

# Klonierung und Mutagenese des Bovinen Herpesvirus Typ 1 als ein infektiöses künstliches bakterielles Chromosom (bacterial artificial chromosome, BAC)

Sascha Trapp

### ► To cite this version:

Sascha Trapp. Klonierung und Mutagenese des Bovinen Herpesvirus Typ 1 als ein infektiöses künstliches bakterielles Chromosom (bacterial artificial chromosome, BAC). Life Sciences [q-bio]. 2003. German. NNT: . tel-02831133

# HAL Id: tel-02831133 https://hal.inrae.fr/tel-02831133

Submitted on 7 Jun2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés. Aus dem Institut für Molekularbiologie der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Insel Riems Präsident: Prof. Dr. T. C. Mettenleiter

Angefertigt unter der Leitung von PD Dr. M. G. Beer, Institut für Virusdiagnostik der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Insel Riems

Eingereicht über Prof. Dr. O.-R. Kaaden, Vorstand des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

# Klonierung und Mutagenese des Bovinen Herpesvirus Typ 1 als ein infektiöses künstliches bakterielles Chromosom (bacterial artificial chromosome, BAC)

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

> von Sascha Trapp aus Witten

München 2003

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

- Dekan: Univ.-Prof. Dr. R. Stolla
- 1. Referent: Univ.-Prof. Dr. O.-R. Kaaden
- 2. Referent: Univ.-Prof. Dr. W. Klee
- 1. Korreferent: Univ.-Prof. Dr. R. Schulz
- 2. Korreferent: Univ.-Prof. Dr. K. Pfister
- 3. Korreferent: Univ.-Prof. Dr. M. H. Erhard

Tag der Promotion: 7. Februar 2003

Meinen Eltern

Teile dieser Arbeit wurden publiziert:

Sascha Trapp, Nikolaus Osterrieder, Günther M. Keil und Martin Beer (2003). Mutagenesis of a Bovine Herpesvirus Type 1 genome cloned as an infectious bacterial artificial chromosome: Analysis of glycoprotein E and G double deletion mutants. *Journal of General Virology* 84, 301 - 306.

Inha	ltsve	rzei	chn	is
mma	11340	1201		13

1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	2
2.1 Klinik und Pathogenese von Infektionen mit dem Bovinen Herpesvirus-1	2
2.2 Klassifizierung und Struktur des Bovinen Herpesvirus-1	3
2.3 BHV-1-Immunologie	5
2.4 Vakzinierung gegen BHV-1-Infektionen	6
2.5 Replikation der Alphaherpesviren	8
2.6 Methoden der Herpesvirus-Mutagenese	13
3. Material und Methoden	18
3.1 Material	18
3.1.1 Zellen	18
3.1.2 Virusstämme	18
3.1.3 Bakterien und Plasmide	18
3.1.3.1 Bakterien	18
3.1.3.2 Plasmide	18
3.1.4 Antikörper	18
3.1.4.1 Monoklonale Antikörper	18
3.1.4.2 Sekundäre Antikörper	19
3.1.5 Chemikalien	19
3.1.6 Enzyme	22
3.1.7 Lösungen und Puffer	22
3.1.8 Geräte, Laborhilfsmittel und Verbrauchsmaterialien	28
3.2 Methoden	30
3.2.1 Zellkultur und Virusanzucht	30
3.2.1.1 Zellkultur	30
3.2.1.2 Vermehrung von Viren in Zellkultur	30
3.2.1.3 Virustitration	30
3.2.1.4 Kontroll-Zellkulturüberstände (mock)	30
3.2.1.5 Gewinnung von Zellysaten	31
3.2.2 Konstruktion rekombinanter Viren	31
3.2.2.1 Präparation von Virus-DNA	31

3.2.2.2 DNA-Transfektion in eukaryotische Zellen	31
3.2.2.2.1 CaPO <sub>4</sub> -Transfektion	31
3.2.2.2 Lipofektion	32
3.2.2.3 Plaquereinigung	33
3.2.3 Charakterisierung rekombinanter Viren in vitro	33
3.2.3.1 Plaquegrößenbestimmung	33
3.2.3.2 Ein-Schritt-Wachstumskinetiken	33
3.2.4 DNA-Analysen	34
3.2.4.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen mittels Adsorptionsspektrometrie	34
3.2.4.2 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen (Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus, RFLP)	34
3.2.4.3 DNA-Charakterisierung durch DNA-DNA-Hybridisierung (Southern-Blot-Hybridisierung)	35
3.2.5 Klonierung rekombinanter DNA	36
3.2.5.1 Präparation von DNA-Fragmenten	36
3.2.5.2 <i>Fill-in</i> (Klenow)-Reaktion	37
3.2.5.3 Dephosphorylierung von DNA	37
3.2.5.4 Ligation	37
3.2.5.5 TOPO TA Cloning <sup>®</sup>	37
3.2.5.6 Amplifikation von DNA-Fragmenten mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	38
3.2.6 Transformation von Bakterien	43
3.2.6.1 Transformation elektrokompetenter Bakterien mit viraler BAC-DNA	43
3.2.6.2 Transformation chemisch kompetenter Bakterien mit Plasmiden	42
3.2.6.3 Präparation rekombinationskompetenter Bakterien	44
3.2.6.4 RecE/T-Mutagenese	45
3.2.6.5 Schnell ("Mini")-präparation bakterieller Plasmid-DNA	45
3.2.6.6 Präparation von Plasmid-DNA im großen Maßstab ("Maxipräparation")	45
3.2.6.7 Anlegen einer Bakteriendauerkultur	46
3.2.7 Proteinnachweise	46
3.2.7.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	46
3.2.7.2 Darstellung von Proteinen durch Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung	47
3.2.7.3 Elektrotransfer und Immunodetektion von Proteinen (Western Blotting)	47

3.2.7.4 Indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT)	48
4. Ergebnisse	49
4.1 Konstruktion und Phänotypisierung des BHV-1-BAC	49
4.1.1 BHV-1-BAC-Konstruktion	49
4.1.2 Genotypische pBHV-1∆gE 2- und pBHV-1∆gE 7-Charakterisierung	52
4.1.3 BHV-1∆gE-Rekonstituierung aus pBHV-1∆gE-DNA	54
4.1.4 Konstruktion der Revertante BHV-1rev	54
4.1.5 Western-Blot-Analyse der rekombinanten Viren	54
4.1.6 BHV-1∆gE-Wachstumsanalyse	57
4.1.6.1 Plaquegrößenbestimmung	57
4.1.6.2 Ein-Schritt-Wachstumskinetiken	57
4.2 BHV-1-RecE/T-Mutagenese	60
4.2.1 Konstruktion und Phänotypisierung der BHV-1∆gE-gG-Doppelmutante	60
4.2.1.1 Konstruktion der BHV-1∆gE-gG-Mutante	60
4.2.1.2 Konstruktion der Revertante BHV-1∆gG	60
4.2.1.3 Genotypische Charakterisierung der BHV-1∆gE-gG- und BHV-1∆gG-Mutanten	63
4.2.1.4 Analyse der gE- und gG-Expression durch indirekte Immunfluoreszenz (IIFT)	63
4.2.1.5 BHV-1∆gE-gG-Wachstumsanalyse	66
4.2.1.5.1 Plaquegrößenbestimmung	66
4.2.1.5.2 Ein-Schritt-Wachstumskinetiken	66
4.2.2 Konstruktion und Phänotypisierung der BHV-1∆gE-gM-Doppelmutante	69
4.2.2.1 Konstruktion der BHV-1∆gE-gM-Mutante	69
4.2.2.2 Genotypische Charakterisierung der BHV-1∆gE-gM-Mutante	69
4.2.2.3 BHV-1∆gE-gM-Wachstumsanalyse	72
4.2.2.3.1 Plaquegrößenbestimmung	72
4.2.2.3.2 Ein-Schritt-Wachstumskinetiken	72
4.2.3 Konstruktion der pBHV-1∆gE-gK-Doppelmutante	75
4.2.3.1 pBHV-1∆gE-gK-Konstruktion	75
4.2.3.2 Genotypische pBHV-1∆gE-gK-Charakterisierung	75

5. Diskussion	79
5.1 Charakterisierung des infektiösen BHV-1-BAC-Klones BHV-1∆gE <i>in vitro</i>	79
5.2 Charakterisierung der Doppelmutante BHV-∆gE-gG in vitro	81
5.3 Charakterisierung der Doppelmutante BHV-1∆gE-gM in vitro	84
5.4 Charakterisierung der Doppelmutante BHV-1∆gE-gK in vitro	87
6. Zusammenfassung	89
6. Summary	90
7. Literatur	91
8. Anhang	105
Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	

#### 1. Einleitung

Das Bovine Herpesvirus Typ 1 (BHV-1), ein Mitglied der Familie der *Herpesviridae*, ist ein weltweit verbreiteter Infektionserreger. Es verursacht Erkrankungen des Respirationstraktes, Rückgang der Milch- und Mastleistung, Störungen der Reproduktionsrate sowie Aborte in der Rinderpopulation (Gibbs und Rweyemamu, 1977).

Durch Handelsbeschränkungen innerhalb der Europäischen Union (EU) für BHV-1-positive Rinder entstehen der Landwirtschaft der Bundesrepublik Deutschland ökonomische Schäden. Daher wird seit 1997 im Sinne der Verordnung zum Schutz der Rinder vor einer Infektion mit dem Bovinen Herpesvirus Typ 1 die BHV-1-Infektion bei Rindern als anzeigepflichtige Tierseuche bekämpft. In dem föderalen System der Bundesrepublik werden von den Ländern zwei grundsätzlich unterschiedliche Strategien der BHV-1-Eradikation verfolgt. Das konventionelle Konzept, das beispielsweise in Bayern Anwendung findet, sieht die Diagnostik und Merzung seropositiver Rinder ohne Impfung vor. Andere Länder mit einem höheren Durchseuchungsgrad, wie z. B. Mecklenburg-Vorpommern, versuchen mit Hilfe des Markerkonzeptes nach dem Vorbild der Bekämpfung der Aujesky'schen Erkrankung das Feldvirus aus der Rinderpopulation sukzessive zu verdrängen. Dieses Konzept basiert auf sogenannten Marker- oder DIVA- (differentiating infected from vaccinated animals) Impfstoffen, bei denen das Glykoprotein E (gE) deletiert ist (Van Oirschot, 1999). BHV-1-Markervakzinen schützen ebenso verlässlich wie konventionelle Impfstoffe vor einer BHV-1-Erkrankung und bieten darüber hinaus die Möglichkeit, geimpfte von feldinfizierten Rindern serologisch unterscheiden zu können (Kaashoek et al., 1994; Van Oirschot et al., 1997). Markerimpfung und Markerdiagnostik sind jedoch mit Problemen behaftet, die sich beispielsweise in einer unbefriedigenden Sensitivität der gE-Serologie ausdrücken (de Wit et al., 1998).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Genom des BHV-1-Stammes Schönböken erstmals als ein infektiöses künstliches bakterielles Chromosom (*Bacterial Artificial Chromosome*, BAC) zu klonieren. Mit Hilfe der BAC-Technologie, die in den letzten Jahren die Herpesvirusforschung revolutioniert hat (Brune et al., 2000), sollten Doppelmutanten generiert werden, bei denen gE und weitere BHV-1-Glykoproteine deletiert sind. Die Glykoproteine G (gG), gM und gK sollten auf ihre Funktionen beim BHV-1-Wachstum *in vitro* und mögliche funktionelle Interaktionen mit gE untersucht werden. Die Analyse des Wachstumsverhaltens der BHV-1-Mutanten sollte außerdem Aufschluss darüber geben, ob die Doppelmutanten prinzipiell für die Entwicklung künftiger BHV-1-Doppel-Markervakzinen in Frage kommen.

## 2. Literaturübersicht

#### 2.1 Klinik und Pathogenese von Infektionen mit dem Bovinen Herpesvirus-1

Herpesviren (*herpein*, griech.= schleichen, kriechen; *virus*, lat.= Gift) sind im Tierreich weit verbreitete Krankheitserreger, die bei zahlreichen Vertebratenspezies nachgewiesen werden konnten. Bisher sind vier Bovine Herpesviren (BHV) beschrieben: BHV-1, BHV-2, BHV-4 und BHV-5 (Schwyzer und Ackermann, 1996). BHV-2-Infektionen manifestieren sich klinisch meist nur bei immunsupprimierten Rindern als Bovine Herpesvirus-Mammilitis (Scott, 1989). Infektionen mit dem BHV-4 kann man kein bestimmtes Krankheitsbild zuordnen (Thiry et al., 1989), und das Virus wird darum auch als bovines *orphan-Herpesvirus* bezeichnet. BHV 5- Infektionen sind in Teilen Südamerikas und Australiens endemisch und verursachen bei Kälbern Polioenzephalitiden (Wyler et al., 1989).

Beim Bovinen Herpesvirus Typ 1 unterscheidet man zwei Subtypen, die mit unterschiedlichen Krankheitsbildern assoziiert sind. BHV-1.1 ist kausatives Agens der Infektiösen Bovinen Rhinotracheitis (IBR), einer Erkrankung des Respirationstraktes, die zuerst in den 1950er Jahren in den USA beschrieben wurde (Miller, 1955). Die Übertragung des Virus erfolgt hauptsächlich aerogen durch Tröpfcheninfektion, ausgehend von klinisch erkrankten, oder in der Inkubation befindlichen, sowie latent infizierten Tieren. Darüber hinaus spielen belebte und unbelebte Vektoren eine Rolle. Die Inkubationszeit beträgt zwei bis sechs Tage. Erste Anzeichen der Krankheit bestehen in vermehrtem serösem Nasenausfluss, der progressiv seromukös und final, als Folge von bakteriellen Superinfektionen, mukopurulent wird. Diese äußerlichen klinischen Erscheinungen werden von hohen Körpertemperaturen, die 41°C übersteigen können, begleitet. Die Morbidität der IBR kann bis zu 100% betragen, die Mortalität liegt zwischen zwei und 12% (Gibbs und Rweyemamu, 1977; Straub, 1975; Yates, 1982).

BHV-1.2 ist assoziiert mit der Infektiösen Pustulösen Vulvovaginitis (IPV) oder Infektiösen Balanoposthitis (IBP) (Edwards et al., 1990). IPV und IBP sind in Europa schon seit 1841 bekannt (Greig et al., 1958). Die Übertragung erfolgte früher hauptsächlich durch den Deckakt. Dieser Übertragungsmodus wurde jedoch durch die künstliche Besamung weitgehend eliminiert. Zwischen weiblichen Tieren erfolgt die Ansteckung meist mechanisch durch Verschmieren von virushaltigem Vaginalschleim beim Schwanzschlagen. Inkubationszeit und Anstieg der Körpertemperatur sind weitgehend identisch mit der IBR. Klinisch manifestiert sich die Infektion als Exanthem der kutanen Vulvovaginal- bzw. Präputialschleimhaut. Beide BHV-1-Subtypen stehen darüber hinaus im kausalen

Zusammenhang mit Aborten sowie Konjunktivitis oder Keratokonjunktivitis (Gibbs und Rweyemamu, 1977). Von epidemiologischer Bedeutung ist die Fähigkeit des BHV-1, latente Infektionen in Ganglienzellen zu etablieren (Ackermann et al., 1982). Nach Infektion der Nasen- oder Rachenschleimhaut mit BHV-1 kommt es dort und in den regionären Lymphknoten zur primären Virusvermehrung. Anschließend wandert das Virus anterograd über sensorische Fasern des fünften Gehirnnervs (Nervus Trigeminus) in das entsprechende Ganglion, um dort eine Latenz zu etablieren und in dieser zu verbleiben. Während der Latenzphase unterbleibt die virale Replikation, und es werden keine BHV-1-Virionen lebenslange Virusträger. gebildet. Einmal infizierte Tiere sind somit Durch Immunsuppression und natürlich auftretende Stresssituationen wie Transport, Geburt und klinische Erkrankung kann die latente Infektion reaktiviert werden. BHV-1 gelangt dann retrograd zu den Schleimhäuten des oberen Respirationstraktes, repliziert dort zu hohen Virustitern und wird ausgeschieden (Engels und Ackermann, 1996; Pastoret et al., 1980; Pastoret et al., 1982). Bei der IPV/IBP gilt in analoger Weise, dass das Virus in der Genitalschleimhaut repliziert und in den Sakralganglien Latenz etabliert (Gibbs und Rweyemamu, 1977). Neben dem natürlichen Wirt vermag BHV-1 Schafe und Ziegen zu infizieren, ohne aber ein Krankheitsbild zu provozieren (Hage et al., 1997; Six et al., 2001).

#### 2.2 Klassifizierung und Struktur des Bovinen Herpesvirus-1

Das Bovine Herpesvirus 1 ist ein Mitglied der Familie der *Herpesviridae*. Herpesviren sind durch einen einheitlichen Aufbau gekennzeichnet und bestehen aus vier morphologisch unterscheidbaren Strukturen, dem *Core*, dem Kapsid, dem Tegument und der Virushülle (*Envelope*). Das *Core*, ein Nukleoprotein, mit dem das doppelsträngige, lineare DNA-Genom assoziiert ist, ist umschlossen von dem ikosaedrischen Kapsid, das aus 162 Untereinheiten, den sogenannten Kapsomeren (150 Hexonen und 12 Pentonen) besteht. *Core* und Kapsid bilden gemeinsam das Nukleokapsid, und werden von einer Proteinmatrix, dem sogenannten Tegument umgeben, das wiederum umhüllt ist von einer Lipidmembran zellulären Ursprungs, in die virale (Glyko)Proteine inseriert sind (Mettenleiter, 2002).

Nach biologischen Kriterien wird die Familie der *Herpesviridae* von dem *International Comittee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) in die Subfamilien *Alpha-, Beta-,* und *Gammaherpesvirinae* unterteilt. Zu den human- und veterinärmedizinisch relevanten Alphaherpesviren zählen neben BHV-1, das Herpes simplex Virus Typ 1 und 2 (HSV-1, HSV-2), das Varicella Zoster Virus (VZV), das Pseudorabies Virus (PRV), das Equine Herpesvirus Typ 1 (EHV-1), das *Marek's disease virus* Typ 1 (MDV-1) und das BHV-5 (van

Regenmortel et al., 2000). Alphaherpesviren sind durch ein relativ weites Wirtsspektrum, kurze Replikationszyklen und rasches Viruswachstum *in vitro* gekennzeichnet (Roizman et al., 1981).

Hinsichtlich ihrer genomischen Organisation werden Herpesviren in die Gruppen A-F eingeteilt. Das ca. 136 Kilobasenpaare (kbp) umfassende BHV-1-Genom setzt sich zusammen aus singulären (*unique*) Segmenten unterschiedlicher Länge. Das kürzere der beiden Segmente, die sog. *Unique Short*-Region (U<sub>S</sub>) wird von zwei identischen repetitiven Genomabschnitten, den *Internal* bzw. *Terminal Repeats* (IR, TR) flankiert. Die IR-Region trennt die U<sub>S</sub> von der sogennanten *Unique Long-Region* (U<sub>L</sub>) (Abbildung 1). Diese Organisation entspricht der eines herpesviralen Genoms der Gruppe D (Roizman, 1996). Die zur Gruppe D der herpesviralen Genome gehörenden Spezies bilden während der Replikation zwei äquimolare Formen der DNA, die sich hinsichtlich der Orientierung der *Unique Short* relativ zur *Unique Long* unterscheiden (Wirth et al., 1991; Abbildung 1).

Das vollständig sequenzierte BHV-1 kodiert für mehr als 70 virale Proteine. Bis heute sind für BHV-1 33 Struktur- und 15 Nichtstrukturproteine beschrieben worden. Sequenzvergleiche mit anderen Alphaherpesviren zeigen, dass die Anordnung der Gene weitgehend kolinear ist (McGeoch et al., 1995)



## Abbildung 1

Genomische Organisation des Bovinen Herpesvirus Typ 1

 $U_L$  = Unique Long-Region,  $U_S$  = Unique Short-Region, IR = Internal Repeat, TR = Terminal Repeat. Die Pfeile bezeichnen die alternative Leserichtung der Unique short.

#### 2.3 BHV-1-Immunologie

Die BHV-1-Infektion provoziert sowohl eine unspezifische als auch eine spezifische Immunantwort (Babiuk et al., 1996). Als Ausdruck der unspezifischen Immunität produzieren infizierte Zellen Interferon  $\alpha$  und  $\beta$ . Die parakrin sezernierten Interferone diffundieren in das umgebende Gewebe und binden an zelluläre Interferonrezeptoren. Diese Bindung löst in den Zielzellen eine Signalkaskade aus, die in der Etablierung eines antiviralen Status, der Reprimierung des Zellzyklus und der Freisetzung weiterer Zytokine resultiert. Die Faktoren des Komplementsystems stellen weitere lösliche Mediatoren der unspezifischen BHV-1 Immunität dar. Verschiedene Zelltypen wie Makrophagen, neutrophile Granulozyten und Natürliche Killerzellen sind ebenfalls an unspezifischen Abwehrmechanismen beteiligt (Campos et al., 1989; Denis et al., 1994).

Die spezifische Immunantwort basiert neben der Bildung von Antikörpern durch B-Lymphozyten (humorale Immunität) auf der T-Zell-Immunität. Innerhalb von 2 Wochen *post infectionem* (p. i.) sind im Serum Immunglobuline (Ig), zunächst IgM später IgG, detektierbar, die über Jahre persistieren können (Van der Poel et al., 1995). Gegen die BHV-1-Hauptimmunogene, die Glykoproteine B und D (gB und gD), sind bereits 8 bis 14 Tage p. i. Antikörper nachweisbar, gegen das weniger immunogene gE erst nach 14 bis 35 Tagen (Kaashoek et al., 1998). In den Schleimhäuten werden als primäre Barriere gegen die Infektion lokal Immunglobuline der Klasse A (IgA) sezerniert, die etwa 6 bis 8 Wochen persistieren. Nach einer Reinfektion oder -aktivierung eines latent infizierten Tieres kommt es zu einer sekundären anamnestischen Immunantwort mit einem erneuten Anstieg der Antikörpertiter innerhalb weniger Tage. Kälber BHV-1-positiver Kühe erhalten über die Kolostralmilch Antikörper, die monatelang nachweisbar sind. Diese maternalen Antikörper schützen die Neonaten zwar vor einer klinischen Erkrankung, behindern aber auch die Ausbildung einer aktiven Immunität nach Vakzination (Lemaire et al., 2000).

Die neutralisierende Wirkung virusspezifischer Antikörper beruht darauf, dass die Virionen, infolge der Bindung der Immunglobuline an Glykoprotein C (gC), gB und gD nicht mehr an die Wirtszelle adsorbieren können (McLain und Fuller, 1994). Diese Fähigkeit der Antikörper zur Virusneutralisation ist aber nur bis zum Auftreten erster entzündlicher Läsionen effektiv, da sich das Virus nun unbeeinflusst von zirkulierenden Antikörpern von Zelle zu Zelle (*cellto-cell spread*, CTCS) ausbreiten kann (Babiuk et al., 1996). Die intrazellulären Viren können während dieser Phase des lytischen Replikationszyklus vornehmlich von zytotoxischen (CD8<sup>+</sup>) T-Lymphozyten bekämpft werden. CD8<sup>+</sup> T-Zellen üben darüber hinaus durch Interleukinfreisetzung und Induktion viele andere nichtlytische Funktionen aus. Sogenannte T-Helferzellen (CD4<sup>+</sup>) haben eine ausschließlich immunmodulatorische Wirkung. Sie produzieren selbst oder induzieren die Produktion von Interleukinen, aktivieren dadurch Makrophagen und kooperieren mit B-Lymphozyten. Obwohl bei den meisten viralen Infektionen T-Lymphozyten das Hauptinstrument der Erregerbekämpfung darstellen, ist über ihre Rolle bei der BHV-1-Infektion bisher wenig bekannt. Es wird allerdings spekuliert, dass die spezifische zelluläre Immunität überaus wichtig ist für die Eliminierung lytischer Infektionen (Babiuk et al., 1996).

#### 2.4 Vakzinierung gegen BHV-1-Infektionen

Da bei einer BHV-1-Infektion therapeutische Erfolge auf die Bekämpfung von Symptomen und die Verhinderung bakterieller Sekundärinfektionen durch Antibiotikagaben beschränkt sind, ist die prophylaktische Impfung der Rinder ein wichtiges Instrument der BHV-1-Bekämpfung. Die Impfung schützt die Tiere zwar zuverlässig vor einer klinischen Erkrankung, verhindert aber nicht die permissive oder latente Infektion mit dem Feldvirus (Kaashoek et al., 1996). Durch den Impfschutz kann jedoch die Ausscheidung von Feldviren soweit reduziert werden, dass die Ansteckung von Nachbartieren eingeschränkt wird. Zum Einsatz kommen Lebendimpfstoffe oder inaktivierte Vakzinen (Van Oirschot et al., 1996a). Lebendimpfstoffe besitzen den Vorteil, dass sie auch zur Notimpfung eingesetzt werden können, um eine weitere Ausbreitung im Bestand zu verhindern. Die schnellste Wirkung wird bei intranasaler Applikation des Lebendimpfstoffes erzielt, die bereits innerhalb von Stunden zu einer lokalen Schleimhautimmunität führt (Kaashoek und Van Oirschot, 1996). Inaktivierte Vakzinen schützen vor klinischer Erkrankung, sollten aber nur in Beständen ohne aktuelles klinisches Geschehen eingesetzt werden.

Aufgrund der gesetzlichen Regelung dürfen in der Bundesrepublik Deutschland zur Impfung gegen BHV-1 nur noch Markervakzinen mit einer Deletion des Glykoprotein E eingesetzt werden. Nur in Ausnahmefällen wird der Einsatz von konventionellen Impfstoffen in Mastbeständen und zur Reagentenimpfung gestattet. Markervakzinen sind Impfstoffe basierend auf Vakzinestämmen, die strukturell so verändert sind, dass Vakzine- und Feldvirus durch die Provokation eines heterologen Antikörperprofils unterscheidbar sind (Van Oirschot et al., 1996b). In der EU werden diese Impfstoffe akronymisch als DIVA-Vakzinen (*differentiating infected from vaccinated animals*) bezeichnet (Van Oirschot, 1999). Es existieren in der Veterinärmedizin verschiedene Ansätze für Markerimpfstoffe: Positiv-Marker- und *Subunit*-Vakzinen sowie Negativ-Markervakzinen. Positiv-Marker-Vakzinen unterscheiden sich von Feldviren darin, dass sie ein zusätzliches Immunogen beinhalten. Ein

großer Nachteil dieses Markerprinzips ist, dass Feldvirusinfektionen *post vaccinationem* (p. v.) nicht mehr nachgewiesen werden können. Von *Subunit*-Impfstoffen spricht man, wenn nur einzelne, besonders immunogene Proteine des Erregers als Vakzine verwendet werden. Für das, durch virale (Adeno- und Bakulovirus) Vektoren exprimierte, Glykoprotein D (gD) konnte eine Eignung als BHV-1-*Subunit*-Vakzine gezeigt werden (Abdelmagid et al., 1998; Gogev et al., 2002). Die in ein Expressionsplasmid klonierte, für gD kodierende Nukleotidsequenz wurde darüber hinaus erfolgreich als DNA-Vakzine eingesetzt (Lewis et al., 1999; Loehr et al., 2001). Negativ-Markervakzinen basieren auf Virusstämmen, bei denen ein Gen teilweise oder vollständig deletiert ist (Deletionsmutanten). Solche Mutanten können auf natürlichen Wege entstehen oder gentechnisch hergestellt werden. Beim Einsatz der Negativ-Markervakzinen ist eine Feldvirus-Infektion auch p. v. detektierbar. Einen weiteren Vorteil bietet die Möglichkeit, sowohl Lebend-, als auch inaktivierte Impfstoffe herzustellen. Summiert man die Vor- und Nachteile der unterschiedlichen Markerprinzipien, stellt sich der Einsatz von Negativ-Markervakzinen das erfolgversprechendste Konzept dar.

Die gE-deletierten Impfviren, die bis heute in der EU als Negativ-Markervakzine eingesetzt werden, gehen sämtlich auf nicht-gentechnisch entstandene BHV-1-Labormutanten zurück, deren genetische Information für das Glykoprotein E (gE) durch in vitro-Passagierung verloren ging (Kaashoek et al., 1994; Rijsewijk et al., 1993; van Engelenburg et al., 1994). Da die Impfviren nicht mehr in der Lage sind gE zu exprimieren, können damit vakzinierte Rinder keine Antikörper gegen gE bilden. Verschiedene veterinärpharmazeutische Firmen vertreiben heute Markerimpfstoffe bestehend aus inaktivierten oder vermehrungsfähigen Impfviruspräparationen. Deletions-Markervakzinen müssen einerseits, wie herkömmliche Impfstoffe, Ansprüchen hinsichtlich Wirksamkeit und Verträglichkeit genügen, andererseits aber auch den besonderen Anforderungen an die Markereigenschaften gerecht werden. Da die Differenzierung feldvirusinfizierter und markervakzinierter Rinder auf der serologischen Untersuchung auf gE-Antikörper basiert, werden an die Leistungsfähigkeit der Markertests ebenfalls hohe Anforderungen gestellt. Bisher stehen zum Nachweis von Antikörpern gegen gE ausschließlich ELISA (enzyme linked immunoassay)-Systeme, die als sogenannte Blocking-Tests funktionieren, zur Verfügung (Van Oirschot et al., 1997). Quantifiziert wird mit diesen Systemen die Inhibition der Bindung eines gE-spezifischen monoklonalen Antikörpers (mAk) durch die zu untersuchende Serum- respektive Plasmaprobe. Im Vergleich zu markerunabhängigen BHV-1-Nachweissystemen (BHV-1-gB-Antikörper-ELISA, indirekter BHV-1-Antikörper-ELISA, Neutralisationstest) sind Sensitivität und Spezifität der gE-Serodiagonistik aber erheblich eingeschränkt (de Wit et al., 1998). Der von dem

#### Literaturübersicht

Nationalen BHV-1-Referenzlabor initiierte, nationale BHV-1-Ringversuch ergab u. a., dass alle bis heute kommerziell erhältlichen gE-Blocking-ELISA-Systeme für die Tankmilchuntersuchung sogar völlig ungeeignet sind (Reichelt und Beer, 2002). Weitere Probleme des Markerkonzeptes ergeben sich aus der Tatsache, dass das Glykoprotein E im Vergleich zu gB, gC und gD bei BHV-1 nur mäßig immunogen ist. Die gE-Antikörperbildung feldvirusinfizierter Rinder fällt deshalb inhomogen und verzögert aus. Das gilt insbesondere für zuvor geimpfte Rinder, die erst spät oder teilweise gar nicht gegen gE serokonvertieren (König et al., unpublizierte Daten). In Anbetracht dieser Mängel gibt es Bestrebungen das Markerkonzept, einerseits hinsichtlich der Serodiagnostik durch Entwicklung sensitiver und spezifischer Testsysteme, andererseits hinsichtlich der Markerimpfstoffe, zu verbessern. Auf der Basis des bisher etablierten gE-Negativ-Marker-Prinzips, könnten Doppelmarkervakzinen mit einer zusätzlichen Deletion eines immunogenen Strukturproteins hierfür ein probates Mittel sein. Der Einsatz von Doppelmarkervakzinen verspricht die Möglichkeit, Serum- oder Plasmaproben, die in der serologischen Untersuchung auf gE-Antikörper kein eindeutiges Ergebnis erbracht haben, zusätzlich auf Antikörper gegen das zweite deletierte Immunogen untersuchen zu können. Dadurch würde sich die Sensitivität der Markerdiagnostik bei fraglichen Einzelproben deutlich erhöhen. Als Kandidaten für eine zusätzliche Deletion kommen notwendigerweise aber nur Proteine in Frage, die bei feldvirusinfizierten Rindern eine befriedigende Immunantwort provozieren. Darüber hinaus sollten Impfviren mit einer Doppeldeletion nach wie vor replikationsfähig sein, einerseits um sich als Lebendvakzine im Impfling vermehren zu können, andererseits um eine ausreichende Virusnachkommenschaft für die Präparation inaktivierter Vakzinen zu gewährleisten. Über die immunogenen Eigenschaften der BHV-1-Glykoproteine G, K und M (gG, gK und gM) ist bisher wenig bekannt. Interessanterweise wurde bei EHV-1 eine gM-Deletionsmutante beschrieben, die eine effektivere Immunantwort evoziert hat, als der Ausgangsstamm RacH (Osterrieder et al., 2001).

