

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Untersuchungen zur Rolle der M10 Region des murinen
Gammaherpesvirus 68 (MHV-68) *in vitro* und *in vivo* durch mit der BAC-
Technologie generierte rekombinante Viren**

vorgelegt von

Britta Sabine Flach

aus

Osnabrück

2009

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn PD Dr. Adler betreut und von Herrn Prof. Dr. Förstemann von der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 19.03.2009

Dissertation eingereicht am: 19.03.2009

1. Gutachter: PD Dr. Heiko Adler

2. Gutachter: Prof. Dr. Klaus Förstemann

Mündliche Prüfung am: 07.07.2009

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
1. EINLEITUNG	1
1.1 Herpesviren	1
<i>Allgemeine Eigenschaften</i>	1
<i>Lytischer und latenter Infektionszyklus</i>	2
<i>Klassifizierung</i>	2
<i>Humane Herpesviren</i>	3
1.2 MHV-68 als Modellsystem für die Untersuchung der Pathogenese von Herpesvirusinfektionen	4
1.3 Das murine Gammaherpesvirus 68 (MHV-68)	5
<i>Klassifikation und Genomstruktur</i>	5
<i>Die MHV-68 spezifischen Gene und deren Funktionen</i>	6
<i>Replikationszyklus von MHV-68 in vitro</i>	9
<i>Replikationszyklus von MHV-68 in vivo</i>	10
<i>Klinische Erscheinungsbilder nach Infektion mit MHV-68</i>	10
<i>Latenz und Reaktivierung von MHV-68</i>	11
1.4 Die 100 bp Wiederholungssequenz und die M10 Region im Genom von MHV-68	12
1.5 Das Kaposi Sarkom-assoziierte Herpesvirus (KSHV)	14
1.6 Die K12 Region von KSHV	15
ZIELSETZUNG	17
2. MATERIAL UND METHODEN	18
MATERIAL	18
2.1 Viren	18
2.2 Eukaryontische Zellen	19
2.3 Bakterien	19
2.4 Mäuse	19
2.5 Plasmide	19
2.6 Nährmedien für die Zellkultur	20
2.7 Nährmedien für Bakterien	21
2.8 Antibiotika	21
2.9 Antikörper	22
2.10 Enzyme	22
2.11 Synthetische Oligonukleotide (Primer)	22

2.12 Chemikalien und Reagenzien	23
2.13 Puffer und Lösungen	25
2.14 Kommerzielle Reaktionssätze	28
2.15 Geräte	28
2.16 Verbrauchsmaterialien	30
2.17 Computerprogramme, Bioinformatik-Tools	31
METHODEN	32
2.18 Bakteriologische Methoden	32
2.18.1 Kultivierung von Bakterien	32
2.18.2 Kryokonservierung prokaryontischer Zellen (Glyzerinkultur)	32
2.18.3 Herstellung elektrokompenter Bakterien	32
2.18.4 Herstellung chemischkompetenter Bakterien	33
2.18.5 Elektrotransformation von Bakterien	33
2.18.6 Chemische Transformation von Bakterien durch Hitzeschockbehandlung	33
2.18.7 BAC - Shuttle Mutagenese	34
2.18.8 ET-Cloning	35
2.19 Molekularbiologische Methoden	37
2.19.1 Plasmidisolierung im analytischen Maßstab (Mini-Präparation)	37
2.19.2 BAC-Plasmidisolierung im analytischen Maßstab (Mini-Präparation)	38
2.19.3 Isolierung von Plasmiden und BAC-Vektoren im präparativen Maßstab (Maxi-Präparation)	39
2.19.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	39
2.19.5 Spaltung von Nukleinsäuren durch Restriktionsendonukleasen	39
2.19.6 Erzeugung kompatibler DNA Enden	40
2.19.7 Dephosphorylierung von DNA	40
2.19.8 Ligation	41
2.19.9 Amplifikation von Nukleinsäuren mittels der Polymerase-Kettenreaktion	41
2.19.10 Analyse von Nukleinsäuren mittels Agarosegelelektrophorese	42
2.19.11 Isolierung von DNA aus Agarosegelen	43
2.19.12 Ethanolpräzipitation von DNA	43
2.19.13 Herstellung einer Digoxigenin markierten Sonde für den Southern Blot	43
2.19.14 Nachweis spezifischer DNA Fragmente durch das Southern Blot Verfahren	44
2.19.15 Isolation von DNA und RNA	45
2.20 Zellkultur-Techniken	46
2.20.1 Kultivierung eukaryontischer Zelllinien	46
2.20.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	46
2.20.3 Transfektion von Nukleinsäuren in eukaryontische Zellen	47
2.21 Virologische Methoden	47
2.21.1 Virusrekonstitution nach der Mutagenese	47
2.21.2 Infektion von Zellen mit MHV-68 und Virusstock Präparation	48
2.21.3 Titerbestimmung von MHV-68 mittels Plaueassay	49
2.21.4 Isolierung viraler DNA (HIRT Extraktion)	49
2.21.5 Bestimmung des Wachstumsverhalten von MHV-68 <i>in vitro</i>	50
2.21.6 Bestimmung der Viruslast in mit den rekombinanten MHV-6 Viren infizierten Splenozyten mittels quantitativer PCR	50
2.22 Tierexperimentelle Methoden	52
2.22.1 Infektion von Versuchstieren	52
2.22.2 Gewinnung von Organhomogenaten	53
2.22.3 Isolation der Splenozyten und Einsatz in den <i>ex vivo</i> Reaktivierungsassay	53
2.23 Proteinbiochemische Methoden	55
2.23.1 Nachweis von rekombinanten M10aHA-tag im Western Blot Verfahren	55
2.23.2 Immunopräzipitation aus mit M10aHA-tag infizierten NIH3T3 Zellen	56
3. ERGEBNISSE	58
3.1. Generierung rekombinanter Viren mittels BAC Technologie	58
3.2. Im Labor bereits vorliegende rekombinante Viren, die in der Arbeit untersucht wurden ...	66

3.3. Analyse der rekombinanten Viren auf genomischer Ebene	69
3.4. Mutationen im M10 Leserahmen beeinflussen das Replikationsverhalten von MHV-68 <i>in vivo</i>, nicht aber <i>in vitro</i>	71
3.5. Der Phänotyp, der nach Infektion mit den rekombinanten Viren ΔM10ΔTet und M10.Del auftritt, lässt sich auf die Deletion innerhalb der M10 Region zurückführen	78
3.6. Die Deletion in ΔM10ΔTet beeinflusst bereits die frühe Phase der lytischen Infektion <i>in vivo</i>	84
3.7. Die Deletion in ΔM10ΔTet beeinflusst bereits die frühe Phase der Latenz <i>in vivo</i>	86
3.8. Der Phänotyp der ΔM10ΔTet Mutante in C57BL/6 Mäusen bleibt auch nach intraperitonealer Infektion bestehen	89
3.9. Die Deletion innerhalb des Replikationsursprunges (OriLyt) von MHV-68 in den rekombinanten Viren ΔM10ΔTet und Δ20Int beeinflusst die Replikation des Virus <i>in vivo</i>	94
3.10. Die Deletion des OriLyt in der Mutante Δ20Int hat keinen Einfluss auf die Parameter der Latenz zu einem späten Zeitpunkt nach Infektion.	101
3.11. Der Phänotyp der Δ20Int Mutante bleibt auch nach intraperitonealer Infektion in C57BL/6 Mäusen bestehen	104
3.12. Reversion des Phänotyps der ΔM10ΔTet Mutante durch ektopye Insertion des Replikationsursprunges (OriLyt) von MHV-68	108
3.13. Untersuchungen zum Nachweis eines in der M10 Region von MHV-68 kodierten Proteins	114
3.14. Insertion der K12 Region von KSHV in die rekombinanten MHV-68 ΔM10ΔTet und M10.Del und der Einfluss dieser Insertion auf die Pathogenese <i>in vivo</i>	120
3.15. Tumorentstehung nach Infektion von Mäusen mit rekombinanten MHV-68, die den K12 Leserahmen von KSHV tragen	129
4. DISKUSSION	131
ZUSAMMENFASSUNG	146
LITERATURVERZEICHNIS	148

Abkürzungsverzeichnis

α	alpha
β	beta
γ	gamma
A	Adenin
Amp	Ampicillin
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
b	Basen
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
Bcl	B-cell lymphoma
BHK-21	Baby hamster kidney cells
BSA	bovine serum albumin
cm	Centimeter
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
Cam	Chloramphenicol
CD	Cluster of Differentiation
CIP	calf intestinal phosphatase
CMV	Zytomegalievirus
CPE	cytopathic effect
Cre	„Cyclization recombination“ Rekombinase des Phagen P1
d.h.	das heißt
dH ₂ O	Destilliertes (vollentsalztes) Wasser
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes (vollentsalztes) Wasser
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco's modified Eagle-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
et al	et alii (und andere)
E	early
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBNA	EBV nuclear antigen
EBV	Epstein-Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FBS	Fetal Bovine Serum
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung
gp	Glykoprotein
G	Guanin
<i>gfp</i> , GFP	green fluorescent protein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HHV	humanes Herpesvirus
HVS	Herpesvirus saimiri
i.n.	intranasal
i.p.	intraperitoneal
IE	immediate early
IF	Immunfluoreszenz
IFN	Interferon
IP	Immunpräzipitation
k	kilo
Kan	Kanamycin
kg	Kilogramm
KSHV	Kaposi-sarkom assoziiertes Herpesvirus
l	Liter
L	late
LAT	latency associated transcript
LB	Luria Bertani
LMP1	EBV latent membrane protein 1
lox P	locus of X-over of P1

M	Molar
μ	Mikro
MC3T3	C57/Bl6-Mausembryo-Fibroblasten
mg	Milligramm
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MHC	Major Histocompatibility Complex
MHV-68	Murines Gammaherpesvirus 68
min	Minute
MOI	Multiplicity of infection
mRNA	messenger RNA
nm	nanometer
NIH3T3	Swiss-Mausembryo-Fibroblasten
OD	Optische Dichte
o.g.	oben genannt
ORF	Open reading frame (offener Leserahmen)
p.i.	post infectionem
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PBS	Phosphat buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PEL	Primary effusion lymphoma
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur bzw. Reverse Transkription
s / sek	Sekunde
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SDS	Sodiumdodecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)
STP	Saimiri tranformation-associated protein
T	Thymin
TAE	Tris Acetat EDTA
TBE	Tris Borsäure EDTA
TBS	Tris Buffered Saline(Tris gepufferte Salzlösung)
TE	Tris EDTA-Puffer

TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tet	Tetrazyklin
TIP	Tyrosine kinase interacting proteins
TPB	Tryptose Phosphat Broth
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Uracil bzw. Unit (Enzymeinheit)
u.a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
v	viral
V	Volt
Vol.	Volumen
VZV	Varizella-Zoster Virus
W	Watt
WB	Western-Blot
z.B.	zum Beispiel

1. EINLEITUNG

1.1 Herpesviren

Allgemeine Eigenschaften

Die Herpesviren gehören zur Familie der *Herpesviridae*. Sie besitzen ein doppelsträngiges (ds) DNA Genom, welches typischerweise bei allen Vertretern dieser Familie in linearer Form vorliegt (Roizman et al. 2001). Gebunden an eine Protein Struktur (Core genannt) ist das Genom von einem ikosaedrischen Kapsid umgeben. Das Kapsid ist von einer Proteinmatrix umschlossen, die Tegument genannt wird. Eine Membran mit eingebetteten Glykoproteinen komplettiert das Virion. Mit einer Masse von 80 – 150 kD, einer Größe von 120 bis 300 nm und einer Kodierkapazität von bis zu 200 offenen Leserahmen (ORF – *open reading frames*) zählen Herpesviren zu den größten bekannten Viren.

Die Replikation der ds DNA erfolgt im Zellkern, dort kommt es ebenfalls zur Morphogenese der Viren. Der Genomaufbau zeigt verschieden große Leserahmen, welche teilweise überlappen. Neben einzigartigen Sequenzen kommen Wiederholungsstrukturen, so genannte „repeats“ vor.

Die Adsorption der Viren an die Wirtszellen ist noch nicht vollständig aufgeklärt, man vermutet aber, dass einzelne Glykoproteine für die Anheftung an die Zelloberfläche und die erfolgreiche Penetration erforderlich sind. Der Eintritt der Herpesviren in die Wirtszelle kann über rezeptorvermittelte Endozytose stattfinden, wie auch über die Verschmelzung der viralen Membran mit der Zellmembran. Das Kapsid und die Tegumentproteine werden hierbei in das Cytoplasma freigesetzt. Das Kapsid wird zu den Kernporen transportiert und das Genom wird in den Nukleus freigesetzt. Die Expression des viralen Genoms erfolgt in einer Kaskade. Zuerst erfolgt die Transkription der α -Gene (IE - *immediate early genes*), welche vor allem regulatorische Funktionen besitzen, dann die Transkription und Translation der β - und γ -Gene. Die β -Gene (E - *early genes*) sind in den Nukleinsäure Metabolismus involviert, die γ -Gene (L – *late genes*) kodieren für Strukturproteine und werden zeitgleich mit der DNA Synthese exprimiert. Die Replikation der viralen DNA erfolgt über den so genannten „rolling-circle“ Mechanismus. Im Zellkern kommt es zum Zusammenbau (*Assembly*) von

Vorläuferpartikeln. Nach Ausschleusung aus dem Zellkern kommt es im Cytoplasma zu weiteren Prozessierungen. Die reifen, infektiösen Partikel werden an die Zelloberfläche transportiert und freigesetzt, dabei kommt es zur Zerstörung der Zelle.

Lytischer und latenter Infektionszyklus

Neben dem lytischen Infektionsverlauf, welcher mit dem Tod der Wirtszelle einhergeht, besitzt die Familie der Herpesviren die Fähigkeit, latent in der Zelle eines Organismus zu verbleiben. Latent bedeutet hierbei, dass die Produktion infektiöser Viren unterbrochen ist, obwohl die gesamte genomische Information vorhanden ist. In der latenten Phase erfolgt eine Minimalexpression einiger viraler Proteine, während das Genom als Episom im Zellkern der infizierten Wirtszelle vorliegt und parallel mit dem zellulären Genom repliziert wird.

Die Latenz des Virus kann von lebenslanger Dauer sein, wobei jederzeit eine Reaktivierung der lytischen Infektionsphase möglich ist, welche von einer Primärinfektion ähnlichem Krankheitsbild begleitet wird. Die Mechanismen der Regulation, Etablierung und der Reaktivierung aus der Latenz sind bei den Herpesviren unterschiedlich ausgeprägt.

Klassifizierung

Die Familie der *Herpesviridae* lässt sich aufgrund ihrer biologischen Eigenschaften in drei verschiedene Unterfamilien aufteilen, die α -, β - und γ -Herpesviren (Roizman et al. 2001). Zur Klasse der α -Herpesviren zählen unter anderem das Herpes-Simplex-Virus 1 (HSV-1) und das Varizella-Zoster-Virus (VZV). Diese Klasse zeichnet sich durch ihr breit gefächertes Wirtsspektrum, einen rapiden Replikationszyklus und die Lyse der infizierten Zelle (CPE – *cytopathic effect*) aus. Der primäre Ort der Latenz sind die Ganglien. Die β -Herpesviren zeigen ein engeres Wirtsspektrum und die Replikation verläuft langsamer, in infizierten Zellen kommt es zur Zytomegalie. Latenz etablieren die Vertreter dieser Unterfamilie, zu denen u.a. das Zytomegalievirus (CMV) gehört, in Zellen verschiedenster Gewebe.

Charakteristisch für γ -Herpesviren, zu denen das in dieser Arbeit untersuchte murine Gammaherpesvirus 68 (MHV-68) gehört, ist eine sehr enge Wirtsspezifität. Der latente

Infektionsverlauf der Viren dieser Gruppe findet in B- und T-Lymphozyten statt. Sie sind in der Lage, lymphoproliferative Erkrankungen zu induzieren, und werden mit verschiedensten Tumoren assoziiert (Simas und Efstathiou 1998). Neben MHV-68 gehören das Epstein-Barr-Virus (EBV) sowie das Kaposi Sarkom-assoziierte Herpesvirus (humanes Herpesvirus 8 bzw. KSHV) zu den γ -Herpesviren.

Humane Herpesviren

Bislang sind acht humane Herpesviren bekannt, im Tierreich sind es eine Vielzahl mehr. Eine Auflistung der humanen Herpesviren findet sich in Tabelle 1.

Tabelle 1: Auflistung der humanpathogenen Herpesviren. Gezeigt sind die drei Unterfamilien der Herpesviridae mit den jeweiligen Genera und den humanen Herpesviren 1 - 8 (HHV). Im Genus der Muromegaloviren findet sich kein humaner Vertreter. (*Virus Taxonomy: 6. Report of the ICTV, 1995*)

Unterfamilie	Genus	Virustyp (Mensch)
α -Herpesviren	Simplexvirus	Herpes-Simplex-Virus 1 (HHV-1) Herpes-Simplex-Virus 2 (HHV-2)
	Varicellovirus	Varizella-Zoster-Virus (HHV-3)
β - Herpesviren	Cytomegalovirus	Humanes Zytomegalievirus (HHV-5)
	Muromegalovirus	- / -
	Roseolovirus	Humanes Herpesvirus 6 (HHV-6) Humanes Herpesvirus 7 (HHV-7)
γ -Herpesviren	Lymphocryptovirus	Epstein-Barr-Virus (HHV-4)
	Rhadinovirus	KSHV * (HHV-8)

* Kaposi Sarkom-assoziiertes Herpesvirus.

Herpesviren sind weltweit verbreitet, mit einer starken Durchseuchungsrate von bis zu 90%. Die Übertragung erfolgt bei allen Vertretern der Herpesviren durch direkten Körperkontakt (Tröpfcheninfektion, Kontakt mit Hautläsionen, Speichel, Blutprodukten sowie

Sexualkontakt). Die Primärinfektion erfolgt meist im Kindes- oder Jugendalter, und das Virus verbleibt lebenslang im Körper des Infizierten. In den meisten Fällen verläuft die latente Infektion asymptomatisch. Sekundärerkrankungen treten nach Virusreaktivierung aus der Latenz auf. Typische Sekundärerkrankungen sind z.B. die Gürtelrose nach Infektion mit VZV. Mit Herpesviren-assoziierte Tumorerkrankungen treten in seltenen Fällen bei immunologisch gesunden Patienten, die die Viren latent tragen, auf. EBV- oder auch KSHV-assoziierte Lymphome finden sich vor allem bei immunsupprimierten Patienten. Eine Prophylaxe in Form einer Impfung ist nur im Fall von VZV gegeben, für die anderen humanen Herpesviren stehen antivirale Therapeutika oder eine allgemeine Behandlung der klinischen Symptome zur Verfügung (Modrow 2003).

1.2 MHV-68 als Modellsystem für die Untersuchung der Pathogenese von Herpesvirusinfektionen

Unter den Vertretern der humanen Herpesviren befinden sich mit EBV und KSHV zwei Viren, die mit Tumorerkrankungen assoziiert werden. EBV Infektionen werden mit dem Burkitt's Lymphom, dem Nasopharynx Karzinom, Morbus Hodgkin sowie mit AIDS-assoziierten Lymphomen und Lymphomen, die nach einer Transplantation entstehen, in Verbindung gebracht. KSHV-tragende Zellen finden sich im Kaposi Sarkom, im primären Effusionslymphom und bei der Morbus-Castleman Erkrankung (Roizman et al. 2001).

Ein wichtiger Schritt zum Verständnis der o.g. Tumorerkrankungen ist die Aufklärung der genetischen und molekularen Vorgänge, die mit der Infektion einhergehen. Wie kommt es zur Entartung der Zellen und zur Entstehung des Tumors, und wie entkommen die Viren der Immunabwehr? Welcher Mechanismus führt zu einer Reaktivierung aus der Latenz? Welche viralen Gene spielen hierbei eine Rolle?

EBV und KSHV sind, wie alle Mitglieder der γ -Herpesvirus-Unterfamilie, spezies-spezifisch, d.h. stark auf ihren Wirt, in diesem Fall den Menschen, beschränkt. Permissive Zellkultursysteme für die Untersuchung der lytischen und latenten Infektionsverläufe sind nicht verfügbar bzw. auf Zelllinien beschränkt, die latent mit EBV oder KSHV infiziert sind. Kleintiermodelle sind ebenfalls nicht vorhanden, und Großtiermodelle mit erheblichem Aufwand und Kosten sowie ethischen Bedenken verbunden. Mit MHV-68, welches wie EBV und KSHV zur Gruppe der γ -Herpesviren gehört, liegt ein Modellsystem vor, das zur

Untersuchung der Pathogenese und Immunologie von Gammaherpesvirus-Infektionen in großem Maße beitragen kann (Simas und Efstathiou 1998, Blackman und Flano 2002, Virgin und Speck 1999a und 1999b). Infektionen von Laborstämmen mit MHV-68 führen zu einem ähnlichen Krankheitsbild wie es nach einer Infektion mit EBV entsteht (Flano et al. 2002, Sunil-Chandra et al. 1992a).

MHV-68 infiziert mehrere Zelltypen humanen und tierischen Ursprungs, wie Fibroblasten und Epithelzelllinien *in vitro* (Blaskovic et al. 1980; Svobodova et al. 1982), sowie verschiedene Mäusestämme *in vivo* (Sunil-Chandra et al. 1992a). Mit der Klonierung des MHV-68 Genoms als BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*) wurde es möglich, erfolgreich rekombinante Viren herzustellen, die im Kontext einer natürlichen Infektion untersucht werden können und dazu beitragen, die Funktion von viralen Genen aufzuklären (Adler et al. 2000).

1.3 Das murine Gammaherpesvirus 68 (MHV-68)

Klassifikation und Genomstruktur

Das murine Gammaherpesvirus 68 wurde 1980 erstmalig aus dem Nager *Clethrionomys glareolus* isoliert und zunächst in die Familie der α -Herpesviren eingegliedert (Blaskovic et al. 1980). Es ist ein natürlicher Erreger wilder Nagetiere, welcher ebenso Labormäuse infizieren kann (Sunil-Chandra et al. 1992a, Rajcani et al. 1985). Molekulare Untersuchungen der genomischen Sequenz von MHV-68 führten zu dessen Eingliederung in die Familie der γ -Herpesviren (Efstathiou et al. 1990a). Die Genomstruktur entspricht in weiten Teilen der von HVS (Herpesvirus saimiri), EBV und KSHV (Efstathiou et al. 1990b). Das virale Genom hat eine Größe von etwa 118 kb, mit einer Kodierungskapazität von etwa 80 Genen. Flankiert wird das Genom beidseitig von terminalen 1,2 kb großen Wiederholungssequenzen (Virgin et al. 1997). Weiterhin finden sich zwei interne Wiederholungssequenzen, das 40 bp und 100 bp repeat (Abb. 1).

Ein Großteil der viralen Gene ist homolog zu den Genen der anderen γ -Herpesviren und kolinear im Genom organisiert (Abb. 2). Sie wurden entsprechend der Nomenklatur der Gammaherpesviren KSHV und HVS benannt. Weiterhin liegen Leserahmen vor, welche

Homologien zu zellulären Genen aufweisen, und solche, bei denen keine Homologien erkennbar sind. Diese viruspezifischen ORF's sind im MHV-68 Genom als M1 bis M14 benannt worden (Virgin et al. 1997).

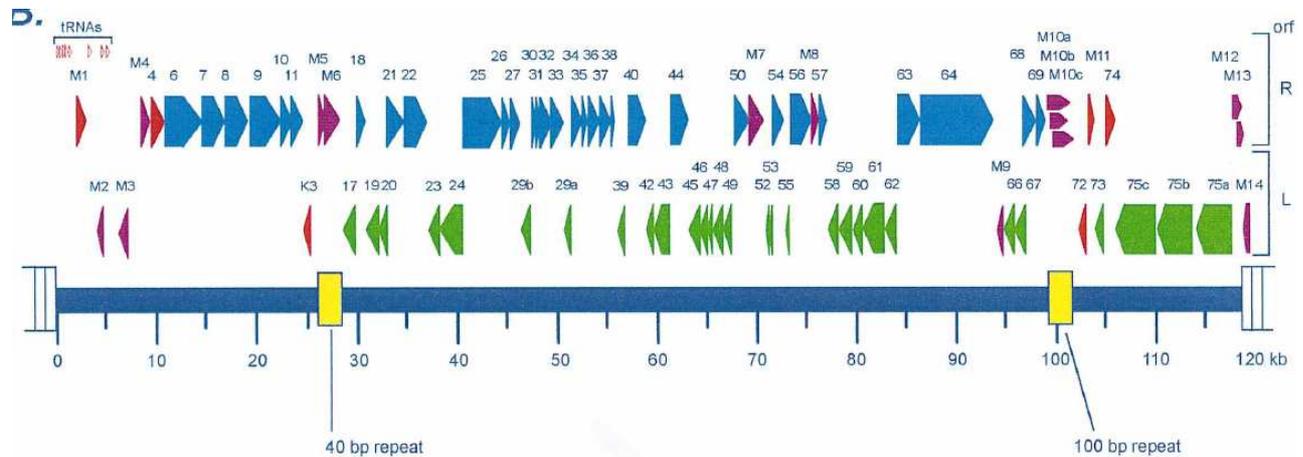


Abb. 1.1: Schematischer Genomaufbau von MHV-68. Dargestellt ist das ca.120 kb große ds DNA Genom (blau), welches zwei interne (gelb) und terminale (weiß) Wiederholungssequenzen enthält. Die Pfeile zeigen die offenen Leserahmen (ORF – *open reading frames*) des Virus, und in welcher Richtung diese transkribiert werden. Grüne und hellblaue Pfeile zeigen ORF's, welche homolog sind zu anderen γ -Herpesviren, rote zeigen die ORFs, die homolog zu zellulären Genen sind. Violett gefärbte Pfeile stehen für Gene, welche spezifisch für MHV-68 (M1 – M14) sind. (Virgin et al. 1997)

Die MHV-68 spezifischen Gene und deren Funktionen

Für einige der MHV-68-spezifischen Gene wurden bereits Funktionen beschrieben. Sequenzvergleiche zeigten eine Homologie des ORF M1 zu dem Serin Protease Inhibitor (SPI-1) der Poxviren (Bowden et al. 1997). M1 liegt zwischen den tRNA-ähnlichen Sequenzen, welche sich ebenfalls am linken Genomende von MHV-68 befinden. Simas et al. 1998b zeigten, dass diese Region nicht essentiell für die Replikation des Virus *in vitro* und für die Etablierung der Latenz *in vivo* ist. Unabhängig davon generierten Clambey et al. 2000 ein rekombinantes MHV-68, bei welchem zielgerichtet die M1 Region deletiert war. Sie konnten die Ergebnisse von Simas et al. 1998b bestätigen und zeigen, dass die akute Replikation des rekombinanten Virus *in vivo* erniedrigt war und die Reaktivierungsfrequenz aus der

Latenzphase um ein Vielfaches erhöht war. Möglicherweise ist die Reaktivierung aus der Latenz direkt durch M1 oder einen von M1 abhängigen Mechanismus gestört. Evans et al. fanden heraus, dass M1 für die CD8⁺ T-Zell Immunantwort *in vitro* und *in vivo* notwendig ist. M1 stimuliert CD8⁺ T-Lymphozyten, speziell diejenigen, die einen Vβ4⁺ TCR (*T-cell Receptor*) tragen. Die stimulierten T-Lymphozyten supprimieren die Reaktivierung des Virus aus der Latenz. M1 unterstützt somit indirekt die latente Infektion, und zeigt eine immunmodulatorische Rolle (Evans et al. 2008).

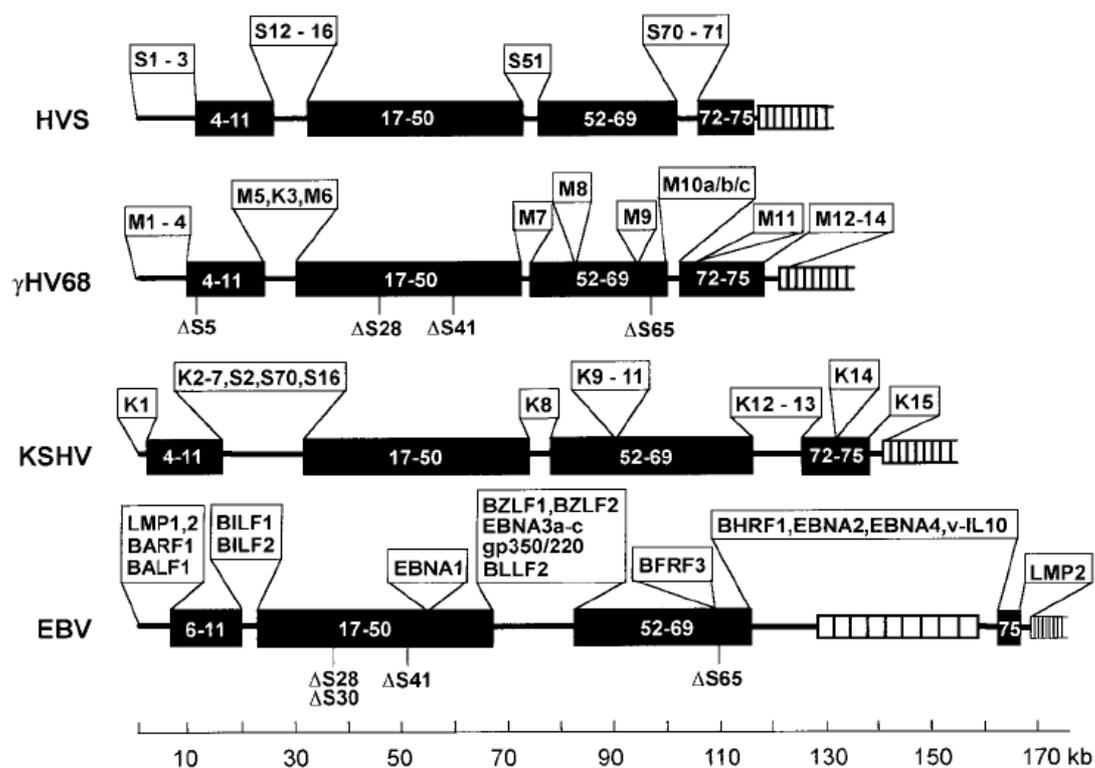


Abb. 1.2 : Schematische Darstellung der Genomorganisation von MHV-68 im Vergleich zu weiteren γ -Herpesviren. Die Gammaherpesviren zeigen untereinander konservierte Blöcke von Genen, die hier in schwarz gekennzeichnet sind. Zusätzlich verfügen sie über ORF's, die homolog zu zellulären Genen sind sowie viruspezifische Gene (M1 – M14 bei MHV-68). Die schraffierten Blöcke am rechten Genomende stellen die an beiden Enden vorhandenen terminalen Wiederholungssequenzen dar (*Virgin et al. 1997*).

M2 liegt ebenfalls in der Region der tRNA-ähnlichen Sequenzen am linken Genom-Ende und gehört zu den Latenz-assoziierten Genen von MHV-68 (Virgin et al. 1999). M2 beinhaltet ein CD8⁺ T-Zell Epitop, welches aktiv vom Immunsystem erkannt wird (Husain et al. 1999). Untersuchungen mit einem rekombinanten MHV-68, bei dem M2 mutiert ist, zeigten keinerlei Veränderungen der Replikation *in vitro* und der lytischen Replikation *in vivo* im Vergleich zum Wildtyp. Jedoch ist die Latenzetablierung *in vivo* gestört und die Anzahl der latent infizierten B-Lymphozyten stark erniedrigt (Jacoby et al. 2002, Macrae et al. 2003). Zurückzuführen ist dies auf eine weniger effiziente Besiedlung der Lymphfollikel in der Milz, nach Infektion mit dem rekombinanten Virus (Simas et al. 2004). Die Reaktivierung aus der Latenz ist ebenfalls beeinträchtigt (Herskowitz et al. 2005). Es wird angenommen, dass M2 zur Expansion und Differenzierung von latent mit MHV-68 infizierten B-Lymphozyten beiträgt. Der M3 Locus von MHV-68 liegt außerhalb der Region der tRNA-ähnlichen Sequenzen. Mit M2, M9 und M14 gehört M3 zu den ORFs, deren Gene von links nach rechts transkribiert werden (Abb. 1). M3 wurde als erstes der Latenz-assoziierten Gene von MHV-68 beschrieben (Simas et al. 1999) und kodiert für ein 44 kDa großes Protein, welches in den Zellkulturüberstand sezerniert wird (van Berkel et al. 1999). Es erfüllt die Rolle eines Chemokin-Rezeptors, indem es selektiv CC-Chemokine bindet (van Berkel et al. 2000). Ein rekombinantes Virus, dem der M3 Locus fehlt, zeigt im Vergleich zum Wildtyp-Virus eine stark erniedrigte Viruslast während der Latenzphase (Bridgeman et al. 2001). M3 leistet somit seinen Beitrag zur Etablierung und Aufrechterhaltung der Latenz in mit MHV-68 infizierten Zellen. Der MHV-68 spezifische Leserahmen M4 scheint ebenfalls zur Etablierung der latenten Infektionsphase beizutragen, ein funktionelles Protein konnte bis jetzt noch nicht detektiert werden (Geere et al. 2006).

Von den weiteren virusspezifischen ORF sind bisher M6, M7 und M11 näher beschrieben worden. M6 wurde bis jetzt als nicht kodierende Region beschrieben. Einhergehend dazu wurde gezeigt, dass sich die Parameter der Latenz nach Infektion mit einem rekombinanten MHV-68, bei dem M6 mutiert wurde, nicht verändern (Nash et al. 2001, Thakur et al. 2007). M7 kodiert für das virale Glykoprotein gp150, welches in der Membran des Virions verankert ist (Stewart et al. 1996). gp150 scheint an der viralen Pathogenese *in vivo* beteiligt zu sein. Ob und wie gp150 bei der Etablierung der Latenz eine Rolle spielt, ist kontrovers (Stewart et al. 2004, de Lima et al. 2004a). Rekombinante Viren, denen Teile von gp150 fehlen, zeigen ein Defekt in der Freisetzung der Virionen aus der Wirtszelle. Somit scheint es eine wichtige Rolle bei der Übertragung von einer infizierten Zelle zur Nachbarzelle zu haben.

M8 formt mit ORF 57 eine Spleißvariante, welche für ein IE Protein kodiert. ORF 57 zeigt

eine Sequenzhomologie zu dem Mta Protein von EBV, welches eine Rolle spielt während der Prozessierung und des Transports der viralen RNA Molekül. ORF 57 fehlt ein ATG Codon, um die Translation dieses Proteins zu initiieren. M8 verfügt über ein Startcodon und es konnte gezeigt werden, dass M8 als 5'Exon in einer Spleißvariante mit ORF 57 fungiert (Mackett et al. 1997, Marques et al. 2003).

Die Sequenz des virusspezifischen ORF M9 zeigt eine Homologie zum ORF 65 von KSHV und Herpesvirus saimiri (HVS). ORF 65 kodiert in beiden Fällen für ein Kapsid-Protein (Virgin et al. 1997, Nash et al. 2001).

Weiterhin wurde die Rolle des virusspezifischen ORF M11 untersucht. Es kodiert für ein virales Protein, das zum zellulären Bcl-2 homolog ist. Bcl-2 ist ein Protein, welches eine anti-apoptotische Funktion hat. Im Kontext einer MHV-68 Infektion *in vitro* inhibiert M11 die Apoptose, *in vivo* ist M11 essentiell für die Reaktivierung aus der Latenz (Gangappa et al. 2002). De Lima et al. konnten feststellen, dass nicht nur die Reaktivierungsfrequenz durch M11 aufrechterhalten wird, sondern auch die Entstehung der Latenz stark von M11 beeinflusst wird (de Lima et al. 2004b).

Für die weiteren MHV-68 spezifischen ORFs M5, M10, M12, M13 und M14 sind bislang keine Funktionen bekannt, sie wurden als Regionen beschrieben, die möglicherweise nicht für virale Proteine kodieren (Nash et al. 2001).

Replikationszyklus von MHV-68 in vitro

Die Replikation der viralen DNA erfolgt nach dem so genannten „rolling-circle“ Prinzip. Als Startpunkt dient hierbei ein Replikationsursprung (OriLyt), welcher im MHV-68 Genom zwischen Position 100.723 und 101.974 liegt, wobei der essentielle Teil des OriLyt die Region von 101.248 – 101.974 umfasst. Verpackungssignale in den terminalen Wiederholungssequenzen des Genoms sorgen dafür, dass das Genom in das Kapsid verpackt wird und letztendlich reife virale Partikel entstehen, welche aus der Zelle austreten, diese durch Lyse (CPE) zerstören und benachbarte Zellen infizieren (Deng et al 2004.). Bei KSHV fanden sich in Untersuchungen zwei funktionale Replikationsursprünge (AuCoin et al. 2002), und 2007 konnte in unserem Labor eine Region am linken Genomende von MHV-68 charakterisiert werden, die einen zweiten OriLyt trägt (Adler et al. 2007).

Replikationszyklus von MHV-68 in vivo

Die natürliche Infektionsroute von MHV-68 ist bislang unbekannt. Die Intranasale Infektion von Labormäusen mit MVH-68 führt zu einer produktiven Infektion der alveolären Epithelzellen in der Lunge (Sunil-Chandra et al. 1992a). Die akute Replikation in der Lunge zeigt ihren Höhepunkt 5 – 8 Tage nach Infektion (p.i. – *post infection*), dann fallen die Titer ab und 15 Tage p.i. ist das Virus durch CD8⁺ T-Lymphozyten und Makrophagen beseitigt (Ehtisham et al. 1993, Weck et al. 1996). Von der Lunge gelangt das Virus in die mediastinalen Lymphknoten, wo es Dendritische Zellen, Makrophagen und B-Lymphozyten latent infiziert. Zum größten Teil in B-Lymphozyten wird das Virus in weitere lymphatische Organe transportiert (Nash et al. 2001). In der Milz kommt es 14 bis 18 Tage p.i. zu einer rapiden Proliferation von latent infizierten B-Lymphozyten sowie zirkulierenden T-Lymphozyten, welche zu einer vorübergehenden Vergrößerung der Milz führt. Das Ausmaß dieser Splenomegalie ist abhängig von den CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten und bleibt bis etwa 30 Tage p.i. bestehen (Sunil-Chandra et al. 1992b, Usherwood et al. 1996a). Das Virus verbleibt lebenslang latent in den B-Lymphozyten. Weitere Reservoirs der Latenz sind Makrophagen, Dendritische Zellen und Epithelzellen der Lunge (Flano et al. 2000, Stewart et al. 1998). Die Etablierung der Latenz ist unabhängig von der Dosis und der Route, mit der die Mäuse infiziert werden (Tibbetts et al. 2003).

Klinische Erscheinungsbilder nach Infektion mit MHV-68

Die Pathogenese nach Infektion mit MHV-68 ähnelt in vielerlei Hinsicht dem Krankheitsverlauf nach Infektion mit anderen γ -Herpesviren, wie z.B. EBV, und unterstreicht dessen Bedeutung als Modellsystem für die humanpathogenen Erreger.

Adulte Mäuse, die mit MHV-68 infiziert werden, zeigen eine interstitielle Lungenentzündung, Vaskulitis und eine der infektiösen Mononukleose ähnliche Symptomatik mit Splenomegalie, polyklonaler B-Zell-Aktivierung und CD8⁺ T-Zell Lymphozytose (Ehtisham et al. 1993; Sunil-Chandra et al. 1992a; Usherwood et al. 1996a, Tripp und Blackman 1997). Mäuse, die chronisch mit MHV-68 infiziert sind, können lymphoproliferative Erkrankungen entwickeln. Aus einem Tumor einer mit MHV-68 infizierten Maus konnte eine B-Zelllinie (S11) isoliert

werden, in der das virale Genom in latenter Form vorliegt (Usherwood et al. 1996b). Bei 10% von mit MHV-68 infizierten Mäusen entstanden nach einer Inkubationsdauer von über neun Monaten Tumore in lymphatischen und nicht-lymphatischen Geweben (Sunil-Chandra et al. 1994).

Latenz und Reaktivierung von MHV-68

Während der Etablierung und Aufrechterhaltung der Latenz wird die virale Genexpression auf ein Minimum beschränkt (Virgin et al. 1999c). Die Latenz-Assoziierten Gene sind für die erfolgreiche Replikation des viralen Episoms wichtig, und sie sind in der Lage, die antivirale Immunantwort des Wirtes zu verhindern. Bislang ist nur wenig bekannt über die viralen Mechanismen die helfen, die Latenz aufrechtzuerhalten und über die Signale, die zu einer Reaktivierung des Virus aus der Latenz führen. Verschiedene Immunmechanismen, wie T-Lymphozyten und Antikörper, kontrollieren das Virus in dieser Phase, um eine Reaktivierung zu verhindern (Stevenson et al. 1999, Christensen et al. 1999, Nash et al. 1994). *In vitro* Studien mit EBV in latent infizierten B-Lymphozyten konnten zeigen, dass zwei virale Proteine, ZEBRA (oder Zta) und Rta den lytischen Replikationszyklus aktivieren (Lieberman et al. 1990, Ragozy et al. 1998). KSHV kodiert für ein Homolog von Rta, welches in der Lage ist die Expression von lytischen Genen in latent infizierten B-Lymphozyten zu induzieren (Lukac et al. 1998, Sun et al. 1998). Rta scheint hoch konserviert zu sein innerhalb der Unterfamilie der γ -Herpesviren, und wurde auch in MHV-68 identifiziert. ORF50 kodiert für ein Rta Homolog (Mackett et al. 1997). Wu et al. konnten 2000 bestätigen, dass das MHV-68 Rta nach Infektion als eines der IE Gene exprimiert wird und die lytische Replikationsphase in der latent infizierten B-Zell Lymphoma Linie S11 einleiten kann. Die viralen Proteine werden translatiert, die virale DNA repliziert und infektiöse Viruspartikel entstehen. Weitere Untersuchungen zeigten, dass Rta essentiell für die Replikation *in vitro* ist (Liu et al. 2000, Pavlova et al. 2003). Ein Zta Homolog in MHV-68 wurde bislang nicht identifiziert.

1.4 Die 100 bp Wiederholungssequenz und die M10 Region im Genom von MHV-68

Wie bereits erwähnt, finden sich im Genom von MHV-68 zwei interne Wiederholungssequenzen (Abb. 1). Eine 40 bp Sequenz aus 36 Kopien zwischen Position 26.778 und 28.191 sowie ein Fragment mit 21 Kopien eines 100mers zwischen Position 98.981 und 101.170 des Genoms. (Virgin *et al.* 1997). Welche Rolle diese Strukturen bei der Pathogenese *in vivo* spielen ist bislang noch nicht genau bekannt. Das 40 bp repeat scheint eine wichtige Rolle bei der Amplifikation der Latenz und der Regulation der viralen Genexpression zu spielen (Thakur *et al.* 2007). Es beinhaltet zusätzlich einen Teil eines zweiten Replikationsursprunges (OriLyt) von MHV-68 (Adler *et al.* 2007).

Der MHV-68-spezifische Leserahmen M10 schließt die 100 bp Wiederholungssequenz sowie einen Teil des Replikationsursprunges (OriLyt) von MHV-68 (Abb. 3) mit ein. Der M10 Locus besteht aus den drei sich überlappenden ORF's M10a, b und c, welche sich zwar repetitive Sequenzen teilen, aber jeweils eigene Carboxyl-Termini besitzen (Virgin *et al.* 1997). Von M10a ist weiterhin bekannt, dass es im Gegensatz zu M10b und c für eine spezifische N-terminale Sequenz kodiert. Computeranalysen zeigen, dass es sich hierbei um eine Transmembrandomäne handeln könnte. M10a könnte demnach eventuell für ein Typ-II-Transmembran-Protein kodieren.

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten Transkripte aus dieser Region nachweisen. Ahn *et al.* untersuchten 2002 die lytische Genexpression der MHV-68 ORFs mittels Microarray-Technologie. NIH3T3 Zellen wurden mit MHV-68 infiziert und an verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion wurde die RNA isoliert und in den cDNA-Array eingesetzt (Ahn *et al.* 2002). Die Expressionsverläufe der einzelnen viralen Gene wurden protokolliert und eine Kinetik erstellt. Auf dem Array wurden auch die MHV-68 spezifischen Gene mitgeführt, die nach bisherigem Stand für kein Protein kodieren, wie M5, M6, M10 und M12. Aus dem M10 Leserahmen wurde M10c untersucht. Zum Zeitpunkt 0, 1 und 3 p.i. zeigte sich keine Genexpression von M10c. 5 und 8 h p.i. konnten Signale detektiert werden, ebenso 12 und 18 h p.i, wobei die Expression zu den späteren Zeitpunkten etwas abnahm. Für M5 und M12 wurden sehr schwache Signale entdeckt. Die Expression von M6 hingegen lag auf einer ähnlichen Höhe wie die von M10c. Ahn *et al.* mutmaßten deshalb, dass M6 und M10c für Proteine kodieren könnten, für M5 und M12 sei das eher unwahrscheinlich. Die Arbeitsgruppe um Ebrahimi *et al.* wiesen mit Hilfe einer Kombination aus einem MHV-68 spezifischen Microarray und RT-PCR Transkripte für die Leserahmen M10a, M10b und

M10c nach (Ebrahimi et al. 2003). Weiterhin konnten sie die Kinetik der Genexpression näher bestimmen. C127 Zellen wurden mit MHV-68 infiziert und 2, 4 und 8 h p.i. auf die Expression der viralen Gene untersucht. Der M10 ORF wurde daraufhin in die Gruppe der E und L Gene eingeordnet. Die Überlappung der drei Leserahmen von M10 in der G+C-reichen 100 bp Wiederholungssequenz erschwert allerdings viele Untersuchungen, wie z.B. die Amplifikation von M10 mittels PCR (Virgin et al. 1999c, Martinez-Guzman et al. 2003, Moorman et al. 2004). Unklar bleibt weiterhin, ob die M10-Gene als funktionelle Proteine exprimiert werden.

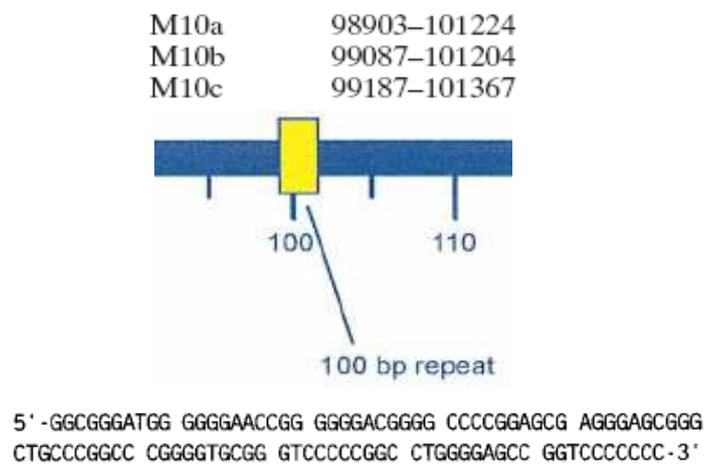


Abb. 1.3: Sequenz des 100 bp „repeats“ im MHV-68 Genom. Die 100 bp Region besteht aus 21 Kopien einer sich wiederholenden Sequenz und einer Kopie einer unvollständigen Sequenz. Gezeigt ist hier eine intakte 100 bp Sequenz. Das Repeat überspannt den Bereich von Nukleotid 98.981 – 101.170, und macht einen großen Teil des M10 Locus aus (Virgin et al. 1997).

Sanchez et al. konnten 2008 zeigen, dass das 100 bp „repeat“ als PAMP (*pathogen-associated molecular pattern*) dient. Die spezifische Struktur der viralen DNA in dieser Region ist ein Ligand für die Induktion von Typ 1 - Interferon. Durch Transposon Insertionen wurden BAC MHV-68 Mutanten erzeugt und deren Wachstumseigenschaften in MEF Zellen untersucht. Nach Transposon Insertionen an Position 100952 sowie 101278 im MHV-68 Genom konnte keine produktive Infektion nachgewiesen werden. Die BAC-Mutanten wurden in BHK-21 Zellen transfiziert. Das Auftreten von CPE wurde überprüft, ebenso die viralen Titer mittels

Plaqueassay. Im Gegensatz zum Wildtyp BAC konnte nach Transfektion mit den Mutanten keine Replikation nachgewiesen werden.

1.5 Das Kaposi Sarkom-assoziierte Herpesvirus (KSHV)

KSHV (humanes Herpesvirus 8) wurde 1994 in einem Kaposi Sarkom eines AIDS Patienten identifiziert (Chang et al. 1994). KSHV Sequenzen finden sich auch in weiteren lymphoproliferativen Tumorerkrankungen, wie PEL und MCD, und sind mit deren Ätiologie assoziiert (Cesarmen et al. 1995, Soulier et al. 1995). Die komplette Sequenz von KSHV wurde 1996 aufgeklärt (Russo et al. 1996). Wie bei den anderen Vertretern der γ -Herpesviren besteht das etwa 165 kb große ds DNA Genom aus einer einmaligen Region, welche 5 interne Repeats beinhaltet und von terminalen Wiederholungssequenzen flankiert wird (Abb. 4). Das KSHV Genom kodiert für über 80 Gene, u.a. finden sich KSHV-spezifische Gene, bezeichnet mit K1 bis K15 (Renne et al. 1996, Järviluoma und Ojala 2006). KSHV besitzt wie MHV-68 und EBV zwei Replikationsursprünge (Adler et al. 2007, Schepers et al. 2003, Nicholas et al. 1998). Der Replikationszyklus von KSHV ist dem der anderen Herpesviren gleich, es durchläuft eine lytische und latente Phase (Jenner et al. 2001). Die Latenz etabliert sich hierbei vor allem in Endothelzellen und B-Lymphocyten.

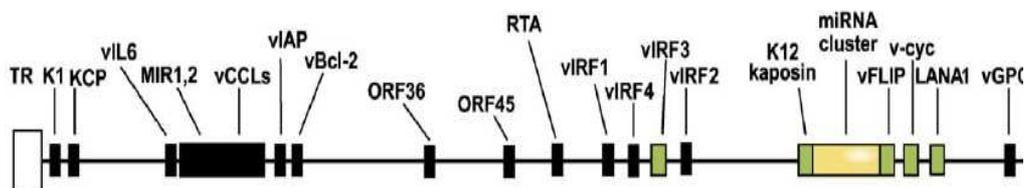


Abb. 1.4 : Schematischer Aufbau des KSHV Genoms. Das Genom besteht aus einer etwa 145 kb langen einzigartigen Region, welche von zwei etwa 800 bp großen terminalen Wiederholungssequenzen (weiße Boxen) flankiert wird. Das Genom kodiert für 81 Gene, die Homologien zu anderen herpesviralen Genen, sowie zu zellulären Genen besitzen. Weiterhin kodiert es für 15 virusspezifische ORFs, bezeichnet mit dem Präfix K. Einige der Latenz-Assoziierten Gene sind gezeigt (grüne Boxen), ebenso wie einige lytische Gene (schwarz). Mit gelb markiert ist die Region, in der die viralen miRNAs identifiziert wurden (Järviluoma and Ojala 2006).

Welche molekularen Mechanismen von KSHV zur Entstehung der lymphoproliferativen Erkrankungen beitragen, und welche sekundären Faktoren bei der Transformation der Zellen eine Rolle spielen, ist bislang noch nicht komplett aufgeklärt. Untersuchungen der Biologie von KSHV sind bisher beschränkt auf latent infizierte Zellkulturen von PEL Patienten, neu entwickelte Systeme mit Endothelzelllinien sollen dies ändern (Lagunoff et al. 2002).

1.6 Die K12 Region von KSHV

Einer der virusspezifischen Leserahmen von KSHV ist K12. K12 ist an derselben Stelle im Genom lokalisiert wie M10 von MHV-68 (Abb. 2). K12 wird zu jenen Genen von KSHV gezählt, welche während der Latenzphase exprimiert werden (Sadler et al. 1999). K12 wurde in aktivierten Endothelzellen (den so genannten Spindelzellen) nahezu aller Kaposi Sarkome, wie auch in den Zellen der PELs identifiziert (Sturzl et al. 1997). Der Leserahmen von K12 findet sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Wiederholungssequenzen D1 und D2 (Abb. 5), er kodiert für drei verschiedene Proteine, Kaposin A – C (Li et al. 2002). Die Transkripte unterscheiden sich in ihrer molekularen Größe, wobei das hydrophobe Protein Kaposin A mit 6 kD das kleinste ist. Kaposin B und C zeigen jeweils Isoformen, welche Teile von D1 und D2 beinhalten (Sadler et al. 1999, Kliche et al. 2001). Die Funktionen der einzelnen ORFs sind unvollständig aufgeklärt. Für das Typ-II-Transmembranprotein Kaposin A wurden transformierende Eigenschaften in Rat 3, Jurkat und NIH3T3 Zellen beschrieben, ebenso onkogenes Potential *in vivo* (Muralidhar et al. 2000, Tomkowicz et al. 2002). Die transformierenden Effekte kommen durch die direkte Bindung an das zelluläre Cytohesin-1, einen Regulator der Integrin vermittelten Zelladhäsion, zustande (Kliche et al. 2001).

Kaposin B bindet an die MAPK-assoziierte Protein Kinase 2 (MK2), und verstärkt deren Aktivität (McCormick et al. 2005). Kaposin B trägt indirekt über die Aktivierung von MAPK-MK2 zur Stabilisierung von cytoplasmatischen mRNAs bei. In Folge kommt es zu einer vermehrten Ausschüttung von proinflammatorischen Cytokinen und zur Transkription von Wachstumsfaktoren (McCormick et al. 2006). Die molekularen Eigenschaften des Kaposin C sind bislang nicht näher untersucht. Zwischen der K12 Region und ORF 71 wurden die ersten 12 miRNAs von KSHV identifiziert, deren Funktion noch nicht bekannt ist (Pfeffer et al. 2005).

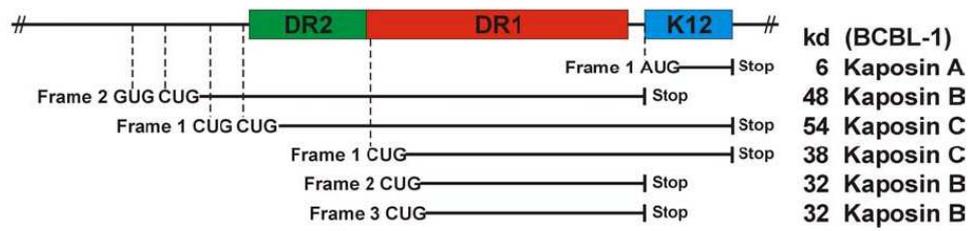


Abb. 1.5 : Die K12 Region des Kaposi Sarkom-assoziierten Herpesvirus. Dargestellt ist der K12 Leserahmen (blau unterlegt) sowie die internen Wiederholungssequenzen D1 (rot) und D2 (grün). Gezeigt sind ebenfalls die einzelnen Translationsprodukte des Kaposin Gens mit Initiationsstartpunkt und Stop-Codon. kD steht für das molekulare Gewicht der Produkte. (Ege A. 2004)

ZIELSETZUNG

Für einige der virusspezifischen Gene des murinen Gammaherpesvirus 68 (MHV-68) sind die biologischen Funktionen bislang nicht bekannt. Einer dieser Leserahmen ist M10 a-c. Ziel dieser Arbeit war es deshalb, den M10 Leserahmen von MHV-68 näher zu untersuchen. Dazu sollte ein rekombinantes Virus, welches ein M10 Fusionsprotein trägt, hergestellt werden. Nach Infektion verschiedener Zelltypen sollten die Lysate und Zellkulturüberstände zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion in Western Blots untersucht werden, um ein potentiell M10 Protein zu detektieren. Nach erfolgreicher Detektion sollte das Protein isoliert werden und in weiteren Experimenten hinsichtlich seiner Lokalisation innerhalb der Zelle, der Interaktion mit anderen Proteinen etc., charakterisiert werden.

Daneben sollten, zusätzlich zu bereits vorliegenden Mutanten, weitere rekombinante Viren mit Hilfe der BAC-Technologie generiert werden, welche eine Deletion in der M10-Region tragen. Das Replikationsverhalten dieser Viren *in vitro* sollte untersucht und mit dem Wachstum des parentalen Virus verglichen werden. Die rekombinanten M10 Viren sollten ebenfalls *in vivo* eingesetzt werden, um den Einfluss der Mutationen auf den Infektionsverlauf in C57BL/6 Mäusen zu untersuchen. Im Vergleich zum parentalen Virus sollten die viralen Titer in der Lunge sowie die Splenomegalie, Reaktivierungsfrequenz und die Viruslast in der Milz nach intranasaler und intraperitonealer Infektion bestimmt werden. Die Ergebnisse der *in vivo* Studien sollten einen Hinweis auf die Rolle der M10 Region von MHV-68 geben.

Da in den rekombinanten Viren neben der M10 Region auch eine der internen Wiederholungssequenzen (100 bp Struktur) sowie einer der lytischen Replikationsursprünge (OriLyt) von MHV-68 von der Mutation betroffen sind, sollte auch die Rolle dieser Elemente im Zuge einer MHV-68 Infektion untersucht werden.

Weiterhin sollte herausgefunden werden, ob die positional homologe K12 Region von KSHV und die M10 Region von MHV-68 funktionelle Eigenschaften teilen. Hierzu sollte der K12 Locus in die viralen M10 Deletionsmutanten inseriert werden. Die K12 Mutanten sollten dann *in vivo* eingesetzt und ihr Phänotyp bestimmt werden. Dem Genprodukt der K12 Region, Kaposin, werden onkogene Eigenschaften zugeschrieben. Weitere Experimente sollten zeigen, ob die Expression von K12 im Kontext einer MHV-68 Infektion zur Entstehung von Tumoren in C57BL/6 Mäusen führt.

