

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Kommissarischer Vorstand: Prof. Dr. E. Märtlbauer

Angefertigt unter der Leitung von PD Dr. Antonie Neubauer-Juric

Untersuchungen über den Einfluss des Equiden Herpesvirus 1 auf die MHC I- und MHC II-Expression equiner Zellen

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

Von
Silvia Müller
aus München

München 2008

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

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. Neubauer-Juric
Korreferent/en:	Univ.-Prof. Dr. Handler

Tag der Promotion: 18. Juli 2008

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	1
2.	SCHRIFTTUM	2
2.1	Die Equiden Herpesviren Typ 1 und 4 (EHV-1 und -4)	2
2.1.1	Die Infektionen mit EHV-1 und -4	2
2.1.2	Die Klassifizierung der Equiden Herpesviren 1 und 4	4
2.1.3	Die Morphologie der Herpesviren	4
2.1.4	Der Genomaufbau des Equiden Herpesvirus 1	5
2.1.5	Die Regulation der Expression herpesviraler Gene	6
2.1.6	Die Replikation der Alphaherpesviren	6
2.1.6.1	Der Viruseintritt und der Transport zum Zellkern	7
2.1.6.2	Die Replikation und Verpackung der viralen DNS	8
2.1.6.3	Die Primäre Umhüllung der Nukleokapside	8
2.1.6.4	Die Sekundäre Umhüllung und Ausschleusung reifer Partikel aus der Zelle („viral egress“)	9
2.2	Die Immunmodulation durch Herpesviren	10
2.2.1	Die Beeinträchtigung der Immun-Effektor-Funktionen	10
2.2.2	Die Interferenz mit der humoralen Immunabwehr	12
2.2.3	Die zell-vermittelte Immunität als Ziel herpesviraler Immunmodulation	13
2.2.4	Die Interaktion mit der Antigen-Präsentation durch MHC I-Moleküle	14
2.2.5	Die Beeinträchtigung der Funktion Natürlicher Killerzellen	17
2.2.6	Der Einfluss auf die Antigen-Präsentation durch MHC II-Moleküle	17
2.2.7	Das UL11-Protein bei EHV-1	20
2.2.8	Das EHV-1-UL43-Protein	21

3.	MATERIAL UND METHODEN	
3.1.	Material	23
3.1.1	Zellen	23
3.1.2	Bakterien und Plasmide	23
3.1.2.1	Bakterien	23
3.1.2.2	Plasmide	23
3.1.3	Antikörper und Antiseren	24
3.1.3.1	Monoklonale Antikörper	24
3.1.3.2	Polyklonale Antikörper	25
3.1.3.3	Mit « Alexa » konjugierte Antikörper	25
3.1.3.4	Mit Peroxidase (POD) konjugierte Antikörper	25
3.1.4	Puffer, Lösungen und Reagenzien	26
3.1.6	Geräte, Laborhilfsmittel und Verbrauchsmaterialien	36
3.2.	Methoden	38
3.2.1	Zellen	38
3.2.1.1	Zellkultur	38
3.2.1.2	Kryokonservierung von Zellen	38
3.2.1.3	Isolierung von PBMCs mittels Dichtezentrifugation	39
3.2.1.4	Giemsa-Färbung von PBMCs	39
3.2.1.5	Zellzählung mittels Fuchs-Rosenthal-Kammer („Lebend-tot-Färbung“)	39
3.2.1.6	Transfektion eukaryotischer Zellen mit Lipofectin® oder PerFectin™	40
3.2.1.7	Stabile Transfektion von Zellen zur Herstellung rekombinanter Zelllinien	40
3.2.2	Virus	41
3.2.2.1	Verwendete Virusstämme	41
3.2.2.2	Vermehrung von Viren in Zellkultur	42
3.2.2.3	Virustitration	42
3.2.2.4	Infektion von Zellen in Zellkultur	42

3.2.2.5	Infektion von PBMCs	43
3.2.3	DNS	43
3.2.3.1	Präparation viraler DNS	43
3.2.3.2	DNS-Konzentrationsbestimmung	44
3.2.3.3	Spaltung der DNS durch Restriktionsendonukleasen	44
3.2.3.4	Aufreinigung von DNS aus einem Agarosegel	45
3.2.3.5	Ligation von DNS-Fragmenten	45
3.2.3.6	Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNS	45
3.2.3.7	Schnellpräparation von Plasmid-DNS aus transformierten Bakterien	46
3.2.3.8	Präparation größerer Mengen an Plasmid-DNS	47
3.2.3.9	Konservierung von Bakterien mit Plasmid-DNS	47
3.2.3.10	Quantifizierung von Genomkopien mittels Real-Time-PCR	47
3.2.4	Proteine	48
3.2.4.1	Herstellung von Zelllysaten für den Western Blot	48
3.2.4.2	Proteinanalyse mittels Elektrophorese	49
3.2.4.2.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	49
3.2.4.2.2	Elektrotransfer und Immunodetektion von Proteinen (Western Blot)	50
3.2.5	Indirekte Immunfluoreszenz (IIF)	51
3.2.5.1	Auswertung mittels Durchflusszytometrie	51
3.2.5.2	Fluoreszenzmikroskopische Auswertung	53
4.	ERGEBNISSE	55
4.1.	Der Einfluss von EHV-1 auf die MHC I-/II-Expression equiner Zellen	55
4.1.1	Der Einfluss der EHV-1-Infektion auf die MHC I-Expression in Zellkultur	57
4.1.2	Die Auswirkungen einer EHV-1-Infektion auf die MHC I-Expression equiner PBMCs	58
4.1.3	Die Expression von MHC II-Molekülen auf equinen Zellkultur-Zellen	60

4.1.4	Die EHV-1-bedingte Beeinträchtigung der MHC II-Expression auf Zellkultur-Zellen	61
4.1.5	Der Einfluss der EHV-1-Infektion auf die MHC II-Expression equiner PBMCs	62
4.1.6	Der Einfluss einer Infektion mit aktuellen EHV-1-Isolaten auf die MHC I- und MHC II-Expression <i>in vitro</i>	64
4.1.6.1	Die Reduktion der MHC I-Expression nach Infektion mit Feldisolaten	64
4.1.6.2	Der Einfluss einer Infektion mit O834 und E216 auf die MHC II-Expression	65
4.1.7	Die Auswirkung einer Deletion der UL11- und UL43-Gene auf die Reduktion der MHC I-/II-Expression	66
4.1.7.1	Die Beeinflussung der MHC I-Expression durch L11 Δ 11 und L11 Δ 43	66
4.1.7.2	Die Reduktion der MHC II-Expression durch L11 Δ 11 und L11 Δ 43	68
4.2	Die Beeinflussung der MHC I-/II-Expression equiner Zellen durch Infektion mit EHV-4	70
4.2.1	Der Einfluss von EHV-4 auf die MHC I-Expression in Zellkultur	70
4.2.2	Die Beeinflussung der MHC I-Expression auf PBMCs durch Infektion mit EHV-4	71
4.2.3	Der Einfluss einer EHV-4-Infektion auf die MHC II-Expression in Zellkultur	72
4.2.4	Die Auswirkung einer Infektion mit EHV-4 auf die MHC II-Expression equiner PBMCs	73
4.3	Die <i>in vitro</i>-Infektion equiner PBMCs	74
4.4	Der Einfluss der Deletion des UL43-Gens auf die Expression anderer viraler Proteine	77
4.4.1	Der Vergleich der Expression verschiedener EHV-1-Proteine mittels Durchflusszytometrie	77
4.4.2	Der Vergleich der Lokalisation verschiedener EHV-1-Proteine mittels Confocaler Laser Scanning-Mikroskopie	83
4.4.3	Die Generierung einer UL43-myc-C-exprimierenden Zelllinie	89

4.4.4	Die Expression von EHV-1-Proteinen auf mit L11 Δ 43 infizierten Rk43-myc-C-Zellen	91
5.	DISKUSSION	93
5.1	Der Einfluss von EHV-1 auf die MHC I- bzw. MHC II-Expression equiner Zellen	93
5.2	Der Einfluss einer Infektion mit EHV-4 auf die MHC I-/II-Expression	100
5.3.	Die <i>in vitro</i>-Infektion equiner PBMCs	101
5.4	Der Einfluss der Deletion des UL43-Gens auf die Expression anderer viraler Proteine	103
6.	ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY	107
7.	LITERATURVERZEICHNIS	111
8.	ANHANG	125

1. EINLEITUNG

Das Equide Herpesvirus 1 (EHV-1), ein Mitglied der Subfamilie *Alphaherpesvirinae*, stellt eines der wichtigsten viralen Pathogene bei Pferden dar. Obwohl Infektionen mit EHV-1 in der Regel mild oder subklinisch verlaufen, können sie auch respiratorische Erkrankungen, Aborte, neonatalen Fohlentod und in selteneren Fällen Myeloenzephalopathien hervorrufen. Trotz des Einsatzes von Vakzinen sind Infektionen und Erkrankungen häufig und verursachen weltweit schwere wirtschaftliche Schäden. Die Tatsache, dass eine EHV-1-Infektion trotz Vorhandenseins neutralisierender Antikörper eine Virämie verursachen kann, weist darauf hin, dass das Virus in der Lage ist, der Erkennung durch die Immunabwehr des Wirtes zu entgehen. Frühere Arbeiten zeigen, dass EHV-1 auch auf die zell-vermittelte Immunabwehr Einfluss nimmt, da die Präsentation viraler Antigene auf infizierten Zellen durch Verringerung der MHC I-Oberflächenexpression beeinträchtigt ist. Die Identifizierung der im Rahmen einer EHV-1-Infektion ablaufenden Immunmodulationsprozesse und der verantwortlichen Gene ist Voraussetzung für eine gezielte Verbesserung der Impfstrategien und somit für einen effektiveren Schutz der Pferde vor EHV-1-assoziierten Erkrankungen. Bisher konnte allerdings erst eines der in diesen Prozess involvierten viralen Genprodukte identifiziert werden. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit stellte daher die Untersuchung einer möglichen Bedeutung der EHV-1-Proteine UL11p und UL43p für EHV-1-Immunmodulationsmechanismen dar. Darüber hinaus sollte der mögliche Einfluss einer EHV-1-Infektion auf die MHC II-Expression equiner Zellen untersucht werden. In einer weiteren Reihe von Experimenten sollte einerseits der Einfluss einer Infektion mit dem eng verwandten Equiden Herpesvirus 4 (EHV-4) auf die MHC I-/II-Expression equiner Zellen abgeklärt werden. Andererseits sollte der Einfluss auf die Verringerung der MHC I-/II-Präsentation zwischen verschiedenen EHV-1-Stämmen verglichen werden, um einen möglichen Zusammenhang zwischen klinischer Symptomatik und viraler Immunmodulation festzustellen.

2. SCHRIFTTUM

2.1 Die equiden Herpesviren Typ 1 und 4 (EHV-1 und -4)

2.1.1 Die Infektionen mit EHV-1 und -4

Von den fünf bisher bei Pferden beschriebenen Herpesviren kommt den Equiden Herpesviren Typ 1 und 4 (EHV-1 und -4) sowohl klinisch als auch wirtschaftlich die größte Bedeutung zu. Beide Erreger sind in Pferdepopulationen weltweit endemisch verbreitet, und trotz intensiver wissenschaftlicher Forschung und dem Einsatz von Vakzinen sind Infektionen und Erkrankungen nach wie vor häufig (Stierstorfer et al., 2002; Patel und Heldens, 2005; Slater et al., 2006). Neben fieberhaften respiratorischen Erkrankungen, die durch beide Pathogene verursacht werden, kann eine Infektion mit EHV-1 zusätzlich zu Aborten, neonatalem Fohlentod, Myeloenzephalopathien und Chorioretinopathien führen. EHV-4-Infektionen hingegen bleiben meist auf den Respirationstrakt beschränkt (Patel und Heldens, 2005; Slater et al., 2006).

Respiratorische Erkrankungen verlaufen in der Regel mild oder subklinisch. Vor allem Fohlen oder Jährlinge können nach Primärinfektionen auch akut erkranken. Neben Fieber, Anorexie, Schwellung der Lymphknoten und serösem bis mukopurulentem Nasenausfluss kann es bisweilen zu viralen Bronchopneumonien in Folge bakterieller Sekundärinfektionen kommen. Nach Reinfektionen treten meist allenfalls milde Symptome auf (van Maanen, 2002). In letzter Zeit erhärtete sich der Verdacht, dass klinisch relevante respiratorische Erkrankungen v.a. durch EHV-4 verursacht werden (Slater et al., 2006).

Im Rahmen einer EHV-1-Infektion entwickelt sich nach initialer Replikation im Epithel des oberen Respirationstrakts eine zell-assoziierte Virämie. Mit Hilfe von infizierten T-Lymphozyten und Monozyten kann sich die Infektion auf andere Organsysteme, u.a. auf den trächtigen Uterus, ausbreiten. Eine Infektion der Endothelzellen endometrialer Gefäße mit besonders virulenten, endotheliotropen EHV-1-Stämmen kann schwere Vaskulitiden mit

thrombo-ischämischen Infarkten und Nekrosen verursachen (Allen et al., 1999; van Maanen, 2002). Letztendlich kommt es infolge einer hämatogenen Virusausbreitung auf den Fetus oder durch weitreichende uteroplazentale Schäden ohne Infektion des Fetus zum Abort (Smith et al., 1992; Smith und Borchers, 2001). EHV-1-bedingte Aborte treten fast ausschließlich im letzten Drittel der Trächtigkeit auf, da der Uterus zu diesem Zeitpunkt empfänglicher für Schädigungen durch EHV-1 zu sein scheint (Allen et al., 1999). Eine Infektion gegen Ende der Trächtigkeit kann zur Geburt lebender, infizierter Fohlen führen, die allerdings meist innerhalb weniger Tage sterben (Patel und Heldens, 2005).

Die in der Regel durch EHV-1 und nicht durch EHV-4 verursachten neurologischen Erkrankungen können sporadisch oder epizootisch auftreten. Die Pathogenese dieser Myeloenzephalopathien ist noch nicht vollständig geklärt und es werden verschiedene Modelle diskutiert. Unter anderem wird angenommen, dass infolge der zell-assoziierten Virämie eine Virusvermehrung in Endothelzellen des ZNS mit nachfolgender Vaskulitis stattfinden könnte. Diese könnte sekundär zur hypoxischen Degeneration des umliegenden neuronalen Gewebes führen (Edington et al., 1986; Stierstorfer et al., 2002). Die Symptome reichen von milden Ataxien, von denen sich die Tiere oft vollständig erholen, über Paresen bis hin zu vollständigem Festliegen. Myeloenzephalopathien können im Zusammenhang mit Aborten oder respiratorischen Erkrankungen auftreten, werden aber häufig ohne weitere Krankheitsanzeichen beobachtet (van Maanen, 2002).

Die Fähigkeit der Herpesviren zur Etablierung latenter Infektionen stellt ein epidemiologisches Problem dar. Während der Latenz liegt das herpesvirale Genom als zirkuläres Molekül in infizierten Zellen vor (Roizman und Pellett, 2001). Vornehmliche Orte für die Etablierung der Latenz durch EHV-1 stellen v.a. Zellen des Immunsystems wie T-Lymphozyten und Monozyten, aber auch neuronale Gewebe dar (Patel und Heldens, 2005). Es wird angenommen, dass die meisten adulten Pferde EHV-1 in latenter Form beherbergen. Die Tiere sind dabei allerdings klinisch unauffällig und virologisch negativ (Allen et al., 1999). Infolge periodischer Reaktivierung durch Stress oder Immunsuppression und nachfolgender Virusausscheidung über den nasalen Mukus dienen latent infizierte

Pferde als Reservoir für die Infektion neuer, empfänglicher Tiere (Slater et al., 2006). Es wird vermutet, dass sowohl Abortgeschehen als auch Myeloenzephalopathien durch Reaktivierung latenter Infektionen im betroffenen Tier ausgelöst werden können (Stierstorfer et al, 2002; Patel und Heldens, 2005).

2.1.2 Die Klassifizierung der Equiden Herpesviren 1 und 4

Die equiden Herpesviren lassen sich aufgrund der typischen Struktur der Viruspartikel in die Familie der *Herpesviridae* einordnen (Roizman und Pellett, 2001). Innerhalb dieser Familie gehören EHV-1 und -4 zum Genus *Varicellovirus* der Subfamilie der *Alphaherpesvirinae*. Weitere Vertreter dieses Genus sind u.a. das humanpathogene Varicella-Zoster Virus (VZV), das Suide Herpesvirus 1 (SuHV-1) sowie das Bovine Herpesvirus 1 (BoHV-1) (Fauquet et al., 2005).

2.1.3 Die Morphologie der Herpesviren

Herpesviren sind aus vier morphologisch differenzierbaren Strukturen aufgebaut. Ein typisches Viruspartikel besteht aus einem Core, das die virale Desoxyribonukleinsäure (DNS) in Form eines Torus enthält. Dieses wird umgeben vom ikosahedralen Kapsid, welches aus 162 Kapsomeren besteht und einen Durchmesser von 100 nm aufweist. Im Anschluss an das Kapsid befindet sich eine teilweise asymmetrische Proteinschicht, die als Tegument bezeichnet wird (Roizman und Pellett, 2001). Dieses wurde lange für unstrukturiert gehalten, zumindest der innere Teil weist aber vermutlich eine ikosahedrale Symmetrie auf (Zhou et al., 1999). Das Tegument interagiert einerseits mit dem Kapsid und andererseits mit den cytoplasmatischen Schwänzen der Hüll-Glykoproteine und sichert so die Integrität der Viruspartikel (Mettenleiter, 2002). Die äußerste Schicht wird von der Virushülle gebildet, die sich von modifizierten zellulären Membranen ableitet und virale

Glykoproteine in Form von Protrusionen auf der Oberfläche trägt (Roizman und Pellett, 2001).

2.1.4 Der Genomaufbau des Equiden Herpesvirus 1

Das Genom von EHV-1 besteht aus einer linearen doppelsträngigen DNS. Es weist eine Größe von 150,223 kbp auf und kodiert für mindestens 76 verschiedene Proteine (Telford et al., 1992). Herpesvirale Genome lassen sich je nach Anzahl und Anordnung sog. iterativer Sequenzen in 6 Gruppen (A- F) einteilen, wobei die Genome der Varizelloviren der Gruppe D zugeordnet werden. Sie sind aus einer langen („unique long“ = U_L) und einer kurzen („unique short“ = U_S) Untereinheit aufgebaut, welche durch eine iterative Sequenz getrennt werden. Diese wird als „internal repeat“ (IR) bezeichnet und wiederholt sich am Ende des Genoms in umgekehrter Orientierung als „terminal repeat“ (TR)-Region. Die Orientierung der von den „inverted repeats“ flankierten U_S-Untereinheit kann somit relativ zur U_L-Untereinheit umgekehrt werden, wodurch zwei in äquimolaren Mengen vorhandene isomere Genomformen entstehen (Telford et al., 1992; Roizman und Pellett, 2001).

Das Genom des ebenfalls zu den *Alphaherpesvirinae* gehörenden Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1) lässt sich der Gruppe E zuordnen und unterscheidet sich von den Genomen der Gruppe D durch Anzahl und Anordnung der IR-Regionen. Dennoch werden die offenen Leserahmen (ORFs) der anderen Alphaherpesviren zur leichteren Vergleichbarkeit in Analogie zu ihren Homologen bei HSV-1 durch Nummerierung innerhalb der U_L- und U_S-Regionen bezeichnet (Roizman und Pellett, 2001). Das bei EHV-1 durch das Gen 51 kodierte Protein wird beispielweise entsprechend seines HSV-1-Homologs als UL11-Protein (UL11p) bezeichnet.

2.1.5 Die Regulation der Expression herpesviraler Gene

Die Expression herpesviraler Gene wird kaskadenartig und durch gegenseitige Wechselwirkungen der Genprodukte reguliert. In Abhängigkeit von der zeitlichen Abfolge und von den Voraussetzungen für ihre Expression lassen sich die viralen Gene in vier Gruppen einteilen. Die α - oder „immediate-early“ (IE)-Gene werden als erstes transkribiert und benötigen für ihre Expression keine vorausgehende Synthese viraler Proteine. Ihre Genprodukte stimulieren die Expression der β - oder „early“ (E)-Gene. Diese sind unabhängig von der Synthese viraler DNS, bewirken jedoch den Beginn der DNS-Replikation und spielen u.a. eine Rolle im Nukleotid-Metabolismus. Die meisten der zuletzt exprimierten γ -Gene kodieren für virale Strukturproteine und lassen sich in zwei Untergruppen einteilen. Die γ_1 - oder „early-late“-Gene werden durch den Beginn der viralen DNS-Synthese verstärkt exprimiert, während die Transkription der γ_2 - oder „true late“-Gene vollkommen von der DNS-Synthese abhängig ist (Caughman et al., 1985; Roizman und Knipe, 2001; Roizman und Pellett, 2001).

2.1.6 Die Replikation der Alphaherpesviren

Der lytische Replikationszyklus der verschiedenen Alphaherpesviren läuft nach einem ähnlichen Muster ab und lässt sich in mehrere Schritte einteilen (Granzow et al., 1997; 2001). Neben der im Folgenden beschriebenen Replikation mit Freisetzung infektiöser Partikel aus der Zelle spielt auch der direkte Transfer von Infektiosität von Zelle zu Zelle, der sog. „cell-to-cell spread“, eine wichtige Rolle im Herpesvirus-Lebenszyklus. Auf diese Mechanismen wird aber im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter eingegangen.

2.1.6.1 Der Viruseintritt und der Transport zum Zellkern

Die Adsorption des Virus an die Zielzelle erfolgt zunächst durch Interaktion des Hüll-Glykoproteins C (gC) mit Glykosaminoglykanen der Zelloberfläche. Die Glykoproteine B und D vermitteln nachfolgend eine stabilere Bindung und interagieren zudem mit einem Komplex aus den Glykoproteinen H und L, wodurch die Penetration des Viruspartikels durch Verschmelzung der Virushülle mit der Plasmamembran ausgelöst wird (Csellner, 2000; Roizman und Knipe, 2001). Elektronenmikroskopisch lassen sich die beiden Phasen der Adsorption durch den unterschiedlichen Abstand der Viruspartikel zur Plasmamembran unterscheiden (Granzow et al., 1997). Für die Vorgänge während der Adsorption und Penetration ist bei EHV-1 neben den Glykoproteinen B, C und D (Neubauer et al., 1997; Osterrieder, 1999; Csellner et al., 2000) auch das Produkt des Gen 71 von Bedeutung, welches als Glykoprotein 2 (gp2) bezeichnet wird und nur bei den equiden Herpesviren 1 und 4 beschrieben ist. Vermutlich bedingt durch das Fehlen von gp2-Spikes adsorbieren gp2-deletierte Virionen weniger effektiv an Zielzellen (Sun et al., 1994; 1996). Ebenso wie bei den anderen Alphaherpesviren behindert die Expression von gD auf der infizierten Zelle zudem die Infektion derselben Zelle durch weitere EHV-1-Partikel (Campadelli-Fiume et al., 1988; 1990). Die Penetrationsgeschwindigkeit von EHV-1 wird auch durch das Vorhandensein der multipel hydrophoben Glykoproteine M und K (gM, gK), welche wichtige Bestandteile der Virushülle darstellen, beeinflusst (Osterrieder, 1996; Neubauer und Osterrieder, 2004). Im Anschluss an die Penetration werden die unbehüllten Herpeskapside mit einem Teil der umgebenden Tegumentproteine entlang des zellulären Mikrotubuli-Netzwerks zum Zellkern transportiert. Dort wird die virale DNS über die Kernporen in das Nukleoplasma entlassen, wo sie schnell zirkularisiert (Sodeik et al., 1997; Granzow et al., 1997; 2001; Roizman und Knipe, 2001; Mettenleiter, 2004).

2.1.6.2 Die Replikation und Verpackung der viralen DNS

Im Kern der infizierten Zelle finden die Transkription, die Replikation viraler DNS sowie der Zusammenbau neu geformter Kapside statt. Die Transkription der viralen DNS durch die zelluläre RNA-Polymerase II erfolgt kaskadenartig. Die Virus-DNS wird zunächst in Form einer Theta-Replikation, später nach dem Prinzip eines „Rolling Circle“-Mechanismus amplifiziert. Dies führt zur Entstehung langer konkatemerer DNS-Moleküle, die während der Einfädung in vorgeformte Kapside in Genome von einheitlicher Länge geschnitten werden (Roizman und Knipe, 2001; Mettenleiter, 2004).

2.1.6.3 Die Primäre Umhüllung der Nukleokapside

Die aktuell die breiteste Unterstützung findende Hypothese über die Ausschleusung reifer Viruspartikel aus der Wirtszelle sieht einen sog. „envelopment-deenvelopment-reenvelopment“-Prozess vor (Granzow et al., 2001).

Nach ihrem Zusammenbau im Zellkern erhalten die neu geformten Nukleokapside demnach durch Knospung an der inneren Kernmembran zunächst eine primäre Hülle. Eine zentrale Rolle spielt dabei der Komplex aus den Proteinen UL31p und UL34p, der die Nukleokapside zum Ort der primären Umhüllung lenkt (Mettenleiter, 2004). Auch US3 ist ein wichtiger regulativer Faktor des Kern-„Egress“ (Mettenleiter, 2002; Reynolds et al., 2002). Das UL34-Protein von EHV-1 lässt sich in infizierten Zellen im Randbereich des Kerns lokalisieren, ist offensichtlich ebenfalls von essentieller Bedeutung für die Ausschleusung von Viruskapsiden aus dem Kern und ist, wie bei den anderen Alphaherpesviren auch, kein Strukturprotein (Neubauer et al., 2002). Primär behüllte Kapside im perinukleären Raum besitzen eine glatte Oberfläche ohne Oberflächenprojektionen und unterscheiden sich somit auch morphologisch von reifen Virionen (Granzow, 1997). Durch Fusion der primären Hülle mit der äußeren Kernmembran kommt es nachfolgend zur Freisetzung unbehüllter Nukleokapside ins Zytoplasma der Zelle. Bei EHV-1 führt eine Deletion des Gen 71 zur Akkumulation von

Kapsiden verschiedener Reifestadien im Kern infizierter Zellen. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass neben dem UL34p auch das gp2 eine wichtige Rolle bei der Ausschleusung der Viruspartikel aus dem Kern spielt (Sun et al., 1996).

2.1.6.4 Die Sekundäre Umhüllung und Ausschleusung reifer Partikel aus der Zelle („viral egress“)

Die sekundäre Umhüllung der Nukleokapside findet nach dem aktuellen Modell im Bereich des *trans*-Golgi-Netzwerks (TGN) statt, indem die Kapside nach Vervollständigung der Tegumentschicht im Zytoplasma der Zelle in Golgi-Vesikel knospen und damit eine finale Umhüllung erhalten (Granzow et al., 2001; Mettenleiter, 2002). Sekundär behüllte Viruspartikel besitzen im Gegensatz zu Partikeln im perinukleären Raum ein diffuses Tegument und elektronenmikroskopisch sichtbare Oberflächenprojektionen aus Glykoproteinen (Granzow et al., 2001). Bei der Steuerung des finalen Umhüllungsschrittes ist eine Vielzahl herpesviraler Proteine involviert und die Zusammenhänge sind noch nicht bis ins Detail geklärt. Sowohl UL11p als auch gM und der gE/gI-Komplex scheinen jedoch von entscheidender Bedeutung zu sein (Mettenleiter, 2002; Kopp et al., 2003; 2004). Ein Fehlen des UL11p oder des gM in Verbindung mit einer Deletion von gE und gI führt auch bei EHV-1 zu einer massiven Beeinträchtigung der sekundären Umhüllung sowie des nachfolgenden Virus-„Egress“ (Seyboldt et al., 2000; Rudolph und Osterrieder, 2002; Schimmer und Neubauer, 2003). Im Anschluss an die finale Umhüllung sammeln sich die reifen Virionen in Prälysosomen, die durch Verschmelzung mehrerer TGN-Vesikel entstehen (Harley et al., 2001). Die Ausschleusung aus der Zelle erfolgt letztendlich durch Verschmelzung dieser Transportvesikel mit der Plasmamembran der Zelle, wodurch die Viruspartikel in den Extrazellulärraum freigesetzt werden (Granzow et al., 1997).

2.2 Die Immunmodulation durch Herpesviren

Trotz Vorhandenseins EHV-1-spezifischer Antikörper kommt es bei infizierten wie auch bei geimpften Pferden regelmäßig zu Infektionsdurchbrüchen mit nachfolgender Erkrankung (Mumford et al., 1987; Ambagala et al., 2004; van der Meulen et al., 2006b). Bereits 6 Monate nach vorangegangener Infektion kann erneut eine zell-assoziierte Virämie auftreten (Edington und Bridges, 1990). Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass die humorale Immunantwort alleine nicht ausreicht, um eine EHV-1-Infektion erfolgreich zu bekämpfen (Ambagala et al., 2004). Das Virus ist offensichtlich in der Lage, seiner Elimination durch die Immunabwehr des Wirtes zu entgehen.

Im Verlauf der Evolution hat das Immunsystem des Wirtsorganismus eine Vielzahl an Möglichkeiten geschaffen, Viren und virusinfizierte Zellen zu bekämpfen. Im Gegenzug haben aber auch Viren, unter dem Druck der Co-Existenz mit ihrem immunkompetenten Wirt, vielfältige Strategien entwickelt, um ihrer Elimination durch das Immunsystem zu entkommen. Aufgrund der großen Kodierungskapazität ihres Genoms sind Herpesviren in der Lage, die Immunabwehr des Wirtsorganismus auf fast jeder Ebene zu beeinträchtigen, um so die Zeitspanne für Replikation und Ausbreitung des Virus zu erweitern. Die Strategien herpesviraler Immunmodulation lassen sich grob einteilen in Mechanismen, die einerseits gegen Immun-Effektor-Funktionen, wie zum Beispiel den alternativen Weg des Komplementsystems oder das Cytokin-Netzwerk, andererseits gegen die humorale Immunantwort gerichtet sind. Des Weiteren haben Herpesviren diverse Möglichkeiten entwickelt, die spezifische zellgebundene Abwehr zu behindern (Vossen et al., 2002; van der Meulen et al., 2006a).

2.2.1 Die Beeinträchtigung der Immun-Effektor-Funktionen

Die frühen Reaktionen auf eine herpesvirale Infektion sind unspezifisch und dienen dazu, die Replikation und Ausbreitung des Virus zu begrenzen, sind aber nicht in der Lage, ein

Fortschreiten der Erkrankung zu verhindern. Neben der Aktivierung der Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) spielt dabei unter anderem die Freisetzung von Interferon- α eine Rolle (Abendroth und Arvin, 2001). Auch das Komplementsystem ist früh an der Abwehr einer Infektion beteiligt, indem es u.a. die Opsonisierung fremder Partikel, die Rekrutierung von Phagozyten sowie die Lyse infizierter Zellen vermittelt (Finlay und McFadden, 2006). Wirtszellen sind durch Expression von sogenannten „regulators of complement activation“ (RCAs) vor Angriffen durch das Komplementsystem geschützt (Vanderplasschen et al., 1998). Einige Viren sind in der Lage, Strukturproteine zu exprimieren, die die Funktion der zellulären RCAs nachahmen, wie zum Beispiel HSV-1 und EHV-1 über das Glykoprotein C, welches eine Dissoziation der C3-Konvertase bewirkt (Friedman et al., 1984; Harris et al., 1990; Huemer et al., 1995).

Cytokine stellen als chemische Botenstoffe wichtige Modulatoren der Immunantwort dar (Baggiolini et al., 1998). Aus diesem Grund haben Viren diverse Möglichkeiten entwickelt, um mit der Cytokin-Antwort des Immunsystems zu interferieren. Das Serum EHV-1-infizierter Ponies enthält beispielsweise den aktivierten „transforming growth factor β “ (TGF β), ein Cytokin mit vielen inhibitorischen Wirkungen auf Immunzellen, u.a. auf die Leukozyten-Proliferation (Charan et al., 1997). Das Glykoprotein G von EHV-1 ist ebenfalls in der Lage, mit dem Cytokin-Netzwerk des Wirtes zu interagieren, indem es beispielsweise die Cytokine Interleukin 8 (IL-8) und CCL3 bindet und so eine korrekte Signalübertragung verhindert (Bryant et al., 2003; van de Walle et al., 2007; 2008). Einige Beta- und Gammaherpesviren, darunter das Equide Herpesvirus 2 (EHV-2), das Humane Cytomegalievirus (HCMV), das Murine Cytomegalievirus (MuHV-1) und das Epstein-Barr-Virus (EBV), kodieren für Homologe des Interleukin 10 (IL-10), ein wichtiges Cytokin mit starker immunsuppressiver und anti-inflammatorischer Wirkung (Vossen et al., 2002; van der Meulen et al., 2006a; Wiertz et al., 2007). Im Rahmen einer normalen Immunantwort wird IL-10 erst zu späten Zeitpunkten der Infektion durch aktivierte T-Zellen, B-Zellen und Monozyten sezerniert, vermutlich um ein Überschießen der Immunreaktion zu unterbinden. Eine frühe Induktion der

IL-10-Ausschüttung führt daher zu einer Blockierung des Anlaufens einer effektiven Immunantwort (Vossen et al., 2002; Wiertz et al., 2007).

2.2.2 Die Interferenz mit der humoralen Immunabwehr

Auch die Mechanismen der Antikörper-abhängigen Immunantwort können durch Herpesviren beeinträchtigt werden. Im Cytoplasma der Wirtszelle neu synthetisierte virale Proteine werden u.a. in die Plasmamembran der Zelle eingebaut (Mettenleiter, 2002) und können in Folge durch virusspezifische Antikörper erkannt und gebunden werden. Dies führt im Normalfall dazu, dass die infizierte Zelle durch verschiedene Komponenten der unspezifischen Immunabwehr wie phagozytierende Zellen, NK-Zellen oder das Komplementsystem erkannt und zerstört werden kann (Favoreel et al., 2003; Ficinska et al., 2005). Verschiedene Herpesviren sind jedoch in der Lage, die Expression viraler Epitope auf der Oberfläche infizierter Zellen zu begrenzen. So wurde gezeigt, dass 70 % der *in vitro* EHV-1-infizierten peripheren mononukleären Blutzellen („peripheral blood mononuclear cells“, PBMCs), die die natürlichen Transportzellen des Virus im Blut darstellen, keine viralen Hüllproteine auf ihrer Oberfläche exprimieren. Auch *in vivo* ließen sich auf 98 % der nachweislich infizierten PBMCs während der zell-assoziierten Virämie EHV-1-infizierter Pferde keine viralen Proteine auf der Zelloberfläche nachweisen (van der Meulen et al., 2003; 2006b). Auf der Zellmembran SuHV-1-infizierter Monozyten werden zwar virale Hüllproteine exprimiert, durch Binden virusspezifischer Antikörper wird allerdings eine Reaktion ausgelöst, die zur Internalisierung dieser Antigen-Antikörper-Komplexe führt. Die SuHV-1-Glykoproteine B und D, aber auch der gE/gI-Fc-Rezeptor-Komplex, spielen eine wichtige Rolle in diesem Endocytose-Prozess (Favoreel et al., 1999; Ficinska et al., 2005).

2.2.3 Die zell-vermittelte Immunität als Ziel herpesviraler Immunmodulation

Für den Verlauf einer herpesviralen Infektion ist die Ausbildung einer spezifischen zellulären Immunantwort von entscheidender Bedeutung. Eine wesentliche Rolle spielen dabei neben den Antikörper-produzierenden B-Lymphozyten vor allem die T-Lymphozyten. CD8-tragende cytotoxische T-Zellen sind in der Lage, virale Peptide zu erkennen, die durch „major histocompatibility complex“ (MHC) Klasse I-Moleküle auf der Oberfläche infizierter Zellen präsentiert werden (Townsend und Bodmer, 1989), und nach Aktivierung die Zerstörung der infizierten Zelle zu bewirken. CD4-tragende T-Helferzellen können Antigene im Komplex mit MHC Klasse II-Molekülen erkennen. Sie dienen u.a. der Induktion und Aufrechterhaltung einer effektiven CD8⁺ T-Zell-Immunität, der Aktivierung von Makrophagen, unterstützen die B-Lymphozyten bei der Antikörper-Produktion und sind in der Lage, Interferon- γ (IFN- γ) zu produzieren (Abendroth und Arvin, 2001; Wiertz et al., 2007).

Die essentielle Bedeutung der cytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs) für die Virusabwehr macht sie zu einem lohnenden Ziel viraler Immunmodulations-Mechanismen. Die naheliegendste Methode, ihre Funktion zu unterbinden, besteht darin, Lymphozyten zu zerstören. Die Fähigkeit zur Zerstörung von CTLs wurde bereits für SuHV-1 nachgewiesen (Mulder et al., 1995). BoHV-1 ist in der Lage, die Apoptose von T- und B-Lymphozyten sowie von Monozyten einzuleiten (Hanon et al., 1996; 1998). Im Blut experimentell EHV-1-infizierter Pferde ist in den ersten 5 Tagen nach Infektion ein akuter Abfall der CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten zu beobachten, was vermuten lässt, dass auch EHV-1 eine Zerstörung von Lymphozyten auslösen kann (Bumgardner et al., 1982; McCulloch et al., 1993). Allerdings ließe sich die beobachtete Abnahme zumindest partiell auch durch eine selektive Migration der Zellen zu den Orten der Infektion, wie z.B. der Lunge, erklären (Kydd et al., 1996).

2.2.4 Die Interaktion mit der Antigen-Präsentation durch MHC I-Moleküle

Die Peptid-Präsentation durch MHC I-Moleküle ist das Ergebnis eines komplexen Prozesses der Antigen-Verarbeitung (Pamer und Cresswell, 1998). MHC I-Moleküle werden von fast allen somatischen Zellen exprimiert (Ambagala et al., 2004). Sie bestehen aus einer schweren Kette (α), einer leichten Kette, bezeichnet als β 2-Mikroglobulin (β 2m), sowie dem gebundenen Peptid. Im Cytoplasma infizierter Zellen werden neben zellulären ständig auch virale Proteine synthetisiert. Ein Teil dieser Proteine wird durch zelleigene Proteasomen zu kurzen Peptiden zerlegt. Diese Peptide werden anschließend durch den „transporter associated with antigen-processing“ (TAP), ein ATP-abhängiger Peptid-Transporter, der sich in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) befindet, in das Lumen des ER gebracht. Dort verbinden sie sich mit neu synthetisierten Heterodimeren aus schweren MHC I-Ketten und β 2m zu einem stabilen Komplex. Dieser Komplex wird zunächst zum Golgi-Apparat und anschließend zur Zellmembran transportiert, wo die durch MHC I-Moleküle präsentierten viralen Peptide von CTLs erkannt werden können (Williams et al., 2002; Ambagala et al., 2003; 2004).

