

**Aus dem Friedrich-Loeffler-Institut  
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit  
Insel Riems  
Präsident: Prof. Dr. T. C. Mettenleiter**

**Angefertigt unter der Leitung von PD Dr. M. Beer,  
Leiter des Instituts für Virusdiagnostik  
des Friedrich-Loeffler-Institutes  
Insel Riems**

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

## **Verpackte Replikons des Virus der Bovinen Virusdiarrhoe (BVDV) als neuartige Vakzine**

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

**von  
Ilia Semmler  
aus Heidelberg**

**München 2004**

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

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

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

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. Ch. Grund

Tag der Promotion: 11. Februar 2005

Meiner Familie

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Schrifttum.....</b>	<b>2</b>
2.1	Das Virus der Bovinen Virusdiarrhoe.....	2
2.1.1	Virusstruktur und -taxonomie .....	2
2.1.2	Genomstruktur und Replikation.....	3
2.2	BVDV-Bekämpfung.....	5
2.2.1	Immunität .....	5
2.2.2	BVD-Vakzinen.....	6
2.2.3	Neue Ansätze in der Vakzineentwicklung .....	8
2.3	Replikons.....	10
2.3.1	Darstellung verschiedener Replikonsysteme .....	10
2.3.2	Komplementierung von Replikons .....	13
2.3.3	Replikons veterinärmedizinisch relevanter Pestiviren.....	14
<b>3</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>16</b>
3.1	Material.....	16
3.1.1	Zellen .....	16
3.1.2	Virusisolate .....	16
3.1.3	Bakterien, Plasmide und Nukleinsäuren .....	17
3.1.4	Antikörper .....	19
3.1.5	Enzyme.....	19
3.1.6	Kits.....	19
3.1.7	Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA).....	20
3.1.8	Chemikalien und Reagenzien .....	20
3.1.9	Lösungen und Puffer.....	21
3.1.10	Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	23
3.1.11	Verbrauchsmaterialien .....	24
3.2	Methoden.....	25
3.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	25
3.2.2	Zellkulturarbeiten .....	26
3.2.3	Tierversuch .....	29
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>35</b>
4.1	<i>In vitro</i> -Charakterisierung von ncp7 $\Delta$ C .....	35
4.1.1	Transkription und Transfektion.....	35
4.1.2	Komplementierung auf PT 805-Zellen .....	36
4.1.3	Komplementierung auf PT 875 .....	39
4.1.4	Versuche zur Passagierbarkeit von komplementierten Replikons auf komplementierenden Zelllinien .....	40

4.2	Tierversuche.....	41
4.2.1	Konzept.....	41
4.2.2	Ergebnisse nach Immunisierung.....	41
4.2.3	Ergebnisse nach Testinfektion.....	50
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>63</b>
5.1	Komplementierung von ncp7 $\Delta$ C-Replikons .....	64
5.2	Immunisierung von Kälbern mit dem trans-komplementierten Replikon ncp7 $\Delta$ C zur sicheren Protektion vor einer BVDV-Infektion .....	67
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>72</b>
<b>7</b>	<b>Summary.....</b>	<b>74</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>76</b>
<b>9</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>93</b>

# 1 Einleitung

Das Virus der Bovinen Virusdiarrhoe / *Mucosal Disease* (BVDV), ein *Pestivirus* aus der Familie der *Flaviviridae*, wurde 1946 erstmals im Zusammenhang mit einer Durchfallerkrankung bei Rindern beschrieben (Olafson *et al.*, 1946). BVD/MD ist eine weltweit verbreitete Rinderkrankheit, die zu hohen ökonomischen Verlusten führt. Die Krankheit verläuft meist subklinisch, kann aber auch zu enteralen und respiratorischen Symptomen führen. Die Infektion tragender Rinder hat Fruchtschäden und Aborte zur Folge. Eine Besonderheit ist die Entstehung von persistent infizierten (PI) Tieren, die 0,5-1,5% aller Rinder in Deutschland ausmachen und hauptverantwortlich für die Virusverbreitung sind (Orban *et al.*, 1983; Liess, 1985; Liess *et al.*, 1987; Houe, 1995). Die Infektion von serologisch negativen Kühen mit nicht-zytopathogenem BVDV während des ersten Drittels der Trächtigkeit führt zu PI-Tieren, die meist gesund zur Welt kommen und das Virus lebenslang in großen Mengen ausscheiden.

Bekämpft wird die BVD/MD in Deutschland unter anderem durch Impfung. Dies gestaltet sich jedoch schwierig, da die Anforderungen an eine BVD-Vakzine so hoch sind, dass sie bisher von keiner kommerziell erhältlichen Vakzine vollständig erfüllt werden. Zur Auswahl stehen attenuierte Lebendvakzinen, die zwar eine protektive Immunität induzieren, aber selbst Virämie und Impfvirusausscheidung zur Folge haben können, und inaktivierte Vakzinen, die zwar weder zu Virämie noch zu Kontaktierinfektionen, aber auch nicht immer zur vollständig belastbaren Immunität führen. Mit modernen Methoden der Molekularbiologie versucht man, die Vorteile beider Systeme zu kombinieren. Sehr vielversprechend sind dabei neben Spalt- und Vektorvakzinen sog. Pseudovirionen. Diese sind selbständig replizierende Deletionsmutanten (= Replikon), die nach *trans*-Komplementierung nicht im Stande sind, infektiöse Nachkommen zu erzeugen (= *defective in second cycle*, DISC).

Ziel der vorliegenden Arbeit war die *in vitro*-Charakterisierung und *Trans*-Komplementierung eines BVDV-Replikons (ncp7 $\Delta$ C) und die anschließende experimentelle Immunisierung von Kälbern mit komplementierten ncp7 $\Delta$ C-Pseudovirionen, wobei deren Immunogenität und Eignung als neuartiger BVD-Impfstoff experimentell geprüft wurde.

## 2 Schrifttum

### 2.1 Das Virus der Bovinen Virusdiarrhoe

#### 2.1.1 Virusstruktur und -taxonomie

Das Virus der Bovinen Virusdiarrhoe (BVDV) ist als Mitglied des Genus *Pestivirus* ein behülltes Virus mit einem Durchmesser von 40-60 nm, das aus viraler RNA, einem sie umgebenden Kapsid und einer Virushülle besteht (Gray und Nettleton, 1987; Moennig und Plagemann, 1992). Die Virushülle wird von den drei Glykoproteinen E<sup>RNS</sup>, E1 und E2 gebildet (Chu und Zee 1984; Coria *et al.*, 1983; Enzmann und Weiland, 1978; Horzinek *et al.*, 1967). E<sup>RNS</sup>, das im Gegensatz zu E1 und E2 keinen Membrananker besitzt, ist der Lipidhülle vermutlich locker assoziiert (Weiland *et al.*, 1992). BVDV ist nahe verwandt mit dem Virus der Klassischen Schweinepest (CSFV) und dem Border Disease Virus (BDV) des Schafes (Collett *et al.*, 1988(a); Korn, 1977; Pringle, 1998; van Regenmortel *et al.*, 2000). Die Familie der *Flaviviridae* beherbergt neben dem Genus *Pestivirus* das Genus *Flavivirus* mit dem Gelbfiebervirus als Namensgeber und das Genus *Hepacivirus* mit einem einzigen Vertreter, dem Hepatitis C-Virus (HCV) des Menschen (Pringle, 1998). Alle Pestiviren sind imstande diverse Wiederkäuer und Schweine zu infizieren, wobei BVDV das breiteste Wirtsspektrum hat (Nettleton *et al.*, 1980; Doyle und Heuschele, 1983; Fernelius *et al.*, 1973; Taylor *et al.*, 1977).