2. MATERIAL UND METHODEN

MATERIAL

2.1 Viren

MHV-68-D8J3	Murines Gammaherpesvirus 68, rekonstituiert aus dem als BAC klonierten MHV-68 (Adler et al. 2001)
MHV-68- Δ M10 Δ Tet	rekombinantes MHV-68, trägt eine Deletion an Position 98.904 – 101.371
MHV-68-M10.Rev	rekombinantes MHV-68 in dem die Wildtyp Eigenschaften (MHV-68-D8J3) wiederhergestellt sind (Revertante zu Δ M10 Δ Tet)
MHV-68-M10.Del	rekombinantes MHV-68, trägt eine Deletion an Position 98.981 – 101.170
MHV-68- Δ 201nt	rekombinantes MHV-68, trägt eine Deletion an Position 101.530 – 101.731
MHV-68-K12 ektop in M10.Del	rekombinantes M10.Del Virus, in dem die K12 Region (Position 117.919 - 118.701) ektop im MHV-68 Genom eingesetzt wurde
MHV-68-K12 in M10.Del	rekombinantes M10.Del Virus, in dem die K12 Region (Position 117.919 - 118.701) in die Deletion eingesetzt wurde
MHV-68-K12 ektop in Δ M10 Δ Tet	rekombinantes Δ M10 Δ Tet Virus, in dem die K12 Region (Position 117.919 - 118.701) ektop im MHV-68 Genom eingesetzt wurde
MHV-68-M10aHAtag Tet ⁺	rekombinantes MHV-68 Virus, an dem die Sequenz des HA an den Leserahmen von M10a angehängt wurde
MHV-68-OriLytektop in Δ M10 Δ Tet	rekombinantes Δ M10 Δ Tet Virus, in welchem ein Fragment des Replikationsursprunges (OriLyt) ektop im MHV-68 Genom eingesetzt wurde

2.2 Eukaryontische Zellen

BHK-21:	Baby Hamsternieren-Fibroblasten (ATCC CCL-10)
NIH3T3:	Swiss-Mausembryo-Fibroblasten (ATCC CRL-1658)
REF/Cre:	Rattenembryo-Fibroblasten, stabil transfiziert mit Cre-Rekombinase
HEK293:	Humane Embryonale Nierenzellen
MEF	Mausembryo-Fibroblasten
Ag8	Maus B-Zelllinie (ATCC CRL-1580)

2.3 Bakterien

<i>E. coli</i> DH10B	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) F80 <i>lacZ</i> Δ M15 <i>lacX74 recA1 endA1 ara</i> Δ 139 Δ (<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU galK</i> Δ - <i>rpsL</i> (StrR) <i>nupG</i>
<i>E.coli</i> DH5a	<i>fhuA2</i> Δ (<i>argF-lacZ</i>)U169 <i>phoA glnV44</i> Φ 80 Δ (<i>lacZ</i>)M15 <i>gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>

2.4 Mäuse

C57BL/6 Wildtyp	Charles River Laboratorium (<i>Sulzfeld</i>)
-----------------	--

2.5 Plasmide

pUC19	„high copy“ <i>E. coli</i> plasmid
MHV-68 BAC	MHV-68 als BAC kloniert (Adler <i>et al.</i> 2003)
pST76 K-SR	Shuttle Plasmid mit <i>recA</i> Genprodukt für Mutagenese

pST76K-SR-M2 (<i>pST76K-SR-M1-NCR-M2</i>)	Shuttle Plasmid für Mutagenese, mit Homologien zum MHV-68 Genom (Position 2406-6261: M1, M2 und nicht-kodierende Regionen)
pCP20	FLP (Flip Rekombinase) Expressionsplasmid
pkD46	<i>E. coli</i> Plasmid mit <i>recA1</i> Gen
pCR3	Expressionsvektor mit Ampicillin Resistenzgen (Invitrogen)

2.6 Nährmedien für die Zellkultur

Ag8-Medium	Dulbeccos-MEM 10 % FKS (bei 56°C hitzeinaktiviert) 1 % Penicillin/Streptomycin 50 µM β-Mercaptoethanol
BHK-21-Medium	Glasgow-MEM 5 % FKS (bei 56°C hitzeinaktiviert) 5 % TPB 1 % Penicillin/Streptomycin
Einfriermedium	90 % FKS (bei 56°C hitzeinaktiviert) 10 % DMSO
HEK293-Medium	Dulbeccos-MEM 10 % FKS (bei 56°C hitzeinaktiviert) 1 % Penicillin/Streptomycin 1 % L-Glutamin
MEF-Medium	Dulbeccos-MEM 10 % FKS (bei 56°C hitzeinaktiviert) 1 % Penicillin/Streptomycin 1 % L-Glutamin
NIH3T3-Medium	Dulbeccos-MEM 10 % FKS (bei 56°C hitzeinaktiviert) 1 % Penicillin/Streptomycin 1 % L-Glutamin

REF/Cre-Medium	Dulbeccos-MEM 10% FKS (bei 56°C hitzeinaktiviert) 1% Penicillin/Streptomycin 1% L-Glutamin 1 % G418
----------------	---

2.7 Nährmedien für Bakterien

Einfriermedium	50%ige Glycerinlösung
LB-Agar	LB-Medium mit 1,5 % Agar
LB-Medium	1 % Caseinextrakt 0,5 % Yeast Extrakt 0,5 % NaCl 0,1 % Glukose pH 7,0
LB-Agar bzw. LB-Medium	
+Amp	100 µg/ml
+Cam	13,6 µg/ml
+Kan	50 µg/ml
+Tet	10µg/ml

2.8 Antibiotika

Ampicillin (Amp)	Serva (<i>Heidelberg</i>)
Chloramphenicol (Cam)	Appligene Oncor (<i>Frankreich</i>)
Kanamyzin (Kan)	Piogene (<i>Cambridge</i>)
Penicillin (Pen)	Cambrex, BioWhittaker (<i>Verviers,Belgien</i>)
Streptomycin (Strep)	Gibco/BRL (<i>Eggenstein</i>)
Tetrazyklin (Tet)	Appligene Oncor (<i>Frankreich</i>)

M10aHA.rev
5' TGT GTT TTT CTT AAC CGA GGT TAT ATA
TAG ACC CTG ATT TCT GTG GGG GCC ACA GGA
AAC AGC TAT GAC CAT GA 3'

Überprüfung der Viruslast in infizierten Splenozyten

L8.for 5' CAG TGA ATA TCG GCA ATG TTT TG 3'

L8.rev 5' TTC ACT CGA GTC TTC TTG GTC TC 3'

L8. Sonde 5' Fam ACC ACC AGC ACA TTG GCA AAC C –
Tamra-3'

gB.for (ORF8) 5' GGC CCA AAT TCA ATT TGC CT 3'

gB.rev (ORF8) 5' CCC TGG ACA ACT CCT CAA GC 3'

gB. Sonde 5' ACA AGC TGA CCA CCA GCG TCA ACA AC-
Tamra-3'

2.12 Chemikalien und Reagenzien

1 kb DNA-Größenstandard	Invitrogen (<i>Karlsruhe</i>)
100 bp DNA-Größenstandard Gene Ruler	Fermentas (<i>St.Leon-Rot</i>)
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (<i>München</i>)
Agarose	Gibco/BRL (<i>Eggenstein</i>)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck (<i>Darmstadt</i>)
Bacto Agar	Difco Laboratories (<i>Detroit, USA</i>)
Borsäure	Roth (<i>Karlsruhe</i>)
Bromphenolblau	Serva (<i>Heidelberg</i>)
Carboxymethylzellulose	Sigma-Aldrich (<i>München</i>)
Chloroform	Merck (<i>Darmstadt</i>)
D(+)-Glucose	Merck (<i>Darmstadt</i>)

Desoxyribonukleotide	Roche (<i>Mannheim</i>)
DMSO	Merck (<i>Darmstadt</i>)
dNTP	Roche
Dulbeccos-MEM High Glucose	Cell Concepts GmbH (<i>Umkirch</i>)
EDTA	Sigma-Aldrich (<i>München</i>)
Ethanol	Merck (<i>Darmstadt</i>)
Ethidiumbromid	Serva (<i>Heidelberg</i>)
FBS (<i>Fetales Bovines Serum</i>)	PAN Biotech (<i>Aidenbach</i>)
Formaldehyd	Merck (<i>Darmstadt</i>)
FuGENE® HD Transfektionsreagenz	Roche (<i>Mannheim</i>)
G418	Calbiochem (<i>Schwalbach</i>)
Glyzerin	Roth (<i>Karlsruhe</i>)
Glasgow MEM	Biochrom KG (<i>Berlin</i>)
Hepes	ICN Biomedicals (<i>Ohio</i>)
Isoamylalkohol	Merck (<i>Darmstadt</i>)
Isopropanol	Merck (<i>Darmstadt</i>)
Kalium-Hydrogencarbonat	Roth (<i>Karlsruhe</i>)
Kalziumchlorid	Roth (<i>Karlsruhe</i>)
Kristallviolett	Merck (<i>Darmstadt</i>)
L-Glutamin	Serva (<i>Heidelberg</i>)
Magermilchpulver	Töpfer (<i>Dietmannsried</i>)
Magnesiumchlorid	Invitrogen (<i>Karlsruhe</i>)
Natriumacetat	Merck (<i>Darmstadt</i>)
Natriumbicarbonat	Merck (<i>Darmstadt</i>)
Natriumchlorid	Merck (<i>Darmstadt</i>)
NaOH	Merck (<i>Darmstadt</i>)
N,N'-Bisacrylamid	Serva (<i>Heidelberg</i>)
Phenol/Chloroform	Roth (<i>Karlsruhe</i>)
Protein G Sepharose	Amersham Bioscience (<i>Freiburg</i>)
Protein-Größenstandard Rainbow Marker	Amersham Bioscience (<i>Freiburg</i>)
RPMI 1640 (1x)	Biochrom KG (<i>Berlin</i>)
SDS	Serva (<i>Heidelberg</i>)
Sucrose	Roth (<i>Karlsruhe</i>)
TEMED	Bio-Rad (<i>München</i>)

Tris	Roth (<i>Karlsruhe</i>)
Trypanblau	Biochrom KG (<i>Berlin</i>)
Trypsin-EDTA	Biochrom KG (<i>Berlin</i>)
Tryptose Phosphate Broth	Biochrom KG (<i>Berlin</i>)
Tween 20	Sigma-Aldrich (<i>München</i>)
Yeast Extract	Gibco/BRL (<i>Eggenstein</i>)

2.13 Puffer und Lösungen

2x SB Puffer für <i>Western Blot</i>	10 % Glyzerin 62,5 mM Tris/HCL, pH 6.8 2 % SDS 0,01 mg/ml Bromphenolblau 5 % Ethanethiol
20x SSC Puffer für <i>Southern Blot</i>	3 M NaCl 0,3 M Na-Citrat-Dihydrat
DIG1 für <i>Southern Blot</i>	100 mM Tris/HCl pH 7,5 150 mM NaCl
DIG2 für <i>Southern Blot</i>	DIG1 + 1 % Blockierungslösung
DIG3 für <i>Southern Blot</i>	0,1 M Tris/HCl pH 9,5 0,1 M NaCl
DNA-Probenpuffer (5x)	50 % TE 50 % Glyzerin 0,04 % Bromphenolblau
Erythrozyten-Lysepuffer pH 7,2	0,15 M NH ₄ Cl 10 mM KHCO ₃ 0,1 mM Na ₂ EDTA
Essigsäure	4%ig mit ddH ₂ O
Ketamin/Xylazin	50/15 mg/kg Körpergewicht 2 V Ketamin 1 V Xylazin 9 V Aqua ad.inj.
Kristallviolett-Färbelösung	10% Formaldehyd in PBS 1% Kristallviolett

Overlay-Medium	10x BHK-Medium 0,75% Carboxymethylzellulose 5% FBS 5% TPB 1% Pen/Strep 2 mM L-Glutamin 33 mM NaHCO ₃
<i>Plasmidisolierung (Mini-Präparation)</i>	
Lösung 1 pH 8,0	50 mM Glucose 10 mM EDTA 10 mM Tris 2mg/ml Lysozym
Lösung 2	0,2 M NaOH 1 % SDS
Lösung 3 pH 4,8	3 M Natriumacetat
PBS-Puffer pH 7,4	0,14 M NaCl 2,7 mM KCl 3,2 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄
4% Sammelgel	4% Acrylamid 1x Sammelgelpuffer 0,1% APS 0,1% TEMED
4x Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCL pH 6,8 0,4 % SDS
SDS-PAGE-Laufpuffer (10x) pH 8,3	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % SDS
SDS-PAGE-Probenpuffer (5x)	250 mM Tris pH 6,8 10 % SDS 0,5 % Bromphenolblau 12,5 % 2-Mercaptoethanol 20 % Glyzerin
Standard-Lysepuffer (+PIC)	20 mM Tris pH 8,0 150 mM NaCl 1 X Triton-X-100 + 1 Tablette PIC/10 ml Puffer + 100 µl Halt Phosphatase Inhibitor Cocktail/10 ml Puffer

<i>Southern Blot</i> -Blockierungslösung	10 % Blocking Reagent in DIG1
<i>Southern Blot</i> -Fixationspuffer	0,25 M HCl
<i>Southern Blot</i> -Denaturierungspuffer	0,25 M NaOH 0,75 M NaCl
<i>Southern Blot</i> -Neutralisierungspuffer	0,25 M Tris/HCl pH 7,0-7,2 0,75 M NaCl
<i>Southern Blot</i> -Hybridisierungslösung	5x SSC 1x Blockierungslösung 0,02 % SDS 0,1 % Lauroylsarcosin
<i>Southern Blot</i> -Waschlösung 1	2x SSC 0,1 % SDS
<i>Southern Blot</i> -Waschlösung 2	0,1x SSC 0,1 % SDS
TAE-Puffer pH 7,8	40 mM Tris/HCl pH 8,0 1 mM EDTA 20 mM Natriumacetat
TBE-Puffer (10x) pH 8,3	1M Tris 830 mM Borsäure 10 mM EDTA
TBS-Puffer (10x) pH 7,4	200 mM Tris 9% NaCl
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl 0,1 mM EDTA pH 8,0
12% Trenngel	12% Acrylamid 4x Trenngelpuffer 0,1% APS 0,1% TEMED
4x Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl pH 8,8 0,4% SDS
<i>Western Blot</i> -Transferpuffer pH 8,3	1x SDS-PAGE Laufpuffer 20 % Methanol
<i>Western Blot</i> -Waschpuffer	TBS-Puffer pH 7,4 0,05 % Tween 20

2.14 Kommerzielle Reaktionssätze

Amersham Miniprep Kit	Amersham (USA)
CDP-Star	Roche (Mannheim)
DIG DNA Labelling Kit	Roche (Mannheim)
DNA Ligation Kit "Mighty Mix"	TaKaRa, Lonza (Hanau)
GFX™ PCR DNA and Gel Purification Kit	GE Healthcare (USA)
Nucleobond PC 500 Maxi-Prep	Macherey-Nagel (Düren)
PCR-Master-Mix	Roche (Mannheim)
Pierce ECL (Western Blotting Substrat)	PIERCE (Bonn)
TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG	Applied Biosystems (Darmstadt)
QIAGEN® DNA Mini Kit	QIAGEN (Hilden)
QIAGEN® Plasmid Maxi Kit	QIAGEN (Hilden)
QIAGEN® RNeasy Kit	QIAGEN (Hilden)

2.15 Geräte

7300 Real Time PCR System (TaqMan®)	Applied Biosystems (Darmstadt)
Blockthermostat BT 1302 HLC	BioTech (Bovenden)
Calibra 852	Socorex (Ecublens, Schweiz)
Drucker (Video copy processor P68E)	Mitsubishi
Drehrad (Testtube Rotator)	Labinco B.V. (Niederlande)
Elektrotransformator <i>E. coli</i> Pulser	Bio-Rad (München)
ELISA Reader „Magellan“	Tecan (Schweiz)
Entwicklermaschine Cawomat 2000	CAWO GmbH (Schrobenhausen)
Feinwaage CP224 S	Sartorius (Göttingen)
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 10	Carl Zeiss (Oberkochen)
Gefrierschrank (-20°C) Comfort	Liebherr (Ochsenhausen)
Gefrierschrank (-80°C) Ult 2090	Revco (USA)
Gel-Analysegerät Gel Doc 2000	Bio-Rad (München)
Gelkammern und Kämme	Amersham Bioscience (USA) Biometra (Göttingen)

Glaswaren	verschiedene Hersteller
Heizblock	IKA Werke (<i>Staufen</i>)
Hybridisierungssofen „HB-100 Hybridizer“	UVP Laboratory Products
Inkubationsschüttler Innova 4430	New Brunswick Scientific (<i>Nürtingen</i>)
Kühlschrank (4 °C)	UT6-K Bauknecht (<i>Stuttgart</i>)
Magnetrührer	IKA Werke (<i>Staufen</i>)
Mighty Small Transphor (Blotting Kammer)	Amersham Bioscience (<i>USA</i>)
Mikropipetten, Pipetman P10-1000	Gilson (<i>Middleton, USA</i>)
Mikroskop Telaval 31	Carl Zeiss (<i>Oberkochen</i>)
Netzgerät Model 200 / 2.0	Bio-Rad (<i>München</i>)
Netzgerät PowerPac 300	Bio-Rad (<i>München</i>)
Neubauer Zählkammer	Karl Hecht KG (<i>Sondheim</i>)
PCR-Gerät GeneAmp 2700	Perkin Elmer (<i>Rodgau</i>)
pH-Meter	WTW GmbH (<i>Weilheim</i>)
Pipettierhilfe	Hirschmann (<i>Eberstadt</i>)
Plastikwaren	verschiedene Hersteller
Schüttler KS 250 basic	IKA Labortechnik (<i>Staufen</i>)
Sterilbank HERAsafe EN12469	Thermo Electron Corporation
Transferpette 8 (Mehrkanalpipette)	Brand (<i>Wertheim</i>)
Transferpette-12 (Mehrkanalpipette)	Brand (<i>Wertheim</i>)
Thermoschüttler	Eppendorf (<i>Hamburg</i>)
Ultraschallgerät Sonopuls HD200	Bandelin (<i>Berlin</i>)
Ultraspec 1100 pro	Amersham (<i>USA</i>)
UV-Crosslinker Stratalinker	Stratagene (<i>La Jolla, USA</i>)
VentiRack™ System	Integra Bioscience (<i>Fernwald</i>)
Vortex-Schüttler VF2	IKA Werke (<i>Staufen</i>)
Waage	Scaltec Instruments (<i>Göttingen</i>)
Wärmeschrank	Heraeus (<i>Hanau</i>)
Wärmeschüttler	HAT Infors AG (<i>Bottmingen</i>)
Wasserbad	Memmert (<i>Schwalbach</i>)
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus (<i>Hanau</i>)
Zentrifuge Rotina 35R	Hettich (<i>Tuttlingen</i>)
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf (<i>Hamburg</i>)
Zentrifuge EBA 12R	Hettich (<i>Tuttlingen</i>)

Zentrifugen Rotanta 460R	Hettich (<i>Tuttlingen</i>)
Zentrifuge Rota Super 40	Hettich (<i>Tuttlingen</i>)

2.16 Verbrauchsmaterialien

3MM-Papier	Whatman (<i>USA</i>)
Einwegpipetten „ <i>Cellstar</i> “ (1 - 25 ml)	Greiner (<i>Nürtingen</i>)
Elektrotransformationsküvetten (Ø 2 mm)	Bio-Rad (<i>München</i>)
Eppendorf-Reaktionsgefäße (0,2 -2,0 ml)	Eppendorf (<i>Hamburg</i>)
FACS-Röhrchen <i>Titertube</i>	Bio-Rad (<i>München</i>)
<i>Falcon</i> -Röhrchen (15 ml, 50 ml)	BD Biosciences (<i>USA</i>)
Injektionskanülen (27G ³ / ₄) <i>Sterican 100</i>	Braun (<i>Melsungen</i>)
Injektionskanülen (20G x 1-1/2-Kanüle) <i>Eco Lab</i>	NeoLab (<i>Heidelberg</i>)
Injektionsspritzen (<i>Omnifix-F 1 ml, 5 ml, 20 ml</i>)	Braun (<i>Melsungen</i>)
Kryoröhrchen „ <i>Cryo Tube Vials</i> “	Nunc (<i>Wiesbaden</i>)
Nitrozellulosefilter	Schleicher & Schuell (<i>Dassel</i>)
Nitrozellulosemembran (0,2 µm) <i>Trans-Blot</i>	Bio-Rad (<i>München</i>)
Nylonmembran <i>Zeta Probe GT</i>	Bio-Rad (<i>München</i>)
Petrischalen	Nunc (<i>Wiesbaden</i>)
Röntgenfilme (<i>BioMax MR</i>)	Kodak (<i>Frankreich</i>)
Sterilfilter (<i>Minisart 0,2-0,45 µm</i>)	Sartorius (<i>Göttingen</i>)
TopCount Mikroplatten 96-well	Packard (<i>Downers Grove</i>)
Ultrazentrifugenröhrchen (<i>UltraClear</i>)	Beckman (<i>München</i>)
Zellkulturplatten / -flaschen	Greiner (<i>Nürtingen</i>) Corning Inc. (<i>USA</i>) Nunc (<i>Wiesbaden</i>)
Zellschaber	Corning Inc. (<i>USA</i>)
Zellsiebe (<i>Falcon 40 µm</i>)	BD Biosciences (<i>USA</i>)

2.17 Computerprogramme, Bioinformatik-Tools

Clone Manager 9.0

Microsoft Office XP (Excel, PowerPoint, Word)

NCBI PubMed

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

Primer3 (v. 0.4.0)

<http://frodo.wi.mit.edu/>

ProtParam

<http://www.expasy.org/cgi-bin/protparam>

Restenzyme (Restriktionsanalyse)

<http://www.enzim.hu/~tusi/restric/>

SigmaPlot 10.0

EndNote Program 9

METHODEN

2.18 Bakteriologische Methoden

2.18.1 Kultivierung von Bakterien

Die Kultivierung der Bakterien für die jeweiligen Experimente erfolgte in antibiotikahaltigem LB-Flüssigmedium über Nacht im Schüttler bei der jeweils erforderlichen Temperatur (30 oder 37°C). Um Einzelkolonien zu erhalten, wurden antibiotikahaltige LB-Agar-Platten zum Ausstrich der Bakterien verwendet, die ebenfalls über Nacht bei entsprechenden Temperaturen (30, 37 und 43°C) im Brutschrank inkubiert wurden.

2.18.2 Kryokonservierung prokaryontischer Zellen (Glyzerinkultur)

Zur Konservierung von Bakterien wurde 1 ml einer Übernachtskultur (ÜN) 1:1 mit einer 50%igen Glyzerinlösung versetzt und anschließend in Aliquots bei -80°C gelagert.

2.18.3 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Zur Herstellung elektrokompetenter Bakterien wurden die *E.coli* Stämme DH10B und DH5 α eingesetzt. 5 ml einer ÜN-Kultur, angeimpft aus einer Einzelkolonie oder Glyzerinkultur, wurden 1:100 mit LB-Medium verdünnt und im 37°C-Schüttler inkubiert bis die Bakterien die exponentielle Wachstumsphase erreicht hatten, messbar durch eine OD₆₀₀ von 0,5-0,7. Die Bakteriensuspension wurde für 20 min auf Eis abgekühlt und anschließend bei 3500 rpm (4°C, 20 min) pelletiert. Im Anschluss wurde das Pellet jeweils 1x in 250 ml eisgekühltem ddH₂O bzw. 200 ml kaltem 0,2 mM HEPES gewaschen und in 10 ml 15% Glyzerinlösung resuspendiert. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 3500 rpm (4°C, 20 min) wurden die Bakterien in 4-5 ml eisgekühlter 10% Glyzerinlösung aufgenommen und auf Trockeneis sofort in 50 μ l oder 100 μ l Portionen aliquotiert. Die Lagerung der Bakterien erfolgte bei -80°C.

2.18.4 Herstellung chemischkompetenter Bakterien

Für die Erzeugung chemischkompetenter Bakterien wurden die Bakterien zunächst wie in 2.18.3. beschrieben bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,7 kultiviert. Die Abkühlung auf Eis und Zentrifugation erfolgten ebenfalls wie in 2.18.3. Nach Resuspendierung des Bakterienpellets in 20 ml eiskaltem 0,1 M CaCl₂ folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (3500 rpm, 20 min, 4°C) und die Aufnahme der Zellen in 4 ml kaltem 0,1 M CaCl₂. Die Bakterien wurden erneut pelletiert, in 2 ml kalter 10%-iger Glycerinlösung resuspendiert und sofort in 50 µl Aliquots bei – 80 °C eingefroren und gelagert.

2.18.5 Elektrotransformation von Bakterien

100 µl an elektrokompetenten Bakterien wurden 10 min auf Eis aufgetaut und anschließend 1 min mit 1-5 ng Plasmid-DNA oder 10-20 µl Ligationsansatz inkubiert. Die Transformation der Zellsuspension erfolgte in einer Elektrotransformationsküvette (Ø 2 mm) bei 2,5 kV, 200 Ω und 25 µF. Die Zellsuspension wurde unmittelbar danach in 500 µl LB-Medium aufgenommen und in einem 1,5 ml- Reaktionsgefäß 30 min bis 1 h bei 120 rpm in einem Thermoschüttler kultiviert. Verschiedene Volumen an Bakterien (1% bis 50%) wurden auf antibiotikahaltigen LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei entsprechender Temperatur inkubiert. Die erhaltenen Einzelkolonien wurden durch weiterführende molekularbiologische Methoden (2.19) untersucht.

2.18.6 Chemische Transformation von Bakterien durch Hitzeschockbehandlung

Neben Elektroschock können Bakterien auch durch Temperaturerhöhung für die Aufnahme von DNA sensitiv gemacht werden. 50 µl oder 100 µl chemisch kompetenter *E.coli* Bakterien wurden dazu auf Eis aufgetaut, 20 min mit 1-5 ng Plasmid-DNA oder 10 µl Ligationsansatz auf Eis inkubiert und anschließend bei 42°C für 2 min transformiert. Nach 2 min Abkühlung auf Eis wurden die Bakterien nach Zugabe von 500 µl LB-Medium bei entsprechender Wachstumstemperatur 1-1,5 h geschüttelt, auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Die Analyse der

erhaltenen Einzelkolonien erfolgte durch weiterführende molekularbiologische Methoden (2.19)

2.18.7 BAC - Shuttle Mutagenese

Bei der Shuttle-Mutagenese wird ein Shuttle Plasmid, in das zuvor die gewünschte Sequenz kloniert wurde, mittels Transformation in *E.coli* Bakterien eingebracht, die bereits ein Wildtyp- oder rekombinantes BAC-MHV-68 Genom tragen. Shuttle Plasmide sind Rekombinationsplasmide, die für jeden Mutageneseprozess neu konstruiert werden. Sie enthalten Regionen, welche homolog zu einer bestimmten Integrationsseite im BAC Plasmid sind sowie ein *recA* Gen. Als Beispiel dient das in dieser Arbeit verwendete Plasmid pST76K-SR-M2. Dieser Vektor enthält ein ca. 4,8 kb großes Fragment, welches homolog zu einer Region am linken Genomende von MHV-68 ist. Diese Region, bestehend aus den viruspezifischen Leserahmen M1 und M2 sowie nichtkodierenden Bereichen ist für die Replikation des Virus *in vitro* entbehrlich und wurde somit als Integrationsseite ausgesucht. Nach Transformation des Shuttle Plasmid in die *E.coli* Bakterien, kann durch verschiedene Selektionsschritte auf antibiotikahaltigen LB-Agar-Platten eine homologe Rekombination zur Einführung des gewünschten Gens in das BAC-MHV-68 Genom erfolgen. Die Rekombination wird ermöglicht durch das *recA* Genprodukt des Shuttle-Plasmids. Die Transformation erfolgte wie in 2.18.5, und die Bakterien wurden in einer bestimmten Reihenfolge auf verschiedenen LB-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei jeweiliger Temperatur inkubiert (Tabelle 1).

Anschließend wurde bei 37 °C eine Parallelinkubation von Einzelkolonien auf Kan⁺ und zusätzlich auf Cam⁺ Agarplatten durchgeführt. Für eine Analyse durch BAC Plasmidisolierung (2.19.2) und nachfolgender Restriktion (2.19.5) wurden nur Einzelkolonien verwendet, die auf Cam⁺ und nicht auf Kan⁺ Agarplatten angezüchtet werden konnten. Nur so kann ausgeschlossen werden, dass sich noch Cointegrate in den Bakterien befinden.

Tabelle 1: Arbeitsschritte zur Durchführung einer Shuttle Mutagenese

Antibiotikum (LB-Agar-Platten)	Temperatur (°C)	Ziel
Kan/Cam	30	Bildung von Cointegraten zwischen Shuttle Plasmid (Kan-Resistenz) und BAC-MHV-68 Genom (Cam-Resistenz) durch homologe Rekombination
Kan/Cam	43	Selektion gegen temperatursensitives Shuttle-Plasmid, Selektion auf Cointegrate
Cam	37	Auflösung der Cointegrate durch homologe Rekombination, Entstehung des rekombinanten BAC-MHV-68 Genoms
Cam/Saccharose	30	Selektion gegen Cointegrate, SacB- Gen des Shuttle-Plasmids verhindert Bakterienwachstum auf Saccharose

2.18.8 ET-Cloning

Bei dem ET-Cloning Verfahren wird ebenfalls die bakterielle Rekombinationsmaschinerie benutzt um Mutationen in DNA einzuführen. Der Name ET-Cloning rührt daher, dass die rekombinanten *recE* und *recT* Proteine von *E.coli* für die homologe Rekombination zwischen linearer und zirkulärer DNA benutzt werden. Ein lineares DNA Fragment, welches die zur Mutagenese erforderlichen Komponenten enthält, wurde in *E.coli* transformiert. Das DNA Fragment wurde hierzu per PCR generiert. Die bereits im Labor vorhandene DNA des pCP16 diente hierbei als Template. Das lineare Fragment enthält eine Tetrazyklin-Kassette, die von zwei FRT (*FLP recognition target sites*) Sequenzen flankiert wird. Die Tet-Kassette dient der

Selektion. Die Primer für die PCR bestehen aus 24 Nukleotiden, die spezifisch an die Tetrazyklin-Kassette binden, sowie 50 Basen, die homolog sind zur Zielsequenz im MHV-68 BAC. Das aufgereinigte PCR Produkt wurde in elektrokompetente *E. coli* Bakterien, welche das zirkuläre MHV-68-BAC tragen, transformiert und kultiviert. Durch Rekombination wird das DNA Fragment in das MHV-68 BAC inseriert, und über die Tetrazyklin Resistenz können die positiven Klone auf Agarplatten selektiert werden. Nach Plasmidisolierung (2.19.2) und Analyse der Klone mittels Restriktionsenzymen (2.19.5) wurde infektiöses Virus rekonstituiert (2.21.1).

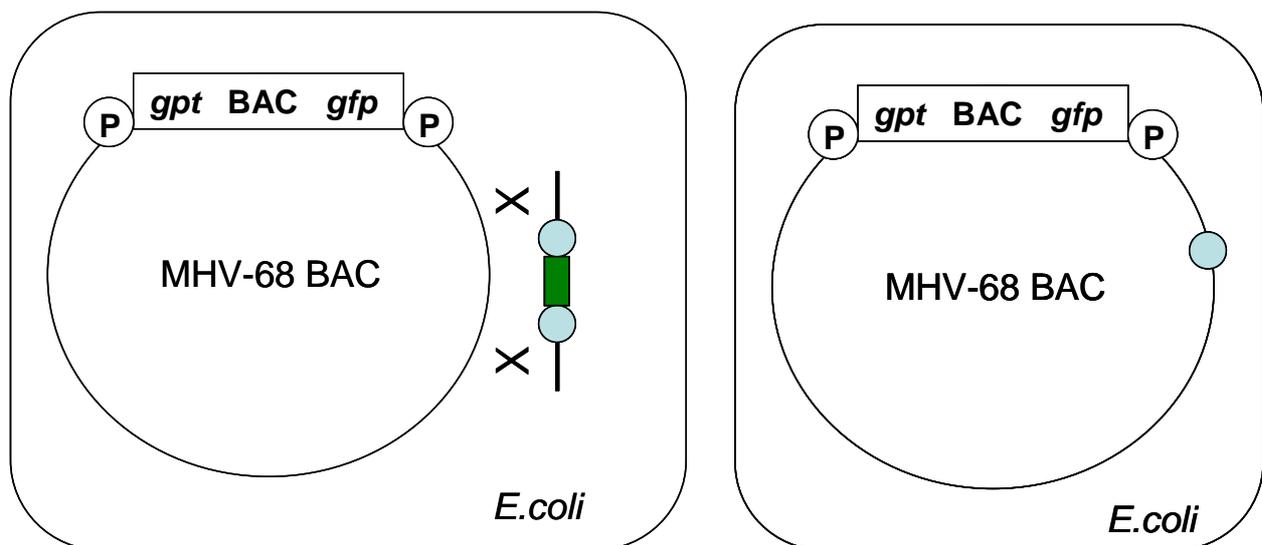


Abb. 2.1: Excision der Tetrazyklin-Kassette während des ET-cloning Verfahrens. Nach erfolgreicher Mutation des BAC Genoms durch homologe Rekombination (X) mit der Zielsequenz (schwarzer Strich)), kann die Tetrazyklin-Kassette (grünes Rechteck) mit Hilfe der FLP-Rekombinase wieder herausgeschnitten werden. Die FLP-Rekombinase erkennt die FRT Sequenzen (blaue Kreise), welche die Tetrazyklin-Kassette flankieren. Nach erfolgreicher Excision bleibt eine FRT Sequenz erhalten.

Entfernung der Tetrazyklin Kasette

Über die FRT Sequenzen ist es möglich, nach erfolgreicher Insertion in das BAC Genom, die Tetrazyklin Kasette wieder zu entfernen. Die FLP Rekombinase erkennt die FRT Sequenzen und schneidet sie zusammen mit der Sequenz des Tetrazyklin heraus. Eine FRT Sequenz bleibt bei diesem Excisionsvorgang erhalten, welche die Replikation des Virus aber nicht beeinflusst. (Abb. 2.1.)

Aus einem der positiven Klone wurden elektrokompente Bakterien hergestellt, welche mit dem FLP Expressionsplasmid (pCP20) transformiert wurden. Die Bakterien wurden bei 30 °C über Nacht auf Cam⁺/Amp⁺ Agarplatten ausplattiert. Die gewachsenen Kolonien wurden auf Cam⁺ Agarplatten überführt und bei 43 °C über Nacht inkubiert. Bei diesem Schritt geht das temperatursensitive pCP20 verloren. Zuletzt erfolgt eine Parallelinkubation der gewachsenen Kolonien auf Cam⁺ sowie Tet⁺ Agarplatten bei 37 °C ebenfalls über Nacht. Kolonien, die auf den Cam⁺ Platten gewachsen waren, nicht aber auf den Tet⁺ Platten, wurden ausgewählt, präpariert und mittels Restriktionsanalyse (2.19.5) untersucht. Die positiven BAC Plasmide wurden wie bereits beschrieben weiterbehandelt und infektiöses Virus rekonstituiert (2.21.1).

2.19 Molekularbiologische Methoden

2.19.1 Plasmidisolierung im analytischen Maßstab (Mini-Präparation)

Zur Isolierung der Plasmid-DNA aus *E.coli* Bakterien wurden 3 ml antibiotikahaltiges LB-Medium mit der Bakterienkultur angeimpft und bei entsprechender Temperatur über Nacht im Schüttler inkubiert. 1 ml dieser Vorkultur wurde anschließend in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 5000 rpm und Raumtemperatur pelletiert. Der Rest der Bakterienkultur wurde bei 4 °C aufbewahrt. Die Lyse des Pellets erfolgte nach Zugabe von 100 µl Lösung 1 und kurzem invertieren. Im Anschluss wurden zur Denaturierung der Proteine 200 µl der frisch hergestellten Lösung 2 zugegeben. Nach kurzen Vortexen erfolgte die Zugabe der Neutralisationslösung (Lösung 3) unter 5-10maligem invertieren. Die Proben wurden 10 min auf Eis inkubiert und danach für 10 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert.

Der Nukleinsäurehaltige Überstand wurde in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt und es erfolgte die Fällung der Plasmid DNA durch Zugabe von 1 ml 100%igem Ethanol und Inkubation für 10 min auf Eis. Nach der Zentrifugation für 10 min bei 14.000 rpm und 4 °C wurde das Pellet einmal mit 75%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl TE-Puffer (+RNase) resuspendiert. Die Proben wurden bei 4 °C gelagert und in den anschließenden Restriktionsverdau (2.19.5) eingesetzt.

In manchen Fällen wurde die Isolation der Plasmid-DNA unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Kits durchgeführt. Verwendung fand für kleinere DNA-Mengen der Amersham Miniprep Kit. Die Arbeitsschritte hierfür wurden dem Handbuch des Herstellers entnommen.

2.19.2 BAC-Plasmidisolierung im analytischen Maßstab (Mini-Präparation)

BAC-Plasmide (2.18.7 und 2.18.8) wurden ebenfalls nach dem Prinzip der alkalischen Lyse gewonnen, müssen jedoch aufgrund ihrer Größe vorsichtig, d.h. mit abgeschnittenen Pipettenspitzen, behandelt werden, um eine Zerstörung der Plasmide durch Scherkräfte zu verhindern.

10 ml antibiotikahaltiges LB Medium wurde mit den Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. 9 ml dieser Kultur wurden bei 3500 rpm für 10 min zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde anschließend mit den Puffern 1-3 des QIAGEN® DNA Mini Kit behandelt (200 µl P1, 300 µl P2, 300 µl P3). Nach Zugabe des jeweiligen Puffers wurden die Suspensionen vorsichtig gemischt und nach 10minütiger Inkubation auf Eis sowie Zentrifugation für 10 min bei 14.000 rpm und 4 °C erfolgte die Trennung der chromosomalen DNA und der Proteine. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Gefäß überführt, die Gewinnung der Plasmid DNA erfolgte dann über die Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanolpräzipitation. Nach Zugabe von 1 ml Phenol/Chloroform wurden die Proben 10 min im Drehrad inkubiert und sofort im Anschluss für 10 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und mit 1 ml 100% Ethanol behandelt. Nach 20minütiger Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4 °C erfolgte ein Waschschriff mit 70%igem Ethanol, das Pellet wurde getrocknet und in 100 µl TE (+RNase) resuspendiert. Die Lösung wurde bei 4 °C aufbewahrt und im anschließenden Restriktionsverdau (2.19.5) überprüft.

2.19.3 Isolierung von Plasmiden und BAC-Vektoren im präparativen Maßstab (Maxi-Präparation)

Die DNA-Gewinnung im größeren Maßstab erfolgte mit Hilfe des QIAGEN® Plasmid Maxi Kit bzw. mit dem Nucleobond PC 500 Maxi-Prep Kit bei BAC-Plasmiden. Hierfür wurden 200 ml (bei BAC-Plasmiden 500 ml) antibiotikahaltiges LB-Medium mit 1 ml einer Bakterien-Vorkultur angeimpft und über Nacht im Schüttler bei entsprechender Temperatur inkubiert. Die Aufarbeitung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Im letzten Schritt wurde die DNA mit Isopropanol gefällt, aufkonzentriert und in 200 µl ddH₂O oder TE-Puffer gelöst. Anschließend erfolgte die Konzentrationsbestimmung (2.19.4) und der jeweilige Restriktionsverdau (2.19.5). Gelagert wurde die DNA bei -20 °C, die BAC-Plasmid DNA bei 4 °C.

2.19.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren in Lösungen kann durch photometrische Bestimmung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD_{260}) gegen eine H₂O Referenzprobe (Blank), ausgehend vom Lambert-Beerschen Gesetz, berechnet werden. Eine OD_{260} von 1 entspricht dabei einer Nukleinsäure-Konzentration von 50 µg/ml für doppelsträngige DNA, 40 µg/ml für RNA sowie 37 µg/ml für Oligonukleotide. Die Plasmid Lösung wurde 1:100 mit H₂O verdünnt und ihre Absorption bei 260 nm und 280 nm im Photometer gemessen. Der Quotient von 260 nm/280nm gibt Aufschluss über die Reinheit der Nukleinsäure, um diese zu gewährleisten sollte er zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

2.19.5 Spaltung von Nukleinsäuren durch Restriktionsendonukleasen

Die enzymatische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen wurde zur Präparation von DNA-Fragmenten sowie zur Kontrolle von Ligationsergebnissen und Plasmidpräparationen angewendet. Pro µg DNA wurden in der Regel 1-2 U des jeweiligen Enzyms in den Restriktionsverdau eingesetzt. Es wurden Ansätze von 50 µl verwendet, wobei die Enzymmenge 10 % des Gesamtvolumens nicht übersteigen sollte, da das im Enzymkonzentrat enthaltene Glycerin unspezifisches Spalten (Sternaktivität) der DNA

begünstigt. Die Angaben zu den benötigten Puffern, der Inkubationstemperatur und –zeit wurde dem Hersteller-Katalog (Roche oder New England BioLabs) entnommen. Der Restriktionsverdau wurde nach Inkubation bei – 20 °C eingefroren oder direkt in die Agarosegelelektrophorese (2.19.10) eingesetzt.

2.19.6 Erzeugung kompatibler DNA Enden

Sollten DNA Fragmente und Vektoren ligiert werden, welche keine kompatiblen überhängenden Enden aufweisen, können mit Hilfe des Klenow Enzyms glatte Enden erzeugt werden. Diese Untereinheit der DNA-Polymerase I erzeugt durch ihre 5'-3' Polymerase- und 3'-5'- Exonukleaseaktivität glatte, ligierbare Enden. Etwa 1- 3 µg DNA wurden zusammen mit 0,4 mM/µl dNTP's, 10x Puffer H (finale Konzentration 1x), 0,5 U/µl Klenow-Enzym und ddH₂O in einem 50 µl Ansatz gemischt und für 25 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Hitzeinaktivierung des Klenow Enzyms bei 75 °C für 20 min. Dann erfolgte die Aufreinigung der DNA über die Agarosegelelektrophorese (2.19.10). Gelagert wurde die DNA bei – 20 °C oder sofort in weiterfolgende Experimente eingesetzt.

2.19.7 Dephosphorylierung von DNA

Die Dephosphorylierung von DNA soll die Religierung des leeren Vektors bei Ligationen (2.19.8) verhindern. Dazu werden die Phosphatgruppen am 5' Ende der DNA durch die alkalische CIP (*calf intestinal alkaline phosphatase*) abgespalten. Die Dephosphorylierung wird im Anschluss an die Restriktion und evtl. Klenow-Behandlung des Vektors durchgeführt. Das Reaktionsgemisch bestand aus der Vektor-DNA (1-3 µg), dem CIP Enzym (1 U) mit entsprechendem 10x Puffer (1x) und wurde mit ddH₂O auf 35 µl aufgefüllt. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion gestoppt und die DNA über die Agarosegelelektrophorese (2.19.10) aufgereinigt. Der dephosphorylierte Vektor wurde aus dem Gel isoliert und bei – 20 °C gelagert oder direkt in die Ligation (2.19.8) eingesetzt.

2.19.8 Ligation

Bei der Ligation werden DNA Fragmente und linearisierte Vektoren miteinander verbunden. Unter Einsatz der T4 Ligase werden die 3'-Hydroxylgruppe und die 5'-Phosphatgruppe der kompatiblen, überhängenden oder glatten Enden der DNA Fragmente verbunden. Das Verhältnis Vektor zu Insert-DNA wurde so gewählt, das 6x mehr Insert eingesetzt wurde als Vektor. Die Gesamtmenge des Ansatzes betrug 20 µl. Verwendet wurden 1 U T4 Ligase mit entsprechendem 10x T4 Ligase Puffer. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle mitgeführt. Dieser Ansatz enthielt lediglich Vektor-DNA, aber keine Insert-DNA. Die Inkubation erfolgte für 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16 °C. Der Ligationsansatz wurde danach bei – 20 °C eingefroren oder direkt weiter verwendet. In einigen Fällen wurde anstelle der o.g. Reagenzien ein Ligation Kit der Firma TaKaRa angewendet. Die Anwendung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.19.9 Amplifikation von Nukleinsäuren mittels der Polymerase-Kettenreaktion

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) dient der exponentiellen Amplifikation von DNA Abschnitten. Die Vervielfältigung der DNA erfolgt in Zyklen. Durch wechselnde Temperaturbedingungen werden die DNA-Doppelstränge zunächst getrennt (Denaturierung), dann erfolgt die Bindung (Annealing) spezifischer Oligonukleotide (Primer) an die komplementäre Sequenz des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts und die Synthese (Elongation) des neuen DNA-Strangs in 5'-3' Richtung durch eine hitzebeständige DNA-Polymerase. Über die Primer ist es ebenfalls möglich, kurze DNA Sequenzen, z.B. Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen, einzuführen.

Die Primer für die einzelnen PCRs wurden mit dem Computerprogramm Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) ausgewählt, und gegebenenfalls manuell noch angepasst. Verschiedene Konzentrationen an DNA (100 ng bis 1 µg) wurden in die PCR Reaktion eingesetzt. Zusätzlich enthielt der 20 µl Ansatz noch die Platinum Taq-Polymerase (1 U) mit entsprechendem 10x Puffer (1x), das Primerpaar (je 0,05 µmol), MgCl₂ (1,5 mM) und dNTP's (0,2 mM). Aufgefüllt wurde der Mix mit ddH₂O.

Die PCR Reaktion erfolgte nach folgendem Programm im Thermocycler:

1. Initial-Denaturierung bei 95 °C für 2 min (1 Zyklus)
2. Denaturierung bei 95 °C für 30 sek (30 Zyklen)
3. Hybridisierung/Annealing bei X °C für 40 sek (30 Zyklen)
4. Elongation bei 72 °C für 1 min (30 Zyklen)
5. finale Elongation bei 72 °C für 5 min (1 Zyklus)

Die Hybridisierungstemperatur (X) wurde für die jeweiligen Primerpaare separat ermittelt, entweder mit dem Primer3 Programm oder über die Schmelztemperatur (TM). Diese berechnet sich aus der Basenzusammensetzung der Primer und kann über folgende Funktion ermittelt werden: $TM = 4 \times (G+C) + 2 \times (A+T)$. Optimal liegt die Hybridisierungstemperatur etwa 4 °C unter der ermittelten Schmelztemperatur.

2.19.10 Analyse von Nukleinsäuren mittels Agarosegelelektrophorese

Die Charakterisierung von DNA-Fragmenten ist anhand ihres Laufverhaltens in der Agarosegelelektrophorese möglich. Im elektrischen Feld wandern die negativ geladenen DNA-Fragmente ihrer Größe entsprechend unterschiedlich schnell zum positiven Pol. Mit Hilfe von zugesetztem Ethidiumbromid können die DNA-Banden visualisiert und ihre Größe anhand eines Längenstandards bestimmt werden.

Der Agaroseanteil im Gel ist verknüpft mit dem Trennbereich der DNA-Fragmente. Große Fragmente durchlaufen das Gel langsamer als kleine, die Siebstruktur der Agarose bietet großen Fragmenten mehr Widerstand als den kleinen. Für die Auftrennung von DNA Fragmenten mit einer Größe von 0,4 bis 6 kb liegt die Konzentration der Agarose im Gel in der Regel bei 1,2 % (w/v). Erhöht sich die Fragmentlänge, wird die Konzentration der Agarose schrittweise erniedrigt.

Die Agarose wurde in dem entsprechenden Volumen an TAE oder TBE Puffer auf einem Heizblock aufgeköcht, kurz abgekühlt und mit 0,0005% Ethidiumbromid versetzt. Nach 15 - 20minütiger Ruhephase wurde das erstarrte Gel in die Gelkammer eingesetzt, mit Puffer überschichtet und mit den Proben und dem Längenstandard beladen. Die DNA wurde vorher bereits mit 1x DNA-Probenpuffer versetzt. Je nach Experiment, Größe des Gels und Fragmentlänge wurde eine Spannung von 60 bis 120 V angelegt. Die Größenbestimmung der

DNA Banden erfolgte unter UV-Licht mit Hilfe des aufgetragenen Größenstandards. Das Ergebnis wurde anschließend fotografisch dokumentiert.

2.19.11 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Für die Präparation der DNA aus dem Agarosegel (2.19.10) wurde die gewünschte Bande mit einem Skalpell unter UV-Beleuchtung ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt. Die Aufbereitung erfolgte unter Verwendung des GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kits durch Schmelzen der Gelsubstanz mit anschließenden Isolations- und Waschschritten entsprechend den Angaben des Herstellers. Nach Elution der DNA wurde diese bei - 20 °C gelagert oder sofort weiterverarbeitet.

2.19.12 Ethanolpräzipitation von DNA

Zur Erhöhung des Reinheitsgrades, zur Aufkonzentration oder für einen Pufferwechsel während eines Restriktionsverdau (2.19.5) wurde eine in Lösung befindliche DNA gefällt und erneut in Lösung gebracht. 2,5 Vol. 100%iger Ethanol und 1/10 Vol. 3M Natriumacetat pH 5,2 wurden zur DNA gegeben. Bei - 80 °C für 30 min erfolgte die Präzipitation der DNA. Anschließend erfolgte die Pelletierung bei 14.000 rpm und 4 °C für 20 min. Nach dem abschließenden Waschschriff mit 70%igen Ethanol wurde das DNA Pellet getrocknet und in dem erforderlichen Volumen ddH₂O oder TE-Puffer aufgenommen und weiterverwendet.

2.19.13 Herstellung einer Digoxigenin markierten Sonde für den Southern Blot

Die rekombinanten Viren (2.18.7 und 2.18.8) wurden allesamt mit Hilfe der Southern Blot Methode auf ihre Mutation überprüft. Zur Detektion der spezifischen DNA Sequenzen dienen komplementäre DNA Sonden, welche mit Digoxigenin markiert sind. Mittels Restriktionsverdau (2.19.5) wurden die gewünschten Fragmente erzeugt. Nach Überprüfung der DNA in der Agarosegelelektrophorese (2.19.10) wurden die ausgewählten Fragmente mit dem GFXTM PCR DNA and Gel Purification Kit (2.19.11) isoliert und in 20 µl TE Puffer aufgenommen. 5 µl dienten der erneuten Kontrolle im Agarosegel, die restlichen 15 µl des

Ansatzes wurden für die Markierungsreaktion eingesetzt. Hierzu wurde der DIG DNA Labelling Kit benutzt. Nach 10 min aufkochen der DNA bei 95 °C und anschließender Denaturierung auf Eis erfolgte die Zugabe von 10x Hexanukleotid Mix (1x), 10x dNTP Mix (1x) und 2 U des Klenow Enzyms. Das Gesamtvolumen von 20 µl wurde mit ddH₂O erreicht. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion mit 2 µl 0,2 M EDTA gestoppt. Die Sonden wurden bei – 20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.19.14 Nachweis spezifischer DNA Fragmente durch das Southern Blot Verfahren

Die Analyse der viralen DNA aus dem Hirt Extrakt (2.21.4) erfolgte mittels des Southern Blot Verfahrens. Diese Methode erlaubt den Nachweis eines bestimmten DNA Fragmentes in einem komplexen Gemisch. Die DNA wird hierzu mit Restriktionsenzymen gespalten (2.19.5) und per Agarosegelelektrophorese (2.19.10) nach Größe aufgetrennt. Danach erfolgt der Transfer auf eine Membran, auf welcher die DNA fixiert wird. Die Detektion erfolgt anhand der Hybridisierung mit einer Sonde (2.19.13), welche komplementär zur gesuchten Sequenz vorliegt und markiert ist.

Für den Restriktionsverdau wurden 20 µl der DNA mit 5 µl 10x Reaktionspuffer und 2 µl der Restriktionsenzyme (3U) gemischt, mit Aqua dest. auf 50 µl aufgefüllt und 3 - 4 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde mit DNA-Probenpuffer (mind. 5 µl) versetzt, und der gesamte Ansatz wurde in einem 0,8%igem Agarosegel in 1x TBE mit Zugabe von **112,5 µl** Ethidiumbromid aufgetragen. Als Größenstandard diente der 1 kb DNA-Größenstandard. Der Lauf wurde bei 60 V für ca. 16 h über Nacht durchgeführt.

Unter UV Licht wurde das entsprechende Gelstück ausgeschnitten, fotografiert, an einem Ende markiert und für 60 min in Fixationspuffer eingelegt. Nach Dekantieren des Puffers und einmaligem Waschen in Aqua dest. wurde das Gel für 1 h im Denaturierungspuffer und im Anschluss für 1 h im Neutralisationspuffer geschwenkt. Der Transfer der DNA auf die Membran wurde mittels Kapillar-Blot durchgeführt. Hierzu wurde eine Plastikwanne mit 20 x SSC Puffer befüllt. Eine Glasplatte mit Whatmanfilterpapier, dessen Enden so lang waren, dass sie in den Puffer hineinreichen, wurde quer auf die Wanne gelegt. Zwei Whatmanfilterpapiere wurden aufgelegt, dann das Gel und darüber liegend die Nylonmembran. Bei diesem Vorgang wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen im Aufbau befinden. Über die Membran wurden zwei Lagen Whatmanfilterpapier sowie ein ca. 10 cm hoher Stapel an Papiertüchern platziert, der von einem Gewicht (ca. 1 kg) beschwert

wurde. So kann ein Flüssigkeitsstrom erzeugt werden, der von unten durch das Gel und die Membran läuft, vom Papierstapel aufgesogen wird und die DNA dabei mitzieht.

Nach dem Transfer über Nacht wurde die Membran zwischen zwei Whatmanfilterpapieren luftgetrocknet und im UV-Crosslinker fixiert. Im Anschluss folgte die Prähybridisierung mit 25 ml Hybridisierungslösung für 2 h bei 65 °C im Hybridisierungssofen. Kurz vor Ablauf der Inkubation wurden die Sonden (2.19.13) 10 min bei 95 °C aufgeköcht, auf Eis gelagert und zu 25 ml kalter Hybridisierungslösung gegeben. Die Membran wurde dann mit dieser Lösung über Nacht bei 65 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die ungebundene Sonde mit einem zweimaligen Waschschrift bei 65 °C mit Waschlösung 1 und 2 von der Membran entfernt. Die Detektion mit verschiedenen Lösungen erfolgte bei Raumtemperatur, nach folgendem Ablauf:

- 50 ml DIG 1, 5 min
- 50 ml DIG 2, 30 min
- 20 ml DIG 2 + anti-DIG AP-Konjugat (1:20.000), 30 min
- 50 ml DIG 1 + 0,3% Tween, 2x 15 min
- 30 ml DIG 3, 10 min

Als Detektionslösung dienten 2 ml einer 1:100 Verdünnung von CDP-Star mit DIG 3, welche direkt auf die Membran gegeben wurde. Nach 5minütiger Inkubation erfolgte die Detektion mit Hilfe eines Röntgenfilmes.

2.19.15 Isolation von DNA und RNA

Die Isolation von DNA wie auch RNA aus infizierten wie auch nicht infizierten Zellen erfolgte mit kommerziellen Kits. RNA wurde mit dem RNeasy Mini Kit[®] von QIAGEN aus Zelllysaten isoliert, DNA mit dem QIAGEN[®] DNA Mini Kit. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Nach Konzentrationsbestimmung wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20 (DNA) oder -80 °C (RNA) gelagert.

2.20 Zellkultur-Techniken

2.20.1 Kultivierung eukaryontischer Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien wurden kontinuierlich bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank mit dem jeweiligen Zellkulturmedium inkubiert. Die Passagierung erfolgte ein- bis zweimal die Woche mit Trypsin-EDTA in Splitverhältnissen von 1:10. Zur Passagierung wurde das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit Trypsin-EDTA gespült, und dann mit 2-3 ml Trypsin-EDTA bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Ablösen der Zellen wurden diese in 8 -12 ml Medium resuspendiert und in dem gewünschten Verhältnis in neue Zellkulturflaschen oder Zellkulturschalen überführt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte durch den Einsatz einer Neubauer-Zählkammer. Die Zellen wurden hierzu 1:5 mit Trypanblau versetzt und die lebenden Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt. Sämtliche Arbeitsschritte wurden unter der Sterilbank durchgeführt, unter Verwendung steriler Lösungen, Medien und Verbrauchsmaterialien. Nicht-adhärente Zellen wurden weitgehend gleich behandelt. Die Passagierung erfolgte allerdings ohne Zugabe von Trypsin im Splitverhältnis 1:10.

2.20.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Kontinuierlich wurden Zelllinien in einer frühen Passage kryokonserviert und gelagert. Aus einer 100 % konfluent bewachsenen 75 cm² Zellkulturflasche wurden vier Aliquots der Zellpopulation eingefroren. Das Medium wurde hierzu abgenommen, die Zellen mit Trypsin-EDTA gespült und anschließend mit 2 ml Trypsin-EDTA resuspendiert und in 15 ml-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 8 ml Medium wurden die Zellen für 5 min bei 2500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 10 ml PBS resuspendiert und gewaschen. Der Überstand wurde wiederum dekantiert und die Zellen wurden rasch in 4 ml 10 % (v/v) DMSO in FBS gegeben. Je 1 ml Aliquots wurden in Kryoröhrchen abgefüllt, 1-2 Tage bei – 80 °C gelagert und dann in Stickstoff eingefroren.

Zum Auftauen der Zellen wurde ein Aliquot unter warmes Leitungswasser gehalten, in 10 ml Medium überführt und für 10 min bei 2500 rpm abzentrifugiert. Im Anschluss wurden die

Zellen in vorgewärmten Medium aufgenommen und im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ in Zellkulturflaschen oder – schalen kultiviert.

2.20.3 Transfektion von Nukleinsäuren in eukaryontische Zellen

Das Einbringen von DNA in Zellen erfolgte mit Hilfe des FuGENE® HD Transfektionsreagenz. Die zu transfizierenden Zellen wurden 24 h vor der Transfektion ausgesät, so dass sie eine ca. 60 – 70 %ige Konfluenz aufwiesen. 10 µl des Reagenz wurden mit ca. 2,5 µg DNA, gelöst in 10 µl PBS, versetzt und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml Medium wurde der Mix auf die Zellen gegeben und für 2 – 3 h bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Transfektionslösung gegen frisches Medium ausgetauscht, und die Zellen wurden bis zur Verwendung im Brutschrank in Kultur gehalten.

2.21 Virologische Methoden

2.21.1 Virusrekonstitution nach der Mutagenese

2 – 3 µg DNA aus der Maxi-Präparation (2.19.3) wurde in BHK-21 Zellen transfiziert. Im Anschluss an die Transfektion (2.20.3) wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂, bis zum Auftreten von 100% CPE inkubiert. Der Erfolg der Transfektion konnte im Fluoreszenzmikroskop überprüft werden. Die BAC-MHV-68 DNA kodiert auch für das *green fluorescent protein* (GFP), transfizierte Zellen erscheinen somit im Mikroskop grün.

Die Virusernte erfolgte über einen zweimaligen Einfrier- und Tauprozess bei – 80 °C bzw. Raumtemperatur. Nach Zentrifugation für 10 min bei 1400 rpm und 4 °C zur Entfernung zellulärer Bestandteile wurde der virushaltige Überstand in Aliquots zu 1 ml bei - 80 °C gelagert.

Um die BAC-Vektor Sequenzen einschließlich der Sequenz für GFP aus dem Genom der rekombinanten MHV-68 zu entfernen, wurden Ref/Cre Zellen mit 5 – 20 µl des Virusüberstandes infiziert (2.21.2). REF/Cre-Zellen sind stabil mit der Rekombinase Cre

transfiziert. Die Cre-Rekombinase vermittelt das Entfernen der mit lox P-Sequenzen flankierten BAC-Kassette. Die infizierten Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ bis zum kompletten CPE inkubiert und das Virus durch zweimaliges frieren und tauen freigesetzt. Nach Zentrifugation bei 1400 rpm und 10 min wurde der Überstand entnommen und bei – 80 °C eingefroren. Um BAC-Sequenz freies Virus zu erhalten, wurden BHK-21 Zellen vorbereitet, welche in 96-Loch Platten für 24 h ausgesät wurden. 3-fach Verdünnungen des Virusüberstandes wurden auf die Zellen ausplattiert. Für jede Reihe (12 Vertiefungen) der 96-Loch Platte wurde eine Verdünnungsstufe auf die Zellen pipettiert. Die Vertiefungen, welche CPE, jedoch keine GFP Expression zeigten, wurden geerntet und in neue 25 cm² Zellkulturflaschen mit BHK-21 überführt. Nach erneuter Kontrolle im Fluoreszenzmikroskop wurden die Zellen bis zum 100 %igen CPE kultiviert, das Virus geerntet und der Überstand bei - 80 °C bis zur Herstellung eines Virusstocks gelagert.

2.21.2 Infektion von Zellen mit MHV-68 und Virusstock Präparation

Die Produktion des Virusstocks erfolgte nach Infektion von BHK-21 Zellen. Die Zellen wurden am Tage vor der Infektion in zwei bis vier 75 cm² Zellkulturflaschen ausgesät. Nach einer ca. 24stündigen Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ wurden die Zellen mit 10-20 µl/ Zellkulturflasche des jeweiligen Virus infiziert. Die Zugabe des Virus erfolgte in einer Suspensionslösung (5 ml GMEM) für ca. 1 h bei 37°C und 5 % CO₂. Im Anschluss wurde die Viruslösung durch frisches Medium ersetzt und die infizierten Zellen wurden im Brutschrank inkubiert. Nach Auftreten von 100%igem CPE wurden die Zellen aufgearbeitet.

Die Zellen plus Medium einer Zellkulturflasche wurden bei 1300 rpm für 10 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml GMEM resuspendiert. Nach einem zweimaligen Gefrier- und Tauprozess bei – 80 °C bzw. Raumtemperatur mit anschließender Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 2000 rpm, konnte der virushaltige Überstand gewonnen und aliquotiert werden. Die Lagerung der Aliquots für die weitere Verwendung erfolgte bei – 80 °C.

Suspensionszellen, wie die Ag8 Zellen, wurden auf eine andere Weise infiziert. Die Zellen wurden in 6-Loch Platten kultiviert, die Virussuspension auf die Zellen getropft und 30 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Medium erneuert und die Zellen bis zur Verwendung im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.21.3 Titerbestimmung von MHV-68 mittels Plaqueassay

Die Anzahl an infektiösen Viruspartikeln wurde mit Hilfe des Plaqueassay bestimmt. Hierzu wurden BHK-21 Zellen 24 h vor der Titration in 24-Loch-Platten ausgesät. Die Zellen sollten hierbei nicht mehr als 30 - 40 % konfluent sein. Von der zu titrierenden Virussuspension wurde, in einem Volumen von 1 ml, eine Verdünnungsreihe (1:10 oder 1:5) mit GMEM erstellt. Die einzelnen Verdünnungen wurden auf die Zellen gegeben und für 90 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach Absaugen der Viruslösung wurde 1 ml Overlay-Medium zugegeben. Die Inkubation im Brutschrank dauerte fünf Tage bei 37 °C und 5 % CO₂. Das Overlay-Medium verhindert, dass neu produzierte Virionen sich über das Medium ausbreiten. Im Anschluss an die Inkubation wurde das Medium vorsichtig von den Zellen abgesaugt und durch 350 µl Kristallviolett-Lösung ersetzt. Nach 10 bis 15 min Färbung der Zellen wurden diese gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend im Lichtmikroskop auf das Vorhandensein von Plaques untersucht. Die Plaques pro Verdünnungsstufe wurden gezählt und der Virustiter anhand folgender Formel errechnet. (Anzahl Plaques x Verdünnungsstufe x Verdünnungsfaktor = Plaque forming units (PFU)/ml.