Die Komplexität dieses Prozesses bietet viralen Erregern eine Fülle an Möglichkeiten, um mit der Peptidpräsentation durch MHC I-Moleküle zu interferieren. Eine Verminderung der MHC I-Expression auf der Oberfläche infizierter Zellen wurde bereits für viele Mitglieder der Subfamilien der Alpha- und Betaherpesviren nachgewiesen, unter anderem auch für EHV-1 (Cohen, 1998; Ambagala et al., 2000 (SuHV-1); Abendroth und Arvin, 2001 (VZV); Koppers-Lalic et al., 2001 (BoHV-1); Rappocciolo et al., 2003; Ambagala et al., 2004 (EHV-1)).

Eine Reduktion der MHC I-Oberflächenkonzentration auf EHV-1-infizierten Zellen wurde zuerst durch Rappocciolo et al. (2003) gezeigt. Die Herunterregulierung durch EHV-1 ist spezifisch für MHC I und reflektiert nicht ein generelles „shutoff“ der zellulären Proteinsynthese, wie z.B. für das „virion host shutoff“(vhs)-Protein von BoHV-1 gezeigt, welches hier zumindest partiell für den MHC I-Verlust verantwortlich gemacht werden kann

(Koppers-Lalic et al., 2001). Eine maximale Reduktion der MHC I-Expression wurde 24 h *post infectionem* (p.i.) beobachtet und betraf nur einen Teil der exprimierten MHC I-Moleküle; nur bestimmte MHC I-Typen waren drastisch vermindert, während andere in geringerer Konzentration detektierbar blieben. Es wurde vermutet, dass dies möglicherweise das Resultat eines Allel-spezifischen Mechanismus ist und dass das Virus durch Belassen einiger MHC I-Allele auf der Zelloberfläche die Zerstörung der infizierten Zelle durch Natürliche Killerzellen verhindert (Rappocciolo et al., 2003). Da eine Behandlung der Zellen mit dem Translations-Hemmstoff Cycloheximid oder mit Brefeldin A (zerstört den Golgi-Apparat) einen deutlich geringeren Rückgang der MHC I-Expression bewirkte als eine Infektion mit EHV-1, wurde angenommen, dass die Reduktion durch Endocytose der MHC I-Moleküle von der Zelloberfläche vermittelt wird (Rappocciolo et al., 2003). Für das Humane Herpesvirus 8 (HHV-8) konnte bereits nachgewiesen werden, dass es über seine Proteine K3 und K5 eine verstärkte Endocytose von MHC I-Molekülen von der Zelloberfläche bewirkt. Die Wirkungen von K3 und K5 beziehen sich unabhängig voneinander jeweils auf spezifische MHC I-Allele (Coscoy und Ganem, 2000; Lorenzo et al., 2002). Die vermutete Endocytose der MHC I-Moleküle bei EHV-1-Infektion wird über ein „early“-Protein vermittelt (Rappocciolo et al., 2003), allerdings wurde bisher noch kein spezifisches Genprodukt identifiziert.

Unabhängig davon wiesen Ambagala et al. (2004) nach, dass EHV-1, ebenso wie zwei andere Mitglieder des Genus Varicellovirus, SuHV-1 (Ambagala et al., 2000) und BoHV-1 (Hinkley et al., 1998), in der Lage ist, mit dem Peptid-Transport durch TAP zu interferieren. Dies geschieht ebenfalls durch Expression eines frühen Proteins. Eine Beeinträchtigung des Transports war bereits 2 h p.i., eine komplette Hemmung (93%) 8 h p.i. erkennbar. Die verringerte Verfügbarkeit von Peptiden im ER führte zudem zu einer verzögerten Reifung der Peptid-MHC I- β 2m-Komplexe im ER. Koppers-Lalic et al. (2005) machten für diese Beobachtung das Produkt des UL49.5 (EHV-1 Gen10) verantwortlich.

Das UL49.5-Homologe ist bei Herpesviren hochkonserviert und agiert als Interaktionspartner des Hüllproteins gM. Es ist sowohl für dessen Prozessierung als demzufolge auch für die

Funktion des gM bzw. des gM/UL49.5-Komplexes beim Virus-„egress“ und bei der Virusausbreitung direkt von Zelle zu Zelle erforderlich (Kapitel 2.1.6.4) (Osterrieder, 1996; Jöns et al., 1998; Rudolph et al., 2002). Eine Hemmung der Funktion des TAP scheint allerdings nur bei Varicellovirus-kodiertem UL49.5 aufzutreten. Das UL49.5-Protein behindert die Aktivität des TAP über eine zweiphasige Reaktion. Zum einen bewirkt es einen konformationalen Arrest des TAP, wodurch der Peptid-Transport durch die Membran des ER zum Erliegen kommt. Des Weiteren werden TAP-Moleküle durch das UL49.5-Protein dem Abbau durch Proteasomen im Cytoplasma der Zelle zugeführt. Für diese Reaktion ist der cytoplasmatische Schwanz des Proteins, welches anschließend zusammen mit TAP abgebaut wird, essentiell.

Auch auf equinen PBMCs wurde in einem *in vitro*-Experiment eine Reduktion der MHC I-Oberflächenkonzentration nach Infektion mit EHV-1 beobachtet. Diese war allerdings auf frühe Zeiten (6 und 9 h) p.i. beschränkt (van der Meulen, 2006a). *In vivo* konnte diese Herunterregulierung bisher dagegen nicht nachgewiesen werden (van der Meulen et al., 2006b).

Für verschiedene andere Herpesviren wurden bereits mehrere Genprodukte identifiziert, über die diese mit der zellulären MHC I-Expression interferieren. HCMV beispielsweise kodiert für mindestens 5 Proteine, die in den Mechanismus der Antigen-Präsentation eingreifen können. Es ist in der Lage, durch Expression seines pp65-Proteins einerseits die proteasomale Degradation einiger viraler Proteine zu verhindern (Vossen et al., 2002), andererseits über sein US6-Protein den Peptidtransport durch TAP zu beeinträchtigen (Lehner et al., 1997). Das HCMV-US3p bewirkt dagegen die Retention von MHC I-Molekülen im ER (Jones et al., 1996), die Expression der US2- und US11-Genprodukte führt zum Abbau der MHC-Moleküle im Cytosol der Zelle (Rappocciolo et al., 2003). Das ICP47-Protein von HSV-1 behindert den Peptid-Transport, indem es mit Peptiden um die cytosolische Bindungsstelle des TAP konkurriert (Tomazin et al., 1996) und vermittelt zudem eine Retention von MHC I-Molekülen im ER (Abendroth und Arvin, 2001). Auch MuHV-1 verfügt

über eine Vielzahl von Proteinen, um in sämtliche Schritte der MHC I-Präsentationskaskade eingreifen zu können (Vossen et al., 2002).

Die Herpesviren des Genus Varicellovirus besitzen allerdings keine Homologe zu den o.g. Genprodukten (Ambagala et al., 2004). In SuHV-1-infizierten Zellen wurde zudem eine unspezifische Herunterregulierung der MHC I-Expression beobachtet. Es wurde gezeigt, dass die Internalisierung von Antigen-Antikörper-Komplexen von der Zelloberfläche mit einer Co-Internalisierung von MHC I-Molekülen einhergeht (Favoreel et al., 1999).

2.2.5 Die Beeinträchtigung der Funktion Natürlicher Killerzellen

Eine drastische Reduktion der Expression von MHC I-Molekülen auf der Oberfläche infizierter Zellen im Rahmen der viralen Immunmodulation würde in Übereinstimmung mit der „missing-self“-Hypothese dazu führen, dass die betroffenen Zellen von Natürlichen Killerzellen erkannt und eliminiert würden (Ljunggren und Kärre, 1990). Virale Erreger haben deshalb verschiedene Strategien entwickelt, um die Erkennung durch NK-Zellen zu umgehen. HCMV und MuHV-1 sind beispielsweise in der Lage, MHC I-Homologe zu exprimieren (Fahnestock et al., 1995; Vossen et al., 2002).

Auch eine Reduktion der Konzentration einiger, aber nicht aller MHC I-Moleküle auf der Oberfläche infizierter Zellen, wie es für EHV-1 (Rappocciolo et al., 2003) und SuHV-1 (Sparks-Thissen und Enquist, 1999) beschrieben wurde, dient vermutlich dazu, die NK-medierte Lyse der Zelle zu verhindern (van der Meulen et al., 2006a).

2.2.6 Der Einfluss auf die Antigen-Präsentation durch MHC II-Moleküle

MHC II-Moleküle werden in der Regel nur auf professionellen Antigen-präsentierenden Zellen wie B-Lymphozyten, Monozyten, dendritischen Zellen und Thymusepithel exprimiert. Auf vielen anderen Zelltypen lässt sich allerdings durch Stimulation mit IFN- γ eine MHC II-Expression induzieren (Collins et al., 1984). Peptide, die durch MHC II-Moleküle präsentiert

werden, stellen im Allgemeinen Bruchstücke extrazellulärer Proteine dar, die durch Phagocytose oder rezeptor-vermittelte Endocytose in die Zelle gelangen, wo sie durch endolysosomale Proteasen abgebaut werden. Aber auch intrazellulär synthetisierte Proteine können auf diesen Abbauweg gelangen und werden anschließend durch MHC II-Moleküle präsentiert (Wiertz et al., 2007). Klasse II-Moleküle bestehen aus einer α - sowie einer β -Kette, die sich im ER mit sog. nicht-variablen („invariant“) Ketten (Ii) verbinden. Durch Signale im cytoplasmatischen Schwanz von Ii wird der $\alpha\beta$ Ii-Komplex vom TGN zu speziellen „class II loading compartments“ transportiert. Eine Spaltung von Ii durch Proteasen ermöglicht anschließend die Peptidbindung, woraufhin stabile $\alpha\beta$ Peptid-Komplexe zur Zelloberfläche transportiert werden (Wiertz et al., 2007). Dort dienen sie der Antigen-Erkennung durch CD4⁺ T-Helferzellen (Cresswell, 1994).

Da sich aufgrund der stimulierenden Wirkung der T-Helferzellen auf andere Bereiche der Immunabwehr eine Beeinträchtigung ihrer Funktion u.a. auch auf die CD8⁺ T-Zell-Immunität sowie auf die Produktion von Antikörpern auswirkt (Wiertz et al., 2007), stellt auch die Antigen-Präsentation durch MHC II-Moleküle ein einladendes Ziel für virale Immunmodulationsmechanismen dar. Allerdings ist die Kenntnis derartiger Strategien bis dato noch sehr eingeschränkt und bezieht sich im Wesentlichen auf humanmedizinisch relevante Herpesviren.

Das HCMV-US2-Protein ist eines der wenigen bisher in diesem Zusammenhang identifizierten Genprodukte. Indem es die Zerstörung zweier essentieller Proteine der MHC II-Präsentationskaskade induziert, führt seine Expression zur Reduktion der Bildung von Klasse II Ii-Komplexen im ER (Tomazin et al., 1999). Das HCMV-US3-Protein führt zur Retention von MHC II-Ii-Komplexen im Golgi-Apparat, das pp65 zum Abbau von MHC II-Komplexen in abnormalen perinukleären Lysosomen (Wiertz et al., 2007). Außerdem ist es in der Lage, durch Reduktion der Expression der Janus-Kinase 1 (Jak1) in den Jak /Stat-Signaltransduktionsweg einzugreifen (Vossen et al., 2002). HSV-1 besitzt die Fähigkeit, durch die Produkte seiner γ_1 34,5- und UL41-Gene mit der MHC II-Präsentation zu interferieren, wobei das UL41-Protein eine starke „virion host shutoff“-Funktion ausübt

(Trgovich et al., 2002). Zudem reduziert HSV-1 die Expression von Stat1, Stat2 und Jak1 (Wiertz et al., 2007). Über sein BZLF1-Genprodukt vermag EBV die Konzentration der IFN- γ -Rezeptoren zu senken, wodurch es zu einer Stilllegung der IFN- γ -induzierten MHC II-Präsentations-Kaskade kommt (Morrison et al., 2001).

Nur für ein einziges Mitglied des Genus Varicellovirus, nämlich das VZV, konnte bisher eine Interferenz mit der MHC II-Peptid-Präsentation nachgewiesen werden. Abendroth und Arvin (2001) zeigten, dass sich durch IFN- γ nur auf 26% der VZV-infizierten Zellen eine Expression von MHC II-Molekülen induzieren ließ, während 86% der VZV-negativen Zellen nach Behandlung mit IFN- γ MHC II präsentierten. VZV ist in der Lage, die MHC II-Kaskade auf der Stufe der Transkription zu beeinträchtigen, indem es die Expression von Jak2 und Stat1 α vermindert (Abendroth und Arvin, 2001).

Da zu EHV-1 in diesem Zusammenhang bisher noch keine Studien durchgeführt wurden, stellte die Untersuchung einer möglichen Beeinflussung der MHC II-Oberflächenpräsentation durch EHV-1 eines der Ziele dieser Arbeit dar.

Angesichts der Vielzahl der beschriebenen Strategien, die alle in einer Verminderung der Oberflächenkonzentration der MHC I- oder MHC II-Moleküle resultieren, denen aber z.T. völlig unterschiedliche Wirkungsweisen zugrunde liegen, erscheint es wahrscheinlich, dass auch EHV-1, neben der Interferenz mit dem TAP-Transporter, über zusätzliche Mechanismen verfügt, die zu einer Modulation der Peptid-Präsentation durch MHC I-/II-Moleküle führen. Eine Klärung von deren Funktionsweise und die Identifizierung der verantwortlichen Gene könnte auf lange Sicht dazu beitragen, die Impfstrategien gegen EHV-1 zu verbessern. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte der mögliche Einfluss einer Deletion der EHV-1-Leserahmen UL11 und UL43 auf die MHC I- und /oder MHC II-Expression *in vitro* untersucht werden.

2.2.7 Das UL11-Protein bei EHV-1

Der elfte Leserahmen innerhalb der U_L-Region des EHV-1-Genoms wird als UL11 bezeichnet (Gen 51) (Telford et al., 1992). Das entsprechende Genprodukt ist ein aus 75 Aminosäuren bestehendes, nicht-glykosyliertes Polypeptid. Es wird als Protein der „early-late“-Expressionsklasse (γ 1-Protein) exprimiert und als Bestandteil des Teguments in extrazelluläre Virionen inkorporiert. In infizierten und transfizierten Zellen ist es im Bereich des Golgi-Apparates sowie in zellulären Membranen lokalisiert (Schimmer, 2002; Schimmer und Neubauer, 2003).

Das Protein ist für die Virusreplikation in Zellkultur nicht essentiell. Eine Deletion des entsprechenden Leserahmens führt allerdings zu einer Reduktion der extrazellulären Virustiter sowie der Größe entstandener Virusplaques. Diese Beobachtung lässt eine Funktion des UL11p im Rahmen des direkten „cell-to-cell spread“ vermuten. Die Lokalisation im Bereich des Golgi-Apparates infizierter Zellen weist zudem auf eine Funktion bei der sekundären Umhüllung der Kapside hin (Schimmer, 2002; Guggemoos, 2004). In der Zelle ist das EHV-1-UL11-Homologe mit Lipid-Rafts assoziiert, vermutlich vermittelt durch die Fettsäuremodifikationen des Proteins durch Myristylierung oder Palmitylierung. Als Lipid-Rafts werden stabile Mikrodomänen zellulärer Membranen bezeichnet, die einen hohen Gehalt an Sphingolipiden und Cholesterol aufweisen. Sie spielen eine Rolle bei der Signaltransduktion innerhalb der Zelle und dienen zudem als bevorzugte Orte für Viruszusammenbau und Umhüllung (Guggemoos, 2004).

Für das ebenfalls myristylierte UL11-Homologe von HSV-1 wurde gezeigt, dass es, vermittelt durch ein saures Aminosäuremuster, zwischen der Plasmamembran der Zelle und den Golgi-Membranen zirkuliert (Bowzard et al., 2000; Loomis et al., 2001). Beim UL11-Protein von EHV-1 ist um den Aminosäurerest 35 ebenfalls ein Bereich mit sauren Seitenketten zu finden (Schimmer, 2002). Im Hinblick auf die nachgewiesene Lokalisation des UL11p in infizierten Zellen wäre auch für das EHV-1-UL11-Protein denkbar, dass es zunächst an den Golgi-Apparat bindet und von dort zur Plasmamembran transportiert wird. Bei seiner

Rückkehr zum Golgi-Apparat könnte es MHC I-Moleküle von der Membran zum TGN transportieren und so zu einer Reduktion der MHC I-Präsentation beitragen. Da MHC II-Moleküle ebenso wie das UL11-Protein in Lipid-Rafts zu finden sind (Anderson et al., 2000), wäre es ebenfalls denkbar, dass diese durch das UL11p von der Zellmembran zu den Lipid-Rafts transportiert werden, was zu einer Verminderung der MHC II-Expression auf der Zelloberfläche führen würde.

2.2.8 Das EHV-1-UL43-Protein

Der UL43-Leserahmen ist innerhalb der Subfamilie der Alphaherpesviren konserviert und wird früh im Replikationszyklus als β -Gen exprimiert. Anhand der Aminosäuresequenz lässt sich für das EHV-1-UL43-Protein ein apparentes Molekulargewicht von 43 kDa berechnen (Carter et al., 1996). Zur Charakterisierung des UL43p wurde in einer ersten Reihe von Experimenten mit einer ein GFP-UL43-Fusionsprotein exprimierenden Zelllinie gearbeitet (Stenke, 2006). Mittels indirekter Immunfluoreszenz wurde gezeigt, dass das Fusionsprotein einerseits mit zellulären Membranen assoziiert ist und andererseits mit dem TGN-Protein γ -Adaptin, in dichten polarisierten Zellverbänden zudem mit dem Adherens Junctions (AJ)-Protein β -Catenin, kolokalisiert. Das UL43-Protein ist für die Virusreplikation in Zellkultur nicht essentiell, auch die Penetrationseigenschaften des Virus sind durch Fehlen des Proteins nicht beeinträchtigt. Allerdings führt eine Deletion des UL43-Leserahmens zu einer Abnahme intra- und extrazellulärer Virustiter sowie zu einer Reduktion der mittleren Plaque-durchmesser um 25%, was auf eine Beteiligung des Proteins am „cell-to-cell spread“ schließen lässt (Stenke, 2006).

Das UL43-Fusionsprotein wird als Bestandteil der Virushülle in extrazelluläre Virionen inkorporiert. Da die sekundäre Umhüllung der Viruspartikel im Bereich des TGN stattfindet, ließe sich so die Assoziation des UL43-Fusionsproteins mit diesem Zell-Kompartiment erklären (Stenke, 2006). Andererseits dient das TGN innerhalb der Zelle als Sortierungsstation, von der aus neu synthetisierte zelluläre und auch virale Proteine, in

Vesikel verpackt, zielgerichtet versandt werden. Es wäre daher denkbar, dass das UL43-Fusionsprotein zunächst im TGN lokalisiert ist, um anschließend von dort zur Membran gesandt zu werden. Zur tatsächlichen Funktion des pUL43 ist allerdings noch nichts bekannt; es scheint eher eine Funktion *in vivo* als *in vitro* zu haben. Da eine frühe Expression typisch für Immunevasionsproteine ist, wäre für das pUL43 als „early“-Protein eine Funktion im Rahmen der Immunmodulation von EHV-1 denkbar. Die nachgewiesenen Lokalisationen lassen die Hypothese zu, dass das UL43p möglicherweise zwischen Golgi-Apparat und der Zellmembran zirkulieren könnte und dabei MHC I-/II-Moleküle von der Zelloberfläche zum TGN transportieren könnte, wie auch für das UL11p gemutmaßt wird. Die Untersuchung dieser Hypothesen stellte eines der Ziele der vorliegenden Arbeit dar.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Material

3.1.1 Zellen

- Rk13 (Kaninchennierenzellen, Zelllinie) ab der 30. Passage
- E-Derm (NBL-6) CCL-57 (equine dermale Zelllinie) ab der 22. Passage
- EEL (equine embryonale Lungenzellen, primäre Zelllinie) ab der 10. Passage
- 51D3 (UL11p-exprimierende Rk13) ab der 35. Passage (Schimmer, 2002)
- Rk-gN („786 / 41“) (gN-exprimierende Rk13-Zellen) ab der 3. Hauspassage
(zur Verfügung gestellt von J. Rudolph und N. Osterrieder)
- ETCC („equine transitional carcinoma cells“) ab der 5. Hauspassage

3.1.2 Bakterien und Plasmide

3.1.2.1 Bakterien

- E. coli-Stamm DH5 α F' (Fa. Gibco BRL, Eggenstein)

3.1.2.2 Plasmide

- pcDNA 3.1/Myc-HIS(+)C (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
- pt43 (UL43-ptZ18R) (Stenke, 2006)

3.1.3 Antikörper und Antiseren

(Gebrauchsverdünnungen jeweils in PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+})

3.1.3.1 Monoklonale Antikörper (MAk)

- Anti-Glykoprotein B (gB):
4B6 1:10 (FACS), 1:20 (IIF) (Meyer und Hübert, 1988)
- Anti-Glykoprotein C (gC):
2A2 1:10 (FACS), 1:5 (IIF) (Meyer und Hübert, 1988)
- Anti-Glykoprotein D (gD):
20C4 1:2000 (FACS), 1:500 (IIF) (Allen und Yeargan, 1987)
- Anti-Glykoprotein 2 (gp2):
3B12 1:10 (FACS), 1:2 (IIF) (Meyer und Hübert, 1988)
- Anti-C-myc mouse monoclonal Antibody (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim)
1:400 (IIF, Western Blot, FACS)
- Mouse Anti Equine MHC Class I (Fa. Serotec, Oxford)
1:50 (FACS, IIF)
- Mouse Anti Equine MHC Class II (Fa. Serotec, Oxford)
1:10 (FACS, IIF)
- PT85A (mouse anti MHC I) (Fa. VMRD, Pullman)
1:400 (FACS, IIF) bzw. 1:800 (FACS PBMCs)
- H58A (mouse anti MHC I) (Fa. VMRD, Pullman)
1:800 (FACS, IIF) bzw. 1:1200 (FACS PBMCs)
- EqT2 (mouse anti equine MHC II) (Fa. VMRD, Pullman)
1:400 (FACS)
- H42A (mouse anti MHC II) (Fa. VMRD, Pullman)
1:400 (FACS)

- WB 103/ 105 (Antibody to Pestiviruses) (Fa. CCPro, Oberdorla)
1:500 (FACS)

3.1.3.2 Polyklonale Antikörper

- anti-Glykoprotein M-Kaninchenserum (gM) (Seyboldt, 2000)
1:2000 (FACS), 1:1000 (IIF)
- anti-UL11-Kaninchenserum (Schimmer, 2002)
1:200 (FACS), 1:100 (IIF)
- anti-UL34-Kaninchenserum (Neubauer et al., 2002)
1:2000 (FACS), 1 :1000 (IIF)

3.1.3.3 Mit « Alexa » konjugierte Antikörper

- anti-mouse «Alexa» 488 nm (1 :1000) (Fa. Molecular Probes, Göttingen)
- anti-rabbit «Alexa» 488 nm (1 :1000) (Fa. Molecular Probes, Göttingen)

3.1.3.4 Mit Peroxidase (POD) konjugierte Antikörper

- anti-mouse IgG (1:1000) (Fa. Sigma, München)
- anti-rabbit IgG (1:1000) (Fa. Sigma, München)

3.1.4 Puffer, Lösungen und Reagenzien

- **A.** bidest., Aqua bidestillata
- **Acrylamidstammlösung** (Rotiphoresegel 30): gebrauchsfertige, gasstabilisierte, wässrige 30 %ige Acrylamidstammlösung mit 0,8 % Bisacrylamid (Fa. AppliChem, Darmstadt)
- **A.** demin., demineralisiertes Wasser
- **Agarose**, peqGold Universal (Fa. PEQLAB, Erlangen)
0,8 bis 2 % (w/v) in 0,5 x Elektrophoresepuffer TAE
- **Amper**, Ammoniumpersulfat (Fa. AppliChem, Darmstadt)
10 % (w/v)
- **Antibiotika** (als Zusatz zu Zell- oder Bakterienkulturmedien und Nährbodenplatten):
 - Ampicillin, 100 mg/ml (Gebrauchsverdünnung 1:1000) (Fa. AppliChem, Darmstadt)
 - Chloramphenicol, 30 mg/ml in Ethanol (1:1000) (Fa. Sigma, München)
 - Geneticin, Geneticindisulfat (G418)-Lösung, 50 mg/ml (1:100) (Fa. Roth, Karlsruhe)
 - Kanamycin, 50 mg/ml (1:1000) (Fa. AppliChem, Darmstadt)
 - Penicillin, 119,8 mg/ml (1:2000) (Fa. Grünenthal, Aachen)
 - Streptomycin, 200 mg/ml in (1:2000) (Fa. Sanavita, Werne)
- **Arabinose** (Fa. Sigma, München)
- **Bacto Agar** (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg)
- **Bacto Trypton** (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg)
- **BCA-Proteinbestimmungskit** (Fa. Pierce, Illinois)
- **Blocking-Puffer** für indirekte Immunfluoreszenz (IIF)
PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} mit 3 % FKS (v/v)
- **Blocking-Puffer** für Western Blot
PBS-T mit 10 % Magermilchpulver (w/v)

- **Bromphenolblau** (Fa. Merck, Darmstadt)
- **BSA** (Bovines Serumalbumin) (Fa. New England Biolabs, Frankfurt a.M.)
- **BSE-Puffer**, 10 x

0,25 %	Bromphenolblau (w/v)
70 mM	EDTA, pH 8,0
5 %	SDS (w/v)
50 %	Sucrose (w/v)
- **CaCl₂**, Calciumchlorid (Fa. Merck, Darmstadt)
- **Chlorophorm** (Fa. AppliChem, Darmstadt)
- **Dabco** (Fa. Sigma, München)
- **Digitonin** (Fa. Sigma, München)

0,01 %ig in PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺
--
- **DMF** (Dimethylformamid) (Fa. Sigma, München)
- **DMSO**, Dimethylsulfoxid (Fa. Roth, Karlsruhe)
- **ECL plus Western Blotting Detection System** (Fa. Amersham, Freiburg)
- **EDTA**, Ethylendiamintetraacetat (Fa. ICN Biomedicals, Ohio)
- **Eisessig** (Fa. Roth, Karlsruhe)
- **Elektrophoresepuffer für Agarosegele**, 50 x TAE, pH 7,8

0,25 M	Na-Acetat
2 M	Tris
	mit Eisessig auf pH 7,8 eingestellt
- **Elektrophoresepuffer für SDS-PAGE**

193 mM	Glycin
0,1 %	SDS (w/v)
25 mM	Tris
- **Ethanol absolut** (Fa. neoLab, Heidelberg)
- **Ethidiumbromid** (Fa. Sigma, München)
- **FKS**, fetales Kälberserum (Fa. Biochrom, Berlin)

- **Formaldehyd** (Fa. Merck, Darmstadt)
- **Formamid** (Fa. neoLab, Heidelberg)
- **Giemsa** (Azur-Eosin-Methylenblau-Lösung) (Fa. Merck, Darmstadt)
- **Giemsa-Färbelösung**
 - 1 ml Phosphatpufferlösung nach Weise
 - 50 µl Giemsa-Stammlösung
- **Glucose** (Fa. Merck, Darmstadt)
- **L-Glutamine**, γ -bestrahlt (200 mM) (Fa. Sigma, München)
- **Glycerin** (Fa. Roth, Karlsruhe)
- **Glycin** (Fa. AppliChem, Darmstadt)
- **Hanks' Modified Eagle's Medium**
 - 5,3 g/l Hanks' Medium (Fa. Sigma, München)
 - 4,8 g/l Earle's Medium (Fa. Sigma, München)
 - 120 mg/l Pyruvic Acid (Fa. Sigma, München)
 - mit NaHCO_3 auf pH 7,6-7,8 eingestellt
- **Harnstoff** (Fa. AppliChem, Darmstadt)
- **HCl**, Salzsäure (Fa. Merck, Darmstadt)
- **Hefeextrakt**, granuliert (Fa. Merck, Darmstadt)
- **Histopaque[®] 1077** (Dichte 1,077) (Fa. Sigma, München)
- **HMFM**, Hogness' modified freezing medium
 - 4 % Glycerin (v/v)
 - 3,6 mM K_2HPO_4
 - 1,6 mM KH_2PO_4
 - 1 mM Magnesiumsulfat
 - 2 mM Natriumcitrat
- **IAC**, Isoamylchloroform
 - 24 Teile Chloroform
 - 1 Teil Isoamylalkohol

- IFN- γ (rekombinantes equines Interferon-gamma) (Fa. RnD Systems, Wiesbaden)
(Gebrauchsverdünnung 1:1000)
- Isoamylalkohol (Fa. Merck, Darmstadt)
- Isopropanol (Fa. neoLab, Heidelberg)
- Kaliumacetat (Fa. Roth, Karlsruhe)
- kb-Leiter, 100 bp, 1 kb, 12 kb und 2-Log (Fa. New England Biolabs, Frankfurt a. M.)
- KCl, Kaliumchlorid (Fa. Merck, Darmstadt)
- KHCO_3 , Kaliumhydrogencarbonat (Fa. Merck, Darmstadt)
- K_2HPO_4 , Kaliumhydrogenphosphat (Fa. Merck, Darmstadt)
- KH_2PO_4 , Kaliumdihydrogenphosphat (Fa. Merck, Darmstadt)
- Kodak GBX Entwickler (Fa. Sigma, München)
- Kodak GBX Fixierer (Fa. Sigma, München)
- Kristallviolett (Fa. Merck, Darmstadt)
- Kristallviolett-Färbelösung nach Witte

85 ml	Ethanol, absolut
250 ml	Formaldehyd
15 g	Kristallviolett
	mit A. demin. auf 1000 ml
- LB-Medium, Luria-Bertoni-Medium, pH 7,2

10 g/l	Bacto Trypton
5 g/l	Hefeextrakt, granuliert
5 g/l	NaCl
	mit 1 N NaOH auf pH 7,2
- LB-Nährbodenplatten

1,5 %	Bacto Agar in LB-Medium
-------	-------------------------
- LiCl, Lithiumchlorid 4M (Fa. Merck, Darmstadt)
- Lipofectin® Reagent (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)

- **Lysis-Puffer für Durchflusszytometrie**
 - 8,29 g NH_4Cl
 - 1 g KHCO_3
 - 0,372 g Na_2EDTA
 - mit A. demin. auf 1000 ml
- **Lysozym** (Fa. Boehringer, Mannheim)
- **Magermilchpulver** (Fa. AppliChem, Darmstadt)
- **MBS**, Morpholinoethansulfonsäure Buffered Saline, pH 6,5
 - 25 mM MES
 - 150 mM NaCl
- **2-Mercaptoethanol** (Fa. Sigma, München)
- **MES** (Morpholinoethansulfonsäure) (Fa. Merck, Darmstadt)
- **Methanol absolut** (Fa. Merck, Darmstadt)
- **Methylcellulose** (Viscosity 4000 cP) (Fa. Sigma, München)
 - 25 g auf 1000 ml A. demin.
- **MgCl_2** , Magnesiumchlorid (Fa. Merck, Darmstadt)
- **MgSO_4** , Magnesiumsulfat (Fa. Merck, Darmstadt)
- **MnCl_2** , Manganchlorid (Fa. Merck, Darmstadt)
- **Molekulargewichtsmarker**, vorgefärbt (Fa. New England Biolabs, Frankfurt a.M.)
- **Molekulargewichtsmarker**, Precision Prestained Broad Range (Fa. BioRad, München)
- **Na-Acetat** (Fa. Roth, Karlsruhe)
- **Na_2EDTA** , Ethylendiamintetraacetat-Natriumsalz (Fa. Sigma, München)
- **Natriumazid**, NaN_3 2 % (Fa. Sigma, München)
- **Na-Citrat** (Fa. Merck, Darmstadt)
- **NaCl**, Natriumchlorid (Fa. Merck, Darmstadt)
- **Natriumdesoxycholat** (Fa. Merck, Darmstadt)
- **NaHCO_3** , Natriumhydrogencarbonat 8,8 % (Fa. Merck, Darmstadt)
- **NaH_2PO_4** , Natriumdihydrogenphosphat (Fa. Merck, Darmstadt)

- **Na₂HPO₄**, Dinatriumhydrogenphosphat (Fa. Merck, Darmstadt)
- **NaOH**, Natronlauge (Fa. Merck, Darmstadt)
- **NEA**, nicht-essentielle Aminosäuren (Fa. Biochrom, Berlin)
- **NH₃Cl**, Ammoniumchlorid (Fa. Roth, Karlsruhe)
- **N-Lauroyl-Sarkosin**, Na-Salz, 30 % (w/v) (Fa. Sigma, München)
- **NP-40** (Nonidet P-40) (Fa. Sigma, München)
- **PBS**, Phosphate Buffered Saline, pH 7,4

0,1 g	CaCl ₂
0,2 g	KCl
0,2 g	KH ₂ PO ₄
0,1 g	MgCl ₂
8,0 g	NaCl
1,12 g	Na ₂ HPO ₄

mit A. demin. auf 1000 ml
- **PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺** (wie PBS, ohne CaCl₂ und MgCl₂)
- **PBS-T** (PBS ohne Ca⁺ und Mg²⁺ mit 0,5 ml/l Tween 20)
- **PerFectin™** Transfektionsreagenz (Fa. Gene Therapy Systems, San Diego)
- **peqGold PCR Hot Start-Mix „Real Time“** (Fa. PeqLab, Erlangen)
- **PFA**, Paraformaldehyd (4 %ige Stammlösung)

96 ml	PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺
4 g	Paraformaldehyd (Fa. Roth, Karlsruhe)
- **PFA für IIF**, 2 %
- **Phenol** (Fa. AppliChem, Darmstadt)
- **Phenolrot**, 0,1% (w/v) (Fa. Merck, Darmstadt)
- **Phosphatpufferlösung nach Weise**

0,285 g	Na ₂ HPO ₄
0,1225 g	KH ₂ PO ₄

in 250 ml A. demin.

