

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre,
Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Kommissarischer Leiter: Prof. Dr. E. Märtlbauer

angefertigt am
Institut für Immunologie,
Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Präsident: Prof. Dr. T.C. Mettenleiter
(Prof. Dr. M. Büttner)

**Rekombinante Parapockenvakzine gegen die klassische Schweinepest:
Vergleichende Charakterisierung der Immunreaktionen im Schwein**

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

Von
Heiner Voigt
aus
Mönchengladbach

München 2005

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent: Univ.-Prof. Dr. E.P. Märtlbauer
1. Korreferent: Univ.-Prof. Dr. J. Braun
2. Korreferent: Univ.-Prof. Dr. R. Wanke
3. Korreferent: Prof. Dr. M. Goldberg
4. Korreferent: Priv.-Doz. Dr. W. Breuer

Tag der Promotion: 15 Juli 2005

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Prof. Dr. Mathias Büttner am Institut für Immunologie des Friedrich-Loeffler-Institutes, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit in Tübingen angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt:

-Herrn Prof. Dr. Mathias Büttner für die Überlassung des Themas, seine wertvolle Hilfe und Förderung innerhalb und außerhalb des Labors, seine konstruktiven Anregungen und seine stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft

-Herrn Prof. Dr. E. Märtlbauer für die externe Betreuung und die Bereitschaft, diese Arbeit vor der Tierärztlichen Fakultät der LMU München zu vertreten

-Herrn Prof. Dr. A. Saalmüller, Herrn Dr. Christian und Frau Anette Marquardt, sowie Frau Konstanze Muschko und Frau Elke Rufer für die Hilfe bei den immunologischen und virologischen Arbeitsmethoden

-Herrn Prof. Dr. E. Pfaff sowie Dr. D. Wienhold für die Unterstützung in der molekularbiologische Methodik und die Bereitstellung des NS3-Impfantigens

-Herrn Dr. H.J. Rziha sowie Herrn M. Henkel und Frau A. Braun für die gute Zusammenarbeit bei der Herstellung und Charakterisierung des rekombinanten Parapoxvirus

-Frau Dr. H. Revets für die Bereitstellung des Adjuvans L-OprI und Frau M.F. LePotier und Frau C. Merant für die Durchführung eines Tierversuches

Bei der kompletten Belegschaft des Standortes Tübingen möchte ich mich für die gewährte Hilfe und das gute Arbeitsklima bedanken. Speziell sei hier den mit der Durchführung der Versuche und der Pflege der Versuchstiere betrauten Personen gedankt.

Allen die darüber hinaus zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, sei hier ein herzliches Wort des Dankes gesagt.

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Schriftum

1.1	Einleitung	1-6
1.2	Schriftum	7-16
1.3	Ziel der Arbeit	17

2. Material

2.1	Tiere	18
2.2	Zellen	18-19
2.3	Viren	19-20
2.4	Zytokine	20
2.5	Pharmaka	20
2.6	Antikörper und Antiseren	20-21
2.7	Chemikalien und Reagenzien	21-22
2.8	Nukleinsäuren	23-24
2.9	Zellkulturmedien und –zusätze	24-25
2.10	Puffer und Lösungen für immunologische Arbeiten	25-27
2.11	Puffer und Lösungen für molekularbiologische Arbeiten	27-29
2.12	Radioaktive Substanzen	29
2.12	Enzyme	29
2.13	Kits	29
2.14	Verbrauchsmaterialien	30
2.15	Geräte	30-32

3. Methoden

3.1	Molekularbiologische Methoden	
3.1.1	Isolierung von PPV-DNA	33
3.1.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	33
3.1.3	Aufarbeitung synthetischer Oligonukleotidprimer	33
3.1.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	34
3.1.5	DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	34
3.1.6	DNA-Agarosegelelektrophorese	34-35
3.1.7	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	35
3.1.8	Ligation von DNA	35
3.1.9	Prokaryotische Zellkulturen	36
3.1.10	Präparation von Plasmid-DNA	
	3.1.10.1 Analytische Isolierung von Plasmid-DNA	37
	3.1.10.2 Präparative Isolierung von Plasmid-DNA	37-38
3.1.11	Phenol/Chloroform-Extraktion	38
3.1.12	Ethanolpräzipitation	38
3.1.13	Sequenzierung von DNA	39
3.1.14	Southern Blot	39-41
3.1.15	Isolierung von Gesamtzell-RNA	41
3.1.16	Reverse Transkription (RT)	42
3.2	Herstellung des rekombinanten Parapockenvirus ORFV D1701VrVE2	42-43

3.3.	Immunologische Methoden	
3.3.1	Serum-Gewinnung	43
3.3.2	Enzym-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)	44
3.3.3	Serumneutralisationstest	45
3.3.4	Western Blot	45-46
3.3.5	Isolierung von mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC) mittels Dichtegradientenzentrifugation	46
3.3.6	Bestimmung der Zellzahl einer Zellsuspension	46-47
3.3.7	<i>In vitro</i> Stimulation von PBMC	47
3.3.8	Bestimmung von TypI-Interferon in Zellkulturüberständen	47-48
3.3.9	ELISPOT	48-49
3.3.10	CD6-Depletion der PBMC mit dem MACS®-System	49
3.3.11	Charakterisierung von Leukozytenpopulationen mit Hilfe der Durchflußzytometrie	50-51
3.4	Eukaryotische Zellkulturen	
3.4.1	Kultivierung und Lagerung von Zellen	51
3.5	Virusanzucht und Titerbestimmung	
3.5.1	Virusanzucht	52
3.5.2	Viruskonzentration mittels Ultrazentrifugation	52
3.5.3	Virustitration	52-53
3.5.4	Virusnachweis mittels immunohistochemischen Methoden	53
3.6	Infektionsnachweis	
3.6.1	Isolierung der weissen Blutzellen (WBC) aus Vollblutproben	53-54
3.6.2	Organprobenentnahme und –bearbeitung	54
3.6.3	Virusnachweis mittels Ko-Kultivierung	54
3.6.4	Virusnachweis mittels RT-PCR	54
3.7.	Tierexperimentelle Methoden	
3.7.1	Haltung der Tiere	55
3.7.2	Klinische Untersuchung	55
3.7.3	Blutentnahme	55
3.7.4	Immunisierung	55-56
3.7.5	Belastungsinfektion	56

4. Ergebnisse

4.1	Analysen des E2-exprimierenden rekombinanten Parapoxvirus ORFV D1701VrVE2	
4.1.1	Nachweis E2 spezifischer DNA im Genom von ORFV D1701VrVE2	57-59
4.1.2	Expression des Glykoproteins E2 in permissiven und nicht permissiven Zellen	60-61
4.1.3	Sicherheit der Applikation von ORFV D1701VrVE2	62-63
4.1.4	Stimulation der TypI Interferon Synthese in porcinen PBMC durch ORFV D1701VrVE2	64-66
4.2.	Immunisierungsversuche	
4.2.1	Immunantwort nach der Immunisierung mit dem Lebendimpfstoff Pestiffa®	67-68
4.2.2	Immunisierung mit dem rekombinanten Parapoxvirus ORFV D1701VrVE2	
4.2.2.1	Homologe <i>Prime-Boost</i> Immunisierung	69-73
4.2.2.2	Einfachimmunisierung „ <i>Prime only</i> “	74-83
4.2.2.3	Heterologe <i>Prime-Boost</i> Immunisierung mit rekombinantem E2 Protein und ORFV D1701VrVE2	84-86
4.2.3	Überprüfung der Adjuvanseigenschaften des OprI von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	87-95
4.2.4	Immunisierung mit Nicht-Struktur-Protein NS3	96-102
5. Diskussion		103-118
6. Zusammenfassung / Summary		119-122
7. Literaturverzeichnis		123-141
8. Anhang		

1 Einleitung und Schrifttum

1.1 Einleitung

Die klassische Schweinepest

Die klassische Schweinepest (classical swine fever, CSF) ist eine in der Liste A der OIE eingruppierte Infektionskrankheit der Schweine, die durch das Virus der klassischen Schweinepest (CSFV) hervorgerufen wird.

Das Virus der klassischen Schweinepest (CSFV) ist ein Vertreter im Genus Pestivirus in der Familie der *Flaviviridae*, der noch das Hepatitis-C-Virus und das Flavivirus angehören. Die veterinärmedizinisch bedeutsamsten Vertreter des Genus Pestivirus sind, neben dem CSFV, das Border-Disease-Virus (BDV) und das Bovine-Virus-Diarrhoe-Virus (BVDV) mit seinen zwei Genotypen. Das Viruspartikel setzt sich aus einem hexagonalen Viruskapsid mit ca. 30 nm Durchmesser und einer sphärischen Virushülle mit 50-60 nm Durchmesser zusammen (Wengler et al.; 1995). Es handelt sich um ein RNA-Virus, mit einem Genom von 12,5 kbp positiver Polarität. Zwischen einem 5' nicht translatierten Bereich (NTR), der als interne ribosomale Bindungsstelle (IRES) fungiert, und einem nicht polyadenylierten 3' NTR (Moormann und Hulst, 1988), liegt ein offener Leserahmen (ORF), der für ein hypothetisches Polyprotein mit ca. 3900 AS kodiert. Dieses wird von viralen und zellulären Proteasen co- und post-translationell in 11 bzw. 12 Proteine prozessiert (Meyers et al.; 1999).

Wie auch bei BVDV und BDV unterscheidet man bei CSFV zwei verschiedene Biotypen. Bei zytopathogenen (cp) Virusstämmen kommt es bei der *in-vitro* Vermehrung zur Zerstörung der Wirtszelle. Hier werden NS2 und NS3 vorwiegend getrennt voneinander gefunden. Nicht-zytopathogene (ncp) CSFV-Stämme repräsentieren die absolute Mehrheit der Feldviren und schädigen *in-vitro* die Wirtszellen nicht lichtmikroskopisch sichtbar. Bei diesen Viren kann nur intaktes Fusionsprotein NS2-3 nachgewiesen werden (Aoki et al.; 2004).

Die Genomorganisation der Pestiviren ist in Abbildung 1 schematisch aufgezeigt.

Abb.1

Genomorganisation der Pestiviren

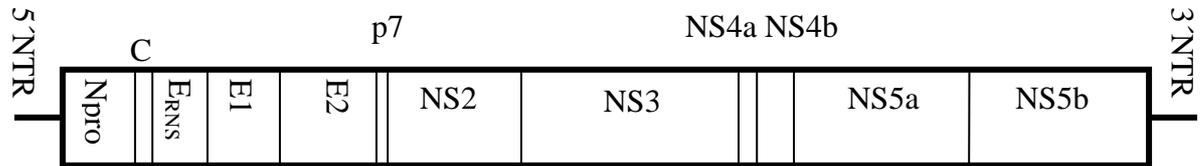


Abb.1: Das Genom der Pestiviren besteht aus einem offenen Leserahmen (ORF), der von einer IRES (5' NTR) und einem nicht polyadenylierten 3' NTR flankiert wird. Für die co- und posttranslational prozessierten Proteine sind bislang folgende Funktionen bekannt:

- Npro: Autoprotease (Stark et al.; 1993),
Inhibitor von IFN- α und Apoptose (Ruggli et al.; 2003)
- C: Kapsidprotein
- ERNS: Hüllprotein; RNase (C-Terminus) (Schneider et al.; 1993);
Transportdomäne (N-Terminus) (Langedijk; 2002)
- E1 und E2: Hüllproteine; Beteiligt an der Zellpenetration (Wang et al.; 2004)
- P7: unbekannt (Elbers et al.; 1996)
- NS2: Regulation der Replikation (Moser et al.; 1999)
- NS3: Helikase, NTPase, Protease (Bazan und Fleterick; 1989; Gorbalenya et. al.;
1989; Wiskerchen et al. ; 1991; Grassman et al.; 1999)
- NS4a: Co-Faktor der Protease des NS3 (Xu et al.; 1997)
- NS4b: unbekannt
- NS5a: Bindet den zellulären Elongationsfaktor eEF1A (Johnson et al.; 2001)
- NS5b: RNA-abhängige-RNA-Polymerase (Xiao et al.; 2002)

Nach der oronasalen Aufnahme und primären Vermehrung in den Tonsillen, den regionären Lymphknoten und den Peyer'schen Platten, verbreitet sich das CSFV durch lymphohämatogene Streuung im Körper, wobei es sowohl frei im Serum, als auch in den Monozyten und immaturren Granulozyten detektiert werden kann (Summerfield et al.; 1998a). Neben dem Epithel von Niere, Nebenniere, Pankreas, Bronchien, und Ileum lässt sich das Virus im Endothel der Gefäße nachweisen (Narita et al.; 2000), wo es zu einer Vaskulopathie führt (Bensaude et al.; 2004), in deren Folge es zu Gerinnungsneigung und Thrombozytopenie und, aus ihr hervorgehend, zu den makroskopisch erkennbaren Blutungen kommt. Da das Virus in der Lage ist, dendritische Zellen (DC) zu infizieren (Carrasco et al.; 2004) gelangt es unter Umständen mit diesen in die sekundären lymphatischen Organe. Hier kommt es zu einer zentral in den Lymphfollikeln beginnenden Virusreplikation und zur Depletion der B-Lymphozyten (Susa et al.; 1992). Sehr früh im Krankheitsverlauf ist Virusantigen auch in Erythroblasten, Megakaryozyten und Zellen der myeloischen Entwicklungsreihe im

Einleitung und Schrifttum

Knochenmark nachweisbar. Die Vorläuferzellen der weißen und roten Blutzellen werden apoptotisch und das Knochenmark zellarm und retikulinfaserreich (Gomez-Villamandoz et al.; 2003), so dass die in der Peripherie absterbenden Zellen nicht in ausreichendem Maße ersetzt werden können. Im peripheren Blut zirkulieren nur noch drastisch reduzierte Populationen von B- und T-Lymphozyten, die im Verlauf der Krankheit auch virusbefallen werden (Summerfield et al.; 1998b). Darüber hinaus sind die peripheren T-Lymphozyten auch funktionell beeinträchtigt (Pauly et al.; 1998). Zwar zeigen die Zellen einen aktivierten Phänotyp, jedoch wird der Apoptoseinducer Fas auf ihrer Oberfläche hochreguliert und ein erhöhter Anteil der Zellen geht in Apoptose (Summerfield et al.; 1998b). In den Follikeln von Lymphknoten und Milz werden nicht nur virusinfizierte Zellen, sondern auch nicht infizierte Nachbarzellen in der Apoptose angetroffen. Dies ist neben den Fas-tragenden T-Lymphozyten noch auf zelluläre Faktoren, wie Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- α), oder virale Faktoren, wie E_{RNS}, zurückzuführen, die von den infizierten Zelle freigesetzt werden (Bruschke et al.; 1997, Choi et al.; 2004). Im Thymus entwickelt sich eine cortikale Thymozytendepletion, bis im Terminalstadium der Phänotyp der Thymozyten dem der T-Lymphozyten des peripheren Blutes entspricht (Pauly et al.; 1998). Es kommt somit zu einer massiven Beeinträchtigung des Immunsystems, die auch für BVDV gezeigt werden konnte (Charleston et al.; 2001).

Die patho-physiologischen Veränderungen führen zu Krankheitssymptomen, wie Fieber von 40°C und mehr, Anorexie, Lethargie, Durchfall, respiratorischen Symptomen, Konjunktivitis, Lymphknotenschwellung, petechialen Blutungen und im Terminalstadium zentralnervösen Störungen, die in unterschiedlichem Maß akut oder chronisch auftreten können (Moennig et al., 2003). Bei transplazentarer Infektion kommt es zum Fruchtod oder, bei Erregerübertritt zwischen dem 50. und 70. Trächtigkeitstag zur Geburt persistent infizierter Ferkel, die mehrere Monate bei schlechtem Wachstum überleben können und in dieser Zeit auf Grund ihrer Immuntoleranz große Mengen Virus ausscheiden (van Oirschot und Terpstra, 1977).

Nach Überleben der Erkrankung, wird eine starke Immunität ausgebildet. Hierbei wird die Immunantwort gegen cp Stämme im BVDV System als schneller und effektiver als gegen ncp Stämme beschrieben. Dies führt man, wie das Potential der ncp Stämme, Feten persistent zu infizieren, auf die ausbleibende Stimulation der unspezifischen Immunabwehr durch die ncp Virusstämme zurück (Brackenbury et al.; 2003). Die humorale Immunantwort richtet sich in erster Linie gegen die Hüllproteine E_{RNS}, E1 und E2 sowie gegen das Nicht-Strukturprotein NS2-3. Antikörper, die gegen die Glykoproteine E2 (Weiland et al.; 1990) oder E_{RNS} (Windisch et al.; 1996) gerichtet sind, können neutralisierende Eigenschaften besitzen, da

Einleitung und Schrifttum

diese Proteine am Viruseintritt in die Zelle beteiligt sind (Wang et al., 2004) und vermitteln einen, zumindest teilweisen Schutz gegen die Erkrankung (Terpstra et al.; 1988).

PBMC von infektionsimmunen Tieren reagieren auf *in vitro* Restimulation durch CSFV mit Proliferation (Armengol et al.; 2002), Cytokin-Sekretion (Suradhat et al.; 2001; Suradhat und Damrongwatanapokin 2003) und Cytotoxizität (Piriou et al.; 2003). Für CSFV konnten in d/d Haplotyp identischen Schweinen mehrere T-Zell-Epitope auf verschiedenen Proteinen des Virus charakterisiert werden (Armengol et al.; 2002). Bei Untersuchungen der zellvermittelten Immunreaktion beim verwandten BVDV sind die Proteine E2 und vor allem das NS2-3 als dominierende T-Zell-Stimulatoren beschrieben (Collen et al.; 2000; Collen und Morrison; 2002). Mit einem adenoviralen Vektor, der das NS3 Protein exprimiert, konnte im Mausmodell eine humorale und zelluläre Immunreaktion gegen BVDV hervorgerufen werden (Elahi et al.; 1999). Jedoch besitzen Seren, die nur Antikörper gegen das NS3 Protein des BVDV enthalten keine neutralisierenden Eigenschaften (Bolin und Ridpath; 1989).

Immunisierungsstrategien gegen das CSFV

Nach der weitgehenden Tilgung des Virus aus der Hausschweinepopulation in den meisten EU-Mitgliedstaaten ist die vorbeugende Impfung in der Europäischen Union 1990 untersagt worden. Seit dieser Zeit kam es allerdings immer wieder zu CSF-Ausbrüchen in vormals virusfreien Gebieten, meist durch Einschleppung aus dem außereuropäischen Ausland oder über Wildschweine. Zur Eindämmung eines Ausbruches wurden früher alle Schweine im Umkreis von 500-1000 Meter um den betroffenen Betrieb getötet. Nach Artikel 19 der EU Richtlinie 2001/89/EG besteht seit 2001 die Möglichkeit der Anordnung einer Notimpfung. Hierzu kann unter hohen Auflagen das attenuierte Lebendvirus C-Stamm (Chinese strain) oder mit weniger Restriktionen eine Markervakzine eingesetzt werden, die eine Unterscheidung von geimpften und infizierten Tieren ermöglicht. Mit rekombinanten Vacciniaviren, die verschiedene Proteine oder Proteinkombinationen des CSFV zur Expression brachten, konnte experimentell gezeigt werden, dass das Glykoprotein E2 das Hauptziel neutralisierender Antikörper ist und mit ihm allein ein Schutz gegen die Infektion erreicht werden kann (König et al.; 1995). Die Epitope der neutralisierenden Antikörper, die gegen E2 gerichtet sind, konnten vor allem in den N-terminalen Domänen des Proteins lokalisiert werden (van Rijn et al.; 1996). In Immunisierungsversuchen induzierte man neutralisierende Antikörper durch die Verabreichung von E2 mit verschiedenen Systemen, die nachfolgend aufgelistet sind:

Einleitung und Schrifttum

E2 kodierende Plasmid DNA: Plasmid DNA erzeugt erst nach mehrfachen Immunisierungen einen messbaren Antikörpertiter, was sie für eine Notimpfung ungeeignet macht (Andrew et al.; 2000). Auch die gleichzeitige Expression von ko-stimulierenden Faktoren führte nicht zu einer Antikörperantwort nach einfacher Applikation (Wienhold; 2002).

Rekombinantes Vaccinia Virus: Hiermit sind neutralisierende Antikörper schon nach der Erstimpfung nachweisbar. Es kommt aber auch zu einer starken Immunreaktion gegen den Vektor, weder die Ausscheidung und Übertragung des Vektors nach der Impfung noch die Ausbreitung von CSFV nach einer Belastungsinfektion wurden untersucht (Rumenapf et al.; 1991; König et al.; 1995).

Rekombinantes Adenovirus: Wie auch die Vaccinia-Rekombinante erzeugt das Adenovirus neutralisierende Antikörper gegen CSFV als auch gegen den Vektor bereits nach einmaliger Verabreichung. Es kommt jedoch zur unkontrollierten Freisetzung des rekombinanten Adenovirus durch die Impflinge (Hammond et al.; 2000; 2001).

Rekombinantes Pseudorabiesvirus: Nach der einmaligen Immunisierung mit einer CSFV E2 exprimierenden PRV-Rekombinante sind neutralisierende Antikörper messbar und die Tiere sind sowohl gegen PRV als auch gegen CSFV geschützt. Somit ist auch hier eine starke Induktion der vektorspezifischen Immunität gegeben. Aussagen über Ausscheidung von Impf- oder Infektionsvirus wurden nicht getroffen (Hooft van Iddekinge et al.; 1996; Peeters et al.; 1997).

Baculo exprimiertes Glycoprotein E2 in Öl-in-Wasser-Adjuvans: Das Baculovirus Expressionssystem wurde zur Produktion von CSFV Glycoprotein E2 eingesetzt, um große Mengen des korrekt glykosylierten Proteins herzustellen (Ruggli et al.; 1995). Diese, für die Notimpfung zugelassene Markervakzine, induziert in einigen Fällen bereits nach einfacher Applikation neutralisierende Antikörper (Bouma et al.; 1999). Dennoch schützt sie selbst nach zweimaliger Applikation nicht sicher vor Virämie und Virusausscheidung (Dewulf et al.; 2001).

Neben diesen E2 Subunit-Vakzinen wurden als neue Alternative chimäre Viren aus BVDV und CSFV konstruiert (van Gennip et al.; 2000; Reimann et al.; 2004). Hierbei konnten mit einem rekombinanten BVD-Virus, in dem das BVDV E2 gegen ein CSFV E2 ausgetauscht worden war, neutralisierende Antikörper und Schutz von Schweinen gegen CSFV nach einmaliger Applikation erzeugt werden. Weder nach der Impfung noch nach der Belastungsinfektion kam es zu messbarer Virusausscheidung. Die geimpften Tiere konnten

Einleitung und Schrifttum

wie bei den Subunit-Vakzinen durch die Abwesenheit von CSFV-E_{RNS}-spezifischen Antikörpern von infizierten Tieren unterschieden werden (Reimann et al.; 2004). Wie zu erwarten führten auch CSFV Viren, die im Austausch das E2 oder E_{RNS} des BVDV enthielten, zum Schutz vor CSFV. Man vermied es jedoch den, für die Neutralisation wichtigen N-Terminus des E2, auszutauschen. Eine Unterscheidung zu Wildtypvirus-infizierten Tieren war mittels kompetitiven ELISA-Systemen möglich (van Gennip et al.; 2000).

Da diese Chimären aber ein vollständiges Pestivirusgenom enthalten, muss untersucht werden, ob sie in der Lage sind, die Plazentaschranke zu überwinden und zu persistent infizierten Ferkeln zu führen. Auch die mögliche Rekombination dieser Chimären mit im Feld vorhandenen Pestiviren muss aus Sicherheitsgründen bedacht werden. Die Ausscheidung der chimären Viren muss ausgeschlossen werden können und eine Apathogenität nicht nur für das Schwein, sondern auch für Rind und kleine Wiederkäuer muss gewährleistet sein, damit es im Zuge einer CSFV-Impfkampagne nicht zu BVDV/BDV Ausbrüchen kommen kann.

1.2 Schrifttum

Immunisierung mit rekombinanten Pockenviren unter besonderer Berücksichtigung heterologer *Prime-Boost* Impfstrategien

In der Geschichte der Impfstoffentwicklung wurde der Sicherheitsaspekt immer mehr in den Vordergrund gestellt. In Folge dessen wird der Einsatz der sehr potenten Lebendvakzinen immer weniger akzeptiert, einerseits wegen der Gefahr der Rückmutation zur Virulenz, andererseits wegen Ausscheidung von vermehrungsfähigen Erregern. Da die sehr sicheren Impfstoffe aus inaktivierten Pathogenen jedoch die zelluläre Immunantwort nur unzureichend aktivieren, suchte man nach einer Möglichkeit Sicherheit mit der Effektivität von Lebendvakzine zu verbinden. Als Lösung boten sich Vektoren an, die zur Expression immunogener Bestandteile eines Pathogens im Impfling führen und somit neben der humoralen auch die zelluläre Seite des Immunsystems ausreichend stimulieren.

Expression von Fremdgenen mit Pockenviren

Die heterologe Impfung gegen Menschenpocken (Variola) mit Vaccinia-Virusstämmen ist eine der erfolgreichsten Pionierleistungen der Medizin. Im Verlauf dieser Impfkampagne wurden die Vertreter der Virusfamilie *Poxviridae* intensiv untersucht und man fand unter anderem Eigenschaften, die sie als Vektoren zur Expression von Impfantigenen besonders geeignet machen. Sie besitzen ein Genom aus doppelsträngiger DNA und einen Enzymapparat, der bei der DNA-Synthese mögliche Fehler behebt (Chen et al.; 2002). Mit seinen 120-300 kb ist das Genom der *Poxviridae* sehr groß und es enthält viele nicht essentielle Gene und nicht kodierende DNA Abschnitte, die als Ziel für die Insertion von Fremdgenen dienen können. So sind für das Vaccinia Virus verschiedenste Gene bekannt, deren Deletion die Virusreplikation nur geringfügig beeinflussen, z.B. das Thymidinkinase-Gen (Buller et al.; 1985) oder das Hämagglutinin-Gen (Lee et al.; 1992). Ebenso wurden Viren erzeugt, die nach der Deletion z.B. des E3L-Gens, ein verändertes Wirtsspektrum zeigten (Hornemann et al.; 2003). Der Austausch intergenomischer Sequenzen bewirkte hingegen keine Änderung der Eigenschaften des Virus (Smith et al.; 1993). Für das Genus Parapoxvirus sind ebenfalls mehrere nicht essentielle Gene und DNA Bereiche beschrieben (Rziha et al.; 1999; Spehner et al.; 2004; McInnes et al.; 2001; Marsland et al.; 2003).

Über homologe Rekombination mit poxviralen Sequenzen, die das Fremdgen flankieren (Mackett et al.; 1982), oder durch *in-vitro* Ligation (Merchlinsky et al.; 1992) lassen sich

Einleitung und Schrifttum

fremde DNA Abschnitte gerichtet an einem Punkt des Pockengenoms einsetzen. Somit kann z.B. ein viruseigenes Gen selektiv gegen ein Fremdgen ausgetauscht werden. Dies kann ausgenutzt werden, um virale Virulenzgene zu deletieren (Hornemann et al.; 2003). Über dieses gezielte Ausschalten bestimmter Genomabschnitte konnten replikationsdefiziente Mutanten erzeugt werden, die eine sicherere Anwendung ermöglichen (Tartaglia et al.; 1992). Dieser gerichtete Austausch von Genomabschnitten ermöglicht aber auch die Anwendung der Negativselektion. In einer Rekombinanten, die ein Reporter-gen enthält, wird dieses durch das gewünschte Fremdgen ausgetauscht, welches effizient exprimiert werden soll. Um dies sicher zu stellen wird eine Selektion auf Abwesenheit des Reporters durchgeführt. Durch seine hohe Aufnahmekapazität von bis zu 25kb Fremdnukleinsäure (Smith und Moss; 1983) besteht sogar die Möglichkeit rekombinante Viren herzustellen, die mehrere Fremdgene stabil in ihr Genom integriert haben und diese auch exprimieren. Dies kann zum einen ausgenutzt werden, um rekombinante Viren herzustellen, mit denen gegen mehrere Pathogene geimpft werden kann. Zum anderen ermöglicht es den Einsatz der Positivselektion, bei der außer der beabsichtigten Expression eines Fremdgens, z.B. zur späteren Immunisierung, noch ein Selektionsprotein, z. B. eine Antibiotikaresistenz, in das Genom integriert wird. Hierdurch kann ein Selektionsdruck auf die nach dem Rekombinationsereignis noch im Überschuss vorhandenen Wildtypviren ausgeübt und die Aufreinigung der Mutanten beschleunigt werden.

Die virale mRNA wird von einer viruseigenen DNA abhängigen RNA Polymerase ohne splicing synthetisiert (Wittek et al.; 1982). Somit können Proteinsynthesemenge und -zeitpunkt über virale oder synthetische Promotoren, die in ihrer Wirkung genau definiert sind, gesteuert werden. Als Fremdgen kann man u. a. cDNA der für ein gewünschtes Protein kodierenden mRNA einsetzen, man benötigt also nicht unbedingt genaueres Wissen über die Struktur des Gens.

Sogar in Zellen, in denen es *in-vitro* nicht zu einer produktiven Virusvermehrung kommt, werden viele der vom Virusgenom kodierten Proteine produziert (Somogyi et al.; 1993), es kommt aber nicht mehr zur Bildung neuer, infektiöser Viruspartikel (Sutter und Moss; 1992; Stittelaar et al.; 2001). Somit können Virusstämme eingesetzt werden, die in der Zielspezies nicht vermehrungsfähig sind. So können zum Beispiel Vertreter des Genus Avipoxvirus oder das modifizierte Vaccinia Virus Ankara (MVA) (Stickl und Hochstein-Mintzel; 1971), obwohl sie in Säugerzellen nicht replizieren, zur Immunisierung von Säugetieren benutzt werden. Auch konnten bereits in der für das Parapoxvirus nicht permissiven Spezies Maus positive Immunisierungsergebnisse mit rekombinanten Parapoxviren erzielt werden (Rziha et

al.; 2000; Fischer et al.; 2003; Henkel et al.; 2005). Die Proteinsynthese und posttranslationelle Prozessierung wird von der eukaryotischen Zelle bewerkstelligt. Somit entsprechen die Produkte körpereigener wie auch viraler Fremdgene, anders als bei prokaryotischen Expressionssystemen, in ihrer Struktur immer dem Ursprungprotein. Der Transport des Fremdproteins kann entweder durch seine eigenen Signalsequenzen geregelt werden, so dass er dem bei der natürlichen Herstellung entspricht, oder das Protein wird gezielt an einen bestimmten Ort in der Zelle dirigiert. So sind Signalsequenzen verwandt wurden, um das exprimierte Protein gezielt in ein Kompartiment des Zytoplasma oder an die Zelloberfläche zu bringen.

Immunisierung mit Pockenvektoren

Neben der intradermalen Applikation, die den natürlichen Infektionsweg der Pockenviren nachvollzieht, führt auch die subkutane und die intramuskuläre Applikation zur Induktion einer systemischen Immunantwort (Flexner und Moss; 1996).

Die klassische Eintrittspforte der Pockenviren ist die verletzte Haut und Schleimhaut. Zur Erzeugung einer starken Schleimhautimmunität ist die mukosale Applikation des Impfstoffes der Weg der Wahl. Nach mukosaler Applikation von poxviralen Vektoren kommt es sowohl zu einer systemischen als auch zu einer lokalen Immunreaktion (Gherardi et al.; 2004).

Da nicht nur die humoralen, sondern auch die zellulären Immunmechanismen aktiviert werden, wurden Impfvektoren auf Pockenvirusbasis hauptsächlich im Zusammenhang mit verschiedenen intrazellulären Pathogenen, wie z.B. Plasmodien (Lanar et al.; 1996) und dem HI-Virus (Michel et al.; 1988), sowie Tumorerkrankungen (Wang et al.; 1995) erforscht, bei denen der Schutz hauptsächlich auf den zellvermittelten Immunreaktionen basiert.

Wegen der zuerst vorliegenden umfangreichen Informationen zum Genom von Vaccinia Virus wurde zunächst vor allem mit Vaccinia-Stämmen experimentiert. Die meisten Vaccinia Virus Stämme (incl. einiger Impfstämme) sind vor allem durch ihr breites Wirtsspektrum nicht gefahrlos einsetzbar. Bei der Impfung von immunsupprimierten Patienten mit replizierenden Vacciniavirusrekombinanten kann es, analog zum Ursprungsvirus, zum Auftreten einer disseminierten Infektion und klinischen Manifestation (Redfield et al.; 1987), und sogar zu tödlichen Enzephalitiden (Lane et al.; 1969), kommen. Ebenso ist ein Ausscheiden des Virus durch den Impfling möglich. So wurden nicht nur Transmissionen innerhalb der Spezies (Egan et al.; 2004), sondern auch vom Tier auf den Menschen beschrieben (Czerny et al.; 1991). Zum einen kann dieser Gefahr dadurch begegnet werden, dass man im empfänglichen Wirt nur mit hoch attenuierten Viren arbeitet. Prominentes Beispiel hierfür ist der Vaccinia

Einleitung und Schrifttum

Virus Stamm MVA, der nach vielfacher Passagierung auf aviären Zellen nicht mehr in der Lage ist, in einem Großteil der vom Säugetier-stammenden Zellen zu replizieren. Dennoch ist eine gute Fremdgenexpression in Mammalierzellen beschrieben (Staib et al.; 2004).

Größte Sicherheit bieten jedoch die in der Impfspezies nicht replizierenden Pockenviren. Da es hier nicht zur Vermehrung und Generalisierung im geimpften Individuum kommen kann, ist auch eine Freisetzung des gentechnisch veränderten Organismus in die Umwelt und dadurch die Infektion von Kontaktindividuen unmöglich. Diesen Sicherheitsvorteil für Säuger bieten die Vertreter des Genus Avipox. Sie führen im Säugetier aber nur zur Expression relativ geringer Mengen von Fremdantigenen.

Vertreter des Genus Parapoxvirus haben beim Säuger ein natürlich eingeschränktes Wirtsspektrum, das im Wesentlichen die Wiederkäuer einschließt (Haig und McInnes; 2002). Die von Parapockenviren verursachten Erkrankungen haben rein lokalen Charakter mit Restriktion der Infektion auf Haut und Schleimhäute ohne systemische Erregerverbreitung (Robinson und Lyttle; 1992; Haig und McInnes; 2002). Obwohl auf molekularer Ebene die Auswirkungen einer Parapoxvirus Infektion in nicht permissiven Zellen noch nicht ausreichend geklärt sind, wird die Anwendung im nicht permissiven System ohne größeres Risiko gesehen (Fischer et al.; 2003; Henkel et al.; 2004).

Als Pathogene der Wiederkäuer (sporadische Übertragung auf den Menschen) sind möglichst attenuierte rekombinante Parapockenviren gute Kandidaten als replikationsdefiziente Vektoren für verschiedene Tierarten (Pferd, Schwein, Hund, Katze). Sowohl im natürlichen Wirt (Marsland et al.; 2003) als auch im nicht permissiven System kommt es nach Applikation von rekombinantem Parapoxvirus ovis zur Fremdgenexpression und zur Antikörperbildung gegen Proteine, die unter der Kontrolle früher Promotoren, wie z.B. des vegf-e Promotors, stehen (Rziha et al.; 1999; Fischer et al.; 2003 ; Henkel et al.; 2004).

Adjuvans-Eigenschaften der Pockenviren

Eine wichtige Voraussetzung und Weichenstellung für die Bildung einer soliden, spezifischen Immunität ist die optimale Aktivierung des angeborenen Teils des Immunsystems (innate immunity; Paramunität). Bei einer Infektion kommt es zur Interaktion von konservierten Molekülen, die vielen Pathogenen eigen sind (Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMP), mit Rezeptoren der Zellen des angeborenen Immunsystems (Pattern Recognizing Receptors, PRR). Diese unspezifische Pathogenerkennung bewirkt unter anderem die Induktion von Zytokinen und die Maturierung dendritischer Zellen (Janeway et al.; 2002; Gallucci und Matzinger; 2001). Attenuierte Lebendimpfstoffe enthalten diese PAMP in

Einleitung und Schrifttum

nativer Form, wohingegen sie bei der Immunisierung mit inaktivierten Erregern oder einzelnen Proteinen in Form eines Adjuvans zugegeben werden müssen. Die Aktivierung der unspezifischen Abwehrzellen, gemessen z.B. über die Sekretion von Typ I IFN, koloniestimulierender Faktoren oder die Erhöhung der NK-Zell-Aktivität, ist für Pockenviren beschrieben (Mayr et al.; 1989). Eine besonders starke Stimulation dieses, auch als Paramunität angesprochenen Phänomens, wurde bei inaktivierten bzw. nicht replizierenden Parapockenviren nachgewiesen (Büttner et al.; 1995b, Fachinger et al.; 2000a; b). Als Mechanismus für die Induktion unspezifischer Immunreaktionen wird bei Parapoxvirus ovis die Interaktion mit den PRR CD14 und Toll-like-Rezeptoren der Zellen des angeborenen Immunsystems diskutiert (Friebe et al.; 2004). Im Schwein konnte überdies die Stimulation von PBMC zu Proliferation und Produktion von IFN- γ und IL-2 durch inaktivierte Pockenviren gezeigt werden (Fachinger et al.; 2000b), wobei im Falle der inaktivierten Parapockenviren eine nicht genauer definierte superantigen-ähnliche Wirkung postuliert wurde (Fachinger et al.; 2000a).

Die Aktivierung der zellvermittelten Immunantwort ist speziell auf die dendritischen Zellen angewiesen. Eine Akkumulation dieser Zellen ist in Parapoxvirus verursachten Läsionen zu finden (Haig et al.; 1997; Rose et al.; 1999). Die Maturierung der dendritischen Zellen ist für inaktivierte (Büttner et al.; 1993) wie auch nicht replizierende Pockenviren beschrieben (Drillien et al.; 2004). Über die *in vitro* Stimulation durch inaktivierte Parapockenviren hinaus, konnte ein positiver Effekt auf eine simultan verabreichte Impfung sowohl auf humoraler (Büttner et al.; 1986) wie auch auf zellulärer (Terzic et al.; 2004) Ebene gezeigt werden.

Prinzipiell ist auch der zusätzliche Einbau von Immunmodulatorgenen in das Genom eines Vektorvirus möglich (Bronte et al.; 1995). Diese können jedoch die Eliminierung des Vektorvirus beschleunigen und somit die Stimulation des Immunsystems durch das Fremdgen verkürzen, was zu einem geringeren Immunisierungserfolg führen kann (Dale et al.; 2004). Eine weitere Möglichkeit, die Immunantwort zu steigern, ist das Einbringen bekannter, für MHCII Peptide kodierender Sequenzen in den Vektor. Hierdurch kommt es zu einer Aktivierung der T_{Helfer} Zellen, die das Zytokinmilieu mitgestalten, auch wenn sie nicht Fremdgen spezifisch geprimt sind (Clark et al.; 1987; Good et al.; 1987).

Fremdgen-spezifische Immunreaktion

Bei der Immunisierung mit rekombinanten Pockenviren aktiviert das exprimierte Fremdprotein die humorale Immunantwort. Dies konnte sowohl für Rekombinanten replizierender als auch replikationsdefizienter Pockenviren immer wieder gezeigt werden. Es besteht eine klare Dosis-Wirkung-Beziehung, was auch die stärkere Immunogenität von replizierenden Vektoren erklärt (Andrew et al.; 1989). Auch ein Einfluss der Applikationsart auf Qualität und Quantität der Antikörperantwort ist beschrieben. So konnten hohe Serum-Antikörpertiter in i.v. immunisierten Mäusen erzeugt werden (Andrew et al.; 1989). Eine Produktion der schleimhautprotektiven IgA Antikörper konnte hingegen in erster Linie nach mucosaler (Eo et al.; 2001) oder intradermaler (Hagensee et al.; 1995) Immunisierung erzeugt werden. Die humorale Immunantwort kann durch Fusion der Transmembrandomäne der zellständigen Immunglobuline mit dem Fremdgen, das dadurch an die Oberfläche der Zelle dirigiert wird, noch verstärkt werden (Langford et al.; 1986).

Die Präsentation von Fremdprotein über das MHCII-Molekül der antigenpräsentierenden Zellen zur Stimulation der T_{Helfer}-Zellen, erfolgt nach Aufnahme und lysosomalem Verdau des Proteins. Eine effektive Gestaltung dieses Mechanismus konnte durch direktes Leiten des Proteins zu den Lysosomen erreicht werden (Rowell et al.; 1995).

Da die Proteinsynthese bei Pockenviren ausschließlich im Cytoplasma stattfindet, kommt es auch zu einer MHCI-Präsentation und somit zur Induktion cytotoxischer T-Lymphozyten, die Fremdgen-spezifisch sind (Ramirez et al.; 2000). Die Bildung von MHCI-Peptid-Komplexen findet nur früh nach der Infektion der Zelle statt, da es bei hohem Viruspartikel-Zellzahlverhältnis (multiplicity of infection, MOI) während der poxviralen Replikation zum sogenannten „shut off“, d.h. der Unterbindung der Synthese zellulärer Proteine, kommt (Andrew et al.; 1992). Somit erscheint es günstig die Fremdgenexpression durch einen frühen oder kombiniert einen frühen und späten Promotor zu kontrollieren. Neben dem richtigen Zeitpunkt der Expression sind auch Effekte des richtigen „Targeting“ beschrieben. Unter anderem führte die Verbringung des Fremdgens ins endoplasmatische Retikulum zu einer verstärkten Antwort cytotoxischer T-Lymphozyten (Irvine et al.; 1995).

Vektor-spezifische Immunreaktion

Der Erfolg der Vacciniaimmunisierung zur Eradikation von Variola basierte in erster Linie auf der Erzeugung einer starken, lang anhaltenden Immunität. So können nach Kontakt mit Vaccinavirus hohe Titer an neutralisierenden Antikörpern gemessen werden. Ebenso konnten aus Probanden, die mit Vaccinia geimpft wurden, sowohl CD4+ (Littua et al.; 1992)

als auch CD8⁺ (Demkowicz und Ennis; 1993) vaccinia-spezifische, cytotoxische T-Zellen isoliert werden.

Bei der Immunisierung mit rekombinanten Vacciniaviren kann sich diese starke Immunantwort gegen den Vektor nachteilig auswirken (Kündig et al.; 1993; Harrington et al.; 2002). Sie kann dazu führen, dass es bei der zweiten Applikation des gleichen Pockenvektors nicht mehr zu einer ausreichenden Fremdgenexpression kommt, da das Virus zu schnell vom Immunsystem neutralisiert und evtl. eliminiert wird (Gherardi et al.; 2004). Dieses Problem ist in erster Linie bei kurzen Impfintervallen gegeben, wogegen nicht replizierende Pockenvektoren bei langen Zwischenimpfzeiten gute Boost-Effekte im homologen Impfgemeinschaft erzielen können (Moore und Hill; 2004). Bei einem homologen Impfgemeinschaft mit Pockenvektoren, kommt es zu einer starken Konkurrenz der T-Lymphozyten um die Kostimulation durch antigenpräsentierende Zellen. Durch die Größe des Vektorvirus beträgt das Verhältnis von vektorspezifisch zu fremdgenspezifisch geprimten T-Zellen nach Erstkontakt bis zu 30:1 (Harrington et al.; 2002), was eine folgende Gedächtnisreaktion vor allem gegen den Vektor begünstigt. Zusätzlich werden dominante, hoch affine T-Zellen in einer Gedächtnisreaktion selektiert (Palmowski et al.; 2002). So konnte gezeigt werden, dass bei Verwendung eines Polyepitops nur das dominante Epitop eine gute Immunantwort durch homologen Poxvirusboost auslösen konnte (Woodberry et al.; 2003). Ein dominantes, vektorspezifisches Epitop ist damit in der Lage, die Immunantwort gegen das Fremdgen zu supprimieren. Sowohl Mitglieder des Genus Avipox (Fries et al.; 1996) als auch der Vacciniavirus Stamm MVA (Gherardi et al.; 2004) induzieren im nicht permissiven Wirt eine geringere Immunantwort gegen sich selbst als zur Replikation fähige Pockenvektoren im gleichen System. Im Gegensatz zu den meisten Vektorkandidaten aus dem Genus *Orthopoxvirus*, wird selbst im natürlichen Wirt nur eine unzureichende humorale Immunität gegen das Parapockenvirus ausgeprägt. Die gebildeten Serumantikörper schützen nicht vor einer Reinfektion (Buddle et al.; 1984). Ebenso bekämpft zwar die induzierte zelluläre Immunität, bei der vor allem die CD4⁺ Lymphozyten funktionell sind (Lloyd et al.; 2000), das Virus bei einer Sekundärinfektion, es kommt jedoch nur zur Reduktion der Symptome und einer schnelleren Abheilung der Läsionen, nicht aber zu steriler Immunität. Im natürlichen Wirt sind die Parapockenviren in der Lage sich lokal in der Haut effektiv gegenüber systemischen Immunreaktionen abzuschotten (Haig und McInnes; 2002). So kann es möglicherweise immer wieder zu Reinfektionen kommen. Eine systemische Applikation (z.B. intramuskulär) von Parapoxvirusvektoren schließt das lokal wirksame und wirtsrestringierte immunevasive Potential des Virus möglicherweise aus, ohne seine positiv-

immunmodulierenden Eigenschaften zu beeinträchtigen. Eine mehrmalige systemische Applikation rekombinanter Parapockenviren sollte immer wieder zu ungestörter Expression des gewünschten Fremdgens führen (Rziha et al.; 2000).

Heterologe Prime-Boost Impfstrategien mit Pockenvirusvektoren

Da zur Initiierung einer belastungsfähigen zellulären Immunität meist eine mehrfache Impfung in kurzer Zeit nötig ist, musste man das Problem der Immunreaktion gegen den Vektor beheben. Eine Möglichkeit ist die Applikation des rekombinanten Virus bei der Wiederholungsimpfung auf Schleimhäute, da es hier nach systemischer Erstimpfung nicht zum Kontakt mit neutralisierenden Antikörpern kommt (Eo et al.; 2001). Besonders attraktiv erschien aber die Möglichkeit, Antigene mit Hilfe von unterschiedlichen Vektoren in einem heterologen *Prime-Boost* Regime zu verabreichen. Meistgebrauchter, moderner Ansatz ist die Erstimmunisierung mit antigenspezifisch kodierender DNA, gefolgt von einer zweiten Impfung mit einem, meist poxviralen Vektor, der das gleiche Antigen zur Expression bringt (Ramsay et al.; 1997; 1999; Degano et al.; 1999; Hill et al.; 2000; Meseda et al. 2002). Somit kommt es bei beiden Immunisierungen zur Synthese des Antigens in körpereigenen Zellen, die eine Stimulation der humoralen, aber vor allem auch der zellulären Immunantwort zu Folge hat (Ramshaw und Ramsey; 2000). Darüber hinaus wurden auch Pockenvektoren mit Adenovirus-Vektoren kombiniert (Gilbert et al.; 2002). Beide Viren zeichnen sich durch die Induktion einer starken vektorspezifischen Immunantwort aus und zeigten, daraus resultierend, schlechte Ergebnisse bei der homologen Folgeimmunisierung. Durch das Kombinations-Impfregime konnte eine starke fremdgenspezifische Immunantwort ausgelöst werden (Casimiro et al.; 2003). Gleiches wurde auch bei der kombinierten Verwendung des Virus der vesikulären Stomatitis (VSV) mit einem Vaccinia Vektorvirus gezeigt (Haglund et al.; 2002). Einen positiven synergistischen Effekt konnte das Zusammenspiel von Vektoren aus Orthopoxviren mit Vertretern verschiedener anderer Genera der *Poxviridae*, wie z.B. Avipoxvirus (Prieur et al.; 2004) oder auch Parapoxvirus (Hausmann et al.; 2005), demonstrieren. Selbst beim Einsatz von Lebendimpfstoffen konnte eine höhere Effektivität einer heterologen Pockenvektor-Zweitimmunisierung gegenüber der homologen zweiten Applikation des Lebendimpfstoffes u. a. bei der Erzeugung antigenspezifischer T-Zellen gegen das *Mycobacterium tuberculosis* gezeigt werden (Vordermeier et al.; 2004). Auffällig ist bei all diesen Kombinationsstrategien, dass die heterologen Impfregime zu einer stärkeren Aktivierung der T-Zell-vermittelten Immunantwort führen als homologe (Estcourt et al.; 2002; Woodland; 2004).

