-Blot; 1:1500 für IIFT).

Aktive Caspase 3-Antikörper: Zum Nachweis des apoptotischen Unterganges wurde als primärer Antikörper ein Kaninchen-anti-aktive Caspase 3-Antikörper (1:150, R&D Biosciences) verwendet.

GFAP-Antikörper: Zur Markierung von Astrozyten diente ein Kaninchen-anti-bovines Gliales Fibrilläres Saures Protein (GFAP)-Antikörper (1:150, DAKO) als primärer Antikörper.

NeuN-Antikörper: Als Marker für neuronale Zellkerne wurde als primärer Antikörper ein Maus-anti-Neuronales Nukleäres Protein (NeuN) (1:150, Chemicon) benutzt.

NeuN-Antikörper: Als weiterer Marker für Neuronen wurde als primärer Antikörper ein Maus-anti-Neurofilamentprotein (NFP) (1:250, DAKO) genutzt.

Kontrollseren: Als Kontrolle wurde Serum eines nicht mit PrV-infizierten Kaninchens, ein Kaninchen-anti- Bovines Papillom Virus (1:150, DAKO) oder ein Maus-anti-Desmin-Antikörper (1:250, DAKO) verwendet.

Sekundäre Antikörper: Als sekundäre Antikörper fanden ein biotinyliertes Ziege-anti-Kaninchen-Antiserum (1:100, Vector), ein biotinyliertes Ziege-anti-Maus-Antiserum (1:100, Vector), ein FITC-konjugiertes-Schwein-anti-Kaninchen-Antiserum (1:400, Dako), FITC-konjugiertes-Ziege-anti-Maus-Antiserum (1:500, Dianova, Cy3-konjugiertes-Ziege-anti-Maus-Antiserum (1:800, Dianova), Alkalische Phosphatase-konjugiertes-Schaf-Anti-Digoxigenin-Antiserum (1:250, Roche), Peroxidase-konjugiertes-Ziege-anti-Maus-Antiserum (1:2000, Dianova) Verwendung.

3.2.9 Zellkulturmedien

DMEM	Zellbank, FLI Riems
F12-Medium/DMEM (1:1)	Gibco BRL
Fetales Kälber Serum	Zellbank, FLI Riems
Leibovitz Medium (L15)	Gibco BRL

3.2.10 Bezugsquellen für Chemikalien

AEC-staining reagent	Dako
Agar	Gibco BRL
Agarose	Gibco BRL
Ampicillin	Gibco BRL
Aquatex [®]	Merck
Chloramphenicol	Gibco BRL

1,4-diazabicyclo[2.2.2]-octane (DABCO)	Sigma
dNTPs	Promega
DIG-markierte dNTPs	Roche
EDTA frei Säure	Sigma
Eosin G 15935	Merck
Ethidiumbromid	Serva
Formaldehyd mind. 37%, säurefrei, 3999	Merck
Hämatoxylin, 4302	Merck
Hefeextrakt	Difco
Kanamycin	Gibco BRL
Kollagenase (Typ 1A)	Sigma
L-Arabinose	Gibo BRL
Methanol reinst, 6008	Merck
Paraffin-Paraplast (Histosec)	Merck
PCR-Puffer	Roche
Penicillin	Gibco BRL
poly-L-Lysine (0,01%)	Sigma
Roti [®] -Histol, 6640	Roth
SDS	Serva
„Tissue Freezing Medium“	Leica
T4-DNA-Ligase-Puffer	Roche
Tris	Invitrogen

Alle anderen Chemikalien wurden bei den Firmen Sigma, Merck, Serva und Roth bestellt.

3.2.11 Geräte

Es sind nur die über die Laborgrundausrüstung hinausgehenden Geräte aufgeführt.

Axioskop 2 Fluoreszenz	Zeiss, Jena
Elektroporationsgerät	Easyject

Eppendorf Thermomixer 5436	Eppendorf
Hybridisierungssofen	Biometra
Kamera am Axioskop	Canon
Konfokales Laser Scan Mikroskop LSM510	Zeiss
Küvetten	Biorad
„Mastercycler Gradient“	Eppendorf
Microtom SM 2000 R	Microm
Phospho-Imager mit Bas Kassette 2325	Fujifilm
Spektrometer Du 640	Beckmann
UV Crosslinker Stratalinker 1800	Stratagen

3.2.12 Verbrauchsmaterial

Chromatographiepapier 3MM	Whatman
Objektträger (Super frost [®] plus)	Menzel-Gläser
Objektträger (Super frost [®])	Menzel-Gläser
Nylonmembran (Hybond-N ⁺)	Amersham-Pharmacia
Filme	Kodak
Reaktionsgefäße	Eppendorf
Hyperfilm™	Amersham Biosciences

3.2.13 Stammlösungen und Puffer

BAC-Mutagenese

Glycerol (10 %)

63	g	Glycerol
450	g	H ₂ O

autoklavieren

Luria-Bertani-(LB)-Medium

10	g	Casein-Hydrolysat
5	g	Hefeextrakt
10	g	Natriumchlorid
ad	1l	H ₂ O

mit Natronlauge auf pH 7,5 einstellen

LB-Platten

LB-Medium mit 1,5 % Agar

SOA-Medium

10	g/l	BactoTryphon
2.5	g/l	Hefeextrakt
290	mg/l	Natriumchlorid
92,5	mg/l	Kaliumchlorid

autoklavieren

SOB-Medium

SOA-Medium

+10	mM	Magnesiumsulfat (steril)
+10	mM	Magnesiumchlorid (steril)

SOC-Medium

SOB-Medium
+ 20 mM Glucose (steril)

50 x TAE-Puffer

2	mM	Tris
0,25	M	Natriumacetat
0,05	M	EDTA

pH 7,8 mit Eisessig einstellen

Probenpuffer

40	%	Sucrose
0,05	%	Bromphenolblau
0,1	%	SDS
1	mM	EDTA

TFB

100	mM	KCl
45	mM	MnCl ₂
10	mM	CaCl ₂
10	mM	Kaliummorpholinoethansulfonsäure
3	mM	Hexaminkobalt(III)chlorid

auf pH 6,2 einstellen, sterilfiltrieren

1 kbp-Marker

30	µl	„1 kbp Ladder“ (1000 µg/ml)
40	µl	10x TAE-Puffer
330	µl	H ₂ O
100	µl	Probenpuffer

10 min bei 56°C erhitzen

Auftrag 3 µl/Gel

Lösung I

10	mM	EDTA (pH 8,0)
20	mM	Tris-HCl, pH 8,0
50	mM	Glucose
2	mg/ml	Lysozym

Lösung II

0,2 M Natriumhydroxid

1 % SDS

TE-Puffer

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

1 mM EDTA

Southern-Blot*20 x SSC-Puffer*

17,5 g Natriumchlorid

8,8 g tri-Natriumzitat-Dihydrat

ad 100 ml H₂O, mit HCl auf pH 7,0 einstellen

Hybridisierungslösung

3 ml 20x SSPE

0,75 ml Magermilch 10%

0,75 ml Heringssperma DNA in H₂O (10 mg/ml)

1,5 ml SDS 10 %

9 ml H₂O

20 x SSPE

3,6 M Natriumchlorid

0,2 M Natriumhydrogenphosphat

20 mM EDTA

Western-Blot*30 % Acrylamid*

290 g/l Acrylamid

10 g/l N,N'-Methylen-bisacrylamid

filtrieren (0,45 µm)

10 % Trenngel

2,5	ml	Unterpuffer
3,33	ml	Acrylamid (30 %)
4,1	ml	H ₂ O
50	μl	Ammoniumpersulfat (10 %)
10	μl	TEMED

3 % Sammelgel

1,25	ml	Oberpuffer
0,65	ml	Acrylamid (30 %)
3,15	ml	H ₂ O
25	μl	Ammoniumpersulfat (10 %)
10	μl	TEMED

Unterpuffer

1,5	M	Tris-HCl
0,4	%	SDS
pH 8,8		

Oberpuffer

0,5	M	Tris-HCl
0,4	%	SDS
pH 6,8		

SDS-Elektrophoresepuffer

200	mM	Glycin
25	mM	Tris-HCl
0,1 % (w/v)		SDS

1 x Protein-Probenpuffer

10	%	Glycerol
2	%	SDS
0,02	%	Bromphenolblau
62,5	mM	Tris-HCl (pH 6,8)

Transferpuffer

200	mM	Glycin
25	mM	Tris-HCl
0,01	%	SDS
100	ml	Methanol (20 %)

1 x TBS-T-Puffer

10	mM	Tris-HCl pH 7,6
150	mM	NaCl
2,5	%	Tween 20

Zellkultur und Transfektion*DABCO*

1,25	g	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
52,25	g	Glycerol
5	ml	PBS

pH 6,8 mit HCl einstellen

MEM (0,37 g/l Natriumchlorid)

100	U/ml	Penicillin G
100	µg/ml	Streptomycin
350	µg/ml	L-Glutamin

Kristallviolett

1 % Kristallviolett in 50 % Ethanol

Methocel-Medium

20	g/l	Methylzellulose
9,4	g/l	MEM
2,2	g/l	NaHCO ₃
1,5	%	PBS
1	%	Glutamax

sterilfiltrieren, Gebrauchsverdünnung 1:4 in MEM mit 5 % FKS

Ringer-Lösung

41	g	Natriumchlorid (140 mM)
25	ml	KCl (5mM)
5	ml	MgCl ₂ (1mM)
10	ml	KCl ₂ (2mM)
12	g	Hepes (10mM)
10	g	Glucose (10mM)

ad 5 l H₂O, auf pH 7,4 einstellen

Sarkosylpuffer

75	mM	Tris-HCl (pH 8,0)
25	mM	EDTA
10 %	(w/v)	SDS

TEN-Puffer

150	mM	NaCl
10	mM	Tris-HCl
1	mM	EDTA

Versen-Trypsin-Lösung

136	mM	NaCl
2,6	mM	KCl
8	mM	Na ₂ HPO ₄
1,5	mM	KH ₂ PO ₄
3,3	mM	EDTA
1,25	g/l	Trypsin

Zitratpuffer

135	mM	NaCl
40	mM	Zitronensäure
10	mM	KCl

pH 3,0; sterilfiltrieren

Histopathologische Untersuchungen*Kresylechtviolett*

1	g	Kresylechtviolett
1000	ml	H ₂ O
5	Tropfen Essigsäure (10 %)	

erwärmen auf 50°C und filtrieren

50 x Denhardts Lösung

1	g	PVP
1	g	BSA
1	g	Ficoll 400

ad 100 ml H₂O

50 x Dextransulfat

10	g	Dextransulfat
----	---	---------------

ad 20 ml H₂O

Eosin/Phloxin

20	ml	Eosin (1 %)
2	ml	Phloxin (1 %)
156	ml	Ethanol
0,8	ml	Eisessig

Hämalaun (n. Meyer)

1	g	Hämatoxylin
1000	ml	H ₂ O
200	mg	NaJO ₃
50	g	Kaliumalaun

schütteln bis blauviolette Lösung

50	g	Chloralhydrat
1	g	Zitronensäure

Farbumschlag zu Rotviolett

Heringssperma-DNA (10 mg/ml)

250	mg	Heringssperma-DNA
25	ml	TE-Puffer (pH 8,0)

400 x Levamisol

96	mg	Levamisol
1	ml	H ₂ O

lösen, in 100 µl Aliquots bei -20°C lagern

Luxol (0,1 %)

1	g	Luxol
1000	ml	H ₂ O
5	ml	Essigsäure (10 %)

filtrieren

*20 x PBS, pH 7,3*29,25 g Na₂HPO₄

160 g NaCl

4 g KCl

4,9 g KH₂PO₄ad 1000 ml H₂O*2 x Puffer I*

200 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,5)

60 ml 5 M NaCl

ad 1000 ml H₂O*Puffer III*

25 ml 1 M Tris-HCl (pH 9,5)

5 ml 5 M NaCl

12,5 ml 1 M MgCl₂ad 250 ml H₂O*20 x SSC (3 M NaCl, 0,3 M Natriumzitat)*

175,32 g NaCl

88,23 g tri-Natriumzitat

in 600 ml H₂O lösen

mit HCl auf pH 7,0 einstellen

ad 1000 ml H₂O*TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0)*

5 ml 1 M Tris-HCl

1 ml 0,5 M EDTA

ad 500 ml H₂O

10 x TBS, pH 7,6

60,57 g Tris-HCl
80,0 g NaCl
in 500 ml H₂O lösen,
mit HCl auf pH 7,65 einstellen

10 mM Zitratpuffer (pH 6,0)

2,1 g Zitrat-Monohydrat
900 ml H₂O
mit ca. 25 ml 2 M NaOH auf pH 6,0 einstellen
ad 1000 ml H₂O

4 ERGEBNISSE

4.1 Herstellung und In-vitro-Charakterisierung von PrV-Mutanten

4.1.1 Deletion des US9-Gens von PrV

Deletion des US9-ORF

Zur Mutation des US9 Gens wurde das genomische 6597 bp *Bam*HI-Fragment 7 (Abb. 5B) des PrV-Ka in ein pUC19-Plasmid kloniert und als pUC-*Sal*Bam7 bezeichnet. Dafür wurde in einem ersten Schritt zur Entfernung unerwünschter *A*fIII-Spaltstellen das Plasmid mit diesem Enzym verdaut und nach Klenow-Behandlung mit T4-Ligase religiert. Abschnitte des *Bam*HI-7-Inserts mit weiteren Restriktionsspaltstellen wurden durch aufeinander folgenden Verdau mit *S*phI und *S*maI und nachfolgender Ligation entfernt. Das verbliebene 797 bp Insert enthielt den kompletten US9-„Open Reading Frame“ (ORF) mit 107 Kodons, von denen Kodon 1 bis 105 durch Ausschneiden eines 285 bp *A*fIII-Fragmentes entfernt wurden. In dem resultierenden pUC-Bam7SSKF (Abb. 5B) wurde das *A*fIII-Fragment durch ein 1256 bp *B*stBI-Fragment aus dem Plasmid pKD13 (Datsenko und Wanner 2000) ersetzt, welches ein durch „Flp-Recombinase Target Site“ (FRT)-flankiertes Kanamycin-Resistenzgen (KanR) enthielt. Nichtkompatible Restriktionsfragmentüberhänge wurden jeweils vor der Ligation mit Klenow-Polymerase behandelt. Das ungefähr 1,8 kbp große Insert von pUC-Bam7SSKF wurde mittels PCR mit den vektorspezifischen Primern M13 (-47) und M13 reverse (-48) amplifiziert.

Mutagenese von pPRV-ΔgB in *E. coli*

Das resultierende PCR-Produkt wurde für die „Red Recombinase“-vermittelte Mutagenese des „Bacterial Artificial Chromosome“ (BAC)-klonierten PrV-Genoms in *E. coli* (Datsenko und Wanner 2000, Kopp et al. 2003) verwendet. Hierzu wurden chemisch kompetente Bakterien, welche das BAC-ΔgB enthielten, mit dem Hilfsplasmid pKD46 transformiert. Das pKD46 enthält die „Red Recombinase“ des Bakteriophagen λ unter Kontrolle eines Arabinose-

induzierbaren Promotors (Datsenko und Wanner 2000). Da dieses Plasmid einen temperatursensitiven Replikationsursprung enthält, erfolgten alle weiteren Kultivierungsschritte bei 30°C. Nach Induktion in arabinosehaltigem Medium wurden die elektrokompotent gemachten Bakterien durch Elektroschock mit pUC-Bam7SSKF-PCR-Produkt transformiert. Anschließend wurden rekombinante Klone auf Kanamycin und Chloramphenicol enthaltenden Agarplatten selektiert. Zur Entfernung des FRT-flankierten KanR wurden die chemisch kompetent gemachten Bakterien mit dem pCP20 (Cherepanov und Wackernagel 1995), welches die FRT-spezifische Flp-Rekombinase und ebenfalls einen temperatursensitiven Replikationsursprung enthält, transformiert. Somit enthielt die entstandene Mutante pPrV-ΔUS9F nur die 36 bp Fremd-DNA einer Kopie der FRT im US9-Genlocus (Abb. 5C). Beide Helferplasmide konnten durch Kultivierung rekombinanter Bakterienklone bei 37°C wieder entfernt werden.

Herstellung der PrV-Mutante

Zur Entfernung des mini-F-Plasmidvektors und der EGFP-Expressionskassette aus dem BAC-geklonten PrV-Genom wurden RK13-Zellen mit pPrV-ΔUS9F und pUC-B1*Bc*II kotransfiziert (Graham und van der Eb 1973, Kopp et al. 2003). pUC-B1*Bc*II enthält das authentische gB-Gen von PrV-Ka innerhalb eines 6971 bp *Bc*II-Fragmentes. Die resultierenden Virusmutanten wurden durch wiederholte Isolierungen nicht fluoreszierender Plaques gereinigt. Schließlich wurde für ein Plaueisolat, PrV-ΔUS9F, die Korrektheit der Deletion mittels Southern-Blot (Abb. 4), Western-Blot und Immunfluoreszenz (Abb. 7) festgestellt.

4.1.2 Simultane Deletion der US9- und UL11-Gene von PrV

Deletion des US9-ORF

Eine US9- und UL11-negative PrV-Doppelmutante wurde auf Grundlage der Mutante pPrV-ΔUL11 hergestellt, die bereits eine FRT-site im UL11-Genlocus enthält (Kopp et al. 2003). Um unerwünschte Rekombinationsereignisse zu ver-

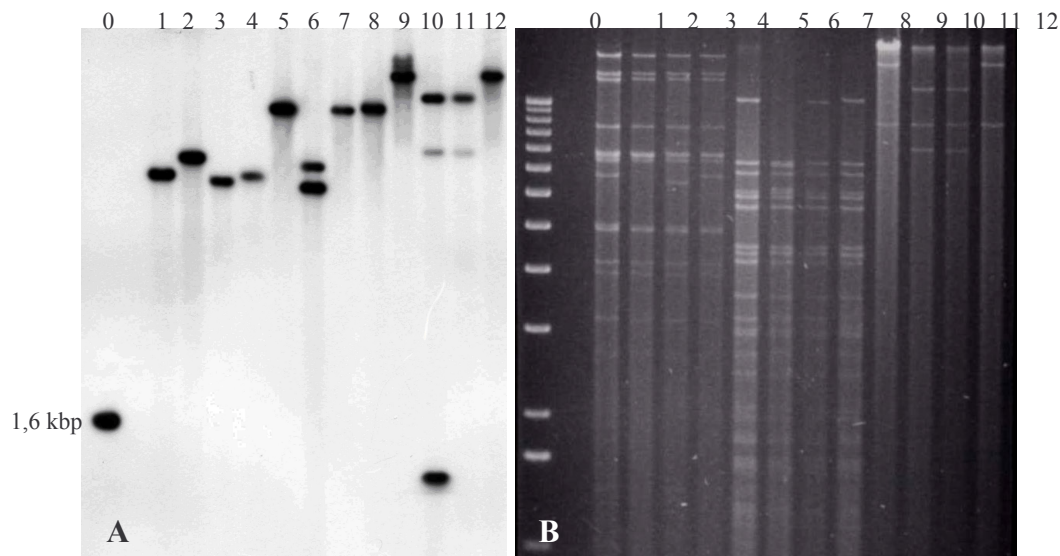


Abb.4. (A) Southern-Blot mit radioaktiv-markierter Sonde für *Bam*H1-Fragment 7 nach Verdau mit verschiedenen Restriktionsenzymen nach Auftrennung im Agarosegel (B). Nachweis der Restriktionsenzymschnittstellen für *Pst*I und *Xba*I in KanR von PrV-ΔUS9K (6, 10) jedoch nicht in PrV-ΔUS9F (7, 11).

Spuren 1-4 nach Restriktionsenzymverdau mit *Bam*H1, Spuren 5-8 mit *Pst*I, Spuren 9-12 mit *Xba*I.

0: 1 kbp-Marker; 1, 5, 9: PrV-Ka; 2, 6, 10: PrV-ΔUS9K; 3, 7, 11: PrV-ΔUS9F; 4, 8, 12: PrV-ΔUS9R.

meiden, wurde eine KanR-Genkassette ohne eine zusätzliche FRT-site permanent in den US9-Genloкус eingefügt. Weiterhin formt US9 eine 3'-koterminale Transkriptionseinheit mit dem US8-Gen, welches für gE kodiert (Klupp et al. 2004b). Weil die Anwesenheit von bakteriellen Fremdsequenzen die Translation und Stabilität von viralen mRNAs negativ beeinflussen kann (Fuchs et al. 2003), wurde zum Erhalt der gE-Expression von pPrV -ΔUL11/ΔUS9K ein zusätzliches Polyadenylierungssignal (PolyA) unterhalb von US8 zusammen mit dem KanR-Gen eingefügt. Zur Herstellung des Plasmides pUC-Bam7SSKA wurde der US9-ORF durch eine Genkassette mit KanR und dem SV40-PolyA-Signal substituiert (Abb. 5C). Diese Kassette wurde durch PCR-Amplifikation des Resistenzgens von pACYC177 mit den Primern KanR-For (TCCGGATCCCGATTATTCAACAAAGCCACG) und KanR-Rev (TTCGAATTCGCCAGTGTTACAACCAATTAACC), die zusätzliche *Bam*H1 bzw. *Eco*RI Restriktionsenzymschnittstellen enthielten (unterstrichene Nukleotide),

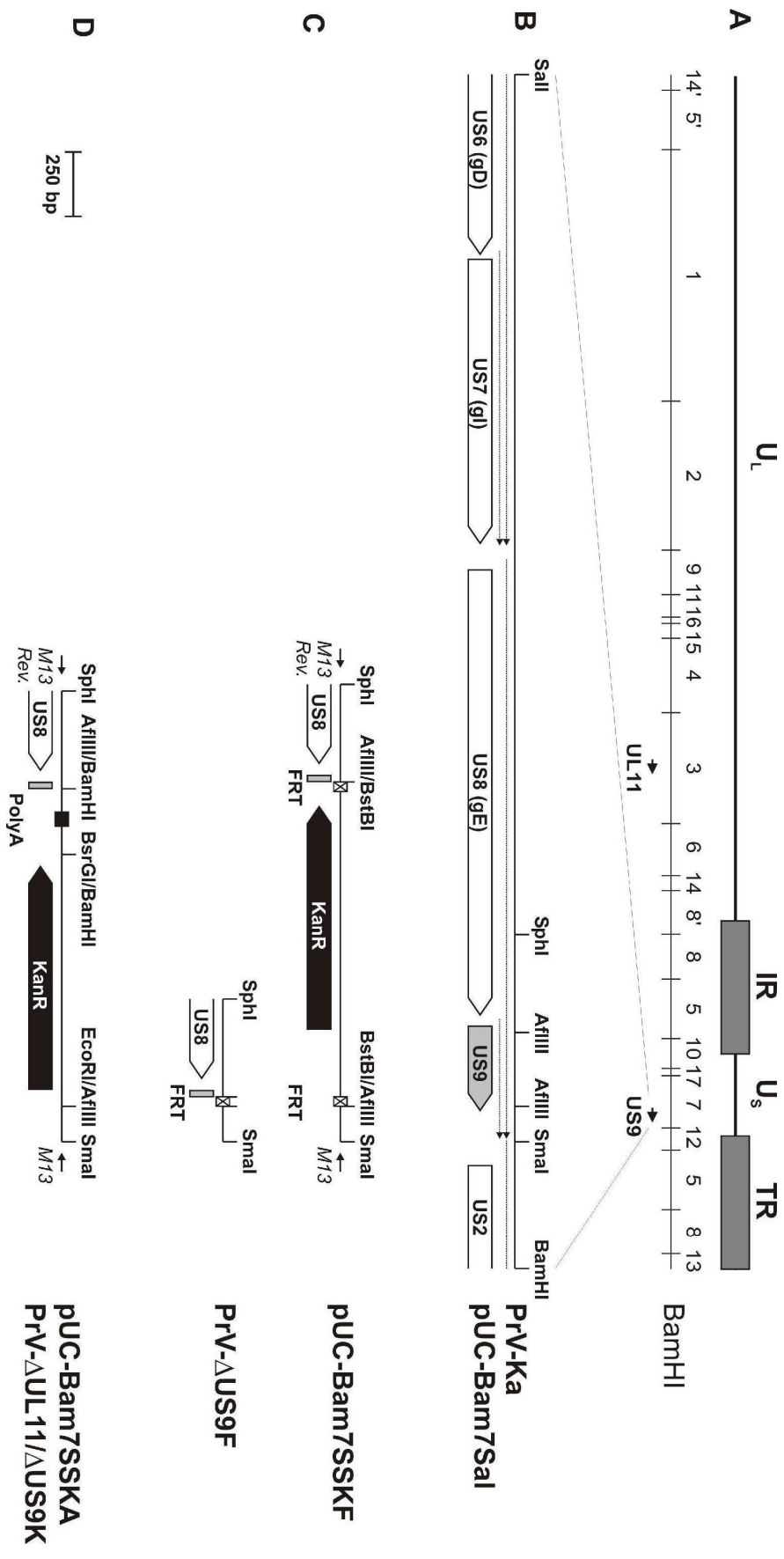


Abb. 5. Konstruktion von PrV-ΔUS9F und PrV-ΔUL11F/US9K. **(A)** Schematische Darstellung des PrV-Genoms, mit einer "Unique Long" (UL) und einer "Unique Short" (US) Region, umgeben von repetitiven Sequenzen (IR und TR). **(B)** Ausschnitt des BamHI-SalI-Fragments von BamHI-Fragment 7, mit dem US9 Gen, Virale Transkripte und Transkriptionsrichtung sind durch Pfeile gekennzeichnet. **(C)** Zur Herstellung von PrV-ΔUS9F, wurde der US9 ORF vorübergehend durch ein Kanamycin-Resistenzgen (KanR) ersetzt. Nach Mutagenese verblieb nur eine Kopie der FRT im US9 Genlokus. **(D)** PrV-ΔUL11F/US9K enthält ein konstant integriertes Kanamycin-Resistenzgen (KanR) und ein zusätzliches Polyadenylationssignal (poly A) unterhalb des ge- Gens.

vervielfältigt. Das 988 bp PCR-Produkt wurde mit den entsprechenden Enzymen verdaut und in das Plasmid pBI-GFP (Fuchs und Mettenleiter 1999), welches mit *EcoRI* und *BstGI* verdaut wurde, eingefügt. Aus dem resultierenden Plasmid konnte die KanR-PolyA-Kassette als 1239 bp *EcoRI/BamHI* Fragment isoliert werden. Dieses wurde in das US9-deletierte, *AflIII*-gespaltene pUC-*BamSph7B* eingefügt. Aus dem resultierenden Plasmid wurde ein ungefähr 1,8 kbp großes Fragment aus pUC-Bam7SSKA (Abb. 5D) mit vektorspezifischen Primern M13 (-47) und M13 reverse (-48) amplifiziert.