- **Probenpuffer für SDS-PAGE (4x)**

2,5 ml	A. dest.
0,1 ml	Bromphenolblau 5 % (w/v)
1 ml	Glycerin
0,4 ml	2-Mercaptoethanol
4 ml	SDS 20 % (w/v)
0,5 ml	Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8
- **PI, Propidiumjodid (10^{-6} molar)** (Fa. Sigma, München)
- **Protease inhibitor cocktail** (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim)
- **Proteinase K** (Fa. AppliChem, Darmstadt)

10 mg	in 1 ml TE-Puffer, pH 8,0
-------	---------------------------
- **Pyruvic Acid** (Fa. Sigma, München)
- **QIAEX[®] II Gel Extraction Kit (150)** (Fa. Qiagen, Hilden)
- **QIAGEN[®] Plasmid Midi Kit (100)** (Fa. Qiagen, Hilden)
- **RbCl₂** , Rubidiumchlorid (Fa. Sigma, München)
- **ReddyMix[™] PCR Master Mix, pre-aliquoted** (Fa. ABgene, Uk)
- **Restriktionsendonukleasen** (Fa. MBI, St. Leon-Roth; Fa. New England Biolabs, Frankfurt a.M.; Fa. Roche Diagnostics, Mannheim)
- **Ripa-Lysispuffer für Western Blot**

150 mM	NaCl
0,5 %	Natriumdesoxycholat (w/v)
1 %	NP-40 (v/v)
0,1 %	SDS (w/v)
50 mM	Tris-HCl, pH 8,0

+ Protease inhibitor cocktail nach Anleitung des Herstellers
- **RNAse A, Ribonuklease A** (Fa. Macherey-Nagel, Düren)

100 mg	in 1 ml TE-Puffer, pH 8,0
--------	---------------------------

- **RPMI-1640 Medium** (Fa. Sigma, München)
- **Saline**

1 g	Glucose
3 mM	KCl
1,5 mM	KH ₂ PO ₄
140 mM	NaCl
10 mM	Na ₂ HPO ₄
10 ml	Phenolrot 0,1 % (w/v)
	mit A. demin. auf 100 ml
- **Sarkosylpuffer**

25 mM	EDTA
10 %	N-Lauroyl-Sarkosin(w/v)
75 mM	Tris-HCl, pH 8,0
- **SDS**, Natrium-Dodecylsulfat 20 % (w/v) (Fa. AppliChem, Darmstadt)
- **SOB-Medium**

2 %	Bacto Trypton
0,5 %	Hefeextrakt
2,5 mM	KCl
10 mM	MgCl ₂
10 mM	MgSO ₄
10 mM	NaCl
- **SOG-Medium**

SOB-Medium mit 1 % Glucose
- **STET-Puffer**

1 mM	EDTA, pH 8,0
0,1 M	NaCl
10 mM	Tris-HCl, pH 8,0
0,5 %	Triton X-100 (v/v)

- **STV**, Saline-Trypsin-Versene-Lösung

100 ml	Saline
50 ml	Trypsin 1,25 % (w/v)
25 ml	Versene
10 ml	NaHCO ₃ 8,8 %
- **Sucrose** (Fa. Merck, Darmstadt)

30 % (w/v)	in PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺
30 % (w/v)	in MES
	+ 0,5 mM EDTA
- **T4-DNA-Ligase** mit 10x Ligasepuffer (Fa. MBI, St. Leon-Roth)
- **TEMED**, Tetramethylethyldiamin (Fa. Merck, Darmstadt)
- **TEN-Puffer**

1 mM	EDTA
150 mM	NaCl
20 mM	Tris-HCl, pH 7,4
- **TE-Puffer**

1 mM	EDTA
10 mM	Tris-HCl pH 8,0
- **TE + RNase:**

50 µg/ml	RNase A
	in TE-Puffer
- **TFB-I-Puffer**

10 mM	CaCl ₂
15 %	Glycerin (v/v)
30 mM	Kaliumacetat
50 mM	MnCl ₂
100 mM	RbCl ₂
	mit NaOH auf pH 5,8

- **TFB-II-Puffer**

75 mM	CaCl ₂
15 %	Glycerin (v/v)
10 mM	MOPS, pH 7,0
10 mM	RbCl ₂
- **Towbin-Puffer, pH 8,3**

193 mM	Glycin
20 %	Methanol (v/v)
25 mM	Tris
- **Tris, Tris(hydroxymethyl)aminomethan** (Fa. AppliChem, Darmstadt)
- **Tris-Puffer für SDS-PAGE-Sammelgel**

0,5 M	Tris-HCl, pH 6,8
-------	------------------
- **Tris-Puffer für SDS-PAGE-Trenngel**

1,5 M	Tris-HCl, pH 8,8
-------	------------------
- **Triton X-100** (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim)
- **Trypsin** (Fa. Serva, Heidelberg)
- **Trypanblau** (Fa. Sigma, München)
- **Tween 20, Polyoxyethylensorbitan** (Fa. BioRad, München)
- **Versene**

3 mM	KCl
1,5 mM	KH ₂ PO ₄
140 mM	NaCl
10 mM	Na ₂ HPO ₄
- **Wizard® Genomic DNA Purification Kit** (Fa. Promega, USA)

3.1.5 Geräte, Laborhilfsmittel und Verbrauchsmaterialien

- **Brutschrank HERAcell 240** (Fa. Heraeus, Hanau)
- **Brutschrank Galaxy S** (Fa. Nunc, Wiesbaden)
- **Chromatographiepapier 3 MM** (Fa. Whatman, Dassel)
- **CL-XPosure™ Filme** (Fa. Pierce, Illinois)
- **Confocales Laser Scanning-Mikroskop Zeiss 510** (Fa. Zeiss, Jena)
- **Elektrophoresekammer Mupid-21** (Fa. Cosmo Bio Co., Tokio)
- **Elektrophoresekammer für PAGE-Gele: Mini-Protean II** (Fa. BioRad, München)
- **Elektrophoretische Transferkammer: Mini-Transblot II** (Fa. BioRad, München)
- **Eppendorf Reaktionsgefäß, 1,5 ml und 2 ml** (Fa. Eppendorf, Hamburg)
- **FACScan Durchflusszytometer** (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg)
- **Fuchs-Rosenthal-Kammer zur Zellzählung** (Fa. Superior, Lauda-Königshofen)
- **Horizontalelektrophoresekammer** (Fa. Biometra, Göttingen)
- **Incubator Shaker C24** (Fa. New Brunswick Scientific, Nürtingen)
- **Kryoröhrchen CryoTube™ Vials, 2ml** (Fa. Nunc, Wiesbaden)
- **MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plates** (Fa. Applied Biosystems, UK)
- **Mikroskop** (Fa. Leitz, Wetzlar)
- **Mikroskop für IIF**
 - Axioskop 2 (Fa. Zeiss, Jena)
 - Axiovert 25 (Fa. Zeiss, Jena)
- **Nitrocellulose Hybond-C** (Fa. Amersham, UK)
- **Nitrocellulose Protran BA 83**
 - Schleicher & Schuell (Fa. Whatman, Dassel)
- **pH-Meter** (Fa. VWR, Wien)
- **Photometer Uvikon xs** (Fa. Bio-Tek, Bad Friedrichshall)
- **Pipetboy comfort** (Fa. Integra Biosciences, Fernwald)
- **Pipetten** (Fa. Abimed, Langenfeld)

- **Power Supply Power Pac 300** (Fa. BioRad, München)
- **Präzisionswaage Navigator™** (Fa. Ohaus, Giessen)
- **PVDF, Polyvinylidenfluorid Transfermembran Hybond™-P** (Fa. Amersham, UK)
- **Real-Time PCR System Mx3000P™** (Fa. Stratagene, Amsterdam)
- **Rührplattform IKA Combimag RCH** (Fa. IKA, Staufen)
- **Schüttler KS250 basic** (Fa. IKA, Staufen)
- **Sicherheitswerkbank HERAsafe** (Fa. Heraeus, Hanau)
- **Thermomixer compact** (Fa. Eppendorf, Hamburg)
- **Vortex-Genie™** (Fa. Bachofer, Reutlingen)
- **Wasserbad WB 22** (Fa. Memmert, Schwabach)
- **Zellkulturplastikwaren**
 - Zellkulturflaschen (175 cm², 75 cm² und 25 cm²) (Fa. Nunc, Wiesbaden)
 - 6-, 24- und 96-Loch-Platten (Fa. Nunc, Wiesbaden)
- **Zellschaber** (Fa. Nunc, Wiesbaden)
- **Zentrifugen**
 - Capsulefuge PMC-060 (Fa. Tomy Kogyo Co., Tokio)
 - Kühlzentrifuge Heraeus Sepatech Suprafuge 22 (Fa. Heraeus, Hanau)
 - Rotor HFA 12.500 (Fa. Heraeus, Hanau)
 - Rotor Sorvall SS-34 (Fa. DuPont Sorvall, Bad Homburg)
 - Kühlzentrifuge Sigma 4K10 (Fa. Sigma, München)
 - Kühlzentrifuge Sigma 1-15K (Fa. Sigma, München)
 - Kühlzentrifuge Sigma 202MK (Fa. Sigma, München)
 - Stock-Zentrifuge (Fa. Stock, Marburg)
 - Ultrazentrifuge Optima™ LE-80K (Fa. Beckman, Krefeld)
 - Rotor SW 28
 - Rotor SW 40
 - Zentrifuge Sigma 3-16 (Fa. Sigma, München)

3.2. Methoden

3.2.1 Zellen

3.2.1.1 Zellkultur

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Zelllinien E-Derm NBL-6, Rk13, EEL und ETCC, außerdem die rekombinanten Zelllinien 51D3 und Rk-gN verwendet. 51D3-Zellen exprimieren das EHV-1-UL11-Protein als C-myc-Fusionsprotein, Rk-gN-Zellen das EHV-1-UL49.5-Genprodukt. Sämtliche Zelllinien wurden in Hanks' Modified Eagle's Medium mit 5 % fetalem Kälberserum (FKS) kultiviert. NBL-6 sowie EEL erhielten Zusätze von 10 % FKS, 1 % nicht-essentieller Aminosäuren (NEA) und 1 % L-Glutamin. Die Inkubation erfolgte in Plastikzellkulturflaschen bzw. -platten bei 37°C in feuchter Atmosphäre mit einem CO₂-Gehalt von 5 %.

Zur Passagierung wurden die Zellen zunächst mit Saline-Trysin-Versene-Lösung (STV) abgelöst, anschließend in frischem Medium resuspendiert bzw. je nach Bedarf zum Teil verworfen oder auf weitere Zellkulturflaschen bzw. -platten verteilt.

Isolierte Leukozyten („peripheral blood mononuclear cells“, PBMCs) konnten in Suspension einige Tage bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert werden. Dazu wurden die mittels Dichtezentrifugation gewonnenen Zellen (Pkt. 3.2.1.3) in RPMI-1640 Medium mit 2 % FKS, 1% NEA sowie 0,05 % Penicillin bzw. Streptomycin und 0,005 % Mercaptoethanol resuspendiert.

3.2.1.2 Kryokonservierung von Zellen

Um die Zellen längerfristig aufzubewahren, wurden ca. 1×10^7 am Vortag passagierte Zellen mit STV abgelöst und 10 Min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Medium mit 10 % FKS und 10 % DMSO resuspendiert und die Zellsuspension auf 4-5 Kryoröhrchen

verteilt. Zum Abkühlen wurden die Röhrchen 4 Stunden bei 4°C aufbewahrt und anschließend bei -70°C tiefgefroren. Eine langfristige Lagerung erfolgte bei -120°C.

3.2.1.3 Isolierung von PBMCs mittels Dichtezentrifugation

Die Isolierung der PBMCs erfolgte durch Dichtezentrifugation mittels Histopaque® 1077. Dazu wurden die Zellen aus frisch gewonnenem und 2:3 mit PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} verdünntem EDTA-Blut in 15 ml-Probenröhrchen nach Herstelleranleitung isoliert, in RPMI-1640 Medium mit den entsprechenden Zusätzen aufgenommen und nach Zellzählung (Pkt. 3.2.1.5) entweder auf 6-Loch-Platten oder auf 15 ml-Probenröhrchen verteilt. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C unter CO_2 -Atmosphäre.

3.2.1.4 Giemsa-Färbung von PBMCs

Zur Differenzierung der mittels Dichtezentrifugation isolierten PBMCs wurden diese Giemsa-gefärbt und unter dem Mikroskop betrachtet. Dazu wurde ein Tropfen der in RPMI-Medium resuspendierten Zellen auf einem Objektträger ausgestrichen und luftgetrocknet. Nach fünfminütiger Fixation in Methanol wurde dieser abpipettiert und Alkoholreste verdampfen lassen, um Zellverluste gering zu halten.

Die Präparate wurden für 15 Minuten mit je 500 µl Giemsa-Färbelösung bedeckt, anschließend vorsichtig mit A. demin. abgespült und in Schräglage getrocknet. Die Betrachtung und Dokumentation erfolgte mit Ölimmersion unter 40 facher Vergrößerung.

3.2.1.5 Zellzählung mittels Fuchs-Rosenthal-Kammer („Lebend-tot-Färbung“)

Um bei unterschiedlichen Experimenten die Zellen mit vergleichbarer „multiplicity of infection“ (MOI) infizieren zu können, wurde die Anzahl der Zellen pro Zellflasche oder 6-Loch-Platte mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt. Hierzu wurde eine 1:4 Verdünnung

der mit STV abgelösten Zellen hergestellt, diese mit Trypanblau (1:20) gefärbt und in die Kammer pipettiert. Unter Berücksichtigung nur der ungefärbten, vitalen Zellen wurden mindestens 4 Quadrate unter dem Mikroskop ausgezählt. Durch Multiplizieren des daraus errechneten Mittelwertes mit dem Verdünnungsfaktor sowie einem Faktor von 10^4 , der sich aus dem Volumen der Kammer berechnet, wurde die Gesamtzellzahl bestimmt.

3.2.1.6 Transfektion eukaryotischer Zellen mit Lipofectin® oder PerFectin™

Um eine Expression von Fremdgenen durch eukaryotische Zellen zu erreichen, kann mit Hilfe von Transfektionsreagenzien wie Lipofectin® oder PerFectin™ die entsprechend kodierende DNS in die Zellen eingeschleust werden. Dazu wurde der nach Herstelleranleitung vorbereitete Transfektionsansatz auf etwa vier Stunden vorher in 6-Loch-Platten eingesäte, ca. 70 % konfluente Rk13-Zellen gegeben. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C unter CO₂-Atmosphäre wurde das Transfektionsmedium durch Hanks' Modified Eagle's Medium mit 10 % FKS ersetzt.

3.2.1.7 Stabile Transfektion von Zellen zur Herstellung rekombinanter Zelllinien

Für eine stabile Expression von Fremdgenen durch eukaryotische Zellen ist eine Integration der Fremd-DNS in das Wirtszellgenom erforderlich. Da es nach einer Transfektion nur selten zu einer derartigen Integration kommt, ist es nötig, auf dieses Ereignis zu selektieren. Hierzu wurden die Zellen mit einem Plasmid transfiziert, das neben dem gewünschten DNS-Abschnitt ein Resistenzgen enthält, dessen Genprodukt Aminoglycosid-Antibiotika durch Dephosphorylierung inaktiviert.

Nach Inkubation über Nacht wurde der Transfektionsüberstand durch ein Gemisch aus 50 % 2 Tage altem Zellkulturüberstand und 50 % frischem Medium mit 10 % FKS ersetzt. Durch Zugabe von 0,5 mg/ml Geneticin zum Zellkulturmedium, welches alle 2 Tage erneuert wurde, konnte auf stabil transfizierte Zellen selektiert werden. Die Expression des gewünschten

Fremdgens wurde durch IIF nachgewiesen. Um die Fremdgenexpression aufrechtzuerhalten, wurden weiterhin nach jeder fünften Zellpassage 0,5 mg/ml Geneticin ins Zellkulturmedium gegeben.

3.2.2 Virus

3.2.2.1 Verwendete Virusstämme

Gearbeitet wurde mit verschiedenen Passagestufen des EHV-1-Stammes Rac, der über serielle Passagierung auf embryonalen Schweinenierenzellen (ENS) attenuiert wurde. Der Laborstamm RacL11 stellt ein Plaqueisolat der 12. Passage dar und ist sowohl für den natürlichen Wirt als auch für Labortiere virulent, während der auch als Impfstamm verwendete RacH der 256. Passage entspricht und avirulent ist (Mayr et al., 1968; Hübert et al., 1996). Desweiteren wurden Mutanten der genannten Laborstämme verwendet, die jeweils Deletionen eines offenen Leserahmens der U_L-Region tragen:

RacL11 Δ 11 (Schimmer, 2002) (Vermehrung auf 51D3-Zellen)

RacL11 Δ 43 (Stenke, 2006)

RacH Δ 43 (Stenke, 2006)

RacL11 Δ 49.5 (zur Verfügung gestellt von J. Rudolph und N. Osterrieder) (Vermehrung auf Rk-gN-Zellen)

Zudem wurde mit den Feldisolaten EHV-1 O834 (Isolat eines neurologischen Falls, 1999) und EHV-1 E216 (Isolat eines Abortfalls, 2006) nach Vermehrung auf NBL-6-Zellen gearbeitet sowie Experimente mit einem EHV-4-Rhinitis isolat (Ziegler et al., 2005) durchgeführt.

3.2.2.2 Vermehrung von Viren in Zellkultur

Zur Virusvermehrung wurden 90-100 % konfluente Rk13-Zellen mit einer MOI von 0,05 bis 0,1 der entsprechenden Virussuspension in Zellkulturmedium infiziert. Nach Auftreten eines cpE von über 80 % wurden die infizierten Zellen zweimal bei -70°C eingefroren und wieder aufgetaut, um intrazelluläre Virionen freizusetzen. Durch zehnminütige Zentrifugation bei 1000 rpm wurden die zellulären Bestandteile vom virushaltigen Überstand getrennt und dieser anschließend portioniert bei -70°C gelagert.

3.2.2.3 Virustitration

Um den Titer der gewonnenen Virus-Stocks zu bestimmen, wurden Verdünnungen von 10^{-1} bis 10^{-6} hergestellt und diese im Doppelansatz à 1000 µl auf 100 % konfluente Rk13-Zellen in 24-Loch-Platten einen Tag nach Subkultivierung gegeben. Nach 90 minütiger Inkubation bei 37°C wurden die Virusverdünnungen abpipettiert und die Zellen mit Methylcellulose überschichtet. Die sich bildenden Plaques konnten nach 3 bis 5 Tagen in je 4 Löchern ausgezählt und der Titer pro ml berechnet werden.

3.2.2.4 Infektion von Zellen in Zellkultur

Um für IIF- oder Western Blot-Analysen infizierter Zellen eine möglichst zeitgleiche Infektion aller Zellen einer Versuchsgruppe zu gewährleisten, wurden Zellkultur-Zellen vorgekühlt infiziert und zur Adsorption des Virus zunächst 90 Minuten bei 4°C inkubiert. Zur Entfernung nicht gebundener Viruspartikel wurde der virushaltige Überstand nachfolgend abpipettiert und die Zellen einmal mit Zellkulturmedium gewaschen. Nach Zugabe von frischem Zellkulturmedium begann die eigentliche Inkubationszeit bei 37°C (Zeitpunkt 0).

3.2.2.5 Infektion von PBMCs

Die isolierten und in Zellkulturmedium resuspendierten Blutzellen wurden zur Infektion in 15ml-Probenröhrchen gegeben, die, um einen Gasaustausch zu ermöglichen, locker mit Alufolie-Kappen verschlossen wurden. Je nach Experiment wurden die Zellen nach Zugabe des Virus entweder sofort bei 37°C inkubiert, wobei das Virus im Medium belassen wurde. Für andere Experimente wurden die Zellen zur Virusadsorption zunächst für 90 Minuten bei 4°C unter zeitweiligem Schwenken inkubiert und anschließend bei 4°C pelletiert. Zum Entfernen nicht gebundener Viruspartikel wurde das Zellpellet in RPMI-Medium resuspendiert und erneut pelletiert. Nach Resuspension der Zellen in 2 ml eines frischen Mediums wurden diese bei 37°C und 5 % CO₂ bis zur gewünschten Zeit p.i. inkubiert.

3.2.3 DNS

3.2.3.1 Präparation viraler DNS

Zur Gewinnung von viraler DNS wurden etwa 6×10^6 Zellen in Zellkulturflaschen mit einer MOI von ca. 0,1 des jeweiligen Virus infiziert und nach Auftreten von 100 % cpE 12 Stunden weiterinkubiert. Die Virussuspension wurde für 90 Minuten bei 25 000 rpm und 4°C abzentrifugiert (Ultrazentrifuge Optima™ LE-80K, Rotor SW40), das Pellet in 300 µl TEN-Puffer resuspendiert und nach Zugabe von 150 µl Sarkosylpuffer 15 Minuten bei 65°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch mit 1 µl RNase A (100 mg/ml) versetzt und 30 Minuten bei 37°C weiterinkubiert. Zur Zerstörung zellulärer und viraler Proteine wurden 50 µl Proteinase K in einer Konzentration von 10 mg/ml zugegeben und mindestens 3 Stunden bei 56°C, nachfolgend über Nacht bei 37°C inkubiert.

Mittels Phenolextraktion können Protein- und Lipidkomponenten von der DNS getrennt werden. Dazu wurde der Ansatz auf Eis mit 500 µl Phenol versetzt, zum Erreichen einer

vollständigen Durchmischung 100 mal geschwenkt und anschließend für 20 Minuten auf Eis belassen. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 8000 rpm und 4°C wurde der DNS-haltige Überstand abgenommen und erneut mit Phenol ausgeschwenkt.

Zur Entfernung von Phenolresten wurde der nun gewonnene Überstand zweimal mit IAC gewaschen. Dazu wurde gleiches Volumen wie Probenvolumen IAC zum Überstand gegeben und 100 Mal geschwenkt. Nach zehnminütiger Phasentrennung auf Eis wurde der Ansatz kurz zentrifugiert und der Waschvorgang mit dem gewonnenen Überstand wiederholt. Die Virus-DNS konnte in Folge aus dem Überstand mit eiskaltem absolutem Ethanol (doppeltes Probenvolumen) mit einem Zusatz von 4 M Lithiumchlorid (LiCl) (1/10 des Probenvolumens) durch Schwenken und anschließendes Tiefgefrieren bei -70°C (20 Minuten) ausgefällt werden. Durch 20 minütige Zentrifugation bei 13 000 rpm und 4°C wurde die ausgefällte DNS pelletiert. Um eventuell vorhandene Salzreste zu entfernen, wurde das DNS-Pellet zweimal mit je 200 µl 70 %igem, eiskaltem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 20 µl TE-Puffer oder A. demin. aufgenommen.

3.2.3.2 DNS-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Konzentration isolierter, in A. demin. gelöster DNS erfolgte durch photometrische Messung bei 280 nm. Aus der gemessenen Extinktion wurde der DNS-Gehalt in Mikrogramm pro Milliliter berechnet, wobei eine Extinktionseinheit einem DNS-Gehalt von 50 µg/ml entspricht.

3.2.3.3 Spaltung der DNS durch Restriktionsendonukleasen

Eine Spaltung von viraler, Plasmid- oder BAC-DNS wurde durch deren Verdau mit Restriktionsenzymen erreicht. Dazu wurde die DNS mit 5 bis 10 Units Enzym pro µg im vom Hersteller mitgelieferten Puffer für 1-2 Stunden (Plasmid-DNS) bzw. 3 Stunden (virale DNS) bei 37°C inkubiert und die Enzyme anschließend hitzeinaktiviert. Eine Auftrennung der

entstandenen DNS-Fragmente erfolgte je nach erwarteter Fragmentgröße in 0,8 bis 2 %igen Agarosegelen bei einer Gleichspannung von 50 bis 100 V. Durch Färbung der Gele mit Ethidiumbromid wurden die DNS-Banden im UV-Licht (302 nm) sichtbar gemacht.

3.2.3.4 Aufreinigung von DNS aus einem Agarosegel

Zur Aufreinigung nach Restriktionsenzymverdau oder PCR erhaltener DNS-Abschnitte wurden die gewünschten Banden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mittels „QIAEX-II Gel-Extraction-Kit“ nach Herstelleranleitung extrahiert. Nachfolgend wurde die DNS in 10 mM Tris pH 8 oder A. demin. aufgenommen und bei -20°C gelagert.

3.2.3.5 Ligation von DNS-Fragmenten

Die Insertion eines DNS-Fragments in ein Plasmid erfolgte mit Hilfe der T4-DNS-Ligase (SAMBROOK und RUSSEL, 2001). Diese verbindet unter ATP-Verbrauch komplementäre 5'-Phosphat- und 3'-OH-Enden linearer DNS-Fragmente. Um zueinander passende Enden zu erhalten, wurden Plasmid und Insert mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten. Nach Auftrennung im Agarosegel und Reinigung der DNS wurden Plasmid und Insert im Verhältnis 1:4 eingesetzt und mit 10 000 U T4-DNS-Ligase pro µg zu ligierender DNS im mitgelieferten Puffer bei 18°C über Nacht inkubiert. Nach 10minütiger Hitzeinaktivierung bei 99°C wurde der Ligationsansatz in kompetente Bakterien transformiert (Pkt. 3.2.3.6) oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

3.2.3.6 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNS

Zur Amplifizierung der Plasmid-DNS wurden kompetente Bakterien mit den rekombinanten Plasmiden transformiert.

Herstellung kompetenter Bakterien

Zur Gewinnung kompetenter Bakterien wurden 100 ml LB-Bouillon mit 1 ml Übernachtskultur des E.coli-Stammes DH5 α F' beimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,5 unter Schütteln inkubiert. Nach 15 minütigem Abkühlen auf Eis wurde die Bakteriensuspension für 5 Minuten bei 3000 rpm und 4°C abzentrifugiert und das entstandene Pellet in 30 ml eiskaltem TFB-I resuspendiert. Nach weiteren 10 Minuten auf Eis wurden die Bakterien erneut abzentrifugiert, das Pellet in 4 ml TFB-II aufgenommen, in Aliquots zu je 60 μ l portioniert und bei -70°C gelagert.

Transformation

Die Bakterien wurden für 1 bis 2 Minuten auf Eis aufgetaut, vorsichtig mit der Hälfte des hitzeinaktivierten Ligationsansatzes vermischt und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Durch Hitzeschock (2 Minuten bei 42°C) und sofortiges Abkühlen auf Eis wurde die Plasmid-DNS in die Bakterien eingeschleust. Nach Zugabe von 200 μ l SOG-Medium wurde die Bakteriensuspension für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend zur Selektion auf transformierte Bakterien auf LB-Nährbodenplatten mit Antibiotika-Zusatz (Pkt. 3.1.4) ausgestrichen, wobei sich die Wahl des Antibiotikums nach dem Resistenzgen des verwendeten Plasmids richtete.

3.2.3.7 Schnellpräparation von Plasmid-DNS aus transformierten Bakterien

Nach Inkubation der Platten über Nacht bei 37°C wurden gewachsene Kolonien mit einer Pipettenspitze gepickt und die Bakterien in 2 ml LB-Bouillon mit entsprechendem Antibiotikazusatz (Pkt. 3.1.4) für 12 bis 16 Stunden bei 37°C unter Schütteln vermehrt.

Je 1,5 ml der Bakteriensuspension wurden für 5 Minuten bei 8000 rpm zentrifugiert, das Pellet in 400 μ l STET-Puffer mit einem Zusatz von 0,67 mg/ml Lysozym resuspendiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Kochen für 45 Sekunden wurden die Bakterien lysiert, die denaturierten Bakterienproteine für 10 Minuten bei 12 000 rpm

abzentrifugiert und das Pellet mit Hilfe einer Pipettenspitze entfernt. Durch Zugabe von 400 µl Isopropanol und 35 µl LiCl (4M) wurde die im Überstand enthaltene Plasmid-DNS durch Schwenken ausgefällt und für 20 Minuten bei 14 000 rpm pelletiert. Das DNS-Pellet wurde zum Entfernen von Salzresten mit 100 µl 70 %igem Ethanol gewaschen, erneut für 10 Minuten zentrifugiert, anschließend bei Raumtemperatur getrocknet und in 20 µl TE-Puffer mit einem Zusatz von RNase A (0,05 mg/ml) aufgenommen. Durch Spaltung der gewonnenen Plasmid-DNS mit Hilfe von Restriktionsenzymen wurden nachfolgend Größe und Orientierung des enthaltenen Inserts überprüft.

3.2.3.8 Präparation größerer Mengen an Plasmid-DNS

Zur Gewinnung größerer Mengen an Plasmid-DNS wurde das „QIAGEN® Midi Kit“ nach Herstelleranleitung verwendet.

3.2.3.9 Konservierung von Bakterien mit Plasmid-DNS

Zur längerfristigen Lagerung der transformierten Bakterien wurden diese in 5 ml LB-Bouillon mit entsprechendem Antibiotikazusatz (Pkt. 3.1.4) über Nacht bei 37°C unter Schütteln vermehrt. Die Bakteriensuspension wurde in 1,5 ml-Portionen für 10 Minuten bei 4°C und 4000 rpm zentrifugiert. Die Bakterienpellets wurden in je 1 ml HMFM-Puffer resuspendiert und bei -70°C gelagert.

3.2.3.10 Quantifizierung von Genomkopien mittels Real-Time PCR

Mit Hilfe einer quantitativen Real-Time PCR ist es möglich, die Anzahl der EHV-1-Genomkopien pro infizierter Zelle zu bestimmen. Dazu wurde die DNS von ca. 2×10^5 infizierten Zellen mit Hilfe des „Wizard® Genomic DNA Purification-Kits“ nach Herstelleranleitung aufgereinigt.

Die Sequenzen der verwendeten Primer waren zum einen spezifisch für Abschnitte des EHV-1-gD-Gens, zum anderen für Sequenzen des equinen $\beta 2m$ -Gens. Bei der Sonde für die EHV-1-gD-Sequenzen handelt es sich um eine „minor-groove-binder-Sonde“ (MGB-Sonde), die den Reporterfarbstoff 6-carboxy-fluorescein (FAM) am 5'-Ende sowie einen Quencherfarbstoff mit MGB-Molekül am 3'-Ende trägt. Die Sonde für das $\beta 2m$ -Gen ist am 5'-Ende mit dem Reporterfarbstoff HEX sowie am 3'-Ende mit einem Quencherfarbstoff mit MGB-Molekül versehen. Die jeweiligen Sequenzen (siehe Tabelle 1) wurden aus Goodman et al. (2006) übernommen. Zur genauen Durchführung der Real-Time PCR siehe Spreyer, 2008.

Primer	Sequenz
EHV-1-gD F-Primer	TCG CGA TCT TGA GCG GTT T
EHV-1-gD R-Primer	CCG CAC GCT TGG CTT T
$\beta 2m$ F-Primer	TCT TTC AGC AAG GAC TGG TCT TT
$\beta 2m$ R-Primer	CAT CCA CAC CAT TGG GAG TAA A
Fluoreszenzsonde	Farbstoff und Sequenz
EHV-1-gD-probe	6-FAM-TCT CTT GTG GAA CAT GC-MGB
$\beta 2m$ -probe	HEX-ATC TTC TGG TCC ATA CTG A-MGB

Tabelle 1: Sequenzen der Primer und Sonden für die Real-Time PCR

3.2.4 Proteine

3.2.4.1 Herstellung von Zelllysaten für den Western Blot

Zur Gewinnung von Lysaten wurden circa 2×10^6 je nach Fragestellung infizierte oder nicht infizierte Zellen „geerntet“, indem die Zellfläschchen zunächst auf Eis gelagert und die Zellen vorsichtig zweimal mit kaltem PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen wurden. Anschließend

wurden 300 bis 500 µl Ripa-Puffer mit zugesetztem Proteinasehemmer-Cocktail auf die Zellen gegeben. Nach zehnminütiger Lysis auf Eis wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden der Zellflasche abgeschabt und die Lysate nach gründlichem Resuspendieren bei -20°C aufbewahrt.

3.2.4.2 Proteinanalyse mittels Elektrophorese

3.2.4.2.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Im Rahmen der SDS-PAGE kommt es zur Anlagerung stark negativ geladener SDS-Moleküle an die Polypeptidketten von Proteinen, was dazu führt, dass diese denaturiert und negativ geladen werden. Während ihrer Wanderung im elektrischen Feld werden die Proteine ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt. Verwendet wurde hierfür das Vertikalelektrophorese-System Protean II (BioRad).

Herstellung der Gele

Die für die SDS-PAGE verwendeten Gele bestanden jeweils aus Sammelgel und Trenngel, wobei durch Variation der Acrylamidkonzentration die Porengröße bzw. der Bereich der optimalen Auftrennung verändert wird. Zur Verwendung im Tris-Glycin-Puffersystem wurden Trenngele mit einer Acrylamidkonzentration von 12 % gegossen. Die Bestandteile der Elektrophorese-Apparatur wurden gereinigt, entfettet und nach Herstelleranleitung zusammengebaut. Nach dem Anmischen der Trenngele (siehe Tabelle 2) wurden diese in die Apparatur eingefüllt und zum Aushärten unter Luftabschluss mit A. demin. überschichtet. In das darüber eingefüllte Sammelgel wurden zur Bildung von Vertiefungen für das Einfüllen der Proben Kämme gesteckt. Die ausgehärteten Gele wurden anschließend in die dafür vorgesehenen Behälter gestellt und diese mit Tris-Glycin-Puffer gefüllt.

Trenngel	12 %	Sammelgel	3 %
A. demin.	2,54 ml	A. demin.	1,85 ml
Tris 1,5 M, pH 8,8	1,90 ml	Tris 0,5 M, pH 6,8	0,75 ml
SDS 20 %	37,5 µl	SDS 20 %	15,0 µl
Acrylamid-		Acrylamid-	
Stammlösung 30%	3,03 ml	Stammlösung 30 %	0,40 ml
Amper 10 %	37,5 µl	Amper 10 %	22,5 µl
TEMED	3,75 µl	TEMED	3,75 µl
Gesamtvolumen	7,55 ml	Gesamtvolumen	3,04 ml

Tabelle 2: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele für Tris-Glycin-Puffer

Vorbereitung der Proben

Der Proteingehalt der Zelllysate wurde mit Hilfe des BCA-Proteinbestimmungs-Kits (Pierce) ermittelt und durch Verdünnung einzelner Proben auf gleiche Konzentration eingestellt. Nachfolgend wurden die Lysate mit 1/3 des Volumens Probenpuffer versetzt, wobei die Zugabe von 2-Mercaptoethanol der Reduzierung von Disulfid-Brücken der Proteine dient. Je nach Protein wurden die Lysate entweder auf Eis belassen oder für 5 Minuten bei 99°C gekocht, bevor sie in die Vertiefungen des Sammelgels pipettiert wurden. Zur späteren Größenbestimmung der Proteine wurde zusätzlich ein Molekulargewichtsmarker eingesetzt. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei 100 V im Tris-Glycin-Elektrophoresepuffer für 2 bis 2,5 h.

3.2.4.2.2 Elektrotransfer und Immunodetektion von Proteinen (Western Blot)

Zum Nachweis spezifischer Proteinbanden durch Immunodetektion müssen diese zunächst mittels Elektrotransfer auf einer Nitrocellulosemembran fixiert werden. Dazu wurde das

Tankblot-Verfahren (TOWBIN et al., 1979) angewandt. Die durch SDS negativ geladenen und elektrophoretisch aufgetrennten Proteine werden dabei durch ein elektrisches Feld aus dem Polyacrylamidgel auf die Nitrocellulosemembran geblottet. Membran und Trenngel wurden zunächst einige Minuten in Towbin-Puffer äquilibriert, anschließend aufeinandergelegt und zu beiden Seiten mit in Towbin-Puffer befeuchteten Whatman-Filtern und Schwämmchen bedeckt. Der Stapel aus Schwämmen, Filtern, Membran und Gel wurde nach Anleitung des Herstellers in eine Mini-Trans-Blot-Apparatur (Fa. BioRad) eingespannt. Nach Füllen der Kammer mit gekühltem Towbin-Puffer wurde für 65 Minuten eine Gleichspannung von 100 V angelegt. Anschließend wurde die Membran zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen für 1 h bei Raumtemperatur in PBS-T mit 10 % Magermilchpulver unter leichtem Schütteln inkubiert. Der primäre Antikörper wurde in PBS-T (monoklonale Antikörper) bzw in PBS-T mit 5 % Magermilchpulver (polyklonale Antikörper) verdünnt und über Nacht bei 4°C auf der Nitrocellulosemembran belassen. Um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen, wurde die Membran am nächsten Tag dreimal je 15 Minuten unter Schütteln mit PBS-T gewaschen. Die nachfolgende Inkubation mit dem in PBS-T mit 5 % Magermilchpulver verdünnten POD-gekoppelten sekundären (Anti-Spezies-IgG)-Antikörper erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur. Zur Entfernung ungebundenen Konjugats wurde die Membran dreimal für 20 Minuten in PBS-T gewaschen und anschließend zusammen mit dem nach Anleitung des Herstellers gemischten Chemilumineszenz-Substrat „ECL“ in Folie eingeschweißt. Zur Sichtbarmachung der Lumineszenz wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und nach variabler Belichtungszeit entwickelt.

3.2.5 Indirekte Immunfluoreszenz (IIF)

3.2.5.1 Auswertung mittels Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie („fluorescence-associated cell sorting“, FACS) lassen sich mittels indirekter Immunfluoreszenz spezifisch markierte Zellen nach Quantität und Qualität

des Signals beurteilen. 1 bis 3×10^6 Zellen wurden hierfür 15 bis 24 Stunden nach Einsaat infiziert und zu bestimmten Zeiten p.i. für die Fluoreszenzfärbung gewonnen. Dazu wurden die Zellen mit STV abgelöst, 10 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert und nach Resuspension des Zellpellets in PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} à 50 μl auf 5 bis 8 Löcher einer auf Eis gelagerten 96-Loch-Platte verteilt. Die Zellen wurden zweimal mit PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen, indem die 96-Loch-Platte 60 Sekunden bei 2000 rpm zentrifugiert, der Überstand entfernt und die Zellen kurz auf dem Schüttler resuspendiert wurden.

Zur Messung Oberflächen-ständiger Proteine erfolgten alle nachfolgenden Schritte auf Eis, wohingegen die Zellen zum Nachweis intrazellulärer Proteine zunächst fixiert und geöffnet wurden. Zur Fixation wurden pro Loch 100 μl 1 %iges PFA auf die Zellen gegeben und 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach einmaligem Waschen erfolgte das Öffnen der Zellen durch fünfminütige Inkubation mit 100 μl Digitonin und erneutes Waschen mit PBS. Primäre bzw. sekundäre Antikörper wurden jeweils in PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} verdünnt und à 50 μl auf die Zellen in der 96-Loch-Platte gegeben (Pkt. 3.1.3.1 und 3.1.3.2). Die optimale Verdünnung der jeweiligen Antikörper war in einem Vorexperiment bestimmt worden. Nach 15 minütiger Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgten zwei Waschschrte mit PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} , um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Mit dem sekundären Antikörper („Alexa 488“ anti-mouse bzw „Alexa 488“ anti-rabbit) (Pkt. 3.1.3.3) wurde 20 Minuten inkubiert, anschließend zur Entfernung von Antikörperresten ebenfalls zweimal gewaschen. Zuletzt wurden die Zellen in je 100 μl Propidiumjodid (PI) (10^{-6} molar) resuspendiert. Durch Einlagerung des PI in die DNS im Kern geöffneter Zellen können diese nachfolgend von ungeöffneten Zellen unterschieden werden. Je Probe wurden schließlich jeweils 10 000 Zellen ins Durchflusszytometer eingelesen. Bei Oberflächenfärbungen wurden PI-positive geöffnete bzw. tote Zellen nicht in die letztendliche Auswertung mit einbezogen. Angegebene Prozentzahlen wurden berechnet, indem im erstellten Histogramm ausgehend von der jeweiligen Negativkontrolle (= 98% negativ) der Prozentsatz positiver Zellen bestimmt wurde.

Zur Färbung der Leukozyten aus gerinnungsgehemmtem Vollblut wurde dieses à 50 µl in 96-Loch-Platten pipettiert. Durch Zugabe von 150 µl Lysispuffer wurden zunächst die Erythrozyten für 2 bis 3 Minuten unter Schütteln lysiert und die verbleibenden Leukozyten anschließend gewaschen und gefärbt wie oben beschrieben.

3.2.5.2 Fluoreszenzmikroskopische Auswertung

Mittels indirekter Immunfluoreszenz markierte Zellen können neben der Durchflusszytometrie auch direkt im Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden. Diese Methode erlaubt eine genauere Zuordnung der Lokalisation und Verteilung des Fluoreszenzsignals in zellulären Strukturen. Circa $1,5 \times 10^6$ Zellen wurden hierzu in 6-Loch-Platten auf Deckgläschen ausgesät und je nach Fragestellung infiziert. Um zelluläre oder virale Proteine auf der Zelloberfläche nachzuweisen, wurden die Zellen nicht fixiert bzw geöffnet. Sämtliche Färbeschritte erfolgten auf Eis und die Waschschrte wurden äußerst vorsichtig durchgeführt. Um intrazelluläre Proteine zu lokalisieren wurden die Zellen zunächst fixiert und geöffnet. Dazu wurde der Zellrasen nach der gewünschten Zeit p.i. zweimal mit kaltem PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen und nachfolgend durch Zugabe von 500 µl 2 %igem PFA für 10 Minuten bei 4°C fixiert. Anschließend erfolgte nach 2 weiteren Waschschrten das Öffnen der Zellen mit 0,1% igem Triton X100 (1 ml pro 6-Loch, 15 Minuten bei RT). Die Zellen wurden erneut zweimal gewaschen und nachfolgend für 60 Minuten mit 5 % FKS in PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blocken. Nach einem weiteren Waschschrte wurden die primären Antikörper in PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} verdünnt und à 200 µl auf die Zellen pipettiert (Pkt. 3.1.3.1. und 3.1.3.2). Nach 60 minütiger Inkubation bei RT wurden die Zellen dreimal je 15 Minuten mit PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} unter leichtem Schwenken gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Anschließend wurde der ebenfalls in PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} verdünnte sekundäre (anti-Spezies-IgG)-Antikörper („Alexa 488“ anti-mouse bzw. anti-rabbit) à 200 µl auf die Zellen gegeben (Pkt. 3.1.3.3). Nach 60 minütiger Inkubation wurden durch

dreimaliges 20 minütiges Waschen nicht gebundene Reste des Konjugats entfernt. Die Deckgläschen wurden luftgetrocknet und anschließend mit der Zellseite nach unten mit 8 µl PBS/Glycerin (1:1) mit einem Zusatz von 0,1 % Dabco auf Objekträger gelegt. Die Ränder der Deckgläschen wurden zur Fixierung mit Nagellack versiegelt. Die Betrachtung und Dokumentation erfolgte mittels Ölimmersion unter dem Fluoreszenzmikroskop bzw. mit Hilfe des Confocalen Laser Scanning-Mikroskopes.