Das BVDV wird aufgrund seiner Genomstruktur in die zwei Genotypen BVDV Typ I und BVDV Typ II eingeteilt (Becher *et al.*, 1997; Beer und Wolf, 1999, Pellerin *et al.*, 1994; Ridpath und Bolin, 1997), wobei in Deutschland BVDV Typ I vorherrschend ist und BVDV Typ II nur selten angetroffen wird (1-11%) (Wolfmeyer *et al.*, 1997; Beer und Wolf, 1999). Beide Genotypen unterscheiden sich weiterhin stark in ihren antigenetischen Eigenschaften, so dass sie serologisch eindeutig unterscheidbar sind und gegenseitig keine oder geringe protektive Immunität induzieren. Je nach Quelle werden die Genotypen in unterschiedlich viele Subtypen eingeteilt. Ridpath und Bolin (1998) unterscheiden BVDV Typ Ia und Ib, während Giangaspero und Mitarbeiter (1997) BVDV Typ Ia bis Ic und Becher und Mitarbeiter (1999) sogar BVDV Typ Ia bis Ie differenzieren. BVDV wird aufgrund seines Verhaltens in Zellkultur in zwei Biotypen – zytopathogen (cp) und nicht-zytopathogen (ncp) – einge-

teilt. Cp BVDV führen in Zellkultur aufgrund virusinduzierter Apoptose zur Zerstörung des Zellrasens (zytopathogener Effekt; CPE) (Zhang *et al.*, 1996; Hoff und Donis, 1997; Lambot *et al.*, 1998). Nicht-zytopathogene BVDV führen zu keiner lichtmikroskopisch sichtbaren Veränderung in Zellkulturen, lassen sich in ihnen aber effektiv passagieren und können daher unerkannte Kontaminanten von Zellkultur-Medien oder Impfstoffen, die fetales Kälberserum enthalten, sein (Levings *et al.*, 1991). Ncp BVDV sind es auch, die von persistent infizierten (PI) Kälbern ausgeschieden werden, solange sie nicht an *Mucosal Disease* (MD) erkrankt sind. Wird ein Virämiker mit einem antigenetisch eng verwandten cp BVDV superinfiziert oder rekombiniert das eigene ncp BVDV durch Insertion oder Duplikation viraler oder zellulärer Sequenzen innerhalb der NS2/3-Region, erkrankt das Tier an MD (Tautz *et al.*, 1998). Somit können je ein cp und ein ncp BVDV ein Viruspaar bilden (sog. *matching pair*).

### 2.1.2 Genomstruktur und Replikation

Das Genom des BVDV besteht aus einer einzelsträngigen, positiv orientierten RNA von etwa 12,3 kb Länge (Collett *et al.*, 1988b; Coria *et al.*, 1983; Meyers *et al.*, 1989). Es kodiert für einen einzigen offenen Leserahmen (*open reading frame*; ORF), der von einer 5' und einer 3'-*untranslated region* (UTR) flankiert wird. Die etwa 385 Nukleotide lange 5'-UTR bildet eine komplexe Sekundär- und Tertiärstruktur mit haarnadelförmigen Schleifen (Brown *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1995), die die *internal ribosomal entry site* (IRES) enthält, die eine cap-unabhängige Translation erlaubt (Pestova und Hellen, 1999; Poole *et al.*, 1995; Rijnbrand *et al.*, 1997). Desweiteren enthält die 5'-UTR Sequenzen, die für die Synthese von Plus-Strang-RNA (RNA<sup>+</sup>), die Translationsregulation und die Verpackung des viralen Genoms verantwortlich sind (Becher *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2000). Die bei Pestiviren weniger konservierte 3'-UTR umfasst ca. 200 Nukleotide (Collett *et al.*, 1988a; Donis, 1995), die zwei Haarnadelstrukturen enthält.

Der offene Leserahmen zwischen den nicht-translatierten Regionen kodiert für ein einziges ca. 4000 Aminosäuren umfassendes Polyprotein, das durch zelluläre und virale Proteasen ko- und posttranslational prozessiert wird (Abbildung 1). Die viralen Strukturproteine (C, E<sup>RNS</sup>, E1 und E2) befinden sich im aminoterminalen Bereich



des Proteins hinter der Autoprotease N<sup>pro</sup>; an sie anschließend liegen carboxyterminal die weiteren Nichtstrukturproteine (p7, NS2/3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B).

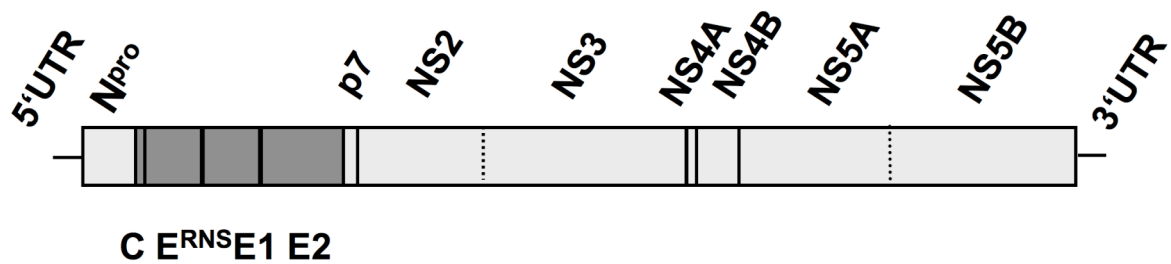


Abbildung 1: Genomorganisation von BVDV (schematisch)

Die Bindung des BVDV (*Attachment*) an die Wirtszelle und das Eindringen (*Penetration*) erfolgen über rezeptorvermittelte Endozytose (*Entry*), bei der die Glykoproteine E<sup>RNS</sup>, E2 und der zelluläre CD46-Rezeptor essentiell zu sein scheinen (Rümenapf, 2000; Iqbal *et al.*, 2000; Maurer *et al.*, 2004). Die Freisetzung der Virus-RNA aus dem Kapsid ist offensichtlich ein pH-abhängiger Schritt (Donis, 1995). Translation und Prozessierung des ORF erfolgen nach Bindung der IRES an Ribosomen am rauen Endoplasmatischen Retikulum (ER) (Poole *et al.*, 1995; Pestova und Hellen, 1999). Am N-Terminus des Polyproteins spaltet sich autokatalytisch N<sup>pro</sup> vom Kapsidprotein ab (Stark *et al.*, 1993). Im ER erfolgt anschließend die Abspaltung der Hüllproteine durch zelleigene Proteasen, überwiegend Signalasen (Rümenapf *et al.*, 1998). Die Nichtstrukturproteine werden durch die virale Serinprotease, die im NS3 bzw. im NS2/3 lokalisiert ist, zusammen mit NS4A als Kofaktor im Zytoplasma gespalten (Tautz *et al.*, 1997). Die für die Replikation notwendigen Proteine bilden den Replikationsapparat zur Synthese von Minusstrang-RNA (RNA<sup>-</sup>), die als Matrize für die Plusstrang-RNA (RNA<sup>+</sup>) dient (Gong *et al.*, 1996). Dabei wird angenommen, dass 10-15 mal mehr RNA<sup>+</sup> als RNA<sup>-</sup> gebildet wird, was frühestens sechs Stunden nach der Infektion nachweisbar ist (Behrens *et al.*, 1998; Gong *et al.*, 1996; Moser *et al.* 1999). Es ist bisher nicht bekannt, durch welche Signale die Verpackung der RNA<sup>+</sup> in die Kapside eingeleitet wird. Zusammenbau und Reifung der Virionen erfolgen schließlich im ER und Golgi-Apparat (Ohmann, 1990; Gray und Nettleton, 1987). Die reifen Virionen werden anschließend durch Exozytose virushaltiger Membranvesikel ausgeschleust (*Budding*) (Ohmann, 1990) (Abbildung 2).