Mutagenese von pPRV-ΔgB in *E.coli*

Anschließend wurde, wie bei der Herstellung von PrV-ΔUS9F beschrieben, dieses Fragment zur „Red Recombinase“-vermittelten Mutagenese des BAC-klonierten PrV-Genoms in *E. coli* (Datsenko und Wanner 2000, Kopp et al. 2003) verwendet.

Herstellung der PrV-Deletionsmutante

Abschließend wurden auch bei dieser Mutante die bakteriellen Vektorsequenzen im gB-Gen von pPrV-ΔUL11/ΔUS9K durch Kalziumphosphat-Kotransfektion in RK13-Zellen mit dem authentischen, klonierten PrV-gB-Gen ersetzt (siehe 4.1.1). Die DNA der entstandenen Virusnachkommenschaft wurde präpariert und mittels *BamHI*-Verdau und Southern-Blot-Hybridisierung auf Deletion der UL11- und US9-Gensequenzen geprüft (Abb.6). Die fehlende Expression der US9- und UL11-Proteine wurde durch Western-Blot und indirekte Immunfluoreszenz in infizierter Zellkultur bestätigt (Abb. 7).

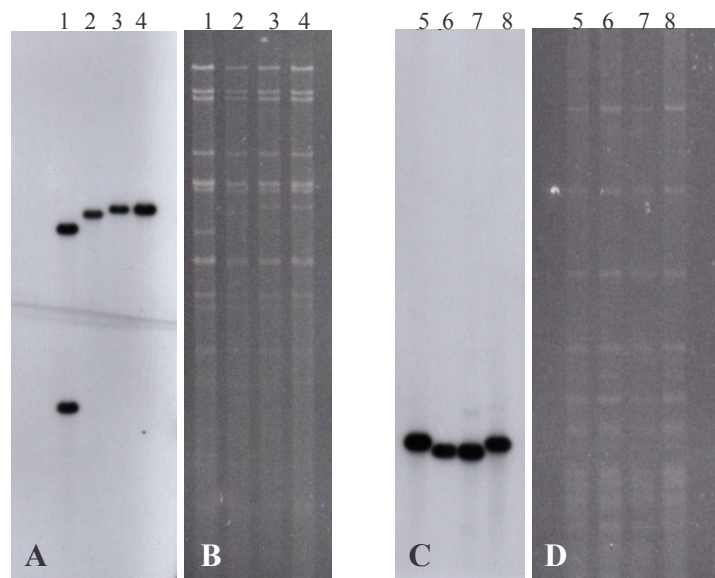


Abb.6. (A) Southern-Blot zum Nachweis der US9-Deletion im *Bam*HI-Fragment 7 nach Restriktionsenzymverdau mit *Bam*HI (B). (C) Southern-Blot zum Nachweis der UL11-Deletion im *Bam*HI-Fragment 3 nach Restriktionsenzymverdau mit *Sma*I (D). Spuren 1-4 nach Restriktionsenzymverdau *Bam*HI, Spuren 5-8 mit *Sma*I. 4, 5: PrV-Ka; 3, 6: PrV-ΔUL11; 1, 7: PrV-ΔUL11/US9K; 2, 8: PrV-ΔUS9F.

4.1.3 Herstellung von US9-Rescuemutanten

Zur Herstellung von US9-Rescuemutanten wurden RK13-Zellen mit viraler DNA von PrV-ΔUS9F oder PrV-ΔUL11/ΔUS9K und pUC-*Bam*7Sal (Fig. 5B) kotransfiziert. Dieses Plasmid wurde durch *Sal*I-Verdau von pUC-*Bam*7 und anschließender Religation gewonnen. Es enthielt den US9-ORF in einem 4623 bp Insert. RK13-Zellen wurden in Mikrotiterplatten kultiviert und mit ca. 1 pfu/well, der aus der Kotransfektion resultierenden Viren infiziert und für 5 Tage bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden Aliquots der Überstände durch Dot-Blot-Hybridisierung (König et al. 2003) mit dem ³²P-markierten 285 bp *Afl*III-Fragment des US9-Gens als Sonde geprüft. Positive Mutanten wurden geerntet und die Prozedur wiederholt, bis die Viruspopulation homogen war. Für einzelne Plaqueisolate wurde die Reinsertion des US9-ORF in den Rescuemutanten PrV-

Δ US9FR und PrV- Δ UL11/US9KR wurden mittels Restriktionsenzymanalyse und Southern-Blot-Hybridisierung geprüft.

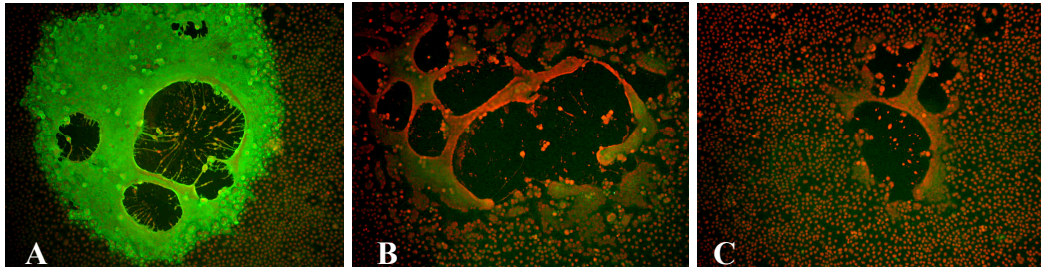


Abb.7. Nachweis der Expression von PrV-US9-Protein in RK13-Zellkultur nach Infektion mit PrV-Ka (A), PrV- Δ US9F (B) und PrV- Δ UL11/US9K (C) unter Plaquetestbedingungen. Immunfluoreszenz mit PrV-US9-spezifischem Antiserum und FITC-konjugiertem Sekundärantikörper (grün). Gegenfärbung der Zellkerne mit Propidiumiodid (rot). (A) PrV-Ka mit brillanter Grünfärbung eines Plaques. (B) PrV- Δ US9F-infizierte Plaques mit wildtypähnlichen Plaquegrößen, jedoch keiner grünen Fluoreszenz. (C) PrV- Δ UL11/US9K, signifikant kleinere Plaques ohne Expression von US9-Antigen (x 20).

4.1.4 In-vitro-Charakterisierung von PrV- Δ US9F und PrV- Δ UL11/US9K

Zur Analyse der In-vitro-Wachstumseigenschaften der Virusmutanten wurden RK13-Zellen mit PrV-Ka, PrV- Δ US9F, PrV- Δ US9FR, PrV- Δ UL11, PrV- Δ UL11/US9K und PrV- Δ UL11/US9KR infiziert und Plaquegrößen sowie Wachstumskinetiken bestimmt. Zwei dpi wurden die Plaquesdurchmesser mikroskopisch gemessen. Wie bereits beschrieben (Brideau et al. 2000b, Kopp et al. 2003), beeinflusste die Deletion von US9 die Zell-zu-Zell Ausbreitung in RK13 Zellkultur nicht, während es nach Deletion von UL11 zu 40 % reduzierten Plaquegrößen im Vergleich zu PrV-Ka kam (Abb. 8B). Zusätzliche Deletion von US9 in PrV- Δ UL11 hatte keinen Effekt auf die Plaquegrößen (Abb. 8B). In der Wachstumskinetik erreichte PrV- Δ US9 Titer, welche nahezu identisch zu PrV-Ka und PrV- Δ US9FR waren (Abb. 8A). Die maximalen Titer von PrV- Δ UL11F waren etwa um den Faktor 10 reduziert (Kopp et al. 2003), nahmen jedoch nach zusätzlicher Deletion des US9 in der Doppelmutante PrV- Δ UL11/US9K nicht

weiter ab (Abb. 8A). Zusammengefasst hatte eine Deletion von US9 keinen Einfluss auf die In-vitro-Replikation, unabhängig von UL11.

4.1.5 Herstellung von Mutanten mit EGFP-UL35 Fusionsprotein

Das UL35-Gen des PrV ist in einem 4500 bp *SalI*-Fragment lokalisiert, das die Nukleotide 31338 bis 35843 der genomischen DNA-Sequenz umfasst (Klupp et al. 2004b). Dieses Fragment wurde durch *SalI*-Verdau der DNA von PrV-Ka isoliert und in den Plasmid-Vektor pUC19 eingefügt. Zur Entfernung unerwünschter *NcoI*-Spaltstellen wurde das erhaltene Plasmid pUC-*SalB* mit *NcoI* und *EcoRI* verdaut, Klenow behandelt und religiert. Zur Mutation des 5'-Endes von UL35 wurden Teile des Insert-Fragmentes von pUC-*SalBEN* mittels „Mismatch“ Primern durch PCR amplifiziert. Der Primer PUL35M-F2 (GAGCCACCATGGTGTACACCTTCGACCCGAACAATCCC) korrespondierte zum Genfragment zwischen den Nukleotiden 32233 bis 32264 des PrV-Genoms, enthielt jedoch zwei Basenaustausche (fett) und sechs zusätzliche Nukleotide (kursiv), durch welche künstliche *NcoI* und *BsrGI* Spaltstellen am und hinter dem UL35-Startkodon angefügt wurden. Dieselben Mutationen waren im Primer PUL35M-R2 (CGAAGGTGTACACCATGGTGGCTCGGCGGGGAGCGC) eingeführt, welcher ansonsten revers-komplementär zu den Nukleotiden 32221 bis 32250 des PrV-Genoms war. Im Gegensatz dazu enthielten die Primer PUL35M-F1 (TGATGTCGGTGAGCTGCTTCGTGC, Nukleotide 21804 bis 31827) und PUL35M-R1 (GCTGGTGGCGAACATGGGCTG, revers-komplementär zu Nukleotid 32463 bis 32483) keine Veränderungen der viralen DNA-Sequenz. Nach Isolierung der erhaltenen 453 und 257 bp PCR-Produkte der Fusions-PCR mit PUL35M-F1 und PUL35M-R2 sowie PUL35M-F2 und PUL35M-R1 wurden ca. 100 ng beider Produkte in eine PCR-Reaktion ohne Primer gegeben, was zu einem 686 bp langen Fusionsfragment führte. Dieses wurde durch eine abschließende PCR mit den Primern PUL35M-F1 und PUL35M-R1 amplifiziert. Mit einem *BsaBI* /*XhoI* Subfragment dieses PCR-Produktes wurde das korrespondierende Fragment des pUC-*SalBEN* ersetzt, was zur Entstehung von

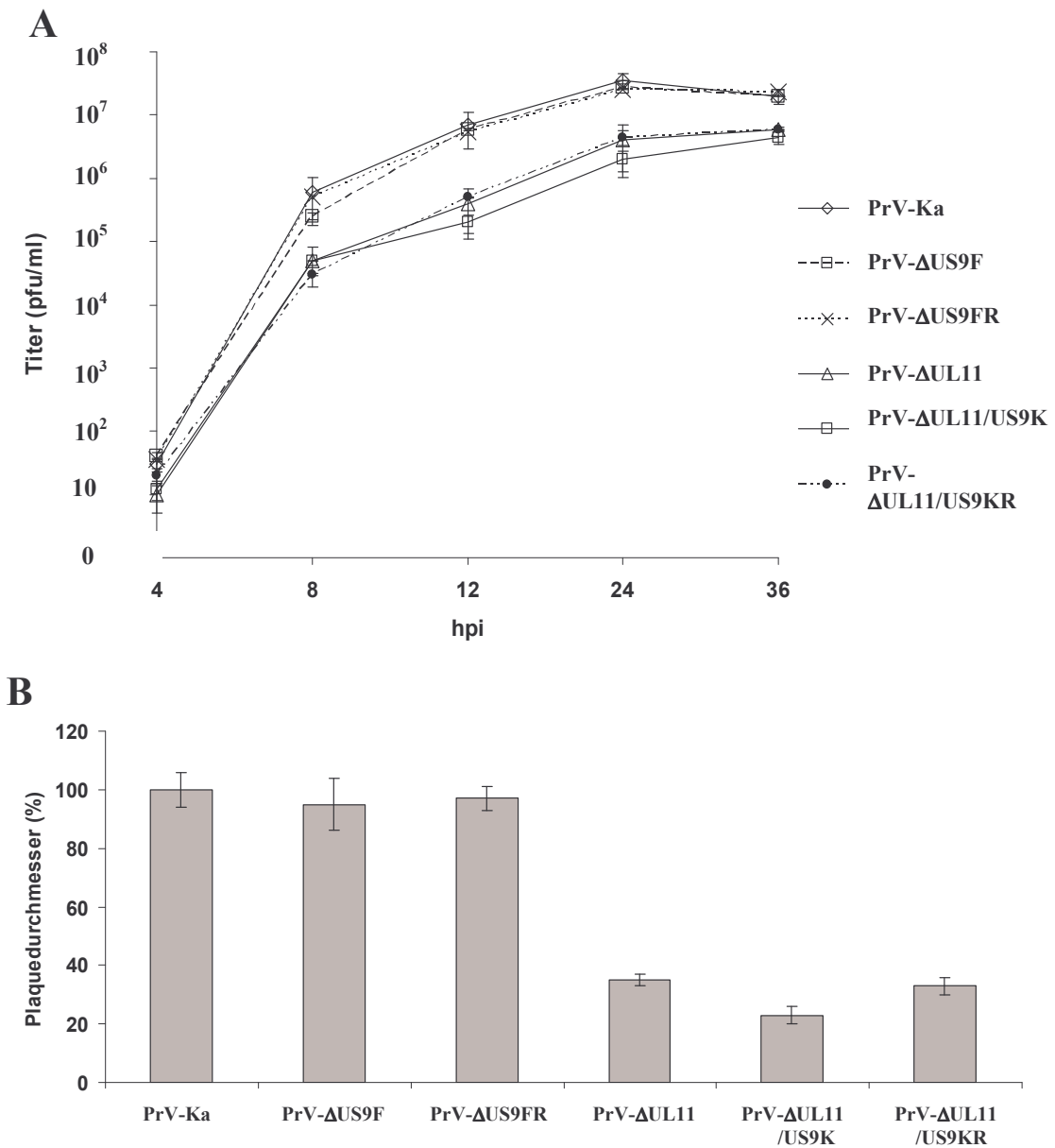


Abb.8. In-vitro-Charakterisierung von PrV-ΔUS9F und PrV-ΔUL11/US9K. **(A)** Wachstumskinetik auf RK13-Zellen 4, 8, 12, 24, 36 hpi, Durchschnittswerte mit Standardabweichungen. Deletion des US9-Gens in PrV-ΔUL11/US9K hat keinen signifikanten Effekt auf die Replikationsfähigkeit. **(B)** Plaquetest, relative Plaquegrößen auf RK13-Zellen, PrV-Ka (100%).

pUC-UL35M führte. Abschließend wurde die kodierende Sequenz des „Enhanced Green Fluorescent Protein“ (EGFP) als 711 bp *NcoI/BsrGI*-Fragment aus dem Plasmid pEGFP-N1 isoliert und in das ebenso gespaltene Plasmid pUC-UL35M eingebaut. Das Insert des resultierenden pUL35G (Abb. 9C) wurde durch DNA-Sequenzierung charakterisiert. Dies ermöglichte die Expression eines Fusionsproteins aus dem EGFP, das N-terminal mit dem UL35-Genprodukt verbunden war. Das UL35-Protein verlor dabei das Methionin an Position 1, und es erfolgte ein Serin-zu-Threonin-Austausch an Position 2. Die Proteinexpression wurde durch den authentischen UL35-Genpromotor des PrV kontrolliert. Zur Herstellung von rekombinantem Virus wurden RK13-Zellen mit pUC-UL35G und viraler DNA von PrV-Ka, PrV- Δ UL11, PrV- Δ US9F, PrV- Δ UL48 und PrV- Δ UL37 kotransfiziert (Graham und van der Eb 1973). Transfektionsnachkommen wurden durch Plaqueassays und nachfolgender Fluoreszenzmikroskopie überprüft. EGFP-exprimierende Virusmutanten wurden isoliert und durch wiederholte Plaquereinigungen bis zur Homogenität gereinigt. In ähnlicher Weise konnten Rescuemutanten durch Kotransfektion von genomischer DNA der UL35-EGFP-Mutanten mit dem Plasmid pUC-*Sal*/BEN und durch Virusisolation aus nicht fluoreszierenden Plaques gewonnen werden.

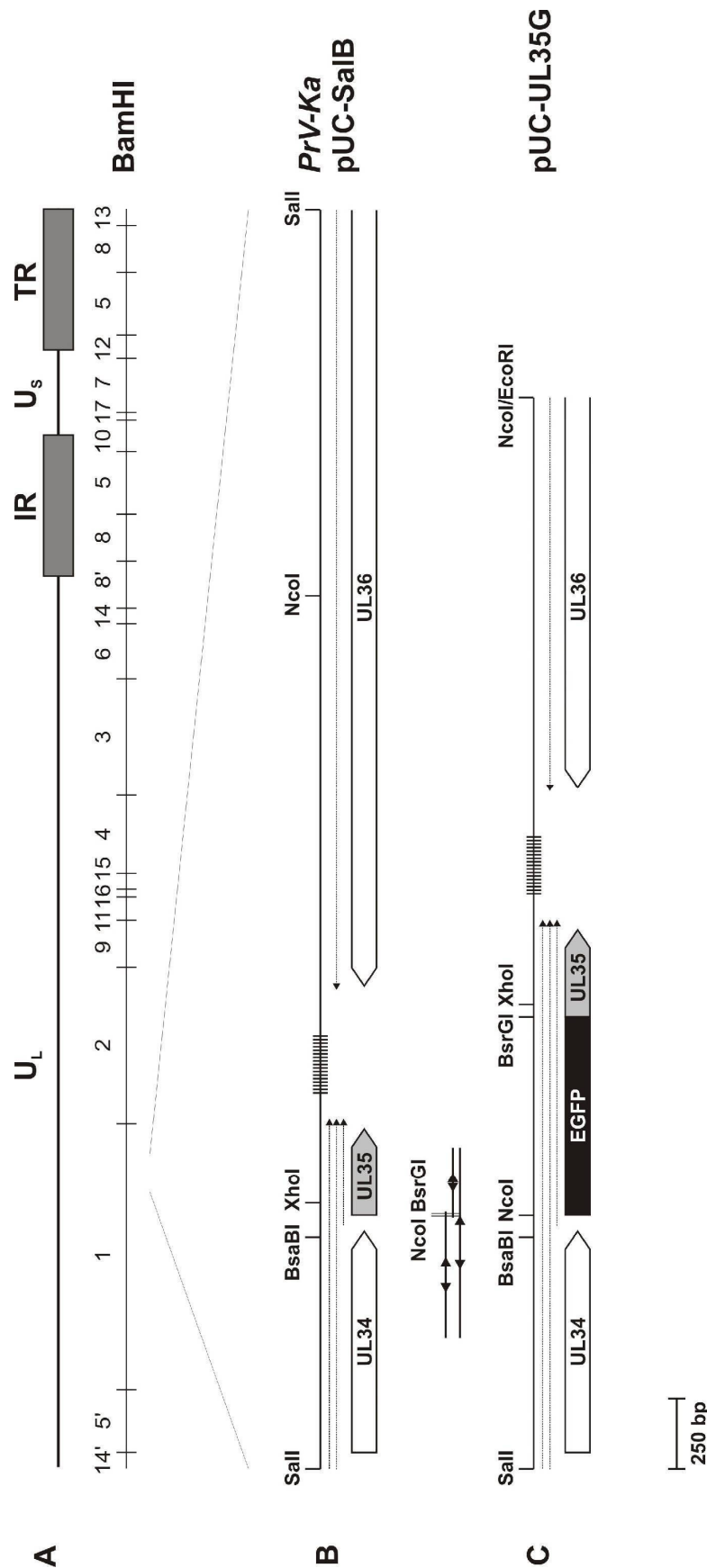


Abb.9. Konstruktion von PrV-Mutanten mit UL35/EGFP Fusionsprotein. (A) Schematische Darstellung des PrV-Genoms, mit "Unique Long" (UL)- und einer "Unique Short" (US)-Region, umgeben von repetitiven Sequenzen (IR und TR). (B) Ausschnitt des *SalI*-Fragments von *BamHI*-Fragment 1, mit dem UL35-Gen. Virale Transkripte und Transkriptionsrichtung sind durch Pfeile gekennzeichnet. (C) Zur N-terminalen Verbindung von EGFP und UL35 wurden künstlichen *NcoI* und *BsrGI* Spaltstellen am und hinter dem UL35-Startkodon eingefügt und anschließend die Sequenz des EGFP in das an dieser Stelle gesplante pUC-SalB eingefügt. Zur Herstellung von rekombinantem Virus wurden RK13-Zellen mit pUC-UL35G und viraler DNA des PrV-Ka, PrV-ΔUL11, PrV-ΔUS9, PrV-ΔUL48 und PrV-ΔUL37 kotransfiziert

4.2 Infektionsexperimente in CD1-Mäusen

4.2.1 Bestimmung der mittleren Überlebenszeit

Die intranasale Inokulation sechs Wochen alter CD1-Mäuse mit 5 μ l Virussuspension (10^6 pfu/ml) der verschiedenen Virusstämme ergab die in Abb. 10 dargestellten mittleren Überlebenszeiten (10 Tiere/Virusstamm).

