

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Oskar-Rüger Kaaden

**Untersuchung der
immunsierenden Eigenschaften
von MVA-exprimiertem Nichtstrukturprotein 3 (NS3)
des Virus der Bovinen Virusdiarrhoe (BVDV)
im Rind**

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

von
Ilona Moßbrugger
aus
Bräunlingen

München 2005

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle

Referent: Univ.-Prof. Dr. O.R. Kaaden

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. K. Pfister

Tag der Promotion: 11. Februar 2005

Meinen Eltern

1. Einleitung	1
2. Schrifttum	2
2.1. Das Genus <i>Pestivirus</i>	2
2.2. Aufbau und Genomstruktur der Pestiviren	5
Sequenzabschnitte und Proteine der Pestiviren	6
5'-nicht translatierte Region (5'-UTR)	6
N-terminale Autoprotease Npro (p20)	7
Kapsidprotein (C; p14)	7
Hüllprotein 0 mit Ribonukleaseaktivität (<u>E</u> nvelope <u>R</u> ibon <u>u</u> clease <u>S</u> oluble = E ^{ms} ; E0; gp48)	8
Hüllprotein 1 (Envelope1 = E1; gp 25)	9
Hüllprotein 2 (Envelope2 = E2; gp53)	9
Nichtstrukturprotein p7	10
Nichtstrukturprotein 2/3 (NS2/3; p125) bzw. Nichtstrukturprotein 2 und 3 (NS2; p54 und NS3; p80)	11
Nichtstrukturproteine 4a und 4b (NS4a; p10 und NS4b; p32) sowie 5a und 5b (NS5a; p58 und NS5b; p75)	13
3'-nicht translatierte Region (3'-UTR)	14
2.3. Der Replikationszyklus der Pestiviren	14
2.4. Immunität gegen Pestiviren	16
2.4.1. Infektionsimmunität	16
Humorale Immunantwort	17
Zelluläre Immunantwort	19
2.4.2. BVDV-Vakzinen	21
Vakzinen mit BVD-Viren, die sich im Tier vermehren (Lebendimpfstoffe)	21

Impfstoffe mit nicht vermehrungsfähigen BVD-Viren (inaktivierte Vakzinen)	22
Experimentelle „neue“ Impfstoffprototypen	24
2.5. Das Modifizierte Vacciniavirus Ankara (MVA) als Vektorvakzine	26
3. Material und Methoden	30
3.1. Zellkulturen	30
3.1.1. Bovine Embryonale Lungenfibroblasten (BEL)	30
3.1.2. Bovine Hodenzellen	31
3.1.3. Hühnerembryofibroblasten (HEF)	31
3.1.4. MA-104-Zellen	32
3.2. Viren	33
3.2.1. BVDV-PT810	33
3.2.2. Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA)	33
3.2.3. Vacciniavirus München 1 (VV-M1)	33
3.3. Virusherstellung	34
3.3.1. Vermehrung von BVDV-PT810 auf BEL	34
3.3.2. Virusvermehrung auf HEF	34
3.3.3. Virustiterbestimmung	35
3.3.3.1. Bestimmung des Titers von BVDV-PT810	35
3.3.3.2. Bestimmung des Titers des rekombinanten MVA	35
3.3.4. Herstellung von Kontroll-Zellkulturüberständen (Mock)	36
3.4. Tiere und Immunisierung	36
3.4.1. Rekombinantes MVA für die Immunisierung	37
3.4.2. Tiergruppen	37
3.4.3. Testinfektion mit BVDV-Ic-PT810	38
3.4.4. Probenentnahme, Bearbeitung und Lagerung	39

3.5. Isolierung von Leukozyten aus dem peripheren Blut	40
3.5.1. Ammoniumchloridlyse	40
3.5.2. Dichtezentrifugation	40
3.5.3. Differenzierung und Auszählung der Blutzellpopulationen	41
3.6. Stimulationsprotokolle für bovine Leukozyten	42
3.6.1. Stimulation in stehenden Zellkulturflaschen	42
3.6.2. Stimulation in 24-Loch-Zellkulturplatten	42
3.6.3. Stimulierung mit BVDV-PT810	43
3.6.4. Stimulierung mit inaktiviertem BVDV-PT810	43
3.6.5. Stimulierung mit Kontrollüberstand	43
3.6.6. Mitogene Stimulation mit Concanavalin A (ConA)	44
3.7. Durchflusszytometrie	44
3.8. Darstellung von intrazellulären Antigenen	46
Nachweis von BVDV-NS2/3 in den Zellen	46
3.9. Zytotoxizitätstest	47
3.9.1. Herstellung der BVDV-infizierten Zielzellen (Targetzellen, Targets)	47
3.9.2. Herstellung BVDV-spezifischer Effektorzellen	47
3.9.3. Protokoll des Zytotoxizitätstestes (<i>cytotoxic T-lymphocyte</i>-Test, CTL-Test)	48
3.10. Proliferationstest mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (CFSE)	50
3.11. <i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i> (Real Time PCR) zur Quantifizierung von Interleukinen	52
3.12. <u>E</u>nzyme <u>L</u>inked <u>I</u>mmunosorbent <u>A</u>ssays (ELISAs)	56
3.12.1. BVDV-NS3-spezifischer Antikörper-ELISA	56
3.12.2. ELISA zum Nachweis von bovinem Gamma-Interferon (γ- IFN)	56

3.13. FACS-Immunfluoreszenz-Inhibitions-Test (FACS-IFI)	56
3.14. Nachweis BVDV-spezifischer Antikörper im Serumneutralisationstest	58
3.15. Plaquereduktionstest	59
3.16. Statistische Auswertung	60
4. Ergebnisse	61
4.1. MVA-Antikörpernachweis und Nachweis nicht neutralisierender Antikörper gegen das BVDV-NS3-Protein	61
4.1.1. MVA-Antikörpernachweis	61
4.1.2. Induktion von NS3-Antikörpern	63
4.1.2.1. Ergebnisse des NS3-Blocking-ELISAs	63
4.1.2.2. FACS-Immunfluoreszenz-Inhibitions-Test	66
4.2. BVD-Virusisolierung und Serumneutralisation der Versuchstiere nach der Testinfektion	69
4.2.1. Virusisolierung	69
4.2.2. BVDV-neutralisierende Antikörper nach Testinfektion mit BVDV-PT810	71
4.3. Veränderung der Gesamtleukozytenzahl im peripheren Blut nach Infektion mit BVDV-PT810	74
4.4. Klinische Erkrankung	75
4.5. Nachweis BVDV-spezifischer zellulärer Immunität	75
4.5.1. Nachweis einer Lymphozytenproliferation mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes CFSE	75
4.5.2. Zytotoxizitätstest	80
4.5.2.1. Befunde an Effektorzellen nach Restimulation mit BVDV-PT810	80
4.5.2.2. Befunde an Zielzellen	80
4.5.2.3. <i>In vitro</i> -Nachweis zytotoxischer Lymphozyten aus dem peripheren Blut der Rinder	80

4.6.	Quantitativer Nachweis der bovinen Interleukine 2 und 4	84
4.7.	Nachweis von bovinem γ -Interferon	87
5.	Diskussion	88
5.1.	BVDV-NS3-rekombinantes MVA als Vektorsystem zur Immunisierung gegen BVDV	88
5.2.	Charakterisierung von BVDV-NS3-rekombinatem MVA im Tierversuch	89
5.3.	Virusisolierung, Leukozytenpopulationen und BVDV-spezifische neutralisierende Antikörper p.inf.	92
5.4.	BVDV-spezifische zelluläre Immunantwort	94
5.4.1.	Induktion einer proliferativen Immunantwort durch das rekombinante BVDV-NS3-MVA	95
5.4.2.	Charakterisierung der zytotoxischen Aktivität nach Immunisierung mit BVDV-NS3-rekombinatem MVA	97
5.4.3.	Zytokinprofil nach Immunisierung mit rekombinatem BVDV-NS3-MVA und nachfolgender BVDV-Infektion	100
6.	Zusammenfassung/Summary	103
7.	Literatur	107
8.	Anhang	134
8.1.	Materialliste	134
8.1.1.	Geräte und Laborhilfsmittel	134
8.1.2.	Enzyme	137
8.1.3.	Kommerzielle Kits	137
8.1.4.	Zellen	137
8.1.5.	Chemikalien, Puffer und Lösungen	138
8.2.	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	143

1. Einleitung

Die Bovine Virusdiarrhoe/*Mucosal Disease* (BVD/MD) ist eine weltweit verbreitete Infektionskrankheit, die in der Rinderhaltung große wirtschaftliche Verluste verursacht. In Abhängigkeit vom Infektionszeitpunkt und dem Immunstatus des Tieres kann eine Infektion zu einer Vielfalt von Krankheitserscheinungen führen. Postnatale Infektionen immunkompetenter Tiere gehen meist mit milden Krankheitssymptomen einher oder verlaufen klinisch inapparent. Wird hingegen ein nicht immunkompetenter Fetus infiziert, kann dies zu erheblichen Schädigungen führen. Das Spektrum der Symptome reicht von der Geburt lebensschwacher, in der Entwicklungsfähigkeit eingeschränkter Kälber bis hin zu Missbildungen, zentralnervösen Schädigungen und dem Absterben der Feten. Erfolgt die diaplazentare Infektion im ersten Drittel der Trächtigkeit, kann es durch Ausbildung einer Immuntoleranz des Fetus zur Entstehung von persistent infizierten Tieren (PI-Tieren) kommen. Diese PI-Tiere können an der tödlich verlaufenden *Mucosal Disease* erkranken und stellen den Hauptvektor im epizootiologischen Geschehen dieser Rinderkrankheit dar, da sie das Virus mit hoher Effizienz horizontal und vertikal übertragen. Bekämpfungsmaßnahmen konzentrieren sich deshalb auf die Diagnose und die Eliminierung solcher PI-Tiere. Durch den Einsatz konventioneller Impfstoffe vor der Gravidität soll die Übertragung des Virus auf den Fetus verhindert werden. Für diesen Zweck stehen kommerziell erhältliche Lebendvakzinen und inaktivierte Impfstoffe zur Verfügung. Vakzinen, die sich systemisch im Tier vermehren, bauen einen über Jahre belastbaren Infektionsschutz auf. Das Impfvirus wird allerdings ausgeschieden und kann somit auf naive, trächtige Tiere übertragen werden. Inaktivierte Impfstoffe schließen eine Kontaktinfektion aus, bieten aber nur einen unbefriedigenden Schutz vor einer diaplazentaren Infektion des Fetus. In dieser Arbeit sollte die Funktion einer lebenden BVDV-Vektorvakzine, die die Vorzüge der Lebendimpfstoffe (Wirkung) mit denen der inaktivierten Vakzinen (Sicherheit) vereint, im Tierversuch überprüft werden. Zum Einsatz kam ein BVDV-NS3-rekombinantes Modifiziertes Vacciniavirus Ankara (MVA). Die Untersuchungen konzentrierten sich insbesondere auf die zelluläre Immunantwort, da Studien darauf hinweisen, dass sich Epitope für die bereits nachgewiesenen BVDV-spezifischen, *Major Histocompatibility Complex*- (MHC) restringierten zytotoxischen T-Zellen (Beer, 1995) innerhalb des Nichtstrukturproteins 3 (NS3) befinden (Reddy *et al.*, 1999). Bisher konnten Epitope für zytotoxische T-Zellen innerhalb dieses Nichtstrukturproteins nur für das Virus der klassischen Schweinepest, Flavi- und Hepaciviren detektiert werden (Pauly *et al.*, 1995; Lobigs *et al.*, 1994; Erickson *et al.*, 1993; Kurokohchi *et al.*, 1996).

2. Schrifttum

2.1. Das Genus *Pestivirus*

Das Virus der Bovinen Virusdiarrhoe (BVDV) gehört mit seinen zwei Virusspezies BVDV-I und BVDV-II, dem Virus der klassischen Schweinepest (*classical swine fever virus* = CSFV) und dem *Border Disease Virus* (BDV) der Schafe, zum Genus *Pestivirus* innerhalb der Familie *Flaviviridae* (van Regenmortel *et al.*, 2000). Die Familie der *Flaviviridae* umfasst neben den Pestiviren zwei weitere Genera, das Genus *Flavivirus* mit dem Gelbfiebervirus als Prototyp, sowie das Genus *Hepacivirus* mit dem Hepatitis C-Virus (HCV) als wichtigsten Vertreter. Die drei Genera weisen deutliche Übereinstimmungen in ihrer Genomstruktur auf (Collett *et al.*, 1988a). Sie besitzen ein einzelsträngiges RNA-Genom mit positiver Polarität und einen offenen Leserahmen (ORF, *open reading frame*) (Collett *et al.*, 1988a; Chambers *et al.*, 1990; Lindenbach und Rice, 2001). Der Replikationszyklus ist ebenfalls identisch (Deng und Brock, 1992). Da BVD-Viren einen dem Hepatitis C-Virus sehr ähnlichen Aufbau im Bereich der Gene für die Nichtstrukturproteine und damit den für die Virusreplikation verantwortlichen Strukturen besitzen, stellen sie ein wichtiges Modellsystem für die in Zellkultur bisher nicht vermehrbaren Hepatitis C-Viren dar (Miller und Purcell, 1990). In Tab. 1 sind die Eigenschaften der drei Genera vergleichend dargestellt.

Die Eingliederung der Pestivirusvertreter in die ehemals drei Spezies BVDV, CSFV und BDV erfolgte früher anhand des Wirtsspektrums und durch eine serologische Unterteilung mit Hilfe von mono- und polyklonalen Antikörpern (Paton *et al.*, 1995). Da Pestiviren als RNA-Viren mit einem Genom positiver Polarität eine hohe Mutabilität aufweisen, gibt die serologische Differenzierung häufig nur einen Teil der genetischen Variabilität wieder (Donis, 1995). So wird heute die Unterteilung in Spezies, Subgruppen und Isolate mit Hilfe von Genomanalysen vorgenommen. Dabei werden sowohl die gesamte Genomsequenz (Rümenapf *et al.*, 1991a; Ridpath und Bolin, 1997; Becher *et al.*, 1998; Avalos-Ramirez *et al.*, 2001) als auch Teilabschnitte (Thiel *et al.*, 1992; Harasawa *et al.*, 2000; Vilcek *et al.*, 2001; Becher *et al.*, 2003) untersucht und verglichen. Für die Phylogenese der Pestiviren ist insbesondere die Analyse der hochkonservierten Nukleotidsequenz der nicht translatierten Region am 5'-Ende (5'-UTR) des Pestivirusgenoms von Bedeutung (Thiel *et al.*, 1992; Harasawa, 1996; Harasawa und Giangaspero, 1998; Harasawa *et al.*, 2000). Es werden aber auch noch weitere Bereiche des Genoms wie Npro (Roehe *et al.*, 1992; Becher *et al.*, 2003), E2 (Becher *et al.*, 2003) und das 3'-Ende (Vilcek *et al.*, 1999b) für die Differenzierung

genutzt. Die beiden BVDV-Spezies und auch die anderen Vertreter des Genus *Pestivirus* lassen sich durch weiterführende Genomanalysen in verschiedene Subgruppen einteilen (Harasawa und Giangaspero, 1998; Becher *et al.*, 1999b; Vilcek *et al.*, 2001). So wurden innerhalb der BVDV-I-Spezies bislang 11 genetisch unterschiedliche Subgruppen definiert (Vilcek *et al.*, 2001). Aktuelle phylogenetische Analysen der Genomstruktur verschiedener neuer Pestivirusisolate weisen zudem darauf hin, dass es innerhalb des Genus *Pestivirus* möglicherweise sieben genetische Hauptgruppen gibt. Während die meisten neuen Virusisolate aus Schafen mit dem Rentierstamm-V60 (*Reindeer-1*) verwandt zu sein scheinen, unterscheidet sich ein einziges ovines Isolat (Gifhorn) stark von den schon beschriebenen Pestiviren, BDV eingeschlossen. Zunächst wurde vorgeschlagen, diese Schafisolate wie folgt zu bezeichnen: BDV-1 für die „klassischen“ BDV-Stämme, BDV-2 (V60-ähnliche) und BDV-3 (Gifhorn). Allerdings wurde dieser Vorschlag bei Betrachtung der Wirtsspezies und des ähnlichen Krankheitsverlaufs wieder relativiert, so dass BDV-2 und BDV-3 zusammen mit dem klassischen BDV (BDV-1) als Hauptgenotypen innerhalb der BDV-Spezies angesehen werden können (Becher *et al.*, 2003).

Durch eine Untersuchung von Isolaten in verschiedenen Ländern ließ sich auch eine länderspezifische Verteilung beispielsweise für die BVDV-II-Spezies und ihre Subgruppen nachweisen (Vilcek *et al.*, 1999a; Couvreur *et al.*, 2002; Vilcek *et al.*, 2003). In der Bundesrepublik dominieren die BVDV-II-Subgruppen IIa und IIc (Beer *et al.*, 2002), was durch Analyse und Vergleich der 5'-UTR-Region mit Feldisolaten festgestellt wurde. Die genetische Variabilität innerhalb der beiden BVDV-Spezies führt in der Regel auch zu einer antigenetischen Variation (Wolfmeyer *et al.*, 1997). Problematisch ist hierbei, dass die in Europa auf dem Markt befindlichen BVDV-Vakzinen nur BVDV-I-Stämme enthalten. Lücken im Impfschutz bei Kontakt mit BVDV-II-Stämmen sind daher zu erwarten. Außerdem erschweren die ausgeprägten Differenzen die virologische und serologische Diagnostik, da sich selbst hochkonservierte Virusproteine unterscheiden können (Pellerin *et al.*, 1995).

Tab. 1: Vergleichende Darstellung der drei Genera der Familie *Flaviviridae*

(modifiziert nach Donis, 1995).

Eigenschaften	<i>Pestivirus</i>	<i>Hepacivirus</i>	<i>Flavivirus</i>
Größe und Morphologie der Virionen	40-60 nm, behüllt		
Dichte der Virionen	1,12-1,13 g/ml	1,09-1,11 g/ml	1,15-1,20 g/ml
RNA-Genom	11,5-15,5 Kilobasen, Positivstrang	10 Kilobasen, Positivstrang	11 Kilobasen, Positivstrang
5'-Struktur der RNA	<i>Internal ribosomal entry site (IRES);</i> keine Cap-Struktur	<i>Internal ribosomal entry site (IRES);</i> keine Cap-Struktur	5'-Cap-Struktur
5'-nicht translatierte Region (5'-UTR)	ca. 385 Nukleotide	ca. 320-350 Nukleotide	ca.150 Nukleotide
Leserahmen	ein offener Leserahmen codiert für ca. 4000 Aminosäuren	ein offener Leserahmen codiert für ca. 3000 Aminosäuren	ein offener Leserahmen codiert für ca. 3400 Aminosäuren
3'-Struktur der RNA	kein Poly-A-Rest		
Aufbau der Virushülle	3 Glykoproteine	2 Glykoproteine	1 Glykoprotein
Morphogenese	Endoplasmatisches Retikulum		
Replikation	selbst replizierende Einheit (Replikon), zytoplasmatisch		
Humanpathogen	nein	ja	teilweise
Übertragung durch Insektenvektoren	nein (nur experimentell)	nein	ja (bis auf einzelne Ausnahmen)

2.2. Aufbau und Genomstruktur der Pestiviren

Pestivirusvirionen stellen sich bei elektronenmikroskopischer Betrachtung von Virionen (Bielefeldt und Bloch, 1982) und virusinfizierten Zellen (Gray und Nettleton, 1987) als pleomorphe, sphärische Partikel mit knopfähnlichen Projektionen dar. Sie besitzen einen Durchmesser von 40-60 nm. Eine schematische Darstellung eines Pestivirusvirions findet sich in Abb. 1.

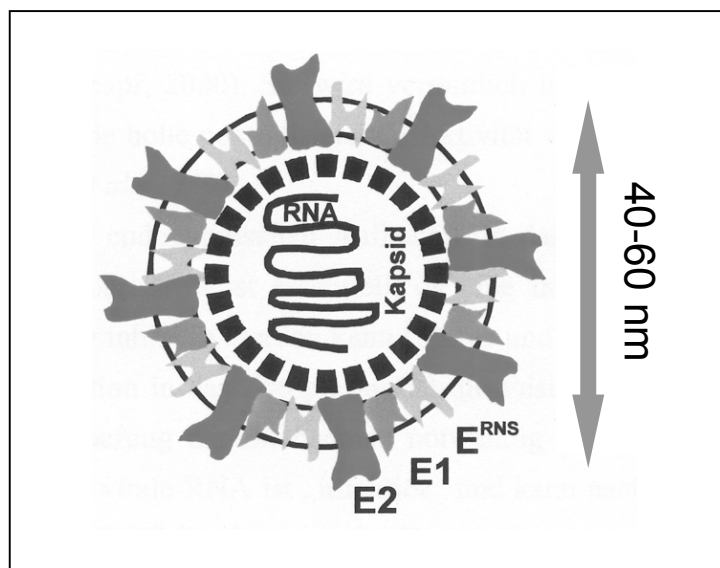


Abb. 1: Schematischer Aufbau von Pestivirusvirionen. Die infektiösen Viren haben einen Durchmesser von 40-60 nm. Sie bestehen aus einer Hülle, die von den drei Glykoproteinen E1, E2 und E^{RNS} gebildet wird und dem *Core* aus Kapsidproteinen (C). Innerhalb des *Core* befindet sich das pestivirale RNA-Genom (Bild: Wolf, unveröffentlicht).

Die Genomstruktur und die Art der codierenden Proteine konnte durch Untersuchung der Proteine aus aufgereinigten Virionen und infizierten Zellen (Donis und Dubovi, 1987a; Donis und Dubovi, 1987c; Weiland *et al.*, 1990; Rügenapf *et al.*, 1991b; Rügenapf *et al.*, 1993), insbesondere aber durch genetische Analysen (Collett, 1987; Collett *et al.*, 1988b; Meyers *et al.*, 1989; Deng und Brock, 1992) aufgeklärt werden. Pestiviren besitzen ein einzelsträngiges RNA-Genom mit positiver Polarität und einer Größe von 11500-15500 Nukleotiden. Ein nicht translaterter Bereich (5'-UTR) von 370-390 Nukleotiden Länge befindet sich am 5'-Ende (Collett *et al.*, 1988b). Dieser Abschnitt dient als *Internal Ribosomal Entry Site* (IRES; Chon

et al., 1998). Anschließend folgt ein ORF, der für ca. 4000 Aminosäuren und 11-12 Proteine codiert (Collett *et al.*, 1988b; Moormann *et al.*, 1990; Thiel *et al.*, 1993). Das nicht codierende 3'-Ende folgt nach dem Stoppsignal und umfasst mehr als 200 Nukleotide (Vilcek *et al.*, 1999b; siehe Abb. 2).

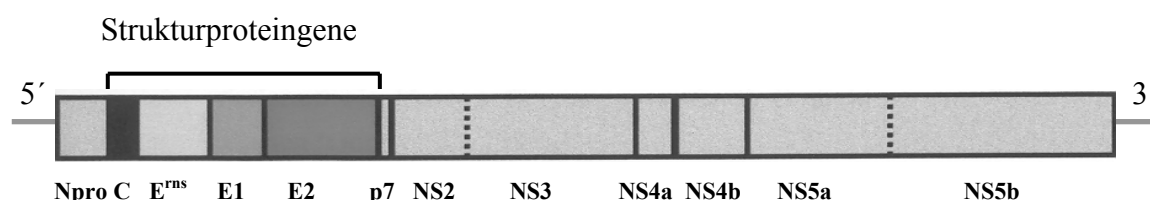


Abb. 2: Schematische Darstellung des Pestivirusgenoms. Die einzelsträngige RNA positiver Polarität hat eine Größe von 11,5-15,5 kb. Die 5'- und 3'-UTR flankieren den ORF. Es werden vier Struktur- und sieben (nichtzytopathogenes BVDV; NS2/3) bzw. acht (zytopathogenes BVDV; NS2 und NS3) Nichtstrukturproteine codiert.

Sequenzabschnitte und Proteine der Pestiviren

5'-nicht translatierte Region (5'-UTR)

Innerhalb der 5'-terminalen, nicht translatierten Region befindet sich die IRES, die die Cap-unabhängige Translation des ORFs ermöglicht (Chon *et al.*, 1998; Pestova und Hellen, 1999; Fletcher *et al.*, 2002; Lyons und Robertson, 2003). Die IRES-Struktur besitzt vermutlich eine t-RNA ähnliche Domäne, da sie mit RNase P gespalten werden kann (Lyons und Robertson, 2003). Ein kleiner Abschnitt der 5'-UTR ermöglicht zudem die Ausbildung von RNA-Sekundär- und Tertiärstrukturen (Fletcher und Jackson, 2002).

Ein Großteil der im Vergleich zu den Flaviviren sehr langen 5'-UTR-Nukleotidsequenz ist innerhalb der Pestiviren hochgradig konserviert. Phylogenetische Analysen und die Art der RNA-Faltung weisen auf eine sehr ähnliche RNA-Struktur der 5'-UTR-Region bei HCV und allen Pestiviren hin (Le *et al.*, 1998). Innerhalb des 5'-Terminus befindet sich zudem eine weitere bifunktionale Struktur, die es der viralen RNA ermöglicht, von der Translation zur Replikation überzuwechseln und umgekehrt (Yu *et al.*, 2000).

N-terminale Autoprotease Npro (p20)

Die N-terminale Autoprotease Npro ist das erste vom ORF codierte Protein und besitzt ein Molekulargewicht von ca. 20 kDa. Es handelt sich um einen neuen Typ viraler Protease (Rümenapf *et al.*, 1998), die sich aufgrund ihrer Funktion als Autoprotease von dem naszierenden Polyprotein selbstständig abspalten kann (Wiskerchen *et al.*, 1991; Muyldermans *et al.*, 1996; Rümenapf *et al.*, 1998). Viren ohne Npro vermehren sich interessanterweise im Tier sehr viel schlechter als der Wildtyp. Für das Wachstum in Zellkultur ist das Npro jedoch nicht essentiell (Tratschin *et al.*, 1998).

Kapsidprotein (C; p14)

Das Nukleokapsidprotein C der Pestiviren ist noch wenig untersucht. Es besteht aus 100 Aminosäuren und ist aufgrund der Anhäufung basischer Aminosäuren (ca. 26 %) vermutlich für die Verpackung des Virusgenoms (siehe Abb. 1) verantwortlich (Donis, 1995). Außerdem spielt das Kapsidprotein für die Translokation der nachfolgenden Proteine in das Endoplasmatische Retikulum (ER) eine wichtige Rolle, denn sein C-terminales Viertel dient als Signalsequenz für die Translokation und als Erkennungssequenz für zelleigene Signalasen (Rümenapf *et al.*, 1993). Durch eine Vakzinierung von Mäusen mit BVDV-Kapsidrekombinanten Adenoviren konnte sowohl eine zelluläre als auch eine humorale Immunantwort induziert werden (Elahi *et al.*, 1999b).

Hüllprotein 0 mit Ribonukleaseaktivität (Envelope Ribonuclease Soluble = E^{rns}; E0; gp48)

Das Hüllprotein 0 stellt einen Teil der aus drei glykosylierten Hüllproteinen bestehenden Pestivirushülle dar (siehe Abb. 1). Hepatitis C-Viren besitzen im Gegensatz zu den Pestiviren nur zwei glykosylierte Hüllproteine und die Flaviviren schließlich nur eins (Donis, 1995). Die drei Hüllproteine wurden früher mit E0, E1, E2 bezeichnet. Eine besondere Eigenschaft des E0 führte jedoch zur Umbenennung. Das E0-Protein besitzt eine ausgeprägte Ribonukleaseaktivität und wird somit heute E^{rns} genannt (Schneider *et al.*, 1993; Hulst *et al.*, 1994). E^{rns}, das 48 kDa groß ist, bildet über kovalente Disulfidbrücken Homodimere und kommt im Virion zusammen mit E1 und E2 (siehe unten) vor (Weiland *et al.*, 1990). Es besitzt keinen transmembralen Anker (Rümenapf *et al.*, 1993). Die Disulfidbrückenbildung findet über neun Cysteine statt. Eine metastabile C-terminale Verlängerung, die ihre Konformation bei Kontakt mit der Plasmamembran verändern kann, ist verantwortlich für die Membrantranslokation (Langedijk *et al.*, 2002). Außerdem kann das E^{rns} sowohl an der Oberfläche von virusinfizierten Zellen, bei BVDV zusammen mit dem E2 (Weiland *et al.*, 1999), als auch frei im Medium gefunden werden (Rümenapf *et al.*, 1993).

Gegen das E^{rns} werden nur im begrenzten Maß (Weiland *et al.*, 1992) bzw. keine (Boulanger *et al.*, 1991; Kühne, 2000) Antikörper gebildet, die in der Lage sind, Pestiviren zu neutralisieren. Untersuchungen bei CSFV und BVDV haben jedoch gezeigt, dass die Bindung von E^{rns}-spezifischen monoklonalen Antikörpern an das Virion stärker ist, als die von E2-spezifischen monoklonalen Antikörpern (Weiland *et al.*, 1999). Weiterhin ist bekannt, dass das E^{rns}-Hüllprotein möglicherweise auch unspezifisch die Immunabwehr beeinflusst. Durch die während der Virusreplikation entstehende doppelsträngige RNA (dsRNA) wird normalerweise eine Produktion α/β -Interferon induziert. Das E^{rns} kann eine gesteigerte Interferonsynthese verhindern, denn es besitzt eine dsRNA-Bindungsaktivität und wirkt bei niedrigem pH-Wert als dsRNase. Beides, sowohl die RNA-Bindung als auch die RNase-Aktivität, werden für die Inhibition des *dsRNA-Signalling* benötigt (Iqbal *et al.*, 2004). Durch Punktmutation konnte die Ribonukleaseaktivität des E^{rns} in CSF-Viren ausgeschaltet werden, was eine Attenuierung dieser Viren zur Folge hatte (Meyers *et al.*, 1999).

Hüllprotein 1 (Envelope1 = E1; gp 25)

Das Hüllprotein 1 wird sowohl in infizierten Zellen als auch in Virionen in kovalenter Bindung mit dem im Polyprotein darauffolgenden Glykoprotein E2 nachgewiesen. E1 ist zudem ein Bestandteil der Lipidhülle der Virionen (siehe Abb. 1). Mit Hilfe von Disulfidbindungen an konservierten Cysteinen werden die Heterodimere von E1 und E2 stabilisiert (Weiland *et al.*, 1990). E1 wird posttranslational durch zwei Glykosylierungen modifiziert und ist danach ca. 25 kDa groß (Rümenapf *et al.*, 1993). Zwei hydrophobe Domänen verankern das E1-Protein in der Membran (Donis, 1995). Rekonvaleszentenserum weisen keine deutlichen Antikörpertiter gegen das E1 auf (Donis, 1995).

Hüllprotein 2 (Envelope2 = E2; gp53)

Das E2-Protein hat in glykosylierter Form eine molekulare Masse von 50-55 kDa und ist 370-390 Aminosäuren lang (Donis und Dubovi, 1987c). Es ist ein Hauptbestandteil der Hüllprojektionen des Virions (siehe Abb. 1) und vermittelt den Rezeptor-abhängigen Viruseintritt in die Wirtszelle. Rekombinant exprimiertes CSFV-E2 bindet reversibel an die Zelloberfläche und verhindert so eine Infektion und Virusausbreitung in Zellkultur (Hulst und Moormann, 1997). Um stabile E2-Monomere zu erhalten, müssen Disulfidbrücken ausgebildet werden (Weiland *et al.*, 1990; Branza-Nichita *et al.*, 2002). Das Protein besitzt drei oder vier Glykosylierungsstellen und es wird sowohl in Virionen, als auch in virusinfizierten Zellen als Homodimer E2-E2 oder als Heterodimer E2-E1 nachgewiesen (Weiland *et al.*, 1990; Rümenapf *et al.*, 1993). Die für die Assoziation der beiden Glykoproteine E1 und E2 in Heterodimere notwendige Faltung kann durch N-butyldeoxynojirimycin (NB-DNJ), einem endoplasmatischen Alpha-Glucosidase-Inhibitor, verhindert werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass die von der Ausbildung von Disulfidbrücken abhängige Faltung des E2 relativ rasch stattfindet (ca. in 2,5 min), während die Faltung des E1-Glykoproteins ca. 30 min dauert. Beide Glykoproteine interagieren mit dem Calnexin der Zelle und sobald sich das E1 von dem Calnexin löst, beginnt die Bildung der E1-E2-Heterodimere. Die Anwesenheit von NB-DNJ verhindert die Assoziation der beiden Hüllproteine mit dem Calnexin, was zu einer Fehlfaltung, einer verringerten Heterodimerbildung und einer Reduktion infektiöser Virionen führt (Branza-Nichita *et al.*, 2001; Jordan *et al.*, 2002). Zwei unterschiedliche Formen des C-terminalen Endes des E2 sind

bekannt: E2 und E2-p7, wobei das Dimer E2-p7 nicht stabil ist (Elbers *et al.*, 1996; Harada *et al.*, 2000) und auch nicht in Virionen detektiert werden kann (Elbers *et al.*, 1996). Mit Hilfe von Funktionsanalysen des E2-p7 konnte gezeigt werden, dass, wenn die Trennung von E2 und p7 aufgehoben wird, zwar eine Virusreplikation stattfindet, aber keine infektiösen Virionen mehr produziert werden (Harada *et al.*, 2000). Ein Teil des C-Terminus von E2 ist stark konserviert und könnte somit bei CSFV, BVDV und BDV zur genusspezifischen Diagnose herangezogen werden (Yu *et al.*, 1996). Dieses etwa 40 Aminosäuren umfassende Stück am C-terminalen Ende des Glykoproteins E2 befindet sich allerdings nicht, wie das N-terminale Ende, an der Virusoberfläche, sondern ist membrangebunden (Rümenapf *et al.*, 1993; Yu *et al.*, 1996).

Dem E2 kommt die besondere Rolle als Hauptimmunogen für die Bildung neutralisierender Antikörper zu (Donis und Dubovi, 1987d; Donis *et al.*, 1988; Weiland *et al.*, 1989). Es bestimmt außerdem den Zelltropismus von BVD-Viren (Liang *et al.*, 2003). Während für BVDV-I zwei unterschiedliche E2-Regionen für die Bildung neutralisierender Antikörper gefunden werden konnten (Toth *et al.*, 1999), scheint es für BVDV-II in drei antigenetischen Domänen konservierte Epitope für neutralisierende Antikörper zu geben (Deregt *et al.*, 1998). Innerhalb dieser antigenen Domänen herrscht eine große Variabilität, was vermutlich Ausdruck eines „Immudrucks“ auf diese Regionen ist (Donis, 1995). Zusammen mit den Genen für die Proteine E^{ms}, E1 und Kapsidprotein C bildet das E2 die Strukturgenregion der Pestiviren.

Nichtstrukturprotein p7

Das p7-Protein liegt im pestiviralen Polyprotein etwa an Position der Aminosäuren 1060-1130 zwischen dem Strukturprotein E2 und dem Nichtstrukturprotein NS2-3 (Elbers *et al.*, 1996). Das Protein ist ca. 7 kDa groß und seine Funktion ist bisher ungeklärt. Das p7-Protein kommt in infizierten Zellen zusammen mit dem E2-Hüllprotein vor. Es lässt sich aber in ausgeschleusten Virionen nicht mehr nachweisen (Elbers *et al.*, 1996). Vorhersagen über die Struktur weisen auf einen hydrophoben Membranankerabschnitt hin, dem sich eine zytosplasmatische Region anschließt. Hypothetisch kommt dem p7 eine Funktion bei der RNA-Bindung und RNA-Verpackung zu (Elbers *et al.*, 1996).

Nichtstrukturprotein 2/3 (NS2/3; p125) bzw. Nichtstrukturprotein 2 und 3 (NS2; p54 und NS3; p80)

Die beiden Nichtstrukturproteine NS2 und NS3 spielen eine wichtige Rolle für das Verständnis der Pathogenese der bovinen Virusdiarrhoe. So kann in Abhängigkeit vom Biotyp (siehe 2.3.) bei nichtzytopathogenen- (ncp-) BVD-Viren nur das ca. 125 kDa schwere NS2/3-Protein nachgewiesen werden. Bei zytopathogenen- (cp-) BVD-Viren hingegen kommen neben dem NS2/3-Protein auch das Einzelprotein NS2 (54 kDa) und das 80 kDa Protein NS3 vor (Donis, 1987; Donis und Dubovi, 1987b). Der Zusammenhang zwischen Zytopathogenität und dem Auftreten von NS3 wurde auch für BDV und BVDV-II beschrieben (Becher *et al.*, 1996; Fulton *et al.*, 2000). Eine Sonderstellung nehmen die CSF-Viren ein, denn bei ihnen kann das NS3-Protein auch bei der Vermehrung von ncp-Viren, allerdings in geringerer Menge, nachgewiesen werden (Donis, 1987; Donis, 1995).

Durch Insertion von RNA-Sequenzen aus der Zelle in das BVDV-Genom kommt es zur Spaltung des NS2/3-Proteins (Meyers *et al.*, 1991; Greiser-Wilke *et al.*, 1993; Tautz *et al.*, 1996; Meyers *et al.*, 1998; Becher *et al.*, 2002). Auch Duplikationen (Meyers *et al.*, 1992) im Bereich des NS2/3-Gens und Punktmutationen im Bereich des NS2-Gens (Kümmerer und Meyers, 2000) sowie die Rekombination eines ncp-Biotyps mit einem cp-Biotyp (Becher *et al.*, 1999a) können zur Spaltung bzw. Trennung von NS2 und NS3 führen. Alle diese Mutationen führen nach der Expression des „veränderten“ Polyproteins zur Spaltung des zuvor zusammenhängenden NS2/3-Proteins (Tautz *et al.*, 1994). Ein zelluläres J-Domänen-Protein, ein Mitglied der DnaJ-Chaperone Familie, scheint durch die Bildung eines stabilen Komplexes mit dem NS2-Protein eine wichtige Rolle bei der Induktion der Spaltung von NS2/3 zu spielen. Dieses zelluläre Protein wird als Jiv (*protein interacting with viral protein*) bezeichnet (Rinck *et al.*, 2001). Zumeist entsteht somit aus einem ncp-Virusstamm ein cp-Virus, das bis auf die Veränderungen im Bereich des NS2/3-Proteins mit dem ursprünglichen ncp-Stamm identisch ist (Kümmerer *et al.*, 2000). Aufgrund der auch immunologisch gegebenen Ähnlichkeiten werden diese ncp/cp-Viruspaare auch *Matching Pairs* genannt (Brownlie, 1990). Die Funktionen einzelner Mutationen konnten bereits mit Hilfe von infektiösen cDNA-Kopien nachgewiesen und auf der Ebene des Genoms nachvollzogen werden (Meyers *et al.*, 1996). Die Protease, die für die Spaltung von NS2/3 verantwortlich ist, konnte bisher nicht gefunden werden. Die Spaltung der beiden Nichtstrukturproteine muss allerdings an einer ganz bestimmten Stelle innerhalb der Aminosäuresequenz von NS2/3 stattfinden, um eine effektive Replikation aufrecht zu erhalten (Tautz und Thiel, 2003).

Untersuchungen haben gezeigt, dass während das NS2/3 meist mit der Membran des rauen Endoplasmatischen Retikulums (ER) assoziiert ist, das NS3 sowohl im Bereich des rauen als auch des glatten ER nachgewiesen werden kann (Zhang *et al.*, 2003).

Über die Funktion des NS2-Proteins ist nur sehr wenig bekannt. Die Aminosäuresequenz des NS2-Proteins besitzt einen konservierten cysteinreichen Abschnitt, der einem Zinkfinger-Motiv ähnelt, das bei vielen Gen-regulierenden Proteinen vorkommt. Folglich wird vermutet, dass das NS2-Protein eine Rolle bei der RNA-Bindung spielt (De Moerlooze *et al.*, 1990). Bisher wurden keine NS2-spezifischen Antikörper in infizierten Tieren nachgewiesen. Für den Virusreplikationsapparat ist das NS2 nicht essentiell (Behrens *et al.*, 1998). Es übt allerdings einen regulatorischen Einfluss aus (Behrens *et al.*, 1998; Moser *et al.*, 1999).

Im Gegensatz zu dem NS2 ist das NS3 ein sehr wichtiger Bestandteil des pestiviralen Replikationsapparates (Xu *et al.*, 1997; Tautz *et al.*, 1999). Es besitzt eine Helikase- und eine Nukleotidtriphosphatase-Aktivität (Warrener und Collett, 1995). Beide Enzymaktivitäten spielen bereits in frühen Phasen der Virusreplikation eine zentrale Rolle (Grassmann *et al.*, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass die Helikase-Aktivität für die Negativstrang-Synthese wichtig ist (Gu *et al.*, 2000). Zudem ist das NS3-Protein zusammen mit dem NS4a-Protein als Kofaktor in Form einer Serin-abhängigen Protease für die posttranslationale proteolytische Prozessierung der Nichtstrukturproteine NS4b, NS5a und NS5b verantwortlich (Tautz *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1997).

Infizierte Tiere bilden eine große Menge an nicht neutralisierenden, NS3-spezifischen Antikörpern (Westenbrink *et al.*, 1986; Lecomte *et al.*, 1991). Das NS3-Protein besitzt konservierte B-Zell-Epitope im Bereich der Helikase-Domäne (Brown *et al.*, 2002). Dem NS3-Protein scheint auch eine Rolle bei der Induktion zellulärer Immunitätsmechanismen zuzukommen. Im Mausmodell konnte nach Injektion rekombinanter BVDV-NS3-Adenoviren sowohl eine humorale Immunantwort als auch eine erhöhte mononukleäre γ -IFN Produktion nach *in vivo* Stimulation mit BVDV festgestellt werden. Die Immunzellproliferation blieb allerdings unbeeinflusst (Elahi *et al.*, 1999a). Eine andere Studie mit rekombinantem BVDV-NS3-*Semliki Forest Virus*, das Mäusen injiziert wurde, wies ebenfalls eine starke zelluläre Immunantwort, die durch cytotoxische T-Zellen vermittelt wurde, nach (Reddy *et al.*, 1999). BVDV-NS3-rekombinantes MVA war in der Lage in Kaninchen eine humorale Immunantwort gegen dieses Nichtstrukturprotein zu induzieren. Die nachgewiesenen Antikörper wiesen allerdings keine neutralisierende Aktivität auf (Klemm, 2001). Die zelluläre Immunantwort auf BVDV-NS3-rekombinantes MVA wurde bisher nicht untersucht.

Nichtstrukturproteine 4a und 4b (NS4a; p10 und NS4b; p32) sowie 5a und 5b (NS5a; p58 und NS5b; p75)

Die Nichtstrukturproteine NS4a und 4b sowie NS5a und 5b bilden zusammen mit dem NS3 den Replikationsapparat der Pestiviren (Tautz *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1997; Behrens *et al.*, 1998; Moser *et al.*, 1999). Dies wurde durch Untersuchung eines subgenomischen pestiviralen RNA-Moleküles (DI9c), das als autonomes Replikon funktioniert, festgestellt. Das DI9c umfasst die 5'- und 3'-UTR und die codierenden Sequenzen der Autoprotease Npro sowie die Nichtstrukturproteine NS3, NS4a, NS4b, NS5a, und NS5b (Behrens *et al.*, 1998). Für CSF-Viren wurde bereits nachgewiesen, dass die Gene, die für Npro, C, E^{ms}, E1, E2, p7 und NS2 codieren, für den Vorgang der Replikation entbehrlich sind (Moser *et al.*, 1999).

NS4a fungiert als Kofaktor für die Proteasefunktion des NS3 bei bestimmten Spaltstellen (Failla *et al.*, 1994; Xu *et al.*, 1997; Tautz *et al.*, 2000). Die Funktionen von NS4b und NS5a sind bisher weitgehend ungeklärt. Untersuchungen haben allerdings gezeigt, dass Mutationen im Bereich des NS4b-Gens zur Attenuierung des Virus trotz Expression eines funktionsfähigen NS3-Proteins führen können (Qu *et al.*, 2001). Das NS5a-Protein scheint durch seine Bindung an die Alpha-Untereinheit des bovinen Translation Elongations Faktor A ebenfalls eine Rolle bei der Virusreplikation zu spielen (Johnson *et al.*, 2001) und das NS5b schließlich fungiert als RNA-abhängige RNA-Polymerase der Pestiviren (Zhong *et al.*, 1998; Xiao *et al.*, 2003a; Xiao *et al.*, 2003b) analog zu den Hepatitis C-Viren (Suzuki *et al.*, 1999). Bei Hepatitis C infizierten Menschen konnten Antikörper gegen diese vier Nichtstrukturproteine nachgewiesen werden (Chen *et al.*, 1999). Ob Antikörper auch bei mit Pestiviren infizierten Tieren gebildet werden, ist bisher ungeklärt.

3'-nicht translatierte Region (3'-UTR)

Das mehr als 200 Nukleotide lange 3'-Ende besitzt bei allen Mitgliedern der Familie der *Flaviviridae* keinen Polyadenosin-Schwanz (Donis, 1995). Innerhalb des 3'-Bereiches wurden, bei Vergleich verschiedener Vertreter der Pestiviren, verschiedene Deletionen und Insertionen beobachtet. Außerdem ist ein Adenin-Uracil reicher Bereich bei Analyse des 3'-Terminus der Pestiviren auffällig, wobei die Position und die Größe dieses Bereiches zwischen den einzelnen Virusgenotypen variiert (Vilcek *et al.*, 1999b). Im Gegensatz zur 5'-UTR ist die 3'-UTR weniger konserviert (Vilcek *et al.*, 1999b). Sie spielt bei der Steuerung der Replikation eine Rolle (Yu *et al.*, 1999).