Zum einen wird bei nicht vorhandener Vektorimmunität wahrscheinlich eine größere Menge an Fremdanigen exprimiert. Desweiteren konnten Liu et al. (2003) zeigen, dass es bei der Verwendung von Papillomavirus vektorspezifisch zur Induktion IL-10 sezernierender Zellen kommt. Bei der homologen Auffrischimpfung kommt es deshalb zu starker IL-10 Sekretion. Diese unterbindet die Induktion IFN- γ produzierender Zellen, ein Phänomen das in IL-10-defizienten Mäusen nicht beobachtet werden konnte. Man erklärt den positiven Effekt der heterologen Zweitimmunisierung auch damit, dass der Boost zum Zweitkontakt mit dem Fremdanigen führt, aber nur den Erstkontakt mit dem Vektor darstellt. Dadurch, dass die Zellen bei der Gedächtnisreaktion schneller proliferieren, steht ihnen auch der Großteil der antigenpräsentierenden Zellen, Zytokine und anderer stimulierender Faktoren zur Verfügung (Palmowski et al.; 2002; Moore und Hill; 2004). Man umgeht überdies auch das bereits beschriebene Problem der Hierarchie der fremdgen-spezifischen und vektorspezifischen Epitope. Neben der quantitativen Überlegenheit (T-Zellproliferation) wird nach heterologem Boost auch die Bildung eines umfassenderen Fremdgen-spezifischen T-Zell-Repertoires beschrieben (Vordermeier et al.; 2004).

In der Literatur sind auch Arbeiten zu finden, in denen mehrere *Prime-Boost* Kombinationen miteinander verglichen wurden. Allgemein lässt sich sagen, dass das Ergebnis von der Stärke der Einzelreaktionen nach den Impfungen abhängt (Vazquez-Blomquist et al.; 2004). So war eine Kombination von adenoviralen oder avipoxviralen Vektoren mit dem Vaccinia Virus Vektor MVA effektiver als dessen Kombination mit einer Plasmid-DNA Vakzine (Moore und Hill; 2004). Auch wird der richtigen Reihenfolge der Immunisierungen ein Einfluss auf den Impferfolg zugeschrieben. Bei einer systemischen Applikation wird DNA zur Erstimmunisierung empfohlen. Bei der Kombination verschiedener Vektorvertreter der *Poxviridae* scheint der Einsatz der Avipoxviren mit ihrer geringeren Expressionseffizienz im Säuger als *Prime* vor einem *Boost* mit dem replikationsrestringierten Vaccinia Virus MVA besser geeignet, als die Verabreichung in umgekehrter Reihenfolge (Vuola et al.; 2005).

Neben der Stärke der induzierten Immunantwort ist auch die Langlebigkeit der Immunität wichtig für den Impferfolg. Während homologe Plasmid-DNA Impfgeme relativ wenige Effektorzellen erzeugen, bleiben diese Zellen als Gedächtniszellen lange erhalten. Bei heterologen DNA-Pockenvirus Applikationskombinationen werden kurzfristig sehr viele Effektorzellen erzeugt. Bei der Generierung von Gedächtniszellen findet sich jedoch kein Unterschied mehr zwischen homologer und heterologer Auffrischungsimpfung (Santra et al.; 2004).

Einleitung und Schrifttum

Auch die lokale Immunantwort ist mit Pockenviren durch mukosale oder intradermale Verabreichung aktivierbar. Da es zur Induktion von IgA Antikörpern kommt, stellt die vektorspezifische Immunität ein Problem bei der Revakzinierung dar. Auch hier ist das Verhältnis von fremdgenspezifischer zu vektorspezifischer Immunantwort bei nicht replizierenden Pockenvektoren besser als bei replizierenden (Gherardi et al.; 2004). Deshalb wurde auch hier der Nutzen heterologer Auffrischimpfungen begutachtet. Zur effektiven Applikation von Nukleinsäuren oder Peptiden sind Adjuvantien unerlässlich (Vajdy et al.; 2004). Es ist aber auch nach mukosaler Erstimpfung mit systemischer Wiederholungsimpfung ein Verstärkungseffekt sowohl systemisch als auch lokal zu erzielen. Da das rekombinante Pockenvirus eine weitaus stärkere Erstantwort nach lokaler Applikation erzeugt als Plasmid-DNA, ist zur Erzeugung einer guten lokalen wie auch systemischen Immunantwort die Applikationsfolge poxviraler Vektor gefolgt von Plasmid-DNA am besten geeignet (Eo et al.; 2001).

1.3 Ziel der Arbeit

Nach wie vor ist klassische Schweinepest eine Bedrohung für die Schweineproduktion in der europäischen Union, insbesondere nach der EU-Erweiterung und künftigen Erweiterungsabsichten. Deshalb besteht ein starkes Interesse, einen Impfstoff zu entwickeln, der in einer Interventionsimpfkampagne eingesetzt werden kann. Die Wunschvorstellung ist, dass eine Interventionsimpfung eine belastungsfähige Immunität bereits kurz nach der Applikation eines geeigneten Impfstoffes erzeugt. Die im Baculovirus Expressionssystem hergestellte und zugelassene Glykoprotein E2 Subunit Vakzine erfüllt dieses Kriterium nicht voll. Wichtig hierbei ist, dass nicht nur die Manifestation der klassischen Schweinepest verhindert oder zumindest abgemildert wird, sondern in erster Linie, dass die Ausscheidung und somit die Verbreitung des Virus gestoppt wird. Um eine Unterscheidung von geimpften gegenüber infizierten Tieren durchführen zu können (Konzept DIVA = differentiation of infected from vaccinated animals), muss der Impfstoff eine Markerkomponente enthalten. In der vorliegenden Arbeit sollte die Effektivität von so genannten Subunit-Impfstoffen, die nur mit einem Proteinbestandteil des CSFV immunisieren, mit Hilfe einer neuen Parapockenvektorvakzine überprüft werden. Hierbei sollte die Induktion der Immunantwort auf humoraler wie auch auf zellulärer Ebene charakterisiert werden. Der Impfschutz wurde durch eine Belastungsinfektion mit einer letalen Dosis eines hoch virulenten Stammes des CSFV getestet. Neben der Beurteilung der klinischen Symptome der infizierten Tiere wurde in limitiertem Umfang auch die Ausscheidung des Virus und Ansteckung ungeimpfter Zustallkontrollen begutachtet.

Da aus der Literatur Informationen zur Immunogenität der Proteine E2 und NS3 der Pestiviren bekannt waren, wurden diese Virusuntereinheiten als Antigene gewählt. Dabei steht die Expression und immunisierende Potenz des CSFV Glykoprotein E2 im Kontext mit der Entwicklung eines neuen rekombinanten Parapockenvirus als Impfvektor im Mittelpunkt. Dementsprechend wurde das rekombinante Virus ORFV D1701VrVE2 hergestellt, *in-vitro* analysiert und danach in verschiedenen Immunisierungsversuchen eingesetzt. Eine detaillierte Überprüfung der Stimulation sowohl des angeborenen wie auch des erworbenen Teils des Immunsystems wurde vorgenommen. Letztendlich wurde auch die Anwendbarkeit des neuen Vektors im Rahmen einer heterologen *Prime-Boost* Vakzinierung im Schwein geprüft, um Informationen zur Einsatzmöglichkeit dieses Konzepts zur eventuellen Verbesserung des Impferfolges zu erhalten.

2 Material

2.1 Tiere

In den Immunisierungsversuchen mit ORFVD1701VrVE2 und dem Adjuvans L-OprI fanden Schweine der Deutschen Landrasse Verwendung. Sie wurden aus der Versuchsstation für Tierhaltung, Tierzucht und Kleintierzucht der Universität Hohenheim bezogen. Die Tiere hatten zu Beginn der Versuche ein Alter von 6-8 Wochen und wogen ungefähr 20-25 kg. Die Immunisierung mit der Lebendvakzine und dem bakteriell exprimierten NS3 wurde in Tieren der Rasse Münchener Miniaturschwein (MMS) (Sambraus; 1987) durchgeführt. Diese Tiere hatten bei Versuchsbeginn ein Alter von 24 Wochen und ein Gewicht von ca. 30 kg. Keines der Tiere wies zu Beginn der Immunisierungsversuche pestiviruspezifische Antikörper auf. Für die Unbedenklichkeitsprüfung im Schaf wurden 2 Tiere der Rasse Merino Landschaf in einem Alter von 12 Monaten verwandt.

2.2 Zellen

Porcine mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
(peripheral blood mononuclear cells PBMC):

Diese Zellen wurden aus Vollblutproben der Tiere gewonnen und entweder direkt nach der Gewinnung oder nach der Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff verwendet.

MA-104 (ATCC Nr: CRL-2378.1) Zelllinie:

Diese Zelllinie wurde zur Anzucht der Parapoxviren verwendet.

KOP-R (Kälber-Oesophagus) Zelllinie (RIE 244):

Diese Zelllinie wurde zur Anzucht der Parapoxviren verwendet.

MDBK (Madin-Darby-Bovine-Kidney)-Zelllinie (ATCC Nr. CCL22):

Diese Zelllinie wurde zum Nachweis der antiviralen Potenz von Typ I IFN in Zellkulturüberständen verwendet (Rubinstein et al.; 1981)

PK-15 (Porcine-Kidney)-Zelllinie (ATCC Nr. CCL33):

Diese Zelle wurde als CSFV-Indikatorzelle in der Ko-Kultivierung und Serumneutralisationstest verwendet (OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals).

Material

STE (Swine-Testis-Epitheloid) (Kosmidou; 1995):

Diese Zelllinie wurde zur Anzucht des CSFV Stammes Eystrup verwendet.

2.3 Viren

Parapoxvirus ovis ORFVD1701VrV (Henkel 1997)

Familie *Poxviridae*, Genus Parapoxvirus

Die verwendete Viruscharge wurde auf MA-104 Zellen vermehrt und hatte einen Titer von 10^7 KID₅₀/ ml.

Die Charge wurde in Portionen zu 1 ml bei -70°C gelagert

Parapoxvirus ovis ORFVD1701VrVE2

Familie *Poxviridae*, Genus Parapoxvirus

Die verwendete Viruscharge wurde auf MA-104 Zellen vermehrt und hatte einen Titer von 10^8 KID₅₀/ ml.

Die Charge wurde in Portionen zu 1 ml bei -70°C gelagert

Virus der klassischen Schweinepest (classical swine fever virus; CSFV) Stamm Eystrup

Familie *Flaviviridae*, Genus Pestivirus

Die verwendete Viruscharge wurde auf STE Zellen vermehrt und hatte einen Titer von 10^7 KID₅₀/ ml.

Die Charge wurde in Portionen zu 1 ml bei -70°C gelagert. Das Virus wurde bis zur Zellinfektion auf Eis gekühlt.

Virus der klassischen Schweinepest (classical swine fever virus; CSFV) Stamm Lothringen (Kosmidou et al.; 1998)

Familie *Flaviviridae*, Genus Pestivirus

Die verwendete Viruscharge wurde auf STE Zellen vermehrt und hatte einen Titer von 10^7 KID₅₀/ ml.

Die Charge wurde in Portionen zu 1 ml bei -70°C gelagert. Das Virus wurde bis zur Zellinfektion auf Eis gekühlt.

Material

Virus der Stomatitits Vesikularis (VSV) Stamm Indiana

Familie *Rhabdoviridae*, Genus *Vesiculovirus*

Die verwendete Viruscharge wurde auf CEC (chicken embryo cells) Zellen vermehrt.

Die Charge wurde in Portionen zu 1 ml bei -70°C gelagert. Das Virus wurde bis zur Zellinfektion auf Eis gekühlt.

2.4 Zytokine

rekombinantes humanes IFN α 2 (hrIFN α 2):

freundlicherweise zur Verfügung gestellt vom National Institute for Health (NIH), Bethesda, MD, USA; Standard No. Gxa 01-901-535

2.5 Pharmaka

Azaperon (Stressnil [®])	Fa. Janssen-Cilag GmbH
Ketaminhydrochlorid (Urostamin [®])	Fa. Serum-Werk Bernburg AG
Penicillin G	Fa. Grünenthal
Streptomycinsulfat	Fa. Serva

2.6 Antikörper und Antiseren

Anti CD6	mAK a38b2 (Maus IgG1) (Pauly et al.; 1996)
Anti CD 21	mAK anti CD21 (Maus IgG1) (Denham et al.; 1998) BDPharmigen, CA, USA
Anti SWC3	mAK 74-22-15A (Maus IgG2b) (Peskovitz et al.; 1984) freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. J.K. Lunney, USDA, Beltsville, MD, USA

Die aufgeführten monoklonalen Antikörper gegen porcine Leukozytenoberflächenantigene wurden von A. Saalmüller, FLI, Tübingen, zur Verfügung gestellt.

Anti porcine IFN- α	mAK 27100-1 (Maus IgG1) (L'Haridon et al.; 1991) PBL Biomedical Laboratories, Picataway, NJ, USA
Anti porcine IFN- γ	mAK MP700 (Maus IgG1) Perbio Science, Erembodegem, Belgien

Material

Anti porcine IFN- α	polyklonales Kaninchenserum 37100-1 PBL Biomedical Laboratories, Picataway, NJ, USA
Anti porcine IFN- γ	polyklonales Kaninchenserum PP700 Perbio Science, Erembodegem, Belgien
Anti CSFV E2	mAK a18 (Maus IgG1) (Weiland et al.; 1990)
Anti CSFV NS3	mAK C16 (Maus IgG1) (Peters et al.; 1986)

Konjugierte Antikörper

Anti Maus POD	Fa. Dianova
Anti Maus IgG1-PE	Fa. Jackson Immuno Research
Anti Maus IgG2b-Alexa 488	Fa. Molecular Probes
Anti Schwein POD	Fa. Dianova
Anti Kaninchen AP	Fa. Promega

2.7 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid-Stammlösungen	Fa. AppliChem, Roth
Agar	Fa. Difco
Agarose für Gelelektrophorese	Fa. Gibco BRL
Ampicillin	Fa. Boehringer Mannheim
Aqua bidest.	Hergestellt mit einer Milli-Q-Ultrafiltrationsanlage
Bacto Hefeextrakt	Fa. Difco
Bacto Trypton	Fa. Difco
BCIP/NBT	Fa. Sigma
Bromphenolblau	Fa. Serva
BSA (Rinderserumalbumin)	Fa. Sigma
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Fa. Merck
ConcanavalinA (ConA)	Fa. Sigma
DEPC	Fa. Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fa. Merck
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Fa. Merck
Ethanol (vergällt)	Fa. Roth

Material

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Fa. Serva
Ethidiumbromid	Fa. Serva
FBS (fötales bovines Serum)	Fa. PAA
Heparin-Natrium, 186000 U/g	Fa. Serva
HEPES	Fa. Fluka
Heringssperma-DNA	Fa. Sigma
Kaliumchlorid (KCl)	Fa. Merck
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	Fa. Merck
Kaliumhydrogenphosphat (KHPO ₄)	Fa. Merck
Kristallviolett	Fa. Sigma
L-15	Fa. Life Technologies
Lymphozytenseparationsmedium (1,077 g/ml)	Fa. PAA
Magnesiumchloridhexahydrat (MgCl ₂ 6H ₂ O)	Fa. Merck
MEM-NEAA	Fa. Life Technologies
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Fa. Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Fa. Merck
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Fa. Merck
Nukleosidtriphosphate	Fa. Roche
OPD	Fa. Sigma
RPMI 1640	Fa. PAA
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Fa. Sigma
Tris-gesättigtes Phenol für DNA-Extraktion	Fa. AppliChem, Roth
H ₂ O-gesättigtes Phenol für RNA-Extraktion	Fa. AppliChem, Roth
Trypsin 250	Fa. Difco
Tryptose-Phosphat-Broth (TPB)	Fa. Difco
Trypanblau, rein	Fa. Serva
Tween 20, rein	Fa. Serva
Prestained-SDS-PAGE Proteinlängenmarker	Fa. Bio-Rad, New England Biolabs
SDS-PAGE Proteinlängenmarker	Fa. Bio-Rad, New England Biolabs
TEMED	Fa. Sigma

Material

2.8 Nukleinsäuren

DNA Molekulargewichtsstandard

(50 bp; 100 bp; 1 kbp)	Fa. Invitrogen
Random Primers	Fa. Invitrogen
Oligonukleotidprimer (siehe Tabelle 2.1)	Fa. Invitrogen

Tabelle 2.1

	Sequenz	Referenz
CSFV Diagnostik		
Panpest.seq.	GTA GTC GTC AGT GTT TCG	Ridpath et al.; 1994
Panpest.rev.	GCC ATG TAC AGC AGA GAT	
Panpest.n.seq.	CGA CAC TCC ATT AGT TGA GG	Ridpath et al.; 1994
Panpest.n.rev.	GTC CAT AAC GCC ACG AAT AG	
CSFV E2		
E2.seq	GCT AGC CTG CAA GGA AGA	CSFV Alfort 187 Nt 2443-2459 (Meyers et al. 1989)
E2.rev	TCA CTG CTG TGC ACT CTA	CSFV Alfort 187 Nt 2850-2867 (Meyers et al. 1989)
PPV Diagnostik		
42k.seq.	TGA TCA GGA TCC TTA ATT TAT TGG CTT GCA GAA CT	Büttner et al.; 1995a
42k.rev.	GTA CTT GAA TTC GTT CTC CTC CAT CCC CCT GGG CG	
42k.n.rev.	GCG AGT CCG AGA AGA ATA CG	

Material

Plasmide

Klon 1051: E2 Gen von CSFV Alfort 187 in pBc SK (-) Phagemid
(Zur Verfügung gestellt von G. Meyers; FLI Tübingen)

Pdv-Rec: PstI-Subfragment des Hind III- Fragmentes H von ORFV D1701 mit teilweise deletiertem vegf-e-Gen und multipler Klonierungsstelle (multiple cloning site, MCS). Das Plasmid enthält sowohl den Promotor als auch das Transkriptionsstoppsignal des vegf-e Gens
(Zur Verfügung gestellt von HJ.Rziha; FLI Tübingen).

2.9 Zellkulturmedien und -zusätze

MEM-Hepes:

9,6 g Minimum Essential Medium (MEM) mit Hepes Salzen
2 g NaHCO₃
ad 1,0 l Aqua dest.; pH7,3; steril filtrieren

RPMI-Medium:

RPMI 1640-Medium mit L-Glutamin und NaHCO₃ (PAA)

BFA-37:

9,6 g Minimum Essential Medium (MEM) mit Earle´s Salzen, nicht-essentiellen Aminosäuren und L-Glutamin
(Invitrogen LifeSciences)
2 g NaHCO₃
ad 1,0 l H₂O dest., steril filtrieren

L-15-Medium (Leibovitz-Medium):

14,5g L-15
0.85g NaHCO₃
ad 1,0 l Aqua dest.; pH7,3; steril filtrieren

TPB-Medium (Tryptose-Phosphat-Broth)

29,5g TPB, ad 1,0 l Aqua dest.; steril filtrieren

Material

MDBK-Medium

45% L-15-Medium

45% BFA-37

10% TPB

BFA-40:

0,125% Trypsin

0,025% EDTA

0,4% NaCl

0,01% KCl

0,01% KH₂PO₄

0,057% Na₂HPO₄

Fötales bovines Serum (FBS):

Steril-filtriertes, Endotoxin-getestetes fötales bovines Serum (PAA) wurde zur Komplementinaktivierung vor Gebrauch 30 Minuten bei 56°C inaktiviert.

Penicillin/Streptomycin-Stammlösung:

1 Mio I.E. Penicillin und 1g Streptomycin in 10 ml Aqua dest. lösen, steril filtrieren und bei 4°C lagern.

Alle Kulturmedien wurden im Verhältnis 1:1000 mit der Penicillin/Streptomycin-Stammlösung versetzt.

2.10 Puffer und Lösungen für immunologische Arbeiten

PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung) :

140 mM NaCl

2,7 mM KCl

6,5 mM Na₂HPO₄

1,5 mM KH₂PO₄

0.7 mM CaCl₂

0,5 mM MgCl₂ 6H₂O; pH7,2-7,4

Material

PBS-A (Phosphat gepufferte Salzlösung ohne zweiwertige Ionen):

140 mM NaCl

2,7 mM KCl

6,5 mM Na₂HPO₄

1,5 mM KH₂PO₄; pH 7,2-7,4

PBS-A-Tween:

0,05% (v/v) Tween20 in PBS-A

Isotone Kochsalzlösung:

0,9% (w/v) NaCl in Aqua dest.

Lysis Puffer:

150 mM NH₄Cl

8 mM KHCO₃

1 mM EDTA; pH 7,0

FACS-Puffer:

2% (v/v) FBS in PBS-A

Coating Puffer:

100 mM NaHCO₃; pH 9,6

Lösungen für immunologische Arbeiten

Concanavalin-A Lösung:

0,1% (w/v) ConA in isotoner Kochsalzlösung

Heparin-Lösung

0,2% (w/v) Heparin in PBS

Trypanblau-Lösung

0,1% (w/v) Trypanblau in PBS

Material

Kristallviolett-Formalin-Lösung:

25% Formalin, konzentriert, 5% Kristallviolett-Lösung (15% (w/v) Kristallviolett in Ethanol),
70% Aqua dest.

4x SDS-Probenpuffer:

8% SDS, 20% β -Mercaptoethanol, 20% Glycerin, 0,004% Bromphenolblau, 250 mM Tris-HCl, pH 6,8

Tris-Glycin-Puffer:

192 mM Glycin, 25 mM Tris-OH, 0,1% SDS

Natrium-Dodekylsulfat- Polyakrylamidgele

	<u>Sammelgel</u>	<u>Trenngel</u>
Acrylamid	5%	12,5%
30% Acrylamid	1,67 ml	12,5 ml
1% N,N'-Methylenbisacrylamid	1,30 ml	3,1 ml
1 M Tris-HCl, pH 8,8	-	11,2 ml
1M Tris-HCl, pH 6,8	1,25 ml	-
20% SDS	0,05 ml	0,15 ml
ad H ₂ O	10 ml	30 ml
TEMED	5 μ l	10-20 μ l
10% Ammoniumpersulfat (APS)	50 μ l	400 μ l

2.11 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Arbeiten

Agarosegelelektrophorese:

1 x TAE-Puffer

40 mM Tris, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA mit Eisessig auf pH 7,8 eingestellt

10x DNA-Probenpuffer

20 mM EDTA, pH 8,0, 50% Glycerin, 0,2% OrangeG, 0,2% Xylencyanol, 0,1%
Bromphenolblau

Material

Prokaryotische Zellkultur:

LB-Medium

10 g Bacto Trypton, 5 g Bacto Hefeextrakt, 5 g NaCl, ad 1 l H₂O; pH 7,5

LB-Agar

LB-Medium mit 1,5% Agar

Selektionsmedium

LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin,

„Schnellminipräparation“ bakterieller Plasmid-DNA:

Bakterien-Lysepuffer

9 Vol. 10x Auftragspuffer, 11 Vol. H₂O, 40 Vol. 0,2 N NaOH/1% SDS

10x Auftragspuffer

0,25% Xylencyanol, 0,25% Bromphenolblau, 25% Ficoll 400

Lösung 2

3 M Kaliumacetat, 1,8 M Ameisensäure

Plasmid-Schnellpräparation:

Lösung A

50 mM Glucose, 25 mM Tris/Cl pH 8,0, 10 mM EDTA, 2 mg/ml Lysozym

Lösung B

0,1 N NaOH, 1% SDS

Lösung C

3 M Na-Acetat pH 4,8

TE-Puffer

10 mM Tris-HCl, pH 7,6, 1 mM EDTA

Material

DNA-Sequenzierung:

1x TBE

90 mM Tris, pH 8,3, 90 mM Borsäure, 2 mM EDTA in H₂O

Denaturierendes 4,25% Acrylamidgel zur Sequenzierung

7,5 ml 30%ige Acrylamidstammlösung, 6 ml 10x TBE (890 mM Tris, 890 mM Borsäure, 200 mM EDTA) und 21 g Harnstoff, ad 21 ml H₂O

2.12 Radioaktive Substanzen

α -³²P dCTP

Fa. ICN Biomedicals GmbH

2.12 Enzyme

SuperScript[®] III Reverse Transkriptase

Fa. Invitrogen

Taq DNA Polymerase

Fa. Invitrogen

Restriktionsenzyme

(EcoR V, Hind III, Apa I, BamH I, XbaI)

Fa. New England Biolabs

T-4-Ligase

Fa. New England Biolabs

DNA Polymerase I, Klenow Fragment

Fa. New England Biolabs

2.13 Kits

Puregene[®] DNA Isolation Kit

Fa. Gentra Systems

Nucleobond extract Kit[®]

Fa. Clontech

PlasmidMidiKit[®]

Fa. Quiagene

ABI[®] PRISM Dye Terminator Cycle

Fa. Perkin Elmer

Sequencing Ready Reaction Kit

Rediprime[®] II DNA Labeling System

Fa. Amersham

Cyto Sets[®] Swine IFN- γ ELISA

Fa. Biosource

Vector VIP[®] Peroxidase Substrat Kit

Fa. Vector Laboratories, CA, USA

Effectene[®] Transfection Reagent

Fa. Quiagene

Material

2.14 Verbrauchsmaterialien

Mikroreaktionsgefäße	Fa. Eppendorf
Nylon-Membran, positiv geladen	Fa. Roche
Pipettenspitzen	Fa. Greiner
Röntgenfilme BioMax MR	Fa. Kodak
Zellkulturplastikwaren	Fa. Greiner
Zentrifugenröhrchen	Fa. Beckman Instruments
Mikrotiterplatten, Rundboden	Fa. Greiner
Mikrotiterplatten, Flachboden	Fa. Greiner
Nunc-Immuno Plate Maxisorb	Fa. Nunc
Einfrierröhrchen	Fa. Greiner
ELISPOTPlatten	Fa. Millipore
FACS-Röhrchen	Fa. Becton-Dickinson
Kanülen	Fa.
Röhrchen, steril, 15 ml; 50 ml (BlueCaps)	Fa. Greiner
Spritzen	Fa. Henke-Sass-Wolf GmbH
Zerstäuberflasche	Fa. Roth
Sterilfilter, Millex®-VV, 0,1µm	Fa. Millipore
Serilfilter, 0,22 µm; 0,45 µm	Fa. Schleicher und Schuell

2.15 Geräte

Durchflußzytometer:

FACStar plus	Fa. Becton Dickinson
--------------	----------------------

Spektralphotometer (ELISA-Reader):

Sunrise	Fa. Tecan
---------	-----------

Feinwaagen:

Mettler PE 200	Fa. Mettler
Sartorius Analytic	Fa. Sartorius

Magnetrührer:

IKA-Combimag RCO	Fa. Janke & Kunkel KG
------------------	-----------------------

Material

Mikroskope:

Modell 471202	Fa. Zeiss
Modell 090-135-001	Fa. Leica

Micropipetten

8-Kanal (50 μ l-250 μ l)	Fa. Titertek
Pipetman® (100 μ l- 1000 μ l)	Fa. Gilson
Precision® (0,5 μ l-10 μ l; 5 μ l-50 μ l; 20 μ l-200 μ l)	Fa. Biozym

Mixer:

Vortex	Fa. Bachofer
--------	--------------

pH-Meßgerät:

Digital-pH-Meter 646	Fa. Bachofer
----------------------	--------------

Thermometer:

Hartmann Digital	Fa. Hartmann
------------------	--------------

Transfereinheit:

Trans Blot SD Apparatur	Fa. BioRad
-------------------------	------------

Ultrafiltrationsanlage zur Herstellung von Aqua bidet.:

Milli-Q-Ultrafiltrationsanlage	Fa. Millipore
--------------------------------	---------------

Wasserbad	Fa. Memmert
-----------	-------------

Zählkammer:

Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	Fa. Roth
----------------------------	----------

Zellkultur:

Brutschrank	Fa. Forma Scientific
Reine Werkbank	Fa. Caeg Schirp

Material

Zentrifugen:

Megafuge 2,0 R

Fa. Heraeus

Minifuge T

Fa. Heraeus

Mini Spin

Fa. Eppendorf

Ultrazentrifuge Centrikon T-1055

Fa. Kontron Instruments

3 Methoden

3.1. Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Isolierung von Parapoxvirus DNA mit PureGene[®] DNA Purification System

Zur Entfernung von Zelltrümmern und damit auch DNA-haltiger Zellkerne wurde die Virussuspension bei 1000 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Mit dem Überstand wurde eine 2,5-stündige Ultrazentrifugation bei 50000 x g durchgeführt. Das Ultrazentrifugen-Pellet wurde zur DNA-Isolierung in Zell-Lysis Puffer aufgenommen, mit 30 µg Proteinase K versetzt und über Nacht bei 55°C inkubiert. Nach Zugabe von RNase wurde das Zelllysate eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Durch den Zusatz von Protein Präzipitationslösung und einer Zentrifugation über 3 Minuten bei 12000 x g wurden die Proteine ausgefällt und pelletiert. Anschließend fällte man mittels Isopropanol aus dem Überstand die DNA, die, nach einem Waschschrift mit 70% Ethanol, in 20µl Hydration Solution über Nacht bei 65°C hydratisiert wurde und so für weitere Analysen bereit stand.

3.1.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren in wässriger Lösung wurde photometrisch bestimmt. Hierzu wurden UV-Absorptionsspektren im Wellenlängenbereich von $\lambda=320-220$ nm aufgenommen. Die Konzentration der Nukleinsäuren errechnet sich aus der Extinktion bei $\lambda=260$ nm (OD_{260}). Eine OD_{260} von 1,0 entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 33 µg/ml einzelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml RNA. Aus dem Verhältnis der Absorptionswerte bei 260 nm und 280 nm (OD_{260}/OD_{280}) läßt sich der Reinheitsgrad der Nukleinsäure ableiten. Für reine DNA liegt dieser Quotient zwischen 1,8 und 2,0; für reine RNA zwischen 1,9 und 2,1.

3.1.3 Aufarbeitung synthetischer Oligonukleotidprimer

Das Oligonukleotid-Lyophilisat wurde mit sterilem DEPC-H₂O auf eine Konzentration von 500 pM/µl eingestellt. Diese Stocklösung konnte anschließend mit DEPC-H₂O auf die in der PCR gewünschte Primerkonzentration weiter verdünnt werden.

Methoden

3.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Mullis et al.; 1986)

Bei der PCR wird ein bestimmter DNA Abschnitt *in vitro* vervielfältigt. Der Abschnitt wird von Bereichen flankiert, an die Oligonukleotidprimer spezifisch hybridisieren können. Von diesem Doppelstrangbereich aus wird der Oligonukleotidprimer an seinem 3'Ende von einer thermostabilen DNA-Polymerase verlängert. Die in einem Thermocycler durchgeführte Reaktion gliedert sich in die drei Schritte: Denaturierung (95°C; 90 Sekunden), Hybridisierung des Primers („Annealing“; $X^{\circ}\text{C}=\text{T}_m$; 90 Sekunden) und Amplifikation (72°C, 60-180 Sekunden, je nach Größe des zu amplifizierenden Abschnittes). Die Annealingtemperatur richtet sich nach dem Schmelzpunkt T_m der Primer, der vom GC-Gehalt des Primers abhängig ist. Er berechnet sich nach „4+2 Formel“:

$$T_m=4^{\circ}\text{C} (\text{G+C}) + 2^{\circ}\text{C} (\text{A+T})$$

Die Reaktion fand in einem 50 μl Reaktionsgemisch statt, das neben den Primern (0,5-2 μM je Primer) und der *Taq* DNA-Polymerase (2,5U) noch Tris-HCl; pH8,4 (20mM) und die Salze KCl (50mM) und MgCl_2 (1,5-3mM) sowie den dNTP-Mix (0,02 μM /dNTP) enthielt.

3.1.5 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die DNA im Bereich bestimmter, sog. palindromer Sequenzen spalten. Die Spaltung der DNA erfolgte in einem Reaktionsgemisch, das aus Reaktionspufferkonzentrat und Aqua bidest. nach Herstellerangaben bereitet wurde. Für 1 μg DNA wurden 10-20 Units (U) Restriktionsendonuklease eingesetzt. Der Volumenanteil des Enzyms in der endgültigen Lösung darf, auf Grund des inhibitorischen Effektes des in ihm enthaltenen Glycin, 10% nicht übersteigen. Die Reaktion fand bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur statt. Die Reaktionszeit betrug zur Fragmentherstellung gesamtviraler DNA 6h -18h, für das Schneiden von Plasmiden und PCR-Produkten 1h. Nach der jeweiligen Reaktionszeit erfolgte eine Inaktivierung des Enzyms durch 10-minütige Inkubation bei 65°C.

3.1.6 DNA-Agarosegelelektrophorese

Aufgrund ihrer negativen Gesamtladung, bewegen sich Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Findet diese Bewegung in einem Agarosegel statt, so trennen sich Nukleinsäurefragmente ihrer Größe nach auf, da kurze Fragmente sich bei gleicher angelegter Spannung schneller bewegen als längere.

Für die Auftrennung wurden 0,8%-3%-ige (w/v) TAE-Agarosegele verwendet, die, für die Visualisierung der DNA, Ethidiumbromid in einer Konzentration von 30 $\mu\text{l/l}$ enthielten. Als

Methoden

Laufpuffer diente 1x TAE-Puffer, der ebenfalls Ethidiumbromid in der oben genannten Konzentration enthielt. Die zu untersuchenden Nukleinsäureproben wurden mit Blaupuffer im Verhältnis 9:1 gemischt und dann in die Geltaschen eingefüllt. Bei linearen Nukleinsäuren wurde ein DNA Molekulargewichtsstandard in einer randständigen Tasche des Gels mitgeführt, anhand dessen die Größe einer vorhandenen Bande in der Probe geschätzt werden konnte. Nun legte man eine Spannung von 5 V/ cm an und ließ diese einwirken, bis die Lauffront des Blaupuffers ungefähr zwei Zentimeter vom unteren Ende des Gels entfernt war. Jetzt konnten im Gel vorhandene Nukleinsäuren durch die Fluoreszenz des interkalierenden Farbstoffes Ethidiumbromid unter UV-Illumination bei einer Anregungswellenlänge von 254 nm bzw. 366 nm sichtbar gemacht werden.

3.1.7 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen

Nach Auftrennung in einem präparativen Agarosegel mit geringem Schmelzpunkt und Färbung mit Ethidiumbromid wurden gewünschte DNA-Fragmente unter langwelligem UV-Licht ($\lambda=366$ nm) ausgeschnitten und mittels des Nucleobond extract Kit® nach Angaben des Herstellers aus dem Gel isoliert.

Hierzu wurde die Agarose in 300 μ l/mg Agarose NB1 Puffer bei 50°C geschmolzen. Die Lösung wurde auf die Säule aufgetragen und 1 Minute bei 6000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule mit Puffer NB3 2x gewaschen und getrocknet, bevor die gebundene DNA mit 50 μ l Aqua bidest. über 2-minütige Zentrifugation bei 12000 x g eluiert wurde.

3.1.8 Ligation von DNA

Die T4-Ligase katalysiert die Ausbildung von Phosphodiesterbrücken zwischen dem 3'OH und dem 5'Phosphat-Ende doppelsträngiger DNA Moleküle.

Für die Ligation wurden jeweils ca. 200 ng Vektor-DNA und ein äquimolares Verhältnis an Insert-DNA, die mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten worden waren, eingesetzt. Die Ligation erfolgte mit 200 U T4-DNA-Ligase in 1x T4-DNA-Ligase-Puffer und einem Gesamtvolumen von 20 μ l über Nacht bei 14°C.

3.1.9 Prokaryotische Zellkulturen

Kultivierung und Kryokonservierung von *Escherichia coli*

Der verwendete *E. coli* Stamm XL1-Blue wurde in LB-Medium angezogen oder auf LB-Agarplatten kultiviert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C über Nacht. Suspensionskulturen wurden bei 200 rpm geschüttelt. Für eine Kryokonservierung wurden 500 µl Kultur mit 30 % Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

Herstellung Transformations-kompetenter *E.coli* mittels CaCl₂ Methode (Cohen et al.; 1972)

Durch CaCl₂ Behandlung in der exponentiellen Wachstumsphase erhalten *E. coli* Zellen die Kompetenz, freie DNA aus dem umgebenen Medium aufzunehmen.

Zur Herstellung transformationskompetenter *E.coli* wurde LB-Medium mit einer *E.coli* Übernachtskultur 1:100 angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,4 geschüttelt. Nach Abkühlen auf Eis wurden die Bakterien pelletiert (3600 x g, 5 min, 4°C), in 0,5 Volumen eiskalter 50 mM CaCl₂-Lösung aufgenommen und 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (3600 x g, 30 s, 4°C) wurde das Bakterienpellet in 0,05 V eiskalter 50 mM CaCl₂-Lösung vorsichtig resuspendiert. Die kompetenten Bakterien wurden daraufhin entweder direkt zur Transformation eingesetzt oder nach Zugabe von 20 % Glycerin zu je 200 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C bis zur Verwendung gelagert.

Transformation

Für die Transformation wurde 0,1-1 ng Plasmid-DNA oder 5 µl Ligationsansatz zu je 100 µl kompetenter Bakterien gegeben. Der Ansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem 2-minütigen Hitzeschock bei 42°C und 2 min auf Eis erfolgten die Zugabe von 1 ml antibiotikafreiem LB-Medium und eine anschließende Inkubation des Ansatzes für 45 min bei 37°C zur Regeneration und Expression des plasmidkodierten Resistenzgens. Nach kurzer Zentrifugation (3600 x g, 5 min) wurde das Pellet in 100-200 µl antibiotikafreiem LB-Medium resuspendiert, auf LB-Selektionsagar ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Methoden

3.1.10 Präparation von Plasmid-DNA

3.1.10.1 Analytische Isolierung von Plasmid-DNA

„Schnellminipräparation“ bakterieller Plasmid-DNA (Le Gouill und Dery, 1991)

Für eine schnelle Überprüfung von transformierten Bakterienklonen auf das Vorhandensein rekombinanter Plasmide kann mittels dieser Schnellmethode Plasmid-DNA direkt aus Bakterienkolonien, die auf einer Agarplatte angezogen wurden, isoliert werden. Die Bakterienklone werden hierbei mit einer Pipettenspitze direkt von der Agarplatte gepickt und in einem Eppendorfgefäß in 16 µl Bakterien-Lysepuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 3 µl Lösung 2 wird für 4 min bei 12000 x g zentrifugiert und der gesamte nukleinsäurehaltige Überstand in einem Agarosegel aufgetrennt.

Plasmid-Schnellpräparation (Birnboim und Doly, 1979)

3 ml LB-Medium, komplettiert mit dem entsprechenden Antibiotikum, wurden hierfür mit einer transformierten Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C kultiviert. Je 1 ml dieser Übernachtskultur wurde kurz abzentrifugiert (5 min, 5400 x g) und das Pellet in 100 µl Lösung A resuspendiert. Die alkalische Lyse der Zellen erfolgte anschließend durch die Zugabe von 100 µl Lösung B und nach kurzem, vorsichtigen Mischen durch die Zugabe von 150 µl Lösung C. Proteine und chromosomale DNA wurden hierbei präzipitiert und nach Inkubation der Proben für 20 min auf Eis abzentrifugiert (15 min, 12000 x g). Der nukleinsäurehaltige Überstand wurde für 15 min bei Raumtemperatur mit 3 Vol. 100%igem Ethanol gefällt, nach Zentrifugation (15 min, 12000 x g) mit 70%igem Ethanol gewaschen, unter Vakuum getrocknet und die Nukleinsäure in 50 µl TE-Puffer mit 10 µg/ml RNase A aufgenommen. Nach Abbau der RNA bei 37°C für 30 min wurden je 2 µl der Proben im Agarosegel analysiert. Insert-tragende Klone zeigen ein verzögertes Laufverhalten gegenüber dem Leervektor.

3.1.10.2 Präparative Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung größerer Mengen reiner Plasmid-DNA, wie sie für Sequenzierungen oder Transfektionen benötigt wurden, erfolgte die Präparation mit dem *Plasmid Midi Kit*® von Qiagene. Dieses stellt eine modifizierte Form der alkalischen Lyse nach Birnboim mit anschließender Aufreinigung der DNA über eine Säulenmatrix dar.

Hierzu wurden 100ml Selektionsmedium mit Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden am nächsten Tag bei 4000 xg pelletiert und in Puffer S1

Methoden

resuspendiert. Nach der Zugabe von Puffer S2 wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor Puffer S3 zugefügt wurde und für 20 Minuten bei 4°C inkubiert wurde. Die präzipitierten Proteine wurden bei 12000 x g abzentrifugiert und der DNA-haltige Überstand auf eine mit Puffer N2 äquilibrierte Säule gegeben. Nach zweimaligem Waschen der Säule mit Puffer N3 wurde die Plasmid-DNA mittels Puffer N5 eluiert und durch Zugabe von Isopropanol gefällt, mit 70% Alkohol gewaschen und in Aqua bidest aufgenommen.

3.1.11 Phenol/Chloroform-Extraktion

Zur Entfernung von Proteinen wurden wässrige Nukleinsäure-Lösungen nacheinander mit je einem Volumen Phenol, Phenol/Chloroform (1:1) und Chloroform ausgeschüttelt. Hierbei kommt es zur Denaturierung der Proteine, die über Zentrifugation aus dem Gemisch entfernt werden können. Für die Extraktion von DNA wurde eine Tris-gesättigte Phenollösung (pH 7,6), für RNA eine H₂O-gesättigte Phenollösung verwendet (pH 4,0). Um die Trennung der Phasen zu beschleunigen und die Abnahme der wässrigen Oberphase zu erleichtern, wurden die ausgeschüttelten Fraktionen jeweils kurz zentrifugiert (1 min, 12000 x g). Nach den Extraktionsschritten wurden die in der wässrigen Phase gelösten Nukleinsäuren mit Ethanol präzipitiert.

3.1.12 Ethanolpräzipitation

Durch die Zugabe von Ethanol und einwertigen Ionen kann die Löslichkeit von DNA herabgesetzt und diese anschließend präzipitiert werden.

Für die Fällung von DNA wurde die wässrige Nukleinsäurelösung mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Volumen 100%igem Ethanol versetzt und 15 min bei RT präzipitiert. Nach Zentrifugation (10 min, 12000 x g) wurde das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und je nach Verwendungszweck in H₂O oder Puffer aufgenommen. Die Präzipitation von RNA erfolgte mit 1/10 Volumen 4 M Lithiumchlorid und 3 Volumen kaltem 100%igem Ethanol. Nach Inkubation für 30 min bei -70°C oder 2 h bei -20°C wurde die gefällte RNA bei 4°C abzentrifugiert (15 min, 12000 x g) und mit kaltem 70%igen Ethanol gewaschen. Das bei Raumtemperatur getrocknete Pellet wurde anschließend in RNase freiem H₂O aufgenommen.

Methoden

3.1.13 Sequenzierung von DNA mittels Kettenabbruchverfahren (Sanger et al.; 1977)

Für Sequenzierungen von DNA wurde der ABI PRISM *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit*® verwendet. Die *Cycle Sequencing PCR* (Sequenzreaktion) wurde nach Angaben des Herstellers (100-500 ng DNA ; 1,5-3 pmol Primer; 2,5 µl *Big Dye reaction mix*; ad 10 µl H₂O) mit DNA aus präparativen Isolierungen durchgeführt. Die Reaktion wurde in 24 Zyklen (Denaturierung: 30 s, 96°C; „Annealing“: 15 s, 50°C; Amplifikation: 4 min, 60°C) durchgeführt

Der Reaktionsansatz wurde anschließend mit 25 µl 100%igem Ethanol für 15 min bei Raumtemperatur gefällt und 45 min bei 12000 x g zentrifugiert. Die pelletierte DNA wurde mit 150 µl 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und bis zum weiteren Gebrauch bei 4°C gelagert. Für die Analyse der Sequenzreaktion auf einem denaturierenden DNA-Sequenzgel wurde die Probe in 5 µl Probenpuffer für Sequenzierung (Perkin Elmer) resuspendiert und 2 min bei 95°C denaturiert und 3 µl der Probe auf das Gel aufgetragen.

Die gelelektrophoretische Analyse der Sequenzreaktionen erfolgte mit dem ABI PRISM 377 *DNA Sequencer*. Für die benötigten 48 cm langen, 4,25%igen denaturierenden Gele wurden 7,5 ml 30%ige Acrylamidstammlösung, 6 ml 10x TBE und 21 g Harnstoff und 21 ml H₂O gemischt, über ein 0,2 µm Zellulosefilter filtriert und entgast. Nach Zugabe von 350 µl 10% APS und 15 µl TEMED wurde die Lösung mit Hilfe einer Spritze in die zum System gehörende Gelkammer gedrückt. Nach zweistündiger Polymerisation des Gels erfolgte der Einbau in die *Sequencer* Apparatur, mit 1x TBE als Elektrophorese-Puffer. Sobald beim Vorlauf (50 W) eine konstante Geltemperatur von 51°C erreicht war, wurden die Proben aufgetragen und der Hauptlauf gestartet (2700 V, 12 h). Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte automatisch mittels der zum System gehörenden Software (DNA Sequencing Analysis Software, Version 2.1.1).

3.1.14 Southern Blot

Denaturierte DNA-Fragmente können kovalent an Nitrozellulosemembranen gebunden werden. An diese kann markierte, komplementäre DNA durch spezifische Basenpaarung hybridisieren. Hierdurch ist die Detektion von speziellen DNA-Abschnitten in gesamtviraler DNA möglich.

Methoden

Southern Transfer (Southern, 1975)

Nukleinsäuren können nach elektrophoretischer Auftrennung über Diffusion vom Elektrophoreseigel auf eine Nylonmembran transferiert und kovalent an diese gebunden werden.

Die DNA wurde durch die Behandlung des Geles mit 0,5M HCl für 5 Minuten depuriniert und anschließend mit 0,5M NaOH/1,5M NaCl alkalisch denaturiert. Der Transfer erfolgte durch Diffusion von 0,25M NaOH/1,5M NaCl. Nach 12h-24h neutralisierte man die Nylonmembran mit 2xSSC und die DNA wurde mit Hilfe von UV-Licht (0,12J) Bestrahlung kovalent an die Membran gebunden. Nachdem die Nylonmembran 2h im Vakuumofen bei 80°C gebacken wurde, konnte sie trocken aufbewahrt werden.

Herstellung radioaktiv markierter DNA Sonden

Die radioaktive Markierung von DNA, die aus Agarose-Gelen isoliert wurde, erfolgte mit Hilfe des "Rediprime[®] DNA Labelling System". Das Prinzip dieser Methode besteht darin, dass ein Gemisch verschiedener Nonamer-Oligonukleotide an die DNA hybridisiert und die dadurch entstandenen DNA-Doppelstrangbereiche in Anwesenheit der Klenow-Polymerase und eines radioaktiv markierten Nukleotids (α -³²P dCTP) verlängert werden (Feinberg und Vogelstein, 1983).