#### 2.5 Replikation der Alphaherpesviren

Die Replikation aller Herpesviren verläuft nach einem prinzipiell gleichen Schema. Initial adsorbieren die Virionen an bestimmte Strukturen der Zelloberfläche. Für dieses sogenannte *Attachment* bilden virale Oberflächen- (Glyko)proteine die Voraussetzung. Beim BHV-1 sind bis heute zehn für Glykoproteine (g) kodierende offene Leserahmen (*open reading frames*, ORFs) mit einer geringen bis hohen Homologie zu HSV-1, dem Prototyp der *Alphaherpesvirinae*, identifiziert worden (gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gK, gL, gM; Schwyzer

und Ackermann, 1996). Das von den ORFs abgeleitete Molekulargewicht der BHV-1-Glykoproteine liegt zwischen 17 kDa (Kilodalton) (gL) und 101 kDa (gB). Das tatsächliche Molekulargewicht liegt jedoch meist deutlich darüber, da die Vorläuferproteine ko- und posttranslational im endoplasmatischen Retikulum (ER) und Golgi-Apparat durch N-Glykosilierung, oder die seltenere O-Glykosilierung sowie durch Phosphorilierung und die Addition von Lipidresten modifiziert werden können. Einige bilden darüber hinaus Homo-(gB) oder Heterodimere (gE/gI, gH/gL, gM/UL49.5; Schwyzer und Ackermann, 1996; Wu et al., 1998). Art und Ausmaß der Glykosilierung werden weitgehend durch die Konformation des Proteins bestimmt. Durch die Inhibierung der N-Glykosilierung mit Tunicamycin kann die Bildung infektionstüchtiger Viren verhindert werden (Van Drunen Littel-Van Den Hurk und Babiuk, 1985). Für das Attachment sind gB, gC und gD von Bedeutung, allerdings ist keines dieser Glykoproteine allein hierfür verantwortlich, da entsprechende Deletionsmutanten noch immer an die Wirtszelle adsorbieren können. Glykoprotein C bindet an der Zelloberfläche Heparansulfat. In Abwesenheit von gC kann die Heparansulfatbindung bei HSV-1, nicht aber bei BHV-1 und PRV, von gB übernommen werden (Shukla und Spear, 2001). Mit der Bindung von gD an weitere zelluläre Rezeptoren geht die heparinsensitive, erste Phase der Adsorption in eine heparinresistene, zweite über (Karger und Mettenleiter, 1993). Diese Rezeptoren gehören unterschiedlichen Proteinsuperfamilien (Mannose-6-Phosphat-Rezeptor, HveA-D = herpesvirus entry mediator A-D) an und können nicht von allen Alphaherpesviren in gleicher Weise genutzt werden (Geraghty et al., 1998; Spear et al., 2000). An das biphasische Attachment schließt sich die Penetration der Viren in die Zelle an. Hierbei verschmelzen die Membranen der Zelle und der Virionen miteinander, und das Nukleokapsid gelangt gemeinsam mit dem Tegument in das Zytosol. Für diesen Prozess ist die Fusionsvermittlung der Glykoproteine B und D, sowie des gH/gL-Komplexes essentiell (Meyer et al., 1998; Schröder und Keil, 1999). Daneben ist bei HSV-1 das Glykoprotein G für die Penetration polarisierter, epithelialer Zellen erforderlich (Tran et al., 2000). Der Übergang von der Adsorption zur Penetration, die gemeinsam als viraler Entry bezeichnet werden, findet rasch statt, da die Virionen einer Inaktivierung durch neutralisierende Antikörper oder sauren pH-Wert schon bald nicht mehr zugänglich sind (Highlander et al., 1987). Sobald das Nukleokapsid frei im Zytosol liegt, wird es entlang der Mikrotubuli unter Nutzung des Dynein-Motors Energie- (ATP) abhängig zum Nukleus transportiert (Sodeik et al., 1997). Durch Mikrotubuli depolymerisierende oder -stabilisierende Drogen wie Nocodazol oder Taxol kann dieser Transport geblockt werden (Elliott und O'Hare, 1998; Kotsakis et al., 2001; Sodeik et al., 1997). Das virale Genom wird durch die Kernporen in das Karyoplasma entlassen, und zirkularisiert dort sofort zu Episomen (Poffenberger und Roizman, 1985). Die zirkuläre DNA wird nach dem Prinzip des rolling circle repliziert. Dabei entstehen lineare Konkatemere, d. h. mehrere aneinander gereihte Genome, die an pac-Signalsequenzen innerhalb der IR-Bereiche geschnitten werden (Varmuza und Smiley, 1985). Die geschnittenen Monomere werden anschließend als genomische DNA in Nukleokapside verpackt (al Kobaisi et al., 1991; Jacob et al., 1979; Ladin et al., 1980) und akquirieren durch Knospung (budding) an der inneren Kernmembran eine primäre Hüllmembran (Granzow et al., 1997; Granzow et al., 2001; Mettenleiter, 2002). Über die nachfolgenden Schritte bei der Reifung der Herpesviren besteht seit Jahren ein Dissens. Ein Modell geht in der weiteren Virusausschleusung (Egress) von einer in situ-Reifung der primär umhüllten Virionen entlang des sekretorischen Pathways und der finalen Exozytose infektionstüchtiger Viren aus (Campadelli-Fiume et al., 1991; Darlington und Moss, III, 1968; Johnson et al., 2001). Ein alternatives Modell, dass in letzter Zeit durch zahlreiche Experimente untermauert wurde, folgt der Vorstellung des sogenannten De-Envelopment/Re-Envelopment (Gershon et al., 1994; Granzow et al., 1997). Danach verlieren die im perinukleären Spalt gelegenen Virionen durch Fusion mit der äußeren Kernmembran bzw. dem endoplasmatischen Retikulum ihre primäre Hülle und gelangen in das Zytoplasma. Die nackten Nukleokapside werden dann nach Addition der Tegumentproteine an den Membranen des Golgi-Apparates sekundär behüllt (Secondary Envelopment), und durch Exozytose der Golgi-Vesikel freigesetzt (Granzow et al., 2001; Mettenleiter, 2002). Beide Hypothesen gehen aber davon aus, dass für den Egress, genauso wie für die Zell-zu-Zell-Ausbreitung (cell-to-cell spread, CTCS), die Behüllung der Virionen notwendig ist. Der cell-to-cell spread ist ein Prozeß bei dem, wie bei der Penetration, die Membranfusion das zentrale Ereignis darstellt. Dennoch bestehen zwischen den Fusionsphänomenen Entry, Egress und CTCS grundsätzliche Unterschiede. Am Egress oder Secondary Envelopment beteiligen sich neben gB und dem gH/gL-Komplex auch gM und gK. Darunter ist für diesen Prozess aber nur das letztgenannte als essentiell beschrieben (Foster und Kousoulas, 1999; Klupp et al., 1998). Das Glykoprotein M ist für das Wachstum in vitro entbehrlich (König et al., 2002), es konnte aber bei PRV gezeigt werden, dass Virusmutanten mit einer gleichzeitigen Deletion des gM und des gE/gI-Komplexes, infolge einer mangelhaften sekundären Behüllung, in ihrem Wachstum erheblich eingeschränkt sind (Brack et al., 1999; Dijkstra et al., 1996; König et al., 2002). Die Glykoproteine E und I sind außerdem maßgeblich in den cell-to-cell spread involviert, ohne aber essentiell zu sein. Folgerichtig manifestiert sich der Phänotyp gE- bzw. gI-deletierter Virusmutanten in einer deutlich verminderten Größe der Virusplagues in vitro (Nakamichi et al., 2000; Rebordosa et al., 1996). Das gleiche gilt für gG, allerdings ist der Defekt analysierter Deletionsmutanten weniger deutlich (Nakamichi et al., 2000). In einer kürzlich erschienenen Publikation wird spekuliert, BHV-1-gG und -gE würden beim CTCS synergistisch agieren, da gG die Lokalisation von gE an den basolateralen Membranen, insbesondere an den *tight junctions* fördere (Nakamichi et al., 2002). Das Glykoprotein D ist *a priori* essentiell für den CTCS, durch serielle Passagen in Zellkultur erfahren gD-negative BHV-1-Mutanten aber genomische Umordnungen, die in einem gD-unabhängigen *Entry* und CTCS resultieren (Fehler et al., 1992; Schröder und Keil, 1999).

Die Expression der viralen Gene erfolgt kaskadenartig, was durch zahlreiche positive und negative Feedback-Mechanismen durch die Interaktion viraler Proteine mit Gen-Promotoren gewährleistet wird. Bis etwa 4 h post infectionem (p. i.) werden die immediate early (IE)- oder α-Gene exprimiert. Sie können unabhängig von viralen Proteinen von der zellulären RNA-Polymerase II transkribiert werden, was bedeutet, dass die nackte Virus-DNA per se infektiös ist (Graham und van der Eb, 1974). Dennoch wird die Expression der  $\alpha$ -Gene durch virale Transaktivatoren, wie das Tegumentprotein VP16 bzw. αTIF (alpha-trans inducing factor) stimuliert (Campbell und Preston, 1987). Durch das Antibiotikum Cycloheximid, das die Initiations- und Elongationsreaktionen der Protein-Biosynthese hemmt, kann die Gen-Expression in vitro auf Ebene der IE-Expression arretiert werden (Engelhardt und Keil, 1996). Die IE-Genprodukte haben eine regulatorische Funktion und initiieren die Transkription der early- (E)- oder β-Gene (Smith et al., 1992). Early-Gene kodieren hauptsächlich für Proteine des Nukleinsäurestoffwechsels, wie z. B. die Thymidinkinase und die virale DNA-Polymerase und sind bis etwa 8 h p. i. nachweisbar. Ab ca. 4 h p. i. beginnt die Translation der *late (L)*- oder  $\gamma$ -Gene, die für virale Strukturproteine kodieren, die während und nach der DNA-Replikation synthetisiert werden (Gray et al., 1987). In der Latenzphase der Alphaherpesvirusinfektion liegt die virale DNA als extrachromosomales Episom im Karyoplasma vor. Im Gegensatz zu den 70 bis 80 exprimierten Genen während einer lytischen Infektion, ist in latent infizierten Neuronen nur ein einziges Transkript, das sog. latencyassociated transcript (LAT) detektierbar. Die Latenz-assoziierten Transkripte sind essentiell für eine effiziente Reaktivierung (Perng et al., 1994) und spielen eine wichtige Rolle bei der Etablierung und Aufrechterhaltung der Latenz, indem sie die neuronale virusinduzierte Apoptose inhibieren (Ciacci-Zanella et al., 1999; Perng et al., 2000). Bei BHV-1 ist anders als bei HSV die Expression eines Latenz-assozierten Gen-Produktes nachweisbar (Hossain et al., 1995), das nicht nur die Apoptose, sondern auch die Progression des Zellzyklus negativ zu beeinflussen scheint (Jiang et al., 1998).



## Abbildung 2

Replikationszyklus der Alphaherpesviren (modifiziert nach Mettenleiter, 2000)

#### 2.6 Methoden der Herpesvirus-Mutagenese

Die zufällige Einführung von Punktmutationen in das virale Genom, unter Verwendung mutagener Chemikalien, ist seit etlichen Jahren ein probates Mittel, um eine große Zahl von Virusmutanten zu produzieren, die anschließend phänotypisiert werden können. Mit Hilfe Jahren dieser 30 die Generierung Methode gelang vor temperatursensitiver Herpesvirusmutanten (Schaffer, 1975). Mag diese Methode besonders geradlinig sein, so ist sie dennoch ungeeignet für die gezielte Untersuchung bestimmter Gene und Genprodukte. In den frühen '80er Jahren wurde für HSV-1 die Methode der zielgerichteten Mutation individueller Gene etabliert und später für viele andere Herpesviren übernommen (Post und Roizman, 1981). Die Insertion eines Selektionsmarkers, unter Mithilfe des DNA-Rekombinations- und Reparationsapparates der eukaryotischen Zelle, erlaubt es seither, bestimmte virale Gene zu unterbrechen bzw. zu deletieren und die hieraus resultierende Virusnachkommenschaft zu subklonieren und aufzureinigen. Diese Schritte sind sehr arbeitsaufwendig und zuweilen unmöglich, wenn beispielsweise Virusmutanten einen deutlichen Wachstumsdefekt aufweisen. Deletionsmutanten essentieller Gene können überdies nur auf Zelllinien produziert werden, die das essentielle Genprodukt in trans komplementieren (DeLuca et al., 1985). Beinahe zehn Jahre später wurde eine neue Methode für die Erforschung herpesviraler Genome entwickelt: Die Klonierung des gesamten viralen Genoms als eine Summe aus mehreren überlappenden Cosmidklonen, welche die direkte Manipulation klonierter Segmente in Escherichia coli (E. coli), also unabhängig von eukaryotischen Zellen erlaubt (van Zijl et al., 1988). Durch Kotransfektion der linearisierten überlappenden Cosmide mit in E. coli manipulierter Cosmid- oder Plasmid-DNA werden unter günstigen Umständen komplette rekombinante und infektiöse Viren in Zellen generiert. Ein Vorteil dieses Systems ist, dass hierbei nicht gegen das Ausgangsvirus selektiert werden muss, da ausschließlich die gewünschten Virusmutanten generiert werden. Nachteilig ist, dass einige Cosmide genetisch instabil sind und viele Rekombinationsereignisse erforderlich sind, um infektiöse Virus-DNA zu rekonstruieren; beides kann die Ursache für unerwünschte Mutationen sein

In der Genetik begrenzte die geringe Größe von Plasmiden und Cosmiden deren Nutzen für die Entschlüsselung großer Säugergenome. Aus diesem Grund wurden neuere Klonierungsvektoren entwickelt, die große DNA-Fragmente aufzunehmen vermögen. Unter diesen sind die künstlichen Hefechromosomen sogenannte *yeast artificial chromosomes* (YACs) die größten, mit einer Kodierungskapazität von mehr als zwei Megabasenpaaren (mbp) (Ramsay, 1994). Aus neuerer Zeit stammen Vektoren, die auf bakteriellen mini-F (Fertilitäts)-Faktoren bzw. Plasmiden basieren und in Analogie zu den YACs, bacterial artificial chromosomes (BACs) genannt werden (Shizuya et al., 1992). Sie sind mittlerweile die Vektoren der Wahl bei der Klonierung sog. eukaryotischer Genom-Bibliotheken. F-Plasmide sind etwa 100 kbp große, ringförmig geschlossene genetische Elemente. Sie replizieren autonom und liegen in einfacher Kopie als sog. low copy-Plasmid in der Bakterienzelle vor. Der F-Faktor ist die Voraussetzung für die bakterielle Konjugation und für den genetischen Informationsaustausch unter Prokaryonten. Sogenannte mini-F-Plasmide sind F-Faktoren, die auf ein Minimum ihrer genetischen Information reduziert sind, ohne die Eigenschaft der autonomen Replikation zu verlieren. Vektoren mit dieser Eigenschaft bezeichnet man in der Molekularbiologie als Replikon oder Amplikon. BACs können fremde DNA-Sequenzen in einer Größe von bis zu 300 kbp aufnehmen, sind einfach zu handhaben und bemerkenswert stabil. Diese Eigenschaften haben die BAC-Technologie attraktiv für die Herpesvirusforschung werden lassen, da selbst die größten herpesviralen Genome als BAC kloniert werden können. Tatsächlich ist das Maus Cytomegalovirus (MCMV), das als erstes Herpesvirus als bacterial artificial chromosome kloniert wurde (Messerle et al., 1997), mit 230 kbp eines der größten überhaupt. Seither wurde die BAC-Technologie unter anderem für das humane Cytomegalovirus (HCMV), Herpes simplex Virus (HSV), Pseudorabies Virus (PRV), equines Herpesvirus-1 (EHV-1) und Marek's disease virus 1 (MDV-1) erfolgreich etabliert (Borst et al., 1999; Rudolph et al., 2002a; Rudolph und Osterrieder, 2002; Saeki et al., 1998; Schumacher et al., 2000; Smith und Enquist, 2000). Versuche, das gesamte virale Genom in BAC-Vektorplasmide zu klonieren, blieben meistens erfolglos. Dieses Problem wurde umgangen, indem man vielmehr die BAC-Kassette mit dem F-Plasmid Replikon konventionell, durch homologe Rekombination in eukaryotischen Zellen in das Virusgenom integriert hat. Das lineare doppelsträngige Genom der Herpesviren zirkularisiert während der Replikation und die Isolation ringförmiger Replikations-

Intermediate der BAC-Mutanten ermöglicht es, mit dieser DNA E. coli-Zellen zu transformieren, die daraufhin das virale Genom stabil als F-Plasmid vermehren. Der prominenteste Nutzen der Virus BACs liegt allerdings nicht in der bakteriellen Vermehrung, sondern eukaryotischen Zellkultursystemen völlig unabhängigen, in der. von Manipulierbarkeit mit Hilfe des bakteriellen Rekombinationsapperates. Das Genom von Herpesviren enthält repetitive Sequenzmotive, die ein Ziel für unerwünschte Rekombinationen darstellen. Daher erfordern Herpesvirus-BACs E. coli-Stämme, in denen das recABCD Rekombinationssystem nicht funktionell ist (Shizuya et al., 1992). Für die Mutagenese sollte die Funktion des Rekombinationsystems aber restauriert werden. Das wird erreicht, indem man als BAC-Wirtszelle einen Bakterienstamm verwendet, der die Proteine RecA (Messerle et al., 1997) oder Red $\alpha/\beta$  (Yu et al., 2000) konditional exprimiert. Eine weitere Alternative ist die unter einen induzierbaren Promotor gestellte, transiente Expression der Rekombinationsgene recA, recE/T oder red $\alpha/\beta$  durch einen Vektor (Datsenko und Wanner, 2000; Zhang et al., 1998). RecE ist eine  $5' \rightarrow 3'$  Exonuklease, RecT ist ein ssDNA-(single strand DNA / DNA-Einzelstrang) bindendes Protein, das die Anlagerung, den Transfer und die Invasion der ssDNA katalysiert (Muyrers et al., 2000; Abbildung 3). Die Rekombinasen RecE/T werden von dem Prophagen Rac exprimiert, Red $\alpha$  und Red $\beta$  sind dem RecE/T funktionell equivalente Proteine, für die der Bakteriophage  $\lambda$  kodiert. 1998 wurde erstmals eine Methode beschrieben, die sich das recE/T-Rekombinationsprinzip zu Nutzen machte und E/T-cloning bezeichnet wurde (Zhang et al., 1998). In der Folge wurde das E/Tcloning auch bei der Manipulation viraler BACs erfolgreich eingesetzt (Rudolph und Osterrieder, 2002; Schumacher et al., 2000; Schumacher et al., 2001; Tischer et al., 2002b). Hierbei wurde ein lineares DNA-Fragment, dass sich aus einem Selektionsmarker und flankierenden der Zielsequenz homologen Bereichen zusammensetzte. in rekombinationskompetente E. coli transferiert. Um zu gewährleisten, dass die lineare DNA in den Bakterien nicht degradiert wurde, arbeitete man mit Exonuklease-negativen Stämmen, oder verwendete Rekombinationsplasmide, die neben den oben beschriebenen Rekombinasen einen Exonuklease-Inhibitor, das Gam Protein des  $\lambda$ -Phagen exprimierten (Wagner et al., 2002). Durch ein doppeltes cross over-Ereignis wird der Selektionsmarker, im Regelfall ein Antibiotikumresistenz-Gen, in die Zielsequenz eingeführt. Die Methode des E/T-clonings ermöglicht so die homologe Rekombination schon ab 25 bis 50 übereinstimmenden Basenpaaren. Anschließend ist das mutagenisierte BAC-Genom in E. coli genetischen Analysen durch DNA-fingerprinting und Southern-Blot-Hybridisierung zugänglich. Die Bakterienklone, die das virale Genom mit der gewünschten Mutation beherbergen, werden für die Präparation der BAC (Plasmid)-DNA im großen Maßstab vermehrt. Durch Transfektion dieser DNA in permissive eukaryotische Zellen lässt sich das Wachstumsverhalten oder der Phänotyp der Virusmutante in vitro bestimmen. Hierdurch gewann man bereits zahlreiche Informationen über die Biologie der Herpesviren (Brune et al., 2000). Durch ihre günstigen Eigenschaften haben sich Herpesvirus-BACs aber auch als Vektoren für die Gentherapie empfohlen. Unter anderem wurden hierfür HSV-BACs konstruiert, die die Verpackung defektiver HSV-Vektoren komplettieren konnten (Saeki et al., 1998; Stavropoulos und Strathdee, 1998). Human artificial episomal chromosomes (HAECs) präsentieren eine weitere Anwendungsmöglichkeit der BAC-Technologie für die Gentherapie (Narayanan et al., 1999;

Sun et al., 1994). Hierbei werden definierte virale Elemente, wie der sog. *origin of replication* und verpackungsrelevante Sequenzen in humangenomische BACs inseriert. Inzwischen haben als BAC klonierte Herpesviren darüber hinaus auch ihren Platz in der Entwicklung von Vakzinen für die aktive Immunisierung von Mensch und Tier gefunden (Tischer et al., 2002; (Suter et al., 1999).



#### Abbildung 3

<u>Schematische Darstellung der RecE/T-Mutagenese</u> (modifiziert nach Muyrers et al., 2000)

Gezeigt ist ein Model der RecE/T- oder Red $\alpha/\beta$ -abhängigen homologen Rekombination in Bakterien. Initial produziert die 5' $\rightarrow$  3' Exonuklease RecE oder Red $\alpha$  einen 3'-ssDNA Überhang. Durch Bindung der RecT- oder Red $\beta$ -Moleküle entsteht dann ein DNA-Einzelstrang, der eine homologe Rekombination durch Einzelstrang-annealing oder Einzelstrang-Invasion erlaubt.

# 3. Material und Methoden

## 3.1 Material

## 3.1.1 Zellen

- KOP-R; RIE244 (Rind, Ösopharynxgewebe; diploide Zellinie; Zellbank für Zellinien in der Veterinärmedizin [ZBV] BFAV Insel Riems) ab der 20. Passage
- MDBK; RIE261 (Rind, Niere; permanente Zellinie; ZBV BFAV Insel Riems) ab der 140. Passage
- PT; RIE11 (Kälberniere; permanente Zellinie; ZBV BFAV Insel Riems) ab der 100. Passage

## 3.1.2 Virusstämme

• BHV-1 Stamm Schönböken (Matheka und Straub, 1972; Virusbank BFAV Insel Riems)

## 3.1.3 Bakterien und Plasmide

## 3.1.3.1 Bakterien

- *E. coli*-Stamm DH10B (One Shot<sup>®</sup> Electrocomp<sup>™</sup> Gene-Hogs<sup>®</sup>, Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
- *E. coli*-Stamm TOP10F' (TOP10F'One Shot<sup>®</sup>, Fa. Invitrogen, Karlsruhe)

# 3.1.3.2 Plasmide

- pACYC177 (MBI Fermentas, Hanover, USA)
- pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
- pHA2 (Adler et al., 2000; freundlicherweise von M. Messerle, Halle/Saale zur Verfügung gestellt)
- pKD46 (Datsenko und Wanner, 2000; freundlicherweise von Barry Wanner, West Lafayette, USA zur Verfügung gestellt)
- pTZ18R (Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden)

# 3.1.4 Antikörper

## 3.1.4.1 Monoklonale Antikörper (mAk)

- mAk antiBHV1gG (anti-BHV-1-gG; freundlicherweise von C. Schelp, Dr. Bommeli AG, Liebefeld, Schweiz zur Verfügung gestellt)
- mAk d3 (anti-BHV-1-gE; freundlicherweise von von C. Schelp, Dr. Bommeli AG, Liebefeld, Schweiz zur Verfügung gestellt)
- mAk 2-1 (anti-BHV-1-gE; freundlicherweise von W. Fuchs und B. Köllner, Insel Riems zur Verfügung gestellt)

- mAk 4d7 (anti-BHV-1-gE; freundlicherweise von von C. Schelp, Dr. Bommeli AG, Liebefeld, Schweiz zur Verfügung gestellt)
- mAk 72/14/6 (anti-BHV-1-gB; freundlicherweise von G. M. Keil, Insel Riems zur Verfügung gestellt)

### 3.1.4.2 Sekundäre Antikörper

- anti-*mouse* IgG, Fluoreszenz-markiert (Alexa<sup>®</sup>Fluor<sup>®</sup>488, Fa. Molecular Probes, Eugene, USA)
- anti-mouse IgG, POD-markiert (Fa. Dianova, Hamburg)

## 3.1.5 Chemikalien

- Aceton (Fa. Roth, Karlsruhe)
- Acrylamid (Fa. Sigma, Deisenhofen)
- Agarose (Fa. Gibco BRL, Eggenstein)
   0,7-1,5 % (w/v) in 1 x TAE-Puffer
- Ammoniumpersulfat (APS; Fa. Sigma, Deisenhofen)
   10 % (w/v) in A. dest. (Stammlösung)
- Ammoniumsulfat (Fa. Merck, Darmstadt)
- Antibiotika für Zell- bzw. Bakterienkulturmedien
  - 100 µg/ml Ampicillin (Endkonzentration; Fa. Sigma, Deisenhofen)
  - 30 µg/ml Chloramphenicol (Endkonzentration; Fa. Sigma, Deisenhofen))
  - 50 µg/ml Kanamycin (Endkonzentration; Fa. Sigma, Deisenhofen)
  - 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin Lsg. (Endkonzentration; Fa. Sigma, Deisenhofen)
- Aprotinin (Fa. Sigma, Deisenhofen)
- L-Arabinose (Fa. Sigma, Deisenhofen)
- N,N-Methylenbisacrylamid (Fa. Serva, Heidelberg)
- Blockierungsreagenz (Fa. Roche, Mannheim)
- Calciumchlorid, CaCl<sub>2</sub> x H<sub>2</sub>O (Fa. Fluka, Buchs, Schweiz)
- Citronensäure (Fa. Roth, Karlsruhe)
- Coomassie Brilliant Blue R 250 (Fa. Sigma, Deisenhofen)
- CSPD<sup>®</sup> (3-(4-methoxyspiro[1,2-dioxethan-3,2'-(5'chloro)Tricyclo{3.3.1.1<sup>3,7</sup>}Decan]-4-yl) Phenylphosphat; Fa. Roche, Mannheim)
- Cycloheximid (Fa. Sigma, Deisenhofen)
- Desoxyribonukleosid-5`-Triphosphate (dNTPs; Fa. Promega, Mannheim)
- DIG Easy Hyb (Fa. Roche, Mannheim)

- DIG High Prime (Fa. Roche, Mannheim)
- DNA molecular weight marker II, digoxigenin-labeled (Fa. Boehringer, Mannheim)
- DMF (Dimethylformamid; Fa. Sigma, Deisenhofen)
- DMSO (Dimethylsulfoxid; Fa. Merck, Darmstadt)
- DOCA (Na-Desoxycholat; Fa. Sigma, Deisenhofen)
- DTT (Dithiothreitol; Fa. Promega, Mannheim)
- Essigsäure (Fa. Riedel-de Haen, Seelze)
- Ethidiumbromid (Fa. Sigma, Deisenhofen)
- Ethanol, absolut (Fa. Roth, Karlsruhe)
- EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure; Fa. Serva, Heidelberg)
- FKS (Fötales Kälberserum; Fa. Gibco BRL, Eggenstein)
- Formaldehyd, 37% (Fa. Roth, Karlsruhe)
- D-(+)-Glucose (Fa. Sigma, Deisenhofen)
- L-Glutamin (Fa. Sigma, Deisenhofen)
- Glycerin (Fa. Roth, Karlsruhe)
- Glycin (Fa. Roth, Karlsruhe)
- HEPES (N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N`-2-ethansulfonsäure; Fa. Serva, Heidelberg)
- IPTG (Isopropylthio-β-D-Galaktosid; Fa. Sigma, Deisenhofen)
   100 mM in *A. dest.* (Gebrauchslösung)
- Isopropanol (2-Propanol; Fa. Roth, Karlsruhe)
- Kaliumacetat, C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>KO<sub>2</sub> (Fa. Roth, Karlsruhe)
- Kaliumchlorid, KCl (Fa. Merck, Darmstadt)
- Kaliumdihydrogenphosphat, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Fa. Serva, Heidelberg)
- Kaliumhydroxid, KOH (Fa. Merck, Darmstadt)
- Kaliumhydrogenphosphat, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Fa. Merck, Darmstadt)
- 1 kbp DNA Ladder + DNA Ladepuffer (6 x; Fa. Promega, Mannheim)
- Kodak GBX Entwickler (Fa. Sigma, Deisenhofen)
- Kodak GBX Fixierer (Fa. Sigma, Deisenhofen)
- Kristallviolett (Fa. Merck, Darmstadt)
- N-Lauroylsarkosin (Fa. Sigma, Deisenhofen)
- LB (Luria-Bertani) BROTH (Lennox L broth), Bouillon (Fa. Sigma, Deisenhofen)
- LB AGAR (Lennox L Agar; Fa. Sigma, Deisenhofen)
- Lipofectin<sup>®</sup> Transfektions-Reagenz (Fa. Gibco BRL, Eggenstein)