2.21.4 Isolierung viraler DNA (HIRT Extraktion)

Die Aufreinigung der viralen DNA wurde nach der Methode von Hirt (Hirt et al. 1967) durchgeführt. NIH3T3 Zellen wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ bis zu einer Konfluenz von 60 – 70 % kultiviert. Die Infektion erfolgte mit ca. 10 µl des jeweiligen Virusstocks. Nach Auftreten von 100 % CPE wurden die Zellen für 10 min bei 1300 rpm pelletiert. Der Überstand nach Zentrifugation wurde verworfen, das Pellet in 10 ml PBS aufgenommen. Nach einem Waschschriff von 10 min bei 1300 rpm wurde der Überstand dekantiert und das Pellet in 500 µl 20 mM EDTA (pH 8,0) resuspendiert. Durch die Zugabe von 500 µl 1,2 % SDS kam es zur Lyse der Zellen. Zelluläre genomische DNA und Proteine wurden nach Gabe von 600 µl 5 M NaCl und 24 h bis 72 h Inkubation bei 4 °C präzipitiert. Zelldebris wurde im Anschluss durch Zentrifugation bei 14000 rpm für 30 min bei 4 °C entfernt. Der Überstand wurde einer Phenol/Chloroform Extraktion unterzogen, um verbleibende Proteine von der DNA zu trennen. Ein Volumen Phenol/Chloroform wurde zum Überstand gegeben und für 10 min im Drehrad gemischt. Nach Zentrifugation bei 4 °C und 14000 rpm für 10 min reicherte sich die DNA in der oberen wässrigen Phase an und wurde

vorsichtig in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt. Um die DNA nicht durch Scherkräfte zu beeinträchtigen, wurden alle Schritte mit abgeschnittenen Pipettenspitzen durchgeführt. Um eine weitere Aufreinigung zu ermöglichen, wurde eine Fällung mit Ethanol durchgeführt. Hierfür wurde zur DNA-Lösung 0,6 Volumen 100 % Ethanol zugegeben, und diese nach vorsichtigem Invertieren für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Hierbei erfolgte die Präzipitation der DNA. Nach einem Zentrifugationsschritt für 10 min bei 10000 rpm und 4 °C wurde das Pellet mit 1 Volumen 70 % Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet, in 50 µl 1x TE Puffer resuspendiert und bei 4 °C gelagert bis zur Verwendung im Southern Blot (2.19.4).

2.21.5 Bestimmung des Wachstumsverhalten von MHV-68 *in vitro*

Wachstumskurven wurden erstellt um das Replikationsverhalten der rekombinanten Viren im Vergleich zum Wildtyp Virus zu bestimmen.

NIH3T3 Zellen ($0,3 \times 10^6$ Zellen/Loch) wurden am Tage vor der Infektion in 6-Loch-Platten umgesetzt und bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Die Infektion erfolgte mit einer MOI von 0,1. Für die verschiedenen Zeitpunkte (0, 24, 48, 72 und 96 h) wurde eine Virussuspension von 5 ml hergestellt, und pro Virus und Loch 1 ml zugegeben. Der Zeitpunkt 0 h stellt die „Input“ Kontrolle dar, diese wurde direkt bei – 80 °C eingefroren. Nach 60 min Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde die Viruslösung abgesaugt und durch frisches DMEM ersetzt. Die 6-Loch-Platten wurden zu den einzelnen Zeitpunkten (0, 24, 48, 72 und 96 h) bei - 80 °C eingefroren. Die Ernte der Viren erfolgte durch zweimaliges Frieren und Tauen der Zellen und der Gewinnung des Überstandes nach Zentrifugation (10 min, 2500 rpm). 1 ml des Überstandes wurde entnommen und bis zur Titerbestimmung (2.21.3) bei - 80 °C gelagert.

2.21.6 Bestimmung der Viruslast in mit den rekombinanten MHV-6 Viren infizierten Splenozyten mittels quantitativer PCR

Nach Infektion von C57BL/6 Mäusen (2.22.1) mit den verschiedenen rekombinanten Viren wurden am Tag 17 nach Infektion die Tiere euthanasiert und die Milzen entnommen. Nach Aufarbeitung der Splenozyten wurde ein Teil in den *ex vivo* Reaktivierungsassay (2.22.3)

eingesetzt. Der andere Teil wurde in Portionen zu 3×10^7 Milzzellen/ml bei -80 °C eingefroren. Zur Bestimmung der Viruslast wurden die einzelnen Aliquots aufgetaut und die DNA isoliert (2.19.15). Nach Konzentrationsbestimmung (2.19.4) der Proben im Photometer wurde die DNA in die quantitative PCR (qPCR, auch real-time PCR) eingesetzt.

Die qPCR beruht auf der normalen Reaktion der PCR, ermöglicht aber weiterhin die Quantifizierung der DNA durch Messungen von Fluoreszenz Farbstoffen, welche an die DNA binden. Die Fluoreszenzsignale während der PCR ermöglichen die Quantifizierung nach Ablauf der PCR Reaktion.

Für die qPCR im TaqMan[®] System wird neben den spezifischen Primern noch eine Sonde benötigt. Diese Sonde ist an ihrem 5' Ende mit einem Reporter Farbstoff (z.B. FAM) und am 3' Ende mit einem so genannten Quencher (z.B. TAMRA) markiert. Im Ausgangszustand liegen Reporter und Quencher in räumlicher Nähe zueinander und der Reporter kann seine Energie auf den Quencher übertragen. Kommt es zur Denaturierung der DNA in der PCR Reaktion, hybridisiert die Sonde an den komplementären DNA Strang. Trifft während der Elongationsphase die Taq-Polymerase auf den Reporter, wird dieser durch die 5'-3' Exonukleaseaktivität hydrolysiert. Reporter und Quencher werden räumlich getrennt, der Reporter zeigt nun seine Eigenstrahlung und überträgt keine Energie mehr auf den Quencher. Diese steigende Reporter-Fluoreszenz kann nun gemessen werden. Zur Kontrolle wird ein Referenz-Gen mitgeführt, welches eine relative Quantifizierung erlaubt.

Für den PCR Lauf wird die DNA im optimalen Falle auf eine Konzentration von 100 ng/ 2 μ l eingestellt. Für die Quantifizierung des viralen Gens gB und des Referenz-Gens L8 wurde die benötigte Probenanzahl ausgerechnet. Neben den Doppelansätzen für jede einzelne Probe wurden die Ansätze für die Standardkurve und Negativkontrollen miteinberechnet. Die Standardkurve bestand bei beiden Genen aus den Verdünnungsstufen $10^1 - 10^8$. Im Anschluss wurde der Master Mix angesetzt. Der 1x Master Mix bestand aus:

12,5 μ l TaqMan[®] Universal PCR Master Mix
1,5 μ l Sonde (je gB oder L8)
1,5 μ l Primer Rev (je gB oder L8)
1,5 μ l Primer For (je gB oder L8)
6 μ l H₂O

23 μ l pro Probe

23 µl des Master Mix/Vertiefung wurde in eine 96-Loch Mikrotiterplatte vorgelegt, die DNA (2 µl/Vertiefung) zugegeben, die Platte kurz abzentrifugiert und sofort im 7300 Real Time PCR System (TaqMan®) gemessen. Der PCR Lauf bestand aus folgenden Zyklen:

1. Initial-Denaturierung bei 95 °C für 10 min (1 Zyklus)
2. Denaturierung bei 95 °C für 15 sek (40 Zyklen)
3. Hybridisierung/Elongation bei 60 °C für 1 min (40 Zyklen)

Die Auswertung erfolgte mit dem Programm des 7300 Real Time PCR System. Für das virale gB Gen, wie auch für das zelluläre Referenzgen L8 wurden Standardkurven ($10^1 - 10^8$) mitgeführt. Aufgrund der Standardkurven konnten den gemessenen Ct-Werten der eingesetzten Proben entsprechende Quantitäten zugeordnet werden. Um die Kopienanzahl zu bestimmen wurden die Werte des viralen gB auf die Werte des Referenzgens bezogen. Dazu wurde folgende Formel verwendet: Anzahl gB/Anzahl L8 * 1000.

2.22 Tierexperimentelle Methoden

2.22.1 Infektion von Versuchstieren

Für die in dieser Arbeit durchgeführten *in vivo* Experimente wurden durchgehend weibliche C57BL/6 Mäuse verwendet. Die Infektion erfolgte in der Sterilbank. Nach Infektion der Tiere wurden die Mäuse in individuell belüfteten Käfigen (VentiRack™) gehalten und unter der Sterilbank untersucht und euthanasiert. So konnte die Infektionsgefahr für andere Tiere ausgeschlossen werden. Die Mäuse wurden intranasal (i.n.) oder intraperitoneal (i.p.) infiziert. Die gewünschte Viruskonzentration von MHV-68 wurde mit sterilem PBS eingestellt. Bei der i.n. Infektion wurden die Mäuse im Vorfeld mit einer Mischung aus Xylazin/Ketamin (50/15 mg/kg) narkotisiert. Nach erfolgter Narkose wurde jeder Maus die Virussuspension (30 µl Virus in PBS) langsam und vorsichtig auf die Nasenöffnung getropft. Über Einatmung wird das Virus von den Mäusen aufgenommen. Zur i.p. Infektion wurden die Mäuse ohne Narkose infiziert. 250 µl der Virussuspension wurden vorsichtig in die untere linke Seite des Bauchraumes injiziert.

2.22.2 Gewinnung von Organhomogenaten

Die Tiere wurden zu bestimmten Zeitpunkten nach Infektion mittels CO₂-Begasung euthanasiert. Zum Nachweis der lytischen Replikation des Virus wurde der linke Lungenflügel entfernt und nachfolgend in den Plaqueassay (2.21.3) eingesetzt.

Nach Entfernung des Fells und Desinfektion mit 80%igem Ethanol wurde der Thorax geöffnet, der Lungenflügel entnommen, in ein steriles Mikroreaktionsgefäß überführt, und danach bei – 80 °C eingefroren. Zur Homogenisierung des Gewebes wurden die Proben mit 500 µl GMEM versetzt und auf Eis aufgetaut. Die Homogenisierung der Proben erfolgte mit speziellen Röhrchen im FastPrep-24 Gerät nach Angaben und mit Materialien des Herstellers. Nach einer 10 sek Behandlung bei 4 m/sek wurde das Homogenat in ein Mikroreaktionsgefäß zurückgegeben und entweder sofort für die Titration in den Plaqueassay (2.21.3) eingesetzt oder bei – 80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Für den *ex vivo* Reaktivierungsassay und die Bestimmung der Viruslast in den Splenozyten wurden den infizierten Mäusen die Milzen entnommen. Nach Euthanasierung der Tiere wurde unterhalb des linken Rippenbogens das Fell entfernt und desinfiziert. Die Bauchhaut wurde durchtrennt und die Milz mittels einer sterilen Pinzette entnommen. Nach Entfernung des Fettgewebes wurde die Milz in ein Gefäß mit DMEM überführt. Für die Titerbestimmung mittels Plaqueassay (2.21.3) wurden die Milzen direkt bei – 80 °C eingefroren und dann mittels FastPrep-24-Gerät homogenisiert. Nach Bestimmung des Milzgewichtes wurden die Splenozyten im *ex vivo* Reaktivierungsassay isoliert (2.22.3).

2.22.3 Isolation der Splenozyten und Einsatz in den *ex vivo* Reaktivierungsassay

Aus den infizierten Mäusen wurden die Milzen entfernt und in den Reaktivierungsassay eingesetzt. Die Milzen wurden vorsichtig zwischen zwei sterilen Objektträgern zerrieben, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Die Zellen plus Medium wurden in einer Petrischale gesammelt und komplett in neue 50 ml Röhrchen überführt, diese wurden auf Eis gelagert bis alle Milzen eines Experimentes zerrieben waren. Danach erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 1500 rpm und 4 °C. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit Zugabe von 5 ml Erythrozyten-Lysepuffer leicht resuspendiert. Eine 5minütige Inkubation bei Raumtemperatur führte zur Lyse der im Pellet vorhandenen Erythrozyten. Nach Zugabe von 8

ml DMEM und einem Waschschrift bei 1500 rpm für 5 min und 4 °C wurde das Pellet in 6 – 8 ml DMEM (je nach Größe der Milz) aufgenommen, durch ein Zellsieb filtriert und auf Eis gelagert.

Ein Aliquot wurde für die Bestimmung der Zellzahl entnommen. Hierfür wurde eine 1:30 Verdünnung mit Trypan-Blau und 4%iger Essigsäure angesetzt und in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

Je drei Mäuse wurden mit einem der rekombinanten Viren infiziert. Jede Milz wurde einzeln aufgearbeitet und nach der Bestimmung der Zellzahl wurde je ein 1 ml Aliquot jeder Milz einer Virusgruppe vereint. Aus diesem 3 ml Ansatz wurden Verdünnungsreihen erstellt und in den *ex vivo* Reaktivierungsassay eingesetzt.

Die Milzzellen wurden mit einer Anfangskonzentration von $1,5 \times 10^5$ Zellen/Vertiefung dreifach verdünnt und die Hälfte der Verdünnungen auf am Tag vorher umgesetzte NIH3T3 Zellen pipettiert. Es wurden $7,5 \times 10^3$ NIH3T3 Zellen in 200 μ l/ Vertiefung ausgesät. Pro Verdünnungsstufe wurden 24 Vertiefungen mit je 100 μ l Milzzellen versetzt. Über den Kontakt der NIH3T3 Zellen mit den latent infizierten Milzzellen kommt es zur Reaktivierung des viralen Genoms. Nach 7 – 14 Tagen werden die Zellen auf vorhandenen CPE überprüft. Die Vertiefungen der Platten, die positiv sind für CPE, werden ausgezählt und der prozentuale Wert je Verdünnung bestimmt. Ein Wert von 63,2 % wird benutzt, um die Frequenz der Reaktivierung mit Hilfe des Programmes SigmaPlot 10.0 (Pharmacology/Standard Curve Analysis) zu berechnen.

Ein weiterer Teil der Splenozyten-Verdünnungen wird benutzt, um das Vorhandensein von lytischem Virus in der Milz zu bestimmen. Diese Zellen werden mittels eines zweimaligem Einfrier- und Auftauprozess zerstört und ebenfalls in Verdünnungsstufen auf NIH3T3 Zellen gegeben. Latent vorhandenes Virus kann aus den zerstörten Zellen nicht reaktivieren, ein auftretender CPE in dieser Co-Kultur wird durch lytisches Virus hervorgerufen. Nach 7 – 14 Tagen wurden die Vertiefungen auf CPE überprüft. Bei allen in dieser Arbeit durchgeführten *ex vivo* Reaktivierungsassays konnte kein lytisches Virus an Tag 17 oder 42 p.i. nachgewiesen werden.

Weiterhin wurden Splenozyten eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt deren DNA isoliert (2.19.5). Die DNA wurde in der quantitativen real-time PCR (2.21.6) eingesetzt, um die Viruslast, also die Anzahl viraler Genome in den Zellen, zu ermitteln. Die PCR Befunde geben Auskunft darüber, ob eine reduzierte oder erhöhte Frequenz der Reaktivierung mit einer erniedrigten oder stärkeren Viruslast in den Zellen einhergeht.

2.23 Proteinbiochemische Methoden

2.33.1 Nachweis von rekombinanten M10aHA-tag im Western Blot Verfahren

Im Western Blot Verfahren wird ein Proteingemisch mit Hilfe der Gelelektrophorese in einer Trägermatrix (SDS-PAGE) entsprechend Größe und Ladung aufgetrennt. Die Proteine werden dann nach der *Tank-blotting*-Methode von dem Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrozellulosemembran elektrotransferiert. Die Detektion des Proteins erfolgt durch Bindung an einen primären Antikörper, der gegen das gewünschte Protein gerichtet ist. Ein markierter sekundärer Antikörper lässt das Protein dann auf dem Röntgenfilm sichtbar werden.

NIH3T3 Zellen (1×10^5 Zellen/Loch) wurden am Tage vor der Infektion in 24-Loch-Platten umgesetzt. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂ wurden die Zellen mit einer MOI von 0,1 PFU in einem Volumen von 100 µl/Loch mit dem Virus M10aHA-tag infiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion (0, 16, 24, 48, 72 und 96 h) wurden die infizierten Zellen sowie die dazugehörigen nichtinfizierten Kontrollen geerntet. Dazu wurde das Medium abgenommen, der Überstand gewonnen und die Zellen 2x mit eiskaltem PBS gewaschen. Das Lysat wurde dann in 300 µl 2x SB Puffer resuspendiert und mit dem Überstand bei – 20 °C eingefroren. Vor dem Einsetzen in das Polyacrylamid-Gel wurden die Proben für je 15 sek mit Ultraschall behandelt. Pro Probe wurden 15 µl abgenommen, in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt, 5 min bei 99 °C denaturiert und anschließend auf Eis gelagert.

Nach Zusammenbau der Gelkammer wurde zuerst das 10 %ige Trenngel aus 1,5 M TRIS (pH 8,8), 10 % SDS, 30 % Polyacrylamid, 1 % APS, 0,04 % TEMED und H₂O gegossen. Etwa 7 ml Trenngel wurden sofort in die Gelkammer eingefüllt, und mit ca. 2,5 ml Überschichtungspuffer (1,5 M TRIS plus H₂O im Verhältnis 1:8) aufgefüllt. Nach der Polymerisation des Gels, durch Zugabe der Katalysatoren APS und TEMED, wurde das 4 %ige Sammelgel aus 0,5 M TRIS (pH 6,8), 10 % SDS, 30 % Acrylamid, 1,5 % APS, 0,1 % TEMED und H₂O gegossen. Nach Dekantieren des Überschichtungspuffers wurde das Sammelgel sofort in die Gelkammer gefüllt und der Gelkamm eingesteckt. Nach 20 – 30 min wurde der Kamm entfernt und die Proben aufgetragen. Der Lauf erfolgte mit 1x Laufpuffer bei 80 V für 30 min, und dann bei 120 V, bis die Lauffront des Auftragspuffers aus dem Gel heraustrat.

Im Anschluss erfolgte der Transfer auf die Nitrozellulosemembran. Die Membran und sechs Whatmanfilterpapiere wurden auf Größe des Gels zurechtgeschnitten. Die Blottingkammer wurde nach folgendem Schema zusammengebaut: je ein Schwamm auf eine Seite, darüber wurden jeweils drei Whatmanfilterpapiere gelegt. Die Membran wurde in H₂O äquilibriert und danach in Blottingpuffer eingelegt. Das Gel wurde ebenfalls mit Blottingpuffer befeuchtet. Die Membran wurde dann, möglichst ohne Luftblasen, auf eine Seite der Kammer gelegt, das Gel auf die Membran. Hierbei war zu beachten, dass das Aufeinanderlegen so erfolgt, dass die Proteine aufgrund ihrer negativen Ladung zur Anode der Blot-Apparatur wandern können. Die Blottingkammer wurde geschlossen und in die Blot-Apparatur eingesetzt. Der Transfer erfolgte bei 120 V für etwa 60 min. Der erfolgreiche Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran konnte, wenn gewünscht, mit einer 1minütigen Anfärbung mit Ponceau-Rot überprüft werden. Die Blockierung der nicht besetzten Bindestellen für die Proteine, um unspezifische Bindungen des primären Antikörpers zu verhindern, wurde durch eine 2-3stündige Inkubation in TBS/Tween mit 10 % Magermilchpulver erreicht. Nach dreimaligem waschen mit TBS/Tween wurde die Membran über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper (1:1000 in TBS) inkubiert.

Nach dem nächsten Waschschrift mit TBS/Tween für 5 min, wurde der sekundäre Antikörper (1:1000 in TBS) zugegeben und die Lösung mit der Membran für 60 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Danach folgten erneut drei Waschschriffe mit TBS/Tween (5 Minuten) und einmal mit TBS. Parallel wurde die Färbelösung (Pierce ECL *Western Blotting* Substrat) angesetzt. Die Reagenzien 1 und 2 wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und direkt in einer trockenen Schale auf die Membran gegeben, und für 1 min inkubiert. Die Membran wurde dann in Folie eingeschlagen und anschließend 1 min bis 24 h, je nach Intensität der Signale, auf einem Röntgenfilm exponiert. Die Größenbestimmung der Proteinbande erfolgte mittels des vorgefärbten Molekulargewichtsstandards (Protein-Größenstandard Rainbow Marker).

2.23.2 Immunopräzipitation aus mit M10aHA-tag infizierten NIH3T3 Zellen

Um ein bestimmtes Protein aus einer Lösung aufzukonzentrieren, wird die Methode der Immunopräzipitation (IP) angewandt.

NIH3T3 Zellen wurden mit einer MOI von 0,1 der Viren D8J3, M10aHA-tag infiziert. Nach Auftreten von 100%igem CPE wurden die Zellen geerntet. Hierzu wurden die

Zellkulturüberstände und abtrypsinierte Zellen zweimal mit PBS gewaschen (5 min, 1200 rpm) und das Pellet in 1ml PBS aufgenommen und in ein Mikroreaktionsgefäß überführt. Nach erneuten Waschschrift und der Aufnahme des Pellets in PBS wurde die Suspension geteilt. 1/5 (200 µl) wurde als „Probe vor der IP“ verwendet. Dazu wurde das entnommene Volumen bei 2000 rpm für 5 min zentrifugiert und das Pellet in 40 µl 2x SB-Puffer aufgenommen, 5 min bei 95 °C aufgeköcht und bei – 20 °C bis zum Western Blot gelagert.

Mit der restlichen Probe wurde die IP durchgeführt.

Nach Zentrifugation bei 2000 rpm für 5 min wird das Pellet in 1 ml Standard-Lysepuffer aufgenommen, vorsichtig resuspendiert und für 1 h bei 4 °C auf einem Drehrad lysiert. Das Lysat wurde nach Inkubation für 10 min bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt. Zum Überstand wurden je 20 µl Protein A Beads gegeben. Diese wurden folgender Vorbehandlung unterzogen: 900 µl der Protein A Beads wurden für 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert und der Ethanol im Überstand vorsichtig abgenommen. Nach Zugabe von 5 ml Standard-Lysepuffer (ohne PIC) und erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 250 µl Standard-Lysepuffer resuspendiert und die Beads bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

Nach Zugabe der Beads zum Überstand wurde die Suspension für mindestens 1 h bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 2 min bei 11000 rpm. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und der Antikörper zugegeben. 15 µl des Rat- α -HA-tag Antiköpers wurden zugegeben und das Gemisch bei 4 °C über Nacht im Drehrad inkubiert. Für jede Probe wurde zusätzlich ein Ansatz ohne Antikörper vorbereitet und parallel mitgeführt. Dem Protein-Antikörperkomplex wurden 30 µl der Protein A Beads zugegeben und zur Präzipitation mindestens 3 h bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Im Anschluss wurden die Beads dreimal mit Standard-Lysepuffer gewaschen (2 min, 11000 rpm). Nach dem letzten Waschschrift wurde die überstehende Flüssigkeit vollständig abgesaugt, und das Pellet in 50 µl 2x SB Puffer aufgenommen und für 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Die Proben wurden entweder sofort in den Western Blot eingesetzt oder bei – 20 °C gelagert.

3. ERGEBNISSE

3.1. Generierung rekombinanter Viren mittels BAC Technologie

Eine gängige Methode, um die Rolle eines viralen Gens im Kontext einer Infektion zu untersuchen, ist die Mutagenese des spezifischen Gens und die Analyse des daraus resultierenden Phänotyps *in vitro* und *in vivo*. Im Jahr 2000 wurde MHV-68 als BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*) kloniert (Adler et al. 2000), so dass diese Technologie zur Generierung von rekombinanten Viren verwendet werden konnte. Bei allen in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Viren wurden Teile des M10 Leserahmen von MHV-68 mutiert, um dessen Rolle während der Pathogenese zu untersuchen.

Gezielte Mutationen im viralen Genom können durch verschiedene Strategien eingeführt werden, welche sich in einigen Punkten unterscheiden. Als Beispiele dienen die Virusmutanten OriLyt Δ M10 Δ Tet und M10aHA-tag, welche mit zwei verschiedenen Mutagenese Prozeduren erzeugt wurden. Von jedem erfolgreich generierten rekombinanten Virus wurden Virusstocks erstellt und eine Titerbestimmung durchgeführt, erst dann erfolgte die Anwendung in weiteren *in vitro* und *in vivo* Experimenten. Als Kontrolle diente ein nichtmutiertes Virus („Parentales Virus“), das aus dem Wildtyp MHV-68 BAC rekonstituiert wurde.

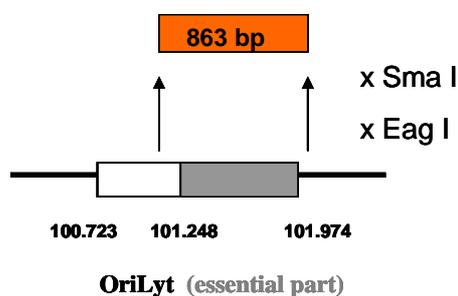
Generierung von OriLyt Δ M10 Δ Tet

Einer der lytischen Replikationsursprünge (OriLyt) von MHV-68 liegt zwischen Position 100.723 und 101.974 im Genom, wobei der essentielle Teil von 101.248 bis 101.947 reicht (Deng et al. 2004). Aus dem Plasmid M10(EagI) in pCR3, welches die MHV-68 Sequenz von Nukleotid 98.833 bis 102.002 trägt und im Labor bereits vorhanden war, wurde mittels der Restriktionsenzyme Sma I und Eag I ein 863 bp großes Fragment gespalten (101.139 bis 102.002). Nach erfolgreicher Isolierung wurden glatte Enden erzeugt und das Fragment in die Bgl II Insertionsstelle des Shuttle Plasmid pST76K-SR-M2 kloniert (Abb.3.1 - 3.3). pST76K-SR-M2 enthält ein ca. 3,8 kb großes Fragment, welches homolog zur MHV-68 Region an

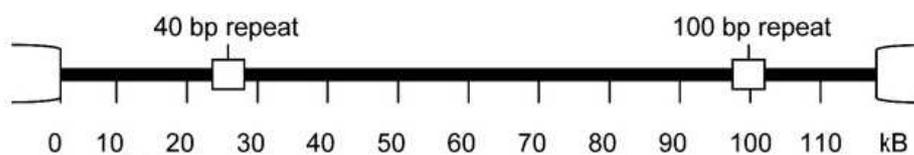
Position 2406 bis 6261 im Genom ist, sowie ein *recA* Gen. Die o.g. Region umspannt die virusspezifischen Gene M1 und M2 sowie benachbarte nichtkodierende Regionen (NCR).

Nach anschließender Ligation und Überprüfung des Konstruktes wurde die Shuttle Mutagenese (2.18.7) durchgeführt. Durch homologe Rekombination kommt es zur Insertion des 836 bp großen OriLyt Fragmentes in das Virusgenom (Abb. 3.4).

Abschließend erfolgte die Rekonstitution von infektiösem Virus in Zellkultur (Abb. 3.5). Nach Anlegen eines Virusstocks und einer Titerbestimmung mittels Plaqueassay wurde die Mutante in weiterführenden Experimenten eingesetzt.



M10 (Eag I) in pCR3
(98.833 – 102.00)



OriLytektopΔM10ΔTet

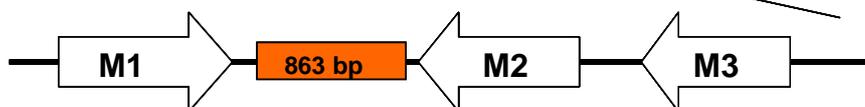


Abb. 3.1 Konstruktion des rekombinanten Virus OriLytektopΔM10ΔTet. Ein 863 bp großes Fragment, welches den essentiellen Teil des OriLyt trägt (orange), wurde mittels Shuttle Mutagenese in das rekombinante Virus ΔM10ΔTet kloniert. Als Insertionsstelle dient eine Region am linken Genomende von MHV-68, welche für die Replikation des Virus nicht benötigt wird.

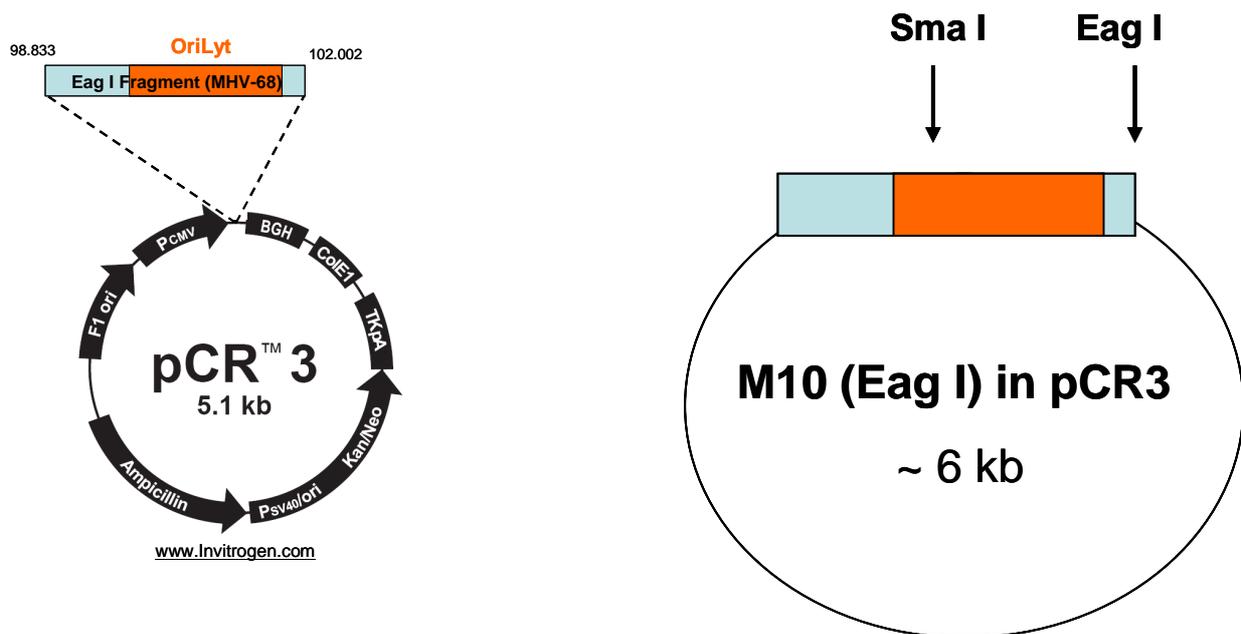
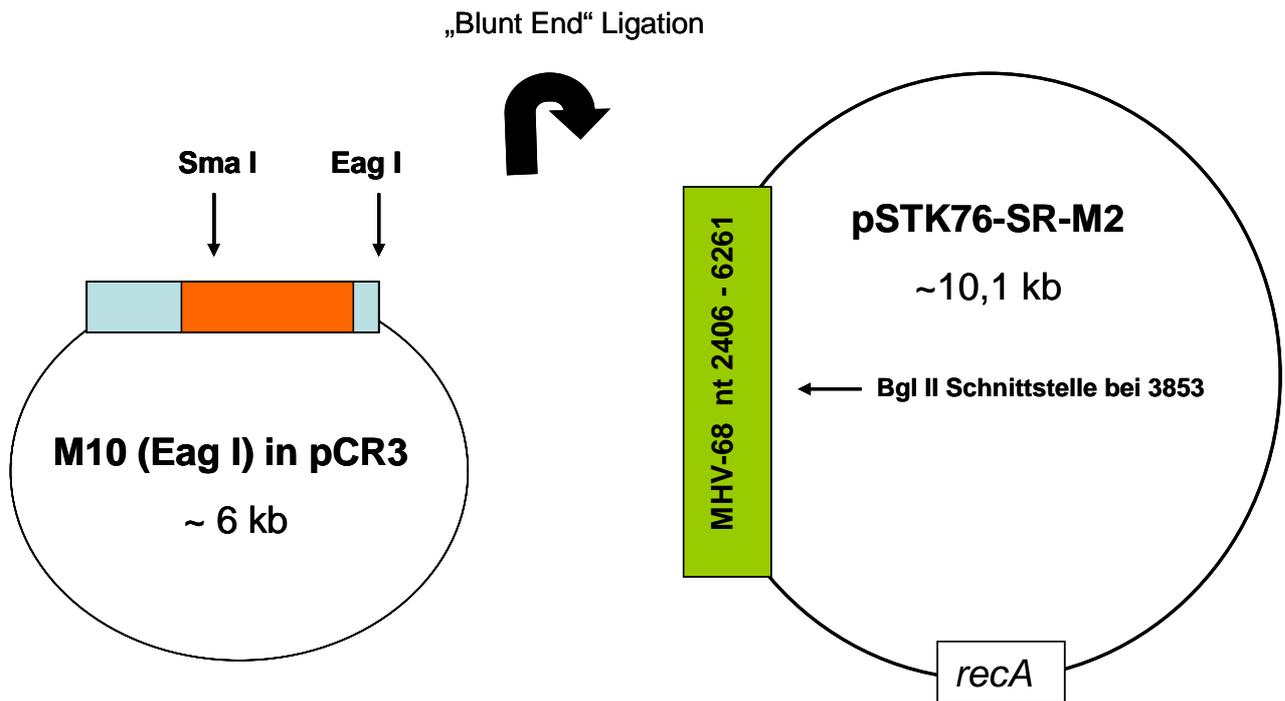


Abb. 3.2 Klonierung des Eag I Fragmentes von MHV-68 in den Vektor pCR3. A) Das Eag I Fragment von MHV-68 wurde in den kommerziellen pCR3 Vektor kloniert. Das Fragment enthält die virale Sequenz von Position 98.833 bis 102.002 (blau), welche den OriLyt (orange) enthält. B) Mit Hilfe der Restriktionsenzyme Sma I und Eag I wurde aus diesem Vektor ein 863 bp großes Stück (Position 101.139 bis 102.002) herausgeschnitten und in die Shuttle Mutagenese (Abb.3.3) eingesetzt.

A)



B)

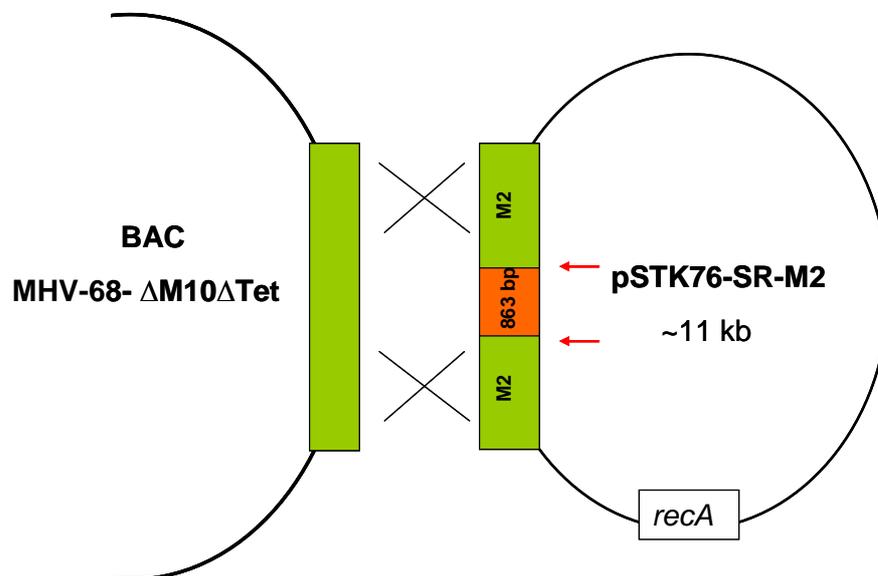


Abb. 3.3 Klonierung des OriLyt Fragmentes in das Shuttle Plasmid pSTK76-SR-M2 und Shuttle Mutagenese. A) Mithilfe der Restriktionsenzyme Sma I und Eag I wird ein 863 bp Fragment, welches den essentiellen Teil des OriLyt trägt, ausgeschnitten, und nach Erzeugung von kompatiblen glatten Enden in die Bgl II Integrationsseite des pST76K-SR-M2 Vektors kloniert. B) Nach Transfektion des Shuttle Plasmides in *E.coli* kommt es zur homologen Rekombination und Insertion des OriLyt Fragmentes in das MHV-68 BAC.

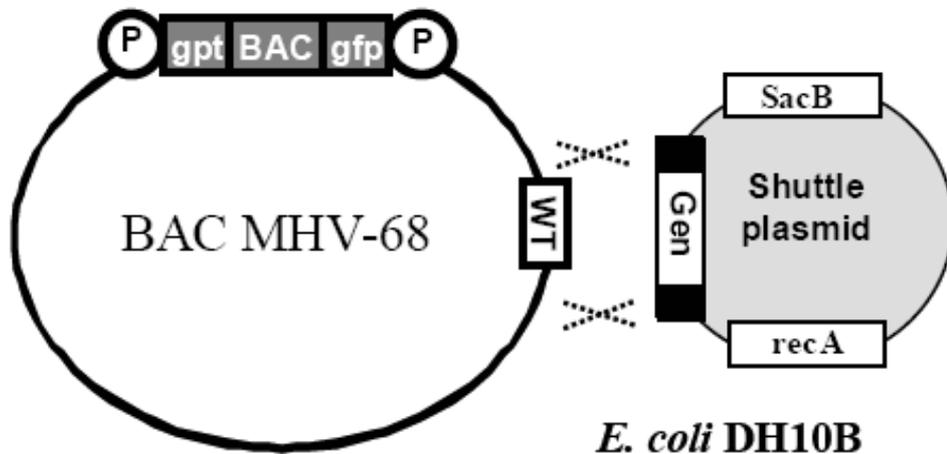


Abb. 3.4 Schematische Darstellung der Shuttle Mutagenese im prokaryontischen System. Neben dem spezifischen Gen trägt das Shuttle Plasmid Sequenzen, welche homolog zu Abschnitten des MHHV-68 Genoms (schwarze Blöcke) sind, sowie Selektionsmarker (SacB) und das *recA* Gen. Durch homologe Rekombination (Kreuze) kommt es in *E.coli* DH10B zur Insertion des spezifischen Gens in das als BAC vorliegende MHHV-68 Genom. Die BAC Kassetten besteht aus der BAC Sequenz (BAC), den Selektionsmarkern *gpt* (*guanosine phosphoribosyl transferase*) und *gfp* (*green fluorescent protein*) sowie zwei lox-P Sequenzen (P). (Adler et al. 2003)

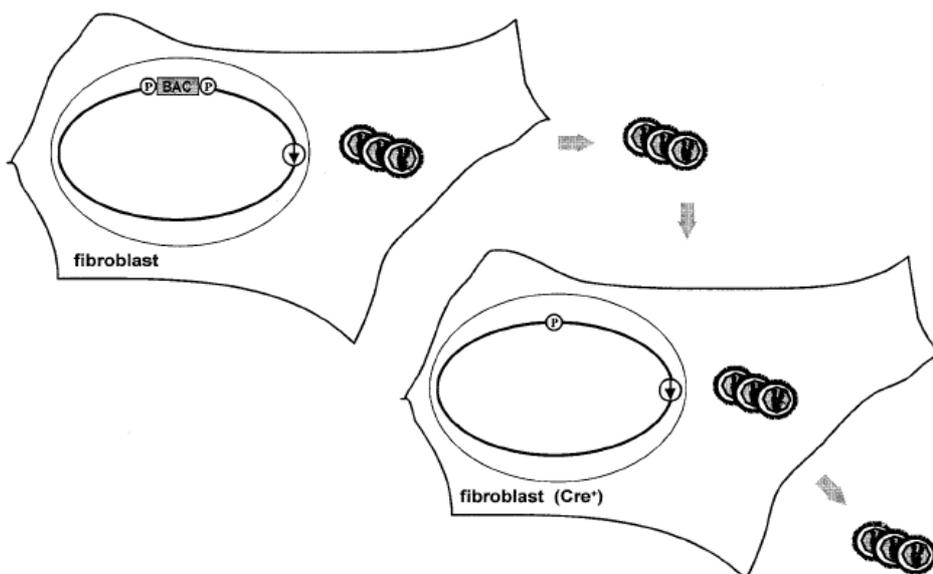


Abb. 3.5 Virusrekonstitution im eukaryontischen System. Nach erfolgreicher Transfektion des MHHV-68 BAC in permissive BHK-21 Zellen erfolgt die Rekonstitution von infektiösen Viruspartikeln. Nach Infektion von REF/Cre Zellen, welche die Rekombinase Cre exprimieren, wird die BAC Kassetten herausgeschnitten. Eine lox-P Sequenz bleibt hierbei erhalten, was das Replikationsverhalten der Viren aber nicht beeinflusst. (Adler et al. 2000)

Generierung von M10aHA-tag

Bislang konnte für den virusspezifischen Leserahmen M10a-c von MHV-68 keine Translation eines funktionellen Proteins gezeigt werden. Um herauszufinden, ob M10a für ein Protein kodiert, wurde ein rekombinantes Virus hergestellt, welches am C-Terminus von M10a ein Epitop, in diesem Fall das Hämagglutinin (HA), trägt. Die HA Sequenz dient der Detektion eines möglichen Proteins mit verschiedenen proteinbiochemischen Methoden.

Das rekombinante Virus wurde, wie in Material und Methoden beschrieben, mit Hilfe des "ET-Cloning" generiert.

Der erste Schritt in der Generierung von M10aHA-tag war das Anhängen des HA an die Sequenz von M10a mit Hilfe einer PCR Reaktion. Das bereits im Labor vorhandene Plasmid pCP16 diente hierbei als Template (Abb. 3. 6). Das lineare Fragment enthält eine Tetrazyklin-Kassette, die von zwei FRT (*FLP recognition target sites*) Sequenzen flankiert wird. Die Tet-Kassette dient der Selektion während der Mutagenese, mit den FRT Sequenzen und der FLP Rekombinase kann diese wieder entfernt werden. Die Primer für die PCR bestehen aus 24 Nukleotiden, die spezifisch an die Tetrazyklin-Kassette binden, sowie 50 Basen, die homolog zur Zielsequenz im MHV-68 BAC sind, in diesem Fall zu Teilen der M10 Region. Der Forward Primer enthält zusätzlich noch die Sequenz des HA. Das entstandene PCR Produkt wurde dann in *E.coli* Bakterien (D8+pKD46) transformiert (Abb. 3.7A). Die Bakterien enthalten das MHV-68 BAC mit den BAC Vektor Sequenzen, den Selektionsmarkern *gpt* und *gfp*, zwei lox-P Sequenzen, sowie das pKD46 Plasmid, welches die *recA1* Sequenz trägt. Durch Rekombination wird das DNA Fragment in das MHV-68 BAC inseriert (Abb. 3.7B). Nach Plasmidisolierung und Analyse der Klone mittels Restriktionsenzymen wurde infektiöses Virus rekonstituiert (Abb. 3.5). Nach einer Überprüfung des Leserahmens durch Sequenzierung wurde ein Virusstock angelegt, der Titer bestimmt und das Virus in *in vitro* Experimenten eingesetzt.

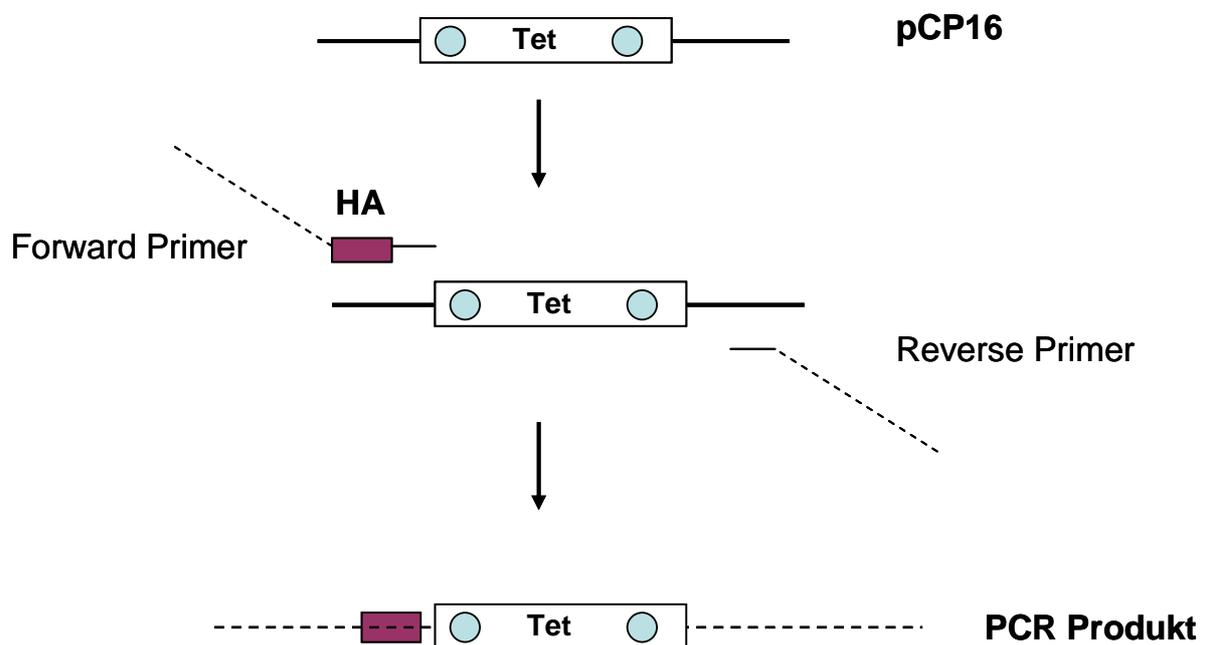
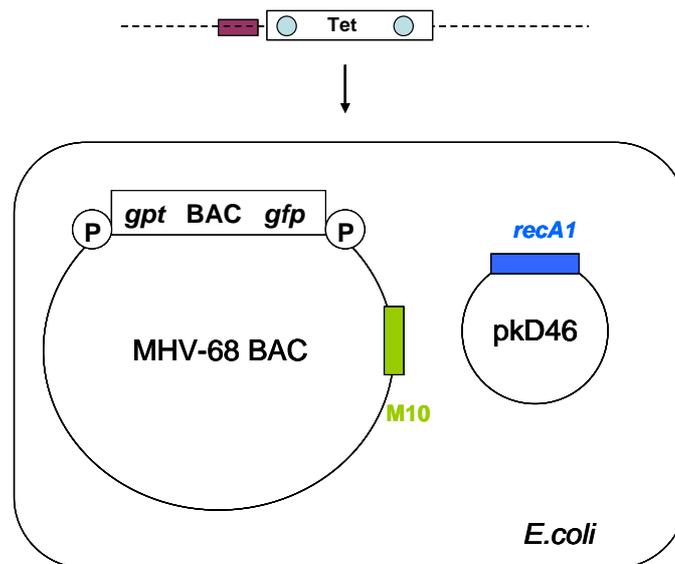


Abb. 3.6 Markierung des M10a Leserahmen mit der Hämagglutinin Sequenz. Das Plasmid pCP16 trägt die Tetrazyklin-Resistenz (Tet), welche von zwei FRT Sequenzen (blaue Kreise) flankiert wird. Die DNA dient als Ausgangsmaterial für die PCR. Die Primer bestehen aus einer 24 Nukleotid langen Sequenz, die homolog zu Teilen der Tetrazyklin-Kassette ist, sowie einem 50 Nukleotid langen Rest (gestrichelte Linie), der homolog zu der Sequenz von M10a ist. Der Forward Primer enthält zusätzlich die HA Sequenz (lila Block). Im unteren Teil ist das Produkt aus der PCR gezeigt.

A)



B)

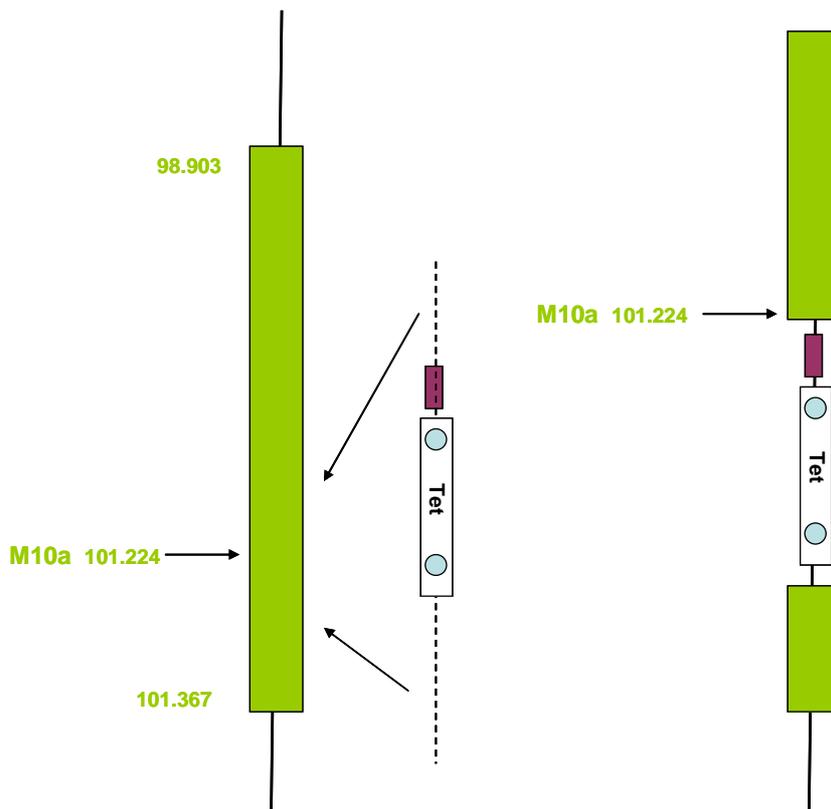


Abb. 3.7 Generierung von M10aHA-tag mittels ET-Cloning. A) Ein lineares DNA Fragment, welches die HA Sequenz, eine Tetrazyklin-Resistenz und Sequenzen, die homolog zu Teilen des M10 Leserahmens sind, trägt, wird in *E. coli* D8+pkD46 transformiert. Die Bakterien tragen ein MHV-68 BAC mit den BAC Vektor Sequenzen (BAC), Selektionsmarkern (*gpt* und *gfp*) und zwei lox-P Sequenzen (P). Zusätzlich enthalten sie das pkD46 Plasmid, welches ein *recA1* Gen enthält. B) Über homologe Rekombination kommt es zur Insertion des Fragmentes in das MHV-68 Genom.

3.2. Im Labor bereits vorliegende rekombinante Viren, die in der Arbeit untersucht wurden

Neben den beiden unter 3.1 beschriebenen Viren wurden in der vorliegenden Arbeit weitere rekombinante Viren untersucht, die bereits im Labor vorlagen. Abbildung 3.8 gibt einen Überblick, welche Viren zur Untersuchung der M10 Region analysiert wurden.

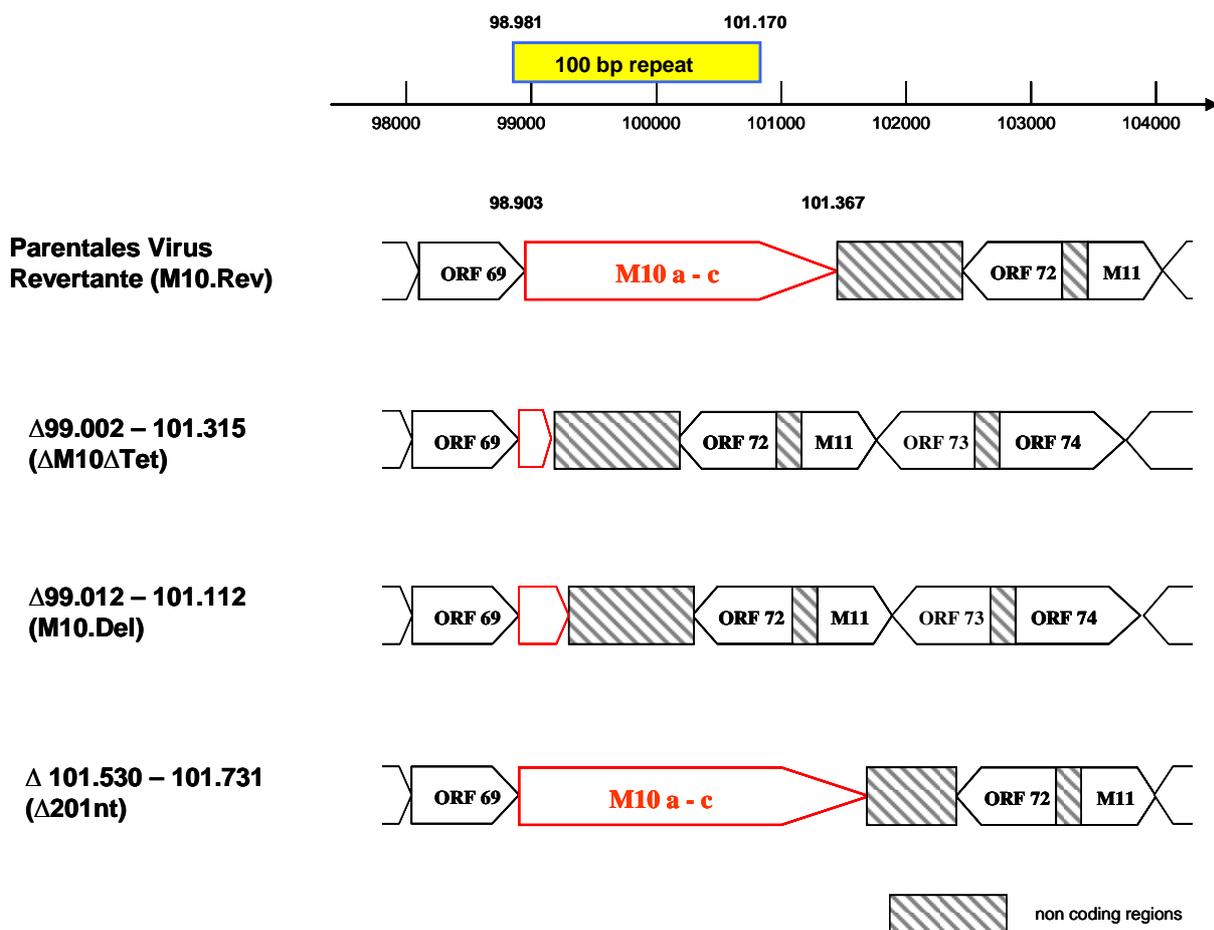


Abb. 3.8 Übersicht über die in der Arbeit verwendeten rekombinanten MHV-68/M10 Viren. In der $\Delta M10\Delta Tet$ Mutante ist bis auf 150bp fast die gesamte Struktur des M10 ORF (roter Pfeil) deletiert. In M10.Del bleiben 58 Nucleotide der 100 bp Struktur und etwa 255 bp des M10 Leserahmens erhalten. Bei $\Delta 201nt$ ist ein 201 bp großer Teil außerhalb der M10 Region von der Deletion betroffen. Bei M10.Rev ist die Deletion des $\Delta M10\Delta Tet$ Virus wieder aufgehoben, sie gleicht dem parental Virus. Die weißen Boxen zeigen die benachbarten Gene der M10-Region, die schraffierten Boxen stehen für nichtkodierende (NCR) Bereiche im Genom.

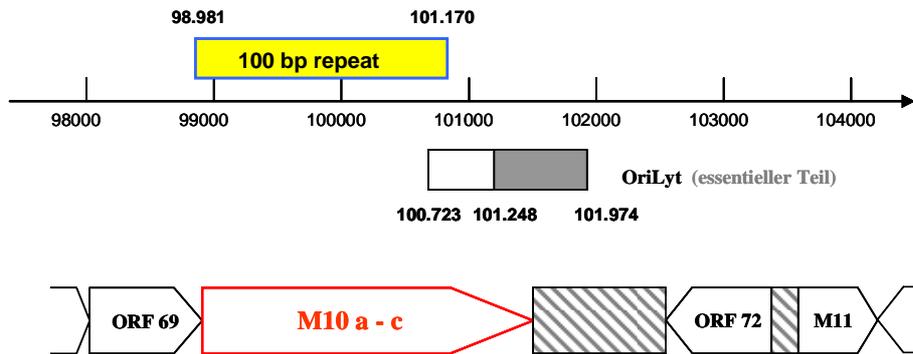
Der M10 Leserahmen reicht von Position 98.903 bis 101.367 im Genom, wobei er die 100 bp Wiederholungsstruktur des Virus an Position 98.981 bis 101.170 beinhaltet (Abb. 1.3.) Bei der Δ M10 Δ Tet Mutante (Δ 99.002 - 101.315) ist bis auf ca. 150 bp der gesamte Leserahmen von M10a-c deletiert, ebenso fehlt die komplette 100 bp Wiederholungssequenz. Im rekombinanten Virus M10.Del (Δ 99.012 - 101.112) bleiben ein kleiner Teil der 100 bp Struktur (58 Nukleotide) und etwa 255 bp des M10 Leserahmen erhalten. Die M10 Region ist somit bei der Δ M10 Δ Tet Mutante durch die Mutation stärker betroffen als bei dem rekombinanten Virus M10.Del. Die M10.Revertante basiert auf der Δ M10 Δ Tet Mutante, deren fehlende Sequenz ist in diesem Virus wiederhergestellt worden. Sie gleicht dem parentalen Virus.

Zwischen dem M10 Leserahmen (98.903 – 101.367) und dem benachbarten MHV-68 Gen, ORF72 (102.426 – 103.181), liegt einer der lytischen Replikationsursprünge (OriLyt) von MHV-68. Der OriLyt erstreckt sich von Position 100.723 bis 101.974 im Genom, wobei der essentielle Teil, der für die virale Replikation unentbehrlich ist (Deng *et al.* 2004), zwischen 101.248 und 101.974 liegt (Abb. 3.9A).

In dem rekombinanten Virus Δ 201nt sind mit der Mutation von Position 101.530 bis 101.731 201 bp dieses essentiellen Teils betroffen. Bei der Mutante Δ M10 Δ Tet ist der komplette nichtessentielle Teil des OriLyt (100.723 - 101.248) durch die Mutagenese zerstört, ebenso wie 123 bp des essentiellen Teils. Bei M10.Del erstreckt sich die Deletion auf 447 bp der nichtessentiellen Region des OriLyt, die entscheidende Sequenz des OriLyt ist nicht betroffen (Abb. 3.9B)

Ein weiteres in dieser Arbeit verwendetes rekombinantes Virus ist OriLyt Δ M10 Δ Tet. Bei dieser Mutante wurde ein 863 bp großes Fragment des OriLyts von MHV-68 (101.139 – 102.002) ektop in die Δ M10 Δ Tet Mutante eingesetzt (Abb.3.1.).

A)



B)

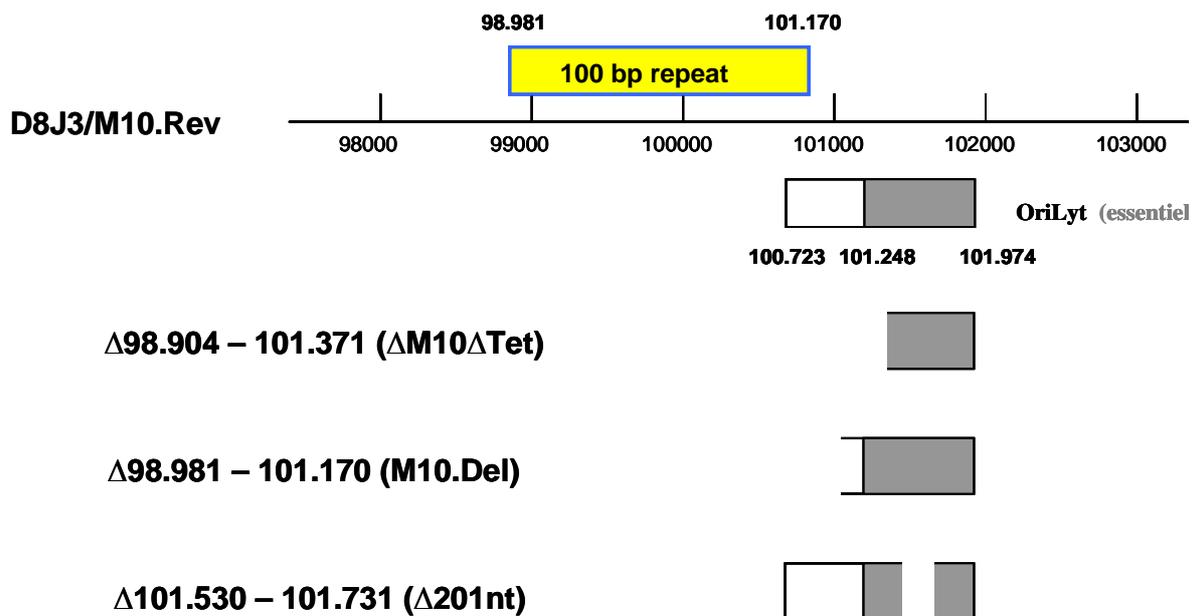


Abb. 3.9 Der Replikationsursprung (OriLyt) von MHV-68 wird durch die Mutationen in den rekombinanten M10 Viren beeinträchtigt. A) Gezeigt ist ein Ausschnitt aus dem MHV-68 Genom, welcher die Region um den M10 Leserahmen schematisch darstellt. Die M10 ORFs M10a, b und c (rot) und die Position der 100 bp Wiederholungssequenz (gelb) sind gezeigt. Der OriLyt erstreckt sich von Position 100.723 bis 101.974 im Genom (weiß-grauer Balken), wobei der essentielle Teil (grau) von 101.248 bis 101.974 reicht. B) Dargestellt sind die Deletionen innerhalb der OriLyt Region, wie sie in den einzelnen rekombinanten Viren auftreten. Bei $\Delta M10\Delta Tet$ und $\Delta 201nt$ ist der essentielle Teil des OriLyt betroffen, bei M10.Del ist ein Teil der nicht essentiellen Sequenz zerstört.