2.3. Der Replikationszyklus der Pestiviren

Pestiviren vermehren sich in einer Vielzahl von Paarhufer-Zelllinien (Fernelius *et al.*, 1969). Durch ihr unterschiedliches Verhalten bei der Replikation in Zellkultur lassen sich zwei Biotypen unterscheiden. Der nichtzytopathogene- (ncp-) Biotyp lässt den Zellrasen völlig intakt, während die zytopathogenen (cp) Pestiviren den Zellrasen nach 24-96 h zerstören (Gillespie *et al.*, 1960). Bei dem zytopathogenen Effekt handelt es sich um eine virusinduzierte Apoptose (Hoff und Donis, 1997; Lambot *et al.*, 1998). Eine Isolation von cp-BVD-Viren ist nur aus Tieren, die an der so genannten *Mucosal Disease* (MD) leiden, möglich (Brownlie *et al.*, 1984; Brownlie, 1990).

Der Replikationszyklus der Pestiviren setzt sich aus folgenden Abschnitten zusammen: Bindung an die Zelle (*Attachment*), Penetration, Gentranslation und Proteinprozessierung, Genomreplikation sowie Zusammenbau und Freisetzung neuer Viruspartikel (*Assembly* und *Budding*). Die gesamte Dauer des Vermehrungszyklus von *Attachment* bis zur Freisetzung der ersten infektiösen Virionen beträgt 10 bis 14 h, wobei pro infizierte Zelle ca. 100 bis 1000 Virionen freigesetzt werden (Donis, 1995; Gong *et al.*, 1996). Zunächst findet eine rezeptorvermittelte Bindung an die Wirtszelle statt (Xue und Minocha, 1993; Schelp *et al.*, 1995; Xue *et al.*, 1997; Minocha *et al.*, 1997; Agnello *et al.*, 1999). Es wurden sowohl für das E2 als auch für das E^{ms} Rezeptoren beschrieben. Bei der Bindung an die Wirtszelle kommt jedoch dem E2-Protein wahrscheinlich eine zentrale Rolle zu. Dies könnte die hohe neutralisierende Aktivität von E2-spezifischen Antikörpern erklären (Weiland *et al.*, 1989).

Allerdings können auch von neutralisierenden Antikörpern gebundene Virionen für Zellen noch infektiös sein, wenn diese Zellen bestimmte Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Dies wurde mit Hilfe von transfizierten bovinen Hodenzellen, die den murinen Fcgamma Rezeptor B2 an ihrer Oberfläche exprimieren, nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass die Virus-Antikörperkomplexe für diese Zellen um ein Vielfaches infektiöser waren als für Hodenzellen, denen der murine Fcgamma Rezeptor B2 fehlte (Flores *et al.*, 2002). Nachdem die Virionen an die Zelle gebunden haben, kommt es zur Endocytose der Viruspartikel in die Zelle (Donis, 1995). Dieser Endocytoseschritt ist essentiell und eine Infektion kann durch Zugabe von Endocytoseblockern effektiv verhindert werden (Flores und Donis, 1995). Es wird vermutet, dass ein zelluläres Actin-bindendes-Protein an der Endocytose der Virionen beteiligt ist (Schelp *et al.*, 2000). Nach der endocytotischen Aufnahme der Viruspartikel kommt es nach Ansäuerung der Endosomen zur Fusion von Virionen und den inneren Zellmembranen. Dadurch wird die genetische Information der Viren ins Zytoplasma abgegeben (Flores und Donis, 1995). Diese ins Zytoplasma freigesetzte RNA ist „infektiös“. Sie bindet über ihre 5'-terminale IRES-Struktur an die Ribosomen und beginnt mit der Cap-unabhängigen Translation des ca. 4000 Aminosäuren codierenden ORF (Pestova und Hellen, 1999; Sanderbrand *et al.*, 2000). Nach etwa 3 h sind die ersten viralen Polypeptide in der Zelle nachweisbar (Donis und Dubovi, 1987a), die anschließend von zelleigenen und viralen Proteasen prozessiert werden. Die Protease Npro spaltet sich am 5'-Terminus autokatalytisch vom Nukleokapsidprotein C ab (Stark *et al.*, 1993; Rümenapf *et al.*, 1998). Die Hüllproteine E^{ms}, E1 und E2 werden nach Translokation ins ER durch Signalasen an den entsprechenden Erkennungssequenzen gespalten und es bilden sich im Golgi-Apparat die beschriebenen Homo- und Heterodimere aus (Rümenapf *et al.*, 1993). Es wird vermutet, dass ebenfalls Signalasen die Proteine p7 und NS2 (cp-Biotyp) bzw. NS2/3 (ncp-Biotyp) vom Hüllprotein E2 trennen. Die weitere Prozessierung in die Nichtstrukturproteine NS4a, NS4b, NS5a und NS5b wird von NS2/3 bzw. NS3 zusammen mit dem Kofaktor NS4a im Zytoplasma vorgenommen (Tautz *et al.*, 1997; Tautz *et al.*, 2000). Der für die Vermehrung der Viren wichtige Replikationsapparat (Replikon) wird nun von den dafür benötigten Proteinen gebildet. Die Proteine synthetisieren Negativ-RNA-Genome (RNA⁻), die dann als Matrize für die Produktion von Positivstrang-Genomen (RNA⁺) dienen (Gong *et al.*, 1996). Die RNA⁺ wird anschließend in das Nukleokapsid verpackt. An den inneren Zellmembranen (ER, Golgi-Apparat) kommt es zur Virionenbildung. In Abhängigkeit von wirtseigener ER-Glucosidase findet im Golgi-Apparat die Prozessierung des E2-Proteins statt (Jordan *et al.*,

2002) und die Virionen werden mittels Exocytose aus der Zelle geschleust (Gray und Nettleton, 1987; Ohmann, 1990).

2.4. Immunität gegen Pestiviren

2.4.1. Infektionsimmunität

Nach einer Infektion mit Pestiviren kommt es sowohl zu einer spezifischen humoralen als auch zu einer zellulären Immunantwort, die bei BVDV-Infektionen meistens zu einer Elimination der Infektionserreger aus dem Wirtsorganismus führt (Potgieter, 1995). Eine Ausnahme bilden hier die ncp-BVD-Viren, welche die Entstehung von persistent infizierten Tieren (PI-Tiere) hervorrufen können. BVDV-PI-Tiere gelten als Hauptfaktor für die Weiterverbreitung der Viren innerhalb der Rinderpopulation (Liess, 1985; Houe, 1995). Diese PI-Tiere haben durch eine Infektion während des ersten Drittels ihrer Embryonalentwicklung eine Immuntoleranz gegen das ncp-BVD-Virus, das sie beherbergen, ausgebildet (Orban *et al.*, 1983; Liess *et al.*, 1987; Moennig und Liess, 1995) und sie werden trotz maternaler Immunantwort gegen das Virus nicht abortiert (Brownlie *et al.*, 1998). Wird dieser ncp-Persistenzstamm nun zum homologen cp-Biotyp, kommt es wegen fehlender Immunantwort zur tödlichen MD. Dieser Wechsel vom ncp- zum cp-Biotyp wird sehr häufig durch spontane Mutation hervorgerufen (Brownlie *et al.*, 1984; Brownlie und Clarke, 1993; Bolin, 1995b). Ursache einer solcher Mutation können beispielsweise Insertionen zellulärer RNA-Sequenzen des Rindes in das virale Genom, Deletionen, Duplikationen, Punktmutationen sowie Rekombinationen mit einem cp-BVDV sein (siehe 2.2.).

Die fatale MD wird aber auch bei Superinfektion mit einem immunologisch identischen oder sehr ähnlichen cp-BVD-Virusstamm beobachtet, was besonders bei der Übertragung des mutierten cp-BVDV-Stammes innerhalb des Bestandes auf weitere PI-Tiere eine Rolle spielt. Die Virämiker (PI-Tiere) können aufgrund ihrer Immuntoleranz gegen das „körpereigene“ ncp-Virus, gegen ein homologes cp-Virus keine Immunantwort ausbilden. Das cp-Virus wirkt zellzerstörend, so dass es zu Läsionen an den Schleimhäuten und im Zwischenklauenspalt, zu Nekrosen, zu hämorrhagischen Durchfällen und zur Depletion bestimmter Lymphozytenpopulationen kommt, was schließlich zur schweren Erkrankung mit sekundärer Sepsis und zum Tod der Tiere führt (Bolin, 1995b; Liebler *et al.*, 1996). Kommt es zu einer

Superinfektion mit einem nicht homologen BVD-Stamm, treten teilweise chronische Krankheitsverläufe auf, die nach Rekombination mit dem persistierenden Stamm zu einem homologen cp-Biotyp ebenfalls in der tödlichen MD enden (*late onset* MD = chronische MD; Ridpath und Bolin, 1995; Fritzscheier *et al.*, 1995). Besonders anfällig dafür sind immunsupprimierte PI-Tiere (Sentsui *et al.*, 2001). Nach einer Superinfektion mit einem antigenetisch anderen BVDV können allerdings auch PI-Tiere eine Immunantwort entwickeln. Bei solchen Tieren können Antikörper gegen das sekundär infizierende Virus nachgewiesen werden (Liess *et al.*, 1983; Loehr *et al.*, 1998). In einigen Fällen werden aber auch nach akuter BVDV-Infektion immunkompetenter Rinder klinische Erscheinungen wie gestörtes Allgemeinbefinden, Fieber, blutige Diarrhoe und respiratorische Störungen beobachtet. Diese Tiere zeigen eine prolongierte und verstärkte Virusausscheidung, eine ausgeprägte Virämiephase sowie eine verzögerte Immunantwort (Bolin und Ridpath, 1992). Das Krankheitsbild des „hämorrhagischen Syndroms“ wurde im Rahmen von sehr schweren Krankheitsausbrüchen mit hämorrhagischen Diathesen, blutigen Durchfällen und Todesfällen, die alle Altersgruppen betrafen, in Nordamerika und Kanada definiert (Pellerin *et al.*, 1994; Ridpath *et al.*, 1994; Carman *et al.*, 1998). Weiterführende Studien zeigten, dass sich keine Korrelation zwischen BVDV-Spezies und Schwere des Krankheitsverlaufs feststellen lässt (Wolfmeyer *et al.*, 1997; Carman *et al.*, 1998). Infektionen mit beiden BVDV-Spezies verlaufen normalerweise subklinisch, jedoch können beide Virusspezies je nach Zustand der betroffenen Tiere und Virusstamm zu schweren Verlaufsformen bis zum hämorrhagischen Syndrom führen (Marshall *et al.*, 1998; Odeon *et al.*, 1999).

Humorale Immunantwort

Die humorale Immunantwort spielt bei der Kontrolle von Pestivirusinfektionen eine wichtige Rolle. Immunkompetente Tiere bilden nach einer Infektion große Mengen an neutralisierenden Antikörpern (Potgieter, 1995). Auch durch Aufnahme von Kolostrum passiv erworbene Antikörper können naive Kälber vor einer BVDV-Erkrankung schützen (Howard *et al.*, 1989; Bolin und Ridpath, 1995). Es besteht dabei eine Korrelation zwischen der Höhe der neutralisierenden Antikörpertiter und der Schutzwirkung (Howard *et al.*, 1989; Bolin und Ridpath, 1995). Die passiv erworbenen Antikörper behindern die Ausbildung einer Immunantwort gegen ein experimentell verabreichtes Virus nicht vollständig. Es kommt jedoch auch nicht zu einem Anstieg der Antikörpertiter nach erfolgter Infektion, so dass ein

Schutz möglicherweise durch zelluläre Immunmechanismen vermittelt wird (Ridpath *et al.*, 2003). Eine Studie zeigte allerdings, dass ein hoher, passiv erworbener Antikörpertiter die Effektivität einer Immunisierung mit attenuiertem Lebendimpfstoff (siehe 2.4.2.) reduzieren kann. Hier schien die große Menge an maternalen Antikörpern das attenuierte Virus neutralisiert zu haben (Ellis *et al.*, 2001). Infektionen von Kälbern mit BVDV während der Phase, in der noch maternale Antikörper nachweisbar sind führen dazu, dass die infizierten Kälber BVDV-spezifische CD4-positive Zellen (CD4⁺, T-Helferzellen), CD8-positive Zellen (CD8⁺, zytotoxische Zellen) und $\gamma\delta$ -T-Zellen (T-Zellen mit $\gamma\delta$ -T-Zellrezeptor) bilden. Eine humorale Immunantwort bleibt dabei, wie oben beschrieben aus (Endsley *et al.*, 2003). Endsley *et al.* (2003) führten weitere Studien über die Effektivität von Impfungen von Kälbern in der kolostralen Phase durch. In den Untersuchungen wurden sowohl modifizierte Lebendvakzinen als auch inaktivierte Impfstoffe mit BVDV-I und BVDV-II verwendet. Kälber, die die modifizierte Lebendvakzine im Alter von sieben Wochen erhalten hatten, bildeten bereits nach der ersten Immunisierung BVDV-I- und BVDV-II-spezifische CD4⁺- und BVDV-II-spezifische $\gamma\delta$ -T-Zellen gegen das in der Vakzine enthaltene BVDV-II. Die Gruppe, die den inaktivierten Impfstoff erhalten hatte, bildete dagegen keine zelluläre Immunantwort aus. Nach einer zweiten Immunisierung der Kälber mit modifizierter Lebendvakzine bzw. mit inaktivem Impfstoff im Alter von 14 Wochen ließ sich eine Antikörperantwort gegen BVDV-II nachweisen. (Endsley *et al.*, 2003).

Durch den Einsatz von Vakzinen mit nicht vermehrungsfähigen Pestiviren, die vorwiegend die humorale Immunantwort stimulieren, kann ebenfalls ein Schutz vor Erkrankungen erreicht werden. Bisweilen können sogar, unter bestimmten Bedingungen, durch eine Immunisierung mit inaktivierten Impfstoffen fetale Infektionen verhindert werden (Brownlie *et al.*, 1995).

Neutralisierende Antikörper sind fast ausschließlich gegen das E2-Glykoprotein der Virushülle gerichtet (Donis, 1995; Potgieter, 1995; Toth *et al.*, 1999). So wird erklärbar, dass durch Applikation von Spaltimpfstoffen, die nur pestivirales E2 enthalten, ähnlich hohe Antikörpertiter erzeugt werden können wie nach Infektion mit replizierenden Viren oder nach Verabreichung von Vollvirus (Bolin und Ridpath, 1996; Brusckie *et al.*, 1997). Im Gegensatz dazu besitzen die durch das Hüllprotein E^{ms}-induzierten Antikörper nur sehr schwache oder keine neutralisierenden Eigenschaften (Boulanger *et al.*, 1991; Donis *et al.*, 1991; Potgieter, 1995). Neben dem E2 ist auch das NS3 in der Lage, eine ausgeprägte humorale Immunantwort zu induzieren (Donis und Dubovi, 1987d; Lecomte *et al.*, 1991; Elahi *et al.*, 1999a). Allerdings besitzen die NS3-spezifischen Antikörper keine neutralisierende Aktivität (Lecomte *et al.*, 1991).

Zelluläre Immunantwort

Während die humorale Immunität gegen Pestiviren gut untersucht ist, befassen sich nur wenige Untersuchungen mit den zellulären Immunitätsmechanismen. Durch eine Testinfektion von Kälbern nach *in vivo* Depletion von Lymphozytenpopulationen konnte gezeigt werden, dass die CD4-positiven Zellen (CD4⁺, T-Helferzellen) bei der Elimination des Virus eine weit wichtigere Rolle spielen als die CD8-positiven Zellen (CD8⁺; zytotoxische Zellen; Howard *et al.*, 1992). Allerdings wurden Pestivirus-spezifische zytotoxische T-Zellen bereits für BVDV (Beer, 1995, Beer *et al.*, 1997), CSFV (Pauly *et al.*, 1995) und BDV (Woldehiwet und Hussin, 1994) in immunen Tieren nachgewiesen. Für die zytotoxischen Zellen gegen CSFV und BVDV wurde zudem eine MHC-Restriktion detektiert (Pauly *et al.*, 1995; Beer, 1995; Beer *et al.*, 1997). Für CSFV beschreiben Pauly und Mitarbeiter (1995) ein Epitop für zytotoxische T-Zellen im C-terminalen Bereich des NS3-Proteins. Zudem ist bekannt, dass das E2-Protein bei CSFV-Infektionen kein geeignetes T-Zell-Epitop dargestellt (Kimman *et al.*, 1993). Die für die Induktion von BVDV-spezifischen zytotoxischen Zellen verantwortlichen T-Zell-Epitope sind bisher nicht bekannt (Beer *et al.*, 1997). Natürliche unspezifische Killerzellen (NK-Zellen) spielen bei der zellulären Immunantwort gegen Pestiviren keine Rolle (Campos *et al.*, 1982).

Analysen von *in vitro* mit autologen BVDV-infizierten Monozyten restimulierten T-Zellen zeigten, dass die CD4⁺-Antwort zumeist vom Typ 2 (B-Zellhilfe) ist, was durch die extrem hohe Mengen an B-Zell-Wachstumsfaktor und IL-4, mit vergleichsweise niedrigen Leveln an γ -IFN und IL-2, zum Ausdruck kommt. Die CD8⁺-Antworten sind dagegen vom Typ 1 mit erhöhter IL-2- und γ -IFN-Aktivität, neben niedrigen Werten für IL-4 und B-Zell-Wachstumsfaktor (Rhodes *et al.*, 1999). Außerdem reagieren mononukleäre Blutzellen von Tieren, die zuvor mit dem Virus Kontakt hatten, *in vitro* nach Zusatz von Virus mit einer spezifischen Proliferation (Larsson und Fossum, 1992). Nach Immunisierung von Mäusen mit BVDV-rekombinanten Adenoviren konnte eine durch NS3, durch das Kapsidprotein und durch E2-induzierte BVDV-spezifische humorale Immunität nachgewiesen werden (Elahi *et al.*, 1999a; Elahi *et al.*, 1999b; Elahi *et al.*, 1999c). In Bezug auf die Induktion zellulärer Immunitätsmechanismen verhielten sich die drei BVDV-rekombinanten Adenoviren im Mausmodell allerdings unterschiedlich. Während bei Mäusen, die mit NS3-rekombinantem Virus immunisiert wurden, einen starker Anstieg der mononukleären γ -IFN-Produktion nach *in vivo* Stimulation mit BVDV nachgewiesen werden konnte (Elahi *et al.*, 1999a), war nach Immunisierung mit Kapsid-rekombinanten Viren sowohl eine erhöhte γ -IFN-Synthese als

auch eine spezifische Proliferation *in vitro* detektierbar (Elahi *et al.*, 1999b). Nach Immunisierung mit E2-rekombinanten Adenoviren hingegen zeigten die mononukleären Zellen der Mäuse *in vitro* nur eine spezifische Proliferation (Elahi *et al.*, 1999c). Ein anderes BVDV-E2-rekombinantes Virus wurde mit Hilfe von Fowlpoxviren hergestellt. Im Gegensatz zum BVDV-E2-rekombinanten Adenovirus konnte mit diesen BVDV-E2-rekombinanten Fowlpoxviren ebenfalls eine erhöhte γ -IFN-Produktion mononukleärer Zellen induziert werden (Mehdy *et al.*, 1999). Auch das *Semliki Forest Virus* (SFV) wurde als Expressionsvektor für das NS3-Protein verwendet. Auf die Injektion dieses BVDV-NS3-rekombinanten SFV reagierten Mäuse mit der Ausbildung einer starken cytotoxischen und Zell-vermittelten Aktivität, die sowohl gegen BVDV-I als auch BVDV-II gerichtet war (Reddy *et al.*, 1999). Für CSFV wurde das Vorhandensein zellulärer Immunität ebenfalls durch den Nachweis einer erhöhten CSFV-spezifischen γ -IFN-Produktion nach einer Vakzinierung erbracht. Hier korrelierte die Menge an γ -IFN mit dem Schutz gegen eine CSFV-Infektion (Suradhat *et al.*, 2001).

Weitere Untersuchungen zeigten, dass eine akute Infektion von Kälbern mit ncp-BVDV sowohl eine starke γ -IFN als auch eine starke α/β -IFN-Reaktion hervorruft. Gleichzeitig ist die Menge an *Transforming growth factor β* (TGF- β) im Serum herabgesetzt. Dies lässt darauf schließen, dass die Immunsuppression während einer Infektion nicht mit einer verringerten IFN-Produktion oder einer erhöhten Menge an TGF- β einhergeht (Charleston *et al.*, 2002).

Eine Infektion von Monozyten und dendritischen Zellen mit ncp-BVDV führt dazu, dass die Monozyten in ihrer Funktion, allogene und CD4⁺-Zellen zu stimulieren, inhibiert werden, während diese Funktion bei dendritischen Zellen unbeeinflusst bleibt (Glew *et al.*, 2003). Außerdem werden die Monozyten im Gegensatz zu den dendritischen Zellen bei einer Infektion mit cp-BVDV abgetötet. Die Vermutung, dass die dendritischen Zellen dem Zelltod aufgrund einer erhöhten α/β -IFN-Produktion entgehen könnten, konnte allerdings nicht bestätigt werden, da nach einer Infektion mit cp-BVDV kein Unterschied in Bezug auf die Produktion von α/β -IFN dieser beiden Zellarten feststellbar ist (Glew *et al.*, 2003).

2.4.2. BVDV-Vakzinen

Mit einer Impfung gegen BVDV werden zwei Ziele verfolgt. Erstens sollen fetale Infektionen bei trächtigen Kalbinnen und Kühen, die zu Fruchtbarkeitsstörungen und zur Entstehung der für die Weiterverbreitung des Virus wichtigen PI-Tiere führen, verhindert werden. Zweitens sollen die Tiere durch Vakzinierung vor einer akuten Erkrankung mit klinischer Symptomatik („hämorrhagisches Syndrom“), ausgelöst durch virulente Stämme, geschützt werden. Die Vakzinierung wird dabei entweder mit inaktivierten BVDV-Impfstoffen oder mit BVDV-Lebendimpfstoffen durchgeführt. Schließlich befinden sich noch experimentelle Vakzintypen wie Spaltimpfstoffe, ISCOM = *Immunostimulating Complex*-Vakzinen, Vektorvakzinen und DNA-Vakzinen in der Entwicklung (Bolin, 1995a; van Oirschot, 1999; van Oirschot *et al.*, 1999).

Vakzinen mit BVD-Viren, die sich im Tier vermehren (Lebendimpfstoffe)

Infektiöse BVD-Viren, die in Zellkultur mehrfach passagiert wurden, waren die ersten Impfstoffe, die für die Vakzinierung gegen BVD eingesetzt wurden (Bolin, 1995a). Diese attenuierten Lebendvakzinen zeichnen sich durch ihre sehr gute Wirksamkeit aus (Haralambiev *et al.*, 1975; Cortese *et al.*, 1998; Dean *et al.*, 2003; Fairbanks *et al.*, 2003). Für die Herstellung dieser Lebendvakzinen wurden verschiedenste BVDV-Stämme und sowohl cp- als auch ncp-Biotypen eingesetzt (Haralambiev *et al.*, 1975; Chapek *et al.*, 1978; Cortese *et al.*, 1998; Paton *et al.*, 1999; Dean *et al.*, 2003). Stämme der BVDV-I-Spezies wie Oregon C24V (cp), NADL (cp) und Singer (ncp) sind auch heute noch in den Vakzinen enthalten. Eine Applikation reicht oft aus, um hohe Titer neutralisierender Antikörper zu erreichen. Selbst bei Belastungsinfektionen mit heterologen BVDV schützen nahezu alle modifizierten Lebendvakzinen die immunisierten Tiere vor einer klinischen Erkrankung (Dean und Leyh, 1999; Fairbanks *et al.*, 2003). Für einige Vakzinen konnte der Nachweis erbracht werden, dass sie auch vor diaplazentarer Infektion des Fetus und somit vor der Entstehung eines PI-Tieres schützen (Cortese *et al.*, 1998; Dean *et al.*, 2003). Dem Vorteil der hohen Wirksamkeit, häufig bereits nach einmaliger Applikation, steht die fehlende Unschädlichkeit solcher Vakzinen mit lebenden Viren gegenüber. So haben Untersuchungen gezeigt, dass selbst bei Verwendung von cp-Stämmen (Oregon C24V) Fruchtbarkeitsstörungen auftreten können (Liess *et al.*, 1984; Thierauf, 1993) und dass es bei Anwendung in der frühen Trächtigkeit zur

Entwicklung von PI-Tieren kommen kann (Thierauf, 1993). So wurden bei 69 % der in der Frühgravidität vakzinierten Tiere Virämiker provoziert und bei Applikation nach dem dritten Trächtigkeitsmonat konnten 41 % fetale Todesfälle verzeichnet werden. Hier liegt die Vermutung nahe, dass in den Vakzinen auch ncp-Viren vorhanden waren oder aus dem cp-Virus durch Mutation im Impfling entstanden sind (Thierauf, 1993). Bei trächtigen Tieren ist somit die Anwendung von Lebendimpfstoffen kontraindiziert (Wolf *et al.*, 1996).

Eine Studie wurde mit dem temperatursensitiven Stamm RIT4350, der selbst in immunsupprimierten Tieren keine systemische Vermehrung und Fruchtschädigung hervorruft, durchgeführt. Der Grad der Immunität, der erreicht wurde, war aber deutlich geringer als bei Verwendung der oben genannten ncp- und cp-Viren (Lobmann *et al.*, 1986).

Sehr hohe, passiv durch Kolostrumaufnahme erworbene Antikörpertiter können die Effizienz einer Impfung mit modifiziertem Lebendvirus insofern beeinflussen, als auch nach korrekt durchgeführter Impfung kein Schutz gegen heterologe BVD-Viren besteht (siehe 2.4.1.). Hohe maternale Antikörpertiter können folglich die Immunantwort auf eine Vakzinierung mit modifizierter Lebendvakzine inhibieren (Ellis *et al.*, 2001).

In den letzten Jahren stieg zudem die Prävalenz der BVDV-II-Spezies innerhalb der Rinderpopulation. Dies ist insofern problematisch, da sich die BVDV-II-Stämme antigenetisch von den in den Vakzinen enthaltenen BVDV-I-Stämmen unterscheiden. Ein Schutz gegen eine BVDV-II-Infektion kann folglich nicht uneingeschränkt gewährleistet werden (Dean und Leyh, 1999).

Impfstoffe mit nicht vermehrungsfähigen BVD-Viren (inaktivierte Vakzinen)

Inaktivierte Impfstoffe werden schon seit vielen Jahren erforscht und zur Immunprophylaxe gegen BVDV eingesetzt (Fernelius *et al.*, 1971; McClurkin und Coria, 1980; Bolin, 1995a; Brownlie *et al.*, 1995; Beer *et al.*, 2000b; Hamers *et al.*, 2003). Zur Anwendung kommen z.B. die mit β -Propionolacton behandelten BVDV-Stämme NADL (Fernelius *et al.*, 1971) und Singer (McClurkin und Coria, 1980). Als Adjuvantien werden unter anderem Mineralöl, Aluminiumhydroxid und QuilA eingesetzt (Howard *et al.*, 1994; Brownlie *et al.*, 1995). Die protektive Wirkung dieser Vakzinen ist umstritten (Bolin, 1995a). Diese Art von Vakzinen schützt zwar häufig vor akuter Erkrankung, jedoch wurde nur für eine Vakzine fetale Protektion beschrieben (Brownlie *et al.*, 1995). Über die Immunitätsdauer kann in diesem Fall aber keine Aussage gemacht werden, da die Infektion bereits 30 Tage nach der zweiten

Vakzinierung durchgeführt wurde. Meist führten ähnliche Studien zu dem Ergebnis, dass nur ein partieller Schutz vor diaplazentarer Übertragung bei einigen Impfungen durch die Vakzinierung induziert wurde (Zimmer *et al.*, 1996; Brusckke *et al.*, 1999). Drei in der Bundesrepublik Deutschland auf dem Markt befindliche inaktivierte BVDV-Vakzinen (Bovilis™, Intervet, Holland; Bovidec, Virbac GmbH; PregSure® BVD, Pfizer GmbH) wurden zum Schutz vor fetaler Infektion zugelassen. Nach zweimaliger Applikation im Abstand von 3-4 Wochen (Grundimmunisierung) muss die Vakzinierung im Abstand von 6 Monaten bzw. jährlich, aufgefrischt werden. Diese Vakzinen enthalten kein Antigen von BVDV-II-Stämmen. Ein fetaler Schutz gegen diese Stämme muss daher angezweifelt werden.

In einer Studie wurde eine inaktivierte Vakzine mit den Stämmen BVDV-Ic-PT810 und BVDV-II-US890 in Immunisierungs- und Belastungsexperimenten analysiert. Diese Vakzine induzierte sehr hohe neutralisierende Antikörpertiter und verkürzte die Virämiephase der Tiere nach einer BVDV-Infektion auf ein Mindestmaß (Beer *et al.*, 2000b). Ein halbes Jahr nach der Impfung konnte durch Belastungsinfektionen mit BVDV-I- und BVDV-II-Stämmen ein hinreichender Schutz vor diaplazentarer Infektion gezeigt werden (Wolf *et al.*, unveröffentlicht).

Eine Möglichkeit, die Problematik der beiden vorgestellten Impfstofftypen zu verringern, ist die so genannte „Zwei Stufen“-Immunisierung. Hier wird mit einer inaktivierten Vakzine vorgeimpft und mit einer Lebendvakzine geboostert. Mit Hilfe dieser Kombinationsimpfung kann ein Schutz vor fetalen Infektionen erreicht werden (Frey *et al.*, 2002). Zudem kann bei dieser Impfstrategie eine risikoreiche Übertragung des Impfvirus auf Kontakttiere nicht beobachtet werden (Hoffmann, 1999).

Experimentelle „neue“ Impfstoffprototypen

Die neuen Vakzineprototypen lassen sich unterteilen in Spaltvakzinen (*Subunit*-Vakzinen), Vektor- und DNA-Impfstoffe. Bei den Spaltvakzinen wurde bisher nur das Glykoprotein E2 in Kombination mit einem Adjuvans verwendet (Bruschke *et al.*, 1997; Bruschke *et al.*, 1999; Bouma *et al.*, 1999). Ihr experimenteller Einsatz wurde für die Immunisierung gegen BVDV (Bolin und Ridpath, 1996; Bruschke *et al.*, 1999) und CSFV (Hulst *et al.*, 1993; Bouma *et al.*, 2000) publiziert. Eine Untersuchung zeigte, dass eine E2-Subunit-Vakzine (E2 des BVDV-I-Stammes Singer) nur partiell gegen eine Infektion mit einem heterologen BVDV-II-Stamm (BVDV-II-US890) schützte (Bolin und Ridpath, 1996). Ebenso konnte eine multivalente BVDV-E2-Spaltvakzine (E2 von BVDV-Ia, -Ib und -II) bei Schafföten nur einen partiellen Schutz vor einer Infektion hervorrufen und selbst eine homologe Testinfektion führte zu einer messbaren Virämie (Bruschke *et al.*, 1999).

Eine vielversprechende Form der Adjuvenierung stellen so genannte ISCOMs dar. Hierbei wird das Glykoprotein E2 in Lipidbilayer-Partikel verpackt, die eine starke humorale und zelluläre Immunantwort auslösen. Eine Belastungsinfektion zur Untersuchung der Schutzwirkung dieser Vakzine im Tier wurde bisher nicht durchgeführt (Kamstrup *et al.*, 1992; Kamstrup *et al.*, 1999).

Immunisierungen gegen Pestiviren mit Hilfe von Vektorvakzinen wurden ebenfalls publiziert (Rümenapf *et al.*, 1991b; König *et al.*, 1995; Elahi *et al.*, 1999c; Kweon *et al.*, 1999; Reddy *et al.*, 1999). Bei Untersuchungen zur Eignung von Vektorvakzinen zum Schutz gegen klassische Schweinepest wurden verschiedene CSFV-Gene (Npro, Kapsid, E^{ms}, E2 und Kapsid bis E2) in das Genom eines Vacciniavirus-Vektors kloniert. Im Tierversuch wurden Schweine i.v. immunisiert und nachfolgend mit einem hochvirulenten CSFV-Stamm infiziert. Es stellte sich heraus, dass nur E2- oder E^{ms}-rekombinante Vacciniaviren in der Lage waren, vor einer letalen Schweinepestinfektion zu schützen. Bei der Immunisierung mit E^{ms} ließen sich allerdings keine neutralisierenden Antikörper nachweisen, so dass der Schutz wahrscheinlich auf zelluläre Immunmechanismen zurückzuführen war (König *et al.*, 1995).

Neuere Untersuchungen konzentrieren sich darauf, die Expressionseffizienz der rekombinanten Gene zu verbessern (Wang *et al.*, 2003). Dies wurde durch Insertion eines regulatorischen Elements für die Expression von rekombinantem BVDV-E2 in bovinem Herpesvirus (BHV) I bereits getestet (Wang *et al.*, 2003). BVDV-E2-kodierende DNA-Plasmide mit einem herpesviralen Promotor wurden ebenfalls erprobt. Bisher wurden BVDV-E2-DNA-Plasmide im Tierversuch bei Mäusen (Harpin *et al.*, 1997) und Rindern (Harpin *et*

al., 1999) getestet. Die erreichten Antikörpertiter waren bei mehrfacher Immunisierung mit in Liposomen verpackter DNA (L-DNA) deutlich höher als für nackte DNA (N-DNA). Allerdings konnte nur für mit N-DNA immunisierte Rinder ein begrenzter Schutz gegen eine Belastungsinfektion nachgewiesen werden (Harpin *et al.*, 1999).

Die Verfügbarkeit infektiöser cDNA-Klone eröffnet weitere Möglichkeiten der Impfstoffentwicklung. So wird eine molekulargenetische Attenuierung von BVDV-Stämmen oder eine in *trans*-Komplementierung (ein dem Virus fehlendes Protein wird unabhängig vom viralen Genom zur Verfügung gestellt) möglich. Bei CSF-Viren konnten z.B. durch Einführung von Punktmutationen im Bereich der für die RNase-Funktion wichtigen Domäne des E^{ms}-Proteins vermehrungsfähige CSF-Viren hergestellt werden, die für das Tier avirulent waren (Meyers *et al.*, 1999). Außerdem konnten E^{ms}-negative Virusgenome in E^{ms}-exprimierende Zellen transfiziert und Viruspartikel erzeugt werden, die nur deletierte Genome verpackten. Diese Viruspartikel, die nur auf E^{ms}-exprimierenden Zellen weiter passagiert werden konnten, werden auch als *Defective in Second Cycle*-Virionen (DISCs) bezeichnet, da eine Vermehrung auf nicht-komplementierenden Zellen unmöglich ist. Mit solchen Virionen immunisierte Schweine waren vor einer letalen Infektion mit dem CSFV-Stamm Bresica geschützt (Widjoatmodjo *et al.*, 2000).

Eine Unterscheidung zwischen einem natürlich infizierten und einem vakzinierten Tier ist mit so genannten DIVA- (*Differentiating Infected from Vaccinated Animals*) Vakzinen möglich (van Oirschot, 1999). Mit E2-Subunit-Vakzinen immunisierte Tiere können beispielsweise durch das Fehlen von E^{ms}- oder NS3-spezifischen Antikörpern von infizierten Tieren unterschieden werden. Beispiele für kommerziell eingesetzte DIVA-Vakzinen sind die gE-Vakzinen zur Bekämpfung der Aujeszky'schen Krankheit beim Schwein und der BHV I Infektion beim Rind (Stegeman *et al.*, 1994; Strube *et al.*, 1996). Für BVDV sind derzeit noch keine effizienten DIVA-Vakzinen verfügbar.

2.5. Das Modifizierte Vacciniavirus Ankara (MVA) als Vektorvakzine

Im folgenden Abschnitt sollen die besonderen Eigenschaften von MVA und seine Eignung als Vektorsystem für Mensch und Tier besprochen werden.

Seinen Ursprung hat das MVA im Dermovaccinia Stamm Ankara (CVA), der in der Türkei längere Zeit als Pocken-Impfstoff verwendet wurde. Die Attenuierung des CVA erfolgte durch mehr als 500 Passagen auf embryonalen Hühnerfibroblasten-Zellkulturen (HEF). Nach 370 Passagen waren erste Veränderungen in der Pathogenität für das Kaninchen und im Wirtszellspektrum zu erkennen (Mayr und Munz, 1964). Nach der 516. Passage schließlich wurde die genetisch stabil in HEF-Zellkulturen wachsende Vaccinia Mutante umbenannt und der Begriff Modifiziertes Vacciniavirus Ankara (MVA) definiert (Mayr *et al.*, 1975).

MVA ist ein Vacciniavirus mit stark verminderter Virulenz, was zahlreiche Tierversuche (bebrütetes Hühnerei, Maus, Kaninchen, Schwein, Rind, Hund, Pferd, Affe) belegen können (Mayr *et al.*, 1975; Mayr, 1976; Mayr *et al.*, 1978; Mahnel, 1985; Mahnel und Mayr, 1994; Sutter *et al.*, 1994b; Glaser, 1998). Affen, Mäuse und Kaninchen erkrankten selbst bei Applikation höchster Impfdosen (10^7 - 10^9 infektiöse Einheiten [I.E.]) nicht (Hochstein-Mintzel *et al.*, 1972; Algasinger, 1980). Eine klinische Allgemeinsymptomatik oder gar Todesfälle wurden nicht beobachtet. Bei intramuskulärer Applikation ist die Reaktion am Applikationsort zudem schwächer als bei der Verwendung eines kommerziellen Tetanusimpfstoffes (Hochstein-Mintzel *et al.*, 1975) und auch eine orale Verabreichung von MVA in hohen Dosen an Ferkel, Hundewelpen und Kälber verlief komplikationslos (Mayr *et al.*, 1975). Infektionsversuche von Tieren führten weder zu einer Virämie mit Virusausscheidung noch zu einer Übertragung auf Kontakttiere (Mayr *et al.*, 1975; Hochstein-Mintzel *et al.*, 1975; Mayr *et al.*, 1978; Mahnel und Mayr, 1994; Glaser, 1998). Neue Studien zeigten anhand von Mäuseversuchen, dass MVA zwar nach intranasaler Verabreichung in der Lunge und im assoziierten Lymphgewebe zu finden war, aber keinerlei Entzündungserscheinungen auftraten (Ramirez *et al.*, 2003). Bei systemischer Applikation wurde es in fast allen lymphatischen Organen, in der Lunge und in den Ovarien gefunden. Eine intrarektale, intravaginale und intragastrale Verabreichung führte zu keiner effizienten Infektion. 48 h nach der Applikation war kein Virus mehr nachweisbar (Ramirez *et al.*, 2003). MVA wurde auch als Pockenimpfstoff an 240.000 Mäusen und 100 Elefanten, die hochempfindlich gegenüber einer Vacciniavirusinfektion sind, getestet. Diese Untersuchungen bestätigten die Verträglichkeit des MVA (Mahnel, 1985; Mahnel und Mayr, 1994). Selbst eine Applikation von MVA an ganzkörperbestrahlte, immunsupprimierte Tiere

verlief komplikationslos (Mayr und Danner, 1978). Im Menschen erwies sich der MVA-Stamm ebenfalls als apathogen. Eine komplikationslose Erstimpfung von 25.000 Personen führte zur Empfehlung, weitere Menschen zu impfen (Stickl *et al.*, 1974). Bis zum Einstellen der Pockenimpfung wurden mehr als 120.000 Personen vakziniert, ohne dass dabei Komplikationen auftraten (Stickl, 1974; Mayr *et al.*, 1978; Mahnel und Mayr, 1994).

MVA vermehrt sich in HEF-Zellen und mit geringeren Virustitern in BHK-Zellen (Carroll und Moss, 1997; Drexler *et al.*, 1998). Für die Vermehrung in HEF-Zellen ist die Expression des Interferonresistenzgens E3L wichtig, da MVA-Delta E3L anfangs zwar noch replizieren, aber zu einem späten Zeitpunkt keine viralen Proteine mehr bilden kann. Die HEF-Zellen werden ca. 6 h nach der Infektion apoptotisch (Hornemann *et al.*, 2003). Bei getesteten humanen primären oder permanenten Zelllinien, sowie auf bovinen Zellen, Affen- und Kaninchenzellen kommt es zur abortiven Virusvermehrung (Mayr *et al.*, 1975; Meyer *et al.*, 1991; Drexler *et al.*, 1998). Eine Virusreplikation in diesen Zellen findet zwar statt, allerdings kommt es durch eine fehlende Prozessierung der MVA-Coreproteine in diesen Zellen zu einer gestörten Virusmorphogenese (Sutter und Moss, 1992). Das Wirtszellspektrum für die Vermehrung von MVA ist somit stark eingeschränkt (Sutter *et al.*, 1994a).

Apathogenität wurde mittlerweile auch für rekombinantes MVA nachgewiesen. Das MVA-LacZ-Konstrukt wurde im Mausmodell untersucht. Es konnte keine Virusvermehrung und Virusausscheidung festgestellt werden (Glaser, 1998). Das Virus ließ sich selbst bei intramuskulärer Applikation hoher Dosen (10^8 I.E.) nur lokal detektieren. Es wurde keine Virusreplikation in angrenzenden Muskelgeweben oder sonstigen Körpergeweben und Organen nachgewiesen. Selbst bei intraperitonealer Applikation kam es sowohl bei immunkompetenten Mäusen als auch bei immundefizienten Nacktmäusen zur raschen Viruseliminierung (Glaser, 1998). Weitere Tierversuche bestätigten die komplikationslose Verabreichung von rekombinanten MVA nach Insertion verschiedener Fremdgene (Sutter *et al.*, 1994b; Hanke *et al.*, 1998; Hanke und McMichael, 1999; Hanke *et al.*, 2002).

Die Veränderungen des MVA im Vergleich zu seinem Ursprungstamm sind auf der Ebene des Virusgenoms gut untersucht (Sutter, 1989; Meyer *et al.*, 1991). So wurden verschiedene Passagen des auf HEF-Zellen attenuierten MVA getestet, um Unterschiede auf molekularer Ebene zum Ursprungstamm CVA zu finden. Es wurden sechs Deletionen in Vergleich zu CVA entdeckt, die die Größe des Genoms von 208 kb (CVA) auf 177 kb (MVA) reduzierten. Vier Deletionen traten während der ersten 382 Passagen auf, wobei der entstandene CVA382-Phänotyp ähnlich wie MVA attenuiert war. Während der nächsten 190 Passagen traten zwei zusätzliche Deletionen auf. Diese schlossen eine Deletion im *host range*-Bereich ein und

fürten zum MVA-Phänotyp. Eine Virulenzsteigerung durch Rekombination im Bereich des *host range*-Gens ist unwahrscheinlich, da trotz Einfügung des entsprechenden Gens des CVA das gesamte Wirtsspektrum nur unvollständig wieder hergestellt werden konnte (Meyer *et al.*, 1991; Wyatt *et al.*, 1998). Dies lässt die Vermutung zu, dass nicht nur die Deletion im Bereich des *host range*-Gens zur Attenuierung beigetragen hat, sondern dass die hochgradige Attenuierung auf mehreren Defekten in teilweise konservierten Genombereichen beruht (Meyer *et al.*, 1991). Da die gesamte Gensequenz von MVA bekannt ist, können genetische Veränderungen jederzeit verfolgt werden (Antoine *et al.*, 1998). Mit Hilfe von Transfervektoren, die die ursprüngliche Genomstruktur von MVA enthalten, wurde rekombinantes MVA hergestellt (Sutter *et al.*, 1995; Sutter und Moss, 1995). Für die Fremdgeninsertion wurden die natürlichen, genau kartierten Deletionen II und III (Sutter und Moss, 1992) ausgewählt und die flankierenden Gensequenzen bestimmt. Durch Insertion einer Expressionskassette in die Deletion II wurde die *Escherichia coli* (*E. coli*) β -Galaktosidase unter die Kontrolle des Vaccinia Promotors p11 gebracht (Sutter und Moss, 1992). Die durch das rekombinante MVA in nicht permissiven Zellen produzierte Proteinmenge ist mit der von replizierenden Vacciniavirus-Vektoren vergleichbar (Sutter und Moss, 1992). Das rekombinante MVA findet heute weitreichende Verwendung (Seth *et al.*, 2000; Sharpe *et al.*, 2001; Weidinger *et al.*, 2001; Wee *et al.*, 2002; Cosma *et al.*, 2003). So haben Untersuchungen gezeigt, dass Affen, die mit *Simian Immunodeficiency Virus* (SIV)-rekombinantes MVA immunisiert wurden, eine SIV-spezifische zytotoxische Reaktivität entwickeln konnten (Sharpe *et al.*, 2003). In Abhängigkeit von der Stärke der durch die Immunisierung hervorgerufenen zytotoxischen Reaktion reduzierte sich die Virämie nach Belastungsinfektion (Seth *et al.*, 2000). Für SIV-rekombinantes MVA konnte zudem gezeigt werden, dass es neben einer Kontrolle der Virämie auch zu einer Verzögerung des Fortschreitens der Erkrankung kam, da es sowohl die zelluläre als auch die humorale Immunität stimulieren konnte (Earl *et al.*, 2002).

Auch in der *Human Immunodeficiency Virus*- (HIV-) Forschung gewinnt rekombinantes MVA zunehmend an Bedeutung. So wurde nach komplikationsloser Applikation von rekombinantes MVA an zehn chronisch HIV-infizierte Personen eine erhöhte Reaktion der CD4⁺-Zellen beobachtet (Cosma *et al.*, 2003). Eine Studie über Kombinationsimpfungen gegen HIV zeigte, dass die Erstimpfung mit rekombinantes MVA mit anschließender Boosterung mit einem rekombinantes Fowlpoxvirus eine stärkere CD8⁺-Immunantwort gegen HIV-Epitope in Mäusen hervorrief, als wenn für die Erstimmunisierung ein DNA-Poxvirus verwendet wurde. Dabei war es nicht entscheidend, ob MVA oder Fowlpox zur Boosterung

eingesetzt wurde (Vazquez-Blomquist *et al.*, 2003). Auch Affen reagierten nach Applikation einer kombinierten DNA-/MVA-Vakzine mit einer guten T-Zellantwort auf mehrere HIV-Epitope (Wee *et al.*, 2002).

Bei Mäusen und Ratten konnte mit Hilfe von rekombinantem MVA eine Immunität gegen Masern induziert werden (Weidinger *et al.*, 2001). Bei Affen konnten maternale Antikörper die Entwicklung einer Immunität gegen das Masernvirus zwar abschwächen, aber die Virusmenge und der Hautausschlag wurden trotz der vorhandenen Antikörper durch die Immunisierung mit rekombinantem MVA reduziert (Zhu *et al.*, 2000).