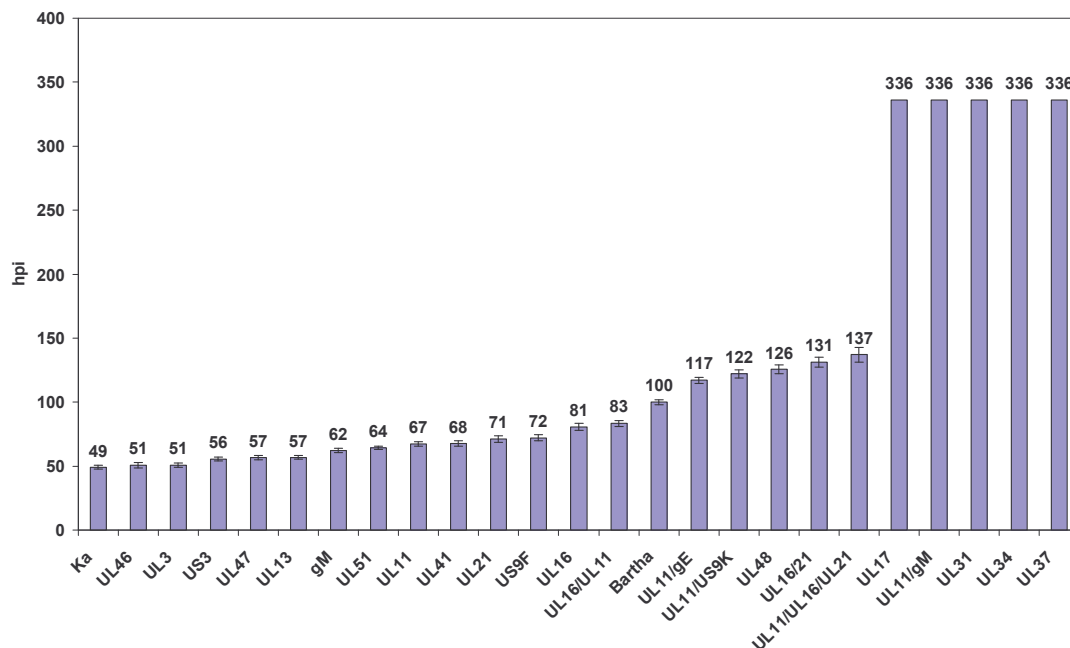


Abb.10: Durchschnittliche Überlebenszeiten von CD1-Mäusen nach intranasaler Infektion mit 10^6 pfu der entsprechenden Virusstämme, maximaler Untersuchungszeitraum 336 hpi.

Eine Reihe von Virusmutanten zeigte eine dem Wildtyp ähnliche Virulenz (PrV- Δ UL46, - Δ UL3, - Δ US3, - Δ UL47, - Δ UL13) und Überlebenszeiten zwischen 51 und 57 hpi. Eine weitere Gruppe von Mutanten (PrV- Δ gM, - Δ UL51, - Δ UL11, - Δ UL41, - Δ UL21, - Δ US9F, - Δ UL16, - Δ UL16/UL11) zeigte eine schwache Attenuierung der Virulenz gegenüber dem PrV-Ka mit Überlebenszeiten zwischen 62 und 83 hpi. Mehrere Deletionsmutanten (PrV-Bartha, - Δ UL11/US9K, - Δ UL11/gE, - Δ UL48, - Δ UL16/UL21, - Δ UL11/UL16/UL21) zeigten eine ausgeprägte Reduktion der Virulenz mit Überlebenszeiten von 100 bis 137 hpi.

Den schwersten Defekt zeigten die Virusmutanten der vierten Gruppe (PrV- Δ UL17, - Δ UL11/gM, - Δ UL31, - Δ UL34, - Δ UL37) mit einer fehlenden Neurovirulenz.

4.2.2. PrV-Kaplan

Die Infektion mit PrV-Ka führte 36 hpi zu ersten klinischen Symptomen. Die Mäuse zeigten Anorexie und Apathie und im Verlauf der folgenden Stunden in zunehmendem Maße anfallsartiges Kratzen (Juckreiz), besonders am Kopf. Als Folge kam es zu einer ausgeprägten Automutilation mit Blutungen, ausgedehnten Exkorationen im Gesichtsbereich sowie einer akuten katarrhalischen Konjunktivitis („Mad Itch“-Syndrom, Pseudowut). Im moribunden Stadium waren zusätzlich Hyperaktivität mit intermittierenden Exzitationen und Konvulsionen, Tachypnoe mit schwerer Dyspnoe und eine Schwellung des Nasenrückens zu beobachten. Beim Auftreten höchstgradiger Symptome nach durchschnittlich 49 h wurden die Tiere euthanasiert. Der immunhistologische Nachweis des PrV-Hauptkapsidproteins, das durch das UL19-Gen kodiert wird, wurde als Marker infizierter Zellen verwendet. Ab 24 hpi und bis zum durchschnittlichen Todeszeitpunkt zunehmend, konnten multiple Herde aus mehreren UL19-antigenpositiven Zellen im respiratorischen und in geringerem Ausmaß auch im olfaktorischen Epithel der Nasenschleimhaut sowie im Plattenepithel der Nasen- und Rachenschleimhaut nachgewiesen werden. Die histologische Untersuchung dieser infizierten Zellen ergab eine gering- bis mittelgradige Schwellung, unscharfe Zellgrenzen sowie karyorrhektische und karyolytische Zellkerne (Degeneration und Nekrose). Subepithelial fand sich zu diesem Zeitpunkt auch eine geringgradige Infiltration mit neutrophilen Granulozyten. Ebenfalls 24 hpi und bis zum Zeitpunkt des Todes zunehmend war eine Infektion von serösen Nasendrüsen der Lamina propria in der respiratorischen Nasenschleimhaut zu beobachten (Abb.11A). Im TG war eine erste Infektion von Neuronen erster Ordnung bereits nach 24 h nachweisbar. Etwa 49 hpi waren neben einer erhöhten Anzahl infizierter Neurone zusätzlich auch

infizierte perineuronale Mantelzellen im TG vorhanden (Abb.11B). Infektion von Neuronen zweiter Ordnung in den trigeminalen Kerngebieten des Pons und der Medulla waren erstmals nach 49 h zu beobachten. PrV-Antigen war hauptsächlich im kaudalen Teil des spinalen trigeminalen Nukleus (Sp5C, Bregma -5,68 bis -8,24) (Abb.11C) und daneben im Me5 und Pr5 zu finden. Die Doppelmarkierung und Analyse mittels konfokaler Laser-Scan-Mikroskopie ergab eine eindeutige Kolo-kalisation von UL19-Antigen mit dem neuronenkernspezifischen Antigen „NeuN“ im Sp5C. Neben einer Infektion von Neuronen des trigeminalen Systems war in allen Mäusen eine Beteiligung sympathischer Neurone im GCC und von parasympathischen Neuronen im GPP zu verzeichnen. Ebenfalls regelmäßig infiziert war das Kerngebiet des 7. Hirnnerven (NF, Bregma -5,68 bis -6,48) und des NTS (Bregma -6,24 bis -8,24). Eine Infektion thalamischer (VPM, Bregma -1,06 bis -2,54) bzw. kortikaler Neurone (SC, Bregma 0,98 bis -1,82) fand sich in keinem Tier. In Lunge, Leber, Niere, Milz, Herz sowie Gastrointestinaltrakt von drei Tieren war virales Antigen immunhistologisch nicht feststellbar. Histopathologisch konnten gelegentlich sowohl in Ganglienzellen als auch in Neuronen des Sp5 intranukleäre Einschußkörperchen vom Typ Cowdry A in Verbindung mit Neuronendegeneration und Kernwandhyperchromasie nachgewiesen werden. Im TG und in den infizierten Kerngebieten des Hirnstammes fanden sich keine entzündlichen Reaktionen. Mit Hilfe der Immunhistologie gegen aktivierte Caspase 3 konnte in infizierten Ganglien apoptotischer Untergang von Gliazellen bzw. infiltrierenden Leukozyten nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigten degenerierende Neuronen mit diesem Antikörper kein positives Signal.

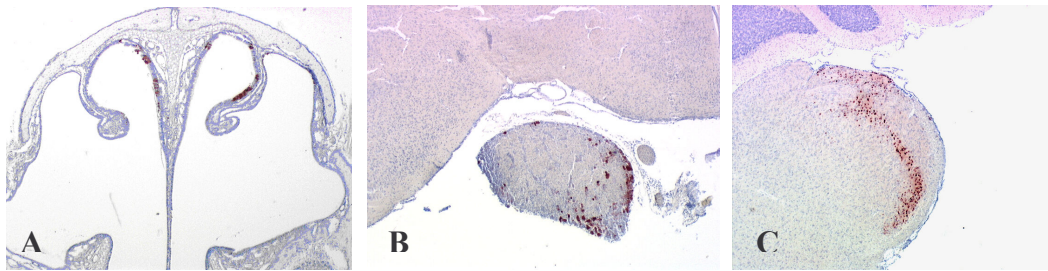


Abb.11. Immunhistologie zum Nachweis von PrV-Antigen in Mäusen 49,5 h nach Inokulation mit 10^6 pfu PrV-Ka; ABC-Methode, anti-UL19-Antiserum. **(A)** Rostraler Abschnitt der Nasenhöhle; infizierte Zellen des respiratorischen Epithels auf beiden Seiten des Nasenseptums und der dorsalen Conchae (x 10). **(B)** TG und die Basis des Mittelhirns; Vielzahl von Ganglienzellen mit kräftiger intrazytoplasmatischer und intranukleärer Färbung (x 15). **(C)** Medulla oblongata (Bregma -7.00); Infektion von Neuronen und Gliazellen des Sp5C (x 15).

4.2.3 PrV- Δ UL46

Mit PrV- Δ UL46 infizierte Mäuse entwickelten erste klinische Symptome nach ca. 36 h in Form von Anorexie und Apathie. Der weitere Verlauf war identisch mit dem von Wildtyp-infizierten Tieren. UL19-Antigen fand sich ab 24 hpi in der respiratorischen und in geringerem Ausmaß auch in der olfaktorischen Nasenschleimhaut sowie in der kutanen Schleimhaut von Nase und Mundhöhle (Abb.12A). Bis zum Tod nahm die Zahl der infizierten Zellen in diesen Bereichen zu. Histopathologisch lag neben Degeneration und Nekrose der infizierten Zellen eine geringgradige submuköse Infiltration mit neutrophilen Granulozyten vor. Ab 24 hpi und bis zum Tod war in zunehmendem Maße eine Infektion seröser Nasendrüsen der respiratorischen Schleimhaut zu beobachten. Erstmals waren Neurone erster Ordnung im TG nach 24 hpi infiziert (Abb.12B). Die Zahl nahm bis zum Tod 51 hpi zu. Zu diesem Zeitpunkt waren auch Mantelzellen sowie Neurone zweiter Ordnung im Pr5, Me5 und Sp5C PrV-Antigen positiv (Abb.12C). Ähnlich der Situation bei Wildtyp-infizierten Tieren fand sich eine Kolo-kalisation von UL19-Antigen und NeuN im Sp5C. Das GCC, GPP, NF und der NTS waren in ähnlicher Ausprägung wie beim Wildtyp infiziert. Eine Infektion thalamischer oder kortikaler Neurone fand sich nicht. Histopathologisch fanden sich in Ganglienzellen des TG und in Neuronen des Sp5C Degenerationen mit intranukleären Einschußkörperchen.

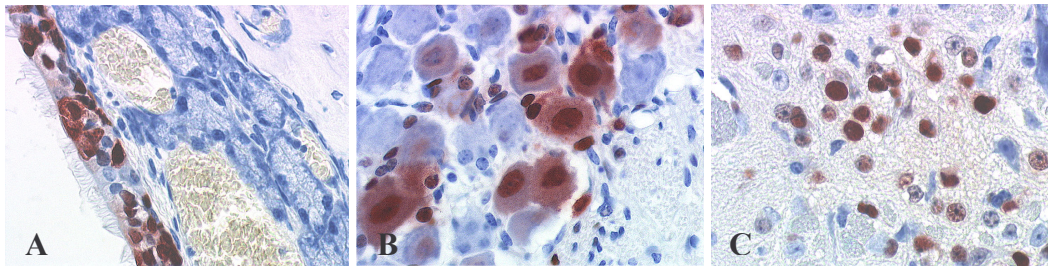


Abb.12. Immunhistologie zum Nachweis von PrV UL19-Antigen in Mäusen 51 h nach Infektion mit 10^6 pfu PrV- Δ UL46. **(A)** Nase, respiratorisches Epithel; multifokal verteilte Herde infizierter Epithelzellen mit intrazytoplasmatischem und intranukleärem Signal. **(B)** TG; infizierte Ganglienzellen und perineuronale Mantelzellen. **(C)** Sp5C; UL19-Antigen positive, degenerierende Neurone zweiter Ordnung (x 60).

4.2.4 PrV- Δ UL3

Der Verlauf der beobachteten Klinik, die Nachweisbarkeit von UL19-Antigen in Nasenschleimhaut, TG, GCC, GPP, NF, NTS und die Infektion von Kerngebieten zweiter Ordnung entsprachen ebenso wie die histopathologischen Befunde der Situation bei Wildtyp-infizierten Tieren.

4.2.5 PrV- Δ US3

Anorexie, Apathie und pumpende Atmung zeigten sich erstmals nach ca. 48 hpi. Der weitere Verlauf der beobachteten Klinik war, obwohl etwas verzögert, identisch mit dem nach Infektion mit PrV-Ka. Nachweisbarkeit von UL19-Antigen in Nasenschleimhaut und Drüsenepithel entsprach den Beobachtungen bei Wildtyp-infizierten Tieren. Allerdings waren Neuronen im TG erst ab 48 hpi infiziert. PrV-Antigen bei dieser Mutante war bereits 48 hpi in Neuronen zweiter Ordnung im Pr5, Me5 und Sp5C nachweisbar. Alle weiteren immunhistologischen und histopathologischen Befunde waren wie unter 4.2.2 für den Wildtyp beschrieben.

4.2.6 PrV- Δ UL47

Der Beginn klinischer Symptome und die Infektion der Nasenschleimhaut entsprachen der bei PrV- Δ US3 beschriebenen Situation, wobei die Zahl infizierter Zellen bis 57 hpi zunahm. Eine Infektion von Neuronen erster und zweiter Ordnung im Pr5, Me5 und Sp5C war nach 48 h zu beobachten. Wie auch bei PrV-Ka fand sich in den infizierten Kerngebieten und hier vor allem im Sp5C ein leichtes Ödem des Neuropils (Abb.13).

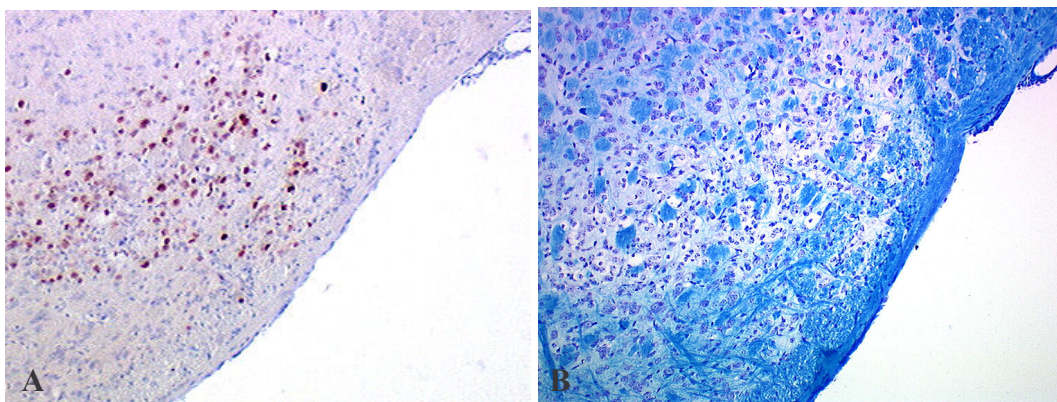


Abb.13. Sp5C 57 h nach Infektion mit PrV- Δ UL47. (A) PrV-infizierte Neurone, anti-UL19-Antigen. (B) Ödem des Neuropils im Konsekutivschnitt, Luxol-Kresyl (x 40).

4.2.7 PrV- Δ UL13

Der Verlauf der klinischen Symptome stimmte mit dem bei PrV- Δ UL47-infizierten Mäusen überein. UL19-Antigen war in Neuronen erster Ordnung im TG ab 48 hpi nachweisbar. Neurone zweiter Ordnung im Pr5, Me5 und Sp5C waren ebenfalls ab 48 hpi infiziert. Immunhistologische und histopathologische Befunde entsprachen ansonsten den Beobachtungen nach Infektion mit Wildtyp-PrV mit eosinophilen intranukleären Einschußkörperchen vom Typ Cowdry A (Abb.14).

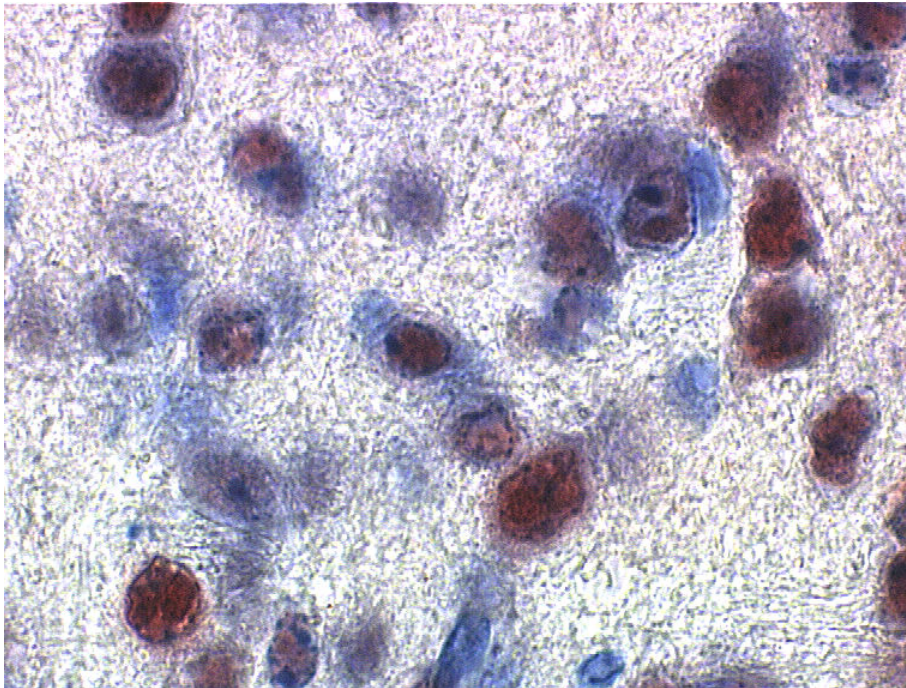


Abb.14. Immunhistologie zum Nachweis von PrV UL19-Antigen. Sp5, 57 h nach Infektion mit PrV- Δ UL13; Neurone mit Kernwandhyperchromasie und intranukleären Einschlusskörperchen vom Typ Cowdry A (x 100).

4.2.8 PrV- Δ gM

Der Verlauf der klinischen Symptome war im Vergleich zum Wildtyp verzögert. Das Ausmaß und die Art der Symptome waren aber, ebenso wie Qualität und Quantität der immunhistologischen Befunde, identisch. Das TG zeigte bei dieser Mutante eine geringgradige Ganglioneuritis. In den Meningen des Hirnstammes fanden sich vermehrt perivaskuläre neutrophile Granulozyten (Abb.15).

4.2.9 PrV- Δ UL51

Der klinische Verlauf, die Infektion der Nasenschleimhaut und der Neuronen erster Ordnung waren wie bei PrV- Δ gM beschrieben. Neurone zweiter Ordnung in Pr5, Me5 und Sp5C waren nach 64 h infiziert. Die weiteren Befunde entsprachen weitestgehend den Veränderungen nach Infektion mit PrV- Δ gM.

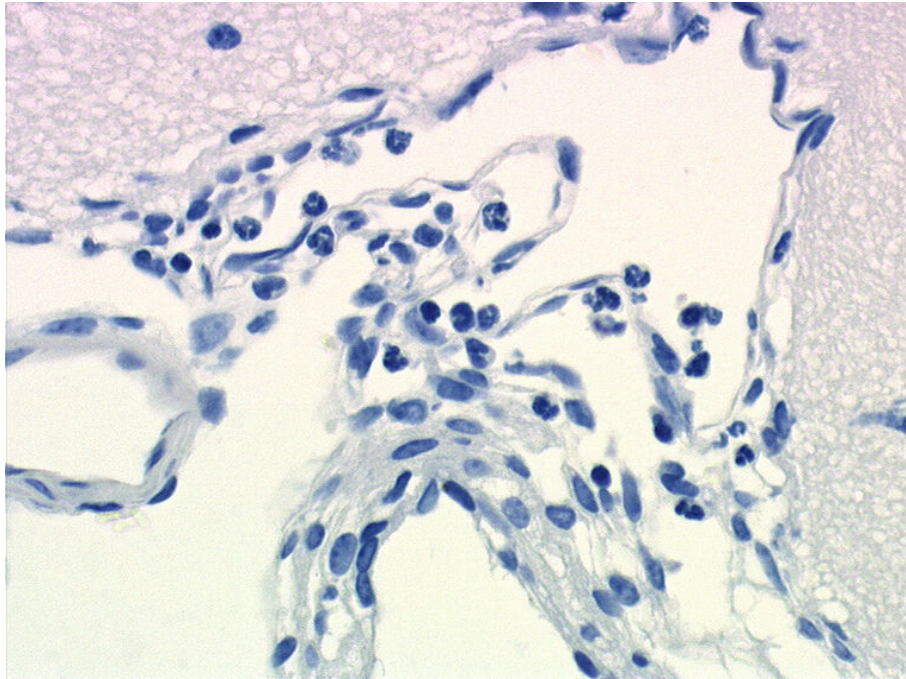


Abb.15. Medulla oblongata (Bregma -7,00), 63 h nach Infektion mit PrV- Δ gM; im Subarachnoidalraum und in der Pia mater sowie perivaskulär wenige neutrophile Granulozyten (x 80).

4.2.10 PrV- Δ UL11

Der Verlauf der klinischen Symptome und die Infektion von Nasenschleimhaut sowie Neuronen erster Ordnung entsprachen dem für PrV- Δ gM beschriebenen Bild. Neurone zweiter Ordnung im Pr5, Me5 und Sp5C waren 67 hpi infiziert. Alle weiteren Befunde entsprachen PrV- Δ gM.

4.2.11 PrV- Δ UL41

Die klinischen Symptome und ihr Verlauf, die Infektion der Nasenschleimhaut und von Neuronen erster Ordnung waren wie bei PrV- Δ gM. In Neuronen zweiter Ordnung im Pr5, Me5 und Sp5C war 68 hpi PrV-Antigen nachweisbar. Die übrigen Befunde entsprachen den Veränderungen nach Infektion mit PrV- Δ gM.

4.2.12 PrV-ΔUL21

Erste klinische Symptome waren ab dem Tag 3 pi zu beobachten und erreichten in Quantität und Qualität ein dem Wildtyp identisches Niveau. Alle weiteren Befunde entsprachen denen von PrV-ΔgM.

4.2.13 PrV-ΔUS9F

Erste klinische Symptome waren ab dem Tag 3 pi zu beobachten und erreichten ein dem Wildtyp identisches Niveau. Die Infektion von Nasenrachenraum (24 hpi) sowie von Neuronen erster (48 hpi) und zweiter Ordnung (72 hpi) entsprach den Befunden nach Infektion mit PrV-ΔgM. Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Mutanten war 72 hpi eine Infektion von Neuronen des VPM nachweisbar. Weiterhin waren in somatosensorischen Rindenarealen vereinzelte kortikale Neurone infiziert (Abb.17). Im Hirnstamm lagen eine mäßige gemischtzellige Enzephalitis mit fokaler Vermehrung von Gliazellen und eine vorwiegend eitrige Leptomeningitis vor.

4.2.14 PrV-ΔUL16

Erste klinische Symptome waren ab dem Tag 3 pi zu beobachten und verstärkten sich bis zum Tag 4 pi. Die Infektion von Nasenepithelien sowie Neuronen erster und zweiter Ordnung entsprach in ihrem zeitlichen Verlauf der von PrV-ΔUS9F-infizierten Tieren, während PrV-Antigen in thalamischen und kortikalen Neuronen erst nach 81 hpi festzustellen war.

4.2.15 PrV-ΔUL16/UL11

Klinischer Verlauf, Kinetik der Infektion sowie histopathologische Befunde waren wie bei PrV-ΔUL16.

4.2.16 PrV-Bartha

Erste klinische Symptome waren ab dem Tag 3 pi zu beobachten. Nach anfänglicher leichter Apathie kamen im Laufe des 4. dpi pumpende Atmung, Schreckhaftigkeit, Kauern mit gekrümmtem Rücken und Teilnahmslosigkeit hinzu. Hinweise auf Pruritus waren nur in sehr beschränktem Maße festzustellen. UL19-Antigen war ab 24 hpi in Epithelzellen des Nasenrachenraumes und der serösen Nasendrüsen nachweisbar, wobei die Zahl infizierter Zellen bis zum Zeitpunkt schwerster klinischer Symptome nicht wesentlich zunahm. Die Infektion von Neuronen erster und zweiter Ordnung wurde nach 48 hpi bzw. 72 hpi festgestellt. Eine ausgeprägte Infektion der Kerngebiete Pr5, Me5 und Sp5C war jedoch erst nach 96 hpi nachweisbar. Zum Zeitpunkt der Euthanasie war eine Infektion von Neuronen des VPM und einer Vielzahl von Pyramidenzellen des SC nachweisbar. Im TG lag eine hochgradige Ganglioneuritis vor, in den Meningen und im Hirnstamm fanden sich perivaskuläre Ansammlungen von Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten (Abb.16).