Etwa 10-30 ng der zu markierenden DNA, wurden mit Aqua bidest auf ein Gesamtvolumen von 45 μ l eingestellt und durch 10-minütiges Aufkochen denaturiert. Die DNA-Lösung wurde mit dem im Kit portionierten Markierungsmix (enthält dNTPs und Klenow-Polymerase) gemischt und mit 5 μ l α -³²P dCTP (50 μ Ci) versetzt. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 37°C inkubiert und die Reaktion mit 5 μ l 0,5 M EDTA (pH 8,0) abgestoppt. Nicht eingebaute Radionukleotide wurden mit einer Sephadex G50-Säule abgetrennt. Bei dieser Ausschlusschromatographie können kleinere Moleküle in die Poren des Säulenmaterials eindringen und werden bei der Elution zurückgehalten, während größere Moleküle nicht ins Säulenmaterial eindringen können. Die Säule wurde mit 3 ml 0,01 M TE (pH 7,4) äquilibriert und sodann die radioaktive Probe aufgetragen. Mit jeweils 400 μ l 0,01 M TE (pH 7,4) wurde zweimal eluiert, wobei Eluat 2 den Hauptanteil der markierten Probe enthielt.

Hybridisierung radioaktiv markierter Sonden-DNA

Die Hybridisierungen wurden in einem Glasrohr im temperierten Rollerschrank durchgeführt. Vor der Hybridisierung wurde die Nylonmembran 1 Stunde bei 65°C in 0,1X

Methoden

SSC/0,5% SDS vorinkubiert. Mit 5 ml der Hybridisierungslösung ohne Sonde wurde für mindestens 2 Stunden bei der errechneten Hybridisierungstemperatur vorinkubiert. Die in der Hybridisierungslösung enthaltene denaturierte Heringssperma-DNA diente zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran. Die Hybridisiertemperatur lag ca. 25°C unter der mittleren Schmelztemperatur des DNA/DNA-Hybrids, die nach folgender Formel berechnet wurde:

$$T_m = 81,5^{\circ}\text{C} + 16,6 (\log c[\text{Na}^+]) + 0,41 (\% \text{ G+C})$$

Die radioaktiv markierte Probe wurde für 10 Minuten im kochenden Wasserbad denaturiert, schnell auf Eis abgekühlt und in 1ml Hybridisierungslösung aufgenommen. Diese Lösung wurde zu der vorhybridisierten Nylonmembran gegeben und über Nacht bei der errechneten Hybridisierungstemperatur inkubiert. Nach der Hybridisierung wurde nicht oder unspezifisch gebundene Radioaktivität entfernt, indem die Membran zunächst zweimal 15 Minuten im Schüttelwasserbad in 2X SSC/0,1% SDS und anschließend zwei- bis fünfmal 15 Minuten in 0,1X SSC/1% SDS gewaschen wurde, bis keine Radioaktivität mehr in der Waschlösung gemessen werden konnte. Die Waschlösungen hatten eine Temperatur von 72°C.

Autoradiographie

Nach den Waschschritten wurde die Membran auf einem Whatman-Papier kurz getrocknet und ein Röntgenfilm in einer Filmkassette mit Verstärkerfolie, je nach Strahlungsintensität der Membran, für 1 bis 7 Tage, bei -70°C exponiert.

3.1.15 Isolierung von Gesamtzell-RNA mit TRIzol® Reagent

Das TRIzol® Reagent ist ein monophasisches Gemisch aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat. Es stabilisiert die RNA während der Homogenisierungsschritte. Diese kann anschließend nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) extrahiert werden.

Man versetzte das zu untersuchende Gewebe mit TRIzol® Reagent und inkubierte für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Danach mischte man die Lösung mit Chloroform und zentrifugierte sie, nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur, für 15 Minuten bei 12000 x g und 4°C. Die wässrige, RNA-haltige Phase überführte man in ein Eppendorfgefäß und präzipitierte die RNA mit Isopropanol. Das RNA Pellet wurde nach der Zentrifugation mit 70% Ethanol gewaschen und in DEPC-Wasser für 10 Minuten bei 60°C hydratisiert.

Methoden

3.1.16 Reverse Transkription (RT)

Die Reverse Transkription ist die Synthese von komplementärer DNA (cDNA) von einem RNA Strang durch die SuperScript[®] III Reverse Transkriptase.

1µg RNA, und Primer wurden mit DEPC-Wasser zu einem Gesamtvolumen von 11µl aufgefüllt und für 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Nach 5 weiteren Minuten bei 4°C setzte man 4µl 5 x first strand buffer, 2,5 µl 10mM dNTP, 40 U RNaseOUT[®] und 2µl 0,1 M DDT hinzu und inkubierte 2 Minuten bei 42°C. Hiernach gab man 100U der SuperScript[®]III Reverse Transkriptase hinzu und inkubierte 1h bei 42°C gefolgt von 15 Minuten bei 70°C. Die so entstandene cDNA konnte nun in eine PCR eingesetzt werden.

3.2 Herstellung des rekombinanten Parapockenvirus ORFV D1701VrVE2

Erstellung des Transfervektors

Die für das Glykoprotein E2 des CSFV Stammes Alfort187 kodierende DNA wurde von G. Meyers im Plasmidvektor pBC-SK(-) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Mit Hilfe der Schnittstellen BamHI und XbaI wurde die E2 Sequenz aus dem Vektor geschnitten und die entstandenen Überhänge mit Hilfe des Klenowenzym begradigt. Der von H.-J. Rziha bereitgestellte Vektor pdV-Rec1 wurde mit dem Restriktionsenzym EcoRV geschnittenen und das E2 Gen *blunt-to-blunt* mit ihm ligiert (Abb. 4.1). Mit Plasmiden, die ein von pdV-Rec1 unterschiedliches Laufverhalten in der Gelelektrophorese zeigten, wurde eine Doppel-Restriktion mit den Restriktionsenzymen Hind III, das im Plasmid schneidet, und Apa I, das im Insert schneidet, durchgeführt. Bei Klonen, die das Insert in der richtigen Orientierung enthielten, ergab sich ein 900bp Fragment. Die so selektierten Plasmide wurden schließlich mittels Sequenzierung auf Übereinstimmung mit der überprüft.

Ko-Transfektion

Zur Herstellung des CSFV-E2 exprimierenden Parapoxvirus wurde das β-Galaktosidase rekombinante Virus ORFV D1701VrV von M. Henkel zur Verfügung gestellt (Henkel; 1997) Dieses Virus enthält an Stelle des vegf-e-Gens das β-Galaktosidasegen (lacZ) von E.coli unter der Kontrolle des synthetischen Promotors eIP1 (Pfleiderer et al.; 1995). Mit diesem Virus wurden MA-104 Zellen in einer MOI≈0,5 in einer 6-Loch-Gewebekulturplatte beimpft und für zwei Stunden inkubiert. Nach der Adsorption des Virus wurde das Medium abgenommen und gegen Transfektionsmedium ersetzt. Dieses enthielt 1µg DNA, die zur Stabilisierung und Einschleusung in die Zelle mit Enhancer und Transfectionsreagenz des *Effectene Transfection*

Methoden

Reagent[®] versetzt wurden war. Die so transfizierten Zellen wurden bis zum Auftreten von komplettem -cpE bebrütet, die Zellen und der Überstand geerntet und bis zur Selektion bei -70°C gelagert.

Negative Selektion auf β -Galaktosidase-Expression

Da das E2 Gen ebenso von den parapoxspezifischen Sequenzen des Pst-Subfragments des HindIII Fragments H flankiert wurde, wie auch das β -Galaktosidasegen, kann es bei homologer Rekombination der neuen InsertDNA mit der Virusnukleinsäure zum gerichteten Austausch des β -Galaktosidasegen gegen die für CSFV E2 kodierende DNA kommen. Deshalb wurde im ersten Schritt eine Negativselektion durchgeführt.

Die Virusernte des Transfektionsansatzes wurde in log₁₀ Schritten auf MA-104 titriert. Sobald sich erste Plaques bildeten wurde das Medium gegen 1% SeaPlaque Agarose in 2x MEM ohne Phenolrot ausgetauscht, in dem 0,3 mg/ml BluoGal in DMSO gelöst waren. Nach über Nacht Kultivierung färben sich ORFV D1701VrV Plaques blau. Die lichtmikroskopisch ungefärbten (weißen) Plaques wurden als potentiell mit neu rekombinanten Viren infizierte Zellen mit einer Pasteur-Pipette gepickt. Diese „Plaque-Pick Reinigung“ wurde wiederholt, bis nach 10 Selektionsrunden nur noch weiße Plaques vorhanden waren, die dann bis zur Ausbildung eines kompletten cpE weiter inkubiert wurden..

Positive Selektion auf E2-Expression

Mit der durch Negativselektion erhaltenen reinen Viruspopulation wurden erneut MA-104 Zellen beimpft und der Nachweis einer CSFV-E2 Expression mit Hilfe der Immunhistochemie unter Verwendung der CSFV-E2 spezifischen monoklonalen Antikörper a18 (Weiland et al.; 1990) durchgeführt.

3.3 Immunologische Methoden

3.3.1 Serumgewinnung

Nach 10-minütiger Inkubation nicht gerinnungsgehemmter Blutproben bei 37 °C, wurden diese für 10 Minuten bei 1000 x g zentrifugiert, der gelbliche Überstand (Serum) abgenommen und bei -20°C gelagert.

Methoden

3.3.2 Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)

Der ELISA ist eine Methode zur Detektion von Festphasen, i. d. R. an Polystyrol-Kunststoff, gebundenen Proteinen (Antigene/Antikörper). Antigene können mit Hilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Diese Antikörper sind entweder direkt enzymgekoppelt oder werden indirekt mit enzymgekoppelten anti-Spezies Immunglobulin markiert. Nach Zusatz eines geeigneten Substrats wird durch die Enzymaktivität ein Farbumschlag bewirkt, der als optische Dichte (O.D.) bei einer geeigneten Wellenlänge λ gemessen wird und der proportional ist zur Konzentration des zu bestimmen Antigens. Durch die Messung einer Verdünnungsreihe bekannter Konzentrationen (Standard), kann eine quantitative Aussage getroffen werden.

ELISA zur Bestimmung proteinspezifischer Antikörper im Serum

Zur Bestimmung der proteinspezifischen Antikörper in einem Serum wurde eine ELISA-Flachbodenplatte (Nunc) mit $10\mu\text{g/ml}$ des Proteins in Coatingpuffer über Nacht bei 4°C beschichtet. Zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen wurde die Platte 1h bei 37°C mit ELISA-Blockinglösung inkubiert. Nach fünf Waschschrritten mit PBS-A-Tween wurden das Serum bzw. die Serumverdünnungen aufgetragen und für eine Stunde bei 37°C bebrütet. Die nach den nächsten Waschschrritten noch an das Protein gebundenen spezifischen Antikörper des Serums wurden nun mit einem Peroxidase konjugierten anti-Spezies Antikörper und dem Peroxidase-Substrat OPD quantitativ bestimmt. Die optische Dichte der Lösung wurde nach Abstoppen der Farbreaktion mit $2\text{N H}_2\text{SO}_4$ in einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 492nm bestimmt.

Der Grenzwert (Cut off) wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Cut off} = M_{\text{neg}} + 2s$$

M_{neg} : arithmetisches Mittel der O.D. der negativen Seren

s : Standardabweichung der O.D. der negativen Seren

Als ELISA-Antikörpertiter wurde der reziproke Wert der Verdünnung angegeben, bei der die O.D. unter den Cut off fällt.

Zur Bestimmung CSFV E2-spezifischer Antikörper wurde Baculo expremiertes E2-Protein zur Beschichtung der Platte verwandt. Das zur Detektion der NS3-spezifischen Antikörper gebrauchte NS3-Protein war in *E. coli* expremiert worden.

3.3.3 Serumneutralisationstest

Zur Bestimmung der Menge Antikörper in einer Serumprobe, die eine neutralisierende Potenz gegen ein Virus haben, wird ein Serumneutralisationstest durchgeführt. Bei diesem werden Serumprobe und eine definierte Virusmenge zusammen inkubiert und anschließend permissive Zellen zugegeben, um lichtmikroskopisch zu prüfen, ob noch nicht neutralisiertes, infektiöses Virus vorliegt. Zur Bestimmung des Antikörpertiters wurde das Serum hierbei in log₂ Stufen zur Festlegung der Verdünnung, die die vorgegebene Virusmenge (100 KID₅₀) nicht mehr neutralisieren kann, verdünnt (OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals).

50 µl der Serumprobe bzw. ihrer Verdünnung wurden mit 50 µl einer CSF-Virus suspension, die 100 KID₅₀ enthält in den Vertiefungen einer 96-Loch-Gewebekulturplatte bei 37°C für 2h inkubiert. Hiernach gab man 100 µl Suspension der CSFV permissiven Zellen PK-15 zu und inkubierte über 4 Tage bei 37°C, 5% CO₂ unter Wasserdampfsättigung.

Die Auswertung erfolgte durch Detektion des Virus mittels immunhistochemischer Färbung (3.5.4). Der vorhandene Antikörpertiter konnte dann nach Kaerber (1931) (siehe 3.5.3) berechnet werden.

3.3.4 Western Blot

Diskontinuierliche Natrium-Dodecylsulfat Polyakrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinlösungen erfolgt durch eine diskontinuierliche SDS-PAGE nach LAEMMLI (1970). Trenngele wurden mit einer Konzentration von 12,5% Acrylamid und Sammelgele mit 5% Acrylamid verwendet. Vor dem Auftrag wurden die Proben mit 0,25 Volumen 4x SDS-Probenpuffer versetzt und durch 10minütiges Erhitzen auf 95°C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte in Tris-Glycin-Puffer bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA in einer Minigelapparatur.

Western Blot Analyse

Der Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf Nitrozellulose erfolgte nach dem „semi-dry“-Verfahren mit der *Trans-Blot SD*-Apparatur®. Entsprechend den Angaben des Herstellers wurden Minigele für 30 min bei 10 V geblottet. Anschließend wurde die Nitrozellulose zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 30 min in PBS mit 10% (w/v) Magermilchpulver geschwenkt. Die Inkubation mit dem ersten Antiserum (Verdünnung in PBS-A-Tween mit 10% (w/v) Magermilchpulver) erfolgte über Nacht bei 4°C oder für mindestens 2 h bei Raumtemperatur. Nach dem Waschen der Membran für 3x 15 min in PBS-A-Tween wurde der zweite, mit Peroxidase (POD) -konjugierter Antikörper (Verdünnung

Methoden

1:1000 in PBS-Tween mit 10% (w/v) Magermilchpulver) zugegeben und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für je 15 min in PBS-T wurde die Membran gefärbt. Die Färbereaktion erfolgte für 1 min in 10 ml ECL Färbelösung.

Die Auswertung erfolgte durch kurzzeitiges (10s-60s) exposition des Blottes auf einen ECL-Hyperfilm[®].

3.3.5 Isolierung von mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC) mittels Dichtegradientenzentrifugation

Zur Durchführung immunologischer Tests werden häufig die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) verwendet. Diese bestehen neben den Lymphozyten auch aus Makrophagen und natürlichen Killerzellen.

Zur Isolierung dieser Zellen wurde Ficoll400[®]-Suspension definierter Dichte (Schwein, Mensch: $\rho = 1,077 \text{ g/ml}$) mit einer gerinnungsgehemmten Vollblutprobe überschichtet. Anschließend wurde bei 700xg für 35 Minuten zentrifugiert, um einen kontinuierlichen Gradienten zu erzeugen, wobei der Rotor am Ende des Laufes nicht gebremst wurde, sondern auslaufen musste. Es entstand eine typische Phasenaufteilung die von unten nach oben wie folgt geschichtet war:

Erythrozyten- Granulozyten- Ficoll400[®]-Suspension - PBMC- Plasma

Die PBMC-Interphase wurde abgenommen, in ein neues Gefäß überführt, mit PBS-A 1:10 verdünnt und bei 400xg für 10 Minuten pelletiert. Das so entstandene Pellet enthielt meist neben den PBMC auch noch einen kontaminierenden Teil Erythrozyten, was sich in seiner Rotfärbung zeigte. Die Erythrozyten wurden nun durch Resuspendieren der Zellen in hypotonem Erythrozyten-Lysepuffer zerstört und die PBMC erneut pelletiert. Das nun vorliegende saubere PBMC Pellet konnte in RPMI 1640 Nährmedium mit 10% FBS aufgenommen werden und stand für immunologische Tests bereit.

3.3.6 Bestimmung der Zellzahl einer Zellsuspension

Die Bestimmung der Anzahl lebender Zellen in einer Zellsuspension wurde mit Hilfe der Trypanblau-Ausschlussmethode und einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer durchgeführt. Hintergrund der Methode ist, dass lebende Zellen den eindringenden Farbstoff, Trypanblau, wieder ausschleusen und somit ungefärbt erscheinen. Tote Zellen färben sich hingegen blau.

Die Zellen wurden in einer definierten Menge Medium aufgenommen. Ein Teil der Suspension wurde mit Trypanblau verdünnt und 10 μ l dieser Zellverdünnung in die Fuchs-Rosenthal-Zählkammer überführt. Nun zählte man die ungefärbten Zellen in 16 Quadraten auf

Methoden

einer Diagonalen in der Zählkammer. Die in der Suspension enthaltene Zellkonzentration berechnet man nach folgender Formel:

$$N = n \times 5 \times 1000 \times vd$$

N: Zellen/ml n: gezählte Zellen vd: reziproke Verdünnung der Zellsuspension in Trypanblau

3.3.7 *In vitro* Stimulation von PBMC

Zur Untersuchung der Produktion von Zytokinen wurden frisch isolierte oder aufgetaute PBMC auf eine Anzahl von 5×10^6 Zellen/ml in RPMI+10% FBS eingestellt. 1 ml dieser Suspension wurde mit der gleichen Zahl Viruspartikel versetzt ($MOI \approx 1$) und auf ein Gesamtvolumen von 1,5 ml mit Medium aufgefüllt. Nach einer Inkubation für 24h bei 37°C und 5% CO₂ unter Wasserdampfsättigung wurde der Zellkulturüberstand entnommen und Zellen sowie das ORFV durch Filtration mit einer Porengröße von 0,1 µm entfernt. Die so gewonnenen zellfreien Überstände wurde bei -20°C gelagert.

3.3.8 Bestimmung von TypI-Interferon in Zellkulturüberständen

Zur Bestimmung des TypI-Interferongehaltes in Zellkulturüberständen wird seine Eigenschaft genutzt, MDBK-Zellen gegen die Zelllyse durch das Virus der Stomatitis Vesicularis (VSV) zu schützen (modifiziert nach Rubinstein et al.; 1981). Es handelt sich somit um einen funktionellen Zytopathogenitäts-Inhibitionstest.

Zur Bestimmung der optimalen Virusmenge, die in dem Test eingesetzt werden sollte, wurde die Verdünnung der Virusstocklösung bestimmt, bei der Zellen in allen Vertiefungen einer Verdünnungsstufe nach 18h durch das Virus komplett lysiert wurden.

In 96-Loch-Flachbodenplatten wurden die zu testenden Zellkulturüberstände sowie ein humaner IFN- α 2a Standard (Gax01-901-535) als Positivkontrolle in log₂ Schritten verdünnt. In jedem Test wurden eine Zellkontrolle und eine Viruskontrolle mitgeführt, in deren Vertiefungen nur Medium vorgelegt wurde. Nun gab man pro Vertiefung 50µl einer Zellsuspension mit 10^6 Zellen/ml hinzu und ließ die Zellen über 4-6h bei 37°C und 5% CO₂ unter Wasserdampfsättigung dicht wachsen. Dann wurde das Medium vom Zellrasen entfernt und durch die Virusgebrauchsverdünnung ersetzt. Nachdem man das Virus 1h bei 37°C und 5% CO₂ unter Wasserdampfsättigung adsorbieren ließ, gab man Medium mit 2% FBS hinzu und inkubierte die Platten bei oben genannten Bedingungen über Nacht. Sobald die Viruskontrollen einen kompletten cpE zeigten, konnte das Medium von den Zellen dekantiert werden und die noch lebenden Zellen mit Kristallviolett-Formalin-Lösung über 20 Minuten

Methoden

bei Raumtemperatur fixiert, angefärbt und anschließend mit Leitungswasser gewaschen werden. Nun war eine makroskopische und mikroskopische Auswertung möglich. Der TypI-Interferongehalt wurde als experimentelle Einheit (EU) angegeben und nach folgender Formel berechnet:

$$\text{EU TypI-IFN/ml} = 2^{\text{Verdünnungsstufe}} \times 20$$

3.3.9 ELISPOT

Mit der ELISPOT-Methode kann die Anzahl der Zellen in einer Suspension bestimmt werden, die bestimmte Proteine (u. a. Zytokine) sezernieren. Sezernierte Zytokine werden mit Hilfe von spezifischen Antikörpern auf einer Membran gebunden und anschließend immunochemisch detektiert. Der hierbei entstehende unlösliche Farbstoff bindet an die Membran, sodass im Bereich einer sezernierenden Zelle ein Farbpunkt (Spot) entsteht.

Zum Nachweis Zytokin produzierender Zellen in den PBMC eines Tieres wurde eine ELISPOT Platte mit spezifisch reaktiven monoklonalen Antikörper gegen das zu untersuchende Protein beschichtet. Hierzu wurden die Vertiefungen der Platte 2x mit PBS-A gewaschen und man gab 100µl der Antikörperverdünnung in jede Vertiefung und lagerte die Platte über Nacht abgedeckt bei 4°C. Am nächsten Tag wurde die Platte mit RPMI+10%FBS gewaschen und anschließend unspezifische Bindungsstellen auf der Platte mittels 200 µl RPMI+ 10%FBS für 2h bei 37°C abgesättigt. Nun wurden die Stimuli und die Zellen auf die Platte gegeben. Bei viraler Stimulation musste das Verhältnis von Zellen zu Viruspartikeln bestimmt werden, es betrug normalerweise 1 (MOI≈1). Als Negativkontrolle wurde Zellysat der Zelle verwandt, auf der das Virus angezüchtet worden war. Als Positivkontrolle wurde der polyklonale Stimulus Conclavidin A (ConA) in einer Konzentration von 5µg/ml eingesetzt. Die so beschickte Platte wurde für 24h bei 37°C, 5% CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre inkubiert.

Zur Entwicklung der Platte wurden die Zellen in zwei Waschschrinen mit Aqua bidest. und drei Waschschrinen mit PBS-A-Tween entfernt. Ein polyklonales Antiserum gegen das sezernierte Protein wurde in PBS-A-Tween +0,1%BSA verdünnt, und jede Vertiefung wurde mit 100µl beschickt. Es folgte eine Inkubation von 1h bei Raumtemperatur. Nach fünf Waschschrinen mit PBS-A-Tween wurde eine Verdünnung eines konjugierten Antikörpers, der spezifisch an die vorher eingesetzten Antikörper bindet, in PBS-A-Tween-0,1%BSA zugegeben. Nach einer weiteren Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurden erneut fünf Waschschrinen mit PBS-A-Tween durchgeführt. Nun gab man das Substrat für das Enzym

Methoden

des Konjugates hinzu. Nach Farbumschlag und Erkennung erster Spots kippte man das Substrat ab und wusch die Platte 5x mit Leitungswasser. Nach einer Trocknungsphase von zwei bis drei Tagen im Dunkeln konnte die Platte mit einem ELISPOT-Reader ausgewertet werden.

Interferon alpha (IFN- α) ELISPOT

Der IFN- α ELISPOT wurde mit dem monoklonalen Antikörper 27100-1 in einer Konzentration von 5 μ g/ml beschichtet. Das gebundene IFN α wurde mit dem polyklonalen anti-IFN- α Serum 37100-1 aus dem Kaninchen in einer Konzentration von 2,5 μ g/ml detektiert. Zur Visualisierung verwendete man anti-Kaninchen-AP-Konjugat in einer Verdünnung von 1/2000 und das Substrat der alkalischen Phosphatase BCIP/NBT.

Interferon gamma (IFN- γ) ELISPOT

Für den IFN- γ ELISPOT wurde der monoklonale Antikörper MP700 in einer Konzentration von 5 μ g/ml zur Beschichtung und das polyklonale Kaninchenserum PP700 in einer Konzentration von 2,5 μ g/ml als Detektor eingesetzt. Als Konjugat fungierte anti-Kaninchen-AP-Konjugat in einer 1/2000 Verdünnung. Substrat war BCIP/NBT

3.3.10 CD6-Depletion der PBMC mit dem MACS[®] System

Mit Hilfe von oberflächenantigenspezifischen Antikörpern können Zellen mit magnetischen Partikeln markiert werden. Durch Einbringen der Zellen in ein Magnetfeld können die nicht markierten von den markierten Zellen abgetrennt werden. Es entsteht eine für das markierte Oberflächenantigen negative, depletierte Zellpopulation und eine für dieses Antigen positive Zellpopulation.

10⁷ PBMC wurden für 20 Minuten bei 4°C in 100 μ l anti-swine-CD6Antikörper (mAK; Isotyp IgG₁) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit FACS-Puffer wurden die Zellen in 100 μ l einer 1/10 Verdünnung von Rat-anti-Mouse-IgG₁-MicroBeats[®] in MACS-Puffer resuspendiert und für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach 2 Waschschritten mit MACS-Puffer wurden die Zellen in 1ml MACS-Puffer resuspendiert. Die MACS-Column[®] wurde in den Magneten eingespannt und mit 3ml MACS-Puffer äquilibriert, bevor die Zellen zugegeben wurden. Hiernach wurde die Säule mit 1ml MACS-Puffer nachgespült. Die nach der Zugabe der Zellen aufgefangene Flüssigkeit enthielt die CD6 negativen Zellen.

Die Reinheit der Zellpopulation wurde durch FACS-Analyse der PBMC vor und nach der Depletion bestimmt.

Methoden

3.3.11 Charakterisierung von Leukozytenpopulationen mit Hilfe der Durchflußzytometrie

Die unterschiedlichen Leukozytenpopulationen können durch Fluoreszenzmarkierung von zellspezifischen Oberflächenantigenen nachgewiesen werden. Die fluoreszenzmarkierten Zellen wurden im Durchflußzytometer (fluorescence activated cell sorter, FACS) analysiert.

Immunfluoreszenzmarkierung von Zellen

Um den Phänotyp von B-Zellen zu charakterisieren wurde eine Zweifarbenimmunfluoreszenz durchgeführt. 100 µl Vollblut wurden nach folgendem Protokoll markiert:

1. Inkubation mit jeweils 50 µl anti CD21 Antikörper (mAk; Isotyp IgG₁) und anti-swine- SWC3 (mAk; Isotyp IgG_{2b})

2. Inkubation mit jeweils 50 µl von folgenden, isotypspezifischen, konjugierten Antikörpern: goat-anti-mouse IgG₁-PE; goat-anti-mouse IgG_{2b} Alexa488

Um die Reinheit der CD6- Zellen zu bestimmen wurden 50µl anti-swine-CD6 Antikörper (mAK; Isotyp IgG₁) und goat-anti-mouse IgG₁-PE verwandt.

Alle Inkubationsschritte wurden für 30 min bei 4 °C durchgeführt. Nach jedem Inkubationsschritt wurden die Zellen zweimal mit je 1 ml FACS-Puffer gewaschen und zentrifugiert (5 min, 400 x g). Die markierten Zellen wurden in FACS-Puffer resuspendiert und $2,5 \times 10^4$ Zellen pro Probe im Durchflußzytometer analysiert. PBMC, die nur mit den bei Schritt 2 eingesetzten Fluorochromkonjugaten markiert worden waren, dienten als Isotypkontrolle. Alle Antikörper und Konjugate wurden vor ihrer Verwendung in der Durchflußzytometrie austitriert und in FACS-Puffer entsprechend verdünnt.

Durchflußzytometrische Analysen

Die fluoreszenzmarkierten Zellen wurden mit einem Durchflußzytometer, das mit einem Argon- und Helium-Neon-Laser ausgerüstet war, analysiert. Streulicht- und Fluoreszenzsignale einzelner Zellen wurden mit Hilfe spezifischer Detektoren gemessen. Die Streulichtparameter enthalten das Vorwärtsstreulicht und das Seitwärtsstreulicht. Das Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) definiert Zellpopulationen aufgrund ihrer Größe. Das Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC) stellt ein relatives Maß für die intrazelluläre Granulation der Zellen dar. Durch weitere fluoreszenzabhängige Parameter können Oberflächenantigene sichtbar gemacht werden. Dabei wird die Fluoreszenzintensität verschiedener Fluorochrome durch die unterschiedlichen Wellenlängen des emittierten Lichtes unterschieden. Die Quantifizierung der Fluoreszenz- und Streulichtemissionen jeder

Methoden

einzelnen Zelle wurde gespeichert. Als B-Lymphozyten wurden CD21+; SWC3- Zellen angesprochen.

Die Daten wurden anschließend mit Hilfe von Computerprogrammen (PC-Lysis und Cell Quest) ausgewertet.

3.4 Eukaryotische Zellkulturen

3.4.1 Kultivierung und Lagerung von Zellen

Zur Virusanzucht und zum Virusnachweis wurde mit adhärent wachsenden Zellen gearbeitet. Diese Zellen wurden in Gewebekulturflaschen liegend kultiviert, bis es zur Bildung eines konfluenten Zellrasens (Monolayer) kam. Zur Weiterkultivierung wurde der Zellrasen mit BFA-40 für 10 Minuten bis zur Ablösung aller Zellen inkubiert und die entstandene Einzelzellsuspension konnte dann auf neue Zellkulturflaschen in einem gewünschten Teilungsverhältnis verbracht und mit neuem Medium kultiviert werden.

Für die benutzten Zellen wurden folgende Medien, Mediumzusätze und Teilungsverhältnisse verwandt:

Zelle	Medium	Mediumzusatz	Teilungsverhältnis
MA-104	MEM-Hepes	10% FBS	1:4
KOP	BFA-37	10% FBS	1:3
MDBK	MDBK-Medium	5% FBS	1:6
PK-15	MEM-Hepes	10% FBS	1:4
STE	MDBK-Medium	10% PNS	1:4

Zur Lagerung wurden Zellen in Medium mit einem Zusatz von 10% FBS und 10% DMSO suspendiert und anschließend für 4h bei 4°C, und 16h bei -70°C gefroren, bevor sie in flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagert wurden. Aufgetaut wurden die Zellen in 42°C warmem Wasser. Das Einfriermedium wurde nach zehnmütiger Zentrifugation bei 400 x g dekantiert und die Zellen wurden in eine Gewebekulturflasche mit frischem Medium eingesät.

3.5 Virusanzucht und Titerbestimmung

3.5.1 Virusanzucht

Zur Vermehrung von Viren, lässt man diese in einer permissiven Zelle replizieren und erntet die Viruslösung unter Zerstörung aller noch intakten Zellen.

Das Virus wurde zusammen mit den Zellen in einer Zellkulturflasche bei 37°C, 5% CO₂ unter Wasserdampfsättigung inkubiert. Hierbei unterscheidet man zwischen einer simultanen Einsaat von Virus und frisch geteilten Zellen und einer Animpfung des Virus auf bereits konfluent gewachsene Zellen.

Bei Viren, die einen cpE zeigen, wurde bei 90-95% Zelllyse die Virusernte durchgeführt. Bei Zellinfektion ohne cpE erfolgte die Virusernte nach einer bestimmten, als optimal getesteten Zeitspanne (CSFV: 4 Tage). Zur Ernte wurde die Zellkultur mehrmals eingefroren und wieder aufgetaut, um alle Zellen zu lysieren. Zur Entfernung von Zelltrümmern wurde das Zelllysate bei 1000 x g für 10 min zentrifugiert und der virushaltige Überstand abgenommen.

3.5.2 Viruskonzentration mittels Ultrazentrifugation

Zur Erhöhung des Virustiters in einer Virussuspension, kann diese einer Konzentrierung durch Ultrazentrifugation unterzogen werden. Bei den hier angewandten g-Kräften kommt es zur Sedimentation der Viruspartikel. Nach Abnahme des Überstandes kann das virushaltige Pellet in einem kleinen Volumen sterilen PBS aufgenommen werden. Je kleiner das zu sedimentierende Virus ist, desto höher muss die applizierte g-Kraft gewählt werden. Bei PPV mit ihrem Durchmesser von ca. 300nm wurde mit 50000 x g über 2,5h zentrifugiert.

3.5.3 Virustitration

Die Viruskonzentration einer Lösung wird mit Hilfe einer Endpunktverdünnungsreihe bestimmt (Mayr et al.; 1974).

Hierzu wurde das Virus in log₁₀ Schritten verdünnt, indem man 100µl Virussuspension mit 900µl Medium mischte. 100µl jeder Verdünnungsstufe wurden in jeweils vier Vertiefungen einer 24-Loch Gewebekulturplatte gegeben. Hierauf gab man virusfreie, permissive Zellen und inkubierte für drei bis vier Tage bei 37°C, 5% CO₂ im wasserdampfgesättigten Brutschrank. Danach erfolgte die lichtmikroskopische Bestimmung viruspositiver und virusnegativer Vertiefungen und die Titerberechnung nach Kaerber mit der Formel:

Methoden

$$\text{KID}_{50}/\text{ml} = (x_0 - d/2 + d/n \times \sum x_i) \times 10$$

x_0 : Der positive Exponent der höchsten Verdünnung, bei welcher alle Vertiefungen viruspositiv sind

d : Dosisabstand der Verdünnungsstufen in Logarithmen (hier: 10); n : Anzahl der

Replikate pro Verdünnungsstufe; $\sum x_i$: Summe aller positiven Vertiefungen, ab und einschließlich der Stufe x_0 .

3.5.4 Virusnachweis mittels immunochemischer Methoden

Geht die Virusreplikation mit einem lichtmikroskopisch fassbaren cytopathischen Effekt (cpE) einher, so kann die Anwesenheit des Virus anhand des cpE lichtmikroskopisch ausgewertet werden. Einige Viren, darunter die meisten Stämme des CSFV, verursachen keinen lichtmikroskopisch erkennbaren cytopathischen Effekt. Zum Nachweis dieser Viren bedient man sich meist des Nachweises von viralen Proteinen mittels immunohistochemischer Methoden.

Zur Detektion von viralen Proteinen im Zytoplasma der Wirtszelle, musste diese fixiert und ihre Zellmembran zur Penetration der verwendeten Antikörper permeabilisiert werden. Hierzu überschichtet man den Zellrasen mit einer $\frac{3}{4}$ Ethanol $\frac{1}{4}$ Aceton Lösung und inkubiert ihn 20 min bei 4°C . Nachdem man den Zellrasen 3x mit PBS-A-Tween gewaschen und gut getrocknet hat, überschichtet man ihn mit einer Gebrauchsverdünnung monoklonaler Antikörper in PBS-A gegen das virale Protein, das nachgewiesen werden soll. Man inkubiert die Platte für 1h bei 37°C . Nach erneutem dreimaligem Waschen und Trocknen wird der Zellrasen mit anti-Maus-POD Konjugatverdünnung überschichtet. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wäscht und trocknet man erneut und gibt dann das Peroxidase-Substrat VIP Vector stain® hinzu. Nach 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln färbt sich das Zytoplasma der Zellen, in denen virales Protein vorhanden ist, rotbraun an. Man entfernt das Substrat, wäscht den Zellrasen mit Wasser und wertet den Test lichtmikroskopisch aus.

3.6 Infektionsnachweise

3.6.1 Isolierung der weißen Blutzellen (WBC) aus Vollblutproben

Das Virus der Klassischen Schweinepest führt zu einer Virämie. Deshalb ist es möglich, im Blut infizierter Tiere, zu bestimmten Zeiten, Virus nachzuweisen. Das Virus liegt zu einem kleinen Teil im Serum vor, der Hauptteil befindet sich jedoch zellgebunden in den Leukozyten. Zum Nachweis des Virus wurden die Leukozyten aus dem Blut isoliert.

Zur Isolation der Zellen wurde gerinnungsgehemmtes Blut für 10 Minuten bei $1000 \times g$ zentrifugiert. Es kommt zu folgender Schichtung der Blutbestandteile:

Erythrozyten -Leukozyten (buffy coat)- Plasma

Methoden

Man entnahm mit einer sterilen Pipette selektiv die Leukozytenfraktion. Hierbei kam es unweigerlich zur Kontamination mit Erythrozyten, die mit Hilfe von hypotonem Lysispuffer lysiert wurden. Nach einer anschließenden Zentrifugation für 10 Minuten bei 400 x g wurde der hämoglobinhaltige Überstand verworfen und das Leukozytenpellet zur weiteren Bearbeitung in PBS resuspendiert.

3.6.2 Organprobenentnahme und –bearbeitung

Zum Nachweis von CSFV in den Organen eines Tieres, wurden Organproben während der Sektion steril entnommen und bis zur weiteren Untersuchung bei -70°C gelagert. Die Organteile wurden dann in Würfel mit einer Seitenlänge von 1cm geschnitten und mittels Mörser und Pistill homogenisiert. Das Homogenisat wurde bei 400 x g für 10 Minuten zentrifugiert und der potentiell virushaltige Überstand durch 0,22 µ Membranen filtriert und zum Virusnachweis in der Ko-Kultivierung mit permissiven Indikatorzellen eingesetzt oder zum Virus-Nukleinsäurenachweis über RT-PCR mit TRIzol® Reagens versetzt.

3.6.3 Virusnachweis mittels Ko-Kultivierung

Zum Nachweis von vermehrungsfähigem CSFV in Proben wurde die Infektion von pestivirusfreien PK-15 Zellen durch Kultivierung in Anwesenheit der Proben getestet.

Man gab in die Vertiefung einer 24 Loch Platte 100µl der zu untersuchenden Probe. Hierauf wurde 1 ml frisch geteilter, pestivirusfreier PK-15 Zellen zupipettiert. Nach viertägiger Inkubation wurde das CSFV mittels immunohistochemischer Färbung (3.3.5) nachgewiesen. Zur Quantifizierung des Virusgehalts der Proben wurden log₁₀ Verdünnungsreihen des Probenmaterials angelegt.

3.6.4 Virusnachweis mittels RT-PCR

Zum Nachweis von Nukleinsäuren des CSFV, wurde aus den Leukozyten bzw. Gewebeproben die Gesamtzell-RNA mit TRIzol® Reagent isoliert. Anschließend wurde mit 1µg dieser RNA die diagnostische RT-PCR mit den Primern nach Vilcek (1994) zum Nachweis CSFV-spezifische-RNA durchgeführt. An diese schloß sich die *nested* PCR nach Ridpath et al. (1994) an.

3.7 Tierexperimentelle Methoden

3.7.1 Haltung der Tiere

Die Tiere wurden nach den Vorgaben des Tierschutzgesetzes in den institutseigenen Stallungen in Gruppen zu 2-5 Tieren gehalten. Sie wurden zweimal täglich mit einem handelsüblichen Alleinfuttermittel für Schweine und Wasser ad libitum versorgt. Die Tierversuche wurden vom Regierungspräsidium Tübingen genehmigt (A.Z.: BFA 201/02)

3.7.2 Klinische Untersuchung

Eine klinische Untersuchung der Tiere fand täglich statt. Hierbei wurden neben der Beurteilung des Allgemein- und Ernährungszustandes und der Anteilnahme an der Umgebung auch die Färbung von Haut und Schleimhäuten, die Kotkonsistenz, der Appetit und die Rektaltemperatur bewertet. Eine Rektaltemperatur über 40°C wurde als Fieber klassifiziert (Gillespie et al.; 2000). Tiere, die schwere Symptome von CSF wie mehrtägige Fieberphasen, Anorexie, Durchfall, Inkoordination oder Apathie zeigten, wurden euthanasiert und unmittelbar anschließend sezziert.

3.7.3 Blutentnahme

Blut wurde am lebenden Tier durch Punktion der Vena jugularis externa gewonnen. Zur Gewinnung von Vollblut wurde den verwendeten Spritzen der Gerinnungshemmer Heparin in einer Konzentration von 0,1mg/ml Blut zugesetzt. Zusätzlich wurde Blut zur Serumgewinnung ohne den Zusatz von gerinnungshemmenden Substanzen in einem sterilen Reagenzglas gesammelt.

3.7.4 Immunisierung

Die Impfstoffe wurden auf die skarifizierte Haut, intra-dermal (i.d.), intra-muskulär (i.m.) oder intravenös (i.v.) verabreicht.

Die Applikation auf die skarifizierte Haut erfolgte durch bestreichen eines 5cm x 2cm großen Hautareals im Nacken. Die Haut wurde zuvor mit einer Kanüle bis zur Erythembildung eingeritzt.

Die i.d.-Applikation erfolgte am Ohr. Der Impfstoff wurde mit einer Kanüle (0,6x25), bei flachem Einstichwinkel zwischen die Schichten der Haut injiziert. Bei der Injektion bildete sich eine leicht erhabene Quaddel.

I.m.-Injektionen wurden in die Nackenmuskulatur vorgenommen. Bei der Impfdosisverteilung („multi-site“ Applikation) wurde der Impfstoff in vier verschiedene Muskeln injiziert (Abb. 3.1).

Zur i.v.-Injektion wurde eine der sichtbaren Venen des Ohres punktiert.

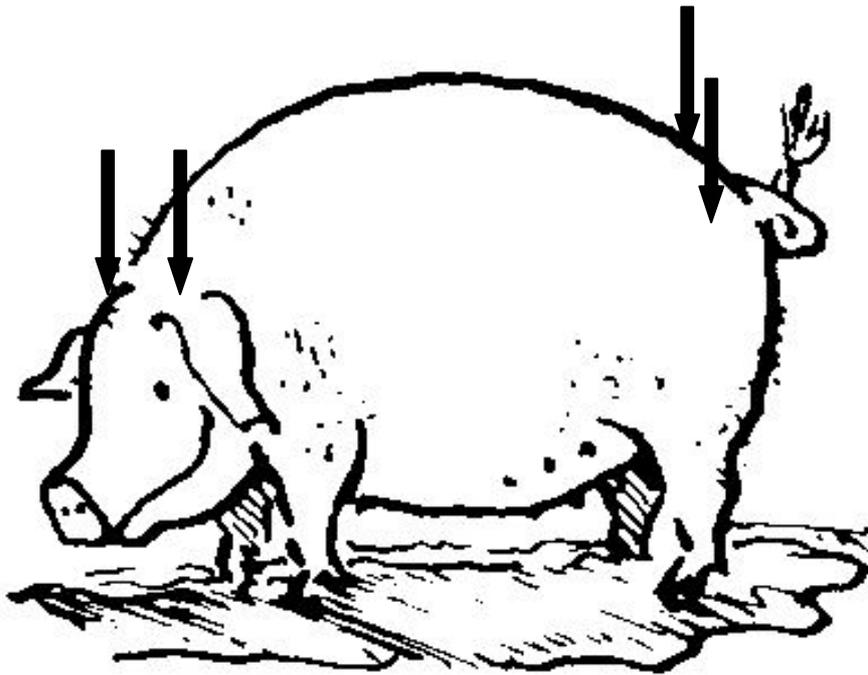


Abbildung 3.1: Injektionsstellen bei der Impfdosisverteilung („multi-site“ Applikation)

Während die Tiere i. d. R. nur durch eine i. m. Injektions am Ohrgrund immunisiert wurden, wurde die Impfdosis bei der „multi-site“ Applikation auf vier Injektionsstellen in die Nacken- und Glutealmuskulatur (Pfeile) verteilt.

3.7.5 Belastungsinfektion

Ziel einer Immunisierung ist der Schutz vor der Infektion. Deshalb wurden die Tiere nach den Impfungen einer Belastungsinfektion mit dem CSFV unterzogen. Hierzu wurde die letale Dosis von 2×10^5 TCID₅₀ des CSFV Stammes Eystrup den Tieren zur Hälfte intramuskulär (i. m.) und zur Hälfte mit einer Zerstäuberflasche intranasal (i. n.) verabreicht (Meyers et al.; 1999). Alternativ wurde in den Immunisierungsversuchen mit bakteriellem NS3, L-OprI und dem Lebendimpfstoff die gesamte Belastungsvirusdosis intranasal gegeben.

4 Ergebnisse

4.1. Analysen des E2 exprimierenden, rekombinanten Parapoxvirus ORFV D1701VrVE2

Über die Sequenzanalyse konnte bestätigt werden, dass in dem Transfervektor pdV-RecI das E2 Gen des CSFV Stammes Alfort 187 in das PstI-Subfragment des HindIII - Fragmentes H von ORFV D1701 eingefügt worden war. Somit entstand das Vektorplasmid pdV-E2. Das E2 Gen steht hier unter Kontrolle des Promotors des vegf-e-Gens des Parapoxvirus ovis ($P_{\text{vegf-e}}$). An das 5' Ende des Inserts schließt sich das parapoxvirale Transkriptions-Stopsignal ($(T_5)NT_{\text{vegf-e}}$) an.

Dieses Plasmid (pdV-E2) wurde in Zellen transfiziert, die zuvor mit ORFV D1701VrV infiziert worden waren (Henkel; 1997). Das E2-Gen konnte so durch homologe Rekombination während der Replikation des Virus gegen das β -Galaktosidasegen ausgetauscht werden. Zellen, in denen sich das Reporter-gen exprimierende ORFV D1701VrV vermehrt hat, färbten sich bei Zugabe des Substrates BluoGal[®] blau. Es waren aber auch deutlich mikroskopisch erkennbare, nicht gefärbte Plaques vorhanden. Durch mehrere Aufreinigungen weißer Plaques, die von Viren gebildet wurden, in denen das E2 Gen inseriert worden war, wurde die Parapoxrekombinante ORFV D1701VrVE2 isoliert.

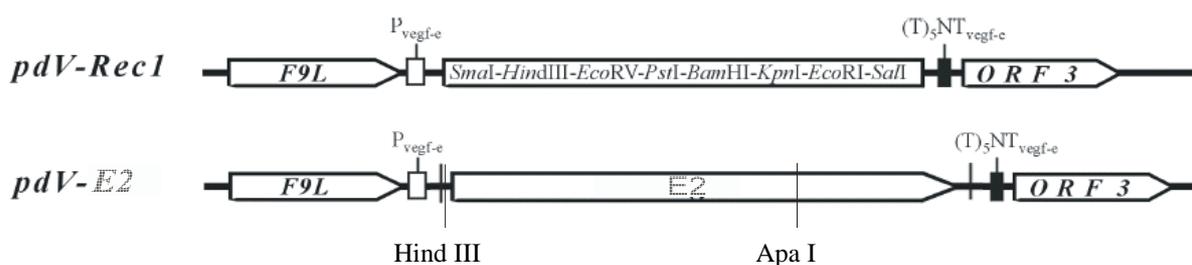


Abbildung 4.1 : Schematische Darstellung der Multiple Cloning Site (MCS) von pdV-Rec1 vor und nach der Insertion des E2 Gens:

Das E2 Gen wurde in den durch *EcoRV* Spaltung linearisierten Vektor pdV-RecI eingesetzt. Das Gen liegt zwischen dem vegf-e Promotor und der poxviralen mRNA Terminierungssequenz. Die Schnittstellen für *HindIII* und *ApaI*, die zur Analyse der richtigen Orientierung des Gens benutzt wurden, sind eingezeichnet. Weitere Details der Klonierung sind dem Text zu entnehmen.

Ergebnisse

4.1.1 Nachweis E2 spezifischer DNA im Genom von ORFV D1701VrE2

Nach Vermehrung von Plaque-gereinigtem Virusmaterial wurde nach einer Ultrazentrifugation aus dem Viruspellet virale DNA von ORFV D1701VrVE2 isoliert. Aus dieser konnte unter Verwendung CSFV-E2 spezifischer Oligonukleotidprimer E2 spezifische DNA mittels PCR amplifiziert werden.

Nach Restriktionsenzymverdau der DNA des Virusgenoms mit KpnI konnte das Fremdgen mit einer CSFV-E2 spezifischen, radioaktiv markierten Sonde in der Southern Blot Hybridisierung nachgewiesen werden. Das Insert liegt, wie in Abbildung 4.2 zu sehen, im KpnI-Fragment G, das eine Größe von ca. 7kb aufweist.