Für das Japanische Encephalitis Virus stellt MVA ebenfalls einen guten Ausgangspunkt für die Herstellung effektiver rekombinanter Vakzinen dar. Dies wurde durch Versuche im Schwein und in der Maus belegt (Nam *et al.*, 2002).

Das MVA-Virus wurde zudem bereits für die Expression von BVDV-E2 im Tier erprobt. Beer (2000) konnte an Schafen zeigen, dass eine Immunisierung mit dem rekombinanten Virus zu hohen neutralisierenden Antikörpertitern führte. Die immunisierten Tiere zeigten nach einer Belastungsinfektion eine nahezu vollständige Reduktion der Virämie und Virusausscheidung (Beer, 2000a).

MVA unterliegt wegen seiner Apathogenität und seiner Unfähigkeit, sich produktiv in humanen Zellen zu vermehren, der niedrigen Sicherheitsstufe L1/S1 (Robert Koch Institut Berlin).

3. Material und Methoden

3.1. Zellkulturen

3.1.1. Bovine Embryonale Lungenfibroblasten (BEL)

Die BEL-Zellen wurden aus drei bis vier Monate alten, BVD-Virus negativen Rinderfeten (*Bos taurus*) aus dem Schlacht- und Viehhof München mit Hilfe der Standardmethode der fraktionierten Trypsinierung (Mayr *et al.*, 1974) gewonnen. Dem sich in Seitenlage befindlichen Fetus wurden nach Abflammen der Haut und steriler Eröffnung der Brusthöhle die Lungenflügel entnommen und in eine mit PBS gefüllte Petrischale überführt. Die noch vorhandene Pleura wurde entfernt und das Lungengewebe mit Hilfe einer Schere zerkleinert. Das zerkleinerte Gewebe wurde einmal mit PBS gewaschen und danach in einen mit vorgewärmter Trypsinlösung, bestehend aus einem Teil Trypsin und vier Teilen PBS, gefüllten Trypsinierkolben überführt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 45-60 min auf einem Magnetrührer (Typ IKA-Combimag REO; IKA-Labortechnik) bei 37 °C. Nach zehnmütiger Sedimentation der größeren Bestandteile wurde die Gewebesuspension durch eine sterile Gaze filtriert. Zu den größeren Gewebestücken, die im Trypsinierkolben verblieben waren, wurde frische Trypsinlösung gegeben und der Vorgang ein- bis zweimal wiederholt, bis sich die Gewebeverbände vollständig aufgelöst hatten. Das Filtrat wurde daraufhin für 10 min bei 2000 rpm (*Sepatech Megafuge* 1.0 mit Rotor Nr. 2150; Heraeus Instruments) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Anzuchtmedium resuspendiert, in Zellkulturflaschen ausgesät (ca. 2×10^5 Zellen/ml) und bei 37 °C und 5%iger CO₂-Atmosphäre bis zur Konfluenz der Zellen inkubiert. Nach 24 Stunden wurden nicht festgewachsene Zellen durch einmaliges Waschen mit PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ entfernt. Für die Anzucht der primären Lungenzellen wurde *Earle's Minimum Essential Medium* (EMEM; Biochrom) mit Zusatz von 10 % *Donor Calf Serum* (DCS; C·C·Pro GmbH) verwendet. Nach Konfluenz der primären Zellkulturen wurden die Zellen nach einmaligem Waschen mit PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ mit Hilfe von Saline-Trypsin-Versen- (STV-) Lösung abgelöst und bei -135 °C in Einfriermedium kryokonserviert. Zur Überprüfung der BVDV-Freiheit wurde nach jeder Passage ein Aliquot BEL-Zellen entnommen und auf BVD-Virusantigen untersucht.

3.1.2. Bovine Hodenzellen

Die bovinen Hodenzellen, die als Zielzellen für den Zytotoxizitätstest dienen sollten, wurden aus den Hoden der Versuchstiere (siehe 3.4.) gewonnen. Die zehn Bullenkälber wurden nach zwei Wochen Eingewöhnungszeit von Mitarbeitern der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München kastriert. Die Hodenzellen wurden mit Hilfe der Methode der fraktionierten Trypsinierung gewonnen (siehe 3.1.1.). Zunächst wurden die Hodenhüllen, der Nebenhoden und der Samenstrang entfernt. Danach erfolgte die Incision der *Tunica albuginea testis* unter sterilen Bedingungen, so dass das gelbbraune Hodenparenchym auf der Schnittfläche sichtbar wurde. Das Hodengewebe wurde mit Hilfe einer Schere vorsichtig von der *Tunica albuginea* abgetrennt und in kleine Stücke zerteilt. Das zerkleinerte Gewebe beider Hoden eines Tieres wurde in einen mit Trypsinlösung gefüllten Trypsinierkolben gegeben und nach der Standardmethode weiterbearbeitet (Mayr *et al.*, 1974). Das Anzuchtmedium für die Hodenzellen bestand aus EMEM (Biochrom) mit 10 % DCS. Nach Konfluenz der Zellen wurden diese mit STV abgelöst und in Einfriermedium bei -135 °C bis zur Durchführung des Zytotoxizitätstestes gelagert.

3.1.3. Hühnerembryofibroblasten (HEF)

Aus zehn bis elf Tage bei 37,5-38,5 °C und bei 50-60 % Luftfeuchtigkeit bebrüteten Hühnereiern aus dem Institut für Geflügelkrankheiten in Oberschleißheim wurden primäre HEF-Zellkulturen hergestellt (Mayr *et al.*, 1974). Zunächst wurde die Eischale mit 70 %igem Ethanol (Roth) gereinigt und das Ei unter sterilen Bedingungen am stumpfen Pol eröffnet. Mit einer sterilen Pinzette wurde der Embryo entnommen und in eine mit PBS gefüllte Petrischale überführt. Nachdem in dieser Schale Kopf und Gliedmaßen entfernt worden waren, erfolgte in einer zweiten Petrischale die Exenteration der inneren Organe. In einer dritten Petrischale wurde der Embryo schließlich mit PBS gewaschen. Alle auf diese Art und Weise gewonnenen Embryonen wurden daraufhin in eine Einmalspritze (20 ml, *Terumo*[®] *syringe*; Terumo Europe N.V.) gefüllt und in ein Polypropylenröhrchen (50 ml; Nunc) gepresst. Das Röhrchen wurde mit PBS aufgefüllt und für 10 min bei 2000 rpm (*Seplatech Megafuge* 1.0 mit Rotor Nr.2150; Heraeus Instruments) zentrifugiert. Die sich nun auf dem Gewebepellet befindlichen Erythrozyten wurden vorsichtig abgekippt und das verbleibende Hühnerembryogewebe in

einen mit Trypsinlösung gefüllten Trypsinierkolben überführt. Das weitere Vorgehen entsprach dem unter 3.1.1. genannten Verfahren der fraktionierten Trypsinierung (Mayr *et al.*, 1974). Das Anzuchtmedium für die primären HEF-Zellkulturen bestand aus EMEM (Biochrom) mit 10 % Fetalem Kälberserum (FKS; Biochrom) und 10 % einer Lösung mit nichtessentiellen Aminosäuren (NEA; Biochrom). Die Zellen wurden entweder in Zellkulturflaschen oder -platten (Nunc) ausgesät und dienten der Vermehrung bzw. Titration von BVDV-NS3- und LacZ-rekombinanten MVA.

3.1.4. MA-104-Zellen

Bei MA-104-Zellen handelt es sich um eine permanente Affennierenzelllinie (Herkunft Dr. E. Bohl, Wooster, Ohio, USA; ursprünglich aus Nierenzellen von Rhesusaffen [*Macaca mulatta*] am Department of Research and Development, Microbiological Associates, Inc., Bethesda, Md., USA, etabliert; Matsuno *et al.*, 1977). Die Kultur erfolgte in Dulbecco's-modifiziertem Eagle-Medium (DMEM, Biochrom) mit Zusatz von 10 % NEA und 5 % FKS. Nach Konfluenz der teils eckig, teils kugelig wachsenden Zellen, wurden diese im Verhältnis 1:4 passagiert. MA-104-Zellen wurden im Rahmen der Versuche bei der Durchführung des Plaquereduktionstestes zum Nachweis neutralisierender Vacciniavirusantikörper (siehe 3.15.) verwendet.

3.2. Viren

3.2.1. BVDV-PT810

BVDV-PT810 ist der BVDV-I-Spezies zuzuordnen, es ist nichtzytopathogen und wurde ursprünglich aus Leukozyten einer persistent virämischen Fleckviehkalbin isoliert (Thierauf, 1993; Wolfmeyer *et al.*, 1997). Das Feldvirus wurde als Ausgangsisolat verwendet und erhielt nach ersten Passagen auf BEL-Zellkulturen die Bezeichnung „*Master*“ (PT810/M). Es wurde bei -80 °C kryokonserviert. Nach einer weiteren Passage auf BEL-Zellen wurde dieses Virus für die Testinfektion der Versuchstiere verwendet und diente außerdem in verschiedenen Testansätzen als Stimulans für die isolierten Leukozyten der Tiere (siehe 3.6.3. und 3.6.4.).

3.2.2. Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA)

Das Wildtyp-MVA (MVA-WT) diente als Ausgangsmaterial für die Herstellung der rekombinanten MVA. Hierbei handelte es sich um den MVA-WT in der 574. Passage (Herrlich und Mayr, 1957; Mayr *et al.*, 1975). Das BVDV-NS3-rekombinante MVA wurde im Rahmen einer am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München angefertigten Dissertation hergestellt (Klemm, 2001). Das LacZ-rekombinante MVA wurde freundlicherweise von Herrn Dr. G. Sutter (GSF, München) zur Verfügung gestellt.

3.2.3. Vacciniavirus München 1 (VV-M1)

Das neurovirulente VV-M1 wurde nach der 6. SM- (*suckling mouse brain*), 9. HEF- und 2. MA-104-Zellpassage verwendet (Czerny *et al.*, 1989; Czerny und Mahnel, 1990). Es diente im Plaquereduktionstest dem Nachweis und der Quantifizierung neutralisierender Vacciniavirusantikörper im Serum der mit rekombinantem MVA immunisierten Versuchstiere (siehe 3.15.).

3.3. Virusherstellung

3.3.1. Vermehrung von BVDV-PT810 auf BEL

Für die Vermehrung des BVD-Virusstammes PT810 wurden BEL-Zellkulturen bis zur dritten Passage verwendet. 100 µl BVDV-PT810/M wurden auf konfluente BEL-Zellen gegeben und drei Tage lang bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurde der Zellkulturüberstand 5 min lang bei 2000 rpm zentrifugiert (*Seatech Megafuge 1.0* mit Rotor Nr. 2150; Heraeus Instruments). Durch den Zentrifugationsschritt sollten abgelöste, tote Zellen entfernt werden. Der Überstand wurde in Aliquots überführt, titriert (siehe 3.3.3.1.) und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.3.2. Virusvermehrung auf HEF

Für die Vermehrung des rekombinanten MVA wurden konfluente HEF-Zellkulturen in 175 cm² Flaschen (Nunc) verwendet. Die zu 80-90 % konfluenten Zellen wurden mit einer *multiplicity of infection* (m.o.i.) von 1-2 infiziert und das Anzuchtmedium durch 10 ml Erhaltungsmedium (EMEM mit 5 % FKS) ersetzt. Nach einer Adsorptionszeit von einer Stunde bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Zellkulturflaschen mit den infizierten HEF-Zellen mit 25 ml Erhaltungsmedium aufgefüllt. Im Anschluss an eine Inkubationszeit von 36-48 h wurden die Zellen bei 70-80 % cpE geerntet. Die HEF-Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers (Nunc) losgelöst und zusammen mit einer geringen Menge Zellkulturüberstand in ein Polypropylenröhrchen (50 ml; Nunc) überführt. Nach einer zehnmütigen Zentrifugation bei 2000 rpm und Resuspension in 15 ml Medium wurde die Zellsuspension nach dreimaligem Gefriertauen dreimal 15 s lang beschallt (50-60 Hz, *Sonifer™ cell disruptor* B12; Branson Sonic Power Company), um die überwiegend zellgebundenen Virionen freizusetzen. Die so entstandene Virussuspension wurde in Aliquots überführt und bei -80 °C gelagert.

3.3.3. Virustiterbestimmung

3.3.3.1. Bestimmung des Titers von BVDV-PT810

Die BVD-Virustiterbestimmung wurde in 96-Loch-Flachboden-Zellkulturplatten (Nunc) durchgeführt. Die Virusverdünnung erfolgte mit EMEM in \log_{10} -Schritten von 10^0 bis 10^{-11} . Von jeder Verdünnungsstufe wurden acht Ansätze angelegt. Nach Vorlage von je 100 μ l der Virusverdünnungen erfolgte die Zugabe von je 100 μ l BEL-Zellsuspension (ca. 20.000 Zellen). Nach anschließender fünftägiger Inkubation bei 37 °C und 5 %iger CO₂-Atmosphäre erfolgte die Auswertung nach Immunfluoreszenzfärbung (siehe 3.8.) im Immunfluoreszenzmikroskop (Axiovert 25; Zeiss). Der Titer wurde in 50 % kulturinfektiöse Dosis pro ml (KID₅₀/ml) angegeben.

3.3.3.2. Bestimmung des Titers des rekombinanten MVA

Die Bestimmung der Titer der rekombinanten MVA erfolgte mit Hilfe der X-Gal-Färbung. Diese Methode macht sich die Expression des *E. coli* LacZ-Reportergens in virusinfizierten Zellen für die Virustiterbestimmung zunutze. Zunächst wurde sowohl ein Aliquot des BVDV-NS3-MVA als auch des LacZ-MVA aufgetaut und in \log_{10} -Schritten verdünnt (10^{-1} bis 10^{-9}). Nach Entfernen des Anzuchtmediums wurden je 1 ml der entsprechenden Verdünnung in die Vertiefungen einer konfluenten HEF-6-Loch-Zellkulturplatten gegeben. Eine Negativkontrolle mit 1 ml Erhaltungsmedium wurde mitgeführt. Es folgte eine Inkubation für 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂. Die Auswertung der Titration erfolgte mit Hilfe des β -Gal Staining Sets (Roche) nach Herstellerangaben. Nach Entfernung des Mediums wurden die Zellen mit PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen mit Fixativlösung, bestehend aus 2 % (v/v) Formaldehyd (Sigma) und 0,2 % (v/v) Glutaraldehyd (Roth) in PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ für 5 min bei Raumtemperatur. Nach der Fixierung wurden die Zellen dreimal mit PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ gewaschen und mit Färbelösung (1 Teil X-Gal-Lösung und 19 Teile Eisenpuffer) überschichtet. Es folgte eine Inkubation von einer Stunde bei 37 °C und 5 % CO₂. Die blau gefärbten Virusplaques konnten nach drei Waschschritten mit PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ makroskopisch zur Virustiterbestimmung ausgezählt werden. Es wurden jeweils nur Verdünnungsstufen mit 10-

50 Plaques ausgezählt. Die Angabe des Titers der rekombinanten MVA erfolgte in infektiösen Einheiten pro Milliliter (I.E./ml).

3.3.4. Herstellung von Kontroll-Zellkulturüberständen (Mock)

Für die Herstellung der Kontroll-Zellkulturüberstände (Mock) wurden ebenfalls konfluente BEL-Zellkulturen benötigt. Die Kontrollüberstände dienten bei den verschiedenen Stimulationsversuchen dazu, unspezifische Einflüsse durch das Medium oder durch den Zusatz von FKS auszuschließen. Der einzige Unterschied zu der Herstellung von virushaltigem Material war, dass bei der Herstellung dieser Überstände der Zusatz von BVD-Virus entfiel. Die Virusfreiheit wurde durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung der Zellen mit anschließender Auswertung im Durchflusszytometer nachgewiesen. Die Kontrollüberstände wurden ebenfalls aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.4. Tiere und Immunisierung

Der Tierversuch war von der Regierung von Oberbayern genehmigt (AZ 211-2531-80/97). Die für den Versuch benötigten zehn Bullenkälber stammten aus unterschiedlichen landwirtschaftlichen Betrieben. Es handelte sich um gesunde Tiere der Rasse „Deutsches Fleckvieh“ im Alter von zwei bis fünf Wochen. Die Tiere wurden vor Ankauf, kurz vor Versuchsbeginn und in regelmäßigen Abständen vor der Testinfektion auf BVDV-Antigen- und BVDV-Antikörperfreiheit untersucht. Vor der Testinfektion waren alle Leukozytenproben der Kälber in der indirekten Immunfluoreszenzfärbung BVDV-Antigen negativ. Der Nachweis von BVDV-Antikörpern im BVDV-Antikörper-ELISA und im BVDV-spezifischen Serumneutralisationstest verlief vor der Testinfektion ebenfalls mit negativem Ergebnis. Die Kälber wurden in Boxen in Gruppen von je zwei Tieren in den Ställen des Institutes für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München auf dem Oberwiesenfeld gehalten.

3.4.1. Rekombinantes MVA für die Immunisierung

Das für die Immunisierung verwendete rekombinante MVA wurde nach der vierten (BVDV-NS3-MVA) bzw. fünften (LacZ-MVA) Zellkulturpassage eingesetzt. Aliquots wurden für die Bestimmung des Virustiters (siehe 3.3.3.2.), die bakteriologische Untersuchung einschließlich der Überprüfung auf Mykoplasmen, zurückbehalten. Jede Viruscharge wurde erst bei negativem bakteriologischen Ergebnis für die Immunisierung verwendet. Das rekombinante BVDV-NS3-MVA wurde zudem vor der Verwendung für die Immunisierung durch PCR und Sequenzanalyse überprüft. Außerdem erfolgte im Falle des BVDV-NS3-rekombinanten MVA eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung infizierter HEF-Zellen zur Überprüfung der Expression von NS3. Kurz vor der Immunisierung wurden das BVDV-NS3- und das LacZ-rekombinante MVA auf Eis aufgetaut.

3.4.2. Tiergruppen

Per Zufall wurde eine Kontrollgruppe (N = 4) und eine Versuchsgruppe (N = 6) bestimmt. Die Kontrollgruppe wurde gebildet, um die durch das MVA selbst hervorgerufenen Einflüsse auf das immunologische Geschehen zu untersuchen. Den Kontrolltieren wurden je 2 ml rekombinantes LacZ-MVA mit einem Titer von $> 10^8$ I.E./ml intramuskulär (i.m.) injiziert. Die Tiere der Versuchsgruppe bekamen 2 ml BVDV-NS3-rekombinantes MVA mit einem Titer von $> 10^8$ I.E./ml pro Impfdosis i.m. verabreicht. Die insgesamt drei Immunisierungen wurden im Abstand von jeweils vier Wochen durchgeführt. Nach den Immunisierungen konnte zu keiner Zeit eine Entzündung oder Schwellung des Applikationsortes festgestellt werden. Auch eine Störung des Allgemeinbefindens oder Fieber konnte nicht beobachtet werden. Genaue Angaben zu den bei den einzelnen Immunisierungen verwendeten Virustitern sowie zu den Zeitabständen zwischen den einzelnen Immunisierungen und der Testinfektion finden sich in Tab. 2.

Tab. 2: Immunisierungsschema.

Gruppe	Rekombinantes MVA/BVD-Virus	Tag der Applikation	Dosis
1. Kontrollgruppe (Tiere: G, H, I, J)	LacZ-MVA	0	1,90 x 10 ⁹ I.E.
		30	1,90 x 10 ⁹ I.E.
		58	1,90 x 10 ⁹ I.E.
	BVDV-PT810	90	1,00 x 10 ⁶ KID ₅₀ /ml
2. Versuchsgruppe (Tiere: A, B, C, D, E, F)	BVDV-NS3-MVA	0	7,00 x 10 ⁸ I.E.
		30	6,70 x 10 ⁸ I.E.
		58	6,85 x 10 ⁸ I.E.
	BVDV-PT810	90	1,00 x 10 ⁶ KID ₅₀ /ml

3.4.3. Testinfektion mit BVDV-Ic-PT810

Das für die Testinfektion verwendete BVD-Virus-PT810 wurde einmal auf BEL-Zellkulturen passagiert und bei -80 °C gelagert. Vor Verwendung des Virus im Infektionsversuch wurde der Virustiter bestimmt, sowie eine bakteriologische Untersuchung und ein Mykoplasmenausschluss mittels PCR durchgeführt. Das Virus wurde mit einem Titer von 10⁶ KID₅₀/ml eingesetzt. Kurz vor Durchführung der Infektion wurde das Virus auf Eis aufgetaut. Alle Tiere bekamen jeweils 1 ml des virushaltigen Zellkulturüberstandes mit Hilfe einer Impfstoffsprühpistole (Muto[®]; Hauptner) und eines 3,5 cm langen Zerstäuberaufsatzes (Hauptner) tief in jeweils beide Nasenöffnungen gesprüht. Nach der Infektion wurde täglich das Allgemeinbefinden der Tiere beobachtet und die rektale Temperatur gemessen. Eine Rücktitration bestätigte den errechneten Virustiter von 10⁶ KID₅₀/ml.

3.4.4. Probenentnahme, Bearbeitung und Lagerung

Allen Tieren wurde während der einzelnen Immunisierungsabschnitte in regelmäßigen Abständen und nach der Testinfektion 19 Tage lang täglich Blut aus der *V. jugularis* entnommen. Für die Gewinnung der mononukleären Blutzellen wurde eine 20 ml Spritze (Terumo Europe N.V.) mit 4 ml Na-Citrat-Lösung (Natriumcitrat Braun 3,13 %; Braun) verwendet. Während der einzelnen Immunisierungsabschnitte wurden zudem in regelmäßigen Abständen EDTA-Blut in 10 ml Plastikröhrchen (Nr. 3009915, Monovette® 9 ml KE Luer EDTA; Sarstedt) und Serum in 10 ml Gefäßen (Nr. 3093801, Monovette® 9 ml Z Luer Serum; Sarstedt) gewonnen. Das Vollblut wurde unverzüglich im Labor weiterverarbeitet. Der Transport und die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur. Das Serum wurde über Nacht bei 4 °C gelagert, am darauf folgenden Tag bei 2500 rpm abzentrifugiert, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Bestimmung der Leukozytenzahl erfolgte aus dem entnommenen EDTA-Blut mit Hilfe des Cell DYN 3500 Analysegerätes (Abbott Laboratories) in der I. Medizinischen Tierklinik der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München. Nach der Testinfektion wurden jeweils 10^5 und 10^6 Leukozyten nach Ammoniumchloridlyse des EDTA-Blutes (siehe 3.5.1.) auf BEL-Zellen in 24-Loch-Zellkulturplatten (Nunc) angeimpft. Nach fünf Tagen Inkubation der Kulturen wurde mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenzfärbung (siehe 3.8.) Virusantigen nachgewiesen. Die Proben wurden für weitere Untersuchungen bei -70 °C gelagert.

3.5. Isolierung von Leukozyten aus dem peripheren Blut

3.5.1. Ammoniumchloridlyse

Die gesamte Leukozytenfraktion aus dem EDTA-Blut wurde mittels hypotoner Lyse der Erythrozyten gewonnen. Zu einem Teil Blut wurden drei Teile Lysispuffer (8,29 g/l NH_4Cl , 1,0 g/l KHCO_3 und 1 mM EDTA in A. demin.) gegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Nach einem sich anschließenden Zentrifugationsschritt bei 2000 rpm für 5 min wurde der Überstand dekantiert und das Zellpellet durch Resuspendieren und Auffüllen mit PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt, um eventuell vorhandene Antikörper zu entfernen. Anschließend wurden jeweils 10^5 bzw. 10^6 Leukozyten im Doppelansatz auf konfluente BEL-Zellen in einer 24-Loch-Zellkulturplatte (Nunc) pipettiert und für fünf Tage inkubiert (siehe 3.4.4.).

3.5.2. Dichtezentrifugation

Die Methode der Zentrifugation über den Dichtegradienten wurde gewählt, um die Lymphozyten- und Monozytenfraktion von den Granulozyten und Erythrozyten abzutrennen. 20 ml Gradientenlösung (*Percoll Separating Solution*, Dichte 1,077; Biochrom) wurden in sterile und endotoxinfreie 50 ml Zentrifugenröhrchen (Polypropylen; Nunc) pipettiert. Das Percoll wurde dann vorsichtig, um Vermischungen zu vermeiden, mit 20 ml gerinnungsgehemmtem Natrium- (Na-) Citrat-Blut überschichtet. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 2500 rpm für 60 min. Mit Hilfe einer 10 ml Glaspipette mit breiter Öffnung wurde der sich in der Interphase befindliche, wenige Millimeter breite *Buffy Coat* der Leukozyten und Monozytenfraktion abgesaugt (siehe Abb. 3). Diese Zellfraktion wurde in sterile und endotoxinfreie Polypropylenröhrchen (50 ml; Nunc) überführt und die Röhrchen mit PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ aufgefüllt. Es folgte eine zehnminütige Zentrifugation bei 1500 rpm. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Zellpellet resuspendiert und das Röhrchen erneut mit PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ aufgefüllt. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Im Anschluss an die Waschschrift wurde das Zellpellet in 1 ml RPMI-1640-Medium (Sigma) mit Zusatz von 2 % FKS, 50 μl Mercaptoethanol, 100 mg/l Streptomycin, 10^5 I.E./l Penicillin,

10 % NEA resuspendiert und die Zellen im Hämozytometer nach Fuchs/Rosental (Brand) ausgezählt.

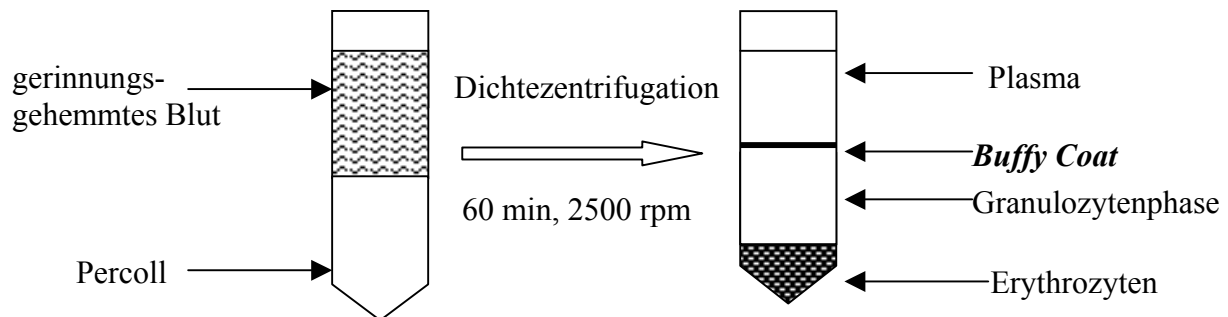


Abb. 3: Dichtezentrifugation mit Percoll zur Abtrennung der mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut.

3.5.3. Differenzierung und Auszählung der Blutzellpopulationen

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte entweder aus EDTA-Blut mit Hilfe des Cell DYN 3500 Analysegerätes (Abbott Laboratories) in der I. Medizinischen Tierklinik oder im Falle von Citratblut nach Abtrennung der Lymphozyten und Monozyten von den polymorphkernigen Blutzellen und Erythrozyten mit Hilfe des Hämozytometers nach Fuchs/Rosental (Brand). Vor der Auszählung im Hämozytometer wurde eine Lebend-/Tot-Färbung der mononukleären Zellen mit Trypanblau (Sigma) durchgeführt. Hierbei nahmen tote Zellen den blauen Farbstoff auf und ließen sich so durch ihre Blaufärbung von den vitalen d.h. lebenden Zellen differenzieren.

Das Cell DYN 3500 Analysegerät konnte nicht zwischen lebenden und toten Zellen unterscheiden. Es wurden sowohl die relativen Zellzahlen d.h. die prozentuale Verteilung der einzelnen Zellarten als auch die absoluten Werte für die einzelnen Zellpopulationen ermittelt. Es standen nach Auswertung im Cell DYN 3500 Analysegerät auch die Werte für die Granulozyten und Thrombozyten zu Verfügung.

Mit Hilfe des Durchflusszytometers FACScan (Becton Dickinson) konnte anhand der Streulichte der einzelnen Zellpopulationen zwischen Granulozyten, Lymphozyten und

Monozyten unterschieden werden. Das Vorwärtsstreulicht (FSC = *forward scatter*) ist dabei ein Maß für die Größe der Zellen, während das Seitwärtsstreulicht (SSC = *side scatter*) Aufschluss über die Zellgranulierung gibt. Somit lassen sich die Granulozyten aufgrund ihres hohen SSC-Wertes und die Lymphozyten und Monozyten wegen ihrer Größe durch unterschiedliche FSC-Werte differenzieren. Durch die Analyse im Durchflusszytometer ließ sich allerdings nur der relative Anteil dieser Zelltypen an der Gesamtzellzahl ermitteln.

3.6. Stimulationsprotokolle für bovine Leukozyten

3.6.1. Stimulation in stehenden Zellkulturflaschen

Die Stimulation der Lymphozyten wurde in stehenden 25 cm² Zellkulturflaschen (Nunc) durchgeführt. Jeweils 10⁷ mononukleäre Zellen pro Tier und Ansatz wurden mit 2 ml RPMI-Medium (Sigma) in eine 25 cm² Zellkulturflasche (Nunc) gegeben. Für jedes Tier wurden vier verschiedene Ansätze angelegt. In jede Zellkulturflasche wurden neben 200 µl des entsprechenden Stimulans (siehe 3.6.3. bis 3.6.5.) 50 µl rekombinantes bovines Interleukin-2 (rboIL-2; R. A. Collins; 2x10⁴ U/ml) zugegeben. Die Zellen wurden bei 37 °C in 5 %iger CO₂-Atmosphäre inkubiert. Es erfolgte eine regelmäßige lichtmikroskopische Kontrolle der verschiedenen Ansätze. Nach drei Tagen wurden erneut 4 ml Lymphozytenmedium, 50 µl rboIL-2 sowie 200 µl des Virus- bzw. Kontrollüberstandes zugegeben, ebenso am Tag 7. In regelmäßigen Abständen und in Abhängigkeit von festgestellten Veränderungen der Zellmorphologie (Blasten, Haarzellen, Haufenbildung) wurden 8 ml Medium vorsichtig abpipettiert und durch 8 ml neues Medium mit Zusatz von 50 µl rboIL-2 sowie 200 µl Virus- oder Kontrollüberstand ersetzt.

3.6.2. Stimulation in 24-Loch-Zellkulturplatten

Zur Gewinnung der für die Interleukin 2- (IL-2-), Interleukin 4- (IL-4-) und die γ -IFN-Bestimmung benötigten Lymphozyten und Zellkulturüberstände wurde die Stimulation der Zellen in 24-Loch-Zellkulturplatten (Nunc) durchgeführt. Sowohl von der Virusstimulation

als auch von der Kontrollstimulation wurden zwei Ansätze angelegt. Es erfolgte keine Zugabe von rboIL-2, da dies die Ergebnisse der Interleukinbestimmung verfälscht hätte. Die Überstände wurden nach sechs Stunden gesammelt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.6.3. Stimulierung mit BVDV-PT810

Für die Stimulation mit BVDV-PT810 wurden jeweils 200 µl virushaltiger Zellkulturüberstand mit einem Titer von mindestens 10^8 KID₅₀/ml in die entsprechenden Zellkulturflaschen gegeben (siehe 3.6.1.).

3.6.4. Stimulierung mit inaktiviertem BVDV-PT810

Vor der Zugabe zu den mononukleären Blutzellen wurde das BVDV-PT810 durch eine zehnmünütige Bestrahlung mit UV-Licht inaktiviert. Durch die Inaktivierung sollte eine Infektion der Lymphozyten verhindert werden, so dass in diesem Ansatz die stimulierenden Eigenschaften der Virusantigene ohne Infektion untersucht werden konnten. Die Inaktivierung wurde stets mit Hilfe von BEL-Zellkulturen kontrolliert.

3.6.5. Stimulierung mit Kontrollüberstand

Um die unspezifischen Einflüsse durch das Medium bzw. das FKS abklären zu können, wurden auch nicht infizierte Zellkulturüberstände hergestellt (siehe 3.3.4.). Diese sogenannten Mock-Überstände wurden in der Stimulation in der gleichen Menge eingesetzt wie die virushaltigen Überstände, d.h. zu jedem Stimulationsansatz wurden 200 µl Mock gegeben.

3.6.6. Mitogene Stimulation mit Concanavalin A (ConA)

Zu den sich in 2 ml RPMI-Medium in 25 cm² Zellkulturflaschen (Nunc) befindlichen Lymphozyten wurden 5 µg/ml Concanavalin A (Nr. C0412, ConA, Typ IV-S; Sigma) gegeben. Diese mitogene Stimulation mit ConA diente als Positivkontrolle in den Stimulationsversuchen.

3.7. Durchflusszytometrie

Mit Hilfe des Durchflusszytometers FACScan (Becton Dickinson) erfolgte die Messung der Fluoreszenzsignale markierter Zellen. Die Datenauswertung erfolgte mit der *Software Cell Quest Pro* (Becton Dickinson). Angaben über die unterschiedlichen Fluorochrome, die in dieser Arbeit verwendet wurden, ihre zugehörigen Fluoreszenzbereiche und Testsysteme finden sich in Tab. 3.

Zur Differenzierung von nicht permeabilisierten und permeabilisierten Zellen wurde der bei dsDNA-interkalierende Farbstoff Propidiumjodid (PJ; Sigma) verwendet und im Messkanal 2 bzw. 3 (FL2 bzw. FL3) gemessen. Vergleichende Untersuchungen der Fluoreszenzintensität gefärbter Zellen erfolgten über den Mittelwert der Intensität für die jeweilige Zellgruppe (*Mean Channel*; MC). Diese Methode war Grundlage bei der Auswertung des Proliferationstestes mit Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (CFSE) (siehe 3.10.).

Tab. 3: Fluorochrome, ihre Fluoreszenzbereiche und Angabe des Testsystems für, das sie verwendet wurden.

Fluorochrom	Fluoreszenzbereich (Maxima)	Testsysteme
<i>Alexa™ 488-markiertes Goat-anti-Mouse Konjugat</i>	Absorption: 495 nm Emission: 519 nm Messparameter: FL1	intrazelluläre Färbung
<i>Propidiumjodid (PJ)</i>	Absorption: 535 nm Emission: 617 nm Messparameter: FL2 oder FL3	1. intrazelluläre Färbung 2. Zytotoxizitätstest
<i>3,3'Dioctadecyloxacarbocyanin perchlorat (D275)</i>	Absorption: 484 nm Emission: 501 nm Messparameter: FL1	Zytotoxizitätstest
<i>Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (CFSE)</i>	Absorption: 495 nm Emission: 519 nm Messparameter: FL1	Proliferationstest

3.8. Darstellung von intrazellulären Antigenen

Nachweis von BVDV-NS2/3 in Zellen

Zunächst wurden die Zellen mit 100 µl einer 1 %igen Paraformaldehydlösung (P6148; Sigma, in PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) auf Eis für 10 min fixiert. Nach einem Waschschrift durch Zugabe von 200 µl PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, 2 min Zentrifugation bei 2000 rpm und Abkippen des Überstandes erfolgte die Permeabilisierung der Zellen mit Hilfe von 100 µl des Detergens Digitonin (D-1407; Sigma, 0,0025 %ig in PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) für 5 min bei Raumtemperatur. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ erfolgte die Zugabe von 50 µl des ersten Antikörpers (WB 103/105; CVL Weybridge, Gebrauchsverdünnung 1:500 in PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) und eine Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur. Dieser primäre „Antikörpermix“ diente dem Nachweis des BVDV-NS2/3. Er beinhaltet die Immunglobulinisotypen IgG1 (WB103) und IgG2a (WB105). Es wurde stets eine Konjugatkontrolle ohne ersten Antikörper mitgeführt. Vor Zugabe des Konjugates wurden die Zellen zweimal mit 200 µl PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 50 µl des sekundären Antikörpers (*Alexa*[™] 488-markiertes Goat-anti-Mouse Konjugat; Molecular Probes; Gebrauchsverdünnung 1:1000 in PBS), eine erneute Inkubation für 60 min bei Raumtemperatur und zwei Waschschriffe mit PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$. Schließlich wurden die Zellen durch Zugabe von 100 µl PJ-Puffer (PJ, Propidiumjodid, P4170; Sigma, 10^{-6} M in PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) resuspendiert. PJ bindet aufgrund seiner Eigenschaft als interkalierender Farbstoff stöchiometrisch an die doppelsträngige DNA. Die Auswertung der indirekten Immunfluoreszenzfärbung erfolgte im Durchflusszytometer mit Hilfe der *Software Cell Quest Pro* (Becton Dickinson) (siehe 3.7.). Ausgewertet wurden permeabilisierte Zellen (mit PJ-Signal). Gemessen wurde sowohl die FL1 (Alexa) als auch die FL2 (PJ). Zunächst wurde die Konjugatkontrolle ohne primären Antikörper ausgewertet, so dass die unspezifische Fluoreszenz der Zellen ermittelt werden konnte. Zur Auswertung kam der prozentuale Anteil der Zellen an der Gesamtzellzahl, die den primären Antikörper im Vergleich zur Kontrolle gebunden hatten. Über unspezifische Streulichte plausible Zellcluster wurden hinsichtlich der spezifischen Fluoreszenz ausgewertet.

3.9. Zytotoxizitätstest

3.9.1. Herstellung der BVDV-infizierten Zielzellen (Targetzellen, *Targets*)

Als Zielzellen wurden autologe Hodenzellen verwendet (siehe 3.1.2.). Zunächst wurden die Zellen aufgetaut und in EMEM mit 10 % DCS in 175 cm² Zellkulturflaschen (Nunc) ausgesät. Nach Konfluenz der Zellen wurden diese mit 200 µl BVDV-PT810 mit einem Titer von $> 10^8$ KID₅₀/ml bzw. 200 µl Mock infiziert. Nach der Infektion der Zellen erfolgte eine dreitägige Inkubation. Die Zellen wurden 12-15 h vor Testdurchführung mit 10 µl (= 25 µg D275) der Gebrauchsverdünnung des grünfluoreszierenden Farbstoffs 3,3'-Dioc-tadecyloxacarboocyanin perchlorat (D275, Nr. D275; Molecular Probes) gefärbt. Durch die Färbung wurde die Zellmembran für mehr als 48 Stunden stabil angefärbt. Eine zytotoxische Wirkung des Farbstoffes konnte nicht beobachtet werden. Die Zielzellen konnten durch diese Färbung im Zytotoxizitätstest anhand ihrer FL1 von den Effektorzellen differenziert werden. Die Effizienz der Färbung wurde stets mit Hilfe des Durchflusszytometers kontrolliert. Die mit D275 fluoreszenzmarkierten Hodenzellen wurden mit 5 ml STV abgelöst. Die Zellen wurden nach Inaktivierung der STV-Lösung durch Zugabe von 1ml FKS über eine Dichtezentrifugation mit Percoll (2000 rpm, 30 min) aufgereinigt. Die Hodenzellen wurden zweimal mit PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ gewaschen und in EMEM auf 2×10^6 Zellen pro ml eingestellt. 75 µl der Zielzellsuspension (sowohl Virus- als auch Mock-infizierte Zellen) wurden bis zur Aufbereitung der Effektorzellen in eine 96-Loch-Zellkulturplatte pipettiert und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

3.9.2 Herstellung BVDV-spezifischer Effektorzellen

Als Effektorzellen dienten die isolierten Lymphozyten der Versuchstiere, die nach unterschiedlicher Stimulationsdauer (15-20 Tage) für den Test verwendet wurden. Die Zellen wurden *in vitro* mit BVDV-PT810 ($> 10^8$ KID₅₀/ml) bzw. Mock stimuliert und nach Beurteilung des Proliferationsverhaltens im Lichtmikroskop für den Test ausgewählt. Die Effektorzellen wurden ebenfalls durch eine Dichtezentrifugation mit Percoll (30 min bei 2000 rpm) von toten Zellen und Zelltrümmern befreit, zweimal mit PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ gewaschen, ausgezählt und auf die entsprechende Zellzahl pro ml Lymphozytenmedium

eingestellt. Die Effektorzellen wurden im Verhältniss 2:1, 10:1 und 100:1 zu den Zielzellen gegeben, um die *ex vivo* Zytotoxizität der peripheren Lymphozyten zu überprüfen.

3.9.3. Protokoll des Zytotoxizitätstestes (*cytotoxic T-lymphocyte-Test*, CTL-Test)

Vor Beginn des Zytotoxizitätstestes wurden die Zellen wie unter 3.9.1. und 3.9.2 beschrieben aufbereitet. Der Test wurde in 96-Loch-Zellkulturplatten (Gewebekulturplatten; Sarstedt) mit U-Boden durchgeführt. Alle Proben wurden im Zweifachansatz untersucht. 75 µl der auf die entsprechende Zellzahl eingestellten Effektorzellsuspension wurde zu den aufbereiteten Zielzellen in der 96-Loch-Zellkulturplatte, mit Ausnahme der Zielzellkontrolle, pipettiert. Die Platte wurde kurz geschüttelt und 1 min bei 500 rpm zentrifugiert. Danach wurden die Zellen für vier Stunden bei 37 °C und 5 %iger CO₂ Atmosphäre inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden 50 µl PJ (10⁻⁵ M in PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺) dazu gegeben und die Zellen mit Hilfe einer Mehrkanalpipette resuspendiert. Die Platte wurde während der Messung auf Eis gehalten, um einen weiteren Zelltod zu verhindern und die zytotoxische Reaktion abzustoppen. Als Positivkontrolle in diesem Test dienten markierte Hodenzellen, die mit Hilfe von 0,0025 %igem Digitonin bei einer Inkubationszeit von fünf Minuten permeabilisiert wurden. Mit dieser positiven Kontrolle wurde die Messtechnik eingestellt. Zunächst erfolgte stets das Setzen eines Schwellenwertes für die FL1 (D275-Fluoreszenz), denn so konnten die Zielzellen deutlich von den Effektorzellen abgetrennt werden. Bei der Auswertung des Testes wurde das PJ-Signal im Fluoreszenzkanal 3 gemessen, da in diesem Kanal die Grünfluoreszenz der D275-gefärbten Hodenzellen nicht störte. Die Messung der spezifischen Zytotoxizität erfolgte zehn Minuten nach Zugabe des Propidiumjodids. Berechnet wurde der Anteil getöteter, d.h. PJ-positiver Zielzellen an der Gesamtzahl der vorhandenen D275-positiven Zielzellen. Dabei wurde die zytotoxische Aktivität BVDV-PT810-stimulierter Lymphozyten gegen BVDV-PT810-infizierte Zielzellen um den Wert der PJ-positiven Zielzellen bei Zugabe Mock stimulierter Effektorzellen korrigiert. Weiterhin musste auch die Differenz der Lyse von Mock infizierten Zielzellen durch Virus-stimulierte und Mock-stimulierte Effektorzellen abgezogen werden. Die Werte für diesen Test wurden nach folgender Formel berechnet (Beer, 1995).

$$(T_{PT810}E_{PT810} - T_{PT810}E_{Mock}) - (T_{Mock}E_{PT810} - T_{Mock}E_{Mock}) = \text{getötete Zielzellen in \%}$$

$T_{PT810}E_{PT810}$ = Mittelwert des Prozentsatzes toter Zielzellen im Ansatz Virus-infizierter Zielzellen und Virus-stimulierter Effektorzellen

$T_{PT810}E_{Mock}$ = Mittelwert des Prozentsatzes toter Zielzellen im Ansatz Virus-infizierter Zielzellen und Mock-stimulierter Effektorzellen

$T_{Mock}E_{PT810}$ = Mittelwert des Prozentsatzes toter Zielzellen im Ansatz Mock-infizierter Zielzellen und Virus-stimulierter Effektorzellen

$T_{Mock}E_{Mock}$ = Mittelwert des Prozentsatzes toter Zielzellen im Ansatz Mock-infizierte Zielzellen und Mock-stimulierte Effektorzellen

Der mit Hilfe diese Formel errechnete Wert für die abgetöteten Zielzellen wurde nochmals korrigiert, denn es sollte der Anteil abgetöteter WB 103/105-positiver Zielzellen berechnet werden. Dazu wurde der Prozentanteil getöteter Zielzellen durch den Anteil WB103/105-positiver Zielzellen geteilt und mit 100 multipliziert.