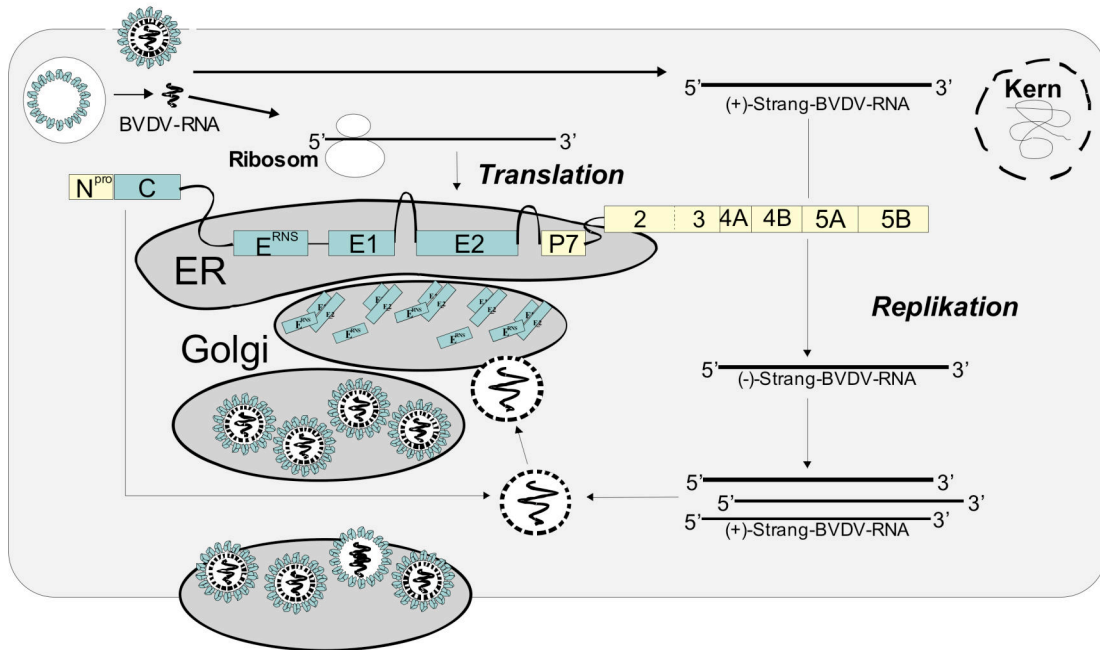


Abbildung 2: Schema des Replikationszyklus von BVDV in der Zelle (Darstellung nach von Freyburg, 1999)

## 2.2 BVDV-Bekämpfung

Zur Bekämpfung der BVDV eignen sich zwei Methoden, die sich auch kombinieren lassen. Erstens die Merzung der PI-Tiere und zweitens die Immunisierung der Rinderpopulation gegen BVDV. Während die skandinavischen Länder Dänemark, Schweden und Finnland durch eine Nicht-Impfpolitik und strenge Seuchenmaßnahmen BVDV-frei geworden sind (Bitch und Ronsholt, 1995; Lindberg und Alenius, 1999; Greiser-Wilke *et al.*, 2003), setzt Deutschland auf die Detektion von PI-Tieren und die Impfung. Seit 2004 ist die Liste der anzeigepflichtigen Tierseuchen um die Bovine Virusdiarrhoe erweitert worden (BANz. Nr. 145, Seite 17386 vom 15. Juli 2004). Für die Impfung gegen BVDV stehen zwei Systeme zur Verfügung: attenuierte Lebendvakzinen und inaktivierte Vakzinen. Um jeweils Vor- und Nachteile derselben und die daraus resultierende Problematik darzulegen, ist es notwendig, auf die Mechanismen der Immunität einzugehen.

### 2.2.1 Immunität

Die natürliche Infektion mit BVDV induziert in immunkompetenten Tieren eine umfassenden Protektion in Form von hohen neutralisierenden Antikörper-Titern und effektiver zellulärer Immunität, die zur Beseitigung von ncp Virus führt und vermutlich mehrere Jahre vor einer erneuten BVDV-Infektion schützt (Potgieter, 1995).

Immunkompetente Rinder entwickeln nach einer Infektion mit BVDV einerseits eine humorale (B-Zellen) und andererseits eine zelluläre (T-Zellen) Immunität (Collen und Morrison, 2000; Potgieter, 1995). Immunogen wirken dabei die viralen Proteine E<sup>RNS</sup>, E2 und NS3, wobei nur E2 neutralisierende Antikörper zu induzieren vermag (Collen *et al.*, 2002; Donis und Dubovi, 1987; Donis *et al.*, 1988; Weiland *et al.*, 1989). Da das E2-Protein stammspezifisch ist, ist die humorale Immunität ebenfalls nur für das Virus optimal, das sie induziert hat. Die Titer neutralisierender Antikörper können zwischen heterologen BVDV-Stämmen um den Faktor 100 schwanken (Wolfmeyer *et al.*, 1997). Aufgrund fehlender Proteinexpression auf der Zelloberfläche ist es unwahrscheinlich, dass es zusätzlich eine Antikörper-vermittelte Zytotoxizität gibt (Beer *et al.*, 1997; Grummer *et al.*, 2001). Im Gegensatz zur humoralen Immunität, deren Aufgabe es ist, freie, im Blut und in Sekreten vorkommende Virionen zu komplexieren, sorgt die zelluläre Immunität durch die Aktivierung BVDV-spezifischer zytotoxischer T-Zellen für die Beseitigung ncp-Virus-infizierter Zellen (Beer *et al.*, 1997). Für die Induktion einer soliden zellulären Immunität ist es allerdings essentiell, dass sich replikationsfähiges Virus im Organismus befindet, das imstande ist, virale Proteine intrazellulär zu exprimieren (Zinkernagel, 1994).

Persistent infizierte Rinder, die durch eine Infektion mit einem ncp BVDV im ersten Drittel der Gestation infiziert wurden und überlebten, bilden keine spezifische Immunität gegen „ihr“ BVDV aus, da sie sich zum Zeitpunkt der Infektion im immuntoleranten Stadium befanden und „ihr“ BVDV als „körpereigen“ erkennen. Sie scheiden das Virus in der Regel reaktionslos aus und sind Hauptursache für die Weiterverbreitung von BVDV in der Rinderpopulation (Orban *et al.*, 1983; Liess, 1985; Liess *et al.*, 1987; Houe, 1995). Im Falle einer Superinfektion mit einem antigene-tisch identischen cp BVDV sind sie nicht in der Lage dieses zu bekämpfen und sterben an MD (Fritzemeier *et al.*, 1995). PI-Tiere können allerdings gegen eine heterologe Superinfektion mit BVDV, z. B. durch Impfung, regulär Antikörper bilden.

### **2.2.2 BVD-Vakzinen**

Die Anforderungen an BVD-Vakzinen sind sehr hoch. Sie müssen einerseits eine protektive Immunität hervorrufen, die der nach einer Infektion gleichkommt und dürfen gleichzeitig nicht zu diaplazentarer Übertragung und Virusausscheidung führen.

Diese Anforderungen werden bisher weder von kommerziell erhältlichen inaktivierten noch von attenuierten Lebendimpfstoffen vollständig erfüllt.

Lebendvakzinen aus attenuierten cp oder ncp BVDV induzieren oft schon nach einmaliger Applikation hohe neutralisierende Antikörper-Titer (Chapek *et al.*, 1978; Cortese *et al.*, 1998a; Haralambiev *et al.*, 1975). Als Lebendvakzine ist in Deutschland nur der Stamm *Oregon C24V* (cp) zugelassen, der eine Protektion auch gegen heterologen BVDV Typ II zu erzeugen vermag (Frey *et al.*, 2002). Jedoch wurde anhand von *Oregon C24V* belegt, dass durch die Immunisierung mit Lebendvakzinen während der Trächtigkeit alle Formen von Fruchtbarkeitsstörungen auftreten und bei Anwendung in der Frühträchtigkeit PI-Tiere erzeugt werden können (Thierauf, 1993). Um dem zu entgehen, wurden inaktivierte Impfstoffe entwickelt, die sich nicht systemisch vermehren und mit einem Adjuvans kombiniert werden (Beer, 2000; Bolin, 1995; Brownlie *et al.*, 1995; Fernelius *et al.*, 1971; Howard *et al.*, 1994; McClurkin und Coria, 1980). Wirksamkeit und Dauer der Belastbarkeit dieser Impfstoffe sind allerdings umstritten (Bolin, 1995; Wolf *et al.*, 1996), wobei mehrere Impfstoffe in der Bundesrepublik für fetale Protektion zugelassen sind. Die Prüfung des fetalen Schutzes erfolgt dabei 3-6 Monate nach Immunisierung mit verwandten BVDV-Stämmen.

Aufgrund dieser Erkenntnisse wird empfohlen, um die Sicherheit der Totvakzinen und die Effektivität der Lebendvakzinen zu kombinieren, Jungtiere einmal, bzw. Kontakttiere zweimal mit inaktivierter Vakzine vorzuimpfen und anschließend mit attenuierter Lebendvakzine zu boostern. So kann die Wahrscheinlichkeit einer Übertragung von Impfvirus auf Kontakttiere und die Entstehung von PI-Tieren minimiert werden (Hofmann, 1999).

In Tabelle 1 sind die Vor- und Nachteile der Vakzinetypen kurz zusammengefasst.