4. ERGEBNISSE

4.1. Der Einfluss von EHV-1 auf die MHC I-/II-Expression equiner Zellen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einer Infektion mit EHV-1 auf die MHC I- und II-Expression equiner Zellen *in vitro* untersucht. Mit Hilfe der IIF konnten MHC I-Moleküle auf NBL-6-, EEL- und ETCC-Zellen sowie auf equinen PBMCs in Form eines fein verteilten Fluoreszenzmusters auf der Zelloberfläche sichtbar gemacht werden. Nach Intrazellulärfärbung war die MHC I-spezifische Fluoreszenz zudem in einem Verteilungsmuster detektierbar, das eine Lokalisation im Bereich des Golgi-Apparates vermuten lässt.

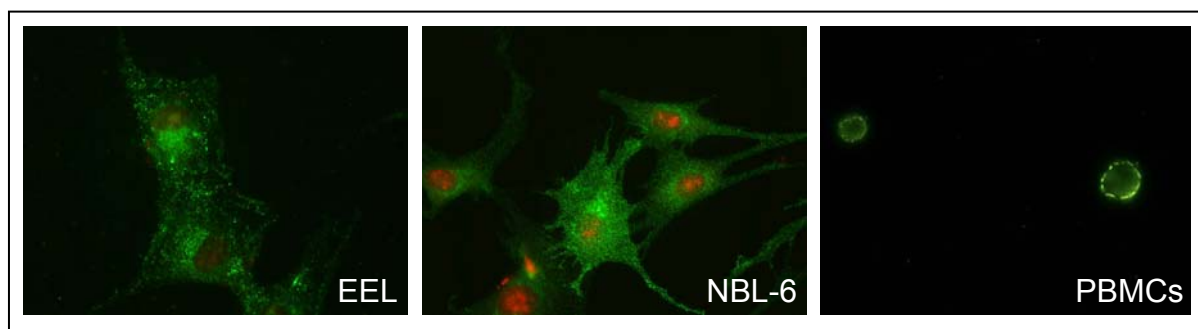


Abbildung 1: Immunfluoreszenz-Analyse von MHC I auf EEL-, NBL-6-Zellen und PBMCs

EEL- und NBL-6-Zellen wurden 20 h nach Passagierung mit PFA fixiert und mit Triton geöffnet. MHC I-Moleküle wurden nachfolgend mit dem anti-MHC I-Antikörper „H58A“ detektiert (grün). Zur Darstellung der Zellkerne wurden diese mit PI gegengefärbt (rot). MHC I-Moleküle auf der Oberfläche equiner PBMCs wurden 24 h nach Isolierung aus EDTA-Blut unfixiert mit „H58A“ detektiert.

Als Methode der Wahl zur Darstellung der MHC I- oder II-Expression auf mittels IIF gefärbten EHV-1-infizierten bzw. nicht-infizierten Zellen wurde im Folgenden die Durchflusszytometrie (FACS) verwendet (Kapitel 3.2.5.1). Eine Oberflächenfärbung mit den anti-MHC I-Antikörpern „Mouse anti equine MHC class I“, „PT85A“ oder „H58A“ und einem „Alexa 488“-gekoppelten „Anti-Mouse IgG“-Antikörper führte sowohl auf NBL-6-, EEL- und ETCC-Zellen als auch auf equinen PBMCs zu einem deutlichen positiven Fluoreszenz-Signal. Dabei

zeigten NBL-6- und EEL-Zellen zwei bzw. neun Tage nach Passagierung keine Unterschiede in der Intensität ihrer MHC I-Expression. Auf der Kaninchenzelllinie Rk13 ließen sich hingegen wie erwartet keine equinen MHC I-Moleküle detektieren. Die anti-MHC II-Antikörper „Mouse anti equine MHC class II“, „EqT2“ und „H42A“ führten zunächst nur auf equinen PBMCs zu einem spezifischen Signal. Durch Zusatz von equinem Interferon- γ (IFN- γ) zum Zellkulturmedium ließ sich jedoch auch auf NBL-6- und ETCC-Zellen ein positives MHC II-Signal induzieren (Kap. 4.1.3).

Eine Präadsorption der Antikörper oder der jeweiligen Zellen mit Pferdeserum führte zu keiner Änderung des Fluoreszenzsignals, was die Spezifität der jeweiligen Antikörperbindungen weiterhin bestätigte. Equine PBMCs wurden mittels Dichtezentrifugation (Histopaque®, Fa. Sigma) aus EDTA-Blut isoliert. Bei den dabei gewonnenen Zellen handelte es sich um Lymphozyten und Monozyten im Verhältnis von ca. 10:1. Eine Isolierung equiner Granulozyten war mit der verwendeten Methode nicht erfolgreich.

Im Folgenden werden jeweils exemplarisch die Ergebnisse eines von mehreren identisch durchgeführten Experimenten gezeigt. Zur Kontrolle der Infektion wurden die auf MHC I-/II-Expression untersuchten Zellen jeweils zugleich nach der Expression verschiedener EHV-1-Proteine beurteilt (Abb. 2).

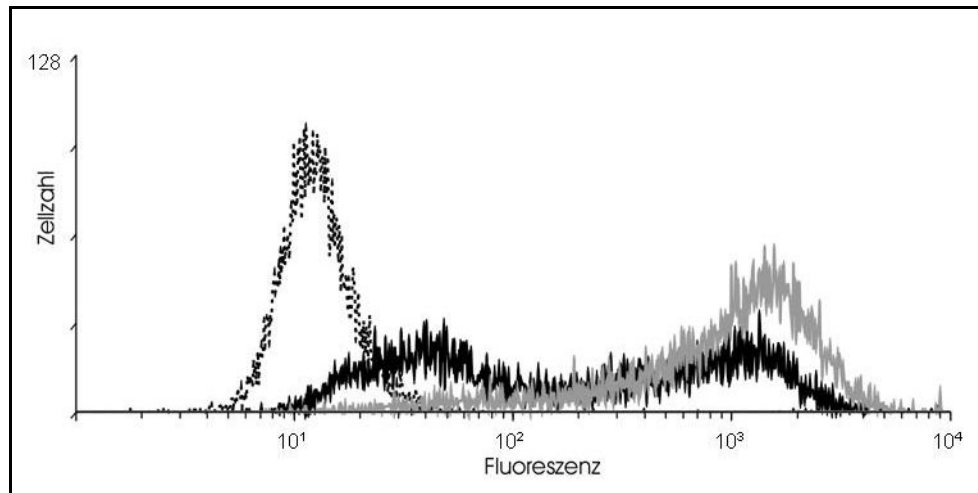


Abbildung 2: gC-Expression nach Infektion von NBL-6-Zellen mit RacL11

NBL-6-Zellen wurden einen Tag nach Passagierung mit RacL11 infiziert (MOI von 2). Nach 8 h (schwarz) bzw. 16 h (grau) wurde die gC-Expression auf der Zelloberfläche mit Hilfe des anti-gC MAK „2A2“ in der Durchflusszytometrie bestimmt. Als Negativkontrolle dienten nicht-infizierte NBL-6-Zellen (gestrichelt). Die Rate der gC-exprimierenden Zellen lag 8 h p.i. bei 81,5 % und 16 h p.i. bei 98,4 %.

4.1.1 Der Einfluss der EHV-1-Infektion auf die MHC I-Expression in Zellkultur

Die Infektion equiner Zellen mit EHV-1 führt, wie bereits bekannt ist, in Relation zur Zeit p.i. zu einer zunehmenden Verringerung der MHC I-Expression auf der Zelloberfläche. Auch in unserem experimentellen System, auf NBL-6- (Abb. 3) oder EEL-Zellen (nicht gezeigt), konnte diese Beobachtung bestätigt werden. Dabei spielte es keine Rolle, welcher der anti-MHC I-MAks verwendet wurde. Eine leichte Abnahme des MHC I-Fluoreszenz-Signals war bereits ab 6 h p.i. erkennbar. Im Verlauf der Infektion ließ sich eine deutliche Verstärkung dieser Reduktion bis hin zum spätesten untersuchten Zeitpunkt von 40 h p.i. beobachten (Daten nicht gezeigt).

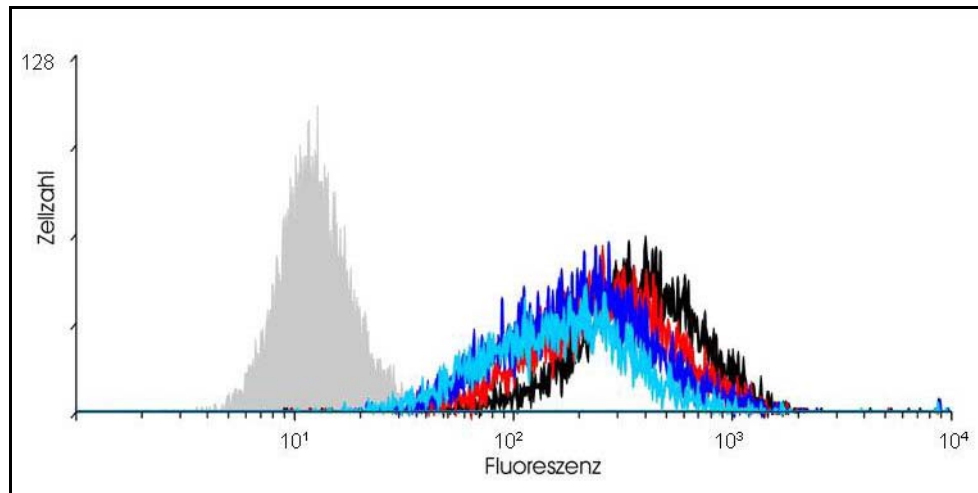


Abbildung 3: Reduktion der MHC I-Expression auf NBL-6-Zellen 8, 16 und 24 h p.i.

NBL-6-Zellen wurden einen Tag nach Einsaat mit RacL11 infiziert (MOI 2) und nach 8 h (rot), 16 h (dunkelblau) oder 24 h (hellblau) die MHC I-Oberflächenexpression mittels des MAk „Mouse anti equine MHC class I“ analysiert. Parallel wurde die MHC I-Expression auf nicht-infizierten NBL-6-Zellen gemessen (schwarz). Als Isotypkontrolle diente der Antikörper „WB 103/105“ (grau hinterlegt). Die Expression des gC betrug 8 h p.i. 81,5 %, 16 h p.i. 98,4 % bzw. 24 h p.i. 98,9 % (vgl. Abb. 1).

4.1.2 Die Auswirkungen einer EHV-1-Infektion auf die MHC I-Expression equiner PBMCs

Auch auf equinen PBMCs konnte *in vitro* nach Infektion mit RacL11 eine Herunterregulierung der MHC I-Präsentation auf der Zelloberfläche beobachtet werden (Abb. 4a). Wie auf der Zellkultur war diese Abnahme ab 6 h p.i. messbar und verstärkte sich im Verlauf der Infektion bis hin zu 42 h p.i. Eine noch geringere MHC I-Expression war 66 h p.i. zu detektieren. Allerdings war zu diesem Zeitpunkt auch auf nicht-infizierten Kontrollzellen eine etwas geringere MHC I-Expression als auf der entsprechenden 42 h-Kontrolle messbar (Daten nicht gezeigt).

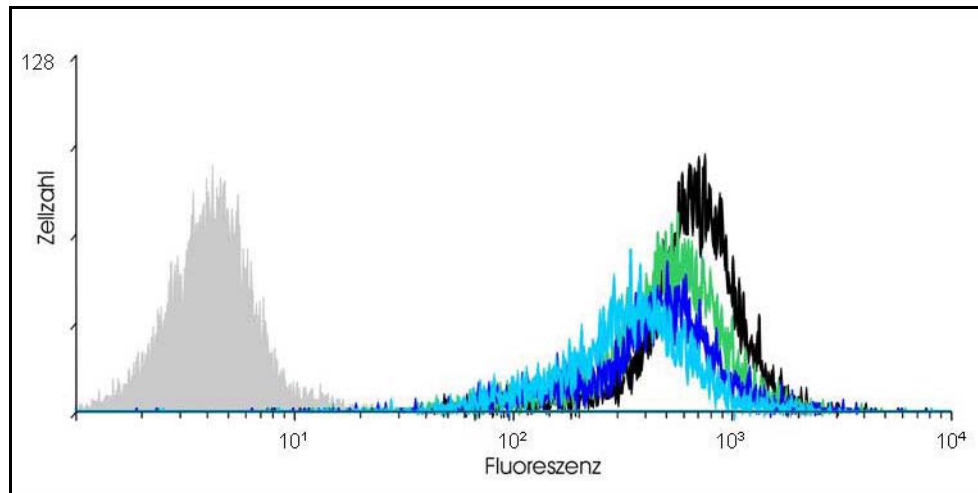


Abbildung 4a: Reduktion der MHC I-Expression auf equinen PBMCs in Relation zur Infektionszeit

Die Zellen wurden 6, 18 und 30 h nach Isolierung mit RaL11 infiziert (MOI 2) und sofort bei 37 °C inkubiert. Die Inkubation mit dem anti-MHC I-Antikörper „PT85A“ und die Messung der MHC I-spezifischen Fluoreszenz erfolgte 12 h (grün), 24 h (dunkelblau) bzw. 36 h (hellblau) nach Infektion. Schwarz dargestellt ist die MHC I-Expression auf nicht-infizierten Zellen, grau hinterlegt die Färbung mit „WB 103/105“ (Isotypkontrolle).

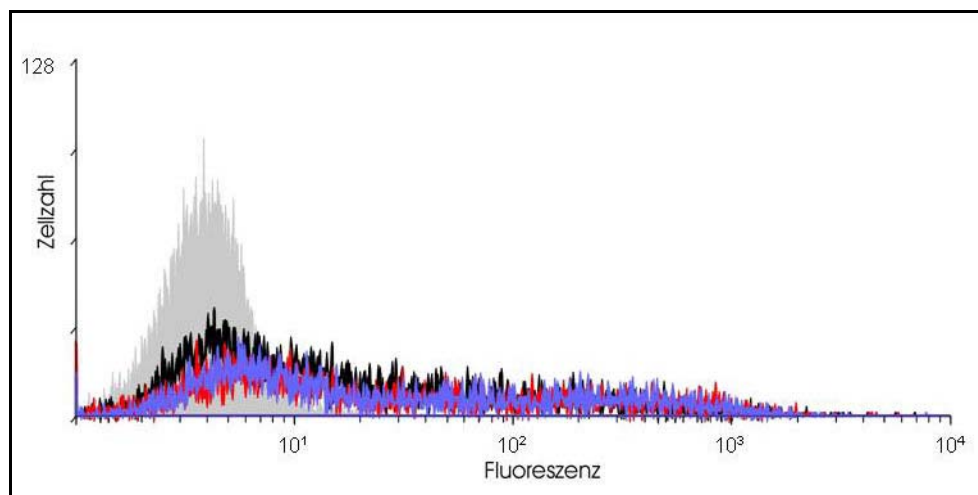


Abbildung 4b: gC-Expression auf infizierten PBMCs

Die in Abbildung 4 auf MHC I gefärbten Zellen wurden parallel mit dem anti-EHV-1-gC-Antikörper „2A2“ inkubiert und die Stärke der gC-Expression anschließend erfasst. 12 h p.i. (schwarz) exprimierten 49 %, 24 h p.i. (rot) 56 % und 36 h p.i. (blau) 57 % der analysierten Zellen gC auf ihrer Oberfläche. Als Kontrolle dienten nicht-infizierte Zellen (grau hinterlegt).

4.1.3 Die Expression von MHC II-Molekülen auf equinen Zellkultur-Zellen

Durch Inkubation von unbehandelten NBL-6-Zellen mit dem anti-MHC II-Antikörper „EqT2“ ließ sich mittels Durchflusszytometrie kein positives Signal nachweisen. Die Antikörper „H42A“ sowie „Mouse anti equine MHC class II“ führten zwar zur Detektion einer schwachen Fluoreszenz, die MHC II-Spezifität dieses Signals ist allerdings zweifelhaft. Eine Infektion der Zellen mit RacL11 bewirkte keine deutliche Änderung dieser Fluoreszenz-Signale.

Durch Zugabe von equinem IFN- γ zum Zellkulturmedium ließ sich auf NBL-6- wie auch auf ETCC-Zellen eine deutliche MHC II-Expression induzieren. Dabei konnte mit zunehmender Zeit nach IFN- γ -Zusatz eine Steigerung der MHC II-Expression beobachtet werden. So war beispielsweise mit „EqT2“ 12,5 h nach IFN- γ -Zugabe auf 72 % der Zellen ein positives Signal zu detektieren, während 16,5 h nach Zugabe bereits 89 % der Zellen MHC II-Moleküle exprimierten. Nicht-behandelte Zellen hingegen reagierten nur zu 14 % positiv (Abb. 5).

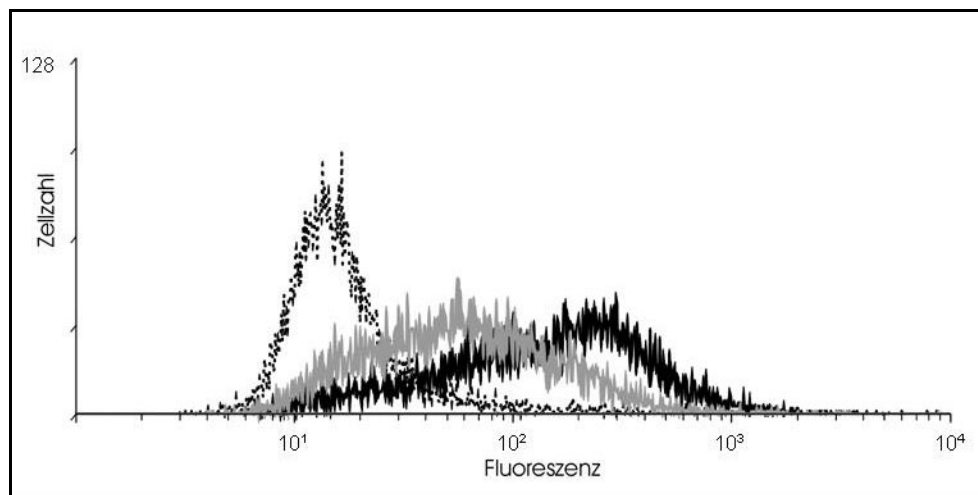


Abbildung 5: Induktion der MHC II-Expression auf NBL-6-Zellen

Das IFN- γ wurde einen Tag nach Einsaat der Zellen zum Zellkulturüberstand gegeben und bis zur IIF-Färbung („EqT2“) 12,5 h (grau) bzw. 16,5 h (schwarz) im Medium belassen. Parallel wurde das Signal auf unbehandelten Zellen gemessen (gestrichelt).

Die Dauer der Exposition der Zellen gegenüber dem IFN- γ spielte für die Auslösung der MHC II-Expressionsinduktion nur eine untergeordnete Rolle. Der Prozentsatz MHC II-exprimierender NBL-6-Zellen betrug bei Färbung mit „EqT2“ 22 h nach IFN- γ -Zugabe und Belassen des Interferons im Medium 96 %, 22 h nach IFN- γ -Zugabe und Entfernen des Interferons nach 15 Minuten durch Wechsel des Zellkulturmediums dagegen 76,4 %.

4.1.4 Die EHV-1-bedingte Beeinträchtigung der MHC II-Expression auf Zellkultur-Zellen

Durch Infektion der Zellen mit dem EHV-1-Stamm RacL11 lässt sich die Induktion der MHC II-Expression auf NBL-6- und ETCC-Zellen deutlich beeinträchtigen. So konnte mit dem Antikörper „EqT2“ 20,5 h nach Infektion nur auf 16 % der IFN- γ -behandelten Zellen eine MHC II-Expression detektiert werden, während 89 % der nicht-infizierten Zellen MHC II-Moleküle exprimierten (Abb.6). Bei Verwendung des Antikörpers „H42A“ war die Expression von 92 % (nicht-infiziert) auf 43 % (infiziert) reduziert (Daten nicht gezeigt). Eine Analyse mittels des „Mouse anti equine MHC class II“-MAk lieferte ähnliche Ergebnisse. Möglicherweise war die Herunterregulierung mit letzteren Antikörpern aufgrund der oben beschriebenen Hintergrundfluoreszenz weniger gut zu detektieren als mit „EqT2“.

Die Frage nach einer möglichen Relation zwischen Infektionszeit und Stärke der Verminderung konnte im Rahmen dieser Experimente nicht beantwortet werden, da es mit zunehmender Inkubationszeit auch zu einer Steigerung der IFN- γ -induzierten MHC II-Expression auf den Zellen kam und die Effekte nicht zu trennen waren (Kapitel 4.1.3).

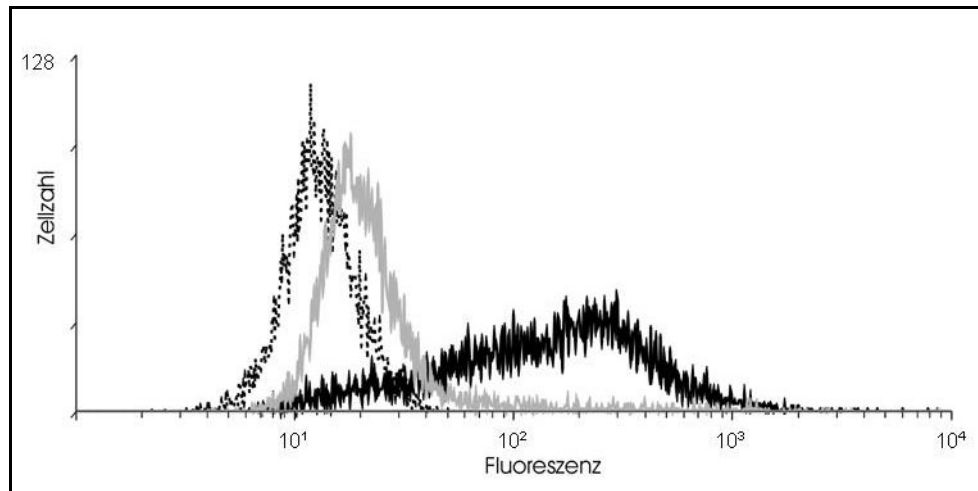


Abbildung 6: Beeinträchtigung der MHC II-Expression durch Infektion mit RacL11

NBL-6-Zellen wurden einen Tag nach Einsaat mit RacL11 infiziert (MOI 1). Die IFN- γ -Zugabe erfolgte 4 h p.i. Gezeigt ist die MHC II-Expression („EqT2“) auf IFN- γ -behandelten, nicht-infizierten (schwarz) bzw. infizierten Zellen (grau) 20,5 h nach Infektion. Das Fluoreszenz-Signal unbehandelter, nicht-infizierter Zellen ist gestrichelt dargestellt. Zur Zeit der Messung betrug der Anteil der gC-exprimierenden Zellen 99,8 %.

Um eine Beeinträchtigung der MHC II-Expression durch Infektion mit RacL11 beobachten zu können, musste der Zusatz des IFN- γ allerdings nach der Infektion erfolgen. Bei IFN- γ -Zugabe vor der Infektion war keine Abnahme der MHC II-Expression, sondern sogar eine leichte Zunahme des positiven Signals zu beobachten. Diese war jedoch auf späte Zeitpunkte nach Infektion beschränkt (Daten nicht gezeigt).

4.1.5 Der Einfluss der EHV-1-Infektion auf die MHC II-Expression equiner PBMCs

Auf equinen PBMCs war mit Hilfe aller drei Antikörper eine deutliche MHC II-Expression zu detektieren. Eine Infektion der Zellen mit RacL11 führte auch hier zu einer leichten Verringerung des positiven Signals. Allerdings war diese Abnahme gering und ließ sich nicht in allen Experimenten in gleichem Maße reproduzieren. Zudem konnte diese Reduktion nicht

mit allen Antikörpern gleich detektiert werden. Eine Relation zur Infektionszeit konnte nicht nachgewiesen werden.

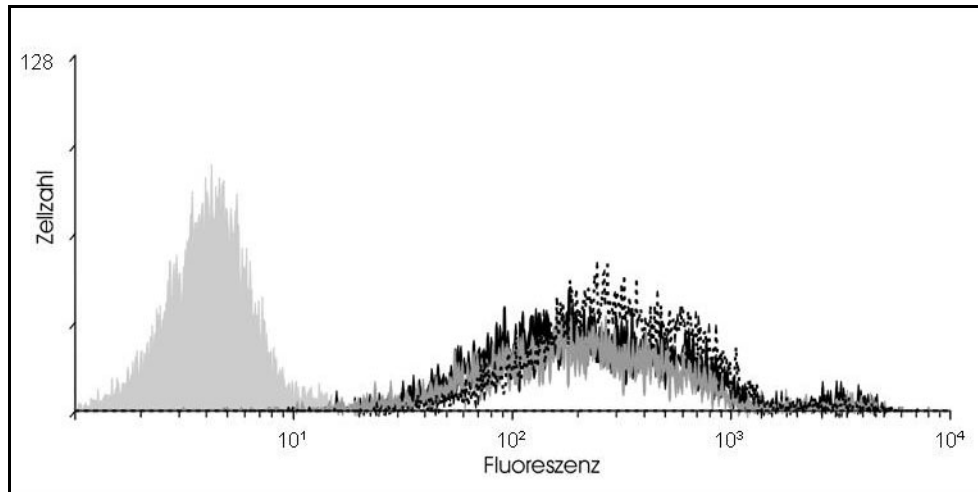


Abbildung 7: Einfluss der Infektion auf die MHC II-Expression equiner PBMCs

Equine PBMCs wurden 18 h bzw. 30 h nach Isolierung mit einer MOI von 2 mit RacL11 infiziert. Dargestellt ist die messbare MHC II-Expression („Mouse anti equine MHC class II“) auf nicht-infizierten Zellen (gestrichelt) sowie auf infizierten Zellen 12 h (schwarz) bzw. 24 h (grau) p.i. Als Isotypkontrolle diente „WB 103/105“ (grau hinterlegt). Der Anteil gC-exprimierender Zellen betrug 12 h p.i. 36 %, 24 h p.i. 44 %.

Eine kleine Population an Zellen wies eine deutlich stärkere MHC II-Fluoreszenz auf als der Rest der PBMCs (Abb. 7, Kurve ganz rechts). Da diese Population aber auf nicht-infizierten Zellen genauso wie auf infizierten Zellen detektierbar war, ist ein Zusammenhang mit der Stärke der Infektion unwahrscheinlich.

4.1.6 Der Einfluss einer Infektion mit aktuellen EHV-1-Isolaten auf die MHC I- und MHC II-Expression *in vitro*

4.1.6.1 Die Reduktion der MHC I-Expression nach Infektion mit Feldisolaten

Da RacL11 ein Plaqueisolat eines 1958 aus einem abortierten Fetus isolierten EHV-1-Stammes ist, sollte auch untersucht werden, ob neuere, niedrigpassagierte Virusisolate einen ähnlichen Einfluss auf die Expression von MHC I-Molekülen auf der Zelloberfläche zeigen. Zudem war von Interesse, ob Unterschiede zwischen Virusstämmen, die zu Abort geführt hatten, und solchen, die neurologische Ausfallerscheinungen verursacht hatten, zu beobachten waren. Dazu wurden NBL-6-Zellen parallel mit RacL11 und dem EHV-1-Isolat O834 (Myeloenzephalopathie, 1999) sowie dem Abortisolat E216 (2006) infiziert. Nach Infektion mit den genannten neueren Isolaten war die Reduzierung der MHC I-Expression auf der Zelloberfläche sogar noch deutlicher als nach Infektion mit RacL11. Ein Unterschied zwischen Abort- und Myeloenzephalopathie-Isolat war jedoch nicht festzustellen (Abb. 8).

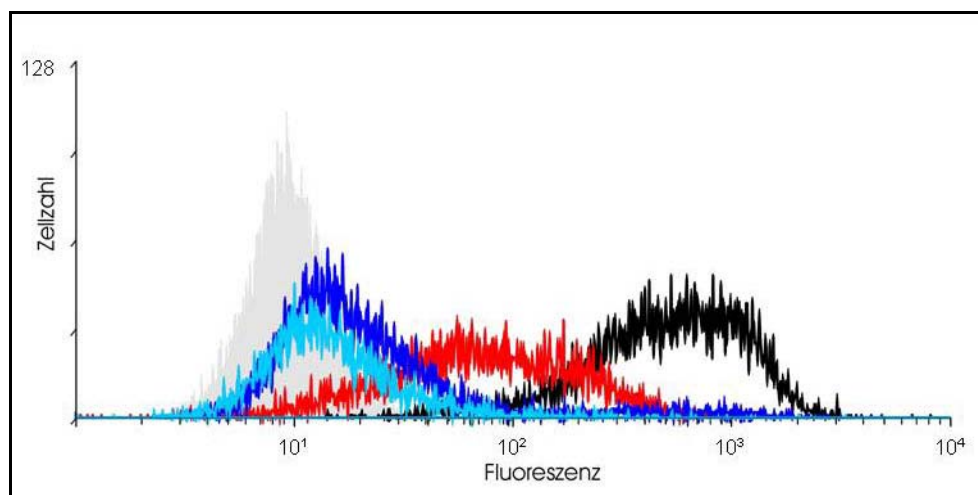


Abbildung 8: Einfluss der EHV-1-Isolate O834 und E216 auf die MHC I-Expression *in vitro*

NBL-6-Zellen wurden mit einer MOI von 0,25 parallel mit RacL11 (rot), O834 (dunkelblau) und dem Abortisolat E216 (hellblau) infiziert. 22 h p.i. wurde die nach IIF-Färbung mit „Mouse anti equine MHC class I“ detektierbare Fluoreszenz beurteilt. Als Isotypkontrolle diente „WB 103/105“ (grau hinterlegt). Das MHC I-Signal auf nicht-infizierten Zellen ist schwarz dargestellt. Um eine vergleichbare Infektion

zu gewährleisten, wurde die gC-Expression zeitgleich kontrolliert (L11: 99,4 % / EHV-1 834: 96,9 % / E 216: 98,2 %)

Auch auf equinen PBMCs führte eine Infektion mit O834 oder E216 zu einer deutlichen Herunterregulierung der MHC I-Expression (Daten nicht gezeigt).

4.1.6.2 Der Einfluss einer Infektion mit O834 und E216 auf die MHC II-Expression

Auch die IFN- γ -induzierte MHC II-Expression auf NBL-6-Zellen wurde durch eine Infektion mit O834 und E216 stark beeinträchtigt (Abb. 9).

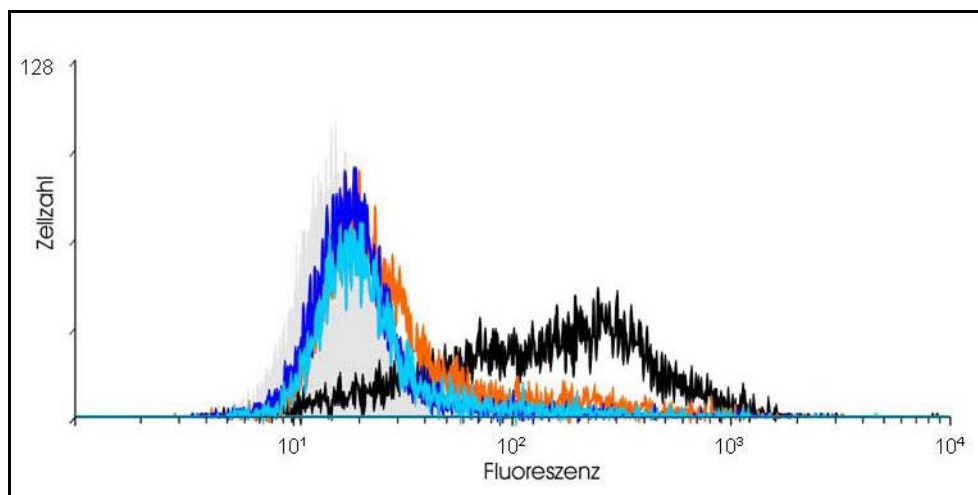


Abbildung 9: Beeinträchtigung der MHC II-Expression durch O834 und E216

Gemessen wurde die MHC II-Expression („EqT2“) auf IFN- γ -behandelten NBL-6-Zellen 19 h nach Infektion (MOI 1) mit RacL11 (orange), O834 (hellblau) und E216 (dunkelblau) sowie auf nicht-infizierten Zellen ohne IFN- γ -Behandlung (grau hinterlegt) bzw. 15 h nach Zusatz von IFN- γ (schwarz). Die Interferon-Zugabe erfolgte 4 h p.i. Die gC-Expression der Zellen betrug für RacL11 97 %, für O834 88 % bzw. für E216 82 %.

4.1.7 Die Auswirkung einer Deletion der UL11- und UL43-Gene auf die Reduktion der MHC I-/II-Expression

4.1.7.1 Die Beeinflussung der MHC I-Expression durch L11 Δ 11 und L11 Δ 43

Wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben, konnte für EHV-1 bisher nur ein einziges Genprodukt identifiziert werden, das eine Rolle bei der Reduktion der MHC I-Expression auf infizierten Zellen spielt. Dabei handelt es sich um das Produkt des UL49.5-Gens. Da für die Proteine UL11p und UL43p eine mögliche Beteiligung in diesem Prozess vermutet wurde, sollte im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss einer Deletion der zugehörigen Leserahmen auf die Fähigkeit zur Verringerung der MHC I- und /oder MHC II-Expression untersucht werden. Dazu wurden NBL-6-Zellen parallel mit dem Ausgangs-Virus RacL11 sowie den rekombinanten Viren L11 Δ 11 und L11 Δ 43 infiziert. Als Kontrolle dienten mit einem UL49.5-deletierten Virus (L11 Δ 49.5) infizierte Zellen. L11 Δ 11 und L11 Δ 43 standen aus vorigen Arbeiten dieses Labors zur Verfügung (Schimmer, 2002; Stenke und Neubauer, unveröffentlicht). Das rekombinante Virus L11 Δ 49.5 wurde von J. Rudolph und N. Osterrieder zur Verfügung gestellt und der Genotyp und Phänotyp vor dem Einsatz mittels PCR, Southern Blot und Western Blot überprüft.

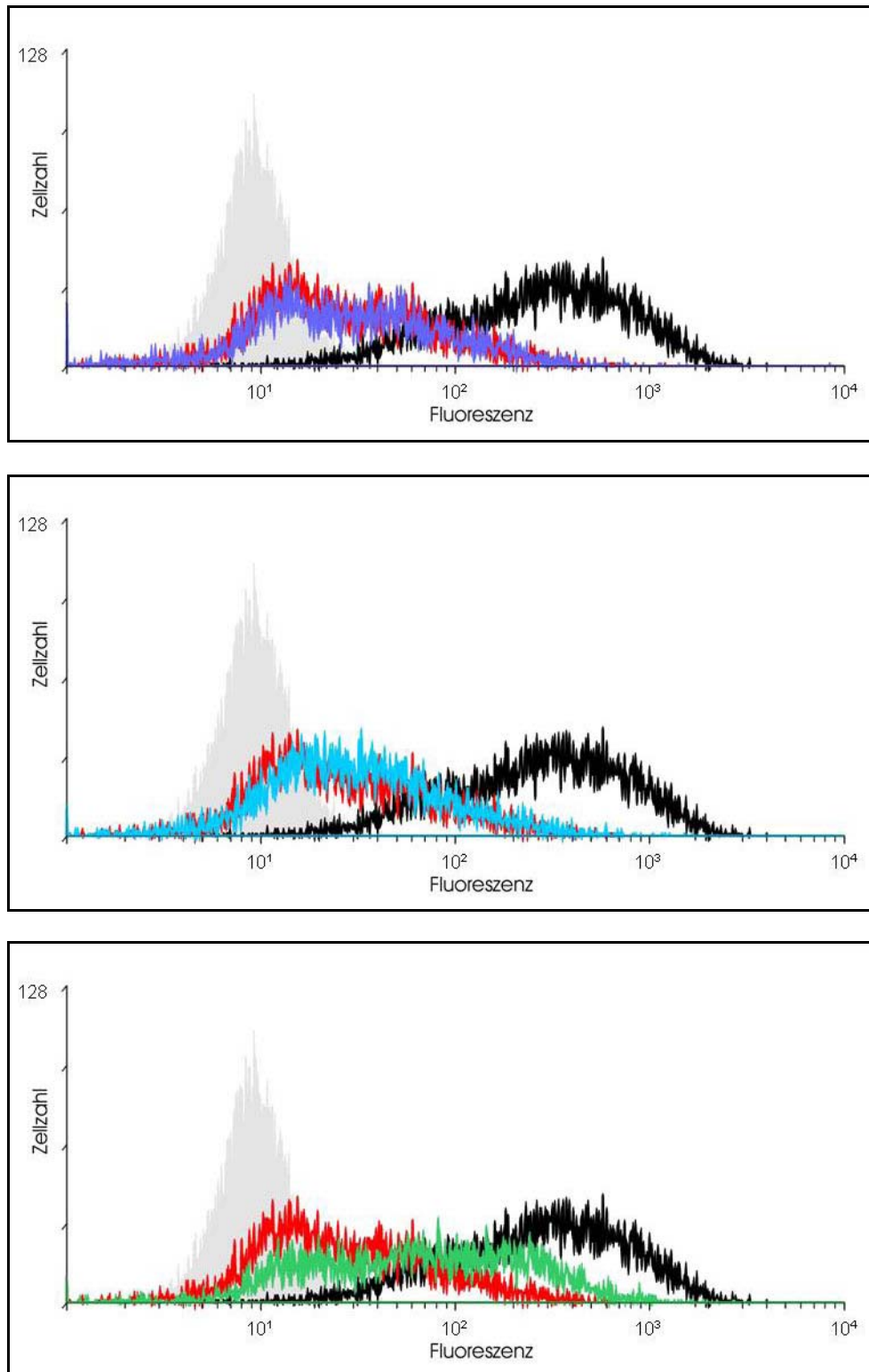


Abbildung 10: Einfluss einer Deletion des UL11, UL43 oder UL49.5 auf die Reduktion der MHC I-Expression in Zellkultur

NBL-6-Zellen wurden parallel mit dem Ausgangsvirus RacL11 (rot) sowie den rekombinanten Viren L11Δ11 (dunkelblau), L11Δ43 (hellblau) und L11Δ49.5 (grün) infiziert (MOI 0,25). 22 h nach Infektion wurde die Stärke der MHC I-Expression mit Hilfe des MAks „PT85A“ analysiert (MHC I-Expression auf

nicht-infizierten Zellen: schwarz / Isotypkontrolle: grau hinterlegt) (gC-Expression: RacL11: 99,4 % / L11Δ11: 98,6 % / L11Δ43: 97,7 % / L11Δ49.5: 99,4 %).