- Lithiumchlorid, LiCl (Fa. Merck, Darmstadt)
- Maleinsäure (Fa. Sigma, Deisenhofen)
- Magermilchpulver (Fa. Saliter, Obergünzburg)
- Magnesiumchlorid, MgCl<sub>2</sub> (Fa. Merck, Darmstadt)
- Magnesiumsulfat, MgSO<sub>4</sub> (Fa. Merck, Darmstadt)
- MEM (*Minimal Essential Medium*, mit Earle's Salzen und Glutamin; Fa. Biochrom, Berlin)
- β-Mercaptoethanol (Fa. Serva, Heidelberg)
- Methanol, absolut (Fa. Roth, Karlsruhe)
- Methocel MC (Fa. Fluka, Buchs, Schweiz)
- MOPS (3-Morpholinopropansulfonsäure; Fa. Fluka, Buchs, Schweiz)
- Natriumacetat-Trihydrat, C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub> 3H<sub>2</sub>O (Fa. Roth, Karlsruhe)
- Natriumazid, NaN<sub>3</sub> (Fa. Sigma, Deisenhofen)
- Natriumchlorid, NaCl (Fa. Roth, Karlsruhe)
- Natriumcitrat-Dihydrat, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub> 2H<sub>2</sub>O (Fa. Roth, Karlsruhe)
- Natriumdihydrogenphosphat, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Fa. Merck, Darmstadt)
- Natriumhydrogencarbonat, NaHCO3 (Fa. Merck, Darmstadt)
- Natriumhydrogenphosphat, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Fa. Merck, Darmstadt)
- Natriumhydroxid, NaOH (Fa. Scharlau, Barcelona, Spanien)
- Puregene<sup>®</sup> DNA Isolation Kit (Fa. Gentra Systems, Minneapolis, USA)
- QIAquick<sup>®</sup> Gel-Extraktions Kit (Fa. Qiagen, Hilden)
- QIAfilter<sup>®</sup> Midi oder Maxi Kit (Fa. Qiagen, Hilden)
- ReddyMix<sup>™</sup> PCR Master Mix (Fa. Abgene, Surrey, Großbritannien)
- Roti<sup>®</sup>-Phenol (pH 8,0; Fa. Roth, Karlsruhe)
- Salzsäure, HCl (Fa. Roth, Karlsruhe)
- SOB Broth, Bouillon (Fa. Fluka, Buchs, Schweiz)
- SDS (Sodium-Dodecylsulfat; Fa. Merck, Darmstadt)
- Sucrose (Fa. Serva, Heidelberg)
- SuperSignal<sup>®</sup> Chemolumineszenz-Substrat (Fa. Pierce, Rockford, USA)
- NNN'N'-TEMED (Tetramethylethylendiamin; Fa. Sigma, Deisenhofen)
- TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
- Tris(2-amino-hydroxymethyl-1,3-propandiol; Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
- Triton X-100 (Fa. Serva, Heidelberg)

- Tween 20 (Fa. Serva, Heidelberg)
- X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactosid; Fa. Sigma, Deisenhofen)
   40 mg/ml DMF (Gebrauchslösung)

## 3.1.6 Enzyme

- CIP (calfi intestine phosphatase; Fa. Boehringer, Mannheim)
- DNA-Polymerase I, Large Fragment (Klenow-Enzym; Fa. Boehringer, Mannheim)
- Lysozym (Fa. Serva, Heidelberg)
  10 mg/ml Tris-Cl (10mM, pH 8,0; Stammlösung)
- Platinum<sup>®</sup> *Pfx*-DNA-Polymerase + 10 x Amplifikationspuffer (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
- Proteinase K (Fa. Boehringer, Mannheim)
  20 mg/ml Tris-Cl (50mM, pH 8,0; Stammlösung)
- Restriktionsendonukleasen + 10 x Endonukleasepuffer, 100 x BSA (Bovines Serumalbumin; Fa. Boehringer, Mannheim; New England Biolabs, Schwalbach; Fa. Promega, Mannheim)
- Ribonuklease A (Fa. Sigma, Deisenhofen)

10 mg/ml TE (pH 8,0; Stammlösung)

15 min bei 100°C erhitzt, zur Inaktivierung von Dnasen

- *Taq*-DNA-Polymerase + 10 x Amplifikationspuffer (Fa. Promega, Mannheim)
- T4-DNA-Ligase + 10 x Ligationspuffer (Fa. Roche, Mannheim)
- Trypsin (Fa. Serva, Heidelberg)

## 3.1.7 Lösungen und Puffer

- Acrylamidlösung (30%) für SDS-PAGE
  - 29,2 g Acrylamid
  - 0,8 g Bisacrylamid
  - in 100 ml A. dest. gelöst, filtriert
- Blocking-Puffer f
  ür Western Blotting 10 % Magermilchpulver in PBS-T
- CBS (*citrate-buffered saline*)
   40 mM Citronensäure
   10 mM KCl
   135 mM NaCl
   mit NaOH auf pH 3,0 eingestellt

- Coomassie-Entfärbungs-Lösung
  - 450 ml Methanol
  - 450 ml A. dest.
  - 100 ml Eisessig
- Coomassie-Färbelösung
   1,25 g Coomassie Brilliant Blue R-250
   in 500 ml Coomassie-Entfärbungs-Lösung
- DNA Denaturierungslösung für Southern Blotting 0,6M NaCl
   0,4 M NaOH
- Ethidiumbromidfärbelösung
   0,5 µg/ml Ethidiumbromid in *A. dest.*
- Gefriermedium für Bakterien
  - 60% (v/v) SOB
  - 40% (v/v) Glycerin
  - 1/1 mit Bakterienkultur mischen
- Glycerollösung für CaCl<sub>2</sub>-Transfektion 50% HBS (2 x) 15% Glycerin, sterilfiltriert
- Glycerollösung für elektrokompetente Bakterien 20% Glycerin, bei 120°C autoklaviert
- HBS-Puffer (2 x; pH 7,0)
   50 mM HEPES
   1,5 mM NA<sub>2</sub>HPO4
  - 280 mM NaCl, filtriert
- Kristallviolettfärbelösung nach Witte
  - 15 g Kristallviolett
  - 85 ml Ethanol (100%)
  - 250 ml Formaldehyd
  - mit A. dest. ad 1000 ml
- Kristallviolettfixierer
   5 % (v/v) Formalin in 1 x PBS
- LB-Agar-Platten 35 g LB AGAR

- in 11A. dest., bei 120°C autoklaviert
- LB-Medium
  - 20 g LB BROTH
  - in 11 A. dest., bei 120°C autoklaviert
- LB-Selektions-Agar-Platten

LB-Agar

- + 100 µg Ampicillin/ml Agar
- + 30 µg Chloramphenicol/ ml Agar
- + 50 µg Kanamycin/ ml Agar
- LB-Selektions-Medium

LB-Medium

- + 100 µg Ampicillin/ml Medium
- + 30  $\mu$ g Chloramphenicol/ ml Medium
- + 50 µg Kanamycin/ ml Medium
- LB-X-Gal-IPTG-Agar-Platten für Blau-Weiß Selektion
  - 40 µl X-Gal
  - 40 µl IPTG
  - pro LB-Agar-Platte
- Lösung 1 für Plasmidpräparationen

25 mM Tris

10 mM EDTA

- 50 mM Glucose
- Lösung 2 für Plasmidpräparationen 0,2 M NaOH

1% SDS

- Lösung 3 für Plasmidpräparationen
   3 M Na-Acetat

  - mit Eisessig auf pH 4,3 eingestellt
- Maleinsäurepuffer (10 x)
  - 1 M Maleinsäure
  - 1,5 M NaCl
  - mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt, sterilfiltriert

- Methocel-Medium (1 x)
  - 10 g Methocel
  - 3,76 g MEM

in 400 ml A. dest. gelöst, bei 120°C autoklaviert

- + 880 mg NaHCO<sub>3</sub>
- in 10 ml A. dest. gelöst, sterilfiltriert
- + 4 ml L-Glutamin 200 mM (Stammlösung)
- 1 x Methocel 1/4 mit Medium verdünnt (Gebrauchslösung)
- PBS (phosphate buffered saline; pH 7,4)
  - 137 mM NaCl
  - 2,7 mM KCl
  - 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
  - $2 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$
- PBS-T
   PBS mit 0,3% (v/v) Tween-20
- Probenpuffer (4x), reduzierend
   4 ml SDS, 20% (w/v)
  - 1 ml Glycerin
  - 0,5 ml 1 M Tris-HCl (pH 6,8)
  - 0,1 ml Bromphenolblau
  - 5% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol
  - mit A. dest. ad 25 ml
- RIPA-Puffer für Zell-Lysis
  10 mM Na-Phosphatpuffer (pH 7,2)
  10 mM EDTA
  1% (v/v) Triton X-100
  - 1% (*w/v*) Na-DOCA
  - 40 mM NaF
  - 0,1% (*w*/*v*) SDS
  - 0,1% (*w/v*) Aprotinin (optional)
- RNaseA-Lösung
   20 μl RNaseA-Stammlösung in 10 ml TE (pH 8,0)
- Sarkosyl-Puffer
  75 mM Tris-HCl (pH 8,0)

25 mM EDTA

10% (w/v) N-Lauroylsarkosin

- SDS-PAGE-Elektrophorese-Puffer
  - 250 mM Glycin

25 mM Tris

- (10 x PAGE-Elektrophorese-Puffer)
- 1/10 mit A. dest. verdünnt
- + 0,1% (*w/v*) SDS
- SOC-Medium 20 mM Glucose in SOB-Medium
- Southern-Blot-Puffer I
  - 1 x Maleinsäurepuffer
  - 0,3% (v/v) Tween-20
- Southern-Blot-Puffer II
  - 1 x Maleinsäurepuffer
  - 1% (*w/v*) Blockierungsreagenz
- Southern-Blot-Puffer III
   100 mM Tris-HCl
   100 mM NaCl
  - auf pH 9,5 eingestellt
- SSC (*standard saline citrate*; 20 x)

3 M NaCl

0,3 M Natriumcitrat

mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt

- TAE-Elektrophorese-Puffer (50 x) für Agarosegel-Elektrophorese
  - 2 M Tris
  - 0,25 M Na-Acetat

0,05 M EDTA

mit Eisessig auf pH 7,8 eingestellt

TBS (*Tris-buffered saline*; 10 x) 100 mM Tris-Cl (pH 7,4)
2 M NaCl
18 M CaCl<sub>2</sub>
200mM MgCl<sub>2</sub> • TE (pH 8,0) 10 mM Tris

1 mM EDTA

- TEN-Puffer
  100 mM NaCl
  10 mm Tris-HCl (pH 8,0)
  - 1 mM EDTA
- Transfer-Puffer f
  ür Western Blotting 10% (v/v) Methanol 5% (v/v) PAGE-Puffer (10 x)
- Tris-Puffer für SDS-PAGE-Sammelgele 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)
- Tris-Puffer für SDS-PAGE-Trenngele 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)
- Trypsinlösung

136 mM NaCl

2,6 mM KCl

 $8 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$ 

- $1,5 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$
- 3,3 mM EDTA
- 0,125% (w/v) Trypsin
- Waschlösung 1 für Southern Blotting 2x SSC

0,1% (*w/v*) SDS

 Waschlösung 2 für Southern Blotting 0,1x SSC

0,1% (*w/v*) SDS
## 3.1.8 Geräte, Laborhilfsmittel und Verbrauchsmaterialien

- Brutschrank B6 (Fa. Heraeus, Hanau)
- CO<sub>2</sub>-Brutschrank QMI300VBA (Fa. Nunc, Wiesbaden)
- Digitalkamera CAMEDIA C-3040ZOOM (3,3 Megapixel; Fa. Olympus, Hamburg)
- EasyjecT<sup>™</sup> Elektroporationssystem (Fa. EquiBio, Middleessex, Großbritannien)
- E.coli Pulser<sup>®</sup> Elektroporationsküvetten (Fa. Biorad, München)
- Fluoreszenzeinrichtung IX-RFAC (Fa. Olympus, Hamburg)
- Fluoreszenz Mikroskop IX50 (Fa.Olympus, Hamburg)
- Gel-Blotting-Papier (Fa. Schleicher und Schuell, Dassel)
- Gel-Dokumentationssystem ICU-1 (Fa. Herolab, Wiesloch)
- Geltrockner SE II 50 (Fa. Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA)
- Hybond<sup>™</sup>-N+, Nylonmembran (Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
- Inkubationsschüttler C25KC (Fa. New Brunswick Scientific, Nürtingen)
- Inversionsmikroskop (Fa. Nikon, Düsseldorf)
- Laborwaage Scout<sup>™</sup> (Fa. Ohaus, Florham Park, USA)
- Magnetrührer RCT basic (Fa. IKA, Staufen)
- Messokular (Fa. Carl Zeiss, Jena)
- Mini Hybridisation Ofen (Fa. Biometra, Göttingen)
- Mini-PROTEAN<sup>®</sup> 3 Cell, Elektrophorese-Zelle (Fa. Biorad, München)
- Mini Trans-Blot<sup>®</sup> Elektrophorese-Transfer-Zelle (Fa. Biorad, München)
- Multipette<sup>®</sup> plus (Fa. Eppendorf, Hamburg)
- pH-Meter 766 Calimatic (Fa. Knick, Berlin)
- Pipette Reference<sup>®</sup> (0,2-2 μl; 0,5-10 μl; 2-20 μl; 10-100 μl; 50-200 μl; 100-1000 μl; Fa. Eppendorf, Hamburg)
- Pipette Research<sup>®</sup> (0,5-10 µl; 2-20 µl; 10-100 µl; 100-1000 µl; Fa. Eppendorf, Hamburg)
- Pipettierhelfer accu jet<sup>®</sup> (Fa. Brand, Wertheim)
- PowerPac 200 Power Supply (Fa. Biorad, München)
- Primer Analysis Software Oligo 4.1 (Fa. Biosciences, Plymouth, USA)
- Protran<sup>®</sup> Nitrocellulose Transfermembran (Fa. Schleicher und Schuell, Dassel)
- Röntgenfilm Hyperfilm<sup>™</sup> MP (Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
- Sicherheitswerkbank (Fa. Heto-Holten, Allerod, Dänemark)
- Spektralphotometer GeneQuant pro (Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
- Stratalinker<sup>R</sup> UV-Crosslinker (Fa. Stratagene, Heidelberg)

- Sub-Cell<sup>®</sup> GT Agarosegel-Elektrophorese System (Fa. Biorad, München)
- Thermocycler Primus 96 plus (Fa. MWG-Biotech, Ebersberg)
- Thermomixer comfort (Fa. Eppendorf, Hamburg)
- Transferpette<sup>®</sup> (20-200 ml) (Fa. Brand, Wertheim)
- Ultraschallgerät Cell Disruptor B15 Branson (Fa. Heinemann, Schwäbisch-Gmünd)
- Vortex-Genie<sup>™</sup> (Fa. Scientific Industries, USA)
- Wasserbad (Fa.GFL, Burgwedel)
- Zellkulturplastikwaren (Fa. Costar, Cambridge, USA; Fa. Sarstedt, Nümbrecht) Zellkulturflaschen (170 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup>, 25 cm<sup>2</sup>)
  - 6-, 24- und 96- Lochplatten
- Zentrifugen:

Kühlzentrifuge 5804R (Fa. Eppendorf, Hamburg)

Megafuge 1.0 R (Fa. Heraeus, Osterode)

mitteltourige Zentrifuge J2-HS (Fa. Beckman, Palo Alto, USA)

Spectrafuge 16M Microcentrifuge (Fa. Labnet, Nürtingen)

Ultrazentrifuge L8-55 (Fa. Beckman, Palo Alto, USA)

Ultrazentrifuge LE 70 (Fa. Beckman, Palo Alto, USA)

Ultrazentrifuge Optima TL (Fa. Beckman, Palo Alto, USA)

Vakuumzentrifuge Univapo 150 H (Fa. Uni Equipment, Martinsried)

- Zentrifugenröhrchen (Fa. Beckman, Palo Alto, USA)
- Zentrifugenrotoren:

JA 10; JA17; JA20; SW41; TLA45; TST28.38; TST4 (Fa. Beckman, Palo Alto, USA)

## 3.2 Methoden

## 3.2.1 Zellkultur und Virusanzucht

## 3.2.1.1 Zellkultur

Für die Untersuchungen wurden KOP-R-, PT- und MDBK-Zellinien verwendet. Die Zellen wurden in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) kultiviert und mit 10% FKS (30 min bei 56°C hitzeinaktiviert) supplementiert. In regelmäßigen Abständen wurden die Zellen, nach einmaligem Waschen mit PBS-Puffer, durch Zugabe einer Trypsin-haltigen Lösung von der Kulturflasche abgelöst und in frischem Medium resuspendiert. Ein Teil der Suspension wurde in der Flasche belassen, der Rest optional auf weitere Zellkulturgefäße verteilt oder verworfen. Die Zellen wurden unter Standardbedingungen bei 37°C in feuchter Atmosphäre mit einem CO<sub>2</sub>-Anteil von 5% inkubiert.

## 3.2.1.2 Vermehrung von Viren in Zellkultur

Konfluent gewachsene KOP-R-Zellen wurden mit einer Virussuspension beimpft und bis zur Ablösung des Zellrasens, nach ein bis drei Tagen, unter Standardbedingungen inkubiert. Zweimal gefriergetaute (-70°C) infizierte Zellen wurden durch Zentrifugation mit 1500 rpm (Umdrehungen pro Minute) für 10 min in Zell-Debris und Überstände getrennt und letztere wurden für weitere Untersuchungen aliquotiert. Die Virusaliquots wurden bei -70°C gelagert. Nach dem Auftauen einzelner Aliquots auf Eis wurde deren Virustiter bestimmt (siehe Kapitel 3.2.1.3).

## 3.2.1.3 Virustitration

Virustitrationen wurden in 96-Loch-Mikrotiterplatten mit MDBK-Zellen durchgeführt (Mayr et al., 1974). Hierzu wurden die infektiösen Zellkulturüberstände in log10-Verdünnungsschritten auf die Zellen gegeben und für 3 Tage unter Standardbedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mikroskopisch auf die Ausbildung eines zpE (zytopathogener Effekt) untersucht. Der Gehalt an infektiösen Viruspartikeln wurde als KID<sub>50</sub>/ml (kulturinfektiöse Dosis 50 pro ml) nach der Methode von Spaerman und Kaerber (Mayr et al., 1974) angegeben.

## 3.2.1.4 Kontroll-Zellkulturüberstände (mock)

Um Einflüsse auf Stimulations- und Infektionsexperimente durch Konditionierung der Medien ausschließen zu können, wurden virusfreie Kontrollüberstände bei der Bereitung der

Virus-Stocks gewonnen. Hierzu wurden die Überstände nicht-infizierter Kulturen nach dem gleichen Muster wie die der infizierten Zellen behandelt (siehe Kapitel 3.2.1.2). Die Virusfreiheit wurde durch Beimpfen permissiver MDBK-Zellen geprüft. Die Kontrollüberstände mit der Bezeichnung "mock" wurden bei –70°C gelagert.

## 3.2.1.5 Gewinnung von Zellysaten

In einem Loch einer 6-Loch-Zellkultur-Schale wurden MDBK-Zellen (etwa 1 x  $10^6$ ) mit einer MOI (*multiplicity of infection*) von 5 infiziert und nach 16 h lysiert. Hierzu wurden die Zellen mit einem Zellschaber von ihrer Unterlage abgelöst und mit dem Medium in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zentrifugation (10 min, 6000 rpm) wurde der Zellkulturüberstand dekantiert und das Zellpellet in 300 µl RIPA (Lysis)-Puffer aufgenommen. Die Lysate wurden, um die DNA zu fragmentieren, 2 x 10 sec mit Ultraschall behandelt. Bis zur weiteren Verwendung für die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (siehe Kapitel 3.2.7.1) wurden die Zellysate bei -70°C gelagert.

## 3.2.2 Konstruktion rekombinanter Viren

## 3.2.2.1 Präparation von Virus-DNA

Für die Präparation viraler DNA wurden MDBK-Zellen infiziert und unter Standardbedingungen bis zur Ablösung des Zellmonolayers inkubiert. Anschließend wurde die DNA mit Hilfe des Puregene<sup>®</sup> DNA Isolation Kits nach Herstellerangaben aufgereinigt. Um vorzugsweise zirkularisierte Replikationsstadien für die bakterielle Transformation (siehe Kapitel 3.2.6.1) zu präparieren, wurde zum Zellkulturüberstand unmittelbar nach der Beimpfung mit einer Virussuspension 100 µg Cycloheximid pro ml Medium gegeben und die virale DNA nach 6stündiger Inkubation aufgereinigt.

## 3.2.2.2 DNA-Transfektion in eukaryotische Zellen

## 3.2.2.2.1 CaPO<sub>4</sub>-Transfektion

Die Calciumphosphat-Transfektion ist eine chemische Transfektionsmethode und wurde ursprünglich für die Steigerung der Infektiosität viraler Nukleinsäure entwickelt (Graham und van der Eb, 1974). Hierbei wird die DNA in einer CaCl<sub>2</sub>-Lösung vorgelegt und mit Phosphatpuffer gemischt. Die gebildeten DNA-Calciumphosphat Ko-Präzipitate werden in das Kulturmedium gegeben, adsorbieren an die Zelloberfläche und werden endozytotisch in die Zelle aufgenommen. Für die Herstellung der Präzipitate wurde die DNA in TE oder *A. dest.* gelöst und in 438  $\mu$ l 10 mM Tris-Cl (pH 7,5) vorgelegt. Nachdem 62  $\mu$ l 2M CaCl<sub>2</sub>

unter Schütteln zugetropft wurden, wurde das Gemisch über Nacht bis zur Bildung eines feinen Präzipitates bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde tropfenweise 500 µl (2 x) HBS (pH 7,0) zugegeben und 500 µl dieses Transfektionsansatzes direkt in das Medium semikonfluenter (60-70% Konfluenz) PT-Zellen, die am Tag zuvor in einer 6-Loch-Schale ausgesät worden waren, getropft. Nach drei bis vierstündiger Inkubation unter Standardbedingungen wurde der Zellmonolaver mit PBS-Puffer gewaschen und für exakt 2 min mit 1,5 ml einer 15% Glycerollösung überschichtet. Nach 2 min wurden die Zellen zweimal mit PBS-Puffer gewaschen, mit Medium (DMEM + 5% FKS) substituiert und unter Standardbedingungen inkubiert. Aus der **DNA-Transfektion** rekonstitutierte Virussuspensionen wurden durch zweimaliges Gefriertauen gewonnen, titriert und auf permissiven MDBK-Zellen passagiert. Homogene, rekombinante Viruspopulationen wurden durch Plaquereinigung (siehe Kapitel 3.2.2.3) erhalten. Das sogenannte green fluorescent protein (GFP) ist ein Quallen (Aequorea victoria)-Protein, das während UV-Licht-Anregung grün autofluoresziert (Prasher et al., 1992). EGFP (enhanced green fluorescent protein, Fa. Clontech, Heidelberg), dessen Expression unter der Kontrolle des HCMV-Immediate-Early-Promotors steht, stellt eine Variante des Wildtypproteins mit einer 35fach stärkeren Fluoreszenz dar. Die generierten rekombinanten Viren konnten fluoreszenzmikroskopisch anhand ihrer EGFP-Expression identifiziert werden.

#### 3.2.2.2.2 Lipofektion

Alternativ zur CaPO<sub>4</sub>-Transfektion wurde als biologische Transfektionsmethode die Lipofektion verwendet (Felgner et al., 1987). Bei der Lipofektion komplexieren Liposomen aus dem kationischen 1,2-Dioleyloxypropyl-3-trimethylammoniumbromid (DOTMA) und Dioleylphosphatidyl-ethanolamin (DOPE) DNA durch eine ionische Bindung. Die positivgeladenen DNA-Liposomen-Komplexe binden vermutlich negativ geladene Sialinsäurereste auf der Zelloberfläche und werden auf nicht exakt geklärte Weise in die Zelle und den Kern importiert. Mit Hilfe der Lipofectin<sup>®</sup>-Liposomensuspension wurden semikonfluente PT-Zellen nach Herstellerangaben transfiziert. Für die Generierung rekombinanter Viren wurden 1 bis 5 µg mutagenisierte (siehe Kapitel 3.2.6.4) virale BAC-DNA in PT-Zellen transfiziert. Bis zur Ausbildung von Virusplaques wurden die Zellen unter Standardbedingungen inkubiert.

## 3.2.2.3 Plaquereinigung

Mit den Transfektionsüberständen (siehe Kapitel 3.2.2.2) infizierte MDBK-Zellen wurden eine Stunde lang unter Standardbedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen und mit semisolidem Methocel-Medium (0,25 x), einem sogenannten *overlay*, überschichtet, um die Verunreinigung homogener rekombinanter Virus-Plaques durch Ausgangsviren im Überstand weitgehend auszuschließen. Zellen rekombinanter Plaques wurden mit 50 µl Methocel-Medium aufgenommen und in 1 ml Medium verdünnt. 300 µl dieser infektiösen Suspension wurden auf MDBK-Zellen passagiert. Durch weitere Plaquereinigungsschritte wurde so eine homogene und rekombinante Viruspopulation subkloniert.

## 3.2.3 Charakterisierung rekombinanter Viren in vitro

## 3.2.3.1 Plaquegrößenbestimmung

Konfluente MDBK-Zellen wurden mit 100 PFU (*plaque forming units* / plaquebildende Einheiten) pro Loch einer 6-Loch-Zellkultur-Schale infiziert, nach einer Stunde mit semisolidem Methocel-Medium (*overlay*) überschichtet und 48 h unter Standardbedingungen inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS-Puffer gewaschen, mit 5 % (*v*/*v*) Formalin fixiert und anschließend zur Darstellung der Virus-Plaques mit Kristallviolettlösung gefärbt. Mit Hilfe eines skalierten Messokulars (Fa. Carl Zeiss, Jena) wurde der maximale Durchmesser von mindestens 150 Plaques mikroskopisch bestimmt. Die Messwerte wurden gemittelt und die Standardabweichung berechnet.

## 3.2.3.2 Ein-Schritt-Wachstumskinetiken

Für die Ermittlung von Ein-Schritt-Wachstumskinetiken wurden die MDBK-Zellen eines Lochs einer 24-Loch-Zellkulturschale mit einer MOI von 1 (etwa 300.000 PFU) infiziert und eine Stunde lang unter Standardbedingungen inkubiert. Anschließend wurde der infizierte Zellrasen mit PBS-Puffer gewaschen und für 2 min mit eiskaltem CBS-Puffer (pH 3,0) bedeckt, um oberflächlich adsorbierende Viruspartikel zu inaktivieren. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS-Puffer gewaschen und mit 1 ml Medium (DMEM + 5% FKS) substituiert. Für die Bestimmung der Infektiosität im Zellkulturüberstand wurde nach 0h, 4h, 8h, 12h, 16h, 24h, 48h und 72h das Medium gewonnen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Bestimmung der zellgebundenen Infektiosität wurde der Zellrasen, wie oben beschrieben, mit CBS-Puffer (pH 3,0) bedeckt und mit PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einer Pipettenspitze von der Kulturschale abgeschabt, in 1 ml Medium

aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die beiden Proben jedes Zeitwerts wurden bis zur Bestimmung der KID<sub>50</sub>/ml (3.2.1.3) bei -70°C gelagert.

## 3.2.4 DNA-Analysen

## 3.2.4.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen mittels Adsorptionsspektrometrie

Bei der Adsorptionspektrometrie kann die Nukleinsäurekonzentration über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt werden. Die Konzentration errechnet sich aus der OD bei 260 nm, dem Verdünnungsfaktor und einem für DNA, RNA, oder Oligonucleotide spezifischen Multiplikationsfaktor. Aus dem Verhältnis der OD<sub>260 nm</sub> und der OD<sub>280 nm</sub> erhält man außerdem eine Aussage über Proteinkontaminationen in der Lösung. Der Quotient aus OD<sub>260 nm</sub> und OD<sub>280 nm</sub> sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. DNA-Lösungen wurden in 1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffer (pH 8,5; Wilfinger et al., 1997) verdünnt und in eine Quarzküvette pipettiert. Anschließend wurde mit Hilfe eines Spektralphotometers (GeneQuant *pro*) die OD<sub>260 nm</sub> der DNA-Lösung bestimmt und ihre Konzentration berechnet.

## 3.2.4.2 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen (Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus, RFLP)

Bei der DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen wurden 2 U (*units* / Einheiten) des entsprechenden Restriktionsenzyms pro 1 µg Plasmid-DNA oder 10-15 U pro 1 µg gereinigte virale DNA eingesetzt. Der Spaltungsansatz wurde mit einem Restriktionsenzympuffer (10 x) supplementiert, der nach Herstellerangaben eine optimale Aktivität ( $\geq$  75%) des entsprechenden Restriktionsenzyms garantiert, und mit *A. dest.* auf ein Gesamtvolumen von mindestens 20 µl gebracht. Anschließend wurde der Spaltungsansatz für 1 bis 2 h (Plasmid-DNA) oder 3 bis 5 h (virale DNA) unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Die DNA-Spaltungsprodukte wurden nach ihrer Fragmentgröße elektrophoretisch aufgetrennt. Hierzu wurde der Spaltungsansatz in DNA-Ladepuffer (6 x) verdünnt, auf ein 0,7 bis 1,5%-iges Agarosegel aufgetragen und anschließend eine Gleichspannung von 40 bis 110 Volt über 1 bis 16 h in einer Sub-Cell<sup>®</sup> GT Agarosegel-Elektrophoresekammer angelegt. 5 µl eines DNA-Markers (1 kbp DNA Ladder) wurden zum Größenvergleich neben den Proben aufgetragen. Das Agarosegel wurde nach der Elektrophorese in einer DNA/RNA-färbenden Ethidium-Bromid-Lösung inkubiert. Die DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht (302 nm) als fluoreszierende Banden visualisiert und photographisch dokumentiert.