3.3. Analyse der rekombinanten Viren auf genomischer Ebene

Die Genomstruktur der rekombinanten Viren wurde mit Hilfe von Restriktionsanalysen und dem Southern Blot Verfahren überprüft, um zu testen, ob die Deletionen und Insertionen im viralen Genom an der richtigen Position vorliegen. Die erste Überprüfung mittels Restriktionsenzymen erfolgte unmittelbar nach der Plasmidisolierung und vor der Rekonstitution der infektiösen Viren (Daten nicht gezeigt). Nach Produktion des Virusstocks wurden NIH3T3 Zellen infiziert, die virale DNA isoliert und im Southern Blot eingesetzt.

Die rekombinanten Viren M10.Del und Δ M10 Δ Tet tragen Deletionen im Bereich von 99.000 bis etwa 101.315 im Genom. Die Sonde für die Detektion im Southern Blot wurde demnach so gewählt, dass sie in diesem Bereich liegt. Aus dem Plasmid Hind-III-D, welches bereits im Labor vorhanden war, wurde mit dem Restriktionsenzym Eco RI ein 949 bp großes Fragment erzeugt. Hind-III-D trägt die genomische Sequenz von MHV-68 von Position 95.678 bis 104.035. Eco RI schneidet an Position 102.217 und 103.166 dieser Sequenz. Das 949 bp lange Produkt des Restriktionsverdau wurde aufgereinigt, markiert und zur Hybridisierung eingesetzt. Die virale DNA wurde mit dem Enzym Pst I verdaut. Pst I erzeugt Restriktionsschnitte an Position 89.560 sowie 103.121. Beim parentalen Virus, welches eine intakte M10 Region besitzt, sollte somit im Southern Blot eine Bande bei 13,561 kb erscheinen. Die beiden mutierten Viren M10.Del und Δ M10 Δ Tet, bei denen Teile der M10 Region deletiert sind, zeigen kleinere Banden, bei 11,461 kb (M10.Del) und 11,248 kb (Δ M10 Δ Tet). Bei der M10.Revertante ist die Deletion wieder aufgehoben, sie sollte einen intakten M10 Locus haben und sich wie das parentale Virus verhalten. In Abb. 3. 10A ist die Auswahl der Sonde, in B der Southern Blot gezeigt.

Δ 201nt trägt eine 201 bp Deletion, die von Position 101.530 bis 101.731 im Genom reicht. Die virale DNA wurde mit dem Enzym Sac I behandelt. Sac I schneidet an Position 98.461 und 102.042 im Genom. Das entstandene Fragment von 3,380 kb wurde im Southern Blot mit folgender Sonde detektiert: aus dem Plasmid Hind-III-D wurde mit den Restriktionsenzymen Sma I (schneidet bei 101.141) und Sac I (schneidet bei 102.045) ein 904 bp langes Fragment ausgeschnitten, welches aufgereinigt, markiert und zur Hybridisierungsreaktion im Southern Blot eingesetzt wurde. Abb. 3. 10A zeigt die Position der Sonde und C den Southern Blot. Zum Vergleich wurde die virale DNA des parentalen Virus mitgeführt. Nach Restriktion mit Sac I entsteht bei diesem Virus eine Bande bei 3,581 kb.

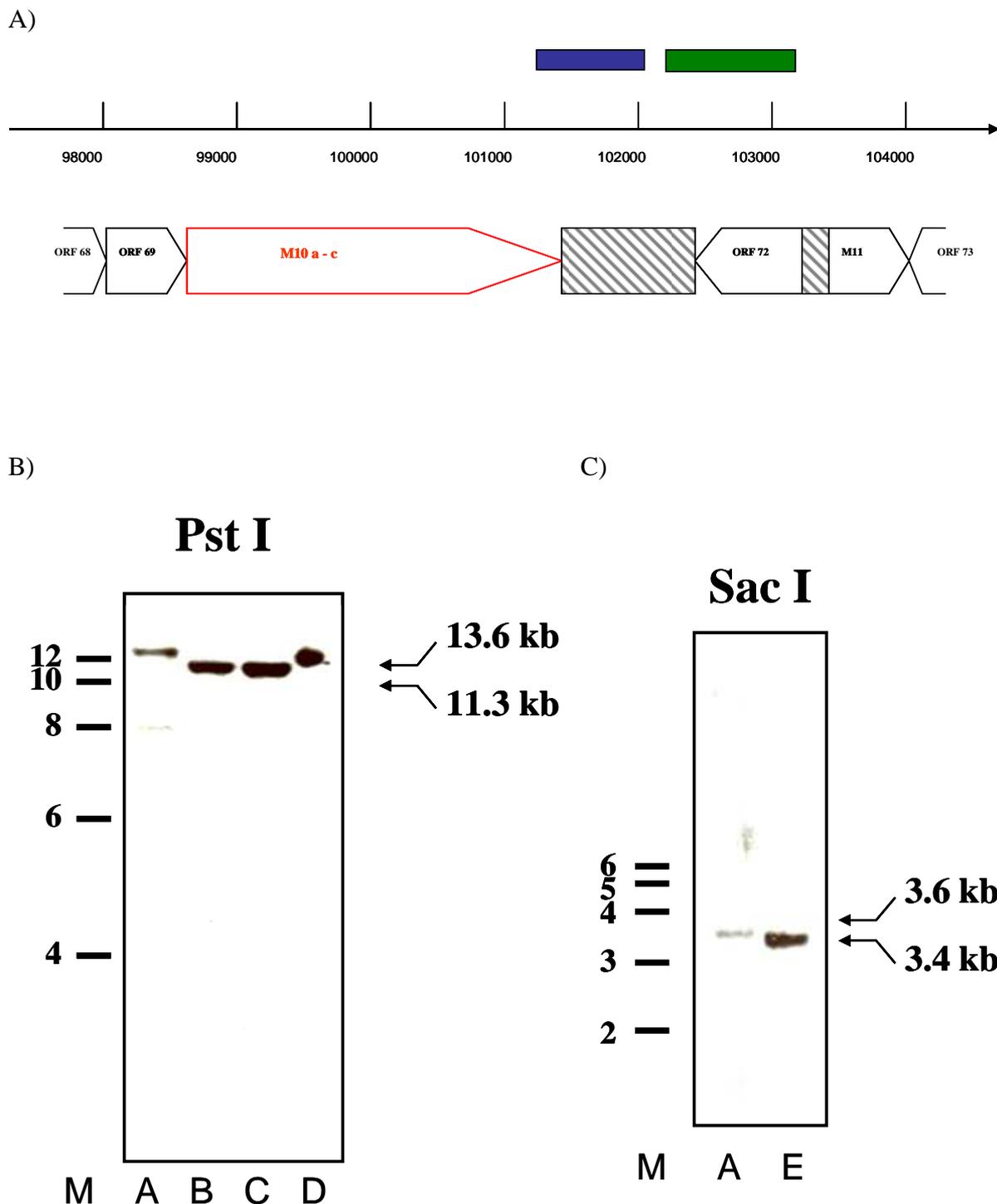


Abb. 3. 10 Kontrolle der rekombinanten Viren durch das Southern Blot Verfahren.

A) Auswahl der Sonde für die Detektion von M10.Del, Δ M10 Δ Tet und M10.Revertante (grün) sowie Δ 201nt (blau). B) Southern Blot Analyse. Nach Restriktion der viralen DNA von D8J3 (A), Δ M10 Δ Tet (B), M10.Del (C), M10.Revertante (D) sowie Δ 201nt (E) mit Pst I bzw. Sac I erfolgte der Transfer der DNA auf eine Nitrozellulosemembran zur Hybridisierung mit der Dioxigenin-markierten Sonde. Die Auftrennung der DNA erfolgte in der Agarosegelelektrophorese bei unterschiedlichen Laufzeiten (16h nach Pst I Verdau und 10 h nach Sac I Verdau) und 60 V. Die schwarzen Pfeile markieren die detektierten Signale nach Exposition der Membran auf einem Röntgenfilm. M zeigt den Größenmarker.

3.4. Mutationen im M10 Leserahmen beeinflussen das Replikationsverhalten von MHV-68 *in vivo*, nicht aber *in vitro*

Nach erfolgreicher Herstellung der Virusmutanten (Abb. 3.8) wurde das Replikationsverhalten der Viren *in vitro* und *in vivo* getestet. Um herauszufinden, ob die Mutation der M10 Region von MHV-68 in den rekombinanten Viren Δ M10 Δ Tet und M10.Del einen Einfluss auf die Replikation des Virus hat, wurde in allen Experimenten zum Vergleich das parentale Virus mitgeführt, um eine mögliche Veränderung des Phänotyps sichtbar zu machen. Weiterhin sollte herausgearbeitet werden, ob es einen Unterschied im Wachstumsverhalten der rekombinanten Viren untereinander gibt.

Untersuchungen *in vitro*

Zuerst wurde das Replikationsverhalten der Viren *in vitro* getestet. Hierfür wurden NIH3T3 Fibroblasten mit den rekombinanten Viren Δ M10 Δ Tet und M10.Del sowie dem parentalen Virus infiziert (MOI von 0,1). An verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion wurden die Zellen geerntet und der Virustiter mittels Plaqueassay bestimmt (Abb. 3.11). Gezeigt sind vier unabhängig voneinander durchgeführte Wachstumskurven. Wie in der Grafik zu sehen, zeigen die Titer nach Infektion mit den rekombinanten Viren Δ M10 Δ Tet und M10.Del einen ähnlichen Verlauf. Die Titer nach Infektion mit dem parentalen Virus liegen schon in kurzer Zeit nach Infektion (0 bis 24 h) auf einem höheren Niveau als die der Mutanten, und bis 96 h p.i. zeigen sich moderat höhere Werte (1/2 bis eine Log-Stufe Unterschied). Die M10 Deletionsmutanten zeigen somit ein leicht erniedrigtes Replikationsverhalten *in vitro*. Alle drei rekombinanten Viren wurden im weiteren *in vivo* auf ihr Replikationsverhalten untersucht.

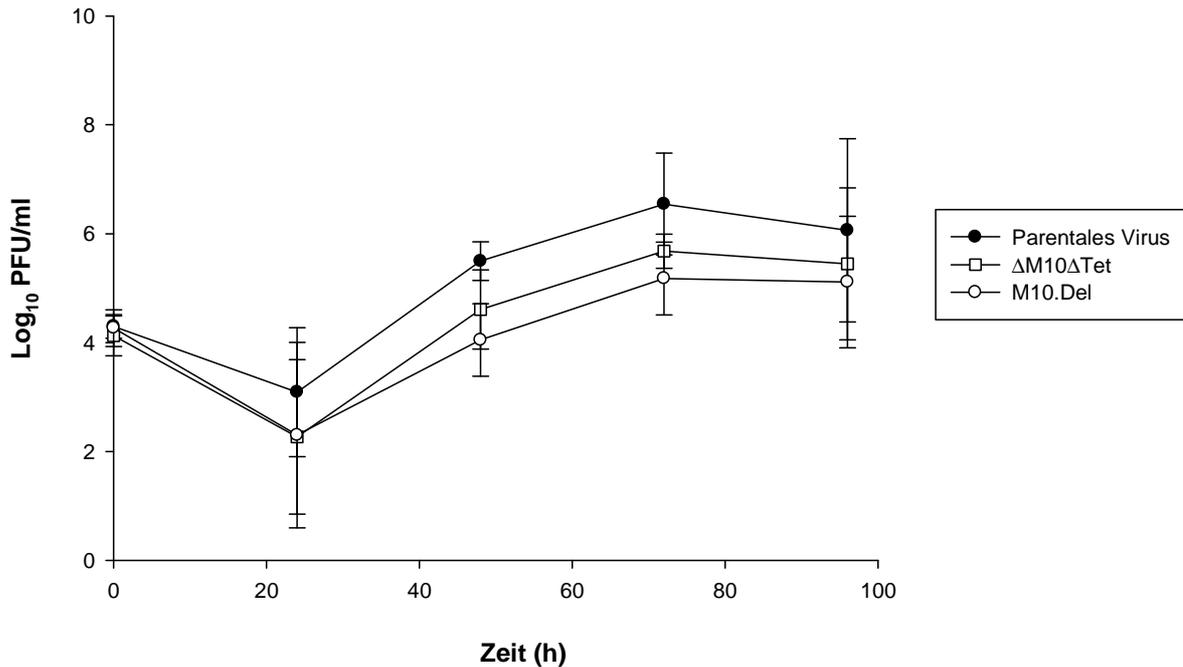


Abb. 3.11 Wachstumsanalyse von Δ M10 Δ Tet, M10.Del und parentalem Virus. NIH3T3 Zellen wurden mit einer MOI = 0,1 der rekombinanten Viren infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 24, 48, 72 und 96 h) nach Infektion geerntet. Der Virustiter wurde mittels Plaqueassay auf BHK-21 Zellen bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Untersuchungen *in vivo*

a) lytische Replikationsphase

Um herauszufinden, wie sich die einzelnen Mutanten während der lytischen Infektionsphase *in vivo* verhalten, wurden C75BL/6 Mäuse intranasal mit $5 \cdot 10^4$ PFU Δ M10 Δ Tet, M10.Del und dem parentalen Virus infiziert. 6 Tage später wurden die einzelnen Mäuse euthanasiert und jeweils die linken Lungenflügel entnommen. Die Organe wurden homogenisiert und mittels Plaqueassay auf infektiöse Partikel titriert. Die Titer der einzelnen Lungen, aus bis zu neun voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten mit je drei Mäusen pro Virus, sind in Abb. 3.12 dargestellt. Gegenüber den Werten nach Infektion mit dem parentalen Virus

liegen die Virustiter nach Infektion mit $\Delta M10\Delta Tet$ signifikant niedriger. Während die Titer des parentalen Virus im Durchschnitt bei 3,6 Log_{10} PFU/ml lagen, sind es nach Infektion mit $\Delta M10\Delta Tet$ 1,7 Log_{10} PFU/ml. Die Virustiter in den Lungen der mit M10.Del infizierten Mäuse sind im Vergleich zu denen nach Infektion mit dem parentalen Virus ebenfalls signifikant erniedrigt (3,6 zu 2,9 Log_{10} PFU/ml Virus; $p < 0,005$), aber nicht so stark wie nach Infektion mit der $\Delta M10\Delta Tet$ Mutante ($p < 0,0005$). Bei drei Lungen von Mäusen aus zwei unterschiedlichen Experimenten konnte kein Virus nachgewiesen werden.

Eine Mutation in der M10 Region von MHV-68 scheint somit die akute lytische Replikation in der Lunge von C57BL/6 Mäusen nach intranasaler Infektion stark zu beeinträchtigen. Im Vergleich zur Infektion mit dem parentalen Virus, wo der M10 Leserahmen intakt ist, liegen die viralen Titer um bis zu zwei log-Stufen niedriger.

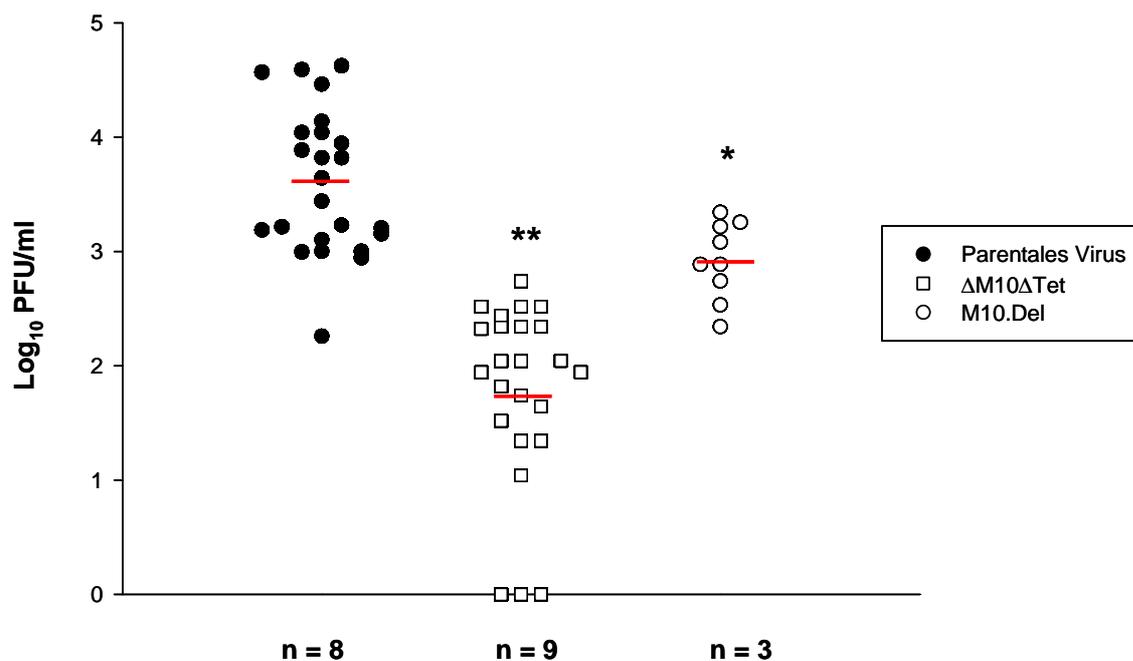


Abb. 3.12 Lytische Replikation von $\Delta M10\Delta Tet$, M10.Del und parentalem Virus in der Lunge. C57BL/6 Mäuse wurden i.n. mit $5 \cdot 10^4$ PFU infiziert. An Tag 6 p.i. wurden die Lungen entnommen und der Virustiter mittels Plaqueassay auf BHK-21 Zellen ermittelt. Gezeigt sind die Titer der einzelnen Mäuse aus mehreren unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit je drei Mäusen pro Gruppe. Die roten Balken zeigen den Mittelwert. n = Anzahl der Experimente. Der Unterschied zwischen den Titern nach Infektion mit $\Delta M10\Delta Tet$ und M10.Del, verglichen mit denen des parentalen Virus, ist statistisch signifikant mit ** = $p < 0,0005$ ($\Delta M10\Delta Tet$), sowie * = $p < 0,005$ (M10.Del), ermittelt mit dem Student's t-test.

b) Latenzphase

Die Parameter zur Charakterisierung der latenten Infektionsphase sind die auftretende Splenomegalie (Vergrößerung der Milz), die Reaktivierungsfrequenz (bestimmt durch den *ex vivo* Reaktivierungsassay) und die Viruslast in den infizierten Splenozyten. C57BL/6 Mäuse wurden intranasal mit $5 \cdot 10^4$ PFU des jeweiligen Virus (Δ M10 Δ Tet, M10.Del und parentalem Virus) infiziert. 17 Tage p.i. wurden die Mäuse euthanasiert und die Milzen entnommen. Um die Splenomegalie nach Infektion zu bestimmen, wurden die einzelnen Milzen gewogen. Das Milzgewicht ist in Abbildung 3.13 dargestellt. Es wurden bis zu neun voneinander unabhängige Experimente durchgeführt. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Milzgewichten nach Infektion mit dem parentalen Virus und Δ M10 Δ Tet. Während die Milzgewichte nach Infektion mit dem parentalen Virus im Durchschnitt bei 405 mg liegen, sind es nach Infektion mit der Mutante 180 mg. Nichtinfizierte Mäuse zeigen an Tag 17 p.i. ein Milzgewicht von 70 - 100 mg (Daten nicht gezeigt). Nach Infektion mit dem rekombinanten Virus M10.Del liegt das Milzgewicht mit 340 mg nur geringfügig niedriger als nach Infektion mit dem parentalen Virus. Die Deletion des gesamten M10 Leserahmens, wie sie in dem rekombinanten Virus Δ M10 Δ Tet vorliegt, hat einen starken Einfluss auf die Etablierung der Splenomegalie nach i.n. Infektion.

Die Reaktivierungsfrequenz der Viren aus den latent infizierten Splenozyten kann mit Hilfe des *ex vivo* Reaktivierungsassays, wie in 2.22.3 beschrieben, bestimmt werden. Es wurden bis zu neun unabhängig voneinander durchgeführte Experimente ausgewertet. Die Reaktivierungsfrequenz (Abb. 3.14) liegt bei mit dem parentalen Virus infizierten Mäusen bei einem Reaktivierungsereignis in 16.887 Zellen, bei mit der Mutante M10.Del infizierten Mäusen bei 1: 69.972 und somit fast 4fach niedriger. Die Häufigkeit der Reaktivierung in mit Δ M10 Δ Tet infizierten Zellen konnte nicht berechnet werden, ein Wert von 63,2 % für CPE positive Vertiefungen wurde nicht erreicht. Eine Reaktivierung aus dem latenten Infektionszyklus ist bei den beiden Mutanten Δ M10 Δ Tet und M10.Del, in denen der M10 Leserahmen von MHV-68 mutiert ist, stark beeinträchtigt.

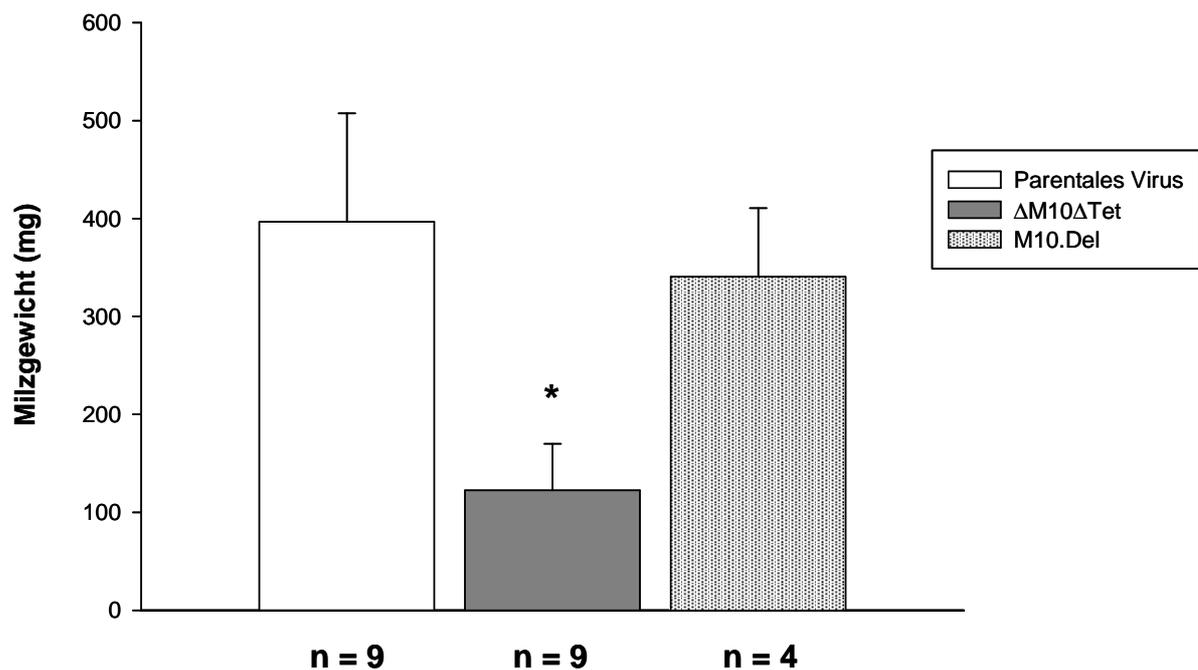


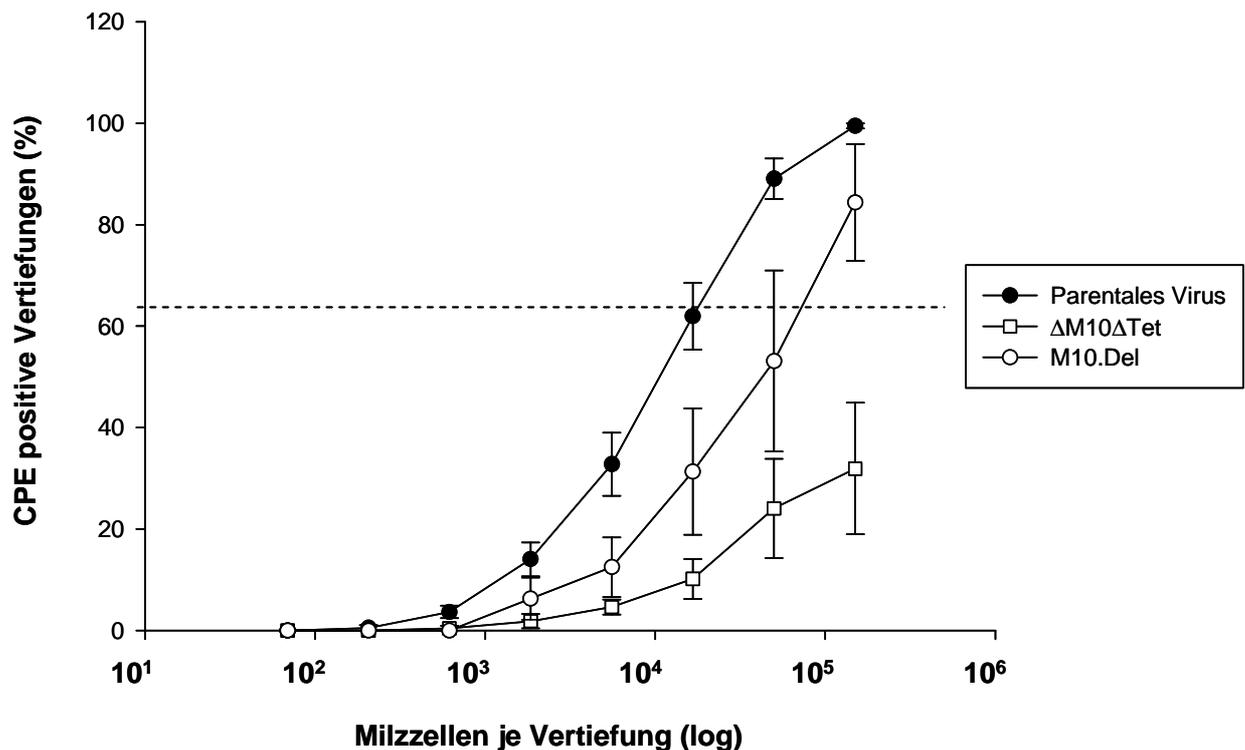
Abb. 3.13 Bestimmung des Milzgewichtes nach intranasaler Infektion mit Δ M10 Δ Tet, M10.Del und parentalem Virus. C57BL/6 Mäuse wurden i.n. mit $5 \cdot 10^4$ PFU infiziert. An Tag 17 p.i. wurden die Milzen entnommen und das Milzgewicht bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD aus mehreren unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. n = Anzahl der durchgeführten Experimente mit je drei Mäusen/Experiment. Der Unterschied im Milzgewicht nach Infektion mit dem parentalen Virus gegenüber der Mutante Δ M10 Δ Tet ist statistisch signifikant mit * = $p < 0,0005$, bestimmt durch den Student's t-test.

Weiterhin wurde mittels quantitativer PCR die Viruslast, also die Anzahl viraler Genome in den Splenozyten an Tag 17 p.i. ermittelt (Abb. 3.15).

Nach Infektion mit dem parentalen Virus sowie dem rekombinanten Virus M10.Del finden sich 48 bzw. 44 Kopien des viralen gB pro 1000 Kopien des zellulären L8. Die Zellen welche mit Δ M10 Δ Tet infiziert wurden zeigen mit 4 viralen Genomen pro 1000 Kopien L8 signifikant weniger als nach Infektion mit dem parentalen Virus.

Die signifikant erniedrigte Splenomegalie sowie die reduzierte Reaktivierungsfrequenz nach Infektion mit dem rekombinanten Virus Δ M10 Δ Tet an Tag 17 p.i. (Abb. 3.13 und 3.14) geht einher mit einer niedrigen Viruslast in den Splenozyten. Für das parentale Virus, welches eine intakte M10 Region beinhaltet, zeigt sich eine deutliche Splenomegalie und eine hohe

Reaktivierungsfrequenz, einhergehend mit einer hohen Viruslast. Nach Infektion mit M10.Del zeigt sich im Vergleich zum parentalen Virus eine leicht erniedrigte Splenomegalie und Reaktivierungsfrequenz, in der Viruslast findet sich im Durchschnitt aber eine nahezu gleiche Kopienanzahl.



Frequenz der Reaktivierung:

Parentales Virus	1: 16.887
ΔM10ΔTet	< 63,2% CPE positive Vertiefungen
M10.Del	1: 69.972

Abb. 3.14 Ex vivo Reaktivierung von Splenozyten nach intranasaler Infektion von C57BL/6 Mäusen mit ΔM10ΔTet, M10.Del und parentalem Virus. C57BL/6 Mäuse wurden i.n. mit $5 \cdot 10^4$ PFU infiziert. 17 Tage p.i. wurden die Milzen entnommen und aufgearbeitet. Nach 7 - 10tägiger Co-Kultivierung der Splenozyten mit NIH3T3 Zellen wurde das Auftreten von CPE in den einzelnen Vertiefungen ausgezählt. Dargestellt sind mehrere unabhängig voneinander durchgeführte Experimente mit n = 8 (D8J3), n = 9 (ΔM10ΔTet) und n = 3 (M10.Del). Je Experiment wurden drei Mäuse pro Virusgruppe verwendet und die Milzen dieser Mäuse zu einer Probe vereinigt. Die Strichlinie zeigt den Wert von 63,2 %, welcher benutzt wurde, um die Reaktivierungsfrequenz der Viren zu bestimmen. Der Unterschied in der Reaktivierung aus den Splenozyten nach Infektion mit dem parentalen Virus verglichen mit den Mutanten ist statistisch signifikant mit p = 0,027 (ΔM10ΔTet) und p = 0,045 (M10.Del), berechnet mit dem Student's t-test.

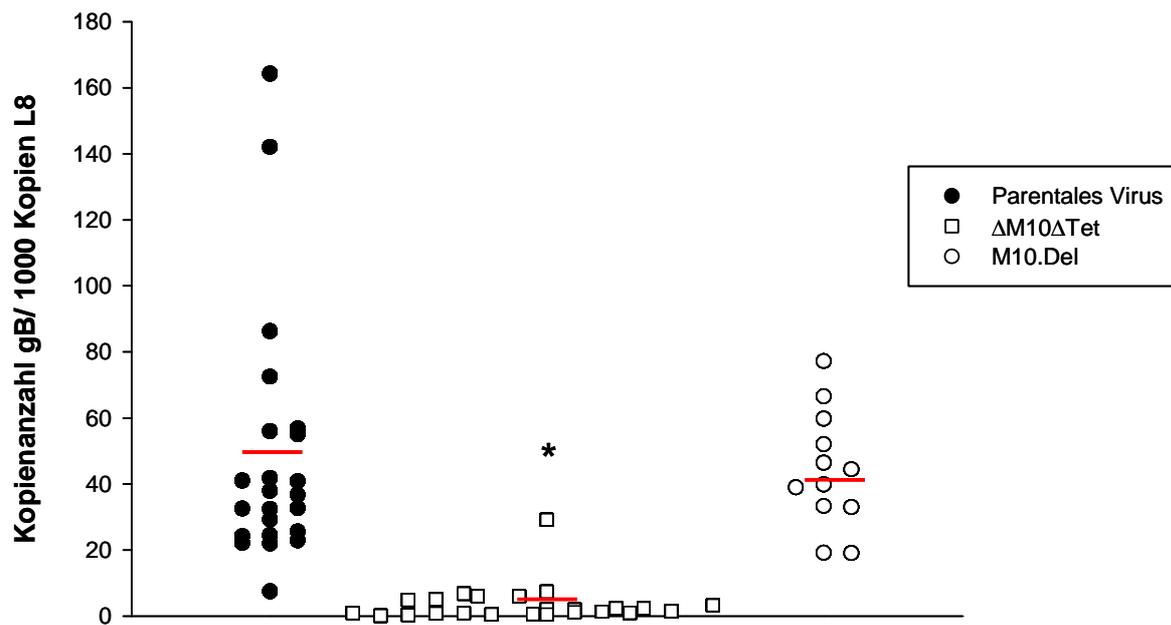


Abb. 3.15 Latente Viruslast in den Milzzellen der mit $\Delta M10\Delta Tet$, M10.Del und parentalem Virus infizierten Mäusen. C57BL/6 Mäuse wurden i.n. mit $5 \cdot 10^4$ PFU infiziert. 17 Tage p.i. wurden die Milzen entnommen, die DNA isoliert und in der quantitativen real-time PCR eingesetzt. Dargestellt sind die Werte der Einzelmäuse aus 8 ($\Delta M10\Delta Tet$, parentales Virus) bzw. 4 (M10.Del) Experimenten mit je drei Mäusen pro Gruppe. Die roten Balken zeigen den jeweiligen Mittelwert. Der Stern zeigt die statistische Signifikanz von $p < 0,005$ zwischen den Werten nach Infektion mit dem parentalen Virus und $\Delta M10\Delta Tet$ (Student's t-test).

Die Parameter der lytischen und latenten Replikationsphase sind nach Infektion mit den M10 Deletionsmutanten $\Delta M10\Delta Tet$ und M10.Del stark reduziert, nach Infektion mit $\Delta M10\Delta Tet$ ist der Unterschied im Vergleich zum parentalen Virus signifikant. Die Deletion des M10 Leserahmens von MHV-68 scheint die Pathogenese stark zu beeinflussen.

3.5. Der Phänotyp, der nach Infektion mit den rekombinanten Viren Δ M10 Δ Tet und M10.Del auftritt, lässt sich auf die Deletion innerhalb der M10 Region zurückführen

Um sicherzustellen, dass die Veränderung des Phänotyps der M10 Mutanten durch eine Deletion des M10 ORF hervorgerufen wird, und nicht durch eine unbeabsichtigte Mutation an anderer Stelle des MHV-68 Genoms im Zuge der Shuttle Mutagenese, wurde eine M10.Revertante auf der Basis des rekombinanten Δ M10 Δ Tet Virus generiert. In dieser Revertante wurde die Sequenz des parentalen Virus wieder hergestellt (Abb. 3.8.). Zu erwarten ist, dass dieses Virus den auftretenden Phänotyp *in vitro* und *in vivo* revertiert.

Untersuchungen *in vitro*

Untersucht wurde das Wachstumsverhalten der rekombinanten Viren M10.Revertante, Δ M10 Δ Tet und des parentalen Virus in NIH3T3 Zellen. Nach Infektion mit einer MOI von 0,1 wurden die Zellen an verschiedenen Zeitpunkten geerntet und die viralen Titer mittels Plaqueassay bestimmt. Abbildung 3.16 zeigt die Resultate aus vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Nach Infektion der Zellen mit der Δ M10 Δ Tet Mutante zeigt sich, wie bereits vorher beschrieben (Abb. 3.11), ein moderates Wachstumsdefizit verglichen mit dem Replikationsverhalten des parentalen Virus. Nach Infektion mit der M10.Revertante hebt sich dieser Unterschied wieder auf. Die Titer liegen im gesamten Verlauf auf einem Niveau mit den Werten des parentalen Virus. Die M10.Revertante, in welcher die Deletion des M10 ORF wiederhergestellt ist, zeigt *in vitro* das gleiche Replikationsverhalten wie das parentale Virus.

Untersuchungen *in vivo*

a) lytische Replikationsphase

Nach intranasaler Infektion von C57BL/6 Mäusen mit dem parentalen Virus, $\Delta M10\Delta Tet$ und der M10.Revertante wurden an Tag 6 die Lungen entnommen, und die Anzahl der infektiösen Viruspartikel in der Lunge mittels Plaqueassay bestimmt (Abb. 3.17).

Es zeigt sich, dass die Titer nach Infektion mit der M10.Revertante auf einer Höhe mit den Werten nach Infektion mit dem parentalen Virus liegen. Im Durchschnitt ergeben sich Titer von 3,6 und 3,7 Log_{10} PFU/ml, während der Titer nach Infektion mit der M10 Deletionsmutante $\Delta M10\Delta Tet$ signifikant erniedrigt ist (1,7 Log_{10} PFU/ml). Mit der M10.Revertante wurden 5 unabhängige Experimente mit je drei Mäusen pro Virus durchgeführt, und in allen Proben lagen die Virustiter über den Werten der mit $\Delta M10\Delta Tet$ infizierten Mäuse und auf einer Ebene mit den Titern des parentalen Virus.

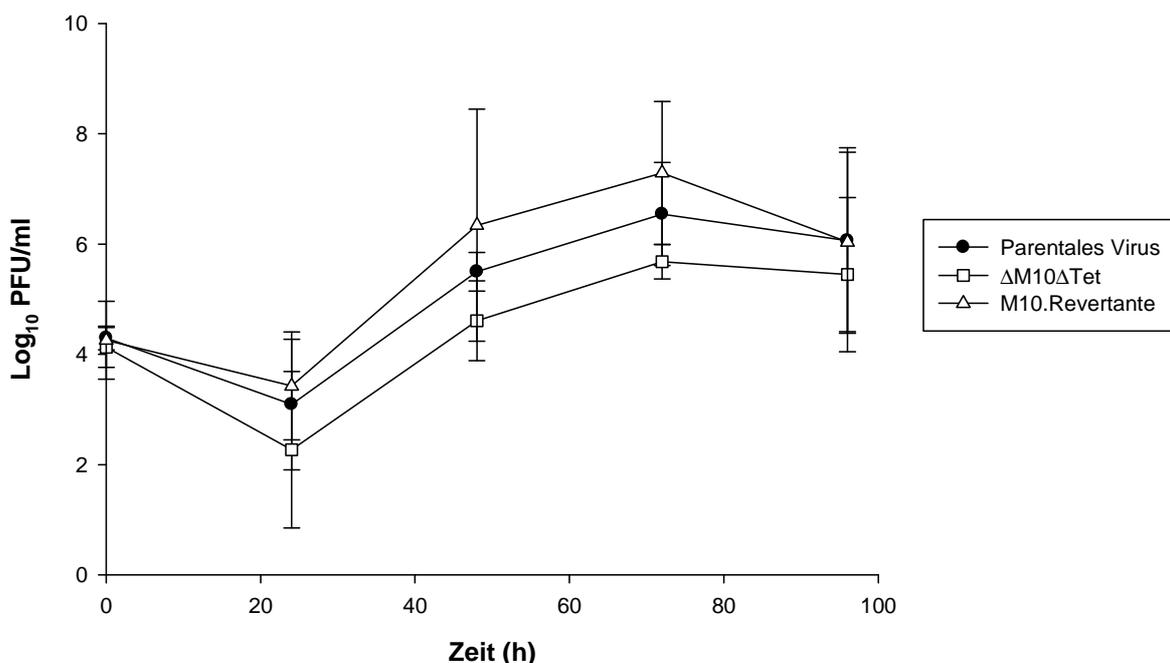


Abb. 3.16 Wachstumsanalyse von $\Delta M10\Delta Tet$, M10.Revertante und parentalem Virus. NIH3T3 Zellen wurden mit einer $\text{MOI} = 0,1$ infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 24, 48, 72 und 96 h) nach Infektion geerntet. Der Virustiter wurde mittels Plaqueassay auf BHK-21 Zellen bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

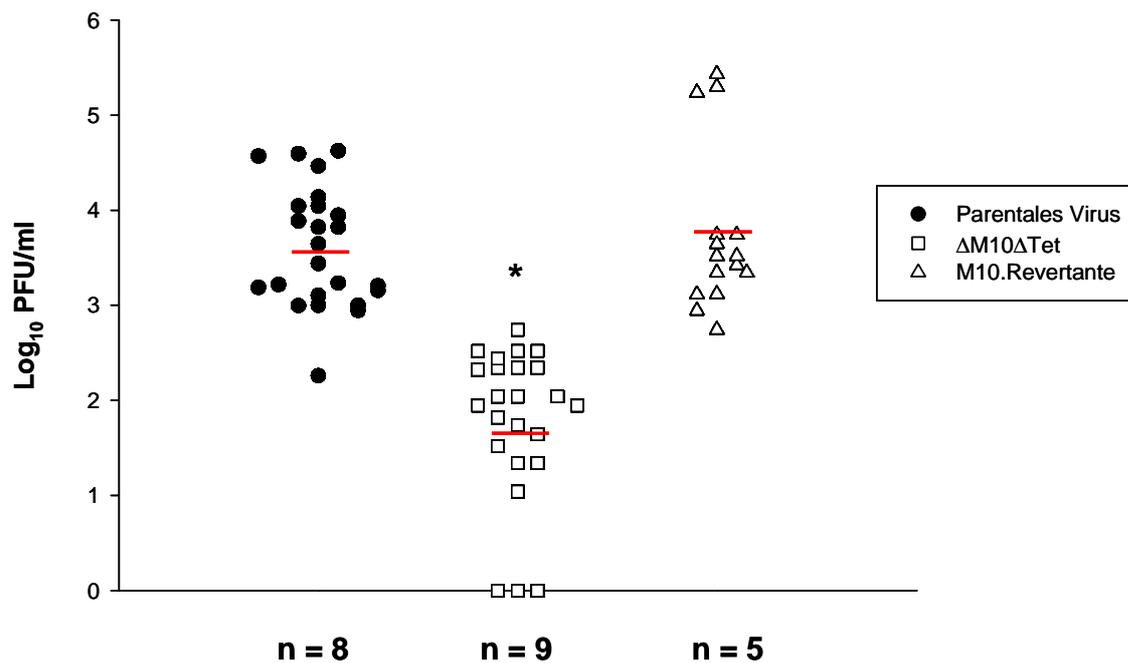


Abb. 3.17 Lytische Replikation von $\Delta M10\Delta Tet$, M10.Revertante und parentalem Virus in der Lunge. C57BL/6 Mäuse wurden i.n. mit $5 \cdot 10^4$ PFU infiziert. An Tag 6 p.i. wurden die Lungen entnommen und der Virustiter mittels Plaqueassay auf BHK-21 Zellen ermittelt. Gezeigt sind die Titer aus mehreren unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Der rote Balken zeigt den Mittelwert. n = Anzahl der Experimente mit je drei Mäusen pro Virus. Der Unterschied zwischen den Titern nach Infektion mit dem parentalen Virus und der M10.Revertante gegenüber der $\Delta M10\Delta Tet$ Mutante ist statistisch signifikant mit $* = p < 0,0005$, ermittelt mit dem Student's t-test.

b) Latenzphase

Für die Bestimmung der latenten Replikationsphase der rekombinanten Viren *in vivo* wurden C57BL/6 Mäuse intranasal mit $5 \cdot 10^4$ PFU $\Delta M10\Delta Tet$, M10.Revertante und dem parentalen Virus infiziert. An Tag 17 p.i. wurden die Tiere euthanasiert, die Milzen entnommen und aufgearbeitet.

Abbildung 3.18 zeigt das Ausmaß der Splenomegalie in den infizierten Mäusen. Dargestellt sind bis zu neun unabhängig durchgeführte Experimente mit je drei Mäusen pro Virus. Nach Infektion mit dem parentalen Virus zeigt sich eine starke Splenomegalie, die Milzgewichte liegen im Durchschnitt bei 405 mg. Ein nahezu gleicher Wert wird erreicht nach Infektion mit

der M10.Revertante, bei welcher die Deletion des M10 Leserahmen (Δ M10 Δ Tet) wiederhergestellt ist. Die Milzgewichte liegen hier im Durchschnitt bei 360 mg.

Nach Infektion mit der Mutante Δ M10 Δ Tet ist die Splenomegalie signifikant erniedrigt, das Milzgewicht erreicht im Durchschnitt nur 180 mg, und liegt damit im Bereich der Werte von nicht infizierten Tieren (70 – 100 mg, Daten nicht gezeigt).

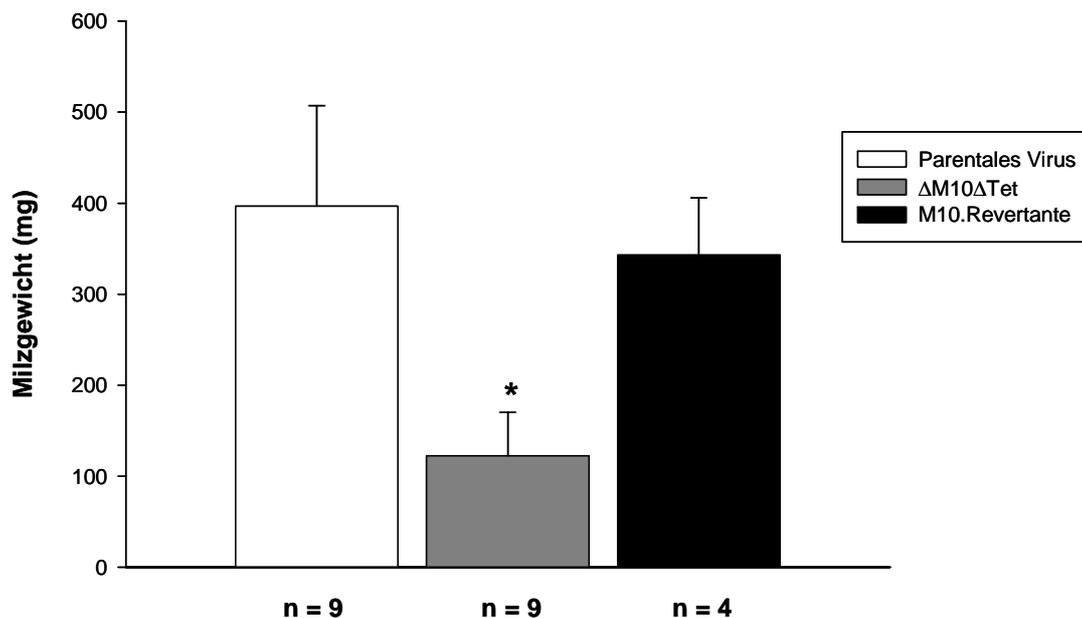
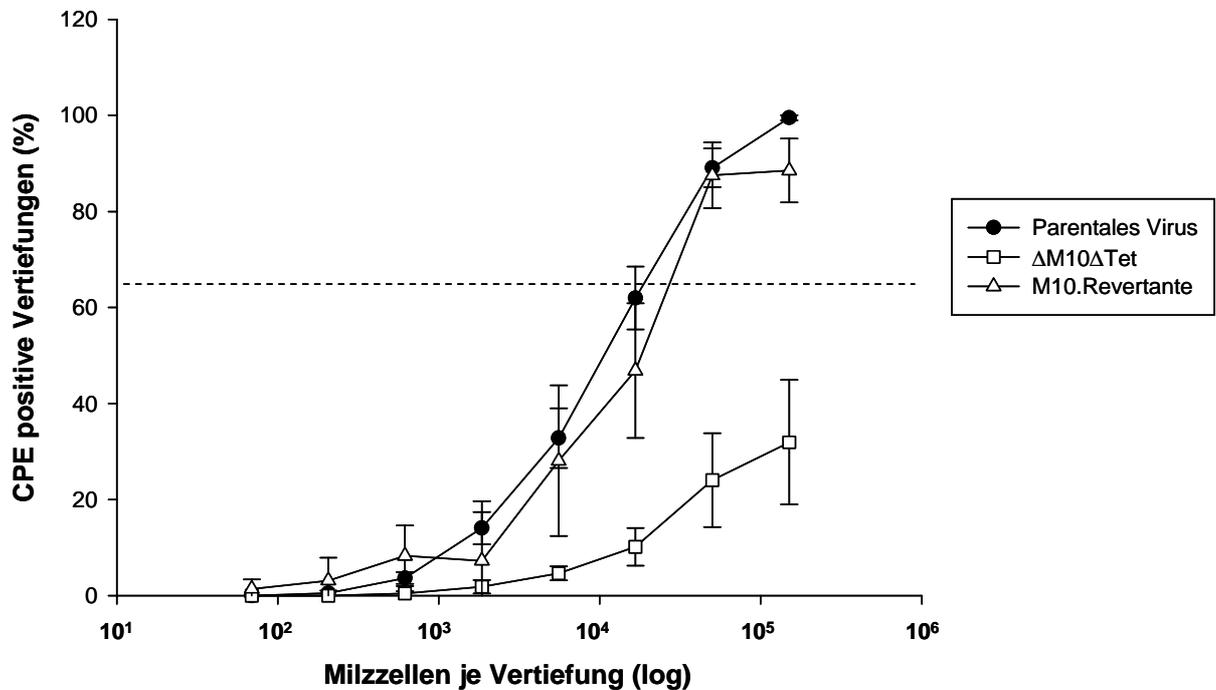


Abb. 3.18 Bestimmung der Splenomegalie nach intranasaler Infektion mit Δ M10 Δ Tet, M10.Revertante und parentalem Virus. C57BL/6 Mäuse wurden i.n. mit $5 \cdot 10^4$ PFU infiziert. An Tag 17 p.i. wurden die Milzen entnommen und das Milzgewicht bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD aus mehreren unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten (n) mit je drei Mäusen. Der Unterschied in der Splenomegalie zwischen den mit parentalem und M10.Revertante infizierten Mäusen gegenüber denen, die mit Δ M10 Δ Tet infiziert wurden, ist statistisch signifikant mit $* = p < 0,0005$, bestimmt durch den Student's t-test.

Die Reaktivierungsfrequenzen, bestimmt durch den *ex vivo* Reaktivierungsassay an Tag 17 p.i, sind Abbildung 3.19 zu entnehmen. Wie in der Grafik gezeigt, unterscheiden sich die Frequenzen nach Infektion mit dem parentalen Virus und der M10.Revertante nur leicht. Während es in den mit dem parentalen Virus infizierten Zellen ein Reaktivierungsereignis pro 16.887 Zellen gibt, ist es nach Infektion mit der M10.Revertante 1 in 23.521. Für die M10

Deletionsmutante $\Delta M10\Delta Tet$ ließ sich keine Frequenz berechnen, der Schwellenwert von 63,2 % CPE positiven Vertiefungen wurde nicht erreicht.



Frequenz der Reaktivierung:

Parentales Virus	1: 16.887
$\Delta M10\Delta Tet$	< 63,2 % CPE positive Vertiefungen
M10.Revertante	1: 23.521

Abb. 3.19 Ex vivo Reaktivierung von Splenozyten nach intranasaler Infektion von C57BL/6 Mäusen mit $\Delta M10\Delta Tet$, M10.Revertante und parentalem Virus. C57BL/6 Mäuse wurden i.n. mit $5 \cdot 10^4$ PFU infiziert. 17 Tage p.i. wurden die Milzen entnommen und aufgearbeitet. Nach 7 - 10tägiger Co-Kultivierung der Splenozyten mit NIH3T3 Zellen wurde das Auftreten von CPE in den einzelnen Vertiefungen ausgezählt. Dargestellt sind mehrere unabhängig voneinander durchgeführte Experimente mit $n = 9$ (parentales Virus, $\Delta M10\Delta Tet$) und $n = 4$ (M10.Revertante). Je Experiment wurden drei Mäuse pro Virusgruppe verwendet und die Milzen dieser Mäuse zu einer Probe vereinigt. Die Strichlinie zeigt den Wert von 63,2 %, welcher benutzt wurde, um die Reaktivierungsfrequenz der Viren zu bestimmen. Der Unterschied in der Reaktivierung aus den Splenozyten nach Infektion mit dem parentalen Virus und der M10.Revertante, verglichen mit $\Delta M10\Delta Tet$, ist statistisch signifikant mit $p = 0,027$ bzw. $p = 0,023$ (Student's t-test).

Einhergehend mit den Ergebnissen des *ex vivo* Reaktivierungsassays und den Werten der Splenomegalie bestätigte die quantitative real-time PCR die bisherigen Befunde. Nach Infektion mit dem parentalen Virus wurden 48 Kopien des viralen gB pro 1000 Kopien des zellulären L8 gemessen (Abb. 3.20). Die mit der M10.Revertante infizierten Splenozyten tragen 49 Kopien gB/1000 Kopien L8. Die Viruslast nach i.n. Infektion an Tag 17 p.i. ist bei beiden Viren somit gleich, wohingegen sie nach Infektion mit Δ M10 Δ Tet signifikant erniedrigt ist (4 Kopien gB/1000 Kopien L8, $p < 0,005$, Student's t-test).

Der beobachtete Phänotyp nach Infektion mit Δ M10 Δ Tet hebt sich nach Infektion mit der M10.Revertante in allen untersuchten Parametern auf. Die gemessenen Werte wie Virustiter in den Lungen an Tag 6 p.i, Splenomegalie, Reaktivierungsfrequenz und Viruslast in den infizierten Splenozyten an Tag 17 p.i. erreichen jeweils die Zahlen des parentalen Virus.

Die Revertante basiert auf der Δ M10 Δ Tet Mutante, die Deletion des M10 Leserahmen (99.002 – 101.315) ist hier wiederhergestellt. Demzufolge kann der Phänotyp, der nach Δ M10 Δ Tet Infektion auftritt, auf die Deletion der M10 Region zurückgeführt werden, und nicht auf unerwünschte Mutationen während der Shuttle Mutagenese.

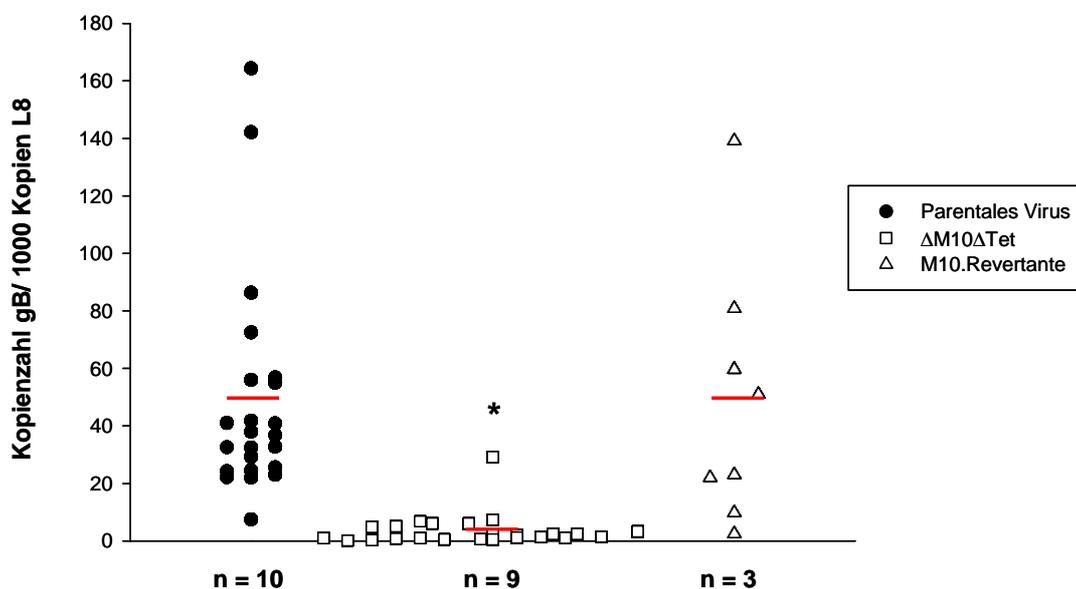


Abb. 3.20 Latente Viruslast in den Milzzellen der mit Δ M10 Δ Tet, M10.Revertante und parentalem Virus infizierten Mäusen. C57BL/6 Mäuse wurden i.n. mit $5 \cdot 10^4$ PFU infiziert. 17 Tage p.i. wurden die Milzen entnommen, die DNA isoliert und in der real-time PCR eingesetzt. Es wurden bis zu 10 unabhängige Experimente (n) durchgeführt, mit je drei Mäusen pro Virus. Die schwarzen Balken zeigen die Mittelwerte aus allen Experimenten. Der Unterschied in der Viruslast nach Infektion mit dem parentalen Virus und der M10.Revertante gegenüber der Mutante Δ M10 Δ Tet ist statistisch signifikant mit * = $p < 0,005$ (Student's t-test).

3.6. Die Deletion in $\Delta M10\Delta Tet$ beeinflusst bereits die frühe Phase der lytischen Infektion *in vivo*

Untersuchungen *in vivo*: lytische Replikationsphase

Die lytische Infektionsphase in der Lunge nach Infektion mit MHV-68 dauert ca. 10 - 12 Tage an, mit dem Höhepunkt der Replikation zwischen Tag 5 und 7. Sechs Tage nach Infektion konnte in den vorangegangenen Experimenten ein signifikanter Unterschied der Virustiter des parentalen Virus gegenüber $\Delta M10\Delta Tet$ festgestellt werden. Um herauszufinden, ob die Replikation der $\Delta M10\Delta Tet$ Mutante während der gesamten lytischen Infektionsphase gestört oder zeitlich verschoben ist, wurde eine Kinetik durchgeführt.

Je neun C57BL/6 Mäuse wurden intranasal mit $5 \cdot 10^4$ PFU des parentalen Virus und $\Delta M10\Delta Tet$ infiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion (Tag 3, 6 und 10 p.i.) wurden je 3 Mäuse pro Virusgruppe euthanasiert, deren Lungen entnommen und eine Titerbestimmung mittels Plaquesassay durchgeführt. Bereits zum frühen Zeitpunkt nach Infektion sind die Titer des parentalen Virus und der Mutante signifikant verschieden (Abb. 3.21). Im Durchschnitt liegen die Titer des parentalen Virus bei 3,4 Log_{10} PFU/ml, nach Infektion mit der M10 Deletionsmutante $\Delta M10\Delta Tet$ erreichen sie im Durchschnitt einen Wert um 1,2 Log_{10} PFU/ml, und liegen somit um fast 2 Log-Stufen niedriger. An Tag 6 nach Infektion steigen die viralen Titer insgesamt an (auf 4,0 bei dem parentalen Virus bzw. 2,4 Log_{10} PFU/ml bei $\Delta M10\Delta Tet$), der signifikante Unterschied zwischen beiden Viren bleibt aber bestehen, wenn auch weniger deutlich als an Tag 3 p.i.. Zum Zeitpunkt 10 Tage p.i. konnte weder nach Infektion mit dem parentalen Virus noch mit der Mutante Virus nachgewiesen werden. Diese Daten sind konvergent mit der Literatur, wo beschrieben ist, dass MHV-68 durch den Einfluss von Makrophagen und $CD8^+$ T-Zellen zwischen Tag 10 und 12 in der Lunge eliminiert wird (Ehtisham *et al.* 1993; Weck *et al.* 1996).

Die Deletion der M10 Region scheint sich somit auszuwirken auf die Etablierung der lytischen Replikation in der Lunge. Im Gegensatz zum parentalen Virus erreicht die Mutante $\Delta M10\Delta Tet$ in der Lunge an Tag 3 und 6 p.i. nur niedrige Titer.

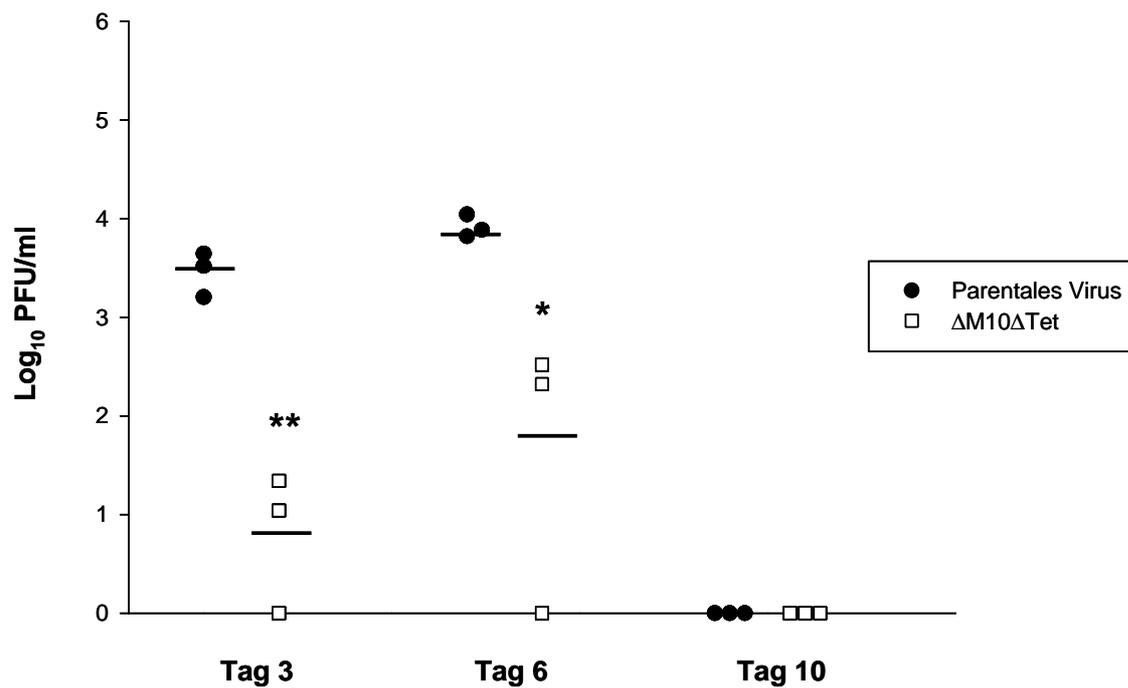


Abb. 3.21. Replikationsverhalten des parentalen Virus und der $\Delta M10\Delta Tet$ Mutante in der lytischen Infektionsphase. C57BL/6 Mäuse wurden i.n. mit $5 \cdot 10^4$ PFU infiziert. 3, 6 und 10 Tage p.i. wurden von je drei Mäusen die Lungen entnommen und die Virustiter in den Organhomogenaten mittels Plaqueassay auf BHK-21 Zellen bestimmt. Gezeigt sind die Einzelwerte der Mäuse an den einzelnen Tagen der Kinetikbestimmung. Die schwarzen Balken stehen für die errechneten Mittelwerte. Die statistische Signifikanz zwischen den Werten des parentalen Virus und der Mutante $\Delta M10\Delta Tet$ wurde mit dem Student's t-test ermittelt (** $p = 0,0033$, * $p = 0,047$)

3.7. Die Deletion in $\Delta M10\Delta Tet$ beeinflusst bereits die frühe Phase der Latenz *in vivo*

Untersuchungen *in vivo*: Latenzphase

Nach intranasaler Infektion von C57BL/6 Mäusen mit dem rekombinanten Virus $\Delta M10\Delta Tet$ sind die Parameter der Latenz signifikant erniedrigt, verglichen mit den Werten nach Infektion mit dem parentalen Virus (Abb. 3.13 – 3.15).