Getötete Zielzellen in Prozent

$$\frac{\text{-----}}{\text{Prozent WB103/105-positiv e Zielzellen}} \times 100 = \text{spezifische Zytotoxizität (\%)}$$

3.10. Proliferationstest mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (CFSE)

Die durch Dichtezentrifugation mit Percoll aufgereinigten Lymphozyten (2500 rpm, 60 min) wurden im Hämocytometer ausgezählt und auf 2×10^7 Zellen/ml eingestellt (siehe 3.5.3.). Die anschließende Markierung der Zellen erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (CFSE; Molecular Probes). CFSE kann die Membran der Zellen durchdringen und bindet in der Zelle kovalent an Aminogruppen des Tubulins. Dies führt dazu, dass der Farbstoff bei der Mitose gleichmäßig an die Tochterzellen weitergegeben wird. Bei jeder Teilung kommt es zu einer Halbierung der Farbstoffmenge in den Tochterzellen (Weston und Parish, 1990). Dieses Phänomen lässt sich dann mit Hilfe des Durchflusszytometers durch die Messung der FL1 der Zellen nachweisen. Die FL1-Intensität der Tochterzellen ist halb so hoch wie die der Ursprungspopulation. Somit werden bei der Darstellung der FL1 in einem Histogramm *Peaks* mit einem niedrigeren mittleren Fluoreszenzkanal (MC) detektierbar. Unmittelbar nach der Färbung lässt sich nur ein *Peak* mit hoher Fluoreszenz identifizieren. Es besteht zudem die Möglichkeit, die Position eines jeden *Peaks* und somit auch gleichzeitig die Anzahl der Zellteilungen mit Hilfe folgender Formel zu berechnen (Hasbold *et al.*, 1999):

$$D_i = ([D_0 - A]/2^i) + A$$

D_i = erwartete Position für den zu berechnenden *Peak*, wobei i die Anzahl der Zellteilungen angibt

D_0 = Position des *Peaks* der ungeteilten Zellen

A = Mittelwert der (geometrischen) Autofluoreszenzintensität

Der CFSE wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, so dass die CFSE-Endkonzentration 10 mM in der Stocklösung betrug. Die Stocklösung wurde in Aliquots von 20 μ l überführt und bei -20 °C eingefroren. Vor der Färbung der Zellen wurden 3 μ l CFSE-Stocklösung mit 5 ml PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gemischt. Diese CFSE-Lösung wurde langsam zu einer gleichen Menge Zellsuspension in einem 50 ml Polypropylenröhrchen (Nunc) pipettiert. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation für zehn Minuten. Zum Stoppen der Farbstoffaufnahme wurden

10 ml FKS zugegeben. Die Zellen wurden daraufhin bei 1500 rpm für zehn Minuten abzentrifugiert und es folgte dreimaliges Waschen mit RPMI-1640. Die gefärbten Zellen wurden in 25 cm² Zellkulturflaschen (Nunc) überführt und nach unterschiedlichen Stimulationsprotokollen *in vitro* restimuliert (siehe 3.6.). Bei der Auswertung des Testes im Durchflusszytometer mit Hilfe der *Software Cell Quest Pro* wurden sechs verschiedene Marker (MK) in einem Histogramm gesetzt. Zur Auswertung kamen die MC, die ein Maß für die Fluoreszenzintensität darstellen, und die prozentualen Anteile der Zellen im Bereich der verschiedenen Marker. MK1 stellte den Ausgangswert dar, d.h. er repräsentierte alle markierten Zellen vor der Teilung. Zellen, die sich geteilt hatten, kamen nach der erfolgten Mitose im Bereich der anderen Marker zu liegen. Nach erfolgter Teilung halbierte sich die Fluoreszenz, so dass galt: $MK1 = 2 \times MK2$; $MK2 = 2 \times MK3$ etc. Folglich lag die Tochtergeneration der Zellen in MK1 nach erfolgter Teilung im Bereich von MK2 und die Tochtergeneration von MK2 im Bereich von MK3 usw. Der prozentuale Anteil der Zellen, die innerhalb eines Markers lag, gab einen Hinweis auf die Stärke der Proliferation.

3.11. *Real Time Polymerase Chain Reaction (Real Time PCR) zur Quantifizierung von Interleukinen*

Die *Real Time* PCR diente dem Nachweis und der Quantifizierung der *messenger* (m) RNA der Interleukine 2 und 4 (IL-2 und IL-4). Es erfolgte eine relative Quantifizierung, da kein Zytokinstandard zur Verfügung stand. Die relative Quantifizierung konnte mit Hilfe von Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als sogenanntem *house keeping gene* durchgeführt werden. GAPDH diente der quantitativen Standardisierung der eingesetzten RNA-Menge und somit als Kontrolle in dieser PCR. Die Lymphozyten aller Tiere wurden nach der dritten Immunisierung und nach der Testinfektion nach einer Stimulationsdauer von sechs Stunden bei -80 °C eingefroren und bis zur Durchführung der PCR gelagert. Die Primer wurden mit Hilfe des Computerprogramms Oligo[®] Version 4.1. (National Biosciences) ausgewählt. Die Synthese der Primer erfolgte durch MWG Biotech (Ebersberg), sie wurden lyophilisiert bezogen und nach Herstellerangaben mit doppelt autoklaviertem Wasser auf eine Konzentration von 100 pMol/µl eingestellt. In Vorversuchen wurde zudem mit Hilfe einer sogenannten Primermatrix die optimale Konzentration für jedes Primerpaar (siehe Tab. 4) bestimmt. Eine Übersicht über die verwendeten Primer findet sich in Tab. 4.

Tab. 4: Spezifikation der eingesetzten Primer.

Primer	Nukleotidsequenz 5' → 3'	Größe (bp)	Eingesetzte Primer- konzentration (pM)	Schmelz- temperatur (T_m)
IL-2- <i>forward</i>	ACCTCAAGCTCTCCAGGATGC	21	100	61,8 °C
IL-2- <i>reverse</i>	TCTGTAGCGTTAACCTTGGGC	21	100	59,8 °C
IL-4- <i>forward</i>	GGCGTATCTACAGGAGCCACA	21	50	61,8 °C
IL-4- <i>reverse</i>	GTCAAGTCCGCCAGGAAT	19	50	58,8 °C
GAPDH- <i>forward</i>	TGGAAAGGCCATCACCATCT	20	100	57,3 °C
GAPDH- <i>reverse</i>	CCACTTGATGTTGGCAGGATC	21	50	59,8 °C

Zunächst wurde die RNA aus den 6 h lang stimulierten Lymphozyten isoliert. Die Extraktion der Interleukin-RNA wurde mit Hilfe des *High Pure™ RNA Isolation Kits* (Roche) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Zellen wurden durch die Zugabe eines Hochsalz-Lysispuffers unter gleichzeitiger Inaktivierung freier RNasen lysiert und die Nukleinsäuren an die Glasfaseroberfläche der Affinitätsäulen gebunden. Die DNA wurde durch Zugabe von DNase (10 µl DNase I in 90 µl DNase Inkubationspuffer) zerstört. Nach zwei Waschschrritten (Waschpuffer I und II) wurde die Gesamt-RNA mit 50 µl Elutionspuffer eluiert. Das Eluat wurde auf Eis gelagert. Im Wasserbad (Typ HWR; Daglef Patz KG) erfolgte ein Denaturierungsschritt bei 65 °C für zehn Minuten. Danach wurde die RNA wieder auf Eis gelagert. Zu den verschiedenen Ansätzen wurden jeweils 1 µl Dithiothreitol (DTT; Roche) pipettiert. Die reverse Transkription (RT) erfolgte im Anschluss mit Hilfe des *TaqMan® Reverse Transkriptions Reagenz* (PE Biosystems) nach Herstellerangaben.

Folgender Ansatz wurde gewählt:

2,5	µl	10 x RT-Puffer (Endkonzentration: 1 x)
5,0	µl	MgCl ₂ (Endkonz.: 5,5 mM)
2,0	µl	dNTP-Mix (Endkonz.: 500 µM für jedes dNTP)
0,5-1,0	µl	<i>reverse</i> Primer (Endkonz.: siehe Tab. 4)
0,6	µl	<i>MultiScribe™ Reverse</i> Transkriptase (Endkonz.: 1,25 U/µl)
1,0	µl	RNasin (Endkonz.: 0,4 U/µl)
5,0	µl	RNA (verschiedene Konz.)
ad 25	µl	RNase freies Wasser

Folgendes Temperaturprogramm wurde gewählt:

25 °C	10 min	- zur Primer-Präinkubation (Maximierung der Primer-RNA-Bindung)
48 °C	30 min	- reverse Transkription der mRNA in cDNA
95 °C	5 min	- Inaktivierung der reversen Transkriptase

2,5 µl der im RT-Reaktionsschritt entstandenen komplementären DNA (cDNA) wurden zur Durchführung der sich anschließenden *Real Time* PCR im *GeneAmp[®] 5700 Sequence Detection System* (PE Biosystems) zu den folgenden Komponenten pipettiert:

12,5 µl	2 x <i>SYBR[®]-Green-Master Mix</i> (Endkonzentration: 1 x)
0,5-1,0 µl	<i>forward</i> Primer (Endkonzentration: siehe Tab. 4)
0,5-1,0 µl	<i>reverse</i> Primer (Endkonzentration: siehe Tab. 4)
ad 25 µl	Wasser Ultrapure [™]

Der Ansatz erfolgte in einer *Micro Amp[®] Optical 96-well Reaction Plate* (PE Biosystems). Vor dem Einsetzen in das *GeneAmp[®] 5700 Sequence Detection System* wurde die *Micro Amp[®] Optical 96-well Reaction Plate* für zehn Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert, um störende Luftblasen zu entfernen.

Anschließend erfolgte die PCR nach folgendem Temperaturprogramm:

95 °C	10 min	- Aktivierung der <i>AmpliAq Gold DNA Polymerase</i>
95 °C	15 sec	- Denaturierung
60 °C	1 min	- Elongation und Primerhybridisierung

Nach Abschluss der PCR erfolgte die Auswertung mit Hilfe der *Gene Amp[®]-Software*. Zunächst wurden die Dissoziationskurven beurteilt, um unspezifische Amplifikate wie Primer-Dimere auszuschließen. Mit Hilfe der *Gene Amp[®]-Software* wurde die 1. Ableitung der Dissoziationskurve kalkuliert, so dass man die Schmelztemperatur des Produkts als *Peak* direkt ablesen konnte. Kurven mit mehreren *Peaks* bzw. mit einem Plateau in der Kurve sprachen für das Vorliegen unspezifischer Produkte oder Verunreinigungen. In fraglichen Fällen wurde eine Gelelektrophorese in einem 3 %igem Agarosegel durchgeführt. Sie diente wie die Beurteilung der Dissoziationskurven dem Ausschluss unspezifischer Reaktionsprodukte.

Der Amplifikationsplot wurde zur Bestimmung des *Threshold Cycle*-Wertes (Ct-Wertes) ausgewertet. Der Ct-Wert gab an, ab welcher Zykluszahl die Fluoreszenz anstieg und den vorher gesetzten *Threshold* überschritten hat. Aus der Zahl der Zyklen bis zum Erreichen des Schwellenwertes konnte nun auf die Ausgangsmenge an mRNA geschlossen werden.

Die relative Quantifizierung der cDNA wurde anhand der ermittelten Ct-Werte für die BVDV-PT810-Stimulation und den jeweils entsprechenden Ct-Werte für GAPDH mit Hilfe folgender Formel durchgeführt (Löcherbach, 2001):

$$\Delta Ct = Ct\text{-Wert des zu berechnenden Zytokins} + (Ct\text{-Wert GAPDH NK} - Ct\text{-Wert GAPDH PK})$$

NK = Negativkontrolle (Mock stimulierte Lymphozyten)

PK = Positivkontrolle (ConA stimulierte Lymphozyten)

$$\text{Diff. } \Delta Ct = Ct\text{-Wert des zu berechnenden Zytokins NK} - \Delta Ct \text{ des Zytokins}$$

Die normalisierte Menge des Zytokins relativ zur Negativkontrolle wurde wie folgt berechnet (Applied Biosystems; GeneAmp[®] 5700 Users Manual):

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

3.12. Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assays (ELISAs)

3.12.1. BVDV-NS3-spezifischer Antikörper-ELISA

BVDV-NS3-spezifische Antikörper im Serum der Tiere wurden mit Hilfe des kommerziell erhältlichen kompetitiven ELISAs Testkit Ceditest[®] BVDV (Lot. Nr. 03K017; Cedi Diagnostics B.V.) nachgewiesen. Der Test wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.12.2. ELISA zum Nachweis von bovinem Gamma-Interferon (γ -IFN)

Der BOVIGAM[™] (*Bovine Gamma-Interferon Test*) Kit (Lot.Nr. 0312-05201; Biocor Animal Health, Inc.) wurde zum Nachweis von bovinem γ -IFN in den Zellkulturüberständen von unterschiedlich lange stimulierten Lymphozytenkulturen (siehe 3.6.2.) verwendet. Die Antigen-spezifische γ -IFN-Produktion durch die Lymphozyten sollte einen Hinweis auf eine zelluläre Immunität in Form von einer T_H1- bzw. CTL-Antwort geben. Der Test wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.13. FACS-Immunfluoreszenz-Inhibitions-Test (FACS-IFI)

Die Untersuchung der Kälberseren auf BVDV-NS3-spezifische Antikörper erfolgte neben dem oben genannten Testkit Ceditest[®] BVDV auch mit Hilfe des *Fluorescence-Activated Cell Sorting Immunfluoreszenz-Inhibitionstest* (FACS-IFI) (Beer *et al.*, 1996; Poll, 1999). Im Rahmen dieses Testes wurden die NS3-Serumantikörper anhand ihrer Hemmungseigenschaften gegenüber monoklonalen Antikörpern (mAK) an BVDV-PT810-infizierten BEL-Zellen im Durchflusszytometer (FACScan; Becton Dickinson) nachgewiesen. Ca. 10⁸ BVDV-PT810-infizierte Zellen wurden zur Fixation zehn Minuten lang auf Eis mit 5 ml 1 %iger Paraformaldehydlösung inkubiert. Das Zellpellet wurde nach Resuspension in Gefriermedium (40 % FKS, 40 % EMEM und 20 % DMSO) aufgenommen und bei -20 °C gelagert. Der FACS-IFI Test wurde in 96-Loch-Mikrotestplatten (Sarstedt) mit ca. 4 x 10⁵ Zellen pro Serumprobe durchgeführt. Als Blocking-Antikörper (mAK) dienten die

monoklonalen Antikörper WB103 und WB105 (C•C Pro) und als Positivkontrolle wurde ein Serumpool aus BVDV-PT810-infizierten Rindern verwendet. Als Negativkontrolle wurden BVDV-Antikörperfreies Rinderserum und ein Ansatz ohne Serumprobe mitgeführt, um die unspezifische Fluoreszenz der Zellen zu bestimmen. Die Zellen wurden nach Auftauen und einmaligem Waschen mit PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ mit Hilfe von 100 μl einer 0,0025 %igen Digitonin-Lösung für fünf Minuten permeabilisiert. Anschließend erfolgte ein Waschschrift mit 200 μl PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$. 100 μl der zuvor bei 56 °C für 30 min im Wasserbad (Typ 1012; Gesellschaft für Labortechnik) hitzeinaktivierten Proben wurden im Doppelansatz in die Vertiefungen gegeben. Bei der Antikörper- und Konjugatkontrolle wurde anstelle des Serums 100 μl PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ in die Reaktionsvertiefungen gegeben. Nach kurzem Schütteln der Platte wurde der Testansatz für 18 h im Kühlschrank (4 °C) inkubiert. Anschließend wurde jeder Vertiefung mit Ausnahme der Konjugatkontrolle 50 μl der Gebrauchsverdünnung der monoklonalen Antikörper (1:100 in FACS-Puffer) zugesetzt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten drei Waschschriffe mit 200 μl PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$. Danach wurden 50 μl des sekundären Antikörpers *AlexaTM 488 goat-anti-mouse-conjugate* (Gebrauchsverdünnung 1:600 in FACS-Puffer, Molecular Probes) zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei Raumtemperatur sowie drei weiteren Waschschriffen mit PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ wurden die Zellen mit 60 μl PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ aufgenommen, resuspendiert und mit Hilfe des FACScan Durchflusszytometers analysiert. Die Auswertung des Testes erfolgte mit Hilfe der *Software Cell Quest Pro* (Becton Dickinson). Bei logarithmischer Messung wurde Reduktion der Fluoreszenzstärke (mittlerer Fluoreszenzkanal) mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$\text{Inhibition in \%} = (\text{NK-Probe}/\text{NK-KK}) \times 100$$

Probe = mittlerer Fluoreszenzkanal der Probe

NK = mittlerer Fluoreszenzkanal der Negativkontrolle

KK = mittlerer Fluoreszenzkanal der Konjugatkontrolle

3.14. Nachweis BVDV-spezifischer Antikörper im Serumneutralisationstest

Alle Serumproben wurden im Dreifachansatz untersucht. Vor der Testdurchführung wurden die Seren für 30 min bei 56 °C im Wasserbad (Typ 1012; Gesellschaft für Labortechnik) inaktiviert. Gegebenenfalls wurden Vorverdünnungen in \log_{10} -Schritten von 1:10 bis 1:1000 hergestellt. Der Test wurde in 96-Loch-Mikrotestplatten durchgeführt. Als Kontrollen wurde eine Rücktitration des Testvirus (\log_4 , 6-fach Ansatz), die Titration eines Positivserums und eines Negativserums sowie eine Zellkontrolle mitgeführt. Nach Vorlage von 50 μl Medium in Reihe B bis H der 96-Loch-Mikrotestplatten wurden jeweils 100 μl des Serums bzw. der entsprechenden Serumverdünnung in die Reihe A der Platte pipettiert. Anschließend wurde das Serum mit Hilfe einer Mehrkanalpipette (50 μl) in \log_2 -Schritten titriert. Danach wurde die Virusgebrauchsverdünnung (100 KID₅₀/50 μl) auf Eis hergestellt und auf die Platten gegeben. Die Inkubation zur Neutralisation erfolgte für eine Stunde in einem CO₂-Brutschrank (Begasungsbrutschrank Typ B5061, Heraeus Instruments) bei 37 °C, gefolgt von der Zugabe von ca. 20.000 BEL-Zellen. Die Kulturen wurden für vier bis sechs Tage bei 37 °C im CO₂-Brutschrank bebrütet. Anschließend erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung (siehe 3.8.) der Zellen. Die Auswertung des Tests erfolgte mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie. Der Antikörpertiter wurde nach mikroskopischer Kontrolle in Anlehnung an die Methode nach Behrens und Kaerber (Mayr *et al.*, 1977) berechnet.

$$\text{Neutralisationstiter } (-\log_2) = a/b + c$$

a = negative Reagenten des Testserums

b = Anzahl der Reagenten pro Verdünnungsstufe

c = $-\log_2$ einer eventuellen Vorverdünnung des Testserums

3.15. Plaquereduktionstest

Zur Untersuchung der Seren der immunisierten Versuchstiere auf Anti-Vacciniavirus-Antikörper wurde der Plaquereduktionstest in 24-Loch-Zellkulturplatten gewählt und nach der Standardmethode (Mayr *et al.*, 1977) durchgeführt. Die Seren der mit BVDV-NS3- bzw. LacZ-rekombinantem MVA immunisierten Tiere wurden 30 min bei 56 °C im Wasserbad inaktiviert. Die anschließende Titration der Seren erfolgte in 96-Loch-Zellkulturplatten (Zellkulturplatte 96-Loch-U-Boden, Nr. 83.1837.500; Sarstedt) in \log_2 -Schritten in DMEM ohne Zusatz von FKS. Dafür wurden zunächst 150 μ l DMEM in jede Vertiefung vorgelegt. Nach Zugabe von 150 μ l Serum in die erste Reihe der Mikrotiterplatte erfolgte die Titration in \log_2 -Schritten mit Hilfe einer Mehrkanalpipette. Als Negativkontrolle wurde jeweils das Nullserum des jeweiligen Kalbes mitgeführt. Ein Kaninchen-Anti-VV-Immunsersum diente als Positivkontrolle. Nach der Titration der Seren erfolgte die Zugabe von 150 μ l Virusgebrauchsverdünnung (Vacciniavirus München 1, eingestellt auf 100 *plaque forming units* [PFU]/100 μ l in DMEM). Anschließend wurde der Testansatz für zwei Stunden bei 37 °C und 5 %iger CO₂-Atmosphäre inkubiert. Konfluente MA-104-Zellen, die am Vortag des Testes mit ca. 5×10^5 Zellen/ml in 24-Loch-Zellkulturplatten eingesät worden waren, wurden nach Entfernung des Anzuchtmediums und Vorlage von 200 μ l DMEM in jede Vertiefung mit je 200 μ l der Proben beimpft. Eine Zell- und Viruskontrolle wurde stets im Dreifachansatz mitgeführt. Nach einer Adsorptionszeit von einer Stunde erfolgte die Entfernung der Proben und in jede Vertiefung wurde 1 ml DMEM mit 2 % FKS pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 24-28 h bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde der Überstand entfernt und die Zellen mit Kristallviolettlösung für 10-20 min bei Raumtemperatur gefärbt und vorsichtig gewaschen. Die Platten wurden über Nacht getrocknet und die Plaques am darauf folgenden Tag makroskopisch ausgezählt. Als Titer wurde die Grenzverdünnung angegeben, bei der eine Plaquereduktion von mindestens 50 % im Vergleich zur Negativkontrolle vorhanden war.

3.16. Statistische Auswertung

Die dargestellten Ergebnisse stellen Mittelwerte (MW) von Mehrfachbestimmungen mit ihren Standardabweichungen dar. Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe des t-Testes nach Student durchgeführt. Signifikante Unterschiede lagen vor, wenn die Überschreitungswahrscheinlichkeit (*level attained*) unter 5 % ($p \leq 0,05$) lag (Riffenburgh, 1999; Kreienbrock und Schach, 2000).

4. Ergebnisse

Die Darstellung der Ergebnisse soll zunächst einen Überblick über die Reaktionen der Tiere nach den Immunisierungen mit BVDV-NS3-rekombinanten MVA und der BVDV-Testinfektion bezüglich MVA- und NS3-Antikörperbildung, sowie die Dauer der Virämie, Serokonversion und die Veränderungen der Leukozytenzahl nach der Testinfektion geben. Im Anschluss werden die Ergebnisse der für den Nachweis BVDV-spezifischer zellulärer Immunitätsmechanismen durchgeführten Testsysteme beschrieben.

4.1. MVA-Antikörpernachweis und Nachweis nicht neutralisierender Antikörper gegen das BVDV-NS3-Protein

4.1.1. MVA-Antikörpernachweis

Nach den Immunisierungen mit den rekombinanten MVA reagierten alle Tiere mit einer Bildung plaquereduzierender Vacciniavirus-Antikörper. Am Tag 14 nach der ersten Immunisierung lagen die mittleren Titer der Versuchsgruppe bei 1:287 und die der Kontrollgruppe bei 1:181. Die zweite Immunisierung (Tag 30) führte zu einer ausgeprägten Boosterreaktion mit neutralisierenden Antikörpertitern von 1:2308 (Versuchsgruppe) und 1:2910 (Kontrollgruppe). Zwei Wochen nach der dritten Immunisierung konnte bei beiden Tiergruppen kein weiterer *Boost*-Effekt detektiert werden. Die Unterschiede zwischen beiden Tiergruppen waren nicht signifikant (siehe Tab. 5 und Abb. 4).

Ergebnisse

Tab. 5: Plaquereduktionstest-Titer ($-\log_2$) gegen MVA (0,0 = Titer <1:2) nach der Immunisierung mit BVDV-NS3-rekombinantes MVA (Immunisierungen: Tag 0; 30; 58).

Versuchsgruppe	Versuchstag			
	0	14	36	73
MVA-BVDV-NS3				
Tier A	0,0	9,0	11,0	12,0
Tier B	0,0	8,0	11,0	11,0
Tier C	0,0	8,0	12,0	11,0
Tier D	0,0	9,0	11,0	11,0
Tier E	0,0	7,0	12,0	12,0
Tier F	0,0	8,0	10,0	11,0
Mittelwert	0,00	8,17	11,17	11,34
Standardabweichung	0,00	0,69	0,69	0,47
mittlerer Titer 1:X	1	287	2308	2593
Kontrolltiere				
MVA-LacZ	0	14	36	73
Tier G	0,0	7,0	11,0	12,0
Tier H	0,0	8,0	11,0	11,0
Tier I	0,0	7,0	12,0	11,0
Tier J	0,0	8,0	12,0	12,0
Mittelwert	0,00	7,50	11,51	11,51
Standardabweichung	0,00	0,50	0,50	0,50
mittlerer Titer 1:X	1	181	2910	2910
Student' t-Test		0,174	0,476	0,645

Plaquereduktionstest gegen VV-M1

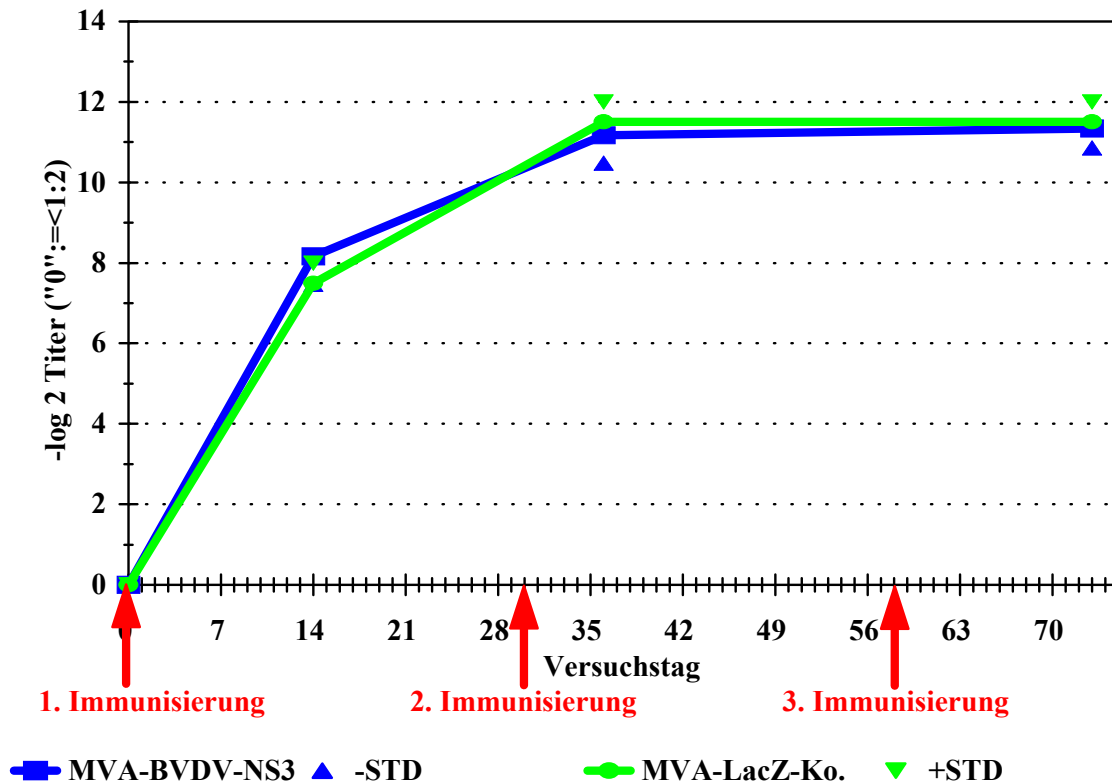


Abb. 4: Induktion neutralisierender Antikörper gegen MVA (Plaquereduktionstest; N = 2 Ansätze pro Serum) nach Immunisierung mit MVA-BVDV-NS3 (Mittelwerte und Standardabweichungen [STD]; N = 6 Kälber) und MVA-LacZ (N = 4 Kälber).

4.1.2. Induktion von NS3-Antikörpern

4.1.2.1. Ergebnisse des NS3-Blocking-ELISAs

Der Nachweis von BVDV-NS3-spezifischen Antikörpern wurde mit Hilfe des kommerziell erhältlichen Testkits Ceditest[®] BVDV durchgeführt. Es zeigte sich, dass bei keinem der Tiere bis zur Testinfektion BVDV-NS3-spezifische Antikörper nachweisbar waren.

12 Tage nach der Testinfektion (p.inf.) waren bei allen Tieren NS3-spezifische Antikörper nachweisbar. Die spezifische Competition bei den Tieren der Versuchsgruppe (Prozent der Inhibition [PDI] = 75,05; Standardabweichung [STD] = 5,34) war jedoch signifikant höher als bei den Tieren der Kontrollgruppe (PDI = 61,50; STD = 5,59). Der t-Test nach Student ergab

einen Wert von $p = 0,009$. Am Tag 43 p.inf. war bei allen Tieren ($N = 10$) bei der Verwendung der unverdünnten Seren ein *Blocking*-Wert im maximalen Bereich erreicht (siehe Tab. 6). Um weitere Unterschiede zwischen beiden Tiergruppen detektieren zu können, wurde eine \log_2 -Titration durchgeführt. Die Titer (letzte Verdünnung mit $> 50\%$ Inhibition) lagen bei der Versuchsgruppe im Mittel bei $2^{6,5}$ ($2^{5,0}$ - $2^{8,0}$) und bei der Kontrollgruppe zwischen $2^{4,0}$ und $2^{6,0}$ (Mittelwert $2^{5,0}$) (siehe Tab. 7).

Tab. 6: BVDV-NS3-spezifische Antikörper der Versuchstiere nach der Testinfektion mit BVDV-PT810 (kompetitiver ELISA; Cedi-Diagnostics).

BVDV-NS3-spezifische Antikörper: % spezifische Konkurrenz im ELISA			
Tiere		Tage p.inf. BVDV-PT810	
Versuchstiere (MVA-NS3)	vor Testinfektion	12	43
Tier A	1,3	70,3	100,0
Tier B	1,5	79,0	100,0
Tier C	1,6	74,0	99,0
Tier D	1,5	67,0	98,0
Tier E	1,3	77,0	95,0
Tier F	1,3	83,0	98,0
Mittelwert	1,41	75,05	98,33
Standardabweichung	0,10	5,34	1,70
Kontrollgruppe (LacZ-MVA)	vor Testinfektion	12	43
Tier G	1,0	55,0	91,0
Tier H	1,2	57,0	95,0
Tier I	1,4	66,0	98,0
Tier J	1,5	68,0	98,5
Mittelwert	1,28	61,50	95,63
Standardabweichung	0,19	5,59	2,99
Student' t-Test	0,245	0,009	0,142

Tab. 7: BVDV-NS3-spezifische Antikörper der Kälber nach der Testinfektion mit BVDV-PT810 (kompetitiver ELISA; Cedi-Diagnostics); Antikörpertiter der Tiere nach log₂-Verdünnung der Seren vom Tag 43 p.inf..

Versuchstiere (MVA-NS3)	BVDV-Antikörpertiter	
	Titer 1:X	Titer log ₂
Tier A	>128	2 ^{8,0}
Tier B	> = 128	2 ^{7,0}
Tier C	64	2 ^{6,0}
Tier D	64	2 ^{6,0}
Tier E	128	2 ^{7,0}
Tier F	32	2 ^{5,0}
Mittelwert		2 ^{6,5}
Kontrollgruppe (MVA-LacZ)		
Tier G	32	2 ^{5,0}
Tier H	64	2 ^{6,0}
Tier I	16	2 ^{4,0}
Tier J	32	2 ^{5,0}
Mittelwert		2 ^{5,0}
Student' t-Test		0,027

4.1.2.2. FACS-Immunfluoreszenz-Inhibitions-Test

Die Seren der Versuchstiere wurden zudem mit Hilfe des FACS-IFI auf BVDV-NS3-Antikörper untersucht. Eine spezifische Reaktion vor der Testinfektion war mit Hilfe dieser Methode nicht nachweisbar. Im Unterschied zum ELISA konnte jedoch bei drei Tieren der Versuchsgruppe bereits am Tag 8 p.inf. eine positive Reaktion detektiert werden. Bei den Tieren **A**, **B** und **C** ließen sich acht Tage nach der Infektion folgende Hemmungsprozente ermitteln: 4,6 % bei Tier **A**, 2,7 % bei Tier **B** und 30,5 % bei Tier **C** (siehe Tab. 8). Bei allen anderen Tieren war am Tag 8 p.inf. keine Competition aufgrund von Serum-NS3-Antikörpern nachweisbar. In Tab. 8 und Abb. 5 sind die ermittelten Werte für beide Tiergruppen an den Tagen 0, 8, 17 und 43 p.inf. vergleichend dargestellt. Bei Betrachtung der Werte fällt auf, dass

die Tiere der Versuchstiergruppe wesentlich früher mit einer starken NS3-Antikörperbildung auf die Testinfektion reagierten als die der Kontrollgruppe. Die ermittelten Werte sind zudem deutlich höher. Für das Tier C konnte bereits am Tag 17 p.inf. eine 100 %ige Hemmung festgestellt werden. Am Tag 43 p.inf. lagen die Werte aller Versuchstiere über 90 % (Mittelwert: 96,62 % spezifische Inhibition). Die Kontrollgruppe erreichte im Gegensatz dazu nach 43 Tagen Werte zwischen 54,7 % und 85,9 % (Mittelwert: 66,88 % spezifische Inhibition). Bei zweiseitiger Betrachtung der Ergebnisse der Tiere im t-Test nach Student ließen sich insbesondere am Tag 17 ($p = 0,023$) und Tag 43 p.inf. ($p = 0,001$) signifikante Unterschiede zwischen beiden Tiergruppen feststellen (siehe Abb. 5 und Tab. 8).

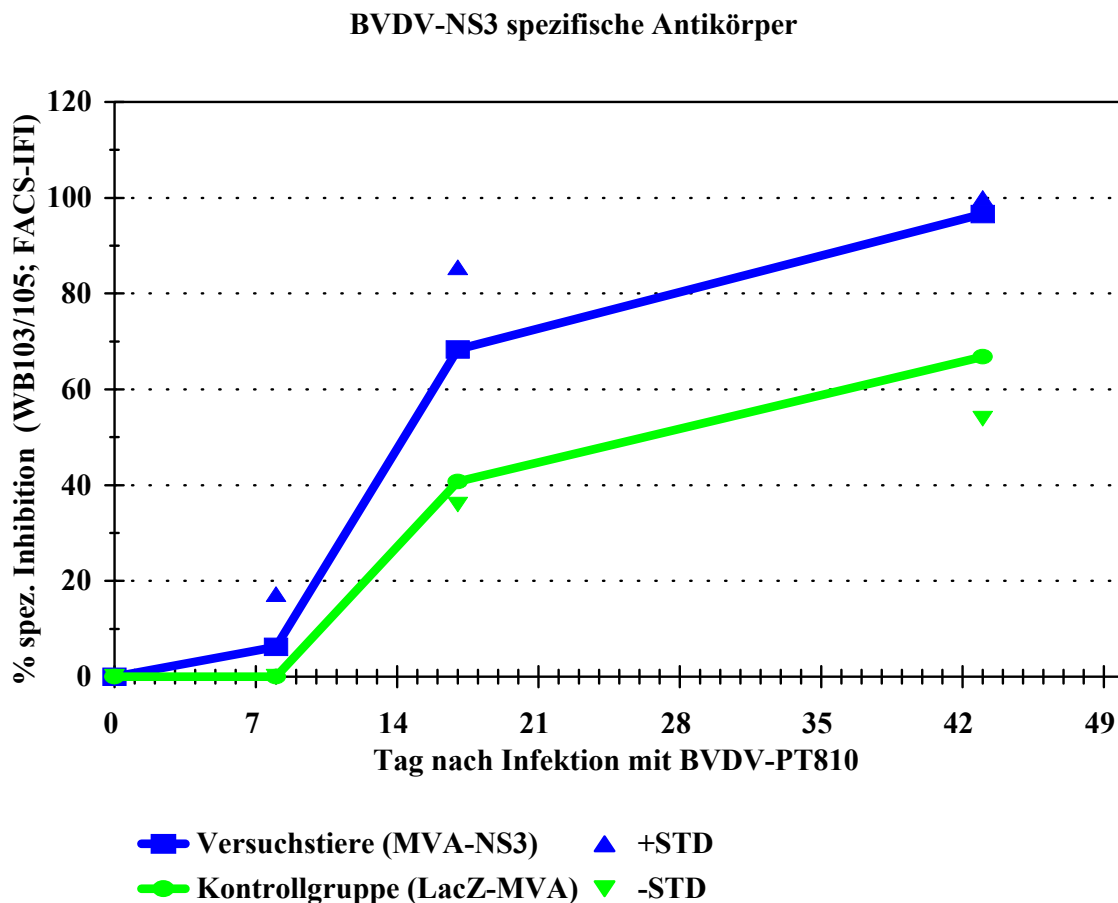


Abb. 5: BVDV-NS3-spezifische Antikörper der Kälber nach der Testinfektion mit BVDV-PT810 (Immunfluoreszenz-Inhibitionstest an BVDV-PT810-infizierten BEL mit den monoklonalen Antikörpern WB103/105).

Tab. 8: BVDV-NS3-spezifische Antikörper der Tiere nach der Testinfektion mit BVDV-PT810 (Immunfluoreszenz-Inhibitionstest an BVDV-PT810-infizierten BEL mit den monoklonalen Antikörpern WB103/105).

BVDV-NS3-spezifische Antikörper: % spezifische Inhibition nach der Infektion mit BVDV-PT810				
Versuchstiere (MVA-BVDV-NS3)	Tag nach Infektion mit BVDV-PT810			
	0	8	17	43
Tier A	0,0	4,6	76,1	100,0
Tier B	0,0	2,7	72,6	98,8
Tier C	0,0	30,5	100,0	100,0
Tier D	0,0	0,0	52,0	92,2
Tier E	0,0	0,0	59,7	96,9
Tier F	0,0	0,0	50,0	91,8
Mittelwert	0,00	6,30	68,40	96,62
Standardabweichung	0,00	10,96	17,12	3,43
Kontrollgruppe (LacZ-MVA)	0	8	17	43
Tier G	0,0	0,0	45,3	85,9
Tier H	0,0	0,0	44,5	71,9
Tier I	0,0	0,0	33,2	55,0
Tier J	0,0	0,0	40,2	54,7
Mittelwert	0,00	0,00	40,80	66,88
Standardabweichung	0,00	0,00	4,80	13,00
Student' t-Test		0,334	0,023	0,001

4.2. BVD-Virusisolierung und Serumneutralisation der Versuchstiere nach der Testinfektion

4.2.1. Virusisolierung

Beginnend am Tag 1 bis 13 Tage nach der Testinfektion wurden täglich 10^5 und 10^6 Blutleukozyten im Doppelansatz auf BEL-Zellen inokuliert. Als Maß für die Virämie und Virusausscheidung wurde jeweils die Zahl der Virusisolate an den einzelnen Tagen p.inf. angegeben (vier positive Ansätze entsprachen mindestens $10^{2,5}$ KID₅₀ pro 10^7 Leukozyten und vier negative Ansätze entsprachen einer KID₅₀ < 1 in 10^7 Leukozyten). Die Titerangaben in 10^x KID₅₀ pro 10^7 Leukozyten, die Anzahl der Tage mit positivem Virusnachweis, die mittleren Titer für jedes Tier sowie die Mittelwerte finden sich in Tab. 9. Aus Tab. 9 ist ersichtlich, dass in der Anzahl der Tage mit Isolat kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen bestand. Im Mittel war bei den Tieren der MVA-NS3-Gruppe an 6,67 Tagen und bei den Kontrolltieren an 8,00 Tagen Virus aus den Leukozyten isolierbar ($p = 0,121$ nicht signifikant).

Bei zweiseitiger Betrachtung der mittleren Titer beider Tiergruppen im Student t-Test konnte ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen detektiert werden ($p = 0,016$). So lagen die mittleren Titer bei der Versuchsgruppe bei $10^{1,05}$ KID₅₀/10⁷ Leukozyten und die der Kontrolle bei $10^{1,33}$ KID₅₀/10⁷ Leukozyten (siehe Tab. 9). Die Höhe der semiquantitativ bestimmten Virustiter innerhalb der Kontrollgruppe waren somit an den Tagen 3-13 p.inf. etwa doppelt so hoch (1,9-fach) wie in der Versuchsgruppe.

Tab. 9: BVDV-Isolierung aus den Leukozyten der Kälber nach der Testinfektion mit BVDV-PT810 (semiquantitativ, je 2 Zellkulturen wurden mit 10^5 und 10^6 Leukozyten beimpft; Titerangabe in $10^x \text{KID}_{50}/10^7$ Leukozyten).

Gruppe MVA-BVDV- NS3	Tage nach der Testinfektion mit BVDV-PT810													Tage mit Isolat	Mittelwert Titer Tage 3-13 p.inf.
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
Tier A	0,0	0,0	1,5	2,0	2,5	2,5	2,5	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6	1,09
Tier B	0,0	0,0	0,0	1,5	1,5	1,5	2,5	2,0	1,5	1,0	0,0	0,0	0,0	7	1,05
Tier C	0,0	0,0	0,0	1,0	2,0	2,5	2,5	1,5	1,5	1,0	0,0	1,0	0,0	8	1,18
Tier D	0,0	0,0	0,0	1,5	1,5	2,0	2,5	1,0	1,0	0,0	1,0	0,0	0,0	7	0,95
Tier E	0,0	0,0	1,0	2,0	2,5	2,5	2,0	0,0	0,0	0,0	1,5	1,0	0,0	7	1,14
Tier F	0,0	0,0	0,0	2,0	2,0	2,5	2,5	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5	0,91
Mittelwert	0,00	0,00	0,42	1,67	2,00	2,25	2,42	0,75	1,00	0,33	0,42	0,33	0,00	6,67	1,05
Standard- abweichung	0,00	0,00	0,61	0,37	0,41	0,38	0,19	0,80	0,50	0,47	0,61	0,47	0,00	0,94	0,10
MVA-LacZ - Ko.															
Tier G	0,0	0,0	0,0	1,5	2,0	2,5	2,5	2,5	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	6	1,09
Tier H	0,0	0,0	0,0	1,0	2,0	2,0	2,5	2,0	2,5	1,0	1,0	1,0	0,0	9	1,36
Tier I	0,0	0,0	0,0	2,0	1,5	1,5	2,5	2,5	1,5	2,0	1,0	0,0	0,0	8	1,32
Tier J	0,0	0,0	2,0	1,5	2,0	2,0	2,5	2,5	2,0	1,5	0,0	0,0	1,0	9	1,55
Mittelwert	0,00	0,00	0,50	1,50	1,88	2,00	2,50	2,38	1,50	1,13	0,75	0,25	0,25	8,00	1,33
Standard- abweichung	0,00	0,00	0,87	0,35	0,22	0,35	0,00	0,22	0,94	0,74	0,43	0,43	0,43	1,22	0,16
Student' t-Test														0,121	0,016

4.2.2. BVDV-neutralisierende Antikörper nach Testinfektion mit BVDV-PT810

Vor der Testinfektion waren bei keinem Kalb neutralisierende Antikörper im BVDV-spezifischen Serumneutralisationstest (SNT) nachweisbar. Die ersten neutralisierenden Antikörper konnten neun Tage nach der Testinfektion bei beiden Tiergruppen nachgewiesen werden. Die Antikörpertiter der mit rekombinantem BVDV-NS3-MVA immunisierten Tiere stiegen etwas schneller an als bei den Tieren der Kontrollgruppe. Der Unterschied in Bezug auf die Titerverläufe der beiden Tiergruppen war an den Tagen 10, 13, 15, 16, und 19 signifikant (Berechnung mit Hilfe des t-Testes nach Student). Der größte Unterschied stellte sich am Tag 15 dar, die mittleren Titer von 1:181 in der Versuchsgruppe und 1:20 in der Kontrollgruppe unterschieden sich höchst signifikant ($p = 0,003$) (siehe Tab. 10).

Ca. 30 Tage p.inf. näherten sich die Titerverläufe der beiden Tiergruppen einander an und die beiden Gruppen erreichten ihre maximalen Mittelwerte am Tag 36 p.inf. (letzter Untersuchungstag; Versuchsgruppe 1:4703; Kontrollgruppe 1:4288). Abb. 6 zeigt die im SNT ermittelten BVDV-PT810-spezifischen Antikörpertiter (Mittelwerte [μ]) mit Angabe der Standardabweichungen (STD) der beiden Tiergruppen, die Einzelergebnisse und die Statistik sind Tab. 10 zu entnehmen.

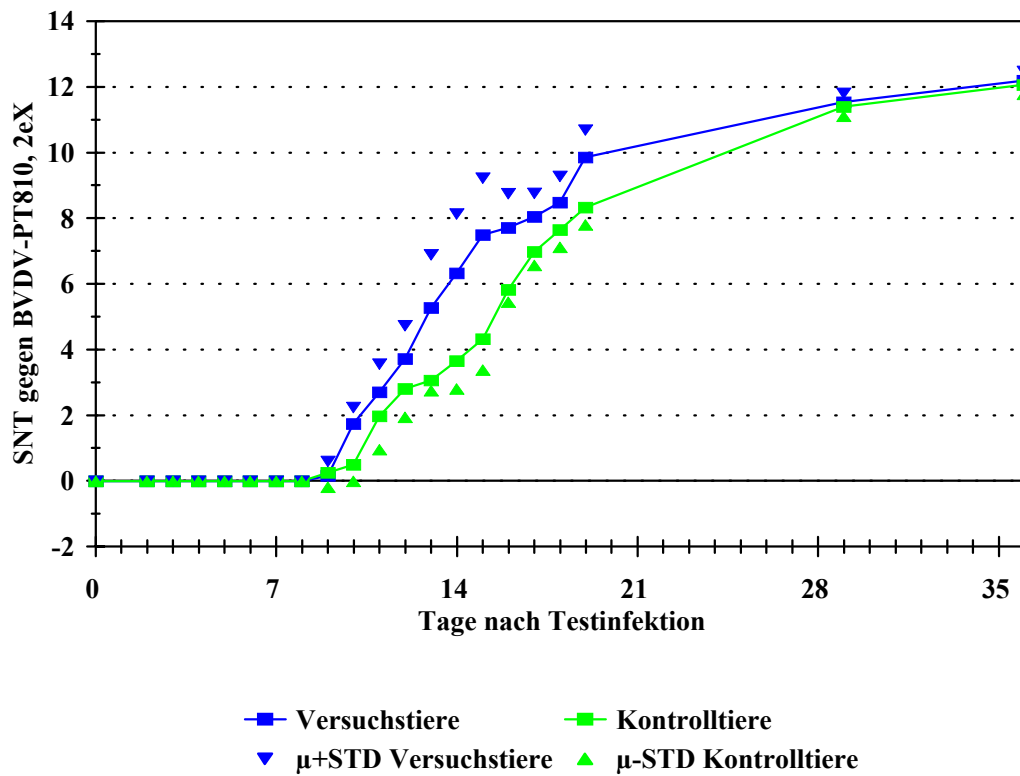


Abb. 6: Serokonversion aller Tiere nach der Testinfektion. Darstellung des Mittelwertes (μ) der Titer der neutralisierenden Antikörper und der entsprechenden Standardabweichungen (STD) von Versuchs- und Kontrolltieren gegen das homologe Virusisolat-PT810.

Tab. 10: SNT-Titer (-log₂) nach der Testinfektion gegen das homologe BVD-Virus PT810 (0,0 = Titer <1:2).