## 3.2.4.3 DNA-Charakterisierung durch DNA-DNA-Hybridisierung (*Southern-Blot*-Hybridisierung)

### Markierung von DNA mit Digoxigenin

Bei der Methode des *random priming* (Feinberg und Vogelstein, 1983) wird die doppelsträngige DNA-Matrize denaturiert und mit Zufallshexameren (*random primers*) hybridisiert, die als Primer für die T7-DNA-Polymerase dienen. Die Markierung erfolgt durch den Einbau von Digoxigenin (DIG)-markiertem dUTP. Ein Mikrogramm der DNA-Matrize wurde in 16  $\mu$ l *A. dest.* aufgenommen, 10 min bei 95°C denaturiert und sofort auf Eis gestellt. Anschließend wurden 4  $\mu$ l DIG-*High Prime*-Lösung zugegeben und der Reaktionsansatz 12 bis 18 h bei 37°C inkubiert. Durch zehnminütiges Erhitzen auf 65°C und die Zugabe von 2  $\mu$ l 0,2 M EDTA (pH 8,0) wurde die Markierung gestoppt. Die DIG-markierte DNA-Sonde wurde mit 2,5  $\mu$ l 4 M LiCl und 75  $\mu$ l Ethanol (absolut) gefällt und 30 min bei –70°C gelagert. Durch Zentrifugation der Probe mit 14.000 rpm für 10 min wurde die DNA pelletiert. Das DNA-Pellet wurde mit Ethanol (70%) gewaschen und in einer Univapo 150 H-Vakuumzentrifuge bei 37°C getrocknet. Die markierte DNA-Sonde wurde in 50  $\mu$ l TE resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

## Southern Blotting

Bei der Southern-Blot-Hybridisierung werden elektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente auf einer Membran fixiert, um einzelne Fragmente durch eine spezifische Reaktion mit markierten Sonden nachweisen zu können (Southern, 1975). Nach Restriktionsenzymspaltung (siehe Kapitel 3.2.4.2) wurden die Fragmente viraler DNA in einem 1%-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht (302 nm) zur Dokumentation photographiert. Das Agarosegel wurde anschließend zum Entfärben 30 min in A. dest. gewaschen und 10 min in 0,1 M HCl-Lösung gebadet, um die DNA-Fragmente zu depurinisieren. Beim eigentlichen Southern Blotting wird ein denaturierender Transferpuffer unter Ausnutzung von Kapillarkräften durch das Agarosegel und eine (Nylon)membran in einen Stapel Zellstoffpapier gesogen. Die denaturierten, einzelsträngigen DNA-Fragmente werden dabei auf der positiv geladenen Nylonmembran fixiert. Für das Southern Blotting wurde das Gel auf eine Filterpapier-Flüssigkeitsbrücke (Gel-Blotting-Papier) gelegt, deren Papierenden in eine denaturierende Transferlösung (0,6 M NaCl, 0,4 M NaOH) tauchten. Eine mit Transferpuffer angefeuchtete Hybond<sup>™</sup>-N+-Nylonmembran wurde auf die Größe des Gels zugeschnitten und luftblasenfrei auf das Agarosegel gelegt. Die Ränder des Gels wurden mit Parafilmstreifen abgedeckt um einen Kontakt des ober- und unterhalb des Gel-Membran-Komplexes befindlichen Filterpapiers zu vermeiden. Anschließend wurden nacheinander zwei angefeuchtete Papierfilter, ein Stapel Zellstoffpapier, eine Glasplatte und ein 1 kg schweres Gewicht auf die Membran gelegt. Der DNA-Transfer erfolgte für 16-24 h bei Raumtemperatur (RT). Nach dem Transfer wurde die Nylonmembran bei RT zwischen zwei Papierfiltern getrocknet und in einem Stratalinker<sup>R</sup> UV-Crosslinker mit UV-Licht bestrahlt, um die DNA kovalent an die Membran zu binden.

#### **DNA-DNA** Hybridisierung und Detektion

In einem Hybridisierungsofen wurde die Membran mit der transferierten DNA 30 min bei 42°C mit 15 ml DIG Easy Hyb<sup>®</sup> inkubiert. Die sequenzspezifische DIG-markierte Sonde wurde 10 min auf 95°C erhitzt und sofort in 10 ml 65°C heißer DIG Easy Hyb<sup>®</sup>-Lösung verdünnt. Nach einer 12 bis 20stündigen Hybridisierung bei 42°C im Hybridisierungsofen wurde die Sonde abgekippt und bis zur erneuten Benutzung bei -20°C gelagert. Die Membran wurde zweimal 10 min bei RT mit Waschlösung 1, zweimal 15 min mit Waschlösung 2 bei 68°C gewaschen und anschließend bei RT 5 min in Southern-Puffer I gebadet. Durch eine 45minütige Inkubation bei Southern-Puffer II wurden RT in unspezifische Antikörperbindungsstellen geblockt. Nach der Blockierung wurden mit alkalischer Phosphatase gekoppelte Antikörper gegen Digoxigenin, 1/10.000 in Southern-Puffer II verdünnt und mit der Membran 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran zweimal 15 min mit Southern-Puffer I gewaschen und 5 min mit Southern-Puffer III äquilibriert. Das chemoluminiszente Substrat CSPD® wurde 1/100 in Southern-Puffer III verdünnt und 15 min bei 37°C mit der Membran inkubiert. Die Aktivität der alkalischen Phosphatase bewirkt die Abspaltung einer Substratphosphatgruppe, wodurch Licht emittiert wird, das einen Röntgenfilm schwärzt. Nach der Inkubation mit dem Substrat wurden sequenzspezifische Signale durch ein- bis dreistündiges Auflegen eines Röntgenfilms detektiert.

#### 3.2.5 Klonierung rekombinanter DNA

#### 3.2.5.1 Präparation von DNA-Fragmenten

PCR-Produkte (siehe Kapitel 3.2.5.6) sowie durch Restriktionsendonukleasen gespaltene (siehe Kapitel 3.2.4.2) Fragmente wurden elektrophoretisch aufgetrennt und nach einer Ethidium-Bromid-Färbung unter UV-Licht (302 nm) visualisiert. Die entsprechende DNA-Bande wurde im Größenvergleich mit einem DNA-Marker (1 kbp DNA Ladder) identifiziert und zügig zur Vermeidung von DNA-Strangbrüchen durch UV-Licht-Exposition mit einer Skalpellklinge aus dem Gel ausgeschnitten. Die DNA wurde dann mit Hilfe des QIAquick<sup>®</sup> Gel-Extraktions Kits nach den Angaben des Herstellers extrahiert und in 30 µl *A. dest.* gelöst.

### 3.2.5.2 Fill-in (Klenow)-Reaktion

Nach einer Spaltung mit Restriktionsendonukleasasen können DNA-Doppelstränge mit terminalen 5'-Überhängen mit Hilfe des bifunktionalen Klenow-Fragments der *Escherichia coli*-Polymerase I aufgefüllt (5'  $\rightarrow$  3'-Polymeraseaktivität) und terminale 3'-Überhänge auf die Länge des komplementären Stranges abgedaut (3'  $\rightarrow$  5'-Exonukleaseaktivität) werden (Jacobsen et al., 1974). Für die sogenannte *fill-in-* oder *blunting*-Reaktion wurde 1 µg der gespaltenen DNA mit 2,5 U Klenow-Fragment, nach Zugabe von 100 µM dNTPs, in 1 x *Blunting*-Puffer für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch zehnminütiges Erhitzen auf 75°C und Zugabe von 1 µl EDTA (0,5 M, pH 7,5) gestoppt.

## 3.2.5.3 Dephosphorylierung von DNA

Bei der Spaltung eines Vektors mit nur einer Restriktionsendonuklease entstehen zwei kompatible Enden, die wieder miteinander ligieren können. Durch Dephosphorylierung der Vektor-DNA kann man diese Reaktion weitgehend einschränken. Hierzu wurde der gelöste linearisierte Vektor mit CIP-Puffer (1 x) auf ein Gesamtvolumen von 270 µl gebracht und mit 2 U CIP (*calf intestine alkaline phosphatase*) eine Stunde bei 37°C inkubiert. Da das Enzym 3'-Überhange, und glatte DNA-Enden weniger effektiv dephosphoryliert, als 5'-Überhänge, wurde in diesen Fällen der Reaktionsansatz 30 min bei 37°C und zusätzlich 30 min bei 56°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 30 µl 0,1 mM EDTA (pH 8,0) und zehnminütiges Erhitzen bei 65°C beendet.

## 3.2.5.4 Ligation

Für die Insertion eines DNA-Fragments (*Insert*) in einen Vektor wurde die T4-DNA-Ligase verwendet, die unter ATP-Verbrauch komplementäre 5'-Phosphat- und 3'-OH-Enden linearer DNA-Fragmente verbindet. Bei der Ligation wurden etwa fünfmal mehr *Insert*-, als Vektor-DNA eingesetzt und in Ligationspuffer mit 0,5 U T4 DNA Ligase 12 bis 18 h bei 14°C inkubiert. Der Ligationsansatz wurde nach 12 h mit ATP (1mM Endkonzentration) supplementiert.

## 3.2.5.5 TOPO TA Cloning<sup>®</sup>

Die *Taq*-Polymerase produziert während der PCR (siehe Kapitel 3.2.5.6) DNA-Fragmente mit unspezifischen Überhängen eines Nukleotids (Clark, 1988), meist eines Adenins (Hu, 1993). Bei der Methode des sogenannten TA-*Clonings* werden PCR-Produkte mit Adenin-

Überhängen in einen linearisierten Vektor mit Thymin-Überhängen kloniert (Marchuk et al., 1991). Das TOPO TA Cloning<sup>®</sup> ist eine Variante des TA-*Clonings* und ermöglicht eine Ligase-unabhängige Ligation eines PCR-Produktes mit einem Topoisomerase-aktivierten Vektor (Shuman, 1994). PCR-Amplifikate, die von einer Polymerase mit 3' → 5'- Exonuklease (*proofreading*)-aktivität (*Pfu-*, *Pfx-*, *Vent*<sup>TM</sup>-Polymerase) produziert wurden, eignen sich für das TA-Cloning erst nachdem ihnen ein Adenosinrest angehängt wurde (*Tailing*). Für die Addition von 3'-Adenin-Überhängen wurde der PCR-Reaktionsansatz, nach einer Amplifikation mit der *Pfx*-Polymerase mit 1 U *Taq*-Polymerase versetzt und 10 min bei 72°C inkubiert. Das PCR-Produkt wurde nach Angaben des Herstellers in den aktivierten pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> Vektor kloniert.

# 3.2.5.6 Amplifikation von DNA-Fragmenten mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

DNA-Fragmente lassen sich mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Polymerase amplifizieren. gezielt Ein Zyklus Standard-PCR Chain *Reaction*) einer mit 30 Reaktionszyklen (Saiki et al., 1988) besteht aus drei Einzelschritten: Strangtrennung der Amplifikationsmatrize (Template) bei 95°C (Denaturierung), Hybridisierung der Primer an das einzelsträngige Template bei 54°C (Annealing), und schrittweise Addition von Desoxyribonukleotideinheiten (dNTPs) an das Primer-3'-Ende bei 72°C, durch eine hitzestabile DNA-Polymerase (Elongation). Primer mit 20 bis 30 sequenzspezifischen Basenpaaren (bp) für das Template wurden mit Hilfe der Primer Analysis Software OLIGO 4.1 abgeleitet, modifiziert und als Oligonukleotide (Fa. MWG-Biotech, Ebersberg) synthetisiert. Die Bedingungen für die PCR und die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes wurden spezifisch an die Primer und das Amplifikat angepasst (Tabelle 1 bis 6).

## **Tabelle 1:** Für die gE-Deletion verwendete Primer:

Den Positionsangaben liegen die Sequenzdaten von Leung-Tack et al. (1994) zugrunde. Kleine, fettgedruckte Buchstaben bezeichnen die Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen. Zusätzliche, nicht sequenzspezifische Basen sind durch kursivgedruckte Großbuchstaben gekennzeichnet.

Position	Strang	Sequenz (5' $\rightarrow$ 3')
6222	positiv	TACCgaattcTGTTGCTCTGGATGGTGGTGCT
70603	negativ	ATATggtaccttaattaaACCCTCTCGCGTGCGCCGTT CC
7894	positiv	TATAttaattaaACCGCGAGTGCTTCACCGACGT
9261	negativ	TCATtctagaCGGGTCCCTAAACCAAACTTTGAA

**Tabelle 2:** Für die Konstruktion der gE-Revertanten verwendete Primer:Den Positionsangaben liegen die Sequenzdaten von Leung-Tack et al. (1994)zugrunde.

Position	Strang	Sequenz (5' $\rightarrow$ 3')	
7383	positiv	GATCTCGCTCGCGTGTGTCTTGG	
8480	negativ	GGTGCCTCGGGGTGGAAGATG	

**Tabelle 3:** Für die gG-Deletion verwendete Primer:

Den Positionsangaben liegen die Sequenzdaten von Leung-Tack et al. (1994) zugrunde. Unterstrichene Buchstaben bezeichnen pACY177-spezifische Sequenzen, die für das Kanamycinresistenz-Gen kodieren. Glykoprotein G-spezifische Sequenzen sind durch fett- und kursivgedruckte Buchstaben gekennzeichnet.

Position	Strang	Sequenz (5' $\rightarrow$ 3')
3223	positiv	GAGCGAACGCGAGCGAACGCGAGCGCAAGCGC
	-	GAGCACAAGACTGCGATC <u>CGATTTATTCAACAAA</u>
		<u>GCCACG</u>
4603	negativ	GTAAACGCGGGGCAGCGGGGTCGGGGCGGCGT
		GGGGTGCCGGCGATCAGAGCCAGTGTTACAACC
		AATTAACC

### **Tabelle 4:** Für die gM-Deletion verwendete Primer:

Den Positionsangaben liegen *online* verfügbare BHV-1 Sequenzdaten zugrunde (NCBI Sequence, NC\_001847). Unterstrichene Buchstaben bezeichnen pACY177-spezifische Sequenzen, die für das Kanamycinresistenz-Gen codieren. Glykoprotein M-spezifische Sequenzen sind durch fett- und kursivgedruckte Buchstaben gekennzeichnet.

Position	Strang	Sequenz (5' $\rightarrow$ 3')
84728	positiv	ACGCCGTCCAGCAGCGCCGCTGCGTCGCCTTCG
		AGCGGGGCCATGCCCGATTTATTCAACAAAGCCA
		CG
85466	negativ	CGCGAAAACTCAGGGGGTTTTGCGGCGGCGTAT
		CATATGAACGCGCTGGCGCCAGTGTTACAACCAA
		TTAACC

#### **Tabelle 5:** Für die gK-Deletion verwendete Primer:

Den Positionsangaben liegen *online* verfügbare BHV-1 Sequenzdaten zugrunde (NCBI Sequence, NC\_001847). Unterstrichene Buchstaben bezeichnen pACY177spezifische Sequenzen, die für das Kanamycinresistenz-Gen codieren. Glykoprotein K-spezifische Sequenzen sind durch fett- und kursivgedruckte Buchstaben gekennzeichnet.

Position	Strang	Sequenz (5' $\rightarrow$ 3')
3207	positiv	GTGGAGCAGCAGTTAACGCACACCTTTCTGATC
		CCGCTCTCGCCGCCGTC <u>CGATTTATTCAACAAAG</u>
		<u>CCACG</u>
3759	negativ	CCGTCGTGCAGCACATCCCGCCCGGGCTGCTCG
		ACGGCGACGAAGCGCTG <u>GCCAGTGTTACAACCA</u>
		ATTAACC

**Tabelle 6:** Darstellung der für die PCR verwendeten Reaktionsbedingungen:A) Amplifikation der Fragmente 1 + 2 für die gE-Deletion

- B) Amplifikation des Fragments für die Konstruktion der gE-Revertanten
- C) Amplifikation des Kanamycinresistenz-Gens für die gG-, gM-, gK-Deletion

verwendete Primer (5' → 3')	Temperatur/ Zeit	Anzahl der Zyklen	Länge des Amplifikats
positiv:	98°C / 5 min	1 x	1381 bp
TACCGAATTCTGTTGCTCTGG			bzw.
ATGGTGGTGCT	95°C / 90 s	15 x	1367 bp
bzw.	62°C / 90 s		-
TATATTAATTAAACCGCGAGT	72°C / 120 s		
GCTTCACCGACGT			
	95°C / 90 s	25 x	
negativ:	55°C / 90 s		
ATATGGTACCTTAATTAAACC	72°C / 120 s		
CTCTCGCGTGCGCCGTTCC			
bzw.	72°C / 10 min	1x	
TCATTCTAGACGGGTCCCTAA			
ACCAAACTTTGAA			

B)

verwendete Primer (5' → 3')	Temperatur/ Zeit	Anzahl der Zyklen	Länge des Amplifikats
positiv: GATCTCGCTCGCGTGTGTCT	98°C / 5 min	1 x	1097 bp
TGG	95°C / 90 s 62°C / 90 s	15 x	
negativ: GGTGCCTCGGGGTGGAAGAT	72°C / 120 s		
G	95°C / 90 s 55°C / 90 s	25 x	
	72°C / 100 s		
	72°C / 10 min	1x	

## C)

verwendete Primer $(5' \rightarrow 3')$	Temperatur/Zeit	Anzahl der Zyklen	Länge des Amplifikats
positiv: (homolog)CGATTTATTCA	95°C / 2 min	1 x	1027 bp
ACAAAGCCACG	95°C / 20 s 51,3°C / 30 s	10 x	
negativ: (homolog)GCCAGTGTTA	72°C / 90 s		
CAACCAATTAACC	95°C / 20 s 72°C / 90 s	25 x	
	72°C / 5 min	1x	

#### 3.2.6 Transformation von Bakterien

#### 3.2.6.1 Transformation elektrokompetenter Bakterien mit viraler BAC-DNA

RecA-negative, elektrokompetente *E. coli* (Stamm DH10B)-Zellen (One Shot<sup>®</sup> Electrocomp<sup>TM</sup> Gene-Hogs<sup>®</sup>) wurden durch die Elektroporation mit zirkularisierten Replikationsstadien viraler BAC-DNA transformiert. Für die Transformation wurden 50 µl kompetente Zellen mit 1 µg der BAC-Virus-DNA-Präparation (siehe Kapitel 3.2.2.1) gemischt und in eine E. coli Pulser<sup>®</sup>-Elektroporationsküvette mit 1 mm Elektrodenabstand gegeben. Die Bakterien wurden in der Küvette mit Hilfe des EasyjecT<sup>TM</sup> Elektroporationssystem bei Standardeinstellungen (1,25 kV, 200  $\Omega$ , und 25 µF) elektroporiert. Nach dem Puls wurden die Bakterien in 1ml SOC-Medium suspendiert und eine Stunde bei 37°C unter Schütteln (350 rpm) inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension auf LB-Chloramphenicol-Selektions-Agarplatten ausplattiert, und bei 37°C inkubiert. Nach 24 bis 36 h wurden Chloramphenicol-resistente Kolonien selektioniert.

#### 3.2.6.2 Transformation chemisch kompetenter Bakterien mit Plasmiden

Chemisch kompetente E. coli (TOP10F'One Shot®)-Zellen wurden mit DNA durch einen Hitzeschock transformiert. 50 µl kompetente Bakterien wurden mit 5 µl eines 20 µl Ligationsansatzes oder 1 bis 100 ng Plasmid-DNA gemischt und für 30 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Bakterien 2 min bei 42°C inkubiert und umgehend auf Eis abgekühlt. Die transformierten Bakterien wurden in 200 ml SOC-Medium suspendiert und eine Stunde unter Schütteln (350 rpm) bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Bakteriensuspension auf LB-Selektions-Agarplatten ausplattiert und 12 bis 18 h bei 37°C inkubiert. Transformierte Bakterienklone wurden durch Koloniewachstum selektioniert. Einige Vektoren bieten die Möglichkeit, Bakterienkolonien durch das sogenannte blue-whitescreening zu selektionieren. Durch die Insertion eines DNA-Fragments in die multiple cloning site eines entsprechenden Vektors (z. B. pTZ18R, pCR®2.1-TOPO®) wird ein lacZ-Gen, das für das N-terminale α-Fragment der β-Galaktosidase kodiert, inaktiviert. Für eine Aktivität der β-Galaktosidase muss das C-terminale ω-Fragment durch das α-Fragment komplementiert werden (α-Komplementierung). Transformierte Bakterien, in denen das lacZ-Gen durch die Klonierung eines DNA-Fragments in die multiple cloning site unterbrochen wird, wachsen bei einer Inkubation auf LB-X-Gal-IPTG-Agar-Platten zu weißen Kolonien heran, während Klone ohne eine Insertion das α-Fragment exprimieren und sich blau anfärben. Bakterienklone, die mit einem rekombinantem Vektor pTZ18R oder pCR®2.1TOPO<sup>®</sup> transformiert wurden, wurden nach einer 12 bis 18stündigen Inkubation bei 37°C durch weißes Koloniewachstum selektioniert.

### 3.2.6.3 Präparation rekombinationskompetenter Bakterien

Mit 2 ml einer Übernachtkultur (LB-Chloramphenicol-Medium) eines Bakterienklons, der die virale DNA als BAC enthält, wurden 200 ml LB-Chloramphenicol-Medium beimpft. Die Bakterienkultur wurde zunächst bei 37°C im Inkubationsschüttler inkubiert. Bei einer photometrisch ermittelten OD<sub>600</sub> von 0,1 bis 0,15 (nach 60 bis 100 min) wurde die Kultur 15 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Bakterienzellen zweimal hintereinander durch Zentrifugation (10 min, -4°C, 6000 rpm) pelletiert, der Überstand abgekippt und das Pellet in 200 ml eiskalter Glycerinlösung (10%) resuspendiert. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde die Glycerinlösung dekantiert und das Pellet in der Residualflüssigkeit aufgenommen. Die Bakteriensuspension wurde in 50 µl Aliquots bei -70°C gelagert. Zur Transformation mit einem Rekombinations-Plasmid wurde ein 50 µl-Aliquot elektrokompetenter Zellen mit 100 ng einer entsprechenden Plasmidpräparation gemischt und wie unter 3.2.6.1 beschrieben elektroporiert. Nach dem elektrischen Puls wurden die Bakterien in 1 ml SOC-Medium suspendiert und eine Stunde bei 30°C unter Schütteln (350 rpm) inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension auf LB-Chloramphenicol/Ampicillin-Selektions-Agarplatten ausplattiert und bei nunmehr 30°C inkubiert. Nach 36 bis 48 h wurden doppelresistente Kolonien selektioniert.

Mit 2 ml einer Übernachtkultur (LB-Chloramphenicol/Ampicillin-Medium) eines Bakterienklons, der sowohl die virale DNA als BAC als auch das Rekombinations-Plasmid pKD46 beherbergt, wurden 200 ml LB-Chloramphenicol/Ampicillin-Medium beimpft. Die Expression der Gene, die für Red $\alpha$ , Red $\beta$  und das Gam-Protein codieren, steht bei dem Vektor pKD46 unter einem durch Arabinose induzierbaren Promotor. Durch die Supplementierung des Mediums mit 1 mM frisch angesetzter Arabinose wurde die Rekombinationskompetenz der Bakterien induziert. Nach der Induktion wurde die Bakterienkultur bei 30°C im Inkubationsschüttler inkubiert. Bei einer photometrisch ermittelten OD<sub>600</sub> von 0,6 (nach 3 bis 4 h) wurde die Kultur 15 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Bakterienzellen, wie oben beschrieben, mit Glycerin gewaschen, aliquotiert und bei –70°C gelagert.

#### 3.2.6.4 RecE/T-Mutagenese

Für die RecE/T-Mutagenese wurde ein 50 μl-Aliquot rekombinationskompetenter Zellen mit 100 - 500 ng des aufgereinigten (siehe Kapitel 3.2.5.3) PCR-Amplifikates des Kanamycinresistenz-Gens gemischt und, wie unter 3.2.6.1 beschrieben, elektroporiert. Nach dem elektrischen Puls wurden die Bakterien in 1ml SOC-Medium suspendiert und eine Stunde bei 37°C unter Schütteln (350 rpm) inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension auf LB-Chloramphenicol/Kanamycin-Selektions-Agarplatten ausplatiert und bei 37°C inkubiert. Durch einen Temperatur-*Shift* von 30°C auf 37°C wurde die Weitergabe des temperatursensitiven Rekombinationsplasmids pKD46 an die bakteriellen Filialgenerationen verhindert, und doppelresistente Kolonien wurden nach 36 bis 48 h selektioniert.

#### 3.2.6.5 Schnell ("Mini")-präparation bakterieller Plasmid-DNA

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

## 3.2.6.6 Präparation von Plasmid-DNA im großen Maßstab ("Maxipräparation")

Für die Maxipräparation von Plasmid-DNA wurden 100 ml (*high-copy* Plasmide: pTZ18R, pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>) oder 250 ml (*low-copy* Plasmide: BACs) LB-Selektionsmedium mit 0,5 ml

einer Übernachtkultur beimpft. Nach den Angaben des Herstellers wurde mit Hilfe des QIAfilter<sup>®</sup> Maxi Kits (Fa. Qiagen, Hilden) die Plasmid-DNA nach alkalischer Bakterienlyse mittels Anionenaustauscherchromatographie aufgereinigt. Die DNA wurde mit Isopropanol aus der Lösung gefällt und durch Zentrifugation (Beckman J2-H2, JA17, 11.000 rpm, 30 min, 4°C) pelletiert. Das DNA-Pellet wurde anschließend mit Ethanol (70%) gewaschen, durch Vakuumzentrifugation getrocknet und in TE (pH 8,0) gelöst.

## 3.2.6.7 Anlegen einer Bakteriendauerkultur

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

## 3.2.7 Proteinnachweise

## 3.2.7.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

SDS (Natriumdodecylsulfat) ist ein Detergens, das mit Ausnahme von Disulfidbrücken alle nichtkovalenten Wechselwirkungen in einem nativen Protein zerstört. Das anionische SDS bildet mit dem denaturierten Protein einen Komplex mit einer negativen Nettoladung, so dass bei der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese Proteine nach ihrer relativen Molekülmasse, unabhängig von ihrer ursprünglichen Ladung, aufgetrennt werden können (Laemmli, 1970). Polyacrylamidgele setzen sich aus zwei Komponenten, einem Trenn- und einem Sammelgel, zusammen. Die eigentliche Auftrennung der Proteine erfolgt in dem engporigen Trenngel, das relativ weitporige Sammelgel hat die Aufgabe das Proteingemisch vor seinem Eintritt in das Trenngel zu fokussieren. Die für die Polymerisierung der Trenn- bzw Sammelgele erforderlichen Reagenzien wurden in den in Tabelle 7 angegebenen Mengenverhältnissen miteinander vermischt. Mit Hilfe einer Mini-PROTEAN<sup>®</sup> 3 Gel-Apparatur wurden Polyacrylamidgele mit einer Tiefe von 1,5 mm gegossen. Die Lysate infizierter Zellen (siehe Kapitel 3.2.1.5) wurden für die Reduktion von Disulfidbrücken mit reduzierendem Probenpuffer (4 x) vermischt, 3 min bei 95°C erhitzt und nach der Aushärtung der Trenn- und Sammelgele in die Taschen der Sammelgele pipettiert. Als Größenmarker wurde ein Molekulargewichtsstandard mitgeführt. Die Proteine wurden 100 min durch Anlegen von 100 V Gleichspannung nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Trenngel	12%	15%	Sammelgel	3%
Volumen	10 ml	10 ml	Volumen	5 ml
A. dest.	3,35 ml	2,35 ml	A. dest.	3,05 ml
1,5 M Tris	2,5 ml	2,5 ml	0,5 M Tris	1,25 ml
(pH 8,8)			(pH 6,8)	
10 % SDS	100 µl	100 µl	10% SDS	50 µl
29,2% Acrylamid	4 ml	5 ml	29,2% Acrylamid	650 µl
0,8% Bisacrylamid			0,8% Bisacrylamid	
10% APS	50 µl	50 µl	10% APS	25 µl
TEMED	5 µl	5 µl	TEMED	5 µl

Tabelle 7: 7	usammensetzung	von Polva	crylamidgelei	n für die	SDS-PAGE
	abammenbetzang	von i orya	or yiunnugoloi		ODO I AOE.

#### 3.2.7.2 Darstellung von Proteinen durch Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung

Proteinbanden können mit dem Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau in einem Polyacrylamidgel sichtbar gemacht werden. Für die Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung wurden die Polyacrylamidgele eine Stunde in einer Coomassie-Färbelösung gebadet und anschließend 12 bis 36 h mit einer Coomassie-Entfärbelösung entfärbt. Die aufgetrennten Proteine wurden als blaue Banden identifiziert. Zur Konservierung wurden die gefärbten Gele auf einen Papierfilter gelegt und mit Hilfe eines Geltrockners 2 h bei 75°C getrocknet.

## 3.2.7.3 Elektrotransfer und Immunodetektion von Proteinen (Western Blotting)

Beim *Western Blotting* werden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine (3.2.7.1) nach dem Tankblotprinzip (Towbin et al., 1979) in einem elektrischen Spannungsfeld auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Das Polyacrylamidgel wurde auf eine zugeschnittene Nitrocellulosemembran gelegt. Die Gel-Membran-Schicht wurde ober- und unterseits mit einem Papierfilter sowie einem Kunststoffschwamm bedeckt und in eine Klammer eingespannt. Die Klammer wurde anschließend in eine mit eiskaltem Transferpuffer gefüllte Mini Trans-Blot<sup>®</sup> Elektrophorese-Transfer-Zelle eingesetzt. Bei einer 90minütigen Gleichspannung von 100 V wurden die anionischen, denaturierten Proteine auf die Nitrocellulosemembran übertragen. Nach dem Elektrotransfer der Proteine wurde die Membran zum Blocken unspezifischer Bindungen 12 bis 16 h in *Blocking*-Puffer (10% [w/v] Magermilchpulver in PBS-T) bei 4°C gebadet. Die geblockte Membran wurde zweimal kurz mit PBS-T gewaschen und eine Stunde bei RT mit einem in PBS-T verdünnten,

monoklonalen Antikörper inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal 10 min mit PBS-T gewaschen und eine Stunde bei RT mit einem Meerrettichperoxidase (POD)-markierten sekundären Antikörper, der 1/30.000 in PBS-T verdünnt wurde, inkubiert. Die Nitrocellulosemembran wurde nach drei weiteren PBS-T-Waschschritten mit einem chemoluminiszenten Substrat (SuperSignal<sup>®</sup>) überschichtet und 15 min bei RT inkubiert. Durch die Zugabe des Substrats wird, unter Katalyse der Meerrettichperoxidase, Licht emittiert, das einen Röntgenfilm schwärzt. Antigenspezifische Signale wurden anschließend durch 1 bis 15minütiges Auflegen eines Röntgenfilms detektiert.