Wie aus Abbildung 10 ersichtlich wird, führte weder die Deletion des UL11 noch die des UL43 zu einer Beeinträchtigung der Fähigkeit von RacL11, eine Herunterregulierung von MHC I-Molekülen auf der Zelloberfläche zu bewirken. Sowohl auf L11Δ11- als auch auf L11Δ43-infizierten Zellen war 22 h p.i. eine ebenso deutliche Verringerung der MHC I-Expression messbar wie auf RacL11-infizierten Zellen. Die mit Hilfe des MAks „PT85A“ detektierte MHC I-Expression betrug auf nicht-infizierten Zellen 99,1 %, nach Infektion mit RacL11, L11Δ11 bzw. L11Δ43 nur noch 57 %, 62,5 % bzw. 65,2 %. Bei Deletion des UL49.5 hingegen war die Herunterregulierung im Vergleich zum Ausgangsvirus RacL11 deutlich reduziert. Hier exprimierten trotz Infektion 82,6 % der Zellen MHC I-Moleküle. Allerdings wurde auch bestätigt, dass die Deletion des UL49.5-Leserahmens alleine nicht ausreicht, um die MHC I-Expression auf den Zellen vollständig zu restaurieren. Es müssen also weitere virale Faktoren eine Rolle spielen. Auch zu früheren oder späteren Zeitpunkten nach Infektion (8 oder 32 h p.i.) konnten keinerlei Unterschiede in der Stärke der Reduktion nach Infektion mit L11Δ11, L11Δ43 oder RacL11 festgestellt werden. Diese Ergebnisse wurden auch unter Verwendung der anti-MHC I-MAks „H58A“ und „Mouse anti equine MHC class I“ bestätigt.

Um dieses Resultat auf Blutzellen zu verifizieren, wurden equine PBMCs in mehreren Experimenten parallel mit L11Δ11, L11Δ43, L11Δ49.5 und RacL11 infiziert. Eine Infektion mit den rekombinanten Viren führte auch auf PBMCs zu einer Abnahme der MHC I-Expression.

4.1.7.2 Die Reduktion der MHC II-Expression durch L11Δ11 und L11Δ43

In einer weiteren Serie von Experimenten wurde auch der mögliche Einfluss einer Deletion des UL11 bzw. UL43 auf die Fähigkeit zur Verminderung der MHC II-Expression auf equinen

Zellen untersucht. Dazu wurden ebenfalls Zellen parallel mit RacL11 bzw. den rekombinanten Viren infiziert. Vier Stunden p.i. wurde durch Zugabe von IFN- γ die Expression von MHC II-Molekülen induziert. Die Analyse der Zellen erfolgte 20,5 h p.i. nach IIF-Färbung im Durchflusszytometer (Abb. 11 und 12).

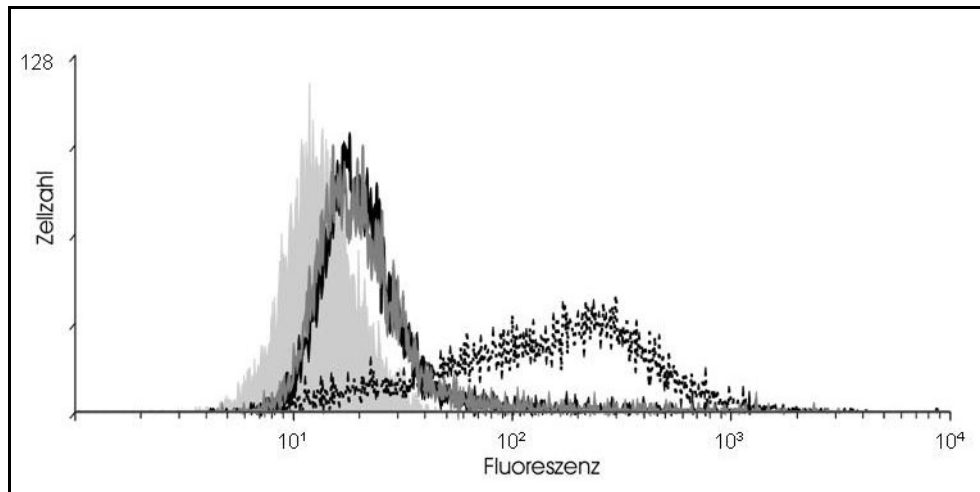


Abbildung 11: Reduktion der MHC II-Expression nach Infektion mit RacL11 und L11 Δ 11

Die Infektion erfolgte parallel mit einer MOI von 1. Dargestellt ist die MHC II-Expression („EqT2“) auf nicht-infizierten NBL6-Zellen ohne IFN- γ -Induktion (grau hinterlegt) bzw. 16,5 h nach IFN- γ -Zugabe (gestrichelt) sowie auf RacL11- (schwarz) und L11 Δ 11-infizierten (grau) IFN- γ -behandelten Zellen 20,5 h nach Infektion.

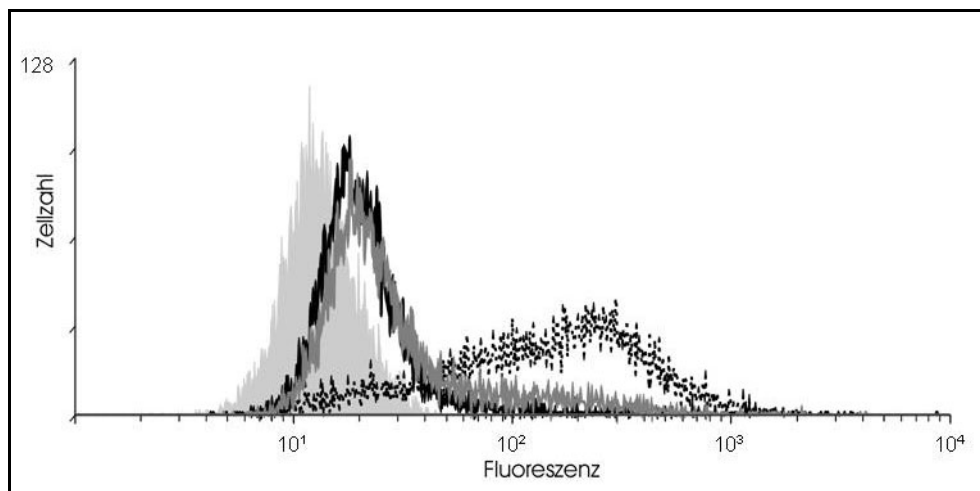


Abbildung 12: Reduktion der MHC II-Expression nach Infektion mit RacL11 (schwarz) und L11 Δ 43 (grau). Infektion und Analyse der Zellen vgl. Abb. 11.

Es zeigte sich, dass es trotz Deletion des UL11- bzw. UL43-Gens zu einer deutlichen Reduktion der MHC II-Expression auf den mit dem jeweiligen rekombinanten Virus infizierten Zellen kam. Die Verringerung erschien ähnlich ausgeprägt wie auf mit RacL11 infizierten Zellen. Eine Infektion mit RacL11 bewirkte im gezeigten Experiment eine Verminderung der MHC II-Expression von 88,7 % (nicht-infiziert) auf 16 %, während die rekombinanten Viren die Expression auf 16,3 % (L11 Δ 11) und 30,8 % (L11 Δ 43) reduzierten. Auch der Einsatz der Antikörper „H42A“ und „Mouse anti equine MHC class II“ führte zu vergleichbaren Ergebnissen. Zeitgleich wurde die gB-Expression („4B6“) kontrolliert. Dabei wiesen RacL11-infizierte Zellen im gezeigten Experiment eine gB-Expressionsrate von 81 % auf, während L11 Δ 11- und L11 Δ 43-infizierte Zellen zu 78 % bzw. 85 % gB exprimierten.

4.2 Die Beeinflussung der MHC I-/II-Expression equiner Zellen durch Infektion mit EHV-4

4.2.1 Der Einfluss von EHV-4 auf die MHC I-Expression in Zellkultur

Um der Frage nachzugehen, ob auch eine Infektion mit EHV-4 die Expression von MHC I-Molekülen auf der Oberfläche von Zellkultur-Zellen beeinflusst, wurden Experimente vergleichend mit RacL11 und einem EHV-4-Rhinitis-Isolat (Ziegler et al., 2005) durchgeführt. Dazu wurden Zellen entsprechend infiziert und die MHC I-spezifische Fluoreszenz im Durchflusszytometer gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass es auch nach Infektion mit EHV-4 zu einer deutlichen Herunterregulierung der MHC I-Expression auf der Oberfläche infizierter Zellen kommt. Im Vergleich zur durch RacL11 bedingten Abnahme führt eine Infektion mit EHV-4 sogar zu einer deutlich stärkeren Reduktion der MHC I-Expression.

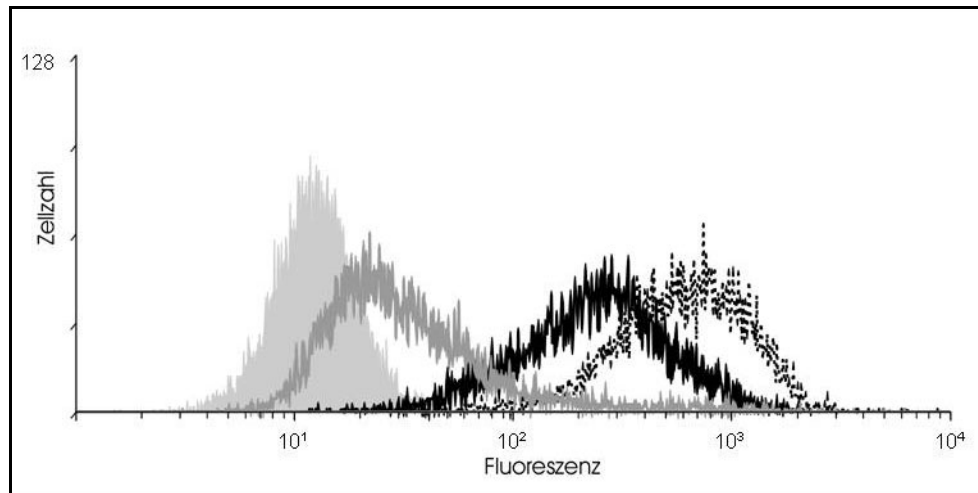


Abbildung 13 : MHC I-Reduktion nach Infektion mit RacL11 oder EHV-4 in Zellkultur

NBL-6-Zellen wurden mit einer MOI von 0,02 parallel mit RacL11 (schwarz) und EHV-4 (grau) infiziert. Die mit Hilfe des Antikörpers „PT85A“ detektierbare Oberflächen-MHC I-Expression wurde 24 h p.i. gemessen (MHC I-Konzentration auf nicht-infizierten Zellen: gestrichelt / Isotypkontrolle: grau hinterlegt).

4.2.2 Die Beeinflussung der MHC I-Expression auf PBMCs durch Infektion mit EHV-4

Es zeigte sich, dass eine Infektion mit EHV-4 auch auf equinen PBMCs zu einer deutlichen Abnahme der MHC I-Präsentation führt.

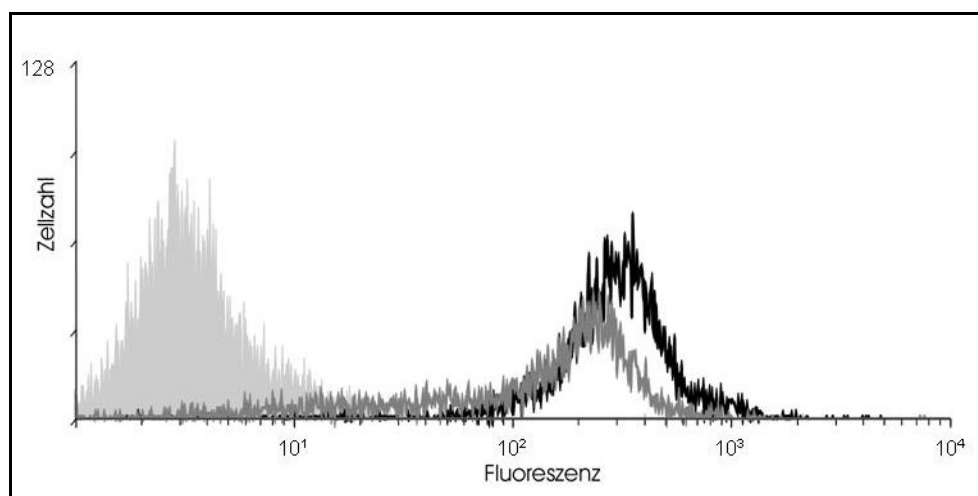


Abbildung 14: MHC I-Expression auf PBMCs nach Infektion mit EHV-4

Die Messung der MHC I-Expression auf nicht-infizierten (schwarz) bzw. auf EHV-4-infizierten Zellen (MOI 0,2) (grau) erfolgte 21 h p.i. („Mouse anti equine MHC class I“). Die Isotypkontrolle ist grau hinterlegt.

4.2.3 Der Einfluss einer EHV-4-Infektion auf die MHC II-Expression in Zellkultur

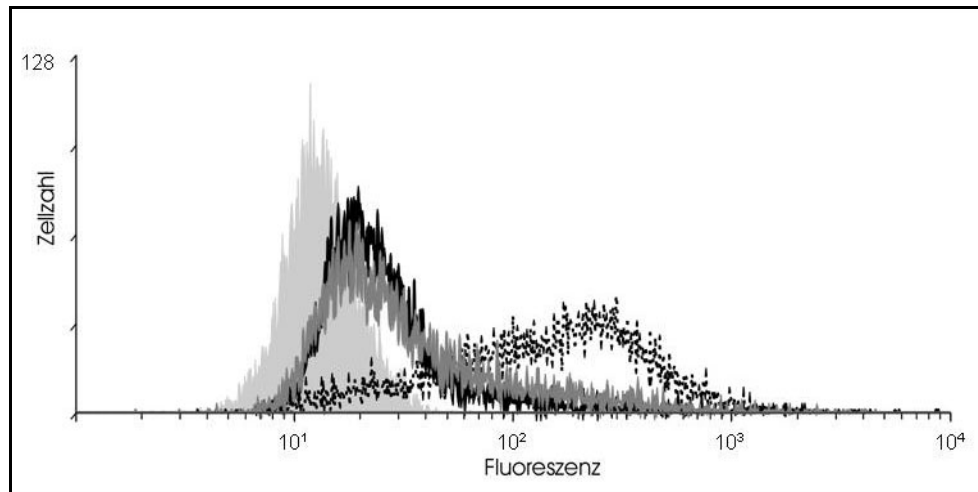


Abbildung 15: MHC II-Expression auf NBL-6-Zellen nach Infektion mit EHV-4

Die Infektion der Zellen erfolgte parallel mit RacL11 (schwarz) und EHV-4 (grau) (MOI 0,2), IFN- γ wurde 4 h p.i. zugegeben. Gemessen wurde das MHC II-Signal („EqT2“) auf nicht-infizierten Zellen ohne IFN- γ -Behandlung (grau hinterlegt) bzw. 16,5 h nach IFN- γ -Zugabe (gestrichelt) sowie auf infizierten, IFN- γ -behandelten Zellen 20,5 h p.i.

Wie aus Abbildung 15 ersichtlich wird, führt eine Infektion mit EHV-4 zu einer deutlichen Verminderung der MHC II-Expression auf NBL-6-Zellen. Im gezeigten Experiment lag die MHC II-Expression nicht-infizierter Zellen bei 88,7 %, während sie nach Infektion mit RacL11 auf 29,5 %, bei Infektion mit EHV-4 auf 40,1 % zurückging. Allerdings lag die gB-Expression nach RacL11-Infektion bei 74,5 %, während EHV-4-infizierte Zellen nur eine Expression von 39,4 % aufwiesen.

4.2.4 Die Auswirkung einer Infektion mit EHV-4 auf die MHC II-Expression equiner PBMCs

Auch auf equinen PBMCs ließ sich nach Infektion mit EHV-4 eine Verminderung der MHC II-Expression nachweisen.

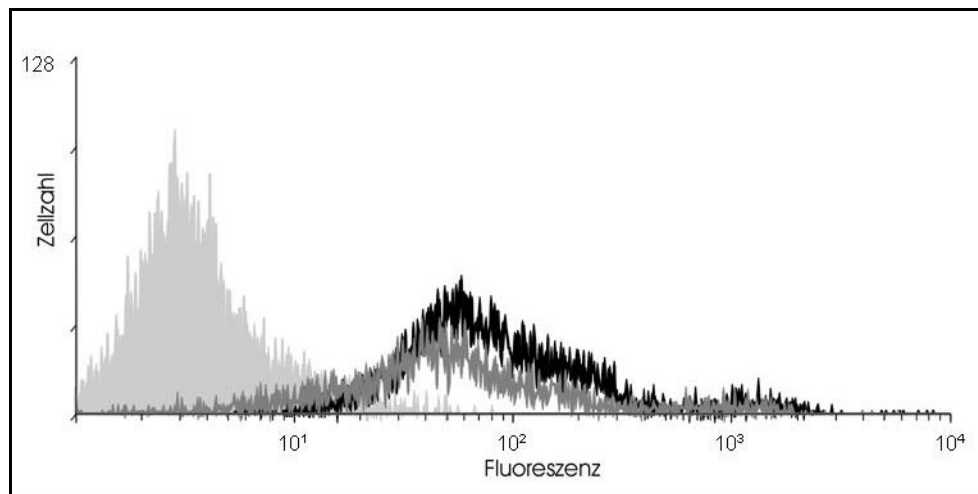


Abbildung 16: MHC II-Expression auf PBMCs: Einfluss von EHV-4

Equine PBMCs wurden mit einer MOI von 0,2 mit EHV-4 infiziert und die MHC II-Expression 21 h p.i. („Mouse anti equine MHC class II“) gemessen. Dargestellt ist die Fluoreszenz auf nicht-infizierten (schwarz) bzw. auf EHV-4-infizierten Zellen (grau) sowie auf mit dem Antikörper „WB 103/105“ inkubierten Zellen (Isotypkontrolle) (grau hinterlegt).

4.3 Die *in vitro*-Infektion equiner PBMCs

Im Verlauf der Untersuchung der MHC I-/II-Expression auf PBMCs fiel auf, dass eine *in vitro*-Infektion equiner PBMCs offensichtlich deutlich anders abläuft als eine Infektion von Zellen in Zellkultur. Zur genaueren Untersuchung des Infektionsablaufs wurden die infizierten Zellen parallel mittels Durchflusszytometrie und quantitativer Real Time-PCR untersucht. Die Ergebnisse eines Experiments sind exemplarisch in Abbildung 17a und b dargestellt.

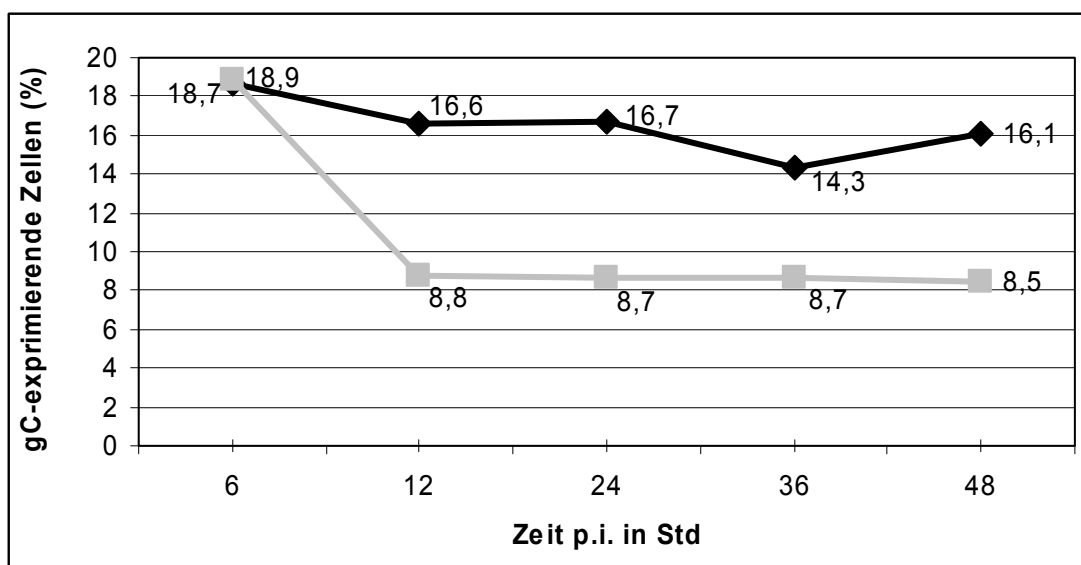


Abbildung 17a: gC-Expression auf *in vitro*-infizierten PBMCs in Relation zur Infektionszeit

Aus EDTA-Blut isolierte PBMCs wurden mit einer MOI von 2 mit RacL11 infiziert und zur Adsorption des Virus an die Zellen zunächst für 90 Minuten bei 4°C inkubiert. In der ersten Gruppe (schwarz) erfolgte im Anschluss eine Temperaturerhöhung auf 37°C (Zeitpunkt 0) ohne Entfernung des Virus-haltigen Überstandes. In der zweiten Gruppe (grau) wurden nicht-gebundene Viruspartikel nach 90 min durch Pelletieren und zweimaliges Waschen der Zellen bei 4°C entfernt. Nach Resuspension dieser Zellen in frischem Medium erfolgte die weitere Inkubation parallel zur ersten Gruppe bei 37°C. Nach einer Inkubationszeit von 6, 12, 24, 36 bzw. 48 h wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen fixiert und geöffnet. Die Messung der Expression viraler Proteine erfolgte nach IIF-Färbung mit dem anti-gC MAk „2A2“ im Durchflusszytometer. Dargestellt ist der Prozentsatz der Zellen, die zur jeweiligen Zeit p.i. virales gC exprimierten.

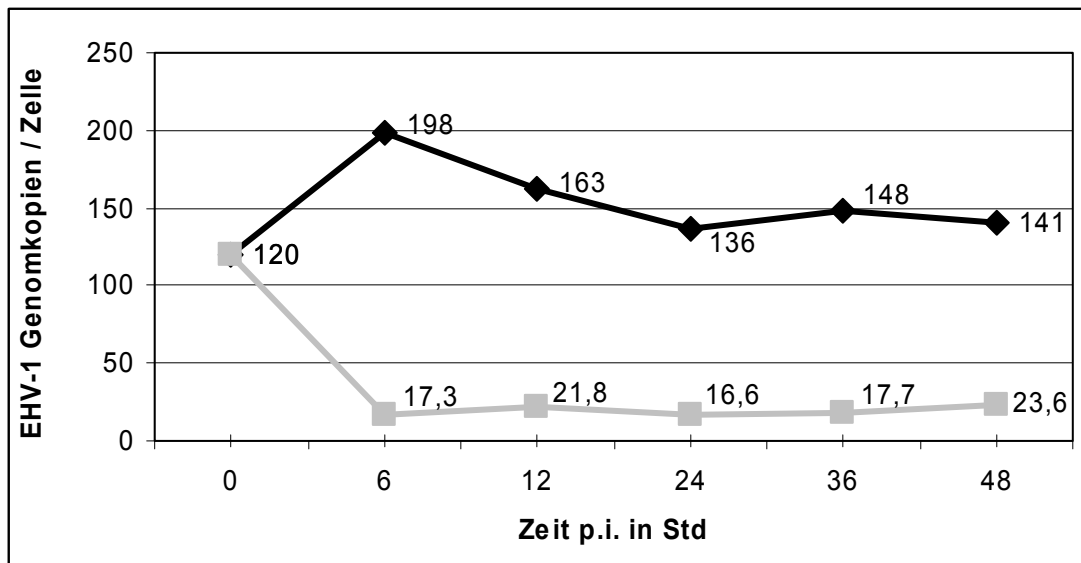


Abbildung 17b: Anzahl der EHV-1-Genomkopien pro Zelle in Relation zur Infektionszeit

Von den in Abb. 17a beschriebenen infizierten Zellen wurden vor der Fixierung Aliquots entnommen und die daraus isolierte DNS mittels Real-Time PCR analysiert. Aus der gemessenen Gesamtzahl aller RacL11 gD-Genomkopien bzw. der zellulären β 2m-Genomkopien wurde die Anzahl der Kopien pro Zelle berechnet und gegen die Zeit p.i. aufgetragen.

Es wurde deutlich, dass die Infektionsmethode scheinbar eine bedeutende Rolle für den weiteren Verlauf der Infektion spielt, zumindest soweit wie durch die beobachteten Parameter beurteilbar. Nach Entfernung nicht-gebundener Viruspartikel aus dem Überstand und zweimaligem Waschen der Zellen kam es zu keiner weiteren Zunahme der gC-Expression auf den Zellen relativ zur Zeit. In den ersten 12 Stunden p.i. konnte stattdessen sogar eine Abnahme der Fluoreszenz beobachtet werden. Zu späteren Zeitpunkten nach der Infektion blieb die gC-Detektion auf niedrigem Niveau konstant.

Bei Messung der EHV-1-Genomkopien pro Zelle zeigte sich nach Entfernung des Virus-haltigen Überstandes und Waschen der Zellen zunächst eine deutliche Abnahme der EHV-1-Genomkopienzahl pro Zelle, ab 6 h p.i. blieb die Genomzahl auch hier bis 48 h p.i. auf dem erreichten Niveau konstant.

Bei Belassen des Virus-haltigen Überstandes auf den Zellen und Temperaturerhöhung auf 37°C ohne Waschschrte kam es hingegen zu keinem nennenswerten Abfall der gC-Detektion auf den Zellen, die Expression blieb auf der nach 6 Stunden erreichten Höhe

konstant. Dagegen ließ die Messung der EHV-1-Genomkopien mittels quantitativer PCR ohne Abzentrifugation des Virus zumindest in den ersten Stunden der Infektion eine leichte Zunahme der Anzahl der Genomkopien pro Zelle erkennen. Im weiteren Verlauf kam es zwar auch in diesem Fall zu keiner messbaren Zunahme der Genomkopien pro Zelle, die Anzahl der Genomkopien blieb aber auf deutlich höherem Niveau konstant.

Auch wenn die exakte Höhe der jeweiligen Messwerte zu bestimmten Zeitpunkten nach Infektion zwischen den einzelnen Experimenten etwas abwich, konnte in jedem der vier zu dieser Fragestellung durchgeführten Experimente ein ähnlicher Verlauf festgestellt werden. Wider Erwarten blieben sowohl Proteinexpression als auch Genomkopienzahl pro Zelle, die letztendlich ja auch die Gesamtkopienzahlen im Messaliquot reflektieren, mit oder ohne Entfernung des Virus-haltigen Überstandes im untersuchten Zeitraum von 48 Stunden auf dem einmal erreichten Niveau relativ konstant. Nach *in vitro*-Infektion equiner PBMCs scheint es in infizierten Zellen offensichtlich zu keiner weiteren Virusvermehrung und zu keiner Ausbreitung infektiöser Viruspartikel auf nicht-infizierte Zellen zu kommen. Im Gegensatz dazu ist nach identischer Infektion von Zellen in Zellkultur eine deutliche Zunahme der Proteinexpression sowie die Infektion weiterer Zellen bis hin zur Expression viraler Proteine auf 100 % der Zellen zu beobachten (vgl. Abb. 2).

4.4 Der Einfluss der Deletion des UL43-Gens auf die Expression anderer viraler Proteine

4.4.1 Der Vergleich der Expression verschiedener EHV-1-Proteine mittels Durchflusszytometrie

Im Rahmen der Durchführung der Experimente zur Untersuchung der MHC I-/II-Expression auf EHV-1-infizierten Zellen fiel auf, dass sich trotz Infektion der Zellen mit exakt gleicher MOI die durchflusszytometrisch messbare Expression viraler Proteine auf L11 Δ 43-infizierten Zellen von der Proteinexpression auf RacL11-infizierten Zellen unterschied. Abhängig vom jeweils analysierten viralen Protein fiel dieser Unterschied mehr oder weniger deutlich aus. Um diesen Beobachtungen nachzugehen, wurden NBL-6- und Rk13-Zellen parallel mit dem Ausgangs-Virus RacL11 sowie mit dem UL43-deletierten Virus L11 Δ 43 infiziert. Die Expression der EHV-1-Glykoproteine gB, gC, gD, gp2, gM, des Membran-assoziierten UL11p und des Kernmembranproteins UL34p wurde anschließend auf der Oberfläche der Zellen bzw. intrazellulär mittels Durchflusszytometrie beurteilt. Vergleichbare Experimente wurden mit dem Virusstamm RacH sowie dem entsprechenden UL43-deletierten RacH (H Δ 43) durchgeführt.

Die Ergebnisse eines von drei auf NBL-6-Zellen identisch durchgeführten Experimenten sind in Abbildung 18a und b dargestellt. Die Zellen wurden ca. 24 h nach Einsaat mit einer MOI von 1 parallel mit RacL11 und L11 Δ 43 infiziert. 14 h p.i. wurde die eine Hälfte der Zellen mit PFA fixiert, mit Digitonin geöffnet und anschließend zusammen mit der anderen Hälfte, den für die Oberflächenfärbung unfixierten Zellen, mit Antikörpern gegen die genannten EHV-1-Proteine inkubiert.

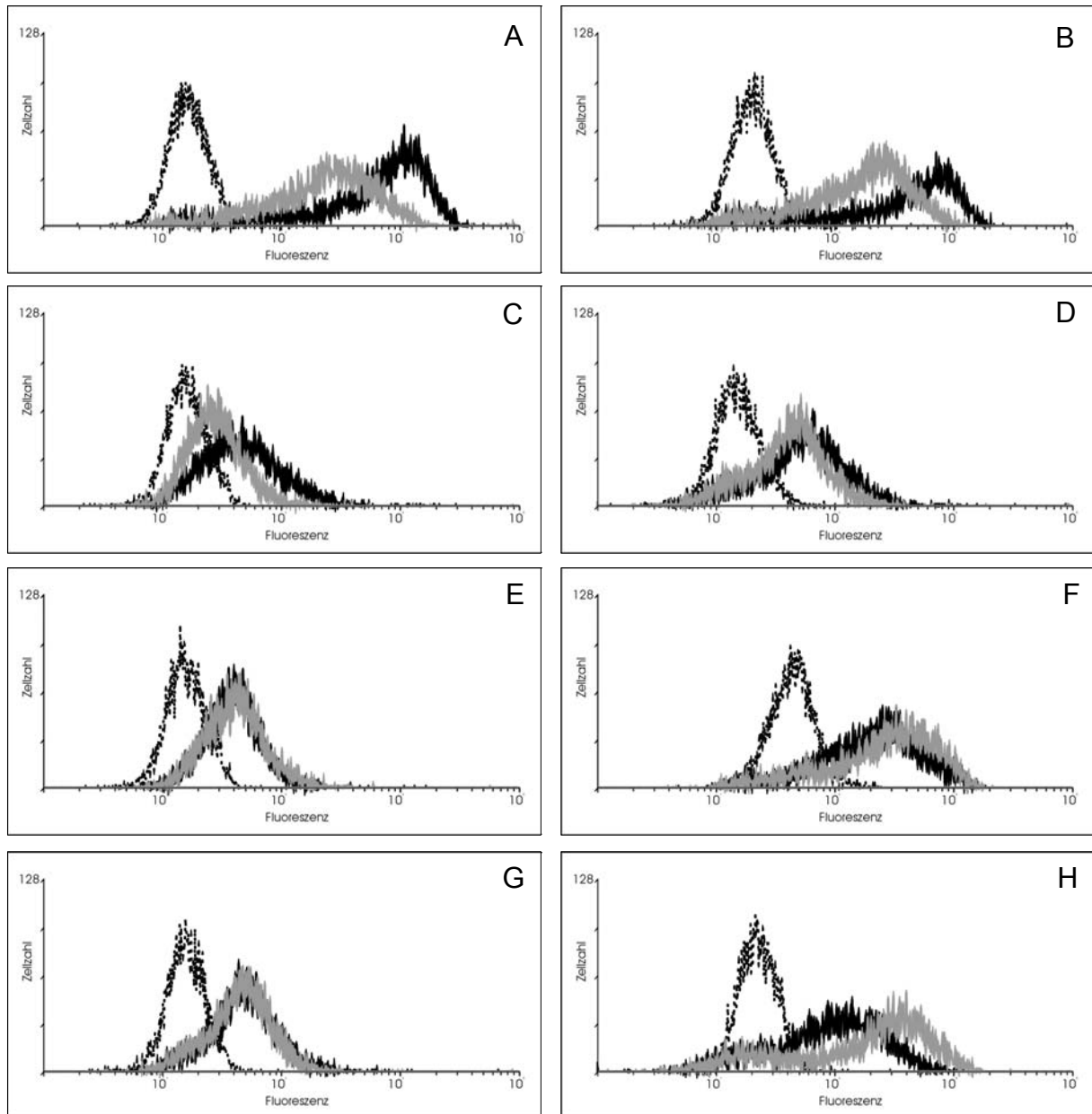


Abbildung 18a: Expression von EHV-1-Proteinen 14 h nach Infektion von NBL-6-Zellen mit RacL11 (schwarz) und L11 Δ 43 (grau)

- | | | |
|--------|------|---|
| A + B: | gC: | Oberflächenfärbung (A) / Gesamtfärbung (B) mit „2A2“ |
| C + D: | gp2: | Oberflächenfärbung (C) / Gesamtfärbung (D) mit „3B12“ |
| E + F: | gB: | Oberflächenfärbung (E) / Gesamtfärbung (F) mit „4B6“ |
| G + H: | gD: | Oberflächenfärbung (G) / Gesamtfärbung (H) mit „20C4“ |

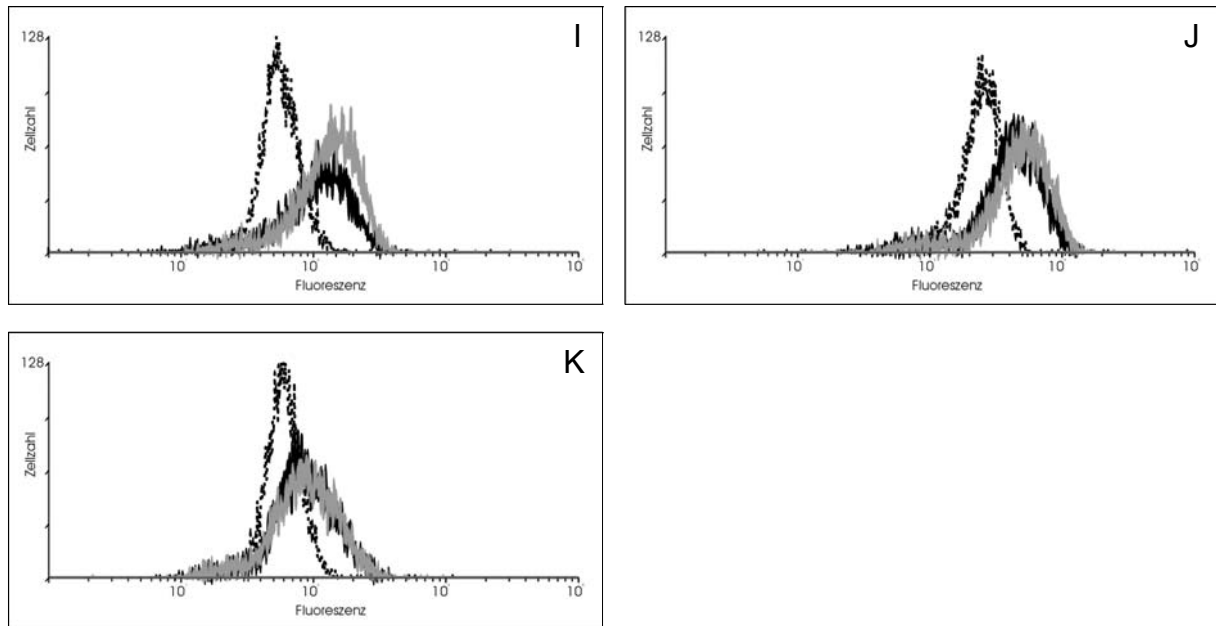


Abbildung 18b: Expression von EHV-1-Proteinen nach Infektion mit RacL11 (schwarz) bzw. L11Δ43 (grau)

- I: gM: Intrazellulärfärbung („anti-gM-Kaninchenserum“)
 J: UL11p: Intrazellulärfärbung („anti-UL11-Kaninchenserum“)
 K: UL34p: Intrazellulärfärbung („anti-UL34-Kaninchenserum“)

Aus Abbildung 18 a und b wird ersichtlich, dass eine Deletion des UL43-Leserahmens offensichtlich eine Auswirkung auf die Expression einzelner oberflächenständiger Glykoproteine wie das gC und das gp2 hat. Im Vergleich zur Expression der beiden Proteine auf der Oberfläche RacL11-infizierter Zellen war das Fluoreszenz-Signal auf L11Δ43-infizierten Zellen deutlich reduziert. Auch nach Öffnung der Zellen und anschließender IIF war eine verminderte Expression zu detektieren, allerdings war der Unterschied hier weniger ausgeprägt.

Die Expression der EHV-1-Proteine gB und gD hingegen war auf der Oberfläche RacL11- und L11Δ43-infizierter Zellen nahezu identisch, für gB, gM, UL11p und UL34p war auch intrazellulär kein Unterschied detektierbar. gD allerdings war nach Infektion mit L11Δ43 intrazellulär sogar deutlich stärker nachzuweisen. Zusammengenommen kann eine weniger starke Infektion L11Δ43-infizierter Zellen als mögliche Ursache des beobachteten Phänomens ausgeschlossen werden.

In Abbildung 19 sind die Mittelwerte dreier unabhängig voneinander auf NBL-6-Zellen durchgeführter Experimente graphisch zusammengefasst.