Gruppe MVA-BVDV-NS3	Tage nach der Testinfektion mit BVDV-PT810													
	0;2-8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	29	36
Tier A	0,0	0,0	3,0	3,3	4,0	6,0	8,3	8,7	9,0	9,7	9,0	10,3	11,2	11,8
Tier B	0,0	0,0	1,6	2,6	3,0	3,0	3,0	5,3	5,3	5,3	7,0	8,0	10,8	12,5
Tier C	0,0	1,0	1,6	2,6	5,0	6,7	8,0	8,3	8,0	8,0	8,7	10,5	11,8	12,1
Tier D	0,0	0,0	1,0	2,6	3,0	4,0	4,3	7,0	7,3	8,0	8,3	10,0	11,8	12,1
Tier E	0,0	0,0	2,3	2,6	3,3	5,3	7,0	8,0	8,7	9,0	9,0	10,3	11,8	12,1
Tier F	0,0	0,0	1,0	2,6	4,0	6,7	7,3	7,7	8,0	8,3	9,0	10,0	11,8	12,5
Mittelwert	0,00	0,17	1,75	2,71	3,72	5,27	6,32	7,50	7,71	8,04	8,49	9,86	11,54	12,20
Standard- abweichung	0,00	0,37	0,72	0,28	0,70	1,36	1,97	1,10	1,19	1,35	0,71	0,85	0,40	0,23
<i>mittl. Titer 1:X</i>	<i>1</i>	<i>1</i>	<i>3</i>	<i>7</i>	<i>13</i>	<i>39</i>	<i>80</i>	<i>181</i>	<i>210</i>	<i>264</i>	<i>360</i>	<i>929</i>	<i>2982</i>	<i>4703</i>
MVA-LacZ - Ko.														
Tier G	0,0	0,0	0,0	2,6	2,7	3,0	2,7	4,3	5,7	7,3	8,3	8,7	11,8	11,8
Tier H	0,0	0,0	0,0	1,0	1,6	2,6	3,3	3,0	5,3	6,3	7,0	7,7	11,5	12,1
Tier I	0,0	1,0	1,0	3,3	4,0	3,3	3,7	5,7	6,0	7,0	7,3	9,0	11,2	12,5
Tier J	0,0	0,0	1,0	1,0	3,0	3,3	5,0	4,3	6,3	7,3	8,0	8,0	11,1	11,8
Mittelwert	0,00	0,25	0,50	1,98	2,81	3,06	3,66	4,33	5,83	6,99	7,66	8,33	11,40	12,07
Standard- abweichung	0,00	0,43	0,50	1,01	0,86	0,31	0,85	0,95	0,37	0,41	0,53	0,53	0,27	0,28
<i>mittl. Titer 1:X</i>	<i>1</i>	<i>1</i>	<i>1</i>	<i>4</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>13</i>	<i>20</i>	<i>57</i>	<i>127</i>	<i>202</i>	<i>322</i>	<i>2696</i>	<i>4288</i>
Student' t-Test		0,779	0,027	0,174	0,141	0,021	0,052	0,003	0,025	0,212	0,110	0,021	0,588	0,481
Differenz Mittel- werte log ₂		-0,08	1,25	0,73	0,91	2,21	2,67	3,17	1,89	1,06	0,84	1,53	0,15	0,13
<i>Ko./Versuchs- gruppe X-fach:</i>		<i>0,9</i>	<i>2,4</i>	<i>1,7</i>	<i>1,9</i>	<i>4,6</i>	<i>6,3</i>	<i>9,0</i>	<i>3,7</i>	<i>2,1</i>	<i>1,8</i>	<i>2,9</i>	<i>1,1</i>	<i>1,1</i>

4.3. Veränderung der Gesamtleukozytenzahl im peripheren Blut nach Infektion mit BVDV-PT810

Die Leukozytenzahl eines jeden Tieres wurde vor der Testinfektion (Ausgangswert) und bis 20 Tage p.inf. täglich mit Hilfe des Cell DYN 3500 Analysegerätes bestimmt. Das arithmetische Mittel der absoluten Zahlen der Leukozyten aller Tiere lag bei 9649 Leukozyten/ μl , wobei die Werte zwischen 7060 Leukozyten/ μl (Tier C) und 15200 Leukozyten/ μl (Tier G) schwankten. In Abb. 7 ist der Verlauf der relativen Leukozytenzahlen graphisch dargestellt. Alle Tiere zeigten eine ausgeprägte Leukopenie mit einem Maximum am Tag 5 p.inf. (Tag 1 = 100 %; Tag 5: Versuchsgruppe: 37,4 % und Kontrollgruppe: 43,2 %). Die Ausgangswerte wurden nach ca. 19 Tagen p.inf. wieder erreicht. Bei zweiseitiger Betrachtung der Werte für die relativen Zahlen der Leukozyten im t-Test nach Student, konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

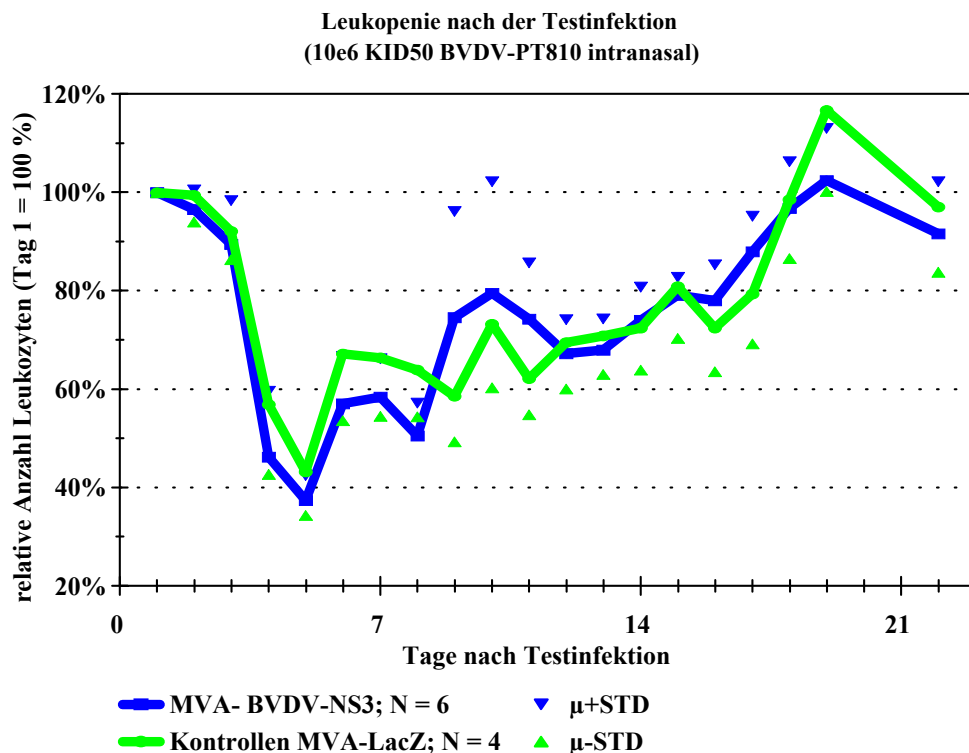


Abb. 7: Vergleich der Leukopenie der MVA-BVDV-NS3 (N = 6) und der MVA-LacZ (N = 4) geimpften Kälber nach der Testinfektion mit 10⁶ KID₅₀ BVDV-PT810. Es sind jeweils die Mittelwerte der relativen Leukozytenzahlen bezogen auf die Tag 0-Werte der beiden Tiergruppen dargestellt.

4.4. Klinische Erkrankung

Anzeichen einer Erkrankung wie Durchfall, Nasen- und Augenausfluss, Husten, Fieber oder Freßunlust traten während des gesamten Beobachtungszeitraums (Immunisierungen und Testinfektion) nicht auf.

4.5. Nachweis BVDV-spezifischer zellulärer Immunität

4.5.1. Nachweis einer Lymphozytenproliferation mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes CFSE

Mit Hilfe des Proliferationstestes mit CFSE sollten erste Hinweise auf das Vorhandensein einer spezifischen zellulären Immunität nach den Immunisierungen und nach der Testinfektion gewonnen werden. Dabei wurde die Reaktion der Lymphozyten der Versuchs- und Kontrolltiere auf den Zusatz des BVD-Virusstammes PT810 überprüft. In jedem Versuchsabschnitt wurden jeweils zwei Stimulationsansätze für jedes Tier angelegt.

Die Lymphozyten der naiven Tiere zeigten keine Proliferation auf den Zusatz von BVDV-PT810 mit einem Titer von mindestens 10^8 KID₅₀/ml. Die Fluoreszenzintensitäten sowohl der Mock- als auch der Virus-stimulierten Lymphozyten aller Tiere lagen innerhalb einer Stimulationsdauer von sechs Tagen bei Betrachtung des Histogramms stets im Bereich des Peaks, der die ursprüngliche, ungeteilte Zellpopulation und somit die höchste Fluoreszenzintensität repräsentiert. Bei Zusatz von ConA, einem unspezifischen Induktor der Zellproliferation, lagen bereits am dritten Tag nur noch 66,7 % (Mittelwert aus jeweils zwei Testansätzen aller Tiere) im Bereich der ungeteilten Population. 22,9 % der Zellen wiesen einen, 8,0 % zwei, 2,1 % drei und 0,3 % vier Zellzyklen auf. Am sechsten Tag waren nach ConA-Stimulation nur noch 11,8 % der Lymphozyten im Bereich der ungeteilten Population zu finden. 37,3 % der Zellen hatten sich einmal, 30,8 % zweimal, 9,9 % dreimal, 5 % viermal und 5,2 % fünfmal geteilt.

15 Tage nach der ersten Immunisierung verhielten sich die Lymphozyten der Kontrolltiere wie die Lymphozyten der noch naiven Tiere vor der ersten Immunisierung. Der größte Teil der Zellen lag stets im Bereich der höchsten CFSE-Fluoreszenz und somit im Ursprungspeak, das heißt die Lymphozyten zeigten keine Proliferation. Drei Tiere der Versuchsgruppe (Tiere

A, B und C) zeigten bereits nach der ersten Immunisierung eine spezifische Proliferation, denn bei diesen drei Tieren lag nur noch etwa die Hälfte der Zellen im Bereich der ungeteilten Population, während die anderen 50 % zwischen ein und drei Zellteilungen aufwiesen (siehe Tab. 11). Auf den Zusatz von UV-inaktiviertem BVDV-PT810 und Mock zeigten die Lymphozyten aller Tiere innerhalb des gesamten Versuchszeitraumes keine Proliferation. Die Lymphozyten der übrigen Tiere **D, E und F** aus der Versuchsgruppe reagierten wie die Lymphozyten der Tiere der Kontrollgruppe nur sehr schwach auf den Viruszusatz. Im Mittel lagen über 90 % der Zellen im Bereich der ungeteilten Zellpopulation (siehe Tab. 11). Bei zweiseitiger Betrachtung der Werte im t-Test nach Student konnte ein schwach signifikanter Unterschied zwischen beiden Tiergruppen festgestellt werden ($p = 0,041$).

15 Tage nach der zweiten Immunisierung mit BVDV-NS3-rekombinantes MVA-Virus reagierten wiederum die Lymphozyten der drei Tiere, die schon nach der ersten Immunisierung eine Proliferation zeigten. Die Mittelwerte von zwei 15 Tage nach der zweiten Immunisierung durchgeführten Testansätzen für die Tiere **A, B und C** sind in Tab. 11 dargestellt. Es wurden nur die Werte nach Stimulation mit vermehrungsfähigem BVDV-PT810 angegeben, da eine Reaktion auf inaktiviertes Virus, wie oben bereits erwähnt, ausblieb. Die Mehrzahl der Zellen teilte sich zwischen ein- und fünfmal. Die anderen drei Tiere aus der Versuchsgruppe verhielten sich ähnlich wie nach der ersten Immunisierung, über 90 % der Zellen blieb, wie auch bei der Kontrollgruppe, ungeteilt (siehe Tab. 11). Der Unterschied zwischen beiden Tiergruppen war schwach signifikant ($p = 0,041$).

15 Tage nach der dritten Immunisierung reagierten wiederum die Tiere **A, B und C** am stärksten auf den Zusatz von Virus. Nun lagen nur noch zwischen 21 % und 30 % der Lymphozyten im Bereich der ungeteilten Population, zwischen 11 % und 43 % der Zellen wies eine, zwischen 15 % und 26 % zwei, zwischen 10 % und 30 % drei und zwischen 0 % und 9 % vier oder fünf Zellteilungen auf. Nach der dritten Immunisierung zeigten auch die Tiere **D, E und F** aus der Versuchsgruppe eine deutliche antigenspezifische Proliferation auf den Zusatz von BVDV-PT810, nur noch 51 % (Tier **D**), 43 % (Tier **E**) und 48 % (Tier **F**) der Lymphozyten dieser Tiere blieb ungeteilt (siehe Tab. 11). Der Unterschied zwischen beiden Tiergruppen nach der dritten Immunisierung war höchst signifikant ($p = 0,000$).

Die Reaktion auf den Zusatz von ConA war bei beiden Tiergruppen ähnlich. So lagen nach sechs Tagen Stimulation stets im Mittel ca. 10 % der Zellen im Bereich des Ursprungspeaks und jeweils 10 % der Zellen hatte sich ein- und zweimal, 30 % dreimal, 30 % viermal und 10 % fünfmal geteilt.

Tab. 11: Lymphozytenproliferation jeweils 15 Tage nach den Immunisierungen mit MVA-BVDV-NS3 (N = 6) und MVA-LacZ (N = 4). CFSE-Test mit 6 Tage *in vitro* BVDV-PT810-restimulierten mononukleären Zellen.

% Zellen mit jeweils X Zellzyklen nach BVDV-Stimulation (6 Tage)

Versuchs- gruppe (MVA-BVDV- NS3)	kein Zyklus			Ein			zwei			drei			vier			fünf Zyklen		
	1*	2**	3***	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Tier A	50	38	21	19	36	11	25	10	26	6	6	30	0	6	7	0	4	5
Tier B	42	45	21	50	29	43	4	12	15	4	7	12	0	7	9	0	0	0
Tier C	67	50	30	13	25	34	18	13	15	2	9	10	0	3	6	0	0	5
Tier D	91	90	51	9	8	21	0	1	26	0	1	2	0	0	0	0	0	0
Tier E	90	90	43	8	7	50	2	3	5	0	0	2	0	0	0	0	0	0
Tier F	95	94	48	4	2	26	1	1	23	0	3	3	0	0	0	0	0	0
Mittelwert	69,2	63,4	33,4	17,2	17,8	30,8	8,3	6,7	18,3	2,0	4,3	9,8	0,0	2,7	3,7	0,0	0,7	1,6
Standardabw.	20,9	23,8	12,3	15,4	12,7	13,2	9,6	5,1	7,5	2,3	3,3	9,8	0,0	2,9	3,8	0,0	1,5	2,4
Kontroll- gruppe (MVA-LacZ)	kein Zyklus			ein			zwei			drei			vier			fünf		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Tier G	98	97	99	2	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier H	99	96	97	1	2	3	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier I	97	97	97	2	2	3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier J	98	98	97	1	2	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mittelwert	98,0	97,0	97,5	1,5	2,3	2,5	0,5	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Standardabw.	0,7	0,7	0,9	0,5	0,4	0,9	0,5	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Student t-Test	0,041	0,041	0,000															

*: 15 Tage nach der ersten Immunisierung

** : 15 Tage nach der zweiten Immunisierung

***: 15 Tage nach der dritten Immunisierung

20 Tage nach der Testinfektion reagierten alle Tiere mit einer BVDV-spezifischen Lymphozytenproliferation. In Tab. 12 sind die Werte für beide Tiergruppen nach sechs Tagen Stimulation mit BVDV-PT810, getrennt nach Kontroll- und Versuchstieren, dargestellt. Auffallend bei Betrachtung der Werte nach der Testinfektion ist, dass es wiederum die Tiere **A**, **B** und **C** aus der Versuchsgruppe waren, die auf den Viruszusatz am stärksten reagierten. So blieben bei Tier **A** nach sechs Tagen Stimulation nur noch 1,6 % der Zellen ungeteilt, 4,4 % der Zellen wies einen, 13,9 % zwei, 22,3 % drei, 41,3 % vier und 16,5 % der Zellen wiesen fünf Zellzyklen auf. Bei den Tieren **B** und **C** befanden sich nur 4,6 % und 1,2 % der Zellen im Bereich der ungeteilten Population. Die in Tab. 12 dargestellten Werte zeigen, dass alle Tiere der Versuchsgruppe mit einer stärkeren Proliferation auf den Zusatz von BVDV-PT810 reagierten wie die Kontrolltiere. So lagen bei den Tieren der Kontrollgruppe noch zwischen 22,4 % und 40,7 % der Zellen im Bereich der ungeteilten Population und nur bei Tier **H** konnten vier Zellzyklen nachgewiesen werden. Innerhalb der Versuchsgruppe lag der prozentuale Anteil der Zellen, der sich nach sechs Tagen Stimulation mit vitalem BVDV-PT810 noch im Bereich der ungeteilten Population befand, zwischen 1,2 % und 17,5 %. Der Unterschied zwischen beiden Tiergruppen ist höchst signifikant bei zweiseitiger Betrachtung im t-Test nach Student ($p = 0,001$). Die Einzelergebnisse sind in Tab. 12 dargestellt.

Tab. 12: Lymphozytenproliferation 20 Tage nach der Testinfektion mit BVDV-PT810.
CFSE-Test mit 6 Tage *in vitro* BVDV-PT810-restimulierten mononukleären Zellen.

Versuchsgruppe (BVDV-NS3-MVA)	Anteil Zellen (%) mit jeweils X Zellzyklen nach BVDV-Stimulation (6 Tage)					
	kein Zyklus	ein	zwei	drei	vier	fünf
Tier A	1,6	4,4	13,9	22,3	41,3	16,5
Tier B	4,6	7,4	15,0	27,4	29,3	16,3
Tier C	1,2	1,8	25,2	40,1	24,8	6,9
Tier D	3,1	2,6	46,2	42,2	5,9	0,0
Tier E	4,5	2,3	45,4	47,3	0,5	0,0
Tier F	17,5	3,8	11,6	25,4	35,5	6,2
Mittelwert	5,42	3,72	26,22	34,12	22,88	7,65
Standardabweichung	5,56	1,87	14,49	9,45	14,90	6,74
Kontrollgruppe (LacZ-MVA)	kein Zyklus	ein	zwei	drei	vier	fünf
Tier G	40,7	35,6	21,2	2,5	0,0	0,0
Tier H	30,7	7,4	34,5	14,0	13,4	0,0
Tier I	22,5	20,5	40,4	16,6	0,0	0,0
Tier J	22,4	19,0	25,5	33,1	0,0	0,0
Mittelwert	29,08	20,63	30,40	16,55	3,35	0,00
Standardabweichung	7,51	10,02	7,51	10,93	5,80	0,00
Student' t-Test	0,001					

4.5.2. Zytotoxizitätstest

4.5.2.1. Befunde an Effektorzellen nach Restimulation mit BVDV-PT810

Die Restimulation mit BVDV führte dazu, dass nach 15 bis 20 Tagen ca. 3,5-12 % der Lymphozyten BVDV-Antigen (NS2/3) positiv waren. Die Lymphozyten der naiven Tiere ließen nach Zusatz von Virus weder eine Blastenbildung noch eine Proliferation im Lichtmikroskop erkennen. Während der einzelnen Immunisierungsabschnitte zeigte sich ein ähnliches Bild wie im Proliferationstest mit CFSE (siehe 4.5.1.), denn nur bei den Tieren **A**, **B** und **C** war bis zur dritten Immunisierung mikroskopisch eine Lymphozytentransformation detektierbar. Nach der dritten Immunisierung reagierten auch die Lymphozyten der restlichen Tiere aus der Versuchsgruppe und nach der Testinfektion die Lymphozytenkulturen aller Tiere mit einer spezifischen Proliferation auf den Zusatz von BVDV-PT810. Die Effektorzellen (Doppelansatz) wurden nach einer Stimulationsdauer von 15 bis 20 Tagen und mehreren Restimulationen mit vitalem BVDV auf Zytotoxizität gegen BVDV-NS2/3 positive Hodenzellen überprüft.

4.5.2.2. Befunde an Zielzellen

Aliquote infizierter Zielzellen waren bei jedem Ansatz zu über 90 % BVDV-NS2/3 positiv. Die Überprüfung der Infektion der Hodenzellen erfolgte mit der monoklonalen Antikörperkombination WB103/105 mittels indirekter Immunfluoreszenz. Die Effizienz der D275-Färbung wurde mit Hilfe des Zytofluorometers überprüft und betrug ebenfalls stets über 90 %.

4.5.2.3. *In vitro*-Nachweis zytotoxischer Lymphozyten aus dem peripheren Blut der Rinder

Die Aktivität zytotoxischer Zellen der Versuchstiere wurde sowohl vor der ersten Immunisierung, im gesamten Versuchszeitraum und nach der Testinfektion untersucht. 21 Tage nach den einzelnen Immunisierungen bzw. nach der Testinfektion wurde allen Tieren Na-Citrat Blut entnommen. Die Lymphozyten wurden mit Hilfe der Zentrifugation über den

Dichtegradienten isoliert und für einen Zeitraum von 15 bis 20 Tagen mit BVDV restimuliert. Als Zielzellen dienten die autologen Hodenzellen eines jeden Tieres, die mit PT810 oder Mock infiziert und kurz vor der Testdurchführung mit dem Farbstoff D275 markiert wurden. Es wurde jeweils ein Zweifachansatz von jedem Effektor- Zielzellverhältnis (E:T = 2:1, 10:1 und 100:1) getestet. Zur Messung der Aktivität zytotoxischer Zellen wurde der Anteil getöteter Zielzellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie quantifiziert (Bindung von PJ an die DNA toter Zellen). In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass Lymphozyten BVDV-infizierter Rinder nicht in der Lage waren allogene BVDV-infizierte Hodenzellen zu lysieren. Vor der ersten Immunisierung konnte bei keinem Tier eine BVDV-spezifische zytotoxische Reaktion detektiert werden (siehe Tab. 13).

Mit 21 Tage nach der ersten Immunisierung für den Test isolierten und restimulierten Lymphozyten ließen sich bei der Durchführung des Zytotoxizitätstestes bereits signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen bei einem Effektor- Zielzellverhältnis von 2:1 und 10:1 feststellen (t-Test; $p = 0,019$ bei einem E:T von 2:1 und $p = 0,030$ bei E:T 10:1).

Nach der zweiten Immunisierung reagierten zwei Probanden der Versuchsgruppe bei einem E:T von 10:1 und 4 der 6 Impflinge nach der dritten Immunisierung mit über 5 % spezifischer Lyse. Der Unterschied in der prozentualen Lyse zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe ist für beide Termine höchst signifikant (t-Test: $p = 0,017$ und $p = 0,002$). Die Daten für die nach der zweiten und dritten Immunisierung ermittelte spezifische Zytotoxizität sind in Tab. 13 dargestellt.

Nach der Testinfektion entwickelten die Kälber, die bereits vor der Infektion eine höhere spezifische Zytoxizität zeigten, sehr deutliche Aktivitäten. Bei drei Tieren war auch bei einem E:T von 100:1 und bei zwei Tieren bei einem E:T von 2:1 eine spezifische Lyse von über 5 % zu messen. Der höchste Wert, der im Rahmen dieser Arbeit detektiert werden konnte lag bei 31,3 % (E:T = 2:1) und 29,3 % (E:T = 10:1) bei Rind A. Auch die Kontrollen reagierten nach der Testinfektion signifikant mit niedrigen Werten (0,3-3,5 % Lyse bei E:T = 10:1) im Vergleich zu allen Testen der Kontrolltiere vor der Infektion (-3,0-0,3 % bei E:T = 10:1). Die Unterschiede von Kontrollgruppe zu Versuchsgruppe waren 21 Tage nach der Testinfektion nicht mehr signifikant (t-Test-Werte $p = 0,188$ [E:T = 2:1]; $p = 0,156$ [E:T = 10:1]; $p = 0,100$ [E:T = 100:1]). Die ermittelten Werte für alle Tiere und den gesamten Untersuchungszeitraum, finden sich in Tab. 13 und Abb. 8 vergleichend dargestellt.

Tab. 13: Spezifische Zytotoxizität von 15-20 Tage *in vitro* mit BVDV-PT810-restimulierten Lymphozyten gegen autologe, BVDV-PT810 infizierte Hodenzellen vor und nach der Immunisierung bzw. Testinfektion.

Spezifische Zytotoxizität gegen BVDV-PT810-infizierte, autologe Hodenzellen

Versuchsgruppe	vor Imm. 10:1*	Blutentnahme jeweils 21 Tage nach									Testinfektion		
		1. Immunisierung			2. Immunisierung			3. Immunisierung			2:1	10:1	100:1
MVA-BVDV-NS3		2:1	10:1	100:1	2:1	10:1	100:1	2:1	10:1	100:1	2:1	10:1	100:1
Tier A	0,0	0,5	2,5	0,3	3,2	6,2***	4,0	4,1	7,7	2,2	31,3	29,3	11,6
Tier B	-1,2 **	0,7	1,5	0,4	0,4	5,3	3,2	5,8	6,3	1,7	10,2	10,3	5,5
Tier C	0,0	0,0	0,0	0,2	0,6	2,0	3,0	1,1	7,6	0,4	4,3	7,0	6,3
Tier D	-1,3	0,2	0,0	0,0	0,6	2,0	4,1	1,7	5,8	0,9	4,9	4,3	2,4
Tier E	-0,8	0,6	0,7	1,0	0,0	1,7	0,3	2,0	3,4	2,0	2,6	3,4	1,7
Tier F	-0,4	0,5	0,1	0,0	0,9	0,3	0,6	0,7	1,6	0,6	3,3	5,2	1,2
Mittelwert	-0,61	0,42	0,80	0,32	0,95	2,92	2,53	2,57	5,38	1,29	9,43	9,92	4,78
Standardabw.	0,51	0,24	0,93	0,34	1,04	2,10	1,53	1,80	2,22	0,69	10,08	8,95	3,59
MVA-LacZ-Ko.													
Tier G	0,0	-3,2	-3,0	0,6	0,0	0,2	0,1	0,5	0,2	0,0	3,2	1,2	1,1
Tier H	-2,5	-1,0	-0,9	0,0	-0,4	-0,3	0,0	0,0	-2,0	0,5	1,9	3,5	0,2
Tier I	-4,0	-0,7	-0,6	0,0	-0,5	-2,0	0,3	0,0	-1,0	0,3	-2,0	3,1	3,2
Tier J	-0,9	0,0	0,0	0,1	0,0	-1,0	0,2	0,3	0,3	0,0	1,8	0,3	-1,3
Mittelwert	-1,84	-1,23	-1,13	0,18	-0,23	-0,78	0,15	0,19	-0,63	0,20	1,23	2,03	0,80
Standardabw.	1,54	1,20	1,13	0,25	0,23	0,83	0,11	0,21	0,94	0,21	1,94	1,32	1,63
Student' t-Test	0,143	0,019	0,030	0,539	0,082	0,017	0,024	0,047	0,002	0,025	0,188	0,156	0,100

*: Effektor-Zielzellverhältnis

** : negative Werte ergeben sich rechnerisch, falls bei der Mock-Stimulation mehr Zellen permeabilisiert (PJ-positiv) waren als im Ansatz mit BVDV-PT810

***:Werte von über 5 % sind rot markiert.

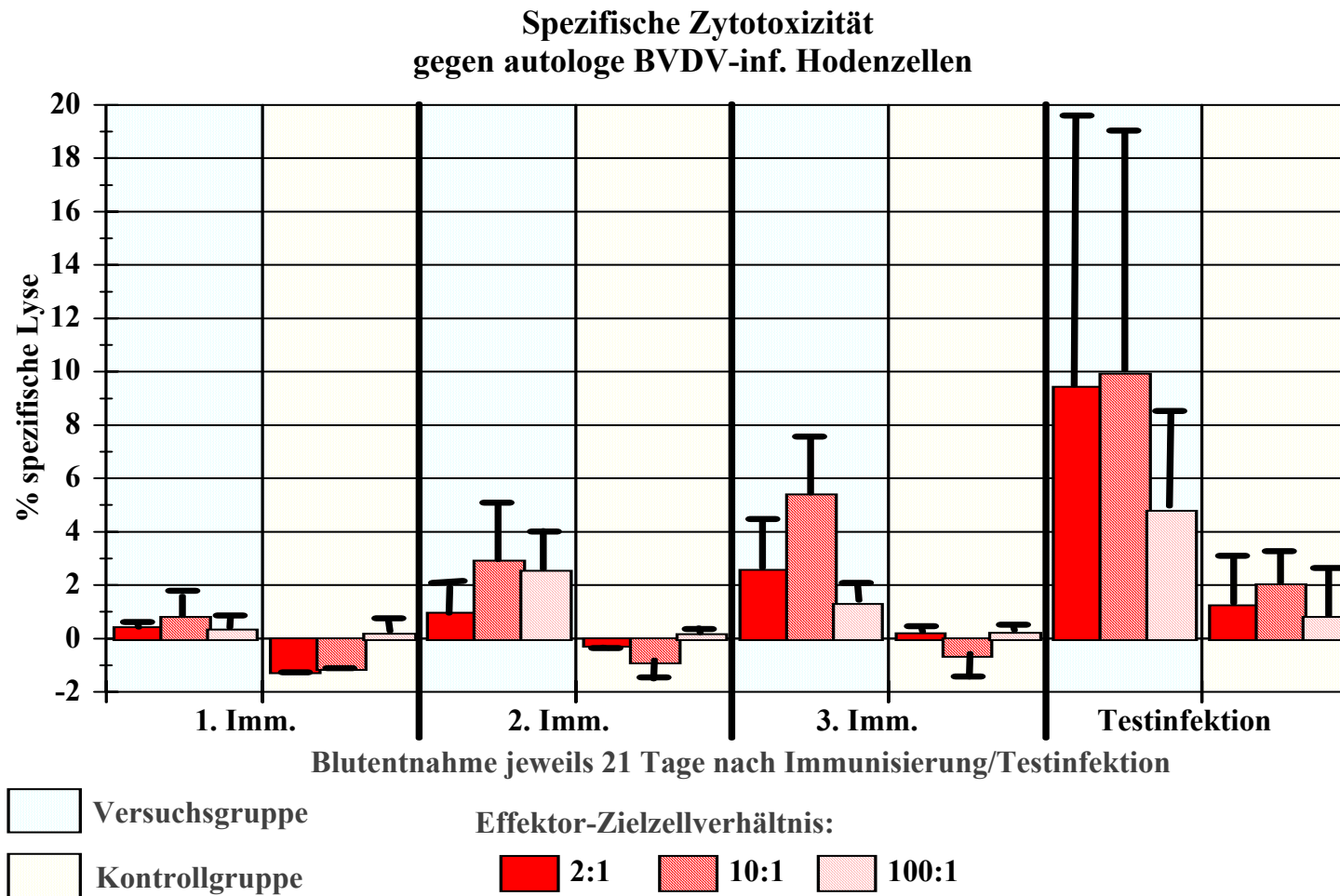


Abb. 8: Spezifische Zytotoxizität von 15-20 Tage *in vitro* mit BVDV-PT810-restimulierten Lymphozyten gegen autologe, BVDV-PT810 infizierte Hodenzellen vor und nach den Immunisierungen bzw. Testinfektion.

4.6. Quantitativer Nachweis der bovinen Interleukine 2 und 4

Die Quantifizierung der bovinen Interleukine 2 und 4 wurde mit Hilfe einer *Real Time* PCR durchgeführt. Das Blut für die Lymphozytengewinnung und den Stimulationsansatz wurde jeweils 14 Tage nach der dritten Immunisierung und nach der Testinfektion entnommen. Die für die bovinen Interleukine (IL-2 und IL-4) spezifische *Real Time* PCR wurde mit der RNA aus 6 h lang BVDV-PT810 ($\geq 10^8$ KID₅₀/ml) stimulierten Lymphozyten (Doppelansatz) und den entsprechenden Kontrollen durchgeführt. In Vorversuchen hatte sich gezeigt, dass nach einer Stimulationsdauer von 6 h die maximale Syntheserate beider Zytokine erreicht wurde. Da IL-2 hauptsächlich von T_H1 (im geringen Maße von CTL) und IL-4 hauptsächlich von T_H2-Zellen produziert wird, gab diese PCR Aufschluss über die Reaktion dieser beiden Zelltypen nach *in vitro* Restimulation mit BVDV-PT810. Nach Durchführung der *Real Time* PCR wurden zunächst die Diff. Δ Ct-Werte für jeden Stimulationsansatz und jedes Interleukin berechnet (siehe 3.11.) und die Mittelwerte gebildet. Mit Hilfe einer Standardkurve (eine log₁₀-Verdünnungsreihe eines Templates wurde in der PCR untersucht) konnte in Vorversuchen zudem gezeigt werden, dass ein Diff. Δ Ct-Wert von 3,32 einer Verzehnfachung der mRNA-Menge entspricht. Daraufhin wurde eine Differenz von 0,6 als positive Reaktion gewertet. Sie entspricht einer Erhöhung der mRNA-Kopien um ca. das Zweifache. In Tab. 14 ist das Vielfache an mRNA-Kopien für die beiden Interleukine nach Stimulation mit ConA und BVDV-PT810 im Vergleich zum Kontrollansatz (Mockstimulation) aufgeführt.

Im Vergleich zu den Mockkontrollen konnte bereits nach der dritten Immunisierung bei den Tieren der Versuchsgruppe ein deutlicher Anstieg der Syntheserate von IL-2 nachgewiesen werden, denn vier der sechs Versuchstiere zeigten einen deutlichen Anstieg in der IL-2-mRNA-Kopienzahl. Der berechnete Mittelwert für die IL-2-mRNA-Kopienzahl (Stimulation mit BVDV-PT810) im Vergleich zum Ansatz ohne Stimulans war zudem deutlich höher wie bei der Kontrollgruppe. Die Signifikanz des Unterschieds bezüglich der IL-2-Synthese blieb jedoch gering ($p = 0,047$). Die IL-4-Syntheserate der nach der dritten Immunisierung isolierten Lymphozyten stieg ebenfalls nach Zusatz von BVDV-PT810. Bei fünf der sechs Tiere der Versuchsgruppe konnte ein Anstieg der IL-4-mRNA-Kopienzahl festgestellt werden. Bei vergleichender Betrachtung der IL-4-Synthese nach der dritten Immunisierung ließ sich bei Vergleich der beiden Tiergruppen ein signifikanter Unterschied feststellen (t-Test: $p = 0,020$).

Nach der Testinfektion konnte sowohl eine Steigerung der IL-4- als auch der IL-2-Synthese bei beiden Tiergruppen festgestellt werden (siehe Tab. 14). Bei der Versuchsgruppe stieg die Syntheserate für das IL-2 weniger stark an wie für das IL-4. Bei zweiseitiger Betrachtung der

Werte im Student' t-Test konnte allerdings nur für das IL-4 ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Tiergruppen festgestellt werden ($p = 0,028$).

Bei Vergleich der mRNA-Kopienzahl für die Virusstimulation mit derjenigen für den Ansatz mit ConA zeigten drei der sechs Versuchstiere (Tiere **A**, **B** und **D**) für die IL-2-mRNA-Synthese und fünf der sechs Versuchstiere für die IL-4-mRNA-Synthese eine höhere Kopienzahl nach Restimulation mit Virus. In Tab. 14 und Abb. 9 sind die Werte aller Tiere vergleichend dargestellt.

Tab. 14: BVDV-PT810 spezifische IL-2- und IL-4-mRNA *in vitro* (6 h Inkubation; die Mock-Stimulation ergab Mittelwerte von 2,3-fach für IL-2 und 2,7-fach für IL-4 bei der MVA-NS3-Gruppe und 1,5-fach für IL-2 und 0,8-fach für IL-4 bei den MVA-LacZ-Kontrolltieren).

Versuchsgruppe (MVA-NS3)	14 Tage nach der 3. Immunisierung				14 Tage nach der Testinfektion			
	mRNA IL-2		mRNA IL-4		mRNA IL-2		mRNA IL-4	
	ConA-Kontrolle	BVDV-PT810	ConA-Kontrolle	BVDV-PT810	ConA-Kontrolle	BVDV-PT810	ConA-Kontrolle	BVDV-PT810
Tier A	32,2	26,6	26,2	13,3	18,9	23,2	23,2	31,9
Tier B	14,3	13,9	14,3	10,6	13,3	17,6	14,9	16,6
Tier C	19,3	15,9	18,9	4,6	13,9	12,0	12,9	15,6
Tier D	13,9	13,3	25,9	10,0	5,6	6,6	8,6	25,2
Tier E	15,6	3,3	13,9	6,6	16,6	5,6	15,3	8,6
Tier F	13,6	0,0	13,9	1,0	26,2	14,9	15,9	16,6
Mittelwert	18,15	12,17	18,87	7,69	15,77	13,34	15,16	19,09
Standardabweichung	6,56	8,68	5,37	4,09	6,22	6,12	4,35	7,47
Kontrollgruppe (MVA-LacZ)								
Tier G	14,3	0,0	15,3	0,0	9,0	4,0	11,0	4,6
Tier H	13,9	1,3	14,3	1,7	14,3	7,6	19,3	9,6
Tier I	32,2	1,7	26,2	1,0	9,3	5,3	16,6	10,3
Tier J	14,3	0,0	15,6	1,3	14,3	6,6	15,3	5,6
Mittelwert	18,68	0,75	17,85	1,00	11,70	5,89	15,52	7,55
Standardabweichung	7,81	0,76	4,86	0,62	2,58	1,38	3,00	2,44
Student' t-Test	0,921	0,047	0,791	0,020	0,300	0,065	0,901	0,028

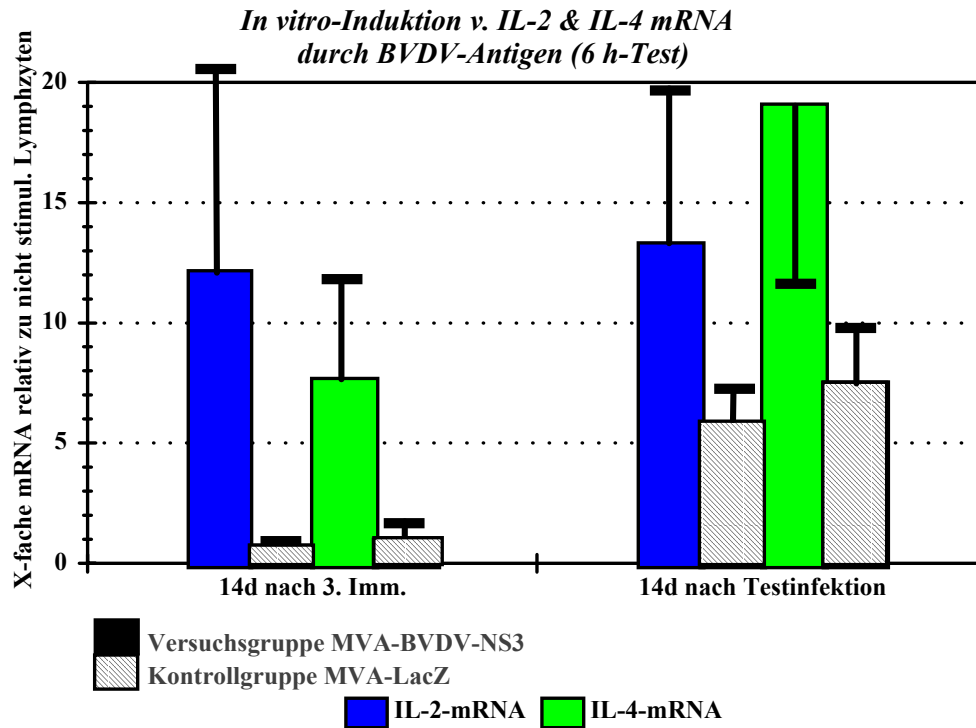


Abb. 9: Mittelwerte und Standardabweichung BVDV-PT810 spezifischer **IL-2-** und **IL-4-mRNA** *in vitro* (6 h Inkubation; die Mock-Stimulation ergab Mittelwerte von 2,3-fach für IL-2 und 2,7-fach für IL-4 bei der MVA-NS3-Gruppe und 1,5-fach für IL-2 und 0,8-fach für IL-4 bei den MVA-LacZ-Kontrolltieren).

4.7. Nachweis von bovinem γ -Interferon

Der kommerziell erhältliche γ -Interferon-ELISA (BOVIGAM™) wurde mit Zellkulturüberständen von sechs Stunden lang BVDV-PT810 ($\geq 10^8$ KID₅₀/ml) stimulierten Lymphozyten nach der dritten Immunisierung und nach der Testinfektion durchgeführt. Dieser Test ließ im Gegensatz zur *Real Time* PCR keine Aussage über die Menge des vorhandenen Interferon zu. Nach Durchführung des ELISAs nach Herstellerangaben ergaben sich die in Tab. 15 dargestellten OD-Werte für die Tiere. Nach der dritten Immunisierung reagierten ausschließlich Tiere der Versuchsgruppe. So konnte bei den Tieren **A, B, C, D** und **E** eine positive Reaktion auf BVDV-PT810 Zusatz festgestellt werden. Die Werte lagen für das Tier **A** bei 2,7 (Mock: 0,6), für das Tier **B** (Mock: 0,4) und **C** bei 1,3 (Mock: 0,5), für das Tier **D** bei 0,9 (Mock: 0,5) und für das Tier **E** bei 0,7 (Mock 0,3). Bei allen Tieren ließ sich nach Zusatz von ConA γ -Interferon nachweisen.

Nach der Testinfektion zeigten alle Tiere eine positive Reaktion (siehe Tab. 15).

Tab. 15: BVDV-PT810 spezifische γ -IFN-Freisetzung *in vitro* (6 h Inkubation), OD-Werte Bovigam ELISA (* Werte $\geq 0,7$ werden vom Testhersteller als positiv bewertet für eine spezifische zelluläre Reaktion).

Bovigam-ELISA Versuchstiere (MVA-NS3)	OD Werte; Blutprobe entnommen 14 Tage nach:	
	3. Immunisierung	Testinfektion
Tier A	2,7*	1,7*
Tier B	1,3 *	1,0*
Tier C	1,3 *	1,5*
Tier D	0,9 *	1,2*
Tier E	0,7 *	1,6*
Tier F	0,6	2,3*
Mittelwert	1,25	1,55
Standardabw.	0,70	0,41
Kontrollgruppe (MVA-LacZ)	3. Immunisierung	Testinfektion
Tier G	0,5	1,5*
Tier H	0,6	1,6*
Tier I	0,3	1,3*
Tier J	0,2	1,2*
Mittelwert	0,40	1,40
Standardabw.	0,16	0,16
Student' t-Test	0,066	0,551

5. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zehn BVDV-Antigen- und Antikörper-freie Tiere zunächst mit BVDV-PT810-NS3- (N = 6) und LacZ- (N = 4) rekombinantem MVA immunisiert und anschließend mit dem BVDV-Isolat PT810 (Thierauf, 1993) infiziert. Die Untersuchungen konzentrierten sich insbesondere auf die durch dieses rekombinante Virus induzierte BVDV-spezifische zelluläre Immunantwort und die entsprechenden Parameter. Außerdem sollte eine mögliche Schutzwirkung dieser experimentellen Vakzine im Hinblick auf eine BVD-Infektion geprüft werden. Das MVA-Vektorsystem wurde gewählt, da es der niedrigen Sicherheitsstufe S1/L1 (Robert Koch Institut Berlin) unterliegt und sich in zahlreichen Tierversuchen als geeignetes Vektorsystem bewährt hat (Sutter und Staib, 2003).

5.1. BVDV-NS3-rekombinantes MVA als Vektorsystem zur Immunisierung gegen BVDV

Bisher wurden die immunogenen Eigenschaften von rekombinantem BVDV-NS3, exprimiert im heterologen Vektor, nur im Mausmodell oder nach Applikation an Kaninchen untersucht und beschrieben (Elahi *et al.*, 1999a; Reddy *et al.*, 1999; Klemm, 2001). Es liegen keine Erkenntnisse vor, wie sich diese rekombinanten Viren im Rind verhalten bzw. ob sich die in den bisherigen Untersuchungen gewonnenen Erkenntnisse auf das Rind übertragen lassen. In der vorliegenden Arbeit sollten die immunogenen Eigenschaften eines rekombinanten BVDV-NS3-MVA erstmals im Rind untersucht und charakterisiert werden.

5.2. Charakterisierung von BVDV-NS3-rekombinatem MVA im Tierversuch

Zur Überprüfung des Immunisierungserfolges wurden die MVA-Virustiter bestimmt. Bei keinem der Tiere konnte nach Applikation des Konstrukts eine Störung des Allgemeinbefindens oder eine lokale Reaktion nachgewiesen werden, was die Untersuchungen über die Apathogenität des MVA bestätigt (Mayr *et al.*, 1975; Glaser, 1998). Die ermittelten neutralisierenden Vacciniavirustiter der beiden Versuchstiergruppen waren nahezu identisch, was für die Applikation etwa gleicher Virusdosen an alle Tiere und eine homogene Immunreaktion auf das Vektorvirus spricht, unabhängig davon, welches rekombinante Virus für die Immunisierung verwendet wurde. Die Vacciniavirus-spezifischen neutralisierenden Antikörpertiter erreichten bei beiden Gruppen nach der zweiten Immunisierung Werte von über 1:2058. Nach der dritten Immunisierung konnte kein deutlicher Titeranstieg mehr festgestellt werden. Diese fehlende bzw. schwache Boosterung nach der dritten Immunisierung wurde vermutlich durch die bereits aufgrund der ersten beiden Immunisierungen induzierten neutralisierenden Vacciniavirusantikörper verursacht.

Mit Hilfe des FACS-IFI und eines NS3-spezifischen ELISAs sollte die humorale Immunantwort auf das rekombinant exprimierte BVDV-NS3 untersucht werden. Bisherige Untersuchungen zeigten, dass Kaninchen nach Applikation von rekombinatem BVDV-NS3-MVA in der Lage waren, eine humorale Immunantwort gegen dieses pestivirale Nichtstrukturprotein zu entwickeln. Die gebildeten Antikörper wurden allerdings erst durch die dritte Immunisierung induziert und wiesen geringe Titer auf. Die FACS-IFI-Werte der Kaninchen betragen nach der dritten Immunisierung nur etwa 20 % (Klemm, 2001).