## 3.2.7.4 Indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT)

Konfluente MDBK-Zellen wurden in einer 35 mm Kultur-Schale mit 100 PFU infiziert, nach einer Stunde mit Methocel-Medium überschichtet und 48 h unter Standardbedingungen inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS-Puffer gewaschen und auf Eis 5 min mit eiskaltem Aceton (80%) bedeckt. Nach der Aceton-Fixierung wurde der Zellrasen dreimal mit PBS-Puffer gewaschen und 30 min bei RT mit einem in PBS-Puffer verdünnten monoklonalen Antikörper inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS-Puffer gewaschen, 30 min mit einem sekundären, Fluoreszenz-markierten Antikörper (Alexa<sup>®</sup>Fluor<sup>®</sup>488) inkubiert, erneut dreimal mit PBS-Puffer gewaschen und schließlich mit 1 ml PBS-Puffer bedeckt. Antigenspezifische Fluoreszenz wurde fluoreszenzmikroskopisch (Fluoreszenz Mikroskop IX50) nachgewiesen und photographisch (Digitalkamera, CAMEDIA C-3040ZOOM) dokumentiert.

## 4. Ergebnisse

#### 4.1 Konstruktion und Phänotypisierung des BHV-1-BAC

#### 4.1.1 BHV-1-BAC-Konstruktion

Für die Generierung des BHV-1-BAC-Klones wurde zunächst ein BAC-Rekombinationsplasmid konstruiert. Hierzu wurden mittels PCR (siehe Kapitel 3.2.5.6) zwei 1,4 kbp große DNA-Fragmente der BHV-1-U<sub>S</sub> amplifiziert, die eine 216 bp grosse Deletion des gE-ORFs flankieren (Abbildung 4). Die Primer für die PCR wurden so modifiziert, dass die Fragmente nach der Amplifikation zusätzliche Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen EcoR I, Kpn I und Pac I oder Pac I und Xba I aufwiesen (Tabelle 1). Die Fragmente wurden über die korrespondierenden Restriktionsenzymschnittstellen in die multiple cloning site des Vektors pTZ18R kloniert. Der rekombinante Vektor wurde durch eine Spaltung mit *Pac* I linearisiert und dephosphoryliert (siehe Kapitel 3.2.5.3). Durch die Insertion eines 8,9 kbp Pac I-Fragments (mini-F-pHA2) des BAC-Vektors pHA2, wurde das Rekombinationsplasmid pAgE-pHA2 konstruiert. Diese mini-F-pHA2-(BAC)-Kassette kodiert für einen F-origin of replication, eine bakterielle Chloramphenicolresistenz und das enhanced green fluorescent protein (EGFP) (Adler et al., 2000; Rudolph et al., 2002a). BHV-1-homologe Sequenzabschnitte flankieren die pHA2spezifischen Sequenzen, so dass die BAC-Kassette durch homologe Rekombination in den gE-ORF inserieren konnte (Abbildung 4). Aufgereinigte (siehe Kapitel 3.2.2.1) DNA des Stammes Schönböken wurde zusammen mit der p∆gE-pHA2-DNA mittels Calciumphosphat-Methode (siehe Kapitel 3.2.2.2.1) in PT-Zellen ko-transfiziert. Der infektiöse Zellkulturüberstand wurde fünf Tage post transfectionem (p. t.) auf MDBK-Zellen passagiert. GFP-exprimierende Virusplaques wurden anschließend subkloniert und rekombinante, gE-deletierte Viren durch weitere Passagen bis zur Homogenität aufgereinigt (siehe Kapitel 3.2.2.3). Nach Isolierung der rekombinanten viralen DNA erfolgte eine Spaltung mit der Restriktionsendonuklease Hind III sowie die Southern-Blot-Analyse auf pHA2-spezifische Sequenzen. Für die Transformation elektrokompetenter Bakterien wurde die virale DNA sechs Stunden p. i. isoliert (siehe Kapitel 3.2.2.1) und in E. coli-DH10B-Zellen elektroporiert (siehe Kapitel 3.2.6.1). Die transformierten Bakterien wurden nach der Elektroporation auf LB-Chloramphenicol-Agarplatten ausgestrichen und einzelne Bakterienkolonien selektioniert. Plasmid-Mini-Präparationen (siehe Kapitel 3.2.6.5) der einzelnen Bakterienklone wurden mit Hind III gespalten und elektrophoretisch aufgetrennt. Bei einigen Bakterienklonen wies das Bandenmuster auf die Anwesenheit hochmolekularer,

extrachromosomaler DNA hin. Die Insertion der BAC-Sequenzen war demzufolge erfolgreich und es konnte davon ausgegangen werden, dass das gesamte BHV-1-Genom als künstliches Chromosom in *E. coli* vorlag. Zwei der Klone mit einem identischen Bandenmuster (pBHV-1 $\Delta$ gE 2 und 7) wurden für weitere Analysen ausgewählt.



## Abbildung 4

Schematische Darstellung der Konstruktion von BHV-1AgE und BHV-1rev

Gezeigt ist die Organisation des 136 kbp grossen BHV-1-Genoms und eine *Hin*d III-Restriktionsfragmentkarte (1). Für die BHV-1 $\Delta$ gE-Konstruktion wurde die mini-FpHA2-Kassette des Vektors p $\Delta$ gE-pHA2 durch homologe Rekombination in den U<sub>S</sub>8/gE-ORF inseriert (2). In der Revertante BHV-1rev wurde die gE-Deletion durch homologe Rekombination mit dem Rekombinationsplasmid pTgEr restauriert (2).

#### 4.1.2 Genotypische pBHV-1∆gE 2- und pBHV-1∆gE 7-Charakterisierung

Die Bakterienklone pBHV-1AgE 2 und 7 wurden mittels Restriktionsfragment- und Southern-Blot-Analyse genotypisch charakterisiert. Die Restriktionsfragmentmuster der Klone nach Spaltung mit Hind III waren identisch, unterschieden sich aber in einem Punkt von dem BHV-1-typischen Bandenmuster: In beiden Bakterienklonen war das für BHV-1-typische 7,2 kbp grosse Hind III-L Fragment nicht nachweisbar, dafür konnte ein zusätzliches 15.8 kbp Fragment beobachtet werden, das auf den Einbau von BAC-Sequenzen hindeutete. Die korrekte Insertion der mini-F-pHA2-Kassette in das Genom der BAC-Klone wurde dann durch die Southern-Blot-Hybridisierung mit einer pHA2-spezifischen Sonde überprüft (Abbildung 5). Dabei konnte das erwartete Reaktionsmuster bestätigt werden: Die pHA2-Sonde hybridisierte ausschließlich mit der 15,8 kbp Bande der BAC-Mutanten und reagierte mit keiner der BHV-1-spezifischen Banden. Hiermit wurde bewiesen, dass in beiden analysierten pBHV-1AgE-Klonen die BAC-Vektor-Sequenzen korrekt in das virale Genom inseriert worden waren und eine stabile Vermehrung des BHV-1-Gesamtgenoms als künstliches bakterielles Chromosom in E. coli erfolgte. Bei der anschließenden BAC-Mutagenese zur Generierung rekombinanter Viren wurde ausschließlich der Klon pBHV-1 $\Delta$ gE 2 verwendet.



## Abbildung 5

#### Southern-Blot-Analyse der pBHV-1AgE-Klone 2 und 7

BHV-1-, pBHV-1∆gE 2- und pBHV-1∆gE 7- DNA wurde mit *Hin*d III gespalten und in einem 1,2% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (a). Eine 1 kbp DNA-Ladder (Fa. Promega Mannheim) wurde als Größenmarker aufgetragen. Die Größe der Marker-Banden in kbp ist am linken Rand der Abbildung angegeben. Die Proben wurden für den Nachweis BAC-spezifischer Sequenzen auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer DIG-markierten mini-F-pHA2-Sonde hybridisiert (b). Die reagierenden Banden sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

#### 4.1.3 BHV-1∆gE-Rekonstituierung aus pBHV-1∆gE-DNA

Die Vermehrung eines stabilen und infektiösen BHV-1-Gesamtgenomes als bakterielles artifizielles Chromosom wurde durch die Rekonstituierung rekombinanter Viren aus BAC-DNA demonstriert. Dazu wurde pBHV-1 $\Delta$ gE DNA aus *E. coli* isoliert (siehe Kapitel 3.2.6.6) und durch Lipofektion (siehe Kapitel 3.2.2.2.2) in PT-Zellen transfiziert. 12 bis 16 h nach der DNA-Transfektion wurden fluoreszenzmikroskopisch GFP-exprimierende Zellen beobachtet, die sich zu BHV-1-spezifischen Plaques entwickelten. Das Wachstum grün fluoreszierender Virusplaques bestätigte, dass das BHV-1-Genom erfolgreich als ein infektiöses *bacterial artificial chromosome* kloniert wurde.

#### 4.1.4 Konstruktion der Revertante BHV-1rev

Um auszuschließen, dass der Phänotyp der BHV-1∆gE Mutante auf anderen Mutationen als der gE-Deletion beruhte, wurde die gE-positive Revertante BHV-1rev generiert (Abbildung 4). Dazu wurde zunächst das Rekombinationsplasmid pTgEr konstruiert. Mit Hilfe der PCR wurde ein 1,1 kbp DNA-Fragment amplifiziert, das die gE-Deletion umfasste (Tabellen 2 und 6). Dieses Fragment wurde durch TOPO TA Cloning<sup>®</sup> (siehe Kapitel 3.2.5.5) in den Vektor pCR2.1-TOPO<sup>®</sup> kloniert und der resultierende Klon als pTgEr bezeichnet. Die aufgereinigte (siehe Kapitel 3.2.6.6) pTgEr-DNA wurde zusammen mit pBHV-1∆gE-DNA durch Lipofektion in PT-Zellen ko-transfiziert. Der infektiöse Zellkulturüberstand wurde nach fünf Tagen auf MDBK-Zellen passagiert. Virusplaques, die kein GFP mehr exprimierten, wurden subkloniert und rekombinante Viren mit dem restaurierten gE-ORF durch weitere Passagen bis zur Homogenität aufgereinigt (siehe Kapitel 3.2.2.3).

#### 4.1.5 Western-Blot-Analyse der rekombinanten Viren

MDBK-Zellen wurden mit BHV-1, BHV-1∆gE, BHV-1rev oder mock (siehe Kapitel 3.2.1.4) infiziert. Zell-Lysate wurden gewonnen (siehe Kapitel 3.2.1.5) und durch *Western-Blot*-Analyse (siehe Kapitel 3.2.7.3) mit einem BHV-1-spezifischen monoklonalen Antikörper (mAk 2-1) auf die Expression des Glykoprotein E getestet (Abbildung 6). Der mAk 2-1 reagierte, in Übereinstimmung mit publizierten Glykoprotein E-Molekulargewichtsangaben (Yoshitake et al., 1997), spezifisch mit einer 94 kDa grossen Proteinbande in Lysaten des Wildtyp-Virus und auch der Revertante. Wie erwartet reagierte das Lysat BHV-1∆gE-infizierter Zellen ebenso wie das Kontroll-Lysat in der *Western-Blot*-Analyse negativ. Die

## Ergebnisse

Deletion von gE einerseits und die erfolgreiche Re-insertion und Expression von gEspezifischen Sequenzen andererseits wurde damit belegt.



## Abbildung 6

Western-Blot-Analyse der gE-negativen Mutante BHV-1∆gE

Lysate infizierter Zellen wurden durch SDS-(12%)-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Der Glykoprotein E-spezifische mAk 2-1 wurde in einer Verdünnung von 1/25 eingesetzt. Die mit Pfeilen markierten Protein-Banden demonstrieren deutlich die Expression des 94 kDa großen gE durch den Wildtyp BHV-1 und die Revertante BHV-1rev.

#### 4.1.6 BHV-1∆gE-Wachstumsanalyse

#### 4.1.6.1 Plaquegrößenbestimmung

Frühere Arbeiten hatten gezeigt, dass eine Deletion des Glykoprotein E die Zell-zu-Zell-Ausbreitung (*cell-to-cell spread*, CTCS) des BHV-1 erheblich beeinträchtigt (Rebordosa et al., 1996). Daher wurde der *cell-to-cell spread* der BHV-1ΔgE-Mutante in einem sogenannten Plaque-Assay analysiert. Dabei wurde der *cell-to-cell spread* unter einem semisoliden *overlay in vitro* beurteilt. MDBK-Zellen wurden dazu mit BHV-1, BHV-1ΔgE und der Revertante BHV-1rev infiziert, mit Methylcellulose überschichtet und für 48 h inkubiert. Der maximale Durchmesser von je 150 Virusplaques wurde mit einem skalierten Messokular bestimmt (siehe Kapitel 3.2.3.1). Die Mittelwerte wurden gebildet und die Standardabweichung errechnet. Die Messwerte in Prozent wurden in Relation zu dem für BHV-1 ermittelten Wert (100%) gesetzt. Dabei wurde für BHV-1 und BHV-1rev ein identischer, für BHV-1ΔgE ein um 45% verminderter Plaquedurchmesser ermittelt (Abbildung 7). Das Resultat der Plaquegrößenbestimmung bestätigte somit den Einfluss von gE auf den BHV-1-CTCS.

#### 4.1.6.1 Ein-Schritt-Wachstumskinetiken

Durch die Klonierung der BAC-Kassette in den BHV-1-gE-ORF wurden ca. 8,9 kbp virusfremder DNA in das BHV-1-Genom inseriert. Um beurteilen zu können, welchen Einfluss die Expression BHV-1-fremder Gene und die gE-Deletion auf die BHV-1-Replikation nehmen, wurden die Wachstumseigenschaften von BHV-1, BHV-1ΔgE und BHV-1rev durch die Ermittlung von Ein-Schritt-Wachstumskinetiken analysiert und miteinander verglichen. Dazu wurden MDBK-Zellen mit BHV-1, BHV-1ΔgE und BHV-1rev infiziert und 0, 4, 8, 12, 16, 24, 48 und 72 h p. i. die intra- und extrazellulären Virustiter bestimmt (siehe Kapitel 3.2.3.2). Die Experimente wurden einmal wiederholt, die Mittelwerte gebildet und die Standardabweichung errechnet. In einer graphischen Darstellung der Wachstumskinetiken unterschieden sich die Verläufe der BHV-1, BHV-1ΔgE und BHV-1rev spezifischen Wachstumskurven intra- wie extrazellulär kaum voneinander (Abbildung 8), was den Schluss erlaubt, dass weder die Expression BHV-1-fremder Gene noch die gE-Deletion die Virusreplikation beeinträchtigt.



## Abbildung 7

Relative Plaquegrößen der gE-negativen Mutante BHV-1AgE

48 h p. i. wurde der maximale Durchmesser von je 150 BHV-1-, BHV-1 $\Delta$ gE- und BHV-1rev-spezifischen Virusplaques bestimmt. Der für BHV-1 ermittelte durchschnittliche Messwert der Plaques wurde auf 100% gesetzt. Striche über den Balken bezeichnen die Standardabweichung. BHV-1 $\Delta$ gE-Plaques waren im Mittel 45% kleiner als die des gE-exprimierenden BHV-1.





## Abbildung 8

Ein-Schritt-Wachstumskinetik der gE-negativen Mutante BHV-1 AgE

MDBK-Zellen wurden mit BHV-1, BHV-1∆gE und BHV-1rev (MOI 1) infiziert. 0, 4, 8, 12, 16, 24, 48 und 72 h p. i. wurden die intra- und extrazellulären Virustiter als KID<sub>50</sub>/ml bestimmt. Striche über den Meßwerten bezeichnen die Standardabweichung. Intra- und extrazellulär konnte kein Wachstumsunterschied zwischen dem Wildtyp BHV-1 und der gE-negativen-Mutante festgestellt werden.

#### 4.2 BHV-1-RecE/T-Mutagenese

#### 4.2.1 Konstruktion und Phänotypisierung der BHV-1∆gE-gG-Doppelmutante

#### 4.2.1.1 Konstruktion der BHV-1∆gE-gG-Mutante

Ein wichtiger Vorteil der BAC-Technologie für die Herpesvirusforschung ist die Manipulierbarkeit viraler Genome in Bakterien. Die RecE/T-Klonierung ist eine kürzlich für die Herpesvirus-Mutagenese etablierte Methode für die zielgerichtete Deletion viraler Gene durch homologe Rekombination in E. coli (Wagner et al., 2002). Mit Hilfe der neuen Methode wurden für das Glykoprotein G (U<sub>s</sub>4) kodierende Sequenzen der pBHV-1ΔgE-DNA in E. coli durch ein Kanamycinresistenz-Gen (kan) ersetzt (siehe Kapitel 3.2.6.4; Abbildung 9). Für die Amplifikation des pACYC177-Kanamycinresistenz-Gens wurden die in Tabelle 3 angegebenen Primer verwendet. Die Primer enthielten 50 BHV-1-homologe Basenpaare am 5' Terminus und 22 (forward Primer) bzw. 23 (reverse Primer) pACYC177-3' Terminus. spezifische Basenpaare am Das PCR-Produkt wurde in rekombinationskompetente (siehe Kapitel 3.2.6.3) E. coli-DH10B-Zellen elektroporiert. Nach der Elektroporation wurden die Bakterien auf LB-Chloramphenicol/Kanamycin-Selektions-Agarplatten ausplattiert und bei  $37^{\circ}$ C inkubiert. BAC-DNA (pBHV-1 $\Delta$ gE-gG) doppelresistenter Bakterien wurde isoliert (siehe Kapitel 3.2.6.6) und rekombinantes Virus (BHV-1\DeltagE-gG) durch Transfektion (siehe Kapitel 3.2.2.2.2) in PT-Zellen rekonstituiert. Die Rekonstituierung infektiöser Viren aus rekombinanter bakterieller DNA illustrierte die erfolgreiche Etablierung des RecE/T-Mutagenese-Systems für die BHV-1-Manipulation auf der Basis eines BAC-Klones.

#### 4.2.1.2 Konstruktion der Revertante BHV-1∆gG

Nakamichi et al. (2000) haben eine Beeinträchtigung des BHV-1-CTCS durch eine singuläre gG-Deletion beschrieben. Um die Wachstumseigenschaften der Doppeldeletionsmutante BHV-1ΔgE-gG und der gE-negativen Mutante BHV-1ΔgE mit denen einer gG-negativen Mutante vergleichen zu können, wurde die Revertante BHV-1ΔgG konstruiert. Dazu wurde der gE-ORF in der Doppeldeletionsmutante BHV-1ΔgE-gG restauriert (Abbildung 9). Für die homologe Rekombination wurde der Vektor pTgEr (siehe Kapitel 4.1.4) verwendet. Aufgereinigte (siehe Kapitel 3.2.6.6) pTgEr-DNA wurde zusammen mit pBHV-1ΔgE-gG-DNA durch Lipofektion in PT-Zellen ko-transfiziert. Der infektiöse Zellkulturüberstand wurde nach fünf Tagen auf MDBK-Zellen passagiert. Virusplaques, die das GFP nicht mehr exprimierten, wurden subkloniert und rekombinante Viren mit einem restaurierten gE-ORF

und einer singulären gG-Deletion durch weitere Passagen bis zur Homogenität aufgereinigt (siehe Kapitel 3.2.2.3).



## Abbildung 9

Schematische Darstellung der Konstruktion von BHV-1AgE-gG und BHV-1AgG

Gezeigt ist die Organisation des 136 kbp grossen BHV-1-Genoms und eine *Hind III*-Restriktionsfragmentkarte (1). Für die Konstruktion von BHV-1 $\Delta$ gE-gG wurde die *kan*-Kassette durch homologe Rekombination in den U<sub>S</sub>4/gG-ORF inseriert (2). In der BHV-1 $\Delta$ gG-Mutante wurde die gE-Deletion durch homologe Rekombination mit dem Rekombinationsplasmid pTgEr restauriert (2).

# 4.2.1.3 Genotypische Charakterisierung der BHV-1 $\Delta$ gE-gG- und BHV-1 $\Delta$ gG-Mutanten

BHV-1AgE-gG- und BHV-1AgG-DNA wurde aus infizierten MDBK-Zellen isoliert (siehe Kapitel 3.2.2.1). Das Genom beider Mutanten wurde in Hind III-Restriktionsfragment- und Southern-Blot-Analysen mit der BHV-1-, BHV-1AgE- und BHVrev-DNA verglichen (Abbildung 10). In der Restriktionsfragmentanalyse unterschied sich BHV-1\DeltagE in den unter 4.1.2 beschriebenen Punkten von BHV-1 und BHV-1rev. Bei der Doppelmutante BHV-1\DeltagE-gG waren im Unterschied zu BHV-1\DeltagE zwei spezifische 13 kbp und 2,4 kbp große DNA-Banden nachweisbar, da durch die kan-Insertion in den gG-ORF eine zusätzliche Hind III-Erkennungssequenz in das 15,8 kbp Fragment eingeführt wurde. Infolge der Restaurierung des gE-ORFs unterschied sich die BHV-1AgG-Mutante von der BHV-1AgE-gG Doppelmutante durch eine Verkleinerung der 13 kbp DNA-Bande auf 4,4 kbp. Durch die Southern-Blot-Hybridisierung mit einer kan-Sonde wurde die korrekte Insertion des Kanamycinresistenz-Gens in das virale Genom überprüft. Dabei wurde das erwartete Reaktionsmuster beobachtet: Die kan-Sonde reagierte mit den 13 kbp und 2,4 kbp grossen BHV-1AgE-gG-spezifischen DNA-Fragmenten sowie mit den 4,4 kbp und 2,4 kbp DNA-Fragmenten der BHV-1AgG-Mutante, aber mit keiner der BHV-1-, BHV-1rev- und BHV-AgE-DNA-Banden. Die singuläre gG-Deletion oder gE-gG-Doppeldeletion wurde durch die Genotypisierung somit bestätigt.

# 4.2.1.4. Analyse der gE- und gG-Expression durch indirekte Immunfluoreszenz (IIFT)

Die Glykoprotein-Expression der BHV-1 Deletionsmutanten wurde in einem indirekten Immunfluoreszenztest (IIFT) mit monoklonalen Antikörpern gegen gB (mAk 72/14/6), gE (mAk d3) und gG (mAk BHV1gG) analysiert und mit dem BHV-1- und BHV-1rev-Expressionsmuster verglichen (Abbildung 11). Dabei wurde folgendes Reaktionsmuster beobachtet: BHV-1 und die Revertante BHV-1rev reagierten im IIFT positiv mit allen monoklonalen Antikörpern. Bei der Deletionsmutante BHV-1 $\Delta$ gE war eine gB- und gG-Expression, nicht aber eine gE-Expression nachweisbar. Die Doppeldeletionsmutante BHV- $\Delta$ gE-gG reagierte im IIFT nur mit dem mAk gegen das Glykoprotein B positiv, dagegen konnte bei dem BHV-1 $\Delta$ gG-Virus zusätzlich zu der gB- auch eine gE-Expression nachgewiesen werden.


#### Southern-Blot-Analyse der rekombinanten Viren mit einer kan-spezifischen Sonde

BHV-1-, BHV-1 $\Delta$ gE-, BHV-1rev-, BHV-1 $\Delta$ gE-gG- und BHV-1 $\Delta$ gG-DNA wurde mit *Hin*d III gespalten und in einem 1% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (a). Eine 1 kbp DNA-Ladder (Fa. Promega Mannheim) wurde als Größenmarker aufgetragen. Die Größe der Marker-Banden in kbp ist am linken Rand der Abbildung angegeben. Die gespaltene DNA wurde auf eine Nylonmembran transferiert und für den Nachweis *kan*-spezifischer Sequenzen mit einer DIG-markierten *kan*-Sonde hybridisiert (b). Pfeile bezeichnen BHV-1 $\Delta$ gE-gG- und BHV-1 $\Delta$ gG-spezifische DNA-Banden, die mit der *kan*-Sonde reagierten.



## Indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT)

Immunfluoreszenz-Analyse BHV-1-, BHV-1 $\Delta$ gE-, BHV-1rev-, BHV-1 $\Delta$ gE-gG- und BHV-1 $\Delta$ gG-spezifischer Virusplaques. 48 h p. i. wurden die Plaques in einem IIFT mit monoklonalen Antikörpern gegen gB, gE und gG angefärbt. Gebundene Antikörper wurden mit einem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper (anti-mouse ALEXA488<sup>TM</sup>) detektiert. Vergrößerung = 200 x.

## 4.2.1.5 BHV-1∆gE-gG Wachstumsanalyse

## 4.2.1.5.1 Plaquegrößenbestimmung

Frühere Arbeiten hatten gezeigt, dass gE und gG in die direkte Zell-zu-Zell-Ausbreitung des BHV-1 involviert sind (Nakamichi et al., 2000; Rebordosa et al., 1996). Der Effekt einer gEgG-Doppeldeletion der Mutante BHV-1AgE-gG auf den BHV-1-CTCS wurde durch die Bestimmung der Plaquegrößen analysiert. BHV-1-, BHV-1 $\Delta$ gE-, BHV-1rev-, BHV-1\DeltagE-gG- und BHV-1\DeltagG-spezifische Plaques wurden dazu miteinander verglichen. MDBK-Zellen wurden mit BHV-1, BHV-1\DeltagE, BHV-1rev, BHV-1\DeltagE-gG und BHV-1\DeltagG infiziert, mit Methylcellulose überschichtet und für 48 h inkubiert. Der maximale Durchmesser von je 150 Virusplagues wurde mit einem skalierten Messokular bestimmt (siehe Kapitel 3.2.3.1). Die Mittelwerte wurden gebildet und die Standardabweichung errechnet. Die Werte wurden in Relation gesetzt zu dem für BHV-1 ermittelten Messwert. Dabei wurde für die Doppeldeletions-Mutante BHV-1AgE-gG eine um 55% verminderte Plaquegröße ermittelt (Abbildung 12). Die alleinige gG-Deletion der BHV-1\DeleG-Mutante resultierte in einer um 19% reduzierten Plaquegröße im Vergleich zum Wildtyp. Die Doppeldeletion beeinträchtigte den CTCS demzufolge erheblich mehr als eine singuläre gG-Deletion, aber nur geringfügig mehr als eine einzelne gE-Deletion, welche in Plaquegrößen resultierte, die um 45% reduziert waren (siehe Kapitel 4.1.6.1).

## 4.1.2.5.2 Ein-Schritt-Wachstumskinetiken

Durch die Bestimmung von Einschritt-Wachstumskinetiken wurden die Replikationseigenschaften von BHV-1 $\Delta$ gE-gG analysiert und mit BHV-1, BHV-1 $\Delta$ gE, BHV-1rev und BHV-1 $\Delta$ gG verglichen. Dazu wurden MDBK-Zellen mit den entsprechenden Viren infiziert (siehe Kapitel 3.2.3.2) und 0, 4, 8, 12, 16, 24, 48 und 72 h p. i. intra-, und extrazelluläre Virustiter bestimmt. Die Experimente wurden einmal wiederholt, die Mittelwerte gebildet und die Standardabweichung berechnet. Die virusspezifischen Wachstumskurven unterschieden sich intra- wie extrazellulär kaum voneinander (Abbildung 13), und alle Viren replizierten zu beinahe identischen End-Titern. Somit hatte, im Gegensatz zu den deutlichen Effekten auf die Plaquebildung, die gE-gG-Doppeldeletion ebenso wenig wie die singuläre Deletion eines der beiden Glykoproteine einen Einfluss auf die hier quantifizierte BHV-1-Replikation.



<u>Relative Plaquegrößen der BHV-1∆gE-gG- und BHV-1∆gG-Mutanten</u>

48 h p. i. wurde der maximale Durchmesser von je 150 BHV-1-, BHV-1 $\Delta$ gE-, BHV-1rev-, BHV-1 $\Delta$ gE-gG- und BHV-1 $\Delta$ gG-spezifischen Plaques bestimmt. Der für BHV-1 ermittelte durchschnittliche Meßwert wurde auf 100% gesetzt. Striche über den Balken bezeichnen die Standardabweichung. BHV-1 $\Delta$ gE-gG Plaques waren im Mittel um 55%, BHV-1 $\Delta$ gG-spezifische Plaques um 19% kleiner als die des Wildtyp-BHV-1.





Ein-Schritt-Wachstumskinetiken der BHV-1AgE-gG- und BHV-1AgG-Mutanten

MDBK-Zellen wurden mit BHV-1, BHV-1 $\Delta$ gE, BHV-1rev, BHV-1 $\Delta$ gE-gG und BHV-1 $\Delta$ gG (MOI 1) infiziert. 0, 4, 8, 12, 16, 24, 48 und 72 h p. i. wurden die intra- und extrazellulären Virustiter als KID<sub>50</sub>/ml bestimmt. Striche über den Meßwerten bezeichnen die Standardabweichung. Es konnte kein Wachstumsunterschied zwischen dem parentalen Virus und den Deletionsmutanten festgestellt werden.