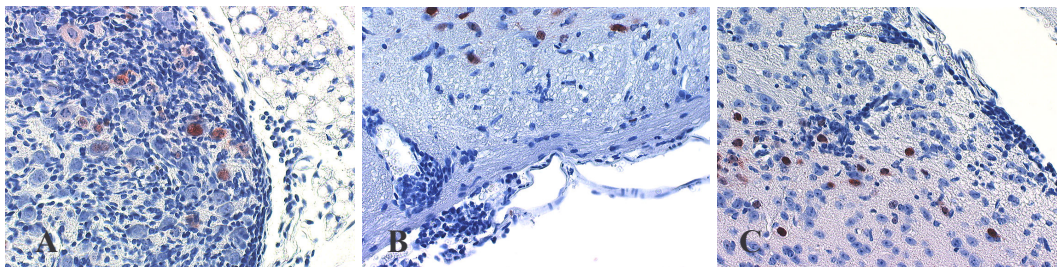


Abb.16. Immunhistologie zum Nachweis von PrV-UL19-Antigen in Mäusen 100 h nach Infektion mit PrV-Bartha. (A) GCC. Ganglioneuritis mit infizierten Ganglienzellen und mäßiger Infiltration mit Lymphozyten. (B) Medulla oblongata (Bregma -7,00); Infektion des NF mit perivaskulärer und meningealer, vorwiegend lymphozytärer Infiltration. (C) Medulla oblongata; Infektion des NTS mit fokaler Gliose und gemischtzelliger Enzephalitis (x 50).

4.2.17 PrV-ΔUL11/gE

Erste klinische Symptome waren ab dem Tag 4 pi zu beobachten. Wie bei PrV-Bartha kamen nach anfänglicher leichter Apathie am Tag 4 pi und im Laufe des 5. Tages pi pumpende Atmung, Schreckhaftigkeit, Kauern mit gekrümmtem Rücken und Teilnahmslosigkeit hinzu. Die Tiere zeigten nur wenig Hinweise auf Pruritus

und dementsprechend keine Automutilation. Zu späteren Zeitpunkten war ein Rückgang der Anzahl immunhistologisch positiver Epithelzellen festzustellen. Eine Infektion einzelner Neuronen erster Ordnung und perineuronaler Mantelzellen im TG war ab 72 hpi, die von Neuronen zweiter Ordnung im Pr5, Me5 und Sp5C erstmals ab 96 hpi, in ausgeprägter Form jedoch erst nach 117 hpi festzustellen. Nach Einsetzen schwerer klinischer Symptome waren Neurone des ventralen Thalamus und vereinzelt Pyramidenzellen des somatosensorischen Kortex infiziert. Histopathologisch zeigten Neurone des Sp5C intranukleäre Einschußkörperchen und Neuronendegenerationen. Weiterhin fanden sich eine hochgradige Ganglioneuritis im TG sowie eine hochgradige Hirnstammenzephalitis.

4.2.18 PrV-ΔUL11/US9K

Das zeitliche Auftreten und das Ausmaß der klinischen Symptome waren wie nach Infektion mit PrV-ΔUL11/gE. UL19-Antigen war in wenigen Herden in den Epithelien des Nasenrachenraumes und in den serösen Nasendrüsen ab 24 hpi nachweisbar. Zu den weiteren Zeitpunkten war auch in den mit PrV-ΔUL11/US9K infizierten Tieren ein Rückgang der Zahl infizierter Epithelzellen festzustellen. Einzelne Neurone erster Ordnung und Mantelzellen des TG waren ab 72 hpi und Neurone zweiter Ordnung erstmals 96 hpi infiziert (Abb.17C,D). Eine Infektion zahlreicher Neuronen war in diesen Kerngebieten 122 hpi nachweisbar (Abb.17G, H). Zum Zeitpunkt der Euthanasie war eine Infektion von Neuronen des ventralen Thalamus und von Pyramidenzellen des somatosensorischen Kortex nachweisbar (Abb.17K,L). Die histopathologischen Befunde wiesen keine Unterschiede zu PrV-ΔUL11/gE infizierten Tieren auf.

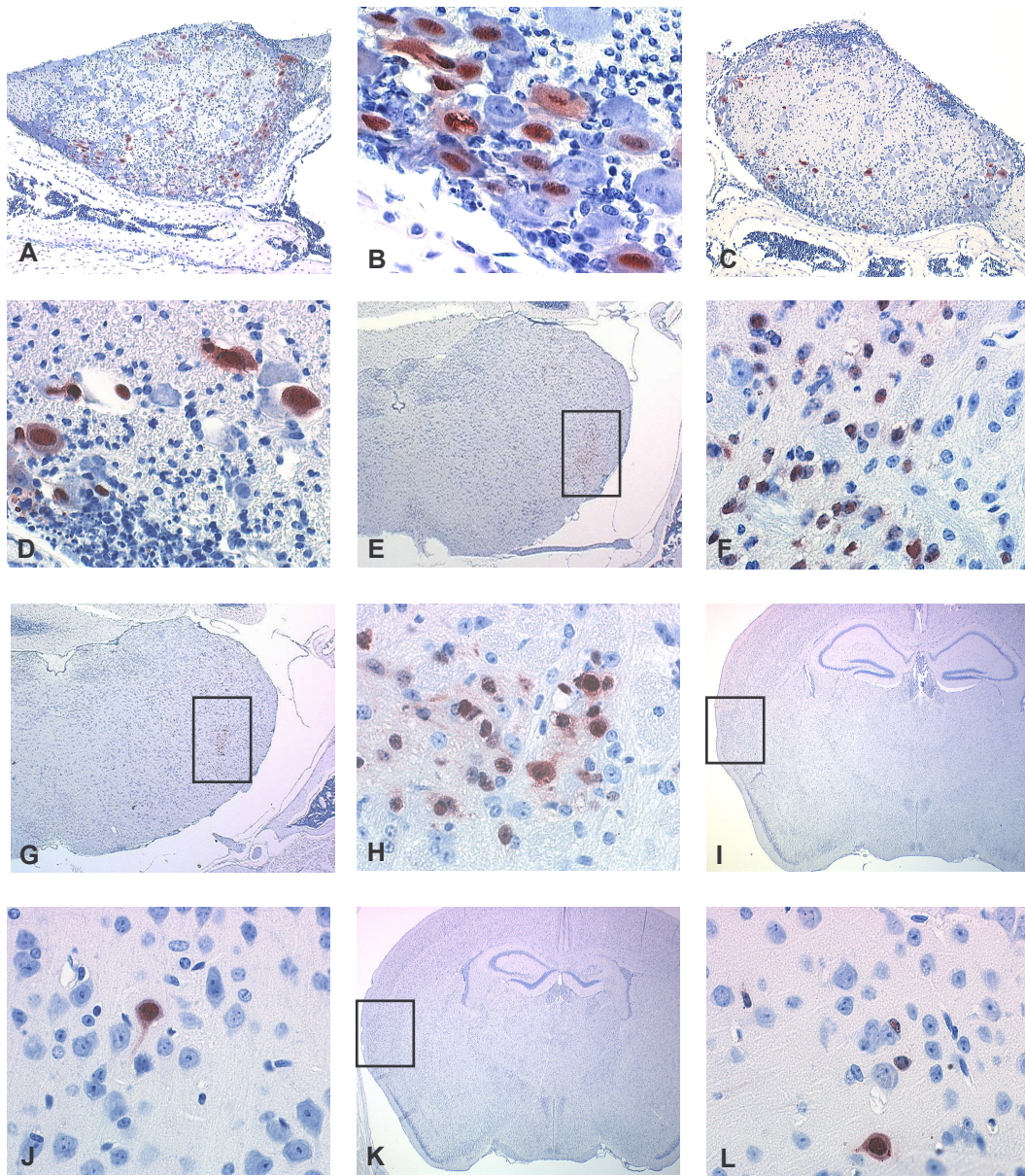


Abb.17. Immunhistologie zum Nachweis von PrV-UL19-Antigen nach Infektion mit PrV- Δ US9F und PrV- Δ UL11/ Δ US9K. **(A)** TG; PrV- Δ US9F-infizierte Ganglienzellen (x 20). **(B)** Ausschnitt aus (A). Infizierte Neurone erster Ordnung mit kräftiger intranukleärer Färbung, perineuronale Zellen nichtinfiziert (x 60). **(C)** TG; PrV- Δ UL11F/ Δ US9K. Ganglioneuritis mit gemischtzelliger Infiltration in der Peripherie des Ganglions (x 20). **(D)** Ausschnitt aus (C). Degenerierte neutrophile Granulozyten, Histiozyten und wenige Lymphozyten um infizierte Ganglienzellen (x 60). **(E)** Medulla oblongata (Bregma -6.96); PrV- Δ US9F (x 20). **(F)** Vergrößerung des Rechteckes in (E). Infizierte Neurone zweiter Ordnung mit intranukleärem Signal sowie Neurodegeneration mit Zytoplasmavakuolen und pyknotischen Kernen (x 60). **(G)** Medulla oblongata (Bregma -7.46); PrV- Δ UL11F/ Δ US9K (x 20). **(H)** Vergrößerung des Rechteckes in (G). Infektion des Sp5C (x 60). **(I)** Großhirn (Bregma -1.46); PrV- Δ US9F. SC (Rechteck) (x 5). **(J)** Vergrößerung des Rechteckes in (I) Infiziertes Neuron des SC (x 60). **(K)** Großhirn (Bregma -1.3); PrV- Δ UL11F/ Δ US9K (x 5). **(L)** Vergrößerung des Rechteckes in (K). Infizierte kortikale Neurone und perineuronale Gliazellen (x 60).

4.2.19 PrV- Δ UL48

Klinisches Bild, Infektion der Nasenschleimhaut, von Neuronen erster und zweiter Ordnung und die histopathologischen Befunde entsprachen PrV- Δ UL11/gE und PrV- Δ UL11/gE. Wenig PrV-Antigen war in einzelnen Neuronen des ventralen Thalamus festzustellen.

4.2.20 PrV- Δ UL16/UL21

Die infizierten Tiere zeigten geringgradige Apathie am Tag 4 pi, zu der am Tag 5 pi Kauern, pumpende Atmung und hochgradige Depression sowie Anorexie hinzukamen. Vereinzelte UL19-Antigen positive Herde im respiratorischen und olfaktorischen Epithel des Nasenrachenraumes waren bis Tag 4 pi nachweisbar. Einzelne Neurone erster Ordnung im TG waren ab 72 hpi und Neurone zweiter Ordnung im Pr5, Me5 und Sp5C erstmals 96 hpi infiziert. Die Anzahl infizierter Neurone zweiter Ordnung nahm bis 131 hpi nicht weiter zu. Zu diesem Zeitpunkt fand sich eine ausgeprägte Enzephalitis im Gebiet des Sp5C (Abb.18A). In GCC, GPP, NF und retikulären Kerngebieten war von unterschiedlichen Zeitpunkten an eine geringgradige Infektion von Neuronen nachweisbar. Eine Infektion von n Neuronen des VPM war ab 96 hpi zu beobachten. Eine Vielzahl kortikaler Neurone war ab 120 hpi immunhistologisch positiv für UL19-Antigen (Abb.18B,C). Histopathologisch lag eine lympho-plasmazelluläre Meningoenzephalitis mit Neutrophilenbeteiligung vor. Zahlreiche degenerierende Ganglienzellen und Neurone des Hirnstammes wiesen intranukleäre Einschlusskörperchen auf. Im TG war eine geringgradige Ganglioneuritis nachweisbar.

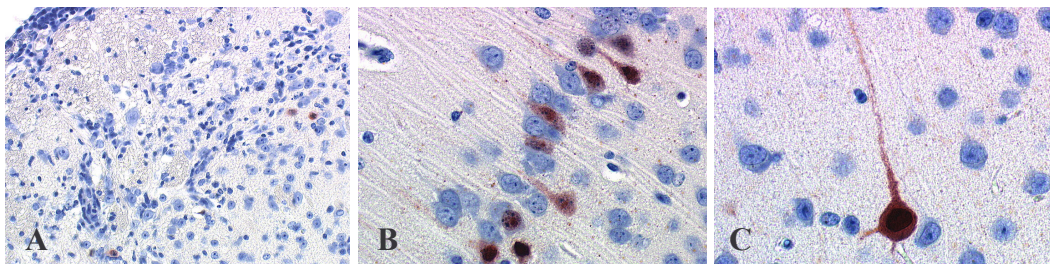


Abb.18. Immunhistologie zum Nachweis von PrV-UL19-Antigen in Mäusen 131 h nach Infektion mit PrV- Δ UL16/UL21. **(A)** Sp5C; Enzephalitis mit wenigen infizierten Neuronen, fokaler diffuser Gliose und ausgeprägter Meningitis (x 40). **(B)** Telenzephalon (Bregma 60); infizierte Neuronen des CA1. **(C)** Telenzephalon; Infektion eines Neurons des SC (x 60).

4.2.21 PrV-ΔUL16/UL21/UL11

Klinischer Verlauf, Zeitpunkte des Auftretens, Lokalisation der Infektion von Neuronen und die histopathologischen Befunde waren identisch mit den von PrV-ΔUL16/UL21 beschriebenen Ergebnissen.

4.2.22 PrV-ΔUL17, PrV-ΔUL11/gM und PrV-ΔUL31

Innerhalb eines Untersuchungszeitraumes von 14 Tagen zeigte keines der mit diesen PrV-Mutanten inokulierten Tiere klinische Symptome einer PrV-Infektion. Alle Tiere überlebten, UL19-Antigen war in einer geringen Zahl von Epithelzellen der respiratorischen Nasenschleimhaut bei den drei Mutanten am Tag 1 pi nachweisbar. Später waren infizierte Zellen im Nasenrachenraum zu finden. Nie war eine Infektion des Nervensystems oder sonstiger Organe zu beobachten. Histopathologische Veränderungen lagen nicht vor.

4.2.23 PrV-ΔUL34

PrV-ΔUL34 infizierte Mäuse wurden nach einem Beobachtungszeitraum von 14 Tagen getötet. Innerhalb dieser Zeit zeigten sie keine klinischen Symptome. Nur in einer von 15 Mäusen war UL19-Antigen am Tag 1 pi in einer äußerst geringen Anzahl von Epithelzellen der respiratorischen Nasenschleimhaut zu finden (Abb.19). Zu keinem Zeitpunkt war Virusantigen im Nervensystem sowie den übrigen Geweben, die histopathologisch ohne besonderen Befund waren, nachweisbar.

4.2.24 PrV-ΔUL37

Ähnlich wie bei PrV-ΔUL34 führte auch eine Infektion mit PrV-ΔUL37 bei keinem Tier innerhalb von 14 Tagen pi zu klinischen Symptomen. Nur zwischen Tag 1 und 3 pi war UL19-Antigen in einer geringen Anzahl von Epithelzellen der respiratorischen Nasenschleimhaut nachweisbar (Abb.20A). Zu einer weitergehenden Ausbreitung des PrV in das Nervensystem oder die übrigen

Organe kam es nicht. Histopathologisch waren keine Läsionen nachweisbar (Abb.20B,C).

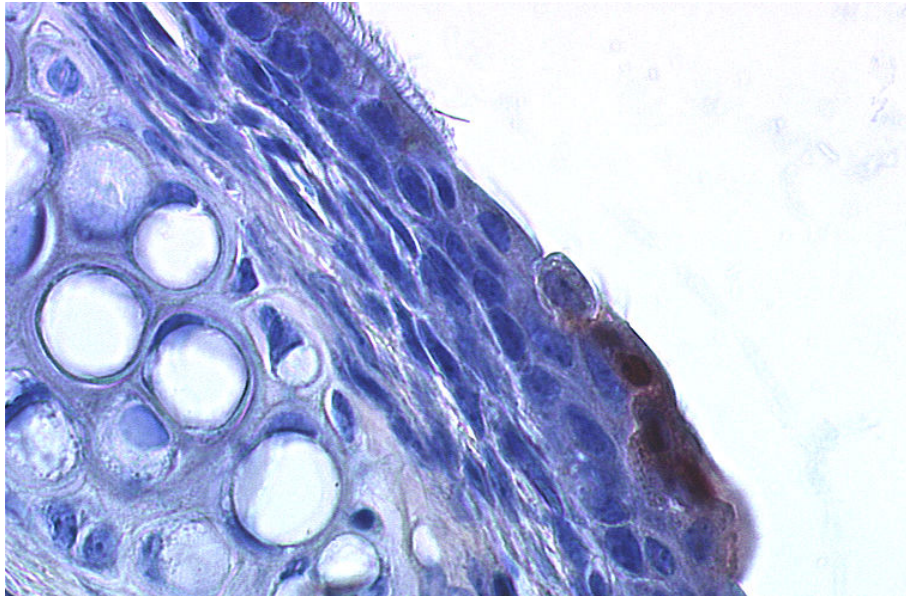


Abb.19. Infektion der kutanen Nasenschleimhaut 24 h nach Inokulation von PrV-ΔUL34. Wenige infizierte Epithelzellen mit intranukleärem Signal im Bereich des Übergangs der kutanen zu respiratorischer Schleimhaut (x 80).

4.2.25 Rescuemutanten

Die Reinsertion der deletierten Gene stellte bei allen untersuchten Mutanten in Bezug auf Überlebenszeiten, klinische Symptome und die Kinetik der viralen Ausbreitung im ZNS sowie das histopathologische Bild wieder einen wildtypgleichen Phänotyp her.

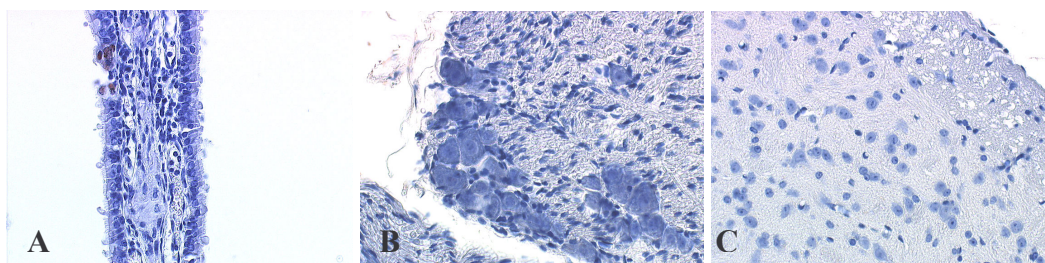


Abb.20. Immunhistologie zum Nachweis von PrV-UL19-Antigen. (A) Nase, Infektion mit PrV-ΔUL37. Schwache Infektion einzelner respiratorischer Epithelzellen zwischen Tag 1 und 3 pi. Keine Infektion von Ganglienzellen des TG (B) und Neuronen des Sp5C (C) (x 40).

Tab.2 Fortsetzung. Zusammenfassende Darstellung von mittleren Überlebenszeiten, klinischen Symptomen und Virusantigennachweis auf den aufeinanderfolgenden neuronalen Ebenen. Standardabweichungen der Überlebenszeiten sind in den Klammern angegeben.

Virus	Pr V-AUL41	Pr V-AUL21	Pr V-AUS9F	Pr V-AUL16	Pr V-AUL16/ UL11	Pr V-Bartha	Pr V- AUL11/gE	Pr V-AUL11/ US9K
Überlebenszeit (h)	68 (2,11)	71 (2,5)	72 (2,3)	81 (2,9)	83 (2,2)	100 (3,3)	117 (2,3)	122 (3,5)
<u>Klinische Symptome</u>								
1 dpi	0	0	0	0	0	0	0	0
2 dpi	+	0	0	0	0	0	0	0
3 dpi	+++	+++	+++	++	+	0	0	0
4 dpi	†	†	†	+++	+++	+	+	+
5 dpi	†	†	†	†	†	+++	+++	+++
<u>Immunhistologie</u>								
Nasenhöhle (dpi)	1	1	1	1	1	1	1	1
Neurone 1. Ordnung (dpi)	2	2	2	2	2	3	3	3
Neurone 2. Ordnung (dpi)	3	3	3	3	3	4	4	4
Neurone, kortikal (dpi)	-	-	3	4	4	5	5	5

Tab.2 Fortsetzung. Zusammenfassende Darstellung von mittleren Überlebenszeiten, klinischen Symptomen und Virusantigennachweis auf den aufeinanderfolgenden neuronalen Ebenen. Standardabweichungen der Überlebenszeiten sind in den Klammern angegeben.

Virus	PrV-AUL48	PrV-AUL16/ UL21	PrV-AUL11/ UL16/UL21	PrV- AUL11/gM	PrV-AUL17	PrV-AUL31	PrV-AUL34	PrV-AUL37
Überlebenszeit (h)	126 (3,3)	1 (3,8)	137 (5,6)	> 336	> 336	> 336	> 336	> 336
<u>Klinische Symptome</u>								
1 dpi	0	0	0	0	0	0	0	0
2 dpi	0	0	0	0	0	0	0	0
3 dpi	0	0	0	0	0	0	0	0
4 dpi	+	+	+	0	0	0	0	0
5 dpi	+++	+++	+++	0	0	0	0	0
<u>Immunhistologie</u>								
Nasenhöhle (dpi)	1	1	1	1	1	1	1	1
Neurone 1. Ordnung (dpi)	3	3	3	-	-	-	-	-
Neurone 2. Ordnung (dpi)	4	(4)	(4)	-	-	-	-	-
Neurone, kortikal (dpi)	(5)	5	5	-	-	-	-	-

□

4.3 Darstellung PrV-infizierter Zellen mittels nicht-radioaktiver In-situ-Hybridisierung

Zur Überprüfung der Spezifität des anti-PrV-UL19-Antiserums wurde eine In-situ-Hybridisierung etabliert. Neurone und Ganglienzellen infizierter Tiere zeigten ein kräftiges, zur Immunhistologie gegen UL19-Antigen korrespondierendes intranukleäres Signal. Zusätzlicher Nachweis von NeuN oder GFAP führte zu einer Doppelmarkierung von Neuronen und Ganglienzellen, während Astrozyten nur selten infiziert waren (Abb.21).

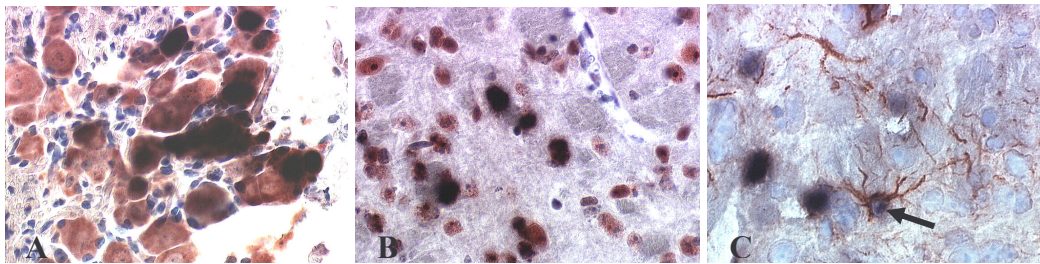


Abb.21. In-situ-Hybridisierung gegen UL19. PrV-Ka, 49 hpi. (A+B) Doppelmarkierung ISH (schwarz) und anti-NeuN-Immunhistologie (rotbraun). Ganglienzellen im TG (A) und Neurone im Sp5C (B) mit Kolo-kalisation beider Signale. (C) Sp5C. Doppelmarkierung ISH und anti-GFAP-Immunhistologie. Wenige Astrozyten mit intranukleärem PRV-UL19 (Pfeil) (x 60).

4.4 Nachweis aktivierter Caspase 3

Mittels Immunhistologie gegen aktivierte Caspase 3 konnte bei allen beschriebenen neuroinvasiven PrV-Mutanten in infizierten Ganglien und zentralnervösen Kerngebieten ein apoptotischer Untergang von Gliazellen und infiltrierenden Leukozyten nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigten degenerierende Neurone mit diesem Antikörper kein positives Signal (Abb.22).