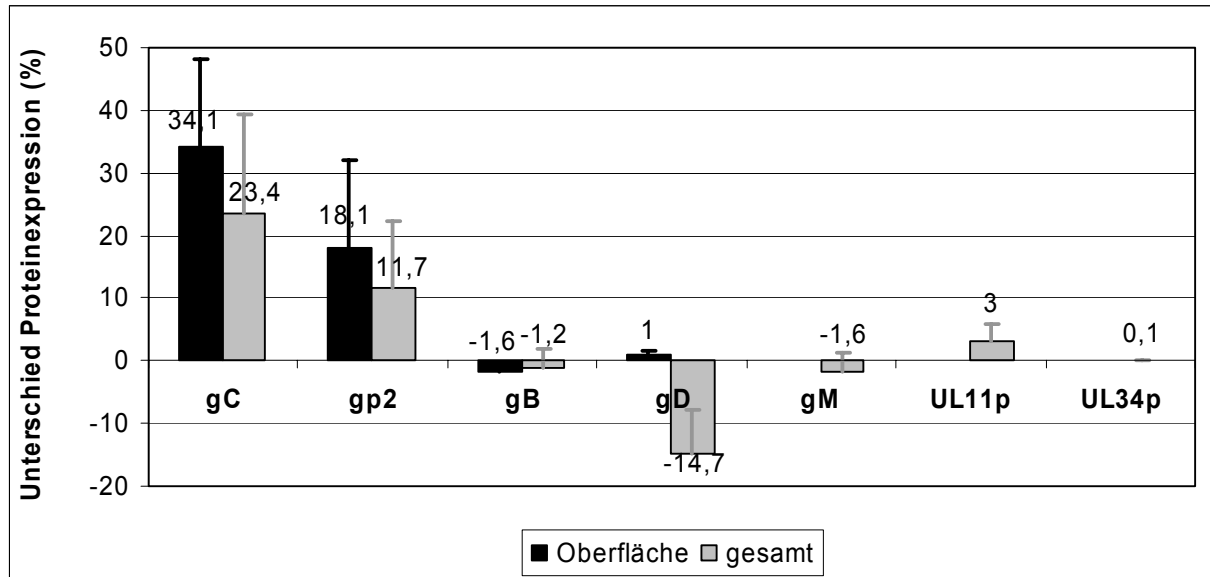


Abbildung 19: Relativer Unterschied der Proteinexpression RacL11- bzw. L11 Δ 43-infizierter NBL-6-Zellen (MOI 1 / 14 h p.i.)

Die mit Hilfe der Durchflusszytometrie erhaltenen Ergebnisse wurden ausgewertet, indem im Histogramm 96 % des Fluoreszenz 1-Signals L11 Δ 43-infizierter Zellen ausgegrenzt wurden und ab dieser Grenze das relative Fluoreszenz 1-Signal der RacL11-infizierten Zellen bestimmt wurde. Bei stärkerem Fluoreszenz 1-Signal auf mit L11 Δ 43 infizierten Zellen wurde der Marker entsprechend auf 96 % des Fluoreszenz 1-Signals der RacL11-infizierten Zellen gesetzt und ab diesem Grenzwert die relative Fluoreszenz 1 der L11 Δ 43-infizierten Zellen gemessen (im Balkendiagramm als negative Werte dargestellt). Aus den erhaltenen Prozentzahlen wurde der Mittelwert errechnet und graphisch dargestellt. Die Standardabweichung ist über den jeweiligen Balken aufgetragen.

Für die gC-Expression auf der Oberfläche RacL11- und L11 Δ 43-infizierter Zellen ergab sich demnach, dass im Mittel 34,1 % der RacL11-Messereignisse eine höhere Fluoreszenz aufwiesen als 96 % der L11 Δ 43-Messereignisse. Nach Öffnung der Zellen betrug die Differenz nur 23,4 %. Für die Messung der Expression des gD galt hingegen, dass 14,7 % der L11 Δ 43-infizierten Zellen eine stärkere Fluoreszenz aufwiesen als der Großteil (96 %) der RacL11-infizierten Zellen.

Bei Durchführung der Experimente auf Rk13-Zellen zeigte sich ein ähnliches Bild. Allerdings wirkte sich hier die Deletion des UL43-Leserahmens vor allem auf die Expression des gC aus. 23,2 % der Messereignisse auf der Oberfläche RacL11-infizierter Zellen wiesen in diesem Fall eine höhere Fluoreszenz auf als 96 % der Messereignisse auf L11 Δ 43-infizierten Zellen. Nach Öffnung der Zellen betrug der Unterschied immerhin noch 15 %. Das Fluoreszenz-Signal der anderen viralen Proteine, auch des gp2, ließ hingegen sowohl auf der Oberfläche als auch gesamt keine deutlichen Unterschiede zwischen RacL11- und L11 Δ 43-infizierten Zellen erkennen.

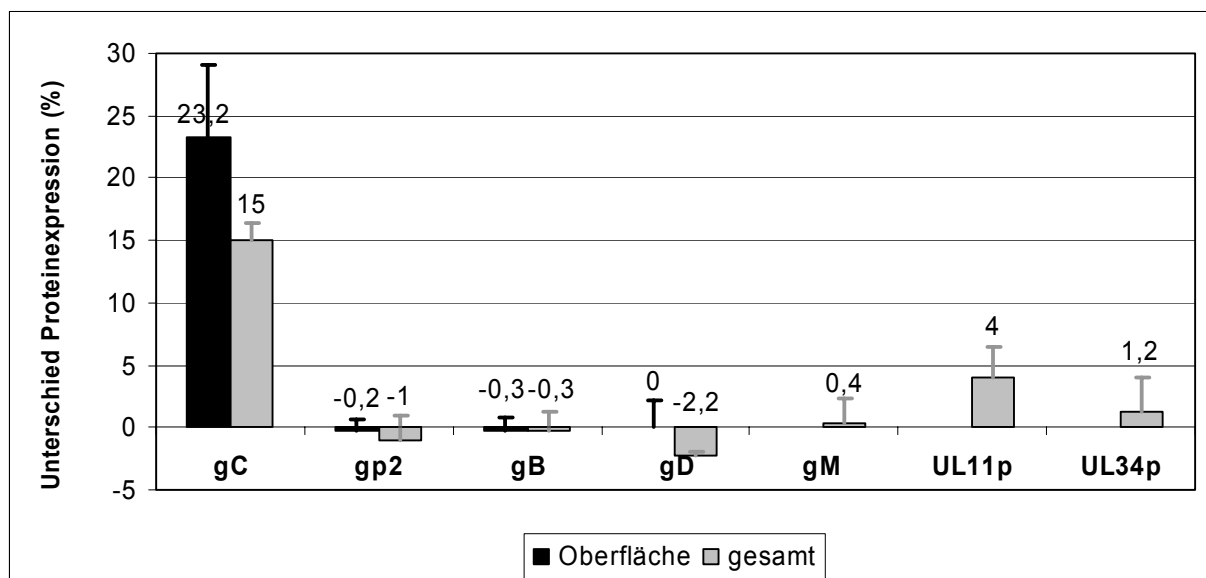


Abbildung 20: Relativer Unterschied der Proteinexpression RacL11 bzw. L11 Δ 43-infizierter Rk13-Zellen (MOI 1 / 14 h p.i.)

Darüber hinaus wurden Experimente mit dem EHV-1-Stamm RacH und dem rekombinanten Virus H Δ 43 durchgeführt. Auf NBL-6-Zellen zeigte sich ein ähnliches Muster wie nach Infektion mit RacL11 und seiner Rekombinante, allerdings waren die Unterschiede insgesamt moderater (Abb. 21). Bei Deletion des UL43-Leserahmens waren wie auf NBL-6 sowohl die gC- als auch die gp2-Expression beeinträchtigt, während die übrigen Proteine ein vergleichbares Fluoreszenz-Signal aufwiesen. Nach Oberflächenfärbung lag der Unterschied der gC-Expression zwischen RacH und H Δ 43 bei 28,8 %, gesamt bei 13,7 %. Die gp2-

Fluoreszenz war auf H Δ 43-infizierten Zellen um 9,6 % (OF) bzw. 4,1 % (gesamt) reduziert, während gD von diesen Zellen um 9,4 % stärker exprimiert wurde.

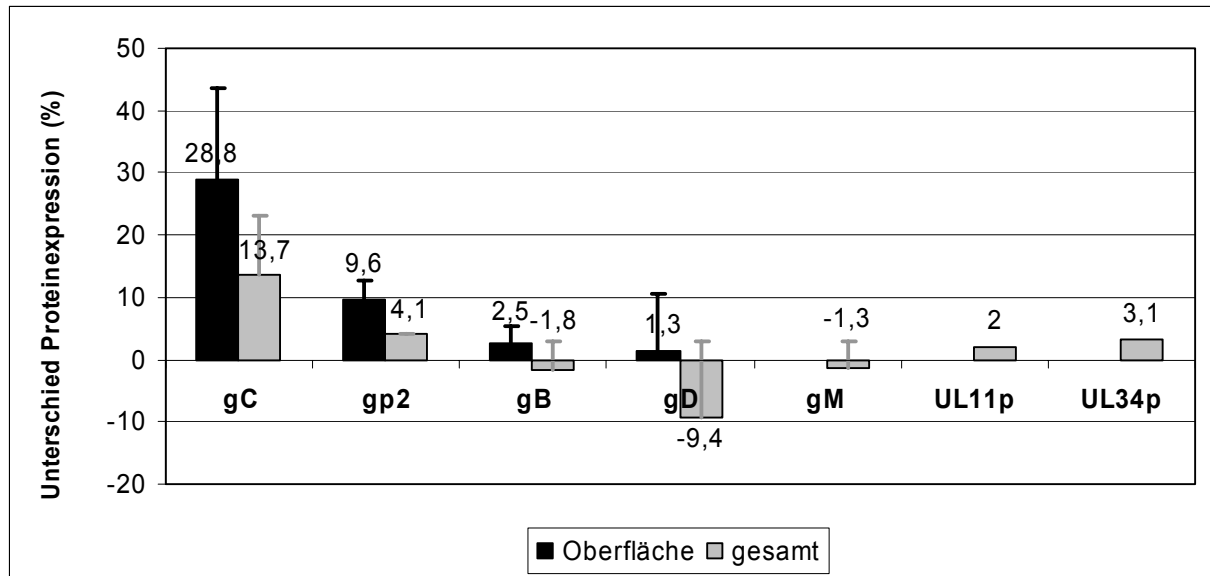


Abbildung 21: Relativer Unterschied der Proteinexpression RacH- bzw. H Δ 43-infizierter NBL-6-Zellen (MOI 1 / 14 h p.i.)

Bei Infektion von Rk13-Zellen mit RacH bzw. H Δ 43 konnte ebenfalls ein deutlicher Unterschied bezüglich der gC-spezifischen Fluoreszenz beobachtet werden. 38,5 % der RacH-Messereignisse wiesen auf der Oberfläche eine höhere Fluoreszenz auf als der Großteil der H Δ 43-Ereignisse, intrazellulär betrug der Unterschied 31,6 %. Allerdings war in diesem Fall auch die Fluoreszenz der übrigen Proteine auf RacH-infizierten Zellen gegenüber H Δ 43-infizierten Zellen leicht verstärkt, so dass bisher ein Einfluss durch einen Replikationsvorteil des Ausgangsvirus gegenüber dem rekombinanten Virus noch nicht ausgeschlossen werden konnte. Zur Sicherstellung müssen weitere Experimente folgen.

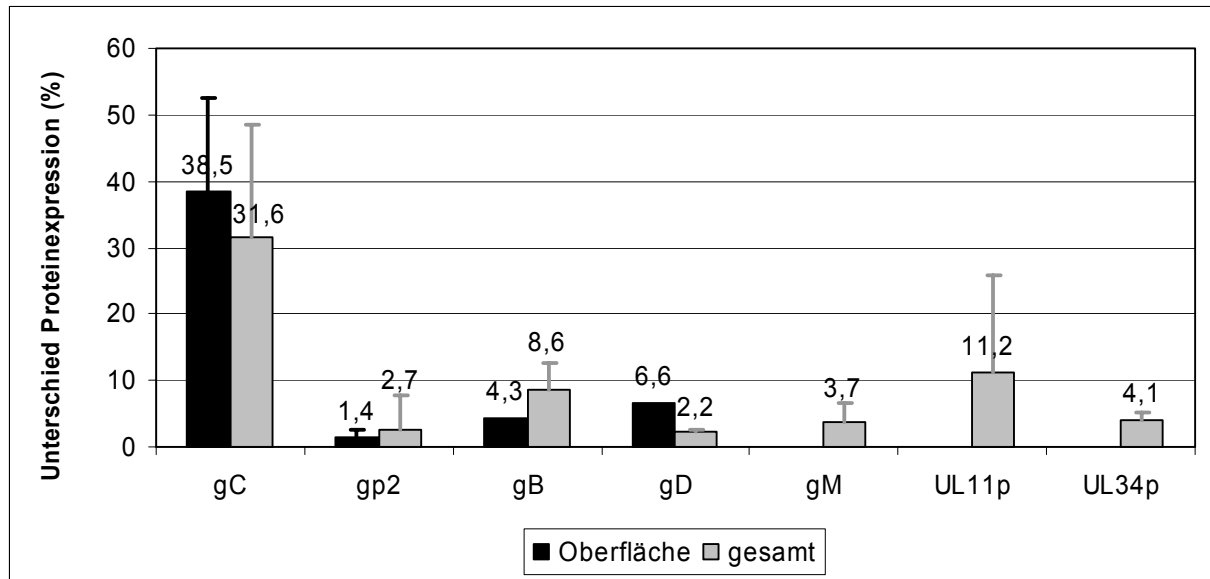
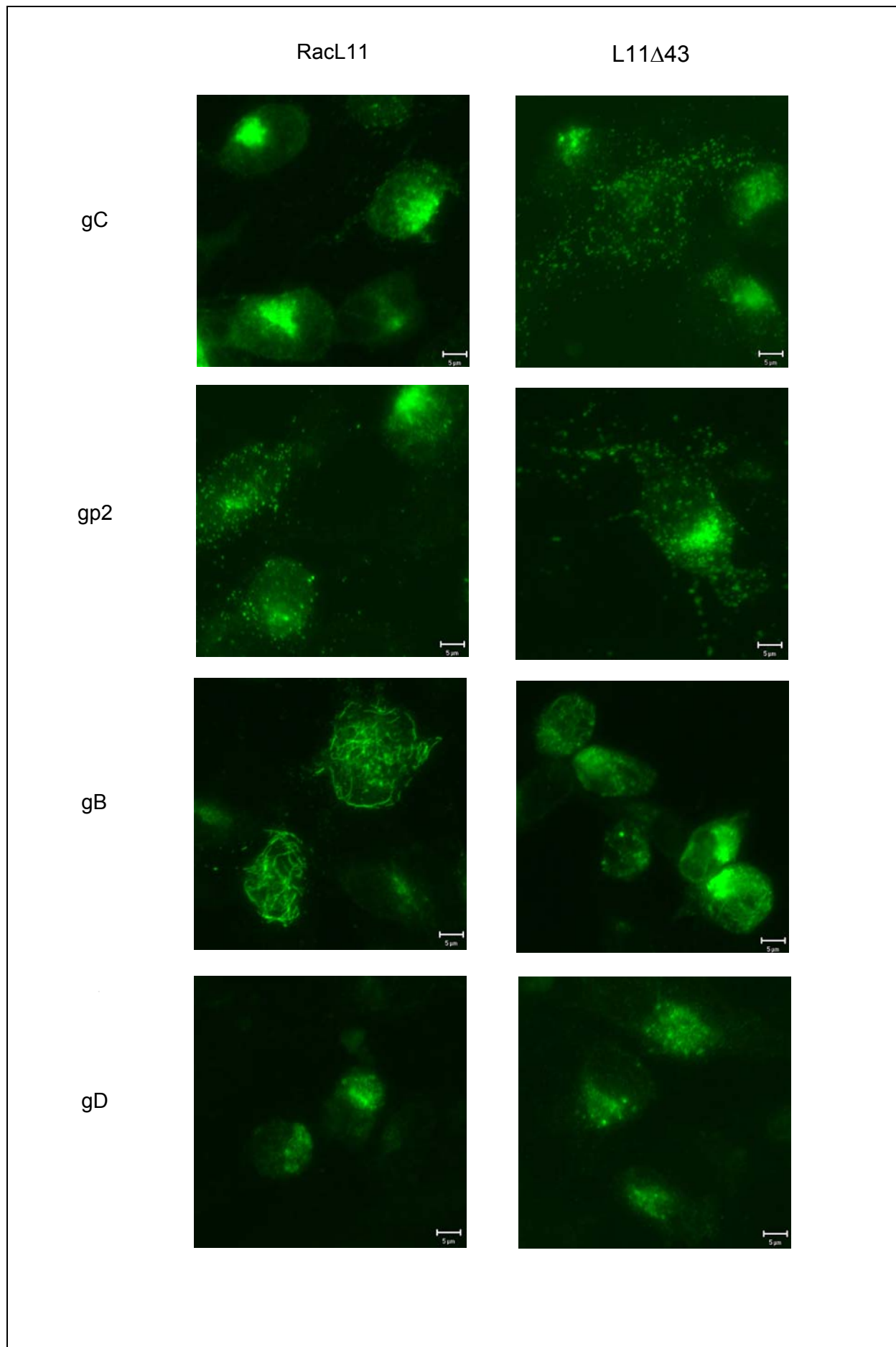


Abbildung 22: Relativer Unterschied der Proteinexpression RacH- bzw. H Δ 43-infizierter Rk13-Zellen (MOI 1 / 14 h p.i.)

4.4.2 Der Vergleich der Lokalisation verschiedener EHV-1-Proteine mittels Confocaler Laser Scanning-Mikroskopie

Um die mit Hilfe der Durchflusszytometrie erhaltenen Ergebnisse zu verifizieren und die Verteilung der verschiedenen Protein-spezifischen Fluoreszenzen in der infizierten Zelle vergleichen zu können, wurden Zellen in gleicher Weise für die mikroskopische Betrachtung infiziert und nach Fixierung, Öffnung und IIF mittels Confocaler Laser Scanning-Mikroskopie analysiert. Es stellte sich heraus, dass die durch Deletion des UL43-Leserahmens ausgelösten Veränderungen im Muster der Proteinexpression z.T. auch mikroskopisch nachvollziehbar waren.



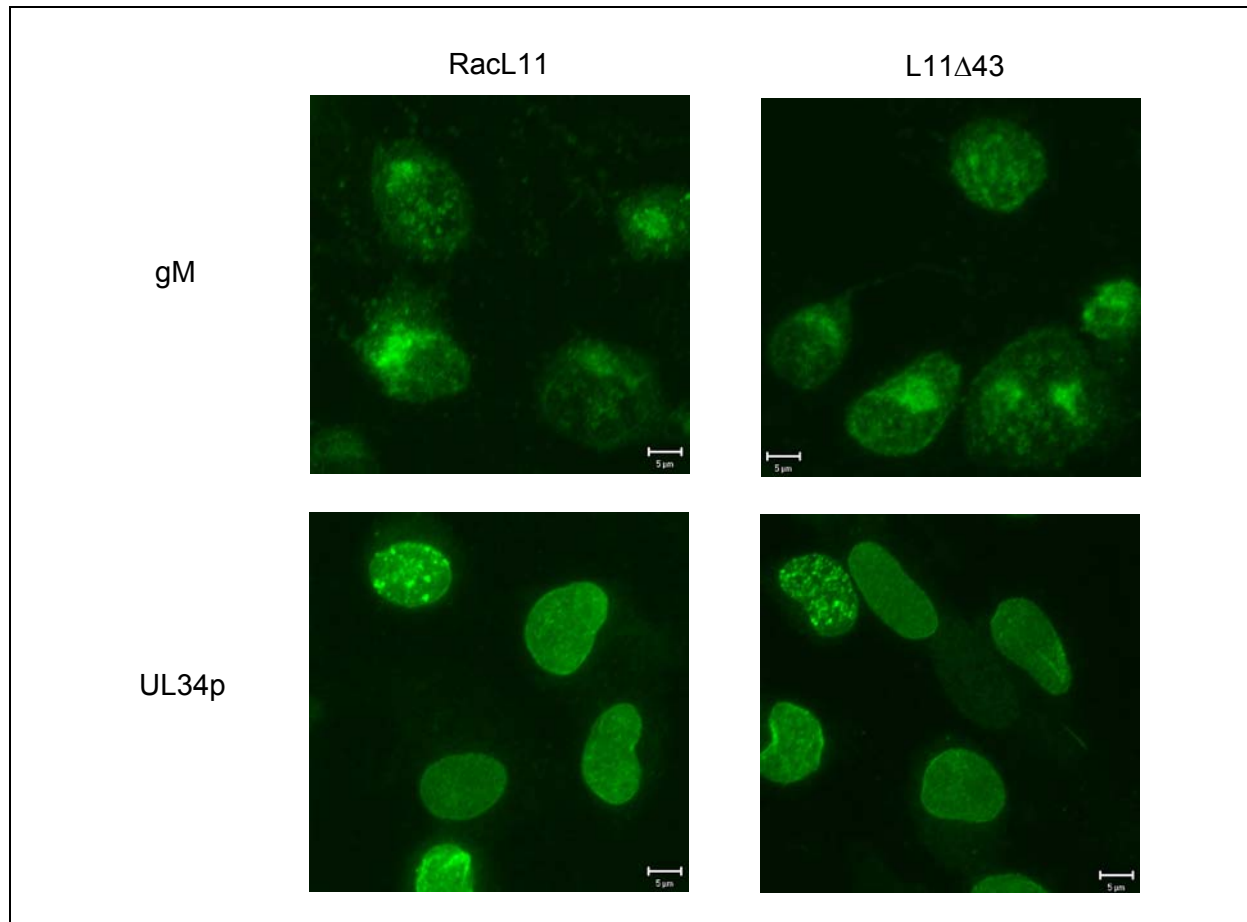


Abbildung 23: Confocale Laser Scanning-Mikroskopie - Darstellung viraler Proteine in RacL11- und L11Δ43-infizierten NBL-6-Zellen

NBL-6-Zellen wurden 2 Tage nach Einsaat mit RacL11 bzw. L11Δ43 infiziert (MOI 1). 14 Stunden nach Infektion wurden die Zellen fixiert, geöffnet und mit gegen die EHV-1-Proteine gC, gp2, gB, gD, gM, UL11p oder UL34p gerichteten Antikörpern inkubiert. Die Betrachtung und Dokumentation erfolgte mittels Confocaler Laser Scanning-Mikroskopie (400-fache Vergrößerung).

Wie aus Abbildung 23 ersichtlich wird, ist ein Unterschied im Fluoreszenzmuster der gC-Expression nach Deletion des UL43-Gens deutlich erkennbar. Bei Infektion mit RacL11 zeigte sich die gC-spezifische Fluoreszenz als sehr feine Pünktchen, die gleichmäßig über die Membran der Zellen verteilt und gelegentlich vor allem auf den Zellausläufern zu finden waren. Zudem deutete die Verteilung der Fluoreszenz auf eine Assoziation des Glykoproteins mit dem Golgi-Apparat und mit dem Netzwerk des ER hin. Nach Infektion der Zellen mit L11Δ43 zeigte sich ein deutlich verändertes Verteilungsbild. An der Zellmembran

der infizierten Zellen waren wesentlich gröbere Punkte auszumachen, die zudem weniger gleichmäßig verteilt erschienen als auf RacL11-infizierten Zellen. Wie bei RacL11 erinnerte die gC-Fluoreszenz-Verteilung an ER und Golgi-Apparat, allerdings schienen diese Organellen weniger stark zu leuchten bzw. waren bei einem Teil der Zellen nicht zu erkennen.

Die gp2-spezifische Fluoreszenz war sowohl nach Infektion mit RacL11 als auch mit L11Δ43 als fein- bis grobkörnige Punktierung in der Zellmembran zu detektieren. Das Protein schien zudem wie gC in der Gegend des Golgi-Apparates lokalisiert zu sein. RacL11-infizierte Zellen wiesen eine etwas feinere Verteilung des Gesamtfluoreszenzsignals auf, die z.T. netzartig strukturiert war und möglicherweise auf eine ER-Lokalisation zurückzuführen ist.

Auch das gB konnte auf der Oberfläche RacL11- bzw. L11Δ43-infizierter Zellen lokalisiert werden. Die erkennbaren Fluoreszenz-Punktchen waren jedoch in wesentlich geringerer Zahl vorhanden, deutlich kleiner als bei gC oder gp2 und v.a. auf Zellausläufern zu finden. Zudem war ein starkes gB-spezifisches Fluoreszenzsignal auszumachen, das aufgrund der Verteilung dem Golgi-Apparat zuzuordnen sein könnte, jedoch nur bei einem Teil der Zellen erkennbar war. Im Cytoplasma RacL11-infizierter Zellen waren, v.a. perinukleär, filamentöse Strukturen in Form von mehr oder weniger langen Fäden zu erkennen, die als Strukturen des ER interpretiert werden könnten. Diese fadenartigen Strukturen waren zum einen in L11Δ43-infizierten Zellen wesentlich seltener zu finden, zum anderen in diesen Zellen deutlich kürzer als bei Infektion mit RacL11. Auch wenn die durchflusszytometrisch messbare gB-Fluoreszenzstärke insgesamt keinen Unterschied zwischen RacL11- und L11Δ43-infizierten Zellen erkennen ließ, hat die Deletion des UL43 offensichtlich auch einen Einfluss auf das Verteilungsmuster des gB in infizierten Zellen.

Das Glykoprotein D war nach Infektion mit RacL11 sowie L11Δ43 als sehr feine Punktchen auf der Zelloberfläche zu detektieren. Im Cytoplasma fluoreszierten Golgi-Apparat-ähnliche Strukturen deutlich. Ein Grund für die deutlich verstärkt messbare Fluoreszenz in L11Δ43-infizierten Zellen war fluoreszenzmikroskopisch nicht nachvollziehbar, da keine Unterschiede im Fluoreszenzmuster zwischen RacL11- und L11Δ43-infizierten Zellen ersichtlich wurden.

Die gM-spezifische Fluoreszenz war nach Infektion mit RacL11 bzw. L11Δ43 in den Oberflächenmembranen der Zellen in Form von sehr vielen feinen punktförmigen Fluoreszenzherden detektierbar und schien zudem im Bereich des Golgi-Apparates lokalisiert zu sein. Auch hier konnte in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Durchflusszytometrie kein Unterschied zwischen der Infektion mit RacL11 oder L11Δ43 festgestellt werden.

Das UL34-Protein war wie erwartet hauptsächlich an den Kernmembranen der mit RacL11 und L11Δ43 infizierten Zellen zu finden. Diese ließen sich zu diesem späten Zeitpunkt nach Infektion als scharf begrenzte Strukturen mit mehr oder weniger unterschiedlich großen, punktförmigen Strukturen darstellen.

Die Lokalisation verschiedener viraler Proteine nach Infektion mit RacL11 bzw. L11Δ43 wurde vergleichend auch auf Rk13-Zellen analysiert. Dazu wurden die Zellen zwei Tage nach Einsaat mit einer MOI von 0,1 infiziert, 14 h p.i. fixiert und mit den verschiedenen Antikörpern inkubiert.

Glykoprotein C war in der gesamten Membran RacL11-infizierter Zellen in Form von relativ feinen Pünktchen detektierbar. Ein spezifisches Fluoreszenzsignal schien auch hier vom Golgi-Apparat zu stammen. Auf L11Δ43-infizierten Zellen hingegen waren die auf der Membran vorhandenen Pünktchen in ihrer Anzahl insgesamt reduziert, eher einzeln gelegen und deutlich größer. Die an den Golgi-Apparat erinnernde Fluoreszenz war weniger intensiv. Somit konnte auch auf Rk13-Zellen der Einfluss einer UL43-Deletion auf das Verteilungsmuster des gC fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden.

Bei Inkubation der Zellen mit gegen das gp2 gerichtetem Antikörper zeigte sich auf RacL11- und L11Δ43-infizierten Zellen ein ähnliches Bild. Das Protein war in relativ groben Fluoreszenzherden auf der Zelloberfläche lokalisierbar, zudem schien es wiederum mit dem Golgi-Apparat assoziiert zu sein.

Wie auf NBL-6-Zellen ließ sich die gB-spezifische Fluoreszenz nach Infektion mit RacL11 bzw. L11Δ43 als feine Granulierung der Membran sowie in Form einer Struktur, die

vermutlich den Golgi-Apparat reflektierte, detektieren. Eine Infektion der Zellen mit RacL11 führte auch hier zu filamentösen Strukturen im Cytoplasma der Zelle. Allerdings war das Auftreten dieser Filamente deutlich weniger ausgeprägt als in NBL-6-Zellen, nur wenige Zellen wiesen ein stark filamentöses Muster auf. In L11 Δ 43-infizierten Rk13 hingegen waren zum einen kaum und wenn dann sehr kurze fadenförmige Strukturen zu erkennen. Auch auf Rk13-Zellen hat die Deletion des UL43 offensichtlich einen Einfluss auf die Verteilung des gB.

gD war fein granuliert auf der Zelloberfläche zu finden. Zudem schien es im Golgi-Apparat lokalisiert zu sein, wo es teilweise auch in größeren Fluoreszenzherden angeordnet war. Ein Unterschied zwischen der Verteilung auf RacL11- bzw. L11 Δ 43-infizierten Zellen war nicht erkennbar.

Die Proteine gM und UL34p ließen in Rk13 ein mit ihrem Verteilungsmuster in NBL-6-Zellen identisches Fluoreszenzbild erkennen.

Somit konnte sowohl auf NBL-6- als auch auf Rk13-Zellen eine Beeinflussung der Verteilung vor allem des gC und des gB nach Deletion des UL43-Gens mikroskopisch nachgewiesen werden. Wodurch der durchflusszytometrisch messbare Unterschied der Fluoreszenzstärke nach gp2-Färbung RacL11- und L11 Δ 43-infizierter Zellen bedingt sein könnte, konnte allerdings mit Hilfe der Confocalen Laser Scanning-Mikroskopie nicht geklärt werden. Es ist aber auch fast unmöglich, mit dem bloßen Auge die Intensität eines Fluoreszenzsignals zu quantifizieren. Das gleiche gilt für den Fluoreszenzanstieg nach gD-Färbung L11 Δ 43- und H Δ 43-infizierter NBL-6-Zellen. Um eine Assoziation der einzelnen Proteine mit dem Golgi-Apparat sowie mit dem ER definitiv nachweisen zu können, müssten in weiteren Experimenten Co-Färbungen mit gegen Golgi- bzw. ER-Markerproteine gerichteten Antikörpern durchgeführt werden. Allerdings ist von vorangegangenen Arbeiten bekannt, dass die Glykoproteine gB, gC, gD, gp2 und gM, ebenso wie UL11p, im Laufe ihrer Prozessierung in RacL11-infizierten Rk13-Zellen mit dem TGN koloalisieren.

4.4.3 Die Generierung einer UL43-myc-C-exprimierenden Zelllinie

Um nachzuweisen, dass die beobachteten Änderungen der Fluoreszenzintensität bzw. der Verteilung einzelner viraler Proteine in infizierten Zellen ausschließlich auf die Nicht-Expression des UL43-Proteins zurückzuführen sind, sollte eine Zelllinie generiert werden, die das UL43-Protein konstitutiv exprimiert. Es wurde ein C-myc-Fusionsprotein gewählt, da keine Antikörper gegen UL43p zur Verfügung stehen und so eine Selektion auf exprimierende Zellklone ermöglicht werden sollte. Es sollte untersucht werden, ob die beobachteten Veränderungen nach Deletion des UL43-Gens durch das *in trans* zur Verfügung-Stellen des UL43-myc-Fusionsproteins komplementiert werden können. Dazu wurde das Plasmid pcDNA3.1UL43/Myc-HIS(+)C generiert, das die Expression eines UL43-myc-His-Fusionsproteins unter Kontrolle des HCMV-IE-Promotors erlaubt (Abb. 24).

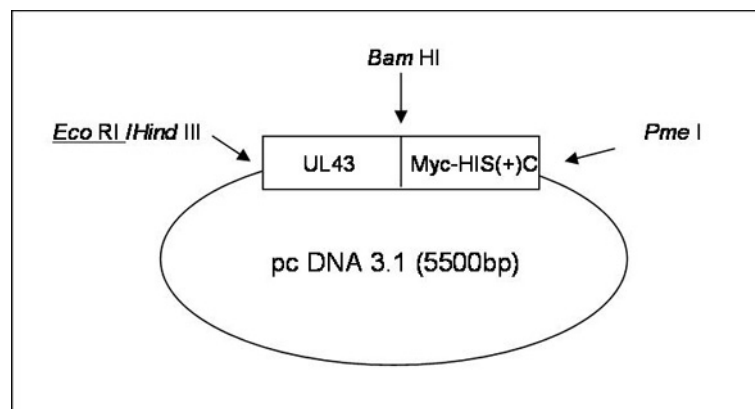


Abbildung 24: UL43-ORF (1205 bp) im Plasmid „pcDNA3.1/Myc-HIS(+)C“

Zur Generierung einer Zelllinie, die das gesamte UL43-C-myc-Fusionsprotein konstitutiv exprimiert, wurden Rk13-Zellen mit der aufgereinigten Plasmid-DNS transfiziert. Da der verwendete Vektor ein Resistenzgen zur Inaktivierung von Aminoglykosid-Antibiotika besitzt, konnte durch Zugabe von Geneticin zum Zellkulturmedium auf stabil transfizierte Zellen selektiert werden. Die Expression des UL43-C-myc-Fusionsproteins wurde durch IIF-Färbung mit dem Antikörper „Anti-C-myc“ überprüft. Exprimierende Zellklone wurden isoliert

und nach Unterklonierung nochmals mittels IIF auf C-myc-Expression kontrolliert. Die entstandene Zelllinie wurde als Rk43-myc-C bezeichnet.

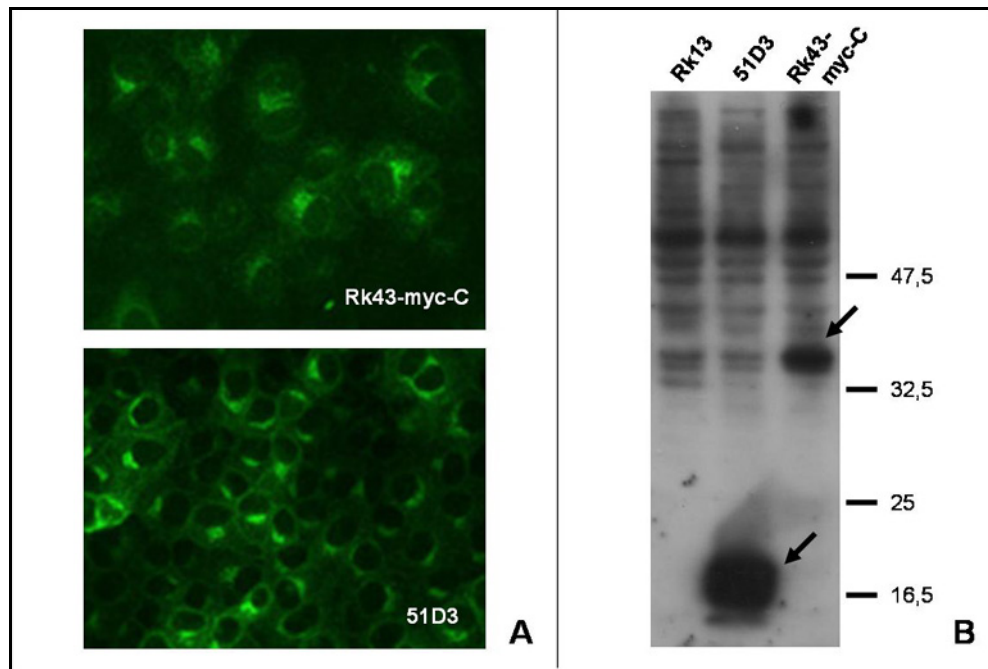


Abbildung 25 A: IIF-Darstellung der Zelllinien Rk43-myc-C und 51D3

Rk43-myc-C-Zellen wurden einen Tag nach Einsaat fixiert und mit „anti-C-myc“-Antikörper inkubiert. Als Positivkontrolle für den Antikörper diente die Zelllinie 51D3 (Schimmer, 2002), die das EHV-1-UL11p als C-myc-Fusionsprotein exprimiert.

Abbildung 25 B: Western Blot-Analyse der generierten Zelllinie

Lysate von zwei Tage gewachsenen Rk13-, 51D3- und Rk43-myc-C-Zellen wurden im PAGE-Gel aufgetrennt und im Western Blot untersucht. Mit Hilfe des Antikörpers „anti-C-myc“ wurden die UL11-C-myc- (51D3) bzw. UL43-C-myc- (Rk43-myc-C) Fusionsproteine detektiert. Rk13-Zellen dienten als Negativkontrolle. Spezifische Banden sind mit Pfeilen markiert. Die Größen eines Proteinstandards sind am rechten Bildrand in kDa angezeigt.

Das im Western Blot mit Hilfe des „anti-C-myc“-Antikörpers detektierte UL43-myc-C-Fusionsprotein erschien mit ca. 38 kDa um über 10 kDa kleiner als es das berechnete Molekulargewicht von 49,5 kDa erwarten ließ. Die veränderten Laufeigenschaften stehen vermutlich damit im Zusammenhang, dass es sich hierbei um ein multipel hydrophobes

Protein handelt, das sich durch SDS-Denaturierung möglicherweise nur ungenügend linearisieren lässt (Stenke, 2006).

4.4.4 Die Expression von EHV-1-Proteinen auf mit L11 Δ 43 infizierten Rk43-myc-C-Zellen

Um zu untersuchen, ob durch Infektion der UL43-myc-C-exprimierenden Zelllinie mit L11 Δ 43 eine Komplementierung der beschriebenen, auffälligen Veränderungen in der Fluoreszenzintensität der EHV-1-Proteine erreicht werden konnte, wurden RacL11- und L11 Δ 43-infizierte Rk13- und Rk43-myc-C-Zellen parallel mit Antikörpern gegen die Proteine gC, gp2, gB, gD, gM, UL11p und UL34p inkubiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Ergebnisse für die gC-Expression sind in Abbildung 26 gezeigt.

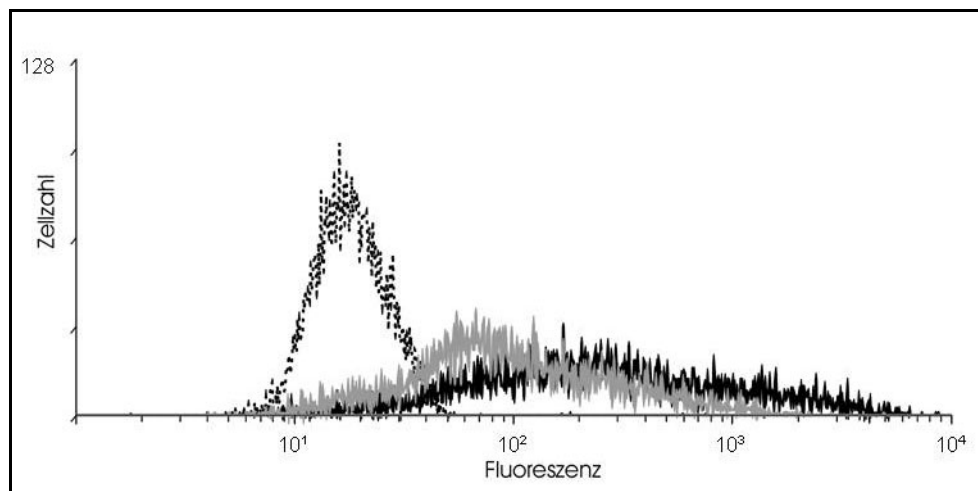


Abbildung 26: gC-spezifische Fluoreszenz auf Rk43-myc-C-Zellen nach Infektion mit RacL11 bzw. L11 Δ 43

Rk43-myc-C-Zellen wurden einen Tag nach Einsaat mit RacL11 (schwarz) bzw. L11 Δ 43 (grau) infiziert (MOI 1). 14 h nach Infektion wurden die Zellen mit dem anti-gC-Antikörper inkubiert (Oberflächenfärbung) und die Expression des gC im Durchflusszytometer bestimmt. Das Fluoreszenzsignal auf nicht-infizierten Zellen ist gestrichelt dargestellt.