## 4.2.2 Konstruktion und Phänotypisierung der BHV-1∆gE-gM-Doppelmutante

#### 4.2.2.1 Konstruktion der BHV-1∆gE-gM-Mutante

Die RecE/T-Klonierung bietet die Möglichkeit der raschen Generierung doppelt Gendeletierter BHV-1-Mutanten auf der Basis des gE-negativen BAC-Klones. Um den Einfluss einer gleichzeitigen Deletion der BHV-1-Glykoproteine gE und gM auf das Viruswachstum in Zellkultur beurteilen zu können, wurde eine gE-gM-negative BAC-Mutante generiert. Dazu wurden mittels RecE/T-Mutagenese (siehe Kapitel 3.2.6.4.) gM (U<sub>L</sub>10)-spezifische Sequenzen der pBHV-1AgE-DNA in rekombinationskompeten Bakterien durch ein kan-Gen ersetzt (Abbildung 14). Die in Tabelle 4 angegebenen Primer wurden zur Amplifikation des Kanamycinresistenz-Gens verwendet. Neben 22 (forward Primer) oder 23 (reverse Primer) 3' terminalen kan-spezifischen Basenpaaren enthielten die Primer 50 gM-spezifische 5' terminale Basenpaare für die homologe Rekombination. Das PCR-Produkt wurde wie unter 3.2.6.3 beschrieben in *E. coli*-DH10B-Zellen elektroporiert. Nach dem elektischen Puls wurden die Bakterien für die Doppelselektion auf LB-Chloramphenicol/Kanamycin-Agarplatten ausplattiert und bei 37°C inkubiert. BAC-DNA (pBHV-1∆gE-gM) doppelresistenter Bakterien wurde isoliert (siehe Kapitel 3.2.6.6) und rekombinantes Virus mit einer gE-gM-Doppeldeletion (BHV-1\DeltagE-gM) konnte durch Transfektion (siehe Kapitel 3.2.2.2.2) in PT-Zellen rekonstituiert werden.

## 4.2.2.2 Genotypische Charakterisierung der BHV-1∆gE-gM-Mutante

Die rekonstituierte BAC-Mutante BHV-1 $\Delta$ gE-gM wurde in in Zellkultur vermehrt und die DNA aus infizierten MDBK-Zellen isoliert (siehe Kapitel 3.2.2.1). Das Genom des rekombinanten Virus wurde in *Hin*d III-Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP)- und *Southern-Blot*-Analysen mit der DNA von BHV-1, BHV-1 $\Delta$ gE und BHVrev verglichen (Abbildung 15). Durch die *kan*-Insertion in den gM-ORF wurde eine zusätzliche *Hin*d III-Erkennungssequenz in das 19,1 kbp (*Hin*d III B)-Fragment eingeführt, so dass das BHV-1 $\Delta$ gE-gM-Genom in der RFLP-Analyse anstelle der 19,1 kbp DNA-Bande zwei zusätzliche 12,5 kbp und 6,6 kbp Banden aufwies. Durch die *Southern-Blot*-Hybridisierung mit einer *kan*-spezifischen DNA-Sonde wurde die korrekte Insertion des Kanamycinresistenz-Gens in das Genom der gE-gM-negativen BHV-1 $\Delta$ gE-gM spezifischen 12,5 kbp und 6,6 kbp Fragmenten. Somit konnte durch die genotypische BHV-1 $\Delta$ gE-gM-Charakterisierung die Deletion der gE- und gM-ORFs bestätigt werden.



Schematische Darstellung der Konstruktion von BHV-1∆gE-gM

Gezeigt ist die Organisation des 136 kbp grossen BHV-1-Genoms und eine *Hind III*-Restriktionsfragmentkarte (1). Für die BHV-1 $\Delta$ gE-gM Konstruktion wurde die *kan*-Kassette durch homologe Rekombination in den U<sub>L</sub>10/gM-ORF inseriert (2).



## Southern-Blot-Analyse der BHV-1AgE-gM-Mutante

DNA von BHV-1, BHV-1 $\Delta$ gE und BHV-1 $\Delta$ gE-gM wurde mit *Hin*d III gespalten und in einem 1,2% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (a). Eine 1 kbp DNA-Ladder wurde als Größenmarker aufgetragen. Die Größe der Marker-Banden in kbp ist am linken Rand der Abbildung angegeben. Die gespaltene DNA wurde auf eine Nylonmembran transferiert und für den Nachweis *kan* spezifischer Sequenzen mit einer DIG-markierten *kan*-Sonde hybridisiert (b). Pfeile bezeichnen mit der *kan*-Sonde reagierende und für BHV-1 $\Delta$ gE-gM spezifische DNA-Banden.

#### 4.2.2.3 BHV-1∆gE-gM-Wachstumsanalyse

#### 4.2.2.3.1 Plaquegrößenbestimmung

Frühere Arbeiten hatten gezeigt, dass eine gleichzeitige gE-gM-Deletion des Pseudorabies Virus die Replikation und Zell-zu-Zell-Ausbreitung in vitro drastisch einschränkt (Brack et al., 1999; Brack et al., 2000). Der Effekt einer gE-gM-Doppeldeletion auf den BHV-1-CTCS wurde in einem Plaque-Assay analysiert. Dabei wurden die Durchmesser BHV-1AgE-gM-, BHV-1-, BHV-1AgE- und BHV-1rev-spezifischer Plaques verglichen. MDBK-Zellen wurden mit dem Wildtyp und den BHV-1-Mutanten infiziert, mit einem semisoliden overlay überschichtet und für 48 h inkubiert (siehe Kapitel 3.2.3.1). Der maximale Durchmesser von je 150 Virusplaques wurde wie unter 3.2.3.1 beschrieben mit einem skalierten Messokular bestimmt. Die Mittelwerte wurden gebildet und die Standardabweichung errechnet. Dabei wurde für die Doppeldeletions-Mutante BHV-1AgE-gM im Vergleich mit dem Wildtyp BHV-1 Schönböken (100%) eine um 54% verminderte Plaquegröße ermittelt (Abbildung 16). Dieser Wert ist beinahe identisch mit dem, der für die gE-gG-negative Doppelmutante bestimmt wurde (siehe Kapitel 4.2.1.5.1) und steht im deutlichen Wiederspruch zu den Beobachtungen, die bei PRV gemacht wurden.

#### 4.2.2.3.2 Ein-Schritt-Wachstumskinetiken

Brack et al. (1999, 2000) haben bei einer gE-gM-negativen PRV-Mutante eine erheblich eingeschränkte Replikation beobachtet. Um beurteilen zu können, ob die Deletion beider Glykoproteine die BHV-1-Replikation in ähnlicher Weise beeinträchtigt, wurden die Replikationseigenschaften von BHV-1∆gE-gM durch die Ermittlung von Einschritt-Wachstumskinetiken analysiert. Dazu wurden MDBK-Zellen mit BHV-1∆gE-gM, BHV-1, BHV-1∆gE und BHV-1rev infiziert (siehe Kapitel 3.2.3.2). Die intra-, und extrazellulären Virustiter wurden 0, 4, 8, 12, 16, 24, 48 und 72 h p. i. bestimmt. Die Experimente wurden einmal wiederholt, die Mittelwerte daraus gebildet und die Standardabweichung berechnet. In bezug auf die in den Zellkulturüberstand sezernierten Viren unterschieden sich die Wachstumskinetiken praktisch nicht voneinander (Abbildung 14). Bei BHV-1∆gE-gM konnte aber, verglichen mit den anderen Viren, 48 h und 72 h p. i. eine signifikante Reduktion der intrazellulären Virustiter beobachtet werden (Abbildung 17). Dennoch zeigen diese Ergebnisse, dass die Replikation der hier beschriebenen gE- und gM-negativen BHV-1-Mutante, anders als bei der von Brack et al. beschriebenen PRV-Mutante, nur geringfügig beeinträchtigt ist.



Relative Plaquegrößen der gE-gM-Doppeldeletionsmutante

48 h p. i. wurde der maximale Durchmesser von je 150 BHV-1-, BHV-1 $\Delta$ gE-, BHV-1rev- und BHV-1 $\Delta$ gE-gM-spezifischen Plaques bestimmt. Der für BHV-1 ermittelte durchschnittliche Meßwert wurde auf 100% gesetzt. Striche über den Balken bezeichnen die Standardabweichung. BHV-1 $\Delta$ gE-gM-Plaques waren im Mittel auf 46% reduziert.





Ein-Schritt-Wachstumskinetiken der gE-gM-Doppeldeletionsmutante

MDBK-Zellen wurden mit BHV-1, BHV-1 $\Delta$ gE, BHV-1rev und BHV-1 $\Delta$ gE-gM (MOI 1) infiziert. 0, 4, 8, 12, 16, 24, 48 und 72 h p. i. wurden die intra- und extrazellulären Virustiter als KID<sub>50</sub>/ml bestimmt. Striche über den Meßwerten bezeichnen die Standardabweichung. Im Vergleich mit dem Wildtyp und BHV-1 $\Delta$ gE wurden bei der BHV-1 $\Delta$ gE-gM-Doppelmutante 48 h und 72 h p. i. etwa 10fach reduzierte intrazelluläre Virustiter bestimmt.

#### 4.2.3 Konstruktion der pBHV-1∆gE-gK-Doppelmutante

#### 4.2.3.1 pBHV-1∆gE-gK-Konstruktion

Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass das Glykoprotein K bei HSV-1, PRV und VZV ein essentielles Genprodukt darstellt (Hutchinson und Johnson, 1995; Klupp et al., 1998; Mo et al., 1999). Um zu überprüfen, ob gK für die BHV-1-Replikation ebenfalls essentiell ist, wurde der für das Glykoprotein K (UL53) kodierende offene Leserahmen (ORF) der pBHV-1AgE-DNA mit Hilfe der RecE/T-Mutagenese (siehe Kapitel 3.2.6.4) deletiert. Dabei wurden gK-Sequenzen durch homologe Rekombination in E. coli durch ein spezifische Kanamycinresistenz-Gen ersetzt (Abbildung 18). Für die Amplifikation des pACYC177-Kanamycinresistenz-Gens wurden die in Tabelle 4 angegebenen Primer verwendet. Die Primer enthielten 50 gK-spezifische Basenpaare für die homologe Rekombination und 22 (forward Primer) bzw. 23 (reverse Primer) kan-spezifische bp. Das Amplifikat wurde in rekombinationskompetente (siehe Kapitel 3.2.6.3) E. coli-DH10B-Zellen elektroporiert. Nach der Transformstion wurden die Bakterien auf LB-Chloramphenicol/Kanamycin-Selektions-Agarplatten ausplattiert und bei 37°C inkubiert. BAC-DNA (pBHV-1∆gE-gK) wurde aus doppelresistenten Bakterien isoliert (siehe Kapitel 3.2.6.6). Bei mehrfach wiederholten Transfektionsexperimenten (siehe Kapitel 3.2.2.2.2) konnte aus pBHV-1∆gE-gK-DNA kein rekombinantes Virus rekonstituiert werden. Die Transfektionsüberstande wurden auf MDBK-Zellen passagiert, ohne dass Infektiösität nachgewiesen werden konnte. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass gK bei BHV-1, ebenso wie bei HSV-1, PRV und VZV, essentiell ist für die virale Replikation.

#### 4.2.3.2 Genotypische pBHV-1∆gE-gK-Charakterisierung

Mit Hilfe der BAC-Technologie können die virale Genome nicht replikationsfähiger Deletionsmutanten aus Bakterien isoliert und genotypisiert werden. pBHV-1AgE-gK-DNA wurde aus Bakterien isoliert (siehe Kapitel 3.2.6.6) und in Hind III-Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus- und Southern-Blot-Analysen mit BHV-1-, pBHV-1∆gE- und BHVrev-DNA verglichen (Abbildung 19). Durch die kan-Insertion in den gK-ORF wurde eine zusätzliche Hind III-Erkennungssequenz in ein 8,8 kbp (Hind III J)-Fragment eingeführt, so dass das pBHV-1\DeltagE-gK-Genom in der RFLP-Analyse anstelle der 8,8 kbp DNA-Bande zwei zusätzliche 1,3 kbp und 7,5 kbp Banden aufwies. Durch die Southern-Blot-Hybridisierung mit einer kan-Sonde wurde die korrekte Insertion des Kanamycinresistenz-Gens in das virale Genom überprüft. Dabei reagierte die kan-Sonde wie

erwartet nur mit den pBHV-1∆gE-gK spezifischen 1,3 kbp und 7,5 kbp Fragmenten. Hierdurch wurde bewiesen, dass Teile des gK-ORF durch ein *kan*-Gen ersetzt worden waren und es konnte gefolgert werden, dass der beobachtete Replikationsdefekt der BHV-1-Mutante auf der Glykoprotein K-Deletion basierte.



Schematische Illustration der Konstruktion von pBHV-1∆gE-gK

Gezeigt ist die Organisation des 136 kbp großen BHV-1-Genoms und eine *Hind III*-Restriktionsfragmentkarte (1). Für die pBHV-1 $\Delta$ gE-gK Konstruktion wurde die *kan*-Kassette durch homologe Rekombination in den U<sub>L</sub>53/gK-ORF inseriert (2).



## Southern-Blot-Analyse der pBHV-1∆gE-gK-Mutante

BHV-1-, BHV-1 $\Delta$ gE- und pBHV-1 $\Delta$ gE-gK-spezifische DNA wurde mit *Hind* III gespalten und in einem 1,2% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (a). Eine 1 kbp DNA Ladder wurde als Größenmarker aufgetragen. Die Größe der Marker-Banden in kbp ist am linken Rand der Abbildung angegeben. Die gespaltene DNA wurde auf eine Nylonmembran transferiert und für den Nachweis *kan*-spezifischer Sequenzen mit einer DIG-markierten *kan*-Sonde hybridisiert (b). Pfeile bezeichnen mit der *kan*-Sonde reagierende pBHV-1 $\Delta$ gE-gK-spezifische DNA-Banden.

# 5. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das vollständige Genom des BHV-1 Stammes Schönböken erstmals als ein künstliches bakterielles Chromosom (*Bacterial Artificial Chromosome*, BAC) kloniert und in Prokaryoten nicht nur vermehrt, sondern auch gezielt manipuliert. Der nun als infektiöses bakterielles Chromosom vorliegende BHV-1-Gesamtklon wurde durch zielgerichtete Insertion einer mini-F-Plasmid-Kassette in das virale Genom generiert. Durch Einfügen der entsprechenden BAC-Sequenzen in den offenen Leserahmen des Glykoprotein E (gE) wurde in dem rekonstituierten BHV-1-gE deletiert. Der so konstruierte BHV-1-BAC-Klon wurde daher als pBHV-1- $\Delta$ gE, das daraus rekonstituierbare Virus als BHV-1- $\Delta$ gE bezeichnet.

Der erste Teil der Arbeit umfasste die Konstruktion und Phänotypisierung des BHV-1-BACs. Der BAC-Klon pBHV-1∆gE wurde im zweiten Teil dieser Arbeit mit Hilfe der, für die Mutagenese herpesviraler BAC-DNA etablierten, RecE/T-Mutagenese (Wagner et al., 2002) gezielt manipuliert. Im Vergleich zu den bisher verfügbaren, langwierigen klassischen Methoden der Rekombination in eukaryotischen Zellen, besitzt der nun verfügbare BAC-Klon das Potential einer schnellen Manipulierbarkeit, unbeeinflusst von einem adaptiven Umfeld. Durch homologe Rekombination mittels RecE/T-Mutagenese in *E. coli* wurden drei verschiedene BHV-1-Mutanten konstruiert, bei denen zusätzlich zu gE entweder das Glykoprotein G (gG), M (gM) oder K (gK) deletiert worden war. BHV-1-Doppelmutanten und Revertanten mit einem restaurierten gE wurden *in vitro* phänotypisiert. Hierbei konnten spezifische Eigenschaften der einzelnen Deletionsmutanten näher definiert und mit dem Wildtyp-Virus verglichen werden.

## 5.1 Charakterisierung des infektiösen BHV-1-BAC-Klones BHV-1∆gE in vitro

Die BAC-Technologie hat in den letzten Jahren die Erforschung der Biologie zahlreicher Herpesviren darunter HSV-1, HCMV, PRV, EHV-1 und MDV-1 erheblich vereinfacht (Borst et al., 1999; Rudolph et al., 2002b; Schumacher et al., 2000; Smith und Enquist, 2000; Stavropoulos und Strathdee, 1998). Mit der Klonierung des Genoms des BHV-1-Stammes Schönböken als BAC sollte die neue Technologie erstmals auch für BHV-1 etabliert werden. Der hier beschriebene BHV-1-BAC (Trapp et al., in press) stellt gemeinsam mit dem vor kurzen durch Mahony et al. (2002) beschriebenen BHV-1-BAC auf der Basis des australischen Stammes V155 den ersten infektiösen BHV-1-Gesamtklon dar.

Für die Konstruktion des BHV-1-BAC-Klones (pBHV-1ΔgE) wurde eine mini-F-Plasmid-Kassette in den für gE kodierenden offenen Leserahmen (ORF) der genomischen DNA des deutschen BHV-1-Stammes Schönböken durch konventionelle homologe Rekombination inseriert. Glykoprotein E bildet einen heterodimeren Komplex mit gI und ist mit Ausnahme des streng zellassoziierten MDV-1 bei bisher allen Alphaherpesviren als nicht-essentiell für das Viruswachstum beschrieben worden (Schumacher et al., 2001). Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass gE bei BHV-1 maßgeblich in den cell-to-cell spread (CTCS) involviert ist, ohne aber beim Virus-Entry eine Rolle zu spielen (Rebordosa et al., 1996). Durch Transfektion der pBHV-1AgE-BAC-DNA in permissive Rindernierenzellen konnte eine gE-negative BHV-1-Mutante (BHV-1 $\Delta$ gE) erfolgreich generiert werden (siehe Kapitel 4.1.3). Durch die Western-Blot-Analyse wurde bestätigt, dass die BHV-1AgE-Mutante im Gegensatz zum Wildtyp BHV-1-Schönböken kein Glykoprotein E exprimierte (siehe Kapitel 4.1.5). Eine gE-Revertante, in der die Deletion restauriert und die BAC-Kassette entfernt wurde (BHV-1rev), exprimierte gE ebenso wie der Wildtyp. Die Wachstumseigenschaften der BHV-1AgE-Mutante wurden durch Plaquegrößen-Bestimmung und die Analyse von Wachstumskinetiken ermittelt (siehe Kapitel 4.1.6) Genetische Analysen der BHV-1∆gE-DNA durch Spaltung mit Restriktionsendonukleasen und durch Southern Blotting haben schließlich eine spezifische Insertion der BAC-Kassette in den gE-ORF belegt (siehe Kapitel 4.1.2). Bei der Bestimmung der Plaquedurchmesser waren Virusplaques die durch die Deletionsmutante induziert worden waren, im Vergleich mit dem Wildtyp oder der gE-Revertante, im Mittel um 45% reduziert. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit den Daten, die bisher für BHV-1-Mutanten mit einer gE-Deletion publiziert wurden (Rebordosa et al., 1996), da alle dort beschriebenen gE-Mutanten ebenfalls eine deutliche Reduktion der Plaquegrößen um etwa 50 % aufwiesen und dokumentiert darüber hinaus eindrucksvoll den Einfluss von gE auf den CTCS. Signifikante Unterschiede der extra- und intrazellulären Virustiter wurde dagegen bei der Bestimmung der Wachstumskinetiken nicht beobachtet (Baranowski et al., 1996; Nakamichi et al., 2000). Interessanterweise ist auch die Wachstumskinetik des hier beschriebenen BHV-1-BACs nicht von der des Wildtyps zu unterscheiden. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Insertion des mehr als 8 Kilobasenpaare großen mini-F-Plasmides keine weitere Veränderung des Phänotyps in vitro zur Folge hatte. Darüber hinaus zeigte die Revertante BHV-1rev ebenfalls das gleiche Wachstumsverhalten wie der Wildtyp. Daraus konnte einerseits gefolgert werden, dass die eingeschränkte Zell-zu-Zell-Ausbreitung der BHV-1AgE-Mutante einzig auf der gE-Deletion basierte und andererseits die Insertion der 8,9 kbp großen BAC-Kassette und die Expression nicht-BHV-1-spezifischer Gene (green

#### Diskussion

fluorescent protein, GFP, Chloramphenicolaminotransferase, CAT) keinen messbaren Einfluss auf das Viruswachstum in vitro genommen hatte. Mahony et al. (2002) berichteten, dass die Deletion des Glykoprotein E in dem als BAC klonierten BHV-1-Subtyp 2-Stamm V155 in einem gE-negativen Virus resultierte, das hohe Titer produzierte, unter einem semisoliden Medium aber keine sichtbaren Plaques formieren konnte. Die Autoren vermuteten, genetische Unterschiede zwischen den BHV-1-Subtypen 1 und 2 seien die Ursache für diese Beobachtung, die erheblich von den Beschreibungen anderer Autoren und den hier gezeigten Resultaten abweicht (Nakamichi et al., 2000; Rebordosa et al., 1996). Da die hier vorgestellte BHV-1-BAC-Mutante ebenfalls auf einem BHV-1-Subtyp 2-Stamm (Schönböken) basiert (Matheka und Straub, 1972), dürften diese differierenden Ergebnisse aber eine andere Ursache haben. Stammspezifische Eigenschaften des australischen BHV-1-Isolates V155 ebenso wie ein Einfluss der Thymidinkinase (TK)-Deletion (Mahony et al., 2002) sind als Grund für die unterschiedlichen Effekte der gE-Deletion auf den BHV-1-CTCS denkbar. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die jetzt verfügbaren BHV-1-BAC-Klone eine neue Phase der BHV-1-Forschung einleiten. Die stabile und effiziente Vermehrung eines viralen Genomes von etwa 135 Kilobasenpaaren in E. coli und die damit verbundene Unabhängigkeit von eukaryotischen Zellen für die gerichtete (RecE/T-Mutagenese) und auch ungerichtete (Transposon-Mutagenese) Manipulation werden einen deutlichen Zuwachs an Informationen zu BHV-1 bringen (Brune et al., 2000; Wagner et al., 2002). In der hier vorgestellten Arbeit wurden bereits drei unterschiedliche Glykoproteine über die gezielte Manipulation in Bakterien deletiert und die neu entstandenen Virusmutanten charakterisiert.

#### 5.2 Charakterisierung der Doppelmutante BHV-AgE-gG in vitro

Die Methode der RecE/T-Klonierung wurde 1998 erstmals von Zhang et al. beschrieben und seitdem erfolgreich für die Mutagenese herpesviraler BACs eingesetzt (Adler et al., 2000; Rudolph et al., 2002a; Rudolph et al., 2002b; Schumacher et al., 2000; Schumacher et al., 2001; Tischer et al., 2002b). Mit Hilfe der RecE/T-Mutagenese wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst der gG-ORF in dem pBHV-1AgE-BAC-Klon gezielt durch die Insertion eines Kanamycinresistenz-Gens (kan) deletiert. Durch Transfektion der manipulierten pBHV-1AgE-gG-DNA in permissive Rindernierenzellen konnte eine gE-gG-negative BHV-1-Mutante (BHV-1AgE-gG) erfolgreich generiert werden (siehe Kapitel 4.2.1.1). Die Rekonstituierung der Doppelmutante demonstriert den außerordentlichen Nutzen der homologen Rekombination in Bakterien für die Herpesvirus-Mutagenese. Für die

#### Diskussion

Konstruktion einer BHV-1-Mutante mit einer singulären Deletion des gG wurde in der Doppelmutante BHV-1\DeltagE-gG die gE-Deletion konventionell, d. h. durch homologe Rekombination in eukaryotischen Zellen, restauriert und so die Mutante BHV-1\DeltagG generiert (siehe Kapitel 4.2.1.2). In früheren Arbeiten wurde beschrieben, dass gG bei BHV-1 und anderen Alphaherpesviren für das Viruswachstum nicht essentiell ist (Balan et al., 1994; Baranowski et al., 1996; Thomsen et al., 1987). Es wurde jedoch gezeigt, dass gG in den BHV-1-CTCS involviert ist und dass eine gG-Deletionsmutante in vitro signifikant kleinere Virusplaques induzierte als der Wildtyp (Nakamichi et al., 2000). Glykoprotein E ist ebenfalls als ein sehr wichtiger Faktor beim CTCS beschrieben worden (Rebordosa et al., 1996). In einer kürzlich erschienenen Publikation wurde spekuliert, gG sei in den CTCS involviert, indem es die korrekte Lokalisation von gE an den basolateralen Membranen, insbesondere an den tight junctions fördere (Nakamichi et al., 2002). Die Autoren nahmen daher an, dass gE und gG beim CTCS synergistisch funktionieren. Um diese Hypothese näher zu prüfen, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Wachstumseigenschaften einer gG-Deletionsmutante und einer gE-gG-Doppeldeletionsmutante ermittelt und mit denen einer gE-Deletionsmutante verglichen. Die in Kapitel 4.2.1.3 und 4.2.1.4 beschriebenen Analysen haben gezeigt, dass der gG-ORF bei BHV-1\DeltagE-gG und BHV-1\DeltagG deletiert wurde und beide Mutanten kein gG exprimierten. Die Expression des Glykoprotein B oder im Fall von BHV-1AgG des gB und gE blieb von der gG-Deletion jedoch unbeeinflusst. Daher kann angenommen werden, dass der in vitro beobachtete Phänotyp der jeweiligen BHV-1-Mutanten ausschließlich oder vorrangig auf einer gE-gG-Doppeldeletion oder der gG-Deletion basierte. Durch die Plaquegrößen-Bestimmung und die Analyse von Wachstumskinetiken wurden die Wachstumseigenschaften der BHV-1\DeltagE-gGund BHV-1\DeltagG-Mutanten bestimmt (siehe Kapitel 4.2.1.5). Bei der Messung der Plaquegrößen waren Virusplaques, die durch BHV-1∆gG induziert worden waren, im Vergleich mit dem Wildtyp im Mittel um 19% reduziert. Diese Beobachtung stimmt mit den von Nakamichi et al. (2000) publizierten Daten überein. BHV-1\DeltagE-gG-Plaques waren verglichen mit BHV-1 um 55% reduziert und somit nur geringfügig kleiner als Plaques, die durch BHV-1AgE induziert worden und um 45% reduziert waren. Diese Ergebnisse demonstrieren deutlich, dass die zusätzliche Deletion von gG einen additiven und keinen synergistischen Effekt auf die Wachstumseigenschaften der gE-deletierten BHV-1 Mutante hatte. Darüber hinaus sprechen diese Daten klar gegen die Hypothese, dass der eingeschränkte CTCS gG-negativer BHV-1-Mutanten aus einer fehlerhaften gE-Lokalisation in der Wirtszelle resultiere (Nakamichi et al., 2002). Der Einfluss von gG auf den BHV-1-CTCS ist somit unabhängig von gE zu sehen. Die

hier gezeigten Ergebnisse belegen zudem, dass gG in einen Schritt des BHV-1-CTCS involviert ist, der von gE unbeeinflusst ist und bekräftigen, dass gG gegenüber gE beim CTCS eine deutlich untergeordnete Rolle spielt (Nakamichi et al., 2000). Interessanterweise konnte bei der Bestimmung der Wachstumskinetiken bei keiner der BHV-1-Mutanten eine signifikante Reduktion der extra- und intrazellulären Virustiter beobachtet werden. Dieses Ergebnis stützt die Hypothese, dass bei Alphaherpesviren die sekundäre Behüllung (*Secondary Envelopment*) sowie der *Egress* einerseits und der *cell-to-cell spread* andererseits unabhängig voneinander ablaufen, obwohl beide Prozesse Membranfusionen erfordern. Unklar ist jedoch weiterhin, an welcher Stelle sich diese Prozesse trennen und warum bestimmte Proteine für beide Vorgänge (z. B. gB) essentiell sind.

Belknap et al. (1999) haben ebenfalls eine BHV-1-Mutante mit einer Deletion des Glykoprotein E und G (gG) sowie des  $U_{s}2$ -ORFs beschrieben, ohne aber auf den Phänotyp dieser Mutante in vitro einzugehen. Ihre Untersuchungen beschränkten sich auf die Überprüfung der dreifach deletierten BHV-1-Mutante auf die Eignung als mögliche Vakzine. Die in der EU verwendeten BHV-1-Markervakzinen basieren auf einer spontanen BHV-1-Labormutante, deren genetische Information für das Glykoprotein E durch in vitro-Passagierung verloren ging (Kaashoek et al., 1994; van Engelenburg et al., 1994). Die in dieser Arbeit beschriebene Klonierung einer gE-negativen BHV-1-BAC-Mutante ist somit eine gute Basis für die Konstruktion von Doppeldeletionsmutanten, die theoretisch als BHV-1-Doppelmarkervakzine in Frage kommen könnten. Bei einem Infektionsversuch mit Kälbern konnte von Kaashoek et al. (1998) gezeigt werden, dass eine BHV-1-Mutante mit einer gG-Deletion weniger virulent als der Wildtyp und immunogener als eine gE-negative Mutante war. Die Autoren folgerten aus den Ergebnissen dieses Tierversuchs, dass eine gGnegative BHV-1-Mutante ein vielversprechender Kandidat für die Entwicklung eines BHV-1-Lebend (Marker)-Impfstoffes sei. In der Publikation von Belknap et al. (1999) wurden die günstigen immunogenen Eigenschaften einer gE-, gG- und Us2-deletierten BHV-1-Mutante beschrieben und ihre Eignung als Markervakzine diskutiert. Der in vitro beobachtete Phänotyp, der hier präsentierten Doppelmutante BHV-1∆gE-gG, macht sie ebenfalls zu einem aussichtsreichen Kandidaten für die Entwicklung einer BHV-1-Markervakzine. Die als BAC klonierte Mutante bietet darüber hinaus den Vorteil der relativ einfachen Manipulierbarkeit mit Hilfe der RecE/T-Mutagenese und die Möglichkeit der Applikation als DNA. Diese Form der Verabreichung von BAC-Klonen wurde bereits für ein Konstrukt des Virus der Marek'schen Krankeit (MDV-1) als wirksame Alternative zu klassischen Viruspräparationen belegt (Tischer et al., 2002a). Mit Hilfe des BHV-1-BACs können zudem in kurzer Zeit weitere rekombinante Viren generiert und in Tierversuchen auf ihre Eignung als BHV-1 (Marker)-Impfstoff untersucht werden.