Ergebnisse

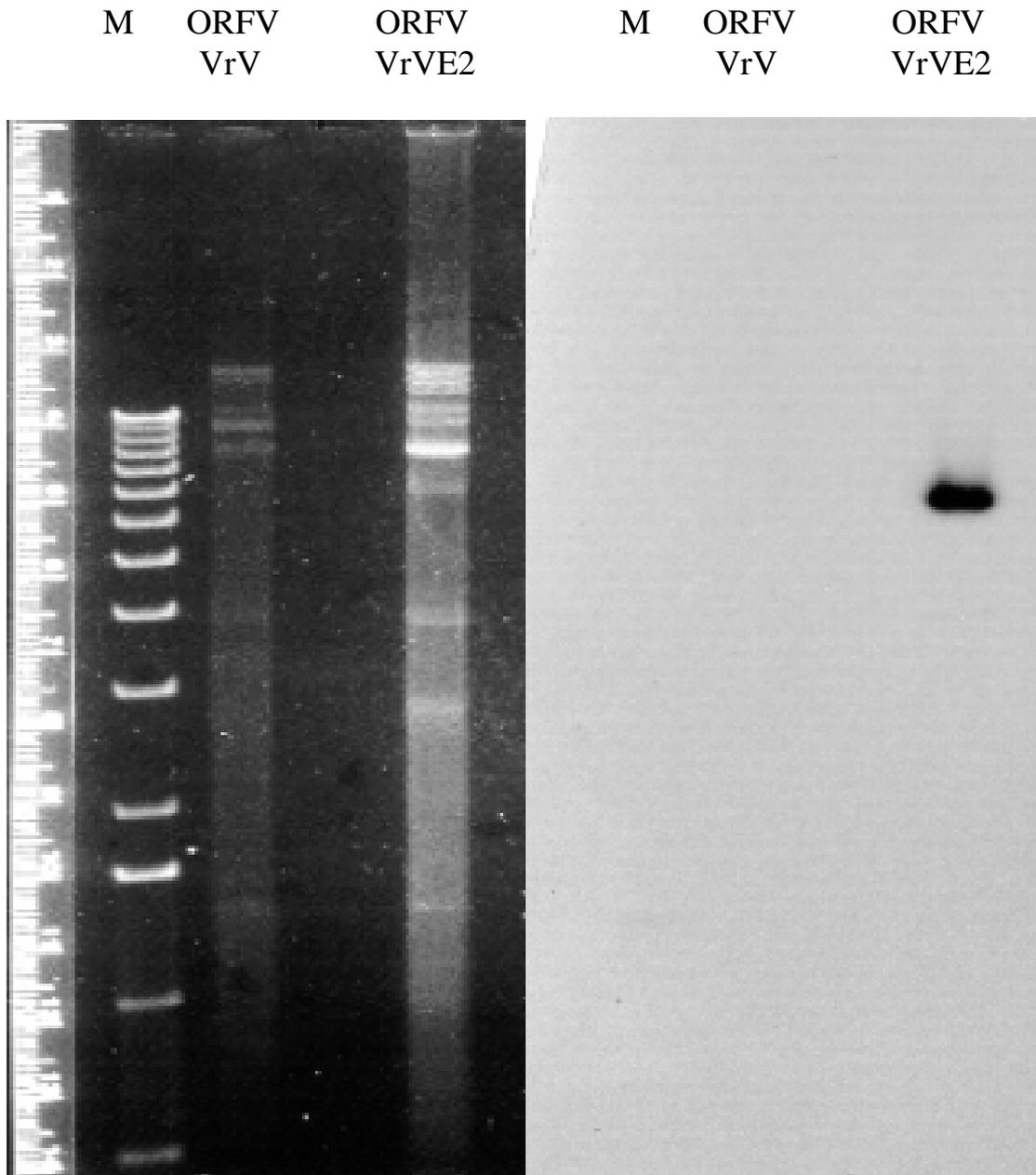


Abbildung 4.2 : Southern Blot Analyse auf CSFV-E2 kodierende DNA

Genomische DNA von ORFV D1701VrV und ORFV D1701VrVE2 wurde mit dem Restriktionsenzym KpnI gespalten und die entstandenen Fragmente in einem 1% Agarosegel aufgetrennt (links).

Die aufgetrennte DNA wurde auf Nitrozellulose geblottet und gegen eine radioaktiv markierte CSFV-E2 Sonde hybridisiert.

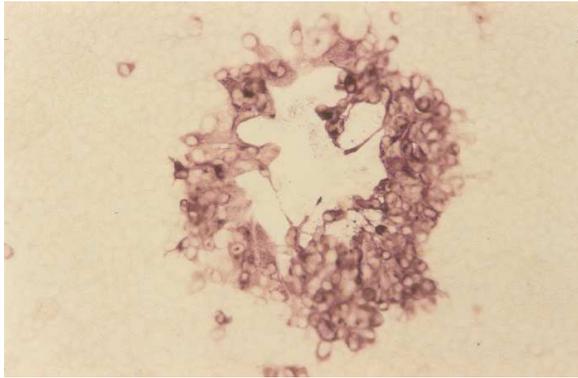
Die Sonde bindet im 7kb großen Fragment des ORFV D1701VrVE2 (rechts).

M: 1kbp DNA Molekulargewichtsstandard
ORFV VrV: DNA des ORFV D1701 VrV
ORFV VrE2: DNA des ORFV D1701 VrVE2

4.1.2 Expression des Glykoproteins E2 in permissiven und nicht permissiven Zellen

Um die Expression des im ORFV D1701VrVE2 inserierten CSFV E2 Genes nachzuweisen musste nach Zellinfektion die Präsenz des E2 Glykoproteins gezeigt werden. Da die Rekombinante zur Immunisierung von Schweinen, die kein natürlicher Wirt für das Parapoxvirus ovis sind, verwendet werden sollte, wurden sowohl für das Virus permissive Zellen (MA-104) als auch für das Virus nicht permissive Schweinezellen (prim. Schweinelungenzellen) auf die Expression von E2 nach der Infektion mit ORFV D1701VrVE2 untersucht. Wie in Abbildung 4.3 zu sehen ist, kommt es nur in den permissiven Zellen zur Ausbildung der für das Virus typischen Plaques (Zellzerstörung). Hier ist eine klare Assoziation von Plaquebildung und E2-Expression zu erkennen. Auch wenn es nach der Infektion der Schweinezellen nicht zur Ausbildung des typischen Virus-cpE kommt, so kann in ihnen doch das Glykoprotein E2 immunhistochemisch nachgewiesen werden. In beiden Zelllinien konnte das Protein nach Infektion mit ORFV D1701VrVE2 auch mittels Western Blot Analyse mit dem CSFV-E2 spezifischen Antikörper a18 nachgewiesen werden.

A Permissive Zellen



B Nicht permissive Zellen

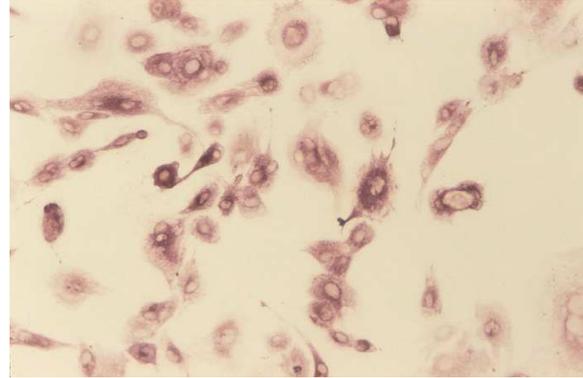


Abbildung 4.3: Expression des E2 Proteins

A: ORFV permissive MA-104 Zellen wurden mit einer MOI ~ 0,1 infiziert. 24h später wies der Zellrasen erste Plaques auf und wurde immunhistochemisch mit den CSFV-E2 spezifischen monoklonalen Antikörpern a18 gefärbt. Es kommt zur plaque-assoziierten Anfärbung der Zellen

B: Nicht permissive primäre Schweinelungenzellen wurden mit einer MOI ~ 1 infiziert und nach 24h wie bei A immunhistochemisch gefärbt. Das E2 Protein konnte auch im Zytoplasma dieser Zellen nachgewiesen werden.

Weder in permissiven noch in nicht permissiven Zellen konnte eine Anfärbung von nicht virusexponierten Kontrollzellen gefunden werden.

4.1.3 Sicherheit der Applikation von ORFV D1701VrVE2

Neben der Bildung einer belastungsfähigen Immunität spielt der Sicherheitsaspekt bei Impfstoffen eine bedeutende Rolle. So soll sich ein sicheres Impfvirus möglichst nicht im Impfling vermehren und auf keinen Fall zu Krankheitssymptomen führen. Dieser Prämisse wurde bei der Konstruktion des rekombinanten Virus dadurch Rechnung getragen, dass als Ausgangsvirus der hoch attenuierte ORFV D1701, ein ehemals zugelassenes Impfvirus, benutzt wurde. Mit dem *vegf-e*-Gen wurde zusätzlich noch ein Virulenzgen dieses Virus deletiert (Meyer et al.; 1999; Savory et al.; 2000).

Um die sichere Applikation des Virus zu überprüfen, wurde sowohl der natürliche Wirt, das Schaf, als auch die Zielspezies, das Schwein, mit dem Virus infiziert. Man applizierte 10^8 KID₅₀ auf ein Hautareal, das man vorher skarifiziert hatte. Das Eindringen in solche Hautläsionen entspricht dem natürlichen Infektionsweg des Parapoxvirus. Als Kontrolle wurde der virulente Wildtyp ORFV MRI eingesetzt, der in der Schafhaut typische, pustuläre Veränderungen erzeugt. Nach Applikation von ORFV D1701VrVE2 waren weder beim Schaf noch beim Schwein Läsionen in den Hautarealen zu erkennen, die mit der Rekombinanten infiziert worden waren (Abb. 4.4). Die Avirulenz im Schaf wurde bereits für ORFV D1701VrV gezeigt (Rziha et al.; 1999)

Als weiterer Test der Sicherheit wurde das Vorliegen einer Virämie untersucht. Es ist bekannt, dass es während der Infektion des permissiven Wirtes nicht zu einer virämischen Verbreitung des Virus im Körper kommt (Robinson und Lyttle; 1992). Um die Generalisierung des Virus auf dem Blutweg auch für das Schwein auszuschließen, injizierte man zwei Schweine intravenös mit 10^9 KID₅₀ des rekombinanten Virus. In den weißen Blutzellen der Tiere konnte nach 24h mit Hilfe einer diagnostischen PCR (Büttner et al.; 1995a) mit anschließender *semi-nested* PCR keine Parapox-spezifische DNA detektiert werden.

Abbildung 4.4 : Unschädlichkeitsnachweis von ORFV D1701VrVE2 in Schaf und Schwein



Hautareal (Schaf) am Tag 5 post infectionem
Auf das zuvor skarifizierte Hautareal wurde das virulente ORF Virus MRI aufgebracht.
Zu sehen sind typische pustuläre bis nekrotisierende Hautläsionen



Hautareal (Schaf) am Tag 5 post infectionem
Auf das zuvor skarifizierte Hautareal wurden 10^8 KID₅₀ des ORFV D1701VrVE2 aufgebracht.
Es entwickelten sich keine ORFV-typischen Läsionen bis zum Abschluss der Wundheilung.



Hautareal (Schwein) am Tag 5 post infectionem
Auf das zuvor skarifizierte Hautareal wurden 10^8 KID₅₀ des ORFV D1701VrVE2 aufgebracht.
Es entwickelten sich keine ORFV-typischen Läsionen bis zum Abschluss der Wundheilung.

4.1.4 Stimulation der Typ I Interferon Synthese in porcinen PBMC durch ORFV

D1701VrVE2

Zur Einleitung einer protektiven Immunantwort ist die richtige Stimulation des unspezifischen Anteils des Immunsystems (innate immunity) notwendig. Ein Indikator für die Aktivierung dieser Immunantwort gegen Virusinfektionen ist die Bildung von Typ I IFN. Zur Kontrolle, ob die Rekombinante eine Typ I Interferon induzierende Potenz im Schwein besitzt, wurden *in vitro* PBMC ORFV naiver Schweine mit vermehrungsfähigem ORFV D1701VrVE2 mit einer MOI ~ 1 stimuliert. Zum einen wurde die Anzahl IFN- α produzierender Zellen im ELISPOT-Assay bestimmt. Die in einem zweiten Ansatz nach 24h gewonnenen Zellkulturüberstände wurden im Zytotoxizitäts-Inhibitionstest auf ihre antivirale Potenz getestet. Auch wenn es große individuelle Unterschiede gab, so konnten doch in den PBMC aller beprobten Tiere (n=4) IFN- α produzierende Zellen nachgewiesen werden (Abb. 4.5). Ebenso besaßen alle Zellkulturüberstände VSV antivirale Potenz (Abb. 4.6). Nachdem die Induktion von IFN- α und die Sekretion antiviral wirksamer Substanzen in porcinen PBMC *in-vitro* nachgewiesen werden konnte, wurde die Stimulation einer IFN-Freisetzung auch *in-vivo* getestet. Hierzu injizierte man 10^9 KID₅₀ des rekombinanten Virus intravenös zwei Schweinen. Nach 16h wurde Serum dieser Schweine gewonnen und im Zytotoxizitäts-Inhibitionstest auf seine VSV antivirale Wirkung getestet. Da die Typ I IFN säurestabil sind, wurde, bevor die Seren in dem Test eingesetzt wurden, ihr pH-Wert kurzzeitig mit Salzsäure auf pH3 abgesenkt und anschließend mit Natronlauge auf pH7 zurück titriert. Im Serum beider Tiere konnte Typ I IFN nach der Injektion nachgewiesen werden (Tier1: 80 EU; Tier2: 320 EU). ORFV D1701VrVE2 bewirkt also auch *in vivo* eine Produktion von antiviral wirksamen Zytokinen.

**VSV antivirale Aktivität von PBMC-Überständen
ORFV-naiver Tiere (n=4)**

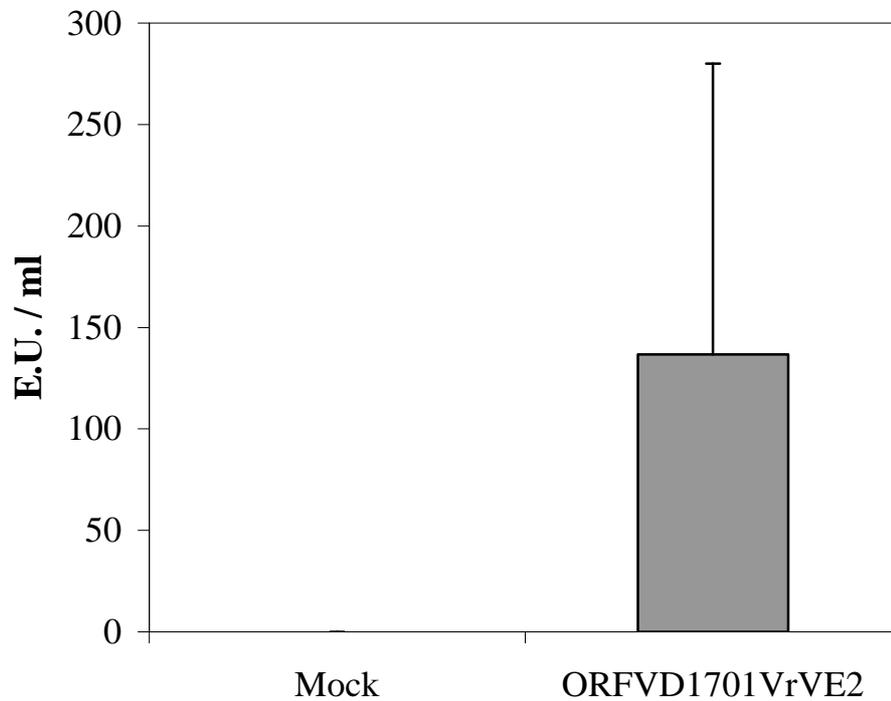


Abbildung 4.5 : Induktion von TypI IFN in porcinen PBMC

PBMC von ORFV naiven Schweinen wurden mit ORFV D170VrVE2 (MOI~1) oder MA-104 Mock für 24h inkubiert und anschließend die Typ I IFN Menge in den Zellkulturüberständen im Zytopathogenitäts-Inhibitionstest bestimmt. Angegeben sind der Mittelwert und die einfache Standardabweichung der VSV antiviralen Wirksamkeit in experimentellen Einheiten (E.U.).

IFN- α ELISPOT
Mittelwerte (n=4) ORFV-naiver Schweine

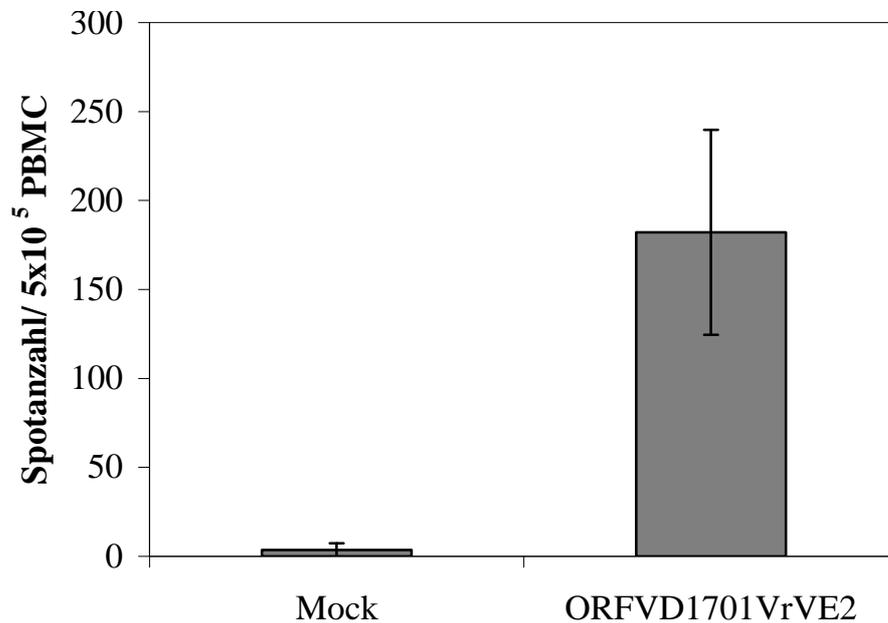


Abbildung 4.6 : Induktion von TypI IFN in porcinen PBMC

5×10^5 PBMC von 4 ORFV naiven Schweinen wurden mit einer MOI~1 ORFV D1701VrVE2 oder einem vergleichbaren Volumen MA104-Mock in 0,15 ml Gesamtvolumen im IFN- α ELISPOT stimuliert. Angegeben ist die mittlere Anzahl IFN- α sezernierender Zellen \pm der einfachen Standardabweichung.

Ergebnisse

4.2 Immunisierungsversuche

4.2.1 Immunantwort nach der Immunisierung mit dem Lebendimpfstoff Pestiffa®

Zur genaueren Charakterisierung der Immunantwort gegen CSFV und zur Validierung der verschiedenen Testsysteme wurden zwei Ferkel mit der vom Hersteller empfohlenen Dosis der CSFV Lebendvakzine Pestiffa®, die den attenuierten Virusstamm „Chinese“ enthält, immunisiert. Nach dieser Impfung wurde die humorale und die zelluläre Immunantwort untersucht und der vermittelte Schutz durch eine intranasale Belastungsinfektion mit einer Dosis von 4×10^5 KID₅₀ des virulenten CSFV Stammes Eystруп durchgeführt.

Antikörperbildung nach der Immunisierung mit dem Lebendimpfstoff Pestiffa®

Bereits nach einmaliger Applikation des Lebendimpfstoffes konnten am Tag 21 nach der Applikation geringe Titer neutralisierender Antikörper in den Seren der Tiere nachgewiesen werden (Tier 20: 1:8 ; Tier 21: 1:24). Diese Titer stiegen kurz nach der Belastungsinfektion stark an (Tier 20 und Tier 21: 1:256).

IFN- γ Produktion nach der Immunisierung mit dem Lebendimpfstoff Pestiffa®

Ebenso wie die humorale Immunantwort bereits durch einmalige Injektion des Lebendvirus aktiviert wurde, konnten auch schon nach der Erstimpfung in den PBMC der Tiere CSFV-spezifische IFN- γ produzierende Zellen nachgewiesen werden. Nach der Belastungsinfektion konnte allerdings kein signifikanter Anstieg dieser Zellpopulation erkannt werden (Daten nicht gezeigt). Um zu untersuchen, in wie weit die IFN- γ produzierenden PBMC als CSFV spezifisch geprägte T-Zellen einzugrenzen sind, wurde der ELISPOT nach Depletion der CD6 + Zellen mit Hilfe des MACS®-Systems nochmals durchgeführt. Durch die Depletion der CD6 + Zellen wurden nahezu alle IFN- γ produzierenden Zellen, die auf CSFV Re-stimulation und nicht auf Mock Stimulation reagierten, entfernt (Abb. 4.7). Die Zellen, die auf CSFV-Re-Stimulation IFN- γ sezernieren, exprimieren somit den Oberflächenmarker CD6.

Verlauf nach der Belastungsinfektion

Nach der intranasalen Belastungsinfektion kam es weder zum Auftreten klinischer Symptome noch zu einem Anstieg der Körpertemperatur der Tiere. Die Belastungsvirusausscheidung durch die Tiere wurde in diesem Versuch nicht untersucht.

IFN- γ sezernierende PBMC vor und nach der CD6 Depletion

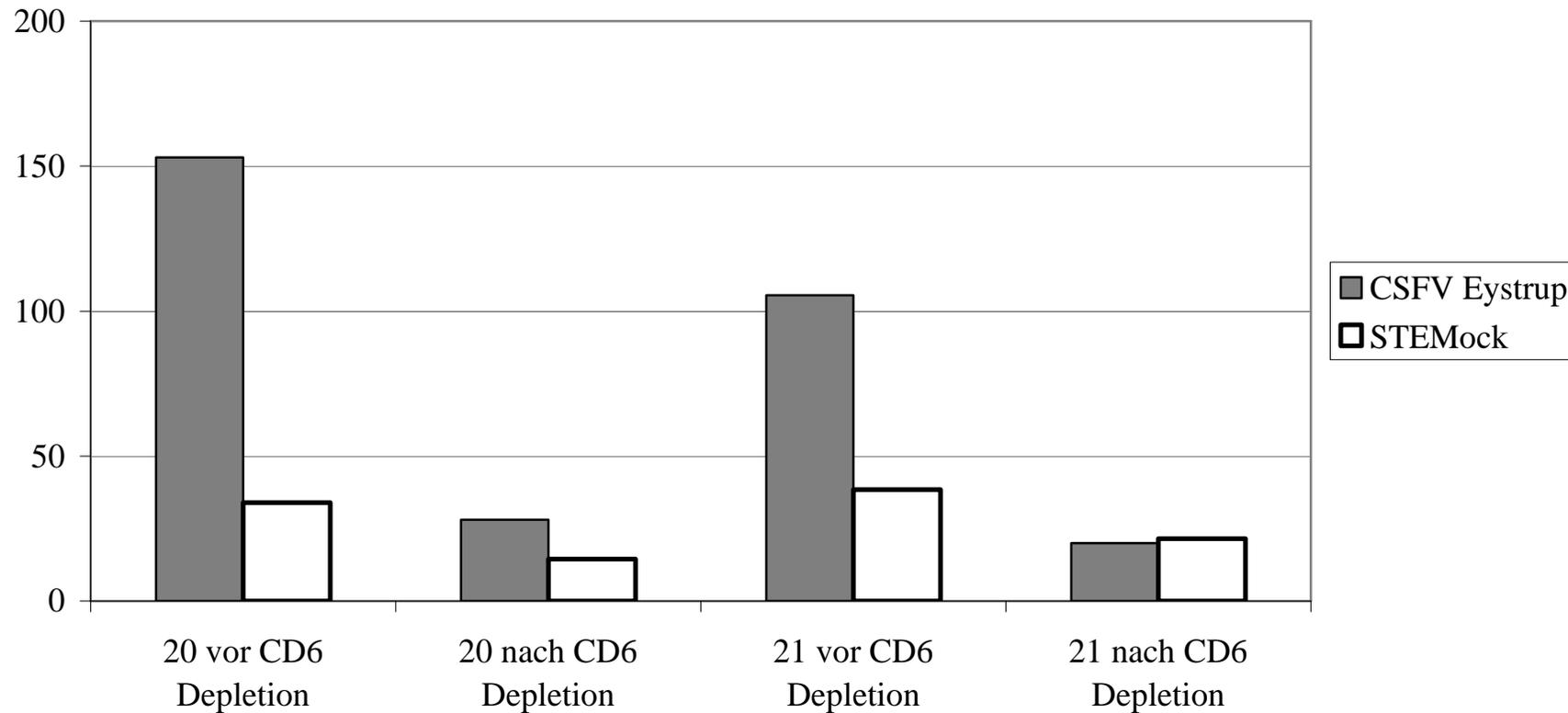


Abbildung 4.7 Einfluss der Depletion der CD6+ Zellen auf das Ergebnis des IFN- γ ELISPOT

PBMC der mit dem Lebendimpfstoff immunisierten Tiere wurden am Tag 21 nach der Impfung gewonnen und im IFN- γ spezifischen ELISPOT eingesetzt. Dargestellt sind die Spotzahlen produziert von 5×10^5 PBMC bzw. nur den CD6 negativen Zellen aus 5×10^5 PBMC nach der CD6-Depletion aus zwei verschiedenen Schweinen (Tier 20; Tier 21).

4.2.2 Immunisierung mit dem rekombinanten Parapoxvirus ORFV D1701VrVE2

Nachdem die Eigenschaften des rekombinanten Parapoxvirus ORFV D1701VrVE2 *in vitro* analysiert worden waren und sowohl die Insertion als auch die Expression des E2-Gens des CSFV nachgewiesen werden konnten, wurde die Rekombinate in verschiedenen Immunisierungsversuchen eingesetzt, um ihre Fähigkeiten als Impfvektor im Schwein zu untersuchen.

4.2.2.1 Homologe *Prime-Boost* Immunisierung

Als erstes wurde das rekombinante Virus in einem klassischen *Prime-Boost* Impfbegime getestet. Zur Immunisierung wurden zwei verschiedene Applikationsarten benutzt. Der Impfstoff wurde zwei Schweinen bei der Erstimpfung auf die skarifizierte Haut aufgetragen, bevor dann 3 Wochen später die Zweitimmunisierung durch intradermale (i.d.) Injektion erfolgte (Gruppe 1). Somit wurde das Impfvirus bei den Immunisierungen in das natürliche Zielorgan der Parapoxvirus Infektion, die verletzte Haut, eingebracht.

Die zweite Gruppe, bestehend aus 3 Tieren, erhielt im Abstand von ebenfalls 3 Wochen zwei i. m. Injektionen, was der üblichen Applikationsroute von Impfstoffen beim Schwein entspricht.

Jede Immunisierungsdosis enthielt 10^8 KID₅₀ Parapoxvirus ORFV D1701VrVE2.

Zur Analyse der Immunantwort wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Blutproben entnommen und das Serum auf neutralisierende Antikörper, sowie die PBMC auf CSFV-spezifische IFN- γ produzierende Zellen untersucht. Zur Ermittlung des Infektionsschutzes wurde 28 Tage nach der Zweitimpfung eine Belastungsinfektion mit 2×10^5 KID₅₀ CSFV Eyrstrup durchgeführt, wobei jeweils die Hälfte i. n. bzw. i. m. verabreicht wurde (Meyers et al.; 1999).

Antikörperbildung nach der Immunisierung

Vor und nach den Impfungen sowie nach der Belastungsinfektion wurden Seren der Impflinge gewonnen. Da bekannt war, dass Antikörper, die gegen das Glykoprotein E2 gerichtet sind, neutralisierende Eigenschaften besitzen, wurden die Seren in einem Neutralisationstest gegen CSFV eingesetzt. In diesem funktionellen Testsystem werden die Antikörper nachgewiesen, die das Virus am Eindringen in die Zelle hindern und somit die Virusvermehrung stoppen können.

Ergebnisse

Nach der Immunisierung über die skarifizierte Haut konnten keine neutralisierenden Antikörper nachgewiesen werden. Jedoch führte die intradermale Boostimmunisierung zu CSFV neutralisierenden Antikörpertitern (Tier1: 1:35; Tier2: 1:35). Im Gegensatz hierzu reichte die einmalige i. m. Applikation des rekombinanten Parapoxvirus zur Erzeugung neutralisierender Antikörper (Tier3: 1:7; Tier4: 1:2; Tier5: 1:5), deren Titer sich nach der Auffrischungsimpfung noch steigerten (Tier3: 1:50; Tier4: 1:35; Tier5: 1:26). Beide Tiergruppen zeigten 7 Tage nach der Belastungsinfektion einen starken Anstieg der CSFV neutralisierenden Antikörpertiter (Abb.4.8).

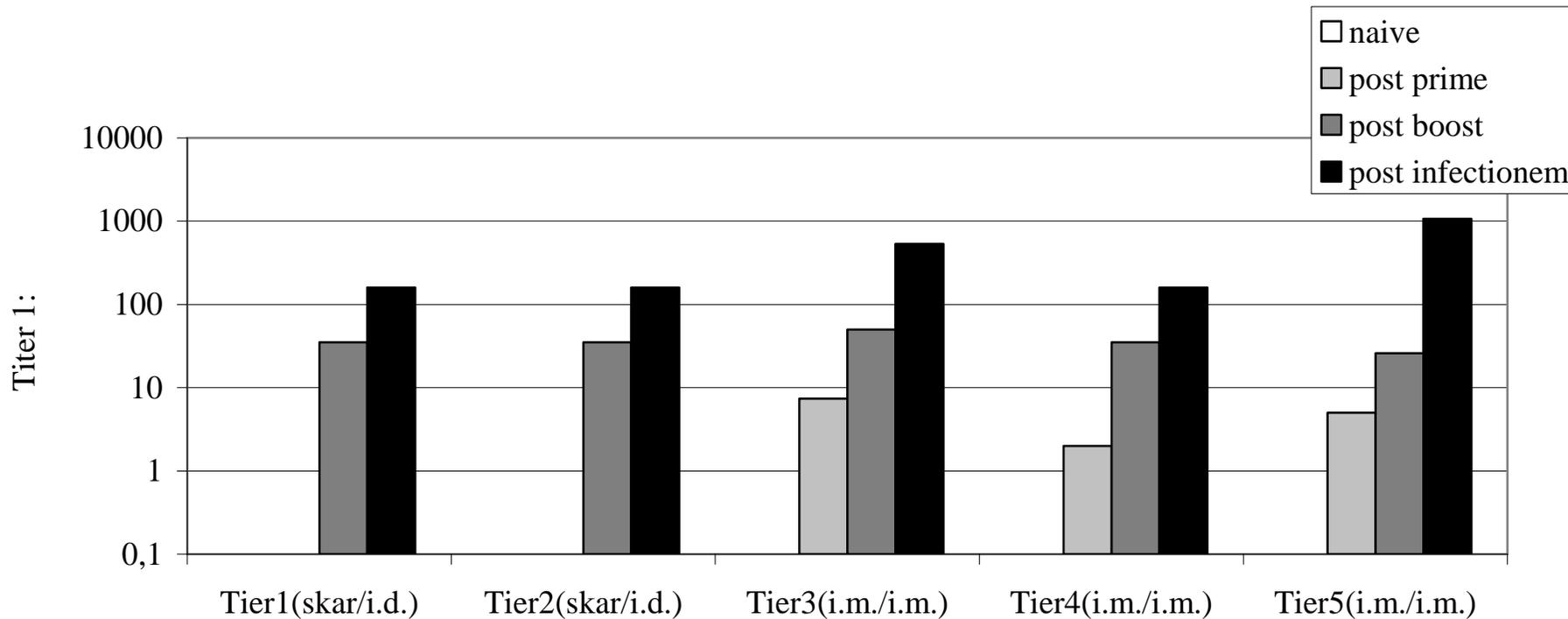


Abbildung 4.8: CSFV-Neutralisierende Antikörper nach homologer *Prime-Boost* Immunisierung mit ORFVD1701VrVE2

Serum der Tiere wurde vor (naive), nach der ersten (post prime) und der zweiten (post boost) Immunisierungen sowie 7 Tage nach der Belastungsinfektion (post infectionem) auf seinen Gehalt an CSFV-neutralisierenden Antikörpern getestet. Dargestellt sind die Titer der neutralisierenden Antikörper. Die Erstimmunisierung von Tier1 und Tier2 erfolgt durch Aufbringen von ORFV D1701VrVE2 auf die skarifizierte Haut, die Auffrischungsimpfung durch intradermale Injektion (skar./ i.d.). Die Tiere 3; 4 und 5 erhielten zwei intramuskuläre Injektionen (i.m./ i.m.). Alle Tiere erhielten die gleiche Dosis an Impf- und Belastungsvirus.

Ergebnisse

IFN- γ Produktion nach der Immunisierung

Die Induktion einer zellvermittelten Immunantwort wurde durch die Untersuchung der PBMC auf IFN- γ produzierende Zellen im ELISPOT begutachtet. Hierbei wurde nur der Anteil der Spots als CSFV-spezifisch angesprochen, der oberhalb der Anzahl Spots lag, die bei Mock-Stimulation entstanden. Weder nach der Erstimmunisierung noch nach der Auffrischungsimpfung konnten signifikante Anzahlen CSFV-spezifischer IFN- γ produzierender Zellen detektiert werden ($p > 0,1$). Erst nach der Belastungsinfektion mit dem CSFV kommt es zur Detektion eines signifikanten Unterschiedes zwischen den Spotzahlen, die nach CSFV-Re-Stimulation und Mock Stimulation entstehen ($p < 0,05$) (Abb. 4.9)

Verlauf nach der Belastungsinfektion

In den Tagen nach der Belastungsinfektion wurden die Tiere klinisch untersucht, was auch die Messung der Körperinnentemperatur einschloss. Die verwandte Virusdosis führte bei einem ungeimpften Kontrolltier zu schweren Symptomen der klassischen Schweinepest, in Form von Durchfall, Anorexie und Apathie. Im Krankheitsverlauf war bei diesem Tier ein stetiger Temperaturanstieg zu beobachten. Am Tag 7 post infectionem fand man das Tier festliegend vor und es musste aus Tierschutzgründen euthanasiert werden. Unabhängig von der Applikationsart des Impfstoffes wurden bei keinem der Impflinge klinische Symptome oder eine Körpertemperatur über 40°C diagnostiziert.

Das rekombinante Parapoxvirus ORFV D1701VrVE2 induziert sowohl nach intradermaler Boostimmunisierung als auch schon nach einmaliger intramuskulärer Applikation CSFV-neutralisierende Antikörper. In keinem der beprobten Tiere wurde eine signifikante Anzahl CSFV-spezifischer IFN- γ sezernierender Zellen durch die Impfung induziert. Dennoch wurde in diesem *Prime-Boost*-Regime ein Schutz vor klinischen Symptomen der klassischen Schweinepest erzeugt.

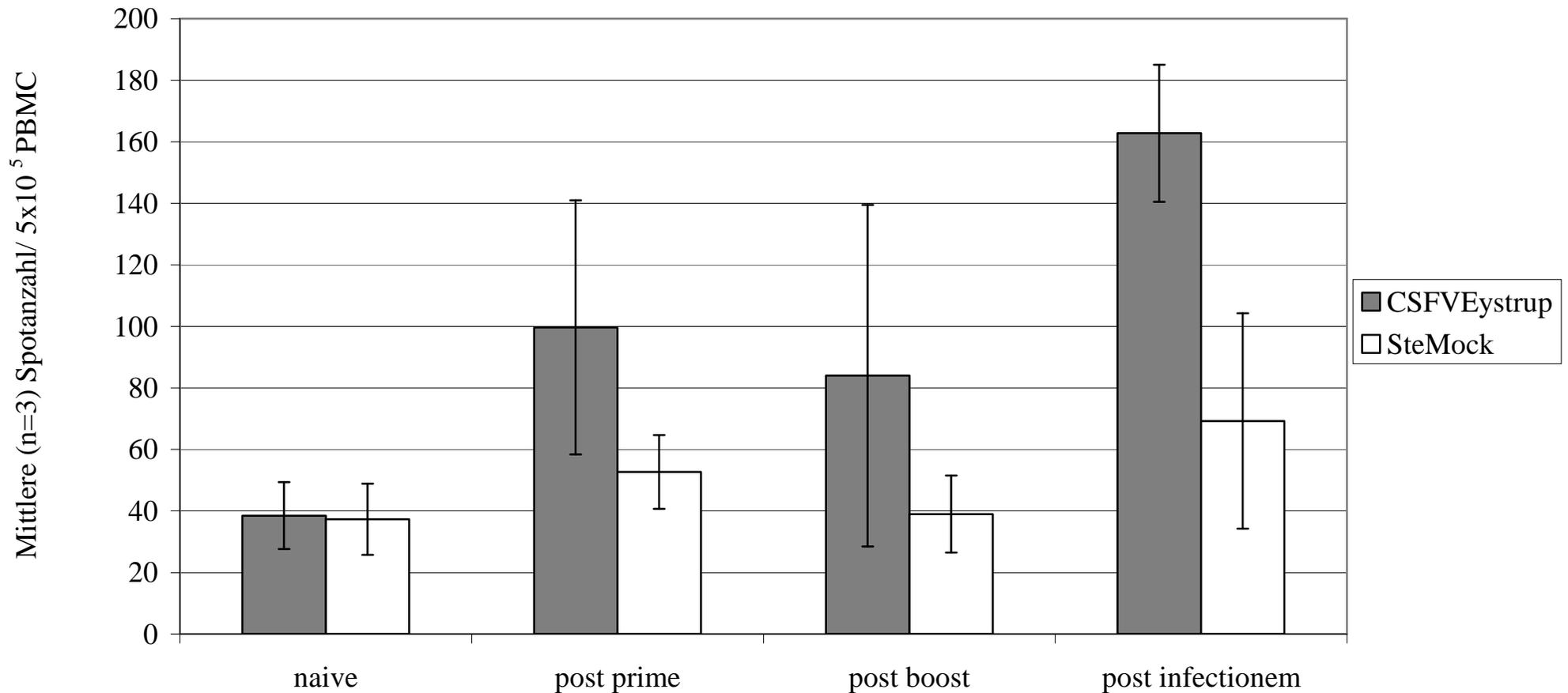


Abbildung 4.9: IFN- γ produzierende Zellen nach homologer „Prime-Boost“ Immunisierung mit ORFV D1701VrVE2

Die PBMC der Tiere, die die Impfung intramuskulär erhalten hatten, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten vor (naive), nach der ersten (post prime) und der zweiten (post boost) Immunisierung sowie 7 Tage nach der Belastungsinfektion (post infectionem) im IFN- γ spezifischen ELISPOT untersucht. Gezeigt sind die mittleren Spotanzahlen nach CSFV Stimulation (grau) bzw. Mock Stimulation (weiß) \pm der einfachen Standardabweichung.

4.2.2.2 Einfachimmunisierung „*Prime only*“

Da in der EU die Immunisierung gegen CSFV nur im Rahmen einer so genannten Interventionsimpfung erlaubt ist, sollte die Möglichkeit untersucht werden, bereits nach einmaliger Impfung mit dem rekombinanten Parapoxvirus ORFV D1701VrVE2 einen Schutz gegen die CSFV-Infektion zu erzeugen. Somit wurde ein Tierversuch konzipiert, der die Situation eines kurzen Zeitabstandes zwischen Impfung und Belastungsinfektion nachvollzieht. Hierzu wurde die Belastungsinfektion bereits 18 Tage nach der einmaligen Immunisierung mit 10^7 KID₅₀ der Rekombinanten durchgeführt. Da dies eine extrem kurze Zeitspanne ist, versuchte man die Effektivität der Immunisierung dadurch zu erhöhen, dass bei drei Tieren (Tier 8; 9; 10) die Impfdosis auf vier unterschiedliche Lymphknoteneinzugsgebiete verteilt wurde. Warrel et al. (1984) konnten zeigen, dass dies zu einer schnelleren Antikörperinduktion bei geringerer applizierter Antigenmenge führt. Um dieses Reaktionsverhalten nach Applikation an verschiedenen Injektionsstellen („multi site“) zu überprüfen, wurde zwei weiteren Tieren (Tier 6; 7) nur an einer Stelle, („single-site“), die gleiche Impfdosis appliziert.

Neben der Einmalimpfung und der zeitlichen Nähe zwischen Impfung und Belastung wird von einer Interventionsimpfung noch verlangt, dass es nicht nur zur Verhinderung der klinischen Krankheitssymptomatik, sondern auch die der Erregerausscheidung zum Erliegen kommt. Um dies zu untersuchen, wurde zu beiden Tiergruppen am Tag nach der Belastungsinfektion, nach gründlicher Reinigung des Stalles, je ein ungeimpftes Kontrolltier zugestellt. Dieses sollte durch Erkrankung und/oder Serokonversion ein Ausscheiden des Infektionsvirus durch die Impflinge anzeigen.

Antikörperbildung nach der Immunisierung

Bereits 17 Tage nach der Immunisierung konnten in den Seren von 2 der 3 „multi-site“ Impflinge neutralisierende Antikörper festgestellt werden (Tier 8: 1:4; Tier 9: 1:6). Das dritte Schwein aus dieser Gruppe sowie beide Tiere, die „single-site“ geimpft wurden, hatten keine detektierbaren neutralisierenden Antikörpertiter. In den Seren aller geimpften Tiere waren 7 Tage nach der Belastungsinfektion hohe Titer an neutralisierenden Antikörpern zu finden. Während die „multi-site“ geimpften Tiere hier noch höhere Titer aufwiesen, hatten sich die Titer der beiden Tiergruppen am Tag 11 post infectionem angeglichen (Abb. 4.10).

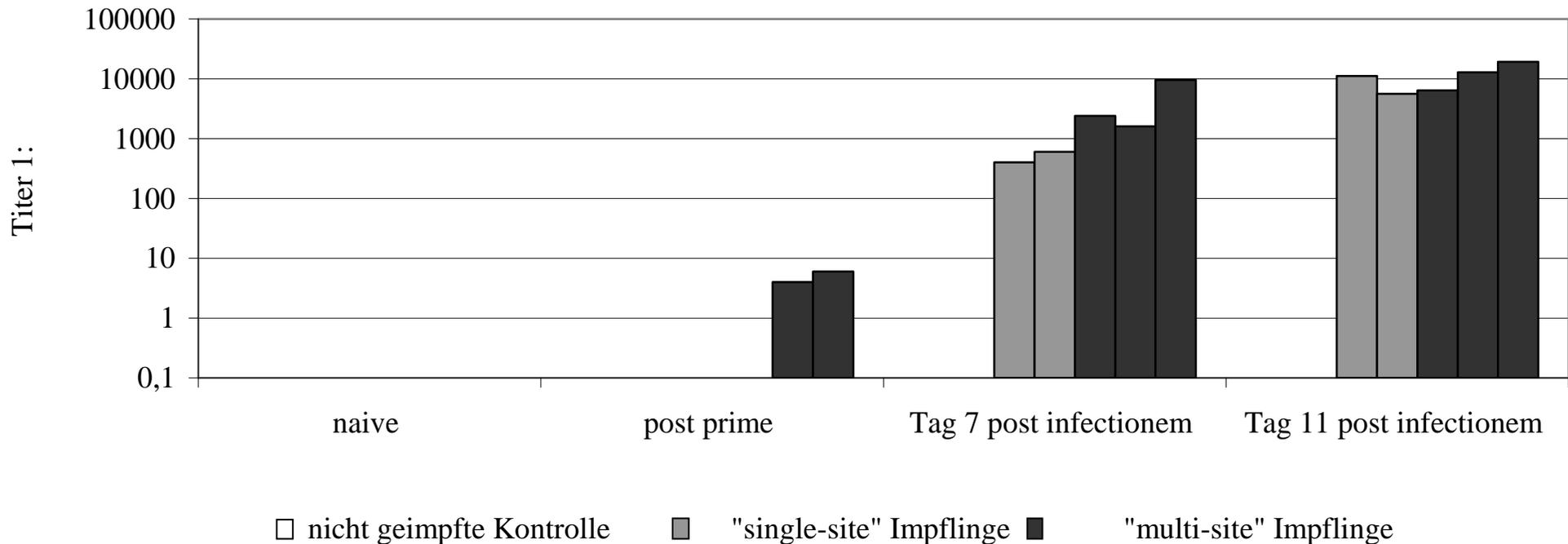


Abbildung 4.10: Neutralisierende Antikörper nach einmaliger („prime only“) Immunisierung mit ORFV D1701VrVE2

Serum der Tiere wurde vor (naive) und nach der Immunisierung (post prime) sowie 7 und 11 Tage nach der Belastungsinfektion (post infectionem) auf seinen Gehalt an CSFV-neutralisierenden Antikörpern getestet. Dargestellt sind die Titer der neutralisierenden Antikörper. Die Applikation des Impfstoffes erfolgte intramuskulär, wobei zwei Tiere die gesamte Dosis in die Nackenmuskulatur erhielten („single-site“ Impflinge) und bei drei Tieren die gleiche Gesamtdosis auf vier Injektionsstellen in der Nacken und Glutealmuskulatur verteilt wurde („multi-site“ Impflinge).

IFN- γ Produktion nach der Immunisierung

Um zu untersuchen, in wie weit die Impfung mit der Rekombinanten in der Lage ist, eine zellvermittelte Immunantwort nach einmaliger Applikation zu induzieren, wurden vor der Impfung sowie vor und nach der Belastungsinfektion die PBMC der Tiere auf die Produktion von IFN- γ untersucht. Nach einmaliger Injektion konnten am Tag 17 keine CSFV-spezifischen IFN- γ produzierenden Zellen nachgewiesen werden. Dies galt sowohl für die „single-site“ als auch für die „multi-site“ Impflinge. Am 7. Tag nach der Belastungsinfektion waren nach in vitro CSFV-Re-Stimulation zahlreiche IFN- γ produzierende PBMC im ELISPOT nachweisbar. Während diese sich bei den „multi-site“ Impfungen hochsignifikant ($p < 0,0005$) von den Spotzahlen bei Mock-Stimulation unterschieden, zeigten die „single-site“ geimpften Tiere auch nach Stimulation mit Mock oder reinem Medium eine große Anzahl Spots (Abb. 4.11). Dieses Phänomen konnte ebenfalls im IFN- γ spezifischen ELISA gezeigt werden. Eines der beiden „single-site“ immunisierten Tiere verstarb unter der Blutentnahme am Tag 11 post infectionem. Bei dem anderen Tier konnten hohe Anzahlen IFN- γ produzierender Zellen unabhängig von der Stimulation bzw. Re-Stimulation bis zum Tag 60 im ELISPOT nachgewiesen werden.