Wie aus Abbildung 26 ersichtlich wird, ist der Fluoreszenzunterschied der gC-Expression zwischen der Infektion mit RacL11 und L11 Δ 43 auch auf der rekombinanten Zelllinie deutlich erkennbar. Sowohl auf der Oberfläche als auch nach Öffnung der Zellen zeigte sich bei Infektion der Rk43-myc-C-Zellen mit L11 Δ 43 eine im Vergleich zu RacL11 verringerte Fluoreszenz. Im dargestellten Experiment wiesen bei Oberflächenfärbung 18,6 % der L11-Messereignisse eine stärkere Fluoreszenz auf als 96 % der L11 Δ 43-Messereignisse. Nach Öffnung der Zellen betrug die prozentuale Differenz 14 %. Auf parallel infizierten Rk13-Zellen war auf der Oberfläche ein Fluoreszenzunterschied von 21,9 %, insgesamt von 14, 1 % messbar. Für die anderen untersuchten Proteine konnte sowohl auf Rk13-Zellen als auch auf der Zelllinie kein bedeutsamer Unterschied bezüglich der Fluoreszenzstärke zwischen RacL11- und L11 Δ 43-Infektion festgestellt werden (vgl. Abb. 20).

Eine Komplementierung der nach Infektion der Zellen mit UL43-deletiertem Virus messbaren Veränderungen im Fluoreszenzmuster konnte somit auf der generierten Zelllinie nicht nachgewiesen werden. In mit derselben Passage der Zelllinie durchgeführten IIF-Färbungen zeigte allerdings nur noch ca. jede fünfzigste Zelle eine C-myc-spezifische Fluoreszenz, d.h. nur noch ca. jede fünfzigste Zelle exprimiert das UL43-Fusionsprotein. Um eine deutliche Komplementierung des Defekts zu erzielen, ist eine wesentlich stärkere Expression des fehlenden Proteins notwendig.

5. DISKUSSION

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss von EHV-1 auf die MHC I-/II-Expression equiner Zellen untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde die MHC I- und II-Oberflächenexpression auf equinen Zellen, Zellkulturzellen und frisch isolierten PBMCs, nach Infektion mit verschiedenen EHV-1 und EHV-4-Isolaten analysiert. Die ersten Ergebnisse zeigten, dass die *in vitro*-Infektion von equinen PBMCs deutlich anders ablief als entsprechende Infektionen von Zellkulturzellen, wurde auch die EHV-1-Infektion der PBMCs genauer charakterisiert.

Eines der Hauptziele dieser Arbeit stellte die Abklärung der Hypothese dar, dass die EHV-1-UL11- und UL43-Proteine für die Herunterregulierung von MHC I- und /oder MHC II-Molekülen von der Zelloberfläche EHV-1-infizierter Zellen eine wichtige Rolle spielen könnten. Deshalb wurden Zellen parallel mit RacL11 und den jeweiligen Deletionsmutanten L11 Δ 11 bzw. L11 Δ 43 infiziert und die Fähigkeit zur Verringerung der MHC I- oder MHC II-Präsentation vergleichend analysiert.

Im Verlauf dieser Arbeiten stellte sich interessanterweise heraus, dass eine Deletion des UL43-Gens zwar keine Auswirkungen auf die MHC I- und II-Oberflächenexpression hat, sich aber offensichtlich auf die Expression anderer EHV-1-Proteine auswirkt. Auch diese Beobachtungen wurden in weiteren Experimenten abgeklärt.

5.1 Der Einfluss von EHV-1-Infektionen auf die MHC I- bzw. MHC II-Expression equiner Zellen

Die MHC I-Expression auf equinen Zellen nach Infektion mit EHV-1

Wie bereits in der Literatur beschrieben, führt eine Infektion mit EHV-1 zu einer deutlichen Verringerung der MHC I-Expression auf der Zelloberfläche (Rappocciolo et al., 2003; Ambagala et al., 2004). Diese Abnahme konnte auch im hier verwendeten experimentellen System nach Infektion von NBL-6- und EEL-Zellen mit dem EHV-1-Stamm RacL11 bestätigt

werden. Ein fast komplettes Verschwinden jeglicher MHC I-Oberflächenexpression, wie es durch Rappocciolo et al. ab 24 h p.i. nach Analyse von EHV-1-infizierten NBL-6-Zellen mit einem der auch hier verwendeten Antikörper („PT85A“) beschrieben wurde, konnte allerdings nicht beobachtet werden. Die Intensität der MHC I-spezifischen Fluoreszenz nahm zwar im Verlauf der Infektion immer deutlicher ab, im Vergleich zur Isotypkontrolle waren aber in verschiedenen Experimenten, abhängig vom verwendeten Antikörper, meist auch zu späten Zeitpunkten p.i. über 50 % der Zellen als MHC I-positiv anzusehen. Allerdings wurden die Zellen durch Rappocciolo et al. mit einer wesentlich höheren MOI infiziert. Darüber hinaus ist auch denkbar, dass eine Infektion mit dem EHV-1-Stamm AB4/14 zu einer stärkeren Reduktion der MHC I-Expression führt als mit dem hier verwendeten Laborstamm RacL11 (s.u.).

Die Verringerung der MHC I-Oberflächenexpression war mit allen drei in dieser Arbeit eingesetzten MHC I-Antikörpern gleichermaßen detektierbar, während Rappocciolo et al. je nach verwendetem Antikörper eine unterschiedliche Herunterregulierung beobachteten. Der Verdacht, dass der Verlust durch einen möglicherweise Allel- oder Locus-spezifischen Mechanismus ausgelöst wird, ließ sich durch die hier durchgeführten Experimente somit nicht vertiefen. Da die Allel-Spezifität der in dieser Studie verwendeten Antikörper noch nicht charakterisiert ist, ist es nicht auszuschließen, dass alle drei sogar an das gleiche Epitop auf equinen MHC I-Molekülen binden, während die von Rappocciolo et al. eingesetzten Antikörper vermutlich unterschiedliche Epitope erkennen.

Auch auf isolierten equinen PBMCs ließ sich nach *in vitro*-Infektion mit RacL11 eine deutliche Verringerung der MHC I-Expression beobachten, die in Relation zur Zeit p.i. abnahm. Van der Meulen et al. (2006a) konnten durch Analyse der Zellen mit dem Antikörper „PT85A“ ebenfalls eine Reduktion der MHC I-Expression auf *in vitro*-infizierten equinen PBMCs detektieren. Allerdings war diese Verringerung nur zu früheren (6 und 9 h), aber nicht zu späten (12 und 24 h) Zeitpunkten nach Infektion zu beobachten. Ursächlich für diese abweichenden Ergebnisse könnten möglicherweise Unterschiede in der Anzahl der infizierten Zellen oder auch wiederum im verwendeten Virusstamm sein. Im Rahmen der in

dieser Arbeit durchgeführten Experimente konnte im Verlauf der Infektion eine zunehmende Verringerung der MHC I-Expression detektiert werden, obwohl der Prozentsatz infizierter Blutzellen zu späteren Zeitpunkten p.i. nicht deutlich anstieg (Kapitel 4.3).

Die im Vergleich zu späteren Experimenten (Kapitel 4.3) hohe Infektionsrate der PBMCs in den für die Untersuchungen zur MHC I- und II-Herunterregulierung gezeigten Experimenten ist vermutlich darin begründet, dass die Blutzellen zunächst anders infiziert wurden. Auf ein Vorkühlen der Zellen und eine Prä-Inkubation von 90 Minuten bei 4°C wurde verzichtet, die Inkubation erfolgte ab dem Zeitpunkt 0 bei 37°C. Zudem wurde das Virus für die gesamte Inkubationszeit im Medium belassen. Da vor Inkubation der Zellen mit dem Antikörper im Vergleich zu den späteren Experimenten weniger Waschschrte erfolgten, ist anzunehmen, dass die Antigene von noch an die Zellen gebundenen, nicht-infektiösen Viruspartikeln oder –Bruchstücken ebenfalls erfasst wurden und somit zur Vortäuschung einer höheren Proteinexpression geführt haben. Um also eine sichere Aussage über die Anzahl Virusantigen-positiver Zellen in Relation zur MHC I-Herunterregulierung treffen zu können, müssten diese Experimente entsprechend der im Laufe dieser Arbeit entwickelten Infektionsmethoden wiederholt werden.

Die MHC II-Expression auf equinen Zellen nach Infektion mit EHV-1

MHC II wird nur auf professionellen Antigen-präsentierenden Zellen wie B-Lymphozyten, Monozyten, dendritischen Zellen und Thymusepithel konstitutiv exprimiert. Wie durch Collins et al. (1984) beschrieben wurde, kann aber durch Zusatz von Interferon- γ auf einer Vielzahl von humanen Zelltypen die Expression von MHC II-Molekülen hervorgerufen werden. Dies wurde in dieser Arbeit auch für equine Zellen bestätigt. Sowohl auf NBL-6- als auch auf ETCC-Zellen ließ sich durch Zusatz von equinem IFN- γ zum Zellkulturmedium eine deutliche MHC II-Expression induzieren, die mit zunehmender Zeit nach IFN- γ -Zugabe deutlich anstieg. Eine Infektions-bedingte Beeinträchtigung der MHC II-Oberflächenexpression auf Zellkultur war bisher nur für ein Mitglied des Genus Varicellovirus beschrieben worden

(Abendroth und Arvin, 2001). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigten, dass auch eine Infektion mit EHV-1 zu einer deutlichen Beeinträchtigung der IFN- γ -induzierten Expression von MHC II-Molekülen auf der Oberfläche von NBL-6- und ETCC-Zellen führt. Dies setzte allerdings voraus, dass die Zellen zuerst infiziert und anschließend mit IFN- γ behandelt wurden. Die Beobachtung, dass eine Infektion der Zellen nach Zusatz von Interferon- γ nicht zu einer Reduktion der MHC II-Expression führt, wurde auch durch Abendroth und Arvin gemacht. Dies könnte nach Wiertz et al. (2007) darauf zurückzuführen sein, dass aufgrund der relativ langen Halbwertszeit von MHC II-Molekülen trotz einer Beeinträchtigung der Präsentation viraler Antigene durch neu synthetisierte MHC II-Moleküle nach der Infektion zunächst eine normale Oberflächenexpression dieser Moleküle messbar bleibt.

Um eine Aussage darüber zu treffen, ab welchem Zeitpunkt nach Infektion eine Beeinträchtigung der MHC II-Präsentation erkennbar wird, müssten weitere Experimente durchgeführt werden. Allerdings ist dies mit der Schwierigkeit verbunden, dass zu frühen Zeitpunkten nach der Infektion die IFN- γ -Zugabe aufgrund der dann noch kurzen Induktionszeit auch auf nicht-infizierten Zellen vermutlich noch zu keiner ausreichenden MHC II-Expression führen würde.

Nach Infektion von equinen PBMCs mit RacL11 wurde deutlich, dass EHV-1 auch mit der MHC II-Oberflächenexpression auf PBMCs interferiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion war eine Abnahme des MHC II-spezifischen Fluoreszenzsignals zu beobachten, die allerdings im Vergleich zur Reduktion der MHC I-Expression eher gering ausfiel und sich auch zu späten Zeitpunkten nach Infektion nicht weiter steigerte. Eventuell lässt sich auch diese Beobachtung mit der relativ langen Halbwertszeit von MHC II-Molekülen erklären, wobei eine Halbwertszeit von über 42 h äußerst unwahrscheinlich ist. Denkbar wäre jedoch, dass auf equinen PBMCs nach der Infektion nur eine geringe Reduktion der MHC II-Oberflächenexpression erkennbar wird, da auf den Blutzellen möglicherweise andere MHC II-Allele reguliert werden als auf NBL-6-Zellen. Auch über die Allel-Spezifität der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Anti-MHC II-Antikörper liegen bisher keine Daten vor. Daher wäre

es möglich, dass eine deutlichere Herunterregulierung der MHC II-Oberflächenexpression bei Analyse der Zellen mit den verwendeten Antikörpern lediglich nicht offensichtlich wird, da die Verringerung eventuell hauptsächlich andere, mit diesen Antikörpern nicht detektierbare MHC II-Allele betrifft. Diese Vermutung ließe sich auch durch die Beobachtung stützen, dass die Detektion der MHC II-Expression mit den drei verschiedenen verwendeten Anti-MHC II-Antikörpern z.T. zu unterschiedlichen Ergebnissen bezüglich der Stärke der Reduktion des MHC II-Signals auf den infizierten PBMCs führte (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse könnten ebenfalls darauf zurückzuführen sein, dass infektionsbedingt bestimmte Typen von MHC II-Molekülen stärker in ihrer Expression beeinträchtigt sind als andere und die drei verwendeten Antikörper eventuell unterschiedliche MHC II-Epitope detektieren.

Experimente mit Brefeldin A und Cycloheximid zeigten, dass auch die meisten MHC I-Moleküle eine relativ lange Halbwertszeit besitzen und auf der Oberfläche equiner NBL-6-Zellen für über 24 h stabil sind (Rappocciolo et al., 2003). In Folge stellt sich daher die Frage, weshalb bereits ab 8 h p.i. eine deutliche Abnahme der MHC I-Expression auf EHV-1-infizierten Zellen zu beobachten ist. Offensichtlich gibt es neben einer Hemmung der Oberflächenexpression neu synthetisierter MHC I-Moleküle weitere Mechanismen, die für eine Entfernung bereits vorhandener MHC I-Moleküle von der Zelloberfläche sorgen. Rappocciolo et al. schlugen dafür die Endozytose von Oberflächen-ständigen MHC I-Molekülen vor. Nach den eigenen Ergebnissen auf equinen PBMCs scheinen derartige Mechanismen im Falle der MHC II-Präsentation nicht vorzukommen. Allerdings muss diese Hypothese durch weitere Experimente abgesichert werden.

Die Auswirkungen einer Infektion mit aktuellen EHV-1-Isolaten auf die MHC I- bzw. II-Expression equiner Zellen

Bei einem Vergleich des Einflusses einer Infektion mit dem EHV-1-Stamm RacL11 (Abort, Polen, 1958) auf die MHC I-Expression mit dem der aktuelleren EHV-1-Isolate O834 (Myeloencephalopathie, Bayern, 1999) und E216 (Abort, Bayern, 2006) zeigte sich

interessanterweise, dass eine Infektion von NBL-6-Zellen mit den beiden neueren Isolaten zu einer deutlich stärkeren Herunterregulierung der MHC I-Präsentation führte. Weder das Genom von RacL11 noch das der neuen Isolate ist bisher komplett sequenziert, allerdings sind einige Abweichungen in der RacL11-Sequenz gegenüber der veröffentlichten Sequenz des EHV-1-Stammes AB4 bereits bekannt. Es ist wahrscheinlich, dass eine dieser genomischen Variationen auch ein Gen betrifft, das Einfluss auf die MHC I-Präsentation nimmt. Das UL49.5 kann hierbei bereits ausgeschlossen werden, so dass diese Experimente auch bestätigen, dass es noch weitere in die MHC I-Oberflächen-Präsentation involvierte virale Genprodukte geben muss. Allerdings ist RacL11 nach wie vor sowohl für Versuchstiere als auch für den Wirt voll pathogen (Mayr et al., 1968). Ein Unterschied in der Beeinflussung der MHC I-Expression zwischen den Isolaten E216 und O834 war dagegen nicht festzustellen. Dies lässt darauf schließen, dass durch die beiden Stämme trotz unterschiedlicher Krankheitsbilder identische Strategien zur Immunmodulation angewandt werden. Auch auf equinen PBMCs ließ sich nach Infektion mit EHV-1 O834 bzw. E216 eine deutliche Verminderung der MHC I-Präsentation beobachten.

In ersten Experimenten zeigte sich, dass die MHC II-Expression auf mit IFN- γ behandelten NBL-6-Zellen nach Infektion mit EHV-1 O834 bzw. E216 in vergleichbarem Ausmaß eingeschränkt war wie nach Infektion mit RacL11. Da bereits eine Infektion mit RacL11 eine ausgeprägte Blockierung der MHC II-Präsentation hervorruft, ist eine wesentlich stärkere MHC II-Expressions-Modulation nach Infektion mit den Feldisolaten auch nicht zu erwarten.

Die Auswirkungen einer Deletion der UL11- und UL43-Gene auf die MHC I-/II-Expression

Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit stellte die Beantwortung der Frage dar, ob die EHV-1-Proteine UL11p und UL43p einen Einfluss auf die Reduktion der MHC I-/II-Oberflächenexpression auf infizierten equinen Zellen nehmen. Durch parallele Infektion von NBL-6-Zellen mit RacL11 sowie mit den rekombinanten Viren L11 Δ 11 und L11 Δ 43 konnte gezeigt werden, dass eine Deletion des UL11- bzw. UL43-Gens offensichtlich keinen

Einfluss auf die Fähigkeit des Virus hat, eine Herunterregulierung der MHC I-Expression auf der Zelloberfläche zu bewirken. Darüber hinaus wurde ersichtlich, dass das Virus auch nach Deletion des UL11- bzw. UL43-Gens in der Lage ist, die IFN- γ -induzierte Expression von MHC II-Molekülen wesentlich zu beeinträchtigen.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die EHV-1-Proteine UL11p und UL43p für die Herunterregulierung der MHC I- und II-Expression auf EHV-1-infizierten Zellen keine wesentliche Rolle spielen. Offensichtlich dient die dynamische Zirkulierung des UL11-Proteins zwischen Golgi-Apparat und Plasmamembran, die für das UL11-Protein von HSV-1 bereits nachgewiesen wurde (Bowzard et al., 2000; Loomis et al., 2001) und für das EHV-1-UL11p vermutet wird, einem anderen Zweck als der Reduktion der MHC I- bzw. MHC II-Oberflächenkonzentration. Da sowohl zu frühen als auch zu späten Zeitpunkten nach Infektion keine Unterschiede im Grad der Herunterregulierung zu erkennen waren, ist auch ein Einfluss der verschiedenen Genprodukte zu unterschiedlichen Zeiten p.i. auszuschließen. Denkbar wäre möglicherweise, dass ein *in vivo* bestehender Zusammenhang durch das Fehlen weiterer Komponenten bei *in vitro*- Infektion von Blutzellen bzw. durch Nachspielen der Verhältnisse einer EHV-1-Infektion in Zellkultur nicht erkennbar wird. Die eindeutigen Ergebnisse der auf Zellkultur durchgeführten Experimente lassen dies aber als relativ unwahrscheinlich erscheinen. Darüber hinaus könnte gemutmaß werden, dass die Proteine UL11p und /oder UL43p zwar einen Einfluss auf die MHC I oder II-Expression nehmen, dies aber im Rahmen der durchgeführten Experimente nicht ersichtlich wurde, da eventuell nur bestimmte Typen von MHC I- oder II-Molekülen herunterreguliert werden, die durch die verwendeten Antikörper nicht erkannt werden.

Es ist anzunehmen, dass auch EHV-1, neben dem bereits identifizierten UL49.5p, über weitere Proteine verfügt, die mit der Präsentation viraler Peptide durch MHC I- und /oder II-Moleküle interferieren. Zum einen ist trotz Abwesenheit des UL49.5p auch auf L11 Δ 49.5-infizierten Zellen eine Abnahme der MHC I-Expression erkennbar, wenn diese auch schwächer ausfällt. Des Weiteren lässt sich aufgrund der langen Halbwertszeit dieser Moleküle die bereits zu frühen Zeiten p.i. messbare deutliche Abnahme der MHC I-

Expression nur schwer mit einem alleinigen Block der Beladung neu synthetisierter MHC I-Moleküle durch eine UL49.5-bedingte Hemmung des TAP erklären. Wie bereits durch Rappocciolo et al. (2003) vermutet, sorgt offensichtlich mindestens ein weiteres Genprodukt für eine Endozytose oder anderweitige Entfernung der MHC I-Moleküle von der Zelloberfläche. Den Ergebnissen dieser Arbeit zu Folge steht fest, dass es sich um mehrere zusätzliche Genprodukte handeln muss, da sowohl die Unterschiede zwischen RacL11-Infektionen und denen mit anderen EHV-1-Isolaten festgestellt wurden, als auch feststeht, dass für RacL11 selbst die Deletion des UL49.5 alleine nicht ausreicht, um die MHC I-Oberflächen-Präsentation auf infizierten Zellen vollständig zu restaurieren. Die Identifizierung dieser Genprodukte würde einen weiteren Schritt zum Verständnis der im Rahmen einer EHV-1-Infektion ablaufenden Immunmodulations-Prozesse beitragen.

5.2 Der Einfluss einer Infektion mit EHV-4 auf die MHC I-/II-Expression

EHV-4 ist ein mit EHV-1 eng verwandtes Virus, das zwar ähnliche klinische Symptome wie EHV-1 im Pferd auszulösen vermag, in der Regel aber auf den Respirationstrakt beschränkt bleibt. Es wäre also vorstellbar, dass EHV-4 das Immunsystem nicht so effektiv beeinflussen kann wie EHV-1. Da über Untersuchungen bezüglich möglicher Auswirkungen einer EHV-4-Infektion auf die MHC I- und /oder MHC II-Expression equiner Zellen in der Literatur bisher keine Daten erarbeitet waren, sollte hier auch ein möglicher Einfluss von EHV-4 auf die MHC I-/II-Expression abgeklärt werden. Es zeigte sich, dass EHV-4 die MHC I und MHC II-Präsentation sowohl auf Zellkultur als auch auf *in vitro*-infizierten equinen PBMCs in vergleichbarem Maße moduliert wie EHV-1. Die durch EHV-4 ausgelöste Verminderung der MHC I-Expression auf NBL-6-Zellen war dabei deutlich stärker ausgeprägt als nach Infektion mit RacL11 und ließ sich eher mit der durch die EHV-1-Isolate O834 und E216 bewirkten Reduktion vergleichen. Die Fähigkeit zur effektiven Beeinflussung der MHC I- und II-Präsentation alleine reicht als Pathogenitätsmerkmal offensichtlich nicht aus.

5.3. Die *in vitro*-Infektion equiner PBMCs

Während der Durchführung der Experimente zur Untersuchung des Einflusses einer EHV-1-Infektion auf die MHC I-/II-Expression equiner PBMCs wurde deutlich, dass sich der Verlauf einer *in vitro*-Infektion von PBMCs offensichtlich grundlegend von der Infektion equiner Zellen in Zellkultur unterscheidet. Während es nach Infektion von Zellkulturen mit der Zeit zu einem Anstieg der Infektionsrate bis zum Erreichen einer Infektion von 100 % der Zellen kommt, schien sich der Prozentsatz Antigen-exprimierender PBMCs auch zu späten Zeitpunkten nach Infektion nicht wesentlich zu erhöhen. Es stellte sich heraus, dass der Verlauf der Experimente von der Infektionsmethode abhängt. Dabei konnte beobachtet werden, dass es nach 90 minütiger Inkubation bei 4°C und anschließender Entfernung des Virus-haltigen Überstandes einschließlich zweimaligen Waschens der Zellen in den ersten Stunden nach der Induktion der Viruspenetration durch Temperaturerhöhung zu einem deutlichen Abfall sowohl der Proteinexpression als auch der Genomkopien pro Zelle kam. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass während der Adsorptionsphase bei 4°C auch eine große Anzahl nicht-infektiöser Viruspartikel oder Virusbruchstücke an die Zellen binden, die nach Temperaturerhöhung allerdings nicht penetrieren können. Es wurde versucht, solche Partikel durch möglichst viele Waschschrte vor Fixation der Zellen bzw. Präparation der DNS zu entfernen, was aber offensichtlich nur begrenzt gelang. Viele dieser Partikel blieben offenbar zunächst gebunden und lösten sich erst allmählich während der ersten Stunden der Infektion. Dies wird dadurch ersichtlich, dass die Messung der Genomkopien pro Zelle zum Zeitpunkt 0, der dem Zeitpunkt der Temperaturerhöhung von 4° auf 37°C nach Abzentrifugieren und zweimaligem Waschen der Zellen entspricht, noch sehr hohe Werte ergab. Es ist anzunehmen, dass neben den Genomen der penetrierten Partikel auch die Genome und Strukturproteine dieser trotz mehrerer Waschschrte noch an den Zellen adhärerten, nicht-infektiösen Viruspartikel bei den Analysen der Proteinexpression bzw. der Kopienzahl pro Zelle mit detektiert wurden und die Ergebnisse somit in gewissem Maße verfälschten.

Die Beobachtung, dass ohne Entfernung des Virus-haltigen Überstandes in den ersten Stunden nach Temperaturerhöhung ein Anstieg der gemessenen Genomkopien, z.T. auch der Detektion viraler Glykoproteine erkennbar wurde, spricht dafür, dass in dieser Zeit offensichtlich weitere Viruspartikel an die Zellen adsorbierten. Dies lässt vermuten, dass in diesem System eine 90 minütige Adsorptionszeit bei 4°C nicht ausreichend ist, um die Adsorption aller Viruspartikel an equine PBMCs zu ermöglichen.

Abgesehen von dem leichten Anstieg in der Detektion viraler Antigene bzw. der Anzahl der Genomkopien pro Zelle nach Temperaturerhöhung ohne Entfernung des Virus-haltigen Überstandes kam es aber in beiden Gruppen in keinem der durchgeführten Experimente zu einem Anstieg eines der Parameter über das nach wenigen Stunden erreichte Niveau hinaus. Nach einer *in vitro*-Infektion scheint es in den infizierten equinen PBMCs, zumindest bis 48 h p.i., offensichtlich zu keiner weiteren Vermehrung des Virus bzw. zu einer Ausbreitung der Infektion auf weitere, nicht-infizierte Zellen zu kommen.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch nach *in vitro*-Infektion isolierter PBMCs mit anderen Alphaherpesviren erzielt. So wurde beispielsweise gezeigt, dass die Replikation von SuHV-1 in porcinen Monozyten deutlich restringiert ist. Nach Nauwynck und Pensaert (1994) exprimierte nur ein Bruchteil der porcinen Monozyten virale Antigene, wobei das Maximum dieser Expression bereits 7-8 h p.i. erreicht war. Nur 0,1 % dieser Zellen produzierten infektiöses Virus. Auch die Replikation von HSV-1 in humanen T-Lymphozyten und Monozyten ist offensichtlich stark eingeschränkt (Teute et al., 1983; Albers et al., 1989). Darüber hinaus wurden auch zur *in vitro*-Infektion equiner PBMCs mit EHV-1 bereits Untersuchungen durchgeführt. Van der Meulen et al. (2000) berichteten, dass 12 h nach Infektion isolierter equiner PBMCs mit EHV-1 der Prozentsatz infizierter Monozyten bei 8,7 % lag, während weniger als 1 % der Lymphozyten virale Antigene exprimierten. Infektiöses Virus wurde nur von 0,16 % der infizierten Monozyten und von 0,05 % der infizierten Lymphozyten produziert. In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass in infizierten PBMCs während der zell-assoziierten Virämie EHV-1-infizierter Ponies offensichtlich lediglich „immediate-early“ und ein „early“-Protein, aber keine „late“-Proteine exprimiert werden.

Daraus wurde geschlossen, dass die Replikation in infizierten PBMCs auch *in vivo* stark eingeschränkt ist. Es wurde vermutet, dass die Replikation von EHV-1 in zirkulierenden PBMCs möglicherweise auf frühe Ereignisse begrenzt ist, bis Aktivierungssignale spätere Ereignisse induzieren (van der Meulen et al., 2006a und b). Diese Hypothese könnte erklären, warum es, wie auch in eigenen Experimenten deutlich wurde, in *in vitro*-infizierten PBMCs offensichtlich zu keiner weiteren Virusvermehrung kommt. Möglicherweise fehlen hier bestimmte Faktoren, die für spätere Ereignisse der Replikation unerlässlich sind.

5.4 Der Einfluss der Deletion des UL43-Gens auf die Expression anderer viraler Proteine

Im Verlauf der Untersuchungen zur EHV-1-Immunmodulation fiel auf, dass sich eine Deletion des UL43-Gens offensichtlich auf die Expression anderer viraler Proteine in der infizierten Zelle auswirkt. Um diesem Phänomen nachzugehen, wurde die Expression und subzelluläre Lokalisation sowohl ausgewählter Strukturproteine, der Glykoproteine gB, gC, gD, gM und des mit Membranen assoziierten Proteins UL11p, als auch des Nicht-Strukturproteins UL34p eingehend untersucht. Diese Proteine gehören sowohl der β - γ - als auch der γ -Expressionsklasse an. Ein Vergleich von RacL11- mit L11 Δ 43-infizierten NBL-6-Zellen mittels Durchflusszytometrie zeigte, dass in der Abwesenheit der UL43-Expression vor allem die Fluoreszenzintensität in der gC-, aber auch in der gp2-Analyse deutlich reduziert war, während die Expression der Proteine gB, gM, UL11p und UL34p keine mittels FACScan detektierbaren Unterschiede aufwies. Das gD-spezifische Fluoreszenzsignal schließlich war nach Infektion mit dem rekombinanten Virus sogar leicht verstärkt. Neben der Tatsache, dass die UL43-deletierten EHV-1 gegenüber dem Ausgangsvirus nur einen geringen Wachstumsnachteil aufweisen (Stenke, 2006; Stenke und Neubauer, unveröffentlicht), zeigten diese Protein-spezifischen Ergebnisse, dass sich die Änderungen der gC- und gp2-Fluoreszenz nicht generell auf eine geringere Infektionsrate der mit L11 Δ 43 infizierten Zellen zurückführen

lassen. Auch eine Infektion der NBL-6-Zellen mit dem EHV-1-Stamm RacH und dem rekombinanten Virus H Δ 43 führte zu einem veränderten Fluoreszenzmuster des gC und gp2, was weiter bestätigt, dass es sich hierbei um ein spezifisches Phänomen handelt. Vergleichbare Ergebnisse ergaben sich auch nach Infektion von Rk13-Zellen mit den entsprechenden Viren. Eine Änderung der Expression des gp2 war hier jedoch nicht reproduzierbar. Dies könnte im Zusammenhang damit stehen, dass die Expression viraler Proteine auch durch verschiedene zelluläre Faktoren beeinflusst wird, die sich zwischen der equinen Zelllinie NBL-6 und der Kaninchenzelllinie Rk13 sicher unterscheiden.

Die mit Hilfe der Durchflusszytometrie erhaltenen Ergebnisse sind rein quantitativ und erlauben außer der Beurteilung der Oberflächenfluoreszenz keine Aussage über die intrazelluläre Verteilung des Fluoreszenzsignals. Deshalb wurden die infizierten Zellen parallel mittels Confocaler Laser Scanning-Mikroskopie analysiert. Dabei wurde ebenfalls ein deutlicher Unterschied im Fluoreszenzmuster des gC offensichtlich, das sich in L11 Δ 43-infizierten Zellen in Form von deutlich gröberen, weniger gleichmäßig verteilten Fluoreszenzherden darstellte als nach Infektion mit RacL11. Diese Strukturen konnten bisher noch nicht sicher identifiziert werden. Es ist denkbar, dass das UL43p, auch in Folge seiner Eigenschaft, Membranen mehrfach zu durchqueren, eine Rolle in der Aufrechterhaltung der gleichmäßigen Verteilung viraler Proteine in den dynamischen Zellmembranen hat. Die mittels Durchflusszytometrie detektierte veränderte Fluoreszenzintensität des gp2 ließ sich mikroskopisch nicht nachvollziehen. Dies hat aber vermutlich den Grund, dass Unterschiede in der Fluoreszenzstärke mit bloßem Auge schwer quantifizierbar sind. Allerdings wurden mikroskopisch auffällige Veränderungen im Verteilungsmuster des gB dokumentiert, die sich offensichtlich aber nicht auf die Gesamtintensität der Fluoreszenz auswirkten und deshalb durchflusszytometrisch nicht messbar waren. Die Lokalisation der anderen untersuchten Proteine wies bei Fehlen des UL43p hingegen auch mikroskopisch keine deutlich erkennbaren Veränderungen auf.

Die Tatsache, dass das gC durch das EHV-1-UL44-Gen kodiert wird und somit in der UL-Region des Genoms direkt neben dem UL43-Gen angesiedelt ist, könnte eine Erklärung für

das deutlich veränderte Verteilungsmuster des gC bei Fehlen des UL43p liefern. Es wäre denkbar, dass durch die Entfernung des UL43-Leserahmens aus dem Genom in diesem Bereich gelegene, nicht identifizierte regulatorische Elemente mit betroffen sind, so dass in Folge schon die effiziente Transkription des gC beeinträchtigt wäre. Dies ist allerdings relativ unwahrscheinlich, da zwischen dem UL43- und dem UL44-Gen ausreichend nichtkodierende Sequenzen auch nach Deletion der UL43-Sequenz erhalten sein sollten. Dagegen spricht zudem die Beobachtung, dass auch andere entfernt kodierte Proteine wie gp2 (U_S-Region) und gB (UL27) durch die UL43-Deletion beeinflusst wurden. So liegt die Vermutung nahe, dass das UL43p selbst für eine korrekte Expression und vor allem Verteilung der genannten Glykoproteine in der infizierten Zelle von Bedeutung ist. Insgesamt scheint es so, als würde sich eine Deletion des UL43-Gens hauptsächlich auf die Verteilung viraler, auch auf der zellulären Oberfläche lokalisierter Glykoproteine in der infizierten Zelle auswirken. Die Lokalisation intrazellulärer Proteine scheint, zumindest für hier untersuchte Genprodukte, nicht beeinträchtigt zu sein. Über ähnliche Funktionen des UL43p bei anderen Herpesviren ist bisher nichts bekannt. Allerdings zeigten Crump et al. (2004), dass das Glykoprotein M in SuHV-1- und HSV-1-infizierten Zellen für eine Umverteilung anderer viraler Proteine sorgt, indem es den Transport der Glykoproteine D, H und L von der Plasmamembran zum *trans*-Golgi-Netzwerk bewirkt. Es wird vermutet, dass dieser Prozess, der zu einer Verringerung der Expression viraler Antigene auf der Zelloberfläche führt, möglicherweise dazu beiträgt, die Erkennung infizierter Zellen durch die Immunabwehr zu beeinträchtigen. Da das UL43p, ebenso wie das gM, ein multipel hydrophobes Transmembran-Protein darstellt, wäre es vorstellbar, dass das UL43p eine ähnliche Funktion besitzt und somit für eine Umverteilung von viralen Proteinen innerhalb der infizierten Zelle sorgt. Um diese Theorie abzusichern, müssen allerdings weitere Experimente folgen, unter anderem, um die zeitliche Entwicklung der beobachteten Änderungen des Verteilungsmusters zu untersuchen.

Die Tatsache, dass die beobachteten auffälligen Veränderungen durch Wachstum des rekombinanten Virus auf einer Zelllinie, die das UL43p als UL43-C-myc-Fusionsprotein konstitutiv exprimiert, nicht komplementiert werden konnten, ließe vermuten, dass die

Unterschiede im Fluoreszenzmuster nicht allein auf ein Fehlen des UL43p zurückzuführen sind. Es ist allerdings prinzipiell auch möglich, dass durch die Expression des UL43p als C-myc-His-Fusionsprotein eine für die Interaktion mit anderen viralen Proteinen wichtige funktionelle Domäne behindert ist. Da aber in der generierten Zelllinie nachweislich nur ca. jede fünfzigste Zelle das UL43p exprimiert, wäre die Komplementierung möglicherweise auch viel zu gering, um in den verwendeten Systemen messbar zu werden. Um eine deutliche Komplementierung zu erreichen, müssten wahrscheinlich wesentlich mehr Zellen das UL43p exprimieren. Um diese Fragestellung endgültig abzuklären, müsste eine weitere Zelllinie generiert werden, die das authentische UL43p in ausreichender Masse exprimiert.

Im Rahmen dieser Arbeit ließ sich somit zwar die Vermutung, dass die EHV-1-Proteine UL11p und UL43p eine Rolle bei der Modulation der MHC I oder MHC II-Oberflächenexpression spielen, nicht bestätigen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass das UL43p offensichtlich eine wichtige Funktion für die korrekte Verteilung anderer viraler Proteine in den infizierten Zellen hat. Auf diese Weise könnte UL43p indirekt doch eine entscheidende Rolle in der EHV-1-Immunmodulation spielen. Einerseits führt, ähnlich wie für gM bereits spekuliert, eine Reduktion der Oberflächenexpression viraler Proteine generell zu einer Verringerung der unmittelbaren Exposition infizierter Zellen gegenüber dem Immunsystem. Andererseits ist gerade für gC bereits eine wichtige immunmodulatorische Funktion, nämlich die Interaktion mit der Komplement-Kaskade, bekannt, die wiederum durch UL43p indirekt unterstützt würde.

6. ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY

Zusammenfassung

Neben verschiedenen anderen Alphaherpesviren ist auch das Equide Herpesvirus 1 (EHV-1) in der Lage, die Präsentation viraler Peptide durch MHC I-Moleküle zu beeinflussen. Bisher ist allerdings erst ein in diesen Prozess involviertes virales Genprodukt, das UL49.5-Protein, bekannt (Rappocciolo et al., 2003; Ambagala et al., 2004; Koppers-Lalic et al., 2005).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, der Hypothese nachzugehen, dass die viralen Genprodukte UL11p und UL43p ebenfalls eine Rolle in der Immunmodulation durch EHV-1 spielen könnten. Zu diesem Zweck musste zunächst die MHC I- und II-Expression auf infizierten equinen Zellen untersucht werden. In verschiedenen Experimenten konnte eine Verringerung der MHC I-Expression sowohl auf der Oberfläche equiner Zellkultur-Zellen als auch auf *in vitro*-infizierten PBMCs bestätigt werden. Darüber hinaus gelang es zum ersten Mal zu demonstrieren, dass eine Infektion mit EHV-1 zu einer deutlichen Beeinträchtigung der IFN- γ -induzierten MHC II-Expression auf equinen Zellkultur-Zellen führt. Eine leichte Reduktion der MHC II-Expression war auch auf *in vitro*-infizierten PBMCs nachweisbar.