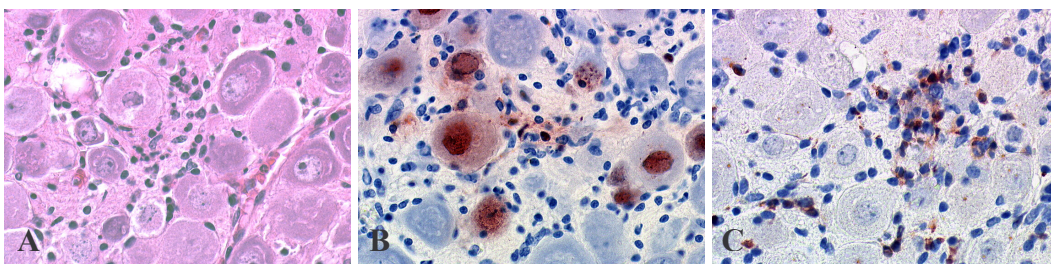


Abb.22. Konsekutivschnitte des Trigeminalganglions 49 h nach Infektion mit PrV-Ka. (A) Fokale Ansammlung von Gliazellen, HE. (B) Infizierte Ganglien- und perineuronale Gliazellen, anti-PrV-UL19. (C) Apoptotische Gliazellen, anti-aktive Caspase 3 (x 60).

4.5 Untersuchung des intraaxonalen Transports von PrV

Zur Untersuchung des intraaxonalen Transports von EGFP-markierten PrV-Kapsiden wurde eine primäre trigeminale Zellkultur etabliert. Trigeminalganglien 2-3 Tage alter CD1-Mäuse wurden präpariert, mit Kollagenase angedaut und auf Deckgläschen kultiviert. Ganglienzellen waren in Kultur als große Zellen mit großen runden Zellkernen, mäßig viel Zytoplasma und einem bis zwei langen Axonen von den spindelförmigen Mantelzellen und Fibroblasten mit kleinen runden bis elongierten Zellkernen gut zu unterscheiden (Abb.23A,24A). Immunfluoreszenztests mit Antikörpern gegen GFAP und NFP bestätigten die morphologische Identifikation (Abb.23B,C).

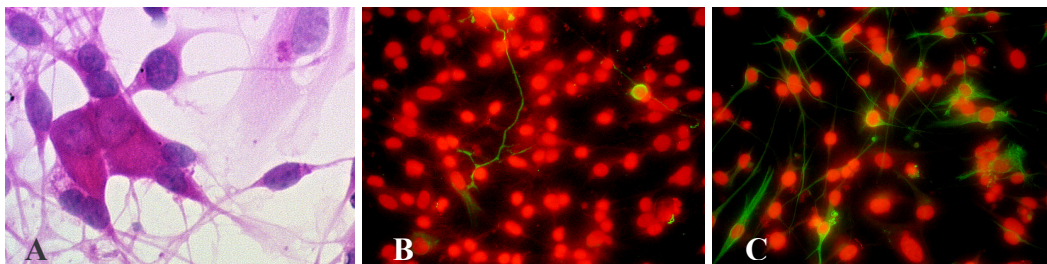


Abb.23. Charakterisierung primärer trigeminaler Zellkultur. **(A)** Ganglienzellen mit großen runden Zellkernen, viel kräftig eosinophilem Zytoplasma und 1-2 axonalen Fortsätzen, perineuronale Mantelzellen, HE. (x 60). **(B)** Verzweigtes Axon mit Grünfluoreszenz (FITC), anti-NFP-Antikörper. **(C)** Perineuronale Mantelzellen mit intrazytoplasmatischer fibrillärer Grünfluoreszenz, anti-GFAP-Antikörper (x 40).

Nach Infektion der Zellkultur mit EGFP-markierten PrV-Virionen konnte bereits wenige Stunden pi in Ganglienzellen und nichtneuronalen Zellen eine intranukleäre EGFP-Fluoreszenz nachgewiesen werden. Durch die Fusion von EGFP mit dem Kapsidprotein UL35 blieb das Signal während des intrazellulären Transports mit dem Kapsid assoziiert. Nach Eintritt in Axone konnten einzelne Kapside als kleine uniforme fluoreszierende Punkte beobachtet werden. Obwohl Kapside kleiner als die maximale Auflösung von Lichtmikroskopen sind, erschienen sie durch ballonierende Diffraktion (Smith et al. 2001) der EGFP-Emission größer (Abb.24B).

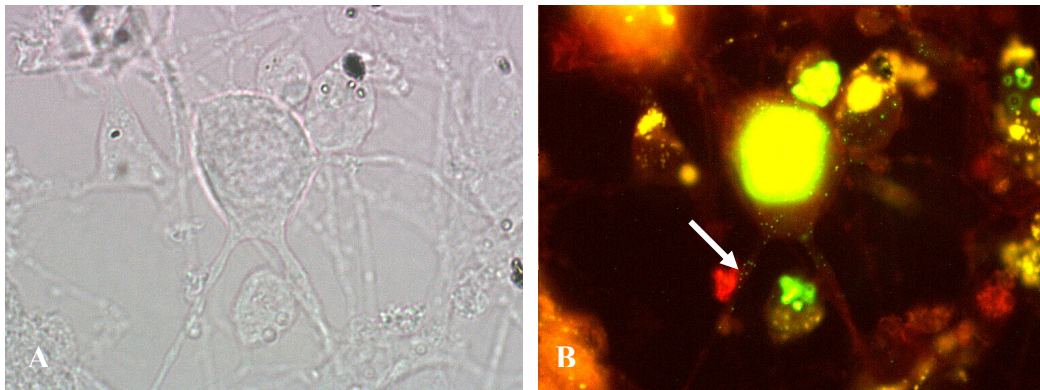


Abb.24. Nachweis intraaxonaler EGFP-markierter Kapside 11 h nach Infektion mit PrV-Ka/EGFP. **(A)** Pseudounipolare Ganglienzelle mit großem runden Zellkern und zwei axonalen Fortsätzen, formalinfixiert. **(B)** Ganglienzelle aus (A). Ausgeprägte intranukleäre Fluoreszenz und einzelne fluoreszierende intraaxonale Kapside (Pfeil) (x 60).

4.5.1 Geschwindigkeitsmessungen des intraaxonalen Transports EGFP-markierter Kapside

Die Geschwindigkeit des intraaxonalen Transports EGFP-markierter Kapside wurde in primärer trigeminaler Zellkultur mittels Zeitrafferaufnahmen am konfokalen Laser Scan Mikroskop gemessen (Tab. 3). Für die Aufnahmen wurden nur solche Axone ausgewählt, denen eindeutig ein freiliegendes Perikaryon zuzuordnen war. Somit konnte ein anterograder Transport als Bewegung des Kapsids zentrifugal vom Perikaryon und ein retrograder Transport als Bewegung zentripetal zum Perikaryon definiert werden. Zur Bestimmung der durchschnittlichen Geschwindigkeiten wurden in fünf unterschiedlichen Axonen von jeweils 15 anterograden und retrograden, kontinuierlichen Bewegungen über Strecken $>1,5 \mu\text{m}$ der Durchschnitt ihrer Geschwindigkeiten und der zurückgelegten Strecken bestimmt. Die Nettostrecken wurden als Summe aus den durchschnittlichen anterograden, kontinuierlich zurückgelegten Strecken minus den durchschnittlichen retrograden, kontinuierlich zurückgelegten Strecken berechnet.

Tab.3. Übersicht über die durchschnittlichen Geschwindigkeiten, zurückgelegten Strecken und Nettostrecken von EGFP-markierten Kapsiden in Axonen primärer trigeminaler Zellkultur (Standardabweichungen in Klammern)

Virus	PrV-Ka	PrV-ΔUL11	PrV-ΔUS9F	PrV-ΔUL48	PrV-ΔUL37
<u>Eintritt in Axon (hpi)</u>	8	9	9	16	(20)
<u>Geschwindigkeit (μm/s)</u>					
anterograd	1,02 (0,24)	1,00 (0,13)	1,08 (0,21)	0,83 (0,23)	0
retrograd	0,78 (0,19)	0,73 (0,18)	0,67 (0,09)	0,61 (0,19)	0
<u>Strecke (μm)</u>					
anterograd	2,82 (1,1)	4,15 (2,6)	2,24 (0,75)	3,14 (0,9)	0
retrograd	2,41 (0,64)	2,84 (1,74)	2,01 (0,78)	2,34 (1,2)	0
<u>Nettostrecke (μm)</u>					
anterograd	0,41	1,31	0,23	0,8	0

4.5.2 PrV-Kaplan

Nach Infektion der primären trigeminalen Neuronenkultur mit 10^4 pfu war in drei Experimenten nach 4-6 hpi eine erste intranukleäre EGFP-Fluoreszenz reproduzierbar festzustellen. Der Eintritt in das Axon und der schnelle axonale Transport von EGFP-markierten Kapsiden waren zwischen 9 und 12 hpi zu beobachten. Nach 12 hpi waren in der Mehrzahl der Axone nur noch stillstehende Kapside zu finden. Für PrV-Ka-infizierte Neurone ergab sich eine durchschnittliche anterograde Geschwindigkeit von 1,02 μm/s (Abb. 25 A-C [1]) und eine retrograde Geschwindigkeit von 0,78 μm/s bei einer insgesamt in anterograder Richtung zurückgelegten Strecke von 0,41 μm (Abb. 25A-C [2,3]). Die einzelnen Messwerte sind in Tabelle 3 aufgeführt. Der Transport erfolgte nicht kontinuierlich und war von unterschiedlich langen Phasen des Stillstandes unterbrochen (Abb. 25 A-C [4]), die mit zunehmender Zeit pi in ihrer Dauer zunahmen. Die Kapside bewegten sich einzeln oder in kleinen Gruppen, häufig zu zweit. Ihre Bewegungen waren bidirektional, wobei in der Mehrzahl einzelne

Bewegungsphasen in einer bzw. in die gegensätzliche Richtung durch Pausen im Bereich von Millisekunden bis Minuten getrennt waren. In Einzelfällen war jedoch auch ein unmittelbarer Richtungswechsel möglich, bei dem in der maximalen zeitlichen Auflösung von einem Bild pro 0,1 s keine Pause nachzuweisen war.

4.5.3 PrV-ΔUL11

Nach Infektion mit PrV-ΔUL11 waren intraaxonale Transportvorgänge zwischen 9 und 13 hpi zu beobachten. Nach 13 hpi zeigte die Mehrzahl der intraaxonalen Kapside keine bidirektionalen Bewegungen mehr. Anterograder Transport erfolgte mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von 1,00 und retrograder Transport mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von 0,73 $\mu\text{m/s}$. Die durchschnittlich in anterograder Richtung zurückgelegte Nettostrecke betrug 1,31 μm . Die einzelnen Messwerte sind aus Tabelle 3 ersichtlich. Der Transport war bidirektional und zeigte, wie auch bei PrV-Ka, zwischen den einzelnen Bewegungsphasen unterschiedlich lange Pausen oder einen unmittelbaren Richtungswechsel der Kapside.

4.5.4 PrV-ΔUS9F

Mit PrV-ΔUS9F infizierte Neuronen zeigten zwischen 9 und 13 hpi maximale axonale Transportaktivität. Später als 13 hpi war eine zunehmende Anzahl stillstehender intraaxonaler Kapside zu beobachten. Die durchschnittlichen Geschwindigkeiten lagen bei 1,08 $\mu\text{m/s}$ in anterograder Richtung und bei 0,67 $\mu\text{m/s}$ in retrograder Richtung. Die durchschnittlich in anterograder Richtung zurückgelegte Nettostrecke betrug 0,23 μm . Die einzelnen Messwerte gehen aus Tabelle 3 hervor. Der Transport der Kapside erfolgte bidirektional und zeigte zwischen anterograden und retrograden Bewegungen Richtungswechsel mit und ohne Pausen.

4.5.5 PrV-ΔUL48

Nach Infektion mit PrV-ΔUL48 war eine intranukleäre EGFP-Fluoreszenz erst nach etwa 12 hpi zu beobachten. Ein Transport von Kapsiden in Axonen war zwischen 16 hpi und 20 hpi nachweisbar. Später kam es nur noch zu vereinzelt Transportbewegungen bei ansonsten stillstehenden Kapsiden. Als durchschnittliche Geschwindigkeiten wurden 0,83 $\mu\text{m/s}$ in anterograder Richtung und 0,61 $\mu\text{m/s}$ in retrograder Richtung bestimmt (Fig. 4.4 A-C-F [1,2,3]). Die dabei durchschnittlich zurückgelegte Nettostrecke belief sich auf 0,8 μm . Zwischen einzelnen Bewegungsphasen des bidirektionalen Transports mit und ohne Richtungswechsel waren unterschiedlich lange Pausen zu beobachten. Vereinzelt waren auch Richtungswechsel ohne Pausen möglich.

4.5.6 PrV-ΔUL37

Etwa 14 h nach Infektion mit PrV-ΔUL37 waren EGFP-markierte intranukleäre Kapside in einzelnen Neuronen zu finden, die ab 24 hpi in ca. 90 % der Zellen vorhanden waren. In mehr als 100 untersuchten infizierten Neuronen konnten zu keinem Zeitpunkt ein intraaxonaler Transport und intraaxonale Kapside nachgewiesen werden. Lediglich in zwei Zellfortsätzen, denen jedoch kein freiliegender Zellkörper zuzuordnen war, fanden sich 20 hpi wenige stillstehende intraaxonale Kapside (Abb. 25 D-F [1,2]).

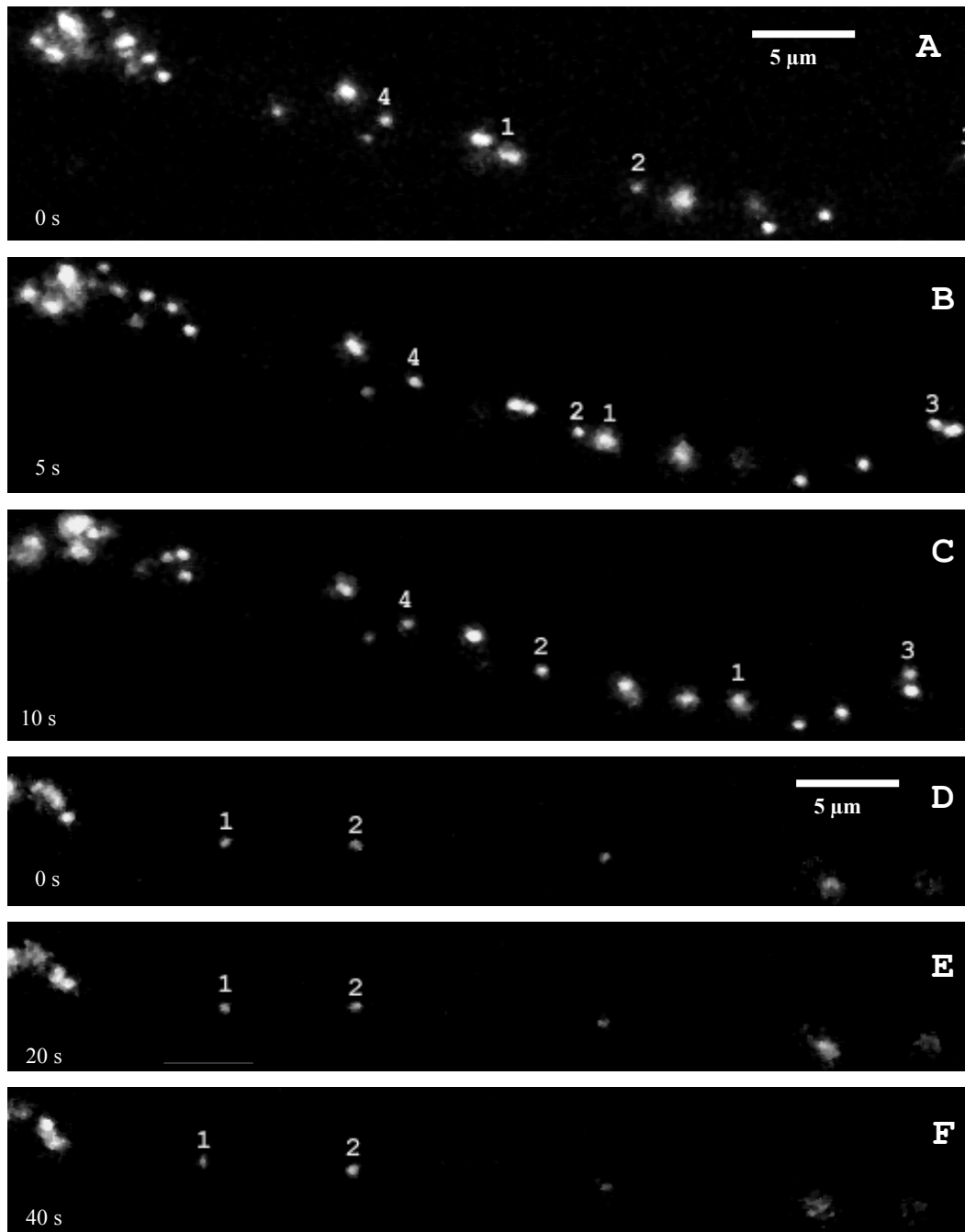


Abb.25. (A-C) Zeitrafferaufnahmen von Axonen PrV-Ka-infizierter trigeminaler Ganglienzellen. Es wurden 16 hpi 2,5 Bilder/s aufgenommen. Zeitpunkt 0, 5 und 10 s werden gezeigt. Das Perikaryon befindet sich links außerhalb des Bildbereiches. Mehrere nummerierte EGFP-Kapside sind sichtbar, die sich in anterograder (Nr.1) und retrograder (2,3) Richtung bewegen oder stillstehen (4). (D-F) In PrV-ΔUL37-infizierten Ganglienzellen finden sich 20 hpi nur in sehr wenigen Axonen EGFP-markierte Kapside, die sich nicht bewegen.

5 DISKUSSION

In-vitro-Untersuchungen zur Funktion von glykosilierten und nichtglykosilierten Membranproteinen und Tegumentproteinen haben gezeigt, dass eine Reihe dieser Proteine die Virusmorphogenese und -replikation in Zellkultur beeinflussen. Im Mausmodell sollte untersucht werden, ob diese Gene auch *in vivo* Einfluss auf die Virulenzeigenschaften des PrV besitzen bzw. ob weitere, *in vitro* nichtessentielle Proteine möglicherweise modulierend auf Neuroinvasion bzw. Neurovirulenz in der Maus wirken. Ausgewählte, in der Neuroinvasion eingeschränkte Virusmutanten sollten anschließend in der primären neuronalen Zellkultur auf ihre Infektiosität bzw. ihren intraaxonalen Transport untersucht werden.

PrV-ΔUS9F und PrV-ΔUL11/US9K zeigen eine verzögerte transsynaptische Ausbreitung im trigeminalen System. Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen haben zu der Hypothese geführt, dass die virale Replikation in Neuronen zwar ähnlich der in unpolarisierten Zellen ist, der Prozess der sekundären Umhüllung jedoch Unterschiede aufweist (Enquist et al. 1998, Miranda-Saksena et al. 2002, Tomishima und Enquist 2002). Während in nichtneuronalen Zellen Kapside nach dem Durchtritt durch die Kernmembran nur über eine kurze Distanz zum trans-Golgi-Netzwerk (TGN) transportiert werden (Mettenleiter 2002b), findet die endgültige Umhüllung in Neuronen hauptsächlich an den Axonenden statt, obwohl eine sekundäre Umhüllung entlang des Axons ebenfalls möglich ist (Penfold et al. 1994, Tomishima und Enquist 2002). Für das US9-Protein, welches ein Bestandteil der viralen Hülle ist, wurde eine essentielle Bedeutung für den anterograden axonalen Transport von Glykoproteinen *in vitro* (Tomishima und Enquist 2001) und im visuellen System der Ratte nachgewiesen (Brideau et al. 2000b, 2000c). Neben seinem Einfluss auf den intraaxonalen Transport von glykoproteinbeladenen Vesikeln sprechen die morphologischen Eigenschaften des US9-Proteins, eines Typ-II-Membranproteins, dafür, dass es eine mögliche Verbindung zwischen Virushülle und tegumentierten Kapsiden

darstellt (Brideau et al. 1998). Eine ähnliche Funktion ist bereits für das Genprodukt des UL11, ein membranaffines Tegumentprotein, nachgewiesen worden (Kopp et al. 2003). Durch seine Membranaffinität ist es möglicherweise wichtig für tegumentierte Kapside, um mit den Glykoproteinen der TGN-Membranen in Kontakt zu treten bzw. zu bleiben. Sowohl in der Zellkultur als auch in der Maus zeigte die UL11-Deletionsmutante eine nur mäßige Attenuierung im Vergleich mit dem Wildtyp. So scheinen andere Proteine, wie eventuell das US9-Protein, die Membranaffinität und Verbindungsfunktion von UL11 während der sekundären Umhüllung übernehmen zu können. Zur Klärung möglicher redundanter Funktionen oder Interaktionen zwischen den UL11- und US9-Genprodukten wurden deshalb Deletionsmutanten in US9 sowie in UL11 und US9 konstruiert und charakterisiert.

In Übereinstimmung mit bisherigen Berichten (Brideau et al. 2000a) war PrV- Δ US9F in seinen In-vitro-Wachstumseigenschaften nicht vom Wildtypvirus zu unterscheiden. Im Gegensatz dazu führte die intranasale Infektion von Mäusen mit PrV- Δ US9 zu verlängerten Überlebenszeiten, die mit denen von PrV- Δ UL11 vergleichbar waren. Immunhistologisch war bei PrV- Δ US9-inokulierten Tieren eine Infektion der Neurone erster Ordnung im TG und von Neuronen zweiter Ordnung im Sp5C zu beobachten. Die direkte Ausbreitung von Virionen zwischen Neuronen des TG und des Sp5 im afferenten trigeminalen System erfolgt anterograd und transsynaptisch, da hierbei ein Sprung von der präsynaptischen Membran der Axonenenden der Ganglienzellen auf die postsynaptischen Membranen von Hirnstammneuronen des Sp5 stattfindet (Shankland 2001). Dies ist ein überraschender Befund, da gezeigt werden konnte, dass US9 für eine anterograde Ausbreitung im Rattenmodell essentiell ist (Brideau et al. 2000a, 2000b). Eine mögliche Erklärung hierfür wäre eine indirekte retrograde Ausbreitung zwischen TG und Sp5. Diese Möglichkeit kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, da das Sp5 mit motorischen Kerngebieten des *N. facialis*, des *N. glossopharyngeus* und des *N. vagus* verschaltet ist. In motorischen, efferenten Systemen ist eine transsynaptische Ausbreitung von der Peripherie ins

ZNS als retrograd anzusehen, da hierbei ein Sprung von der postsynaptischen zur präsynaptischen Membran stattfindet. Ein Erreichen des Sp5C auf retrogradem Wege über die motorischen und parasymphatischen Fasern des NV und des NG unter Umgehung der direkten Verbindung zwischen TG und Sp5 konnte ausgeschlossen werden, da keine Infektion von Neuronen des NA oder des NPGV nachzuweisen war. Eine retrograde Infektion über den NF ist jedoch denkbar, da im motorischen Kerngebiet des NF eine ausgeprägte PrV-Infektion zu beobachten war. Trotzdem ist die exklusive Infektion des Sp5 über diesen Weg aufgrund der Kinetik der Infektion eher unwahrscheinlich, da PrV den NF und den Sp5 nahezu zeitgleich erreicht. Weiterhin spricht die Geschwindigkeit der Neuroinvasion von PrV-ΔUS9 für die anterograde Ausbreitung, da im Vergleich zum Wildtyp diese Mutante nur unwesentlich später im TG und in Neuronen des Sp5 erscheint. Letztendlich ist das Infektionsmuster im ZNS PrV-ΔUS9-infizierter Tiere, abgesehen von der Infektion der Neurone im Thalamus und dem somatosensorischen Kortex, nahezu identisch mit dem von PrV-Ka. Dies widerspricht einer ausschließlich retrograden Ausbreitung.

Da keine Defekte in der Zell-zu-Zell-Ausbreitung und der viralen Replikation *in vitro* beobachtet werden konnten, bewirkt die Deletion von US9 eine Attenuierung nur *in vivo*. Durch Reinsertion von US9 wurde in der Rescuemutante PrV-ΔUS9FR das Wildtypverhalten wiederhergestellt. Dies bestätigt, dass der beobachtete Phänotyp durch Deletion des US9-Proteins und nicht durch weitere genomische Veränderungen verursacht wurde.