Tabelle 1: Gegenüberstellung von Vor- und Nachteilen bei Lebend- und Totimpfstoffen

	Vorteile	Nachteile
Lebendimpfstoffe	Lange Immunitätsdauer	Impferkrankung durch ungenügende Attenuierung
	Schneller Immunitätseintritt	Gefahr der Kontakttierinfektion
	Belastbare Immunität gegenüber heterologer BVDV-Infektion	MD-Erkrankung infolge Vakzination
	Einfache Herstellung	Kontaminationsgefahr der Vakzine mit ncp-BVDV
Totimpfstoffe	Keine unkontrollierte Impfvirusausbreitung	Evtl. auftretende Impfschäden
	Keine Rückmutation zu virulenten Stämmen	Vergleichsweise aufwändige Herstellung
	Keine Kontamination mit vermehrungsfähigen Fremdviolen	Langsam eintretender Impfschutz, wiederholte Applikation nötig
	Während der Gravidität applizierbar	Immunität nur begrenzt belastbar
		Kurze Immunitätsdauer

### 2.2.3 Neue Ansätze in der Vakzineentwicklung

Um eine ideale Vakzine, die jeweils die Vorteile beider bisher vorhandenen Vakzinengruppen beinhaltet, zu erhalten, setzt man mehr und mehr auf moderne, molekular-

larbiologische Verfahren. Bisher kommerziell nicht erhältliche Vakzinetypen sind Spaltvakzinen (*Subunit-Vakzinen*), DNA-Vakzinen und Vektorimpfstoffe. Neueste Veröffentlichungen beschreiben außerdem den Gebrauch von sog. „Replikons“ als Zukunft in der Virusbekämpfung (Widjoatmodjo *et al.*, 2000; van Gennip *et al.*, 2002).

Für die Generierung von Spaltvakzinen bietet sich aufgrund seiner Immunogenität und der Fähigkeit, neutralisierende Antikörper zu induzieren, das Glykoprotein E2 an. Es wurde bisher experimentell für die Immunisierung gegen CSFV (de Smit, 2000) und BVDV (Bolin und Ridpath, 1996; Bruscke *et al.*, 1999) eingesetzt. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass nur de Smit mit einer E2-Spaltvakzine, zweimalig kurz vor und kurz nach der Insemination an Sauen verabreicht, eine fetale Infektion verhindern konnte. Alle anderen Versuche, mit Spaltvakzinen eine Virämie als potentielle Gefahr für den Fetus zu verhindern, scheiterten oft bereits bei der homologen Testinfektion. Kamstrup und Mitarbeiter (1992) versuchten, Spaltvakzinen durch die Verwendung von ISCOMs (*immunostimulating complex*) als Adjuvantien effektiver zu machen. ISCOMs werden hohe stimulierende Eigenschaften, sowohl der humoralen als auch der zellulären Immunität, zugeschrieben. Veröffentlichungen, die die Protektion im Falle einer Testinfektion belegen, existieren allerdings bisher nicht.

Für die Verwendung von BVDV-E2-kodierenden DNA-Plasmiden mit einem herpesviralen Promotor zur Immunisierung liegen derzeit nur zwei publizierte Experimente vor. So wurden E2-DNA-Plasmide sowohl im Mausmodell (Harpin *et al.*, 1997) als auch bei Rindern (Harpin *et al.*, 1999) eingesetzt. Die nach mehrfacher Applikation erreichten Antikörpertiter waren für in Liposomen verpackte DNA (L-DNA) deutlich höher als für „nackte“ DNA (N-DNA). Dennoch wurde ein begrenzter Schutz für die N-DNA-immunisierten Rinder beschrieben (Harpin *et al.*, 1999).

Für den Einsatz von Vektorvakzinen zur Immunisierung gegen BVDV ist bisher vor allem die E2-Expression im Herpesvirus-1-Vektor publiziert (Kweon *et al.*, 1999; Schmitt *et al.*, 1999). Ob die neutralisierenden Antikörper, die bei den immunisierten Kälbern von Kweon 1999 induziert wurden, einer Belastungsinfektion standhalten würden, ist bisher allerdings nicht bekannt.

Als Virusvektoren für die BVDV-Immunisierung dienten bisher das Sindbis-Virus-System, das als Modell in Mäusen und Kaninchen nachweislich z.T. hohe (bis 1:10000) Antikörpertiter erzielen konnte (von Freyburg, 1999; Kühne, 2000) und das „Modifizierte Vakzinia Virus Ankara“ MVA, (Beer, 2000), das gegenüber dem Sindbis-Virus-System den Vorteil hat, dass es einer niedrigeren Sicherheitsstufe L1/S1 (statt L2/S2) angehört und in Wiederkäuerzellen das eingesetzte Fremdgen exprimieren kann.

Eine vielversprechende neue Entwicklung ist die Komplementierung von BVDV-„Replikons“, die im Folgenden ausführlich besprochen werden soll und Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist.

## 2.3 Replikons

### 2.3.1 Darstellung verschiedener Replikonsysteme

Replikons sind selbständig replizierende, nicht-infektiöse RNA-Einheiten. Ihnen fehlen im Allgemeinen alle oder zumindest einige für die Bildung von Virionen essentielle Genomregionen, so dass nur noch die Replikationsinformation im Genom vorhanden und keine Synthese von Virusnachkommen mehr möglich ist (Abbildung 3). Sie kommen entweder natürlicherweise vor, wobei sie dann ein Helfervirus für die Bildung von infektiösen Nachkommen benötigen (*defective interfering particle*), oder sie werden *in vitro* durch gezielte Deletion und ggf. Insertion von Fremdgenen synthetisiert (Behrens *et al.*, 1998; Moser *et al.*, 1999; Stettler *et al.*, 2002; Reimann *et al.*, 2003). In der Anwendung sind Replikons sehr vielfältig. Sie können permanent in Zellen exprimiert als *in vitro*-Modell dienen, wie es für HCV beschrieben ist (Lohmann *et al.*, 1999) oder als Chimären Fremdgene bis hin zu Vollängen-Genomen fremder Viren, für die es kein geeignetes Zellsystem gibt, exprimieren und für die *in vitro*-Charakterisierung verfügbar machen (Pietschmann und Bartenschlager, 2001; Ikeda *et al.*, 2002; Molenkamp *et al.*, 2003; Reimann *et al.*, 2004). Desgleichen können sie in Zellen transfiziert für die Komplementierung anderer defekter Genome als Helfer fungieren (Khromykh *et al.*, 1998; Varnavski *et al.*, 1999).

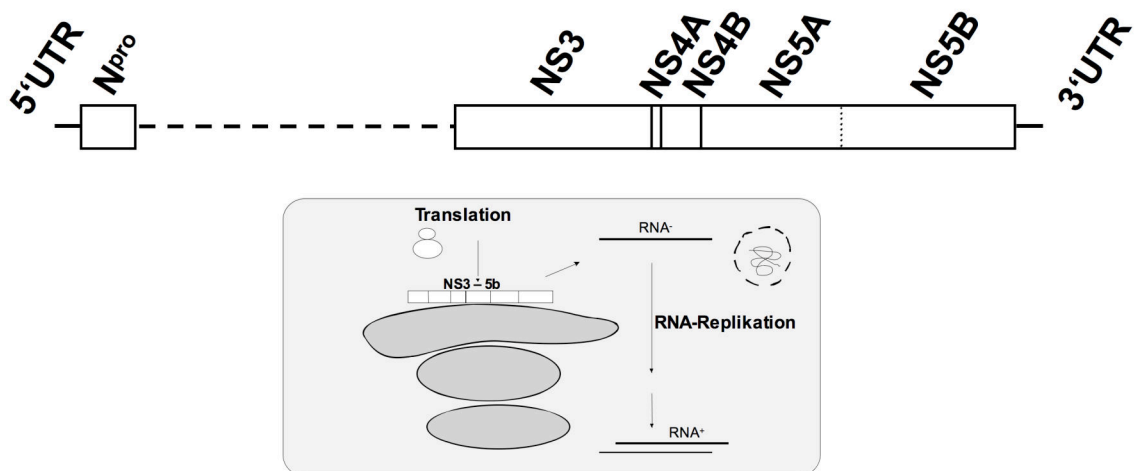


Abbildung 3: Schematische Darstellung eines BVDV-Replikons am Beispiel von DI9 und dessen intrazelluläre Replikation

Replikons können aber auch über Helferviren oder über in Zellen konstitutiv exprimierte Proteine *trans*-komplementiert werden und sogenannte Pseudovirionen bilden, die sich als attenuierte Vakzinen anbieten. Diese Pseudovirionen werden je nach Autor VLP (*virus like particles*) (Khromykh, 2000) oder DISC (*defective in second cycle*) (Reimann, 2004) genannt. In der vorliegenden Arbeit soll der Ausdruck „Pseudovirion“ benutzt werden, da der Gebrauch der Abkürzungen VLP – auch verwendet für leere Virushüllen – und DISC – ebenfalls synonym für replikationsdefekte Genome – Missverständnisse hervorrufen kann. Mit Pseudovirionen sind einmal-infektiöse Viren gemeint, die durch ein Helfersystem ihre Hülle (und somit Infektiosität) erhalten, jedoch selbst nur ein defektes, aber replikationskompetentes Genom besitzen. Nach erfolgreicher Infektion einer Zielzelle können sie sich dort vermehren und bestimmte (Fremd-) Proteine exprimieren, aber keine Virusnachkommen bilden.