#### 5.3 Charakterisierung der Doppelmutante BHV-1AgE-gM in vitro

Offene Leserahmen (ORFs), die für das Glykoprotein M kodieren, wurden bisher bei allen Mitgliedern der Familie der Herpesviridae identifiziert. Wu et al. (1998) haben gM bei BHV-1 identifiziert und charakterisiert. Die Autoren haben außerdem beschrieben, dass gM durch eine Disulfid-Brückenbindung mit dem UL49.5-Genprodukt (gN) heterodimerisiert. Durch eine Analyse von Deletionsmutanten konnte gezeigt werden, dass gM bei HSV-1, PRV und EHV-1 für die Replikation in vitro (Baines und Roizman, 1991; Dijkstra et al., 1996; Osterrieder et al., 1996) und in vivo (Osterrieder et al., 2001) nicht essentiell ist. BHV-1-Mutanten mit einer gM-Deletion replizierten in vitro jedoch zu geringeren Virustitern und penetrierten die Wirtszelle deutlich langsamer als der Wildtyp (Dijkstra et al., 1996; Osterrieder et al., 1996). Erst kürzlich haben König et al. (2002) Daten über eine BHV-1-Mutante mit einer Deletion des Glykoprotein M publiziert. Die Autoren beschrieben, dass gM bei BHV-1 ebenso wie bei HSV-1, PRV und EHV-1 nicht essentiell für das Viruswachstum in vitro ist. Sie konnten aber zeigen, dass eine gM-Deletion bei BHV-1 in einer reduzierten Plaquegröße und einem verzögerten Anstieg der extrazellulären Virustiter resultierte. Brack et al. (1999) haben eine PRV-Mutante mit einer Deletion des gE/gI-Komplexes und des gM beschrieben. Sie beobachteten, dass die gleichzeitige Deletion von gE/gI und gM die Plaquebildung und Replikation bei PRV drastisch beeinträchtigte. Der gleiche Effekt wurde beobachtet, wenn neben gM nur der zytoplasmatische Teil von gE deletiert wurde (Brack et al., 2000). In elektronenmikroskopischen Analysen konnte gezeigt werden, dass in der Abwesenheit von gE/gI und gM intrazytoplasmatische Aggregate gebildet wurden, die aus Kapsiden und Tegument-Proteinen bestanden (Mettenleiter, 2002). Da die Kapside noch immer tegumentiert wurden, eine sekundäre Behüllung (Secondary Envelopment) aber offensichtlich ausblieb, wurde für gE/gI und gM eine wichtige Rolle beim Secondary Envelopment postuliert (Brack et al., 1999). Um den Einfluss einer gleichzeitigen Deletion von gE und gM auf das BHV-1-Wachstum zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit eine BHV-1-Mutante mit einer Deletion beider Glykoproteine auf der Basis eines infektiösen, gE-negativen BAC-Klons generiert. Dazu wurde durch homologe Rekombination in E. coli der gM (U<sub>L</sub>10)-ORF in der BAC-Mutante pBHV-1∆gE deletiert. Mit der durch die RecE/TpBHV-1\DeltagE-gM-BAC-DNA Mutagenese manipulierten konnte in permissiven eukaryotischen Zellen eine BHV-1-Mutante (BHV-1AgE-gM) mit einer gE- und gM-Deletion

erfolgreich rekonstituiert werden (siehe Kapitel 4.2.2.1). Durch genetische Analysen wurde gezeigt, in der BHV-1∆gE-gM-DNA der gM (U<sub>L</sub>10)-ORF dass durch ein Kanamycinresistenz-Gen ersetzt und somit erfolgreich deletiert worden war (siehe Kapitel 4.2.2.2). Daraus konnte gefolgert werden, dass der beobachtete Phänotyp der BHV-1\DeltagE-gM-Mutante mit hoher Sicherheit aus einer gleichzeitigen gE- und gM-Deletion resultierte. Die Wachstumseigenschaften der BHV-1AgE-gM-Doppelmutante wurden wie bei der Phänotypisierung der BAC-Mutante BHV-1AgE-gG durch eine Plaquegrößen-Bestimmung und die Bestimmung von Wachstumskinetiken (siehe Kapitel 4.2.1.5) ermittelt. Hierbei zeigte sich, dass BHV-1AgE-gM-spezifische Virusplaques bei der Bestimmung der Plaque-Durchmesser, verglichen mit dem Wildtyp (BHV-1-Schönböken), im Mittel um 54% reduziert waren. Dieses Ergebnis war überraschend, da Brack et al. bei einer gleichzeitigen Deletion von gE/gI und gM (1999) oder von gE und gM (2000) beim PRV eine drastischere Reduktion der Plaque-Durchmesser um 90% (RK13-Zellen) oder 65% (MDBK-Zellen) beobachtet haben. König et al. (2002) konnten zeigen, dass eine BHV-1-Mutante mit einer singulären gM-Deletion Plaques bildete, deren Durchmesser im Vergleich mit dem Wildtyp (BHV-1-Stamm Aus12) um etwa 55% reduziert waren. Dieser Wert stimmt nahezu mit der Reduktion überein, die bei der hier vorgestellten BHV-1-BAC-Mutante mit einer gE- und gM-Doppeldeletion ermittelt wurde. Bei der Analyse der Wachstumskinetiken konnte bei der gE- und gM-negativen Doppelmutante BHV-1AgE-gM, im Vergleich mit dem Wildtyp und der gE-negativen BAC-Mutante BHV-1\DeltagE, keine signifikante Reduktion der extrazellulären Virustiter ermittelt werden. Die intrazellulären Virustiter waren aber 48 h und 72 h p. i. etwa 10fach reduziert. Diese Ergebnisse weichen sehr deutlich von denen von Brack et al. (2000) ab, die bei einer gE- und gM-negativen PRV-Mutante eine etwa 1000fache Reduktion der extrazellulären Virustiter beobachtet haben. König et al. (2002) haben zudem beschrieben, dass die singuläre gM-Deletion eine verzögerte Freisetzung der BHV-1-Mutante zur Folge hatte. Die phänotypische Analyse der BHV-1\DeltagE-gM-BAC-Mutante macht deutlich, dass eine gleichzeitige gE- und gM-Deletion das BHV-1-Viruswachstum kaum beeinträchtigt. Es wurde aber gezeigt, dass diese Doppeldeletion den BHV-1-CTCS erheblich einschränkt. Da die hier beobachtete Einschränkung des CTCS mit der übereinstimmt, die bei einer BHV-1-Mutante mit einer singulären gM-Deletion beschrieben wurde (König et al., 2002), kann bestätigt werden, dass gM neben gE eine Rolle beim BHV-1-CTCS spielt. Es darf aber spekuliert werden, dass gE das wichtigere Protein für den CTCS darstellt. Die Rolle von gM beim CTCS und ob gM dabei in einen anderen Schritt als gE involviert ist, kann erst durch die künftige Generierung und Charakterisierung einer Mutante mit einer singulären gM-Deletion

#### Diskussion

auf der Basis des hier beschriebenen BAC-Klones geklärt werden. Die starke Reduktion der Plaquegrößen bei der publizierten gM-Mutante könnte auf besonderen Eigenschaften des BHV -1-Stammes Aus12 beruhen. So konnten eigene Untersuchungen zeigen, dass dieser Stamm zwar gE und gI exprimiert, eine gE/gI-Komplexierung aber ausbleibt. Außerdem konnte eine Glykoprotein G-Expression nicht detektiert werden (Beer et al., unpublizierte Daten). Ursächlich für diese Veränderungen könnte die hohe Passagenzahl des Stammes Aus12 (mehr als 100 Zellkulturpassagen) sein. Eine von König et al. (2002) beschriebene verzögerte Zunahme der extrazellulären Virustiter konnte bei der Analyse der BAC-Doppelmutante ebenfalls nicht bestätigt werden. Genetische Unterschiede zwischen dem BHV-1 Stamm Schönböken und dem hochpassagierten Stamm Aus12 (Schröder et al., 1997) könnten auch hierfür die Erklärung sein. Ein drastischer Wachstumsdefekt konnte bei einer gleichzeitigen gE- und gM-Deletion bei BHV-1, anders als bei PRV, nicht beobachtet werden (Brack et al., 1999; Brack et al., 2000). Fuchs et al. (2002) haben vor kurzem durch Yeasttwo-hvbrid Analysen gezeigt, dass die zytoplasmatischen Teile von gE und gM mit dem U<sub>L</sub>49-Tegumentprotein interagierten. Die Autoren vermuteten. dass für einen uneingeschränkten *Egress* entweder gE oder gM mit dem U<sub>L</sub>49-Tegumentprotein interagieren müsste, und dass infolge dieser Redundanz ein erheblicher Wachstumsdefekt nur bei der gleichzeitigen Deletion von gE und gM zu beobachten ist. Die unterschiedlichen Effekte einer Doppeldeletion der Glykoproteine E (gE) und M (gM) bei BHV-1 und PRV könnten darauf hinweisen, dass bei BHV-1 andere oder zusätzliche Virusproteine in die UL49-Interaktion involviert sind.

In der Literatur wurden BHV-1-Mutanten mit mehrfachen Gen-Deletionen und ihre Eignung als Vakzine beschrieben (Belknap et al., 1999; Kaashoek et al., 1998). Die potentielle Eignung einer gE- und gG-negativen BHV-1-BAC-Mutante (BHV-1 $\Delta$ gE-gG) als Doppel-Markervakzine wurde bereits diskutiert. Das Wachstum der gE- und gM-negativen Mutante BHV-1 $\Delta$ gE-gM war überraschenderweise ebenso wie das der BHV-1 $\Delta$ gE-gG-Mutante kaum eingeschränkt. Daher darf auch hier spekuliert werden, dass die Mutante BHV-1 $\Delta$ gE-gM prinzipiell als (Marker)-Vakzine geeignet ist. Bisher existiert keine Publikation über eine *in vivo*-Phänotypisierung einer gM-deletierten BHV-1-Mutante. Bei EHV-1 konnte jedoch in Tierversuchen mit Mäusen gezeigt werden, dass eine gM-negative Mutante auf der Basis des Stammes RacH *in vivo* avirulent war und darüber hinaus deutlich günstigere immunogene Eigenschaften besaß als der Wildtyp (Neubauer et al., 1997; Osterrieder et al., 2001). Im Zusammenhang mit dieser Beobachtung erscheint die hier präsentierte BHV-1-Mutante mit einer gleichzeitigen gE- und gM-Deletion ebenfalls als ein attraktiver Kandidat für die Entwicklung eines BHV-1-(Marker)-Impfstoffes.

#### 5.4 Charakterisierung der Doppelmutante BHV-1∆gE-gK in vitro

Die für die Herpesvirusforschung etablierte BAC-Technologie bietet den besonderen Vorteil, dass Virusmutanten mit einer Deletion eines essentiellen Gens genotypisch analysiert werden können. Konventionell konstruierte Virusmutanten mit einer letalen Deletion sind in der Zellkultur nur infolge einer zellulären Komplementierung des essentiellen Genproduktes in trans replikationsfähig und erlauben daher ohne die trans-Komplementierung keine Isolation der rekombinanten Virus-DNA in vitro. Rekombinante Virus-BACs können unabhängig von Deletionen viraler Sequenzen in Bakterien vermehrt werden. D. h. die Isolation viraler BAC-DNA aus Bakterien ermöglicht bei dieser Technologie die Analyse rekombinanter Mutanten, die in vitro kein Viruswachstum provozieren können. Das Glykoprotein K ist unter allen Alphaherpesviren konserviert und wurde bei HSV-1, PRV und VZV als essentiell für die virale Replikation beschrieben (Hutchinson und Johnson, 1995; Klupp et al., 1998; Mo et al., 1999). Bei BHV-1 wurde das U<sub>L</sub>53-Genprodukt als Glykoprotein K charakterisiert (Khadr et al., 1996). Der Phänotyp einer gK-deletierten BHV-1-Mutante in vitro wurde allerdings noch nicht beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf der Basis eines gE-negativen infektiösen Gesamtklons (pBHV-1AgE) erstmals eine BHV-1-Mutante mit einer Deletion des gK konstruiert. Mittels RecE/T-Klonierung wurde der UL53-ORF in dem BAC-Klon durch die Insertion eines Kanamycinresistenz-Gens deletiert. Der große Nutzen des bakteriellen Rekombinationssystems für die Konstruktion rekombinanter BHV-1-Mutanten wurde hierbei erneut deutlich. Die DNA des BAC-Klones pBHV-1AgE-gK wurde in E. coli vermehrt und anschließend genetisch analysiert. Restriktionsenzymfragment- und Southern-Blot-Analysen bewiesen, dass der gK (UL53)-ORF in der pBHV-1AgE-gK-DNA deletiert worden war. Bei mehrfach wiederholten Transfektionsversuchen konnte mit der pBHV-1AgE-gK-DNA jedoch kein Viruswachstum provoziert werden. Diese Beobachtung spricht dafür, dass gK beim BHV-1 ebenso wie beim HSV-1, PRV und VZV essentiell für die virale Replikation ist. Durch die geplante in trans-Komplementierung des hier beobachteten Effektes über eine transiente oder permanente zelluläre gK-Expression kann diese Beobachtung endgültig bestätigt werden. Die gezeigten Ergebnisse demonstrieren allerdings eindeutig die Eignung des BAC-Systems für die Konstruktion und genetische Analyse rekombinanter Viren, auch beim Vorliegen eines letalen

#### Diskussion

Replikationsdefektes. Die Deletion ist hierbei auch, im Gegensatz zu den konventionellen Methoden, unabhängig von einer Komplementierung der essentiellen Proteine möglich.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das gesamte Genom des BHV-1-Stammes Schönböken erstmals als ein bacterial artificial chromosome (BAC) kloniert werden konnte. Der hier beschriebene BHV-1-BAC-Klon und eine BAC-Mutante auf der Basis des australischen BHV-1-Stammes V155 präsentieren die ersten publizierten infektiösen BHV-1-Gesamtklone (Mahony et al., 2002; Trapp et al., in press). Analysen in vitro haben gezeigt, dass die Insertion der BAC-Sequenzen in den BHV-1-gE-ORF keinen Effekt auf das Viruswachstum hatte, der nicht aus der gE-Deletion resultierte. Das RecE/T-System wurde erfolgreich für die zielgerichtete Mutagenese der BHV-1-BAC-Mutante etabliert. Durch homologe Rekombination in E. coli konnten drei unterschiedliche BHV-1-Doppelmutanten konstruiert werden. Das Viruswachstum der Mutanten mit einer gleichzeitigen Deletion des gE und gG oder gE und gM war *in vitro* kaum beeinträchtigt. Beide BHV-1-Doppelmutanten zeigten aber einen vergleichbar deutlichen Defekt der Zell-zu-Zell-Ausbreitung und bestätigten dadurch den Einfluss von gE, gG und gM auf den BHV-1-cell-to-cell spread. Aus einer BAC-Mutante mit einer gE- und gK-Deletion konnte kein infektiöses Virus rekonstituiert werden, was den Schluss nahe legte, dass gK allein oder gemeinsam mit gE für die BHV-1-Replikation essentiell ist. Die hier vorgestellten Ergebnisse haben zudem gezeigt, dass BAC-Klone die weitere Forschung zur Charakterisierung von BHV-1 erheblich verbessern werden. Insbesondere Studien über die Interaktion von Virusproteinen, die Mehrfach-Deletionen voraussetzen, werden erleichtert. Durch die Insertion unterschiedlicher Antibiotikumresistenz-Gene für die Deletion unterschiedlicher BHV-1-Gene und aufgrund der drastisch reduzierten Gefahr einer adaptiven Anpassung von Virusmutanten wird die Forschung auf diesem Gebiet nicht nur erleichtert, sondern es ist auch mit höherer Sicherheit davon auszugehen, dass die Untersuchungsergebnisse die tatsächlichen Verhältnisse bei der Virusreplikation widerspiegeln.

## 6. Zusammenfassung

Das gesamte Genom des BHV-1-Stammes Schönböken wurde erstmals als infektiöses künstliches bakterielles Chromosom (bacterial artificial chromosome, BAC) kloniert. Für die BAC-Konstruktion wurden mini-F-Plasmid-Sequenzen in den offenen Leserahmen (ORF) des Glykoprotein E (gE) inseriert. Durch Transfektion der DNA des resultierenden BAC-Klones pBHV-1AgE in Rindernierenzellen konnte die gE-negative Virusmutante BHV-1AgE rekonstituiert werden. Mit Hilfe der RecE/T-Mutagenese in Escherichia coli wurden auf der Basis des BHV-1-BACs drei mutierte BHV-1-Genome konstruiert, in denen zusätzlich zu gE entweder gG (pBHV-1 $\Delta$ gE-gG) oder gM (pBHV-1 $\Delta$ gE-gM) oder gK (pBHV-1 $\Delta$ gE-gK) deletiert worden war. Nach Transfektion der in Bakterien manipulierten BAC-DNA in eukaryotische Zellen konnten rekombinante Viren mit einer gleichzeitigen Deletion von gE und gG (BHV-1\DeltagE-gG) sowie gE und gM (BHV-1\DeltagE-gM) rekonstituiert werden. Aus der gK-negativen BAC-Mutante pBHV-1\DeltagE-gK konnte jedoch kein Virus generiert werden, was dafür spricht, dass gK bei BHV-1, ebenso wie bei anderen Alphaherpesviren, ein für die Replikation essentielles Genprodukt darstellt. Die Wachstumseigenschaften der übrigen BAC-Mutanten BHV-1AgE, BHV-1AgE-gG und BHV-1AgE-gM wurden in vitro mittels Ein-Schritt-Wachstumskinetik und Plaquegrößenbestimmung genauer analysiert. Die Virustiter der BAC-Mutanten unterschieden sich intra- und extrazellulär kaum voneinander und waren vergleichbar mit Titern des Wildtyps BHV-1 Schönböken. Bei der Bestimmung der Plaquedurchmesser waren BHV-1AgE-spezifische Virus-Plaques um 45% kleiner als die des Wildtyps. Die BAC-Doppelmutanten BHV-1\DeltagE-gG und BHV-1\DeltagE-gM bildeten Plaques, die um 56% (BHV-1∆gE-gG) oder 54% (BHV-1∆gE-gM) reduziert waren. Diese Beobachtungen bekräftigen einerseits, dass gE, gG und gM die BHV-1-Zell-zu-Zell-Ausbreitung deutlich beeinflussen, andererseits demonstrieren sie, dass eine gleichzeitige Deletion von gE und gG oder gE und gM die Zell-zu-Zell-Ausbreitung nur wenig mehr einschränkt als eine singuläre gE-Deletion. Darüber hinaus konnte durch den Vergleich der Plaquegrößen von BHV-1\DeltagE, BHV-1\DeltagE-gG und BHV-1\DeltagG gezeigt werden, dass gE und gG bei der Zell-zu-Zell-Ausbreitung, anders als bisher vermutet, additiv und nicht synergistisch oder kompensativ agieren.

Die hier vorgestellten Ergebnisse illustrieren, dass die Vermehrung und Manipulation eines BHV-1-BACs mit Hilfe des bakteriellen Rekombinationsapparates gegenüber konventionellen Methoden zur Klonierung rekombinanter Viren eine raschere Herstellung und Charakterisierung von BHV-1-Deletionsmutanten ermöglicht. Hieraus folgt, dass mit der neuen Technik BHV-1-Mutanten künftig schneller generiert und auf ihre Eignung als (Marker-)Impfstoff untersucht werden können.

# 6. Summary Cloning and mutagenesis of the bovine herpesvirus type 1 as an infectious bacterial artificial chromosome (BAC)

For the first time the complete BHV-1 Schönböken genome was cloned as an infectious bacterial artificial chromosome (BAC), by inserting mini F plasmid sequences into the glycoprotein E (gE) open reading frame (ORF). DNA of the resulting BAC clone pBHV-1 $\Delta$ gE was transfected into permissive bovine kidney cells and infectious BHV-1 $\Delta$ gE could be recovered. Using RecE/T cloning in Escherichia coli BHV-1 genomes with a deletion of either glycoprotein G (gG) or gM or gK in addition to gE (pBHV-1∆gE-gG, pBHV-1AgE-gM and pBHV-1AgE-gK) were generated. The recombinant viruses with a simultaneous deletion of gE and gG (BHV-1 $\Delta$ gE-gG) or gE and gM (BHV-1 $\Delta$ gE-gM), respectively, were reconstituted after transfection of manipulated BAC DNA into eukaryotic cells. However, no virus could be recovered after transfection of recombinant pBHV-1AgE-gK DNA, suggesting that gK is likewise essential for the replication of BHV-1 as demonstrated for other alphaherpesviruses. Growth properties of the other BAC derived virus mutants BHV-1\DeltagE, BHV-1\DeltagE-gG and BHV-1\DeltagE-gM were analysed in vitro. The mutant viruses exhibited no markedly lowered virus titres compared to wild type strain Schönböken. However, BHV-1∆gE specific virus plaques were reduced by 45% compared to BHV-1 Schönböken as assessed by plaque size measurement. Plaques sizes of BHV-1\DeltagE-gG and BHV-1\DeltagE-gM were reduced by 56\% (BHV-1\DeltagE-gG) and 54\% (BHV-1\DeltagE-gM). The observations made here emphasize the influence of gE, gG and gM on the BHV-1 cell-to-cell spread. Moreover, they clearly demonstrate that viral cell-to-cell spread is slightly more inhibited by a simultaneous deletion of gE and gG or gE and gM than by a single gE deletion. Comparing the plaque sizes of BHV-1 $\Delta$ gE, BHV-1 $\Delta$ gE-gG and BHV-1 $\Delta$ gG it could be shown that gE and gG function independently from each other in cell-to-cell spread, because an additive and no synergistic effect was observed in the gE-gG double deletion mutant.

These studies illustrate, that the propagation and manipulation of herpesviruses in bacterial systems provides the advantage of a more rapid and accurate generation and characterisation of BHV-1 deletion mutants over conventional cloning procedures. In conclusion the new technique will allow the fast generation of BHV-1 mutants as well as the investigation for their suitability as future (marker) vaccines.

# 7. Literatur

- Abdelmagid, O. Y., Mansour, M. M., Minocha, H. C. und Van Drunen Littel-Van Den Hurk. (1998). Evaluation of baculovirus-expressed bovine herpesvirus-1 (BHV-1) glycoproteins for detection and analysis of BHV-1-specific antibody responses. *Vet.Microbiol.* **61**, 249 - 259.
- Ackermann, M., Peterhans, E. und Wyler, R. (1982). DNA of bovine herpesvirus type 1 in the trigeminal ganglia of latently infected calves. *Am.J.Vet.Res.* **43**, 36 40.
- Adler, H., Messerle, M., Wagner, M. und Koszinowski, U. H. (2000). Cloning and mutagenesis of the murine gammaherpesvirus 68 genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *J. Virol.* **74**, 6964 6974.
- al Kobaisi, M. F., Rixon, F. J., McDougall, I. und Preston, V. G. (1991). The herpes simplex virus UL33 gene product is required for the assembly of full capsids. *Virology* 180, 380 388.
- Babiuk, L. A., Van Drunen Littel-Van Den Hurk und Tikoo, S. K. (1996). Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. *Vet.Microbiol.* **53**, 31 42.
- Baines, J. D. und Roizman, B. (1991). The open reading frames UL3, UL4, UL10, and UL16 are dispensable for the replication of herpes simplex virus 1 in cell culture. *J. Virol.* 65, 938 944.
- Balan, P., Davis-Poynter, N., Bell, S., Atkinson, H., Browne, H. und Minson, T. (1994). An analysis of the in vitro and in vivo phenotypes of mutants of herpes simplex virus type 1 lacking glycoproteins gG, gE, gI or the putative gJ. *J.Gen.Virol.* **75**, 1245 -1258.
- Baranowski, E., Keil, G., Lyaku, J., Rijsewijk, F. A., Van Oirschot, J. T., Pastoret, P. P. und Thiry, E. (1996). Structural and functional analysis of bovine herpesvirus 1 minor glycoproteins. *Vet.Microbiol.* 53, 91 - 101.
- Belknap, E. B., Walters, L. M., Kelling, C., Ayers, V. K., Norris, J., McMillen, J., Hayhow,
  C., Cochran, M., Reddy, D. N., Wright, J. und Collins, J. K. (1999). Immunogenicity and protective efficacy of a gE, gG and US2 gene-deleted bovine herpesvirus-1 (BHV-1) vaccine. *Vaccine* 17, 2297 2305.

- Borst, E. M., Hahn, G., Koszinowski, U. H. und Messerle, M. (1999). Cloning of the human cytomegalovirus (HCMV) genome as an infectious bacterial artificial chromosome in Escherichia coli: a new approach for construction of HCMV mutants. *J. Virol.* **73**, 8320 8329.
- Brack, A. R., Dijkstra, J. M., Granzow, H., Klupp, B. G. und Mettenleiter, T. C. (1999). Inhibition of virion maturation by simultaneous deletion of glycoproteins E, I, and M of pseudorabies virus. *J.Virol.* **73**, 5364 - 5372.
- Brack, A. R., Klupp, B. G., Granzow, H., Tirabassi, R., Enquist, L. W. und Mettenleiter,
  T. C. (2000). Role of the cytoplasmic tail of pseudorabies virus glycoprotein E in virion formation. *J. Virol.* 74, 4004 4016.
- Brune, W., Messerle, M. und Koszinowski, U. H. (2000). Forward with BACs: new tools for herpesvirus genomics. *Trends Genet.* **16**, 254 259.
- Campadelli-Fiume, G., Farabegoli, F., Di Gaeta, S. und Roizman, B. (1991). Origin of unenveloped capsids in the cytoplasm of cells infected with herpes simplex virus 1. *J.Virol.* 65, 1589 - 1595.
- **Campbell, M. E. und Preston, C. M.** (1987). DNA sequences which regulate the expression of the pseudorabies virus major immediate early gene. *Virology* **157**, 307 316.
- Campos, M., Ohmann, H. B., Hutchings, D., Rapin, N., Babiuk, L. A. und Lawman, M. J. (1989). Role of interferon-gamma in inducing cytotoxicity of peripheral blood mononuclear leukocytes to bovine herpesvirus type 1 (BHV-1)-infected cells. *Cell Immunol.* **120**, 259 - 269.
- Ciacci-Zanella, J., Stone, M., Henderson, G. und Jones, C. (1999). The latency-related gene of bovine herpesvirus 1 inhibits programmed cell death. *J. Virol.* **73**, 9734 9740.
- Clark, J. M. (1988). Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* **16**, 9677 9686.

Darlington, R. W. und Moss, L. H., III. (1968). Herpesvirus envelopment. J. Virol. 2, 48 - 55.

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

- de Wit, J. J., Hage, J. J., Brinkhof, J. und Westenbrink, F. (1998). A comparative study of serological tests for use in the bovine herpesvirus 1 eradication programme in The Netherlands. *Vet.Microbiol.* 61, 153 163.
- **DeLuca, N. A., McCarthy, A. M. und Schaffer, P. A.** (1985). Isolation and characterization of deletion mutants of herpes simplex virus type 1 in the gene encoding immediateearly regulatory protein ICP4. *J. Virol.* **56**, 558 - 570.
- Denis, M., Splitter, G. A., Thiry, E., Pastoret, P. P. und Babiuk, L. (1994). Infectious bovine rhinotracheitis (bovine herpesvirus 1): Helper T cells, cytotoxicity T cells and NK cells. In: eds. B. Goddeeris I. Morrisons, Cell Mediated Immunity in Ruminants. *CRC Press, Boca Raton* 157 - 172.
- Dijkstra, J. M., Visser, N., Mettenleiter, T. C. und Klupp, B. G. (1996). Identification and characterization of pseudorabies virus glycoprotein gM as a nonessential virion component. *J. Virol.* **70**, 5684 5688.
- Edwards, S., White, H. und Nixon, P. (1990). A study of the predominant genotypes of bovid herpesvirus 1 found in the U.K. *Vet.Microbiol.* **22**, 213 223.
- Elliott, G. und O'Hare, P. (1998). Herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22 induces the stabilization and hyperacetylation of microtubules. *J. Virol.* **72**, 6448 6455.
- Engelhardt, T. und Keil, G. M. (1996). Identification and characterization of the bovine herpesvirus 5 US4 gene and gene products. *Virology* **225**, 126 135.
- Engels, M. und Ackermann, M. (1996). Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. *Vet.Microbiol.* **53**, 3 15.
- Fehler, F., Herrmann, J. M., Saalmuller, A., Mettenleiter, T. C. und Keil, G. M. (1992). Glycoprotein IV of bovine herpesvirus 1-expressing cell line complements and rescues a conditionally lethal viral mutant. J. Virol. 66, 831 - 839.
- Feinberg, A. P. und Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal.Biochem.* **132**, 6 - 13.
- Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J.
   P., Ringold, G. M. und Danielsen, M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipidmediated DNA-transfection procedure. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 84, 7413 - 7417.

- Foster, T. P. und Kousoulas, K. G. (1999). Genetic analysis of the role of herpes simplex virus type 1 glycoprotein K in infectious virus production and egress. *J. Virol.* 73, 8457 8468.
- Geraghty, R. J., Krummenacher, C., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J. und Spear, P. G. (1998). Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor. *Science* **280**, 1618 1620.
- Gershon, A. A., Sherman, D. L., Zhu, Z., Gabel, C. A., Ambron, R. T. und Gershon, M. D. (1994). Intracellular transport of newly synthesized varicella-zoster virus: final envelopment in the trans-Golgi network. *J. Virol.* **68**, 6372 6390.
- Gibbs, E. P. J. und Rweyemamu, M. M. (1977). Bovine Herpesviruses. Part I. Bovine Herpesvirus 1. *Veterinary Bulletin* **47**, 317 343.
- Gogev, S., Vanderheijden, N., Lemaire, M., Schynts, F., D'Offay, J., Deprez, I., Adam,
  M., Eloit, M. und Thiry, E. (2002). Induction of protective immunity to bovine herpesvirus type 1 in cattle by intranasal administration of replication-defective human adenovirus type 5 expressing glycoprotein gC or gD. *Vaccine* 20, 1451 1465.
- Graham, F. L. und van der Eb, A. J. (1974). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**, 456 467.
- Granzow, H., Klupp, B. G., Fuchs, W., Veits, J., Osterrieder, N. und Mettenleiter, T. C. (2001). Egress of alphaherpesviruses: comparative ultrastructural study. *J.Virol.* **75**, 3675 3684.
- Granzow, H., Weiland, F., Jons, A., Klupp, B. G., Karger, A. und Mettenleiter, T. C. (1997). Ultrastructural analysis of the replication cycle of pseudorabies virus in cell culture: a reassessment. *J. Virol.* **71**, 2072 2082.
- Gray, W. L., Baumann, R. P., Robertson, A. T., Caughman, G. B., O'Callaghan, D. J. und
  Staczek, J. (1987). Regulation of equine herpesvirus type 1 gene expression: characterization of immediate early, early, and late transcription. *Virology* 158, 79 87.
- Greig, A. S., Bannester, C. L., Mitchell, D. und Baxter, C. A. V. (1958). Cultivation in tissue culture of an infectious agent from coital exanthema of cattle. *Canadian Journal for Comparative Medicine* 22, 119 122.