Die simultane Deletion der Genprodukte von UL11 und US9 in PrV-ΔUL11/US9K führte im Vergleich zur Einzelmutante PrV-ΔUL11 zu keinem zusätzlichen Replikationsdefekt in nichtneuronalen Zellkultur. Die Infektion von Mäusen führte hingegen zu Überlebenszeiten, die fast doppelt so lang waren wie die der beiden Einzelmutanten. Wiederum konnte eine verzögerte, transsynaptische Infektion von trigeminalen Neuronen zweiter Ordnung im Sp5 gezeigt werden. Die unterschiedlichen Phänotypen *in vivo* und *in vitro* deuten darauf hin, dass neben US9, auch die Wechselwirkung zwischen US9 und UL11

eine Rolle speziell während der Neuroinvasion spielt. In der primären trigeminalen Zellkultur konnte für beide Proteine keine Einschränkung des intraaxonalen Transports von Kapsiden beobachtet werden, so dass die verlängerten Überlebenszeiten nicht von einem Defekt im intraaxonalen Transport verursacht werden. Weiterhin zeigen die Untersuchungen, dass beide Proteine nicht ausschließlich direkt interagieren, da simultane Deletion einen additiven Effekt auf die Überlebenszeiten hat. Eine ausgeprägte Meningoenzephalitis wurde nur in der Doppeldeletionsmutante gefunden. Aufgrund der Tatsache, dass verschiedene andere Mutanten mit langen Überlebenszeiten ähnliche histopathologische Läsionen zur Folge haben, ist es eher unwahrscheinlich, dass der Schweregrad des Entzündungsgeschehens Ausdruck einer fehlenden UL11-US9-vermittelten antiinflammatorischen Wirkung von PrV ist.

Während die Infektion mit PrV-Ka auf Neurone erster und zweiter Ordnung beschränkt bleibt, breiten sich PrV- Δ US9 und PrV- Δ UL11/US9 stark im ZNS aus und infizieren auch höhere neuronale Ebenen, wie thalamische Kerngebiete und kortikale Neurone. Wie die verlängerten Überlebenszeiten zeigen, ist bei diesen Mutanten ein erhöhtes neuroinvasives Potential offensichtlich nicht mit einer erhöhten Neurovirulenz verbunden. Dies ähnelt dem Phänotyp des Bartha-Stammes. Tirabassi et al. (1998) postulierten, dass die Deletion von gE in PrV für die in Mäusen verminderte Zytopathogenität verantwortlich ist und eine erhöhte Neuroinvasivität zur Folge hat. Im Analogschluß könnte die Deletion von US9 eine der gE-Deletion ähnliche Abschwächung der Zytopathogenität von PrV bewirken. Die verlängerten Überlebenszeiten der Mäuse scheinen hierbei für die intensive Neuroinvasion nicht unmittelbar ausschlaggebend zu sein, da eine Inokulation mit PrV- Δ UL11 bei ähnlichen Überlebenszeiten zu keiner Infektion von thalamischen und kortikalen Neuronen führte. Verantwortlich hierfür scheint vielmehr eine ineffiziente sekundäre Umhüllung zu sein, die bei PrV-Mutanten, denen UL11 fehlt, die Ursache für die reduzierten Virustiter und die eingeschränkte Zell-zu-Zell-Ausbreitung in nichtneuronaler Zellkultur ist. Im Gegensatz dazu zeigen US9-Deletionsmutanten eine effiziente virale

Morphogenese in nichtneuronaler Zellkultur. So sind die verlängerten Überlebenszeiten und die ausgeprägte Infektion von kortikalen Neuronen wahrscheinlich auf eine Kombination des durch die UL11-Deletion verursachten Replikationsdefekts und die US9-bedingte, verringerte Zytopathogenität zu erklären.

Geht man jedoch davon aus, dass US9 essentiell für den intraneuronalen Transport von Glykoproteinen *in vivo* ist, und die Infektion des Sp5 durch PrV- Δ US9 nach oronasaler Infektion direkt, transsynaptisch und anterograd erfolgt, so müsste dies Glykoprotein-unabhängig geschehen. Dies ist unmöglich, da phänotypisch komplementierte PrV-Deletionsmutanten in gB oder gH, d.h. Mutanten, die zwar die Proteine, nicht jedoch die entsprechenden Gene enthielten, unfähig zur Invasion des ZNS nach oronasaler Infektion von Mäusen sind (Babic et al. 1993, Babic et al. 1996b). Mögliche Erklärungen für den beobachteten Phänotyp von US9-Deletionsmutanten wären ein US9-unabhängiger Transport von Glykoprotein-beladenen Vesikeln zu den Axonenenden oder eine sekundäre Umhüllung von Kapsiden direkt im Zellkörper vor dem Eintritt in die Axone, obwohl dies im Gegensatz zu den bisher veröffentlichten Daten steht (Miranda-Saksena et al. 2000). Weiterführende elektronenmikroskopische Untersuchungen sind erforderlich, um nähere Informationen über die Morphologie der axonal transportierten US9-negativen Viren zu erhalten.

Es bleibt offen, worin die im Vergleich zur Literatur beobachteten Differenzen in Bezug auf die anterograde Ausbreitungsfähigkeit von US9-deletierten Mutanten zu erklären sind. Eine mögliche Ursache könnten Unterschiede des Infektionsmodus und des betrachteten neuronalen Systems sein. Die bisher veröffentlichten Daten bezogen sich dabei auf In-vitro-Experimente oder intravitreale und intrazerebrale Infektion von Ratten mit dem PrV-Bartha oder US9-Deletionsmutanten (Brideau et al. 2000a, 2000b, Tomishima und Enquist 2001). Im Gegensatz dazu ähnelt das in dieser Arbeit verwendete oronasale Infektionsmodell weitestgehend der natürlichen Übertragung von PrV.

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass US9-deletierte PrV-Mutanten eine unveränderte virale Replikation und Zell-zu-Zell-Ausbreitung in nichtneuronalen Zellen, jedoch eine mäßig und nach zusätzlicher Deletion von UL11 hochgradig verzögerte transsynaptische anterograde Neuroinvasion in der Maus zeigen. Somit hat das US9-Protein zwar einen Einfluss auf die Zytopathogenität in Neuronen, jedoch keinen auf den anterograden Transport im trigeminalen System der Maus.

UL37 ist essentiell für den axonalen Transport von Kapsiden in der primären trigeminalen Zellkultur und die Neuroinvasion. Das UL37-Protein stellt zusammen mit dem Kapsid-assoziierten UL36-Tegumentprotein, mit dem es interagiert, die innerste Schicht des Teguments dar (Zhou et al. 1999, Klupp et al. 2002). Die Deletion von UL37 aus dem PrV-Genom führte zu Virusmutanten mit stark reduzierten Replikationseigenschaften und drastisch verringerten Plaquegrößen in Zellkultur (Klupp et al. 2001b). Inokulation von Mäusen mit phänotypisch komplementiertem PrV-ΔUL37 führte zu keiner neuronalen Infektion. Zusätzlich war auch die Replikation in den primären Zielzellen, der Nasenschleimhaut, drastisch vermindert. Da die Infektionsdosis identisch mit der anderer Mutanten war, kann die geringe Anzahl infizierter Epithelzellen mit dem in Zellkultur zu beobachtenden Ausbreitungsdefekt von PrV-ΔUL37 erklärt werden, der den Hauptmechanismus der Virusausbreitung nach Infektion epithelialer Zellen darstellt (Heffner et al. 1993). Dieser Phänotyp ist von der Deletion von UL37 abhängig, da die Reinsertion des genomischen UL37-Fragments die Wiederherstellung einer wildtypgleichen Neuroinvasion und Neurovirulenz bewirkte. In RK13-Zellen bilden sich in Abwesenheit von UL37 regelmäßig geformte, intrazytoplasmatische Einschlüsse, die ultrastrukturell aus nackten Kapsiden bestehen (Klupp et al. 2001b). Die Unfähigkeit von PrV-ΔUL37, sich in der Nasenschleimhaut auszubreiten, könnte möglicherweise mit diesen Beobachtungen zusammenhängen. Die elektronenmikroskopische Untersuchung von Gewebeproben zur Bestätigung dieses Phänotyps ist aufgrund der geringen Anzahl von infizierten epithelialen Zellen jedoch unmöglich. Somit

bleibt unklar, ob der Neuroinvasionsdefekt durch eine reduzierte Virusreplikation in Epithelzellen und der daraus resultierenden reduzierten Virusnachkommenschaft für die weitere Infektion von Neuronen verursacht wird oder Ergebnis einer ausbleibenden Zell-zu-Zell-Ausbreitung zwischen Epithelzellen und benachbarten freien Nervenendigungen ist. Allgemein wird angenommen, dass die direkte Infektion von Neuronen in der Nasenhöhle nach intranasaler Infektion ein seltenes Ereignis ist, und dass eine effiziente primäre Replikation in epithelialen Zellen die Voraussetzung für die neuronale Infektion darstellt (Babic et al. 1994). Die respiratorische Nasenschleimhaut, der Hauptort der primären Infektion, besteht aus einem einschichtigen, hochprismatischen mit Kinozilien besetzten Epithel, das von einem vaskulären Stroma mit serösen und mukösen Drüsen unterlegt ist. Der *N. maxillaris* des *N. trigeminus* innerviert dieses Epithel mit einer Vielzahl von freien Nervenendigungen. Freie Nervenendigungen sind die einfachste Form von sensorischen Rezeptoren und entlang der Grenze zwischen Epithel und Lamina propria zu finden. Dieser anatomische Aufbau erfordert, dass das Virus den epithelialen Zellverband durchdringen muss, um neuronales Gewebe zu infizieren. Daraus folgt, dass ein Defekt von PrV-ΔUL37 in der Zell-zu-Zell-Ausbreitung die Infektion von Neuronen indirekt verhindern würde.

In infizierten Neuronen replizieren Herpesviren im Zellkern, während virale Untereinheiten, wie tegumentierte Kapside und virale Glykoproteine enthaltende Vesikel, separat bidirektional im Axon transportiert werden (Penfold et al. 1994, Enquist et al. 2002). Die Bildung kompletter Virionen durch sekundäre Umhüllung erfolgt hauptsächlich an der Synapse (Enquist et al. 2002). Dieser Schritt entspricht vermutlich prinzipiell wieder der Virusreifung in infizierten nichtneuronalen Zellen (Mettenleiter 2002b). Der Hauptunterschied zwischen der Situation in kultivierten Epithelzellen und Neuronen *in vivo* ist somit, dass in letzteren virale Untereinheiten über längere Strecken mittels schnellem axonalen Transport zum Ort des finalen Zusammenbaus transportiert werden. Während für den Transport von Glykoproteinen in Vesikeln zur Synapse eine Beteiligung des

US9-Proteins postuliert wurde, sind die viralen Proteine, die für die Interaktion von tegumentierten Kapsiden mit den zellulären Mikrotubuli-assoziierten Transportsystemen verantwortlich sind, nicht bekannt (Enquist et al. 2002). Da sich das Tegument von Alphaherpesviren vor dem Eintritt in das Axon im Zellkörper von Neuronen formt, ist eine Beteiligung von Tegumentproteinen an der Kopplung von Kapsiden an das Kinesin-Motorprotein wahrscheinlich. Das UL37-Protein als innerste Schicht des Teguments ist für die Neuroinvasion *in vivo* essentiell und stellt somit ein mögliches Verbindungselement zwischen viralem Kapsid und zellulären Transportern dar. Aus diesem Grund wurde eine UL37-Deletionsmutante mit einem UL35/EGFP-markierten Kapsid hergestellt und in der primären trigeminalen Zellkultur untersucht. Im Gegensatz zu PrV-Ka war PrV-ΔUL37 nach phänotypischer Komplementierung zwar ebenfalls infektiös, zeigte aber in Zeitrafferaufnahmen keinen intraaxonalen Transport. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass UL37 maßgeblich am Eintritt von tegumentierten Kapsiden in das Axon und am anterograden intraneuronalen Transport beteiligt ist. Die erst zu späten Zeitpunkten in sehr wenigen Neuronen nachweisbaren intraaxonalen Kapside zeigen, dass wenige anterograde Bewegungen stattgefunden haben. Dies könnte mit der phänotypischen Komplementierung der Ausgangsviren zu erklären sein, die während der Infektion in geringer Menge UL37-Protein mit in die infizierten Neuronen bringen, welches möglicherweise noch für eine Komplementierung zur Verfügung stand. Andere UL37-unabhängige Transportmechanismen, Diffusion oder sporadische Verpackung von Kapsiden in Transportvesikel sind weitere spekulative Erklärungen für den Eintritt einzelner Kapside in Axone.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das UL37-Protein aufgrund seiner möglichen Bedeutung für die Zell-zu-Zell-Ausbreitung in epithelialen Zellen und den Eintritt von Kapsiden in Axone bzw. deren intraaxonalen Transport, essentiell für die Neuroinvasion in Mäusen nach oronasaler Infektion ist.

Die Deletion von UL48 bewirkt eine verzögerte Infektion von Neuronen zweiter Ordnung und verlängerte Überlebenszeiten. Obwohl die Deletion von UL48 und UL37 aus dem PrV-Genom zu Virusmutanten mit ähnlich eingeschränkten Wachstumseigenschaften und Plaquegrößen in Zellkultur führte (Klupp et al. 2001b, Fuchs et al. 2002a), unterschied sich ihr Verhalten *in vivo*. So waren im Gegensatz zu PrV- Δ UL37, 126 h nach Infektion mit PrV- Δ UL48 alle neuronalen Zentren in einem dem Wildtyp ähnlichen Ausmaß infiziert, obwohl die Neuroinvasion stark verzögert war. Vom ersten Auftreten infizierter Neurone bis zum Tod der Tiere vergingen ca. 55 h. Diese Verzögerung könnte entsprechend dem Zellkulturphänotyp durch einen schweren Defekt bei der Replikation in Neuronen erster oder zweiter Ordnung verursacht sein. In der Zellkultur konnte gezeigt werden, dass das UL48-Genprodukt verschiedener Alphaherpesviren zwei Funktionen besitzt. Zum einen ist es wichtiger Bestandteil des Teguments, und in seiner Abwesenheit ist die Tegumentation hochgradig gestört (Mossman et al. 2000, Fuchs et al. 2002a). Zum anderen wird es während des Eintritts in die Zelle in das Zytosol entlassen, gelangt zum Zellkern und transaktiviert die viralen "Immediate-Early"-Gene (Batterson und Roizman 1983). Während beide Funktionen bedeutsam sind, beeinflusst die Deletion von UL48 in PrV in höherem Maße die späten als die frühen Schritte der Virusreplikation (Fuchs et al. 2002a). So kann angenommen werden, dass der beobachtete In-vivo-Phänotyp hauptsächlich durch die Rolle von UL48 in der Morphogenese verursacht wird, obwohl ein Beitrag der fehlenden "Immediate-Early"-Transaktivierung nicht auszuschließen ist. Ob dieser Effekt direkt oder indirekt ist, bleibt unklar, da für das UL48-Protein des HSV-1 eine Interaktion mit dem UL41-Protein während der Tegumentation (Smibert et al. 1994) und die fehlende Inkorporation von UL41 in Abwesenheit von UL48 (Lam et al. 1996) gezeigt werden konnte. In PrV ist eine ähnliche Wechselwirkung beider Proteine bisher nicht geklärt. Die nur schwache Virulenzreduzierung von PrV- Δ UL41 spricht jedoch gegen einen bedeutenden Einfluss von UL41 auf den Phänotyp von PrV- Δ UL48. Zur Untersuchung möglicher Einflüsse des UL48-Proteins auf den

intraaxonalen Transport von Kapsiden wurde auch eine PrV- Δ UL48 Mutante mit dem UL35/EGFP-Protein markiert und in neuronaler Zellkultur untersucht. Im Vergleich zu markierten PrV-Ka waren in Bezug auf Anzahl infizierter Zellen und transportierter Kapside keine Unterschiede feststellbar. Die Reduzierung der durchschnittlichen Geschwindigkeiten des intraaxonalen retrograden und anterograden Transports von Kapsiden ist vermutlich auf die langen Infektionszeiten der betroffenen Neuronen zurückzuführen, bei denen bis zu 20 h vergingen, bis transportierte Kapside zu beobachten waren.

Die Deletion von UL48 führt somit zu einer verzögerten Kinetik der Neuroinvasion von PrV und beeinflusst den intraneuronalen schnellen axonalen Transport.

Der Komplex aus UL16 und UL21 des PrV beeinflusst die Neurovirulenz. Die Deletion von UL16 oder UL21 führte in Zellkultur zu schwach reduzierten Virustitern und drastisch reduzierten Plaquegrößen (Klupp et al. 2005a). Ultrastrukturelle Untersuchungen zeigten, dass in Abwesenheit des UL16-Proteins die sekundäre Umhüllung gestört ist. Ähnliche Zellkultureigenschaften wurden für die UL11-Deletionsmutante gezeigt (Kopp et al. 2003). Weiterhin wiesen Loomis et al. eine physikalische Interaktion von der UL16- und UL11-Proteine des HSV-1 nach. Durch Immunpräzipitationsanalysen konnte bei PrV keine direkte Interaktion beider Proteine gezeigt werden. Bestätigt wurden diese Beobachtungen durch das Verhalten der Mutante *in vitro* (Klupp et al. 2005a) und *in vivo*. In beiden Fällen zeigte simultane Deletion keinen additiven Effekt. Dies korreliert mit der Annahme, dass beide Proteine eine funktionelle Einheit bilden. Durch Immunpräzipitation konnte aber eine physikalische Interaktion der Genprodukte von UL16 und UL21 nachgewiesen werden (Klupp et al. 2005a). In Zellkultur zeigte eine Deletionsmutante beider Gene nur marginal veränderte Eigenschaften (Klupp et al. 2005a). Während PrV- Δ UL21 im Schwein deutlich attenuiert war, ergab sich nach Infektion der Maus eine nur mäßige Reduktion der Neurovirulenz, was die eher untergeordnete Rolle von UL21 bei der

Virusmorphogenese bestätigt. Eine weitaus wichtigere Rolle *in vivo* scheint der UL16/UL21-Komplex zu spielen. Im Gegensatz zu der mit den Einzelmутanten vergleichbaren mäßigen Attenuierung der UL16/UL21-Doppelmутante *in vitro*, zeigte diese in der Maus eine ausgeprägte Reduktion der Neurovirulenz bei unveränderter Neuroinvasion und im Vergleich zu PrV-Ka deutlich verlängerte Überlebenszeiten. Interessanterweise waren trotz einer ausgeprägten Entzündungsreaktion in Ganglien und Hirnstamm zu allen Zeitpunkten immunhistologisch in diesen Lokalisationen nur wenige infizierte Zellen nachweisbar. Außergewöhnlich war die zu späten Zeitpunkten vorhandene Infektion von kortikalen Neuronen. Daraus folgt, dass diese Mutante sich zwar in synaptisch verbundenen Neuronen über weite Strecken ausbreitet, aber möglicherweise einen Defekt der Infektion von Nasenschleimhaut-innervierenden Neuronen aufweist. Dies könnte die geringe Anzahl infizierter Neuronen erster und zweiter Ordnung erklären. Ein Defekt in der nichtsynaptischen Zell-zu-Zell-Ausbreitung auf einer neuronalen Ebene ist auszuschließen, da auch in PrV-Ka-infizierten Tieren vorrangig eine spezifische, transsynaptische Ausbreitung von Virionen zu beobachten ist (Tomishima und Enquist 2002). Weiterhin ist auch ein Defekt im intraaxonalen Transport als Ursache für die schwache Infektion von TG und Sp5 unwahrscheinlich, da für die Infektion kortikaler Neurone ein Transport über weitere Strecken nötig ist. Die reduzierte Neurovirulenz ist deshalb wohl auf eine reduzierte Zytopathogenität oder eingeschränkte Replikationsfähigkeit in Neuronen zurückzuführen.

Die vorliegenden Daten ermöglichen keine Aussage über einen immunmodulierenden Einfluss des UL16/UL21-Komplex. Dennoch spricht die in anderen Mutanten mit ähnlich attenuierter Neurovirulenz ebenfalls zu beobachtende starke Meningoenzephalitis in den infizierten Gebieten (siehe PrV-ΔUL48, PrV-ΔUL11/US9) gegen einen Einfluss des Proteinkomplexes auf die Immunreaktion. Der fehlende Nachweis von aktivierter Caspase 3 in neuronalem Gewebe schließt eine Funktion der beiden Proteine im Apoptosegeschehen ebenfalls aus. Die zusätzliche Deletion von UL11 in PrV-ΔUL16/UL21/UL11

führte zu keiner weiteren Veränderung des In-vivo-Phänotyps und korreliert somit zusätzlich die postulierte funktionelle Einheit von UL11 mit UL16 bzw. UL16/UL21.

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass die Deletion von UL16 oder UL21 einen nur mäßigen Einfluss auf die Neuroinvasion hat, während die simultane Deletion beider Proteine eine Reduktion der Neurovirulenz zur Folge hat und nur in eingeschränktem Maße die Neuroinvasion beeinflusst.

UL17, UL31, UL34 und UL11/gM sind essentiell für die Neuroinvasion von PrV. Die Deletion von UL17, UL31, UL34 und UL11/gM führte ebenso wie in PrV-ΔUL37 zu einem vollständigen Block der Neuroinvasion. Für das Genprodukt von UL17 konnte *in vitro* eine essentielle Beteiligung an der Kapsidbildung und der DNA-Spaltung nachgewiesen werden (Salmon et al. 1998, Taus et al. 1998, Klupp et al. 2005b). Der nahezu vollständige Defekt der Virusreplikation der Deletionsmutante *in vitro* bestätigte sich in der *in vivo* Situation. So konnte nach Inokulation mit phänotypisch komplementiertem PrV-ΔUL17 eine Infektion einzelner Zellen des respiratorischen Epithels, jedoch zu keinem Zeitpunkt infizierte Neuronen nachgewiesen werden. Da die bisher für PrV und HSV-1 beschriebenen Funktionen von UL17 auf die intranukleären Vorgänge während der Virusmorphogenese beschränkt sind, ist davon auszugehen, dass der vollständige Verlust der Neurovirulenz in der Maus durch gleichartige Mechanismen in Neuronen begründet ist.

UL31 und UL34 interagieren physikalisch miteinander und sind für die primäre Umhüllung von PrV an der inneren Kernmembran in den perinukleären Spalt wichtig (Klupp et al. 2000, Fuchs et al. 2002c). Die Bedeutung beider Proteine für die In-vitro-Replikation bestätigte sich nach oronasaler Infektion von Mäusen. Neben einer Infektion von wenigen Zellen des respiratorischen Nasenepithels war keine Neuroinvasion feststellbar.

Einen ebenfalls vollständigen Block der Neuroinvasion zeigte PrV-ΔUL11/gM, wohingegen die Deletionsmutanten PrV-ΔUL11 und PrV-ΔgM eine nahezu

identische, mäßig verzögerte Neuroinvasion aufwiesen. Dies entspricht den Beobachtungen in der Zellkultur. Während für UL11 eine tegumentseitige Verbindung zwischen tegumentierten Kapsiden und dem TGN postuliert wurde, ist gM an der finalen Umhüllung über seine Interaktion mit dem UL49-Protein beteiligt (Brack et al. 1999, 2000, Fuchs et al. 2002b). Somit sind UL11 und gM möglicherweise auch in Neuronen an unterschiedlichen, teilweise redundanten Prozessen während der sekundären Umhüllung beteiligt. Nach der Hypothese des getrennten Transports von tegumentierten Kapsiden und Glykoprotein-beladenen Vesikeln vom Perikaryon zum Axonenende müssten daher die elektronenmikroskopisch in mit PrV-ΔUL11/gM infizierten RK13-Zellen sichtbaren intrazytoplasmatischen Einschlüsse (Kopp et al. 2004) auch in Neuronen, hier allerdings vor allem in den Axonenenden zu beobachten sein.

Deletionsmutanten in UL51 und UL41 führten zu geringgradig verlängerten Überlebenszeiten und reduzierter Neurovirulenz. Die Deletion von UL51 und UL41 führte im Mausmodell zu verlängerten Überlebenszeiten im Vergleich zu PrV-Ka. Die Kinetik der Virusausbreitung entlang des *N. trigeminus*, aber auch in anderen Systemen war dementsprechend verzögert, führte im Endstadium jedoch zu einem dem Wildtyp entsprechenden Infektionsmuster im ZNS.