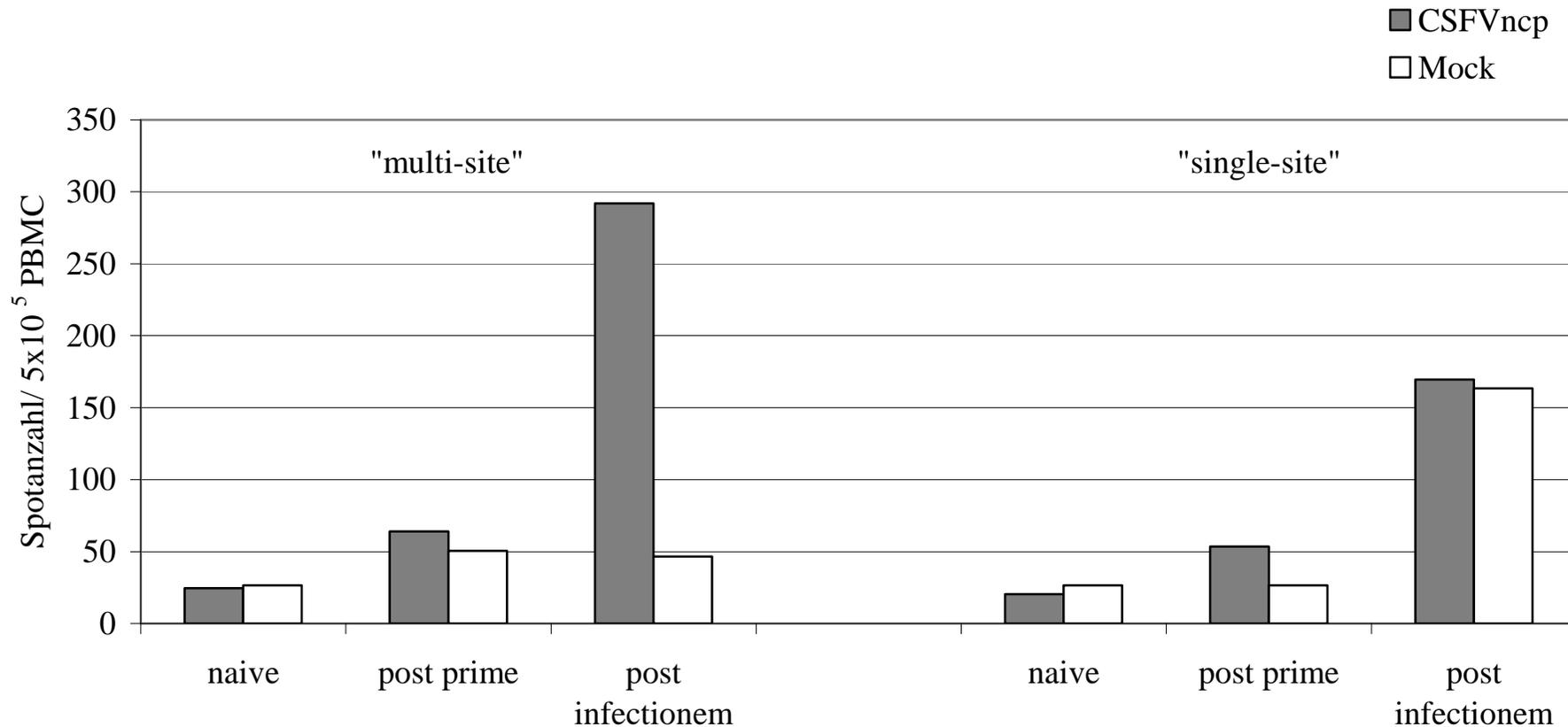


Abbildung 4.11: IFN- γ produzierende Zellen nach „*prime only*“ Immunisierung mit ORFV D1701VrVE2

Die PBMC der Impflinge wurden vor (naive) und nach der Immunisierung (post prime) sowie nach der Belastungsinfektion (post infectionem) im IFN- γ spezifischen ELISPOT untersucht. Gezeigt sind die Spotzahlen nach CSFV Restimulation (grau) bzw. Mock Stimulation (weiß) für jeweils ein repräsentatives Tier, dem die Impfdosis in vier verschiedene Muskeln („multi-site“: links) bzw. in nur einen Muskel („single-site“: rechts) injiziert wurde.

Verlauf nach der Belastungsinfektion

Bei der klinischen Untersuchung der Tiere nach der Belastungsinfektion konnten keine Symptome der klassischen Schweinepest bei den Impfungen gesehen werden. Die Messungen zur Entwicklung der Körpertemperatur zeigten, dass die „single-site“ geimpften Tiere eine kurze zweitägige Fieberphase zeigten, wohingegen bei den „multi-site“ Impfungen keine Temperatur über 40°C gemessen wurde (Abb. 4.12).

Ein labordiagnostisch erfassbares Symptom der klassischen Schweinepest ist die Reduktion der B-Lymphozyten im peripheren Blut (Susa et al.; 1992). Diese wurden vor und an verschiedenen Tagen nach der Infektion durchflußzytometrisch bestimmt (Abb. 4.13). Alle immunisierten Tiere zeigten ein kurzes Abfallen des relativen Anteils der B-Zellen im peripheren Blut, die jedoch ab Tag 6 wieder auf Normalwerte stiegen. Diese Erholung zeigte ein ungeimpftes Kontrolltier nicht, viel mehr war hier eine anhaltende Reduktion dieser Lymphozytenpopulation bis zum Todestag zu sehen.

Ebenso wie die Impflinge und die Infektionskontrolle wurden auch die Zustallkontrollen untersucht. Das Schwein, das den Stall mit den „single-site“ immunisierten Tieren teilte, erkrankte an der klassischen Schweinepest und zeigte alle typischen Symptome einschließlich hohem Fieber und B-Zellreduktion. Die Symptome konnten ungefähr drei Tage nach dem Auftreten erster Symptome bei der Infektionskontrolle gesehen werden. Das Tier musste am Tag 12 p.i. ebenfalls euthanasiert werden.

Die Zustallkontrolle in der Gruppe der „multi-site“ Impflinge zeigte keine Symptomatik der klassischen Schweinepest und war selbst 2 Monate nach der Zustallung noch seronegativ.

Virus-Reisolierung aus infizierten Tieren

Aus den Leukozyten der Infektionskontrolle konnte ab Tag 3 p.i. CSFV isoliert werden. Ebenso war auch das Zustallkontrolltier der „single-site“ Impflinge am Tag 7 virämisch. Aus den bei der Sektion entnommenen Organen beider Tiere konnte ebenfalls Virus isoliert werden.

Weder aus den Leukozyten noch aus Organverreibungen der geimpften Tiere und der „multi-site“ Zustallkontrolle konnte zu irgendeinem Zeitpunkt CSFV in Zellkultur angezüchtet werden. Um einen Einfluss neutralisierender Antikörper auf die Anzucht auszuschließen, wurden die in der Ko-Kultivierung negativ getesteten Proben auch in einer diagnostischen RT-PCR mit anschließender *nested* PCR auf virale RNA getestet. Auch hier waren alle Proben der immunisierten und des zugestellten Tieres aus der „multi-site“ Gruppe negativ.

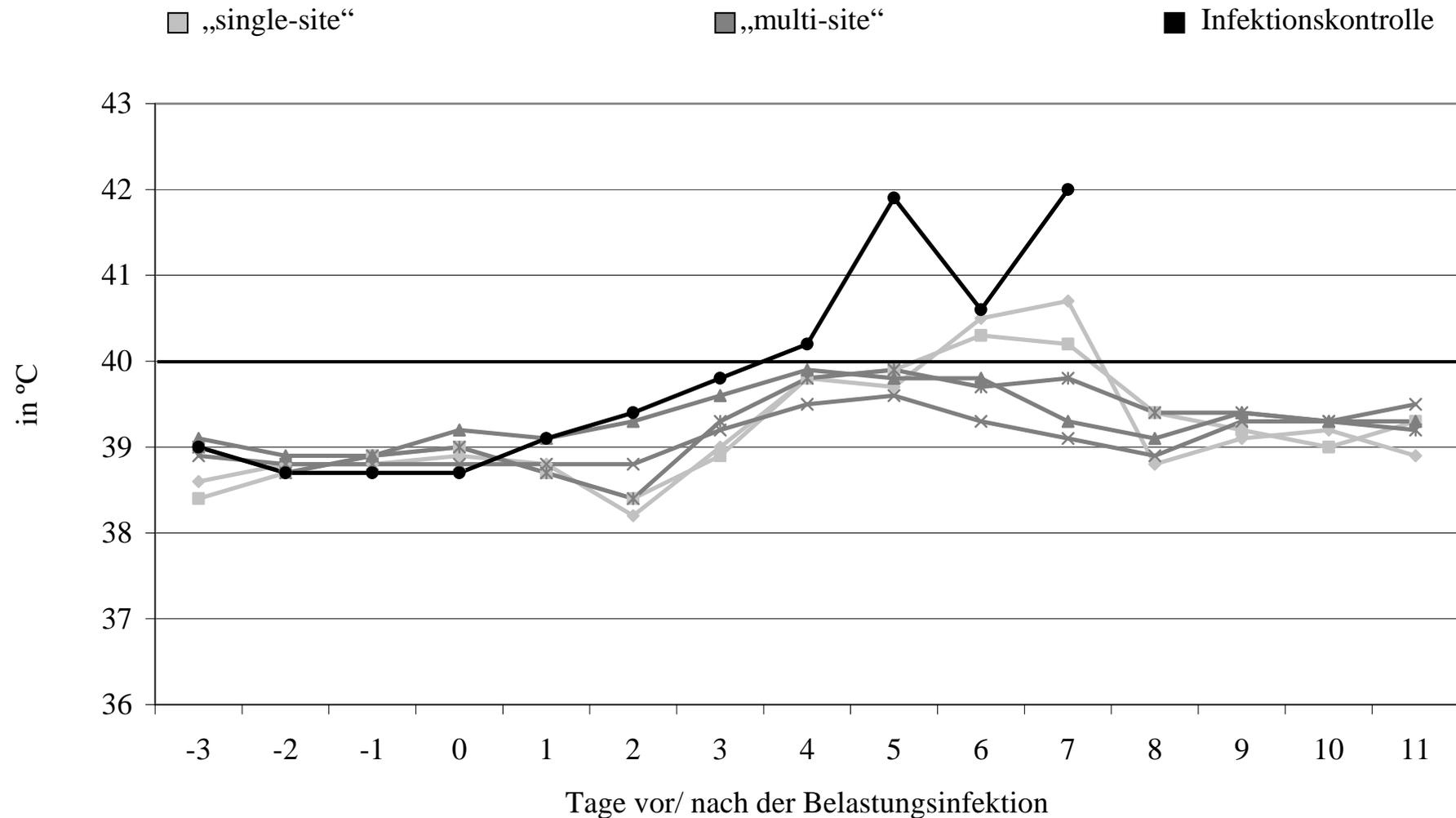


Abbildung 4.12: Körpertemperatur der ORFV D1701VrVE2 „prime only“ Implfinge

Kurz vor und nach der Belastungsinfektion wurde täglich die Körpertemperatur durch rektale Messung ermittelt. Dargestellt sind die Körpertemperaturen der Tiere, die die Impfdosis auf vier Muskeln verteilt („multi-site“: dunkelgrau) oder in nur einen Muskel („single-site“: hellgrau) injiziert bekamen, sowie die eines nicht immunisierten Kontrolltieres (schwarz). Als Fieber wurden Temperaturen über 40°C gewertet.

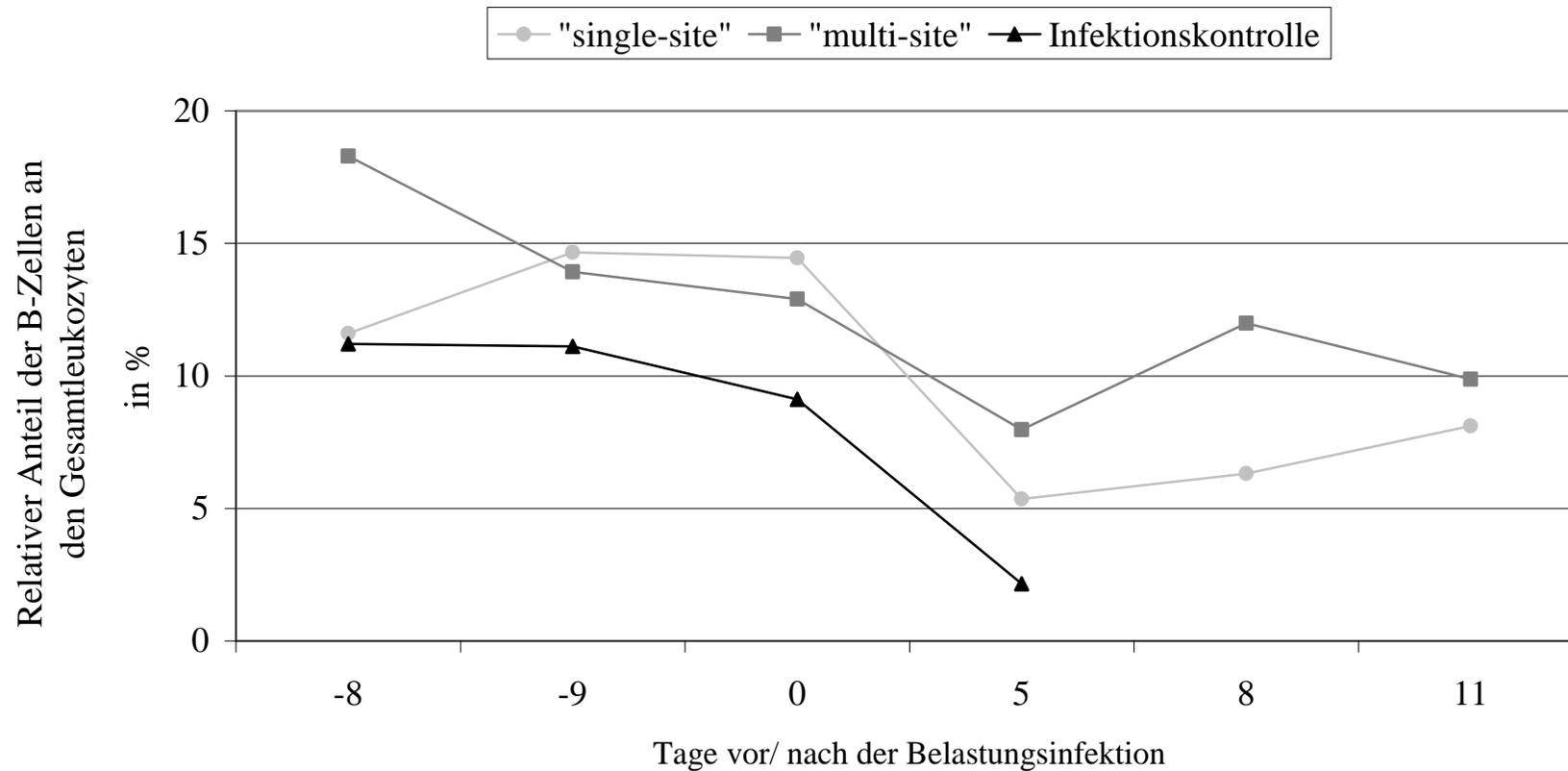


Abbildung 4.13: Relativer Anteil der B- Zellen an den Gesamtleukozyten nach „*prime only*“ Immunisierung mit ORFVD1701VrVE2

Im Zeitraum zwischen Tag 8 vor und Tag 11 nach der Immunisierung wurden mehrfach Blutproben entnommen und der relative Anteil der B-Zellen an den Gesamtleukozyten durchflußzytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse für jeweils ein repräsentatives Tier das die Impfdosis an vier Stellen („multi-site“: Quadrate, dunkelgrau) bzw. an einer Stelle („single-site“: Kreise, hellgrau) injiziert bekommen hatte, sowie für die ungeimpfte Infektionskontrolle (Dreiecke, schwarz).

Ergebnisse

Während die einmalige Impfung der Schweine mit der gewählten Dosis des Impfvirus bei Applikation an einer Stelle die CSFV-Ausscheidung nicht zu verhindern mochte, schien die „multi-site“ - Applikation diesbezüglich unter Berücksichtigung der geringen Tierzahl effizient zu sein.

Es wurde deshalb entschieden die Effektivität der „multi-site“ Applikation mit einer größeren Tierzahl zu testen. Gleichzeitig sollte ein Vergleich mit dem auf dem Chinese-Stamm basierenden Lebendimpfstoff Pestiffa[®] angestellt werden.

Dieser Versuch wurde im biologischen Sicherheitsbereich der AFFSA (Agence française de sécurité sanitaire des aliments), Swine Immunology and Virology Unit, in Ploufragan, Frankreich, durchgeführt.

Jeweils fünf Schweine wurden entweder mit dem Lebendimpfstoff „single-site“ oder mit 10^7 KID₅₀ des Parapoxvirus ORFV D1701VrVE2 „multi-site“ geimpft. 21 Tage später erfolgte eine rein intranasale Belastungsinfektion mit 10^6 KID₅₀ CSFV Eystrup. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich im gleichen Stall drei ungeimpfte Tiere, die durch eine Holzwand von den immunisierten Tieren abgetrennt waren und nicht infiziert wurden. Am darauf folgenden Tag entfernte man diese Trennung nach gründlicher Reinigung des Stallabteils. Im Verlauf des Tierversuches wurde die humorale Immunantwort getestet und nach der Belastungsinfektion wurden die Tiere auf klinische Symptomatik untersucht.

Antikörperbildung nach der Immunisierung

Sowohl vor der Immunisierung als auch vor und nach der Belastungsinfektion wurden Seren von den Tieren gewonnen und im Neutralisationstest getestet. Der Lebendimpfstoff führte 21 Tage nach der Immunisierung zu geringen CSFV neutralisierenden Antikörpertitern in den Seren von vier der fünf Impflinge. Am gleichen Tag konnten in den Seren von drei der fünf Tiere, die das rekombinante Parapockenvirus erhalten hatten, neutralisierende Antikörper nachgewiesen werden. Es lagen jedoch geringere Titer vor als bei den C-Stamm-Impflingen. In den Seren der Tiere aus beiden Gruppen kam es in Folge der Belastungsinfektion zu einem sprunghaften Anstieg der Titer. Auffällig war hierbei, dass am Tag 7 nach der Infektion in den Seren der ORFV D1701VrVE2 geimpften Tiere signifikant höhere Titer neutralisierender Antikörper messbar waren, als in denen der Tiere, die den Lebendimpfstoff erhalten hatten ($p < 0,025$) (Abb. 4.14).

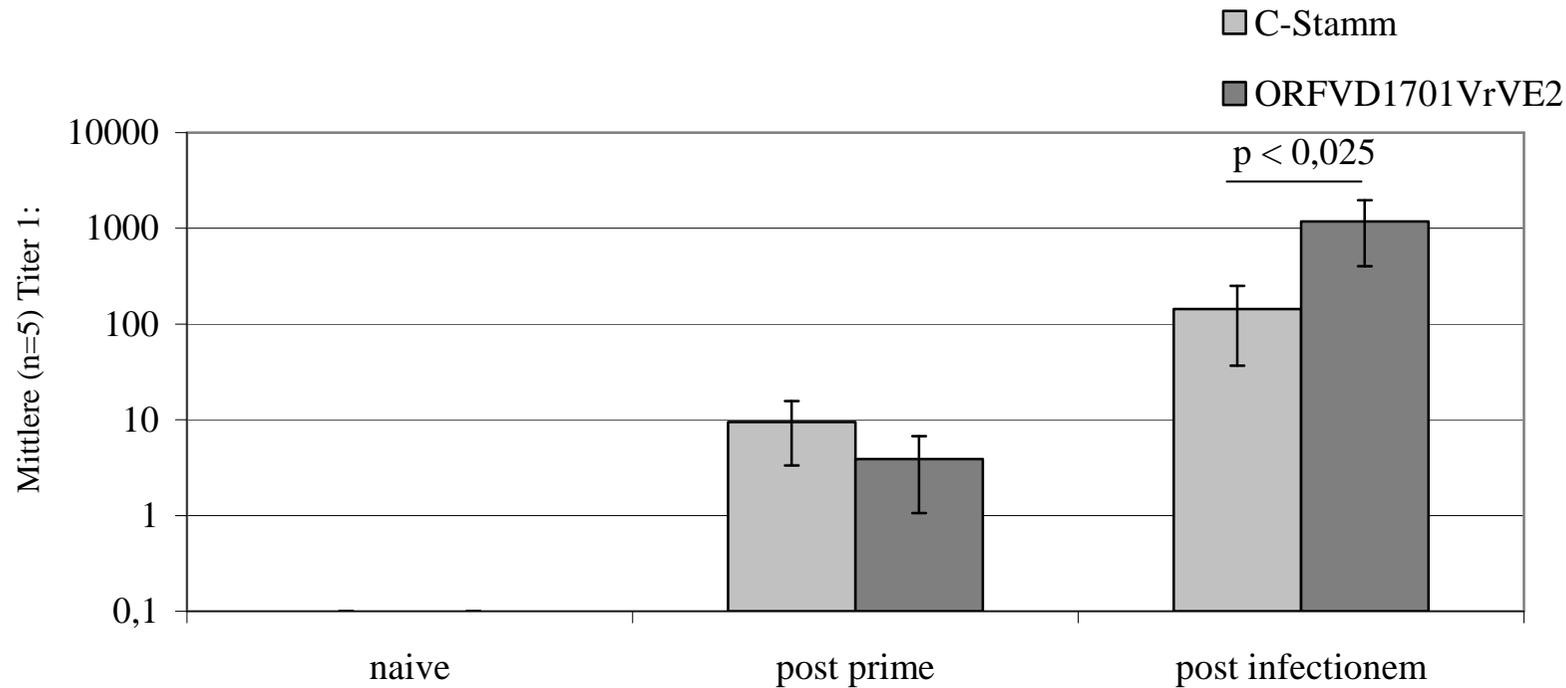


Abbildung 4.14: Neutralisierende Antikörper nach einmaliger Immunisierung mit der C-Stamm Schweinepest-Lebendvakzine, bzw. ORFV D1701VrVE2, Injektion hier auf vier Muskeln verteilt („multi-site“)

Serum der Tiere (n=5) wurde vor (naive) und nach der Immunisierung (post prime) sowie 7 Tage nach der Belastungsinfektion (post infectionem) auf seinen Gehalt an CSFV-neutralisierenden Antikörpern getestet. Dargestellt sind die Mittelwerte der neutralisierenden Antikörpertiter \pm der einfachen Standardabweichung.

Die Signifikanzberechnung der Titerunterschiede nach der Belastungsinfektion erfolgte mit dem *Welch-Test*

Ergebnisse

Verlauf nach der Belastungsinfektion

Nach der intranasalen Belastungsinfektion zeigte eines der ORFV D1701VrVE2 geimpften Tiere eine fünf Tage anhaltende Fieberphase. In der, zu dieser Zeit entnommenen Blutprobe, konnte jedoch kein Virus nachgewiesen werden. An den Tagen 5-8 p.i. waren zudem zwei der Zustallkontrollen febril. In diesen zwei Tieren konnte in dieser Zeit auch eine Virämie nachgewiesen werden. Obwohl in den Blutproben aller übrigen Tiere kein Virus nachgewiesen werden konnte, wurde post mortem in der Milz eines Impflings, der vorher keinerlei Symptomatik gezeigt hatte, CSFV-RNA mit Hilfe der RT-PCR detektiert.

Ebenso wie bei den Zustallkontrollen der Tiere, die mit dem rekombinanten Parapoxvirus immunisiert worden waren, wurden auch bei den Tieren, die das Stallabteil mit den Lebendvirus-Impfungen teilten, zwei als viraemisch erkannt. Auch hier wurde in Proben der Milz sowohl bei einem geimpften, als auch bei allen drei zugestellten Tieren CSFV-spezifische, virale Nukleinsäure mit Hilfe der RT-PCR nachgewiesen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in der Gruppe der ORFV D1701VrVE2 immunisierten Tiere, bei diesem Impfrezime der Immunschutz anscheinend so labil war, dass es zur Transmission des Belastungsvirus kam. Diese Übertragung des Belastungsvirus konnte jedoch auch durch Impfung mit dem attenuierten CSFV C-Stamm nicht verhindert werden.

Ergebnisse

4.2.2.3 Heterologe *Prime-Boost* Immunisierung mit rekombinantem E2 Protein und ORFV D1701VrVE2

Obwohl gegen das Parapoxvirus im Schwein wahrscheinlich keine effektive Immunantwort ausgelöst wird, sollte der Effekt einer heterologen *Prime-Boost* Immunisierung untersucht werden. Denn trotz des Anstieges der Antikörpertiter nach der homologen Auffrischungsimpfung konnte kein signifikanter Anstieg der IFN- γ produzierenden Zellen erkannt werden. Im getesteten heterologen Impfbereitstellung wurden zwei Tiere (Tier 11; Tier 12) ohne die Verwendung eines Adjuvans mit der vom Hersteller empfohlenen Dosis von 32 μ g E2-Protein, das im Baculovirussystem hergestellt worden war, immunisiert. 14 Tage später erfolgte die Boosterimmunisierung mit 10⁷ KID₅₀ des rekombinanten Parapoxvirus ORFV D1701VrVE2, das ebenfalls in die Nackenmuskulatur verabreicht wurde. Die Reaktion des Immunsystems wurde nach beiden Impfungen untersucht.

Antikörperbildung nach der Immunisierung

Sowohl vor der Erstimmunisierung als auch nach dieser waren keine CSFV-neutralisierenden Antikörper in den Seren der Tiere nachweisbar. Am Tag 14 nach der Auffrischungsimpfung konnten in den Seren beider Schweine neutralisierende Titer (Tier 11: 1:16; Tier 12: 1:12) detektiert werden Abb. (4.15).

IFN- γ Produktion nach der Immunisierung

Analog zur humoralen Immunantwort führte die Immunisierung mit dem Baculovirus-exprimierten Glykoprotein E2 nicht zu einer Induktion CSFV-spezifischer IFN- γ produzierender Zellen. Während die Zweitimmunisierung mit ORFV D1701VrVE2 nach homologer Erstimmunisierung keinen starken Anstieg dieser Zellpopulation erzeugte, wurden nach dem heterologen *Prime* mit E2-Glykoprotein viele CSFV-spezifische IFN γ produzierende Zellen generiert (Abb. 4.16).

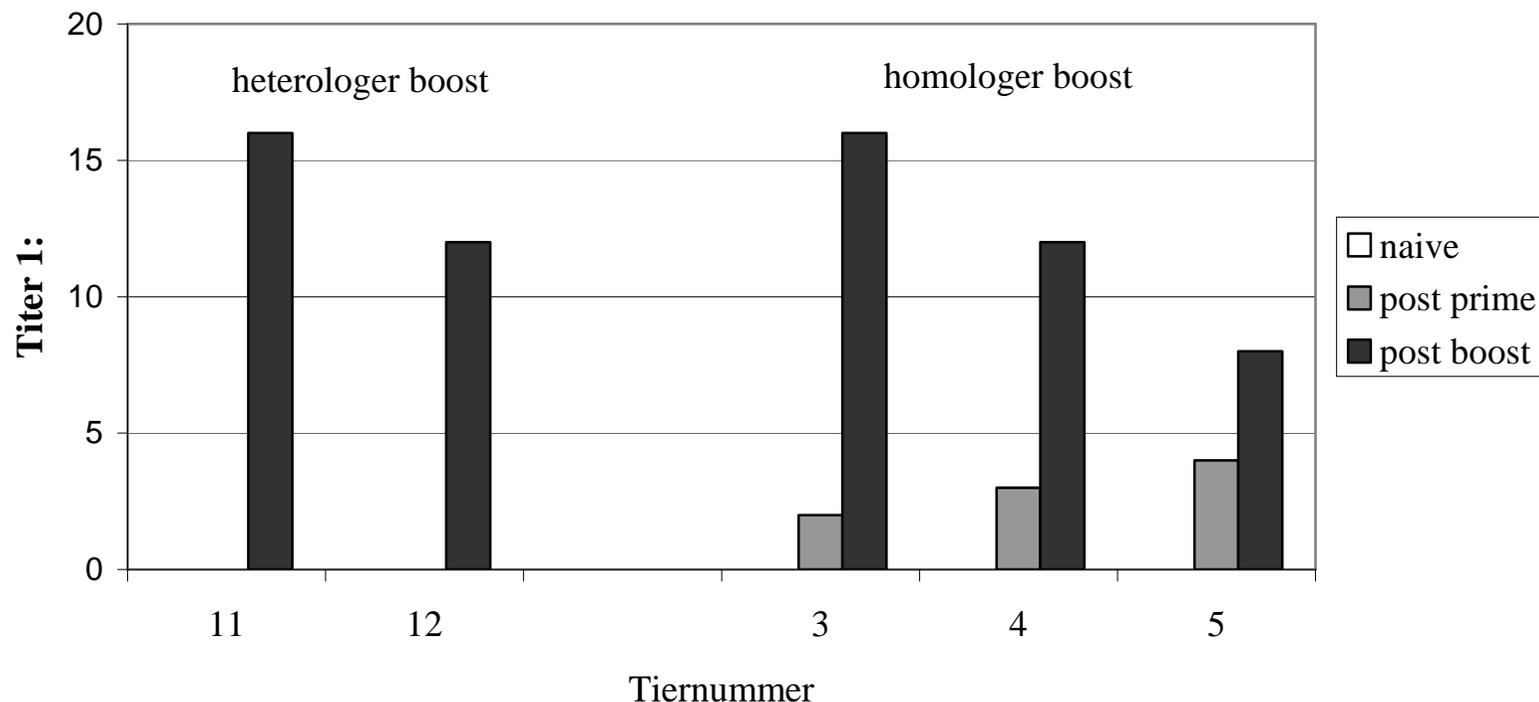


Abbildung 4.15: Neutralisierende Antikörper nach homologer *Prime-Boost* Immunisierung mit ORFV D1701VrVE2 bzw. heterologer *Prime-Boost* Immunisierung mit Baculovirus-exprimiertem E2 und ORFV D1701VrVE2

Serum der Tiere wurde vor (naive) und nach der ersten (post prime) und zweiten (post boost) Immunisierung auf seinen Gehalt an CSFV-neutralisierenden Antikörpern getestet. Dargestellt sind die Titer der neutralisierenden Antikörper. Die Tiere 3; 4 und 5 erhielten bei beiden Immunisierungen 10^8 KID₅₀ ORFV D1701VrVE2 (homologer boost). Die Tiere 11 und 12 erhielten als Erstimpfung 32µg Baculovirus-exprimiertes E2 Glykoprotein ohne Adjuvans, gefolgt von einer Zweitimpfung mit 10^8 KID₅₀ ORFV D1701VrVE2 (heterologer boost).

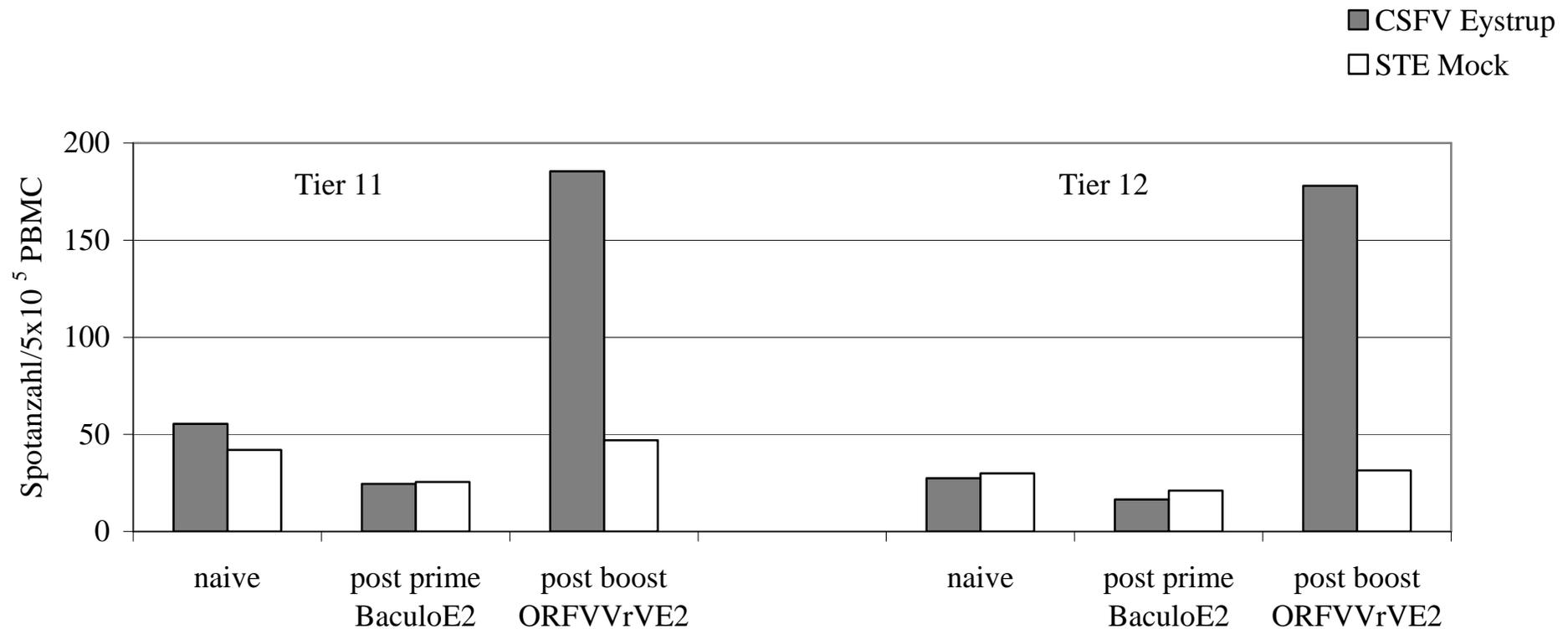


Abbildung 4.16: IFN- γ produzierende Zellen nach heterologer *Prime-Boost* Immunisierung mit Baculovirus-exprimiertem E2 und ORFV D1701VrVE2

Die PBMC der Impflinge wurden vor (naive) und nach der ersten (post prime) und zweiten (post boost) Immunisierung im IFN γ spezifischen ELISPOT untersucht. Gezeigt sind die Spotzahlen nach CSFV Stimulation (grau) bzw. Mock Stimulation (weiß), der im heterologen *Prime-Boost* Impfreime mit Baculovirus-exprimiertem E2 und ORFV D1701VrVE2 immunisierten Tiere 11 und 12.

4.2.3 Überprüfung der Adjuvanseigenschaften des L-OprI von *Pseudomonas aeruginosa*

Durch die Immunisierung mit dem Glykoprotein E2 des CSFV können neutralisierende Antikörper induziert werden und es kommt zum partiellen Schutz der Tiere. Um diesen Schutz effektiver zu gestalten, könnte eine stärkere Aktivierung zellulärer Immunmechanismen hilfreich sein.

Das L-OprI, ein Protein der äußeren Membran von *Pseudomonas aeruginosa*, ist als starker Induktor einer Th1 Antwort im Mausmodell beschrieben. Für seine Wirkung ist der Lipidbereich essentiell (Cote-Sierra et al.; 2002). Es ist nicht nur beschrieben, dass durch Einsatz dieses Adjuvans bei der Immunisierung die zelluläre Immunantwort im Vordergrund steht, sondern auch, dass eine bestehende Th2 Immunantwort in eine stärker Th1 dominierte Immunantwort geändert werden kann (Revets et al.; 2004). Um zu untersuchen, ob das Adjuvans eine ähnliche Wirkung auch im Schwein erzielen kann, wurde der folgende Immunisierungsversuch durchgeführt.

Drei Gruppen zu je vier Tieren wurden 2 x im Abstand von drei Wochen mit E2-Protein, das im Baculovirus System exprimiert worden war, immunisiert (zur Verfügung gestellt von A. Saalmüller). Das Protein entspricht dem, das in der zugelassenen E2 Subunit-Vakzine Bayovac CSF E2[®] der Firma Bayer Verwendung findet. Anstelle des in diesem Impfstoff benutzten Öl-in-Wasser Adjuvans wurde das Lipoprotein L-OprI, das in E.coli exprimiert worden war, verwandt (zur Verfügung gestellt von H Revets). Die Schweine in Gruppe 2 erhielten mit 16 µg die Hälfte, die Tiere der Gruppe 1 mit 8 µg ein Viertel der vom Hersteller empfohlenen Glykoprotein E2 Dosis. Bei diesen beiden Tiergruppen wurden dem Impfstoff pro Tier 35 µg L-OprI bei beiden Impfungen zugesetzt. Die Schweine in Gruppe 3 dienten als Kontrollgruppe und erhielten nur die halbe optimale Dosis E2-Glykoprotein ohne Adjuvans. Neben der Induktion E2-spezifischer und darüber hinaus neutralisierender Antikörper wurde, mit Hilfe des IFN-γ ELISPOT die Generierung CSFV-spezifischer IFN-γ produzierender Zellen in den PBMC der geimpften Tiere untersucht. Der durch die Impfung vermittelte Schutz wurde durch eine i.n. Belastungsinfektion mit letaler CSFV-Dosis überprüft.

Antikörperbildung nach der Immunisierung mit dem Glykoprotein E2 und L-OprI

Ergebnisse

An verschiedenen Tagen vor und nach der Immunisierung sowie nach der Belastungsinfektion wurden den Tieren Blutproben entnommen. Die hieraus gewonnenen Seren wurden mit einem E2 spezifischen ELISA untersucht. Bereits nach der ersten Impfung konnten geringe Mengen E2-reaktiver Antikörper nachgewiesen werden. Hierbei unterschieden sich die Mittelwerte der O.D. der beprobten drei Tiergruppen nur geringfügig. Nach der Boost-Immunisierung konnte ein signifikanter Unterschied zwischen Seren aus der Gruppe 2 und 3 festgestellt werden ($p < 0,025$). Nach der Belastungsinfektion kam es in allen Tieren zu einer starken Bildung E2-spezifischer Antikörper (Abb. 4.17).

Neben diesem rein quantitativen Nachweis E2 - reaktiver Antikörper wurde außerdem die Funktion der Antikörper im Neutralisations-Test gegen CSFV Eustrup untersucht (Abb. 4.18). Neutralisierende Antikörper konnten in den Seren der Schweine allen Gruppen frühestens nach der Zweitimpfung detektiert werden. Obwohl kein signifikanter Unterschied der Serumtiter der Tiere aus Gruppe 2 und Gruppe 3 vorlag, fiel hier vor allem auf, dass in der Gruppe 3 (Impfung ohne Adjuvans) nur ein Tier neutralisierende Antikörper vor der Belastungsinfektion zeigte. In allen vier Tieren der Gruppe 2, die die gleiche Dosis Antigen erhalten hatten, wurden, mit Hilfe des Adjuvans L-OprI, bereits nach dem Boost neutralisierende Antikörper induziert. Sogar in den Seren von drei der vier Tiere aus Gruppe 1 waren diese Antikörper nach dem Boost nachweisbar, obwohl diese Tiere nur ein Viertel der empfohlenen Dosis, diese jedoch mit Adjuvans, erhalten hatten. Nach der Belastungsinfektion stiegen die neutralisierenden Antikörpertiter sprunghaft an. Am Tag 7 post infectionem unterschieden sich die Titer der Gruppe 2 und 3 signifikant ($p < 0,025$) (Abb. 4.18)

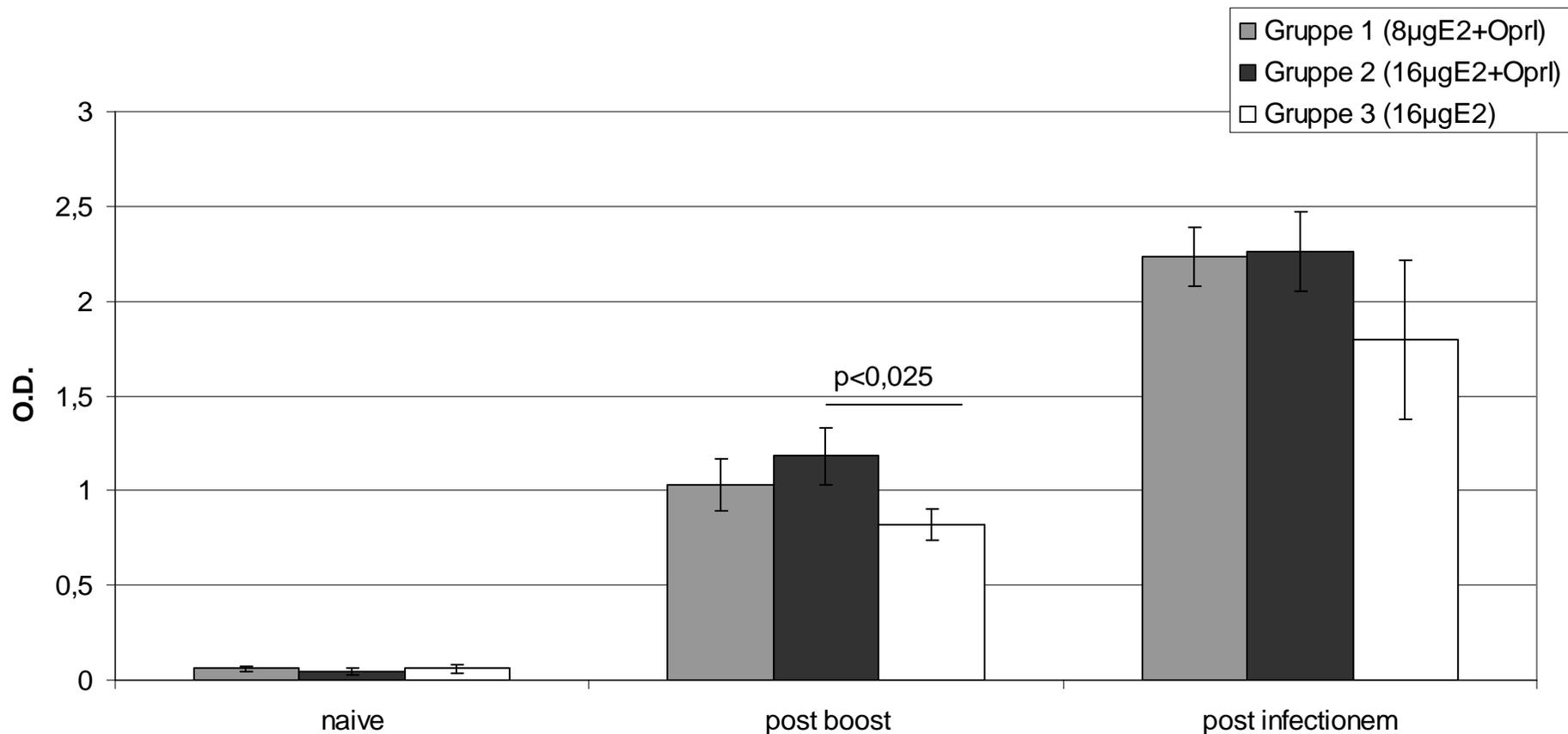


Abbildung 4.17: Nachweis E2-spezifischer Antikörper im ELISA nach Immunisierung mit Baculovirus-exprimiertem E2 Glykoprotein mit und ohne Adjuvans L-OprI

Die Seren der Tiere wurden vor der Immunisierung (naive), nach der Auffrischungsimpfung (post boost) und 7 Tage nach der Belastungsinfektion (post infectionem) auf ihren Gehalt an E2-spezifischen Antikörpern getestet. Die Zusammensetzung des Impfstoffes ist in der Legende in Klammern angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm der einfachen Standardabweichung der optischen Dichte (O.D.) für die verschiedenen Tiergruppen, die bei einer Serumverdünnung von 1:200 erzielt wurden. Die Signifikanzberechnung der Unterschiede nach der Zweitimmunisierung erfolgte mit dem *Welch-Test*.

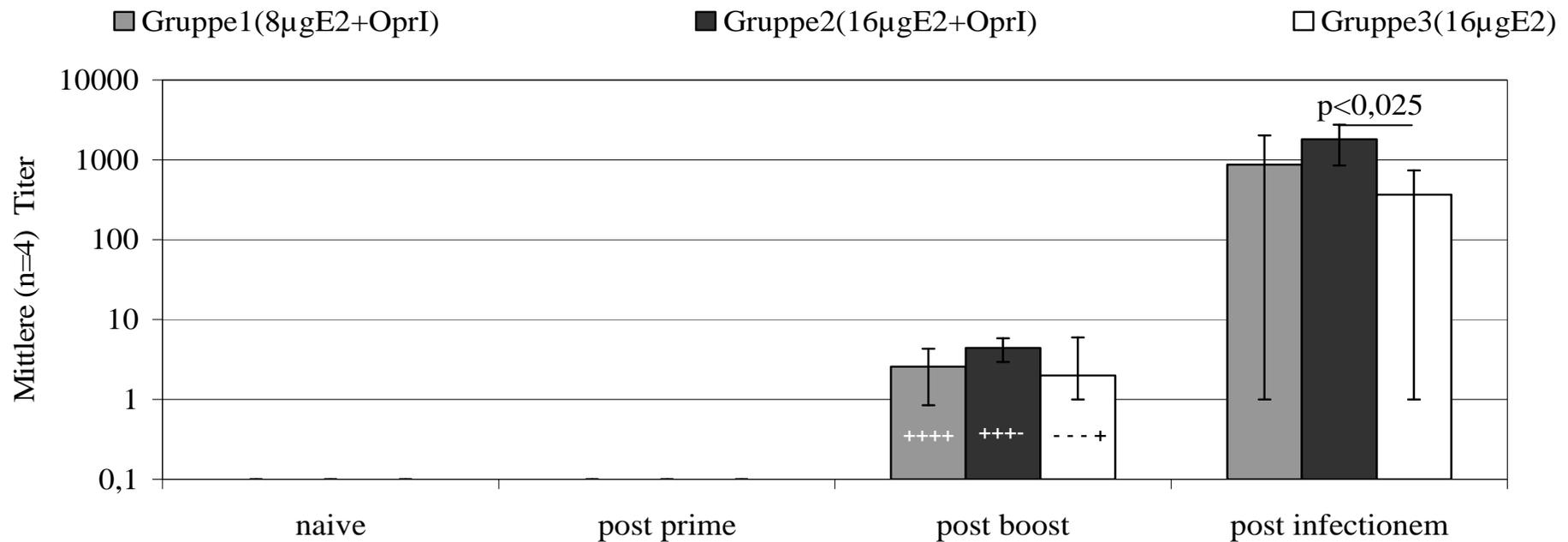


Abbildung 4.18: CSFV-Neutralisierende Antikörper nach Immunisierung mit Baculovirus-exprimiertem E2 Glykoprotein mit und ohne Adjuvans L-OprI

Serum der Tiere wurde vor (naive) und nach den Immunisierungen (post prime; post boost) sowie nach der Belastungsinfektion (post infectionem) auf seinen Gehalt an CSFV- neutralisierenden Antikörpern getestet. Dargestellt sind die Mittelwerte der neutralisierenden Antikörpertiter der verschiedenen Tiergruppen. Die Zusammensetzung des Impfstoffes ist in der Legende in Klammern angegeben. Zusätzlich ist in den Säulen des Blutentnahmezeitpunktes post boost eine Einzeltieraufschlüsselung angegeben. Tiere, die neutralisierende Antikörper aufwiesen, sind mit einem +, Tiere ohne messbare neutralisierende Antikörper, mit einem - gekennzeichnet.

Die Signifikanzberechnung der Unterschiede nach der Belastungsinfektion erfolgte mit dem *Welch-Test*.

Ergebnisse

IFN- γ Produktion nach der Immunisierung

Im vorliegenden Tierexperiment sollte vor allem untersucht werden, ob das Adjuvans L-OprI in der Lage ist, eine starke zellvermittelte Immunität im Schwein zu erzeugen. Als Maß hierfür wurde die Generierung CSFV-spezifischer IFN- γ produzierender Zellen untersucht. Aus den Blutproben, die den Schweinen im Verlauf des Tierversuches entnommen wurden, wurden die PBMC isoliert und im IFN- γ ELISPOT unter CSFV und Mock-Stimulation beprobt. Es wurde das Verhältnis der IFN- γ Produzenten nach Mock Stimulation und CSFV Stimulation begutachtet. Die Differenz dieser beiden Zahlen wurde als CSFV-spezifisch angesehen. Zum anderen wurden die Spitzahlen an den verschiedenen Blutentnahmetermeninen sowie der verschiedenen Tiergruppen verglichen. Weder nach der Immunisierung ohne noch mit Adjuvans konnten messbare Zahlen CSFV-spezifischer IFN- γ produzierende Zellen in den PBMC vor der Belastungsinfektion induziert werden. Am 7. Tag nach der Belastungsinfektion konnte nur in den PBMC aus Tieren der Gruppe 2, die mit der hohen Dosis E2 in Verbindung mit L-OprI immunisiert worden waren, ein signifikanter Unterschied der Spitzahlen nach CSFV Stimulation verglichen mit Mock Stimulation gesehen werden ($p < 0,001$) (Abb. 4.19).

Bei der Betrachtung der individuellen Ergebnisse fiel noch deutlicher der Unterschied zwischen den mit und den ohne Adjuvans geimpften Tieren auf. In Gruppe 3 war auch hier nur bei dem einen Tier eine große Zahl CSFV-spezifischer IFN- γ produzierender PBMC nachweisbar, das auch bereits vor der Belastungsinfektion neutralisierende Antikörper zeigte. Im Gegensatz hierzu konnten nach der Belastungsinfektion bei allen Tieren der Gruppe 2 viele CSFV-spezifische Spots detektiert werden.