Replikons auf Plusstrang-RNA-Basis haben gegenüber konventionellen DNA-basierten Expressionssystemen einige entscheidende Vorteile:

- Fremdgenexpression in hohem Maße, bei gleichzeitiger autonomer Replikation;
- Rein zytoplasmatische Replikation, was *Splicing* im Zellkern und Integration ins Wirtsgenom unmöglich macht;



- Kein *Egress* von Viren aus der Zelle, was eine hohe biologische Sicherheit bedeutet. Pseudovirionen können sich nicht replikativ im Impfling ausbreiten und daher auch nicht durch den Impfling ausgeschieden werden;
- Relativ kleines Genom (7-9 kb), was einfache Manipulationen als cDNA und effiziente Klonierungsstrategien ermöglicht.

Replikons können auf verschiedene Weise appliziert werden:

- Transfektion nackter, *in vitro*-transkribierter RNA;
- Transfektion von Plasmid DNA, die *in vivo* durch die zelluläre RNA-Polymerase II synthetisierte RNA ins Zytoplasma entlässt;
- Infektion mit verpackten Replikons (Pseudovirionen).

Obwohl die Applikation von nackter RNA beschrieben ist (Johanning *et al.*, 1995), machen es die Instabilität der RNA und die notwendige *in vitro*-Transkription schwierig, nackte RNA im großen Stil zu verabreichen. Deutlich einfacher ist es mit Plasmid-DNA, die im Stande ist, funktionale Replikon-RNA *in vivo* zu produzieren und bei deren Applikation man schwierige Schritte wie die RNA-Präparation umgeht. Replikon-RNA verpackt in Pseudovirionen verhindert den RNA-Abbau und steigert die Effektivität der Immunantwort, da sie den natürlichen Infektionsweg, z.B. bei der rezeptorvermittelten Endozytose, nachahmt.

Replikon-basierte Expressionssysteme wurden bisher für Alphaviren, Picornaviren und Flaviviren beschrieben (Khromykh, 2000).

Vorteile von Alphaviren (vertreten durch das Semliki-Forest-Virus (SFV), das Sindbisvirus und das Venezuelan Equine Encephalitis Virus (VEE)) sind die nachweislich hohe Induktion von Antikörpern (Fleeton *et al.*, 2000) sowie die Induktion einer CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Antwort (Anraku *et al.*, 2002). Die subgenomische RNA, in der die Fremdgene exprimiert werden, wird etwa 100mal mehr als die genomische Volllänge-RNA produziert. Eine sehr gute Protektion gegen Testinfektionen ist ebenfalls beschrieben (Hariharan *et al.*, 1998).

Bei Picornaviren (vertreten durch das Poliovirus und das Humane Rhinovirus 14) wird das Fremdgen anstelle der Strukturproteine VP2, VP3 und VP1 inseriert (Kaplan und Racaniello, 1988; McKnight und Lemon, 1996). Picornaviren besitzen wie

Pestiviren nur einen ORF und bilden keine subgenomische RNA, so dass Struktur- und Nicht-Strukturproteine equimolar vorliegen.

Flaviviren (vertreten durch das Kunjinvirus) bilden ebenfalls keine subgenomische RNA, haben aber Alphaviren gegenüber den Vorteil, dass sie auch nicht-zytopathogene Replikons bilden, was nachweislich zu einer prolongierten Expression der Fremdgene und somit zu einer intensiveren Immunantwort führen kann (Varnavski *et al.*, 2000).

Replikons werden nicht nur als Vakzine gegen Virusinfektionen, sondern auch als Therapiemöglichkeit tumoröser Erkrankungen experimentell eingesetzt (Cheng *et al.*, 2002), zum Beispiel bei der Bekämpfung des durch Humane Papillomaviren (HPV) ausgelösten Zervixkarzinoms. Versuche zeigten, dass Mäuse, die mit dem das HPV-Onkogen E7 exprimierenden Kunjin-Replikon immunisiert wurden, einem Tumorchallenge standhielten (Herd *et al.*, 2004).

### **2.3.2 Komplementierung von Replikons**

Ziel der Komplementierung von Replikons ist die Bildung von Pseudovirionen. Diese sind im Stande, *in vitro* und *in vivo* Zellen zu infizieren. Speziell *in vivo* bedeutet dies eine enorme Effizienzsteigerung beim Einsatz von Replikons im Rahmen von Immunisierungen. Des Weiteren entfallen zusätzliche Schritte wie DNA- oder RNA-Aufreinigung, da die von den Zellen gebildeten Virionen selbst appliziert werden.

Die Komplementierung kann auf verschiedene Weise erfolgen.

Polioviren werden durch die Transfektion von *in vitro*-transkribierten RNAs in Zellen generiert, die bereits zuvor mit Poliovirus-VP1-Kapsid-Vorläuferprotein-exprimierendem Vakzinia Virus infiziert wurden (Ansardi *et al.*, 1993). Die dabei entstehenden Pseudovirionen werden allerdings nicht aus den Zellen ausgeschleust (Ansardi *et al.*, 1993).

Flavivirus-Replikons werden durch zwei konsekutive Transfektionen verpackt. Dabei wird zunächst das zu transkribierende Replikon in Zellen transfiziert. 24-36 Stunden später wird ein heterologes, die fehlenden Flavivirus-Strukturproteine exprimierendes, nicht infektiöses Helfervirus (beispielsweise SFV) in dieselben Zellen transfiziert (Khromykh *et al.*, 1998; Varnavski *et al.*, 1999). Dank der im Helfervirus-Genom veränderten Anordnung der Flavivirus-Strukturproteine, ist bei dieser

Art der Komplementierung die unerwünschte Rekombinationen von Replikon- und Helfervirus-RNA fast unmöglich. Nach der Komplementierung werden die Virionen aus der Zelle ausgeschleust (Khromykh *et al.*, 1998; Varnavski und Khromykh, 1999).

Für Alphaviren existieren zwei Komplementierungsmechanismen. Zum einen die Kotransfektion von Alphavirus-Replikon und DH (*defective helper*)-RNA (Liljeström und Garoff, 1991; Bredenbeek *et al.*, 1993), zum anderen die Transfektion des Alphavirus-Replikons in eine Alphavirus-Strukturprotein-exprimierende Zelllinie (Polo *et al.*, 1999). Speziell wenn die Strukturproteine auch hier in veränderter Reihenfolge, als natürlicherweise im Genom vorliegend, exprimiert werden, vermindert sich die Gefahr unerwünschter Rekombinationen, sie ist jedoch nicht vollständig ausgeschlossen. Auch diese Pseudovirionen werden in den Zellkulturüberstand abgegeben (Bredenbeek *et al.*, 1993; Liljeström und Garoff, 1991).

### **2.3.3 Replikons veterinärmedizinisch relevanter Pestiviren**

Replikons bei Pestiviren ähneln aufgrund ihrer Verwandtschaft denen der Flaviviren. Wie eingangs beschrieben besitzen Pestiviren mehrere Strukturproteine. Die Deletion aller oder einiger Strukturproteine führt zur Bildung von Replikons.

Prototyp des BVDV-Replikons ist das *defective interfering particle* DI9, dem außer den Strukturproteinen auch p7 und NS2 fehlen, so dass NS3 direkt an N<sup>pro</sup> anschließt (Tautz *et al.*, 1994). DI9 wurde zusammen mit einem Helfervirus als CP9-Virusstock publiziert. Es stellte sich heraus, dass CP9, zytopathogen in Zellkultur, aus einem nicht-zytopathogenen Helfervirus und jenem defekten interferierenden Partikel (DI9) mit einer Genomlänge von 8 kb bestand (Abbildung 3 Seite 11).