Weitere Experimente zeigten, dass sich zu verschiedenen Zeitpunkten p.i. weder die Deletion des UL11- noch des UL43-Gens auf die Fähigkeit des Virus, die MHC I/II-Expression auf infizierten NBL-6-Zellen zu verringern, auswirkten. Überraschenderweise führte aber eine Infektion mit aktuelleren EHV-1-Isolaten (O834, Myeloenzephalopathie, 1999 und E216, Abort, 2006) zu einer stärkeren Reduktion der MHC I-Expression als eine Infektion mit dem Plaqueisolat RacL11 (Abort, 1958). Einen Hinweis auf Unterschiede zwischen aktuellem Abort- und Myeloenzephalopathie-Stamm gab es jedoch nicht. Die IFN- γ -induzierte Expression von MHC II-Molekülen war dagegen nach Infektion mit allen untersuchten EHV-1-Stämmen in vergleichbarem Ausmaß beeinträchtigt. Darüber hinaus wurde demonstriert, dass auch das mit EHV-1 eng verwandte Equide Herpesvirus 4 in der

Lage ist, die MHC I- und MHC II-Expression auf NBL-6-Zellen und equinen PBMCs deutlich zu reduzieren.

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass das UL43-Protein zwar keine Bedeutung für die Verteilung von MHC I-/II-Molekülen, dafür aber für die von weiteren viralen Oberflächenproteinen in der infizierten Zelle hat. Vergleichende Untersuchungen mit RacL11, RacH und den entsprechenden UL43-deletierten Viren ergaben, dass die Deletion des UL43-Gens einerseits deutliche quantitative Veränderungen in der Expression vor allem der EHV-1-Glykoproteine gC, gp2 und gD und andererseits Abweichungen in der mittels Confocaler Laser Scanning-Mikroskopie dokumentierten Verteilung der Glykoproteine gB und gC innerhalb der infizierten Zelle auslöst. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass das UL43p tatsächlich *in vivo* eine weitaus wichtigere Rolle spielt als bisher *in vitro* festgestellt.

Summary

Analysis of MHC I and II presentation on Equid herpesvirus 1 infected cells

Various Alphaherpesviruses are able to interfere with MHC class I presentation by reducing surface expression of these molecules. Equid herpesvirus 1 (EHV-1) infection also results in MHC I downregulation on the respective cells, but other than the involvement of the viral UL49.5-protein, this process is not yet very well understood (Rappocciolo et al., 2003; Ambagala et al., 2004; Koppers-Lalic et al., 2005). As the *in vitro* non essential EHV-1 proteins UL11p and UL43p were considered as further candidate proteins for playing a role in interfering with MHC I or II expression, the aim of this study was to elucidate this supposition. In a first step, the influence of EHV-1-infection on MHC I/II surface expression had to be investigated.

At various time-points p.i., a considerable reduction of MHC class I-molecules on the surface of EHV-1-infected cultured equine cells could indeed be confirmed and was also observed after *in vitro*-infection of equine PBMC. Moreover, it could be clearly demonstrated for the first time that EHV-1-infection also results in a downregulation of MHC II expression on equine cell culture cells following interferon- γ -induction. MHC II-expression on the surface of *in vitro* EHV-1-infected PBMC, however, was reduced slightly only.

Previous results gave rise to the hypothesis that the EHV-1 proteins UL11p and /or UL43p might be involved in EHV-1-induced immunomodulation. In the course of this study, however, it could be demonstrated that neither a deletion of the UL11- nor of the UL43-gene had an impact on the downregulation of MHC I or II surface expression.

No difference in MHC I presentation was detectable between cells infected with the recently isolated EHV-1 strains O834 (myeloencephalopathy, 1999) and E216 (abortion, 2006) but, surprisingly, MHC class I downregulation was even more pronounced than on cells infected with the EHV-1 strain RacL11 (abortion, 1958). The interferon- γ induced MHC II presentation, however, was affected similarly by all EHV-1 strains tested.

Interestingly, during the course of this study, it became obvious that deleting the UL43-gene does not influence MHC I or II surface expression, but the distribution of viral cell surface glycoproteins in EHV-1-infected cells. Comparative studies with cells infected with RacL11, RacH, and the respective UL43-deleted viruses revealed that the absence of the UL43 gene-product resulted in quantitative changes concerning the expression of EHV-1 glycoproteins such as gC, gp2 and gD, as assessed by flow cytometry analysis. In addition, by confocal laser scanning microscopy, clear variations regarding the distribution of gB and gC were shown. Other glycoproteins, such as gM or membrane-associated proteins such as UL11p were not affected. These results give rise to the assumption that UL43p might in fact play a by far more important role *in vivo* than has yet been demonstrated *in vitro*.

7. LITERATURVERZEICHNIS

ABENDROTH, A. und ARVIN, A.M. 2001. Immune evasion as a pathogenic mechanism of varicella zoster virus. *Immunology* 13, 27-39

ALBERS, I., KIRCHNER, H., DOMKE-OPITZ, I. 1989. Resistance of human blood monocytes to infection with herpes simplex virus. *Virology* 169/2, 466-469

ALLEN, G.P., KYDD, J.H., SLATER, J.D., und SMITH, K.C. 1999. Advances in Understanding of the Pathogenesis, Epidemiology and Immunological Control of Equine Herpesvirus Abortion, in: Wernery, U., Wade, J.F., Mumford, J.A., Kaaden, O.-R. (Hrsg.), Equine Infectious Diseases VIII, Proceedings of the Eighth International Conference, Dubai, 23rd -26th March 1998. R&W Publications (Newmarket), 129-146

ALLEN, G.P. und YEARGAN, M.R. 1987. Use of λ gt11 and Monoclonal Antibodies to Map the Genes for the Six Major Glycoproteins of Equine Herpesvirus 1. *J. Virol.* 61, 2454-2461

AMBAGALA, A.P.N., HINKLEY, S. und SRIKUMARAN, S. 2000. An Early Pseudorabies Virus Protein Down-Regulates Porcine MHC Class I Expression by Inhibition of Transporter Associated with Antigen Processing (TAP), *J. Immunol.* 164, 93-99

AMBAGALA, A.P.N., GOPINATH, R.S. und SRIKUMARAN, S. 2003. Inhibition of TAP by pseudorabies virus is independent of its vhs activity. *Virus Res.* 96, 37-48

AMBAGALA, A.P.N., GOPINATH, R.S. und SRIKUMARAN, S. 2004. Peptide transport activity of the transporter associated with antigen processing (TAP) is inhibited by an early protein of equine herpesvirus-1. *J. Gen. Virol.* 85, 349-353

ANDERSON, H.A., HILTBOLD, E.M., ROCHE, P.A. 2000. Concentration of MHC class II molecules in lipid rafts facilitates antigen presentation. *Nat. Immunol.* 1/2, 156-162

BAGGIOLINI, M. 1998. Chemokines and leukocyte traffic, *Nature* 392, 565-568

BOWZARD, J.B., VISALLI, R.J., WILSON, C.B., LOOMIS, J.S., CALLAHAN, E.M., COURTNEY, R.J. und WILLS, J.W. 2000. Membrane Targeting Properties of a Herpesvirus Tegument Protein-Retrovirus Gag Chimera. *J. Virol.* 74/18, 8692-8699

BRYANT, N.A., DAVIS-POYNTER, N., VANDERPLASSCHEN, A. und ALCAMI, A. 2003. Glycoprotein G isoforms from some alphaherpesviruses function as broad-spectrum chemokine binding proteins. *EMBO J.* 22 /4, 833-846

BUMGARDNER, M.K., DUTTA, S.K., CAMPBELL, D.L., MYRUP, A.C. 1982. Lymphocytes from ponies experimentally infected with equine herpesvirus 1: subpopulation dynamics and their response to mitogens. *Am. J. Vet. Res.* 43 /7, 1308-1310

CAMPADELLI-FIUME, G., ARSENAKIS, M., FARABEGOLI, F., ROIZMAN, B. 1988. Entry of herpes simplex virus 1 in BJ cells that constitutively express viral glycoprotein D is by endocytosis and results in degradation of the virus. *J. Virol.* 62/1, 159-167

CAMPADELLI-FIUME, G., QI, S., AVITABILE, E., FOA-TOMASI, L., BRANDIMARTI, R., ROIZMAN, B. 1990. Glycoprotein D of herpes simplex virus encodes a domain which precludes penetration of cells expressing the glycoprotein by superinfecting herpes simplex virus. *J. Virol.* 64/12, 6070-6079

CARTER, K.L., WARD, P.L. und ROIZMAN, B. 1996. Characterization of the Products of the UL43 Gene of Herpes Simplex Virus 1: Potential Implications for Regulations of Gene Expression by Antisense Transcription. *J. Virol.* 70/11, 7663-7668

CAUGHMAN, G.B., STACZEK, J. und O'CALLAGHAN, D.J. 1985. Equine herpesvirus type 1 infected cell polypeptides: evidence for immediate early / early / late regulation of viral gene expression. *Virology* 145/1, 49-61

CHARAN, S., PALMER, K., CHESTER, P., MIRE-SLUIS, A.R., MEAGER, A. und EDINGTON, N.

1997. Transforming growth factor- β induced by live or ultraviolet-inactivated equid herpes virus type-1 mediates immunosuppression in the horse. *Immunology* 90, 586-591

COHEN, J.I. 1998. Infection of cells with varicella-zoster virus downregulates surface expression of class I major histocompatibility complex antigens. *J. Infect. Dis.* 177 /5, 1390-1393

COLLINS, T., KORMAN, A.J., WAKE, C.T., BOSS, J.M., KAPPES, D.J., FIER, W., AULT, K.A., GIMBRONE, M.A. Jr., STROMINGER, J.L., POBER, J.S. 1984. Immune interferon activates multiple class II major histocompatibility complex genes and the associated invariant chain gene in human endothelial cells and dermal fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 4917-4921

COSCOY, L. und GANEM, D. 2000. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes two proteins that block cell surface display of MHC class I chains by enhancing their endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97/14, 8051-8056

CRESSWELL, P. 1994. Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 259-293

CRUMP, C.M., BRUUN, B., BELL, S., POMERANZ, L.E., MINSON, T. und BROWNE, H.M. 2004. Alpha herpesvirus glycoprotein M causes the relocalization of plasma membrane proteins. *J. Gen. Virol.* 85, 3517-3527

CSELLNER, H., WALKER, C., WELLINGTON, J.E., McLURE, L.E., LOVE, D.N. und WHALLEY, J.M. 2000. EHV-1 glycoprotein D (EHV-1 gD) is required for virus entry and cell-cell fusion, and an EHV-1 gD deletion mutant induces a protective immune response in mice. *Arch. Virol.* 145/11, 2371-2385

EDINGTON, N., BRIDGES, C.G., PATEL, J.R. Endothelial cell infection and thrombosis in paralysis caused by equid herpesvirus-1: equine stroke. *Arch Virol.* 90/1-2, 11-24

EDINGTON, N. und BRIDGES, C.G. 1990. One way protection between equid herpesvirus 1 and 4 in vivo. *Res. Vet. Sci.* 48/2, 235-239

FAHNESTOCK, M.L., JOHNSON, J.L., FELDMAN, R.M., NEVEU, J.M., LANE, W.S., BJORKMAN, P.J. 1995. The MHC class I homolog encoded by human cytomegalovirus binds endogenous peptides. *Immunity* 3/5, 583-590

FAUQUET, C.M., MAYO, M.A., MANIOFF, J., DESSELBERGER, U. und BALL, L.A. (eds.) 2005. Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses. Eighth Report of the International Comitee on the Taxonomy of Viruses. *Academic Press*, San Diego, San Francisco, New York

FAVOREEL, H.W., NAUWYNCK, H.J., HALEWYCK H.M., VAN OOSTVELDT, P., METTENLEITER, T.C. und PENSAERT, M. 1999. Antibody-induced endocytosis of viral glycoproteins and major histocompatibility complex class I on pseudorabies virus-infected monocytes. *J. Gen. Virol.* 80, 1283-1291

FAVOREEL, H.W., VAN DE WALLE, G.R., NAUWYNCK, H.J. und PENSAERT, M.B. 2003. Virus complement evasion strategies. *J. Gen. Virol.* 84, 1-15

FICINSKA, J., VAN MINNEBRUGGEN, G., NAUWYNCK, H.J., BIENKOWSKA-SZEWCZYK, K. und FAVOREEL, H.W. 2005. Pseudorabies Virus Glycoprotein gD Contains a Functional Endocytosis Motif That Acts in Concert with an Endocytosis Motif in gB To Drive Internalization of Antibody-Antigen Complexes from the Surface of Infected Monocytes. *J. Virol.* 79/11, 7248-7254

FINLAY, B.B. und McFADDEN, G. 2006. Anti-Immunology: Evasion of the Host Immune System by Bacterial and Viral Pathogens. *Cell* 124, 767-782

FRIEDMAN, H.M., COHEN, G.H., EISENBERG, R.J., SEIDEL, C.A., CINES, D.B. 1984. Glycoprotein C of herpes simplex virus 1 acts as a receptor for the C3b complement component on infected cells, *Nature* 309, 633-635

- GOODMAN, L.B., WAGNER, B., FLAMINIO, M.J.B.F., SUSSMAN, K.H., METZGER, S.M., HOLLAND, R., OSTERRIEDER, N.** 2006. Comparison of the efficacy of inactivated combination and modified-live virus vaccines against challenge infection with neuropathogenic equine herpesvirus type 1 (EHV-1). *Vaccine* 24, 3636-3645
- GRANZOW, H., KLUPP, B.G., FUCHS, W., VEITS, J., OSTERRIEDER, N. und METTENLEITER, T.C.** 2001. Egress of Alphaherpesviruses: Comparative Ultrastructural Study. *J. Virol.* 75/8, 3675-3684
- GRANZOW, H., WEILAND, F., JÖNS, A., KLUPP, B.G., KARGER, A., und METTENLEITER, T.C.** 1997. Ultrastructural Analysis of the Replication Cycle of Pseudorabies Virus in Cell Culture: a Reassessment, *J. Virol.* 71/3, 2072-2082
- GUGGEMOOS, S.** 2004. Untersuchungen zur Struktur und Funktion der UL11- und UL20-Proteine des equinen Herpesvirus Typ 1. *Vet. Med. Diss.*, München
- GUGGEMOOS, S., JUST, F.T. und NEUBAUER, A.** 2006. The Equine Herpesvirus 1 UL20 Product Interacts with Glycoprotein K and Promotes Egress of Mature Particles. *J. Virol.* 80/1, 95-107
- HANON, E., VANDERPLASSCHEN, A., LYAKU, J., KEIL, G., DENIS, M. und PASTORET, P.P.** 1996. Inactivated Bovine Herpesvirus 1 Induces Apoptotic Cell Death of Mitogen-Stimulated Bovine Peripheral Blood Mononuclear Cells, *J. Virol.* 70/6, 4116-4120
- HANON, E., LAMBOT, M., HOORNAERT, S., LYAKU, J., PASTORET, P.P.** 1998. Bovine herpesvirus 1-induced apoptosis: phenotypic characterization of susceptible peripheral blood mononuclear cells. *Arch. Virol.* 143/3, 441-452
- HARLEY, C.A., DASGUPTA, A. und WILSON, D.W.** 2001. Characterization of Herpes Simplex Virus-Containing Organelles by Subcellular Fractionation: Role for Organelle Acidification in Assembly of Infectious Particles. *J. Virol.* 75/3, 1236-1251

HARRIS, S.L., FRANK, I, YEE, A., COHEN, G.H., EISENBERG, R.J., FRIEDMAN, H.M. 1990.

Glycoprotein C of herpes simplex virus type 1 prevents complement-mediated cell lysis and virus neutralization. *J. Infect. Dis.* 162/2, 331-337

HINKLEY, S., HILL, A .B., SRIKUMARAN, S. 1998. Bovine herpesvirus-1 infection affects the peptide transport activity in bovine cells. *Virus Res.* 53/1, 91-96

HÜBERT, P.H., BIRKENMAIER, S., RZIHA, H.J. und OSTERRIEDER, N. 1996. Alterations in the Equine Herpesvirus Type-1 (EHV-1) Strain RacH during Attenuation. *J. Vet. Med.* B 43, 1-14

HUEMER, H.P., NOWOTNY, N., CRABB, B.S., MEYER, H., HÜBERT, P.H. 1995. gp13 (EHV-gC): a complement receptor induced by equine herpesviruses. *Virus Res.* 37/2, 113-126

JÖNS, A., DIJKSTRA, J.M. und METTENLEITER, T.C. 1998. Glycoproteins M and N of Pseudorabies Virus Form a Disulfide-Linked Complex. *J. Virol.* 72/1, 550-557

JONES, T.R., WIERTZ, E.J.H.J., SUN, L., FISH, K.N., NELSON, J.A. und PLOEGH, H.L. 1996. Human cytomegalovirus US3 impairs transport and maturation of major histocompatibility complex class I heavy chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 11327-11333

KOPP, M., GRANZOW, H., FUCHS, W., KLUPP, B.G., MUNDT, E., KARGER, A. und METTENLEITER, T.C. 2003. The Pseudorabies Virus UL11 Protein is a Virion Component Involved in Secondary Envelopment in the Cytoplasm. *J. Virol.* 77, 5339-5351

KOPP, M., GRANZOW, H., FUCHS, W., KLUPP, B. und METTENLEITER, T.C. 2004. Simultaneous Deletion of Pseudorabies Virus Tegument Protein UL11 and Glycoprotein M Severely Impairs Secondary Envelopment. *J. Virol.* 78/6, 3024-3034

KOPPERS-LALIC, D., REITS, E.A.J., RESSING, M.E., LIPINSKA, A.D., ABELE, R., KOCH, J., MARCONDES REZENDE, M., ADMIRAAL, P., VAN LEEUWEN, D., BIENKOWSKA-SZEWCZYK, K., METTENLEITER, T.C., RIJSEWIJK, F.A.M., TAMPE, R., NEEFJES, J. und WIERTZ, E.J.H.J.

2005. Varicelloviruses avoid T cell recognition by UL49.5-mediated inactivation of the transporter associated with antigen processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102/14, 5144-5149

KOPPERS-LALIC, D., RIJSEWIJK, F.A.M., VERSCHUREN, S.B.E., VAN GAANS-VAN DEN BRINK, J.A.M., NEISIG, A., RESSING, M.E., NEEFJES, J., WIERTZ, E.J.H.J. 2001. The UL41-encoded virion host shutoff (vhs) protein and vhsindependent mechanisms are responsible for down-regulation of MHC class I molecules by bovine herpesvirus 1. *J. Gen. Virol.* 82, 2071-2081

KYDD, J.H., HANNANT, D., MUMFORD, J.A. 1996. Residence and recruitment of leucocytes to the equine lung after EHV-1 infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 52, 15-26

LEHNER, P.J., KARTTUNEN, J.T., WILKINSON, G.W.G. und CRESSWELL, P. 1997. The human cytomegalovirus US6 glycoprotein inhibits transporter associated with antigen processing-dependent peptide translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 6904-6909

LJUNGGREN, H.G., KÄRRE, K. 1990. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol. Today* 11/7, 237-244

LOOMIS, J.S., BOWZARD, J.B., COURTNEY, R.J. und WILLS, J.W. 2001. Intracellular Trafficking of the UL11 Tegument Protein of Herpes Simplex Virus Type 1. *J. Virol.* 75/24, 12209-12219

LORENZO, M.E., JUNG, J.U., PLOEGH, H.L. 2002. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus K3 Utilizes the Ubiquitin-Proteasome System in Routing Class I Major Histocompatibility Complexes to Late Endocytic Compartments. *J. Virol.* 76/11, 5522-5531

MAYR, A., PETTE, J., PETZOLD, K., und WAGENER, K. 1968. Untersuchungen zur Entwicklung eines Lebendimpfstoffes gegen die Rhinopneumonitis (Stutenabort) der Pferde. *J. Vet. Med.* B 15, 406-418

- McCULLOCH, J., WILLIAMSON, S.A., POWIS, S.J., EDINGTON, N. 1993.** The effect of EHV-1 infection upon circulating leucocyte populations in the natural equine host. *Vet. Microbiol.* 37/1-2, 147-161
- MEYER, H. und HÜBERT, H.P. 1988.** Isolation and Characterization of Monoclonal Antibodies Against an Attenuated Vaccine Strain of Equine Herpesvirus Type 1 (EHV-1). *Vet. Microbiol.* 18, 95-101
- METTENLEITER, T.C. 2002.** Herpesvirus Assembly and Egress. *J. Virol.* 76/4, 1537-1547
- METTENLEITER, T.C., 2004.** Budding events in herpesvirus morphogenesis. *Virus Res.* 106, 167-180
- MORRISON, T.E., MAUSER, A., WONG, A., TING, J.P., KENNEY, S.C. 2001.** Inhibition of IFN-gamma signaling by an Epstein-Barr virus immediate-early protein. *Immunity* 15/5, 787-799
- MULDER, W.A., PRIEM, J., POL, J.M., KIMMAN, T.G. 1995.** Role of viral proteins and concanavalin A in in vitro replication of pseudorabies virus in porcine peripheral blood mononuclear cells. *J. Gen. Virol.* 76, 1433-1442
- MUMFORD, J.A., ROSSDALE, P.D., JESSETT, D.M., GANN, S.J., OUSEY, J., COOK, R.F. 1987.** Serological and virological investigations of an equid herpesvirus 1 (EHV-1) abortion storm on a stud farm in 1985. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 35, 509-518
- NAUWYNCK, H.J. und PENSAERT, M.B. 1994.** Virus production and viral antigen expression in porcine blood monocytes inoculated with pseudorabies virus. *Arch. Virol.* 137/1-2, 69-79
- NEUBAUER, A., BRAUN, B., BRANDMÜLLER, C., KAADEN, O.-R. und OSTERRIEDER, N. 1997.** Analysis of the Contributions of the Equine Herpesvirus 1 Glycoprotein gB Homolog to Virus Entry and Direct Cell-to-Cell Spread. *Virology* 227, 281-294

NEUBAUER, A., RUDOLPH, J., BRANDMÜLLER, C., JUST, F.T. und OSTERRIEDER, N. 2002.

The Equine Herpesvirus 1 UL34 Gene Product Is Involved in an Early Step in Virus Egress and Can Be Efficiently Replaced by a UL34-GFP Fusion Protein. *Virology* 300, 189-204

NEUBAUER, A. und OSTERRIEDER, N. 2004. Equine herpesvirus type 1 (EHV-1) glycoprotein K is required for efficient cell-to-cell spread and virus egress. *Virology* 329, 18-32

OSTERRIEDER, N., NEUBAUER, A., BRANDMÜLLER, C., BRAUN, B., KAADEN, O.-R. und

BAINES, J.D. 1996. The Equine Herpesvirus 1 Glycoprotein gp21/22a, the Herpes Simplex Virus

Type 1 gM Homolog, Is Involved in Virus Penetration and Cell-to-Cell Spread of Virions. *J. Virol.* 70/6, 4110-4115

OSTERRIEDER, N. 1999. Construction and characterization of an equine herpesvirus 1 glycoprotein C negative mutant. *Virus Res.* 59, 165-177

PAMER, E. und CRESSWELL, P. 1998. Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 323-358

PATEL, J.R. und HELDENS, J. 2005. Equine herpesvirus 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4) – epidemiology, disease and immunoprophylaxis: A brief review. *Vet. J.* 170, 14-23

RAPPOCCIOLO, G., BIRCH, J. und ELLIS, S.A. 2003. Down-regulation of MHC class I expression by equine herpesvirus-1. *J. Gen. Virol.* 84, 293-300

REYNOLDS, A.E., WILLS, E.G., ROLLER, R.J., RYCKMAN, B.J., und BAINES, J.D. 2002.

Ultrastructural Localization of the Herpes Simplex Virus Type 1 UL31, UL34, and US3 Proteins Suggests Specific Roles in Primary Envelopment and Egress of Nucleocapsids. *J. Virol.* 76/17, 8939-8952

ROIZMAN, B. und KNIPE, D.M. 2001. Herpes Simplex Viruses and Their Replication, in: Knipe, D.M., Howley, M.D. (eds.), *Fields Virology*, 4th ed., Lipincott Williams & Wilkins, Philadelphia

ROIZMAN, B. und PELLETT, P.E. 2001. The Family Herpesviridae: A Brief Introduction, in : Knipe, D.M., Howley, M.D. (eds.), Fields Virology, 4th ed., Lipincott Williams & Wilkins, Philadelphia

RUDOLPH, J., SEYBOLDT, C., GRANZOW, H. und OSTERRIEDER, N. 2002. The Gene 10 (UL49,5) Product of Equine Herpesvirus 1 Is Necessary and Sufficient for Functional Processing of Glycoprotein M. *J. Virol.* 76/6, 2952-2963

RUDOLPH, J. und OSTERRIEDER, N. 2002. Equine Herpesvirus Type 1 Devoid of gM and gp2 Is Severely Impaired in Virus Egress but Not Direct Cell-to-Cell Spread. *Virology* 293, 356-367

SAMBROOK, J. und RUSSEL, D.W. (eds.) 2001. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

SCHIMMER, C. 2002. Identifizierung und Charakterisierung des UL11-Homologs des Equinen Herpesvirus Typ 1. *Vet. Med. Diss.*, München

SCHIMMER, C. und NEUBAUER, A. 2003. The equine herpesvirus 1 UL11 gene product localizes to the *trans*-Golgi network and is involved in cell-to-cell spread. *Virology* 308, 23-36

SEYBOLDT, C., GRANZOW, H. und OSTERRIEDER, N. 2000. Equine Herpesvirus 1 (EHV-1) Glycoprotein M: Effect of Deletions of Transmembrane Domains. *Virology* 278, 477-489

SLATER, J.D., LUNN, D.P., HOROHOV, D.W., ANTCZAK, D.F., BABIUK, L., BREATHNACH, C., CHANG, Y.-W., DAVIS-POYNTER, N., EDINGTON, N., ELLIS, S., FOOTE, C., GOEHRING, L., KOHN, C.W., KYDD, J., MATSUMURA, T., MINKE, J., MORLEY, P., MUMFORD, J., NEUBAUER, T., O'CALLAGHAN, D., OSTERRIEDER, K., REED, S., SMITH, K., TOWNSEND, H., VAN DER MEULEN, K., WHALLEY, M., WILSON, W.D. 2006. Report of the equine herpesvirus-1 Havermeier Workshop, San Gimignano, Tuscany, June 2004, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 111/1-2, 3-13.

SMITH, K.C., WHITWELL, K.E., BINNS, M.M., DOLBY, C.A., HANNANT, D., MUMFORD., J.A.

1992. Abortion of virologically negative foetuses following experimental challenge of pregnant pony mares with equid herpesvirus 1. *Equine Vet. J.* 24 /4, 256-259

SMITH, K.C. und BORCHERS, K. 2001. A Study of the Pathogenesis of Equid Herpesvirus-1 (EHV-1)

Abortion by DNA In-situ Hybridization. *J. Comp. Path.* 125, 304-310

SODEIK, B., EBERSOLD, M.W., und HELENIUS, A. 1997. Microtubule-mediated Transport of

Incoming Herpes Simplex Virus 1 Capsids to the Nucleus. *J. Cell Biol.* 136 /5, 1007-1021

SPARKS-THISSEN, R.L. und ENQUIST, L.W. 1999. Differential Regulation of D α and K α Major

Histocompatibility Complex Class I Proteins on the Cell Surface after Infection of Murine Cells by Pseudorabies Virus. *J. Virol.* 73/7, 5748-5756

SPREYER, 2008. Etablierung einer Multiplex Real-Time PCR zur Detektion und Differenzierung der

Equiden Herpesviren 1 (EHV-1) und 4 (EHV-4), *Vet. Med. Diss.*, München, *im Druck*

STENKE, T. 2006. Untersuchungen über den Einfluss der multipel hydrophoben Proteine des Equiden

Herpesvirus 1 auf die Replikation in polarisierten Zellen. *Vet. Med. Diss.*, München

STIERSTORFER, B., EICHHORN, W., SCHMAHL, W., BRANDMÜLLER, C., KAADEN, O.-R. und

NEUBAUER, A. 2002. Equine Herpesvirus Type 1 (EHV-1) Myeloencephalopathy: a Case Report. *J. Vet. Med.* B 49, 37-41

SUN, Y., MacLEAN, A.R., AITKEN, J.D., BROWN, S.M. 1996. The role of the gene 71 product in the

life cycle of equine herpesvirus 1. *J. Gen. Virol.* 77, 493-500

SUN, Y., MacLEAN, A.R., DARGAN, D. und BROWN, S.M. 1994. Identification and characterization

of the protein product of gene 71 in equine herpesvirus 1. *J. Gen. Virol.* 75, 3117-3126

TELFORD, E.A., WATSON, M.S., McBRIDE, K. und DAVISON, A.J. 1992. The DNA sequence of equine herpesvirus-1. *Virology* 189/1, 304-316

TEUTE, H., BRAUN, R., KIRCHNER, H., BECKER, H., MUNK, K. 1983. Replication of herpes simplex virus in human T lymphocytes. *Intervirology* 20/1, 32-41

TOMAZIN, R., HILL, A.B., JUGOVIC, P., YORK, I., VAN ENDERT, P., PLOEGH, H.L., ANDREWS, D.W. und JOHNSON, D.C. 1996. Stable binding of the herpes simplex virus ICP47 protein to the peptide binding site of TAP. *EMBO J.* 15/13, 3256-3266

TOMAZIN, R., BONAME, J., HEDGE, N.R., LEWINSOHN, D.M., ALTSCHULER, Y., JONES, T.R., CRESSWELL, P., NELSON, J.A., RIDDELL, S.R., JOHNSON, D.C. 1999. Cytomegalovirus US2 destroys two components of the MHC class II pathway, preventing recognition by CD4+ T cells. *Nat. Med.* 5/9, 1039-1043

TOWBIN, H., STAHELIN, T. und GORDON, J. 1979. Electrophoretic Transfer of Proteins From Polyacrylamid Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedures and Some Applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354

TOWNSEND, A. und BODMER, H. 1989. Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 7, 601-624

TRGOVCICH, J., JOHNSON, D. und ROIZMAN, B. 2002. Cell Surface Major Histocompatibility Complex Class II Proteins Are Regulated by the Products of the α 34,5 and UL41 Genes of Herpes Simplex Virus 1. *J. Virol.* 76/14, 6974-6986

VANDERPLASSCHEN, A., MATHEW, E., HOLLINSHEAD, M., SIM, R.B. und SMITH, G.L. 1998. Extracellular enveloped vaccinia virus is resistant to complement because of incorporation of host complement control proteins into its envelope. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 7544-7549

VAN DER MEULEN, K.M., NAUWYNCK, H.J., BUDDAERT, W. und Pensaert, M.B. 2000.

Replication of equine herpesvirus type 1 in freshly isolated equine peripheral blood mononuclear cells and changes in susceptibility following mitogen stimulation. *J. Gen. Virol.*

81, 21-25

VAN DER MEULEN, K.M., NAUWYNCK, H.J. und Pensaert, M.B. 2003. Absence of viral antigens on the surface of equine herpesvirus-1-infected peripheral blood mononuclear cells: a strategy to avoid complement-mediated lysis. *J. Gen. Virol.* 84, 93-97

VAN DER MEULEN, K.M., FAVOREEL, H.W., Pensaert, M.B., NAUWYNCK, H.J. 2006a. Immune escape of equine herpesvirus 1 and other herpesviruses of veterinary importance. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 111/1-2, 31-40

VAN DER MEULEN, K., CAIJ, B., Pensaert, M., NAUWYNCK, H. 2006b. Absence of viral envelope proteins in equine herpesvirus 1-infected blood mononuclear cells during cell-associated viremia. *Vet. Microbiol.* 113/3-4, 265-73

VAN DE WALLE, G.R., MAY, M.L., SUKHUMAVASI, W., VON EINEM, J., OSTERRIEDER, N. 2007. Herpesvirus chemokine-binding glycoprotein G (gG) efficiently inhibits neutrophil chemotaxis in vitro and in vivo. *J. Immunol.* 179/6, 4161-4169

VAN DE WALLE, G.R., SAKAMOTO, K., OSTERRIEDER, N. 2008. CCL3 and viral chemokine-binding protein gg modulate pulmonary inflammation and virus replication during equine herpesvirus 1 infection. *J. Virol.* 82/4, 1714-1722

VAN MAANEN, C. 2002. Equine herpesvirus 1 and 4 infections: an update. *Vet. Q.* 24, 58-78

VOSSSEN, M.T.M., WESTERHOUT, E.M., SÖDERBERG-NAUCLER, C., WIERTZ, E.J.H.J. 2002. Viral immune evasion: a masterpiece of evolution. *Immunogenetics* 54, 527-542

WIERTZ, E.J., DEVLIN, R., COLLINS, H.L. und RESSING, M.E. 2007. Herpesvirus Interference with Major Histocompatibility Complex Class II-Restricted T-Cell Activation. *J. Virol.* 81/9, 4389-4396

WILLIAMS, A., PEH, C.A., ELLIOTT, T. 2002. The cell biology of MHC class I antigen presentation. *Tissue Antigens* 59/1, 3-17

ZHOU, Z.H., CHEN, D.H., JAKANA, J., RIXON, F.J., CHIU, W. 1999. Visualization of Tegument-Capsid Interactions and DNA in Intact Herpes Simplex Virus Type 1 Virions. *J. Virol.* 73/4, 3210-3218

ZIEGLER, C., JUST, F.T., LISCHESKI, A., ELBERS, K. und NEUBAUER, A. 2005. A glycoprotein M-deleted equid herpesvirus 4 is severely impaired in virus egress and cell-to-cell spread. *J. Gen. Virol.* 86, 11-21

8. ANHANG

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
A. demin.	Aqua demineralisata
Amper	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	bacterial artificial chromosome
$\beta 2m$	$\beta 2$ -Mikroglobulin
BoHV-1	Bovines Herpesvirus 1
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
$^{\circ}C$	Grad Celsius
Ca^{2+}	Calcium
CD-	cluster of differentiation
CO_2	Kohlenstoffdioxid
CTLs	cytotoxische T-Lymphozyten
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNS	Desoxyribonukleinsäure
E	early
EBV	Trivialabkürzung des Humanen Herpesvirus 4 (Epstein-Barr Virus) offizielle Abkürzung: HHV-4
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

EEL	equine embryonale Lungenzellen
EHV-1	Equides Herpesvirus 1
EHV-4	Equides Herpesvirus 4
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	und andere Autoren
ETCC	equine transitional carcinoma cells
Fa.	Firma
FKS	fetales Kälberserum
g	Gramm
g(p)	Glykoprotein
h	Stunde(n)
HCMV	Trivialabkürzung des Humanen Herpesvirus 5 (Humanes Cytomegalie-Virus) offizielle Abkürzung: HHV-5
HSV-1	Trivialabkürzung des Humanen Herpesvirus 1 (Herpes Simplex Virus 1) offizielle Abkürzung: HHV-1
IAC	Isoamylalkohol-Chloroform-Gemisch
IE	immediate early
IFN- γ	Interferon- γ
Ig-	Immunglobulin-
Ii	nicht-variable Kette
IIF	indirekte Immunfluoreszenz
IL-	Interleukin-
IR	„Internal Repeat“-Region
Jak	Janus-Kinase
k	Kilo
kbp	Kilobasenpaare

kDa	Kilodalton
L	late
l	Liter
LB	Luria Bertoni
LiCl	Lithiumchlorid
m	Milli-
μ	Mikro-
M	molar
MAk	monoklonaler Antikörper
MGB-	minor-groove-binder-
Mg ²⁺	Magnesium
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
min	Minute
mind.	mindestens
MOI	multiplicity of infection
MuHV-1	Murines Cytomegalie-Virus
nm	Nanometer
N	normal
N-	an Stickstoff gebunden
NBL-6	equine dermale Zelllinie
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
O-	an Sauerstoff gebunden
o.	oben
OD _x	optische Dichte bei x nm Wellenlänge gemessen
o.g.	oben genannt
OH-	an Hydroxylgruppe gebunden
ORF	offener Leserahmen (open reading frame)
p	Protein von

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMCs	periphere mononukleäre Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells)
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PBS-T	Phosphat-gepufferte Saline mit Tween20
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentia hydrogenium
PI	Propidiumjodid
p.i.	post infectionem
POD	Peroxidase
RCAs	Regulatoren der Komplement-Aktivierung
Rk13	Zelllinie aus Kaninchennierenzellen (Rabbit kidney-Zelllinie)
RNA	Ribonukleinsäure
RNS	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
Stat	Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription
Std.	Stunde(n)
STV	Saline-Trypsin-Versene-Lösung
SuHV-1	Swines Herpesvirus 1
Tab.	Tabelle
TAP	Transporter für die Antigen-Prozessierung (transporter associated with antigen-processing)
TGN	<i>trans</i> -Golgi-Netzwerk

TEMED	Tetramethylethylendiamin
U	Unit (Einheit)
u.a.	unter anderem
UL	Unique long – Region
US	Unique short – Region
UV	ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
vhs	virion host shutoff
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
VZV	Trivialabkürzung des Humanen Herpesvirus 3 (Varizella-Zoster Virus) offizielle Abkürzung: HHV-3
W	Watt
w/v	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Erwin Märtlbauer gilt mein Dank für die freundliche Aufnahme im Institut, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die stets gewährte Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Antonie Neubauer-Juric für die ausgezeichnete Betreuung dieser Arbeit. Für ihr stetes Engagement, ihr Verständnis und die jederzeit gewährte Hilfe und Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit möchte ich mich ganz herzlich bei ihr bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Christine Brandmüller für die kompetente Einarbeitung in die molekularbiologischen Arbeitsmethoden, ihre unermüdliche Hilfe bei kleineren und größeren Problemen des Laboralltags und die gute Zusammenarbeit bedanken.

Den Mitarbeitern des BVD-Labors, insbesondere Frau Astrid Freudenstein, möchte ich vielmals danken für die Einweisung in die Arbeitstechniken der Durchflussszytometrie, das zur Verfügung Stellen von Geräten und Reagenzien und die nette Arbeitsatmosphäre.

Für die stets freundliche Hilfsbereitschaft möchte ich mich vor allem bei Herrn Dr. Werner Eichhorn, Herrn Dr. Robert Fux, Frau Dr. Eva Alešik und Frau Dr. Tanja Stenke ganz herzlich bedanken.

Vielen anderen Mitarbeitern des Instituts, insbesondere meinen Kolleginnen aus der Isolierstation, sei an dieser Stelle herzlich für ihre Hilfe und das gute Arbeitsklima gedankt.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern und meiner Familie danken – für jegliche Unterstützung und Aufmunterung und dafür, dass sie mir diesen Weg ermöglicht haben.