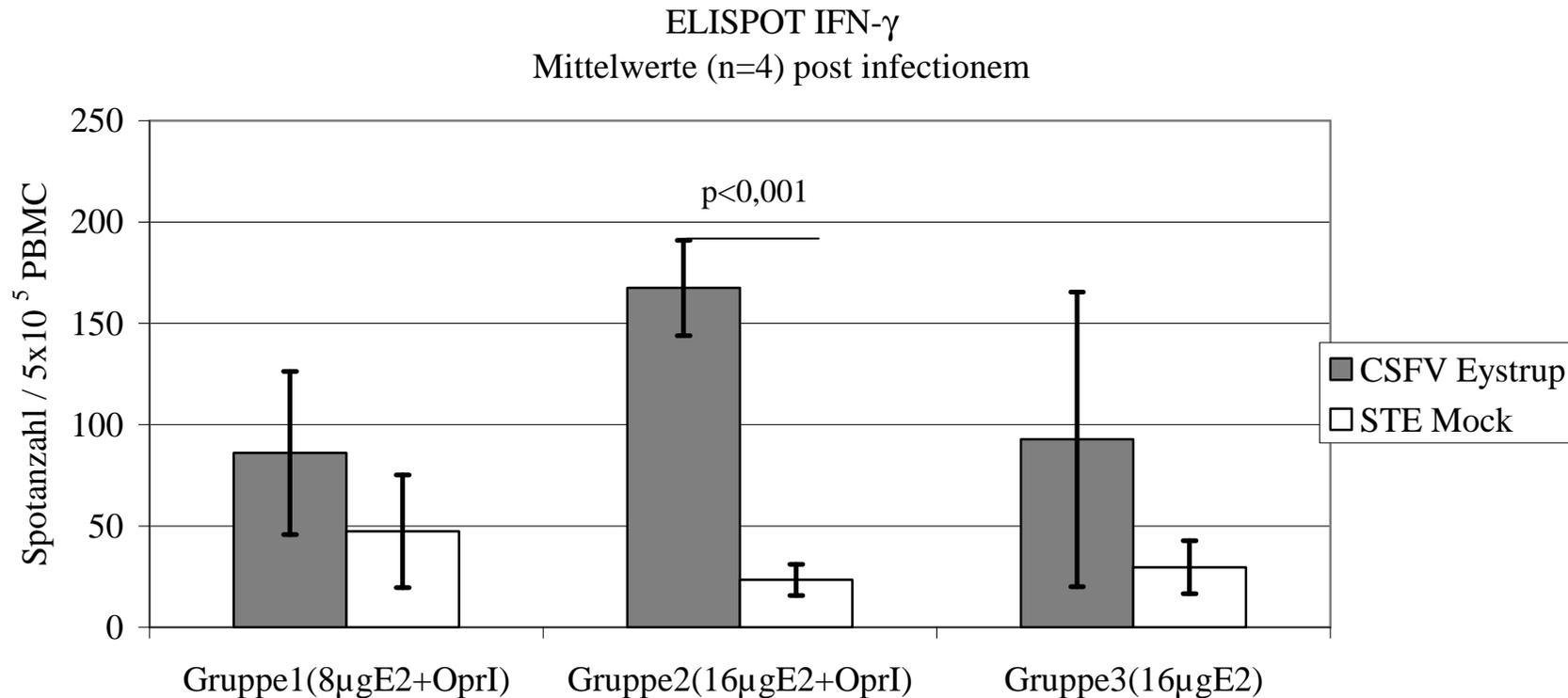


Abbildung 4.19: Vergleich der IFN- γ produzierenden Zellen in den PBMC der Impflinge nach der Belastungsinfektion

Am Tag 7 nach der Belastungsinfektion wurden Vollblutproben der Tiere aller Gruppen (je n=4) entnommen und aus ihnen die PBMC gewonnen. Diese wurden im ELISPOT auf das Vorliegen IFN- γ produzierender Zellen untersucht. Angegeben sind die Mittelwerte der Spotzahlen / 5×10^5 PBMC \pm der einfachen Standardabweichung für die jeweilige Gruppe. Die Zusammensetzung des Impfstoffes ist in Klammern angegeben. Nur bei Tieren in Gruppe 2 lag ein hoch signifikanter Unterschied zwischen den Spotzahlen nach CSFV- bzw. Mock-Stimulation vor ($p < 0,001$). Die Signifikanzberechnung erfolgte mit dem *Student's t-Test*.

Ergebnisse

Verlauf nach der Belastungsinfektion

Am Tag 20 nach der Auffrischungsimpfung wurden alle Impflinge mit einer Dosis von 5×10^5 KID₅₀ des virulenten CSFV-Stammes Eystrup intranasal infiziert. Am darauf folgenden Tag wurde in jeden Stall zum Monitoring der CSFV-Ausscheidung ein Tier hinzustellen. Während Gruppe 1 und Gruppe 2 mit einem nicht geimpften Tier überwacht wurden, war das Schwein, das zu Gruppe 3 verbracht wurde, mit dem Lebendimpfstoff Pestiffa[®] immunisiert worden und wies geringe Titer neutralisierender Antikörper sowie eine, über IFN- γ messbare, zellvermittelte Immunantwort gegen CSFV am Tag der Zustallung auf. An jedem Tag wurden die Tiere klinisch untersucht und die Körpertemperatur gemessen. In allen Tiergruppen kam es zum Auftreten von Fieber (Abb. 4.20). Während die Tiere der Gruppe 2 und zwei der Tiere der Gruppe 1 sich erholten, blieben die restlichen febril und mussten aus tierschutzrechtlichen Gründen getötet werden.

In Gruppe 1 und 3 zeigten die Tiere Diarrhoe, bei den schwerkranken Tieren gesellten sich noch Apathie und Paresen hinzu. Am Tag 6 post infectionem (p.i.) mussten zwei Mitglieder der Gruppe 3 und eines der Gruppe 1 mit schweren klinischen Symptomen euthanasiert werden. Am Tag 7 mussten die übrigen Tiere der Gruppe 3 getötet werden. Am Tag 16 wurde der Versuch durch Tötung aller Tiere, bis auf zwei Mitglieder der Gruppe 2, beendet. An den Tagen 7 und 10 p.i. wurden die Leukozytenfraktion auf das Vorliegen von Virus in der Ko-Kultivierung untersucht; negative Ergebnisse wurden mit Hilfe der diagnostischen RT-PCR überprüft. Ebenso wurde mit den post mortem entnommenen Proben der Milz vorgegangen. Die Ergebnisse der Virusnachweise sowie die Tötungstage der Tiere sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

Trotz des relativ milden Verlaufs der Krankheit bei den Schweinen in Gruppe 2 erkrankte die Zustallkontrolle hier genauso wie die der Gruppe 1. Beide Tiere zeigten Diarrhoe, Anorexie und Apathie und es konnte sowohl eine Virämie als auch post mortem Virus in der Milz nachgewiesen werden. Erstaunlich war, dass die Zustallkontrolle der Gruppe 3 trotz der einmaligen Immunisierung mit dem Lebendimpfstoff ebenfalls klinische Symptome der klassischen Schweinepest, vor allem intermittierendes Fieber, zeigte. Entgegen der Erwartung konnte kein Anstieg der neutralisierenden Antikörpertiter nachgewiesen werden. Während in der Ko-Kultivierung in den Proben dieses Schweines kein Virus nachweisbar war, detektierte die RT-PCR virale Nukleinsäure in der Leukozytenprobe des Tages 10 p.i. Diese höhere Sensitivität der RT-*nested* PCR gegenüber dem kulturellen Virusnachweis wurde von Paton et al. (2000) beschrieben.

Ergebnisse

Somit konnte in diesem Versuch eine Milderung der klinischen Symptome aber keine sterile Immunität und keine Verhinderung der Virusausscheidung durch die Verabreichung des L-OprI mit einer suboptimalen Dosis E2-Antigen gezeigt werden. Interessant war, dass auch eine einmalige Immunisierung mit dem Lebendimpfstoff Pestiffa[®] nicht vor der Ansteckung mit dem CSFV schützte.

Tabelle 4.1: Virusnachweis aus Proben der Impflinge

Tiernummer	Virämie		Virus in der Milz Post mortem	Tag der Euthanasie
	d.7 p.i.	d.10 p.i.		
Gruppe 1 (8µg E2+ OprI)				
43	+	n.d.	+	6 p.i.
44	+	-	-	13 p.i. *
46	+	n.d.	+	7 p.i.
61	+	n.d.	+	6 p.i.
Gruppe 2 (16µg E2+OprI)				
40	-	-	n.d.	n.d.
57	-	-	-	13 p.i. *
60	-	-	n.d.	n.d.
62	+	-	-	13 p.i. *
Gruppe 3 (16µg E2)				
58	+	n.d.	+	7 p.i.
64	+	n.d.	+	6 p.i.
65	+	n.d.	+	6 p.i.
70	+	n.d.	+	7 p.i.

An den Tagen 7 und 10 post infectionem (p.i.) wurde aus Vollblut der Tiere die Leukozytenfraktion isoliert und auf das vorliegen vermehrungsfähigen Virus durch Ko-Kultivierung untersucht. Negative Befunde wurden mit Hilfe der diagnostischen RT-PCR überprüft. Positive Befunde sind mit einem +, negative mit einem - gekennzeichnet. Die Zusammensetzung des Impfstoffes ist bei den Gruppen in Klammern angegeben. Der Zeitpunkt der Tötung der Tiere ist ebenfalls angegeben. Die an Tag 13p.i. geschlachteten Tiere zeigten keine klinischen Symptome der klassischen Schweinepest mehr, was durch * gekennzeichnet ist. Die Tiere 40 und 60 wurden über einen längeren Zeitraum beobachtet, weswegen keine post mortem Diagnose durchgeführt wurde (n.d.).

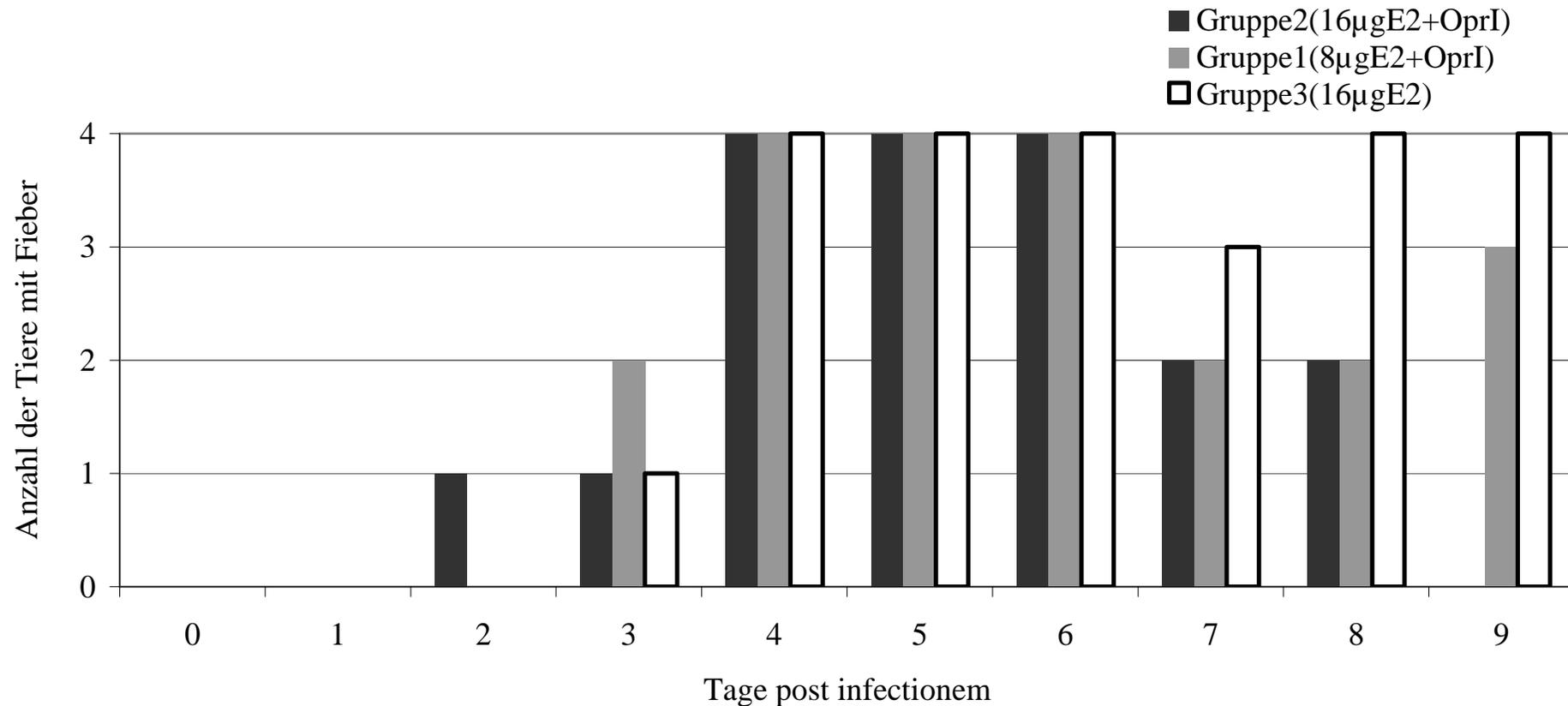


Abbildung 4.20: Körpertemperaturentwicklung der Impflinge nach der Belastungsinfektion

Nach der Belastungsinfektion wurde jeden Tag die Körpertemperatur der Tiere durch rektale Messung ermittelt. Dargestellt ist die Anzahl der geimpften Tiere pro Gruppe, die am jeweiligen Tag eine Temperatur von 40°C oder > aufwiesen. Die Zusammensetzung des Impfstoffes ist in der Legende in Klammern angegeben. Tiere, die bereits euthanasiert werden mussten, sind hierbei ebenfalls als positiv gewertet. Während es bei Gruppe1 und Gruppe2 zur Erholung einiger Tiere im Versuchsverlauf kam, mussten alle Tiere der Gruppe3 mit Fieber getötet werden.

4.2.4 Immunisierung mit dem Nicht-Struktur-Protein NS3

Im Rahmen der „Subunit“ Immunisierungen sollte untersucht werden, in wie weit eine Immunisierung mit dem NS3 Protein allein eine protektive Immunantwort gegen eine CSFV Infektion auslösen kann. Das zur Immunisierung benutzte NS3 „Subunitprotein“ (von D. Wienhold freundlicherweise zur Verfügung gestellt) wurde in *Escherichia coli* exprimiert und mittels Vakuumdialyse aufgereinigt. Seine Spezifität wurde im Western Blot mit den monoklonalen Antikörpern C16 nachgewiesen (Peters et al.; 1986; Greiser-Wilke et al.; 1991). Vier Schweine der Rasse MMS wurden mit diesem Protein dreimal i. m. geimpft. Bei der Erstimpfung am Tag -66 wurden 4 µg Protein 1:1 gemischt in komplettem Freund'schen Adjuvans appliziert. Die Zweitimmunisierung am Tag -45 und Drittimpfung am Tag -14 wurden mit jeweils 2 µg NS3 durchgeführt. Während das Protein bei der Zweitimpfung zusammen mit inkomplettem Freund'schen Adjuvans verabreicht wurde, verzichtete man bei der dritten Immunisierung auf Hilfsstoffe. 14 Tage nach der dritten Applikation, am Tag 0, wurde eine Belastungsinfektion mit 5×10^5 KID₅₀ des hochvirulenten CSFV Stammes Eystrup intranasal durchgeführt.

Antikörperbildung nach der Immunisierung mit dem NS3 Protein

Zur Bestimmung der Spezifität der induzierten Antikörper wurde eine Western Blot - Analyse mit den Seren der Tiere vom Tag der Infektion durchgeführt. Hierzu wurden PK-15 Zellen in einer MOI~1 mit CSFV infiziert und nach 24h lysiert. Die Proteine der infizierten und von nicht infizierten PK-15 Zellen wurden mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und mit den Seren der geimpften Schweine als Primärantikörper inkubiert. Da das NS3 in den verschiedenen Biotypen der Pestiviren unterschiedlich vorliegt, wurden sowohl mit dem ncp CSFV-Stamm Eystrup als auch mit dem cp CSFV-Stamm Lothringen infizierte Zellen verwendet.

Während vor der Impfung keines der Tiere NS3 reaktive Antikörper aufwies, konnten nach der 3. Impfung in den Seren aller 4 Schweine Antikörper gegen das Protein nachgewiesen werden. Diese waren spezifisch für das ca. 120kd schwere NS2-3 Fusionsprotein des ncp-Stammes, bzw. für das ca. 90kd schwere NS3 des cp-Stammes (Abb.4.21).

Zur Quantifizierung der NS3-bindenden Antikörper wurde mit den Seren ein Antikörper-ELISA durchgeführt. Die Seren wurden auf ELISA-Platten getestet, die mit in *E. coli* exprimiertem NS3 beschichtet worden waren. Da es sich hierbei um ein ubiquitäres Bakterium

Ergebnisse

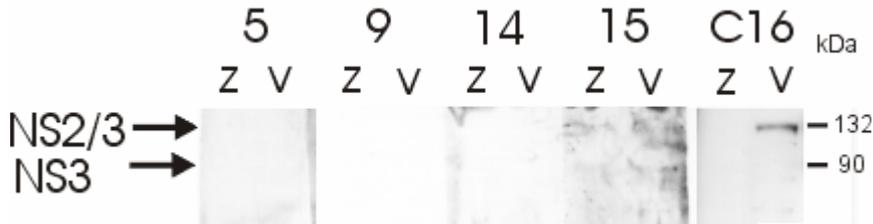
handelt und mit dem gleichen Material immunisiert wurde, musste eine Bindung von Antikörpern, die gegen bakterielle Antigene gerichtet sind zur Vermeidung starker Hintergrundreaktionen, verhindert werden. Um solche störenden Antikörper aus den Seren zu entfernen, wurden sie 1h bei 37°C mit *E. coli* Lysat präabsorbiert, entstandene Antigen-Antikörperkomplexe pelletiert, und nur der Überstand in die ELISA-Platte überführt.

Auch wenn es individuelle Unterschiede gab, konnten nach der ersten Auffrischungsimpfung NS3-spezifische Antikörpertiter in den Seren aller Tiere bestimmt werden. Die dritte Immunisierung ließ diese Antikörpertiter nochmals ansteigen, wobei sich die intraindividuellen Unterschiede noch stärker manifestierten (Abb.4.22).

Der Anteil der Antikörper, die neutralisierende Potenz besitzen, wurde im Neutralisations-Test auf PK-15 Zellen mit anschließender immunhistochemischer Detektion virusinfizierter Zellen bestimmt. Obwohl, wie im Western Blot und ELISA gezeigt, NS3 spezifische Antikörper durch die Immunisierung generiert wurden, konnten zu keinem Zeitpunkt vor oder nach der Impfung bzw. nach der Infektion ncp CSFV-neutralisierende Antikörper nachgewiesen werden.

Ergebnisse

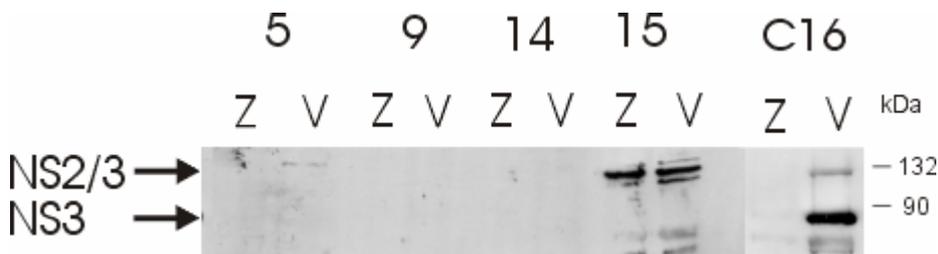
A1 CSFV ncp prä vaccinationem



A2 CSFV ncp post 2. boost



B1 CSFV cp prä vaccinationem



B2 CSFV cp post 2. boost

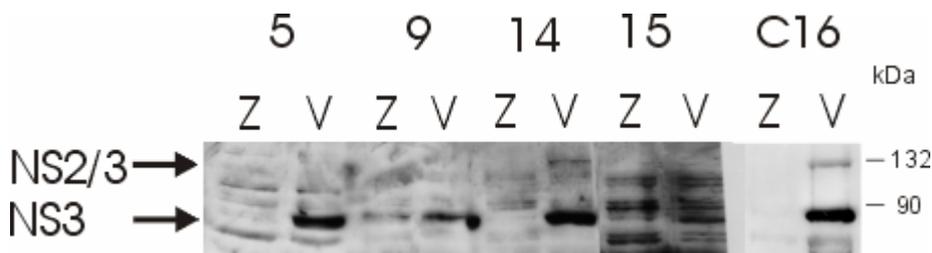


Abbildung 4.21: Nachweis NS3-spezifischer Antikörper mittels Western Blot Analyse

Seren der Impflinge (5; 9; 14; 15) vor der ersten Immunisierung (A1; B1) und nach der dritten Immunisierung (A2; B2) wurden im Western Blot auf ihre Reaktivität mit Zelllysaten von nicht infizierten PK-15 Zellen (Z) und CSFV infizierten PK-15 Zellen (V) analysiert. Der Test wurde sowohl mit dem nicht zythopathogenen CSFV Stamm Eystrup (A) als auch mit dem zythopathogenen CSFV Stamm Lothringen (B) durchgeführt. Als Positivkontrolle wurden jeweils die NS3 spezifischen monoklonalen Antikörper C16 (C16) mit eingesetzt. Alle Tiere zeigen nach der Immunisierung Antikörper, die bei dem nicht zythopathogenen mit NS2-3 bzw. dem NS3 des zythopathogenen CSFV Stammes reagierten.

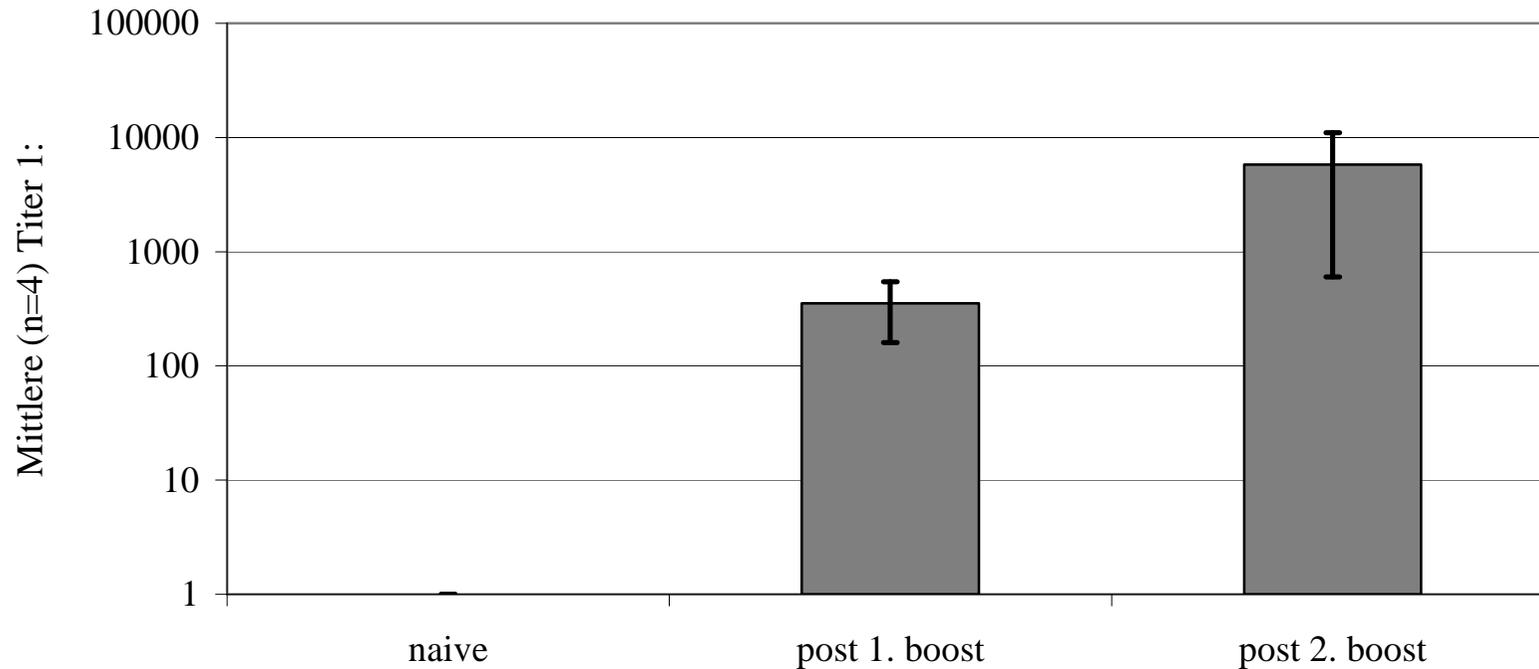


Abbildung 4.22: NS3-spezifischer-Antikörper-ELISA

Die Seren der NS3 Impflinge (n=4) wurden zu verschiedenen Zeitpunkten vor der Impfung (naive) und nach der ersten (post 1. boost) und zweiten (post 2. boost) Auffrischungsimpfung gewonnen. Die Seren wurden im ELISA auf NS3-reaktive Antikörper getestet. Als Titer ist der reziproke Wert der Verdünnung angegeben, bei dem das Serum noch eine optische Dichte oberhalb des „Cut off“ ergab. Dargestellt ist der Mittelwert der Antikörpertiter \pm der einfachen Standardabweichung

Ergebnisse

IFN- γ Produktion nach der Immunisierung mit dem NS3 Protein

Als Parameter für die zellvermittelte Immunantwort gegen das CSFV wurde erneut die IFN- γ Produktion der PBMC getestet. Hierzu wurden zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach den Impfungen sowie nach der Belastungsinfektion PBMC der Tiere im IFN- γ -ELISPOT unter in vitro CSFV Stimulation bzw. Restimulation untersucht. Es wurde erneut die Anzahl der Zellen detektiert, die auf virale Stimulation das Zytokin produzieren. Als CSFV-spezifisch wurden die Spotzahlen festgelegt, die deutlich über der nach Mock Stimulation entstandenen Spotzahl lag. Die Induktion signifikanter Zahlen CSFV-spezifischer, IFN- γ produzierender PBMC ($p < 0,005$) konnte bereits nach der zweiten Injektion nachgewiesen werden (Abb. 4.23). Obwohl noch nach der nächsten Auffrischungsimpfung ein weiterer Anstieg dieser Zellpopulation zu beobachten war, reduzierte sich ihre Zahl wieder nach der Belastungsinfektion bei den klinisch kranken Tieren (Abb. 4.23).

Verlauf nach der Belastungsinfektion

In Folge der intranasalen Belastungsinfektion mit 5×10^5 KID₅₀ des hochvirulenten CSFV-Stammes Eystrup entwickelten die Tiere nach einer Inkubationszeit von 5 Tagen Fieber. Im weiteren Verlauf bis hin zum Tag 9 post infectionem (p. i.), an dem die Tiere auf Grund der schweren klinischen Symptomatik euthanasiert werden mussten, wurden Diarrhöe, Anorexie, Inkoordination und vor allem Apathie beobachtet. Die Ausprägung der Krankheitssymptome bei den Impfungen unterschied sich nicht von denen, die ein ungeimpftes, naives, aber identisch infiziertes Kontrolltier zeigte.

IFN- γ ELISPOT
Mittelwerte (n=4)

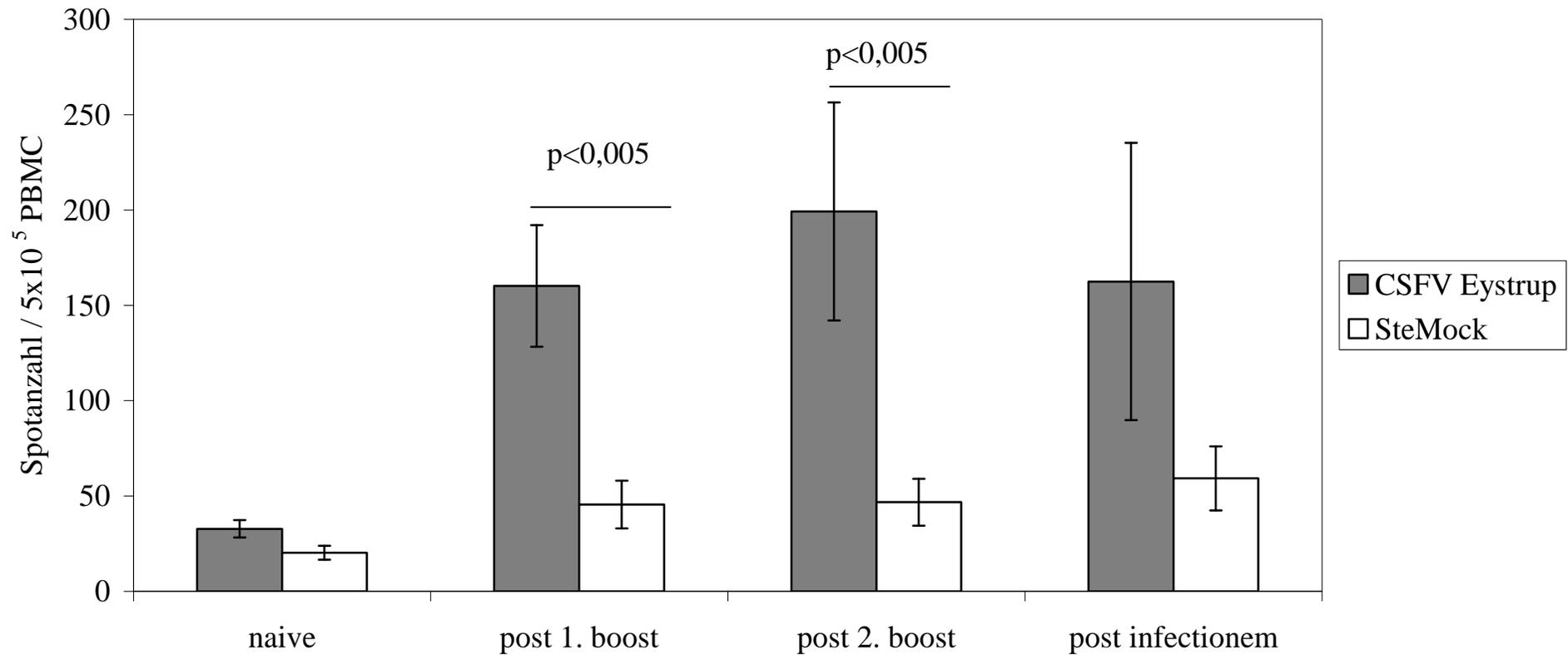


Abbildung 4.23: IFN- γ produzierende Zellen nach der Immunisierung mit dem NS3 Protein

Die PBMC der NS3 Impflinge (n=4) wurden zu verschiedenen Zeitpunkten vor der Impfung (naive) und nach der ersten (post 1. boost) und zweiten (post 2. boost) Auffrischungsimpfung sowie nach der Belastungsinfektion (post infectionem) im IFN- γ spezifischen ELISPOT untersucht. Gezeigt sind die Mittelwerte der Spotanzahlen nach CSFV Stimulation (grau) bzw. Mock Stimulation (weiß) an den jeweiligen Zeitpunkten \pm der einfachen Standardabweichung.

Die Signifikanz der Unterschiede der beiden Stimulationen wurde mit dem *Student's t-Test* bestimmt.

Ergebnisse

Virus-Reisolierung aus infizierten Tieren

Um die Auswirkungen der Infektion über das klinische Bild hinaus zu untersuchen, wurden am Tag 5 p. i. und Tag 7 p. i. Blutproben der Tiere entnommen. Aus diesen wurde die Leukozytenfraktion isoliert und mittels Ko-Kultivierung auf das Vorliegen von vermehrungsfähigen CSFV untersucht. Ebenso wurden Proben der Milz, die bei der Sektion entnommen worden waren, analysiert.

Alle geimpften Schweine sowie das Kontrolltier, waren an beiden Blutentnahmetermenen virämisch und es konnte auch in der Milz post mortem Virus nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Hiermit konnte eine produktive CSFV Infektion mit Ausbreitung auf dem Blutweg bestätigt werden.

Die alleinige, dreimalige Immunisierung mit dem CSFV „Subunit“ Protein NS3 führte nicht zur Bildung CSFV-neutralisierender Antikörper, induzierte aber bereits nach der zweiten Applikation virusspezifische IFN- γ produzierende Lymphozyten. Ein Schutz vor letaler Belastung mit dem CSFV Stamm Eustrup konnte selbst nach dreimaliger Impfung nicht erzielt werden.

5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Herstellung und Charakterisierung der immunisierenden Eigenschaften eines neuen Parapockenvektorimpfstoffes gegen die CSF. Die Forderungen an neue Impfstoffe gegen CSF sind hoch:

- a) es soll die induzierte Immunantwort vergleichbar sein mit der des bekannten Lebendimpfstoffes auf der Basis des attenuierten CSFV Stammes „Chinese“.
- b) Der Impfstoff soll die Unterscheidung geimpfter und natürlich infizierter Tiere ermöglichen (Markervakzine).

Aus diesen Gründen sollte auch die Forderung nach schnellem postvakzinalen Schutzeintritt im Falle einer „Interventionsimpfung“ geprüft werden. Neben der Analyse bedeutender immunologischer Parameter wurde letztlich als praxisrelevantes Qualitätskriterium der neuen Versuchsvakzine der Schutz vor einer letalen Belastungs-infektion mit dem CSFV klinisch und immunologisch überwacht.

Die adaptive Immunantwort nach Infektion mit CSFV

Unter den Virusisolaten des CSFV sind unterschiedliche Virulenzgrade ausgeprägt. Die Virulenzunterschiede zeigen sich nicht nur in der klinischen Verlaufsform der Krankheit, sondern auch in ihrer histopathologischen Ausprägung. Zwar ist die Organverteilung des Virus vergleichbar, jedoch ist der Grad der ausgelösten Gewebsschädigung bei schwach virulenten Stämmen weitaus geringer ausgeprägt (Narita et al.; 2000). Der genaue Mechanismus, der die Virulenz bestimmt, ist noch nicht endgültig entschlüsselt. Bislang gibt es Ergebnisse, die Mutationen speziell in den Glykoproteinen E_{RNS} und E2 als Determinanten der Virulenz beschreiben (van Gennip et al.; 2004).

Für die postnatale Infektion mit dem CSFV sind je nach Konstitution des Wirtes und Virulenz des Erregers eine perakute, eine akute und eine chronische Verlaufsformen beschrieben (Moennig et al.; 2003). So kann es in Folge der Infektion mit einem hoch virulenten Erreger zum perakuten Versterben des Tieres ohne messbare Immuninduktion kommen. In einigen Fällen, vor allem nach Infektion mit schwach virulenten CSFV Stämmen kann es auch zum chronischen Verlauf der Erkrankung kommen. Die Tiere zeigen intermittierende Krankheitsschübe mit Fieber und Enteritis. Hieraus resultieren Auszehrung und Tod der

Diskussion

Tiere. Über den kompletten Krankheitsverlauf ist Virus im Blut der Tiere nachweisbar und wird wahrscheinlich auch ausgeschieden, was eine weite Verbreitung ermöglicht (Handel et al.; 2004; Choi und Chae; 2003). Bei dieser Verlaufsform wird nur eine unzureichende Immunität ausgebildet. Bei der Infektion älterer Tiere und/oder der Infektion mit schwach virulenten CSFV-Stämmen kommt es dagegen zu einer kurzen akuten oder subklinischen Infektion, in deren Verlauf eine starke zellvermittelte wie humorale Immunität ausgebildet wird.

Bereits in den ersten Tagen nach der Infektion CSFV-naiver Tiere kommt es zur Reduktion aller Lymphozytenpopulationen im peripheren Blut. Extrem sind die CD4+, CD8- naiven T-Helferzellen hiervon betroffen (Summerfield et al.; 2001). Überdies ist die Reduktion der B-Lymphozyten nicht nur im Blut, sondern auch in den lymphatischen Organen beschrieben (Susa et al.; 1992). Als Ursache für die Apoptose der Lymphozyten werden das sezernierte, virale Glykoprotein E_{RNS} (Bruschke et al.; 1997), sowie vom Virus induzierte zelluläre Faktoren wie TNF- α diskutiert (Choi et al.; 2004). Durch den Mangel an Lymphozyten ist die Ausbildung einer adaptiven Immunantwort kurz nach der Infektion nahezu ausgeschlossen. Während es bei der Infektion mit hochvirulenten CSFV Stämmen zu einer stetigen Lymphozyten-Reduktion bis zum Todestag kommt, steigen die Lymphozytenzahlen bei Infektion mit einem schwach virulenten Stamm nach einiger Zeit wieder an (Summerfield et al.; 2001). Dadurch ist die Ausbildung einer viruspezifischen Immunität auf quantitativ ausreichender, zellulärer Basis wieder möglich.

Sowohl nach überlebter Infektion als auch nach der Immunisierung mit einem CSFV-Lebendimpfstoff sind neutralisierende Antikörper in den Seren der Tiere nachweisbar. Ebenso können in den PBMC CSFV-spezifische IFN- γ produzierende Zellen (Suradhat et al.; 2001; Piriou et al.; 2003) und zytotoxische T-Lymphozyten nachgewiesen werden (Piriou et al.; 2003).

Neben diesen Beobachtungen in infektionsimmunen Tieren nach überstandener Krankheit ist auch ein Anstieg der unspezifischen Lyse syngener Zellen durch die PBMC nicht immuner CSFV-infizierter Tiere bekannt (Pauly et al.; 1996). Dieser noch ungeklärte Umstand zeigt die Wichtigkeit einer adäquaten, tierspezifischen Negativkontrolle bei der Bestimmung zellvermittelter Immunreaktionen im CSFV-System. Während der viruspezifische Anteil der zytotoxischen Zellen innerhalb der porcinen PBMC das Oberflächenantigen CD6 trägt, sind die Effektoren der unspezifischen Lyse syngener Zellen CD6 negativ (Pauly et al.; 1996). Inwieweit diese Abgrenzung auch für die IFN- γ produzierenden Zellen möglich ist, wurde durch die CD6 Depletion der PBMC vor der Durchführung des IFN- γ spezifischen ELISPOT

untersucht. Weil nach der Entfernung der CD6 + Zellen aus den PBMC hochimmuner Tiere die Spotzahlen nach CSFV-Re-Stimulation das gleiche Niveau der Mock stimulierten Zellen aufwies, konnte gezeigt werden, dass die virusspezifischen Produzenten des IFN- γ größtenteils in der CD6 + Fraktion der PBMC lokalisiert sind (vgl. Abschnitt 4.2; Abb. 4.7). Das porcine Oberflächenantigen CD6 wird auf reifen T-Lymphozyten mit dem α/β -T-Zellrezeptor ko-exprimiert (Pauly et al.; 1996). Somit bestätigen diese Ergebnisse die Aussagen von Rodriguez-Carreno et al. (2002), die in der Durchflußzytometrie zeigen konnten, dass die Majorität der auf Stimulation hin IFN- γ sezernierenden Zellen den α/β T-Zellrezeptor tragen.

Das Glykoprotein E2 des CSFV als Induzent von Immunreaktionen

Die Bedeutung neutralisierender Antikörper als wichtiger Bestandteil einer soliden Immunität gegen CSF ist unbestritten (Piriou et al.; 2000). Die hier erarbeiteten Ergebnisse unterstreichen die Wichtigkeit der Induktion neutralisierender Antikörper als sicheren prognostischen Parameter für die Immunität gegen das CSFV. Allerdings sind nicht messbare neutralisierende Antikörpertiter gegen CSFV nicht ausschlaggebend für einen fehlgeschlagenen Immunschutz, z.B. nach Impfung mit der attenuierten Lebendvakzine (C-Stamm) (Suradhat et al.; 2001). Um nach der Infektion schnell die Bildung neutralisierender Antikörper in „geprimten“, aber eventuell noch seronegativen Tieren zu induzieren, sollte ein Interventionsimpfstoff deshalb, neben der schnellen Aktivierung zellvermittelter Abwehrmechanismen, auch die Bildung neutralisierender Antikörper verursachen.

Als Kandidat für eine neue vektorexprimierte CSFV „Subunit“ Komponente wurde, wie schon im Baculovirus-Expressionssystem, das Glykoprotein E2 ausgewählt. Dieses virale Glykoprotein ist das Hauptziel der Antikörperantwort gegen CSFV. E2 enthält Epitope CSFV- neutralisierender Antikörper (Weiland et al.; 1990). Überdies stimulieren Peptide des E2 Glykoproteins PBMC CSFV-immuner Schweine zur Proliferation (Armengol et al.; 2002). Im BVDV-System wurden CD4+ T-Zellen immuner Tiere neben NS3 auch von E2 zur Proliferation stimuliert (Collen und Morrison; 2000). Über diese Erkenntnisse aus infektionsimmunen Tieren hinaus, konnte in mehreren experimentellen Ansätzen zumindest ein partieller Schutz gegen klinische Symptome der klassischen Schweinepest durch die Applikation von E2-Subunit-Vakzinen erzeugt werden. Die Injektion von Baculovirus-exprimiertem Glykoprotein E2 induziert zwar neutralisierende Antikörper, kann aber die horizontale und vertikale Erregerstreuung nicht vollständig verhindern (Dewulf et al.; 2001).

Diskussion

Bei der Applikation E2-kodierender Plasmid-DNA können erst nach mehrmaliger Applikation neutralisierende Antikörper gemessen werden (Andrew et al.; 2000; Wienhold; 2002). Die Verwendung verschiedener viraler Vektorsysteme, die im Schwein replizieren können, erscheint wegen der potentiellen Ausscheidung des Impfvectors und daraus folgenden Sicherheitsbedenken ungeeignet (König et al.; 1995; Hooft van Iddekinge et al.; 1996; Hammond et al.; 2000; Hahn et al.; 2001). Die Verabreichung von Peptiden des E2 führte selbst nach zweimaliger Injektion nicht zu einem vollen klinischen Schutz (Dong et al.; 2002). In all diesen Versuchen wurde die Aktivierung der zellvermittelten Immunität nicht untersucht. Es ist aber bekannt, dass rekombinante Vacciniaviren nach einmaliger Verabreichung einen partiellen Schutz gegen CSFV vermitteln (König et al.; 1995). Elahi et al. (1999) konnten in Mäusen durch die Immunisierung mit einem BVDV-E2 exprimierenden Hühnerpockenvirus neutralisierende Antikörper und Zellen, die auf BVDV-Stimulation IFN- γ produzierten, induzieren. Dies waren ermutigende Impulse zur Entwicklung der ORFV D1701VrVE2 Vektorvakzine und ihrer Prüfung im Schwein.

Expression des Glykoprotein E2 durch das rekombinante Parapoxvirus ORFV D1701VrVE2

Um den durch das Glykoprotein E2 vermittelten Schutz zu optimieren, suchte man nach Möglichkeiten, neben der Stimulation der Antikörperbildung auch die Aktivierung der zellvermittelten Immunreaktion bei der Immunisierung mit diesem Virusprotein effektiv zu gestalten. Eine Möglichkeit, eine Subunit-Vakzine zu entwickeln, die die zellvermittelte Immunantwort aktiviert, ist die Herstellung rekombinanter Viren. In diesem Zusammenhang oft verwendete Viren sind die Mitglieder der Familie *Poxviridae*.

Charakterisierung des rekombinanten Parapoxvirus ORFV D1701VrVE2

Aufgrund der postulierten hohen Sicherheit bei der Anwendung im nicht permissiven Wirtstier Schwein und der andererseits für diese Tierart beschriebenen immunstimulatorischen Eigenschaften des Parapoxvirus ovis (Büttner et al.; 1995b; Fachinger et al.; 2000a; b), wurde das für das E2 Glykoprotein kodierende Gen des CSFV Stammes Alfort 187 in das Genom des hochattenuierten Parapox-Impfvirus ORFV D1701 (Mayr et al.; 1981) eingesetzt. Als Zielort für die Insertion wählte man den vegf-e Genlokus des Parapoxvirus. Dieses nicht essentielle Gen von ORFV D1701 konnte durch die Reportergene *lacZ* und *xgpt* ersetzt werden. Dies führte zu ORFV D1701VrV (Henkel; 1997). Diese Deletionsmutante ist selbst für das permissive Wirtstier avirulent (Rziha et al.; 1999; 2000).

Diskussion

Die Mitglieder der *Poxviridae* sind in der Lage, in viele verschiedene Zelltypen einzudringen. Es wird eine Anlagerung an die Zelle über viruskodierte Rezeptoren für Glukosaminoglykane diskutiert. Für das Genus Parapoxvirus wird ein Rezeptor für das Glukosaminoglykan Heparinsulfat, das ubiquitär auf Zelloberflächen angetroffen wird, postuliert (Scagliarini et al.; 2004) Nach der Penetration werden Genprodukte der Pockenviren auch in nicht permissiven Zellen produziert (Sutter und Moss; 1992). Dementsprechend konnte die *in-vitro* Synthese des Glykoproteins E2 nach Infektion mit ORFV D1701VrVE2 sowohl in permissiven, als auch in nicht permissiven, porcinen Zellen, mittels Immunhistochemie und in der Western Blot Analyse mit den E2-spezifischen, monoklonalen Antikörpern a18 gezeigt werden (vgl. Abschnitt 4.1; Abb. 4.3).

Die *in-vivo* Expression und Produktion des Glykoprotein E2 konnte indirekt über die Bildung E2 spezifischer Antikörper nach der Immunisierung CSFV-naiver Schweine nachgewiesen werden (vgl. Abschnitt 4.2.2).

Die Sicherheit der Anwendung des rekombinanten Virus ORFV D1701VrVE2 im Schwein wurde ebenfalls nachgewiesen. Nach keiner der Applikationen kam es zur negativen Beeinflussung des Allgemeinbefindens der Impflinge. Selbst das Nachvollziehen des natürlichen Infektionsweges durch Aufbringen des Virus auf die verwundete Haut, führte weder im Schwein noch im Schaf zu parapoxspezifischen Läsionen (vgl. Abschnitt 4.1. Abb. 4.4).

Im natürlichen Wirt, dem Schaf, kommt es während der Erkrankung nicht zu einer Ausbreitung auf dem Blutweg (Robinson und Lyttle; 1992). Zur Überprüfung einer Virämiephase im Schwein, wurde eine sehr hohe Dosis der Rekombinante zwei Schweinen i.v. injiziert. Bereits 16h nach dieser Injektion war keine virale DNA mehr in den Leukozyten der Tiere mit einer diagnostischen *seminested*-PCR nachweisbar (vgl. Abschnitt 4.1). Diese Beobachtung zusammen mit der Tatsache, dass es *in-vitro* nicht zu einer produktiven Virusvermehrung in porcinen Zellen kommt, führt zu der Annahme, dass die Injektion des Virus nur zur Infektion direkt getroffener Zellen führt. In diesen werden offensichtlich virale Gene, unter ihnen das inserierte Fremdgen E2, exprimiert. Diese „Trefferinfektion“ löst dann die Immunreaktion aus. Da es bei Orthopockenviren im nicht permissiven System nicht zur Bildung neuer infektiöser Partikel kommt (Sutter und Moss; 1992) liegt auch keine Generalisierung vor. Analog ist auch nach ORFV Applikation im Schwein eine Ausscheidung des rekombinanten Virus unwahrscheinlich. Tatsächlich konnten in den Seren von Tieren, die mit den Impflingen nach der i. m. Injektion im gleichen Stall gehalten wurden, keine E2 spezifischen Antikörper detektiert werden (vgl. Abschnitt 4.2.2.2).

Für das Schwein wurde eine immunmodulatorische Wirkung des Parapoxvirus ovis für vermehrungsfähiges (Büttner et al.; 1995b) wie auch inaktiviertes Virus nachgewiesen (Fachinger et al.; 2000a; b).