Um herauszufinden, ob bereits die Etablierung der Latenz *in vivo* nach Infektion mit der $\Delta M10\Delta Tet$ Mutante gestört ist, und wie sich der Phänotyp zu einem späten Zeitpunkt der Latenz entwickelt, wurde eine Kinetik durchgeführt. C57BL/6 Mäuse wurden i.n. mit $5 \cdot 10^4$ PFU parentalem Virus, $\Delta M10\Delta Tet$ und der M10.Revertante infiziert. An Tag 10 und Tag 42 wurden die Mäuse euthanasiert und die Milzen entnommen. Anschließend wurden die Milzgewichte (Abb. 3.22) sowie die Viruslast in den Splenozyten (Abb. 3.23) bestimmt.

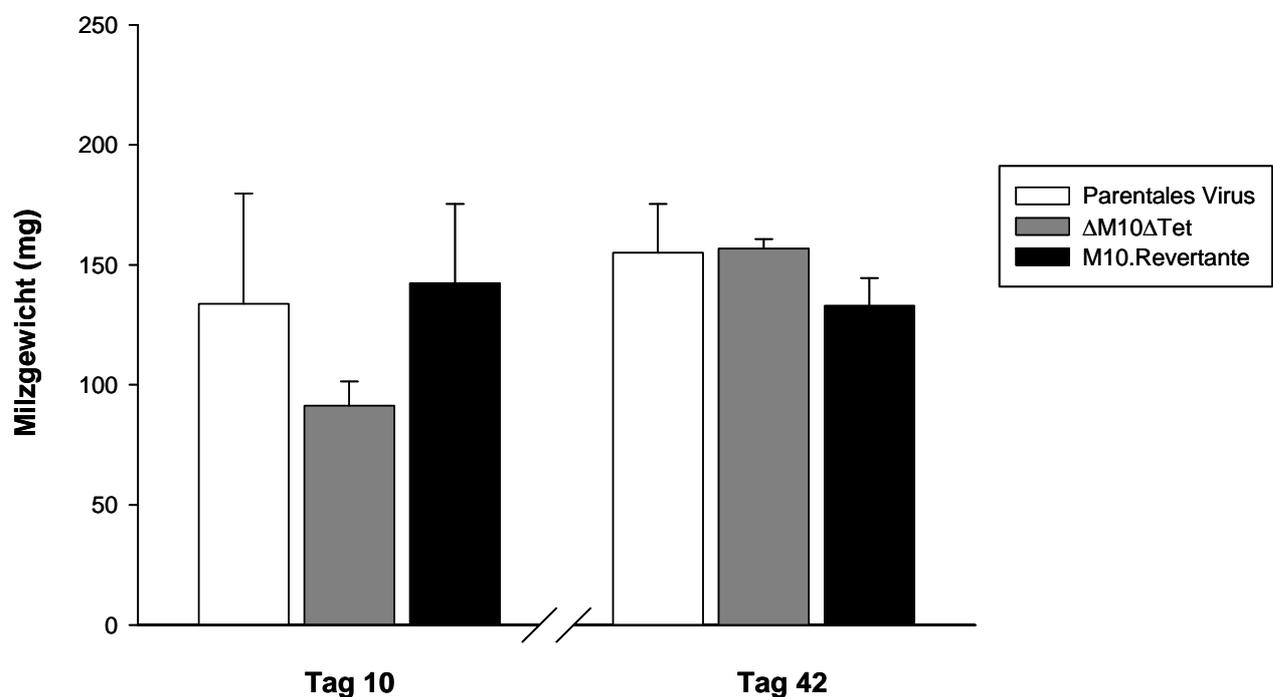


Abb. 3.22 Bestimmung des Milzgewichtes nach intranasaler Infektion mit rekombinanten MHV-68. C57BL/6 Mäuse wurden i.n. mit $5 \cdot 10^4$ PFU des jeweiligen Virus infiziert. An Tag 10 und 42 p.i. wurden die Milzen entnommen und das Milzgewicht bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit je drei Mäusen pro Virus.

An Tag 17 p.i. sind die Unterschiede im Milzgewicht zwischen den Mäusen, die mit parentalem Virus bzw. M10.Revertante infiziert wurden, und den mit Δ M10 Δ Tet infizierten Mäusen signifikant (Abb. 3.18). Dieser Unterschied wird bereits an Tag 10 deutlich (Abb. 3.22). Nach Infektion mit dem parentalen Virus und der M10.Revertante liegen die Milzgewichte bei 133 bzw. 142 mg, nach Infektion mit der Δ M10 Δ Tet Mutante sind es 91 mg im Durchschnitt. Dieses Milzgewicht entspricht in etwa dem einer nicht infizierten Maus (70 – 100 mg, Daten nicht gezeigt). Zu einem späten Zeitpunkt der Latenzphase, 42 Tage p.i., heben sich die o.g. Unterschiede auf, die Milzgewichte aller infizierten Mäuse liegen mit Werten um 130 bis 155 mg auf nahezu einem Niveau, es ist noch eine leichte Splenomegalie erkennbar (Abb. 3.22).

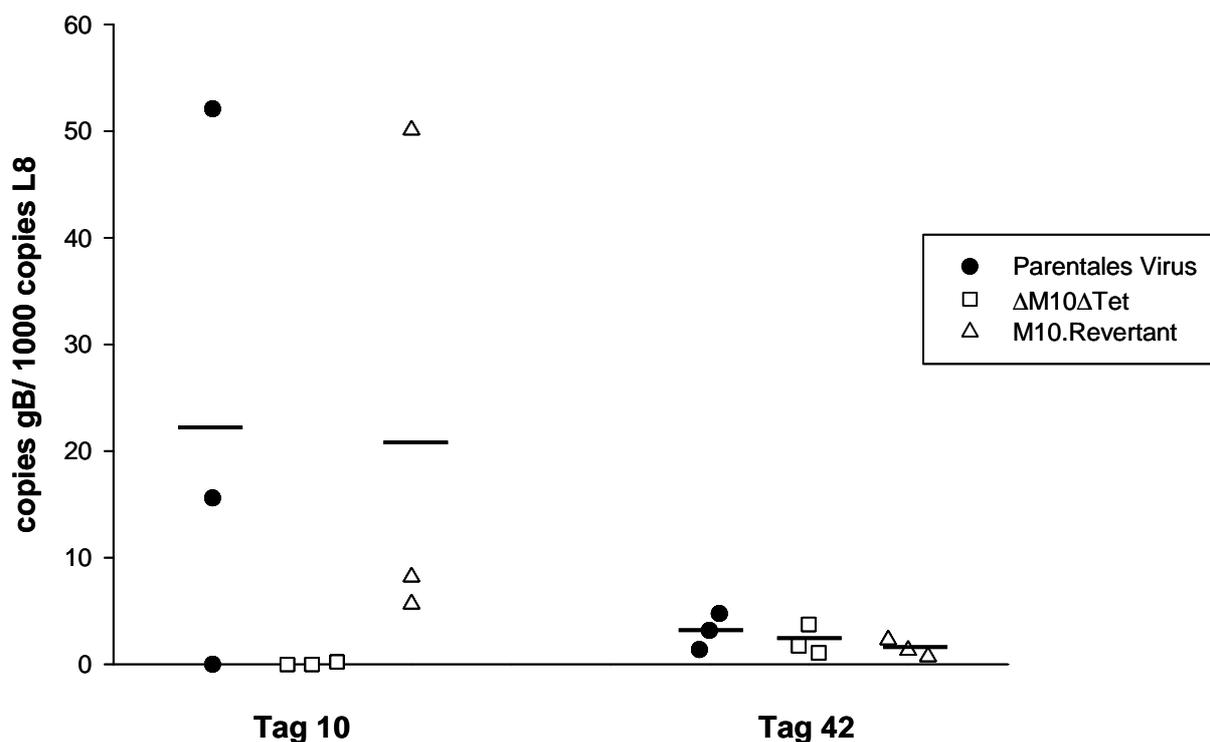


Abb. 3.23. Bestimmung der Viruslast nach intranasaler Infektion mit parentalem Virus, Δ M10 Δ Tet und M10.Revertante. C57BL/6 Mäuse wurden i.n. mit $5 \cdot 10^4$ PFU infiziert. An Tag 10 und 42 p.i. wurden die Milzen entnommen, aufgearbeitet, und die DNA isoliert. Die Viruslast in den Splenozyten wurde mittels quantitativer real-time PCR bestimmt. Gezeigt sind ein Experiment an Tag 10 und eins an Tag 42, mit je drei Mäusen pro Virus. Der schwarze Balken zeigt den errechneten Mittelwert.

In der quantitativen real-time PCR wurde die Viruslast in den infizierten Splenozyten gemessen (Abb. 3.23). Nach Infektion mit dem parentalen Virus und der M10.Revertante liegen 22,5 bzw. 21 Kopien des viralen gB pro 1000 Kopien des zellulären L8 vor. In den mit Δ M10 Δ Tet infizierten Proben konnten bei zwei von drei Proben keine Signale für das virale gB gemessen werden. In einer Probe fand sich eine Kopie gB/1000 Kopien L8. An Tag 42 p.i. gleichen sich die Werte für alle infizierten Mäuse an, mit 1 bis 3 Kopien gB/1000 Kopien L8 im Durchschnitt.

Im Gegensatz zur Infektion mit dem parentalen Virus und der M10.Revertante (in welcher die Mutation des M10 Leserahmens wiederhergestellt wurde) findet sich nach Infektion mit der Mutante Δ M10 Δ Tet eine Beeinträchtigung in der Etablierung der latenten Replikationsphase *in vivo*. An Tag 10 findet sich kaum Virus in den Splenozyten der infizierten Mäuse, einhergehend mit der nicht einsetzenden Splenomegalie. An Tag 17 p.i. ist die Splenomegalie kaum ausgeprägt und auch die Viruslast recht niedrig. Die Mutation der M10 Region, wie sie in Δ M10 Δ Tet vorliegt, hat einen starken Einfluss sowohl auf die lytische als auch auf die latente Replikationsphase *in vivo* nach intranasaler Infektion.

3.8. Der Phänotyp der $\Delta M10\Delta Tet$ Mutante in C57BL/6 Mäusen bleibt auch nach intraperitonealer Infektion bestehen

Neben der vermuteten natürlichen Infektionsroute von MHV-68 in Mäusen ist es möglich, den Nasen- und Rachenraum zu umgehen und die Mäuse intraperitoneal zu infizieren. Auf diese Weise gelangt das Virus direkt in das Peritoneum und auch in die Milz.

Um zu untersuchen, ob sich der Phänotyp der $\Delta M10\Delta Tet$ Mutante nach intraperitonealer Infektion verändert, wurden C57BL/6 Mäuse i.p. mit $1 \cdot 10^5$ PFU parentalem Virus und $\Delta M10\Delta Tet$ infiziert. Die Ergebnisse sind im Folgenden beschrieben.

Untersuchungen *in vivo*

a) lytische Replikation

In zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten wurden C57BL/6 Mäuse mit $1 \cdot 10^5$ PFU parentalem Virus und $\Delta M10\Delta Tet$ infiziert. An Tag 6 nach Infektion wurden die Mäuse euthanasiert und die Milzen entnommen. Mit Hilfe des Plaqueassays wurden anschließend die viralen Titer in der Milz bestimmt. Abb. 3.24 zeigt das Ergebnis des Plaqueassays. Nach Infektion mit dem parental Virus liegen die viralen Titer im Durchschnitt bei 2,1 \log_{10} PFU/ml, während nach Infektion mit der Mutante $\Delta M10\Delta Tet$ in beiden Experimenten kein Virus nachgewiesen werden konnte.

b) Latenzphase

Parallel wurden weitere Mäuse intraperitoneal mit $1 \cdot 10^5$ PFU des parental Virus und $\Delta M10\Delta Tet$ infiziert, welche an Tag 17 p.i. euthanasiert wurden. Nach Bestimmung der Splenomegalie wurde mit den entnommenen Milzen der *ex vivo* Reaktivierungsassay zur Bestimmung der Reaktivierungsfrequenz aus der Latenz durchgeführt. Die Splenomegalie ist

in Abb. 3.25 dargestellt. Die Milzgewichte der mit dem parentalen Virus infizierten Mäuse (344 mg) liegen höher als die der Mäuse, die mit $\Delta M10\Delta Tet$ infiziert wurden (174 mg), der Unterschied ist jedoch nicht signifikant. Die Werte nach i.p. Infektion liegen etwa im Bereich der Milzgewichte nach i.n. Infektion (siehe Abb. 3.13). Der Phänotyp der nach i.n. Infektion in der Milz auftritt, findet sich auch nach i.p. Infektion.

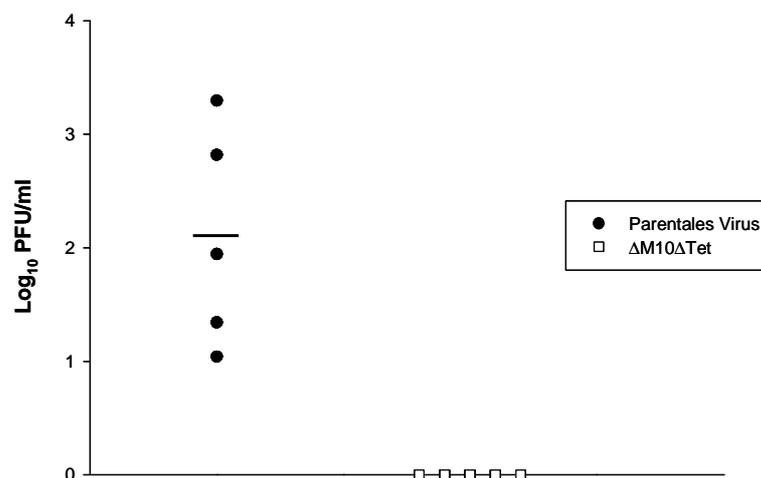


Abb. 3.24 Lytische Replikation von parentalem Virus und $\Delta M10\Delta Tet$ in der Milz nach intraperitonealer Infektion. C57BL/6 Mäuse wurden mit $1 \cdot 10^5$ PFU parentalem Virus und $\Delta M10\Delta Tet$ infiziert. 6 Tage p.i. wurden die Milzen entnommen und der virale Titer mittels Plaqueassay bestimmt. Zusammengefasst sind zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente mit 3 bzw. 2 Mäusen pro Virus. Der schwarze Balken stellt den Mittelwert dar.

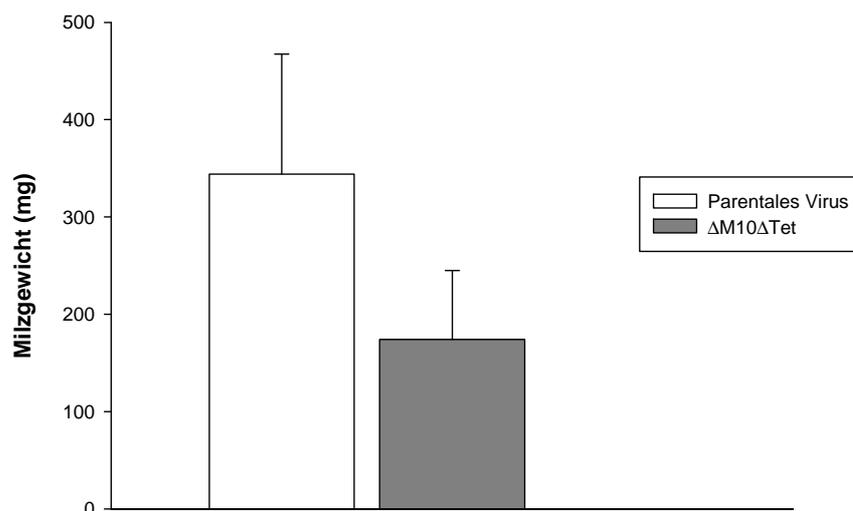
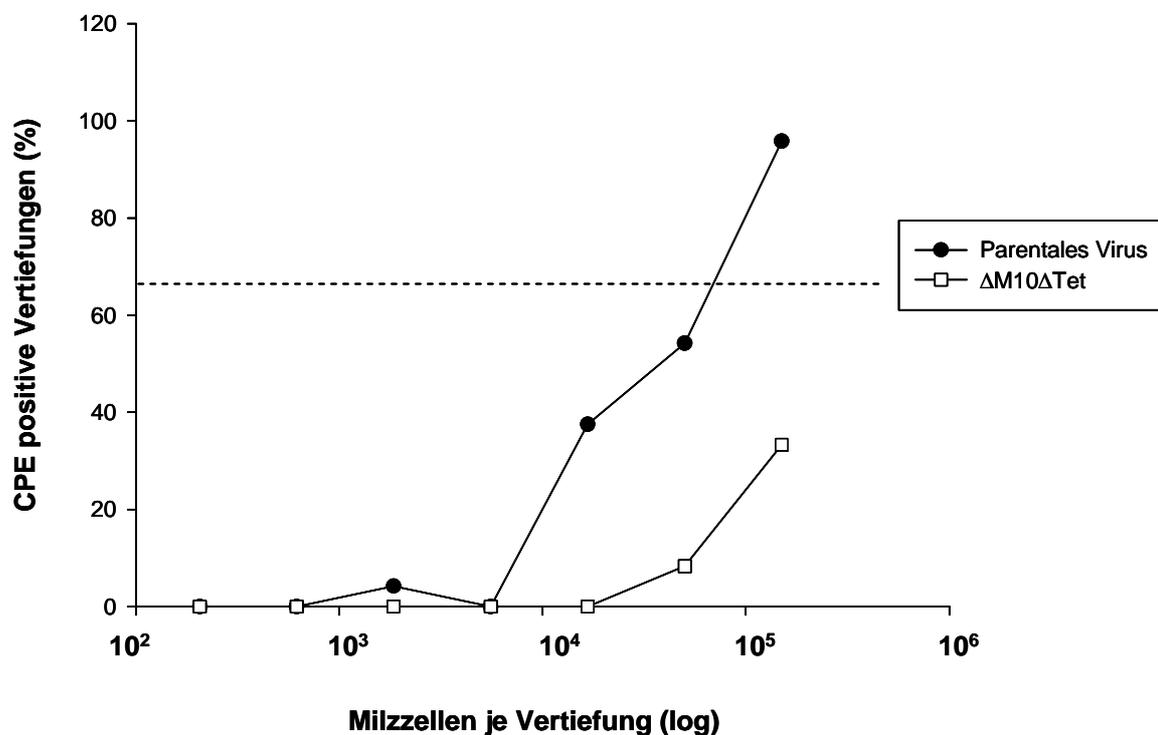


Abb. 3.25 Bestimmung des Milzgewichtes nach intraperitonealer Infektion mit parentalem Virus und $\Delta M10\Delta Tet$. C57BL/6 Mäuse wurden i.p. mit $1 \cdot 10^5$ PFU infiziert. An Tag 17 p.i. wurden die Milzen entnommen und das Milzgewicht bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus einem einzelnen Experiment mit drei Mäusen pro Virus.

Die Reaktivierungsfrequenz nach i.p. Infektion mit dem parentalen Virus liegt bei einem Reaktivierungsereignis in 57.049 Zellen (Abb. 3.26). Die Frequenz ist hierbei etwas geringer als nach intranasaler Infektion mit dem parentalen Virus (1: 16.887, Abb. 3.14). Die Reaktivierung aus der Latenz ist jedoch auch nach intraperitonealer Infektion mit der Mutante $\Delta M10\Delta Tet$ massiv gestört, ein Wert für die Reaktivierungsfrequenz konnte aufgrund fehlender Werte bei 63,2 % nicht errechnet werden.



Frequenz der Reaktivierung:

Parentales Virus	1: 57.049
$\Delta M10\Delta Tet$	< 63,2 % CPE positive Vertiefungen

Abb. 3.26 Ex vivo Reaktivierung von Splenozyten nach intraperitonealer Infektion von C57BL/6 Mäusen mit parentalem Virus und $\Delta M10\Delta Tet$. C57BL/6 Mäuse wurden i.p. mit $1 \cdot 10^5$ PFU infiziert. 17 Tage p.i. wurden die Milzen entnommen und aufgearbeitet. Nach 7 - 10tägiger Co-Kultivierung der Splenozyten mit NIH3T3 Zellen wurde das Auftreten von CPE in den einzelnen Vertiefungen ausgezählt. Dargestellt ist ein Experiment mit drei Mäusen je Virus. Die Strichlinie zeigt den Wert von 63,2 %, welcher benutzt wurde, um die Reaktivierungsfrequenz der Viren zu bestimmen.

Die Viruslast in den Splenozyten an Tag 17, ein wichtiger Parameter für die Latenzentwicklung während der Infektion, wurde mittels quantitativer real-time PCR bestimmt (Abb. 3.27). Nach Infektion mit dem parentalen Virus finden sich im Durchschnitt 22 Kopien des viralen gB pro 1000 Kopien des zellulären L8 Gens. In den mit $\Delta M10\Delta Tet$ infizierten Splenozyten finden sich mit 11 Kopien gB/ 1000 Kopien L8 um die Hälfte weniger. Diese Daten bestätigen die Werte des *ex vivo* Reaktivierungsassay. Die niedrige Kopienzahl nach Infektion mit $\Delta M10\Delta Tet$ geht einher mit einer geringeren Reaktivierungsfrequenz verglichen mit den Werten des parentalen Virus. Dasselbe Bild zeigt sich nach intranasaler Infektion mit der $\Delta M10\Delta Tet$ Mutante (siehe Abb. 3.14 und 3.15).

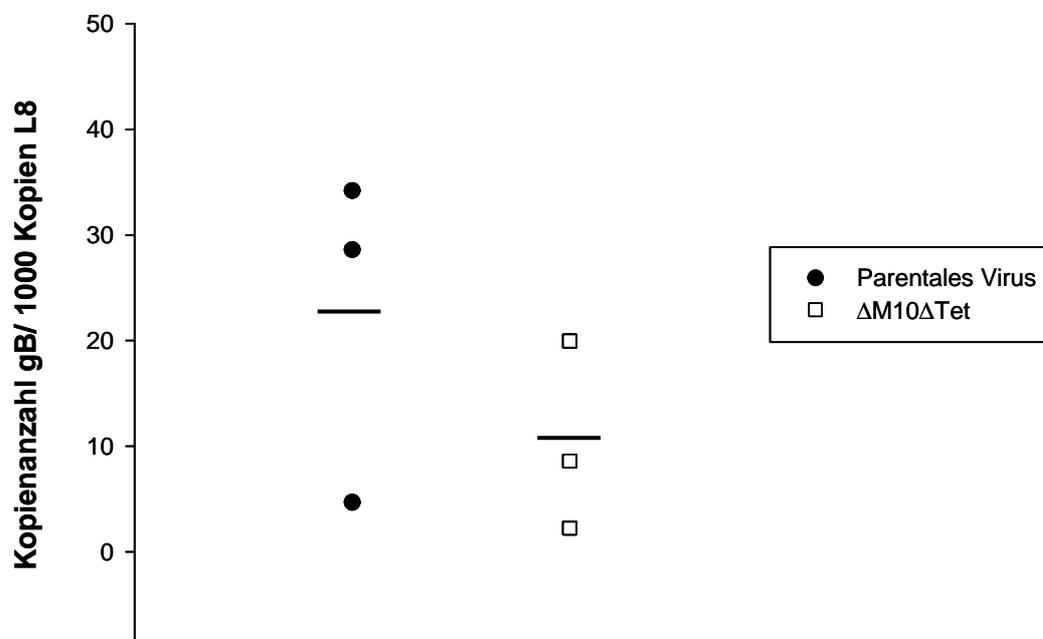


Abb. 3.27 Latente Viruslast in den Milzzellen der mit parentalem Virus und $\Delta M10\Delta Tet$ infizierten Mäusen. C57BL/6 Mäuse wurden i.p. mit $1 \cdot 10^5$ PFU Virus infiziert. 17 Tage p.i. wurden die Milzen entnommen, aufgearbeitet, und nach DNA Isolierung die Viruslast in den Splenozyten mittels quantitativer real-time PCR bestimmt. Gezeigt sind die Einzelwerte eines durchgeführten Experimenten mit je drei Mäusen pro Virus, der schwarze Balken zeigt den Mittelwert.

Der Phänotyp nach Infektion mit der M10 Deletionsmutante $\Delta M10\Delta Tet$ scheint nach i.n. Infektion stärker ausgeprägt zu sein als nach i.p. Infektion, der Trend bleibt aber bestehen. Die Unterschiede im Milzgewicht, in der Reaktivierungsfrequenz sowie der Viruslast in den Splenozyten an Tag 17 p.i. sind nach Infektion mit $\Delta M10\Delta Tet$ nicht signifikant erniedrigt, sowie das nach i.n. Infektion der Fall war, dies ist aber zurückzuführen auf die relativ kleine Zahl an i.p. Experimenten. Parallel zu den vorliegenden Ergebnissen wurden Mäuse i.p. mit verschiedenen Dosen an Virus infiziert ($1 \cdot 10^4$ und $1 \cdot 10^6$ PFU), und auch hier konnte der o.g. Trend bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Die Mutante $\Delta M10\Delta Tet$ zeigt auch nach intraperitonealer Infektion einen Defekt in der lytischen und latenten Replikationsphase.

3.9. Die Deletion innerhalb des Replikationsursprunges (OriLyt) von MHV-68 in den rekombinanten Viren Δ M10 Δ Tet und Δ 201nt beeinflusst die Replikation des Virus *in vivo*.

In den rekombinanten Viren Δ M10 Δ Tet und M10.Del ist neben dem M10 Leserahmen ein Teil des lytischen Replikationsursprunges (OriLyt) von MHV-68 durch die Mutagenese betroffen (Abb. 3.9.). Der OriLyt erstreckt sich von Position 100.723 bis 101.974, wobei der für die Replikation essentielle Teil von 101.248 bis 101.974 reicht. Bei der M10.Del Mutante ist der nicht-essentielle Teil des OriLyt von der Mutation betroffen, bei Δ M10 Δ Tet sind zusätzlich ca. 120 bp der für die Replikation unerlässlichen Sequenz deletiert.

Um herauszufinden, ob der Phänotyp nach Infektion mit Δ M10 Δ Tet und M10.Del auf die Deletion des M10 Leserahmen oder auf die Deletion innerhalb der OriLyt Sequenz zurückzuführen ist, wurde ein weiteres rekombinantes Virus generiert. Δ 201nt trägt eine Deletion im essentiellen Teil des OriLyt (101.530 bis 101.731), nicht aber im M10 Leserahmen (Abb. 3.9).

Nachdem in den vorangegangenen Experimenten der Phänotyp der Δ M10 Δ Tet Mutante deutlich stärker ausgeprägt war als bei M10.Del, wurde in den folgenden Experimenten Δ M10 Δ Tet als Vergleich herangezogen.

Untersuchungen *in vitro*

Zur Untersuchung des Wachstumsverhaltens *in vitro* wurden NIH3T3 Zellen mit den rekombinanten Viren Δ M10 Δ Tet, Δ 201nt sowie dem parentalen Virus mit einer MOI von 0,1 infiziert. An verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion wurden die Zellen geerntet und die Virustiter mittels Plaquesassay ermittelt. Abbildung 3. 28 zeigt das Ergebnis der Titerbestimmung und das Replikationsverhalten der einzelnen Viren zwischen 0 bis 96 h p.i. Nach Infektion mit der Δ 201nt Mutante zeigt sich im Vergleich mit dem parentalen Virus ein Unterschied im Wachstumsverhalten. Bis zum Zeitpunkt 24 h p.i. liegen die Titer der drei rekombinanten Viren auf einer Ebene, zwischen 24 und 96 h liegen die Werte der beiden Mutanten Δ 201nt und Δ M10 Δ Tet unter denen des parentalen Virus, wobei der Unterschied 48 h p.i. am stärksten ist. Δ 201nt erreicht trotz allem Titer von über 3 Log₁₀ PFU/ml und ist

somit *in vitro* replikationsfähig, wenn auch schwächer als das parentale Virus. Infolgedessen konnte das Virus auch in *in vivo* Experimenten eingesetzt werden.

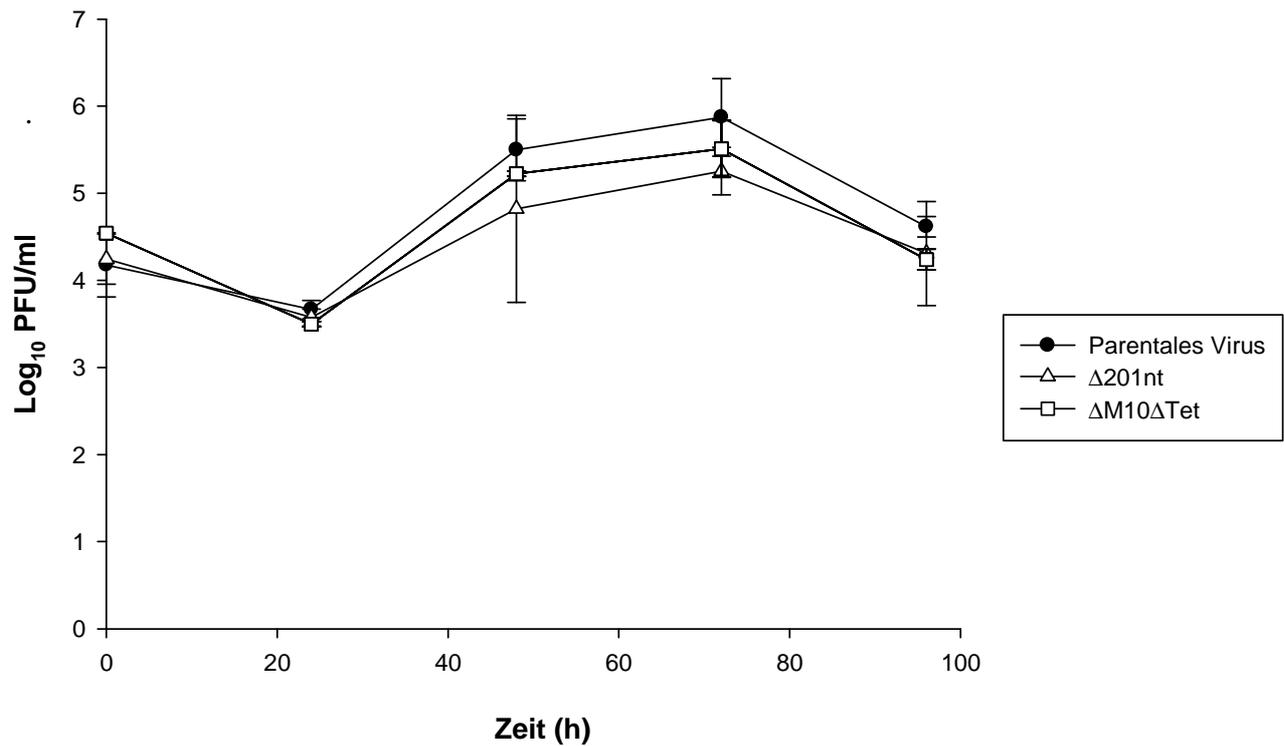


Abb. 3.28 Wachstumsanalyse von $\Delta M10\Delta Tet$, $\Delta 201nt$ und parentalem Virus. NIH3T3 Zellen wurden mit einer MOI = 0,1 der rekombinanten Viren D8J3, $\Delta M10\Delta Tet$ und $\Delta 201nt$ infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 24, 48, 72 und 96 h) nach Infektion geerntet. Die Virustiter wurden mittels Plaqueassay bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten.

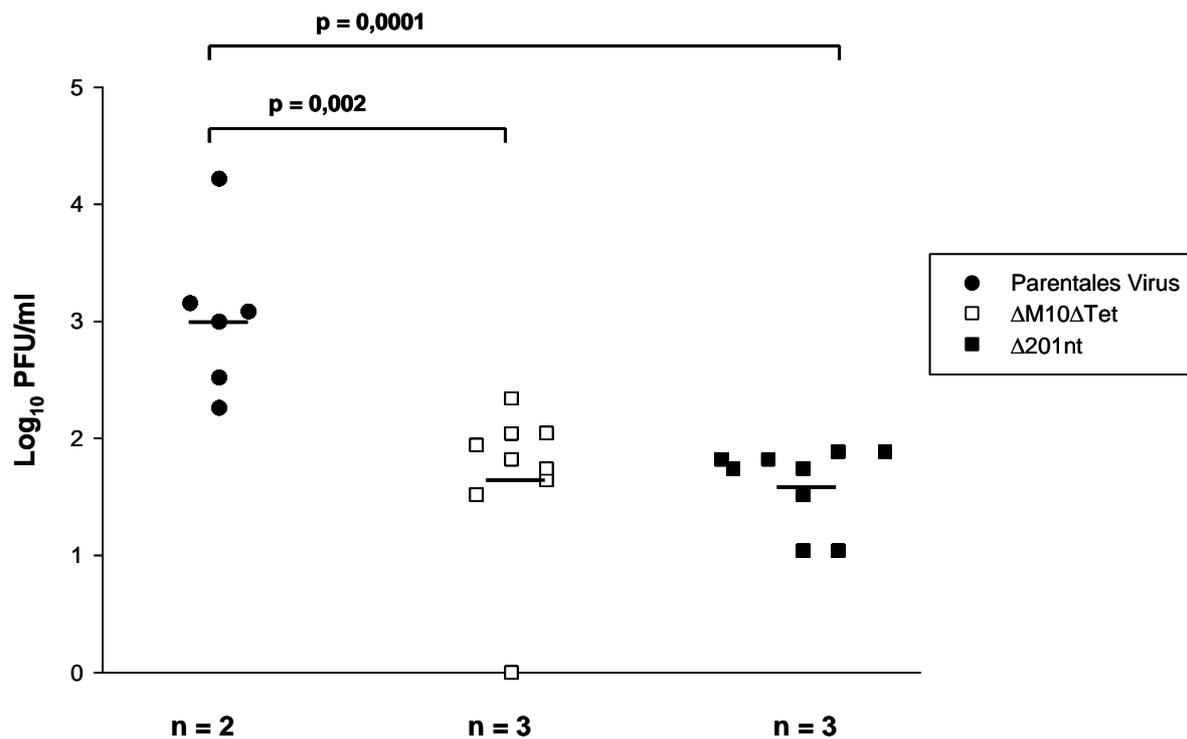


Abb. 3.29 Lytische Replikation von $\Delta M10\Delta Tet$, $\Delta 201nt$ und parentalem Virus in der Lunge. C57BL/6 Mäuse wurden i.n. mit $5 \cdot 10^4$ PFU infiziert. An Tag 6 p.i. wurden die Lungen entnommen und der Virustiter mittels Plaqueassay ermittelt. Gezeigt sind bis zu drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente (n) mit je drei Mäusen pro Experiment und Virus. Der schwarze Balken zeigt den Mittelwert. Der Unterschied im Virustiter zwischen dem parentalen Virus und den beiden Mutanten $\Delta M10\Delta Tet$ und $\Delta 201nt$ ist in beiden Fällen signifikant (Student's t-test).

Untersuchungen *in vivo*

a) lytische Replikationsphase

C57BL/6 Mäuse wurden intranasal mit $5 \cdot 10^4$ PFU der rekombinanten Viren $\Delta 201nt$, $\Delta M10\Delta Tet$ und dem parentalen Virus infiziert. Sechs Tage nach Infektion wurden die Tiere euthanasiert und die Lungen entnommen. Anschließend erfolgte die Bestimmung der viralen Titer mittels Plaqueassay (Abb. 3.29). Nach Infektion mit dem parentalen Virus finden sich erwartungsgemäß hohe Titer in der Lunge, im Durchschnitt $3,0 \text{ Log}_{10} \text{ PFU/ml}$. Wie in den

vorangegangenen Experimenten sind die Titer der $\Delta M10\Delta Tet$ Mutante im Vergleich zum parentalen Virus signifikant erniedrigt ($p = 0,002$). Im Durchschnitt sind die Werte um fast 2 Log-Stufen verringert. Nach Infektion mit der OriLyt Mutante $\Delta 201nt$ finden sich ebenfalls signifikant geringere Titer in der Lunge ($p = 0,0001$). Eine Mutation des OriLyt von MHV-68 beeinträchtigt erheblich die akute lytische Replikation in der Lunge.

Untersuchungen *in vivo*

b) Latenzphase

Ein ähnlicher Phänotyp lässt sich in der Phase der Latenz beobachten. Nach der intranasalen Infektion von C57BL/6 Mäuse mit $\Delta M10\Delta Tet$, $\Delta 201nt$ und dem parentalen Virus wurden die Mäuse an Tag 17 euthanasiert und deren Milzen entnommen. In verschiedenen Experimenten wurden die Parameter der Latenz bestimmt. Abbildung 3.30 zeigt das Milzgewicht an Tag 17 p.i.. Übereinstimmend mit den Ergebnissen aus den vorangegangenen Experimenten (Abb. 3.13) zeigt sich eine deutliche Splenomegalie nach Infektion mit dem parentalen Virus. In drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten zeigen die Milzen im Durchschnitt ein Gewicht von 350 mg. Nach Infektion mit $\Delta M10\Delta Tet$ findet sich ein signifikant erniedrigtes Milzgewicht ($p = 0,0001$) mit Werten von 149 mg im Durchschnitt. Das Gewicht liegt hiermit über 2fach niedriger als nach Infektion mit dem parentalen Virus und knapp über dem Gewicht der Milzen aus nichtinfizierten Mäusen (Daten nicht gezeigt). Das rekombinante Virus $\Delta 201nt$ zeigt ebenfalls nur eine leichte Splenomegalie. Im Mittelwert liegen die Milzgewichte nach Infektion mit $\Delta 201nt$ bei 183 mg. Sie liegen somit leicht über dem Gewicht der mit $\Delta M10\Delta Tet$ infizierten Milzen, sind aber signifikant niedriger als nach Infektion mit dem parentalen Virus ($p = 0,006$). Die Deletion des OriLyt scheint somit auch einen Einfluss auf die latente Infektion von MHV-68 zu haben, bzw. auf die Etablierung der Latenz *in vivo*.

Die Reaktivierungsfrequenz der einzelnen Mutanten ist in Abb. 3.31 dargestellt. Zusammengefasst sind drei unabhängige Experimente mit $\Delta M10\Delta Tet$, $\Delta 201nt$ und dem parentalen Virus. Die Frequenz der Reaktivierung nach Infektion mit dem parentalen Virus

beträgt 1:24.158. Die Reaktivierungsfrequenz für $\Delta M10\Delta Tet$ und $\Delta 201nt$ infizierte Proben konnte nicht berechnet werden, man erkennt am Kurvenverlauf in Abb. 3.31, dass sie den für die Berechnung nötigen Wert von 63,2 % nicht erreichen. Die Werte bestätigen vorherige Ergebnisse und zeigen, dass eine Deletion des OriLyt von MHV-68 Folgen hat für die Reaktivierung des latenten Virus aus den Splenozyten.

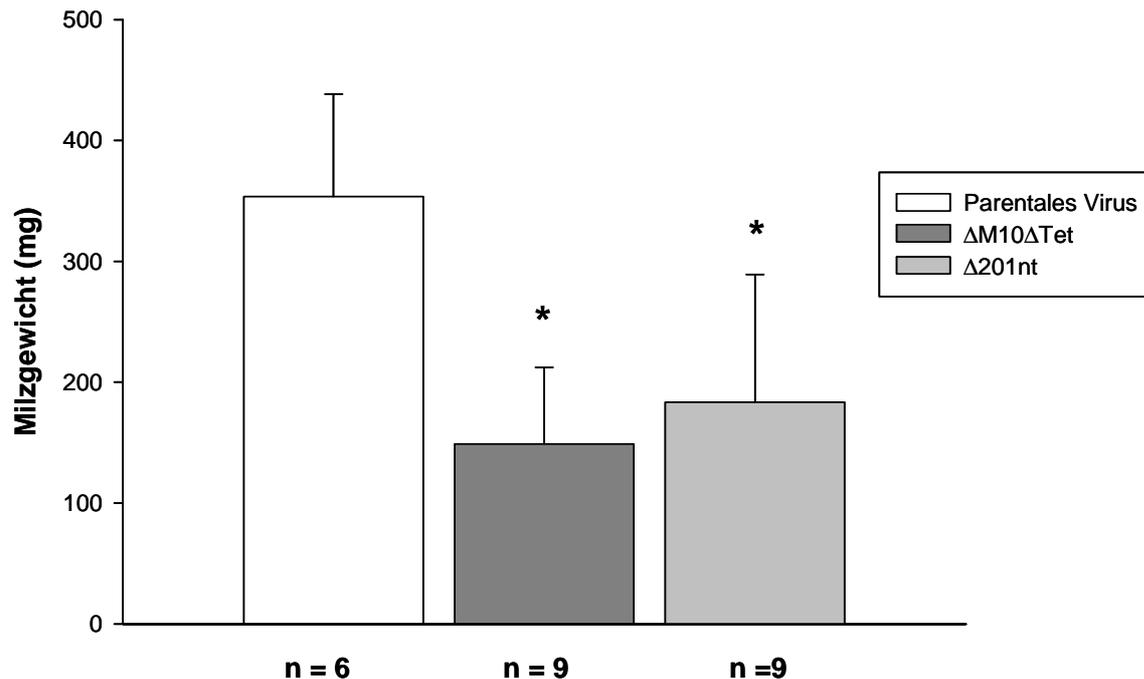
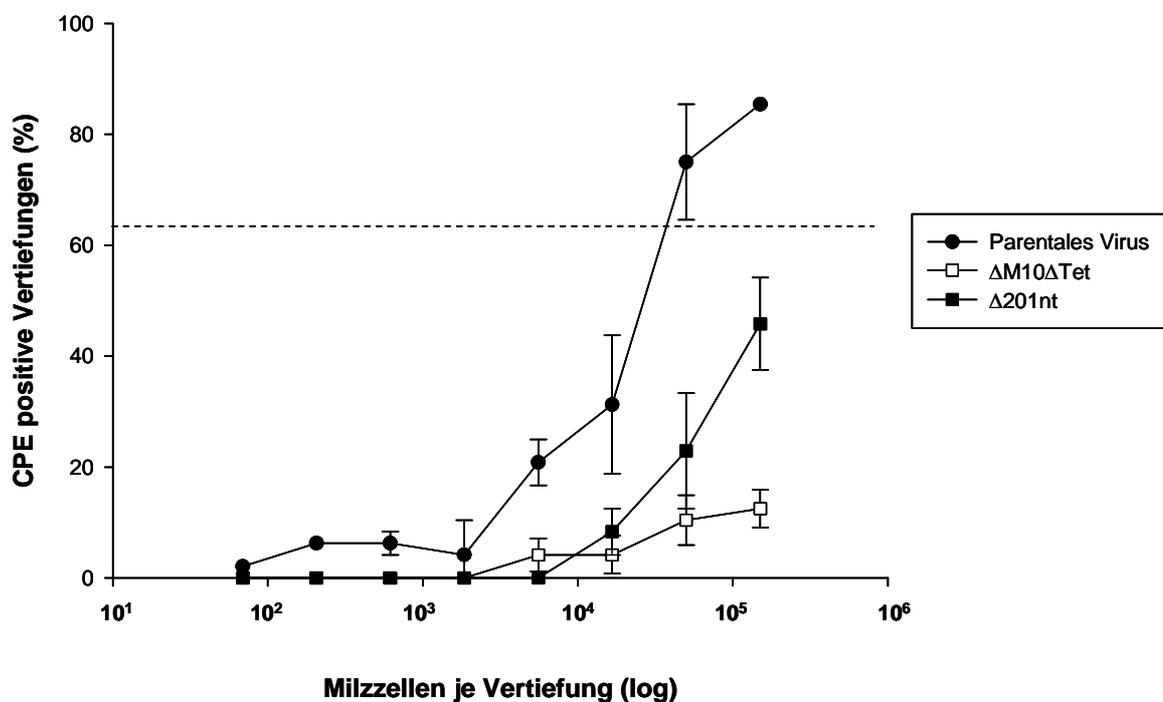


Abb. 3.30 Bestimmung des Milzgewichtes nach intranasaler Infektion mit $\Delta M10\Delta Tet$, $\Delta 201nt$ und parentalem Virus. C57BL/6 Mäuse wurden i.n. mit $5 \cdot 10^4$ PFU infiziert. An Tag 17 p.i. wurden die Milzen entnommen und das Milzgewicht bestimmt. Gezeigt sind drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente, n = Anzahl der Versuchstiere. Der Unterschied im Milzgewicht zwischen dem parentalen Virus und den beiden Mutanten ist statistisch signifikant mit $* = p < 0,01$, bestimmt durch den Student's t-test.

Um herauszufinden, ob der Defekt in der Reaktivierung des rekombinanten Virus $\Delta 201nt$ aus der Latenz mit einer verminderten Viruslast in den Splenozyten einhergeht, oder ob der Reaktivierungsprozess an sich gestört ist, wurde die DNA aus den infizierten Splenozyten isoliert und in die quantitative real-time PCR eingesetzt (Abb. 3.32). Nach Infektion mit dem parentalen Virus findet sich ein Mittelwert von 38 Kopien des viralen gB pro 1000 Kopien

des zellulären L8 Gens. Nach Infektion mit der $\Delta 201nt$ Mutante liegt die Kopienzahl und damit die Viruslast signifikant niedriger ($p = 0,006$) als nach Infektion mit dem parentalen Virus. Im Durchschnitt wurden 13 Kopien gB/1000 Kopien L8 gemessen. Übereinstimmend mit den Werten des Reaktivierungsassays ist ebenso die Viruslast nach Infektion mit $\Delta M10\Delta Tet$ signifikant erniedrigt ($p = 0,0005$), mit einer Kopie des viralen gB pro 1000 Kopien L8 im Durchschnitt. Die geringe Frequenz der Reaktivierung nach Infektion mit den Mutanten $\Delta M10\Delta Tet$ und $\Delta 201nt$ geht einher mit einer niedrigen Viruslast, verglichen mit den Parametern nach Infektion mit dem parentalen Virus. Die latente Replikationsphase ist in beiden Mutanten, in welchen der OriLyt von der Deletion betroffen ist, gestört.



Frequenz der Reaktivierung:

Parentales Virus	1: 24.158
$\Delta M10\Delta Tet$	< 63,2 % CPE positive Vertiefungen
$\Delta 201nt$	< 63,2 % CPE positive Vertiefungen

Abb. 3.31 Ex vivo Reaktivierung in Splenozyten nach intranasaler Infektion von C57BL/6 Mäusen mit $\Delta M10\Delta Tet$, $\Delta 201nt$ und parentalem Virus. C57BL/6 Mäuse wurden i.n. mit $5 \cdot 10^4$ PFU infiziert. 17 Tage p.i. wurden die Milzen entnommen und aufgearbeitet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SeM aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Strichlinie zeigt den Wert von 63,2 %, welcher benutzt wurde, um die Reaktivierungsfrequenz zu bestimmen. Der Unterschied in der Reaktivierung aus den Splenozyten nach Infektion mit dem parentalen Virus verglichen mit den Mutanten ist statistisch signifikant mit $p = 0,021$ ($\Delta 201nt$) und $p = 0,027$ ($\Delta M10\Delta Tet$), berechnet mit dem Student's t-test.

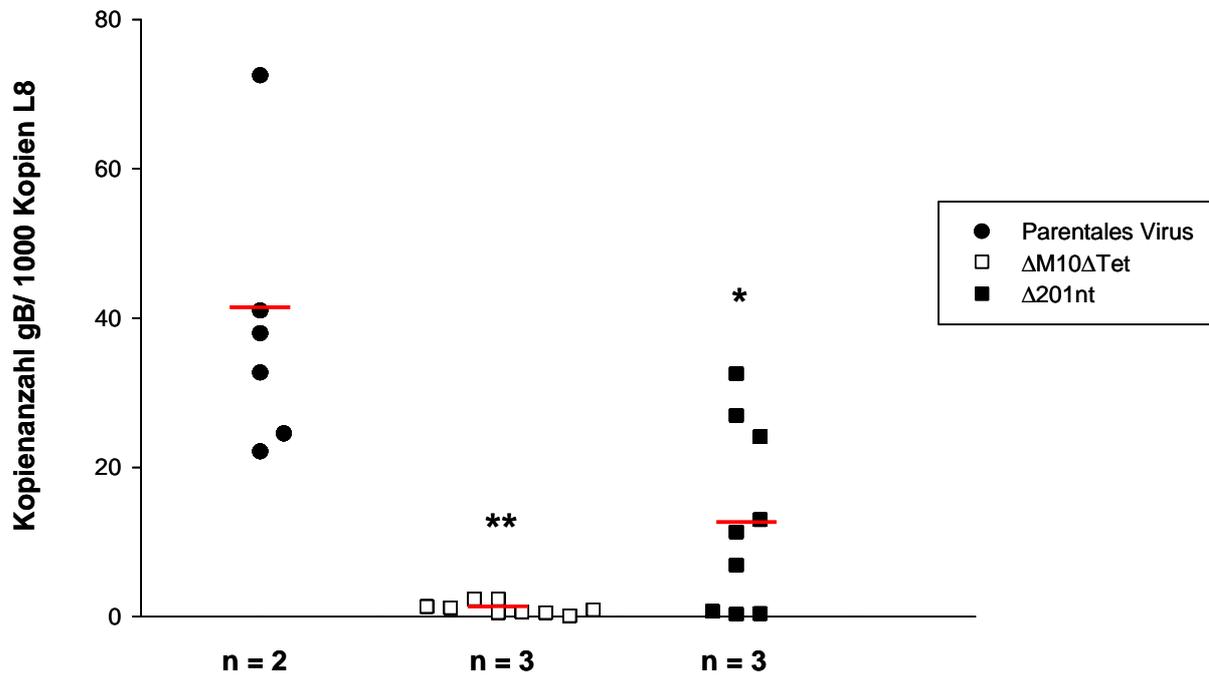


Abb. 3.32 Viruslast in Splenozyten nach intranasaler Infektion von C57BL/6 Mäusen mit $\Delta M10\Delta Tet$, $\Delta 201nt$ und parentalem Virus. C57BL/6 Mäuse wurden i.n. mit $5 \cdot 10^4$ PFU infiziert. 17 Tage p.i. wurden die Milzen entnommen, aufgearbeitet und in die quantitative PCR eingesetzt. Es wurden bis zu drei Experimente (n) mit je 3 Mäusen pro Virus durchgeführt. Dargestellt sind die Einzelwerte aus den verschiedenen Experimenten. Die roten Balken zeigen die Mittelwerte aus allen Mäusen. Der Unterschied in der Viruslast zwischen parentalem Virus und den Mutanten ist statistisch signifikant mit $\Delta M10\Delta Tet$ ** $p = 0,0005$, und $\Delta 201nt$ * $p = 0,006$ (Student's t-test).

3.10. Die Deletion des OriLyt in der Mutante $\Delta 201nt$ hat keinen Einfluss auf die Parameter der Latenz zu einem späten Zeitpunkt nach Infektion.

An Tag 17 p.i. sind die Parameter der latenten Infektionsphase (Splénomegalie, Reaktivierungsfrequenz und Viruslast) nach einer Infektion mit der $\Delta 201nt$ Mutante stark erniedrigt, verglichen mit dem parentalen Virus. Um zu überprüfen, wie sich das Virus zu einem späten Zeitpunkt nach Infektion verhält, wurden C57BL/6 Mäuse intranasal mit $5 \cdot 10^4$ PFU $\Delta 201nt$, $\Delta M10\Delta Tet$, M10.Revertante und parentalem Virus infiziert und an Tag 42 p.i. euthanasiert. Die Milzen wurden entnommen und in den verschiedenen Assays untersucht. Wie in Abbildung 3.33 erkennbar, liegen die Milzgewichte aller Viren an Tag 42 p.i. auf einem ähnlichen Niveau. Die Werte liegen mit 133 bis 157 mg leicht über den Werten nichtinfizierter Mäuse (70 – 100 mg, Daten nicht gezeigt), eine Splénomegalie ist nicht mehr vorhanden. Große Unterschiede zwischen parentalem Virus und Mutanten sind nicht gegeben.

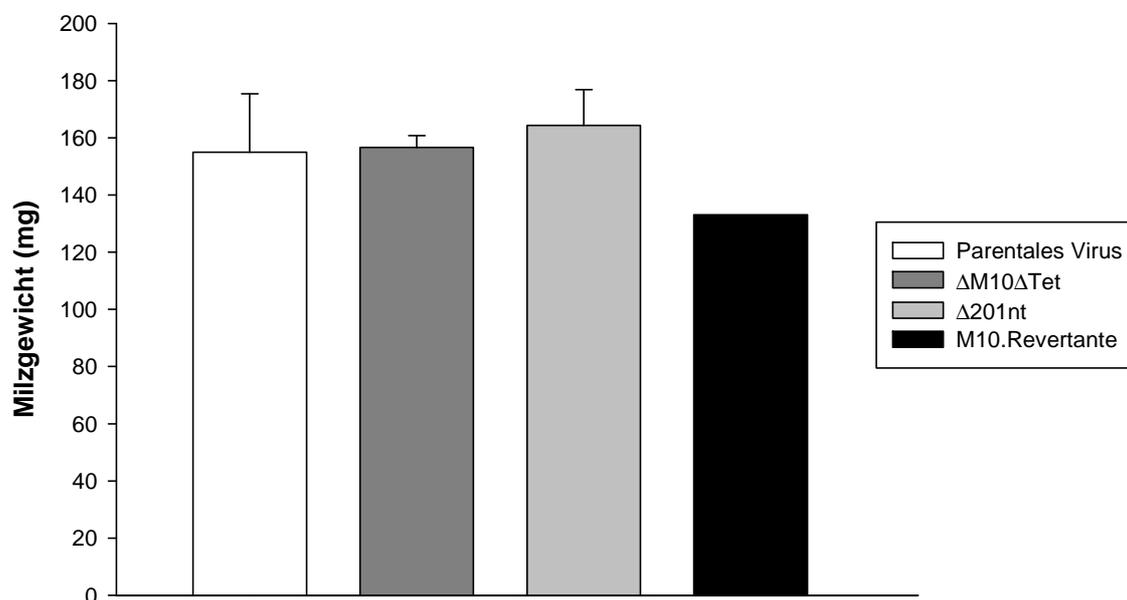


Abb. 3.33 Bestimmung des Milzgewichtes nach intranasaler Infektion mit $\Delta M10\Delta Tet$, $\Delta 201nt$, M10.Revertante und parentalem Virus. C57BL/6 Mäuse wurden i.n. mit $5 \cdot 10^4$ PFU infiziert. An Tag 42 p.i. wurden die Milzen entnommen und das Milzgewicht bestimmt. Dargestellt ist ein Experiment mit je 3 Mäusen pro Virus.

Nach Auswertung des *ex vivo* Reaktivierungsassays (Abb. 3.34) bestätigt sich dieses Bild. Die Reaktivierungsfrequenzen nach Infektion mit den einzelnen Viren konnten nicht bestimmt werden. Der Wert von 63,2 % für CPE positive Vertiefungen wurde von keinem der rekombinanten Viren erreicht. Auch zeigen sich keine großen Unterschiede in der Reaktivierung der einzelnen Viren untereinander.

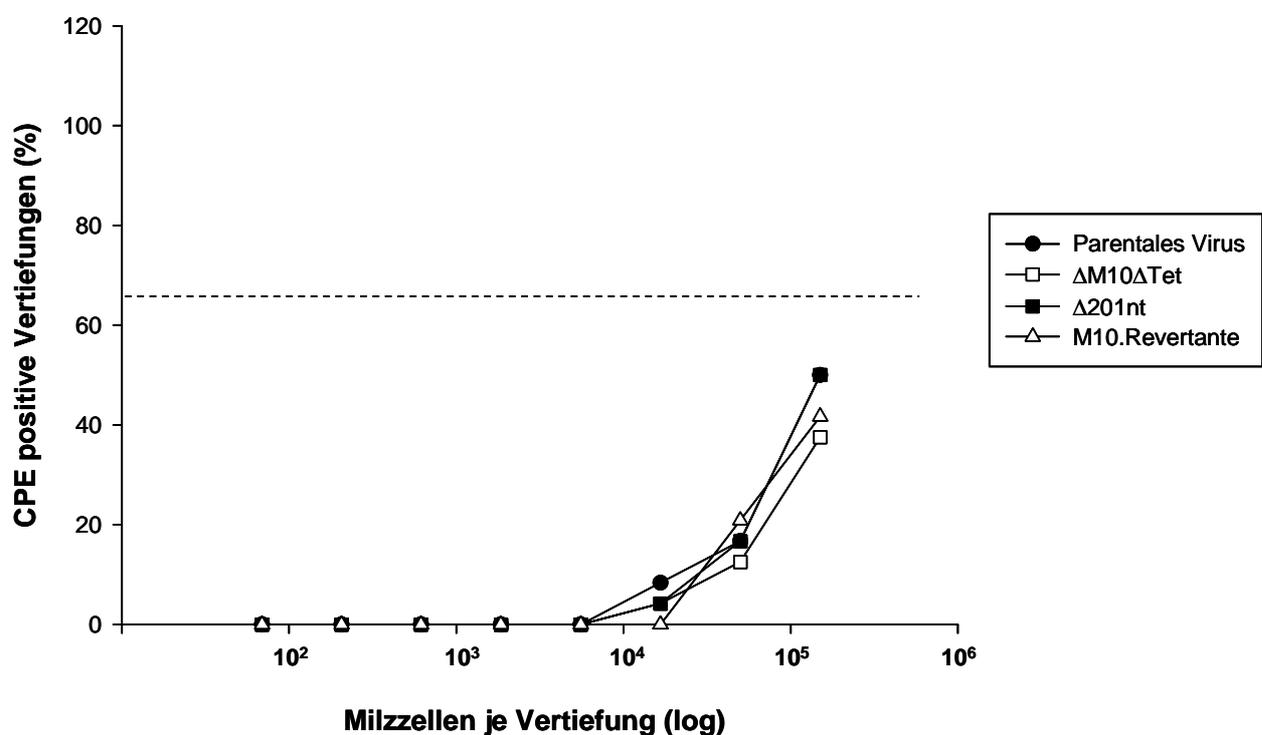


Abb. 3.34 *Ex vivo* Reaktivierung von Splenozyten nach intranasaler Infektion von C57BL/6 Mäusen mit Δ M10 Δ Tet, Δ 201nt, M10.Revertante und parentalem Virus. C57BL/6 Mäuse wurden i.n. mit $5 \cdot 10^4$ PFU infiziert. 42 Tage p.i. wurden die Milzen entnommen und aufgearbeitet. Nach 7 - 10tägiger Co-Kultivierung der Splenozyten mit NIH3T3 Zellen wurde das Auftreten von CPE in den einzelnen Vertiefungen ausgezählt. Dargestellt ist ein Experiment mit je drei Mäusen pro Virus. Die Strichlinie zeigt den Wert von 63,2 %, welcher benutzt wird, um die Reaktivierungsfrequenz zu bestimmen.