Für BDV-Replikons existiert nur eine Veröffentlichung, die sich mit dem E2-bedingten Zelltropismus bei Pestiviren befasst (Liang *et al.*, 2003). Nach der Veröffentlichung des infektiösen cDNA-Klons durch Gregor Meyers (Meyers *et al.*, 1996), wurden auf dieser Basis Replikons für CSFV (Behrens *et al.*, 1997) und BVDV (Reimann *et al.*, 2002) publiziert. Replikons können komplementiert wie attenuierte Lebendimpfstoffe eine protektive Immunität erzeugen, wie für eine CSFV-Mutante mit deletierter E<sup>RNS</sup>-Region gezeigt werden konnte (Widjoatmodjo *et al.*, 2000). Für CSFV und BVDV existieren Experimente, die nach Immunisierung mit chimären CSFV/BVDV in Schweinen eine protektive Immunität gegenüber einer Testinfektion

mit CSFV belegen (van Gennip *et al.*, 2001; Reimann *et al.*, 2004). Replikons können Fremdgene auch bicistronisch exprimieren oder durch die Expression von Strukturproteinen über ein separates Cistron (zweite IRES) komplementiert werden (Stettler *et al.*, 2002).

Tabelle 2: Humanmedizinisch und veterinärmedizinisch relevante Replikons

	Humanmedizinisch relevant		Veterinärmedizinisch relevant	
	Replikon	Fremdgen	Replikon	Fremdgen
Picornaviren	HRV 14	ohne		
	Poliovirus	HIV		
Alphaviren	SFV	HCV		
Flaviviren	KUN	HPV	BDV	BVDV
	TBEV	ohne	BVDV	CSFV / ohne
	YV	HCV	CSFV	BVDV / ohne

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Zellen

PT

RIE11, permanente  
Kälbernieren-Zelllinie  
(Zellbank für Zelllinien in der  
Veterinärmedizin [ZBV] FLI  
Insel Riems)

PT 805

RIE805, siehe RIE11,  
exprimiert permanent die  
Strukturproteine C, E<sup>RNS</sup>, E1  
und E2 von BVDV (Stamm  
PT810) (Beer *et al.*  
unveröffentlichte Daten)

PT 875

RIE875; siehe RIE11,  
exprimiert permanent die  
Strukturproteine C und E<sup>RNS</sup> von  
BVDV (Stamm PT810) (Beer *et al.*  
unveröffentlichte Daten)

KOP-R

RIE244, diploide bovine  
Zelllinie, Ösopharynxgewebe  
(ZBV FLI Insel Riems)

#### 3.1.2 Virusisolate

CS8644

LMU München

ncp7

G. Meyers, FLI

PT810

LMU München

SE5508

LMU München

### 3.1.3 Bakterien, Plasmide und Nukleinsäuren

#### 3.1.3.1 Bakterien

<i>E. coli</i> -Stamm DH10B™	Invitrogen
<i>E. coli</i> -Stamm OneShot® TOP10	Invitrogen

#### 3.1.3.2 Plasmide

ncp7ΔC_969	I. Reimann, FLI
pGEM-T Easy	Promega
pCR®2.1-Topo	Invitrogen

#### 3.1.3.3 Nukleinsäuren

##### 3.1.3.3.1 Marker

1 kb DNA-Größenmarker	MBI Fermentas
-----------------------	---------------

##### 3.1.3.3.2 Primer

Die Primer wurden von der Firma MWG hergestellt. Nukleinsäure-Angaben beziehen sich auf die cp7-Sequenz (Meyers *et al.* 1997) bzw. auf die des synthetischen Gens Syn ORF des BVDV-Isolates PT810 (T. Schlapp, Bayer AG).

Tabelle 3: Primer zur Amplifizierung von PCR-Fragmenten innerhalb und außerhalb der Kapsid-kodierenden Region von ncp7 bzw. von PT810

<b>Oligo</b>	<b>Nukleotidsequenz</b> 5' → 3'	<b>Position</b> (nt)	<b>Richtung</b> (und Virus)
C-873Not	TTA AGC GGC CGC ATC ATG TCC GAC ACA AAA GAT GAA GGG	873-912	vorwärts (ncp7)
C-1178RXba	CCA ATC TAG ATT ATC CCA TTG TGA CTT CAA AGA AAA	1178- 1142	rückwärts (ncp7)
Cmod-1031R	GAC TTG GTA TTT GAC GCC GTC G	1031- 1009	rückwärts (PT810)

Tabelle 4: Plasmidspezifische Oligonukleotide für die automatische Sequenzierung

<b>Oligo</b>	<b>Nukleotidsequenz</b> 5' → 3'
M13pUC <i>Sequencing Primer</i> (-20)	GTAAAACGACGGCCAGT
M13pUC <i>Sequencing Primer</i> (-40)	GTTTTTCCCAGTCACGAC

### 3.1.4 Antikörper

#### 3.1.4.1 Monoklonale Antikörper (mAK) für die indirekte Immunfluoreszenz

Tabelle 5: mAK für IF

Bezeichnung	Subtyp	Spezifität	Referenz/Hersteller
<b>E2-Mix</b> (CA 1/2; CA34/1/2; CA3/2/22)		BVDV-E2	TiHo Hannover
<b>WB215</b>	IgG <sub>2b</sub>	BVDV-E2 Genotyp I (PT 810)	(Edwards <i>et al.</i> , 1988) CVL-Weybridge
<b>WB210</b>	IgG <sub>1</sub>	BVDV-E <sup>RNS</sup> Genotyp I (PT810)	Edwards <i>et al.</i> , 1988 CVL Weybridge
<b>C16</b>	IgG <sub>1</sub>	NS3 Pan-Pestivirus	(Peters <i>et al.</i> , 1986) (Edwards <i>et al.</i> , 1988) Dr Bommeli AG

#### 3.1.4.2 Sekundäre Antikörper

*anti-mouse* Ig ALEXA<sup>488</sup>

Molecular Probes

### 3.1.5 Enzyme

Restriktionsendonukleasen

New England Biolabs

T4 DNA Ligase

Promega

T7 RNA Polymerase

Promega

Taq-DNA-Polymerase

Qiagen

Trypsin

Serva

Für die Reaktionen wurden die vom jeweiligen Enzymhersteller mitgelieferten Puffer eingesetzt.

### 3.1.6 Kits

QIAGEN *One Step* RT-PCR Kit

Qiagen

QIAGEN Plasmid *Purification* Midi Kit

Qiagen

QIAGEN-Plasmid *Purification* Maxi Kit

Qiagen

QIAquick *Nucleotide Removal* Kit

Qiagen

QuantiTect *Probe* RT-PCR Kit

Qiagen



RiboMax™ <i>Large Scale RNA Production System-T7</i>	Promega
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Topo TA <i>Cloning Kit</i>	Invitrogen

### 3.1.7 Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA)

BVD-Virus III Chekit	Bommeli Diagnostics
Ceditest BVDV	Cedi Diagnostics B.V.
Herdcheck BVDV (Antikörper)	IDEXX

### 3.1.8 Chemikalien und Reagenzien

β-Mercaptoethanol	Merck
Aceton	Roth
Agar	Gibco
Agarose	Gibco
Amphotericin B	Sigma
Ampicillin	USB
Digitonin	Sigma
DMEM (Dulbecco´s Modified Eagle Medium)	Gibco
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure; Dinatriumsalz)	Roth
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Bio-Rad
FKS (Fetales Kälberserum)	Gibco
Gentamicin	Sigma
Glucose	Sigma
Isopropanol (2-Propanol)	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat, $\text{KH}_2\text{PO}_4$	Serva
Magnesiumchlorid, $\text{MgCl}_2$	Sigma
Magnesiumsulfat, $\text{MgSO}_4$	Merck
Methanol	Roth
Natriumdihydrogenphosphat, $\text{NaH}_2\text{PO}_4$	Merck
Natriumhydrogencarbonat, $\text{NaHCO}_3$	Merck
Natriumhydroxid, $\text{NaOH}$	Scharlau
Oligonukleotide	MWG
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma

Penicillin-Streptomycin-Lösung	Sigma
Phenol	Roth
Probenpuffer, reduzierend	Roth
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma
Trichlormethan/Chloroform	Roth
Trizol-Reagenz	Gibco
Tween 20	Bio-Rad
X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactosid)	Sigma

### 3.1.9 Lösungen und Puffer

#### Ethidiumbromidfärbelösung

0,5  $\mu$ g/ml Ethidiumbromid in *A. dest.*

#### Ladepuffer

40 % Sucrose

0,05 % Bromphenolblau

1mM EDTA

0,1 % SDS

#### LB-Agar

LB-Medium mit 1,5 % Agar

#### LB-Medium

LB-Broth

#### LB-Selektions-Agar-Platten

LB-Agar

+ 100  $\mu$ g Ampicillin/ml Agar

#### LB-Selektions-Medium

LB-Medium

+ 100  $\mu$ g Ampicillin/ml Medium

### **LB-X-Gal-IPTG-Agar-Platten für Blau-Weiß Selektion**

80 µg/ml X-Gal

250 µg/ml IPTG

### **Lysis-Puffer (pH 7,4)**

8,29 g/l NH<sub>4</sub>Cl

1,00 g/l KHCO<sub>3</sub>

0,372g/l EDTA

in H<sub>2</sub>O lösen und autoklavieren

### **PBS<sup>-</sup> (pH 7,4)**

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

### **Probenpuffer für Agarosegel-Elektrophorese**

0,25 % Bromphenolblau

0,25 % Xylencyanol FF

30 % Glycerin

in H<sub>2</sub>O lösen

### **RNA-Probenpuffer (denaturierend) für Agarosegel-Elektrophorese**

10 µl Formamid, entionisiert

3,5 µl Formaldehyd, 37% (w/v)

2 µl 10 x MOPS-Puffer

### **SOC**

2 % Bacto Trypton

0,5 % Bacto Hefeextrakt

10 mM NaCl

20 mM Glucose

10 mM MgCl<sub>2</sub>

10 mM MgSO<sub>4</sub>

**0,5 x TBE**

45 mM Tris-Borat

1 mM EDTA

**Transportmedium\_für\_Nasentupfer**

5 % inaktiviertes, BVD-freies Rinderserum

100000 IE/l Penicillin

100 mg/l Streptomycin

50000 IE/l Gentamicin

2,5 mg/l Amphotericin B

in PBS<sup>-</sup>**Trypsinlösung**

136 mM NaCl

2,6 mM KCl

8 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

3,3 mM EDTA

0,125 % Trypsin

**3.1.10 Geräte und Verbrauchsmaterialien****3.1.10.1 Geräte**

Brutschrank B6	Heraeus
CellDyn 3700	Abbott
CO <sub>2</sub> -Brutschrank QMI300VBA	Nunc
Digitalkamera CAMEDIA C-3040ZOOM	Olympus
EasyjecT™ Elektroporationssystem	EquiBio
Fluoreszenz Mikroskop IX50	Olympus
Gelelektrophoresekammern, horizontal	Bio-Rad
Geltrockner	Hofer
Horizontal-Elektrophoreseaparatur	Bio-Rad
Inkubationsschüttler C25KC	New Brunswick Scientific
Inversionsmikroskop	Nikon

Kühlwasserbad	Lauda
Labor-Zentrifugen	Hettich, Eppendorf
LICOR Automatischer Sequenzer	MWG
Megafuge 1.0 R	Heraeus
Magnetrührer	IKA
Mikrowellengerät	Quelle
pH-Meter	Knick
Pipetten	Eppendorf, Abimed
Power Pac Stromversorgungsgeräte	Bio-Rad
Präzisionswaagen	Sartorius
Sicherheitswerkbank	Heto-Holten
Thermocycler PTC-200	MJ Research
Thermomixer	Eppendorf
Transilluminator	Serva
Vertikal-Elektrophoreseapparatur	Bio-Rad
Vortex Reax	Heidolph

### **3.1.11 Verbrauchsmaterialien**

Elektroporationsküvetten 0,4 cm	Bio-Rad
Kanülen	Terume Europe N.V.
Luer-Monovetten (EDTA, Serum)	Sarstedt
Petrischalen	Costar
Pipettenspitzen	Eppendorf
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Sarstedt
Zellkulturplastikwaren	Sarstedt
Zellschaber	Nunc

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.2.1.1 *In vitro*-Transkription

Die zu transkribierende DNA wurde zunächst mittels Restriktionsendonuklease-Verdau (*Sma*I) linearisiert. Anschließend erfolgte eine Reinigung mit dem QIAquick™ Nucleotide Removal Kit (Qiagen). Abweichend von den Herstellerangaben wurde der erste Schritt (Adsorbieren der DNA an die Matrix) wiederholt. Das in sterilem Wasser aufgenommene Präzipitat wurde anschließend mit T7-Polymerase (RiboMAX™ Large Scale RNA Production System – T7) transkribiert.

Reaktionsansatz:

DNA	1 µg
5 x Transkriptionspuffer	4 µl
25 mM rNTP's	6 µl
Enzym-Mix	2 µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	ad 20 µl

Der Ansatz wurde für drei Stunden bei 37°C inkubiert und danach mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

#### 3.2.1.2 Agarosegel-Elektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese erfolgte in 1-2 %igen Gelen und wurde mit 0,5 x TBE als Gel- und Elektrophoresepuffer durchgeführt. Den Gelen wurden 100 ng/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Die Proben wurden mit ¼ Ladepuffer versetzt, auf das Gel aufgetragen und für 30 Minuten bei einer Spannung von 100 V aufgetrennt. Danach wurde die RNA unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert.

### 3.2.1.3 Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

#### Reaktionsansatz (QuantiTect™ Probe RT-PCR; Qiagen):

RNA	1-5 $\mu$ l (entspricht 1-2 $\mu$ g Gesamtzell-RNA)
2 x Probe RT-Master Mix	12,5 $\mu$ l
Vorwärts-Primer (10pM)	0,75 $\mu$ l
Rückwärts-Primer (10pM)	0,75 $\mu$ l
RT-Mix (Enzym)	0,25 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	ad 25 $\mu$ l

Mittels RT-PCR konnte die RNA bei 50°C zunächst revers transkribiert werden. Nach einem 95°C-Denaturierungsschritt, der gleichzeitig die reverse Transkriptase inaktiviert und die Taq-DNA-Polymerase startet, wurde die cDNA mittels T7-Polymerase amplifiziert. Die RT-PCR wurde im Thermocycler PTC-200 durchgeführt.

#### Zyklus-Protokoll:

Reverse Transkription	50°C	30 min	
Initiale Aktivierung	95°C	15 min	
Denaturierung	94°C	30 s	
Annealing	56°C	30 s	
Extention	72°C	1 min	
Insgesamt 30 Zyklen			
Finale Extention	72°C	10 min	abkühlen auf 10°C

## 3.2.2 Zellkulturarbeiten

### 3.2.2.1 Zellkultur-Haltung

Für die Experimente wurden KOP-R- und PT-Zelllinien verwendet. Sie wurden in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) kultiviert und mit 10 % hitzeinaktiviertem FKS supplementiert. In regelmäßigen Abständen wurden die Zellen, nach einmaligem Waschen mit PBS<sup>-</sup>, mit einer Trypsinlösung vom Untergrund gelöst und in frischem Medium resuspendiert. Ein Teil der Suspension wurde in der Zellkulturflasche belassen und der Rest je nach Anwendung auf

flasche belassen und der Rest je nach Anwendung auf weitere Flaschen verteilt oder verworfen. Die Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

### 3.2.2.2 Transfektion / Transkomplementierung

Die Transfektion erfolgte durch Elektroporation. Am Vortag geteilte, 80 % dicht gewachsene PT805-Zellen wurden nach Entfernen des Mediums und einmaligem Waschen mit PBS<sup>-</sup> mit ATV aus T175-Zellkulturflaschen abgelöst und zweimal bei 400 x g für eine Minute mit PBS<sup>-</sup> gewaschen. Pro 0,4 cm-Elektroporationsküvette wurden ca.  $1 \times 10^7$  Zellen in 700  $\mu$ l PBS<sup>-</sup> suspendiert und mit ca. 5  $\mu$ g RNA-Transkript ncp7 $\Delta$ C vermischt. Die Elektroporation erfolgte zweimal bei 850 V und 25  $\mu$ F im Elektroporator (Equibio). Anschließend wurden die Zellen aus vier Küvetten in T175-Zellkulturflaschen ausgesät und mit antibiotikahaltigem Medium bei 37°C inkubiert. Nach 24 Stunden Inkubation wurde der virionenhaltige Überstand abgenommen und in Kunststoffröhrchen bei -70°C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert. Zu den transfizierten Zellen wurde erneut Zellkultur-Medium zugegeben und für weitere 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Dieser Überstand (48 Stunden nach Transfektion geerntet) wurde ebenfalls in Kunststoffröhrchen überführt und bei -70°C gelagert.