In der vorliegenden Arbeit wurde im Schwein untersucht, ob die vermehrungsfähige Rekombinante die für ORFV D1701 beschriebene Immunstimulation auslöst. Obwohl für das Parapoxvirus ovis ein Homolog des IFN-Resistenzgens E3L von Vaccinia virus beschrieben ist (McInnes et al.; 1998) konnte nachgewiesen werden, dass porcine PBMC auf parapoxvirale Stimulation IFN- α sezernieren. Die Zellkulturüberstände ORFV D1701VrVE2 exponierter PBMC besaßen antivirale Wirkung. Somit konnte eine Aktivierung angeborener Immunreaktionen für das replizierende Virus ORFV D1701VrVE2 *in-vitro* gezeigt werden (vgl. Abschnitt 4.1; Abb. 4.5 und Abb. 4.6).

Auch die Induktion von Serum IFN wurde *in-vivo* durch die i.v. Applikation von 10^9 KID₅₀ des rekombinanten Virus in zwei Schweinen untersucht. 16h nach dieser Injektion zeigten die Seren dieser Tiere antivirale Wirksamkeit gegen das VSV. Diese konnte als Typ I IFN-vermittelt charakterisiert werden, da sie sich als säureresistent erwies (vgl. Abschnitt 4.1).

Prime-Boost Immunisierung mit dem rekombinanten Parapoxvirus ORFV D1701VrVE2

Es wurden verschiedene Immunisierungsversuche mit dem rekombinanten Virus durchgeführt. Die Induktion der Immunantwort wurde auf zellulärer wie auch auf humoraler Ebene vor und nach der Belastungsinfektion mit dem hoch virulenten CSFV Stamm Eystrup untersucht.

Im Rahmen der Unschädlichkeitstests wurde die Applikation über die skarifizierte Schweinehaut vorgenommen. Die dermale Applikation nicht replizierender Pockenviren kann die humoralen wie auch die zellvermittelten Immunmechanismen aktivieren (Taracha et al.; 2003). Hier waren allerdings nach der Applikation von 10^8 KID₅₀ von ORFV D1701VrVE2 auf die skarifizierte Haut keine CSFV-neutralisierenden Antikörper nachweisbar. Bei dieser Art der Applikation kann die Zahl der infizierten Zellen geringer sein als nach i. m. Injektion. Ferner wurde die Effizienz der E2 Expression in der Haut nicht nachgewiesen. Die erfolgreiche Immunisierung des nicht permissiven Wirtes über die Haut wurde mit dem rekombinanten Parapoxvirus durch eine intradermale Zweitimmunisierung der vorher skarifizierten Tiere gezeigt, weil diese zur Bildung CSFV-neutralisierender Antikörper führte (vgl. Abschnitt 4.2.2.1).

Eine zweimalige i. m. Applikation des ORFV D1701VrVE2 führt meist schon nach Erstapplikation zur Bildung CSFV-neutralisierender Serumantikörper und nach der Zweit-

immunisierung immer zu einem Anstieg der Antikörpertiter. (vgl. Abschnitt 4.2.2.1; Abb. 4.8). Eine Inhibition der immunologischen Gedächtnisreaktion gegen das Fremdgen durch vektorspezifische Immunität, wie sie für rekombinante Orthopoxviren beschrieben ist (Gherardi et al.; 2004), war hier also nicht gegeben. Diese Beobachtung im nicht permissiven Wirt (Schwein) kann aus der Parapoxvirus-Infektion des natürlichen Wirtes (Schaf) geschlossen werden. Als Reaktion auf die Infektion kommt es zwar zu einer normalen adaptiven Immunreaktion auf zellvermittelter, wie auch auf humoraler Ebene (Jenkinson et al.; 1990; Haig et al.; 1996a; b; Anderson et al.; 2001). Im Gegensatz zu den Orthopoxvirus Infektionen werden jedoch kaum neutralisierende Antikörper gegen das Parapoxvirus gebildet (Buddle und Pulford; 1984).

Zwar waren in den PBMC der Impflinge keine signifikanten Anzahlen CSFV-spezifischer IFN- γ sezernierender Zellen nachweisbar, dennoch waren die Tiere vor der letalen Belastungsinfektion mit dem CSFV-Stamm Eystrup vor klinischen Symptomen der Krankheit geschützt.

„Prime only“ Immunisierung mit dem rekombinanten Parapoxvirus ORFV D1701VrVE2

Bei einer Interventionsimpfung sollte Schutz gegen eine Infektion mit dem CSFV nicht nur nach zweimaliger Immunisierung mit dem E2 exprimierenden rekombinanten ORFV vermittelt werden, sondern bereits durch einmalige Applikation erreicht werden. Aus Sicherheitsgründen fand ein nicht replizierendes Vektorsystem Verwendung. Für nicht replizierende Pockenviren ist eine geringere Immunogenität im Vergleich zu replizierenden Rekombinanten beschrieben (Andrew et al.; 1989). Deshalb galt es eine Immunisierungsstrategie zu finden, die eine möglichst schnelle und starke Aktivierung der Immunmechanismen auch ohne produktive Replikation des Virus bewirkt. Deshalb verabreichte man die Impfdosis in die tributären Gebiete verschiedener Lymphknoten („multi-site“). Die schnellere Immuninduktion durch diese „multi-site“ Applikation wurde im Menschen für die Impfung gegen Tollwut beschrieben (Warrel et al.; 1984; Madhusudana et al.; 2002). Im vorliegenden Modell konnten durch diese Verteilung von 10^7 KID₅₀ in zwei von drei Tieren bereits am Tag 17 nach der Impfung neutralisierende Antikörper nachgewiesen werden. In zwei gleichzeitig mit derselben Dosis in nur einen Muskel immunisierten Tieren, konnten zu diesem Zeitpunkt noch keine neutralisierenden Antikörper detektiert werden (vgl. Abschnitt 4.2.2.2; Abb. 4.10).

Der positive Effekt dieser Impfdosisverteilung lässt sich unter anderem mit dem Priming in verschiedenen Lymphknoten erklären. Auch bei der Immunisierung mit dem Lebendimpfstoff

kommt es durch die für diesen beschriebene *in-vivo* Vermehrung und Ausbreitung zur Stimulation in verschiedenen Immunkompartments (Lorena et al.; 2001). Da eine Vermehrung und Ausbreitung bei ORFV D1701VrVE2 im Schwein nicht vorliegt, sollte eine Applikation, die mehrere Lymphknoten erreicht, effizienter sein. Eine weitere Ursache für die bessere Immuninduktion nach „multi-site“ Injektion könnte darin bestehen, dass es zu einer höheren Zell-Trefferquote kommt. Da es bei der Infektion mit Pockenviren im nicht-permissiven Wirt nicht zur Bildung neuer, infektiöser Partikel kommt (Sutter und Moss; 1992), hängt die Menge Fremdanigen, die zur Immuninduktion führt, mit hoher Wahrscheinlichkeit von der Anzahl infizierter Zellen ab. Eine bessere Verteilung könnte also, über die Infektion einer größeren Anzahl Zellen, zu besserer E2 Expression und mehr produziertem Antigen führen. Dies könnte dann eine stärkere Immunantwort auslösen.

Obwohl sie keine CSFV-spezifischen IFN- γ produzierenden PBMC aufwiesen, waren die „multi-site“ Impflinge vor der Infektion mit dem CSFV Stamm Eystrup geschützt. Dies galt auch für das Tier, das am Tag der Belastungsinfektion keine messbaren neutralisierenden Antikörper aufwies. Auch die nur in einem Muskel („single-site“) geimpften Schweine zeigten keine klinischen Symptome der klassischen Schweinepest, jedoch stellte man bei ihnen eine zweitägige Fieberphase fest. Die geimpften Tiere zeigten nur eine transiente Reduktion der peripheren B-Lymphozyten nach der Infektion, während es bei dem erkrankten Kontrolltier zu einer stetigen Verminderung dieser Lymphozytenpopulation ohne Erholungstendenz kam (vgl. Abschnitt 4.2.2.2; Abb. 4.13). Diese positive Beeinflussung der B-Zellreduktion nach der Belastungsinfektion ist auch in Folge der Immunisierung mit der Lebendvakzine beschrieben (Piriou et al.; 2003). Diese Erholung von der B-Zellreduktion in Verbindung mit dem bereits erfolgten „Priming“ von B-Lymphozyten ermöglicht es wahrscheinlich den Tieren relativ schnell nach der Infektion neutralisierende Antikörper gegen das CSFV zu bilden und so die Infektion zu bekämpfen. Während bei den über die Impfdosisverteilung („multi-site“) geschützten Tieren die Anzahl der CSFV-spezifischen IFN- γ produzierenden PBMC anstieg, konnte in den PBMC der „single-site“ Impflinge nur eine größere Anzahl der unspezifisch IFN- γ produzierenden Zellen nachgewiesen werden (vgl. Abschnitt 4.2.1.2; Abb. 4.11). Eine ähnliche unspezifische Aktivierung wurde auch anhand der starken Lyse nicht infizierter, syngener Zellen durch Lymphozyten nach CSFV-Infektion beschrieben (Pauly et al.; 1996). Zusätzlich berichten Summerfield et al. (1998b) von einem aktivierten Phänotyp der T-Lymphozyten in nicht immunen CSFV-infizierten Schweinen. Ein weiteres Indiz für die kurzzeitige Etablierung der Belastungsinfektion in den „single-site“ Impflingen ist, dass ein, am Tag nach der Infektion zu ihnen gestelltes CSFV-

naives Tier, an CSF erkrankte. Es kann also von einer Erregerausscheidung dieser Tiere ausgegangen werden. Im Gegensatz hierzu kam es zu keiner Übertragung des Belastungsvirus durch die „multi-site“ immunisierten Tiere auf ihren zugestellten, naiven Stallgenossen. Selbst zwei Monate nach der Zustallung hatte dieses Kontrolltier keine CSFV-spezifischen Antikörper im Serum (vgl. Abschnitt 4.2.2.2). Aus diesem Pilotexperiment gehen Hinweise für die höhere Effektivität nicht replizierender Vektorimpfstoffe durch die Impfdosisverteilung („multi-site“ Applikation) hervor.

Als die Effektivität der „multi-site“ Immunisierung in Ploufragan, Frankreich, überprüft wurde, kam es jedoch zur Virustransmission auf CSFV-naive Schweine, sowohl in der ORFV D1701VrVE2 „multi-site“ geimpften Tiergruppe, als auch in der Kontrollgruppe, in der die Tiere mit der attenuierten Lebendvakzine geimpft worden waren. In diesem Versuch teilten die Zustallkontrollen mit den Impfungen am Tag der Belastungsinfektion den Stall und waren nur durch eine Holzbarriere von diesen abgetrennt. Deshalb besteht die Möglichkeit, dass die naiven Tiere nicht durch Virus, das von den Impfungen ausgeschieden wurde, sondern durch ein bei der intranasalen Belastungsinfektion entstandenes Aerosol infiziert wurden. Diese Art der Aerosol-Transmission innerhalb des Stallabteils wurde für das CSFV experimentell gezeigt (Dewulf et al.; 2000).

IFN- γ Produktion nach der Applikation von ORFV D1701VrVE2

Während der Infektion des natürlichen Wirtes wird eine IFN- γ Antwort gegen das Parapoxvirus ausgelöst. Diese konnte lokal durch *in-situ* Hybridisierung IFN γ -spezifischer mRNA in der Hautläsion des Schafes bei einer Re-Infektion gezeigt werden (Anderson et al.; 2001). Bei Re-Infektionen wurden ab dem ersten Tag vermehrt CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten in den afferenten Lymphbahnen, die die Läsion drainierten, gefunden. Ab Tag drei nach der Re-Infektion sezernieren diese Zellen *in-vitro* ohne weitere Stimulation IFN- γ (Yirrell et al.; 1991a; b; Haig et al.; 1992; 1996a; b). Die systemische Immunantwort im Schaf ist bislang nicht ausreichend untersucht.

Im porcinen System konnte die Induktion von IFN- γ *in-vitro* in naiven PBMC ab Tag drei nach der Stimulation mit inaktiviertem Parapoxvirus ovis gezeigt werden. Dies war jedoch nicht Ausdruck einer adaptiven Immunantwort gegen das Parapoxvirus, sondern wurde als Effekt eines viruseigenen „Superantigens“ charakterisiert (Fachinger et al.; 2000a).

Dennoch konnten weder nach der einmaligen Injektion von ORFV D1701VrVE2, noch durch eine homologe Auffrischungsimpfung direkt *ex-vivo* signifikante Anzahlen CSFV-spezifischer IFN- γ produzierender Zellen innerhalb der PBMC nachgewiesen werden (vgl. Abschnitt

4.2.2; Abb. 4.9 und 4.11). Eine geringe Frequenz fremdantigenspezifischer Zellen konnte abhängig vom exprimierten Fremdgen auch für rekombinante MVA-Vektoren gezeigt werden (Smith et al.; 2005). In diesem Zusammenhang könnte die hier angewandte ELISPOT-Methode nicht ausreichend sensitiv zur Detektion der wenigen gepimten Zellen sein, zumal hier immer adequate Mock-Kontrollen mitegeführt wurden.

Wie für die anderen Mitglieder der Familie der *Poxviridae* sind auch für das Genus Parapoxvirus einige zum Vorteil des Virus immunmodulierende Gene beschrieben (Haig und McInnes; 2002). Über die Wirksamkeit dieser Faktoren im nicht permissiven Wirt ist bislang wenig bekannt. Da sie jedoch oftmals große Homologien zu Genen der Wirtsspezies aufweisen wird postuliert, dass sie im Verlauf der Ko-Evolution aus dem Genom des Wirtes in das Genom des Pockenvirus übergegangen sind (Nash et al.; 1999). Dies würde für eine hohe Wirtsspezifität für die natürliche Wirtsspezies sprechen. Tatsächlich konnte ein inhibitorischer Faktor gegen das GM-CSF und das IL-2 (GIF) im Genom des Parapoxvirus ovis entdeckt werden. Dieser erwies sich als extrem spezifisch und interagierte mit ovinen aber nicht mit humanen Zytokinen, obwohl der Mensch auch einen permissiven Wirt für das Virus darstellt (Deanne et al.; 2000). Für ein ORFV-kodiertes Homolog des IL-10 ist hingegen die Wirksamkeit auf murine Immunzellen beschrieben (Fleming et al.; 1997; 2000; Imlach et al.; 2002; Lateef et al.; 2003). Dennoch konnte eine unbeeinträchtigte Immunogenität parapoxviraler Vektorvakzinen in dieser Spezies nachgewiesen werden (Rziha et al.; 2000; Fischer et al.; 2003; Henkel et al.; 2004).

Heterologe *Prime-Boost* Immunisierung mit Baculovirus exprimiertem E2 und ORFV D1701VrVE2

Die effektive Aktivierung speziell der zellvermittelten Mechanismen der adaptiven Immunantwort durch ein heterologes *Prime-Boost* Regime ist mehrfach beschrieben (Ramshaw und Ramsay; 2000; Woodland; 2004). Dieses Phänomen konnte in der vorliegenden Arbeit auch bei der Kombination des Baculovirus-exprimierten E2-Glykoprotein mit dem rekombinanten Parapoxvirus im Schwein gezeigt werden. Nach der heterologen Auffrischungsimpfung konnten große Zahlen CSFV-spezifischer IFN- γ sezernierender Zellen innerhalb der PBMC der Impflinge gefunden werden (vgl. Abschnitt 4.2.2.3; Abb. 4.16). Hausmann et al. (2005) konnten in der Maus zeigen, dass der homologe Boost mit rekombinantem Parapoxvirus nur marginal zytotoxische T-Zellen induziert. Nach der Anwendung des Parapoxvirus als heterologe Auffrischungsimpfung nach Erstimmunisierung mit einem rekombinanten Vaccinia-Virus, welches das gleiche Protein exprimierte,

konnte allerdings eine gute virusspezifische Lyse infizierter Zellen durch die Immunzellen der geimpften Mäuse gesehen werden.

Für die relativ schlechten Ergebnisse homologer Auffrischungsimpfungen mit Vektorvakzinen auf zellulärer Ebene werden verschiedene Erklärungsansätze diskutiert.

Eine Ursache könnte die teilweise oder vollständige Neutralisierung des Impfvektors bei der Auffrischungsimpfung sein, wie sie für Orthopockenvektoren beschrieben ist (Gherardi et al.; 2004). Diese würde die Expressionseffizienz mindern. Gegen das Parapoxvirus werden allerdings kaum neutralisierende Antikörper gebildet. Während bei den orthopoxviralen Vektorsystemen auch auf humoraler Ebene kein positiver Effekt der Auffrischungsimpfung zu sehen ist, konnte dieser für das rekombinante Parapoxvirus gezeigt werden (Abschnitt 4.2.1.1; Abb. 4.8).

Ein weiterer bei der Erstimmunisierung ausgelöster Effekt könnte die Induktion vektor-spezifischer IL-10-sezernierender Zellen sein. Dieses Zytokin, das die zellvermittelte Immunantwort supprimiert, würde dann bei Zweitkontakt mit dem Vektor sezerniert. Diese Hypothese konnte durch Versuche mit Mäusen bestätigt werden, denen das IL-10 Gen fehlt. Bei diesen Tieren konnte trotz bestehender Papillomavirusimmunität eine zellvermittelte Immunreaktion gegen ein mit diesem Vektor appliziertes Antigen ausgelöst werden. Im Gegensatz hierzu zeigten Mäuse, die IL-10 bilden konnten, keine zellvermittelte Immunreaktion gegen das Impfantigen, wenn sie bereits vorher mit dem Vektor Kontakt hatten (Liu et al.; 2003).

Ein weiterer Erklärungsansatz für die geringe Effektivität der homologen Auffrischungsimpfung ergibt sich aus der Hierarchie der T-Zell-Epitope. Bei zweimaliger Applikation des gleichen Impfstoffes führt diese zur Selektion von Lymphozyten bestimmter Spezifität (Palmowski et al.; 2002; Subbramanian et al.; 2003). Bei poxviralen Vektorsystemen ist zudem ein Verhältnis vektorspezifischer Zellen zu fremdantigenspezifischen Zellen bis zu 30:1 beschrieben (Harrington et al.; 2002). Somit könnte die zellvermittelte Immunantwort gegen das E2 Glykoprotein auch von dominanten Epitopen des Vektors unterdrückt werden.

Wird das Parapoxvirus als heterologe Zweitimmunisierung eingesetzt ist die negative Beeinflussung der zellvermittelten Immunreaktion durch bestehende Vektorimmunität nicht gegeben.

Zusätzlich kann sich noch positiv auswirken, dass bei der heterologen Zweitimpfung nur gegen die Epitope des E2 eine Gedächtnisreaktion ausgelöst wird (Woodland; 2004). Währenddessen wird gegen die Epitope des Vektors nur die relativ schwächere und langsamer einsetzende Primärreaktion ausgelöst. Den für die Epitope des E2 spezifischen T-

Lymphozyten steht somit der Großteil der antigenpräsentierenden Zellen und von diesen gebildeten Zytokine zur Verfügung (Palmowski et al.; 2002). Es kommt automatisch zur Selektion der E2-spezifischen Zellklone, die in großer Zahl als CSFV-spezifische Effektorzellen detektiert werden konnten (Abschnitt 4.2.2.3; Abb. 4.16).

Die Belastungsinfektion als heterologe Boost-Immunisierung

Vordermeier et al. (2004) konnten zeigen, dass der heterologe Boost bei der Induktion der zellulären Immunantwort gegen ein Pathogen nicht nur die Effektivität zweier Subunit-Vakzinen verbessert, sondern auch positive Effekte erzielt, wenn einer der beiden angewandten Impfstoffe ein attenuierter Erregerstamm ist. Ein ähnlicher Ablauf ist bei einer Interventionsimpfung gegeben. Die mit der Subunit-Vakzine immunisierten Tiere kommen in Kontakt mit dem Feldvirus. Letzteres repräsentiert dann die heterologe Auffrischimpfung, da es zum Zweitkontakt mit dem Antigen kommt, das in der Vakzine enthalten war. Tatsächlich konnten in ORFV D1701VrVE2 Impfungen nach der Belastungsinfektion mehr IFN- γ Produzenten im ELISPOT detektiert werden, als zu gleichen Zeitpunkten in Tieren, die mit dem Lebendimpfstoff immunisiert worden waren. Auch war die nach der Belastungsinfektion gemessene humorale Immunantwort bei den Tieren, die das rekombinante ORFV erhalten hatten, signifikant größer, als bei Tieren, die mit dem CSFV Stamm „Chinese“ immunisiert worden waren (vgl. Abschnitt 4.2.2.2; Abb. 4.14).

Über diese „Verstärkung“ der sekundären Immunantwort bei heterologen *Prime-Boost* Regimen kann also eine hohe Effektivität von Subunit-Impfstoffen postuliert werden. Zwar kommt es bei der Immunisierung mit nur wenigen Antigenen eines Pathogens auch nur zur Immuninduktion gegen diese Bestandteile. Jedoch kann der Nachteil der geringeren Breite der Immunantwort durch eine stärkere Antwort bei Kontakt mit dem Gesamtpathogen (Belastungsvirus) teilweise oder ganz ausgeglichen werden. Dies scheint den Wirkungsnachteil der Subunit-Vakzinen zu mindern, den man als Preis für die Markerkomponente in Kauf nehmen muss.

Das Lipoprotein L-OprI als Adjuvans bei der Immunisierung mit dem Glykoprotein E2

Parallel zum Hauptziel der vorgelegten Arbeit, nämlich der Entwicklung und Erprobung eines neuen parapoxviralen Vektors, wurde nach weiteren Verbesserungsmöglichkeiten der Glykoprotein E2 vermittelten Schutzwirkung gesucht. Es sollte neben der Stimulation der

Antikörperbildung auch die Aktivierung der zellvermittelten Immunreaktionen mit diesem Protein günstig beeinflusst werden.

In der zugelassenen Vakzine wird ein klassisches Öl-in-Wasser-Adjuvans mit seinen bekannten Nachteilen der Granulombildung eingesetzt (Goto; 1978). An Stelle dessen wurde bei der Impfung von Tieren mit dem Baculovirus-exprimierten E2 Protein das Lipoprotein L-OprI der äusseren Membran von *Pseudomonas aeruginosa* zugesetzt. Dieses Lipoprotein wurde als starker Induzent zellvermittelter Immunmechanismen im Mausmodell beschrieben (Cote-Sierra et al.; 2002). Diese Wirkung konnte auf die Interaktion mit dem murinen TLR-2 und daraus resultierende Maturierung der antigenpräsentierenden Zellen (APC) zurückgeführt werden (Hertz et al.; 2001). Zusätzlich werden TLR-2-Liganden sehr effektiv von den APC internalisiert und über MHC-II-Moleküle präsentiert (Schjetne et al.; 2003). Für porcine Makrophagen ist überdies die Effektive Aufnahme und MHC-I-Präsentation von L-OprI bekannt. Dies wird bei der Verwendung von Antigen-L-OprI-Fusionsproteinen ausgenutzt (Leitao et al.; 1998).

In den immunisierten Tieren konnte ein Effekt des Adjuvans auf die Bildung neutralisierender Antikörper gezeigt werden. Während alle Tiere, die das Adjuvans erhalten hatten, vor der Belastungsinfektion neutralisierende Antikörper aufwiesen, konnten Antikörper mit dieser Funktion nur in einem der Tiere nachgewiesen werden, die die gleiche Menge E2 jedoch ohne L-OprI erhalten hatten (vgl. Abschnitt 4.2.3; Abb. 4.18). Diese Stimulation der Antikörperbildung durch das Lipoprotein konnte im Mausmodell ebenfalls gezeigt werden. Diese kommt hier bei vergleichbaren Titern der Antikörper vom Isotyp IgG₁ durch die stärkere Bildung von Antikörpern des Isotyp IgG₂ zustande (Cote-Sierra et al.; 2002).

Jedoch konnten unabhängig von der Anwendung des L-OprI keine CSFV-spezifischen IFN- γ produzierenden Zellen vor der Belastungsinfektion innerhalb der PBMC nachgewiesen werden. Diese mangelnde Induktion der zellvermittelten Immunantwort ist unter Umständen auf die Darreichungsform des Impfstoffes zurückzuführen. Ein wichtiger Mechanismus zur Stimulation der zellvermittelten Abwehr durch das L-OprI ist die Internalisierung und MHC-I-Präsentation des fusionierten Antigens. Da ein solches Fusionsprotein nicht vorlag, wurde mit einer E2 L-OprI-Mischung immunisiert. Die geringere Stimulation der zellvermittelten Abwehrmechanismen durch das Adjuvans in Antigen-L-OprI-Gemischen ist aus dem Mausmodell bekannt (Cote-Sierra et al.; 2002).

Nach der Belastungsinfektion zeigten die Rezipienten des L-OprI bei gleicher applizierter E2-Antigenmenge mildere Symptome des CSF. Dieses Ergebnis war auf Grund der besseren Bildung neutralisierender Antikörpertiter in den Tieren dieser Gruppe zu erwarten.

Neben den mildereren Krankheitssymptomen fiel am Tag 7 nach der Belastungsinfektion noch eine größere Anzahl CSFV-spezifischer IFN- γ produzierender Zellen in den PBMC der Tiere auf, die das Adjuvans und die hohe Antigenosis erhalten hatten (vgl. Abschnitt 4.2.3; Abb. 4.19). Diese kann jedoch nicht unbedingt auf die Wirkung des Adjuvans zurückgeführt werden, da eines der vier Tiere, die kein Adjuvans erhalten hatten, vergleichbare IFN- γ ELISPOT Ergebnisse aufwies.

Für das Lipoprotein L-OprI von *Pseudomonas aeruginosa* kann eine Stimulation humoraler Immunmechanismen im Schwein nach den vorliegenden Ergebnissen angenommen werden. Über diese kann auch die bessere Protektion gegen die CSFV-Infektion erklärt werden. Für die Stimulation der zellvermittelten Immunantwort gab es im vorliegenden Versuch keine eindeutigen Hinweise. Eine abschließende Bewertung der Wirksamkeit dieses Adjuvans im Schwein sollte aber erst nach Untersuchungen mit L-OprI-Fusionsproteinen erfolgen.

Immunisierung mit dem Nicht-Struktur-Protein NS3

Nach der Immunisierung mit dem Lebendimpfstoff kommt es schneller zu einer messbaren Aktivierung der zellvermittelten, als der humoralen Immunität, die meist erst ab Tag 21 nachgewiesen werden konnte (Suradhat et al.; 2001). Da Tiere vor einer Infektion geschützt sein können, ehe die Ausbildung neutralisierender Antikörper im Serum nachweisbar ist, scheint die Induktion einer starken zellvermittelten Immunität ein wichtiges Kriterium in der Schutzausbildung zu sein. Peptide des Nicht-Strukturproteins NS3 stimulieren die PBMC CSFV-immuner Tiere zu starker Proliferation (Armengol et al.; 2002). Ähnliches ist für das nah verwandte BVDV beschrieben (Collen et al.; 2002). Zusätzlich konnten Elahi et al. (1999) durch die Immunisierung mit einem rekombinanten Adenovirus, das das NS3-Protein des BVDV exprimiert, virusspezifische IFN- γ sezernierende Zellen in Mäusen induzieren. Ein Epitop CSFV-spezifischer cytotoxischer T-Zellen wurde für das d/d Histokompatibilitäts-Inzuchtschwein im C-terminalen Bereich des NS3 beschrieben (Pauly et al.; 1995). All dies weist auf eine Bedeutung von NS3 bei zellvermittelten Immunreaktionen gegen das CSFV hin, weshalb hier seine immunisierenden Fähigkeiten und letztendlich seine mögliche Schutzinduktion geprüft wurden.

Die Immunisierung mit bakteriell exprimiertem NS3 Protein des CSFV unter Verwendung von Freund'schem Adjuvans führte zur Bildung NS3 spezifischer Antikörper, die im Western Blot und ELISA nachweisbar waren (vgl. Abschnitt. 4.2.4; Abb. 4.21 und 4.22). Dennoch

besaßen die Seren der Tiere weder vor noch nach der Belastungsinfektion neutralisierende Potenz. Dieses Phänomen beschrieben schon Bolin und Ridpath (1989) für das BVDV. Sie konnten in früh nach der Immunisierung mit einem Lebendimpfstoff gewonnenen Seren NS3-spezifische Antikörper nachweisen. Diese Seren enthielten jedoch keine BVDV-neutralisierenden Titer.

Bei den NS3 Impflingen kommt es offensichtlich erst bei der Belastungsinfektion zum Kontakt mit den Virusproteinen, die neutralisierende Antikörper induzieren. Die Produktion dieser Antikörper kann deshalb wahrscheinlich zeitlich nicht vor der massiven Reduktion der B-Lymphozyten beginnen (Susa et al.; 1992). Möglicherweise ist die massive B-Zell-Depression in der Peripherie Ausdruck nachhaltiger Störungen der B-Zellgenese, deren weitere Folge das Ausbleiben der Bildung neutralisierender Antikörper ist.

Die NS3-Subunitvakzine führte nach zweimaliger Applikation zu einer messbaren Induktion IFN- γ produzierender Zellen innerhalb der PBMC der Impflinge (vgl. Abschnitt 4.2.4; Abb. 4.23). Dennoch war die ausschließlich gegen das NS3 gerichtete Immunantwort nicht in der Lage, die Impflinge gegen eine Infektion mit dem CSFV zu schützen. Die Impflinge erkrankten nach der Belastungsinfektion im gleichen Maße wie ein ungeimpftes Kontrolltier (vgl. Abschnitt 4.2.4).

Dass die zellvermittelte Immunität allein nicht in der Lage ist, vor einer Infektion mit dem CSFV zu schützen, konnten auch Piriou et al. (2000) zeigen, die durch den passiven Transfer von T-Lymphozyten aus CSFV-immunen Schweinen auf naive Tiere die Infektion mit dem Virus nicht beeinflussen konnten.

Die NS3 Impflinge zeigten nach der Belastungsinfektion eine Abnahme der CSFV-spezifischen IFN- γ produzierenden Zellen. Diese Beobachtung kann als funktionelles Korrelat zu der mehrfach beschriebenen Reduktion der T-Zellen im peripheren Blut, während der CSFV-Infektion, aufgefasst werden (Markowska-Daniel et al.; 1999; Summerfield et al.; 1998b; 2001).

Die durch die Immunisierung mit einer NS3-Subunit-Vakzine ausgelöste Immunantwort ist trotz der guten Aktivierung der zellvermittelten Immunmechanismen nicht in der Lage, vor einer Infektion mit dem CSFV zu schützen. Dies kann unter anderem auf die Unfähigkeit der induzierten Antikörper zurückgeführt werden, das CSFV zu neutralisieren.

Diskussion

Abschließend lässt sich sagen, dass Schutz vor dem letalen Ausgang der klassischen Schweinepest durch die Applikation des E2 Proteins gezeigt werden konnte. Das Parapoxvirus ovis stellt für die Applikation dieses „Subunit“ Proteins im Schwein einen vielversprechenden Vektor dar. Es zeichnet sich durch hohe Sicherheit und eine effiziente Fremdgenexpression im nicht permissiven Wirtstier aus. Durch die Größe seines Genoms stellt es viele potentielle Insertionsorte zur Verfügung. Im Gegensatz zu orthopoxviralen Vektorsystemen kommt es nicht zu einer starken Immunreaktion gegen diesen Vektor, was die mehrfache Applikation möglich macht. Im nicht permissiven Wirt besitzt das Parapoxvirus immunmodulatorische Eigenschaften, die eine Adjuvans-ähnliche Wirkung für das exprimierte Antigen haben könnten. Dadurch war es möglich bereits nach einmaliger Applikation eine Protektion gegen das CSFV zu erzeugen. Vor allem nach der Impfdosisverteilung („multi-site“ Applikation) des rekombinanten Parapoxvirus ovis ORFV D1701VrVE2 konnte in einem Pilotprojekt eine relativ schnelle, protektive Immuninduktion gezeigt werden. Diese sollte in größer dimensionierten Versuchen bestätigt und eine Anwendung des „multi-site“ Konzeptes speziell für Interventionsimmunisierungen überdacht werden

Sowohl nach der Belastungsinfektion, als auch in einem *Prime-Boost* Regime mit Baculovirus-exprimiertem E2 Protein und der Parapoxrekombinante, konnte die positive Wirkung der heterologen Zweitimmunisierung auf die Induktion der zellvermittelten Immunreaktion nachvollzogen werden.

Für das Adjuvans L-OprI konnte eine Stimulation humoraler Immunmechanismen gezeigt werden. In wie weit es, über seine bessere Verträglichkeit hinaus, einen Fortschritt gegenüber einem klassischen Öl-in-Wasser-Adjuvans darstellt, bleibt zu klären.

Das „Subunit“ Protein NS3 stellte sich als starker Induzent CSFV-spezifischer IFN- γ produzierender Zellen heraus, konnte jedoch weder neutralisierende Antikörper, noch einen Schutz vor der CSF induzieren. Durch die Applikation von NS3 zusammen mit E2 könnten zellvermittelte und humorale Immunmechanismen aktiviert werden und unter Umständen ein komplexerer Schutz der Impflinge bewerkstelligt werden.

6 Zusammenfassung

Da es immer wieder zu Ausbrüchen der klassischen Schweinepest (CSF) in der Europäischen Union kommen kann, besteht Bedarf nach einer Vakzine, die in einer Interventionsimpfung eingesetzt werden kann. Da die hierfür bislang zugelassene E2 „Subunit“ Vakzine keine ausreichende Protektion vermittelt, wurde nach Möglichkeiten gesucht, den durch E2 vermittelten Immunschutz vor allem auch auf der zellulären Ebene zu verbessern.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht das zu diesem Zweck entwickelte rekombinante Parapoxvirus ovis ORFV D1701VrVE2. Sowohl die Expression des inserierten Gens in nicht permissiven, porcinen Zellen, als auch die Apathogenität der Vektorvakzine für das Schwein, wurden gezeigt. Eine Stimulation angeborener Immunreaktionen (innate immunity) im Schwein wurde beispielhaft durch die Bildung von IFN- α und antivirale Aktivität für die Vektovakzine nachgewiesen. In mehreren Impfversuchen trat die Bildung CSFV-neutralisierender Antikörper bereits nach einmaliger Immunisierung ein. Der Schutz der geimpften Tiere vor einer letalen Belastungsinfektion, einschließlich des Ausbleibens von Fieber und der Erholung von der typischen B-Lymphozyten-Reduktion wurde erreicht. Ein kurzer Zeitraum zwischen Immunisierung, detektierbaren neutralisierenden Antikörpertitern und Infektionsschutz war in einem Pilotversuch durch die Verteilung der Impfdosis auf vier verschiedene Injektionsstellen („multi-site“ Applikation) realisierbar. So geimpfte Schweine übertrugen, im Gegensatz zu klassisch, nur in einen Muskel immunisierten Tieren, das Belastungsvirus nicht auf ein zugestalltes naives Tier. Während es bei homologer Zweitimmunisierung mit ORFV D1701VrVE2 zwar zum Anstieg der Serumantikörpertiter kam, konnten keine IFN- γ produzierenden Zellen unter den PBMC der Impflinge detektiert werden. Dies ändert sich, wenn das rekombinante Parapoxvirus in einem heterologen *Prime-Boost* Impfgeme mit Baculovirus-exprimiertem E2 Protein eingesetzt wurde. Ein ähnlicher positiver Effekt auf die IFN- γ produzierenden Zellen wird evident, wenn die Belastungsinfektion nach erfolgter Impfung mit ORFV D1701VrVE2 als heterologer Boost wirkt. Hier waren nach der Infektion mehr IFN- γ produzierende Zellen in den PBMC der Impflinge detektierbar, als bei Tieren, die vor der Infektion mit einem CSFV-Lebendimpfstoff (homolog) immunisiert worden waren.

Die zusätzlich durchgeführte Prüfung des Effektes des Lipoprotein L-OprI von *Pseudomonas aeruginosa* auf die Immunogenität des Baculovirus-exprimierten E2 zeigte eine positive

Zusammenfassung

Beeinflussung der humoralen Immunantwort, jedoch im vorliegenden Versuch keinen Einfluss auf zellvermittelte Immunmechanismen.

Die Immunogenität einer zweiten Untereinheit des CSFV, des Nicht-Strukturproteins NS3, wurde untersucht. Dieser Bestandteil des CSFV wurde als guter Induzent IFN- γ produzierender Zellen charakterisiert. Die nach der Immunisierung gebildeten Antikörper neutralisierten das CSFV allerdings nicht und die Tiere waren nicht vor einer letalen Belastungsinfektion geschützt.

Summary

Recombinant parapoxvirus vaccine against classical swine fever: comparative characterization of immune reactions in swine

Despite good efforts in eradication of classical swine fever (CSFV) within the EU massive disease outbreaks cannot be excluded. Therefore an “intervention vaccination strategy” is one option in legal EU combat strategies against CSF. At the moment an E2 subunit vaccine is licensed in the EU but possibly can be replaced by an improved vaccine to achieve optimal stimulation of the humoral as well as the cellular immune responses. The aim of the present work was the generation of a new Parapoxvirus ovis vector expressing the E2 glycoprotein of CSFV which was named ORFV D1701VrVE2. It could be successfully demonstrated that his vector vaccine efficiently expresses the foreign gene even in cells of swine as a non permissive host. It was shown to be completely avirulent for pigs. The vector is a potent stimulator of IFN- α and VSV antiviral activity in porcine PBMC supernatants. In several animal immunisation experiments with swine ORFV D1701VrVE2 induced CSFV-neutralizing serum antibodies already after a single application. Immunized piglets were protected against lethal CSFV challenge and did not develop fever. Vaccinated and challenged animals recovered from the characteristic CSFV-induced B-cell reduction. The distribution of the vaccine dose over four intra-muscular injection sites (multi-site application) led to a rapid induction of neutralizing antibodies and to solid protection from CSF after a single vaccination. In contrast to single site vaccinated animals, multi-site vaccinated piglets did not transmit the challenge virus to a naive sentinel. Two successive vector virus applications in a homologous prime-boost regimen did not provoke IFN- γ producing cells among PBMC. However, a heterologous prime-boost regimen as a combination of prime with baculovirus expressed glycoprotein E2 followed by boost with the parapoxvirus vector induced high numbers of IFN- γ producing cells. A similar beneficial effect became evident when the challenge infection mimicked the booster vaccination after a single vector prime. In contrast when the challenge CSFV was applied after a homologous prime with modified live CSFV vaccine the immunised piglets responded with lower numbers of IFN- γ producing cells as well as lower titres of CSFV-neutralizing serum antibodies. In additional experiments the adjuvant effect of lipoprotein L-OprI of *Pseudomonas aeruginosa* was tested in combined administration with baculovirus expressed E2 in piglets

Zusammenfassung

using sub-optimal doses of the E2 protein. The adjuvant showed a beneficial effect on the formation of CSFV neutralizing serum antibodies but had no influence on the number of IFN- γ producing cells in piglets before challenge.

As another important CSFV subunit the immunogenic properties of the *E. coli* produced non structural protein NS3 have been tested. Although NS3 induced high amounts of IFN- γ producing cells in PBMC of vaccinated piglets their serum antibodies did not neutralize CSFV and even after two booster vaccinations the animals were not protected against lethal CSFV challenge.

7 Literaturverzeichnis

Anderson IE, Reid HW, Nettleton PF, McInnes CJ, Haig DM. (2001). Detection of cellular cytokine mRNA expression during orf virus infection in sheep: differential interferon-gamma mRNA expression by cells in primary versus reinfection skin lesions. *Vet Immunol Immunopathol.* 83:161-176.

Anderson RJ, Hannan CM, Gilbert SC, Laidlaw SM, Sheu EG, Kortzen S, Sinden R, Butcher GA, Skinner MA, Hill AV. (2004). Enhanced CD8+ T cell immune responses and protection elicited against *Plasmodium berghei* malaria by prime boost immunization regimens using a novel attenuated fowlpox virus. *J Immunol.* 172:3094-3100.

Andrew ME, Coupar BE, Boyle DB. (1989). Humoral and cell-mediated immune responses to recombinant vaccinia viruses in mice. *Immunol Cell Biol.* 67:331-337.

Andrew ME, Coupar BEH, Boyle, DB (1992). Immunogenicity and antigen presentation. In: Binns und Smith (eds.): *Recombinant poxviruses.* CRC Press, Boca Raton, pp 207-234

Andrew ME, Morrissy CJ, Lenghaus C, Oke PG, Sproat KW, Hodgson ALM, Johnson MA, Coupar BEH. (2000). Protection of pigs against classical swine fever with DNA-delivered gp55. *Vaccine* 18:1932-1938.

Aoki H, Sakoda Y, Nakamura S, Suzuki S, Fukusho A. (2004). Cytopathogenicity of classical swine fever viruses that do not show the exaltation of Newcastle disease virus is associated with accumulation of NS3 in serum-free cultured cell lines. *J Vet Med Sci.*66:161-167.

Armengol E, Wiesmuller KH, Wienhold D, Büttner M, Pfaff E, Jung G, Saalmüller A. (2002). Identification of T-cell epitopes in the structural and non-structural proteins of classical swine fever virus. *J Gen Virol.* 83:551-560.

Bazan JF & Fletterick, RJ (1989). Detection of a trypsin-like serine protease domain in flaviviruses and pestiviruses. *Virology* 171:637-639.

Bensaude E, Turner JL, Wakeley PR, Sweetman DA, Pardieu C, Drew TW, Wileman T, Powell PP. (2004). Classical swine fever virus induces proinflammatory cytokines and tissue factor expression and inhibits apoptosis and interferon synthesis during the establishment of long-term infection of porcine vascular endothelial cells. *J Gen Virol.* 85:1029-37.

Birnboim HC, Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-1523.

Bolin SR, Ridpath JF. (1989). Specificity of neutralizing and precipitating antibodies induced in healthy calves by monovalent modified-live bovine viral diarrhoea virus vaccines. *Am J Vet Res.* 50:817-821.

Bouma A, de Smit AJ, de Kluijver EP, Terpstra C, Moormann RJ. (1999). Efficacy and stability of a subunit vaccine based on glycoprotein E2 of classical swine fever virus. *Vet Microbiol* 66:101-114.

Brackenbury LS, Carr BV, Charleston B. (2003). Aspects of the innate and adaptive immune responses to acute infections with BVDV. *Vet Microbiol.* 96:337-344.

Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.

Bronte V, Tsung K, Rao JB, Chen PW, Wang M, Rosenberg SA, Restifo NP. (1995). IL-2 enhances the function of recombinant poxvirus-based vaccines in the treatment of established pulmonary metastases. *J Immunol.* 154:5282-5292.

Bruschke CJ, Hulst MM, Moormann RJ, van Rijn PA, van Oirschot JT. (1997). Glycoprotein Erns of pestiviruses induces apoptosis in lymphocytes of several species. *J Virol.* 71:6692-6696.

Buddle BM, Pulford HD (1984). Effects of passively acquired antibodies and vaccination on the immune response to contagious ecthyma virus. *Vet Microbiol.*9:515-522.

Buller RM, Smith GL, Cremer K, Notkins AL, Moss B. (1985). Decreased virulence of recombinant vaccinia virus expression vectors is associated with a thymidine kinase-negative phenotype. *Nature.*317:813-815.

Büttner M. (1986). Safety and efficacy of a combined parapox/BVD vaccine. *Dev Biol Stand.* 65:221-226.

Büttner M, von Einem C, McInnes C, Oksanen A. (1995a). Clinical findings and diagnosis of a severe parapoxvirus epidemic in Finnish reindeer *Tierarztl Prax.* 23:614-618.

Büttner M, Czerny CP, Lehner KH, Wertz K. (1995b). Interferon induction in peripheral blood mononuclear leukocytes of man and farm animals by poxvirus vector candidates and some poxvirus constructs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 46: 237-250.

Büttner M, Rziha HJ. (2002). Parapoxviruses: from the lesion to the viral genome. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health.* 49: 7-16.

Carrasco CP, Rigden RC, Vincent IE, Balmelli C, Ceppi M, Bauhofer O, Tache V, Hjertner B, McNeilly F, van Gennip HG, McCullough KC, Summerfield A. (2004). Interaction of classical swine fever virus with dendritic cells. *J Gen Virol.* 85:1633-1641.

Casimiro DR, Chen L, Fu TM, Evans RK, Caulfield MJ, Davies ME, Tang A, Chen M, Huang L, Harris V, Freed DC, Wilson KA, Dubey S, Zhu DM, Nawrocki D, Mach H, Troutman R, Isopi L, Williams D, Hurni W, Xu Z, Smith JG, Wang S, Liu X, Guan L, Long R, Trigona W, Heidecker GJ, Perry HC, Persaud N, Toner TJ, Su Q, Liang X, Youil R, Chastain M, Bett AJ, Volkin DB, Emini EA, Shiver JW. (2003). Comparative immunogenicity in rhesus monkeys of DNA plasmid, recombinant vaccinia virus, and replication-defective adenovirus vectors expressing a human immunodeficiency virus type 1 gag gene. *J Virol.* 77:6305-6313.

Chakrabarti S, Brechling K, Moss B. (1985). Vaccinia virus expression vector: coexpression of β -galactosidase provides visual screening of recombinant virus plaques. *Mol Cell Biol.* 5:3403-3409.

Charleston B, Hope JC, Carr BV, Howard CJ. (2001). Masking of two in vitro immunological assays for Mycobacterium bovis (BCG) in calves acutely infected with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Vet Rec.* 149:481-484.

Chen R, Wang H, Mansky LM. (2002). Roles of uracil-DNA glycosylase and dUTPase in virus replication. *J Gen Virol.* 83:2339-2345.

Choi C, Chae C. (2003). Localization of classical swine fever virus from chronically infected pigs by in situ hybridization and immunohistochemistry. *Vet Pathol.* 40:107-113.

Choi C, Hwang KK, Chae C. (2004). Classical swine fever virus induces tumor necrosis factor-alpha and lymphocyte apoptosis. *Arch Virol.* 149:875-889.

Chomezynski P, Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162:156-159.

Clark BE, Newton SE, Carroll AR (1987). Improved immunogenicity of a peptide after fusion to hepatitis C core protein. *Nature* 330: 381-384

Cohen SN, Chang AC, Hsu L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 69:2110-2114.

Collen T, Carr V, Parsons K, Charleston B, Morrison WI. (2002). Analysis of the repertoire of cattle CD4(+) T cells reactive with bovine viral diarrhoea virus. *Vet Immunol Immunopathol.* 87:235-8.

Collen T, Morrison WI. (2000). CD4(+) T-cell responses to bovine viral diarrhoea virus in cattle. *Virus Res.* 67:67-80.

Cote-Sierra J, Bredan A, Toldos CM, Stijlemans B, Brys L, Cornelis P, Segovia M, de Baetselier P, Revets H. (2002). Bacterial lipoprotein-based vaccines induce tumor necrosis factor-dependent type 1 protective immunity against Leishmania major. *Infect Immun.* 70:240-248.

Czerny CP, Eis-Hubinger AM, Mayr A, Schneeweis KE, Pfeiff B. (1991). Animal poxviruses transmitted from cat to man: current event with lethal end. *Zentralbl Veterinarmed B.* 38:421-431.

Dahle J, Liess B. (1992). A review on classical swine fever infections in pigs: epizootiology, clinical disease and pathology. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 15, 203-211.

Dale CJ, De Rose R, Wilson KM, Croom HA, Thomson S, Coupar BE, Ramsay A, Purcell DF, Ffrench R, Law M, Emery S, Cooper DA, Ramshaw IA, Boyle DB, Kent SJ. (2004). Evaluation in macaques of HIV-1 DNA vaccines containing primate CpG motifs and fowlpoxvirus vaccines co-expressing IFNgamma or IL-12. *Vaccine.* 23:188-197.

de Smit AJ, Bouma A, de Kluijver EP, Terpstra C, Moormann RJ (2000). Prevention of transplacental transmission of moderate-virulent classical swine fever virus after single or double vaccination with an E2 subunit vaccine. *Vet Q.* 22, 150-153.