Zur Bestimmung der Viruslast in den Splenozyten an Tag 42 wurde aus eingefrorenen Milzzellen die DNA isoliert und in die quantitative real-time PCR eingesetzt. Das Ergebnis ist in Abb. 3.35 gezeigt. Übereinstimmend mit den Daten des *ex vivo* Reaktivierungsassays (Abb. 3.34) finden sich nur wenige virale Genome zu diesem Zeitpunkt in den Splenozyten, welches somit die niedrige Reaktivierung erklären kann. Nach Infektion mit dem parentalen Virus finden sich 3 Kopien des viralen gB/1000 Kopien L8, nach Infektion mit $\Delta M10\Delta Tet$ 2 Kopien. In den mit $\Delta 201nt$ und der M10.Revertante infizierten Splenozyten konnten im Durchschnitt nur eine Kopie gB/1000 Kopien L8 gemessen werden.

Der Phänotyp, der nach Infektion mit der Mutante $\Delta 201nt$ an Tag 17 p.i. in der Milz von infizierten Mäusen auftritt, ist zu einem späteren Zeitpunkt der Latenz nicht mehr sichtbar. An Tag 42 p.i. sind die gemessenen Parameter bei allen rekombinanten Viren gleich, es tritt kein Unterschied mehr auf, vergleicht man das parentale Virus (oder die M10.Revertante) und die $\Delta 201nt$ Mutante.

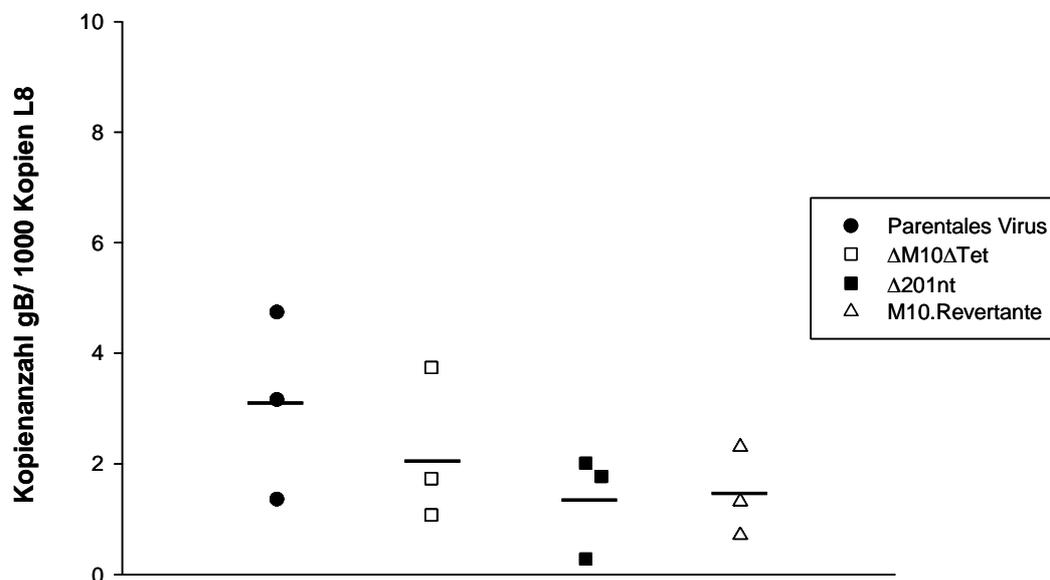


Abb. 3.35 Latente Viruslast in den Milzzellen der mit $\Delta M10\Delta Tet$, $\Delta 201nt$, M10.Revertante und parentalem Virus infizierten Mäuse. C57BL/6 Mäuse wurden i.n. mit $5 \cdot 10^4$ PFU infiziert. 42 Tage p.i. wurden die Milzen entnommen, die DNA isoliert und in der real-time PCR eingesetzt. Gezeigt ist ein Experiment mit je drei Mäusen pro Virusgruppe. Die schwarzen Balken zeigen den errechneten Mittelwert.

3.11. Der Phänotyp der $\Delta 201nt$ Mutante bleibt auch nach intraperitonealer Infektion in C57BL/6 Mäusen bestehen

Neben der intranasalen Infektionsroute können die Mäuse auch intraperitoneal infiziert werden. Hierbei gelangt das Virus direkt in die Milz, wo es lytisch repliziert und anschließend in die Latenzphase übergeht.

Das rekombinante Virus $\Delta M10\Delta Tet$ zeigt nach i.p. Infektion einen ähnlichen Phänotyp wie nach i.n. Infektion (siehe 3.8). Die Infektionsroute scheint die Parameter der latenten Infektion (Splénomegalie, Reaktivierungsfrequenz und Viruslast in den infizierten Splenozyten) nach Infektion mit $\Delta M10\Delta Tet$ nicht zu beeinflussen. Der Defekt in der Replikation bleibt auch nach i.p. Infektion bestehen, wenn auch in einem geringeren Ausmaß. Um herauszufinden, wie sich das rekombinante Virus $\Delta 201nt$ *in vivo* verhält, wenn eine andere Infektionsroute gewählt wird, wurden C57BL/6 Mäuse i.p. mit $1 \cdot 10^4$ PFU der M10.Revertante, $\Delta M10\Delta Tet$ und $\Delta 201nt$ infiziert. Die M10.Revertante wurde anstelle des parentalen Virus eingesetzt (siehe 3.5). An Tag 17 p.i. wurden die Mäuse euthanasiert, die Milzen entnommen und die Parameter der latenten Infektionsphase bestimmt.

Untersuchungen *in vivo*: Latenzphase

Als erstes wurde das Ausmaß der Splénomegalie nach Infektion mit den rekombinanten Viren untersucht. In Abb. 3.36 ist das Milzgewicht an Tag 17 p.i. nach Infektion mit der M10.Revertante, $\Delta M10\Delta Tet$ und $\Delta 201nt$ gezeigt. Erwartungsgemäß zeigt die M10.Revertante das höchste Gewicht (im Durchschnitt 423 mg). Nach Infektion mit den Mutanten $\Delta M10\Delta Tet$ und $\Delta 201nt$ wiegen die Milzen deutlich weniger (251 und 309 mg). Die Werte bestätigen prinzipiell den Phänotyp nach intranasaler Infektion, wenngleich die Splénomegalie nach i.n. Infektion weniger stark ausgeprägt ist (vgl. Abb. 3.30).

In Abb. 3.37 sind die Daten des *ex vivo* Reaktivierungsassay an Tag 17 p.i. gezeigt. Die Frequenz der Reaktivierung nach Infektion mit der M10.Revertante liegt bei einem Ereignis in 61.010 Zellen. Nach Infektion mit der Mutante $\Delta M10\Delta Tet$ geht die Frequenz leicht zurück

(1: 89.822), nach Infektion mit $\Delta 201nt$ konnte keine Frequenz bestimmt werden, der Wert von 63,2 % CPE positiver Vertiefungen wurde nicht erreicht.

Die Viruslast in den Splenozyten, bestimmt durch quantitative PCR, bestätigt die Daten des Reaktivierungsassays. Mit 38 Kopien des viralen gB/ 1000 Kopien L8 ist die Viruslast nach Infektion mit der M10.Revertante am höchsten (Abb. 3.38). In den mit $\Delta M10\Delta Tet$ infizierten Splenozyten fanden sich 31 Kopien des viralen gB an Tag 17 p.i, nach Infektion mit $\Delta 201nt$ fast die Hälfte weniger (14 Kopien gB/1000 Kopien L8). Verglichen mit den Daten nach intranasaler Infektion (vgl. 3.9) zeigen die Mutanten $\Delta M10\Delta Tet$ und $\Delta 201nt$ einen ähnlichen Phänotyp *in vivo* nach i.p. Infektion. In den Parametern Splenomegalie, Reaktivierungsfrequenz und Viruslast an Tag 17 sind die Werte nach Infektion mit den Mutanten deutlich verringert, verglichen mit dem parentalen Virus bzw. der M10.Revertante. Für $\Delta 201nt$ wurde nur ein Experiment mit je drei Mäusen pro Virus durchgeführt, die Unterschiede in der Latenz an Tag 17 p.i. sind somit nicht signifikant verschieden zum parentalen Virus, wie das nach i.n. Infektion der Fall ist, wo drei Experimente durchgeführt wurden (Abb. 3.30 bis 3.32). Der Trend, dass die Deletionen in der M10.Region zu einem Phänotyp *in vivo* führt, tritt aber auch nach i.p. Infektion auf. Die Wahl der Infektionsroute ist für den Phänotyp nicht entscheidend.

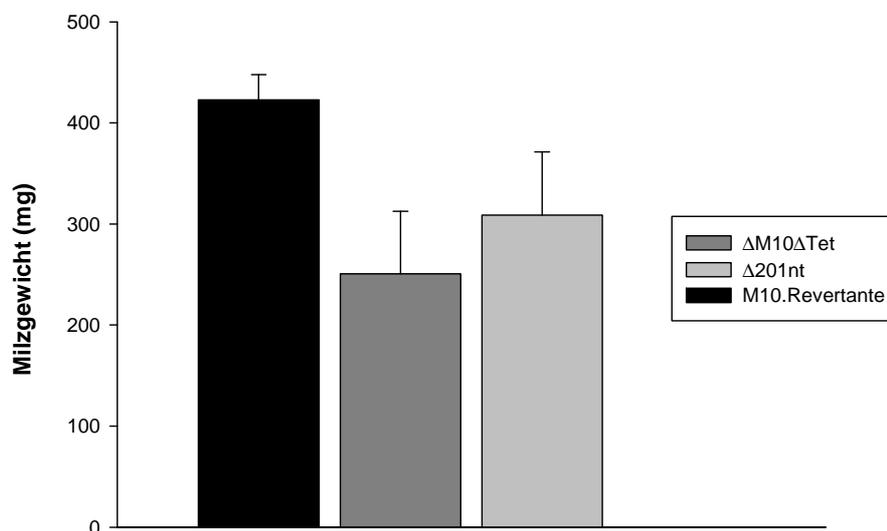
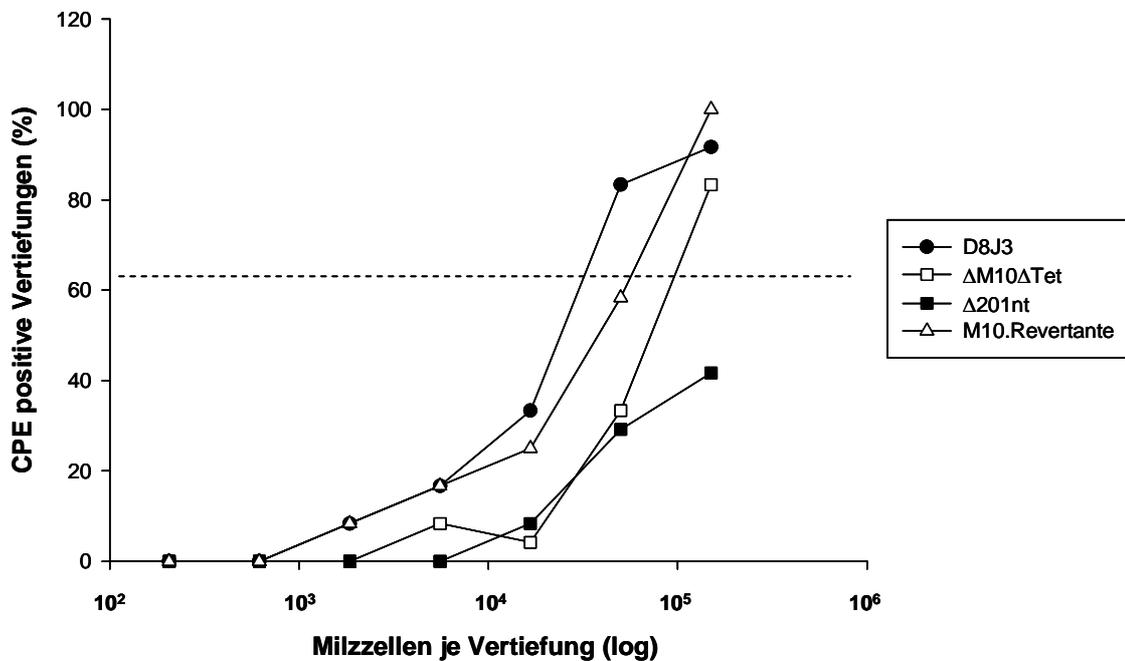


Abb. 3.36 Splenomegalie in C57BL/6 Mäusen nach intraperitonealer Infektion mit der M10.Revertante, $\Delta M10\Delta Tet$ und $\Delta 201nt$. Die Mäuse wurden intraperitoneal mit $1 \cdot 10^4$ PFU Virus infiziert. 17 Tage p.i. wurden die Mäuse euthanasiert und das Milzgewicht bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD aus einem Experiment mit je drei Mäusen pro Virus.



Frequenz der Reaktivierung:

Parentales Virus	1: 61.010
ΔM10ΔTet	1: 89.822
Δ201nt	< 63,2 % CPE positive Vertiefungen

Abb. 3.37 *Ex vivo* Reaktivierung von Splenozyten nach intraperitonealer Infektion von C57BL/6 Mäusen mit der M10.Revertante, ΔM10ΔTet und Δ201nt. C57BL/6 Mäuse wurden i.p. mit $1 \cdot 10^4$ PFU infiziert. 17 Tage p.i. wurden die Milzen entnommen und aufgearbeitet. Nach 7 - 10tägiger Co-Kultivierung der Splenozyten mit NIH3T3 Zellen wurde das Auftreten von CPE in den einzelnen Vertiefungen ausgezählt. Die Strichlinie zeigt den Wert von 63,2 %, welcher benutzt wird um die Reaktivierungsfrequenz zu bestimmen. Dargestellt ist ein Experiment mit je drei Mäusen pro Virus.

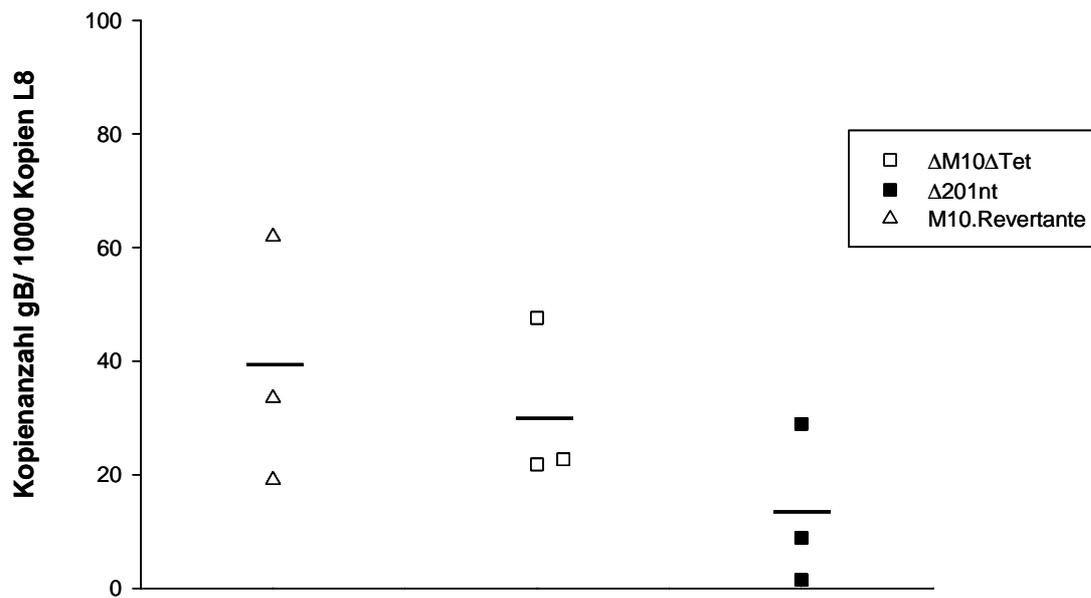


Abb. 3.38 Latente Viruslast in den Milzzellen der mit M10.Revertante, Δ M10 Δ Tet und Δ 201nt infizierten Mäuse. C57BL/6 Mäuse wurden i.p. mit $1 \cdot 10^4$ PFU infiziert. 17 Tage p.i. wurden die Milzen entnommen, die DNA isoliert und in der real-time PCR eingesetzt. Gezeigt ist ein Experiment mit je drei Mäusen pro Virus, die schwarzen Balken zeigen den Mittelwert.

3.12. Reversion des Phänotyps der $\Delta M10\Delta Tet$ Mutante durch ektope Insertion des Replikationsursprunges (OriLyt) von MHV-68

Nach intranasaler Infektion von Mäusen mit den Virusmutanten $\Delta M10\Delta Tet$ und $\Delta 201nt$ kommt es sowohl in der Lunge an Tag 6 p.i. als auch in der Milz an Tag 17 p.i. zu einer Reduktion der viralen Replikation. Beide Viren tragen eine Deletion im Bereich des Replikationsursprunges (OriLyt) von MHV-68, $\Delta M10\Delta Tet$ trägt zusätzlich eine Deletion im Bereich des M10 Leserahmens (Abb. 3.9). Um zu zeigen, dass der veränderte Phänotyp auf die Deletion des OriLyt zurückzuführen ist, wurde ein rekombinantes Virus auf Basis der $\Delta M10\Delta Tet$ Mutante generiert, in welchem der essentielle Teil des OriLyt durch ektope Insertion wiederhergestellt wurde. Im OriLyt $\Delta M10\Delta Tet$ Virus ist ein 863 bp großes Fragment, das den gesamten essentiellen Teil des OriLyt einschließt, am linken Genomende eingefügt (Abb. 3.1). Gemeinsam mit dem parentalen Virus und der Mutante $\Delta M10\Delta Tet$ wurde dieses Virus *in vitro* und *in vivo* getestet.

Untersuchungen *in vitro*

Das Replikationsverhalten *in vitro* ist in Abbildung 3. 39 dargestellt. NIH3T3 Zellen wurden mit einer MOI von 0,1 mit den rekombinanten Viren $\Delta M10\Delta Tet$, OriLyt $\Delta M10\Delta Tet$ und dem parentalen Virus infiziert. Zu den Zeitpunkten 0, 24, 48, 72 und 96 h nach Infektion wurden die Zellen geerntet und der Virustiter der Proben mittels Plaqueassay bestimmt.

Wie in den vorangegangenen Experimenten zeigt die Mutante $\Delta M10\Delta Tet$ eine moderat erniedrigte Replikation *in vitro* (vergleiche Abb. 3.11). Die Titer nach Infektion mit $\Delta M10\Delta Tet$ liegen 1 – 1 ½ Log-Stufen unter denen des parentalen Virus. Die Replikation des OriLyt $\Delta M10\Delta Tet$ Virus hingegen verläuft wie die des parentalen Virus, teilweise liegen die Titer von OriLyt $\Delta M10\Delta Tet$ sogar leicht über denen des parentalen Virus (24 bis 72 h p.i.). *In vitro* wird der Phänotyp des $\Delta M10\Delta Tet$ Virus durch die ektope Insertion des essentiellen Teils des OriLyt (Abb.3.1) revertiert. Dies bestätigt die vorangegangenen Ergebnisse und deutet darauf hin, dass die Deletion im lytischen Replikationsursprung für die erniedrigte Replikation von $\Delta M10\Delta Tet$ *in vitro* verantwortlich ist.

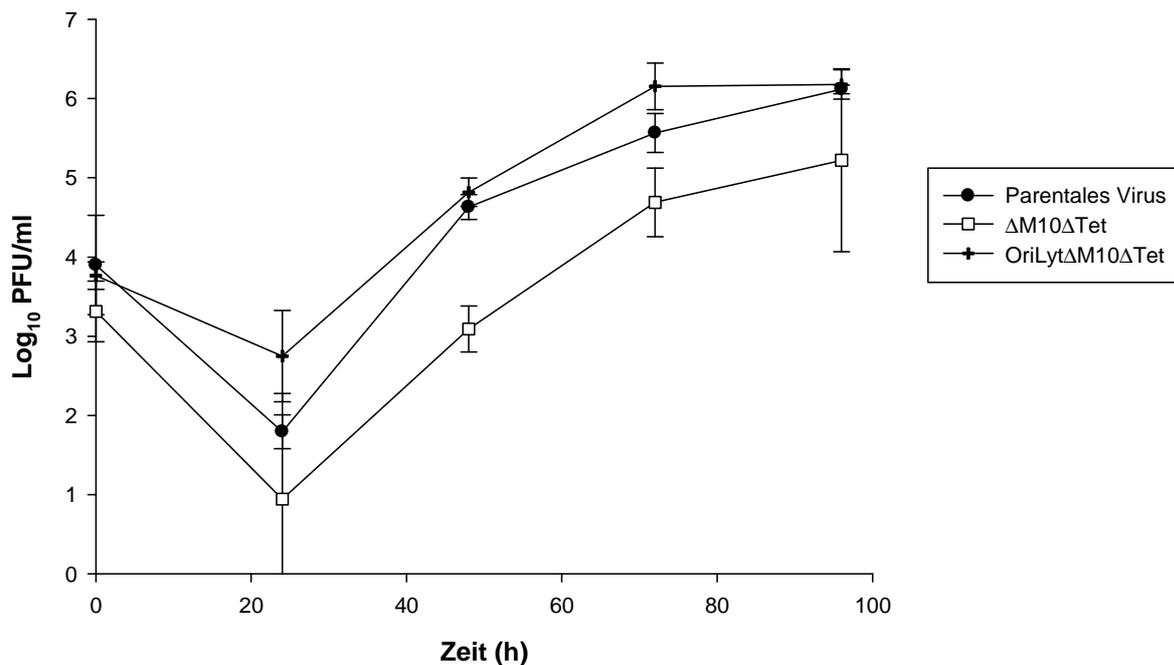


Abb. 3.39 Wachstumsanalyse von $\Delta M10\Delta Tet$, OriLyt $\Delta M10\Delta Tet$ und parentalem Virus. NIH3T3 Zellen wurden mit einer MOI = 0,1 der rekombinanten Viren $\Delta M10\Delta Tet$ und OriLyt $\Delta M10\Delta Tet$, sowie dem parentalen Virus infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 24, 48, 72 und 96 h) nach Infektion geerntet. Der Virustiter wurde mittels Plaqueassay auf BHK-21 Zellen bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Untersuchungen *in vivo*

a) lytische Replikation

Nach intranasaler Infektion von C57BL/6 Mäusen mit $5 \cdot 10^4$ PFU $\Delta M10\Delta Tet$, OriLyt $\Delta M10\Delta Tet$ und parentalem Virus wurde die lytische Replikation an Tag 6 p.i. untersucht. Hierzu wurden die infizierten Mäuse euthanasiert, deren Lungen entnommen und homogenisiert. Die viralen Titer der Proben wurden mit dem Plaqueassay bestimmt. Abbildung 3.40 zeigt die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten mit je drei Mäusen pro Virus. Nach Infektion mit der Mutante $\Delta M10\Delta Tet$ liegen die Titer der einzelnen Mäuse zwischen 1,3 und 2,3 Log₁₀ PFU/ml. Die Titer der mit dem parentalen Virus infizierten Mäuse

liegen signifikant höher, bei im Durchschnitt 3,0 Log₁₀ PFU/ml. Nach Infektion mit OriLytΔM10ΔTet zeigt sich dasselbe Bild. Mit Werten von im Durchschnitt 2,7 Log₁₀ PFU/ml liegen die Titer der OriLytΔM10ΔTet Mutante auf einer Ebene mit denen des parentalen Virus. Der Phänotyp, der nach intranasaler Infektion mit ΔM10ΔTet zu beobachten ist, hebt sich auf, wenn die Mäuse mit OriLytΔM10ΔTet infiziert werden. Der Defekt, der in der lytischen Replikationsphase *in vivo* auftritt, ist somit auf die Deletion des OriLyt in ΔM10ΔTet zurückzuführen.

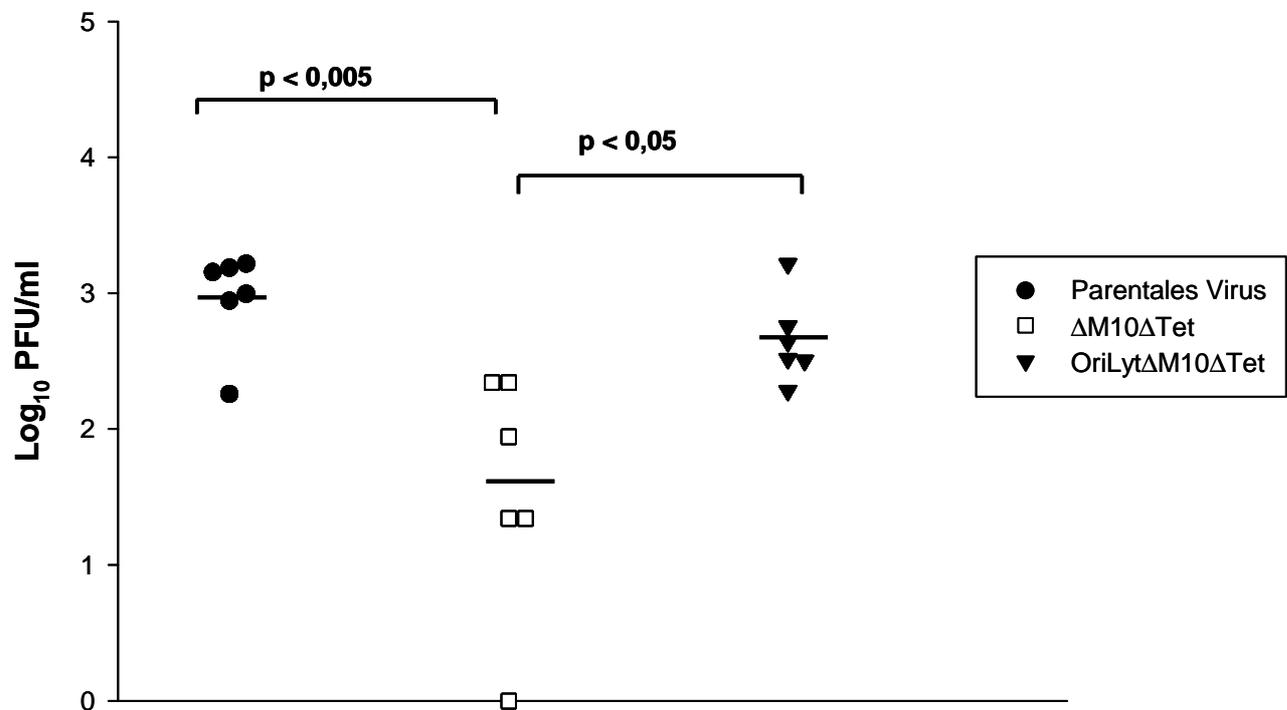


Abb. 3.40 Lytische Replikation von ΔM10ΔTet, OriLytΔM10ΔTet und parentalem Virus in der Lunge. C57BL/6 Mäuse wurden i.n. mit $5 \cdot 10^4$ PFU des jeweiligen Virus infiziert. An Tag 6 nach Infektion wurden die Lungen entnommen, und der Virustiter mittels Plaueassay ermittelt. Gezeigt sind zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente mit je drei Mäusen pro Gruppe. Die schwarzen Balken zeigen den Mittelwert. Der Unterschied zwischen parentalem Virus und ΔM10ΔTet ist statistisch signifikant mit $p < 0,005$, der Unterschied zwischen OriLytΔM10ΔTet und ΔM10ΔTet, mit $p < 0,05$ (Student's t-test).

b) Latenzphase

Um herauszufinden, ob die Deletion des OriLyt in $\Delta M10\Delta Tet$ auch für den auftretenden Phänotyp in der Latenzphase verantwortlich ist, wurden C57BL/6 Mäuse mit den rekombinanten Viren $\Delta M10\Delta Tet$, OriLyt $\Delta M10\Delta Tet$ und parentalem Virus infiziert. 17 Tage nach Infektion wurden die Versuchstiere euthanasiert, die Milzen entnommen und aufgearbeitet. Das Milzgewicht an Tag 17 p.i. ist in Abb. 3.41 gezeigt. Während nach Infektion mit $\Delta M10\Delta Tet$ kaum eine Splenomegalie zu beobachten ist (119 mg), zeigen sich signifikant erhöhte Milzgewichte nach Infektion mit dem parentalen Virus und OriLyt $\Delta M10\Delta Tet$ ($p < 0,003$). Mit Werten von 342 und 308 mg im Durchschnitt liegen die Milzgewichte von parentalem Virus und OriLyt $\Delta M10\Delta Tet$ auf nahezu einer Ebene. Diese Ergebnisse sind ein weiteres Indiz dafür, dass auch in der latenten Phase der MHV-68 Infektion eine Deletion des OriLyt Auswirkungen auf die Replikation hat.

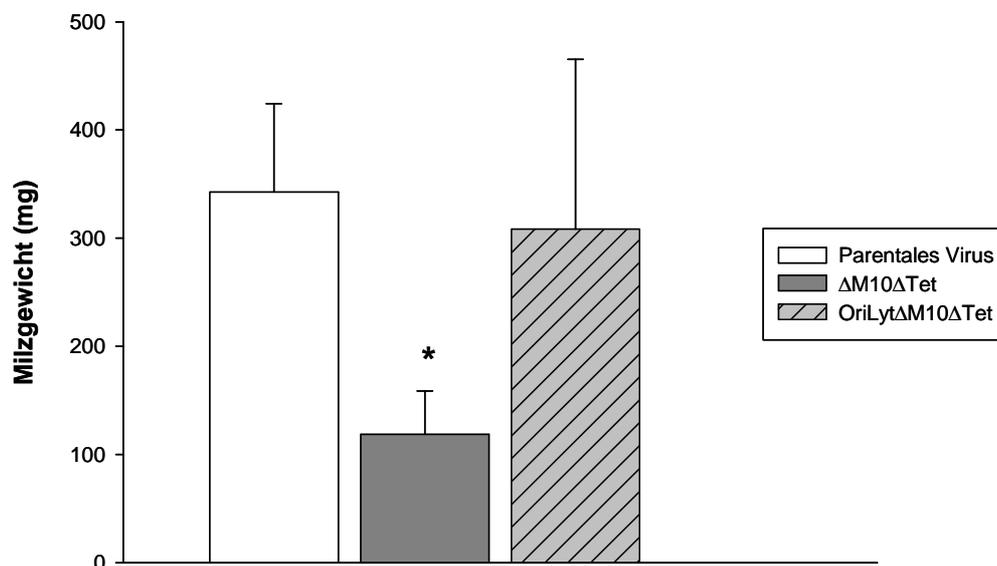
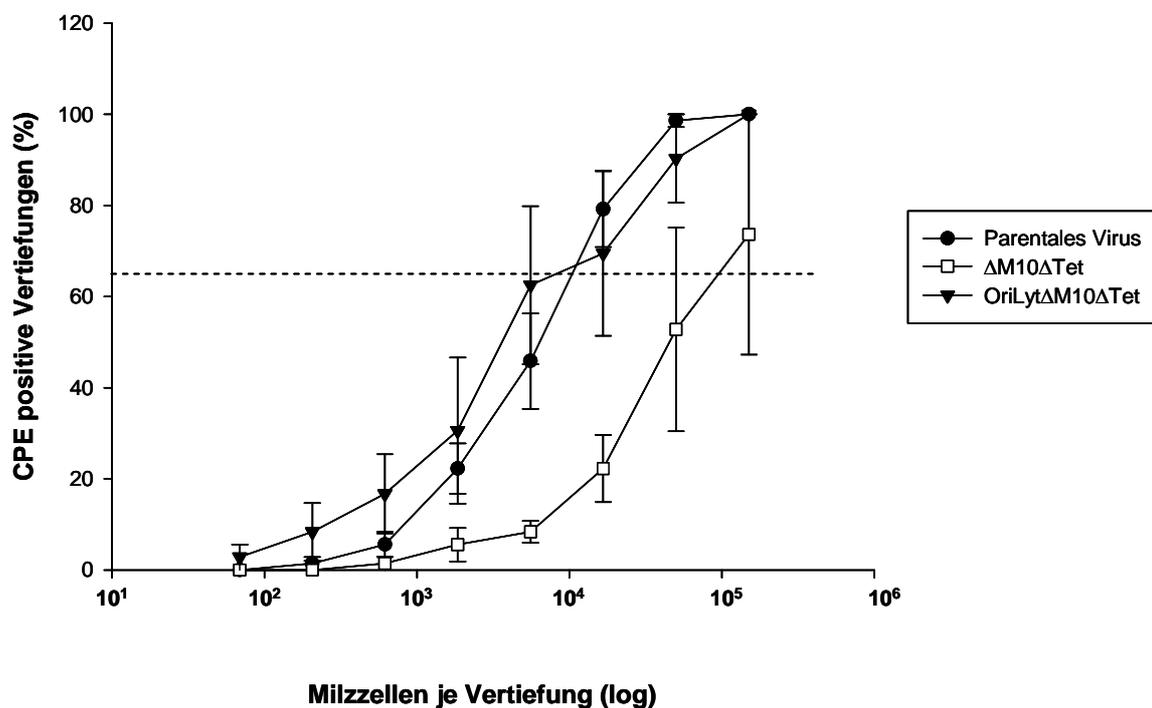


Abb. 3.41 Splenomegalie in C57BL/6 Mäusen nach intranasaler Infektion mit $\Delta M10\Delta Tet$, OriLyt $\Delta M10\Delta Tet$ und parentalem Virus. Die Mäuse wurden mit $5 \cdot 10^4$ PFU Virus infiziert. 17 Tage p.i. wurden die Mäuse euthanasiert und das Milzgewicht bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit jeweils drei Mäusen pro Virus. Die statistische Signifikanz zwischen den Werten nach Infektion mit parentalem Virus sowie OriLyt $\Delta M10\Delta Tet$ und Infektion mit $\Delta M10\Delta Tet$ beträgt * = $p < 0,003$ (Student's t-test).

Der *ex vivo* Reaktivierungsassay mit den errechneten Reaktivierungsfrequenzen ist in Abb. 3.42 dargestellt. Nach Infektion mit dem parentalen Virus liegt die Reaktivierungsfrequenz bei einem Reaktivierungsereignis in 9.172 Zellen. Wie dem Kurvenverlauf zu entnehmen ist, liegt die Frequenz nach Infektion mit OriLyt Δ M10 Δ Tet auf einem ähnlichen Niveau (1:8.556). Die Splenozyten die mit der Mutante Δ M10 Δ Tet infiziert wurden zeigen im Vergleich eine deutlich reduzierte Reaktivierungsfrequenz von einem Reaktivierungsereignis in 79.992 Zellen.



Frequenz der Reaktivierung:

Parentales Virus	1: 9.172
Δ M10 Δ Tet	1: 79.992
OriLyt Δ M10 Δ Tet	1: 8.556

Abb. 3.42 *Ex vivo* Reaktivierung von Splenozyten nach intranasaler Infektion von C57BL/6 Mäusen mit Δ M10 Δ Tet, OriLyt Δ M10 Δ Tet und parentalem Virus. C57BL/6 Mäuse wurden i.n. mit $5 \cdot 10^4$ PFU infiziert. 17 Tage p.i. wurden die Milzen entnommen und aufgearbeitet. Nach 7 - 10tägiger Co-Kultivierung der Splenozyten mit NIH3T3 Zellen wurde das Auftreten von CPE in den einzelnen Vertiefungen ausgezählt. Die Strichlinie zeigt den Wert von 63,2 %, welcher benutzt wird, um die Reaktivierungsfrequenz zu bestimmen. Der Unterschied in der Reaktivierung zwischen parentalem Virus, OriLyt Δ M10 Δ Tet und Δ M10 Δ Tet ist statistisch signifikant mit $p = 0,02$ (parentales Virus) und $p = 0,004$ (OriLyt Δ M10 Δ Tet), berechnet mit dem Student's t-test.

Die Daten des Reaktivierungsassays werden durch die Ergebnisse der quantitativen real-time PCR unterstützt. Wie in Abb. 3.43 zu sehen, liegt die Viruslast in den Splenozyten nach Infektion mit der Mutante $\Delta M10\Delta Tet$ im Mittel bei 4 Kopien gB/ 1000 Kopien L8. Nach Infektion mit OriLyt $\Delta M10\Delta Tet$ und dem parentalen Virus steigt die Kopienzahl auf über 30 Kopien des viralen gB pro 1000 Kopien des zellulären L8 an (32 Kopien bei parentalem Virus, 39 bei OriLyt $\Delta M10\Delta Tet$). Der Unterschied in der Viruslast an Tag 17 p.i. zwischen dem parentalen Virus bzw. OriLyt $\Delta M10\Delta Tet$ und der $\Delta M10\Delta Tet$ Mutante ist statistisch signifikant mit $p < 0,01$, berechnet mit dem Student's t-test. Die Reaktivierungsfrequenzen entsprechen der Viruslast in den infizierten Splenozyten. Bei niedriger Kopienzahl zeigt sich eine erniedrigte Reaktivierungsfrequenz ($\Delta M10\Delta Tet$), diese steigt an bei höherer Kopienzahl (OriLyt $\Delta M10\Delta Tet$ und parentales Virus). Weiterhin bestätigt sich, dass der Phänotyp nach Infektion mit $\Delta M10\Delta Tet$ auf die Deletion des OriLyt von MHV-68 zurückzuführen ist. Nach ektopter Insertion des essentiellen Teils des OriLyt in $\Delta M10\Delta Tet$ liegen die untersuchten Parameter *in vivo* (Lungentiter an Tag 6 p.i, Splenomegalie, Reaktivierungsfrequenz und Viruslast an Tag 17 p.i.) wieder auf einer Ebene mit denen nach Infektion mit dem parentalen Virus. Die Deletion des OriLyt von MHV-68 hat einen starken Einfluss auf die lytische wie auch die latente Replikationsphase des Virus.

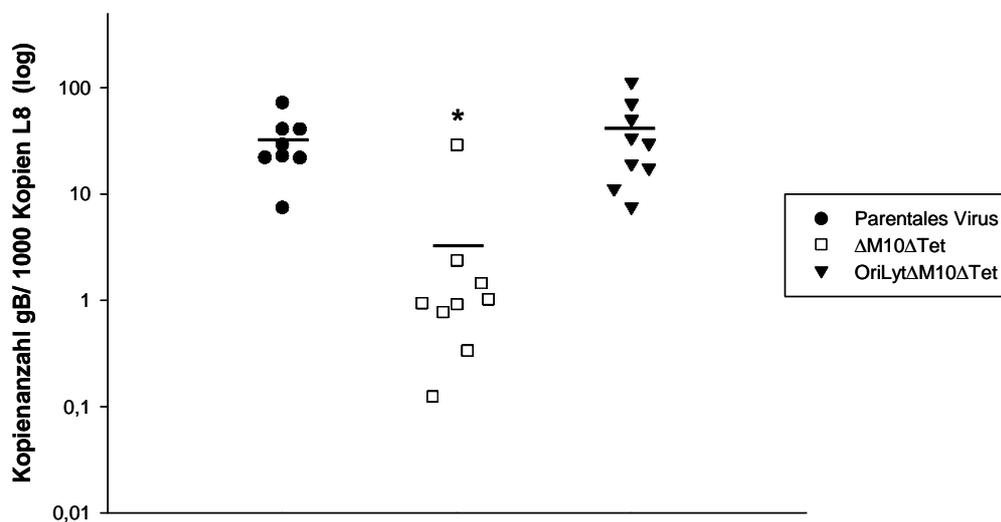


Abb. 3.43 Latente Viruslast in den Milzzellen der mit $\Delta M10\Delta Tet$, OriLyt $\Delta M10\Delta Tet$ und parentalem Virus infizierten Mäuse. C57BL/6 Mäuse wurden i.n. mit $5 \cdot 10^4$ PFU infiziert. 17 Tage p.i. wurden die Milzen entnommen, die DNA isoliert und in der real-time PCR eingesetzt. Gezeigt sind drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente mit je drei Mäusen pro Virusgruppe. Der schwarze Balken zeigt den Mittelwert. Der Stern zeigt die statistische Signifikanz der Werte nach Infektion mit parentalem Virus und OriLyt $\Delta M10\Delta Tet$ gegenüber den Werten nach Infektion mit $\Delta M10\Delta Tet$ ($p < 0,01$, Student's t-test).

3.13. Untersuchungen zum Nachweis eines in der M10 Region von MHV-68 kodierten Proteins

Bislang ist unklar, ob der M10 Leserahmen (M10a, b und c) von MHV-68 für potentielle virale Proteine kodiert. Trotz des Nachweises verschiedener Transkripte für die einzelnen Leserahmen (siehe 1.4) konnte keine Translation funktioneller Proteine nachgewiesen werden. In Vorarbeiten zu dieser Dissertation wurden verschiedene Strategien erprobt, um eine eventuelle Expression viraler Proteine nachzuweisen bzw. auszuschließen, welche aber zu keinem aussagekräftigen Ergebnis führten. Im Folgenden sind diese Experimente kurz beschrieben.

In einem ersten Ansatz wurde ein Western Blot mit synthetischen Peptid-Antiseren gegen die M10 Region durchgeführt. Hierzu wurden Lysate von mit MHV-68 infizierten NIH3T3 sowie latent infizierten S11 (\pm TPA; TPA für Induktion des lytischen Zyklus) Zellen im Western Blot getestet. Es konnten keine Signale für M10 detektiert werden. Im Folgenden wurden verschiedene M10-Fusionsproteine hergestellt. Ein Fragment, welches die gesamte M10 Region enthält, wurde in verschiedene Expressionsvektoren kloniert. Jeder Vektor trägt zusätzlich zur M10 Sequenz eine Sequenz, die der Aufreinigung und Detektion der potentiellen Proteine dient, wie die GST (*Glutathion S-transferase*) und HIS (*Histidin*) Sequenz, oder eine Kombination aus beiden. Nach Transformation in Bakterien und Induktion der Proteinexpression wurden Western Blots mit Hilfe von kommerziellen Antikörpern sowie den synthetischen Peptid-Antiseren durchgeführt. Nur in einem Fall konnte ein Fusionsprotein detektiert werden (M10 Fragment 98464 – 102045 in Vektor pETM-30, mit N- und C-terminaler HIS Sequenz sowie GST). Nach Aufreinigung des Proteins über eine Säule wurde das gewonnene Eluat zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern verwendet (AG E. Kremmer, Helmholtz Zentrum München).

Die Antikörper wurden dann im Western Blot eingesetzt. Als Proben dienten hierbei Lysate infizierter sowie nichtinfizierter Zellen sowie mit dem Leervektor oder M10 tragendem Vektor transfizierte Zellen. Als Zelllinien wurden neben NIH3T3 Zellen auch 293, Ag8 und S11 Zellen verwendet. Zusätzlich zu den Zelllysaten wurden die Zellkulturüberstände getestet. In keinem der durchgeführten Blots konnte ein Signal für M10 detektiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde nun eine weitere Strategie erprobt, um potentielle M10 Proteine nachzuweisen und gegebenenfalls zu charakterisieren. Hierzu wurde mit Hilfe des ET-Cloning ein rekombinantes MHV-68 Virus generiert, welches eine Hämagglutinin (HA)

Sequenz am M10a Leserahmen trägt (vgl. Abb. 3.6 und 3.7). Die HA Sequenz erlaubt über spezifische Antikörper die Detektion des Proteins im Western Blot. Die M10 Region des Virus M10aHA-tag wurde nach der Herstellung sequenziert und anschließend *in vitro* eingesetzt.

NIH3T3 Zellen, ausgesät in einer 6-Loch-Platte oder einer 25 cm² Zellkulturflasche, wurden sowohl mit dem parentalen Virus wie auch mit dem rekombinanten M10aHA-tag Virus mit einer MOI von 0,1, später auch 1, infiziert. Parallel wurden nicht infizierte Zellen als Negativkontrolle mitgeführt. Als Positivkontrolle diente eine Lysat, welches ein EBV Protein mit angehängter HA-Sequenz und definierter Größe enthielt (bereitgestellt von S. Petermann, AG B. Kempkes, Helmholtz Zentrum München; EBVHA-tag). An verschiedenen Zeitpunkten p.i. wurden die Zellen geerntet und lysiert. Die Lysate wurden aliquotiert und bei -20 °C bis zum Einsatz im Western Blot gelagert. Der Zellkulturüberstand wurde ebenfalls gesammelt und eingefroren.

Abb. 3. 44 zeigt exemplarisch einen der in dieser Arbeit durchgeführten Western Blots. NIH3T3 Zellen wurden mit M10aHA-tag und einer MOI von 0,1 infiziert. Zum Zeitpunkt 16, 24 und 48 h p.i. wurden die Zellen geerntet und lysiert. Die Lysate der infizierten Zellen sowie eine Negativ- (nichtinfiziert, 48 h p.i.) und Positivkontrolle (EBVHA-tag) wurden in den Western Blot eingesetzt. Spur M zeigt den Marker (in kDa). Spur P zeigt die deutliche Bande für die Positivkontrolle (EBVHA-tag). In Spur 1 ist die Negativkontrolle aufgetragen. Die Lysate der mit dem rekombinanten M10aHA-tag Virus infizierten Zellen sind in den Spuren 2 bis 4 aufgetragen, wobei Spur 2 die Probe 16 h p.i, die Spur 3 und 4 die Proben 24 bzw. 48 h p.i. darstellt. Vergleicht man die nichtinfizierte und die infizierte Probe 16 h p.i, findet sich das gleiche Bandenmuster. 24 und 48 h p.i. werden die Signale schwächer, die beiden deutlichen Banden bei ca. 40 und 100 kDa sind aber noch zu sehen. Die Exposition betrug bei diesem Film 15 min. Spezifische Banden für ein potentielles M10a Protein (mit einem erwarteten Molekulargewicht von ca. 73 kDa) konnten auf dem Film nicht detektiert werden, ebenfalls nicht nach kürzerer oder längerer Exposition. Die zusätzliche Bande in Spur 2 zwischen 45 und 66 kDa, fand sich auch in anderen durchgeführten Blots, es handelt sich somit ebenfalls um keine spezifische Bande für M10a.

Bei den detektierten Banden in Abb. 3.44 scheint es sich um unspezifische Banden zu handeln. Ein Western Blot, in dem nur der sekundäre Antikörper eingesetzt wurde, bestätigt

dies (Abb. 3.45). Vergleicht man das Bandenmuster nach Inkubation des Blots mit dem primären (HA-spezifischem) und sekundären Antikörper mit dem Muster das nach alleiniger Inkubation mit dem sekundären Antikörper auftritt, zeigen sich die gleichen Signale. Abb. 3.45 zeigt zwei Teile eines Western Blots. Spuren 1 bis 4 wurden sowohl mit dem primären als auch mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Aufgetragen sind eine Negativkontrolle (N), sowie Lysate von NIH3T3 Zellen, die mit M10aHA-tag infiziert wurden. Die Kontrolle wurde 48 h p.i. geerntet, die Proben der NIH3T3 Zellen 16, 24, 48 und 72 h p.i. (Spur, 1, 2, 3 und 4). Der zweite Teil des Western Blots (5 und 6) wurde nur mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Aufgetragen sind mit M10aHA-tag infizierte Proben zum Zeitpunkt 48 und 72 h p.i. Betrachtet man die entsprechenden Spuren miteinander (3 und 4 mit 5 und 6) zeigt sich ein gleiches Bandenmuster. Die Signale scheinen unspezifisch durch den sekundären Antikörper zustande zu kommen.

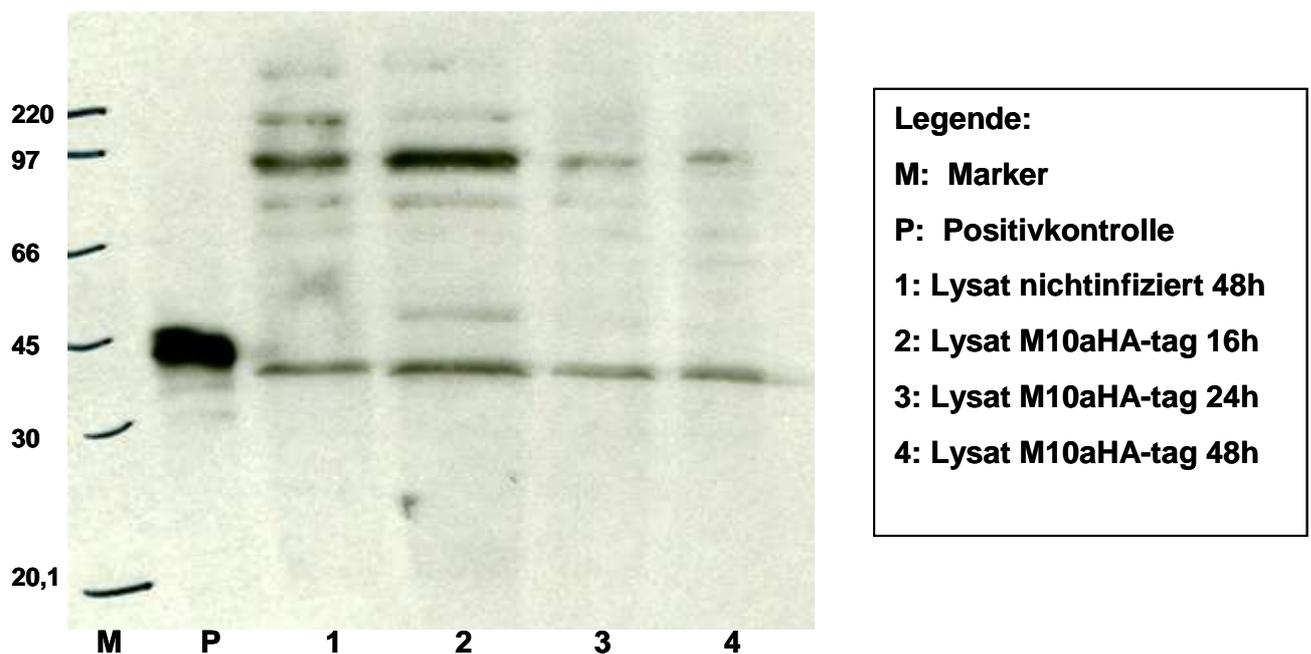


Abb. 3. 44 Western Blot von mit M10aHA-tag infizierten Proben. NIH3T3 Zellen wurden mit einer MOI von 0,1 M10aHA-tag infiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion wurden die Zellen geerntet und lysiert. Im Anschluss erfolgte der Einsatz im Western Blot. Gezeigt sind drei Proben der mit M10aHA-tag infizierten Zellen zum Zeitpunkt 16, 24 und 48 h p.i. (Spur 2-4). Spur 1 zeigt die Negativkontrolle (nichtinfiziertes Lysat), in der mit P bezeichneten Spur ist die Positivkontrolle (EBVHA-tag) aufgetragen. Die erste Spur (M) zeigt den Marker mit folgenden Größen: 220, 97, 66, 45, 30 und 20,1 kDa.

Es konnte mit Hilfe der Positivkontrolle (Abb. 3.44) gezeigt werden, dass der primäre Antikörper wie erwartet an die HA-Sequenz bindet. Um sicherzugehen, dass nicht eine zu geringe Konzentration von M10a im Zelllysat oder Zellkulturüberstand der Grund für die fehlende Detektion im Western Blot ist, wurde in einigen Experimenten vor dem Western Blot eine Immunopräzipitation (IP) durchgeführt. Die IP dient der Isolierung und Aufkonzentration eines bestimmten Proteins aus einem Proteingemisch (in diesem Fall aus dem Zelllysat oder Überstand) über einen spezifischen Antikörper.

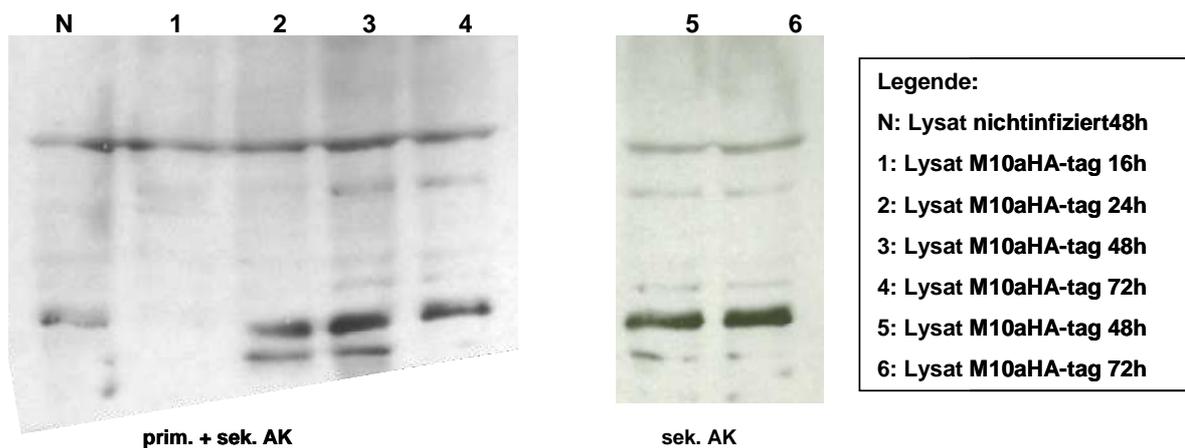


Abb. 3. 45 Western Blot von mit M10aHA-tag infizierten Proben. NIH3T3 Zellen wurden mit einer MOI von 0,1 M10aHA-tag infiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion wurden die Zellen geerntet und lysiert. Im Anschluss erfolgte der Einsatz im Western Blot. Gezeigt sind 6 Proben der mit M10aHA-tag infizierten Zellen zum Zeitpunkt 16, 24, 48 und 72 h p.i. (Spur 1-6). In der mit N bezeichneten Spur ist die Negativkontrolle aufgetragen. Hierbei handelt es sich um ein nichtinfiziertes Lysat von NIH3T3 Zellen. Die Proben 1-4 wurden sowohl mit dem primären als auch mit dem sekundären Antikörper inkubiert, Spur 5 und 6 (die Proben entsprechen 3 und 4) nur mit dem sekundären Antikörper.

Hierzu wurden NIH3T3 Zellen mit einer MOI von 0,5 des parentalen Virus sowie M10aHA-tag infiziert. Nach Auftreten von CPE wurden die Zellen geerntet und lysiert. Zusätzlich wurden Lysate nichtinfizierter Zellen als Kontrollen mitgeführt. Alle Lysate wurden mit Protein G Beads und dem HA-spezifischen Antikörper behandelt und sofort in den Western Blot eingesetzt. Vor dem Einsatz in die IP wurde ein Aliquot des Zelllysats abgenommen und direkt in den Western Blot eingesetzt (Proben bezeichnet mit: vor IP). Während der IP wurden einige Proben nicht mit dem HA-spezifischen Antikörper behandelt (Proben bezeichnet mit: ohne AK). Zusammen mit den Aliquots vor der IP dienten diese als Negativkontrollen. Als Positivkontrolle diente eine Lysat, welches ein MCMV Protein mit angehängter HA-Sequenz trägt (bereitgestellt von AG B. Adler, Genzentrum der LMU München). Die Positivkontrolle zeigte in durchgeführten Western Blot ein Signal (Daten nicht gezeigt), ist aber in Abb. 3.46 nicht mitgeführt worden.

In Abb. 3.46 ist ein Versuch der IP zu sehen. Aufgetragen im Western Blot sind Lysate von mit M10aHA-tag und parentalem Virus infizierten NIH3T3 Zellen sowie nichtinfizierten Zellen. Für jedes Lysat wurden drei Proben aufgetragen. Zum ersten der Teil des Lysats, der vor der IP gewonnen wurde. Weiterhin die Proben, die in die IP eingesetzt wurden. Einmal der Teil, der mit dem spezifischen Antikörper behandelt wurde, einmal der unbehandelte. Das Lysat vor der IP entspricht den Lysaten aus den vorherigen Western Blots (Abb. 3.44). Durch den Vergleich der Proben die mit oder ohne AK inkubiert wurden, sollen unspezifische Signale, welche allein durch den Antikörper hervorgerufen werden detektiert werden. In Abb. 3.46 zeigt sich, dass das Bandenmuster in allen Proben gleich ist, unabhängig davon ob die Zellen mit dem parentalen Virus oder M10aHA-tag infiziert, bzw. nichtinfiziert wurden. Die entstandenen Banden zeigen somit unspezifische Signale.

Sowohl für den Western Blot als auch für die IP wurde ein kommerziell hergestellter Antikörper (Rat α HA-tag, *Roche*) benutzt, der in zwei Western Blots durch einen der monoklonalen Antikörper aus der AG Kremmer (s.o.) ersetzt wurde. Neben den Zelllysaten wurden ebenfalls einige der Zellkulturüberstände getestet. In keinem der durchgeführten Experimente konnten nach Infektion mit M10aHA-tag spezifische Banden für ein mögliches M10 Protein detektiert werden. Parallel durchgeführte Immunfluoreszenztests zeigten ebenso kein positives Ergebnis (Daten nicht gezeigt).

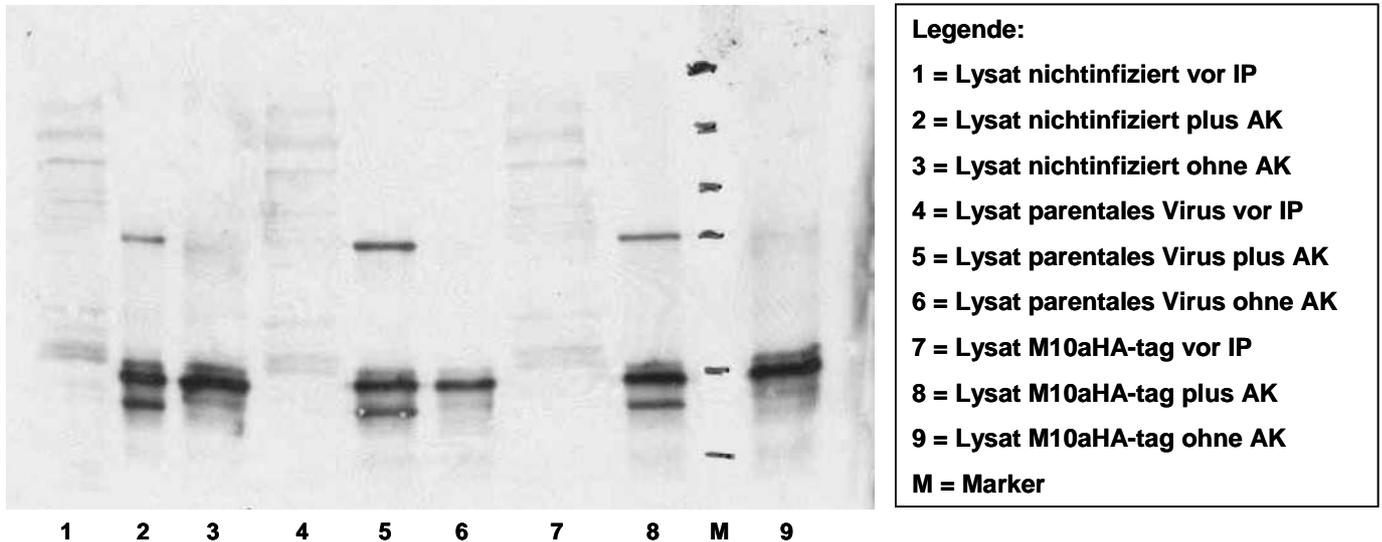


Abb.3.46 Immunpräzipitation (IP) und Western Blot von mit M10aHA-tag infizierten Proben. NIH3T3 Zellen wurden mit einer MOI von 0,5 M10aHA-tag und parentalen Virus infiziert. Nach Auftreten von 100%igem CPE wurden die Zellen geerntet, lysiert und in die IP eingesetzt. Nach Inkubation der Lysate mit dem HA-spezifischen Antikörper über Nacht wurden die Proben in den Western Blot eingesetzt. Gezeigt sind jeweils drei Proben der mit parentalen Virus und M10aHA-tag infizierten Zellen sowie nichtinfizierter Zellen. Die erste Probe (Spur 1, 4 und 7) zeigt die Zelllysate vor der IP, Spur 2, 5 und 8 die Lysate, die mit dem HA-spezifischen Antikörper behandelt wurden, und die Spuren 3, 6 und 9 die Negativkontrolle ohne Antikörper. Die mit M gekennzeichnete Spur zeigt den Marker an, welcher von oben nach unten folgende Proteingrößen anzeigt: 220, 97, 66, 45, 30 und 20,2 kDa.