Mit BVDV-NS3-rekombinanten Adenoviren immunisierte Mäuse entwickelten bereits drei Wochen nach der ersten Immunisierung NS3-spezifische, nicht neutralisierende Antikörper (Elahi *et al.*, 1999a). Folglich kann man vermuten, dass eine humorale Immunantwort auch in Rindern durch rekombinante BVDV-NS3-Viren induzierbar ist, zumal nach natürlicher Infektion NS3-spezifische Antikörper im Rind gefunden werden können (Westenbrink *et al.*, 1986; Lecomte *et al.*, 1991).

In den Seren der Versuchstiere waren jedoch bis zur Testinfektion keine NS3-spezifischen Antikörper mit Hilfe der beiden verwendeten Methoden, FACS-IFI und ELISA, detektierbar. Untersuchungen von rekombinant exprimiertem BVDV-NS3 haben gezeigt, dass die Expression der NS3-B-Zell-Epitope abhängig von einer einzigen Aminosäure innerhalb einer 57 Aminosäuren langen Sequenz am carboxyterminalen Ende des NS3-Proteins ist (Brown *et al.*, 2002). Es wäre folglich möglich, dass es *in vitro* bei der Vermehrung des BVDV-NS3-

rekombinanten MVA oder nach der Applikation des rekombinanten MVA im Rind zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz des NS3 kam und die B-Zell-Epitope nicht mehr exprimiert wurden. Derartige Veränderungen lassen sich auch trotz der Tatsache, dass das rekombinante NS3-MVA vor der Verwendung für die Immunisierung durch PCR, Sequenzanalyse und indirekte Immunfluoreszenzfärbung überprüft wurde, nicht sicher ausschließen.

Eine weitere Möglichkeit für die fehlende Induktion von NS3-Antikörpern bei den Versuchsrindern stellt die Inhibition einer NS3-spezifischen Antikörperbildung durch die bereits beschriebene starke humorale Immunantwort gegen das Vektorvirus dar. Die gegen das Vektorvirus gerichteten Antikörper verhinderten vermutlich eine starke Vermehrung des MVA und somit auch eine für die Antikörperbildung ausreichende Expression des NS3 im Rind. Für andere rekombinante Viren, wie *Semliki Forest Virus* (SFV) im Hantavirus- und *Simian Immunodeficiency Virus*- (SIV-) Modell konnte nachgewiesen werden, dass die gegen das SFV gebildeten Antikörper zu einer verminderten antigenspezifischen zellulären Immunantwort führten (Kamrud *et al.*, 1999; Mossman *et al.*, 1996). Kaninchen zeigten nach Immunisierung mit BVDV-NS3-rekombinantem MVA hohe plaquereduzierende Titer von über 1:1000 gegen MVA und entwickelten, wie oben bereits erwähnt, nur sehr geringe Titer gegen das NS3 (Klemm, 2001). Auch für Hepatitis C-Virus-NS3-rekombinante SFV-Viren wurde ein Fehlen der NS3-spezifischen humoralen Immunantwort beschrieben. Im Gegensatz zu der hier vorliegenden Arbeit und den anderen Untersuchungen waren in dieser Hepatitis C-Studie die gegen das SFV-Vektorvirus gerichteten Antikörpertiter jedoch sehr gering (Brinster, *et al.*, 2002).

Außerdem besteht die Möglichkeit, dass die beiden voneinander unabhängig durchgeführten Tests, der NS3-ELISA und der FACS-IFI, die im Serum der Tiere eventuell vorhandenen NS3-Antikörper nicht detektieren konnten. Es handelt sich bei beiden Nachweismethoden um so genannte *Blocking*-Tests. Es wäre folglich möglich, dass zwar Antikörper in den Seren der Tiere vorhanden waren, aber diese Serumantikörper andere Epitope des NS3-Proteins als die im Test verwendeten Antikörper erkannten. Somit würde eine Konkurrenz und Blockade der Testantikörper ausbleiben. Die Serumantikörper könnten, wenn dies der Fall wäre, dem Nachweis entgehen. Bei polyklonalen Reagenzien ist das aber unwahrscheinlich, zumal NS3-*Blocking*-Teste auch für die Diagnostik zugelassen sind.

Schließlich besteht auch die Möglichkeit, dass die Menge an verabreichtem BVDV-NS3-rekombinantem MVA zu gering gewesen ist, um eine B-Zell-Antwort in den Rindern zu induzieren. Untersuchungen haben gezeigt, dass sich MVA in Säugertierzellen nur abortiv

vermehrt (Mayr *et al.*, 1975). Die Virusreplikation in den Zellen verläuft zwar normal, allerdings ist die Virusmorphogenese durch fehlende Prozessierung der MVA-Coreproteine gestört (Sutter und Moss, 1992). Es kommt zu keiner Virämie bzw. Virusausscheidung (Glaser, 1998). Außerdem lässt sich rekombinantes MVA selbst nach intramuskulärer Applikation hoher Dosen (10^8 I.E.) nur lokal nachweisen (Glaser, 1998). Diese abortive Virusvermehrung könnte ein weiterer Grund für das Ausbleiben einer NS3-spezifischen B-Zellantwort vor der Testinfektion sein. Möglicherweise war aufgrund der nur lokal am Applikationsort stattfindenden Vermehrung des rekombinanten BVDV-NS3-MVA die Induktion einer NS3-spezifischen B-Zellantwort zunächst nicht möglich. Ein T-Zell-*Priming* könnte allerdings stattgefunden haben, denn vermutlich waren es insbesondere die so genannten professionellen Antigenpräsentierenden Zellen (APCs) im Gewebe, die nach den Immunisierungen das NS3-Protein bzw. seine spezifischen Peptide über ihre MHC-Moleküle präsentieren konnten. In der Folge kam es dann vermutlich zu einer Aktivierung und zu einem *Priming* von $CD4^+$ -T-Zellen.

Nach der Testinfektion ließen sich nicht neutralisierende NS3-Antikörper bei allen Rindern nachweisen. Dies bestätigt Studien, die den Nachweis für nicht neutralisierende NS3-Antikörper in infizierten Tieren erbrachten (Westenbrink *et al.*, 1986; Donis und Dubovi, 1987d; Lecomte *et al.*, 1991). Nach der Infektion mit BVDV kam es bei allen Tieren zu einer Virämie mit Virusausscheidung. Das NS3-Protein wurde in großer Menge gebildet und konnte dann in der Folge neben der direkten Infektion auch von den B-Zellen über ihre oberflächenständigen Immunglobulinmoleküle gebunden und internalisiert werden.

Bei einigen Versuchstieren war schon am Tag 8 p.inf. eine Detektion von NS3-Antikörpern mit Hilfe des FACS-Immunfluoreszenz-Inhibitions-Testes möglich. Außerdem wurden für alle Tiere der Versuchsgruppe wesentlich höhere Hemmungsprozente im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen. Diese schnellere und effektivere NS3-Antikörperbildung bei den Tieren der Versuchsgruppe wurde vermutlich durch T-Helferzellen (T_H2 und ein Teil der T_H1), die durch die Immunisierungen mit dem rekombinanten BVDV-NS3-MVA geprimt wurden, vermittelt. Nach der Testinfektion standen diese Zellen dann bei den Tieren der Versuchsgruppe in ihrer Funktion als „Helfer“ für die B-Zellantwort zur Verfügung. Im Gegensatz dazu blieb dieses *Priming* und somit eine stärkere Aktivierung von B-Zellen mit nachfolgender Antikörperbildung nach der Testinfektion bei den Tieren der Kontrollgruppe aus.

5.3. Virusisolierung, Leukozytenpopulationen und BVDV-spezifische neutralisierende Antikörper p.inf.

Bei vergleichender Betrachtung der Daten für die Isolierung von BVDV aus den Blutleukozyten, der Zahl der Leukozyten und der Bildung neutralisierender Antikörper im Blut ließ sich folgendes feststellen:

1. Die beiden Tiergruppen wiesen keine deutlichen Unterschiede in der Dauer der Virämie nach der Testinfektion auf. Allerdings waren die mittleren Virustiter an den Tagen 3-13 p.inf. bei den Tieren der Versuchsgruppe nur halb so hoch wie bei der Kontrollgruppe.
2. Die Leukozytenzahlen innerhalb von 19 Tagen p.inf. verhielten sich in etwa gleich. Bei beiden Gruppen war eine Leukopenie zu beobachten, die bei beiden Tiergruppen gleichzeitig auftrat. Auch die Zeitdauer bis zur Normalisierung der Zellzahlen im peripheren Blut wies keine deutlichen Unterschiede auf.
3. Die neutralisierenden Antikörpertiter stiegen bei den Tieren der Versuchsgruppe etwas schneller an als bei der Kontrollgruppe. Ein höchst signifikanter Unterschied zwischen beiden Tiergruppen zeigte sich insbesondere am Tag 15 p.inf.. Der mittlere Antikörpertiter der Tiere der Versuchsgruppe war am Tag 15 p.inf. neunmal so hoch wie jener der Kontrollgruppe.

Die Bildung neutralisierender Antikörper spielt bei der Immunantwort gegen eine BVDV-Infektion und bei der Eliminierung des Virus aus dem Körper eine entscheidende Rolle. Untersuchungen haben gezeigt, dass sich das BVD-Virus in Abhängigkeit von der vorhandenen Menge an neutralisierenden Antikörpern nicht systemisch ausbreiten kann und dass neutralisierende Antikörper bei der Elimination des Virus aus dem Organismus eine sehr wichtige Rolle spielen (Howard *et al.*, 1989). Diese neutralisierenden Antikörper sind allerdings gegen das E2-Protein, das als Hauptimmunogen für die Bildung neutralisierender Antikörper bei BVDV-Infektionen gilt, gerichtet (Donis und Dubovi, 1987d; Donis *et al.*, 1988; Weiland *et al.*, 1989). Nach Untersuchung der Seren der Versuchstiere im SNT auf E2-Antikörper konnte bei den Versuchstieren im Vergleich zu den Kontrolltieren ein etwas schnellerer Anstieg der neutralisierenden Antikörper festgestellt werden. Diese Antikörper

waren vermutlich zusammen mit zellulären Immunitätsmechanismen in der Lage das Ausmaß der BVDV-Infektion der Leukozyten der Versuchstiere zu limitieren, was die Halbierung des mittleren Virustiters im Vergleich zur Kontrollgruppe erklären würde. Durch die Immunisierungen mit rekombinantem BVDV-NS3-MVA kam es bei den Versuchstieren möglicherweise, wie oben bereits erwähnt, zu einem *Priming* von T-Helferzellen. Es ist bekannt, dass die T-Helferzellen und die von ihnen aktivierten B-Zellen dasselbe Antigen erkennen müssen, damit eine so genannte gekoppelte Erkennung bzw. *linked recognition* und eine nachfolgende Aktivierung mit Antikörperbildung erfolgt. Allerdings muss nicht das identische Epitop von beiden Zellen erkannt werden. Entscheidend ist, dass das Peptid, das von der T-Zellen erkannt wird, zum gleichen Antigenen-Komplex gehört wie das, das die B-Zelle erkennt (Janeway und Travers, 1997). Die schnellere Bildung der neutralisierenden Antikörper bei den Tieren der Versuchsgruppe könnte somit möglicherweise darauf zurückzuführen sein, dass die durch die Immunisierungen geprimten T-Helferzellen nach der Testinfektion Peptide des NS3, die auf B-Zellen präsentiert wurden erkannten und so in der Lage waren effektiv eine Antikörperantwort auch gegen das E2-Protein zu unterstützen. Die durch die neutralisierenden Antikörper und die zellulären Immunitätsmechanismen (siehe 5.4.) induzierte protektive Wirkung war allerdings nur begrenzt, denn der Verlauf der Leukozytenzahlen und auch die Dauer der Virämie beider Tiergruppen p.inf. unterschieden sich nicht signifikant.

Die bei allen Tieren aufgetretene Leukopenie nach der Testinfektion mit BVDV-PT810 wurde in zahlreichen Untersuchungen beschrieben. Bei Studien über die Auswirkungen einer BVDV-Infektion auf die Zellzahlen im peripheren Blut p.inf. unter Berücksichtigung einzelner Lymphozytenpopulationen, wurde z.B. für einen ebenfalls ncp-BVDV-Stamm (NY-1) eine alle Lymphozytenpopulationen betreffende Lymphopenie nachgewiesen (Ellis *et al.*, 1988). Auch für den in dieser Arbeit für die Testinfektion der Tiere verwendeten ncp-BVDV-Stamm PT810 wurde nach Infektion von serologisch negativen Tieren eine ausgeprägte Lymphopenie beschrieben (Beer, 1995). Dieses Phänomen blieb nach Infektion von serologisch positiven Tieren aus (Beer, 1995). Diese Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass die bei den von Beer (1995) beschriebenen serologisch positiven Tieren vorhandenen neutralisierenden Antikörper in der Lage waren, das Virus rasch zu eliminieren und eine Lymphopenie zu verhindern. Howard (1990) beschreibt die alle Lymphozytenpopulationen betreffende Lymphopenie als mögliche Ursache einer BVDV-induzierten Immunsuppression, die die Beantwortung anderer Infektionen beeinträchtigt (Howard, 1990). Die Lymphopenie kann aber auch als Umverteilung der Lymphozyten im Rahmen der Immunantwort angesehen

werden (Beer, 1995). Die Lymphozyten zentrieren sich nach einer Infektion auf periphere oder zentrale Bereiche der Antigenpräsentation und die Immunantwort wird eingeleitet. Außerdem konnte für ncp-BVDV gezeigt werden, dass die Lymphopenie nicht durch direkte Schädigung der Blutzellen verursacht wird (Beer, 1995).

5.4. BVDV-spezifische zelluläre Immunantwort

Ein Ziel dieser Arbeit war es, zelluläre Immunitätsmechanismen, die durch rekombinant exprimiertes BVDV-NS3 induziert werden, näher zu charakterisieren. Während die humorale Immunantwort auf das BVD-Virus gut beschrieben ist, ist über die zelluläre Immunität nur wenig bekannt. Bisherige Untersuchungen zeigten, dass BVDV insbesondere Zellen des Immunsystems wie B-Zellen, T-Zellen und APCs infiziert (Sopp *et al.*, 1994). Andere Studien der zellulären Immunantwort auf eine BVDV-Infektion konnten nachweisen, dass natürliche Killerzellen BVDV-infizierte Zellen nicht lysieren (Campos *et al.*, 1982). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Lymphozyten immunisierter Tiere auf BVDV-Zusatz *in vitro* mit einer Proliferation reagieren (Larsson und Fossum, 1992; Hooper *et al.*, 1992). Beer gelang (1995) erstmals der Nachweis von BVDV-spezifischen MHC-restringierten zytotoxischen T-Zellen. Die für die Generierung dieser T-Zellen verantwortlichen Epitope konnten bisher allerdings keinem BVDV-Protein zugeordnet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte insbesondere die Funktion des NS3-Proteins im immunologischen Geschehen während einer BVDV-Infektion näher untersucht werden, da es zahlreiche Hinweise auf eine Involvierung des NS3-Proteins in die Induktion zellulärer Immunitätsmechanismen gibt (Lambot *et al.*, 1997; Reddy *et al.*, 1999; Elahi *et al.*, 1999a). Für das zur gleichen Virusfamilie gehörige Hepatitis C-Virus konnte sowohl eine humorale als auch eine T_H1-Antwort gegen das stark konservierte NS3-Protein nachgewiesen werden. Hier schien die Stärke der T_H1-Antwort mit der Viruselimination bei akuten HCV-Infektionen zu korrelieren, da diese bei unbehandelten chronischen Infektionen nur sehr schwach ausgeprägt war oder ganz fehlte (Diepolder *et al.*, 1995; Missale *et al.*, 1996; Lazdina *et al.*, 2001). Außerdem befindet sich innerhalb des Hepatitis C-NS3-Proteins ein immundominantes CD4⁺-T-Helferzell-Epitop (Diepolder *et al.*, 1997) sowie verschiedene Epitope für zytotoxische Zellen (Kurokohchi *et al.*, 1996). Die Existenz von T-Zell-Epitopen für

zytotoxische Zellen innerhalb des NS3-Proteins wird auch für BVDV diskutiert (Elaihi *et al.*, 1999a; Reddy *et al.*, 1999; Collen und Morrison, 2000)

Durch die Immunisierung der Versuchstiere mit BVDV-NS3-rekombinatem MVA war es möglich, die Immunantwort auf dieses vermutlich sehr immunogene Nichtstrukturprotein zu beschränken und gleichzeitig die Schutzwirkung gegen eine nachfolgende Infektion zu untersuchen.

5.4.1. Induktion einer proliferativen Immunantwort durch das rekombinante BVDV-NS3-MVA

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die BVDV-spezifische Lymphozytentransformation, zusammenfassend folgendes festgestellt:

- Die Lymphozyten von drei der sechs mit rekombinatem BVDV-NS3-MVA immunisierten Tiere reagierten bereits 15 Tage nach der ersten Immunisierung mit einer deutlichen Proliferation auf die Restimulation mit BVDV-PT810.
- Die Reaktion der Lymphozyten dieser drei Tiere verstärkte sich sukzessive nach den einzelnen Immunisierungen.
- 15 Tage nach der dritten Immunisierung zeigten alle Versuchstiere eine deutlich stärkere Proliferation als die Tiere der Kontrollgruppe, denn zu diesem Zeitpunkt reagierten auch die restlichen drei Tiere der Versuchsgruppe mit einer deutlichen Proliferation auf den *in vitro* Zusatz von BVDV (Student' t-Test: $p = 0,000$).
- 20 Tage nach der Testinfektion reagierten die Lymphozyten aller Versuchstiere mit einer stärkeren Proliferation im Vergleich zu den Lymphozyten der Kontrollgruppe. So blieben bei den Tieren der Versuchsgruppe nur noch zwischen 1,2 und 17,5 % der Zellen ungeteilt (Kontrollgruppe 22,4-40,7 % der Zellen ohne Zellzyklus). Dieser Unterschied war höchst signifikant bei zweiseitiger Betrachtung im t-Test nach Student ($p = 0,001$).

Bei Stimulation der Lymphozyten mit UV-inaktiviertem BVD-Virus konnte keine Proliferation festgestellt werden. Dies liegt möglicherweise daran, dass die antigenen Bereiche, die für die Induktion einer *in vitro* Proliferation essentiell sind, durch die Inaktivierung zerstört wurden. In einer anderen Studie wurde das Ausbleiben einer proliferativen Antwort auch für den Zusatz von hitzeinaktivierten BVD-Viren beschrieben (Larsson und Fossum, 1992).

Die bei drei Tieren der Versuchsgruppe bereits nach der ersten Immunisierung nachgewiesene verstärkte Lymphozytentransformation nach Zusatz von BVDV lässt darauf schließen, dass das rekombinant exprimierte BVDV-NS3 in der Lage war, bei einigen Tieren bereits nach einmaliger Applikation, eine BVDV-NS3-spezifische Immunantwort zu induzieren. Die bei diesen drei Tieren festgestellte Proliferation war auch nicht unspezifisch, da diese Tiere in mehreren Testansätzen im Vergleich zu den restlichen drei Tieren aus der Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe stets verstärkt reagierten. Auch der nach drei Immunisierungen und nach der Testinfektion nachweisbare signifikante Unterschied zwischen beiden Tiergruppen spricht deutlich für eine Induktion einer BVDV-NS3-spezifischen Immunität aufgrund der Immunisierungen mit BVDV-NS3-rekombinantem MVA. Nach der Testinfektion zeigten zwar alle Tiere eine BVDV-spezifische Proliferation. Jedoch reagierten die Tiere der Versuchsgruppe mit einer wesentlich stärkeren antigenspezifischen Proliferation als die Kontrolltiere.

Die beschriebene sich sukzessiv verstärkende Reaktion von drei Tieren der Versuchsgruppe bereits vor der Testinfektion und die verstärkte Proliferation der Lymphozyten aller Tiere der Versuchsgruppe nach der dritten Immunisierung und nach der Testinfektion gibt einen deutlichen Hinweis auf eine durch das rekombinant exprimierte NS3-induzierte zelluläre Immunantwort. Im Gegensatz zu der in dieser Arbeit nachgewiesenen BVDV-NS3-spezifischen Lymphozytenproliferation konnte nach Immunisierung von Mäusen mit rekombinantem BVDV-NS3-Adenoviren keine Immunzellproliferation detektiert werden (Elahi *et al.*, 1999a). Diese bei den Mäusen ausbleibende Reaktion könnte zum einen auf speziesspezifischen Unterschieden bezüglich der Reaktion des Immunsystems auf spezifische Proteinantigene beruhen. Möglicherweise spielt dabei auch die Wahl des Vektorvirus eine entscheidende Rolle. Die zelluläre Immunantwort auf das rekombinante BVDV-NS3-MVA in Kaninchen wurde nicht untersucht (Klemm 2001).

Warum allerdings nur drei der sechs Versuchstiere bereits nach den ersten beiden Immunisierungen mit einer deutlichen Proliferation reagierten, bleibt ungeklärt. Vermutlich beruht dies auf individuellen Unterschieden in Bezug auf die Reaktion auf ein spezifisches

Antigen. Die Ergebnisse sind mit denen von Hooper *et al.* (1992) sowie Larrson und Fossum (1992) vergleichbar, denn auch in deren Studien über das Proliferationsverhalten BVDV-stimulierter Lymphozyten *in vitro* zeigten nicht alle Tiere eine positive Reaktion.

Vermutlich handelt es sich bei der im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesenen Lymphozytentransformation um eine CD4⁺-T-Zell-spezifische Proliferation. Andere Untersuchungen haben gezeigt, dass nach Depletion von CD4⁺-Zellen keine BVDV-spezifische Lymphozytentransformation mehr stattfindet (Howard *et al.*, 1992; Beer, 1995). Für verwandte Viren wie das Hepatitis C Virus des Menschen ist bekannt, dass das auch das HCV-NS3 eine CD4⁺-T-Zell Antwort in Form einer proliferativen T-Helferzellantwort auslösen kann (Lazdina *et al.*, 2001).

Im Gegensatz hierzu steht eine Untersuchung von Lymphozyten seropositiver Rinder, die *in vitro* mit infizierten APCs eines PI-Tieres stimuliert wurden. In dieser Studie zeigten sowohl CD4⁺-T-Zellen als auch CD8⁺-T-Zellen eine BVDV-spezifische Lymphozytenproliferation (Glew und Howard, 2001). Da bei den Experimenten von Glew und Howard (2001) MHC identische Rinder (Haplotyp: A13:A31; Ellis *et al.*, 1998) verwendet wurden, kann das Phänomen der „*mixed lymphocyte reaction*“ bei der in ihrer Studie nachgewiesenen Lymphozytentransformation nahezu ausgeschlossen werden. Für CSFV ist bekannt, dass die Lymphozytentransformation nach Depletion von CD4⁺-T-Zellen, im Gegensatz zu BVDV, unbeeinflusst bleibt. Werden allerdings die CD8⁺-T-Zellen entfernt, bleibt eine proliferative Reaktion auf den *in vitro* Zusatz von CSFV völlig aus (Kimann *et al.*, 1993).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Depletion der CD8⁺-T-Zellen für die *in vitro* Kultivierung der Lymphozyten der Versuchstiere nicht durchgeführt. Somit könnte es sich bei der nachgewiesenen Lymphozytenproliferation sowohl um eine BVDV-spezifische Reaktion der CD4⁺- als auch CD8⁺-Zellen handeln.

5.4.2. Charakterisierung der zytotoxischen Aktivität nach Immunisierung mit BVDV-NS3-rekombinantem MVA

Virus-spezifische zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) spielen, wie Untersuchungen von zahlreichen Virusinfektionen zeigen, eine sehr wichtige Rolle bei der Immunabwehr viraler Infektionen (Byrne und Oldstone, 1984; Ada und Jones, 1986; Reddehase *et al.*, 1988).

Untersuchungen von BDV, CSFV sowie BVDV haben bereits den Nachweis für das Vorkommen zytotoxischer Zellen im Rahmen der Immunantwort gegen diese Infektionen

erbracht (Woldehiwet *et al.*, 1994; Pauly *et al.*, 1995; Beer, 1995). Für das CSF-Virus konnte zudem ein T-Zell-Epitop für CTLs in der Nähe der Spaltungsstelle von NS3 und NS4a detektiert werden (Pauly *et al.*, 1995). Ebenso konnten für das Hepatitis C-Virus zwei CTL-Epitope innerhalb des NS3-Proteins identifiziert werden (Giuggio *et al.*, 1998). Die für die Generierung zytotoxischer Zellen entscheidenden Epitope der BVDV-Proteine konnten im Gegensatz dazu, wie bereits erwähnt, bisher nicht identifiziert werden. Allerdings lassen die Erkenntnisse, die über diese verwandten Viren vorliegen, die Vermutung zu, dass sich auch bei BVDV wichtige Epitope für die Generierung zytotoxischer Zellen innerhalb des NS3-Proteins befinden. Dies sollte in dieser Studie mit Hilfe des rekombinant exprimierten BVDV-NS3-Proteins überprüft werden.

Für die Generierung zytotoxischer-T-Zellen wurden die Lymphozyten aller Tiere *in vitro* mit BVD-Virus stimuliert. Eine BVDV-spezifische Zytotoxizität konnte bereits mit Hilfe von BVDV-infizierten ConA-Blasten als Zielzellen nachgewiesen werden (Beer *et al.*, 1995).

In der vorliegenden Arbeit wurden bovine, autologe Hodenzellen zur Überprüfung der *in vitro* Zytotoxizität verwendet, denn diese ließen sich, im Gegensatz zu ConA-Blasten (Beer *et al.*, 1995), bis zu 100 % mit BVDV infizieren und konnten somit über ihre MHC-I-Moleküle sehr effektiv BVD-Virusantigen präsentieren. Ein weiterer Vorteil der Hodenzellen im Gegensatz zu ConA-Blasten ist, dass Gewebezellen zumeist nur MHC-I-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren. Somit stellen Hodenzellen für zytotoxische Zellen, die ihr spezifisches Antigen nur MHC-I gebunden erkennen, geeignete *Targets* dar. Zudem liegen Untersuchungen über eine BDV-induzierte Zytotoxizität vor, bei denen sich Hodenzellen bereits als geeignete Zielzellen erwiesen haben (Woldehiwet und Hussin, 1994).

Vor der Testinfektion mit BVDV-PT810 zeigten bereits vier der sechs mit rekombinantem BVDV-NS3-MVA immunisierten Tiere eine spezifische Zytotoxizität von über 5 % bei einem Effektor-Zielzellverhältnis von 10:1. Im Gegensatz dazu war bei keinem Tier der Kontrollgruppe eine spezifische Zytotoxizität von über 0,6 % nachweisbar. Der Unterschied in der prozentualen Lyse vor der Testinfektion zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe war höchst signifikant (t-Test [E:T:10:1]; $p = 0,017$ nach der zweiten Immunisierung und $p = 0,002$ nach der dritten Immunisierung [E:T:10:1]).

21 Tage nach der Testinfektion ließ sich bei einem Rind aus der Versuchsgruppe die höchste im Rahmen dieser Arbeit gemessene spezifische Zytotoxizität von 31,3 % bei einem Effektor-Zielzellverhältnis von 2:1 ermitteln. Auch die Kontrolltiere reagierten nach der Testinfektion signifikant mit niedrigen Werten (0,3-3,5 % Lyse bei E:T 10:1) im Vergleich zu allen Testen der Kontrolltiere vor der Infektion (-3,0-0,3 % Lyse bei E:T 10:1).

Die vorliegenden Ergebnisse sprechen deutlich für eine Induktion zytotoxischer Zellen durch das rekombinant exprimierte BVDV-NS3-Protein.

Die von Beer (1995) nachgewiesenen BVDV-spezifischen Zytotoxizitätswerte restimulierter Lymphozyten waren zum Teil höher, sind aber nicht vergleichbar, da andere Zielzellen (ConA-Blasten) und andere Immunisierungsprotokolle verwendet wurden. Eine zelllytische Aktivität von Natürlichen Killerzellen (NK) kann nahezu ausgeschlossen werden, da die Aktivität von der spezifischen Immunisierung abhängig war und Antikörper (durch Aufreinigung der Zellen) im Zytotoxizitätstest nicht zugegen waren. Auch eine Beteiligung des Komplementsystems bei der nachgewiesenen zytotoxischen Reaktion ist eher unwahrscheinlich, da das Komplementsystem aus vielen Plasmaproteinen besteht und das Plasma bei der Zentrifugation über den Dichtegradienten von den Lymphozyten abgetrennt wurde.

Campos und Mitarbeiter beschreiben bereits 1982 das Fehlen der Aktivität von Natürlichen Killerzellen gegenüber BVDV-infizierten Zellen. Somit kann eine Reaktion dieses Zelltyps bei der in dieser Arbeit nachgewiesenen zytotoxischen Reaktion und auch bei der von Beer (1995) nachgewiesenen Zytotoxizität nahe zu ausgeschlossen werden.

Die im Vergleich zu den Werten nach der Testinfektion niedrigen Werte nach den Immunisierungen sprechen dafür, dass das BVDV vermutlich zusätzliche Epitope für CTLs besitzt, die nicht innerhalb des NS3-Proteins liegen. Für das Hepatitis C-Virus beispielsweise wurde ein zusätzliches Epitop innerhalb des NS2-Proteins nachgewiesen (Giuggio *et al.*, 1998). Das Fehlen dieser zusätzlichen Epitope bei der Immunisierung könnte ein weiterer Grund dafür sein, dass nur eine relativ niedrige Zytotoxizität im Vergleich zu anderen Untersuchungen (Beer, 1995) nachgewiesen werden konnte.

Der signifikante Unterschied in der spezifischen Lyse zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe vor der Testinfektion belegt eine Induktion einer BVDV-spezifischen Zytotoxizität durch das rekombinant exprimierte BVDV-NS3-Protein. Insbesondere konnte durch die Verwendung von autologen Hodenzellen als Zielzellen ein deutlicher Hinweis auf eine MHC-I-restringierte Zytotoxizität gewonnen werden. Die vorliegenden Ergebnisse für das Rind bestätigen die von Reddy *et al.* 1999 mit Hilfe von rekombinantem BVDV-NS3-SFV-Virus in Mäusen induzierte starke zelluläre Immunantwort, die durch zytotoxische Zellen vermittelt wurde.

5.4.1. Zytokinprofil nach Immunisierung mit rekombinantem BVDV-NS3-MVA und nachfolgender BVDV-Infektion

Bei Vergleich der Zytokinproduktion der Lymphozyten der Versuchs- und Kontrolltiere nach den Immunisierungen und nach der Testinfektion mit BVDV ließen sich nach Restimulation der Lymphozyten mit BVDV-PT810 ebenfalls Hinweise auf eine Induktion einer Immunantwort durch das rekombinant exprimierte BVDV-NS3-Protein gewinnen.

Die Blutlymphozyten der Kälber der Versuchsgruppe wiesen nach drei Immunisierungen mit rekombinantem NS3 sowohl eine höhere IL-2- (12,17-fach [Mittelwert im Vergleich zur Mockkontrolle]) als auch IL-4- (7,69-fach [Mittelwert im Vergleich zur Mockkontrolle]) Produktion nach Stimulation mit BVDV-PT810 im Vergleich zur Kontrollgruppe (IL-2: 0,75-fach und IL-4: 1,0-fach [jeweils Mittelwerte im Vergleich zur Mockkontrolle]) auf. Diese Ergebnisse waren signifikant, da sich bei zweiseitiger Betrachtung der Werte im t-Test nach Student für das IL-2 ein Wert von $p = 0,047$ und für das IL-4 ein Wert von $p = 0,020$ ergab.

So genannte Zytokinprofile lassen eine Schlussfolgerung auf die Art der induzierten Immunantwort zu. IL-4, das vorwiegend von T_H2 -Zellen produziert wird, gilt als B-Zellwachstumsfaktor (Janeway und Travers, 1997). Es gibt somit einen Hinweis auf die Induktion einer T_H2 -Antwort nach der Immunisierung mit rekombinantem BVDV-NS3-MVA. Mit Hilfe des IL-2 können dagegen keine Rückschlüsse auf die Art der induzierten Immunantwort getroffen werden, da es von den meisten T-Zellen gebildet wird. Die Ergebnisse für dieses Zytokin sind sehr vorsichtig zu interpretieren. Allerdings gibt ein vermehrtes Vorkommen von IL-2 einen guten Hinweis auf Aktivierungsvorgänge.

Die nachgewiesene vermehrte Produktion beider Interleukine bereits vor der Testinfektion lässt die Vermutung zu, dass es durch das rekombinant exprimierte NS3-Protein zu einer Aktivierung verschiedener Immunzellen der Versuchstiere kam. Die erhöhte IL-4-Produktion legt die Vermutung für das Vorliegen geprimter T_H2 -Zellen nahe, so dass die verstärkte NS3- und E2-Antikörperbildung nach der Testinfektion innerhalb der Versuchsgruppe erklärbar werden (siehe 5.2.).

Nach der Testinfektion reagierten die Lymphozyten der Versuchstiere auf den Zusatz von BVDV-PT810 insbesondere mit einem Anstieg der IL-4-Produktion. Der Unterschied in Bezug auf die IL-4-Produktion war wiederum bei Vergleich der beiden Tiergruppen signifikant, da der t-Test nach Student bei zweiseitiger Betrachtung Werte von $p = 0,028$ ergab. Die Werte für das IL-2 stiegen bei beiden Tiergruppen an. Hier war jedoch

insbesondere ein Anstieg bei der Kontrollgruppe von 1 auf 5,9 zu beobachten. Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen bestand nicht.

Die nachgewiesene verstärkte IL-4-Produktion bestätigt eine Untersuchung, im Rahmen derer ebenfalls die Zytokinprofile restimulierter Lymphozyten seropositiver Rinder untersucht wurden. In dieser Studie wurde in den Überständen kultivierter und mit BVDV-restimulierter CD4⁺-T-Zellen ebenfalls eine vermehrte Produktion von IL-4 nachgewiesen (Rhodes *et al.*, 1999).

Ein Zytokinmuster, das die CD4⁺-T-Zellantwort in Richtung der T_H2-Antwort antreibt, wurde auch für andere Virusinfektionen wie z.B. die Maserninfektion des Menschen (Griffin und Ward, 1993), beschrieben.

Die bei vier von sechs Tieren der Versuchsgruppe nach den Immunisierungen nachweisbare γ -IFN-Produktion der Lymphozyten bei Zusatz von Virus lässt darauf schließen, dass bereits vor der Testinfektion ebenfalls eine Tendenz in Richtung einer T_H1-bzw. CTL-Antwort vorlag, denn das γ -IFN wird vorwiegend von diesen beiden Immunzelltypen gebildet.

Studien von isolierten und *in vitro* mit BVDV-stimulierten CD8⁺-Zellen zeigten, dass diese vorwiegend IL-2 und γ -IFN bildeten (Rhodes *et al.*, 1999). Somit könnte die im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesene γ -IFN-Produktion auf eine BVDV-spezifische Reaktion von CD8⁺-Zellen zurückzuführen sein. Dies würde auch das Vorliegen von zytotoxischen T-Zellen bestätigen.

Eine durch ein rekombinant exprimiertes BVDV-NS3-Protein induzierte starke γ -IFN-Produktion konnte bereits nach Immunisierung von Mäusen mit rekombinantem NS3-Adenovirus mit Hilfe von *in vivo* mit BVDV-stimulierten Lymphozyten nachgewiesen werden (Elahi *et al.*, 1999a)

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Studie folgendes nachgewiesen:

1. Durch das rekombinant exprimierte BVDV-NS3 konnte vermutlich sowohl ein *Priming* von T_H2-Zellen als auch eine BVDV-spezifische zelluläre Immunantwort induziert werden.
2. Die Lymphozyten der mit BVDV-NS3-MVA immunisierten Tiere reagierten nach der dritten Immunisierung und nach der Testinfektion mit einer signifikant stärkeren BVDV-spezifischen Proliferation als die Tiere der Kontrollgruppe, was für die Induktion einer zellulären Immunantwort aufgrund des rekombinant exprimierten NS3 spricht.
3. Es konnte gezeigt werden, dass auch zytotoxische Zellen durch die Immunisierung induziert wurden. Dies war insbesondere vor der Testinfektion signifikant.
4. Die induzierte humorale und zelluläre Immunantwort konnte die Virämiedauer und das Ausmaß der Leukopenie nach der Testinfektion nicht signifikant beeinflussen. Tendenziell konnte jedoch ein gewisser Schutz induziert werden, denn die mittleren Virustiter waren bei den Tieren der Versuchsgruppe nur halb so hoch wie diejenigen der Kontrollgruppe. Krankheitssymptome nach der Testinfektion traten erwartungsgemäß weder bei den Versuchs-, noch bei den Kontrolltieren auf.

Die vorliegenden Ergebnisse aller Untersuchungen sprechen für das Vorkommen von Epitopen im BVDV-Nichtstrukturprotein 3, die die Induktion zellulärer Immunitätsmechanismen unterstützen. Dabei gibt es sowohl Hinweise auf CD4⁺- als auch CD8⁺-spezifische Epitope, die vermutlich eine wichtige Rolle bei der Auslösung der Immunantwort gegen eine BVDV-Infektion spielen. Es konnte gezeigt werden, dass die Immunisierung mit rekombinantem BVDV-NS3-MVA in der Lage war verschiedene Immunitätsmechanismen zu induzieren, die bei dem Aufbau einer protektiven Immunität gegen das BVDV, neben der E2-Antikörperbildung, eine wichtige Rolle zu spielen scheinen.

6. Zusammenfassung/Summary

In der vorliegenden Arbeit wurden die immunogenen Eigenschaften des Nichtstrukturproteins 3 (NS3) des Virus der Bovinen Virusdiarrhoe (BVDV) erstmals im natürlichen Wirt charakterisiert. Hierzu wurden sechs Kälber dreimal im Abstand von vier Wochen mit BVDV-NS3-rekombinanten modifiziertem Vacciniavirus Ankara (MVA) intramuskulär immunisiert ($>10^8$ infektiöse Einheiten). Vier Kälber, die mit LacZ-rekombinanten MVA ($>10^8$ infektiöse Einheiten) immunisiert wurden, bildeten die Kontrollgruppe. Fünf Wochen nach der letzten Immunisierung erfolgte eine Belastungsinfektion mit dem BVD-Virusisolat PT810 (10^6 kulturinfektiöse Dosen₅₀).

Für die Untersuchung der BVDV-spezifischen zellulären Immunitätsmechanismen wurden die Lymphozyten aller Tiere mit infektiösem BVDV-PT810 *in vitro* restimuliert und mit Hilfe verschiedener Testsysteme untersucht. Eine zytofluorometrische Nachweismethode (Fluoreszenzfarbstoff: Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester [CFSE]) diente der Detektion einer antigenspezifischen Lymphozytenproliferation. Die Aktivität BVDV-spezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten (CTL) gegen autologe, BVDV-infizierte Zielzellen wurde mit Durchflusszytometrie gemessen. Mit Hilfe einer *Real Time* PCR wurde die Interleukin-2 (IL-2) und 4 (IL-4) mRNA-Synthese untersucht. Ein kommerziell erhältlicher ELISA (Bovigam) diente dem Nachweis der γ -Interferon-Synthese. Über einen Zeitraum von 19 Tagen nach der intranasalen BVDV-Testinfektion wurden die Kälber täglich klinisch untersucht, die Gesamtleukozytenzahl im peripheren Blut bestimmt, quantitative BVDV-Isolierungen aus den Leukozyten durchgeführt und BVDV-spezifische Antikörper mit Serumneutralisationstesten gemessen.

Bereits vor der Belastungsinfektion ließ sich bei allen Kälbern, die mit BVDV-NS3-rekombinanten MVA immunisiert wurden, eine antigenspezifische Lymphozytentransformation nachweisen. Ebenso konnte bei vier Tieren der Versuchsgruppe (N = 6) nach der dritten Immunisierung eine deutliche BVDV-spezifische Zytotoxizität gegenüber autologen Hodenzellen detektiert werden. Nach der BVDV-Belastungsinfektion war die spezifische Zytotoxizität bei fünf der sechs BVDV-NS3-MVA-Impftiere höher als bei den Tieren der LacZ-Kontrolle.

Im Gegensatz zur Kontrollgruppe ließ sich bei der Versuchsgruppe nach der dritten Immunisierung ein deutlicher Anstieg der IL-2 und IL-4 mRNA-Syntheserate von *in vitro* mit BVDV-restimulierten Lymphozyten nachweisen. Bei fünf der sechs Kälber war zu diesem

Zeitpunkt auch γ -Interferon detektierbar. Der Nachweis von BVDV-neutralisierenden Antikörpern war vor der Testinfektion bei keinem Kalb möglich.

Nach der Testinfektion konnte ein spezifischer *Priming*-Effekt für alle immunologischen Parameter, einschließlich der Bildung BVDV-neutralisierender Antikörper, festgestellt werden. Erwartungsgemäß wurden bei beiden Tiergruppen keine Krankheitssymptome beobachtet. Das Ausmaß der Leukopenie infolge der Testinfektion war gleich. Dagegen war der semi-quantitativ bestimmte BVDV-Titer in Blutproben der Kontrollgruppe an den Tagen 3-13 nach der Infektion etwa doppelt so hoch (1,9-fach) wie bei der Versuchsgruppe ($p = 0,016$; signifikant). Im Mittel war bei der Versuchsgruppe an 6,7 Tagen und bei der Kontrollgruppe an 8,0 Tagen BVDV reisolierbar ($p = 0,121$; nicht signifikant). Neben den beachtlichen immunologischen Stimulationseffekten wurde die Reduktion der Viruslast als Hinweis für eine protektive Wirkung des BVDV-NS3 gewertet.

Investigation of the immunogenic properties of Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) nonstructural protein 3 (NS3) expressed by a Vaccinia Virus Vector in cattle

In this study, the immunogenic properties in cattle of nonstructural protein 3 (NS3) of bovine viral diarrhea virus (BVDV) were characterized for the first time. Six calves were immunized intramuscularly three times in four week intervals with a recombinant Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA; $>10^8$ infectious units) expressing BVDV-NS3. Four calves immunized with recombinant MVA expressing β -galactosidase ($>10^8$ infectious units) served as negative controls. All calves were challenged five weeks after the last immunization with an intranasal application of BVDV isolate PT810 (10^6 tissue culture infectious doses₅₀).

For the investigation of cell-mediated immunity against BVDV, lymphocytes of all animals were restimulated with infectious BVDV *in vitro* and subsequently examined using different test systems. Antigen-specific lymphocyte proliferation was tested by a cytofluorometric assay (Dye: carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester [CFSE]). The activity of BVDV-specific cytotoxic T-lymphocytes (CTL) versus autologous BVDV-infected target cells was measured by flow cytometry. With the help of a real time PCR assay, interleukin IL-2 and IL-4 mRNA synthesis in lymphocytes was determined. A commercially available ELISA (Bovigam) was used for the investigation of γ -interferon synthesis. In addition, clinical observations, leukocyte counts, a quantitative BVDV isolation out of the peripheral blood cells and a determination of BVDV neutralizing antibodies were performed on a daily basis for 19 days after BVDV challenge.

After vaccination with recombinant MVA expressing BVDV-NS3, a BVDV-specific lymphocyte transformation was observed in the absence of challenge infection. A BVDV-specific CTL reaction against autologous bovine testicle cells was induced by MVA expressing NS3 in four out of six calves after the third immunization. After challenge infection, CTL reactions of five of the six calves in the experimental group were stronger than in the negative control animals. Lymphocytes from calves immunized with the BVDV-NS3 recombinant MVA that were restimulated *in vitro* with BVDV reacted with an increased rate of IL-2 and IL-4 mRNA synthesis. Five of the six calves showed an *in vitro* γ -interferon production before challenge, while none of the animals in the control group did. BVDV-specific neutralizing antibodies could not be detected before challenge. After challenge infection, a priming effect induced by vaccination with the MVA recombinant expressing BVDV-NS3 could be observed with respect to all immunological parameters, including BVDV-specific neutralizing antibodies. As expected, no clinical signs were observed in either group. The induced immunity, however,

did not have any influence on leukopenia after challenge infection.. The virus titers in white blood cells in animals of the control group was approximately twice (1.9-fold) as high as those in the vaccinated group ($p = 0,016$; significant). Virus could be reisolated on 8,0 days in control animals and on 6,7 days in the vaccinated group ($p = 0,121$; not significant). The above results show that immunization with a recombinant MVA expressing BVDV-NS3 resulted in considerable priming of immune responses to BVDV infection and measurable reductions in viremia as an evidence for protection.

7. Literatur

- Ada, G.L. und Jones, P.D.**, 1986: The immune response to influenza infection. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, **128**, 1-54.
- Agnello, V., Abel, G., Elfahal, M., Knight, G.B. und Zhang, Q.X.**, 1999: Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 12766-12771.
- Algasinger, M.**, 1980: Verlauf der Antikörperbildung nach Erst- und Wiederimpfung mit dem attenuierten Vaccinia-Virus Stamm MVA. *Diss. Vet. Med., LMU-München*.
- Antoine, G., Scheiflinger, F., Dorner, F. und Falkner, F.G.**, 1998: The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses. *Virology*, **244**, 365-396.
- Avalos-Ramirez, R., Orlich, M., Thiel, H.J. und Becher, P.**, 2001: Evidence for the presence of two novel pestivirus species. *Virology*, **286**, 456-465.
- Becher, P., Meyers, G., Shannon, A.D. und Thiel, H.J.**, 1996: Cytopathogenicity of border disease virus is correlated with integration of cellular sequences into the viral genome. *J. Virol.*, **70**, 2992-2998.
- Becher, P., Orlich, M. und Thiel, H.J.**, 1998: Complete genomic sequence of border disease virus, a pestivirus from sheep. *J. Virol.*, **72**, 5165-5173.
- Becher, P., Orlich, M., König, M. und Thiel, H.J.**, 1999a: Nonhomologous RNA Recombination in bovine viral diarrhea virus: molecular characterization of a variety of subgenomic RNAs isolated during an outbreak of fatal mucosal disease. *J. Virol.*, **73**, 5646-5653.
- Becher, P., Orlich, M., Kosmidou, A., König, M., Baroth, M. und Thiel, H.J.**, 1999b: Genetic diversity of pestiviruses: identification of novel groups and implications for classification. *Virology*, **262**, 64-71.
- Becher, P., Thiel, H.J., Collins, M., Brownlie, J. und Orlich, M.**, 2002: Cellular sequences in pestivirus genomes encoding gamma-aminobutyric acid (A) receptor-associated protein and Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kilodaltons. *J. Virol.*, **76**, 13069-13076.
- Becher, P., Avalos, R.R., Orlich, M., Cedillo, R.S., König, M., Schweizer, M., Stalder, H., Schirrmeier, H. und Thiel, H.J.**, 2003: Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. *Virology*, **311**, 96-104.