- Deane D, McInnes CJ, Percival A, Wood A, Thomson J, Lear A, Gilray J, Fleming S, Mercer A, Haig D. (2000).** Orf virus encodes a novel secreted protein inhibitor of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-2. *J Virol.* 74:1313-1320.
- Degano P, Schneider J, Hannan CM, Gilbert SC, Hill AV. (1999).** Gene gun intradermal DNA immunization followed by boosting with modified vaccinia virus Ankara: enhanced CD8+ T cell immunogenicity and protective efficacy in the influenza and malaria models. *Vaccine.* 18:623-632.
- Demkowicz WE Jr, FA. (1993).** Vaccinia virus-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes in humans. *J Virol.* 67:1538-1544.
- Denham S, Zwart RJ, Whittall JT, Pampusch M, Corteyn AH, Bianchi AT, Murtaugh MP, Parkhouse RM, Tlaskalova H, Sinkora J, Sinkora M, Rehakova Z. (1998).** Monoclonal antibodies putatively identifying porcine B cells. *Vet Immunol Immunopathol* 60:317-328.
- Dewulf J, Laevens H, Koenen F, Vanderhallen H, Mintiens K, Deluyker H, de Kruif A. (2000).** An experimental infection with classical swine fever in E2 sub-unit marker-vaccine vaccinated and in non-vaccinated pigs. *Vaccine.* 19:475-482.
- Dewulf J, Laevens H, Koenen F, Mintiens K, de Kruif A. (2001).** An E2 sub-unit marker vaccine does not prevent horizontal or vertical transmission of classical swine fever virus. *Vaccine* 20: 86-91.
- Dong XN, Wei K, Liu ZQ, Chen YH. (2002).** Candidate peptide vaccine induced protection against classical swine fever virus. *Vaccine.* 21:167-173.
- Drillien R, Spohner D, Hanau D. (2004).** Modified vaccinia virus Ankara induces moderate activation of human dendritic cells. *J Gen Virol.* 85:2167-2175.
- Egan C, Kelly CD, Rush-Wilson K, Davis SW, Samsonoff WA, Pfeiffer H, Miller J, Taylor J, Cirino NM. (2004).** Laboratory-confirmed transmission of vaccinia virus infection through sexual contact with a military vaccinee. *J Clin Microbiol.* 42:5409-5411.
- Elahi SM, Shen SH, Harpin S, Talbot BG, Elazhary Y. (1999).** Investigation of the immunological properties of the bovine viral diarrhoea virus protein NS3 expressed by an adenovirus vector in mice. *Arch Virol.* 144:1057-1070.
- Elbers K, Tautz N, Becher P, Stoll D, Rüménapf T, Thiel HJ. (1996).** Processing in the Pestivirus E2-NS2 Region: Identification of Proteins p7 and E2p7. *J Virol* 70, 4131-4135.
- Eo SK, Gierynska M, Kamar AA, Rouse BT. (2001).** Prime-boost immunization with DNA vaccine: mucosal route of administration changes the rules. *J Immunol.* 166:5473-5479.
- Estcourt MJ, Ramsay AJ, Brooks A, Thomson SA, Medveckzy CJ, Ramshaw IA. (2002).** Prime-boost immunization generates a high frequency, high-avidity CD8(+) cytotoxic T lymphocyte population. *Int Immunol.* 14:31-37.
- Fachinger V, Schlapp T, Saalmüller A. (2000a).** Evidence for a parapox ovis virus-associated superantigen. *Eur. J. Immunol.* 30: 2962-2971.

Fachinger V, Schlapp T, Strube W, Schmeer N, Saalmuller A. (2000b). Poxvirus-induced immunostimulating effects on porcine leukocytes. *J Virol.* 74:7943-51.

Falkner FG, Moss B. (1988). Escherichia coli gpt gene provides dominant selection for vaccinia virus open reading frame expression vectors. *J. Virol.* 62: 1849-1854.

Feinberg AP, Vogelstein B. (1983). A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132: 6-13.

Fields BN, Knipe DM, Howley PM. (1996). *Virology (Third Edition) Volume 1* Fischer Verlag, Stuttgart.

Fischer T, Planz O, Stitz L, Rziha HJ. (2003). Novel recombinant parapoxvirus vectors induce protective humoral and cellular immunity against lethal herpesvirus challenge infection in mice. *J Virol.* 77:9312-9323.

Fleming SB, Mc Caughan CA, Andrews AE, Nash AD, Mercer A. (1997). A homolog of interleukin-10 is encoded by the poxvirus orf virus. *J. Virol.* 71: 4857-4861.

Fleming SB, Haig DM, Nettleton P, Reid HW, McCaughan CA, Wise LM, Mercer A. (2000). Sequence and functional analysis of a homolog of interleukin-10 encoded by the parapoxvirus orf virus. *Virus Genes* 21: 85-95.

Flexner C, Moss B. (1996). In: *Vaccinia Virus as a live vector for expression of immunogens.* Woodrow, G.C., Levine, M.M. (Eds.). Dekker, New York.

Fraser KM, Hill DF, Mercer A, Robinson AJ. (1990). Sequence analysis of the inverted terminal repetition in the genome of parapoxvirus, Orf virus. *Virology* 176:379-389.

Friebe A, Siegling A, Friederichs S, Volk HD, Weber O. (2004). Immunomodulatory effects of inactivated parapoxvirus ovis (ORF virus) on human peripheral immune cells: induction of cytokine secretion in monocytes and Th1-like cells. *J Virol.* 78:9400-9411.

Fries LF, Tartaglia J, Taylor J, Kauffman EK, Meignier B, Paoletti E, Plotkin S. (1996). Human safety and immunogenicity of a canarypox-rabies glycoprotein recombinant vaccine: an alternative poxvirus vector system. *Vaccine.*14:428-434.

Gallucci S, Matzinger P. (2001). Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol.* 13:114-119

Gherardi MM, Perez-Jimenez E, Najera JL, Esteban M. (2004). Induction of HIV immunity in the genital tract after intranasal delivery of a MVA vector: enhanced immunogenicity after DNA prime-modified vaccinia virus Ankara boost immunization schedule. *J Immunol.* 172:6209-6220.

Gilbert SC, Schneider J, Hannan CM, Hu JT, Plebanski M, Sinden R, Hill AV. (2002). Enhanced CD8 T cell immunogenicity and protective efficacy in a mouse malaria model using a recombinant adenoviral vaccine in heterologous prime-boost immunisation regimes. *Vaccine.* 20:1039-1045.

- Gillespie RR, Hill MA, Kanitz CL, Knox KE, Clark LK, Robinson JP. (2000).** Infection of pigs by Aujeszky's disease virus via the breath of intranasally inoculated pigs. *Res Vet Sci.* 68:217-222.
- Gomez-Villamandos JC, Salguero FJ, Ruiz-Villamor E, Sanchez-Cordon PJ, Bautista MJ, Sierra MA. (2003).** Classical Swine Fever: pathology of bone marrow. *Vet Pathol.* 40:157-163.
- Good MF, Maloy WL, Lunde MN, Margalit H, Cornette JL, Smith GL, Moss B, Miller LH, Berzofsky JA. (1987).** Construction of synthetic immunogen: use of new T-helper epitope on malaria circumsporozoite protein. *Science.* 235:1059-1062.
- Goonetilleke NP, McShane H, Hannan CM, Anderson RJ, Brookes RH, Hill AV. (2003).** Enhanced immunogenicity and protective efficacy against Mycobacterium tuberculosis of bacille Calmette-Guerin vaccine using mucosal administration and boosting with a recombinant modified vaccinia virus Ankara. *J Immunol.* 171:1602-1609.
- Gorbalenya A E, Donchenko AP, Koonin EV, Blinov VM. (1989).** N-terminal domains of putative helicases of flavi- and pestiviruses may be serine proteases. *Nucl Acids Res* 17: 3889-3897.
- Gorbalenya AE, Koonin EV, Donchenko AP, Blinov VM. (1989).** Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucl Acids Res* 17:4713-4730.
- Goto N. (1978).** Comparative studies on effects of incomplete oil adjuvants with different physical properties. *Jpn J Med Sci Biol.* 31:53-79.
- Grassmann CW, Isken O, Behrens SE. (1999).** Assignment of the multifunctional NS3 protein of bovine viral diarrhoea virus during RNA replication: an in vivo and in vitro study. *J Virol.* 73:9196-205.
- Greiser-Wilke I, Dittmar KE, Liess B, Moennig V. (1991).** Immunofluorescence studies of biotype-specific expression of bovine viral diarrhoea virus epitopes in infected cells. *J Gen Virol.* 72:2015-2019.
- Hagensee ME, Carter JJ, Wipf GC, Galloway DA. (1995).** Immunization of mice with HPV vaccinia virus recombinants generates serum IgG, IgM, and mucosal IgA antibodies. *Virology.* 206:174-182.
- Haglund K, Leiner I, Kerksiek K, Buonocore L, Pamer E, Rose JK. (2002).** Robust recall and long-term memory T-cell responses induced by prime-boost regimens with heterologous live viral vectors expressing human immunodeficiency virus type 1 Gag and Env proteins. *J Virol.* 76:7506-7517.
- Hahn J, Park SH, Song JY, An SH, Ahn BY. (2001).** Construction of recombinant swinepox viruses and expression of the classical swine fever virus E2 protein. *J Virol Methods* 93:49-56.

Haig D, Entican G, Yirrell DL, Deane D, Miller HRP, Norval M, Reid HW. (1992). Differential appearance of interferon- and colony stimulating activity in afferent versus efferent lymph following orf virus infection of sheep. *Vet. Dermatol.* 3: 221-229.

Haig D, Deane D, Percival A, Myartt N, Thomson J, Inglis L, Rothel J, Seow HF, Wood P, Miller HRP, Reid HW. (1996a). The cytokine response of afferent lymph following orf virus reinfection of sheep. *Vet. Dermatol.* 7: 11-20.

Haig D, Hutchison G, Thomson J, Yirrel D, Reid HW. (1996b). Cytolytic activity and associated serine protease expression by skin and afferent lymph CD8+ T cells during orf virus reinfection. *J. Gen. Virol.* 77: 953-961.

Haig DM, McInnes C, Deane D, Reid H, Mercer A. (1997). The immune and inflammatory response to orf virus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 20:197-204.

Haig D, McInnes CJ. (2002). Immunity and counter-immunity during infection with the parapoxvirus orf virus. *Virus Res.* 88:3-16.

Hammond JM, Jansen ES, Morrissy CJ, Goff VW, Meehan CG, Lenghaus WC, Sproat KW, Andrew ME, Coupar BEH, Johnson MA. (2001). A prime-boost vaccination strategy using naked DNA followed by recombinant porcine adenovirus protects pigs from classical swine fever. *Veterinary Microbiology* 80:101-119.

Hammond JM, McCoy RJ, Jansen ES, Morrissy CJ, Hodgson AL, Johnson MA. (2000). Vaccination with a single dose of a recombinant porcine adenovirus expressing the classical swine fever virus gp55 (E2) gene protects pigs against classical swine fever. *Vaccine* 18:1040-1050.

Handel K, Kehler H, Hills K, Pasick J. (2004). Comparison of reverse transcriptase-polymerase chain reaction, virus isolation, and immunoperoxidase assays for detecting pigs infected with low, moderate, and high virulent strains of classical swine fever virus. *J Vet Diagn Invest.* 16:132-138.

Harkness JW, Roeder PL. (1988). The comparative biology of classical swine fever virus. In: Liess, B. (ed.): *Classical swine fever and related viral infections.* Martinus Nijhoff Publishing, Boston, Dordrecht, Lancaster. pp 233-288.

Harrington LE, Most Rv R, Whitton JL, Ahmed R. (2002). Recombinant vaccinia virus-induced T-cell immunity: quantitation of the response to the virus vector and the foreign epitope. *J Virol.* 76:3329-3337.

Hausmann J, Baur K, Engelhardt KR, Fischer T, Rziha HJ, Staeheli P. (2005). Vaccine-induced protection against Borna disease in wild-type and perforin-deficient mice. *J Gen Virol.* 86:399-403.

Henkel M. (1997). Parapockenvirus Orf D1701: Versuche zur Herstellung einer VEGF-negativen Mutante. Diplomarbeit, Eberhard-Karls-Universität Tübingen

Henkel M, Planz O, Fischer T, Stütz L, Rziha HJ. (2005). Prevention of virus persistence and protection against immunopathology after Borna disease virus infection of the brain by a novel Orf virus recombinant. *J Virol.* 79:314-325.

Hertz CJ, Kiertscher SM, Godowski PJ, Bouis DA, Norgard MV, Roth MD, Modlin RL. (2001). Microbial lipopeptides stimulate dendritic cell maturation via Toll-like receptor 2. *J Immunol.* 166:2444-2450.

Hill AV, Reece W, Gothard P, Moorthy V, Roberts M, Flanagan K, Plebanski M, Hannan C, Hu JT, Anderson R, Degano P, Schneider J, Prieur E, Sheu E, Gilbert SC. (2000). DNA-based vaccines for malaria: a heterologous prime-boost immunisation strategy. *Dev Biol (Basel).* 104:171-179.

Hoof van Iddekinge BJ, de Wind N, Wensvoort G, Kimman TG, Gielkens AL, Moormann RJ. (1996). Comparison of the protective efficacy of recombinant pseudorabies viruses against pseudorabies and classical swine fever in pigs; influence of different promoters on gene expression and on protection. *Vaccine.* 14:6-12.

Hornemann S, Harlin O, Staib C, Kisling S, Erfle V, Kaspers B, Hacker G, Sutter G. (2003). Replication of modified vaccinia virus Ankara in primary chicken embryo fibroblasts requires expression of the interferon resistance gene E3L. *J Virol.* 77:8394-8400

Imlach W, McCaughan CA, Mercer A, Haig D, Fleming SB. (2002). Orf virus-encoded interleukin-10 stimulates the proliferation of murine mast cells and inhibits cytokine synthesis in murine peritoneal macrophages. *J. Gen. Virol.* 83: 1049-1058.

Inoshima Y, Morooka A, Murakami K, Sentsui H. (2000). Simple preparation of parapoxvirus genome DNA for endonuclease analysis. *Microbiol. Immunol.* 44: 69-72.

Irvine KR, McCabe BJ, Rosenberg SA, Restifo NP. (1995). Synthetic oligonucleotide expressed by a recombinant vaccinia virus elicits therapeutic CTL. *J Immunol.* 154:4651-4657.

Janeway Jr, Travers P, Hunt S Walport M. (2002). *Immunologie*, 5. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

Jenkinson D, McEwan PE, Moss VA, Elder HY, Reid HW. (1990). Location and spread of orf virus antigen in infected ovine skin. *Vet. Dermatol.* 1: 189-195.

Jenkinson D, Mc Ewan PE, Hutchison G, Reid HW. (1992). The B and T cell responses to orf virus infection. *Vet. Dermatol.* 2: 57-64.

Johnson CM, Perez DR, French R, Merrick WC, Donis RO. (2001). The NS5A protein of bovine viral diarrhoea virus interacts with the alpha subunit of translation elongation factor-1. *J Gen Virol.* 82:2935-2943.

Kaerber G. (1931) Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Arch exp Pathol Pharmakol.* 162: 480.

König M, Lengsfeld T, Pauly T, Stark R, Thiel HJ. (1995). Classical swine fever virus: independent induction of protective immunity by two structural glycoproteins. *J Virol* 69, 6479-6486.

Kosmidou A. (1995). Differenzierung und Charakterisierung von Isolaten und Mutanten des Schweinepestvirus mittels monoklonaler Antikörper. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover

Kosmidou A, Büttner M, Meyers G. (1998). Isolation and characterization of cytopathogenic classical swine fever virus (CSFV). *Arch Virol.*143:1295-1309.

Kündig TM, Kalberer CP, Hengartner H, Zinkernagel RM. (1993). Vaccination with two different vaccinia viruses: long-term inhibition of secondary vaccination. *Vaccine* 11: 1154-1158.

Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lanar DE, Tine JA, de Taisne C, Seguin MC, Cox WI, Winslow JP, Ware LA, Kauffman EB, Gordon D, Ballou WR, Paoletti E, Sadoff JC. (1996). Attenuated vaccinia virus-circumsporozoite protein recombinants confer protection against rodent malaria. *Infect Immun.* 64:1666-1671.

Lane JM, Ruben FL, Neff JM, Millar JD. (1969). Complications of smallpox vaccination. 1968. *N Engl J Med.* 281:1201-1208

Langedijk JP. (2002). Translocation activity of C-terminal domain of pestivirus Erns and ribotoxin L3 loop. *J Biol Chem.* 277:5308-5314.

Langford CJ, Edwards SJ, Smith GL, Mitchell GF, Moss B, Kemp DJ, Anders RF. (1986). Anchoring a secreted plasmodium antigen on the surface of recombinant vaccinia virus-infected cells increases its immunogenicity. *Mol Cell Biol.* 6:3191-3199.

Lateef Z, Fleming S, Halliday G, Faulkner L, Mercer A, Baird M. (2003). Orf virus-encoded interleukin-10 inhibits maturation, antigen presentation and migration of murine dendritic cells. *J Gen Virol.* 84:1101-1109.

Lear A, Hutchison G, Reid H, Norval M, Haig DM. (1996). Phenotypic characterisation of the dendritic cells accumulating in ovine dermis following primary and secondary orf virus infection. *Eur. J. Derm.* 6: 135-140.

Lee MS, Roos JM, McGuigan LC, Smith KA, Cormier N, Cohen LK, Roberts BE, Payne LG. (1992). Molecular attenuation of vaccinia virus: mutant generation and animal characterization. *J Virol.* 66:2617-2630.

Le Gouill C, Dery CV. (1991). A rapid procedure for screening of recombinant plasmids. *Nucleic Acid Res* 19, 6655.

L'Haridon RM, Bourget P, Lefevre F, La Bonnardiere C. (1991). Production of an hybridoma library to recombinant porcine alpha I interferon: a very sensitive assay (ISBBA) allows the detection of a large number of clones. *Hybridoma.* 10:35-47.

- Leitao A, Malur A, Cornelis P, Martins CL. (1998).** Identification of a 25-aminoacid sequence from the major African swine fever virus structural protein VP72 recognised by porcine cytotoxic T lymphocytes using a lipoprotein based expression system. *J Virol Methods.* 75:113-119.
- Littaua RA, Takeda A, Cruz J, Ennis FA. (1992).** Vaccinia virus-specific human CD4+ cytotoxic T-lymphocyte clones. *J Virol.*66:2274-2280.
- Liu XS, Xu Y, Hardy L, Khammanivong V, Zhao W, Fernando GJ, Leggatt GR, Frazer IH. (2003).** IL-10 mediates suppression of the CD8 T cell IFN-gamma response to a novel viral epitope in a primed host. *J Immunol.* 171:4765-4772.
- Lloyd, J. B., Gill, H.S., Haig, D. M., Husband, A. J. (2000).** In vivo T-cell subset depletion suggests that CD4+ T-cells and a humoral immune response are important for the elimination of orf virus from the skin of sheep. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 74: 249-262.
- Lorena J, Barlic-Maganja D, Lojkic M, Madic J, Grom J, Cac Z, Roic B, Terzic S, Lojkic I, Polancec D, Cajavec S. (2001).** Classical swine fever virus (C strain) distribution in organ samples of inoculated piglets. *Vet Microbiol.* 81:1-8.
- Lyttle DJ, Fraser KM, Fleming SB, Mercer A, Robinson AJ. (1994).** Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf-virus. *J. Virol.* 68: 84-92.
- Mackett M, Smith GL, Moss B. (1982).** Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 79:7415-7419.
- Madhusudana SN, Anand NP, Shamsundar R. (2002).** Economical multi-site intradermal regimen with purified chick embryo cell vaccine (Rabipur) prevents rabies in people bitten by confirmed rabid animals. *Int J Infect Dis.* 6:210-214.
- Markowska-Daniel I, Pejsak Z, Winnicka A, Collins RA. (1999).** Phenotypic analysis of peripheral leukocytes in piglets infected with classical swine fever virus. *Res Vet Sci.* 67:53-57.
- Marsland BJ, Tisdall DJ, Heath DD, Mercer AA. (2003).** Construction of a recombinant orf virus that expresses an *Echinococcus granulosus* vaccine antigen from a novel genomic insertion site. *Arch Virol.* 148:555-62.
- Mayr A, Bachmann PA, Bibrack B, Wittmann G. (1974).** Quantitative Bestimmung der Virusinfektiösität (Virustitration). In: *Virologische Arbeitsmethoden Band I.*
- Mayr A, Herlyn M, Mahnel H, Danco A, Zach A, Bostedt H. (1981).** Bekämpfung der ecthyma contagiosum (Pustular dermatitis) der Schafe mit einem neuen Parenteral-Zellkultur-Lebendimpfstoff. *Zentralblatt Veterinärmedizin B.* 28: 535-552.
- Mayr A, Buttner M, Wolf G, Meyer H, Czerny C. (1989).** Experimental detection of the paraspecific effects of purified and inactivated poxviruses. *Zentralbl Veterinarmed B.* 36:81-99.
- McInnes CJ, Wood AR, Mercer AA. (1998).** Orf virus encodes a homolog of the vaccinia virus interferon-resistance gene E3L. *Virus Genes.* 17:107-15.

- McInnes CJ, Wood AR, Nettleton PF, Gilray JA. (2001).** Genomic comparison of an avirulent strain of orf virus with that of a virulent wild type isolate reveals that the orf virus G2L gene is non-essential for replication. *Virus Genes* 22: 141-150.
- McKeever DJ, Reid HW, Inglis NF, Herring AJ. (1987).** A qualitative and quantitative assessment of the humoral antibody response of the sheep to orf virus infection. *Vet. Microbiol.* 15: 229-241.
- Mercer A, Fraser KM, Barns G, Robinson AJ. (1987).** The structure and cloning of orf virus DNA. *Virology* 157: 1-12.
- Mercer A, Lyttle DJ, Whelan EM, Fleming SB, Sullivan JT. (1995).** The establishment of a genetic map of orf virus reveals a pattern of genomic organization that is highly conserved among divergent poxviruses. *Virology* 212: 698-704.
- Merchlinsky M, Moss B. (1992).** Introduction of foreign DNA into the vaccinia virus genome by in vitro ligation: recombination-independent selectable cloning vectors. *Virology.* 190 :522-526.
- Meseda CA, Elkins KL, Merchlinsky MJ, Weir JP. (2002).** Prime-boost immunization with DNA and modified vaccinia virus ankara vectors expressing herpes simplex virus-2 glycoprotein D elicits greater specific antibody and cytokine responses than DNA vaccine alone. *J Infect Dis.* 186:1065-1073.
- Meyer M, Lanz C, Clauss M, Lepple-Wienhues A, Waltenberger J, Augustin HG, Ziche M, Lenz C, Büttner M, Rziha HJ, Dehio C. (1999).** A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling by VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinase. *EMBO J.* 18: 363-374.
- Meyers G, Rümenapf T, Thiel HJ (1989).** Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus. *Virology* 171: 555-567
- Meyers G, Saalmüller A, Büttner M. (1999).** Mutations abrogating the RNase activity in glycoprotein E(rns) of the pestivirus classical swine fever virus lead to virus attenuation. *J Virol* 73: 10224-10235.
- Michel F, Hoffenbach A, Langlade-Demoyen P, Guy B, Girard M, Lecocq JP, Wain-Hobson S, Kieny MP, Plata F. (1988).** HIV-specific T lymphocyte immunity in mice immunized with a recombinant vaccinia virus. *Eur J Immunol.* 18:1917-1924.
- Moennig V, Floegel-Niessmann G, Greiser-Wilke I. (2003).** Clinical signs and epidemiology of CSF: A review of knowledge. *Vet. Journal.* 165: 11-20.
- Moore AC, Hill AV. (2004).** Progress in DNA-based heterologous prime-boost immunization strategies for malaria. *Immunol Rev.* 199:126-143.
- Moormann RJM, Hulst MM. (1988).** Hog cholera virus: identification and characterization of the viral RNA and the virus-specific RNA synthesized in infected swine kidney cells. *Virus Res* 11: 281-291.

- Moser C, Stettler P, Tratschin JD, Hofmann MA. (1999).** Cytopathogenic and noncytopathogenic RNA replicons of classical swine fever virus. *J Virol.*73: 7787-7794.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. (1986).** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 51:263-73.
- Narita M, Kawashima K, Kimura K, Mikami O, Shibahara T, Yamada S, Sakoda Y. (2000).** Comparative immunohistopathology in pigs infected with highly virulent or less virulent strains of hog cholera virus. *Vet Pathol.* 2000 Sep; 37:402-408.
- Nash P, Barrett J, Cao JX, Hota-Mitchell S, Lalani AS, Everett H, Xu XM, Robichaud J, Hnatiuk S, Ainslie C, Seet BT, McFadden G. (1999).** Immunomodulation by viruses: the myxoma virus story. *Immunol Rev.*168: 103-20.
- Palmowski MJ, Choi EM, Hermans IF, Gilbert SC, Chen JL, Gileadi U, Salio M, Van Pel A, Man S, Bonin E, Liljestrom P, Dunbar PR, Cerundolo V. (2002).** Competition between CTL narrows the immune response induced by prime-boost vaccination protocols. *J Immunol.* 168:4391-4398.
- Paton DJ, McGoldrick A, Belak S, Mittelholzer C, Koenen F, Vanderhallen H, Biagetti M, De Mia GM, Stadejek T, Hofmann MA, Thuer B. (2000).** Classical swine fever virus: a ring test to evaluate RT-PCR detection methods. *Vet Microbiol.*73:159-74.
- Pauly T, Elbers K, König M, Lengsfeld T, Saalmüller A, Thiel H J (1995).** Classical swine fever virus-specific cytotoxic T lymphocytes and identification of a T cell epitope. *J Gen Virol* 76, 3039-3049.
- Pauly T, Weiland E, Hirt W, Dreyer-Bux C, Maurer S, Summerfield A, Saalmuller A. (1996).** Differentiation between MHC-restricted and non-MHC-restricted porcine cytolytic T lymphocytes. *Immunology.* 88:238-246.
- Pauly T, König M, Thiel HJ, Saalmüller A. (1998).** Infection with classical swine fever virus: effects on phenotype and immune responsiveness of porcine T lymphocytes. *J Gen Virol.* 79:31-40
- Pescovitz MD, Lunney JK, Sachs DH. (1984).** Preparation and characterization of monoclonal antibodies reactive with porcine PBL. *J Immunol.* 133:368-35.
- Peeters B, Bienkowska-Szewczyk K, Hulst M, Gielkens A, Kimman T. (1997).** Biologically safe, non-transmissible pseudorabies virus vector vaccine protects pigs against both Aujeszky's disease and classical swine fever. *J Gen Virol* 78, 3311-3315.
- Peters W, Greiser-Wilke I, Moennig V, Liess B. (1986).** Preliminary serological characterization of bovine viral diarrhoea virus strains using monoclonal antibodies. *Vet Microbiol.* 12:195-200.
- Pfleiderer M, Falkner FG, Dorner F. (1995).** A novel vaccinia virus expression system allowing construction of recombinants without the need for selection markers, plasmids and bacterial hosts. *J Gen Virol.* 76:2957-2962.

- Piriou L, Hutet E, Chevallier S, Saintilan AF, Legal S, Le Potier MF. (2000).** Protection against classical swine fever virus infection conferred by antibodies or T-lymphocytes after transfer in inbred pigs. 5th. Int. Congress of ESVV.
- Piriou L, Chevallier S, Hutet E, Charley B, Le Potier MF, Albina E. (2003).** Humoral and cell-mediated immune responses of d/d histocompatible pigs against classical swine fever (CSF) virus. *Vet Res.* 34:389-404.
- Prieur E, Gilbert SC, Schneider J, Moore AC, Sheu EG, Goonetilleke N, Robson KJ, Hill AV. (2004).** A Plasmodium falciparum candidate vaccine based on a six-antigen polyprotein encoded by recombinant poxviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:290-295.
- Ramirez JC, Gherardi MM, Esteban M. (2000).** Biology of attenuated modified vaccinia virus Ankara recombinant vector in mice: virus fate and activation of B- and T-cell immune responses in comparison with the Western Reserve strain and advantages as a vaccine. *J Virol.* 2000. 74:923-933.
- Ramsay AJ, Kent SJ, Strugnell RA, Suhrbier A, Thomson SA, Ramshaw IA. (1999).** Genetic vaccination strategies for enhanced cellular, humoral and mucosal immunity. *Immunol Rev.* 171:27-44.
- Ramsay AJ, Leong KH, Ramshaw IA (1997).** DNA vaccination against virus infection and enhancement of antiviral immunity following consecutive immunization with DNA and viral vectors. *Immunol. Cell Biol.* 75: 382-388.
- Ramshaw IA, Ramsay AJ. (2000).** The prime-boost strategy: Exciting prospects for improved vaccination. *Immunol. Today* 21: 163-165.
- Redfield RR, Wright DC, James WD, Jones TS, Brown C, Burke DS. (1987).** Disseminated vaccinia in a military recruit with human immunodeficiency virus (HIV) disease. *N Engl J Med.* 316:673-676.
- Reimann I, Depner K, Trapp S, Beer M. (2004).** An avirulent chimeric Pestivirus with altered cell tropism protects pigs against lethal infection with classical swine fever virus. *Virology.* 322:143-157
- Reverts H, Pynaert G, Grooten J, De Baetselier P. (2004).** Lipoprotein I, a TLR2/4 ligand modulates Th2-driven allergic immune responses. *J Immunol.* 174:1097-1103.
- Ridpath JF, Bolin SR, Dubovi EJ. (1994).** Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. *Virology.* 205:66-74.
- Robinson AJ, Lyttle DJ. (1992).** Parapoxviruses: Their biology and potential as recombinant vaccines. In: Binns, M.M., Smith, G.L. (Eds.), *Recombinant poxviruses.* CRC Press Inc., Boca Raton, FL, pp. 285-327.
- Rodriguez-Carreno MP, Lopez-Fuertes L, Revilla C, Ezquerra A, Alonso F, Dominguez J. (2002).** Phenotypic characterization of porcine IFN-gamma-producing lymphocytes by flow cytometry. *J Immunol Methods.* 259:171-179.

- Rose C, Starostik P, Brocker EB. (1999).** Infection with parapoxvirus induces CD30-positive cutaneous infiltrates in humans. *J Cutan Pathol.* 26:520-522.
- Rowell JF, Ruff AL, Guarnieri FG, Staveley-O'Carroll K, Lin X, Tang J, August JT, Siliciano RF. (1995).** Lysosome-associated membrane protein-1-mediated targeting of the HIV-1 envelope protein to an endosomal/lysosomal compartment enhances its presentation to MHC class II-restricted T cells. *J Immunol.* 155:1818-1828.
- Rubinstein S, Familletti PC, Pestka S. (1981).** Convenient assay for interferons. *J Virol.* 37:755-758.
- Ruggli N, Moser C, Mitchell D, Hofmann M, Tratschin JD. (1995).** Baculovirus expression and affinity purification of protein E2 of classical swine fever Alfort/187. *Virus Genes.* 10:115-126.
- Ruggli N, Tratschin JD, Schweizer M, McCullough KC, Hofmann MA, Summerfield A. (2003).** Classical swine fever virus interferes with cellular antiviral defense: evidence for a novel function of N(pro). *J Virol.* 77:7645-7654.
- Rumenapf T, Stark R, Meyers G, Thiel HJ. (1991).** Structural proteins of hog cholera virus expressed by vaccinia virus: further characterization and induction of protective immunity. *J Virol* 65, 589-597.
- Rziha HJ, Henkel M, Cottone R, Bauer B, Auge U, Götz F, Pfaff E, Röttgen M, Dehio C, Büttner M. (2000).** Generation of recombinant parapoxviruses: non-essential genes suitable for insertion and expression of foreign genes. *J. Biotechnol.* 83: 137-145.
- Rziha HJ, Henkel M, Cottone R, Meyer M, Dehio C, Büttner M. (1999).** Parapoxviruses: potential alternative vectors for directing the immune response in permissive and non-permissive hosts. *J Biotechnol.* 73:235-242.
- Samraus HH. (1987).** Atlas der Nutztierassen. Ulmer Verlag, Stuttgart, 2nd Edition
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. (1977).** DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- Santra S, Barouch DH, Koriath-Schmitz B, Lord CI, Krivulka GR, Yu F, Beddall MH, Gorgone DA, Lifton MA, Miura A, Philippon V, Manson K, Markham PD, Parrish J, Kuroda MJ, Schmitz JE, Gelman RS, Shiver JW, Montefiori DC, Panicali D, Letvin NL. (2004).** Recombinant poxvirus boosting of DNA-primed rhesus monkeys augments peak but not memory T lymphocyte responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:11088-11093.
- Savory LJ, Stacker SA, Fleming SB, Niven BE, Mercer A. (2000).** Viral vascular endothelial growth factor plays a critical role in orf virus infection. *J. Virol.* 74:10699-10706.
- Scagliarini A, Gallina L, Dal Pozzo F, Battilani M, Ciulli S, Prosperi S. (2004).** Heparin binding activity of orf virus F1L protein. *Virus Res.* 105:107-112.

Schjetne KW, Thompson KM, Nilsen N, Flo TH, Fleckenstein B, Iversen JG, Espevik T, Bogen B. (2003). Cutting edge: link between innate and adaptive immunity: Toll-like receptor 2 internalizes antigen for presentation to CD4+ T cells and could be an efficient vaccine target. *J Immunol.* 171:32-36.

Schneider R, Unger G, Stark R, Schneider-Scherzer E, Thiel HJ. (1993). Identification of a structural glycoprotein of an RNA virus as a ribonuclease. *Science.* 261(5125):1169-71.

Smith GL, Moss B. (1983). Infectious poxvirus vectors have capacity for at least 25 000 base pairs of foreign DNA. *Gene.* 1983 Nov;25:21-28

Smith KA, Stallard V, Roos JM, Hart C, Cormier N, Cohen LK, Roberts BE, Payne LG. (1993). Host range selection of vaccinia recombinants containing insertions of foreign genes into non-coding sequences. *Vaccine.* 11:43-53.

Smith CL, Dunbar PR, Mirza F, Palmowski MJ, Shepherd D, Gilbert SC, Coulie P, Schneider J, Hoffman E, Hawkins R, Harris AL, Cerundolo V. (2005). Recombinant modified vaccinia Ankara primes functionally activated CTL specific for a melanoma tumor antigen epitope in melanoma patients with a high risk of disease recurrence. *Int J Cancer.* 113:259-266.

Somogyi P, Frazier J, Skinner MA. (1993). Fowlpox virus host range restriction: gene expression, DNA replication and morphogenesis in nonpermissive mammalian cells. *Virology.* 197:439-444.

Southern E. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.

Spehner D, De Carlo S, Drillien R, Weiland F, Mildner K, Hanau D, Rziha HJ. (2004). Appearance of the bona fide spiral tubule of ORF virus is dependent on an intact 10-kilodalton viral protein. *J Virol.* 2004. 78:8085-8093.

Staib C, Drexler I, Sutter G. (2004). Construction and isolation of recombinant MVA. *Methods Mol Biol.* 269:77-100.

Stark R, Meyers G, Rümenapf T, Thiel HJ. (1993). Processing of pestiviral polyprotein: cleavage site between autoprotease and nucleocapsid protein of classical swine fever virus. *J Virol* 67, 7088-7095.

Stark R, Rümenapf T, Meyers G, Thiel HJ. (1990). Genomic localization of hog cholera virus glycoproteins. *Virology* 174, 286-289.

Stickl H, Hochstein-Mintzel V. (1971). Intracutaneous smallpox vaccination with a weak pathogenic vaccinia virus ("MVA virus") *Munch Med Wochenschr.* 113:1149-1153.

Stittelaar KJ, Kuiken T, de Swart RL, van Amerongen G, Vos HW, Niesters HG, van Schalkwijk P, van der Kwast T, Wyatt LS, Moss B, Osterhaus AD. (2001). Safety of modified vaccinia virus Ankara (MVA) in immune-suppressed macaques. *Vaccine.* 19:3700-3709.

- Subbramanian RA, Kuroda MJ, Charini WA, Barouch DH, Costantino C, Santra S, Schmitz JE, Martin KL, Lifton MA, Gorgone DA, Shiver JW, Letvin NL. (2003).** Magnitude and diversity of cytotoxic-T-lymphocyte responses elicited by multiepitope DNA vaccination in rhesus monkeys. *J Virol.* 77:10113-10118.
- Summerfield A, Hofmann MA, McCullough KC. (1998a).** Low density blood granulocytic cells induced during classical swine fever are targets for virus infection. *Vet Immunol Immunopathol.* 63:289-301.
- Summerfield A, Knotig SM, McCullough KC. (1998b).** Lymphocyte apoptosis during classical swine fever: implication of activation-induced cell death. *J Virol.* 72:1853-1861.
- Summerfield A, McNeilly F, Walker I, Allan G, Knoetig SM, McCullough KC. (2001).** Depletion of CD4(+) and CD8(high+) T-cells before the onset of viraemia during classical swine fever. *Vet Immunol Immunopathol.* 78:3-19.
- Suradhat S, Intrakamhaeng M, Damrongwatanapokin S. (2001).** The correlation of virus-specific interferon-gamma production and protection against classical swine fever virus infection. *Vet Immunol Immunopathol.* 83:177-189.
- Suradhat S, Damrongwatanapokin S. (2003).** The influence of maternal immunity on the efficacy of a classical swine fever vaccine against classical swine fever virus, genogroup 2.2, infection. *Vet Microbiol.* 92:1871-94.
- Susa M, König M, Saalmüller A, Reddehase MJ, Thiel HJ. (1992).** Pathogenesis of classical swine fever: B-lymphocyte deficiency caused by hog cholera virus. *J Virol* 66, 1171-1175.
- Sutter G, Moss B. (1992).** Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 89: 10847-10851.
- Tartaglia J, Perkus ME, Taylor J, Norton EK, Audonnet JC, Cox WI, Davis SW, van der Hoeven J, Meignier B, Riviere M, et al. (1992).** NYVAC: a highly attenuated strain of vaccinia virus. *Virology.* 188(1):217-232.
- Taracha EL, Bishop R, Musoke AJ, Hill AV, Gilbert SC. (2003).** Heterologous priming-boosting immunization of cattle with Mycobacterium tuberculosis 85A induces antigen-specific T-cell responses. *Infect Immun.* 71(12):6906-6914.
- Terpstra C, Wensvoort G. (1988).** The protective value of vaccine-induced neutralising antibody titres in swine fever. *Vet Microbiol* 16, 123-128.
- Terzic S, Jemersic L, Lojkic M, Sver L, Valpotic I, Orsollic N, Humski A, Cvetnic Z. (2004).** Leukocyte subsets and specific antibodies in pigs vaccinated with a classical swine fever subunit (E2) vaccine and the attenuated ORF virus strain D1701. *Acta Vet Hung.* 52(2):151-161.
- Thiel HJ, Stark R, Weiland E, Rümenapf T, Meyers G. (1991).** Hog cholera virus: Molecular composition of virions from a pestivirus. *J Virol* 65, 4705-4712.

Vajdy M, Singh M, Kazzaz J, Soenawan E, Ugozzoli M, Zhou F, Srivastava I, Bin Q, Barnett S, Donnelly J, Luciw P, Adamson L, Montefiori D, O'Hagan DT. (2004).

Mucosal and systemic anti-HIV responses in rhesus macaques following combinations of intranasal and parenteral immunizations. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 20(11):1269-1281.

van Gennip HG, van Rijn PA, Widjojoatmodjo MN, de Smit AJ, Moormann RJ. (2000).

Chimeric classical swine fever viruses containing envelope protein E(RNS) or E2 of bovine viral diarrhoea virus protect pigs against challenge with CSFV and induce a distinguishable antibody response. *Vaccine*. 2000 19(4-5):447-459.

van Gennip HG, Vlot AC, Hulst MM, De Smit AJ, Moormann RJ. (2004). Determinants of virulence of classical swine fever virus strain Brescia. *J Virol*. 78(16):8812-8823.

van Oirschot JT, Terpstra CA. (1977). A congenital persistent swine fever infection. *Vet. Microb*. 2, 121-142

van Rijn PA, Bossers A, Wensvoort G, Moormann RJM. (1996). Classical swine fever virus (CSFV) envelope glycoprotein E2 containing one structural antigenic unit protects pigs from lethal CSFV challenge. *J. Gen. Virol*. 77, 2737-2745.

van Zijl M, Wensvoort G, de Kluyver E, Hulst M, van der Gulden H, Gielkens A, Berns A, Moormann RJM. (1991). Live attenuated pseudorabies virus expressing envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus protects swine against both pseudorabies and hog cholera. *J Virol* 65, 2761-2765.

Vazquez-Blomquist D, Quintana D, Duarte CA. (2004). Modified-vaccinia-virus-Ankara (MVA) priming and fowlpox-virus booster elicit a stronger CD8+ T-cell response in mice against an HIV-1 epitope than does a DNA/poxvirus prime-booster approach. *Biotechnol Appl Biochem*. 39(Pt 3):313-318.

Vilcek S. (1994). Development of PCR tests for the detection of bovine herpesvirus-1, bovine respiratory syncytial viruses and pestiviruses *Vet Med (Praha)*; 39(11):687-700.

Vordermeier HM, Rhodes SG, Dean G, Goonetilleke N, Huygen K, Hill AV, Hewinson RG, Gilbert SC. (2004). Cellular immune responses induced in cattle by heterologous prime-boost vaccination using recombinant viruses and bacille Calmette-Guerin. *Immunology*. 112(3):461-470.

Vuola JM, Keating S, Webster DP, Berthoud T, Dunachie S, Gilbert SC, Hill AV. (2005). Differential immunogenicity of various heterologous prime-boost vaccine regimens using DNA and viral vectors in healthy volunteers. *J Immunol*. 174(1):449-455.

Wang M, Bronte V, Chen PW, Gritz L, Panicali D, Rosenberg SA, Restifo NP. (1995). Active immunotherapy of cancer with a nonreplicating recombinant fowlpox virus encoding a model tumor-associated antigen. *J Immunol*. 1995 154(9):4685-4692.

Wang Z, Nie Y, Wang P, Ding M, Deng H. (2004). Characterization of classical swine fever virus entry by using pseudotyped viruses: E1 and E2 are sufficient to mediate viral entry. *Virology*. 2004 5;330(1):332-341.

Warrell MJ, Suntharasamai P, Nicholson KG, Warrell DA, Chanthavanich P, Viravan C, Sinhaseni A, Phanfung R, Xueref C, Vincent-Falquet JC. (1984). Multi-site intradermal and multi-site subcutaneous rabies vaccination: improved economical regimens. *Lancet*. 1(8382):874-876.

Weiland E, Ahl R, Stark R, Weiland F, Thiel HJ. (1992). A second envelope glycoprotein mediates neutralization of a pestivirus, hog cholera virus. *J. Virol.* **66**, 3677-3682.

Weiland E, Stark R, Haas B, Rumenapf T, Meyers G, Thiel HJ. (1990). Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer. *J Virol* 64, 3563-3569.

Wengler G, Bradley DW, Collet MS, Heinz FX, Schlesinger RW, Strauss JH. (1995). Flaviviridae. In *Virus Taxonomy*. Sixth report of the international committee of taxonomy of viruses New York; Springer

Wienhold D. (2002). DNA-Vakzinierung gegen classical swine fever virus-Einfluß von Immunstimulatoren auf die Effizienz. Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

Windisch JM, Schneider R, Stark R, Weiland E, Meyers G, Thiel HJ. (1996). RNase of classical swine fever virus: biochemical characterization and inhibition by virus-neutralizing monoclonal antibodies. *J Virol.* 70(1):352-358.

Wiskerchen M, Collet MS. (1991). Pestivirus gene expression-protein p80 of bovine viral diarrhea virus is a proteinase involved in polyprotein processing. *Virology* 184, 341-350.

Wittek R. (1982). Organization and expression of the poxvirus genome. *Experientia.* ;38(3):285-297.

Woodberry T, Gardner J, Elliott SL, Leyrer S, Purdie DM, Chaplin P, Suhrbier A. (2003). Prime boost vaccination strategies: CD8 T cell numbers, protection, and Th1 bias. *J Immunol.* 170(5):2599-2604.

Woodland DL. (2004). Jump-starting the immune system: prime-boosting comes of age. *Trends Immunol.* 25(2):98-104.

Yirrell DL, Reid HW, Norval M, Miller HRP. (1991a). Qualitative and quantitative changes in ovine afferent lymph draining the site of epidermal orf virus infection. *Vet. Dermatol.* 2: 133-138.

Yirrell DL, Reid HW, Norval M, Entrican G, Miller HRP. (1991b). Response of efferent lymph and popliteal lymph node to epidermal infection of sheep with orf virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 28: 219-235.

Xiao M, Zhang CY, Pan ZS, Wu HX, Guo JQ. (2002). Classical swine fever virus NS5B-GFP fusion protein possesses an RNA-dependent RNA polymerase activity. *Arch Virol.* 147(9):1779-1787.

Xu J, Mendez E, Caron PR, Lin C, Murcko MA, Collett MS, Rice CM. (1997). Bovine viral diarrhoea virus NS3 serine proteinase: polyprotein cleavage sites, cofactor requirements, and molecular model of an enzyme essential for pestivirus replication. *J Virol.* 71(7):5312-5322.

8 Anhang

Verzeichnis der Abkürzungen

α	alpha
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	American Type Culture Collection
Bluo-Gal	hologeniertes Indolyl- β -D-Galactosid
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
γ	gamma
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
CD	Cluster of Differentiation
Ci	Curie
cpe	cytopathogener Effekt
CTL	cytotoxische T-Lymphozyten
Da	Dalton
dCTP	2'-Desoxy-Cytidin-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FBS	fötales bovines Serum
g	Gramm bzw. relative Zentrifugalbeschleunigung
GIF	GM-CSF-inhibitorischer Faktor
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating-Factor
h	Stunde
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
ITR	Inverted Terminal Repeats
kb(p)	Kilobasen(paare)
kDa	Kilodalton
l	Liter
m	milli
M	Molaritätseinheit
MCS	multiple cloning site
MEM	Minimal Essential Medium
μg	Mikrogramm
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute
MOI	multiplicity of infection (Infektionsdosis)
mRNA	messenger RNA
MVA	modified vaccinia virus Ankara

Anhang

ng	Nanogramm
NK	Zelle Natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
Nt	Nukleotid
O.D.	optische Dichte
ORFV	Orf Virus
p	Plasmid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
Pen	Penicillin
p.i.	post infectionem
POD	Peroxidase
PPV	Parapoxvirus
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur/ Reverse Transkription
s.	siehe
SSC	Standard Saline Citrat
SSPE	Standard Saline-Phosphat-EDTA
Strep	Streptomycin
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEAB	Triethanolamin-Puffer
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
Th-Zelle	T-Helferzelle
TK	Thymidinkinase
Tm	Schmelztemperatur
Tris	Trishydroxymethylaminoethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
VACV	Vaccinia Virus
vegf	vascular endothelial growth factor
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
w/v	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit
ZNS	Zentralnervensystem
%	Prozent

Für die Bezeichnung von Nukleotiden und Aminosäuren wurden die international gebräuchlichen IUB-Einbuchstaben-Codes verwendet.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Heiner Voigt
Wohnort: Waldeckstrasse 2
72074 Tübingen
Geburtsdatum: 28. Februar 1977
Geburtsort: Mönchengladbach
Familienstand: ledig

Ausbildung:

1983-1987 Gemeinschaftsgrundschule Jüchen
1987-1996 Städt. Gymnasium Mönchengladbach-Odenkirchen
1996 Allgemeine Hochschulreife (Abitur)
1997-2002 Studium der Veterinärmedizin an der
Tierärztliche Hochschule Hannover
2002 Approbation als Tierarzt

Beruflicher Werdegang:

2003-2005 Anfertigung der vorgelegten Promotionsarbeit am
Institut für Immunologie,
Friedrich-Loeffler-Institut (FLI)
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Mathias Büttner