Die Deletion des UL51-Gens aus dem PrV-Genom beeinflusste die Replikation in Zellkultur und im Mausmodell nur geringgradig. Als Teil des Teguments, einer viralen Struktur mit einer Vielzahl von Protein-Protein-Interaktionen, ist auch für UL51 anzunehmen, dass funktionelle Redundanzen, ähnlich denen von viralen Glykoproteinen (zusammengefasst in Mettenleiter 2002a), zutreffen. Möglicherweise müssen eine Vielzahl von Deletionen in das virale Genom eingefügt werden, um die speziellen Funktionen eines einzelnen Proteins aufzudecken. Gleiches gilt für den vhs-Faktor des UL41-Gens von PrV, für dessen homologes Protein in HSV-1 eine Schlüsselrolle in der Umschaltung des zellulären Metabolismus auf die virale Replikation postuliert wurde (Read et al. 1993). Wie für HSV-1, bei dem die Deletion von UL41 nur zu einer leichten

Reduktion der Virustiter *in vitro* (Read et al. 1993) und einer etwas verminderten Replikation *in vivo* führt (Strelow und Leib 1995, 1996, Strelow et al. 1997), zeigt die Deletionsmutante PrV-ΔUL41 im Vergleich mit PrV-Ka nur geringe Veränderungen im Zellkultur-Phänotyp und eine mäßige Attenuierung der Neurovirulenz. Zusammengefasst führt dies zu der Erkenntnis, dass UL41 allein weder *in vitro* noch *in vivo* eine herausragende Rolle bei der Anpassung der zellulären Replikationsmaschinerie an die virale Replikation spielt.

Die Genprodukte von UL46, UL3, US3, UL47 und UL13 besitzen nur einen geringen Einfluss auf die Neurovirulenz von PrV. Deletionsmutanten in UL46, UL3, US3, UL47 und UL13 zeigten im Vergleich zum Wildtyp nach oronasaler Infektion von Mäusen kaum verlängerte Überlebenszeiten sowie ein identisches Infektionsmuster im ZNS.

Die Genprodukte von UL46 und UL47 des PrV stellen Hauptbestandteile des Teguments dar und besitzen möglicherweise modulierenden Einfluss auf die transaktivierenden Eigenschaften des UL48 (Kopp et al. 2002). Die nur geringfügig eingeschränkte Replikation von PrV-ΔUL46 in Zellkultur bestätigt sich auch im Mausmodell, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Funktionen des UL46-Proteins sowohl *in vitro* als auch *in vivo* vollständig durch andere virale Produkte kompensiert werden. Der im Vergleich zu PrV-ΔUL46 deutlichere Defekt von PrV-ΔUL47 in der nichtneuronalen Zellkultur zeigte sich ebenfalls im Mausmodell.

Das Nichtstrukturprotein UL3 hat *in vivo* ebenfalls kaum Einfluss auf die Neurovirulenz und Neuroinvasion. Wenn im viralen Genom kodierte Proteine eine Funktion für die Virusreplikation besitzen und nicht als „Ballast“ erhalten bleiben, so scheinen auch in diesem Fall andere Proteine des PrV die Funktion des UL3 nahezu vollständig übernehmen zu können.

Die US3-Proteinkinase beeinflusst die Freisetzung primärer Virionen an der äußeren Kernmembran. Der mit der Deletionsmutante *in vitro* zu beobachtende schwache Defekt in der Virusreplikation bestätigt sich in der geringgradigen

Attenuierung der Neurovirulenz. Dies zeigt, dass das US3-Produkt auch für die Replikation in Neuronen von untergeordneter Bedeutung ist oder durch andere virale Proteine, wie die synergistische Proteinkinase des UL13 ersetzt wird (De Wind et al. 1992). So zeigt PrV- Δ UL13 *in vitro* und in der Maus einen ähnlichen Phänotyp wie PrV- Δ US3, während eine Doppeldeletionsmutante beider Proteine sowohl in der Zellkultur als auch im Schwein eine ausgeprägte Virulenzreduktion aufweist (De Wind et al. 1992).

Abschließend lässt sich feststellen, dass bei diesen fünf Mutanten das In-vitro- mit dem In-vivo-Verhalten korreliert.

Die untersuchten Deletionsmutanten zeigten keine Apoptoseinduktion in Neuronen. Der Nachweis aktivierter Caspase 3 in Neuronen durch Immunhistologie bei den verschiedenen Virusmutanten und dem Wildtyp zeigte keinen apoptotischen Untergang von Neuronen in den infizierten Gebieten. Es kann also postuliert werden, dass keines der deletierten Proteine oder Proteinkomplexe einen unmittelbaren Einfluss auf das apoptotische Geschehen in Neuronen hat. Bisher bestehen noch keine Erkenntnisse darüber, ob PrV in Neuronen Apoptose auslösen kann. Fraglich bleibt damit, ob das Fehlen von Apoptose in PrV-infizierten Neuronen auf eine Unterdrückung dieses Prozesses oder einen prinzipiell apoptoseunabhängigen Untergang zurückgeführt werden kann.

Die Apoptose von infiltrierenden Immunzellen am Ort des Entzündungsgeschehens ist ein gut bekanntes Phänomen. Er ist zum einen damit zu erklären, dass eine Reihe der von diesen Zellen freigesetzten Mediatoren, wie FASL, TNF von Lymphozyten oder Sauerstoffradikale und Stickstoffoxide des „Respiratory Burst“ von neutrophilen Granulozyten, neben einem parakrinen Effekt auf die infizierten Zielzellen auch autokrin wirken. Weiterhin umfasst das Immunsystem gut entwickelte Mechanismen der Beseitigung nicht mehr benötigter Zellen. Nach Ausschalten des Reizes, der diese Zellen ursprünglich angelockt hat, gehen diese Zellen offenbar an Apoptose zugrunde.

6 ZUSAMMENFASSUNG

1. Die PrV-Deletionsmutante PrV- Δ US9F replizierte ohne Einschränkung, während die Doppelmutante PrV- Δ US9/UL11K einen PrV- Δ UL11-ähnlichen Phänotyp in der nichtneuronalen Zellkultur zeigte.
2. Nach oronasaler Infektion von Mäusen zeigte PrV- Δ US9F eine verringerte Neurovirulenz, immunhistologisch jedoch eine dem Wildtyp ähnliche Infektion von trigeminalen Neuronen. Zusätzlich waren Neurone des Thalamus und des somatosensorischen Kortex infiziert. Eine EGFP/UL35-markierte PrV- Δ US9F-Mutante zeigte bei Zeitrafferaufnahmen keine Einschränkungen des anterograden axonalen Transports von Kapsiden in der primären trigeminalen Zellkultur.
3. Die Mutante PrV- Δ UL11/US9K zeigte im Mausmodell eine stark verzögerte Neuroinvasion, war jedoch fähig, sich anterograd und transsynaptisch bis in den somatosensorischen Kortex und den Thalamus auszubreiten. Die Genprodukte von UL11 und US9 besitzen aus diesem Grund möglicherweise redundante Funktionen während der Replikation und des Transports in Neuronen, so dass die Anwesenheit eines der beiden Proteine für eine effiziente Ausbreitung in neuronalen Systemen notwendig ist.
4. Das UL37-Protein ist notwendig für die Neuroinvasion nach oronasaler Infektion von Mäusen und für den schnellen axonalen Transport von Kapsiden in der primären trigeminalen Zellkultur. Außer einer Infektion einzelner Zellen des respiratorischen Epithels konnte kein PrV-Antigen im Nervengewebe nachgewiesen werden. In kultivierten trigeminalen Neuronen zeigte phänotypisch komplementiertes PrV- Δ UL37 keinen axonalen Transport von Kapsiden. Als innerste Schicht des Teguments könnte das

UL37-Protein ein wichtiges Bindeglied zwischen viralem Kapsid und zellulären Motorproteinen darstellen.

5. Die Neuroinvasion von PrV- Δ UL48 war stark verzögert, jedoch nicht blockiert. Zeitrafferaufnahmen in neuronaler Zellkultur zeigten einen uneingeschränkten axonalen Transport. Die verlängerten Überlebenszeiten sind somit hauptsächlich durch einen Defekt von PrV- Δ UL48 in der Virusreplikation und nicht durch Einschränkungen im axonalen Transport von Kapsiden bedingt.
6. Die Deletion von UL16 oder UL21 hatte einen nur mäßigen Einfluss auf die Virulenz der Mutanten. Während das simultane Fehlen beider Proteine *in vitro* nur eine leichte Reduktion der Zell-zu-Zell-Ausbreitung bewirkte, zeigte sich *in vivo* eine ausgeprägte Reduktion der Neurovirulenz, nicht jedoch der Neuroinvasion. Der Komplex aus den UL16- und UL21-Proteinen des PrV besitzt somit virulenzbestimmende Eigenschaften *in vivo*. Die zusätzliche Deletion von UL11 bewirkte keine weiteren Einschränkungen der Neurovirulenz.
7. Deletionsmutanten in UL17, UL31, UL34 und UL11/gM waren nicht neuroinvasiv. Diese Ergebnisse im Mausmodell entsprechen weitestgehend den In-vitro-Phänotypen der Deletionsmutanten.
8. Deletionsmutanten in UL51 und UL41 zeigten geringgradig verlängerte Überlebenszeiten und leicht reduzierte Neurovirulenz. Dies führt zu der Annahme, dass UL41 keine herausragende Rolle im „Viral Host Cell Shutoff“ des PrV spielt und funktionelle Redundanzen anderer Proteine möglicherweise die Deletion der Gene ausgleichen.

9. Die Genprodukte von UL46, UL3, US3, UL47 und UL13 besitzen nur einen geringen Einfluss auf die Neurovirulenz von PrV.
10. Apoptose von Neuronen konnte in keinem der mit den verschiedenen PrV-Mutanten und dem Wildtyp infizierten Tiere nachgewiesen werden.

6 Summary

1. The deletion of the US9 in the PrV- Δ US9F mutant did not affect the replication in cultured nonneuronal cells. PrV- Δ US9/UL11K had an *in vitro* phenotype similar to that of PrV- Δ UL11.
2. In mice, PrV- Δ US9F showed a reduced neurovirulence. However, immunohistochemistry revealed an infection of the trigeminal circuit similar to that of wild type PrV. Additionally, neurons of the thalamus and the somatosensory cortex were infected. Time-lapse recording of PrV- Δ US9F capsids bearing multiple copies of the EGFP protein revealed no limitations of anterograde axonal transport in primary trigeminal cell culture.
3. Although PrV- Δ UL11/US9K demonstrated a delayed neuroinvasion, it was able to spread anterogradely and transsynaptically to the somatosensory cortex and the Thalamus. For this reason, UL11 and US9 proteins might possess redundant functions during replication and axonal transport. The presence of either of them is therefore necessary for efficient spread in neuronal systems.
4. The UL37 protein is essential for neuroinvasion after oronasal infection of mice and for fast axonal transport of capsids in primary trigeminal cell culture. Despite an infection of single cells of the nasal respiratory epithelium no infection of neuronal tissue could be detected. Phenotypically complemented PrV- Δ UL37 displayed no axonal transport of capsids. The UL37 protein, representing the innermost layer of the tegument, might constitute an important link between the capsid and motor proteins.
5. Neuroinvasion of PrV- Δ UL48 was severely delayed, but not blocked. Time-lapse recording revealed an efficient axonal transport of capsids in cultured

neurons. Therefore, the prolonged survival times of mice are caused mainly by an impaired replication of PrV-ΔUL48 and not by delayed axonal transport of capsids.

6. Deletion of the UL16 and UL21 genes had only little influence on the virulence of the mutants. While absence of both proteins reduced only slightly the cell-to-cell spread *in vitro*, the double deletion mutant showed *in vivo* a marked attenuation in neurovirulence, but no reduction in neuroinvasiveness. Therefore, the UL16/UL21-complex determines virulence *in vivo*. Additional deletion of the UL11 gene did not further reduce neurovirulence.
7. Deletion mutants in UL17, UL31, UL34 and UL11/gM genes were not neuroinvasive. These results in the mouse model correspond largely with the *in vitro* phenotype of the respective mutants.
8. Deletion of UL51 and UL41 genes resulted in slightly extended mean survival times and reduced neurovirulence. This leads to the assumption that UL41 alone does not play a central role in viral host cell shutoff and functional redundancies of other proteins might substitute deletion of the genes.
9. The deletion of UL46, UL3, US3, UL47 and UL13 hardly influenced the neurovirulence of PrV.
10. Apoptosis of infected neurons could not be detected in any of the animals infected with the different PrV mutants or the wild type virus.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Aleman N, MI Quiroga, M Lopez-Pena, S Vazquez, FH Guerrero, JM Nieto (2001).

Induction and inhibition of apoptosis by pseudorabies virus in the trigeminal ganglion during acute infection of swine.

J Virol **75**: 469-479.

Alvarado-Mallart MR, C Batini, C Buisseret-Delmas, J Corvisier (1975).

Trigeminal representations of the masticatory and extraocular proprioceptors as revealed by horseradish peroxidase retrograde transport.

Exp Brain Res **23**: 167-179.

Aubert M, JA Blaho (1999).

The herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP27 is required for the prevention of apoptosis in infected human cells.

J Virol **73**: 2803-2813.

Aubert M, SA Rice, JA Blaho (2001).

Accumulation of herpes simplex virus type 1 early and leaky-late proteins correlates with apoptosis prevention in infected human HEp-2 cells.

J Virol **75**: 1013-1030.

Aujeszkzy A (1902).

Über eine neue Infektionskrankheit bei Haustieren.

Zbl Bakt Abt **1**: 42-45.

Babic N, B Klupp, A Brack, TC Mettenleiter, G Ugolini, A Flamand (1996a).

Deletion of glycoprotein gE reduces the propagation of pseudorabies virus in the nervous system of mice after intranasal inoculation.

Virology **219**: 279-284.

Babic N, BG Klupp, B Makoschey, A Karger, A Flamand, TC Mettenleiter (1996b).

Glycoprotein gH of pseudorabies virus is essential for penetration and propagation in cell culture and in the nervous system of mice.

J Gen Virol **77**: 2277-2285.

Babic N, TC Mettenleiter, A Flamand, G Ugolini (1993).

Role of essential glycoproteins gII and gp50 in transneuronal transfer of pseudorabies virus from the hypoglossal nerves of mice.

J Virol **67**: 4421-4426.

Babic N, TC Mettenleiter, G Ugolini, A Flamand, P Coulon (1994).

Propagation of pseudorabies virus in the nervous system of the mouse after intranasal inoculation.

Virology **204**: 616-625.

Baines JD, B Roizman (1992).

The UL11 gene of herpes simplex virus 1 encodes a function that facilitates nucleocapsid envelopment and egress from cells.

J Virol **66**: 5168-5174.

Bareyre FM, M Kerschensteiner, O Raineteau, TC Mettenleiter, O Weinmann, ME Schwab (2004).

The injured spinal cord spontaneously forms a new intraspinal circuit in adult rats.
Nat Neurosci **7**: 269-277.

Batterson W, B Roizman (1983).

Characterization of the herpes simplex virion-associated factor responsible for the induction of alpha genes.
J Virol **46**: 371-377.

Baumeister J, BG Klupp, TC Mettenleiter (1995).

Pseudorabies virus and equine herpesvirus 1 share a nonessential gene which is absent in other herpesviruses and located adjacent to a highly conserved gene cluster.
J Virol **69**: 5560-5567.

Benedict CA, PS Norris, CF Ware (2002).

To kill or be killed: viral evasion of apoptosis.
Nat Immunol **3**: 1013-1018.

Berthomme H, B Jacquemont, A Epstein (1993).

The pseudorabies virus host-shutoff homolog gene: nucleotide sequence and comparison with alphaherpesvirus protein counterparts.
Virology **193**: 1028-1032.

Brack AR, JM Dijkstra, H Granzow, BG Klupp, TC Mettenleiter (1999).

Inhibition of virion maturation by simultaneous deletion of glycoproteins E, I, and M of pseudorabies virus.
J Virol **73**: 5364-5372.

Brack AR, BG Klupp, H Granzow, R Tirabassi, LW Enquist, TC Mettenleiter (2000).

Role of the cytoplasmic tail of pseudorabies virus glycoprotein E in virion formation.
J Virol **74**: 4004-4016.

Brideau AD, BW Banfield, LW Enquist (1998).

The Us9 gene product of pseudorabies virus, an alphaherpesvirus, is a phosphorylated, tail-anchored type II membrane protein.
J Virol **72**: 4560-4570.

Brideau AD, JP Card, LW Enquist (2000a).

Role of pseudorabies virus Us9, a type II membrane protein, in infection of tissue culture cells and the rat nervous system.
J Virol **74**: 834-845.

Brideau AD, MG Eldridge, LW Enquist (2000b).

Directional transneuronal infection by pseudorabies virus is dependent on an acidic internalization motif in the Us9 cytoplasmic tail.
J Virol **74**: 4549-4561.

Brideau AD, LW Enquist, RS Tirabassi (2000c).

The role of virion membrane protein endocytosis in the herpesvirus life cycle.
J Clin Virol **17**: 69-82.

Brown SM, J Harland (1987).

Three mutants of herpes simplex virus type 2: one lacking the genes US10, US11 and US12 and two in which Rs has been extended by 6 kb to 0.91 map units with loss of Us sequences between 0.94 and the Us/TRs junction.

J Gen Virol **68**: 1-18.

Buijs RM, SE la Fleur, J Wortel, C Van Heyningen, L Zuiddam, TC Mettenleiter, A Kalsbeek, K Nagai, A Nijima (2003).

The suprachiasmatic nucleus balances sympathetic and parasympathetic output to peripheral organs through separate preautonomic neurons.

J Comp Neurol **464**: 36-48.

Campbell ME, JW Palfreyman, CM Preston (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.

Card JP, LW Enquist (1995).

Neurovirulence of pseudorabies virus.

Crit Rev Neurobiol **9**: 137-162.

Card JP, ME Whealy, AK Robbins, RY Moore, LW Enquist (1991).

Two alpha-herpesvirus strains are transported differentially in the rodent visual system.

Neuron **6**: 957-969.

Cherepanov PP, W Wackernagel (1995).

Gene disruption in Escherichia coli: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant.

Gene **158**: 9-14.

Cheung AK (1989).

DNA nucleotide sequence analysis of the immediate-early gene of pseudorabies virus.

Nucleic Acids Res **17**: 4637-4646.

Cheung AK, Z Chen, Z Sun, D McCullough (2000).

Pseudorabies virus induces apoptosis in tissue culture cells.

Arch Virol **145**: 2193-2200.

Cody FW, RW Lee, A Taylor (1972).

A functional analysis of the components of the mesencephalic nucleus of the fifth nerve in the cat.

J Physiol **226**: 249-261.

Coulter LJ, HW Moss, J Lang, DJ McGeoch (1993).

A mutant of herpes simplex virus type 1 in which the UL13 protein kinase gene is disrupted.

J Gen Virol **74**: 387-395.

Craig AD, Jr., H Burton (1981).

Spinal and medullary lamina I projection to nucleus submedialis in medial thalamus: a possible pain center.

J Neurophysiol **45**: 443-466.

Dado RJ, GJ Giesler, Jr. (1990).

Afferent input to nucleus submedius in rats: retrograde labeling of neurons in the spinal cord and caudal medulla.

J Neurosci **10**: 2672-2686.

Darian-Smith I (1973).

The Trigeminal System: Handbook of Sensory Physiology, Vol. 2, The Somatosensory System. Springer Verlag, New York : 271-314.

Datsenko KA, BL Wanner (2000).

One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products.

Proc Natl Acad Sci U S A **97**: 6640-6645.

De Wind N, J Domen, A Berns (1992).

Herpesviruses encode an unusual protein-serine/threonine kinase which is nonessential for growth in cultured cells.

J Virol **66**: 5200-5209.

DeBiasi RL, BK Kleinschmidt-DeMasters, S Richardson-Burns, KL Tyler (2002).

Central nervous system apoptosis in human herpes simplex virus and cytomegalovirus encephalitis.

J Infect Dis **186**: 1547-1557.

Desai P, S Person (1998).

Incorporation of the green fluorescent protein into the herpes simplex virus type 1 capsid.

J Virol **72**: 7563-7568.

Diefenbach RJ, M Miranda-Saksena, E Diefenbach, DJ Holland, RA Boadle, PJ Armati, AL Cunningham (2002).

Herpes simplex virus tegument protein US11 interacts with conventional kinesin heavy chain.

J Virol **76**: 3282-3291.

Douglas MW, RJ Diefenbach, FL Homa, M Miranda-Saksena, FJ Rixon, V Vittone, K Byth, AL Cunningham (2004).

Herpes Simplex Virus Type 1 Capsid Protein VP26 Interacts with Dynein Light Chains RP3 and Tctex1 and Plays a Role in Retrograde Cellular Transport.

J Biol Chem **279**: 28522-28530.

Enquist LW (1999).

Life beyond eradication: veterinary viruses in basic science.

Arch Virol Suppl **15**:87-109.

Enquist LW (2002).

Exploiting circuit-specific spread of pseudorabies virus in the central nervous system: insights to pathogenesis and circuit tracers.

J Infect Dis **186 Suppl 2**:S209-14.

Enquist LW, PJ Husak, BW Banfield, GA Smith (1998).

Infection and spread of alphaherpesviruses in the nervous system.

Adv Virus Res **51**:237-347

Enquist LW, MJ Tomishima, S Gross, GA Smith (2002).

Directional spread of an alpha-herpesvirus in the nervous system.
Vet Microbiol **86**: 5-16.

Erzurumlu RS, HP Killackey (1979).

Efferent connections of the brainstem trigeminal complex with the facial nucleus of the rat.
J Comp Neurol **188**: 75-86.

Field HJ, TJ Hill (1974).

The pathogenesis of pseudorabies in mice following peripheral inoculation.
J Gen Virol **23**: 145-157.

Field HJ, TJ Hill (1975).

The pathogenesis of pseudorabies in mice: virus replication at the inoculation site and axonal uptake.
J Gen Virol **26**: 145-148.

Flamand A, T Bennardo, N Babic, BG Klupp, TC Mettenleiter (2001).

The absence of glycoprotein gL, but not gC or gK, severely impairs pseudorabies virus neuroinvasiveness.
J Virol **75**: 11137-11145.

Frame MC, DJ McGeoch, FJ Rixon, AC Orr, HS Marsden (1986).

The 10K virion phosphoprotein encoded by gene US9 from herpes simplex virus type 1.
Virology **150**: 321-332.

Fraser G, SP Ramachandran (1969).

Studies on the virus of Aujeszky's disease. I. Pathogenicity for rats and mice.
J Comp Pathol **79**: 435-444.

Fuchs E, DW Cleveland (1998).

A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease.
Science **279**: 514-519.

Fuchs W, H Granzow, BG Klupp, M Kopp, TC Mettenleiter (2002).

The UL48 tegument protein of pseudorabies virus is critical for intracytoplasmic assembly of infectious virions.
J Virol **76**: 6729-6742.

Fuchs W, H Granzow, TC Mettenleiter (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, BG Klupp, H Granzow, C Hengartner, A Brack, A Mundt, LW Enquist, TC Mettenleiter (2002a).

Physical interaction between envelope glycoproteins E and M of pseudorabies virus and the major tegument protein UL49.
J Virol **76**: 8208-8217.

Fuchs W, BG Klupp, H Granzow, N Osterrieder, TC Mettenleiter (2002).

The interacting UL31 and UL34 gene products of pseudorabies virus are involved in egress from the host-cell nucleus and represent components of primary enveloped but not mature virions. *J Virol* **76**: 364-378.

Fuchs W, TC Mettenleiter (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.

Geerling JC, TC Mettenleiter, AD Loewy (2003).

Orexin neurons project to diverse sympathetic outflow systems. *Neuroscience* **122**: 541-550.

Ginzburg I (1991).

Neuronal polarity: targeting of microtubule components into axons and dendrites. *Trends Biochem Sci* **16**: 257-261.

Graham FL, AJ van der Eb (1973).

A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**: 456-467.

Granzow H, BG Klupp, TC Mettenleiter (2004).

The pseudorabies virus US3 protein is a component of primary and of mature virions. *J Virol* **78**: 1314-1323.

Granzow H, F Weiland, A Jons, BG Klupp, A Karger, TC Mettenleiter (1997).

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

Harper DR, HO Kangro (1990).

Lipoproteins of varicella-zoster virus. *J Gen Virol* **71**: 459-463.

Hata S, AH Koyama, H Shiota, A Adachi, F Goshima, Y Nishiyama (1999).

Antiapoptotic activity of herpes simplex virus type 2: the role of US3 protein kinase gene. *Microbes Infect* **1**: 601-607.

Heffner S, F Kovacs, BG Klupp, TC Mettenleiter (1993).

Glycoprotein gp50-negative pseudorabies virus: a novel approach toward a nonspreading live herpesvirus vaccine. *J Virol* **67**: 1529-1537.

Henkel CK, SB Edwards (1978).

The superior colliculus control of pinna movements in the cat: possible anatomical connections. *J Comp Neurol* **182**: 763-776.