3.14. Insertion der K12 Region von KSHV in die rekombinanten MHV-68 Δ M10 Δ Tet und M10.Del und der Einfluss dieser Insertion auf die Pathogenese *in vivo*

Wie bereits beschrieben, liegt der M10 Leserahmen von MHV-68 in seiner Position im Genom homolog zum K12 Leserahmen von KSHV (Abb.1.2). K12 kodiert für die Proteine der Kaposin Familie (Kaposin A-C). M10 zeigt ebenfalls mehrere Leserahmen (M10a-c), wengleich funktionelle Proteine noch nicht detektiert werden konnten. Der M10 Leserahmen schließt die 100 bp Wiederholungsstruktur von MHV-68 ein, K12 findet sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu zwei der KSHV spezifischen Wiederholungssequenzen, D1 und D2. Um herauszufinden, ob beide ORFs neben diesen molekularen Eigenschaften auch biologische Funktionen teilen, wurden auf Basis der rekombinanten Viren Δ M10 Δ Tet und M10.Del Virusmutanten erzeugt, die zusätzlich zu einer Deletion im M10 Leserahmen den K12 Leserahmen plus die Wiederholungssequenzen D1 und D2 tragen (Abb. 3.47). Beide Viren lagen bei Beginn der Arbeit bereits im Labor vor. Bei dem rekombinanten Virus K12-M10.Del wurde die K12 Region (ohne Promotorbereich) mittels BAC Technologie in die Deletionsstelle von M10.Del kloniert. Eine Frage war hierbei, ob K12 in diesem Falle über einen potentiellen M10 Promotor exprimiert wird, und welche Rolle die K12 Region in der Pathogenese des Virus spielt. Parallel wurde K12 ektop in eine nichtkodierende Region von MHV-68 am linken Genomende inseriert (K12ektopM10.Del). Hierbei stand die gesamte K12 Expressionskassette unter der Kontrolle eines RSV Promotors, die Expression des K12 sollte somit gegeben sein. Western Blots bestätigten auch die Expression von K12 in K12ektopM10.Del, nicht aber von K12 in K12-M10.Del (AG Adler, B.Steer, Daten nicht gezeigt).

Inwiefern die Insertion des K12 die Pathogenese der MHV-68 Mutanten beeinflusst, und ob K12 teilweise oder vollständig die Funktionen der deletierten M10 Region übernehmen kann, sollte *in vivo* getestet werden. Hierzu wurden C57BL/6 Mäuse mit den jeweiligen rekombinanten Viren infiziert und die Parameter der lytischen und latenten Replikationsphase untersucht.

In parallel durchgeführten Experimenten, in denen die M10 Deletionsmutanten vergleichend untersucht wurden, zeigte sich relativ schnell, dass die M10 Mutante Δ M10 Δ Tet einen stärkeren Phänotyp *in vivo* aufweist als M10.Del (siehe 3.4). Im Vergleich zum parentalen Virus zeigten beide Mutanten in allen untersuchten Parametern einen veränderten Phänotyp.

Die Unterschiede in den Parametern Lungentiter, Splenomegalie, Reaktivierungsfrequenz und Viruslast in den Splenozyten nach Infektion mit $\Delta M10\Delta Tet$ waren jedoch stärker als nach Infektion mit M10.Del. Deswegen wurde ein weiteres Virus auf der Basis der $\Delta M10\Delta Tet$ Mutante generiert. In K12ektop $\Delta M10\Delta Tet$ ist die K12 Region ektop am linken Genomende inseriert (Abb. 3.47).

Die rekombinanten Viren wurden in zwei unabhängig voneinander durchgeführten *in vivo* Experimenten eingesetzt. Die Parameter, die untersucht wurden, waren die lytische Infektion an Tag 6 sowie die latente Infektionsphase an Tag 17 p.i..

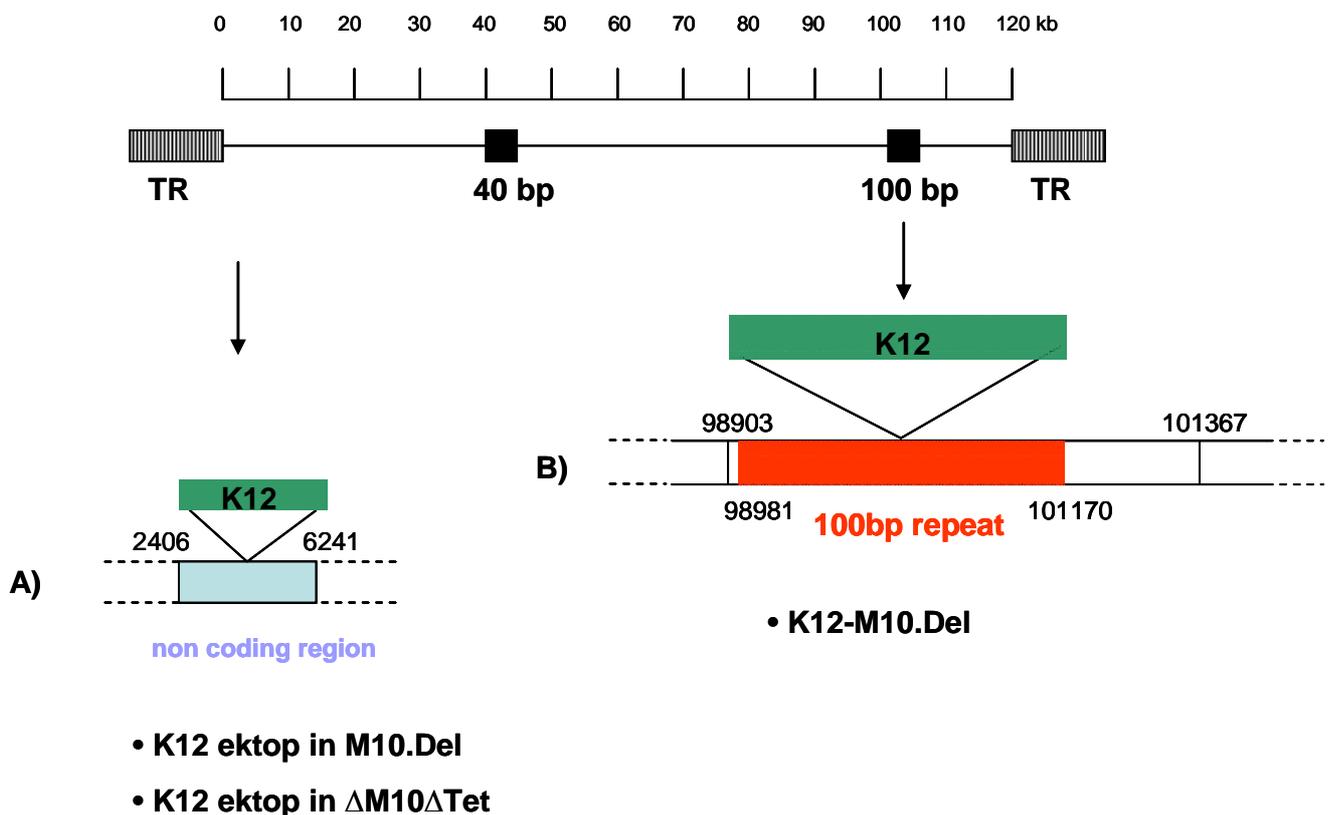


Abb. 3. 47 Herstellung der rekombinanten MHV-68, die die K12 Region von KSHV tragen. Mit Hilfe der BAC-Technologie wurden drei verschiedene rekombinante Viren erzeugt, die jeweils die K12 Region tragen. Die Viren wurden auf Basis der M10.Del und $\Delta M10\Delta Tet$ Mutante generiert. K12ektopM10.Del und K12ektop $\Delta M10\Delta Tet$ tragen den K12 ORF ektop am linken Genomende von MHV-68 (A), K12-M10.Del trägt das Fragment in der Deletionsstelle des M10.Del Virus (B). TR = terminale Wiederholungsstrukturen, 40 bp und 100 bp = interne Wiederholungsstrukturen

Untersuchungen *in vivo*: lytische Replikationsphase

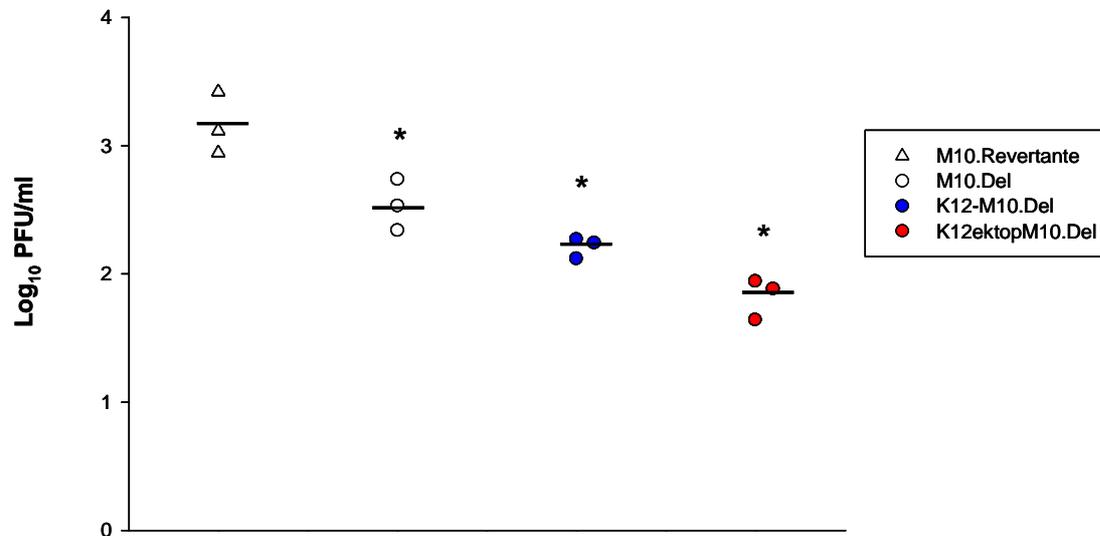
Abbildung 3.48. zeigt die viralen Titer in der Lunge an Tag 6 p.i.. C57BL/6 Mäuse wurden intranasal mit $5 \cdot 10^4$ PFU M10.Revertante, M10.Del, K12-M10.Del und K12ektopM10.Del, sowie $5 \cdot 10^3$ PFU parentalem Virus, Δ M10 Δ Tet und K12ektop Δ M10 Δ Tet infiziert (Abb. 3.48A und B). Sechs Tage nach Infektion wurden die Tiere euthanasiert, die Lungen entnommen und der Titer der einzelnen Viren mittels Plaqueassay bestimmt.

Abbildung 3.48A zeigt die Titer nach Infektion mit M10.Revertante, M10.Del, K12-M10.Del und K12ektopM10.Del. Die M10.Revertante wurde anstelle des parentalen Virus eingesetzt, da in den vorangegangenen Experimenten gezeigt werden konnte, dass dieses Virus sich *in vivo* wie das parentale verhält (siehe 3.5). Nach Infektion mit der M10.Revertante finden sich die höchsten Virustiter mit im Mittel $3,2 \text{ Log}_{10}$ PFU/ml. Infiziert man die Mäuse mit der M10 Deletionsmutante M10.Del, sinken die Titer signifikant auf im Durchschnitt $2,5 \text{ Log}_{10}$ PFU/ml ab ($p < 0,03$). Eine Infektion mit den beiden K12 Mutanten weist ebenfalls signifikant niedrigere Titer im Vergleich zur M10.Revertante ($p < 0,003$) auf. Nach Infektion mit K12-M10.Del liegen die Titer bei 2,2, nach Infektion mit dem Virus K12ektopM10.Del bei $1,8 \text{ Log}_{10}$ PFU/ml.

In einem weiteren Experiment wurden Mäuse mit dem parentalen Virus sowie Δ M10 Δ Tet und K12ektop Δ M10 Δ Tet infiziert (Abb. 3.48B). Nach Infektion mit dem parentalen Virus finden sich virale Titer von im Mittel $3,0 \text{ Log}_{10}$ PFU/ml, nach Infektion mit Δ M10 Δ Tet sinken die Titer massiv ab und erreichen nur noch $0,3 \text{ Log}_{10}$ PFU/ml ($p < 0,002$). Nach Infektion mit der K12 Mutante K12ektop Δ M10 Δ Tet konnten keine Viren in der Lunge der Mäuse nachgewiesen werden.

In beiden Experimenten verhielten sich die rekombinanten K12 Viren ähnlich wie die M10 Mutanten. Eine Reversion des Phänotyps nach Infektion mit M10.Del und Δ M10 Δ Tet konnte durch die Insertion der K12 Region nicht erreicht werden. Die K12 Region scheint die Funktion der M10 Region nicht übernehmen zu können. Die Werte in der Lunge nach Infektion mit den K12 Mutanten scheinen den auftretenden Phänotyp sogar leicht zu verstärken.

A)



B)

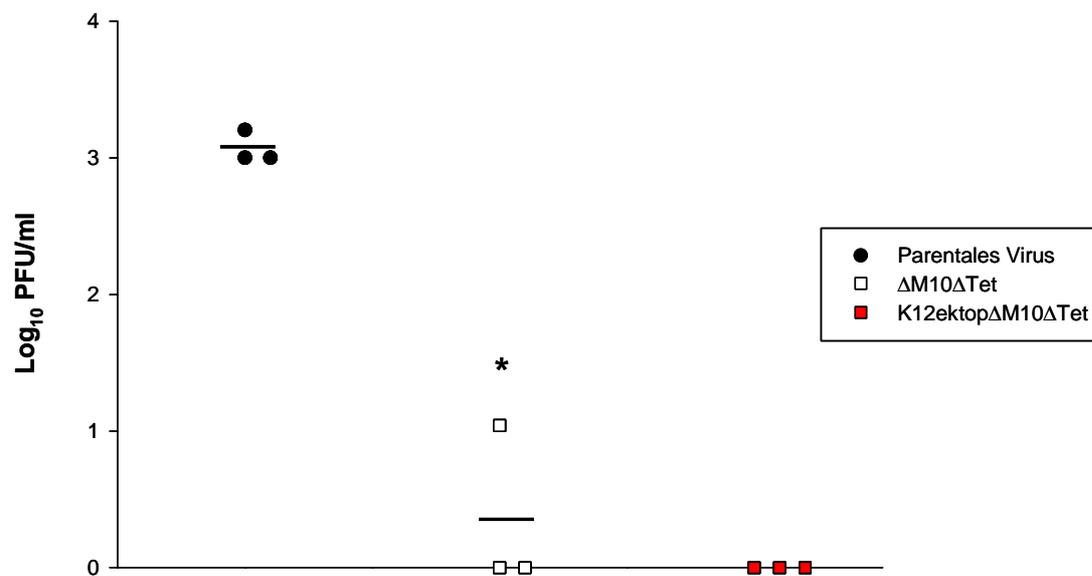


Abb. 3.48 Lytische Replikation der rekombinanten MHV-68 die die K12 Region von KSHV tragen. C57BL/6 Mäuse wurden i.n. mit $5 \cdot 10^4$ PFU (A) und $5 \cdot 10^3$ PFU (B) des jeweiligen Virus infiziert. An Tag 6 nach Infektion wurden die Lungen entnommen und der Virustiter mittels Plaueassay ermittelt. Gezeigt sind zwei unabhängige Experimente mit je drei Mäusen pro Gruppe. Der schwarze Balken stellt den Mittelwert aus drei Mäusen dar. Die Sterne zeigen die statistische Signifikanz der Titer der Mutanten M10.Del ($p < 0,03$), K12-M10.Del ($p < 0,003$), K12ektopM10.Del ($p < 0,002$) im Vergleich zur M10.Revertante, bzw. den Titer der Mutante $\Delta M10\Delta Tet$ verglichen mit dem parentalen Virus ($p < 0,002$). Alle Werte wurden mit dem Student's t-test bestimmt.

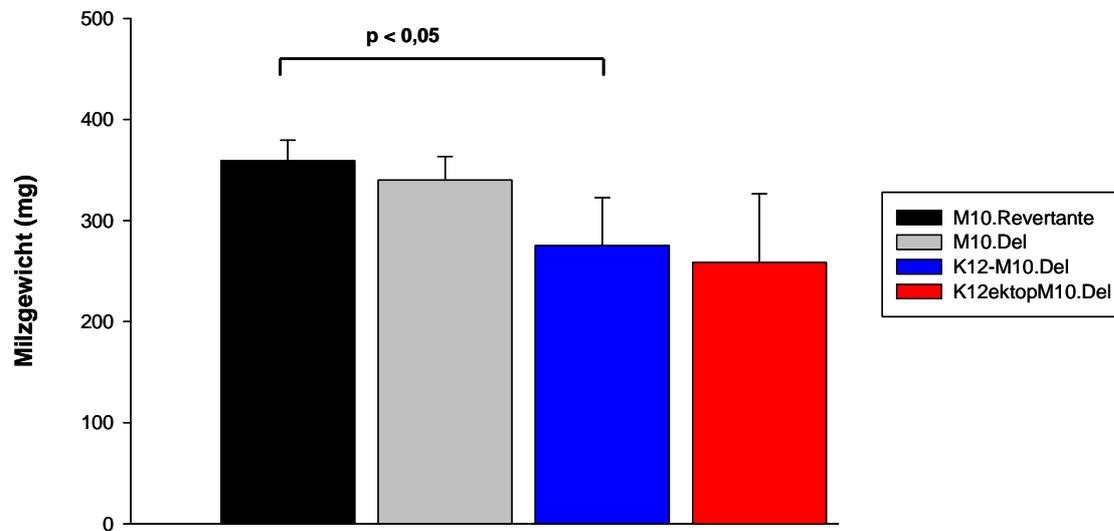
Untersuchungen *in vivo*: Latenzphase

An Tag 17 p.i. wurden die Milzgewichte der mit den jeweiligen Mutanten infizierten Mäuse bestimmt. Abbildung 3. 49A zeigt die Splenomegalie nach Infektion mit M10.Revertante, M10.Del, K12-M10.Del und K12ektopM10.Del. Die Milzen der mit der M10.Revertante infizierten Mäuse weisen erwartungsgemäß die höchsten Gewichte auf (359 mg). Nach Infektion mit M10.Del zeigen die Milzen im Durchschnitt ein Gewicht von 340 mg, und somit eine ähnliche Splenomegalie. Nach Infektion mit den K12 Viren reduziert sich das Milzgewicht auf Werte um 275 mg (K12-M10.Del) und 258 mg (K12ektopM10.Del), wobei der Unterschied im Vergleich zur M10.Revertante nach Infektion mit K12-M10.Del signifikant ist ($p = 0,047$). In beiden Fällen wird das Milzgewicht nach Infektion mit M10.Del jedoch nicht erreicht. Die Insertion der K12 Region hebt die Unterschiede also nicht auf.

Deutlicher wird dies noch im zweiten Experiment, in dem C57BL/6 Mäuse mit $5 \cdot 10^3$ PFU des parentalen Virus sowie $\Delta M10\Delta Tet$ und K12ektop $\Delta M10\Delta Tet$ infiziert wurden (Abb. 3.49B). Das Milzgewicht an Tag 17 p.i. ist nach Infektion mit dem parentalen Virus erwartungsgemäß auf einem hohen Niveau (526 mg). Nach Infektion mit dem rekombinanten Virus $\Delta M10\Delta Tet$ liegen die Werte signifikant niedriger. Mit Werten von im Durchschnitt 124 mg ($p = 0,017$) liegen die Milzgewichte nur knapp über dem Niveau von naiven Mäusen (Daten nicht gezeigt). Wie bereits beschrieben, zeigt die $\Delta M10\Delta Tet$ Mutante eine stark reduzierte Splenomegalie. Nach Insertion des K12 locus in diese Mutante kommt es nicht zu einem Anstieg des Milzgewichtes, eher sinken die Werte noch weiter ab. Die Milzen nach Infektion mit K12ektop $\Delta M10\Delta Tet$ liegen bei 88 mg, und zeigen so ein signifikant erniedrigtes Gewicht ($p = 0,012$).

Der *ex vivo* Reaktivierungsassay bestätigt die Daten der Splenomegalie. Die Reaktivierungsfrequenzen nach Infektion mit der M10.Revertante, M10.Del, K12-M10.Del und K12ektopM10.Del sind in Abb. 3.50 dargestellt, die Werte nach Infektion mit parentalem Virus sowie $\Delta M10\Delta Tet$ und K12ektop $\Delta M10\Delta Tet$ in Abbildung 3.51.

A)



B)

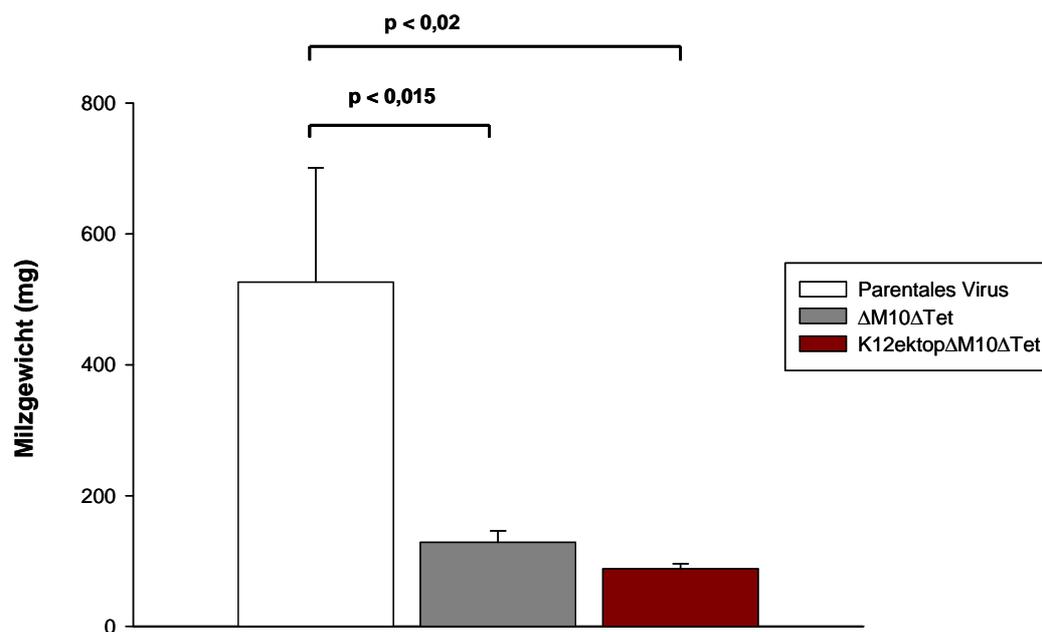
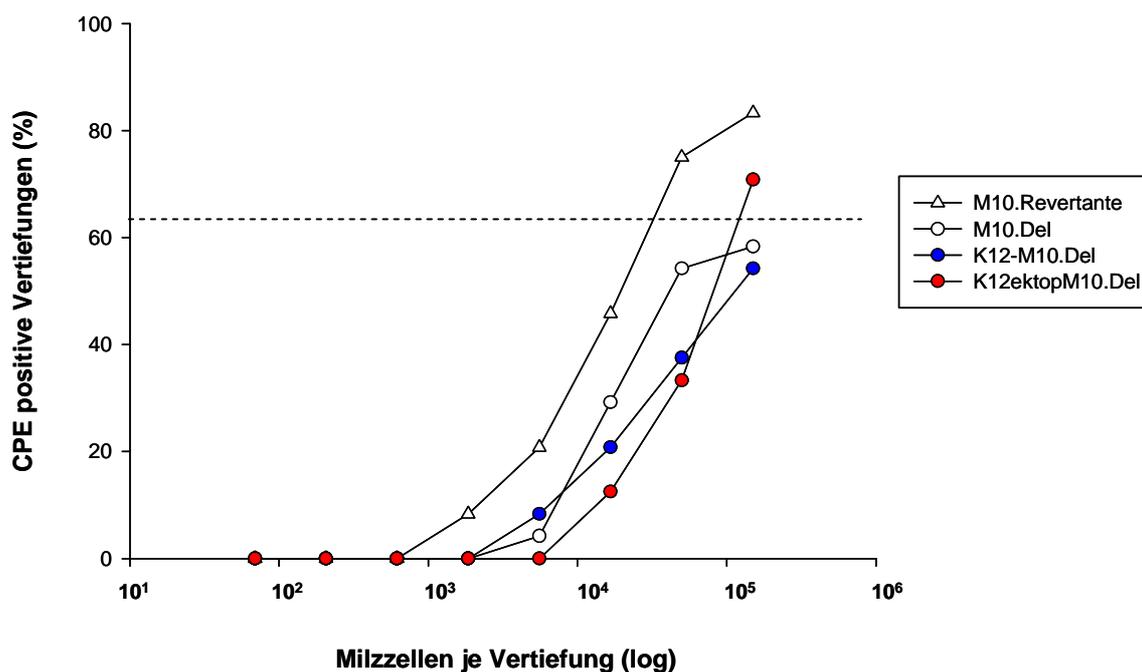


Abb. 3.49 Splenomegalie in C57BL/6 Mäusen nach intranasaler Infektion mit rekombinanten MHV-68, welche den K12 Leserahmen von KSHV tragen. Die Mäuse wurden mit $5 \cdot 10^4$ M10.Revertante, M10.Del, K12-M10.Del und K12ektopM10.Del (A) bzw. $5 \cdot 10^3$ PFU parentalem Virus, Δ M10 Δ Tet und K12ektop Δ M10 Δ Tet (B) infiziert. 17 Tage p.i. wurden die Mäuse euthanasiert und das Milzgewicht bestimmt. Für die zwei Experimente sind die Mittelwerte \pm SD von je drei Mäusen pro Virus gezeigt. Die statistische Signifikanz (p) wurde mit dem Student's t-test bestimmt.



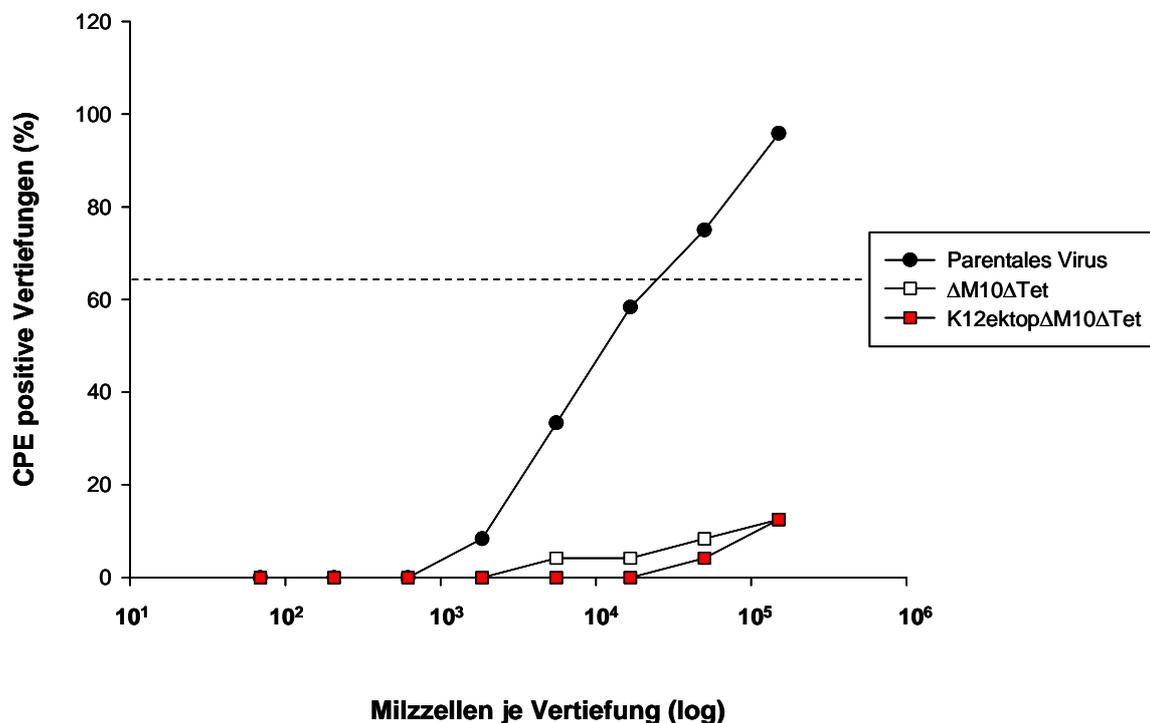
Frequenz der Reaktivierung:

M10.Revertante	1: 30.860
M10.Del	< 63,2 % CPE positive Vertiefungen
K12-M10.Del	< 63,2 % CPE positive Vertiefungen
K12ektotM10.Del	1: 119.964

Abb. 3.50 Ex vivo Reaktivierung von Splenozyten nach intranasaler Infektion von C57BL/6 Mäusen mit rekombinanten MHV-68, welche den K12 Leserahmen tragen. C57BL/6 Mäuse wurden i.n. mit $5 \cdot 10^4$ PFU der M10.Revertante, M10.Del, K12-M10.Del und K12ektotM10.Del infiziert. 17 Tage p.i. wurden die Milzen entnommen und aufgearbeitet. Nach 7 - 10tägiger Co-Kultivierung der Splenozyten mit NIH3T3 Zellen wurde das Auftreten von CPE in den einzelnen Vertiefungen ausgezählt. Die Strichlinie zeigt den Wert von 63,2 %, welcher benutzt wird um die Reaktivierungsfrequenz zu bestimmen. Dargestellt sind die Werte aus einem Experiment.

Die Reaktivierungsfrequenz nach Infektion mit der M10.Revertante liegt bei einem Reaktivierungsereignis in 30.860 Zellen, nach Infektion mit K12ektotM10.Del liegt sie weitaus geringer bei 1: 119.964. Die Frequenzen für M10.Del und K12-M10.Del konnten nicht berechnet werden, die Werte erreichen die erforderlichen 63,2 % nicht. Wie der Kurvenverlauf in Abb. 3.50 verdeutlicht, liegen die K12 Viren und die M10 Deletionsmutante in einem ähnlichen Bereich der Reaktivierung, erreichen aber nicht die Werte der

M10.Revertante. Abb. 3.51 zeigt die Reaktivierung nach Infektion mit dem parentalen Virus, $\Delta M10\Delta Tet$ und K12ektop $\Delta M10\Delta Tet$. Die beiden Mutanten zeigen hierbei kaum eine Reaktivierung aus der Latenz, verglichen zum parentalen Virus (1:22.011). Eine Reaktivierungsfrequenz konnte aufgrund fehlender Werte bei 63,2 % bei keiner der beiden Mutanten bestimmt werden. Auch in der latenten Infektionsphase zeigt sich so deutlich, dass die Insertion der K12 Region in die M10 Mutanten den Phänotyp des parentalen Virus nicht wiederherstellen kann.



Frequenz der Reaktivierung:

D8J3	1: 22.011
$\Delta M10\Delta Tet$	< 63,2 % CPE positive Vertiefungen
K12ektop $\Delta M10\Delta Tet$	< 63,2 % CPE positive Vertiefungen

Abb. 3.51 *Ex vivo* Reaktivierung von Splenozyten nach intranasaler Infektion von C57BL/6 Mäusen mit rekombinanten MHV-68, welche den K12 Leserahmen tragen. C57BL/6 Mäuse wurden i.n. mit $5 \cdot 10^3$ PFU des parentalen Virus, $\Delta M10\Delta Tet$ und K12ektop $\Delta M10\Delta Tet$ infiziert. 17 Tage p.i. wurden die Milzen entnommen und aufgearbeitet. Nach 7 - 10tägiger Co-Kultivierung der Splenozyten mit NIH3T3 Zellen wurde das Auftreten von CPE in den einzelnen Vertiefungen ausgezählt. Die Strichlinie zeigt den Wert von 63,2 %, welcher benutzt wird um die Reaktivierungsfrequenz zu bestimmen. Dargestellt sind die Werte aus einem Experiment.

Um bestimmen zu können, ob der Defekt in der Reaktivierung aus der Latenz nach Infektion mit den K12 Viren den Reaktivierungsprozess an sich, oder die Etablierung der Latenz in den Splenozyten betrifft, wurde die Viruslast der Milzzellen an Tag 17 p.i. mittels quantitativer real-time PCR bestimmt. Aus eingefrorenen Splenozyten wurde die DNA isoliert und in die PCR eingesetzt. Abb. 3.52 und 3.53 zeigen die Ergebnisse der Experimente.

Die Resultate der quantitativen PCR bestätigen prinzipiell die Daten des *ex vivo* Reaktivierungsassay. Nach Infektion mit der M10.Revertante und M10.Del finden sich 48 bzw. 44 Kopien des viralen gB pro 1000 Kopien L8. Wurden die Mäuse mit den rekombinanten K12 infiziert, sinkt die Kopienanzahl auf 25 (K12-M10.Del) bzw. 14 (K12ektopM10.Del) Kopien gB/1000 L8 ab (Abb. 3.52). Im zweiten Experiment finden sich ähnliche Resultate (Abb. 3.53). Nach Infektion mit dem parentalen Virus wurden 45 Kopien gB/1000 L8 gemessen, in mit Δ M10 Δ Tet infizierten Splenoyzten deutlich weniger (4 Kopien gB/1000 L8). Nach Infektion mit K12ektop Δ M10 Δ Tet konnten keine Virusgenome nachgewiesen werden.

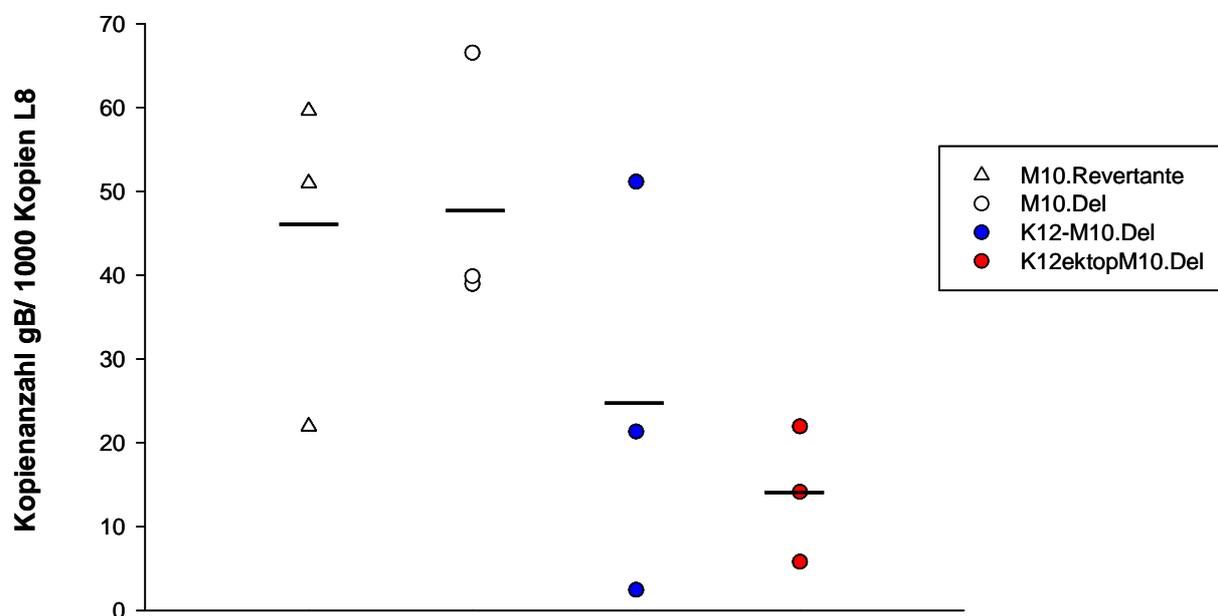


Abb. 3.52 Latente Viruslast in den Milzzellen der mit **M10.Revertante**, **M10.Del**, **K12-M10.Del** und **K12ektopM10.Del** infizierten Mäuse. C57BL/6 Mäuse wurden i.n. mit $5 \cdot 10^4$ PFU infiziert. 17 Tage p.i. wurden die Milzen entnommen, die DNA isoliert und in der quantitativen real-time PCR eingesetzt. Gezeigt ist ein Experiment mit je drei Mäusen pro Virus. Die schwarzen Balken stellen die Mittelwerte der drei Mäuse dar.

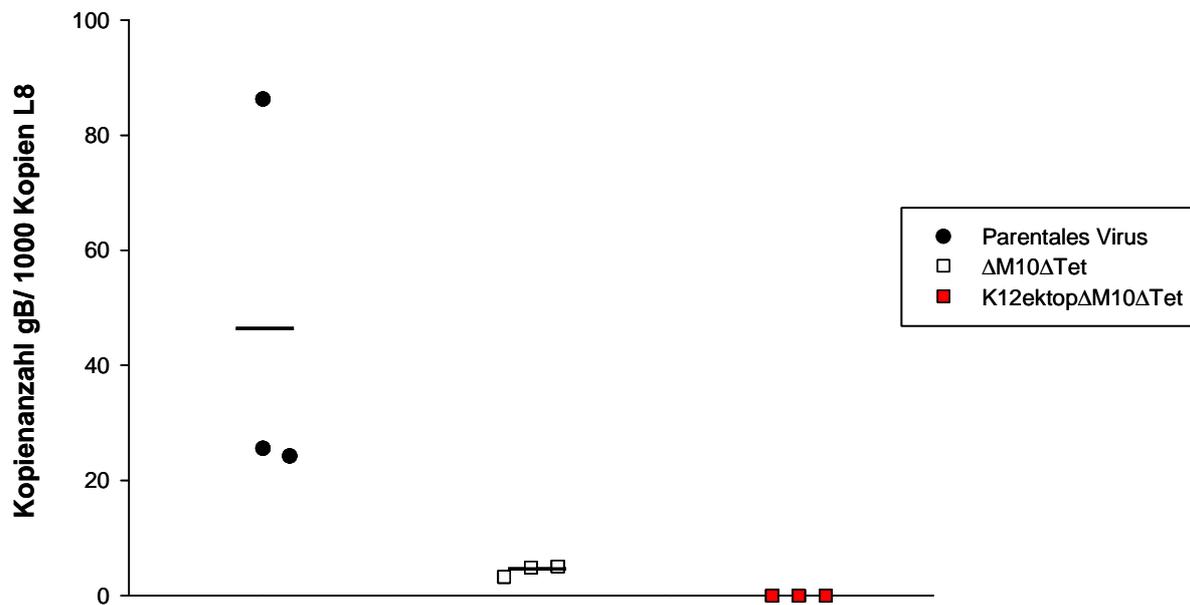


Abb. 3.53 Latente Viruslast in den Milzzellen der mit parentalem Virus, $\Delta M10\Delta Tet$ und K12ekttop $\Delta M10\Delta Tet$ infizierten Mäuse. C57BL/6 Mäuse wurden i.n. mit $5 \cdot 10^3$ PFU infiziert. 17 Tage p.i. wurden die Milzen entnommen, die DNA isoliert und in der quantitativen real-time PCR eingesetzt. Gezeigt ist ein Experiment mit je drei Mäusen pro Gruppe. Die schwarzen Balken stellen die Mittelwerte der drei Mäuse dar.

In beiden Fällen stimmen die Ergebnisse der PCR mit denen des Reaktivierungsassays überein. Die niedrige Viruslast nach Infektion mit den K12 Viren K12-M10.Del, K12ekttopM10.Del und K12ekttop $\Delta M10\Delta Tet$ geht einher mit niedrigen Reaktivierungsfrequenzen. Die K12 Viren zeigen wie die M10 Mutanten M10.Del und $\Delta M10\Delta Tet$ einen Defekt in der Etablierung der Latenz in den Splenozyten.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Insertion des K12 ORF in die rekombinanten Viren M10.Del und $\Delta M10\Delta Tet$ keine Auswirkung auf den Phänotyp *in vivo* hat. Die untersuchten Parameter an Tag 6 und 17 nach Infektion mit den K12 Mutanten und M10.Del und $\Delta M10\Delta Tet$ zeigten nahezu ähnliche Werte, teilweise waren die Werte bei den K12 Mutanten sogar geringer. K12 scheint nicht in der Lage zu sein, die Deletion in der M10 Region teilweise oder vollständig zu komplementieren.

3.15. Tumorentstehung nach Infektion von Mäusen mit rekombinanten MHV-68, die den K12 Leserahmen von KSHV tragen

Für Kaposin A von KSHV wurden bereits transformierende Eigenschaften *in vitro*, sowie onkogenes Potential *in vivo* beschrieben. In einem Langzeitversuch sollte getestet werden, ob die Expression von K12 im Kontext der MHV-68 Infektion zur Entstehung von Tumoren *in vivo* führt. Hierzu wurden drei Gruppen von je drei C57BL/6 Mäusen mit $5 \cdot 10^4$ PFU parentalem Virus, K12-M10.Del und K12ektopM10.Del infiziert. Die Mäuse wurden in regelmäßigem Abstand untersucht. Nach einem Zeitraum von 1 ½ Jahren, in denen kein auffälliger klinischer Befund beobachtet werden konnte, wurden die Mäuse euthanasiert und pathologisch untersucht. In keiner der infizierten Mäuse konnte ein Tumor oder ein Anzeichen auf eine Tumorentwicklung festgestellt werden.

4. DISKUSSION

Die Genomorganisation von MHV-68 gleicht denen der anderen Gammaherpesviren wie EBV, KSHV und HVS. Es zeigt sich eine kolineare Anordnung der Leserahmen (Abb.1.2). Neben konservierten Blöcken von Genen finden sich Leserahmen, die für jedes Virus spezifisch sind. Zusätzlich gibt es ORFs, die homolog zu zellulären oder viralen Genen sind (Virgin et al 1997). Untereinander konserviert sind vor allem die Gene, die für die lytische Replikation der Gammaherpesviren von Bedeutung sind. Die Latenz-assoziierten Gene scheinen hingegen nicht konserviert zu sein. Diese werden in der späten Phase der lytischen Replikation bzw. während der Latenz transkribiert. In dieser Phase findet nur eine minimale Genexpression statt, welche der Aufrechterhaltung der Latenz dient. Wie die Transkription dieser mit der latenten Phase der Infektion assoziierten Gene reguliert wird, ist bislang nicht vollständig geklärt.

Für die Latenz-assoziierten Gene von EBV wie EBNA (*EBV nuclear antigen*) und LMP (*EBV latent membrane protein*) sowie für K1, K12 und vIRF von KSHV finden sich keine homologen Sequenzen innerhalb der Genome der anderen Gammaherpesviren. Ebenso scheinen die Gene STP (*saimiri transformation-associated protein*) und TIP (*tyrosine kinase interacting proteins*) von HVS, die mit der Transformation von Zellen in Zusammenhang gebracht werden, für dieses Virus spezifisch zu sein. Einiges spricht also dafür, dass die Latenz- und Transformations-assoziierten Gene von MHV-68 und den anderen Vertretern der Gammaherpesviren durch virusspezifische Gene kodiert werden, und somit jedes Virus eigene Strategien zur Etablierung und Aufrechterhaltung der Latenz besitzt (Virgin et al. 1997). Der latente Infektionszyklus von MHV-68 findet in der Milz, dem Knochenmark und in der Lunge der infizierten Mäuse statt (Sunil-Chandra 1992a, Stewart et al. 1998, Weck et al. 1999b, Flano et al. 2003). Dort persistiert das Virus in den B-Lymphozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen (Flano et al. 2000). Die Regulation der Latenz und der Reaktivierung aus der Latenz, beides wichtige Faktoren für die virale Pathogenese, ist unvollständig aufgeklärt. Neben dem viralen Transkriptionsaktivator Rta (Wu et al. 2000 und 2001) wird dem *v-cyclin* (ORF72) und *v-Bcl-2* (M11) eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Reaktivierung zugewiesen (Gangappa et al. 2002).

Einige der 14 virusspezifischen Gene von MHV-68 spielen eine Rolle während der Latenzphase von MHV-68. M3 wurde als erstes Latenz-assoziiertes Gen identifiziert (Simas et al. 1999). Es kodiert für ein virales Protein, welches die Rolle eines Chemokin-Rezeptors

erfüllt (van Berkel et al. 2001). Eine M3 Deletionsmutante zeigt eine stark erniedrigte Viruslast während der latenten Infektion *in vivo* (Bridgeman et al. 2001).

In weiteren Untersuchungen wurden auch M2, M9 und M11 als Kandidaten für Latenz-assoziierte Gene beschrieben (Virgin et al. 1999, Rochford et al. 2001 und Martinez-Guzman et al. 2003). M2 zeigt keinerlei Homologien zu viralen oder zellulären Genen. Es beinhaltet ein CD8⁺ T-Zell Epitop, welches aktiv vom Immunsystem erkannt wird (Husain et al. 1999). Untersuchungen mit einem rekombinanten Virus, in welchem M2 deletiert ist, zeigten eine Störung in der Etablierung der Latenz *in vivo* sowie eine erniedrigte Anzahl latent infizierter B-Lymphozyten im Vergleich zum Wildtyp-Virus (Jacoby et al. 2002, Macrae et al. 2003). Zurückzuführen ist dies auf eine weniger effiziente Besiedlung der Lymphfollikel in der Milz nach Infektion mit dem rekombinanten Virus (Simas et al. 2004). Die Reaktivierung aus der Latenz ist ebenfalls beeinträchtigt (Herskowitz et al. 2005). Es wird somit angenommen, dass M2 zur Expansion und Differenzierung von latent mit MHV-68 infizierten B-Lymphozyten beiträgt. M4 scheint ebenfalls zu den Latenz-assoziierten Genen von MHV-68 zu gehören (Geere et al. 2006), seine Rolle während der Pathogenese ist aber bislang ungeklärt. M9 wurde mittlerweile als Gen mit Homologie zu ORF65, einem Kapsidprotein-kodierendes Gen anderer Gammaherpesviren, neu klassifiziert (Nash et al. 2001).

Für die MHV-68 spezifischen Leserahmen M5, M6, M10, M12, M13 und M14 wurden bislang keine Genprodukte identifiziert. Sie wurden als Regionen beschrieben, die möglicherweise nicht für virale Proteine kodieren (Virgin et al. 1997, Nash et al. 2001). In der vorliegenden Arbeit sollte der M10 Leserahmen untersucht und charakterisiert werden.

Das MHV-68 Genom wird beidseitig von zwei terminalen Wiederholungssequenzen flankiert und trägt zwei interne Wiederholungsstrukturen, die 40 bp und 100 bp Struktur (Virgin et al. 1997). Die Anordnung und das Auftreten dieser Strukturen ist bei den Herpesviren allgemein und gerade innerhalb der Familie der Gammaherpesviren ähnlich (Roizman und Pellet 2001). Ihre Funktionen sind weitgehend unbekannt. Die virusspezifischen Leserahmen M5, M6, M10, M12, M13 und M14 von MHV-68 liegen weitgehend innerhalb dieser Strukturen oder in unmittelbarer Nähe (Abb. 1.2). Zwei potentielle Startcodons für ein virales M14 Protein liegen innerhalb der terminalen Wiederholungssequenz am rechten Ende des Genoms. Die Initiationspunkte für die Translation eines möglichen Proteins liegen im Falle von M12 und M13 außerhalb der terminalen Wiederholungssequenz. Die Sequenz der beiden ORFs ragt aber schlussendlich bis in die terminale Region hinein. M5 liegt unmittelbar vor der 40 bp Wiederholungssequenz, M6 schließt die Struktur mit ein. Der virusspezifische Leserahmen

M10 umfasst die 100 bp Wiederholungsstruktur (Abb. 1.3). Beide interne Strukturen bestehen aus mehreren Kopien einer Sequenz (36 Kopien eines 40bpmers, 21 Kopien eines 100bpmers) mit definierter Basenabfolge und -länge und haben einen hohen G+C Gehalt von bis zu 86 % (Virgin et al. 1997). Diese Eigenschaften erschweren die Untersuchungen dieser Regionen, z.B. durch PCR oder DNA-Mikroarray. Trotzdem konnte die Expression von mRNAs der virusspezifischen Gene M5, M6, M10 und M12 in der lytischen Phase der Infektion nachgewiesen werden (Ahn et al. 2002, Ebrahimi et al. 2003). Im DNA-Mikroarray fanden sich für M5 und M12 schwache Signale, für M6 und M10c, welche beide die Wiederholungsstrukturen einschließen, waren die Signale höher, was bedeuten könnte, dass sie für funktionelle Proteine kodieren (Ahn et al. 2002).

Dass die Wiederholungsstrukturen in den kodierenden Regionen wichtige Funktionen haben können, zeigen die Beispiele von EBV und KSHV. EBNA1, eines der Latenz-assoziierten Gene von EBV, beinhaltet eine Sequenz aus Gly-Ala Wiederholungen, welche die MHC-Klasse I Präsentation von Antigenen verhindert (Levitskaya et al. 1995). Kaposin B von KSHV umschließt zwei Wiederholungssequenzen, DR1 und DR2. Diese sind essentiell für die Funktion des viralen Proteins (McCormick et al. 2006). Kaposin B trägt indirekt über die Aktivierung der MAPK-assoziierten Protein Kinase 2 (MK2) zur Stabilisierung von cytoplasmatischen mRNAs bei. In Folge kommt es zu einer vermehrten Ausschüttung von proinflammatorischen Cytokinen und Transkription von Wachstumsfaktoren (McCormick et al. 2006).

Die Wiederholungsstrukturen besitzen aber auch unabhängig von den Leserahmen, in denen sie liegen, Funktionen im viralen Lebenszyklus. Die terminalen Wiederholungsstrukturen am Genomende von MHV-68 spielen eine Rolle bei der Verpackung der viralen DNA in die reifen Viruspartikel (Deng et al. 2004). Die 40 bp Struktur scheint bei der viralen Amplifikation während der Latenz eine Rolle zu spielen, indem sie die virale Genexpression reguliert. Während die Struktur für die lytische Replikation *in vitro* und *in vivo* entbehrlich ist, zeigt sich nach Infektion mit einer 40 bp Deletionsmutante eine reduzierte Expression von K3 und ORF72 (Thakur et al. 2007). Bei beiden handelt es sich um virale Gene, die mit der latenten Phase der Infektion assoziiert sind. Die Deletion des virusspezifischen Leserahmen M6 allein zeigte keinerlei Auswirkungen auf die lytische oder latente Replikation des Virus (Thakur et al. 2007). Die 40 bp Wiederholungssequenz ist zusätzlich ein Teil des zweiten Replikationsursprunges (OriLyt) von MHV-68 (Adler et al. 2007). Die 100 bp Wiederholungssequenz wurde als PAMP identifiziert. Die Struktur dient als Ligand für die Induktion von Typ 1 – Interferon (Sanchez et al. 2008). Sie ist ebenfalls ein Teil einer OriLyt

Sequenz (Deng et al. 2004). Für den virusspezifischen Leserahmen M10 ist bislang keine biologische Funktion bekannt, ein potentielles Protein konnte bislang nicht nachgewiesen werden.

Die M10 Region besteht aus drei sich überlappenden ORFs, M10 a, b und c (Virgin et al. 1997). Computeranalysen hinsichtlich der Struktur der M10 Region zeigten, das M10a eine potentielle Transmembrandomäne besitzt (J. Haas, LMU München). Um herauszufinden, ob ein potentielles M10 Protein gebildet wird, und inwieweit die M10 Region für die Pathogenese von MHV-68 *in vitro* und *in vivo* wichtig ist, wurden in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der BAC-Technologie rekombinante Viren generiert und in verschiedenen Assays eingesetzt.

Zur Charakterisierung und Darstellung eines möglichen M10 Proteins wurden im Vorfeld dieser Dissertation bereits mehrere Arbeiten durchgeführt. Western Blots mit einem monoklonalen Antikörper gegen rekombinantes M10 sowie Experimente mit einem Peptidserum konnten allerdings die Translation eines Proteins aus dem M10 Leserahmen nicht nachweisen.

Im Zuge dieser Arbeit wurde ein rekombinantes Virus hergestellt, welches ein Fusionsprotein trägt. Da wie bereits erwähnt M10a eine Transmembrandomäne trägt, welche ein Hinweis auf ein funktionelles M10a Protein sein könnte, wurde die Hämagglutinin (HA) Sequenz mittels ET-cloning an M10a angehängt (siehe 3.1). Die M10 Region wurde nach Herstellung sequenziert, um auszuschließen, dass sich die genomische Sequenz nach der Mutagenese verändert hat. NIH3T3 Zellen wurden anschließend mit dem Virus M10aHA-tag infiziert und die Zelllysate wurden in Western Blots eingesetzt (Abb. 3.44). Als Positivkontrolle wurde das Lysat eines EBV Proteins mit HA Sequenz mitgeführt, welches in allen Experimenten ein starkes Signal im Blot zeigte (siehe Abb. 3.44, Spur K). Als Negativkontrolle wurden die Lysate von nichtinfizierten NIH3T3 Zellen benutzt. Nach Infektion von Zellen mit dem rekombinanten M10aHA-tag Virus wurden diese zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion geerntet (0 -96 h p.i.). Im Western Blot zeigte sich allerdings kein Unterschied im Bandenmuster der einzelnen Proben an den verschiedenen Zeitpunkten. Zu erwarten wäre, laut dem Bioinformatikprogramm ProtParam, ein Molekulargewicht von ca. 73 kD für M10a. In Abbildung 3.44, welche stellvertretend für andere in dieser Arbeit durchgeführte Western Blots steht, findet sich an keinem Zeitpunkt eine spezifische Bande für ein potentielles M10a Protein. Die Banden, die in dem Bereich zwischen 66 und 97 kD liegen, zeigen sich auch in der Negativkontrolle. Generell gab es in allen durchgeführten Blots keine sichtbaren

Unterschiede im Bandenmuster zwischen den infizierten Lysaten zu verschiedenen Zeitpunkten und den nichtinfizierten Proben. Der Kontroll-Blot, welcher nur mit dem sekundären Antikörper inkubiert wurde (Abb. 3.45), zeigte eine ähnliche Verteilung der Banden, mit derselben Intensität, so dass angenommen werden muss, dass es sich bei den detektierten Banden im Western Blot in Abbildung 3.44 um unspezifische Signale handelt, die durch den sekundären Antikörper hervorgerufen werden. Auch in den Zellkulturüberständen der mit M10aHA-tag infizierten Proben fanden sich keine Signale für ein potentiell M10a Protein (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich zu den Western Blots, die mit einem kommerziellen HA-spezifischen Antikörper inkubiert wurden, wurde in zwei Experimenten ein monoklonaler Antikörper, der gegen den M10 ORF gerichtet ist, eingesetzt. Auch in diesen Western Blots konnten weder in Zelllysaten noch in Zellkulturüberständen infizierter NIH3T3 Zellen spezifische Banden detektiert werden. Auch nach Infektion anderer Zelltypen (Ag8 und 293), welche mit M10aHA-tag infiziert wurden, konnte kein M10a Protein detektiert werden.

Die Transkription von M10a-c ist im Vergleich zu anderen MHV-68 Genen eher gering (Ahn et al. 2002). Die Konzentration potentieller M10 Proteine in der Zelle könnte somit auch zu niedrig sein, um sie im Lysat infizierter Zellen zu detektieren. Um M10a aus dem Proteingemisch in der Zelle aufzukonzentrieren, wurde mit M10aHA-tag infizierten Zellen eine Immunpräzipitation (IP) im Vorfeld des Western Blots durchgeführt (Abb. 3.46). Es konnte jedoch auch mit dieser Strategie kein M10a Protein nachgewiesen werden.

Das Transkriptionsprofil von MHV-68 wurde in mehreren Arbeiten untersucht (Ahn et al. 2002, Ebrahimi et al. 2003). Die M10 Region wurde hierbei in die Klasse der „early-late“ Gene eingeordnet, eine Expression von M10a, b und c wurde an den Zeitpunkten 8 – 18 h p.i. beobachtet. Nach Infektion mit M10aHA-tag wurden die NIH3T3 Zellen an verschiedenen Zeitpunkten geerntet. Mit Zeitpunkten von bis zu 96 h p.i. sollte der Zeitrahmen für die Translation eines oder mehrerer M10 Proteine abgedeckt sein und funktionelle Proteine bereits im Zelllysate vorhanden sein. Jedoch konnten auch an den späten Zeitpunkten 72 und 96 h p.i. keine Signale für M10a im Western Blot detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Die potentielle Transmembrandomäne in M10a spricht dafür, dass M10a nicht in den Zellkulturüberstand sezerniert wird. Trotzdem wurde der Überstand nach Infektion mit M10aHA-tag und dem parentalen Virus gesammelt und mit entsprechenden Kontrollen zur Überprüfung in den Western Blot eingesetzt. Auch hier konnte kein Signal detektiert werden. Parallel zu den Western Blot Versuchen wurden Immunfluoreszenztests (IF) durchgeführt. 293 Zellen wurden hierzu mit M10 in pCR3 transfiziert. Der Vektor trägt die M10 Sequenz

von Position 98.833 - 102.002 des MHV-68 Genoms unter der Kontrolle eines CMV Promotors. Die Immunfluoreszenz wurde mit Serum von Mäusen durchgeführt, die mit MHV-68 infiziert wurden und an Tag 17 p.i. euthanasiert wurden. Als Kontrolle diente das Serum von naiven Mäusen sowie 293 Zellen, die mit dem Leervektor pCR3 transfiziert bzw. nicht-transfiziert wurden. Als sekundärer Antikörper diente ein markierter anti-Maus-IgG Antikörper. In der IF konnte ebenso wie im Western Blot kein spezifisches M10 Protein detektiert werden.

Zusammengefasst scheinen die Ergebnisse konform mit den Beschreibungen von Virgin et al. 1997 und Nash et al. 2001 zu sein, demnach M10 wahrscheinlich nicht für ein oder mehrere virale Proteine kodiert. Mit der Anhängung der HA-Sequenz an M10a wurden allerdings die Leserahmen für M10b und c unterbrochen. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass sie für potentielle Proteine kodieren. Allerdings zeigte die Kontrolle von mit parentalem Virus infizierten Zellen, in dem die M10 Leserahmen intakt sind, ebenfalls keinerlei spezifische Signale im Western Blot.

Um die Funktion der M10 Region *in vitro* und *vivo* näher zu untersuchen, wurden mittels BAC-Technologie mehrere rekombinante Viren erzeugt. Alle viralen BAC-Mutanten wurden durch Restriktionsverdau mit drei verschiedenen Restriktionsenzymen analysiert. Im Southern Blot wurden die Deletionen in den rekonstituierten Viren nochmals überprüft (siehe 3.3, Abb. 3.10). Anschließend wurden die Viren in die Experimente eingesetzt.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Sanchez et al. 2008 waren alle M10-Deletionsmutanten *in vitro* in NIH3T3 Zellen replikationsfähig (Abb. 3.11 und 3.28). Die Deletionen in den viralen Mutanten Δ M10 Δ Tet, M10.Del und Δ 201nt, deren Wachstumseigenschaften nach Infektion in NIH3T3 Zellen untersucht wurden, sind 200 bp bis 2,3 kb groß. Trotzdem sind die aus den BAC Mutanten rekonstituierten Viren *in vitro* replikationsfähig und zeigen nur leichte Unterschiede in ihren viralen Titern verglichen mit denen des parentalen Virus (Abb. 3.11 und 3.28). Auch Sanchez et al. generierten BAC-Mutanten durch die Insertion von 1,3 kb großen Transposons an Position 100.952 und 101.278 im MHV-Genom. Die Mutanten wurden direkt in BHK-21 Zellen transfiziert und die Zellen auf CPE und virale Titer untersucht. Es konnte keine produktive Infektion nachgewiesen werden (Sanchez et al. 2008). Diese Ergebnisse sind gegensätzlich zu Resultaten aus Experimenten unserer Arbeitsgruppe. Nach Transfektion der BAC DNA von Δ 201nt in BHK-21 Zellen zeigte sich nur ein leichter Unterschied in der Virusrekonstitution gegenüber dem parentalen BAC, die Deletion hatte ebenso keinen negativen Einfluss auf das Wachstum des Virus in NIH3T3 Zellen (Adler et al.

2007). Die Arbeitsgruppe um Sanchez et al. zeigte keinen Beweis, dass die Insertion des Transposons in der M10 Region an sich, und nicht ungewollte Mutationen an anderer Stelle im viralen Genom, für den Phänotyp der Transposon-Mutanten verantwortlich sind. In der vorliegenden Arbeit wurde mittels BAC-Technologie eine M10.Revertante generiert, bei der die M10 Region wiederhergestellt wurde. Diese zeigte *in vitro* und *in vivo* denselben Phänotyp wie das parentale Virus und lieferte somit den Beweis, dass die Mutation in der M10 Region für den Phänotyp verantwortlich ist (siehe 3.5).

Sowohl die Mutanten $\Delta M10\Delta Tet$ und M10.Del, welche beide eine Deletion im M10 Leserahmen tragen, als auch das rekombinante Virus $\Delta 201$, bei welchem der essentielle Teil des OriLyt mutiert wurde, zeigten *in vitro* in mehreren unabhängigen Experimenten ($n = 3$, bzw. $n = 4$) nur einen geringfügigen Unterschied im Wachstum, verglichen zum parentalen Virus (Abb. 3.11 und 3.28). Für die Replikation des Virus in NIH3T3 Zellen scheint weder die M10 Region noch der eine der beiden MHV-68 Replikationsursprünge zwingend notwendig zu sein. Diese Daten stimmen mit früheren Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe überein, dass MHV-68, wie auch die anderen Vertreter der Gammaherpesviren, zwei lytische Replikationsursprünge besitzt (Adler et al. 2007). Der zweite OriLyt befindet sich am linken Genomende in einer Region, die auch die 40 bp Wiederholungsstruktur einschließt. Wachstumskurven in NIH3T3 Zellen zeigten, dass die Viren, die eine Mutation in einem der beiden OriLyts tragen, einen ähnlichen bzw. nur gering unterschiedlichen Replikationsverlauf haben wie das parentale Virus. Sind allerdings beide OriLyt-Regionen von der Deletion betroffen, zeigt das Virus keine Replikation *in vitro* (Adler et al. 2007). Im Falle einer Beeinträchtigung einer der beiden Replikationsursprünge scheint der andere den Ausfall zu kompensieren und so die Replikation des Virus *in vitro* aufrechtzuerhalten.