- Beer, M.**, 1995: Nachweis spezifischer zellulärer Immunitätsmechanismen, insbesondere zytotoxischer T-Zellen, bei der Bovinen Virusdiarrhoe.
Diss. Vet. Med., LMU-München.
- Beer, M., Wolf, G., Wolfmeyer, A. und Kaaden, O.R.**, 1996: Immunfluoreszenz-Inhibitionstest mittels Durchflusszytometer für epitopspezifische Nachweise an BVDV infizierten Zellen.
22. Kongress der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, 453-459.
- Beer, M., Wolf, G., Pichler, J., Wolfmeyer, A. und Kaaden, O.R.**, 1997: Cytotoxic T-lymphocyte responses in cattle infected with bovine viral diarrhea virus.
Vet. Microbiol., **58**, 9-22.
- Beer, M.**, 2000a: Entwicklung und Prüfung einer Vektorvakzine gegen die Bovine Virusdiarrhoe/*Mucosal Disease*.
Habil., LMU-München.
- Beer, M., Hehnen, H.R., Wolfmeyer, A., Poll, G., Kaaden, O.R. und Wolf, G.**, 2000b: A new inactivated BVDV genotype I and II vaccine. An immunisation and challenge study with BVDV genotype I.
Vet. Microbiol., **77**, 195-208.
- Beer, M., Wolf, G. und Kaaden, O.R.**, 2002: Phylogenetic analysis of the 5'-untranslated region of german BVDV type II isolates.
J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health, **49**, 43-47.
- Behrens, S.E., Grassmann, C.W., Thiel, H.J., Meyers, G. und Tautz, N.**, 1998: Characterization of an autonomous subgenomic pestivirus RNA replicon.
J. Virol., **72**, 2364-2372.
- Bielefeldt, O.H. und Bloch, B.**, 1982: Electron microscopic studies of bovine viral diarrhea virus in tissues of diseased calves and in cell cultures.
Arch. Virol., **71**, 57-74.
- Bolin, S.R. und Ridpath, J.F.**, 1992: Differences in virulence between two noncytopathic bovine viral diarrhea viruses in calves.
Am. J. Vet. Res., **53**, 2157-2163
- Bolin, S.R.**, 1995a: Control of bovine viral diarrhea infection by use of vaccination.
Vet. Clin. North Am. Food Anim Pract., **11**, 615-625.
- Bolin, S.R.**, 1995b: The pathogenesis of mucosal disease.
Vet. Clin. North Am. Food Anim Pract., **11**, 489-500.
- Bolin, S.R. und Ridpath, J.F.**, 1995: Assessment of protection from systemic infection or disease afforded by low to intermediate titers of passively acquired neutralizing antibody against bovine viral diarrhea virus in calves.
Am. J. Vet. Res., **56**, 755-759.

- Bolin, S.R. und Ridpath, J.F.**, 1996: Glycoprotein E2 of bovine viral diarrhoea virus expressed in insect cells provides calves limited protection from systemic infection and disease.
Arch. Virol., **141**, 1463-1477.
- Boulanger, D., Waxweiler, S., Karelle, L., Loncar, M., Mignon, B., Dubuisson, J., Thiry, E. und Pastoret, P.P.**, 1991: Characterization of monoclonal antibodies to bovine viral diarrhoea virus: evidence of a neutralizing activity against gp48 in the presence of goat anti-mouse immunoglobulin serum.
J. Gen. Virol., **72**, 1195-1198.
- Bouma, A., de Smit, A.J., de Kluijver, E.P., Terpstra, C. und Moormann, R.J.**, 1999: Efficacy and stability of a subunit vaccine based on glycoprotein E2 of classical swine fever virus.
Vet. Microbiol., **66**, 101-114.
- Bouma, A., de Smit, A.J., de Jong, M.C., de Kluijver, E.P. und Moormann, R.J.**, 2000: Determination of the onset of the herd-immunity induced by the E2 sub-unit vaccine against classical swine fever virus.
Vaccine, **18**, 1374-1381.
- Branza-Nichita, N., Durantel, D., Carrouee-Durantel, S., Dwek, R.A. und Zitzmann, N.**, 2001: Antiviral effect of N-butyldeoxynojirimycin against bovine viral diarrhoea virus correlates with misfolding of E2 envelope proteins and impairment of their association into E1-E2 heterodimers.
J. Virol., **75**, 3527-3536.
- Branza-Nichita, N., Lazar, C., Durantel, D., Dwek, R.A. und Zitzmann, N.**, 2002: Role of disulfide bond formation in the folding and assembly of the envelope glycoproteins of a pestivirus.
Biochem. Biophys. Res. Commun., **296**, 470-476.
- Brinster, C., Chen, M., Boucreux, D., Paranhos-Baccala, G., Liljeström, P., Lemmonier, F. und Inchauspe, G.**, 2002: Hepatitis C virus non-structural protein 3 specific cellular immune responses following single or combined immunization with DNA or Semliki Forest virus particles.
J. Gen. Virol., **83**, 369-381.
- Brown, L.M., Papa, R.A., Frost, M.J., Mackintosh, S.G., Gu, X., Dixon, R.J. und Shannon, A.D.**, 2002: A single amino acid is critical for the expression of B-cell epitopes on the helicase domain of the pestivirus NS3 protein.
Virus Res., **84**, 111-124.
- Brownlie, J., Clarke, M.C. und Howard, C.J.**, 1984: Experimental production of fatal mucosal disease in cattle.
Vet. Rec., **114**, 535-536.
- Brownlie, J.**, 1990: Pathogenesis of mucosal disease and molecular aspects of bovine virus diarrhoea virus.
Vet. Microbiol., **23**, 371-382.

- Brownlie, J. und Clarke, M.C.**, 1993: Experimental and spontaneous mucosal disease of cattle: a validation of Koch's postulates in the definition of pathogenesis. *Intervirology*, **35**, 51-59.
- Brownlie, J., Clarke, M.C., Hooper, L.B. und Bell, G.D.**, 1995: Protection of the bovine fetus from bovine viral diarrhoea virus by means of a new inactivated vaccine. *Vet. Rec.*, **137**, 58-62.
- Brownlie, J., Hooper, L.B., Thompson, I. und Collins, M.E.**, 1998: Maternal recognition of foetal infection with bovine virus diarrhoea virus (BVDV) - the bovine pestivirus. *Clin. Diagn. Virol.*, **10**, 141-150.
- Bruschke, C.J., Moormann, R.J., van Oirschot, J.T. und van Rijn, P.A.**, 1997: A subunit vaccine based on glycoprotein E2 of bovine virus diarrhoea virus induces fetal protection in sheep against homologous challenge. *Vaccine*, **15**, 1940-1945.
- Bruschke, C.J., van Oirschot, J.T. und van Rijn, P.A.**, 1999: An experimental multivalent bovine virus diarrhoea virus E2 subunit vaccine and two experimental conventionally inactivated vaccines induce partial fetal protection in sheep. *Vaccine*, **17**, 1983-1991.
- Byrne, J.A. und Oldstone, M.B.A.**, 1984: Biology of cloned cytotoxic T-lymphocytes specific for lymphocytic choriomeningitis virus: Clearance of virus in vivo. *J. Virol.*, **51**, 682-686.
- Campos, M., Rossi, C.R. und Lawman, M.J.**, 1982: Natural cell-mediated cytotoxicity of bovine mononuclear cells against virus-infected cells. *Infect. Immun.*, **36**, 1054-1059.
- Carman, S., van-Dreumel, T., Ridpath, J., Hazlett, M., Alves, D., Dubovi, E., Tremblay, R., Bolin, S., Godkin, A. und Anderson, N.**, 1998: Severe acute bovine viral diarrhoea in Ontario, 1993-1995. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **10**, 27-35.
- Carroll, M.W. und Moss, B.**, 1997: Host range and cytopathogenicity of the highly attenuated MVA strain of vaccinia virus: propagation and generation of recombinant viruses in a nonhuman mammalian cell line. *Virology*, **238**, 198-211.
- Chambers, T.J., Hahn, C.S., Galler, R. und Rice, C.M.**, 1990: Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu. Rev. Microbiol.*, **44**, 649-688.
- Chapek, M.L., McClaughry, L.E. und Wilkins, L.M.**, 1978: Evaluation of a bovine virus diarrhoea vaccine. *Mod. Vet. Pract.*, **59**, 755-757.

- Charleston, B., Brackenbury, L.S., Carr, B.V., Fray, M.D., Hope, J.C., Howard, C.J. und Morrison, W.I.**, 2002: Alpha/beta and gamma interferons are induced by infection with noncytopathic bovine viral diarrhea virus in vivo. *J. Virol.*, **76**, 923-927.
- Chen, M., Sallberg, M., Sonnerborg, A., Weiland, O., Mattsson, L., Jin, L., Birkett, A., Peterson, D. und Milich, D.R.**, 1999: Limited humoral immunity in hepatitis C virus infection. *Gastroenterology*, **116**, 135-143.
- Chon, S.K., Perez, D.R. und Donis, R.O.**, 1998: Genetic analysis of the internal ribosome entry segment of bovine viral diarrhea virus. *Virology*, **251**, 370-382.
- Collen, T. und Morrison, W.I.**, 2000: CD4⁺ T-cell responses to bovine viral diarrhoea virus in cattle. *Virus Res.*, **67**, 67-80.
- Collett, M.S.**, 1987: Molecular genetics of Pestivirus. *Comp. Immun. Microbiol. infect. Dis.* **15**, 145-154.
- Collett, M.S., Anderson, D.K. und Retzel, E.**, 1988a: Comparisons of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus with members of the flaviviridae. *J. Gen. Virol.*, **69**, 2637-2643.
- Collett, M.S., Larson, R., Gold, C., Strick, D., Anderson, D.K. und Purchio, A.F.**, 1988b: Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhea virus. *Virology*, **165**, 191-199.
- Cortese, V.S., Grooms, D.L., Ellis, J., Bolin, S.R., Ridpath, J.F. und Brock, K.V.**, 1998: Protection of pregnant cattle and their fetuses against infection with bovine viral diarrhea virus type 1 by use of a modified-live virus vaccine. *Am. J. Vet. Res.*, **59**, 1409-1413.
- Cosma, A., Nagaraj, R., Buhler, S., Hinkula, J., Busch, D.H., Sutter, G., Goebel, F.D. und Erfle, V.**, 2003: Therapeutic vaccination with MVA-HIV-1 nef elicits Nef-specific T-helper cell responses in chronically HIV-1 infected individuals. *Vaccine*, **22**, 21-29.
- Couvreur, B., Letellier, C., Collard, A., Quenon, P., Dehan, P., Hamers, C., Pastoret, P.P. und Kerkhofs, P.**, 2002: Genetic and antigenic variability in bovine viral diarrhea virus (BVDV) isolates from Belgium. *Virus Res.*, **85**, 17-28.
- Czerny, C.P., Mahnel, H. und Hornstein, O.**, 1989: Prüfung der Immunität gegen Orthopockenviren an der weißen Maus mit Vacciniavirus. *J. Vet. Med. B*, **36**, 100-112.

- Czerny, C.P. und Mahnel, H.**, 1990: Structural and functional analysis of orthopoxvirus epitopes with neutralizing monoclonal antibodies.
J. Gen. Virol., **71**, 2341-2352.
- De Moerlooze, L., Desport, M., Renard, A., Lecomte, C., Brownlie, J. und Martial, J.A.**, 1990: The coding region for the 54-kDa protein of several pestiviruses lacks host insertions but reveals a "zinc finger-like" domain.
Virology, **177**, 812-815.
- Dean, H.J. und Leyh, R.**, 1999: Cross-protective efficacy of a bovine viral diarrhea virus (BVDV) type 1 vaccine against BVDV type 2 challenge.
Vaccine, **17**, 1117-1124.
- Dean, H.J., Hunsaker, B.D., Bailey, O.D. und Wasmoen, T.**, 2003: Prevention of persistent infection in calves by vaccination of dams with noncytopathic type-1 modified-live bovine viral diarrhea virus prior to breeding.
Am. J. Vet. Res., **64**, 530-537.
- Deng, R. und Brock, K.V.**, 1992: Molecular cloning and nucleotide sequence of a pestivirus genome, noncytopathic bovine viral diarrhea virus strain SD-1.
Virology, **191**, 867-869.
- Deregt, D., van Rijn, P.A., Wiens, T.Y. und van den Hurk, J.**, 1998: Monoclonal antibodies to the E2 protein of a new genotype (type 2) of bovine viral diarrhea virus define three antigenic domains involved in neutralization.
Virus Res., **57**, 171-181.
- Diepolder, H.M., Zachoval, R., Hoffmann, R.M., Wierenga, E.A., Santantonio, T., Jung, M.C., Eichenlaub, D. und Pape, G.R.**, 1995: Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection.
Lancet, **346**, 1006-1007.
- Diepolder, H.M., Gerlach, J.T., Zachoval, R., Hoffmann, R.M., Jung, M.C., Wierenga, E.A., Scholz, S., Santantonio, T., Houghton, M., Southwood, S., Sette, A. und Pape, G.R.**, 1997: Immunodominant CD4⁺ T-cell epitope within nonstructural protein 3 in acute hepatitis C virus infection.
J. Virol., **71**, 6011-6019.
- Donis, R.O.**, 1987: The proteins of bovine viral diarrhea virus: characterization, biotype-specific differences, and immunological properties.
Diss. Vet. Med., Cornell
- Donis, R.O. und Dubovi, E.J.**, 1987a: Characterization of bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus-specific proteins in bovine cells.
J. Gen. Virol., **68**, 1597-1605.
- Donis, R.O. und Dubovi, E.J.**, 1987b: Differences in virus-induced polypeptides in cells infected by cytopathic and noncytopathic biotypes of bovine virus diarrhoea-mucosal disease virus.
Virology, **158**, 168-173.

- Donis, R.O. und Dubovi, E.J.**, 1987c: Glycoproteins of bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus in infected bovine cells.
J. Gen. Virol., **68**, 1607-1616.
- Donis, R.O. und Dubovi, E.J.**, 1987d: Molecular specificity of the antibody responses of cattle naturally and experimentally infected with cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhea virus biotypes.
Am. J. Vet. Res., **48**, 1549-1554.
- Donis, R.O., Corapi, W. und Dubovi, E.J.**, 1988: Neutralizing monoclonal antibodies to bovine viral diarrhoea virus bind to the 56K to 58K glycoprotein.
J. Gen. Virol., **69**, 77-86.
- Donis, R.O., Corapi, W.V. und Dubovi, E.J.**, 1991: Bovine viral diarrhea virus proteins and their antigenic analyses.
Arch. Virol. Suppl., **3**, 29-40.
- Donis, R.O.**, 1995: Molecular biology of bovine viral diarrhea virus and its interactions with the host.
Vet. Clin. North Am. Food Anim Pract., **11**, 393-423.
- Drexler, I., Heller, K., Wahren, B., Erfle, V. und Sutter, G.**, 1998: Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara replicates in baby hamster kidney cells, a potential host for virus propagation, but not in various human transformed and primary cells.
J. Gen. Virol., **79**, 347-352.
- Earl, P.L., Wyatt, L.S., Montefiori, D.C., Bilska, M., Woodward, R., Markham, P.D., Malley, J.D., Vogel, T.U., Allen, T.M., Watkins, D.I., Miller, N. und Moss, B.**, 2002: Comparison of vaccine strategies using recombinant env-gag-pol MVA with or without an oligomeric Env protein boost in the SHIV rhesus macaque model.
Virology, **294**, 270-281.
- Elahi, S.M., Shen, S.H., Harpin, S., Talbot, B.G. und Elazhary, Y.**, 1999a: Investigation of the immunological properties of the bovine viral diarrhea virus protein NS3 expressed by an adenovirus vector in mice.
Arch. Virol., **144**, 1057-1070.
- Elahi, S.M., Shen, S.H., Talbot, B.G., Massie, B., Harpin, S. und Elazhary, Y.**, 1999b: Induction of humoral and cellular immune responses against the nucleocapsid of bovine viral diarrhea virus by an adenovirus vector with an inducible promoter.
Virology, **261**, 1-7.
- Elahi, S.M., Shen, S.H., Talbot, B.G., Massie, B., Harpin, S. und Elazhary, Y.**, 1999c: Recombinant adenoviruses expressing the E2 protein of bovine viral diarrhea virus induce humoral and cellular immune responses.
FEMS Microbiol. Lett., **177**, 159-166.
- Elbers, K., Tautz, N., Becher, P., Stoll, D., Rümenapf, T. und Thiel, H.J.**, 1996: Processing in the pestivirus E2-NS2 region: identification of proteins p7 and E2p7.
J. Virol., **70**, 4131-4135.

- Ellis, J.A., Davis, W.C., Belden, E.L. und Pratt, D.L.,** 1988: Flow cytofluorimetric analysis of lymphocyte subset alterations in cattle infected with bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Pathol.* **25**, 231-236.
- Ellis, S.A., Staines, K. A., Stear, M.J., Hensen, E.J. und Morrison, W.I.,** 1998. DNA typing for BoLA class I using sequence-specific primers (PCR-SSP). *European Journal of Immunogenetics*, **25**, 365-370.
- Ellis, J., West, K., Cortese, V., Konoby, C. und Weigel, D.,** 2001: Effect of maternal antibodies on induction and persistence of vaccine-induced immune responses against bovine viral diarrhoea virus type II in young calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **219**, 351-356.
- Endsley, J.J., Roth, J.A., Ridpath, J. und Neill, J.,** 2003: Maternal antibody blocks humoral but not T cell responses to BVDV. *Biologicals*, **31**, 123-125.
- Erickson, A.L., Houhgton, M., Choo, Q.L., Weiner, A.J., Ralston, R., Muchmore, E. und Walker, C.M.,** 1993: Hepatitis C virus-specific CTL responses in the liver of chimpanzees with acute and chronic hepatitis C. *J. Immunol.*, **151**, 4189-4199.
- Failla, C., Tomei, L. und De Francesco, R.,** 1994: Both NS3 and NS4A are required for proteolytic processing of hepatitis C virus nonstructural proteins. *J. Virol.*, **68**, 3753-3760.
- Fairbanks, K., Schnackel, J. und Chase, C.C.,** 2003: Evaluation of a modified live virus type-1a bovine viral diarrhoea virus vaccine (Singer strain) against a type-2 (strain 890) challenge. *Vet. Ther.*, **4**, 24-34.
- Fernelius, A.L., Lambert, G. und Hemness, G.J.,** 1969: Bovine viral diarrhoea virus-host cell interactions: adaption and growth of virus in cell lines. *Am. J. Vet. Res.*, **30**, 1561-1572.
- Fernelius, A.L., Classick, L.G. und Smith, R.L.,** 1971: Evaluation of a soluble antigen vaccine prepared from bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus-infected cell cultures. *Am. J. Vet. Res.*, **32**, 1963-1979.
- Fletcher, S.P. und Jackson, R.J.,** 2002: Pestivirus internal ribosome entry site (IRES) structure and function: elements in the 5' untranslated region important for IRES function. *J. Virol.*, **76**, 5024-5033.
- Fletcher, S.R., Ali, I.K., Kaminski, A., Digard, P. und Jackson, R.J.,** 2002: The influence of viral coding sequences on pestivirus IRES activity reveals further parallels with translation initiation in prokaryotes. *RNA*, **8**, 1558-1571.

- Flores, E.F. und Donis, R.O.**, 1995: Isolation of a mutant MDBK cell line resistant to bovine viral diarrhoea virus infection due to a block in viral entry.
Virology, **208**, 565-575.
- Flores, E.F., Risatti, G.R. und Donis, R.O.**, 2002: Expression of the mouse Fc receptor B2 in bovine cells rescues the infectivity of conditionally neutralized bovine viral diarrhoea virus.
Vet. Microbiol., **85**, 99-109.
- Frey, H.R., Eicken, K., Grummer, B., Kenkies, S., Oguzoglu, T.C. und Moennig, V.**, 2002: Foetal protection against bovine virus diarrhoea virus after two-step vaccination.
J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health, **49**, 489-493.
- Fritzemeier, J., Greiser-Wilke, I., Haas, L., Pituco, E., Moennig, V. und Liess, B.**, 1995: Experimentally induced "late-onset" mucosal disease--characterization of the cytopathogenic viruses isolated.
Vet. Microbiol., **46**, 285-294.
- Fulton, R.W., Saliki, J.T., Confer, A.W., Burge, L.J., d'Offay, J.M., Helman, R.G., Bolin, S.R., Ridpath, J.F. und Payton, M.E.**, 2000: Bovine viral diarrhoea virus cytopathic and noncytopathic biotypes and type 1 and 2 genotypes in diagnostic laboratory accessions: clinical and necropsy samples from cattle.
J. Vet. Diagn. Invest., **12**, 33-38.
- Gillespie, J.H., Baker, J.A. und McEntee, K.**, 1960: A cytopathogenic strain of bovine virus diarrhoea virus.
Cornell Vet., **50**, 73-79.
- Giuggio, V. M., Bonkovsky, H. L., Smith, J. und Rothman, A.L.**, 1998: Inefficient Recognition of Viral Sequences by intrahepatic Hepatitis C Virus-Specific Cytotoxic T Lymphocytes in chronically Infected Subjects.
Virology, **251**, 132-140.
- Glaser, H.**, 1998: Untersuchungen zur Biologie einschliesslich Fremdgenexpression von rekombinantem MVA Virus in der Zellkultur und in Mäusen.
Diss. Vet. Med., LMU-München.
- Glew, E.J. und Howard, C.J.**, 2001: Antigen-presenting cells from calves persistently infected with bovine viral diarrhoea virus, a member of the Flaviviridae, are not compromised in their ability to present viral antigen.
J. Gen. Virol., **82**, 1677-1685.
- Glew, E.J., Carr, B.V., Brackenbury, L.S., Hope, J.C., Charleston, B. und Howard, C.J.**, 2003: Differential effects of bovine viral diarrhoea virus on monocytes and dendritic cells.
J. Gen. Virol., **84**, 1771-1780.

- Gong, Y., Trowbridge, R., Macnaughton, T.B., Westaway, E.G., Shannon, A.D. und Gowans, E.J.**, 1996: Characterization of RNA synthesis during a one-step growth curve and of the replication mechanism of bovine viral diarrhoea virus.
J. Gen. Virol., **77**, 2729-2736.
- Grassmann, C.W., Isken, O. und Behrens, S.E.**, 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**, 9196-9205.
- Gray, E.W. und Nettleton, P.F.**, 1987: The ultrastructure of cell cultures infected with border disease and bovine virus diarrhoea viruses.
J. Gen. Virol., **68**, 2339-2346.
- Greiser-Wilke, I., Haas, L., Dittmar, K., Liess, B. und Moennig, V.**, 1993: RNA insertions and gene duplications in the nonstructural protein p125 region of pestivirus strains and isolates in vitro and in vivo.
Virology, **193**, 977-980.
- Griffin, D.E. und Ward, B.J.**, 1993: Differential CD4 T cell activation in measles.
J. of infectious Diseases, **168**, 275-281.
- Gu, B., Liu, C., Lin-Goerke, J., Maley, D.R., Gutshall, L.L., Feltenberger, C.A. und Del Vecchio, A.M.**, 2000: The RNA helicase and nucleotide triphosphatase activities of the bovine viral diarrhoea virus NS3 protein are essential for viral replication.
J. Virol., **74**, 1794-1800.
- Hamers, C., Couvreur, B., Dehan, P., Letellier, C., Fischer, L., Brun, A.J., Lewalle, P., Michaux, C., Pastoret, P.P. und Kerkhofs, P.**, 2003: Assessment of the clinical and virological protection provided by a commercial inactivated bovine viral diarrhoea virus genotype 1 vaccine against a BVDV genotype 2 challenge.
Vet. Rec., **153**, 236-240.
- Hanke, T., Blanchard, T.J., Schneider, J., Hannan, C.M., Becker, M., Gilbert, S.C., Hill, A.V., Smith, G.L. und McMichael, A.**, 1998: Enhancement of MHC class I-restricted peptide-specific T cell induction by a DNA prime/MVA boost vaccination regime.
Vaccine, **16**, 439-445.
- Hanke, T. und McMichael, A.**, 1999: Pre-clinical development of a multi-CTL epitope-based DNA prime MVA boost vaccine for AIDS.
Immunol. Lett., **66**, 177-181.
- Hanke, T., McMichael, A.J., Samuel, R.V., Powell, L.A., McLoughlin, L., Crome, S.J. und Edlin, A.**, 2002: Lack of toxicity and persistence in the mouse associated with administration of candidate DNA- and modified vaccinia virus Ankara (MVA)-based HIV vaccines for Kenya.
Vaccine, **21**, 108-114.

- Harada, T., Tautz, N. und Thiel, H.J.**, 2000: E2-p7 region of the bovine viral diarrhea virus polyprotein: processing and functional studies.
J. Virol., **74**, 9498-9506.
- Haralambiev, H., Tsvetkov, P., Nikolov, A. und Gaytandgieva, R.**, 1975: Immunization against mucosal disease-bovine viral Diarrhea (MD-BVD) in calves applying lapinized vaccine against swine fever and a modified live virus of MD-BVD.
Arch. Exp. Veterinärmed., **29**, 701-704.
- Harasawa, R.**, 1996: Phylogenetic analysis of pestivirus based on the 5'-untranslated region.
Acta Virol., **40**, 49-54.
- Harasawa, R. und Giangaspero, M.**, 1998: A novel method for pestivirus genotyping based on palindromic nucleotide substitutions in the 5'-untranslated region.
J. Virol. Methods, **70**, 225-230.
- Harasawa, R., Giangaspero, M., Ibata, G. und Paton, D.J.**, 2000: Giraffe strain of pestivirus: its taxonomic status based on the 5'-untranslated region.
Microbiol. Immunol., **44**, 915-921.
- Harpin, S., Talbot, B., Mbikay, M. und Elazhary, Y.**, 1997: Immune response to vaccination with DNA encoding the bovine viral diarrhea virus major glycoprotein gp53 (E2).
FEMS Microbiol. Lett., **146**, 229-234.
- Harpin, S., Hurley, D.J., Mbikay, M., Talbot, B. und Elazhary, Y.**, 1999: Vaccination of cattle with a DNA plasmid encoding the bovine viral diarrhoea virus major glycoprotein E2.
J. Gen. Virol., **80**, 3137-3144.
- Hasbold, J., Gett, A.V., Rush, J.S., Deenick, E., Avery, D., Jun, J. und Hodgkin, P.D.**, 1999: Quantitative analysis of lymphocyte differentiation and proliferation *in vitro* using carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester.
Immunology and Cell Biology, **77**, 516-522.
- Herrlich, A. und Mayr, A.**, 1957: Pockenimpfstoff aus Zungengewebekulturen vom Rind.
Arch. f. Virusforsch., **7**, 284-296.
- Hochstein-Mintzel, V., Huber, H.C. und Stickl, H.**, 1972: Virulenz und Immunogenität eines modifizierten Vaccinia-Virus (Stamm MVA).
Z. Immunitätsforsch. Exp. Klin. Immunol., **144**, 104-156.
- Hochstein-Mintzel, V., Hanichen, T., Huber, H.C. und Stickl, H.**, 1975: Vaccinia- und variolaprotektive Wirkung des modifizierten Vaccinia-Stammes MVA bei intramuskulärer Immunisierung.
Zentralbl. Bakteriolog. A., **230**, 283-297.
- Hoff, H.S. und Donis, R.O.**, 1997: Induction of apoptosis and cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase by cytopathic bovine viral diarrhea virus infection.
Virus Res., **49**, 101-113.

- Hoffmann, M.**, 1999: Risikoabschätzung für den Einsatz der BVD-Lebendvakzine Oregon C24V nach vorheriger Applikation einer Vakzine aus inaktiviertem BVD-Virus: Laborinfektion und Feldversuch an Rindern. Diss. Vet. Med., LMU-München.
- Hooper, L. Clarke, M. und Brownlie, J.**, 1992: Lymphocyte proliferation in response to bovine viral-diarrhea virus antigen. Proceedings of Second Symposium on Pestiviruses, 1-3 October 1992.
- Hornemann, S., Harlin, O., Staib, C., Kisling, S., Erfle, V., Kaspers, B., Hacker, G. und 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**, 8394-8407.
- Houe, H.**, 1995: Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim Pract.*, **11**, 521-547.
- Howard, C.J., Clarke, M.C. und Brownlie, J.**, 1989: Protection against respiratory infection with bovine virus diarrhoea virus by passively acquired antibody. *Vet. Microbiol.*, **19**, 195-203.
- Howard, C.J.**, 1990: Immunological responses to bovine virus diarrhoea virus infections. *Rev. Sci. Tech.*, **9**, 95-103.
- Howard, C.J., Clarke, M.C., Sopp, P. und Brownlie, J.**, 1992: Immunity to bovine virus diarrhoea virus in calves: the role of different T-cell subpopulations analysed by specific depletion in vivo with monoclonal antibodies. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **32**, 303-314.
- Howard, C.J., Clarke, M.C., Sopp, P. und Brownlie, J.**, 1994: Systemic vaccination with inactivated bovine virus diarrhoea virus protects against respiratory challenge. *Vet. Microbiol.*, **42**, 171-179.
- Hulst, M.M., Westra, D.F., Wensvoort, G. und Moormann, R.J.**, 1993: Glycoprotein E1 of hog cholera virus expressed in insect cells protects swine from hog cholera. *J. Virol.*, **67**, 5435-5442.
- Hulst, M.M., Himes, G., Newbiggin, E. und Moormann, R.J.**, 1994: Glycoprotein E2 of classical swine fever virus: expression in insect cells and identification as a ribonuclease. *Virology*, **200**, 558-565.
- Hulst, M. M. und Moormann R. J.**, 1997: Inhibition of pestivirus infection in cell culture by enveloped proteins E(rns) and E2 of classical swine fever virus: E (rns) and E2 interact with different receptors. *J. Gen. Virol.*, **78**, 2779-2787.
- Iqbal, M., Poole, E., Goodbourn, S. und McCauley, J.W.**, 2004: Role for bovine viral diarrhoea virus Erns glycoprotein in the control of activation of beta interferon by double-stranded RNA. *J. Virol.*, **78**, 136-145.

- Janeway, C.A. und Travers, P.**, 1997: Immunologie; 2. Auflage, Spektrum Lehrbuch, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.
- Johnson, C.M., Perez, D.R., French, R., Merrick, W.C. und Donis, R.O.**, 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.
- Jordan, R., Nikolaeva, O.V., Wang, L., Conyers, B., Mehta, A., Dwek, R.A. und Block, T.M.**, 2002: Inhibition of host ER glucosidase activity prevents Golgi processing of virion-associated bovine viral diarrhoea virus E2 glycoproteins and reduces infectivity of secreted virions.
Virology, **295**, 10-19.
- Kamrud, K.I., Hooper, J.W., Elgh, F. und Schmaljohn, C.S.**, 1999: Comparison of the protective efficacy of naked DNA, DNA-based Sindbis replicon, and packaged Sindbis replicon vectors expressing Hantavirus structural genes in hamsters.
Virology, **263**, 209-219.
- Kamstrup, S., Ronsholt, L., Jensen, M.H. und Dalsgaard, K.**, 1992: A novel subunit ISCOM vaccine against bovine virus diarrhoea virus.
Rev. Sci. Tech., **11**, 873-877.
- Kamstrup, S., Roensholt, L., Jensen, M.H. und Dalsgaard, K.**, 1999: Production of a highly immunogenic subunit ISCOM vaccine against Bovine Viral Diarrhoea Virus.
Vaccine, **17**, 1057-1064.
- Kimman, T.G., Bianchi, A.T., Wensvoort, G., de-Bruin, T.G. und Meliefste, C.**, 1993: Cellular immune response to hog cholera virus (HCV): T cells of immune pigs proliferate in vitro upon stimulation with live HCV, but the E1 envelope glycoprotein is not a major T-cell antigen.
J. Virol., **67**, 2922-2927.
- Klemm, M.**, 2001: Das Strukturprotein Kapsid und die Nichtstrukturproteine Npro, p7, NS2 und NS3 des Virus der Bovinen Virusdiarrhoe/*Mucosal Disease* (BVDV): Expression und Charakterisierung mit Hilfe eines prokaryonten Expressionssystems und rekombinanter viraler Vektoren.
Diss. Vet. Med., LMU-München.
- König, M., Lengsfeld, T., Pauly, T., Stark, R. und Thiel, H.J.**, 1995: Classical swine fever virus: independent induction of protective immunity by two structural glycoproteins.
J. Virol., **69**, 6479-6486.
- Kreienbrock, L. und Schach, S.**, 2000: Epidemiologische Methoden, 3.Aufl., Heidelberg; Berlin: Spektrum, Akademischer Verlag GmbH.
- Kühne, S.**, 2000: Die Strukturregion (Kapsid, E^{ms}, E1 und E2) des Virus der Bovinen Virusdiarrhoe (BVDV): Expression und Immunisierung mit rekombinanten Sindbisvirus- und cDNA-Vektoren.
Diss. Vet. Med., LMU-München.

- Kümmerer, B.M. und Meyers, G.,** 2000: Correlation between point mutations in NS2 and the viability and cytopathogenicity of Bovine viral diarrhoea virus strain Oregon analyzed with an infectious cDNA clone.
J. Virol., **74**, 390-400.
- Kümmerer, B.M., Tautz, N., Becher, P., Thiel, H. und Meyers, G.,** 2000: The genetic basis for cytopathogenicity of pestiviruses.
Vet. Microbiol., **77**, 117-128.
- Kurokohchi, K., Akatsuka, T., Pendleton, C.D., Takamizawa, A., Nishioka, M., Battegay, M., Feinstone, S.M. und Berzofsky, J.A.,** 1996: Use of a recombinant protein to identify a motif-negative human cytotoxic T-cell epitope presented by HLA-A2 in the Hepatitis C virus NS3 region.
J. Virol., **70**, 232-240.
- Kweon, C.H., Kang, S.W., Choi, E.J. und Kang, Y.B.,** 1999: Bovine herpes virus expressing envelope protein (E2) of bovine viral diarrhoea virus as a vaccine candidate.
J. Vet. Med. Sci., **61**, 395-401.
- Lambot, M., Douart, A., Joris, E., Letesson, J.J. und Pastoret, P.P.,** 1997: Characterization of the immune response of cattle against non-cytopathic and cytopathic biotypes of bovine viral diarrhoea virus.
J. Gen. Virol., **78**, 1041-1047.
- Lambot, M., Hanon, E., Lecomte, C., Hamers, C., Letesson, J.J. und Pastoret, P.P.,** 1998: Bovine viral diarrhoea virus induces apoptosis in blood mononuclear cells by a mechanism largely dependent on monocytes.
J. Gen. Virol., **79**, 1745-1749.
- Langedijk, J.P.; van Veelen, P.A.; Schaaper, W.M.; de Ru, A.H.; Meloen, R.H. und Hulst, M.M.,** 2002: A structural model of pestivirus E(rns) based on disulfide bond connectivity and homology modeling reveals an extremely rare vicinal disulfide.
J. Virol., **76**, 10383-10392.
- Larsson, B. und Fossum, C.,** 1992: Bovine virus diarrhoea virus induces in vitro a proliferative response of peripheral blood mononuclear cells from cattle immunized by infection.
Vet. Microbiol., **31**, 317-325.
- Lazdina, U., Hultgren, C., Frelin, L., Chen, M., Lodin, K., Weiland, O., Leroux-Roels, G., Quiroga, J. A., Peterson, D. L., Milich, D. R. und Sällberg, M.,** 2001: Humoral and CD4⁺ T helper (Th) cell responses to the hepatitis C virus non-structural 3 (NS3) protein: NS3 primes Th1-like responses more effectively as a DNA-based immunogen than as a recombinant protein.
J. Gen. Virol., **82**, 1299-1308.
- Le, S.Y., Liu, W.M. und Maizel, J.V., Jr.,** 1998: Phylogenetic evidence for the improved RNA higher-order structure in internal ribosome entry sequences of HCV and pestiviruses.
Virus Genes, **17**, 279-295.

- Lecomte, C., Vandenberg, D., Vanderheijden, N., De Moerlooze, L., Pin, J.J., Chappuis, G., Desmettre, P. und Renard, A.,** 1991: Identification and production of pestivirus proteins for diagnostic and vaccination purposes. *Arch. Virol. Suppl.*, **3**, 149-156.
- Liang, D., Sainz, I.F., Ansari, I.H., Gil, L.H., Vassilev, V. und Donis, R.O.,** 2003: The envelope glycoprotein E2 is a determinant of cell culture tropism in ruminant pestiviruses. *J. Gen. Virol.*, **84**, 1269-1274.
- Liebler, E.M., Kusters, C. und Pohlenz, J.F.,** 1996: Experimental mucosal disease in cattle: changes in the number of lymphocytes and plasma cells in the mucosa of the small and large intestine. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **55**, 93-105.
- Liess, B., Frey, H.R., Orban, S. und Hafez, S.M.,** 1983: Bovine virus diarrhoea (BVD)-mucosal disease: persistent BVD field infections in serologically selected cattle. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.*, **90**, 261-266.
- Liess, B., Orban, S., Frey, H.R., Trautwein, G., Wiefel, W. und Blindow, H.,** 1984: Studies on transplacental transmissibility of a bovine virus diarrhoea (BVD) vaccine virus in cattle. II. Inoculation of pregnant cows without detectable neutralizing antibodies to BVD virus 90-229 days before parturition (51st to 190th day of gestation). *Zentralbl. Veterinarmed. B.*, **31**, 669-681.
- Liess, B.,** 1985: Importance of immune tolerance for the pathogenesis of bovine virus diarrhoea. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.*, **98**, 420-423.
- Liess, B., Orban, S., Frey, H.R. und Trautwein, G.,** 1987: Consequences of transplacental transmission of bovine diarrhoea virus on bovine fetuses. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.*, **94**, 585-587.
- Lindenbach, B.D. und Rice, C.M.,** 2001: Flaviviridae: The Viruses and their Replication. In: *Fields virology*, Fourth Edition; Chapter **32**, 991-1125, Lippincott-Raven publishers, Philadelphia, Pa..
- Lobigs, M.; Arthur, C.E.; Müllbacher, A. und Blanden, R.V.,** 1994: The flavivirus nonstructural protein NS3 is a dominant source of cytotoxic T cell peptide determinants. *Virology*, **202**, 195-201.
- Lobmann, M., Charlier, P., Klaassen, C.L. und Zygraich, N.,** 1986: Safety of a temperature-sensitive vaccine strain of bovine viral diarrhoea virus in pregnant cows. *Am. J. Vet. Res.*, **47**, 557-560.
- Löcherbach, A.,** 2001: Untersuchungen zur zellulären Immunität gegen das canine Parvovirus. *Diss. Vet. Med., LMU-München.*

- Loehr, B.I., Frey, H.R., Moennig, V. und Greiser, W.I.,** 1998: Experimental induction of mucosal disease: consequences of superinfection of persistently infected cattle with different strains of cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus. *Arch. Virol.*, **143**, 667-679.
- Lyons, A.J. und Robertson, H.D.,** 2003: Detection of tRNA-like structure through RNase P cleavage of viral internal ribosome entry site RNAs near the AUG start triplet. *J. Biol. Chem.*, **278**, 26844-26850.
- Mahnel, H.,** 1985: Schutzimpfung gegen Mäusepocken. *Tierärztl. Prax.*, **13**, 403-407.
- Mahnel, H. und Mayr, A.,** 1994: Erfahrungen bei der Schutzimpfung gegen Orthopocken von Mensch und Tier mit dem Impfstamm MVA. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.*, **107**, 253-256.
- Marshall, D.J., Moxley, R.A. und Kelling, C.L.,** 1998: Severe disease following experimental exposure of calves to noncytopathic bovine viral diarrhoea virus isolate New-York-1. *Aust. Vet. J.*, **76**, 428-430.
- Matsuno, S., Inouye, S. und Kono, R.,** 1977: Plaque assay of neonatal calf diarrhoea virus and the neutralizing antibody in human sera. *J. Clin. Microbiol.*, **5**, 1-4.
- Mayr, A. und Munz, E.,** 1964: Veränderungen von Vacciniavirus durch Dauerpassagen in Hühnerembryofibroblasten-Kulturen. *Zentralbl. Bakteriol. B.*, **195**, 24-35.
- Mayr, A., Bachmann, P.A., Bilbrack, B. und Wittmann, G.,** 1974: Virologische Arbeitsmethoden Band I., Stuttgart, Gustav Fischer Verlag.
- Mayr, A., Hochstein-Mintzel, V. und Stickl, H.,** 1975: Abstammung, Eigenschaften und Verwendung des attenuierten Vaccinia-Stammes MVA. *Infection*, **3**, 6-14.
- Mayr, A.,** 1976: TC-Marker des attenuierten Vacciniaimpfstammes "MVA" in menschlichen Zellkulturen. *Zentralbl. Veterinarmed. B.*, **23**, 417-430.
- Mayr, A., Bachmann, P.A., Bilbrack, B. und Wittmann, G.,** 1977: Virologische Arbeitsmethoden Band II., Stuttgart, Gustav Fischer Verlag.
- Mayr, A. und Danner, K.,** 1978: Vaccination against pox diseases under immunosuppressive conditions. *Dev. Biol. Stand.*, **41**, 225-234.
- Mayr, A., Stickl, H., Müller, H.K., Danner, K. und Singer, H.,** 1978: Der Pockenimpfstamm MVA: Marker, genetische Struktur, Erfahrungen mit der parenteralen Schutzimpfung und Verhalten im abwehrgeschwächten Organismus. *Zentralbl. Bakteriol. B.*, **167**, 375-390.

- McClurkin, A.W. und Coria, M.F.**, 1980: Bovine viral diarrhea virus (BVDV) serotiters stimulated in cattle in isolation and under field conditions by inactivated BVDV vaccine.
Proc. Annu. Meet. U. S. Anim. Health Assoc., **84**, 223-231.
- Mehdy, E.S., Bergeron, J., Nagy, E., Talbot, B.G., Harpin, S., Shen, S.H. und Elazhary, Y.**, 1999: Induction of humoral and cellular immune responses in mice by a recombinant fowlpox virus expressing the E2 protein of bovine viral diarrhea virus.
FEMS Microbiol. Lett., **171**, 107-114.
- Meyer, H., Sutter, G. und Mayr, A.**, 1991: Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence.
J. Gen. Virol., **72**, 1031-1038.
- Meyers, G., Rügenapf, T. und Thiel, H.J.**, 1989: Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus.
Virology, **171**, 555-567.
- Meyers, G., Tautz, N., Dubovi, E.J. und Thiel, H.J.**, 1991: Viral cytopathogenicity correlated with integration of ubiquitin-coding sequences.
Virology, **180**, 602-616.
- Meyers, G., Tautz, N., Stark, R., Brownlie, J., Dubovi, E.J., Collett, M.S. und Thiel, H.J.**, 1992: Rearrangement of viral sequences in cytopathogenic pestiviruses.
Virology, **191**, 368-386.
- Meyers, G., Tautz, N., Becher, P., Thiel, H.J. und Kümmerer, B.M.**, 1996: Recovery of cytopathogenic and noncytopathogenic bovine viral diarrhea viruses from cDNA constructs.
J. Virol., **70**, 8606-8613.
- Meyers, G., Stoll, D. und Gunn, M.**, 1998: Insertion of a sequence encoding light chain 3 of microtubule-associated proteins 1A and 1B in a pestivirus genome: connection with virus cytopathogenicity and induction of lethal disease in cattle.
J. Virol., **72**, 4139-4148.
- Meyers, G., Saalmüller, A. und 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.
- Miller, R.H. und Purcell, R.H.**, 1990: Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **87**, 2057-2061.
- Minocha, H.C., Xue, W. und Reddy, J.R.**, 1997: A 50 kDa membrane protein from bovine kidney cells is a putative receptor for bovine viral diarrhea virus (BVDV).
Adv. Exp. Med. Biol., **412**, 145-148.

- Missale, G. Bertoni, R., Lamonaca, V., Valli, A., Massari, M., Mori, C., Rumi, M.G., Houghton, M. Fiaccadori, F. und Ferrari, C.,** 1996: Different clinical behaviours of acute hepatitis C virus infection are associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response.
Journal of Clinical Investigation, **98**, 706-714.
- Moennig, V. und Liess, B.,** 1995: Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhea virus.
Vet. Clin. North Am. Food Anim Pract., **11**, 477-487.
- Moormann, R.J., Warmerdam, P.A., van der, M.B., Schaaper, W.M., Wensvoort, G. und Hulst, M.M.,** 1990: Molecular cloning and nucleotide sequence of hog cholera virus strain Brescia and mapping of the genomic region encoding envelope protein E1.
Virology, **177**, 184-198.
- Moser, C., Stettler, P., Tratschin, J.D. und Hofmann, M.A.,** 1999: Cytopathogenic and noncytopathogenic RNA replicons of classical swine fever virus.
J. Virol., **73**, 7787-7794.
- Mossmann, S.P., Bex, F., Berglund, P., Arthos, J., O'Neil, S.P., Riley, D., Maul, D.H., Bruck, C., Momin, P., Burny, A., Fultz, P.N., Mullins, J.I., Lilkjeström, P. und Hoover, E.A.,** 1996: Protection against lethal simian immunodeficiency virus SIVsmmPBj14 disease by a recombinant Semliki Forest Virus gp160 vaccine and by a gp120 subunit vaccine.
J. Virol., **70**, 1953-1960.
- Muyldermans, G., San Gabriel, M.C., Hamers, R. und Wyns, L.,** 1996: Expression in *E. coli* and purification of the active autoprotease P20 of classical swine fever virus.
Virus Genes, **13**, 135-142.
- Nam, J.H., Cha, S.L. und Cho, H.W.,** 2002: Immunogenicity of a recombinant MVA and a DNA vaccine for Japanese encephalitis virus in swine.
Microbiol. Immunol., **46**, 23-28.
- Odeon, A.C., Kelling, C.L., Marshall, D.J., Estela, E.S., Dubovi, E.J. und Donis, R.O.,** 1999: Experimental infection of calves with bovine viral diarrhea virus genotype II (NY-93).
J. Vet. Diagn. Invest., **11**, 221-228.
- Ohmann, H.B.,** 1990: Electron microscopy of bovine virus diarrhoea virus.
Rev. Sci. Tech., **9**, 61-73.
- Orban, S., Liess, B., Hafez, S.M., Frey, H.R., Blindow, H. und Sasse, P.B.,** 1983: Studies on transplacental transmissibility of a Bovine Virus Diarrhoea (BVD) vaccine virus. I. Inoculation of pregnant cows 15 to 90 days before parturition (190th to 265th day of gestation).
Zentralbl. Veterinarmed. B., **30**, 619-634.