Hiraoka M, M Shimamura (1977).

Neural mechanisms of the corneal blinking reflex in cats. *Brain Res* **125**: 265-275.

Hirokawa N (1998).

Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport.
Science **279**: 519-526.

Holland DJ, M Miranda-Saksena, RA Boadle, P Armati, AL Cunningham (1999).

Anterograde transport of herpes simplex virus proteins in axons of peripheral human fetal neurons: an immunoelectron microscopy study.
J Virol **73**: 8503-8511.

Honess RW, DH Watson (1977).

Unity and diversity in the herpesviruses.
J Gen Virol **37**: 15-37.

Hsu SM, L Raine, H Fanger (1981).

Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures.
J Histochem Cytochem **29**: 577-580.

Jacquin MF, RW Rhoades, HL Enfiejian, MD Egger (1983).

Organization and morphology of masticatory neurons in the rat: a retrograde HRP study.
J Comp Neurol **218**: 239-256.

Jerge CR (1963).

Organization and function of the trigeminal mensencephalic nucleus.
J Neurophysiol **26**:379-92.: 379-392.

Jerome KR, R Fox, Z Chen, AE Sears, H Lee, L Corey (1999).

Herpes simplex virus inhibits apoptosis through the action of two genes, Us5 and Us3.
J Virol **73**: 8950-8957.

Jöns A, JM Dijkstra, TC Mettenleiter (1998).

Glycoproteins M and N of pseudorabies virus form a disulfide-linked complex.
J Virol **72**: 550-557.

Kai-Kai MA (1989).

Cytochemistry of the trigeminal and dorsal root ganglia and spinal cord of the rat.
Comp Biochem Physiol A **93**: 183-193.

Kandel ER, CH Schröder, A Ott-Hartmann (1991).

Principles of Neural Science.
3rd ed Appleton and Linage, Norwalk .

Karger A, TC Mettenleiter (1993).

Glycoproteins gIII and gp50 play dominant roles in the biphasic attachment of pseudorabies virus.
Virology **194**: 654-664.

Klupp BG, S Böttcher, H Granzow, M Kopp, TC Mettenleiter (2005a).

Complex formation between the UL16 and UL21 tegument proteins of pseudorabies virus.
J Virol in press

Klupp BG, W Fuchs, H Granzow, R Nixdorf, TC Mettenleiter (2002).

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

Klupp BG, H Granzow, W Fuchs, E Mundt, TC Mettenleiter (2004a).

Pseudorabies virus UL3 gene codes for a nuclear protein which is dispensable for viral replication.
J Virol **78**: 464-472.

Klupp BG, H Granzow, TC Mettenleiter (2000).

Primary envelopment of pseudorabies virus at the nuclear membrane requires the UL34 gene product.
J Virol **74**: 10063-10073.

Klupp BG, H Granzow, TC Mettenleiter (2001a).

Effect of the pseudorabies virus US3 protein on nuclear membrane localization of the UL34 protein and virus egress from the nucleus.
J Gen Virol **82**: 2363-2371.

Klupp BG, H Granzow, TC Mettenleiter (2005b).

Pseudorabies virus UL17 gene product is a virion component required for cleavage and encapsidation of viral RNA.
J Virol in press

Klupp BG, H Granzow, E Mundt, TC Mettenleiter (2001b).

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

Klupp BG, H Granzow, R Klopffleisch, W Fuchs, M Kopp, M Lenk, TC Mettenleiter (2005c).

Functional analyses of the pseudorabies virus UL51 protein.
J Virol in press

Klupp BG, CJ Hengärtner, TC Mettenleiter, LW Enquist (2004b).

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

Klupp BG, H Kern, TC Mettenleiter (1992).

The virulence-determining genomic BamHI fragment 4 of pseudorabies virus contains genes corresponding to the UL15 (partial), UL18, UL19, UL20, and UL21 genes of herpes simplex virus and a putative origin of replication.
Virology **191**: 900-908.

Klupp BG, B Lomniczi, N Visser, W Fuchs, TC Mettenleiter (1995).

Mutations affecting the UL21 gene contribute to avirulence of pseudorabies virus vaccine strain Bartha.
Virology **212**: 466-473.

König P, M Beer, B Makoschey, JP Teifke, U Polster, K Giesow, GM Keil (2003).

Recombinant virus-expressed bovine cytokines do not improve efficacy of a bovine herpesvirus 1 marker vaccine strain.
Vaccine **22**: 202-212.

Kopp M, H Granzow, W Fuchs, B Klupp, TC Mettenleiter (2004).

Simultaneous deletion of pseudorabies virus tegument protein UL11 and glycoprotein M severely impairs secondary envelopment.
J Virol **78**: 3024-3034.

- Kopp M, H Granzow, W Fuchs, BG Klupp, E Mundt, A Karger, TC Mettenleiter (2003).**
The pseudorabies virus UL11 protein is a virion component involved in secondary envelopment in the cytoplasm.
J Virol **77**: 5339-5351.
- Kopp M, BG Klupp, H Granzow, W Fuchs, TC Mettenleiter (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.
- Kritas SK, MB Pensaert, TC Mettenleiter (1994).**
Invasion and spread of single glycoprotein deleted mutants of Aujeszky's disease virus (ADV) in the trigeminal nervous pathway of pigs after intranasal inoculation.
Vet Microbiol **40**: 323-334.
- Lam Q, CA Smibert, KE Koop, C Lavery, JP Capone, SP Weinheimer, JR Smiley (1996).**
Herpes simplex virus VP16 rescues viral mRNA from destruction by the virion host shutoff function.
EMBO J **15**: 2575-2581.
- Lenk M, N Visser, TC Mettenleiter (1997).**
The pseudorabies virus UL51 gene product is a 30-kilodalton virion component.
J Virol **71**: 5635-5638.
- Leopardi R, C Van Sant, B Roizman (1997).**
The herpes simplex virus 1 protein kinase US3 is required for protection from apoptosis induced by the virus.
Proc Natl Acad Sci U S A **94**: 7891-7896.
- Liem RSB, Copray J.C.V.M. (1992).**
Ultrastructure of the rat mesencephalic trigeminal nucleus.
Acta Anat **143**: 74-78.
- Longnecker R, B Roizman (1987).**
Clustering of genes dispensable for growth in culture in the S component of the HSV-1 genome.
Science **236**: 573-576.
- Loomis JS, JB Bowzard, RJ Courtney, JW Wills (2001).**
Intracellular trafficking of the UL11 tegument protein of herpes simplex virus type 1.
J Virol **75**: 12209-12219.
- Loomis JS, RJ Courtney, JW Wills (2003).**
Binding partners for the UL11 tegument protein of herpes simplex virus type 1.
J Virol **77**: 11417-11424.
- MacLean CA, B Clark, DJ McGeoch (1989).**
Gene UL11 of herpes simplex virus type 1 encodes a virion protein which is myristylated.
J Gen Virol **70**: 3147-3157.
- Masse MJ, A Jons, JM Dijkstra, TC Mettenleiter, A Flamand (1999).**
Glycoproteins gM and gN of pseudorabies virus are dispensable for viral penetration and propagation in the nervous systems of adult mice.
J Virol **73**: 10503-10507.

McCracken RM, JB McFerran, C Dow (1973).

The neural spread of pseudorabies virus in calves.
J Gen Virol **20**: 17-28.

McGeoch DJ, S Cook (1994).

Molecular phylogeny of the alphaherpesvirinae subfamily and a proposed evolutionary timescale.
J Mol Biol **238**: 9-22.

McNabb DS, RJ Courtney (1992).

Characterization of the large tegument protein (ICP1/2) of herpes simplex virus type 1.
Virology **190**: 221-232.

Mettenleiter TC (1994).

Pseudorabies (Aujeszky's disease) virus: state of the art. August 1993.
Acta Vet Hung **42**: 153-177.

Mettenleiter TC (2000).

Aujeszky's disease (pseudorabies) virus: the virus and molecular pathogenesis--state of the art, June 1999.
Vet Res **31**: 99-115.

Mettenleiter TC (2002a).

Brief overview on cellular virus receptors.
Virus Res **82**: 3-8.

Mettenleiter TC (2002b).

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

Mettenleiter TC (2003).

Pathogenesis of neurotropic herpesviruses: role of viral glycoproteins in neuroinvasion and transneuronal spread.
Virus Res **92**: 197-206.

Miranda-Saksena M, P Armati, RA Boadle, DJ Holland, AL Cunningham (2000).

Anterograde transport of herpes simplex virus type 1 in cultured, dissociated human and rat dorsal root ganglion neurons.
J Virol **74**: 1827-1839.

Miranda-Saksena M, RA Boadle, P Armati, AL Cunningham (2002).

In rat dorsal root ganglion neurons, herpes simplex virus type 1 tegument forms in the cytoplasm of the cell body.
J Virol **76**: 9934-9951.

Mossman KL, R Sherburne, C Lavery, J Duncan, JR Smiley (2000).

Evidence that herpes simplex virus VP16 is required for viral egress downstream of the initial envelopment event.
J Virol **74**: 6287-6299.

Nishiyama Y, R Kurachi, T Daikoku, K Umene (1993).

The US 9, 10, 11, and 12 genes of herpes simplex virus type 1 are of no importance for its neurovirulence and latency in mice.
Virology **194**: 419-423.

O'Brien V (1998).

Viruses and apoptosis.
J Gen Virol **79**: 1833-1845.

Ogg PD, PJ McDonell, BJ Ryckman, CM Knudson, RJ Roller (2004).

The HSV-1 Us3 protein kinase is sufficient to block apoptosis induced by overexpression of a variety of Bcl-2 family members.
Virology **319**: 212-224.

Ohara PT, AN Tauscher, JH LaVail (2001).

Two paths for dissemination of Herpes simplex virus from infected trigeminal ganglion to the murine cornea.
Brain Res **899**: 260-263.

Osorio FA, DL Rock (1992).

A murine model of pseudorabies virus latency.
Microb Pathog **12**: 39-46.

Pannese E, M Ledda, G Arcidiacono, L Rigamonti, P Procacci (1984).

A comparison of the density of microtubules in the central and peripheral axonal branches of the pseudounipolar neurons of lizard spinal ganglia.
Anat Rec **208**: 595-605.

Panneton WM, GF Martin (1983).

Brainstem projections to the facial nucleus of the opossum. A study using axonal transport techniques.
Brain Res **267**: 19-33.

Paxinos G. (1994).

The nervous system of the rat.
Academic Press, San Diego .

Peeters B, J Pol, A Gielkens, R Moormann (1993).

Envelope glycoprotein gp50 of pseudorabies virus is essential for virus entry but is not required for viral spread in mice.
J Virol **67**: 170-177.

Penfold ME, P Armati, AL Cunningham (1994).

Axonal transport of herpes simplex virions to epidermal cells: evidence for a specialized mode of virus transport and assembly.
Proc Natl Acad Sci U S A **91**: 6529-6533.

Perng GC, C Jones, J Ciacchi-Zanella, M Stone, G Henderson, A Yukht, SM Slanina, FM Hofman, H Ghiasi, AB Nesburn, SL Wechsler (2000).

Virus-induced neuronal apoptosis blocked by the herpes simplex virus latency-associated transcript.
Science **287**: 1500-1503.

Pfister H, KA Remer, M Brcic, R Fatzer, S Christen, S Leib, TW Jungi (2002).

Inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in listeric encephalitis: a cross-species study in ruminants.
Vet Pathol **39**: 190-199.

Priola SA, DP Gustafson, EK Wagner, JG Stevens (1990).

A major portion of the latent pseudorabies virus genome is transcribed in trigeminal ganglia of pigs.

J Virol **64**: 4755-4760.

Priola SA, JG Stevens (1991).

The 5' and 3' limits of transcription in the pseudorabies virus latency associated transcription unit. Virology **182**: 852-856.

Raappana P, J Arvidsson (1993).

Location, morphology, and central projections of mesencephalic trigeminal neurons innervating rat masticatory muscles studied by axonal transport of choleragenoid-horseradish peroxidase.

J Comp Neurol **328**: 103-114.

Ramachandran SP, G Fraser (1971).

Studies on the virus of Aujeszky's disease. II. Pathogenicity for chicks.

J Comp Pathol **81**: 55-62.

Ray N, LW Enquist (2004).

Transcriptional response of a common permissive cell type to infection by two diverse alphaherpesviruses.

J Virol **78**: 3489-3501.

Read GS, BM Karr, K Knight (1993).

Isolation of a herpes simplex virus type 1 mutant with a deletion in the virion host shutoff gene and identification of multiple forms of the vhs (UL41) polypeptide.

J Virol **67**: 7149-7160.

Reynolds AE, BJ Ryckman, JD Baines, Y Zhou, L Liang, RJ Roller (2001).

U(L)31 and U(L)34 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.

Roizman B (1996).

Herpesviridae.

In: Fields, B N (ed): Virology 3rd ed Lippincott, Raven Publ , Philadelphia : 2231-2295.

Roizman B, P Pellet (2001).

The family herpesviridae: a brief introduction.

Virology, 4th edition Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa : 2381-2397.

Salmon B, C Cunningham, AJ Davison, WJ Harris, JD Baines (1998).

The herpes simplex virus type 1 U(L)17 gene encodes virion tegument proteins that are required for cleavage and packaging of viral DNA.

J Virol **72**: 3779-3788.

Sams JM, AS Jansen, TC Mettenleiter, AD Loewy (1995).

Pseudorabies virus mutants as transneuronal markers.

Brain Res **687**: 182-190.

Sanchez V, E Sztul, WJ Britt (2000).

Human cytomegalovirus pp28 (UL99) localizes to a cytoplasmic compartment which overlaps the endoplasmic reticulum-golgi-intermediate compartment.

J Virol **74**: 3842-3851.

Schijns VE, NR Van der, BL Haagmans, DR Bar, H Schellekens, MC Horzinek (1991).

Tumour necrosis factor-alpha, interferon-gamma and interferon-beta exert antiviral activity in nervous tissue cells.

J Gen Virol **72**: 809-815.

Schmidt SP, WA Hagemoser, JP Kluge, HT Hill (1987).

Pathogenesis of ovine pseudorabies (Aujeszky's disease) following intratracheal inoculation.

Can J Vet Res **51**: 326-333.

Shankland WE (2001).

The trigeminal nerve. Part III: The maxillary division.

Cranio **19**: 78-83.

Shimeld C, S Efstathiou, T Hill (2001).

Tracking the spread of a lacZ-tagged herpes simplex virus type 1 between the eye and the nervous system of the mouse: comparison of primary and recurrent infection.

J Virol **75**: 5252-5262.

Shope RE (1931).

An experimental study of 'mad itch' with special reference to its relationship to pseudorabies.

J Exp Med **54**: 233-248.

Smibert CA, B Popova, P Xiao, JP Capone, JR Smiley (1994).

Herpes simplex virus VP16 forms a complex with the virion host shutoff protein vhs.

J Virol **68**: 2339-2346.

Smith GA, SP Gross, LW Enquist (2001).

Herpesviruses use bidirectional fast-axonal transport to spread in sensory neurons.

Proc Natl Acad Sci U S A **98**: 3466-3470.

Sodeik B, MW Ebersold, A Helenius (1997).

Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus.

J Cell Biol **136**: 1007-1021.

Spear PG (2004).

Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry.

Cell Microbiol **6**: 401-410.

Strelow L, T Smith, D Leib (1997).

The virion host shutoff function of herpes simplex virus type 1 plays a role in corneal invasion and functions independently of the cell cycle.

Virology **231**: 28-34.

Strelow LI, DA Leib (1995).

Role of the virion host shutoff (vhs) of herpes simplex virus type 1 in latency and pathogenesis.

J Virol **69**: 6779-6786.

Strelow LI, DA Leib (1996).

Analysis of conserved domains of UL41 of herpes simplex virus type 1 in virion host shutoff and pathogenesis.

J Virol **70**: 5665-5667.

Takahashi H, Y Yoshikawa, C Kai, K Yamanouchi (1993).

Mechanism of pruritus and peracute death in mice induced by pseudorabies virus (PRV) infection.

J Vet Med Sci **55**: 913-920.

Taus NS, B Salmon, JD Baines (1998).

The herpes simplex virus 1 UL 17 gene is required for localization of capsids and major and minor capsid proteins to intranuclear sites where viral DNA is cleaved and packaged.

Virology **252**: 115-125.

Teodoro JG, PE Branton (1997).

Regulation of apoptosis by viral gene products.

J Virol **71**: 1739-1746.

Tirabassi RS, LW Enquist (1998).

Role of envelope protein gE endocytosis in the pseudorabies virus life cycle.

J Virol **72**: 4571-4579.

Tirabassi RS, LW Enquist (1999).

Mutation of the YXXL endocytosis motif in the cytoplasmic tail of pseudorabies virus gE.

J Virol **73**: 2717-2728.

Tomishima MJ, LW Enquist (2001).

A conserved alpha-herpesvirus protein necessary for axonal localization of viral membrane proteins.

J Cell Biol **154**: 741-752.

Tomishima MJ, LW Enquist (2002).

In vivo egress of an alphaherpesvirus from axons.

J Virol **76**: 8310-8317.

Tomishima MJ, GA Smith, LW Enquist (2001).

Sorting and transport of alpha herpesviruses in axons.

Traffic **2**: 429-436.

Topp KS, LB Meade, JH LaVail (1994).

Microtubule polarity in the peripheral processes of trigeminal ganglion cells: relevance for the retrograde transport of herpes simplex virus.

J Neurosci **14**: 318-325.

Umene K (1986).

Conversion of a fraction of the unique sequence to part of the inverted repeats in the S component of the herpes simplex virus type 1 genome.

J Gen Virol **67**: 1035-1048.

Wagenaar F, JM Pol, B Peeters, AL Gielkens, N De Wind, TG Kimman (1995).

The US3-encoded protein kinase from pseudorabies virus affects egress of virions from the nucleus.

J Gen Virol **76**: 1851-1859.

Yoshida A, JO Dostrovsky, BJ Sessle, CY Chiang (1991).

Trigeminal projections to the nucleus submedialis of the thalamus in the rat.
J Comp Neurol **307**: 609-625.

Zhang JD, BR Wang, HM Li, JS Li (1991).

Projections from neurons innervating the masseter muscle to the subnucleus oralis of the spinal trigeminal nucleus and adjacent lateral reticular formation in the rat.
J Hirnforsch **32**: 641-646.

Zhou ZH, DH Chen, J Jakana, FJ Rixon, W Chiu (1999).

Visualization of tegument-capsid interactions and DNA in intact herpes simplex virus type 1 virions.
J Virol **73**: 3210-3218.

Zhu Q, RJ Courtney (1994).

Chemical cross-linking of virion envelope and tegument proteins of herpes simplex virus type 1.
Virology **204**: 590-599.

Zuckermann FA, TC Mettenleiter, C Schreurs, N Sugg, T Ben Porat (1988).

Complex between glycoproteins gI and gp63 of pseudorabies virus: its effect on virus replication.
J Virol **62**: 4622-4626.

Abkürzungen

AK	Aujeszkysche Krankheit
AmpR	Ampicillin-Resistenzgen
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
BSA	Bovines Serumalbumin
BHV-1	Bovines Herpesvirus 1
°C	Grad Celsius
Cy3	Indocarbocyanin
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EHV-1	Equines Herpesvirus 1
FITC	Fluorescein-Isothiocyanate
FKS	Fetales Kälberserum
FR	Formatio reticularis
FRT	FLP-Recombinase Target Site
g	Gramm
GCC	Ganglion cervicale craniale
GD	Ganglion distale n. glossopharyngei et vagi
GFP	Green Fluorescent Protein
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GG	Ganglion geniculi
GP	Ganglion pterygopalatinum
h	Stunde(n)
HBS	Hepes Buffered Saline
HCMV	Humanes Zytomegalievirus
HE	Hämatoxylin/Eosin-Färbung

HSV-1	Herpes simplex Virus Typ 1
IIFT	Indirekter Immunfluoreszenztest
ISH	In-situ-Hybridisierung
Ka	Kaplan
KanR	Kanamycin-Resistenzgen
kbp	Kilobasenpaar(e)
LATs	Latenz-assoziierte-Transkripte
LB	Luria-Bertani-Medium
M	Molar
M.	Musculus
Me5	Nucleus mesencephalici n. trigemini
MDV	Marek's Disease Virus
min	Minute(n)
ml	Milliliter
N. (n.)	Nervus (nervi)
NA	Nucleus ambiguus
NeuN	Neuronen-spezifisches Kernprotein
NF	Nucleus facialis
NFP	Neurofilamentprotein
NG	N. glossopharyngeus
NH	Nucleus motorius n. hypoglossi
NI	N. intermedius
NPGV	Nucleus parasympath n. glossopharyngei et vagi
NTS	Nucleus tractus solitarius
NV	N. vagus
OD	Optische Dichte
ORF	Open Reading Frame
pi	Post infectionem
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction

PFA	Paraformaldehyd
pfu	Plaque Forming Units
PIPES	Piperazin-1,4-bis (2-ethansulfonsäure)
PNS	Peripheres Nervensystem
PolyA	Polyadenylierungssignal
Pr5	Nucleus sensibilis pontinus n. trigemini
PrV	Pseudorabiesvirus
RT	Raumtemperatur
RK13	Rabbit Kidney Cells 13
rpm	Rounds Per Minute
s	Sekunde(n)
SC	Somatosensorischer Kortex
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sp5C	Nucleus tractus n. trigemini caudalis
SSC	Standard Saline Citrate
SSPE	Standard Saline Phosphate EDTA
TA	Tris-Azetat-Puffer
TAE	Tris-Azetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris Buffered Saline
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEN	Tris-EDTA-Natriumchlorid-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TG	Ganglion trigeminale
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TNF	Tumornekrosefaktor
UL	Unique Long Region
US	Unique Short Region
üN	Über Nacht
UV	Ultraviolett
vhs	Viral Host Cell Shutoff

VPM	Nucleus ventroposteriomedialis thalami
VZV	Varicella-Zoster Virus
W	Watt
ZNS	Zentrales Nervensystem

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. T. C. Mettenleiter möchte ich mich herzlich für die Aufnahme in das Institut, die Überlassung des Themas, die Unterstützung bei den Publikationen und die anregenden Vorschläge sowie die Freiräume während der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

Herrn PD Dr. J. P. Teifke danke ich besonders für die intensive Betreuung, die umfangreiche und exzellente pathomorphologische Ausbildung, die Integration in seine wissenschaftlichen Arbeiten und die Geduld bei der Korrektur dieser Arbeit.

Herrn Dr. W. Fuchs, Frau Dr. B. G. Klupp und Frau Dr. M. Kopp haben mir mit ihrem großen molekularbiologischen Wissen bei der Herstellung der PrV-Mutanten sehr geholfen. Mit der Bereitstellung der vielen PrV-Deletionsmutanten haben sie die Basis dieser Arbeit geschaffen.

Herrn Dr. Ch. Wetzel und Herrn N. Damann möchte ich herzlich für die Hilfe bei der Anfertigung der Zeitrafferaufnahmen am konfokalen Laser-Scan-Mikroskop an der Ruhr-Universität Bochum danken.

Herrn Prof. Dr. E. Weiß, Frau Prof. Dr. I. Käufer-Weiß, Herrn Dr. V. Kaden und Herrn Dr. J. Beier danke ich für die aufwendige und kritische Durchsicht und Korrektur dieser Arbeit.

Frau Chem-Ing. G. Czerwinski und Frau G. Busch danke ich für die geduldige und zügige Einführung in die histopathologischen und immunhistologischen Labormethoden und meinen Mitdoktoranden I. v. Felbert und K. Saenger für die gute Stimmung und die unkomplizierte Zusammenarbeit. Allen nicht namentlich genannten Kollegen, Mitarbeitern und Freunden am Friedrich-Loeffler-Institut danke ich für das angenehme Arbeitsklima.

Bei meiner Familie bedanke ich mich für die ausdauernde emotionale und finanzielle Unterstützung während meiner langen Ausbildungszeit und dafür, daß sie mir immer ein warmes Zuhause gegeben haben.

Constanze danke ich für ihre unermüdliche Unterstützung, ihren erfrischenden Optimismus, ihr Verständnis, wenn es mal länger dauerte und die schöne Zeit mit ihr an der vorpommerschen Ostseeküste.

ISBN 3-938026-30-8



Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH
35392 Gießen · Frankfurter Str. 89 · Tel.: 06 41/2 44 66 · Fax: 06 41/2 53 75
e-mail: [Geschaeftsstelle @dvg.net](mailto:Geschaeftsstelle@dvg.net) · Homepage: <http://www.dvg.net>