In vivo zeigt sich ein Einfluss der M10 Mutationen auf die Pathogenese. Wie bereits beschrieben, führt die intranasale Infektion von C57BL/6-Mäusen mit MHV-68 zu einer produktiven Infektion in den Epithelzellen der Lunge, wobei die viralen Titer zum Zeitpunkt 5-8 Tage p.i. ihre höchsten Werte zeigen (Sunil-Chandra et al. 1992a). Nach Infektion mit den Mutanten $\Delta M10\Delta Tet$ und M10.Del sind die Titer in der Lunge an Tag 6 p.i. im Vergleich zum parentalen Virus signifikant erniedrigt, wobei der Phänotyp bei $\Delta M10\Delta Tet$ am stärksten ausgeprägt ist (Abb. 3.12). Eine Kinetik der Titer in der Lunge von Tag 3 bis Tag 10 p.i. bestätigt, dass die Titer nach Infektion mit $\Delta M10\Delta Tet$ bereits an Tag 3, also vor dem Höhepunkt der akuten Replikationsphase, signifikant niedriger sind als beim parentalen Virus (Abb. 3.21). An Tag 10 p.i. konnten für beide Viren keine Titer bestimmt werden (Abb. 3.21).

Dieses Ergebnis geht mit Beschreibungen aus der Literatur einher, demnach die viralen Titer in der Lunge nach etwa 8 Tagen p.i. abfallen und das Virus im folgendem durch CD8⁺ T-Lymphozyten und Makrophagen eliminiert wird. An Tag 15 p.i. findet sich in den Lungen infizierter Mäuse kein lytisches Virus mehr (Etisham et al. 1993, Weck et al. 1996).

Der Phänotyp nach Infektion mit $\Delta 201nt$, dem rekombinanten Virus, in dem einer der beiden OriLyts deletiert ist, gleicht dem nach Infektion mit $\Delta M10\Delta Tet$. Auch hier liegen die Werte der Titerbestimmung an Tag 6 p.i. signifikant unter denen des parentalen Virus (Abb. 3.29). Diese Experimente legen nahe, dass der Defekt in der lytischen Replikationsphase durch die Beeinträchtigung des OriLyt zustande kommt. In $\Delta M10\Delta Tet$ sind neben dem M10 Leserahmen und der 100 bp Wiederholungssequenz 67 Nukleotide des essentiellen Teils des OriLyt betroffen, bei $\Delta 201nt$ liegt die Mutation ausschließlich im essentiellen Teil des OriLyt. Bei M10.Del ist eine etwa 400 bp große Sequenz des nichtessentiellen Teils des OriLyts mutiert (Abb. 3.9). Dies erklärt die Unterschiede im Lungentiter zwischen M10.Del und $\Delta M10\Delta Tet$ sowie $\Delta 201nt$. In allen Fällen führen die Deletionen in den jeweiligen Viren aber zu einer signifikant verringerten Replikation in den Lungen infizierter Mäuse an Tag 6 p.i., verglichen zu den Titern des parentalen Virus. Die M10-Region von MHV-68 scheint somit einen Einfluss auf die lytische Replikation des Virus *in vivo* zu nehmen.

In der Milz latent infizierter Mäuse entsteht durch die Proliferation latent infizierter B-Lymphozyten und zirkulierender T-Lymphozyten eine vorübergehende Splenomegalie, die ihren Höhepunkt zum Zeitpunkt 14 – 21 Tage p.i. hat (Sunil-Chandra et al. 1992a). Zur Bewertung der Splenomegalie wurden die Milzen an Tag 17 p.i. gewogen. Die Milzgewichte der mit $\Delta M10\Delta Tet$ und $\Delta 201nt$ infizierten Mäuse waren in allen durchgeführten Experimenten signifikant geringer als die des parentalen Virus (Abb. 3.13 und 3.30). Nach Infektion mit M10.Del war die Splenomegalie ebenfalls reduziert, jedoch nicht signifikant im Vergleich zum parentalen virus (Abb. 3.13).

Um herauszufinden, ob sich der Phänotyp in der Milz nach Infektion mit $\Delta M10\Delta Tet$ bereits in der frühen Phase der Latenz ausbildet, wurde eine Kinetik durchgeführt. An Tag 10 zeigten die Milzen der mit $\Delta M10\Delta Tet$ infizierten Mäuse ein geringeres Gewicht als nach Infektion mit dem parentalen Virus (Abb. 3.22). 42 Tage nach der Infektion liegen die Milzgewichte nach Infektion mit $\Delta M10\Delta Tet$ und dem parentalem Virus auf einer Höhe, bei beiden zeigt sich nur noch eine geringe Splenomegalie. Dasselbe Resultat ergibt sich nach Infektion mit dem rekombinanten Virus $\Delta 201nt$ (Abb. 3.33). Diese Befunde stimmen mit der Beschreibung in der Literatur überein. Etwa 5 – 6 Wochen nach Infektion bildet sich die Splenomegalie

zurück, latent infizierte Splenozyten können aber weiterhin nachgewiesen werden (Sunil-Chandra et al. 1992a, Usherwood et al. 1996).

Die Milz der mit $\Delta M10\Delta Tet$ und $\Delta 201nt$ infizierten Mäuse ist an allen untersuchten Zeitpunkten der Latenz nur leicht vergrößert, eine starke Splenomegalie wie im Falle des parentalen Virus bildet sich nicht aus.

Die Reaktivierungsfrequenz der latent infizierten Milzzellen an Tag 17 p.i. wird mit dem Reaktivierungsassay bestimmt. Mit diesem Test ist es möglich, zwischen infektiösem lytischen Virus und latent infizierten Zellen zu unterscheiden und die Reaktivierungsereignisse aus den latenten Splenozyten genau zu quantifizieren (Weck et al. 1996). Die Reaktivierungsfrequenz nach Infektion mit $\Delta M10\Delta Tet$ und $\Delta 201nt$ ist signifikant geringer als nach Infektion mit dem parentalen Virus (Abb. 3.14 und 3.31). Für M10.Del konnte ebenfalls ein Unterschied in der Reaktivierung im Vergleich zum parentalen Virus gezeigt werden, dieser war allerdings nicht signifikant. Die Ergebnisse der quantitativen real-time PCR bestätigen die Befunde aus dem Reaktivierungsassay. Die mit $\Delta M10\Delta Tet$ und $\Delta 201nt$ infizierten Milzen tragen eine signifikant verringerte Anzahl an viralen Genomen verglichen mit dem parentalen Virus (Abb. 3.32). Die Viruslast nach Infektion mit M10.Del ist im Vergleich zum parentalen Virus allerdings nur leicht vermindert (Abb. 3.15). Die Kopienzahl der viralen Genome ist in mit $\Delta M10\Delta Tet$ infizierten Milzzellen bereits im frühen Stadium der Latenz (10 Tage p.i.) sehr gering, im Vergleich zu den mit parentalem Virus infizierten Zellen. In der späten Phase der Latenz heben sich die Unterschiede zwischen den rekombinanten Viren wieder auf (Abb. 3.23, 3.34 und 3.35).

Die Reaktivierungsfrequenz sowie die Viruslast in den Splenozyten sind nach Infektion mit den Mutanten $\Delta M10\Delta Tet$ und $\Delta 201nt$ signifikant verringert, ein Hinweis darauf, dass die M10 Region von MHV-68 eine wichtige Rolle während der Latenzphase der Infektion *in vivo* spielt.

Um zu bestätigen, dass der durch $\Delta M10\Delta Tet$, M10.Del und $\Delta 201nt$ hervorgerufene Phänotyp auf die Deletion der M10 Region zurückzuführen ist und nicht auf unbeabsichtigte Mutationen an anderer Stelle im Genom im Zuge der Mutagenese, wurde auf Basis der $\Delta M10\Delta Tet$ Mutante eine Revertante generiert (Abb. 3.8 und 3.10). Das Virus zeigte *in vitro* dasselbe Wachstumsverhalten wie das parentale Virus (Abb. 3.16). Die Replikation *in vivo* während der lytischen Phase und der Latenz verläuft ebenfalls auf der gleichen Höhe wie nach Infektion mit dem parentalen Virus und ist signifikant höher als nach Infektion mit den

Mutanten $\Delta M10\Delta Tet$ und $\Delta 201nt$ (Abb. 3.17 bis 3.20). Der Phänotyp *in vivo* wird nach Infektion mit der M10.Revertante wieder aufgehoben, die Beeinträchtigung der Parameter der MHV-68 Infektion ist somit auf die Deletion der M10 Region zurückzuführen.

Da der Defekt in der lytischen Replikation in der Lunge und in der Latenzphase in der Milz auch nach Infektion mit dem rekombinanten Virus $\Delta 201nt$ auftritt, könnte die Beeinträchtigung des OriLyt für den Phänotyp *in vivo* verantwortlich sein. In $\Delta 201nt$ ist, im Gegensatz zu $\Delta M10\Delta Tet$, nur der OriLyt, unabhängig von M10 und der 100 bp Wiederholungssequenz, von der Mutation betroffen (Abb. 3.9). Um herauszufinden, ob die Deletion des lytischen Replikationsursprunges für die Beeinträchtigung der viralen Replikation verantwortlich ist, wurde eine Revertante auf Basis der $\Delta M10\Delta Tet$ Mutante generiert, in der die Sequenz des essentiellen Teils des OriLyt in eine nichtkodierende Region am linken Ende des Genoms inseriert wurde (Abb. 3.1). In allen untersuchten Parametern der Infektion *in vitro* (Abb. 3.39) und *in vivo* (Abb. 3.40 bis 3.43) verhält sich die OriLyt Revertante wie das parentale Virus. Diese Befunde verdeutlichen, dass der Phänotyp nach Infektion mit $\Delta M10\Delta Tet$ durch die Deletion des essentiellen Teils des OriLyt von MHV-68 hervorgerufen wird und nicht durch die Deletion des M10 Leserahmens und der 100 bp Wiederholungsstruktur. In $\Delta 201nt$ und $\Delta M10\Delta Tet$ sind ca. 200 bzw. 70 Nukleotide der essentiellen Sequenz des OriLyt betroffen, diese Deletion reicht demnach aus, um die Replikation des Virus *in vivo* massiv zu beeinflussen (siehe 3.4 und 3.9). Auch die Mutation eines Teilstückes der nichtessentiellen Sequenz (M10.Del) zeigt Auswirkungen auf die Pathogenese des Virus, wenngleich der Effekt nicht so stark ist wie bei $\Delta M10\Delta Tet$ und $\Delta 201nt$ (siehe 3.4).

Dass die rekombinanten Viren nach der Mutation *in vitro* weiterhin replikationsfähig bleiben, ist auf die Präsenz eines zweiten Replikationsursprunges von MHV-68 zurückzuführen (Adler et al. 2007). Dass Gammaherpesviren mehr als einen OriLyt besitzen und dass einer dieser Replikationsursprünge ausreicht, um die Replikation des Virus *in vitro* weiterzuführen, wurde bereits beschrieben (AuCoin et al. 2002, Feederle et al. 2004, Xue et al. 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch zum ersten Mal die Funktion eines OriLyt von MHV-68 *in vivo* im Zuge einer natürlichen Infektion in C57BL/6 Mäusen adressiert.

Der o.g. Phänotyp bildet sich nach intranasaler Infektion von C57BL/6 Mäusen mit $\Delta M10\Delta Tet$ und $\Delta 201nt$ aus. Die natürliche Infektionsroute von MHV-68 konnte bislang noch nicht identifiziert werden, somit werden Labormäuse neben der intranasalen Route auch

häufig intraperitoneal infiziert (Tibbetts et al. 2003). Bei der i.p. Infektion gelangt das Virus direkt in die Reservoirire der Latenz, u.a. in die Milz. Um herauszufinden, ob die Infektionsroute einen Einfluss auf den Phänotyp der Mutanten hat, wurden C57BL/6 Mäuse über die i.p. Route mit den Virusmutanten infiziert. Nach Infektion mit $\Delta M10\Delta Tet$ konnten im Gegensatz zum parentalen Virus keine viralen Titer in der Milz an Tag 6 bestimmt werden (Abb. 3.24) Hierbei muss berücksichtigt werden, dass der Höhepunkt der lytischen Replikation erst zu einem späteren Zeitpunkt (Tag 9-10 p.i.) vorliegt (Weck et al. 1996). Trotzdem zeigt die Titerbestimmung an Tag 6, dass die Deletion des OriLyt in $\Delta M10\Delta Tet$ Auswirkungen auf die lytische Replikation nach i.p. Infektion hat.

In der Latenzphase an Tag 17 p.i. sind die Splenomegalie, die Reaktivierungsfrequenz und die Viruslast nach Infektion mit $\Delta M10\Delta Tet$ im Vergleich zum parentalen Virus deutlich erniedrigt (Abb. 3.25 bis 3.27). Die Mutante $\Delta 201nt$ verhält sich ähnlich wie die $\Delta M10\Delta Tet$ Mutante (Abb. 3.36, 3.37 und 3.38). Der Phänotyp, der nach intranasaler Infektion mit den Mutanten auftritt (siehe 3.4 und 3.9), erscheint somit auch nach i.p. Infektion, wenngleich er nicht so stark ausgeprägt ist. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden zum Hauptteil nach i.n. Infektion durchgeführt, für die i.p. Experimente ist somit nur eine kleine Versuchszahl vorhanden ($n = 1$ bzw. $n = 2$). Dies erklärt, warum die beobachteten Unterschiede nicht das Signifikanzniveau von $p < 0,05$ erreichten. Da aber die Tendenz nach i.p. Infektion gleich bleibt, scheint der Phänotyp, der nach Infektion mit $\Delta M10\Delta Tet$ und $\Delta 201nt$ auftritt, nicht von der Infektionsroute abhängig zu sein.

Der M10 Leserahmen von MHV-68 befindet sich aufgrund des kolinearen Genomaufbaus der Gammaherpesviren an der gleichen Position wie die K12 Region von KSHV. M10 und K12 zeigen zwar keine Sequenzhomologie, doch besitzen beide Leserahmen ähnliche Eigenschaften. Beide schließen eine der internen Wiederholungssequenzen ein, kodieren in allen Leserahmen für die gleiche Proteinsequenz und beinhalten einen der beiden OriLyts.

Dass zwei positional homologe ORFs ohne Sequenz- und Strukturhomologien die gleichen Funktionen ausüben, konnte bereits mit dem ORF K1 von KSHV und STP von HVS gezeigt werden. Ein rekombinantes HVS, in dem der ORF für STP deletiert war und dafür der K1 Leserahmen eingesetzt wurde, zeigte transformierende Eigenschaften in primären T-Lymphozyten und verursachte Lymphome *in vivo* (Lee et al. 1998). Ein ähnliche Beobachtung wurde bei Untersuchungen eines rekombinanten HVS, in dem der ORF R1 des Rhesusaffen Rhadinovirus (RRV) in die STP Deletion inseriert wurde, gemacht. Das Virus zeigte onkogenes Potential *in vitro* (Damania et al. 1999).

Parallel zu den o.g. Experimenten wurde deshalb untersucht, ob der K12 Locus von KSHV die Deletion der positional homologen Region M10 *in vivo* komplementieren kann. Hierfür wurden ebenfalls rekombinante Viren generiert und *in vivo* eingesetzt. K12 kodiert für drei virale Proteine, Kaposin A, B und C (Li et al. 2002). Bei Kaposin A handelt es sich um ein Typ-II-Transmembranprotein, welches onkogene Eigenschaften *in vitro* und *in vivo* besitzt (Muralidhar et al. 2000, Tomkowicz et al. 2002). Nach MHV-68 Infektion kann es ebenso zur Entstehung von Lymphomen *in vivo* kommen, wobei nur etwa 10 % der infizierten Mäuse Lymphome entwickelten, und das auch erst nach einer langen Zeitspanne (Sunil-Chandra et al. 1994, Tarakanova et al. 2008). Die onkogenen Eigenschaften von K12 wurden bislang noch nicht im Zuge einer natürlichen Infektion *in vivo* untersucht - mit der Einführung von MHV-68 als Modellsystem ist dies möglich. Studien mit MHV-76, einer natürlich auftretenden Mutante von MHV-68, bestätigten bereits die transformierenden Eigenschaften des ORF K1 von KSHV (Douglas et al. 2004). K1, unter Kontrolle eines CMV Promotors, wurde mittels homologer Rekombination am linken Genomende von MHV-76 inseriert. *In vitro* zeigte sich kein Unterschied im Replikationsverhalten, *in vivo* kam es hingegen zur transienten Proliferation von Epithelzellen in der Lunge und zur Tumorentwicklung (Douglas et al. 2004).

Ob M10, das positionelle Homolog von K12, onkogene Eigenschaften besitzt, ist nicht bekannt. Der Leserahmen von K12 wurde in die M10 Deletionsmutanten Δ M10 Δ Tet und M10.Del inseriert (Abb. 3.47). C57BL/6 Mäuse wurden mit den Mutanten und dem parental Virus infiziert und über einen langen Zeitraum beobachtet. Nach 1 ½ Jahren ohne auffällige Symptome wurden die mit K12-M10.Del, K12ektop Δ M10 Δ Tet und parentalem Virus infizierten Mäuse euthanasiert und pathologisch untersucht. Weder nach Infektion mit den K12 Viren noch in der Kontrollgruppe fanden sich Anzeichen einer Tumorentwicklung. Die Frage des onkogenen Potentials von K12 *in vivo* muss somit weiter adressiert werden. Mit MHV-68 ist ein Kleintiermodell gegeben, mit dem diese Fragestellungen bearbeitet werden können. Durch die BAC Technologie ist es relativ einfach, rekombinante Viren zu generieren, welche dann im Zuge einer natürlichen Infektion untersucht werden können. Die Hinweise auf die transformierenden Eigenschaften von Kaposin A sind vielfältig (Muralidhar et al. 2000, Tomkowicz et al. 2002), und mit den vorliegenden Versuchen auch nicht ausgeschlossen. Eine Erhöhung der Versuchstierzahl und die Generierung von weiteren rekombinanten MHV-68, welche K12 Insertionen tragen, könnte zur Aufklärung beitragen. Ebenso könnte anstelle des gesamten K12 Leserahmens nur Kaposin A inseriert werden und *in vivo* untersucht werden.

In weiteren Experimenten wurde der Einfluss der K12 Insertion auf die Pathogenese der rekombinanten Viren *in vivo* adressiert und die Fragestellung untersucht, ob der K12 Leserahmen teilweise oder vollständig Funktionen von M10 komplementieren kann.

C57BL/6 wurden jeweils mit den K12 Viren, die auf Basis der M10.Del Mutante erstellt wurden, sowie mit K12ektop Δ M10 Δ Tet und der entsprechenden Mutante Δ M10 Δ Tet infiziert. In K12-M10.Del wurde K12 direkt in die Deletionsstelle inseriert. Die Expression sollte hierbei über den potentiellen Promotor von M10 gesteuert werden, bei K12ektopM10.Del und K12ektop Δ M10 Δ Tet steht die Expressionskassette am linken Genomende unter der Kontrolle eines heterologen RSV Promotors. Die Expression von K12 in K12ektopM10.Del, nicht aber von K12 in K12-M10.Del, konnte *in vitro* im Western Blot gezeigt werden.

In der lytischen Replikation in der Lunge nach i.n. Infektion von C57BL/6 Mäusen zeigten die K12 Viren einen signifikanten Unterschied im viralen Titer verglichen mit dem parentalen Virus, bzw. der M10.Revertante (Abb. 3.48). Die Splenomegalie, die Reaktivierungsfrequenz und die Viruslast in den Splenozyten an Tag 17 nach Infektion mit den K12 Viren waren ebenfalls erniedrigt (Abb. 3.49 bis 3.52). Die Insertion des K12 Leserahmen in die rekombinanten Viren Δ M10 Δ Tet und M10.Del, welche beide eine Deletion im M10 Leserahmen tragen, konnte also den Phänotyp dieser Mutanten nicht revertieren. Die K12 Viren zeigten in allen untersuchten Parametern ähnliche oder sogar leicht erniedrigte Werte wie Δ M10 Δ Tet und M10.Del. Es ist bereits beobachtet worden, dass die Insertion von fremden Sequenzen in rekombinante Viren zu einem veränderten Phänotyp führen kann. Für MHV-68 konnte gezeigt werden, dass die Expression eines fremden Gens, in diesem Falle des NS3-Gens des Hepatitis-C-Virus, über die gegen NS3 gerichtete Immunantwort für einen attenuierten Phänotyp *in vivo* verantwortlich ist (El-Gogo et al. 2008).

Obwohl K12 und M10 positional homolog sind und sie weitere Eigenschaften teilen, scheint die Funktion der beiden Regionen nicht gegeneinander austauschbar zu sein. Mit den Ergebnissen dieser Arbeit wird auch deutlich, dass M10 höchstwahrscheinlich, wie bereits beschrieben, nicht für ein funktionelles Protein kodiert. *In vitro* konnte keine Translation des ORF M10a nachgewiesen werden. Der Phänotyp der M10 Deletionsmutanten *in vivo* wird durch die Beeinträchtigung des OriLyt und nicht durch die Deletion von M10 kodierenden Sequenzen hervorgerufen. Der M10 Leserahmen sowie die 100 bp Wiederholungsstruktur scheinen für die Replikation *in vivo* nicht wichtig zu sein. Die DNA Struktur in dieser Region spielt allerdings - unabhängig von der Expression eines möglichen M10 Proteins - eine Rolle. Die 100 bp Struktur dient als Ligand für die Induktion von Interferon Typ-1, und Mutationen

in dieser Region führen zu einer verminderten Interferon-Induktion und haben einen Einfluss auf die Etablierung eines antiviralen Status (Sanchez et al. 2008). Somit könnte man erwarten, dass die Deletion in $\Delta M10\Delta Tet$, bei der auch die 100 bp Struktur betroffen ist, eigentlich zu einer erhöhten Replikationsrate führen müsste, da die Induktion von Interferon und der antivirale Status durch die Deletion der 100 bp Struktur reduziert sind. In mit $\Delta M10\Delta Tet$ infizierten Mäusen ist aber genau das Gegenteil der Fall, die lytische Replikation wie auch die Latenz ist in diesen Mäusen massiv gestört, eine Folge der Mutation in einem der lytischen Replikationsursprünge von MHV-68. Dass die Interferon Induktion in diesem Virus trotzdem reduziert ist, konnte in einem Vorexperiment gezeigt werden. MEF Zellen wurden mit $\Delta M10\Delta Tet$ und der M10.Revertante infiziert und im Anschluss wurde die Interferon β Expression mittels RT-PCR bestimmt. Nach Infektion mit der M10.Revertante findet sich eine hohe Expression, nach Infektion mit der Mutante nimmt sie stark ab (Daten nicht gezeigt).

Die Tatsache, dass MHV-68 eine Region besitzt, die gleichzeitig durch die OriLyt Sequenz die eigene Replikation unterstützt, aber auch durch die 100 bp Struktur Interferon induziert, ist ein Beispiel für die Immunmodulation von Viren. Mit einer intakten 100 bp Wiederholungsstruktur muss das Virus somit Strategien entwickelt haben, wie es dem antiviralen Effekt, der durch diese Region ausgelöst wird, parallel entgegenwirken kann. Hier kommen virale Proteine ins Spiel, welche die Induktion und/oder die Effekte von IFN blockieren können. Ein Beispiel ist der ORF 45 von MHV-68. Mutationen in ORF45 blockieren die virale Replikation und führen zu einer hohen Induktion von Interferon (Jia et al. 2005, Sanchez et al. 2008). M1, eines der MHV-68 spezifischen Gene, zeigt ebenso immunmodulatorische Eigenschaften (Evans et al. 2008).

Mit der Kontrolle der Immunantwort über virale Gegenmechanismen und der Replikationsfähigkeit durch zwei vorhandene Replikationsursprünge ist MHV-68 in der Lage, seine Infektion im Einklang mit dem Wirt zu steuern. Eine kontrollierte Infektionsrate und ein Überleben des Wirts können so die Ausbreitung des Virus und Neuinfektionen garantieren.

Der OriLyt am rechten Genomende ist für die Replikation des Virus wichtig. *In vitro* hat sein Ausfall kaum eine Auswirkung auf die Replikation des Virus, die lytische Replikation *in vivo* ist jedoch massiv gestört. Der OriLyt am linken Genomende von MHV-68 kann den Ausfall *in vivo* zwar kompensieren und die Replikation aufrechterhalten, aber auf einem niedrigeren Niveau.

Die Deletion eines OriLyt hat weiterhin nicht nur einen Einfluss auf die lytische Replikationsphase *in vivo*, sondern auch auf die Latenz. Die Splenomegalie, die Reaktivierungsfrequenz und die Viruslast in den Splenozyten sind nach Infektion mit den OriLyt-Mutanten $\Delta M10\Delta Tet$ und $\Delta 201nt$ signifikant verringert. Reaktivierendes Virus und die nachfolgende lytische Replikation sind wichtig für die Existenz des Virus im Wirt. Eine produktive Replikation ist essentiell, um ein hohes Niveau an latent infizierten Zellen aufrechtzuerhalten (Gangappa et al. 2002), und die persistente Infektion wird wiederum aufrechterhalten durch die Reaktivierung von latenten Virus und der folgenden Neubesiedlung von Latenzreservoirien (Willer et al. 2005). Ein Defekt in einem der lytischen Replikationsursprünge zeigt somit auch einen Einfluss auf die latente Infektionsphase von MHV-68.

Zusammenfassend zeigt sich, das MHV-68 als Modellsystem für Gammaherpesvirusinfektionen einen hohen Stellenwert hat. Die Pathogenese kann im Kontext einer natürlichen Infektion untersucht und die Funktionen einzelner Leserahmen abgefragt werden. Die Untersuchungen *in vivo* können somit zum allgemeinen Verständnis humaner Gammaherpesvirusinfektionen beitragen und neue Ansätze für die Behandlung von Infektionen wie EBV und KSHV aufzeigen.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Funktion einiger der virusspezifischen Gene von MHV-68 ist bislang nicht bekannt. Es ist auch unklar, ob sie überhaupt für funktionelle Proteine kodieren. Mit den Ergebnissen dieser Arbeit wurde die Hypothese aus der Literatur und aus eigenen Vorarbeiten bestätigt, demnach der MHV-68 Leserahmen M10 höchstwahrscheinlich nicht für ein Protein kodiert. Verschiedene Zellkulturen wurden mit dem rekombinanten Virus M10aHA-tag infiziert und in Western Blots eingesetzt. Weder in den Zelllysaten noch den Zellkulturüberständen konnte mit einem HA spezifischen, sowie einem gegen M10 gerichteten Antikörper, in IP und Western Blots ein vermeintliches M10a Protein detektiert werden. Auch mit Immunfluoreszenztests konnte kein M10 Protein nachgewiesen werden.

Die BAC-Technologie erlaubte die Herstellung mehrerer rekombinanter Viren, welche im Kontext einer viralen Infektion *in vitro* und *in vivo* untersucht wurden. Die Mutationen in diesen Viren veränderten die M10 Region einschließlich der 100 bp Struktur (Δ M10 Δ Tet, M10.Del) und in verschiedenem Ausmaß einen der OriLyts von MHV-68 (Δ 201nt, Δ M10 Δ Tet und M10.Del).

In vitro zeigten die rekombinanten Viren im Vergleich zum parentalen Virus, welches eine intakte Genomsequenz trägt, keinen bzw. nur einen leichten Unterschied im Replikationsverhalten. Nach intranasaler Infektion von C57BL/6 Mäusen mit Δ M10 Δ Tet und Δ 201nt waren die Parameter der lytischen und latenten Infektion gegenüber dem Wildtyp signifikant erniedrigt. Nach Infektion mit M10.Del waren die Werte auch erniedrigt, wengleich aber nicht signifikant. Nach i.p. Infektion zeigte sich derselbe Phänotyp, allerdings in einem geringeren Ausmaß. Eine Revertante auf Basis der Δ M10 Δ Tet Mutante, in welcher die M10 Region sowie der OriLyt wiederhergestellt wurde, verhielt sich *in vitro* und *in vivo* wie das parentale Virus, so dass der Phänotyp auf die Deletion dieser Bereiche zurückzuführen ist.

Bei Δ M10 Δ Tet und M10.Del sind der OriLyt sowie M10a-c und die 100 bp Struktur von der Deletion betroffen, bei Δ 201nt ist allein der essentielle Teil des OriLyt zerstört. Dies deutete darauf hin, dass die Mutation im Replikationsursprung für den Phänotyp *in vivo* verantwortlich ist. Eine Revertante auf Basis von Δ M10 Δ Tet, in welcher etwa 900 bp des essentiellen Teils des OriLyts ektop im Genom inseriert wurde, bewies dies. Sie verhielt sich *in vitro* wie auch *in vivo* wie das parentale Virus und revertierte den Phänotyp, der nach Infektion mit Δ M10 Δ Tet auftrat.

Die Ergebnisse zeigen zum ersten Mal, dass einer der OriLyts von MHV-68 eine wichtige Rolle bei der Pathogenese des Virus spielt, nicht nur in der lytischen, sondern auch in der latenten Phase der Replikation.

Diese Arbeit konnte weiterhin zeigen, dass die Insertion der zu M10 positional homologen K12 Region von KSHV in die M10 Deletionsmutanten den Defekt *in vivo* nicht kompensieren kann. Die Insertion zeigte keinen Einfluss auf die Pathogenese. Die Parameter in der Lunge und der Milz von C57BL/6 Mäusen nach i.n. Infektion mit den rekombinanten K12 Viren veränderten sich nicht, sondern zeigten einen ähnlichen Phänotyp wie die M10 Viren. Die Expression des K12 Leserahmens, welcher für die Familie der Kaposin Proteine kodiert, führt im Kontext der MHV-68 Infektion nicht zur Entstehung von Tumoren. Somit bleibt die Frage nach dem onkogenen Potential von K12 von KSHV *in vivo* weiter ungeklärt.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass der OriLyt am rechten Genomende von MHV-68 eine wichtige Rolle während der lytischen und latenten Infektionsphase des Virus *in vivo* spielt. Die Deletion im Bereich des OriLyt, nicht aber im M10a-c Leserahmen, führt zu einer signifikant reduzierten Replikationsfähigkeit *in vivo*. Die Insertion der K12 Region von KSHV, welche sowohl eine homologe Position im Genom als auch ähnliche biologische Eigenschaften wie der ORF M10 aufweist, konnte die Deletion *in vivo* nicht komplementieren. Dass der virusspezifische M10 Leserahmen für ein oder mehrere Proteine kodiert kann aufgrund der vorliegenden Daten mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Die Arbeit unterstreicht insgesamt einmal mehr, warum MHV-68 als Modellsystem für die Pathogenese humaner Gammaherpesviren große Vorteile bietet. Durch die BAC- Technologie ist die Herstellung rekombinanter MHV-68 einfach und schnell möglich. Die Mutanten können dann im Kontext einer natürlichen Infektion *in vivo* untersucht werden, und die einzelnen Leserahmen im Genom des Virus näher charakterisiert werden.

LITERATURVERZEICHNIS

- Adler H., M. Messerle, M. Wagner and UH. Koszinowski (2000). Cloning and mutagenesis of the murine gammaherpesvirus 68 genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *J Virol* 74(15): 6964-74.
- Adler H., M. and UH. Koszinowski (2001). Virus reconstituted from infectious bacterial artificial chromosome (BAC)-cloned murine gammaherpesvirus 68 acquires wild-type properties in vivo only after excision of BAC vector sequences. *J Virol* 75(12): 5692-6.
- Adler H., M. Messerle and UH. Koszinowski (2003). Cloning of herpesviral genomes as bacterial artificial chromosomes. *Rev Med Virol* 13(2): 111-21.
- Adler H., B. Steer, K. Freimüller and J. Haas (2007). Murine Gammaherpesvirus 68 (MHV-68) contains two functional lytic origins of replication. *J Virol* 81(13): 7300-5
- Ahn JW., KJ. Powell, P. Kellarn and DG. Alber (2002). Gammaherpesvirus Lytic Gene Expression as characterized by DNA Array. *J Virol* 76(12): 6244-56.
- AuCoin DP., KS. Colletti, Y. Xu, SA. Cei and GS. Pari (2002). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) contains two functional lytic origins of DNA replication. *J Virol* 76 (15): 7890-96.
- Blackman, MA. and E. Flano (2000). Murine gamma herpesvirus-68: a mouse model for infectious mononucleosis? *Mol Med Today* 6 (12): 488-90.
- Blackman MA. und E. Flano (2002). Persistent gammaherpesvirus Infections: What can we learn from an experimental mouse model ? *J Exp Med* 195 (7): F29 – F32
- Blaskovic D., M. Stanceková, J. Svobodová and J. Mistríková (1980). Isolation of five strains of herpesviruses from two species of free living small rodents. *Acta Virol* 24(6): 468.
- Boname JM., HM. Coleman, JS. May and PG. Stevenson (2004). Protection against wild-type murinegammaherpesvirus-68 latency by a latency-deficient mutant. *J Gen Virol* 85(Pt 1): 131-5.
- Bowden RJ., JP. Simas, AJ. Davis and S. Efstathiou (1997). Murine gammaherpesvirus 68 encodes tRNA-like sequences which are expressed during latency. *J Gen Virol* 78: 1675-87

Bridgeman A., PG. Stevenson, JP. Simas and S. Efstathiou (2001) A secreted chemokine binding protein encoded by murine gammaherpesvirus-68 is necessary for the establishment of a normal latent load.

J Exp Med. 194(3):301-12

Cesarman E., Y. Chang, PS. Moore, JW. Said and DM. Knowles (1995). Kaposi's sarcoma associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas.

N. Engl. J. Med. 332. 1186–1191

Chang, Y., E. Cesarman, MS. Pessin, F. Lee, J. Culpepper, DM. Knowles and PS Moore (1994). Identification of herpesvirus - like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. Science 266, 1865-1869.

Christensen JP, RD. Cardin, KC. Branum, and PC. Doherty (1999). CD4(+) T cell-mediated control of a gamma-herpesvirus in B cell-deficient mice is mediated by IFN-gamma.

Proc Natl Acad Sci USA 96(9):5135-40.

Clambey ET, HW. Virgin and SH. Speck (2000). Disruption of the murine gammaherpesvirus 68 M1 open reading frame leads to enhanced reactivation from latency.

J Virol 74(4):1973-84.

Damania B, M. Li, JK. Choi, L. Alexander, JU. Jung and RC. Desrosiers (1999) Identification of the R1 oncogene and its protein product from the rhadinovirus of rhesus monkeys.

J Virol. 73(6):5123-31.

de Lima, BD., JS. May, and PG. Stevenson. (2004a). Murine gammaherpesvirus 68 lacking gp150 shows defective virion release but establishes normal latency in vivo.

J Virol 78:5103–5112.

de Lima BD, JS. May, S. Marques, JP. Simas and PG. Stevenson (2004b) Murine gammaherpesvirus 68 bcl-2 homologue contributes to latency establishment in vivo.

J Gen Virol 86(Pt 1):31-40

Deng, H., JT. Chu, NH. Park and R.Sun (2004). Identification of cis sequences required for lytic DNA replication and packaging of murine gammaherpesvirus 68.

J Virol 78(17): 9123-31.

Douglas J, B. Dutia, S. Rhind, JP Stewart and SJ. Talbot (2004). Expression in a recombinant murine herpesvirus 4 reveals the in vivo transforming potential of the K1 open reading frame of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus.

J Virol 78(16):8878-84.

Dutia, BM., DJ. Allen, H. Dyson and AA. Nash (1999 a). Type I interferons and IRF-1 play a critical role in the control of a gamma herpesvirus infection.

Virology 261: 173-79.

Dutia, BM., CJ. Clarke, DJ. Allen and AA. Nash (1997). Pathological changes in the spleens of gamma interferon receptor-deficient mice infected with murine gammaherpesvirus: a role for CD8 T cells.

J Virol 71(6): 4278-83.

Dutia, BM., JP. Stewart, RAE. Clayton, H. Dyson and AA. Nash (1999b). Kinetic and phenotypic changes in murine lymphocytes infected with murine gammaherpesvirus-68 in vitro.

J Gen Virol 80 (Pt 10): 2729-36.

Ebrahimi, B., BM. Dutia, KL. Roberts, JJ. Garcia-Ramirez, P. Dickinson, JP. Stewart, P. Ghazal, DJ. Roy and AA. Nash (2003) Transcriptome profile of murine gammaherpesvirus-68 lytic infection.

J Gen Virol 84: 99-109.

Efstathiou, S., YM. Ho, S. Hall, CJ. Styles, SD. Scott and UA. Gompels (1990a) Murine herpesvirus 68 is genetically related to the gammaherpesviruses Epstein-Barr virus and herpesvirus saimiri.

J Gen Virol 71 (Pt 6): 1365-72.

Efstathiou, S., YM. Ho and AC. Minson (1990b) Cloning and molecular characterization of the murine herpesvirus 68 genome.

J Gen Virol 71 (Pt 6): 1355-64.

Ege, Alexander (2004) Translational initiation controls localization and regulatory function of the gamma-herpesviral protein kaposin.

Dissertation, LMU München: Fakultät für Chemie und Pharmazie

Ehtisham, S., NP. Sunil-Chandra and AA. Nash (1993) Pathogenesis of murine gammaherpesvirus infection in mice deficient in CD4 and CD8 T cells.

J Virol 67(9): 5247-52.

El-Gogo S, B. Flach, C. Staib, G. Sutter and H. Adler (2008). In vivo attenuation of recombinant murine gammaherpesvirus 68 (MHV-68) is due to the expression and immunogenicity but not to the insertion of foreign sequences.

Virology. 380(2):322-7

Evans AG, JM. Moser, LT. Krug, V. Pozharskaya, AL. Mora and SH. Speck. (2008) A gammaherpesvirus-secreted activator of Vbeta4+ CD8+ T cells regulates chronic infection and immunopathology.

J Exp Med. 205(3):669-84

Feederle R. and HJ. Delecluse (2004). Low level of lytic replication in a recombinant Epstein-Barr virus carrying an origin of replication devoid of BZLF1-binding sites.

J Virol 78(21):12082-4.

Flano, E., SM. Husain, JT. Sample, DL. Woodland and MA. Blackman (2000). Latent murine gamma-herpesvirus infection is established in activated B cells, dendritic cells, and macrophages.

J Immunol 165(2): 1074-81.

Flano, E., IJ. Kim, DL. Woodland and MA. Blackman (2002). Gamma-herpesvirus latency is preferentially maintained in splenic germinal center and memory B cells.

J Exp Med 196(10): 1363-72.

Flano E., DL. Woodland and MA. Blackman (2002). A mouse model for Infectious mononucleosis.
Immunol Res 25: 201-17

Flañó E., IJ. Kim, J. Moore, DL. Woodland and MA. Blackman (2003). Differential gamma-herpesvirus distribution in distinct anatomical locations and cell subsets during persistent infection in mice.
J Immunol. 170(7):3828-34.

Ganem, D. (1997) KSHV and Kaposi's sarcoma: the end of the beginning?
Cell 91, 157-160.

Gangappa, S., LF. van Dyk, TJ. Jewett, SH. Speck and HW. Virgin (2002). Identification of the in vivo role of a viral bcl-2.
J Exp Med 195, 931-940.

Geere HM, Y. Ligertwood, KM. Templeton, I. Bennet, B. Gangadharan, SM. Rhind, AA. Nash and BM. Dutia (2006) The M4 gene of murine gammaherpesvirus 68 modulates latent infection.
J Gen Virol 87(Pt 4):803-7

Herskowitz J., MA. Jacoby and SH. Speck (2005). The murine gammaherpesvirus 68 M2 gene is required for efficient reactivation from latently infected B cells.
J Virol 79(4):2261-73

Hirt, B. (1967). "Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures."
J Mol Biol 26(2): 365-9.

Husain SM, EJ. Usherwood, H. Dyson, C. Coleclough, MA. Coppola, DL. Woodland, MA Blackman, JP. Stewart and TJ. Sample (1999) Murine gammaherpesvirus M2 gene is latency-associated and its protein a target for CD8(+) T lymphocytes.
Proc Natl Acad Sci USA. 96(13):7508-13.

Järviluoma A. and PM. Ojala (2006). Cell signaling pathways engaged by KSHV. *Biochim Biophys Acta*. 1766(1):140-58

Jacoby, MA., HW. Virgin and SH. Speck. (2002). Disruption of the M2 gene of murine gammaherpesvirus 68 alters splenic latency following intranasal, but not intraperitoneal, inoculation.
J. Virol 76:1790-1801.

Jenner RG, MM. Alba, C. Boshoff and P. Kellam (2001) Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latent and lytic gene expression as revealed by DNA arrays,
J. Virol. 75 (2) 891-902.

Jia Q, V. Chernishof, E. Bortz, I. Mchardy, TT. Wu, HI. Liao and R. Sun (2005). Murine gammaherpesvirus 68 open reading frame 45 plays an essential role during the immediate-early phase of viral replication.
J Virol 79(8):5129-41.

Kliche, S., W. Nagel, E. Kremmer, C. Atzler, A. Ege, T. Knorr, U. Koszinowski, W. Kolanus, and J. Haas (2001) Signaling by human herpesvirus 8 kaposin A through direct membrane recruitment of cytohesin-1.
Mol. Cell 7:833–843.

Lagunoff, J. Bechtel, E. Venetsanakos, AM. Roy, N. Abbey, B. Herndier, M. McMahon and D. Ganem. (2002). De novo infection and serial transmission of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in Cultured endothelial cells,
J. Virol. 76: 2440–2448.

Lee H, R. Veazey, K. Williams, M. Li, J. Guo, F. Neipel, B. Fleckenstein, A. Lackner, RC. Desrosiers and JU. Jung (1998) Deregulation of cell growth by the K1 gene of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus.
Nat Med 4(4):435-40.

Levitskaya J, M. Coram, V. Levitsky, S. Imreh, PM. Steigerwald-Mullen, G. Klein, MG. Kurilla and MG. Masucci (1995) Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1.
Nature 375(6533):685-8.

Li H., T. Komatsu, BJ. Dezube and KM. Kaye (2002). The Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K12 transcript from a primary effusion lymphoma contains complex repeat elements, is spliced, and initiates from a novel promoter.
J Virol 76(23):11880-8.

Liu S., IV. Pavlova, HW. Virgin, and S. H. Speck. (2000) Characterization of gammaherpesvirus 68 gene 50 transcription.
J. Virol. 74:2029–2037.

Lieberman PM., JM. Hardwick, J. Sample, GS. Hayward, and SD.Hayward. (1990) The Zta transactivator involved in induction of lytic cycle gene expression in Epstein-Barr virus-infected lymphocytes binds to both AP-1 and ZRE sites in target promoter and enhancer regions.
J. Virol. 64:1143–1155.

Lukac DM., R. Renne, JR. Kirshner, and D. Ganem (1998) Reactivation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection from latency by expression of the ORF 50 transactivator, a homolog of the EBV R protein.
Virology 252:304–312.

Mackett M., JP. Stewart, SD. Pepper, M. Chee, S. Efstathiou, AA. Nash, and JR. Arrand. (1997). Genetic content and preliminary transcriptional analysis of a representative region of murine gammaherpesvirus 68.
J Gen Virol 78:1425–1433.

Macrae AI., EJ. Usherwood and SM. Husain (2003). Murid herpesvirus 4 strain 68 M2 protein is a B-cell associated antigen important for latency but not lymphocytosis.
J Virol 77, 9700–9709.

- Marques S, S. Efsthathiou, KG. Smith, M. Haury and JP. Simas (2003) Selective gene expression of latent murine gammaherpesvirus 68 in B lymphocytes. *J Virol* 77(13):7308-18.
- Martin JN., DE. Ganem, DH. Osmond, KA. Page-Shafer, D. Macrae and DH. Kedes (1998) Sexual transmission and the natural history of human herpesvirus 8 infection, *N Engl J Med* 338; 948–954.
- Martinez-Guzman D., T. Rickabaugh, TT. Wu, H. Brown, S. Cole, MJ. Song, L. Tong and R. Sun (2003). Transcription program of murine gammaherpesvirus 68. *J Virol* 77(19):10488-503.
- McCormick, C., and D. Ganem. (2005) The kaposin B protein of KSHV activates the p38/MK2 pathway and stabilizes cytokine mRNAs. *Science* 307:739–741.
- McCormick C. and D. Ganem (2006). Phosphorylation and function of the kaposin B direct repeats of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol* 80(12):6165-70.
- Modrow S., D. Falke and U. Truyen (2003). *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Moorman NJ., CY. Lin and SH. Speck (2004) Identification of candidate gammaherpesvirus-68 genes required for virus replication by signature tagged transposon mutagenesis. *J Virol* 78: 10282-90.
- Muralidhar S., AM. Pumfery, M. Hassani, MR. Sadaie, N. Azumi, M. Kishishita, JN. Brady, J. Doniger, P. Medveczky, and LJ. Rosenthal (1998) Identification of Kaposin (open reading frame K12) as a human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) transforming gene. *J Virol* 72:4980–4988.
- Muralidhar S., G. Veytsmann, B. Chandran, D. Ablashi, J. Doniger, and LJ. Rosenthal (2000) Characterization of the human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) oncogene, kaposin (ORF K12). *J Clin Virol* 16:203–213.
- Nash AA., BM. Dutia, JP. Stewart and AJ. Davison (2001). Natural history of murine gamma-herpesvirus infection. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356(1408): 569-79.
- Nash AA. and NP. Sunil-Chandra (1994) Interactions of the murine gammaherpesvirus with the immune system. *Curr Opin Immunol* 6(4):560-3.
- Nicholas J, JC. Zong, DJ. Alcendor, DM. Ciufu, LJ. Poole, RT. Sarisky, CJ. Chiou, X. Zhang, X. Wan, HG. Guo, MS. Reitz and GS. Hayward (1998). Novel organizational features, captured cellular genes, and strain variability within the genome of KSHV/HHV8. *J Natl Cancer Inst Monogr.* (23):79-88.

- Pavlova IV., HW. Virgin and SH. Speck (2003) Disruption of gammaherpesvirus 68 gene 50 demonstrates that Rta is essential for virus replication.
J. Virol. 77:5731–5739.
- Paulose-Murphy M., NK. Ha, C. Xiang, Y. Chen, L. Gillim, R. Yarchoan, P. Meltzer, M. Bittner, J. Trent and S. Zeichner, Transcription program of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus),
J. Virol. 75 (2001) 4843–4853.
- Pfeffer S., A. Sewer, M. Lagos-Quintana, R. Sheridan, C. Sander, FA. Grässer, LF. van Dyk, CK. Ho, S. Shuman, M. Chien, JJ. Russo, J. Ju, G. Randall, BD. Lindenbach, CM. Rice, V. Simon, DD. Ho, M. Zavolan and T. Tuschl (2005). Identification of microRNAs of the herpesvirus family.
Nat Methods 2(4):269-76
- Ragoczy, T., L. Heston, and G. Miller. 1998. The Epstein-Barr virus Rta protein activates lytic cycle genes and can disrupt latency in B lymphocytes.
J. Virol. 72:7978–7984.
- Rajcani J., D. Blaskovic, J. Svobodová , F. Ciampor, D. Hucková and D. Staneková (1985). Pathogenesis of acute and persistent murine herpesvirus infection in mice.
Acta Virol 29: 51-60.
- Renne R., M. Lagunoff, W. Zhong and D. Ganem (1996) The size and conformation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) DNA in infected cells and virions,
J. Virol. 70, 8151–8154.
- Rochford R., ML. Lutzke, RS. Alfinito, A. Clavo and RD. Cardin (2001). Kinetics of murine gammaherpesvirus 68 gene expression following infection of murine cells in culture and in mice.
J Virol 75 (11): 4955-63.
- Roizman, B. and PE. Pellet (2001). The family Herpesviridae: A brief introduction.
In David, P. M. H. and M. Knipe, *Fields Virology*, Fourth ed., Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, Pa., pp. 2381-2397
- Russo JJ., RA. Bohenzky, MC. Chien, J. Chen, M. Yan, D. Maddalena, JP. Parry, D. Peruzzi, IS. Edelman, Y. Chang and PS. Moore (1996) Nucleotide sequence of the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (HHV8).
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 14862 - 14867.
- Sadler R., L. Wu, B. Forghani, R. Renne, W. Zhong, B. Herndier and D. Ganem (1999) A complex translational program generates multiple novel proteins from the latently expressed kaposin (K12) locus of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus.
J. Virol. 73:5722–5730
- Sanchez DJ, D. Miranda, V. Arumugaswami, S. Hwang, AE Singer, A. Senaati, A. Shahangian, MJ. Song, R. Sun and G. Cheng (2008). A repetitive region of gammaherpesvirus genomic DNA is a ligand for induction of type I interferon.
J Virol 82(5):2208-17

Schepers A., D Pich, J Mankertz and W Hammerschmidt (1993). Cis-acting elements in the lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus.
J Virol. 67(7): 4237–4245

Simas JP. and S. Efstathiou (1998a). Murine gammaherpesvirus 68: a model for the study of gammaherpesvirus pathogenesis.
Trends Microbiol 6(7): 276-82.

Simas JP, RJ. Bowden, V. Paige and S. Efstathiou (1998b). Four tRNA-like sequences and a serpin homologue encoded by murine gammaherpesvirus 68 are dispensable for lytic replication in vitro and latency in vivo.
J Gen Virol 79 (Pt 1):149-53.

Simas JP., D. Swann, R. Bowden and S. Efstathiou (1999). Analysis of murine gammaherpesvirus-68 transcription during lytic and latent infection.
J Gen Virol 80 (Pt 1): 75-82.

Simas JP, S. Marques, A. Bridgeman, S. Efstathiou and H. Adler (2004). The M2 gene product of murine gammaherpesvirus 68 is required for efficient colonization of splenic follicles but is not necessary for expansion of latently infected germinal centre B cells.
J Gen Virol 85(10):2789-97.

Soulier J. , L. Grollet, E. Oksenhendler, P. Cacoub, D. Cazals-Hatem, P. Babinet, MF. d'Agay, JP. Clauvel, M. Raphael, L. Degos, et al., (1995) Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in multicentric Castleman's disease,
Blood 86, 1276–1280.

Speck SH. and HW. Virgin (1999). Host and viral genetics of chronic infection: a mouse model of gamma-herpesvirus pathogenesis.
Curr Opin Microbiol 2(4): 403-9.

Stevenson PG., RD. Cardin, JP. Christensen and PC. Doherty (1999). Immunological control of a murine gammaherpesvirus independent of CD8+ T cells.
J Gen Virol 80 (Pt 2): 477-83.

Stevenson PG., JM. Boname, B. de Lima and S. Efstathiou (2002 b). A battle for survival: immune control and immune evasion in murine gamma-herpesvirus-68 infection.
Microbes Infect 4(11): 1177-82.

Stevenson PG. (2004). Immune evasion by gamma-herpesviruses.
Curr Opin Immunol 16(4): 456-62.

Stevenson PG. and S. Efstathiou (2005). Immune mechanisms in murine gammaherpesvirus-68 infection.
Viral Immunol 18(3):445-56.

Stewart JP., NJ. Janjua, SD. Pepper, G. Bennion, M. Mackett, T. Allen, AA. Nash, and JR. Arrand. (1996) Identification and characterization of murine gammaherpesvirus 68 gp150: a virion membrane glycoprotein.
J Virol 70:3528–3535.

Stewart JP., EJ. Usherwood, A. Ross, H. Dyson and AA. Nash (1998). Lung epithelial cells are a major site of murine gammaherpesvirus persistence.
J Exp Med 187(12): 1941-51.

Stewart JP, OJ. Silvia, IM. Atkin, DJ. Hughes, B. Ebrahimi and H. Adler (2004) In vivo function of a gammaherpesvirus virion glycoprotein: influence on B-cell infection and mononucleosis.
J Virol 78(19):10449-59.

Sturzl, M., C. Blasig, A. Schreier, F. Neipel, C. Hohenadl, E. Cornali, G. Ascherl, S. Esser, NH. Brockmeyer, M. Ekman, EE. Kaaya, E. Tschachler and P. Biberfeld (1997) Expression of HHV-8 latency-associated T0.7 RNA in spindle cells and endothelial cells of AIDS-associated, classical and African Kaposi's sarcoma.
Int. J. Cancer 72:68-71.

Sun, R., SF. Lin, L. Gradoville, Y. Yuan, F. Zhu, and G. Miller (1998) A viral gene that activates lytic cycle expression of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:10866-10871.

Sunil-Chandra NP., S. Efstathiou, J. Arno and AA. Nash (1992a). Virological and pathological features of mice infected with murine gamma-herpesvirus 68.
J Gen Virol 73 (Pt 9): 2347-56

Sunil-Chandra NP., S. Efstathiou and AA. Nash (1992 b). Murine gammaherpesvirus 68 establishes a latent infection in mouse B lymphocytes *in vivo*.
J Gen Virol 73 (Pt 12): 3275-79.

Sunil-Chandra NP., J. Arno, J. Fazakerley and AA. Nash (1994). Lymphoproliferative disease in mice infected with murine gammaherpesvirus 68.
Am J Pathol 145: 818-26.

Tarakanova VL, F. Kreisel, DW. White and HW. Virgin (2008). Murine gammaherpesvirus 68 genes both induce and suppress lymphoproliferative disease.
J Virol 82(2):1034-9

Thakur NN, S. El-Gogo, B. Steer, K. Freimüller, A. Waha and H. Adler (2007). A gammaherpesviral internal repeat contributes to latency amplification.
PLoS ONE 2(1):e733.

Tibbetts SA., J. Loh, V. van Berkel, JS. McClellan, MA. Jacoby, SB. Kapadia, SH. Speck and HW. Virgin (2003). Establishment and maintenance of gammaherpesvirus latency are independent of infective dose and route of infection.
J Virol 77(13): 7696-701.

Tomkowicz B., SP. Singh, M. Cartas, and A. Srinivasan (2002) Human herpesvirus-8 encoded Kaposin: subcellular localization using immunofluorescence and biochemical approaches.
DNA Cell Biol. 21:151-162.

Tripp RA, AM. Hamilton-Easton, RD. Cardin, P. Nguyen, FG. Behm , DL. Woodland, PC. Doherty and MA. Blackman (1997). Pathogenesis of an infectious mononucleosis-like disease induced by a murine gamma-herpesvirus: role for a viral superantigen?
J Exp Med 185(9):1641-50.

Usherwood EJ., AJ. Ross, DJ. Allen and AA. Nash (1996a). Murine gammaherpesvirus-induced splenomegaly: a critical role for CD4 T cells.
J Gen Virol 77 (Pt 4): 627-30.

Usherwood EJ., JP. Stewart and AA. Nash (1996 b). Characterization of tumor cell lines derived from murine gammaherpesvirus-68-infected mice.
J Virol 70: 6516-8.

Usherwood E.J., JP. Stewart, K. Robertson, DJ. Allen and AA. Nash (1996 c). Absence of splenic latency in murine gamma herpesvirus 68-infected B cell-deficient mice.
J Gen Virol 77: 2819-25.

Usherwood E.J., DJ. Roy, K. Ward, SL. Surman, BM. Dutia, MA. Blackman, JP. Stewart and DL. Woodland (2000). Control of gammaherpesvirus latency by latent antigen-specific CD8(+) T cells.
J Exp Med 192(7): 943-52.

van Berkel V., K. Preiter, HW. Virgin and SH. Speck (1999). Identification and Initial Characterization of the Murine Gammaherpesvirus 68 Gene M3, Encoding an Abundantly Secreted Protein
J Virol. 73:4524–4529

van Berkel V, J. Barrett, HL. Tiffany, DH. Fremont, PM. Murphy, G. McFadden, SH. Speck and HW. Virgin (2000) Identification of a gammaherpesvirus selective chemokine binding protein that inhibits chemokine action.
J Virol 74(15):6741-7

Virgin HW., P. Latreille, P. Wamsely, K. Hallsworth, KE. Weck, AJ. Dal Canto and SH. Speck (1997). Complete sequence and genomic analysis of murine gammaherpesvirus 68.
J Virol 71(8): 5894-904.

Virgin HW. and SH. Speck (1999a). Unraveling immunity to gamma-herpesviruses: a new model for understanding the role of immunity in chronic virus infection.
Curr Opin Immunol 11(4): 371-9.

Virgin HW. and SH. Speck (1999b). Host and viral genetics of chronic infection: a mouse model of gamma-herpesvirus pathogenesis.
Curr Opin Microbiol 2(4):403-9

Virgin HW., RM. Presti, XY. Li, C. Liu and SH. Speck (1999c). Three distinct regions of the murine γ -herpesvirus 68 genome are transcriptionally active in latently infected mice.
J Virol 73: 2321-32.

Weck KE., ML. Barkon, LI. Yoo, SH. Speck and HW. Virgin (1996). Mature B cells are required for acute splenic infection, but not for establishment of latency, by murine gammaherpesvirus 68.

J Virol 70(10): 6775-80.

Weck KE., AJ. Dal Canto, JD. Gould, AK. O'Guin, KA. Roth, JE. Saffitz, SH. Speck and HW. Virgin (1997). Murine gamma-herpesvirus 68 causes severe large-vessel arteritis in mice lacking interferon-gamma responsiveness: a new model for virus-induced vascular disease.

Nat Med 3(12): 1346-53.

Weck KE., SS. Kim, HW. Virgin and SH. Speck (1999 a). B cells regulate murine gammaherpesvirus 68 latency.

J Virol(73): 4651-61.

Weck KE., SS. Kim, HW. Virgin and SH. Speck (1999b). Macrophages are the major reservoir of latent murine gammaherpesvirus 68 in peritoneal cells.

J Virol 73: 3273-83.

Wu TT., EJ. Usherwood, JP. Stewart, AA.Nash and R. Sun (2000). Rta of murine gammaherpesvirus 68 reactivates the complete lytic cycle from latency.

J Virol 74(8): 3659-67.

Wu TT, L. Tong, T. Rickabaugh, SH. Speck and R. Sun (2001). Function of Rta is essential for lytic replication of murine gammaherpesvirus 68.

J Virol 75(19):9262-73.

Xue SA. und BE. Griffin (2007). Complexities associated with expression of Epstein-Barr virus (EBV) lytic origins of DNA replication.

Nucleic Acids Res. 35(10):3391-406

DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich PD Dr. Heiko Adler für die Bereitstellung des Themas der Dissertation und dessen exzellente Betreuung danken. Seine stets offene, freundliche und hilfreiche Art hat mir geholfen viele Hürden zu meistern und diese Arbeit erfolgreich durchzuführen.

Prof. Dr. Klaus Förstemann, der sich bereit erklärt hat, meine Arbeit für die Fakultät Chemie, Biochemie und Pharmazie zu betreuen.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Adler: Beatrix Steer, Susanne El-Gogo, Simone Walser und Klaus Freimüller, für die hervorragende Teamarbeit und das angenehme Arbeitsklima.

Meinen alten und neuen Kollegen aus der KKG sowie aus dem 4. Stock. Besonders danken möchte ich hierbei Julia Zorn, Dagmar Bund und Verena Aumiller, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Herzlichen Dank auch an alle Tierpfleger des Helmholtz Zentrum München in Neuherberg für die gute Zusammenarbeit im Tierstall.

Vor allem möchte ich meinen Eltern danken, die mich mein gesamtes Studium und während der Doktorarbeit mit allen Kräften unterstützt haben.

LEBENS LAUF

Name: Britta Sabine Flach
Geburtsdatum: 22.06.1980
Geburtsort: Osnabrück

Schulbildung

1986-1990 Heinrich-Schüren-Grundschule, Osnabrück
1990-1992 Orientierungsstufe Innenstadt, Osnabrück
1992-1999 Ratsgymnasium Osnabrück
Juli 1999 Abschluss der allgemeinen Hochschulreife

Akademische Ausbildung

1999-2001 Studium der Biologie an der Universität Osnabrück
Juli 2001 Abschluss Diplom-Vorprüfungen
2001-2005 Studium der Biologie an der Universität Bremen
September 2004 Abschluss Diplom-Hauptprüfung
November 2004-Juli 2005 Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. Angelika Vallbracht am Institut für Virologie, Universität Bremen
Thema: „Charakterisierung von rRNA-Degradationsprodukten in Hepatitis-A-Virus infizierten FRhK-4-Zellen und Untersuchung des Einflusses der Infektion auf die Promotoraktivität der ISG20-Nuklease“

September 2005 Erlangung des akademischen Grades: Diplom Biologin

Oktober 2005 – Dezember 2008 Dissertationsarbeit unter Anleitung von PD Dr. Heiko Adler am Helmholtz Zentrum München, LMU
Thema:“Untersuchungen zur Rolle der M10 Region des murinen Gammaherpesvirus 68 (MHV-68) in vitro und in vivo durch mit der BAC-Technologie generierte rekombinante Viren