- Hage, J. J., Vellema, P., Schukken, Y. H., Barkema, H. W., Rijsewijk, F. A., Van Oirschot, J. T. und Wentink, G. H. (1997). Sheep do not have a major role in bovine herpesvirus 1 transmission. *Vet.Microbiol.* 57, 41 - 54.
- Highlander, S. L., Sutherland, S. L., Gage, P. J., Johnson, D. C., Levine, M. und Glorioso, J. C. (1987). Neutralizing monoclonal antibodies specific for herpes simplex virus glycoprotein D inhibit virus penetration. *J. Virol.* **61**, 3356 - 3364.
- Hossain, A., Schang, L. M. und Jones, C. (1995). Identification of gene products encoded by the latency-related gene of bovine herpesvirus 1. *J. Virol.* **69**, 5345 5352.
- Hu, G. (1993). DNA polymerase-catalyzed addition of nontemplated extra nucleotides to the 3' end of a DNA fragment. *DNA Cell Biol.* **12**, 763 770.
- Hutchinson, L. und Johnson, D. C. (1995). Herpes simplex virus glycoprotein K promotes egress of virus particles. *J. Virol.* **69**, 5401 5413.
- Jacob, R. J., Morse, L. S. und Roizman, B. (1979). Anatomy of herpes simplex virus DNA.
  XII. Accumulation of head-to-tail concatemers in nuclei of infected cells and their role in the generation of the four isomeric arrangements of viral DNA. *J. Virol.* 29, 448 457.
- Jiang, Y., Hossain, A., Winkler, M. T., Holt, T., Doster, A. und Jones, C. (1998). A protein encoded by the latency-related gene of bovine herpesvirus 1 is expressed in trigeminal ganglionic neurons of latently infected cattle and interacts with cyclindependent kinase 2 during productive infection. *J. Virol.* **72**, 8133 - 8142.
- Johnson, D. C., Webb, M., Wisner, T. W. und Brunetti, C. (2001). Herpes simplex virus gE/gI sorts nascent virions to epithelial cell junctions, promoting virus spread. *J. Virol.* 75, 821 833.
- Kaashoek, M. J., Moerman, A., Madic, J., Rijsewijk, F. A., Quak, J., Gielkens, A. L. und Van Oirschot, J. T. (1994). A conventionally attenuated glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus type 1 is an efficacious and safe vaccine. *Vaccine* 12, 439 - 444.
- Kaashoek, M. J., Rijsewijk, F. A. und Oirschot, J. T. (1996). Persistence of antibodies against bovine herpesvirus 1 and virus reactivation two to three years after infection. *Vet.Microbiol.* 53, 103 - 110.

- Kaashoek, M. J., Rijsewijk, F. A., Ruuls, R. C., Keil, G. M., Thiry, E., Pastoret, P. P. und Van Oirschot, J. T. (1998). Virulence, immunogenicity and reactivation of bovine herpesvirus 1 mutants with a deletion in the gC, gG, gI, gE, or in both the gI and gE gene. Vaccine 16, 802 - 809.
- Kaashoek, M. J. und Van Oirschot, J. T. (1996). Early immunity induced by a live gEnegative bovine herpesvirus 1 marker vaccine. *Vet.Microbiol.* **53**, 191 - 197.
- **Karger, A. und Mettenleiter, T. C.** (1993). Glykoproteins gIII and gp50 play dominant roles in biphasic attachment of pseudorabies virus. *Virology* **194**, 654 664.
- Khadr, A., Tikoo, S. K., Babiuk, L. A. und Van Drunen Littel-Van Den Hurk. (1996). Sequence and expression of a bovine herpesvirus-1 gene homologous to the glycoprotein K-encoding gene of herpes simplex virus-1. *Gene* **168**, 189 - 193.
- Klupp, B. G., Baumeister, J., Dietz, P., Granzow, H. und Mettenleiter, T. C. (1998). Pseudorabies virus glycoprotein gK is a virion structural component involved in virus release but is not required for entry. *J. Virol.* **72**, 1949 - 1958.
- König, P., Giesow, K. und Keil, G. M. (2002). Glycoprotein M of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) is nonessential for replication in cell culture and is involved in inhibition of bovine respiratory syncytial virus F protein induced syncytium formation in recombinant BHV-1 infected cells. *Vet.Microbiol.* 86, 37 49.
- Kotsakis, A., Pomeranz, L. E., Blouin, A. und Blaho, J. A. (2001). Microtubule reorganization during herpes simplex virus type 1 infection facilitates the nuclear localization of VP22, a major virion tegument protein. *J. Virol.* **75**, 8697 8711.
- Ladin, B. F., Blankenship, M. L. und Ben Porat, T. (1980). Replication of herpesvirus DNA.
   V. Maturation of concatemeric DNA of pseudorabies virus to genome length is related to capsid formation. *J. Virol.* 33, 1151 1164.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680 685.
- Lemaire, M., Weynants, V., Godfroid, J., Schynts, F., Meyer, G., Letesson, J. J. und Thiry, E. (2000). Effects of bovine herpesvirus type 1 infection in calves with maternal antibodies on immune response and virus latency. *J.Clin.Microbiol.* 38, 1885 - 1894.

- Lewis, P. J., Van Drunen Littel-Van Den Hurk und Babiuk, L. A. (1999). Induction of immune responses to bovine herpesvirus type 1 gD in passively immune mice after immunization with a DNA-based vaccine. *J.Gen.Virol.* **80**, 2829 2837.
- Loehr, B. I., Pontarollo, R., Rankin, R., Latimer, L., Willson, P., Babiuk, L. A. und Van Drunen Littel-Van Den Hurk. (2001). Priming by DNA immunization augments T-cell responses induced by modified live bovine herpesvirus vaccine. *J.Gen.Virol.* 82, 3035 - 3043.
- Mahony, T. J., McCarthy, F. M., Gravel, J. L., West, L. und Young, P. L. (2002). Construction and Manipulation of an Infectious Clone of the Bovine Herpesvirus 1 Genome Maintained as a Bacterial Artificial Chromosome. *J. Virol.* **76**, 6660 - 6668.
- Marchuk, D., Drumm, M., Saulino, A. und Collins, F. S. (1991). Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Res.* **19**, 1154
- Matheka, H. D. und Straub, O. C. (1972). Weitere Untersuchungen zur Differenzierung des Virus der Rhinotracheitis (IBR) vom Virus des Bläschenausschlages (IPV) durch die trägerfreie Zonenelektrophorese in einem Glukose-Dichtegradienten. Archiv für die gesamte Virusforschung 39, 265 - 273.
- Mayr, A., Bachmann, P. A., Bibrack, B. und Wittman, G. (1974). Virologische Arbeitsmethoden Band I. *Gustav Fischer Verlag.Stuttgart*
- McGeoch, D. J., Cook, S., Dolan, A., Jamieson, F. E. und Telford, E. A. (1995). Molecular phylogeny and evolutionary timescale for the family of mammalian herpesviruses. *J. Mol. Biol.* **247**, 443 458.
- Messerle, M., Crnkovic, I., Hammerschmidt, W., Ziegler, H. und Koszinowski, U. H. (1997). Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**, 14759 14763.
- **Mettenleiter, T. C.** (2000). Aujeszky's disease (pseudorabies) virus: the virus and molecular pathogenesis -state of the art, June 1999. *Vet Res.* **31**, 99-115.
- Mettenleiter, T. C. (2002). Herpesvirus assembly and egress. J. Virol. 76, 1537 1547.
- Meyer, G., Hanon, E., Georlette, D., Pastoret, P. P. und Thiry, E. (1998). Bovine herpesvirus type 1 glycoprotein H is essential for penetration and propagation in cell culture. *J.Gen.Virol.* **79**, 1983 - 1987.

- Miller, N. J. (1955). Infectious necrotic rhinotracheitis of cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **126**, 463 - 467.
- Mo, C., Suen, J., Sommer, M. und Arvin, A. (1999). Characterization of Varicella-Zoster virus glycoprotein K (open reading frame 5) and its role in virus growth. J. Virol. 73, 4197 - 4207.
- Muyrers, J. P., Zhang, Y., Buchholz, F. und Stewart, A. F. (2000). RecE/RecT and Redalpha/Redbeta initiate double-stranded break repair by specifically interacting with their respective partners. *Genes Dev.* **14**, 1971 1982.
- Nakamichi, K., Matsumoto, Y. und Otsuka, H. (2002). Bovine herpesvirus 1 glycoprotein G is necessary for maintaining cell-to-cell junctional adherence among infected cells. *Virology* **294**, 22 30.
- Nakamichi, K., Ohara, K., Kuroki, D. und Otsuka, H. (2000). Bovine herpesvirus 1 glycoprotein G is required for viral growth by cell-to-cell infection. *Virus Res.* **68**, 175 181.
- Narayanan, K., Williamson, R., Zhang, Y., Stewart, A. F. und Ioannou, P. A. (1999). Efficient and precise engineering of a 200 kb beta-globin human/bacterial artificial chromosome in E. coli DH10B using an inducible homologous recombination system. *Gene Ther.* 6, 442 - 447.
- Neubauer, A., Beer, M., Brandmuller, C., Kaaden, O. R. und Osterrieder, N. (1997). Equine herpesvirus 1 mutants devoid of glycoprotein B or M are apathogenic for mice but induce protection against challenge infection. *Virology* 239, 36 - 45.
- Osterrieder, N., Neubauer, A., Brandmuller, C., Braun, B., Kaaden, O. R. und Baines, J. D. (1996). The equine herpesvirus 1 glycoprotein gp21/22a, the herpes simplex virus type 1 gM homolog, is involved in virus penetration and cell-to-cell spread of virions. *J. Virol.* **70**, 4110 4115.
- Osterrieder, N., Seyboldt, C. und Elbers, K. (2001). Deletion of gene 52 encoding glycoprotein M of equine herpesvirus type 1 strain RacH results in increased immunogenicity. *Vet.Microbiol.* **81**, 219 226.
- Pastoret, P. P., Babiuk, L. A., Misra, V. und Griebel, P. (1980). Reactivation of temperature-sensitive and non-temperature-sensitive infectious bovine rhinotracheitis vaccine virus with dexamethasone. *Infect.Immun.* 29, 483 - 488.

- Pastoret, P. P., Thiry, E., Brochier, B. und Derboven, G. (1982). Bovid herpesvirus 1 infection of cattle: pathogenesis, latency, consequences of latency. *Ann.Rech.Vet.* 13, 221 235.
- Perng, G. C., Dunkel, E. C., Geary, P. A., Slanina, S. M., Ghiasi, H., Kaiwar, R., Nesburn,
  A. B. und Wechsler, S. L. (1994). The latency-associated transcript gene of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) is required for efficient in vivo spontaneous reactivation of HSV-1 from latency. *J. Virol.* 68, 8045 8055.
- Perng, G. C., Jones, C., Ciacci-Zanella, J., Stone, M., Henderson, G., Yukht, A., Slanina, S. M., Hofman, F. M., Ghiasi, H., Nesburn, A. B. und Wechsler, S. L. (2000). Virusinduced neuronal apoptosis blocked by the herpes simplex virus latency-associated transcript. *Science* 287, 1500 - 1503.
- Poffenberger, K. L. und Roizman, B. (1985). A noninverting genome of a viable herpes simplex virus 1: presence of head-to-tail linkages in packaged genomes and requirements for circularization after infection. *J. Virol.* **53**, 587 - 595.
- Post, L. E. und Roizman, B. (1981). A generalized technique for deletion of specific genes in large genomes: alpha gene 22 of herpes simplex virus 1 is not essential for growth. *Cell* 25, 227 - 232.
- Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G. und Cormier, M. J. (1992). Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein. *Gene* 111, 229 - 233.
- Ramsay, M. (1994). Yeast artificial chromosome cloning. Mol. Biotechnol. 1, 181 201.
- Rebordosa, X., Pinol, J., Perez-Pons, J. A., Lloberas, J., Naval, J., Serra-Hartmann, X.,
   Espuna, E. und Querol, E. (1996). Glycoprotein E of bovine herpesvirus type 1 is involved in virus transmission by direct cell-to-cell spread. *Virus Res.* 45, 59 68.
- **Reichelt, D. und Beer, M.** (2002). Nationaler BHV-1 Ringtest 2001. *Zusammenfassung der Ergebnisse des 1. Nationalen BHV-1 Ringtests*
- Rijsewijk, F. A., Kaashoek, M. J., Madic, J., Paal, H., Ruuls, R. C., Gielkens, A. und Van Oirschot, J. T. (1993). Characterization of a DNA rearrangement found in the unique short region of the Za strain of bovine herpesvirus type 1 and the vaccine properties of this strain. *Proc. 18th Int.Herpesvirus Workshop, Pittsburgh, July 25-30*, C-67
- Roizman, B. (1996). Herpesviridae. In: Fields, B. N., Knipe, D. M., Howley, P. M. et al. (Eds.)
  Fields Virology, Vol. 2, 3rd edn. *Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia* 2221 2230.
- Roizman, B., Carmichael, L. E., Deinhardt, F., de The, G., Nahmias, A. J., Plowright, W.,
   Rapp, F., Sheldrick, P., Takahashi, M. und Wolf, K. (1981). Herpesviridae.
   Definition, provisional nomenclature, and taxonomy. The Herpesvirus Study Group,
   the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology* 16, 201 217.
- Rudolph, J., O'Callaghan, D. J. und Osterrieder, N. (2002a). Cloning of the genomes of equine herpesvirus type 1 (EHV-1) strains KyA and racL11 as bacterial artificial chromosomes (BAC). J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health 49, 31 - 36.
- Rudolph, J. und Osterrieder, N. (2002). Equine herpesvirus type 1 devoid of gM and gp2 is severely impaired in virus egress but not direct cell-to-cell spread. *Virology* 293, 356 -367.
- Rudolph, J., Seyboldt, C., Granzow, H. und Osterrieder, N. (2002b). The gene 10 (UL49.5) product of equine herpesvirus 1 is necessary and sufficient for functional processing of glycoprotein M. *J. Virol.* **76**, 2952 - 2963.
- Saeki, Y., Ichikawa, T., Saeki, A., Chiocca, E. A., Tobler, K., Ackermann, M., Breakefield, X. O. und Fraefel, C. (1998). Herpes simplex virus type 1 DNA amplified as bacterial artificial chromosome in Escherichia coli: rescue of replicationcompetent virus progeny and packaging of amplicon vectors. *Hum.Gene Ther.* 9, 2787 - 2794.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K.
  B. und Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487 491.
- Schaffer, P. A. (1975). Temperature-sensitive mutants of herpesviruses. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* **70**, 51 - 100.
- Schröder, C. und Keil, G. M. (1999). Bovine herpesvirus 1 requires glycoprotein H for infectivity and direct spreading and glycoproteins gH(W450) and gB for glycoprotein D-independent cell-to-cell spread. *J.Gen.Virol.* 80 (Pt 1), 57 - 61.
- Schröder, C., Linde, G., Fehler, F. und Keil, G. M. (1997). From essential to beneficial: glycoprotein D loses importance for replication of bovine herpesvirus 1 in cell culture. *J.Virol.* **71**, 25 - 33.

- Schumacher, D., Tischer, B. K., Fuchs, W. und Osterrieder, N. (2000). Reconstitution of Marek's disease virus serotype 1 (MDV-1) from DNA cloned as a bacterial artificial chromosome and characterization of a glycoprotein B-negative MDV-1 mutant. *J.Virol.* 74, 11088 - 11098.
- Schumacher, D., Tischer, B. K., Reddy, S. M. und Osterrieder, N. (2001). Glycoproteins E and I of Marek's disease virus serotype 1 are essential for virus growth in cultured cells. *J.Virol.* **75**, 11307 - 11318.
- Schwyzer, M. und Ackermann, M. (1996). Molecular virology of ruminant herpesviruses. *Vet.Microbiol.* **53**, 17 29.
- Scott, F. M. M. (1989). Bovine herpesvirus-2 infection. In: G. Wittmann (Editor), Herpesvirus Diseases of Cattle, Horses and Pigs. *Kluwer Academic Publishers, Boston,* Dordrecht, London 73 - 95.
- Shizuya, H., Birren, B., Kim, U. J., Mancino, V., Slepak, T., Tachiiri, Y. und Simon, M. (1992). Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in Escherichia coli using an F-factor-based vector. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89, 8794 - 8797.
- Shukla, D. und Spear, P. G. (2001). Herpesviruses and heparan sulfate: an intimate relationship in aid of viral entry. *J.Clin.Invest* **108**, 503 510.
- Shuman, S. (1994). Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. J.Biol.Chem. 269, 32678 - 32684.
- Six, A., Banks, M., Engels, M., Bascunana, C. R. und Ackermann, M. (2001). Latency and reactivation of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) in goats and of caprine herpesvirus 1 (CapHV-1) in calves. *Arch. Virol.* **146**, 1325 - 1335.
- Smith, G. A. und Enquist, L. W. (2000). A self-recombining bacterial artificial chromosome and its application for analysis of herpesvirus pathogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 4873 4878.
- Smith, R. H., Caughman, G. B. und O'Callaghan, D. J. (1992). Characterization of the regulatory functions of the equine herpesvirus 1 immediate-early gene product. *J.Virol.* 66, 936 - 945.
- Sodeik, B., Ebersold, M. W. und Helenius, A. (1997). Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J.Cell Biol.* **136**, 1007 1021.

- **Southern, E. M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J.Mol.Biol.* **98**, 503 517.
- Spear, P. G., Eisenberg, R. J. und Cohen, G. H. (2000). Three classes of cell surface receptors for alphaherpesvirus entry. *Virology* **275**, 1 8.
- Stavropoulos, T. A. und Strathdee, C. A. (1998). An enhanced packaging system for helper-dependent herpes simplex virus vectors. *J.Virol.* **72**, 7137 7143.
- Straub, O. C. (1975). Infectious bovine rhinotracheitis virus. History and recent developments. *Dev.Biol.Stand.* 28, 530 533.
- Sun, T. Q., Fernstermacher, D. A. und Vos, J. M. (1994). Human artificial episomal chromosomes for cloning large DNA fragments in human cells. *Nat.Genet.* **8**, 33 41.
- Suter, M., Lew, A. M., Grob, P., Adema, G. J., Ackermann, M., Shortman, K. und Fraefel,
  C. (1999). BAC-VAC, a novel generation of (DNA) vaccines: A bacterial artificial chromosome (BAC) containing a replication-competent, packaging- defective virus genome induces protective immunity against herpes simplex virus 1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96, 12697 12702.
- Thiry, E., Bublot, M., Dubuisson, J. und Pastoret, P. P. (1989). Bovine herpesvirus-4 (BHV-4) infections of cattle. In: G. Wittmann (Editor), Herpesvirus Diseases of cattle, Horses and Pigs. *Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrecht, London* 96 115.
- Thomsen, D. R., Marchioli, C. C., Yancey, R. J., Jr. und Post, L. E. (1987). Replication and virulence of pseudorabies virus mutants lacking glycoprotein gX. J. Virol. 61, 229 - 232.
- Tischer, B. K., Schumacher, D., Beer, M., Beyer, J., Teifke, J.-P., Osterrieder, K., Fehler,
   F. und Osterrieder, N. (2002a). A DNA vaccine containing an infectious Marek's disease virus genome confers protection against tumorigenic Marek's disease in chickens. *J.Gen.Virol.* in press
- Tischer, B. K., Schumacher, D., Messerle, M., Wagner, M. und Osterrieder, N. (2002b). The products of the UL10 (gM) and the UL49.5 genes of Marek's disease virus serotype 1 are essential for virus growth in cultured cells. *J.Gen.Virol.* 83, 997 -1003.

- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **76**, 4350 4354.
- Tran, L. C., Kissner, J. M., Westerman, L. E. und Sears, A. E. (2000). A herpes simplex virus 1 recombinant lacking the glycoprotein G coding sequences is defective in entry through apical surfaces of polarized epithelial cells in culture and in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 1818 - 1822.
- Trapp, S., Osterrieder, N., Keil, G. M. und Beer, M. (2003). Mutagenesis of a Bovine Herpesvirus Type 1 genome cloned as an infectious bacterial artificial chromosome: Analysis of glycoprotein E and G double deletion mutants. *J. Gen. Virol.* 84, 301 - 306.
- Van der Poel, W. H., Kramps, J. A., Quak, J., Brand, A. und Van Oirschot, J. T. (1995). Persistence of bovine herpesvirus-1-specific antibodies in cattle after intranasal vaccination with a live virus vaccine. *Vet.Rec.* **137**, 347 - 348.
- Van Drunen Littel-Van Den Hurk und Babiuk, L. A. (1985). Effect of tunicamycin and monensin on biosynthesis, transport, and maturation of bovine herpesvirus type-1 glycoproteins. *Virology* 143, 104 - 118.
- van Engelenburg, F. A., Kaashoek, M. J., Rijsewijk, F. A., van den, B. L., Moerman, A.,
  Gielkens, A. L. und Van Oirschot, J. T. (1994). A glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus 1 is avirulent in calves. *J.Gen.Virol.* 75 (Pt 9), 2311 2318.
- Van Oirschot, J. T. (1999). Diva vaccines that reduce virus transmission. *J.Biotechnol.* **73**, 195 205.
- Van Oirschot, J. T., Kaashoek, M. J., Maris-Veldhuis, M. A., Weerdmeester, K. und Rijsewijk, F. A. (1997). An enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against glycoprotein gE of bovine herpesvirus 1 allows differentiation between infected and vaccinated cattle. *J.Virol.Methods* 67, 23 - 34.
- Van Oirschot, J. T., Kaashoek, M. J. und Rijsewijk, F. A. (1996a). Advances in the development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccines. *Vet.Microbiol.* 53, 43 -54.
- Van Oirschot, J. T., Kaashoek, M. J., Rijsewijk, F. A. und Stegeman, J. A. (1996b). The use of marker vaccines in eradication of herpesviruses. *J.Biotechnol.* **44**, 75 81.

- van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Carstens, E. B., Estes, M. K., Lemon, S. M., Maniloff, M. A., Mayo, D. J., McGeoch, D. J., Pringle, C. R. und Wickner, R. B. (2000). Virus taxonomy. Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. *Academic Press* 1024pp.
- van Zijl, M., Quint, W., Briaire, J., de Rover, T., Gielkens, A. und Berns, A. (1988). Regeneration of herpesviruses from molecularly cloned subgenomic fragments. *J.Virol.* 62, 2191 - 2195.
- Varmuza, S. L. und Smiley, J. R. (1985). Signals for site-specific cleavage of HSV DNA: maturation involves two separate cleavage events at sites distal to the recognition sequences. *Cell* 41, 793 - 802.
- Wagner, M., Ruzsics, Z. und Koszinowski, U. H. (2002). Herpesvirus genetics has come of age. *Trends Microbiol.* **10**, 318 324.
- Wilfinger, W. W., Mackey, K. und Chomczynski, P. (1997). Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques* 22, 474 -481.
- Wirth, U. V., Vogt, B. und Schwyzer, M. (1991). The three major immediate-early transcripts of bovine herpesvirus 1 arise from two divergent and spliced transcription units. *J. Virol.* **65**, 195 205.
- Wu, S. X., Zhu, X. P. und Letchworth, G. J. (1998). Bovine herpesvirus 1 glycoprotein M forms a disulfide-linked heterodimer with the U(L)49.5 protein. J. Virol. 72, 3029 3036.
- Wyler, R., Engels, M. und Schwyzer, M. (1989). Infectious bovine rhinotracheitis / vulvovaginitis. In: G. Wittmann (Editor), Herpesvirus Diseases of Cattle, Horses and Pigs. *Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrecht, London* 1 72.
- Yates, W. D. (1982). A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle. *Can.J.Comp Med.* 46, 225 263.
- Yoshitake, N., Xuan, X. und Otsuka, H. (1997). Identification and characterization of bovine herpesvirus-1 glycoproteins E and I. *J.Gen.Virol.* **78** ( Pt 6), 1399 1403.
- Zhang, Y., Buchholz, F., Muyrers, J. P. und Stewart, A. F. (1998). A new logic for DNA engineering using recombination in Escherichia coli. *Nat.Genet.* **20**, 123 128.

# 8. Anhang

### Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

А	Adenin
A. dest.	Aqua destillata
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	bacterial artificial chromosome
BFAV	Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere
BHV-1, -2, -4, -5	Bovines Herpesvirus Typ 1, 2, 4, 5
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
С	Cytosin
°C	Grad Celsius
CAT	Chloramphenicolaminotransferase
CBS	Citrat-gepufferte Saline
CIP	calf intestine phosphatase
CSPD <sup>®</sup>	3-(4-methoxyspiro[1,2-dioxethan-3,2'-(5'chloro)- Tricyclo{3.3.1.1 <sup>3,7</sup> }Decan]-4-yl) Phenylphosphat
CTCS	cell-to-cell spread
Da	Dalton
d. h.	das heißt
DIG	Digoxigenin
DIVA	differentiating infected from vaccinated animals
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosid-5`-Triphosphat
DOCA	Natriumdesoxycholat
DOPE	Dioleylphosphatidyl-ethanolamin
DOTMA	1,2-Dioleyloxypropyl-3-trimethylammoniumbromid
DTT	Dithiothreitol

### Anhang

Е	early
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	enhanced green fluorescent protein
EHV-1	Equines Herpesvirus Typ 1
ELISA	enzyme linked immunoassay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	et altera
EU	Europäische Union
F	Farad
F-Faktor	Fertilitätsfaktor
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
G	Guanin
GFP	green fluorescent protein
griech.	griechisch
gX	Glykoprotein X
h	Stunde
HBS	Hepes-gepufferte Saline
HAEC	Human artificial episomal chromosome
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HSV-1, -2	Herpes Simplex Virus Typ 1, 2
HveA-D	herpesvirus entry mediator A-D
IBP	Infektiöse Balanoposthitis
IBR	Infektiöse Bovine Rhinotracheitis
ICTV	International Comittee on Taxonomy of Viruses
IE	immediate early
IgA, IgG, IgM	Immunglobulin A, Immunglobulin G, Immunglobulin M
IIFT	Indirekter Immunfluoreszenztest
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyrosid
IPV	Infektiöse Pustulöse Vulvovaginitis
IR	Internal Repeat
k	Kilo
kan	Kanamycinresistenz-Gen

### Anhang

KID <sub>50</sub> /ml	kulturinfektiöse Dosis 50 pro ml
L	late
1	Liter
lacZ	β-Galaktosidase-Gen
lat.	lateinisch
LAT	latency-associated transcript
LB	Luria-Bertani
log	Logarithmus
Lsg.	Lösung
m	Mega
m	Meter
m	Milli
μ	Mikro
М	Mol
mAk	monoklonaler Antikörper
MCMV	Maus Cytomegalovirus
MDBK	Madin Darby Bovine Kidney
MDV-1	Marek's disease virus Typ 1
MEM	Minimal Essential Medium
min	Minute
MOI	multiplicity of infection
mRNA	messenger RNA
n	Nano
Ν	Normal
N-	Stickstoff-gebunden
Ω	Ohm
0-	Sauerstoff-gebunden
OD	Optische Dichte
ORF	open reading frame, offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFU	plaque forming units, plaquebildende Einheiten
pН	potentia Hydrogenium

Anhang

p. i.	post infectionem
POD	Peroxidase
PRV	Pseudorabies Virus
p. t.	post transfectionem
p. v.	post vaccinationem
RFLP	Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus
RIPA	Radioimmunpräzipitations-Assay
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
sog.	sogennant
ssDNA	single strand DNA, einzelsträngige DNA
SSC	standard saline citrate
Т	Thymin
TBS	Tris-gepufferte Saline
TEMED	Tetramethylethylendiamin
αTIF	alpha-trans inducing factor
ТК	Thymidinkinase
TR	Terminal Repeat
U	Einheit
UL	Unique long
Us	Unique short
UV	Ultraviolett
V	Volt
<i>v/v</i>	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
VZV	Varicella Zoster Virus
W	Watt
<i>w/v</i>	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactosid
YAC	yeast artificial chromosome
z. B.	zum Beispiel

ZBV	Zellbank für Zellinien in der Veterinärmedizin
ZNS	Zentralnervensystem
zpE	zytopathogener Effekt

#### Danksagung

Herrn Prof. O.-R. Kaaden schulde ich für seine Förderung und Unterstützung dieser Arbeit großen Dank.

Herrn Prof. Thomas C. Mettenleiter danke ich vielmals für seine Unterstützung und das stete Interesse an meiner Arbeit.

Diese Arbeit wurde im nationalen BHV-1-Referenzlabor unter der Anleitung von Herrn PD Dr. Martin G. Beer angefertigt. Martin danke ich für seine vorbildliche Betreuung und Unterstützung, seinen Enthusiasmus und seine Freundschaft.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Nikolaus Osterrieder, Cornell University. Klaus hat durch seine Inspiration und Motivation erheblich zu dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Bei Herrn Dr. Horst Schirrmeier bedanke ich mich vielmals für die Überlassung des Arbeitsplatzes im Institut für Virusdiagnostik.

Bei allen Kollegen der BFAV Insel Riems möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bedanken. Mein besonderer Dank gilt hierbei den mir freundschaftlich verbundenen Mitarbeitern des nationalen BHV-1-Referenzlabors: Doreen Reichelt, Birgit Goerl, Ilia Semmler, Katrin Kühn und Eber A. Oliveira.

Kerstin Wink, Dr. Günther Keil, Dr. Daniel Schumacher, Dr. Karsten Tischer und Dr. Jens von Einem danke ich vielmals für ihre Unterstützung bei der Etablierung der BAC-Technologie für das Bovine Herpesvirus Typ 1.

Meiner Schwester, Sabine Trapp, danke ich für die Mithilfe bei der Drucklegung dieser Arbeit.

# Lebenslauf

Name:	Sascha Trapp
Adresse:	East State Street 703, Ithaca, New York 14850, USA
Eltern:	Dietmar F. J. und Renate M. M. Trapp, geb. Schmidt
Geburtsdatum:	05. März 1974
Geburtsort:	Witten
Schulausbildung:	1980 – 1984 Grundschule, Pferdebachschule Witten 1984 – 1994 Städtisches Ruhrgymnasium Witten 01. Juni 1994 Abitur
Studium:	Wintersemester 1995/1996 – Wintersemester 2000/2001, Tiermedizin-Studium an der Ludwig-Maximilians-Universität München 10. Januar 2001 Abschluss der Tierärztlichen Prüfung
Approbation:	22. Februar 2001
Dissertation:	März 2001– Februar 2003, Thema: "Klonierung und Mutagenese des Bovinen Herpesvirus Typ 1 als ein infektiöses künstliches bakterielles Chromosom ( <i>bacterial artificial chromosome</i> , BAC)"