- Paton, D.J., Sands, J.J., Lowings, J.P., Smith, J.E., Ibata, G. und Edwards, S., 1995:** A proposed division of the pestivirus genus using monoclonal antibodies, supported by cross-neutralisation assays and genetic sequencing.
Vet. Res., **26**, 92-109.
- Paton, D.J., Sharp, G. und Ibata, G., 1999:** Foetal cross-protection experiments between type 1 and type 2 bovine viral diarrhoea virus in pregnant ewes.
Vet. Microbiol., **64**, 185-196.
- Pauly, T., Elbers, K., König, M., Lengsfeld, T., Saalmüller, A. und 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.
- Pellerin, C., van den Hurk, J., Lecomte, J. und Tussen, P., 1994:** Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities.
Virology, **203**, 260-268.
- Pellerin, C., Moir, S., Lecomte, J. und Tijssen, P., 1995:** Comparison of the p125 coding region of bovine viral diarrhoea viruses.
Vet. Microbiol., **45**, 45-57.
- Pestova, T.V. und Hellen, C.U., 1999:** Internal initiation of translation of bovine viral diarrhoea virus RNA.
Virology, **258**, 249-256.
- Poll, G., 1999:** Etablierung und Validierung eines FACS-Immunfluoreszenz-Inhibitions-Testes zum Nachweis und zur Differenzierung von spezifischen Antikörpern gegen bovine Virus Diarrhoe Virus (BVDV) in Serum, Plasma und Milch von Rindern.
Diss. Vet. Med., LMU-München.
- Potgieter, L.N., 1995:** Immunology of bovine viral diarrhoea virus.
Vet. Clin. North Am. Food Anim Pract., **11**, 501-520.
- Qu, L., McMullan, L.K. und Rice, C.M., 2001:** Isolation and characterization of noncytopathic pestivirus mutants reveals a role for nonstructural protein NS4B in viral cytopathogenicity.
J. Virol., **75**, 10651-10662.
- Ramirez, J.C., Finke, D., Esteban, M., Kraehenbuhl, J.P. und Acha-Orbea, H., 2003:** Tissue distribution of the Ankara strain of vaccinia virus (MVA) after mucosal or systemic administration.
Arch. Virol., **148**, 827-839.
- Reddahase, M.J., Jonjic, S., Weiland, F., Mutter, W. und Koszinowski, U.H., 1988:** Adoptive immunotherapy of murine cytomegalovirus adenitis in the immunocompromised host: CD4-helper-independent antiviral function of CD8-positive memory T-lymphocytes derived from latently infected donors.
J. Virol., **65**, 589-597.

- Reddy, J.R., Kwang, J., Varthakavi, V., Lechtenberg, K.F. und Minocha, H.C., 1999:** Semliki forest virus vector carrying the bovine viral diarrhea virus NS3 (p80) cDNA induced immune responses in mice and expressed BVDV protein in mammalian cells. *Comp Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **22**, 231-246.
- Rhodes, S.G., Cocksedge, J.M., Collins, R.A. und Morrison, W.I., 1999:** Differential cytokine responses of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in response to bovine viral diarrhoea virus in cattle. *J. Gen. Virol.*, **80**, 1673-1679.
- Ridpath, J.F., Bolin, S.R. und Dubovi, E.J., 1994:** Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes. *Virology*, **205**, 66-74.
- Ridpath, J.F. und Bolin, S.R., 1995:** Delayed onset postvaccinal mucosal disease as a result of genetic recombination between genotype 1 and genotype 2 BVDV. *Virology*, **212**, 259-262.
- Ridpath, J.F. und Bolin, S.R., 1997:** Comparison of the complete genomic sequence of the border disease virus, BD31, to other pestiviruses. *Virus Res.*, **50**, 237-243.
- Ridpath, J.E., Neill, J.D., Endsley, J. und Roth, J.A., 2003:** Effect of passive immunity on the development of a protective immune response against bovine viral diarrhea virus in calves. *Am. J. Vet. Res.*, **64**, 65-69.
- Riffenburgh, R.H., 1999:** *Statistics in Medicine.* Academic Press; San Diego.
- Rinck, G., Birghan, C., Harada, T., Meyers, G., Thiel, H.J. und Tautz, N., 2001:** A cellular J-domain protein modulates polyprotein processing and cytopathogenicity of a pestivirus. *J. Virol.*, **75**, 9470-9482.
- Roehe, P.M., Woodward, M.J. und Edwards, S., 1992:** Characterisation of p20 gene sequences from a border disease-like pestivirus isolated from pigs. *Vet. Microbiol.*, **33**, 231-238.
- Rümenapf, T., Meyers, G., Stark, R. und Thiel, H.J., 1991a:** Molecular characterization of hog cholera virus. *Arch. Virol. Suppl*, **3**, 7-18.
- Rümenapf, T., Stark, R., Meyers, G. und Thiel, H.J., 1991b:** Structural proteins of hog cholera virus expressed by vaccinia virus: further characterization and induction of protective immunity. *J. Virol.*, **65**, 589-597.
- Rümenapf, T., Unger, G., Strauss, J.H. und Thiel, H.J., 1993:** Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses. *J. Virol.*, **67**, 3288-3294.

- Rümenapf, T., Stark, R., Heimann, M. und Thiel, H.J.**, 1998: N-terminal protease of pestiviruses: identification of putative catalytic residues by site-directed mutagenesis. *J. Virol.*, **72**, 2544-2547.
- Sanderbrand, S.A., Tautz, N., Thiel, H.J., Ochs, K., Beck, E. und Niepmann, M.**, 2000: Translation from the internal ribosome entry site of bovine viral diarrhea virus is independent of the interaction with polypyrimidine tract-binding protein. *Vet. Microbiol.*, **77**, 215-227.
- Schelp, C., Greiser-Wilke, I., Wolf, G., Beer, M., Moennig, V. und Liess, B.**, 1995: Identification of cell membrane proteins linked to susceptibility to bovine viral diarrhoea virus infection. *Arch. Virol.*, **140**, 1997-2009.
- Schelp, C., Greiser-Wilke, I. und Moennig, V.**, 2000: An actin-binding protein is involved in pestivirus entry into bovine cells. *Virus Res.*, **68**, 1-5.
- Schneider, R., Unger, G., Stark, R., Schneider-Scherzer, E. und Thiel, H.J.**, 1993: Identification of a structural glycoprotein of an RNA virus as a ribonuclease. *Science*, **261**, 1169-1171.
- Sentsui, H., Nishimori, T., Kirisawa, R. und Morooka, A.**, 2001: Mucosal disease induced in cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus by antigenically different cytopathic virus. *Arch. Virol.*, **146**, 993-1006.
- Seth, A., Ourmanov, I., Schmitz, J.E., Kuroda, M.J., Lifton, M.A., Nickerson, C.E., Wyatt, L., Carroll, M., Moss, B., Venzon, D., Letvin, N.L. und Hirsch, V.M.**, 2000: Immunization with a modified vaccinia virus expressing simian immunodeficiency virus (SIV) Gag-Pol primes for an anamnestic Gag-specific cytotoxic T-lymphocyte response and is associated with reduction of viremia after SIV challenge. *J. Virol.*, **74**, 2502-2509.
- Sharpe, S., Polyanskaya, N., Dennis, M., Sutter, G., Hanke, T., Erfle, V., Hirsch, V. und Cranage, M.**, 2001: Induction of simian immunodeficiency virus (SIV)-specific CTL in rhesus macaques by vaccination with modified vaccinia virus Ankara expressing SIV transgenes: influence of pre-existing anti-vector immunity. *J. Gen. Virol.*, **82**, 2215-2223.
- Sharpe, S., Hanke, T., Tinsley-Bown, A., Dennis, M., Dowall, S., McMichael, A. und Cranage, M.**, 2003: Mucosal immunization with PLGA-microencapsulated DNA primes a SIV-specific CTL response revealed by boosting with cognate recombinant modified vaccinia virus Ankara. *Virology*, **313**, 13-21.
- Sopp, P., Hooper, L.B., Clarke, M. C., Howard, C.J. und Brownlie, J.**, 1994: Detection of bovine viral diarrhoea p80 protein subpopulations of bovine leukocytes. *J. Gen. Virol.*, **75**, 1189-1194.

- Stark, R., Meyers, G., Rümnapf, T. und Thiel, H.J.**, 1993: Processing of pestivirus polyprotein: cleavage site between autoprotease and nucleocapsid protein of classical swine fever virus.
J. Virol., **67**, 7088-7095.
- Stegeman, J.A., Tielen, M.J., Kimman, T.G., van Oirschot, J.T., Hunneman, W.A. und Berndsen, F.W.**, 1994: Intensive regional vaccination with a gI-deleted vaccine markedly reduces pseudorabies virus infections.
Vaccine, **12**, 527-531.
- Stickl, H., Hochstein-Mintzel, V., Mayr, A., Huber, H.C., Schafer, H. und Holzner, A.**, 1974: MVA-Stufenimpfung gegen Pocken. Klinische Erprobung des attenuierten Pockenimpfstoffes, Stamm MVA.
Dtsch. Med. Wochenschr., **99**, 2386-2392.
- Stickl, H.A.**, 1974: Smallpox vaccination and its consequences: first experiences with the highly attenuated smallpox vaccine "MVA".
Prev. Med., **3**, 97-101.
- Strube, W., Auer, S., Block, W., Heinen, E., Kretzdorn, D., Rodenbach, C. und Schmeer, N.**, 1996: A gE deleted infectious bovine rhinotracheitis marker vaccine for use in improved bovine herpesvirus 1 control programmes.
Vet. Microbiol., **53**, 181-189.
- Suradhat, S., Intrakamhaeng, M. und 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.
- Sutter, G.**, 1989: Das Genom des Vacciniavirusstammes Ankara und seine Änderung während der Attenuierung.
Diss. Vet. Med., LMU-München.
- Sutter, G. und Moss, B.**, 1992: Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **89**, 10847-10851.
- Sutter, G., Ramsey Ewing, A., Rosales, R. und Moss, B.**, 1994a: Stable expression of the vaccinia virus K1L gene in rabbit cells complements the host range defect of vaccinia virus mutant.
J. Virol., **68**, 4109-4116.
- Sutter, G., Wyatt, L.S., Foley, P.L., Bennink, J.R. und Moss, B.**, 1994b: A recombinant vector derived from the host range-restricted and highly attenuated MVA strain of vaccinia virus stimulates protective immunity in mice to influenza virus.
Vaccine, **12**, 1032-1040.
- Sutter, G. und Moss, B.**, 1995: Novel vaccinia vector derived from the host range restricted and highly attenuated MVA strain of vaccinia virus.
Dev. Biol. Stand., **84**, 195-200.

- Sutter, G., Ohlmann, M. und Erfle, V.,** 1995: Non-replicating vaccinia vector efficiently expresses bacteriophage T7 RNA polymerase.
FEBS Lett., **371**, 9-12.
- Sutter, G. und Staib, C.,** 2003: Vaccinia vectors as candidate vaccines: the development of modified vaccinia virus Ankara for antigen delivery.
Curr. Drug Targets. Infect. Disord., **3**, 263-271.
- Suzuki, R., Suzuki, T., Ishii, K., Matsuura, Y. und Miyamura, T.,** 1999: Processing and functions of Hepatitis C virus proteins.
Intervirology, **42**, 145-152.
- Tautz, N., Thiel, H.J., Dubovi, E.J. und Meyers, G.,** 1994: Pathogenesis of mucosal disease: a cytopathogenic pestivirus generated by an internal deletion.
J. Virol., **68**, 3289-3297.
- Tautz, N., Meyers, G., Stark, R., Dubovi, E.J. und Thiel, H.J.,** 1996: Cytopathogenicity of a pestivirus correlates with a 27-nucleotide insertion.
J. Virol., **70**, 7851-7858.
- Tautz, N., Elbers, K., Stoll, D., Meyers, G. und Thiel, H.J.,** 1997: Serine protease of pestiviruses: determination of cleavage sites.
J. Virol., **71**, 5415-5422.
- Tautz, N., Harada, T., Kaiser, A., Rinck, G., Behrens, S. und Thiel, H.J.,** 1999: Establishment and characterization of cytopathogenic and noncytopathogenic pestivirus replicons.
J. Virol., **73**, 9422-9432.
- Tautz, N., Kaiser, A. und Thiel, H.J.,** 2000: NS3 serine protease of bovine viral diarrhea virus: characterization of active site residues, NS4A cofactor domain, and protease-cofactor interactions.
Virology, **273**, 351-363.
- Tautz, N. und Thiel, H.J.,** 2003: Cytopathogenicity of pestiviruses: cleavage of bovine viral diarrhea virus NS2-3 has to occur at a defined position to allow viral replication.
Arch. Virol., **148**, 1405-1412.
- Thiel, H.J., Stark, R., Meyers, G., Weiland, E. und Rügenapf, T.,** 1992: Proteins encoded in the 5' region of the pestivirus genome-considerations concerning taxonomy.
Vet. Microbiol., **33**, 213-219.
- Thiel, H.J.; Meyers, G.; Stark, R.; Tautz, N.; Rügenapf, T.; Unger, G. und Conzelmann, K.K.,** 1993: Molecular characterization of positive-strand RNA viruses: pestiviruses and the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV).
Arch. Virol. Suppl, **7**, 41-52.
- Thierauf, P.,** 1993: Untersuchungen zur Epidemiologie, Diagnose und Immunprophylaxe von BVD/MD-Virusinfektionen in Milchviehzuchtbeständen.
Diss. Vet. Med., LMU-München.

- Toth, R.L., Nettleton, P.F. und McCrae, M.A.**, 1999: Expression of the E2 envelope glycoprotein of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) elicits virus-type specific neutralising antibodies.
Vet. Microbiol., **65**, 87-101.
- Tratschin, J.D., Moser, C., Ruggli, N. und Hofmann, M.A.**, 1998: Classical swine fever virus leader proteinase Npro is not required for viral replication in cell culture.
J. Virol., **72**, 7681-7684.
- van Oirschot, J.T.**, 1999: Diva vaccines that reduce virus transmission.
J. Biotechnol., **73**, 195-205.
- van Oirschot, J.T., Brusckhe, C.J. und van Rijn, P.A.**, 1999: Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea.
Vet. Microbiol., **64**, 169-183.
- van Regenmortel, H.V., Bishop, D.H.L., Regenmortel van, M.H. und Fauquet, C.M.**, 2000: Virus taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.
 Academic Press; Orlando, USA.
- Vazquez-Blomquist, D., Quintana, D. und Duarte, C.A.**, 2003: Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA) priming and Fowlpox Virus booster elicit stronger CD8+ T cell response in mice against an HIV-1 epitope than DNA-Poxvirus prime-booster.
Approach. Biotechnol. Appl. Biochem.
- Vilcek, S., Drew, T.W., McGoldrick, A. und Paton, D.J.**, 1999a: Genetic typing of bovine pestiviruses from England and Wales.
Vet. Microbiol., **69**, 227-237.
- Vilcek, S., Paton, D., Lowings, P., Bjorklund, H., Nettleton, P. und Belak, S.**, 1999b: Genetic analysis of pestiviruses at the 3' end of the genome.
Virus Genes, **18**, 107-114.
- Vilcek, S., Paton, D.J., Durkovic, B., Strojny, L., Ibata, G., Moussa, A., Loitsch, A., Rossmanith, W., Vega, S., Scicluna, M.T. und Paifi, V.**, 2001: Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups.
Arch. Virol., **146**, 99-115.
- Vilcek, S., Greiser-Wilke, I., Durkovic, B., Obritzhauser, W., Deutz, A. und Kofer, J.**, 2003: Genetic diversity of recent bovine viral diarrhoea viruses from the southeast of Austria (Styria).
Vet. Microbiol., **91**, 285-291.
- Wang, L., Menon, S., Bolin, S.R. und Bello, L.J.**, 2003: A hepadnavirus regulatory element enhances expression of a type 2 bovine viral diarrhoea virus E2 protein from a bovine herpesvirus 1 vector.
J. Virol., **77**, 8775-8782.

- Warrener, P. und Collett, M.S.**, 1995: Pestivirus NS3 (p80) protein possesses RNA helicase activity.
J. Virol., **69**, 1720-1726.
- Wee, E.G., Patel, S., McMichael, A.J. und Hanke, T.**, 2002: A DNA/MVA-based candidate human immunodeficiency virus vaccine for Kenya induces multi-specific T cell responses in rhesus macaques.
J. Gen. Virol., **83**, 75-80.
- Weidinger, G., Ohlmann, M., Schlereth, B., Sutter, G. und Niewiesk, S.**, 2001: Vaccination with recombinant modified vaccinia virus Ankara protects against measles virus infection in the mouse and cotton rat model.
Vaccine, **19**, 2764-2768.
- Weiland, E., Thiel, H.J., Hess, G. und Weiland, F.**, 1989: Development of monoclonal neutralizing antibodies against bovine viral diarrhea virus after pretreatment of mice with normal bovine cells and cyclophosphamide.
J. Virol. Methods, **24**, 237-243.
- Weiland, E., Stark, R., Haas, B., Rumenapf, T., Meyers, G. und Thiel, H.J.**, 1990: Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer.
J. Virol., **64**, 3563-3569.
- Weiland, E., Ahl, R., Stark, R., Weiland, F. und Thiel, H.J.**, 1992: A second envelope glycoprotein mediates neutralization of a pestivirus, hog cholera virus.
J. Virol., **66**, 3677-3682.
- Weiland, F., Weiland, E., Unger, G., Saalmüller, A. und Thiel, H.J.**, 1999: Localization of pestiviral envelope proteins E(rns) and E2 at the cell surface and on isolated particles.
J. Gen. Virol., **80**, 1157-1165.
- Westenbrink, F., Middel, W.G., Straver, P.J. und de-Leeuw, P.W.**, 1986: A blocking enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for bovine virus diarrhoea virus serology.
Zentralbl. Veterinarmed. B., **33**, 354-361
- Weston, S.A. und Parish, C.R.**, 1990: New fluorescent dyes for lymphocyte migration studies. Analysis by flow cytometry and fluorescence microscopy.
J. Immunol. Meth., **133**, 87-97.
- Widjoatmodjo, M.N., van Gennip, H.G., Bouma, A., van Rijn, P.A. und Moormann, R.J.**, 2000: Classical swine fever virus E(rns) deletion mutants: trans-complementation and potential use as nontransmissible, modified, live-attenuated marker vaccines.
J. Virol., **74**, 2973-2980.
- Wiskerchen, M., Belzer, S.K. und Collett, M.S.**, 1991: Pestivirus gene expression: the first protein product of the bovine viral diarrhea virus large open reading frame, p20, possesses proteolytic activity.
J. Virol., **65**, 4508-4514.

- Woldehiwet, Z. und Hussin, A.A.**, 1994: Cytotoxic T cell responses in lambs experimentally infected with Border disease virus.
Vet. Immunol. Immunopathol., **41**, 201-209.
- Wolf, G., Thierauf, P., Wolfmeyer, A., Beer, M. und Kaaden, O.R.**, 1996: Impfindikation und Impfstrategie bei BVD.
Prakt. Tierarzt, **77**, 4-8.
- Wolfmeyer, A., Wolf, G., Beer, M., Strube, W., Hehnen, H.R., Schmeer, N. und Kaaden, O.R.**, 1997: Genomic (5'UTR) and serological differences among German BVDV field isolates.
Arch. Virol., **142**, 2049-2057.
- Wyatt, L.S., Carroll, M.W., Czerny, C.P., Merchlinsky, M., Sisler, J.R. und Moss, B.**, 1998: Marker rescue of the host range restriction defects of modified vaccinia virus Ankara.
Virology, **251**, 334-342.
- Xiao, M., Chen, J. und Li, B.**, 2003a: RNA-dependent RNA polymerase activity of Classical swine fever virus NS5B protein expressed in natural host cells.
Acta Virol., **47**, 79-85.
- Xiao, M., Wang, Y., Chen, J. und Li, B.**, 2003b: Characterization of RNA-dependent RNA polymerase activity of CSFV NS5B proteins expressed in *Escherichia coli*.
Virus Genes, **27**, 67-74.
- Xu, J., Mendez, E., Caron, P.R., Lin, C., Murcko, M.A., Collett, M.S. und Rice, C.M.**, 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**, 5312-5322.
- Xue, W. und Minocha, H.C.**, 1993: Identification of the cell surface receptor for bovine viral diarrhoea virus by using anti-idiotypic antibodies.
J. Gen. Virol., **74**, 73-79.
- Xue, W., Zhang, S. und Minocha, H.C.**, 1997: Characterization of a putative receptor protein for bovine viral diarrhoea virus.
Vet. Microbiol., **57**, 105-118.
- Yu, M., Wang, L.F., Shiell, B.J., Morrissy, C.J. und Westbury, H.A.**, 1996: Fine mapping of a C-terminal linear epitope highly conserved among the major envelope glycoprotein E2 (gp51 to gp54) of different pestiviruses.
Virology, **222**, 289-292.
- Yu, H., Grassmann, C.W. und Behrens, S.E.**, 1999: Sequence and structural elements at the 3' terminus of bovine viral diarrhoea virus genomic RNA: functional role during RNA replication.
J. Virol., **73**, 3638-3648.

- Yu, H., Isken, O., Grassmann, C.W. und Behrens, S.E.**, 2000: A stem-loop motif formed by the immediate 5' terminus of the bovine viral diarrhea virus genome modulates translation as well as replication of the viral RNA.
J. Virol., **74**, 5825-5835.
- Zhang, G., Flick-Smith, H. und McCauley, J.W.**, 2003: Differences in membrane association and sub-cellular distribution between NS2-3 and NS3 of bovine viral diarrhoea virus.
Virus Res., **97**, 89-102.
- Zhong, W., Gutshall, L.L. und Del Vecchio, A.M.**, 1998: Identification and characterization of an RNA-dependent RNA polymerase activity within the nonstructural protein 5B region of bovine viral diarrhea virus.
J. Virol., **72**, 9365-9369.
- Zhu, Y., Rota, P., Wyatt, L., Tamin, A., Rozenblatt, S., Lerche, N., Moss, B., Bellini, W. und McChesney, M.**, 2000: Evaluation of recombinant vaccinia virus-measles vaccines in infant rhesus macaques with preexisting measles antibody.
Virology, **276**, 202-213.
- Zimmer, G., Wentik, G.H., Brinkhof, J., Brusckke, C.J.M., Westerbrink, F.J., Crauweis, A.P.P. und de Goey, I.**, 1996: Model for Testing Efficacy of Bovine Viral Diarrhea Vaccines against Intrauterine Infection. Proceedings of the 14th World Congress on Diseases of Cattle.
Proceedings of the 14th World Congress on Diseases of Cattle. Edingburgh., 217-220

8. Anhang

8.1. Materialliste

8.1.1. Geräte und Laborhilfsmittel

- Brutschränke:
 - Typ B4 (zum Bebrüten von Hühnereiern, 37,5-38,5 °C, 50-60 % Luftfeuchte); Ehert, Emmendingen
 - Memmert Universalschrank, Typ BVM 50 (für Zellkulturen, 37 °C); Memmert, Schwabach)
 - Begasungsbrutschrank Typ B5061 (für Zellkulturen, 37°C, 5 % CO₂, 50-60 % Luftfeuchte); Heraeus Instruments, Hanau
- CCD-Kamera System (zur Dokumentation von Agarosegelen); Froebel Labortechnik, Wasserburg
- Cell DYN 3500 Analysegerät; Abbott Laboratories, Illinois, USA
- Cryoröhrchen (1,8 ml zum Einfrieren von Zellen); Nunc, Roskilde, Dänemark
- Einwegkanülen: Neolus (Nr.1 Luer 0,9 x 40 mm) Terumo[®]; Terumo, Leuven, Belgien
- Einwegspritzen (2 ml); Becton Dickinson, Braunschweig
- Einwegspritzen (1 ml, 5 ml, 10 ml und 20 ml); Terumo Europe N.V., Leuven, Belgien
- Fluoreszenzmikroskop: Typ Axiovert 25; Zeiss, Jena
- GeneAmp[®] 5700 Sequence Detection System; PE Applied Biosystems, Weiterstadt
- *Gene Amp[®]-Software*; PE Applied Biosystems, Weiterstadt
- Handschuhe (aus Latex): Multi-Perect Latex Handschuhe; Multi-Com Goods, Ahrensburg
- Handschuhe (aus Nitril): TouchNTuff[™]; Ansell Edmont, Cochocton, Ohio, USA
- Impfstoffsprühpistole: Hauptner-Muto[®]; Firma Hauptner,
- Laborglaswaren: Schott Glas, Mainz
- Lichtmikroskop: Typ Laborlux K; Leitz; Wetzlar
- Luer-Monovetten:
 - Nr.3093801 Monovette[®] 9 ml Z Luer Serum; Sarstedt, Nümbrecht
 - Nr.3009915 Monovette[®] 9 ml KE Luer EDTA; Sarstedt, Nümbrecht
- Magnetrührer: Typ IKA-Combimag REO; IKA-Labortechnik, Staufen i.Br.

- Messpipetten aus Glas: Silberbrand Eterna Klasse B (1 ml, 5 ml, und 10 ml); Brand, Wertheim
- *MicroAmp*[®] *Optical Caps*; Applied Biosystems, Foster City; USA
- *MicroAmp*[®] *Optical Tubes*; Applied Biosystems, Foster City; USA
- *MicroAmp*[®] *Optical 96-well Reaction Plates*; Applied Biosystems, Foster City; USA
- Mikro-Schraubröhren (2 ml); Sarstedt, Nümbrecht
- Mikrotiterplatten:
 - *Microtest Plate 96-well* (U-Boden, für Durchflusszytometrie); Sarstedt, Nümbrecht
 - 96-Loch-Zellkulturplatte (U-Boden, Nr.83.1837.500); Sarstedt Inc. Newton, USA
- Mikrowellengerät Panasonic Typ SS-758; Matsushita Electric, GB
- *Optical Adhesive Cover Starter Kit*; Applied Biosystems, Foster City, USA
- Petrischalen (steril) Durchmesser 90 mm; Waldeck, Münster
- pH-Meßgerät Typ DIGI 510; WTW Wiss.-Techn.Werkstätten, Weilheim
- Pipetten:
 - *Research* (0,1-2,5 µl, 0,5-10 µl und 100-1000 µl); Eppendorf, Köln
 - *Reference* (2-20 µl und 20-200 µl); Eppendorf, Köln
 - Nichipet[™] 5000 DG (2-20 µl und 20-200 µl); Nichingo, Japan
 - Transferpette[®]-12 (20-200 µl); Brand, Wertheim
 - Autoklavierbare Mehrkanalpipette (Nr.06200-12; 25-200 µl); SLG Süd-Laborbedarf, Gauting
- Pipettenspitzen: Plastibrand[®]- Pipettenspitzen Typ A 0,5-20 µl, Typ B 2-200 µl, Typ D 50-1000µl; Brand, Wertheim
- Pipettenspitzen mit Filter: Biospere Filter Tips 10 µl Type Eppendorf und 1000µl Blue; Sarstedt, Nürtingen
- Pipettierhilfe: *Accu-Jet*[®]; Brand, Wertheim
- Photometer: *Tecan Sunrise Touchscreen*; Tecan Austria GmbH, Gröding/Salzburg, Österreich
- Photometer-Software: Magellan Software Standart; Tecan Austria GmbH, Gröding/Salzburg, Österreich
- Polypropylenröhrchen (15 ml, 50 ml); Nunc, Roskilde, Dänemark

- Reaktionsgefäße(1,5 ml); Eppendorf, Köln
- Schüttler für Mikrotiterplatten:
 - Typ MTS4; IKA-Labortechnik, Staufen i.Br.
 - *Micro-Shaker*; Dynatech, Guernsey, Channel Islands, GB
- Sicherheitswerkbank: *Hera safe*–Heraeus, Klasse 2, Typ H; Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
- *Software Oligo*[®] Version 4.1.; National Biosciences, Plymouth, MN, USA
- Spannungsquelle: - Sebia Typ GD61D; AGS, Heidelberg
- Sterile Zellkulturplastikwaren:
 - Zellkulturflaschen (25cm², 80 cm² und 175 cm²), *Nunclon*[™] Δ *Surface*; Nunc, Roskilde, DK
 - 6-und 24-Loch-Zellkulturplatten, *Nunclon*[™] Δ *Surface*; Nunc, Roskilde, DK
 - 96-Loch-Zellkulturplatten (U-und Flachboden), *Nunclon*[™] Δ *Surface*, Nunc, Roskilde, DK
- Taqman-Software: Gene Amp[®] -Software
- Tissue-Tücher: Roth, Karlsruhe
- Ultraschallgeräte:
 - *Sonifier*[™] *cell disruptor* B12; Branson Sonic Power Company, Dänemark
 - *Electrosonic* Typ 07; Kurt Mige Laborbedarf, Heidelberg
- Vortex-Genie, Mod.K550-GE: Bachhofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen
- Waagen:
 - Elektronische Analysenwaage Scout SC 6010 (0,1g); Ohaus corp., Florham park, N.Y. USA
 - Elektronische Analysenwaage Typ 1219 MP (1mg); Sartorius, Göttingen
- Wasserbäder:
 - Typ 1012; Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
 - Typ HWR; Daglef Patz KG, Wankendorf
- Zählkammer nach Fuchs-Rosenthal; Brand, Wertheim
- Zellschaber: *Cell Scraper* (23 und 32 cm); Nunc, Roskilde, Dänemark
- Zentrifugen:
 - *Centrifuge 5417 R* mit Rotor F 45-30-11 (1,5 ml Reaktionsgefäße)

- Sepatech Megafuge 1.0 mit Rotoren Nr. 3471 (Mikrotiterplatten) und Nr.2150 (15 ml und 50 ml Probenröhrchen); Heraeus Instruments, Osterode

- Zytofluorometer:
FACScan; Becton Dickinson, Heidelberg
Software Cell Quest Pro; Becton Dickinson, Heidelberg

8.1.2. Enzyme

- RNA-Inhibitor (RNasin); Promega, Mannheim

8.1.3. Kommerzielle Kits

- *β-Gal Staining Set*; Firma Roche, Mannheim
- BOVIGAM™ (Bovine Gamma Interferon Test) Kit; Lot.Nr. 0312-05201; Biocor Animal Health, Inc., Omaha, USA
- Ceditest® BVDV; Lot. Nr. 03K017; Cedi Diagnostics B.V., Lelystad, NL
- High Pure™ RNA Isolation Kit; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- TaqMan® Reverse Transkriptions Reagenz; PE Biosystems, Weiterstadt

8.1.4. Zellen

- BEL-Zellen (Bovine Embryonale Lungenfibroblasten; primäre Zellkultur)
- Bovine Hodenzellen (primäre Zellkultur)
- HEF-Zellen (Hühnerembryofibroblasten; primäre Zellkultur)
- MA-104-Zellen (Dr. E. Bohl, Wooster, Ohio, USA, 120. Passage)

8.1.5. Chemikalien, Puffer und Lösungen

- Agarose (molecular biology grade); Eurogentec, Belgien
- *Alexa[™] 488 goat anti-mouse IgG (H+L), F(ab')₂ fragment conjugate*; Molecular Probes, Leiden, Niederlande
 - 1:1000 in FACS-Puffer (für indirekte Immunfluoreszenz)
 - 1:600 in FACS-Puffer (für FACS-IFI)
- Antibiotika (den Zellkulturmedien zugesetzt)
 - 100.000 I.E./l Penicillin G; Grünenthal, Stolberg
 - 100 mg/l Streptomycin (Strepto-Hefa); Hefa Pharma, Werne
- CaCl₂ (Calciumchlorid); Sigma, Deisenhofen
- *Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE)*; Molecular Probes, Eugene, USA
- Concanavalin A, Nr.C0412, Typ IV-S; Sigma, Deisenhofen
- Digitonin; D-1407; Sigma, Deisenhofen
 - 0,0025 % (w/v) in PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺
- Dimethylsulfoxid (DMSO); Merck, Darmstadt
- 3,3'-Diocetadecyloxycarbocyanin perchlorat (D275, Nr. D275); Molecular Probes, Eugene, USA
- Dithiothreitol (DTT); Roche, Mannheim
- DNA-Marker (*100 bp DNA-step ladder*); Promega Corp., Madison, USA
- *Donor Calf Serum*, Neugeborenenenserum; (DCS); C•C•Pro GmbH, Neustadt/W
- *Dulbecco-modifiziertes-Eagle-Medium (DMEM)*; Biochrom, Berlin
 - mit 10 % FKS (Anzuchtmedium)/ 5 % FKS (Erhaltungsmedium)
 - 1 % NaHCO₃ (8,8 %ig)
 - 1000000 I.E. Penicillin g/l
 - 100 mg Streptomycin/l
- *Earle's Minimum-Essential-Medium (EMEM)*; Biochrom, Berlin
 - mit 10 % FKS (Anzuchtmedium)/ 5 % FKS (Erhaltungsmedium)
 - 1 % NaHCO₃ (8,8 %ig)
 - 1000000 I.E. Penicillin g/l
 - 100 mg Streptomycin/l

- Einfriermedium für BEL und bovine Hodenzellen (2x Lösung)
 - 40 % EMEM
 - 40 % FKS
 - 20 % DMSO
- Einfriermedium für Lymphozyten (2x Lösung)
 - 40 % RPMI 1640
 - 40 % FKS
 - 20 % DMSO
- Elektrophoresepuffer für Agarose-Gelelektrophorese (50x EP) (TAE-Puffer)
 - 2 M Tris
 - 0,25 M Natriumazetat
 - 0,05 M EDTA
 - ad 1 l Aq.demin., mit Eisessig auf pH 7,8 eingestellt
- Ethanol; Roth, Karlsruhe
- Ethidiumbromid; Sigma, Deisenhofen
 - 0,05 % (w/v) in Aq.demin.
- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA); Merck, Darmstadt
- FACS-Puffer, pH 7,4
 - 10 mM Hepes
 - 10 mM EDTA
 - 2 % (v/v) FKS
 - 0,1 % (w/v) Natriumazid; Sigma, Deisenhofen
 - ad 1 l PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$
- Fetales Kälberserum (FKS); *Fetal Bovine Serum*; Biochrom KG, Berlin
- Formaldehyd, 37 % *solution* (Formalin); Sigma, Deisenhofen
- Glutaraldehyd, 25 % in Wasser; Roth, Karlsruhe
- KCl (Kaliumchlorid); Sigma, Deisenhofen
- KH_2PO_4 (Kaliumphosphat); Merck, Darmstadt

- Kristallviolettlösung
 - 15 g Kristallviolett; Merck, Darmstadt
 - 85 ml Ethanol (absolut); Merck, Darmstadt
 - 250 ml Fomaldehyd, 37 % *solution* (Formalin); Sigma, Deisenhofen
 - ad 1 l Aq. Demin.
- L-Glutamin; Sigma, Deisenhofen
- Lysispuffer pH 7,4
 - 8,29 g NH₄Cl
 - 1,0 g KHCO₃
 - 1 mM EDTA
 - ad 1 l Aq. Demin
- Hepes (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaciny]-Ethansulfonsäure; Sigma, Deisenhofen
- MgCl₂ (Magnesiumchlorid); Merck, Darmstadt
- 2-Mercaptoethanol; Sigma, Deisenhofen
- Monoklonale Antikörperkombination WB103/105; C·C·Pro GmbH, Neustadt/W., Central Veterinary Laboratory Weybridge
 - 1:100 in FACS-Puffer (für FACS-IFI)
 - 1:500 in FACS Puffer (für indirekte Immunfluoreszenz)
- NaCl₂ (Natriumchlorid); Merck, Darmstadt
- NaHCO₃ (Natriumhydrogencarbonat); Merck, Darmstadt
- Na₂HPO₄ (Natriumhydrogenphosphat); Merck, Darmstadt
- Na-Citrat-Lösung, Natriumcitrat Braun 3,13 %; Braun
- Nichtessentielle Aminosäuren (*Non-Essential Amino Acids*) 100x; Biochrom AG, Berlin
- Paraformaldehyd (PFA); Sigma, Deisenhofen
 - 1 % (w/v) in PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺
- PBS (*phosphate buffered saline*)
 - 8 g NaCl
 - 0,2 g KCl
 - 2,37 g Na₂HPO₄ x 12 H₂O
 - 0,2 g KH₂PO₄
 - 0,132 g CaCl₂ x 2 H₂O

0,1 g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$

ad 1 l Aq. demin., pH 7,4

- PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$
wie PBS aber ohne CaCl_2 und MgCl_2
- *Percoll Separating Solution (Density 1.077)*; Biochrom AG, Berlin
- Phenolrot; Merck, Darmstadt
- Propidiumjodid; Sigma, Deisenhofen
 10^{-6} und 10^{-5}M in PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ für indirekte Immunfluoreszenzfärbung
und zytofluorometrische Auswertung des Zytotoxizitätstestes
- Rekombinantes Interleukin-2 (rboIL-2); R. A. Collins, Compton, Großbritannien
Gebrauchsverdünnung 2×10^4 U/ml PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ mit Zusatz von 0,1 %
endotoxin- und proteinfreiem Serumalbumin
- RNase-Inhibitor (RNAsin); Promega, Mannheim
- RPMI-1640-Medium; Sigma, Deisenhofen
- Saline (10x)
8 g NaCl
0,2 g KCl
1,15 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
0,2 g KH_2PO_4
1g Glucose
10 ml Phenolrot (0,1 %)
ad 1 l Aq. Demin
- Serumalbumin (endotoxin-und proteinfrei); Sigma, Deisenhofen
- Natriumphosphat; Sigma, Deisenhofen
- STV-Lösung (Saline-Trypsin-Versene-Lösung)
100 ml Saline
50 ml Trypsin (1,25 %)
25 ml Versene (1 %)
ad 1 l Aq. demin., pH 7,4
- Trypanblaulösung; Sigma, Deisenhofen
- Trypsin (1:250, from bovine pancreas, 5,7 U/mg); Serva, Heidelberg
1,12 g Trypsin ad 1 l Aq. demin.

- Trypsin/PBS-Lösung (für die Herstellung von primären Zellkulturen)
 - 100 ml Trypsin (1,25 %)
 - 400 ml PBS
- Versene (Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz); Serva, Heidelberg
 - 1 % in 1 l Aq. demin.
- X-Gal-Stammlösung (5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid); Boehringer, Mannheim
 - 2 % (w/v) in DMF (Dimethylformamid); Merck, Darmstadt
- X-Gal-Färbelösung
 - 250 μ l X-Gal-Stammlösung
 - 50 μ l 2 mM Kaliumhexacyanoferrat (II) ($K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3 H_2O$); Merck, Mannheim
 - 50 μ l 2 mM Kaliumhexacyanoferrat (III) ($K_4[Fe(CN)_6]$); Merck, Mannheim
 - ad 5 ml PBS ohne Ca^{2+}/Mg^{2+}

8.2. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

A

Abb	Abbildung
A. demin.	<i>Aqua demineralisata</i>
APC	Antigen präsentierende Zelle

B

BDV	<i>Border disease Virus</i>
BEL	Bovine embryonale Lungenfibroblasten
BHK	<i>Baby Hamster Kidney</i> -Zellen
BVD	<i>Bovine Virus Diarrhoe</i>
BVDV	<i>Bovine Virus Diarrhoe Virus</i>
bzw.	beziehungsweise

C

C	Kapsid
C-	Carboxy-
°C	Grad Celsius
CD	<i>cluster of differentiation</i> , Differenzierungscluster
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
ConA	Concanavalin A
cp	zytopathogen
cpE	zytopathogener Effekt
CFSE	Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester
CSFV	<i>Classical Swine Fever Virus</i>
Ct	<i>Threshold Cycle</i>
CTL	zytotoxischer T-Lymphozyt (<i>cytotoxic T-lymphocyte</i>)
CVA	Dermovaccinia Stamm Ankara

D

D	Dye
D275	3,3'-Diocetadecyloxacarbocyanin perchlorat
DC	dendritischen Zellen

Anhang

DCS	<i>Donor Calf Serum</i>
DISC	<i>Defective in Second Cycle</i>
DIVA	<i>Differentiating infected from vaccinated Animals</i>
DMEM	<i>Dulbecco-modifiziertes-Eagle-Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol

E

E	<i>envelope</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay</i>
EMEM	<i>Earle's Minimal-Essential-Medium</i>
Endkonz.	Endkonzentration
EP	Elektrophoresepuffer
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
ER	<i>Endoplasmatisches Retikulum</i>
E ^{rns}	<i>envelope, RNase, soluble</i>
<i>et al.</i>	<i>et altera, und andere</i>
etc.	<i>et cetera</i>

F

FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>
FACS-IFI	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i> Immunfluoreszenz Inhibitionstest,
FKS	Fetales Kälberserum
FL	Fluoreszenz
FSC	<i>forward scatter</i> , Vorwärtsstreulicht

G

GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GIT	Gastrointestinaltrakt

gp	Glykoprotein
<u>H</u>	
h	Stunden
HCV	Hepatitis C-Virus
HEF	Hühnerembryofibroblasten
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
Hz	Hertz
<u>I</u>	
I.E.	infektiöse Einheiten
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.m.	intramuskulär
IRES	<i>Internal Ribosomal Entry Site</i>
ISCOM	<i>Immunostimulating Complex</i>
i.v.	intravenös
<u>J</u>	
Jiv	<i>protein interacting with viral protein</i>
<u>K</u>	
K	Kalium
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KID	kulturinfektiose Dosis
Konz.	Konzentration
<u>L</u>	
LacZ	β -Galaktosidase-Gen
Log	Logarithmus

M

M	molar
μ	Mittelwert
MA	<i>Macaca mulatta</i> , Rhesusaffen
mAK	monoklonaler Antikörper
MC	<i>Mean Channel</i> , mittlerer Fluoreszenzkanal
MD	<i>Mucosal Disease</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minuten
MK	Markerbereich
ml	Mililiter
mM	Milimolar
μM	Mikromolar
μl	Mikroliter
m.o.i.	<i>multiplicity of infection</i> , Infektionsmultiplizität
mRNA	Boten-RNA; <i>messenger RNA</i>
MVA	Modifiziertes Vaccinisvirus Ankara
MVA-WT	MVA-Wildtypvirus

N

Na	Natrium
NB-DNJ	N-butyldeoxynojirimycin
nep	nichtzytopathogen
NK	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
nM	Nanomol
Npro	N-terminale Autoprotease
Nr.	Nummer
NS	Nichtstrukturprotein

O

OD	<i>optical density</i> (optische Dichte)
ORF	<i>open reading frame</i> , offener Leserahmen

P

PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Saline)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PFU	<i>plaque forming units</i> (Plaques bildende Einheiten)
PDI	Prozentsatz der Inhibition
pH	<i>potentia Hydrogenium</i>
PI	persistent infiziert
p.inf.	<i>post infectionem</i>
PJ	Propidiumjodid
Poly-(A)	Polyadenylierung

R

rboIL-2	rekombinantes bovines Interleukin-2
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuclease
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	reverse Transkription

S

S	Sekunden
SFV	<i>Semliki Forest Virus</i>
SIV	<i>Simian Immunodeficiency Virus</i>
SM	<i>suckling mouse brain</i>
SNT	Serumneutralisationstest
SSC	<i>side scatter</i> , Seitwärtsstreulicht
Standardabw.	Standardabweichung
STD	Standardabweichung
STV	Saline-Trypsin-Versen-Lösung

T

Tab.	Tabelle
TGF	<i>Transforming growth factor</i>

t-RNA

Transfer-RNA

U

U

units, Einheiten

usw.

und so weiter

UTR

nicht translatierter Bereich, *untranslated region*

UV

Ultraviolett

V

V.

Vena (Vene)

v/v

Volumenanteil pro Volumenanteil (*volume per volume*)

VV

Vacciniavirus

VV-M1

Vacciniavirus München I

W

w/v

Gewichtsanteil pro Volumenanteil (*weight per volume*)

X

X-Gal

5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid

Z

z.B.

zum Beispiel

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonders danke ich Herrn Prof. Oskar-Rüger Kaaden für die freundliche Aufnahme in seinem Institut, die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes und für die Unterstützung meiner Arbeit.

Ein großes Dankeschön gilt Herrn Dr. Georg Wolf nicht nur für seine wertvollen Anregungen in den Bereichen Immunologie und Statistik, sondern auch für die jederzeit freundschaftlich gewährte Hilfe und Betreuung.

Astrid und Micha danke ich für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, so manches aufbauende Wort und die vielen sehr lustigen Stunden im BVD-Labor.

Claudi und Judith danke ich für ihre Hilfe bei diversen Computerproblemen und natürlich auch für die vielen netten Stunden, die ich mit Ihnen verbringen durfte.

Den Tierpflegern im Oberwiesenfeld gilt mein ganz besonderer Dank für die perfekte Betreuung meiner Tiere und die Unterstützung bei dem im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuch.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie danke ich für die mir stets entgegengebrachte Hilfsbereitschaft, den freundschaftlichen Umgang und das gute Arbeitsklima.

Ganz besonders möchte ich mich aber bei meinen Eltern bedanken, denn ohne ihre Hilfe wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Auch ihr Verständnis und ihre Unterstützung haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.