### 3.2.2.3 Virusvermehrung

Für die Virusvermehrung wurde 1 ml Virussuspension auf eine T175-Zellkulturflasche mit dichtgewaschenen KOP-R-Zellen gegeben und bei 37°C drei Tage lang inkubiert. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand in ein Kunststoffröhrchen überführt und Zelltrümmer 10 Minuten lang bei 2000 x g sedimentiert. Der Überstand wurde in 2 ml-Kunststoffröhrchen bis zu seiner Verwendung bei -70°C gelagert.

### 3.2.2.4 Virustitration

Der Virustiter wurde in 96-Lochplatten auf KOP-R-Zellen bestimmt. Dazu wurde der virushaltige Zellkulturüberstand in Log<sub>10</sub>-Verdünnungsstufen titriert und auf Zellen drei Tage lang bei 37°C inkubiert. Die Titerbestimmung erfolgte anschließend mittels indirekter Immunfluoreszenz mit dem Anti-NS3-Antikörper C16 und dem sekundären Antikörper Alexa 488 *anti-mouse*. Der Titer wurde als Kulturinfektiöse Dosis



50 % (KID<sub>50</sub>) pro ml nach der Methode von Spaerman und Kaerber (Mayr *et al.*, 1974) angegeben.

### 3.2.2.5 Indirekter Immunfluoreszenztest

Der indirekte Immunfluoreszenztest erfolgte in Zellkulturplatten (6-Loch-, 24-Loch-, 96-Lochplatte). Zunächst wurden die Zellen mit PBS<sup>-</sup> gewaschen und mit 4 % Paraformaldehyd für 15 Minuten auf Eis fixiert. Nach einem erneuten Waschschrift erfolgte die Permeabilisierung der Zellmembranen mit 0,0025 % Digitonin für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurde zweimal mit PBS<sup>-</sup> gewaschen und der erste Antikörper für 30 Minuten zugegeben. Weiterem zweimaligen Waschen folgte der sekundäre Antikörper für 30 Minuten. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS<sup>-</sup> gewaschen und unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt.

### 3.2.2.6 Passagieren auf Zellkultur

Zur Bestimmung des Virusgehaltes der 24 und 48 Stunden nach der Transfektion in komplementierende Zellen (PT 805) geernteten Zellkulturüberstände, wurde je 1 ml Zellkulturüberstand nach einmaligem Waschvorgang mit PBS<sup>-</sup> und Mediumwechsel auf einen dichten Rasen nicht komplementierender, empfänglicher Rinderösophagus-Zellen (KOP-R) in 6-Lochplatten pipettiert und bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> für 2 Stunden inkubiert. Danach folgte einem Waschschrift der Mediumwechsel und die Inkubation über 3-5 Tage. Dann wurde der Überstand abgenommen und erneut nach Waschen und Mediumwechsel auf frische Zellen überführt. Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C wurde das Medium gewechselt und die Zellen 3-5 Tage im Brutschrank inkubiert. Die Zellen der Infektion (0. Passage) und aller weiteren Passagen wurden mit C16 als primärem und *anti-mouse* Alexa 488 als sekundärem Antikörper angefärbt, um vermehrungsfähiges Virus nachzuweisen. Der gesamte Vorgang wurde, wenn kein Virus nachgewiesen werden konnte, bis zu vier mal wiederholt.

### 3.2.2.7 RNA-Isolierung aus Zellen

#### 3.2.2.7.1 Isolierung mit Trizol-Reagent

Zur Gewinnung von RNA aus Zellkultur wurde der Zellmonolayer einer 6-Lochplatte mit 1 ml Trizol beschichtet und die Flüssigkeit bis zur vollständigen Lyse des Zellra-

sens mehrmals mit der Pipette aufgezogen und in ein 1,5 ml-Kunststoffröhrchen überführt. Nach einer Inkubation von 5 Minuten bei Raumtemperatur, darauf folgender Zugabe von 0,2 ml Chloroform pro ml Ausgangsmenge Trizol und 15 Sekunden kräftigem Schütteln, wurde erneut 2-3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgte mittels Zentrifugation (1300 x g 15 Minuten 4°C) die Auftrennung von RNA und DNA. Währenddessen wurde in einem neuen 1,5 ml-Kunststoffröhrchen 0,5 ml Isopropanol pro ml Ausgangsmenge Trizol vorgelegt und die klare, RNA-haltige Phase nach der Zentrifugation hinzugegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer zehnmütigen Zentrifugation bei 13000 x g und 4°C wurde der Überstand vorsichtig abgegossen, so dass das Präzipitat gelartig am Boden des Röhrchens zu erkennen war. Das Pellet wurde mit 1 ml 75 % Ethanol (mit RNase freiem Wasser verdünnt) pro ml Ausgangsmenge Trizol gemischt und bei 8000 x g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20-30 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen und bei -70°C gelagert.

### **3.2.3 Tierversuch**

#### **3.2.3.1 Tiere**

Die Tierversuche wurden gemäß § 8 Abs 1 des Tierschutzgesetzes unter dem Aktenzeichen 310-4/7221.3-1.1-017/01 durch die Regierung des Landes Mecklenburg-Vorpommern genehmigt.

#### **3.2.3.2 Auswahl**

Für die Versuche wurden insgesamt 25 BVDV- und BHV-1-Antikörper-freie Fleckviehkälber aus bayerischen Betrieben ausgewählt. Zwei Wochen nach der Ankunft im Versuchstierstall auf der Insel Riems wurden die vier bis fünf Monate alten Kälber erneut getestet und als BVDV- und BVD-Antikörper-frei befunden.

##### **3.2.3.2.1 Haltung**

Die Haltung der Tiere erfolgte im Isolierstallgebäude des FLI auf der Insel Riems. Im ersten Tierversuch standen beide Tiergruppen in zwei räumlich getrennten Ställen. Im zweiten Tierversuch wurde die Kontrollgruppe in einem von den immunisierten Tieren getrennten Raum gehalten, während die zwei Immunisierungsgruppen in Anbindehaltung in einem Raum gemeinsam, aber ohne direkten Kontakt zwischen

den Gruppen, gehalten wurden. Ab dem Einstalldatum wurde bei allen Tieren täglich die rektale Körpertemperatur gemessen und das Allgemeinbefinden kontrolliert. Beginn des Versuches war 2 bzw. 3 Wochen nach Einstallen der Kälber.

#### 3.2.3.2.2 Einteilung

Die Kälber, die durchweg in einem sehr guten Gesundheitszustand waren, wurden unabhängig von Alter und Größe zufällig in zwei (erster Versuch) bzw. drei Gruppen (zweiter Versuch) eingeteilt. Dabei bestand jede Gruppe aus fünf Tieren. In jedem Versuch waren eine Kontrollgruppe, die nicht immunisiert wurde, und eine bzw. zwei Immunisierungsgruppen enthalten.

Tierversuch 1:

Ohrmarken-Endziffern der Kälber in Gruppe 1 (Vakzinegruppe): 173, 537, 554, 758, 997

Ohrmarken-Endziffern der Kälber in Gruppe 2 (Kontrollgruppe): 97, 99, 172, 610, 611

Tierversuch 2:

Nummerierung der Kälber in Gruppe 3 (= zweimal immunisiert): 1, 2, 3, 4, 5

Nummerierung der Kälber in Gruppe 4 (= Kontrollgruppe): 6, 7, 8, 9, 10

Nummerierung der Kälber in Gruppe 5 (= einmal immunisiert): 11, 12, 13, 14, 15

#### 3.2.3.2.3 Immunisierung

Für die Immunisierungen wurden jeweils *trans*-komplementierte ncp7ΔC-Pseudovirionen verwendet. Der Titer der Immunisierungslösungen im ersten Tierversuch betrug nach Rücktitration  $10^{5,625}$  KID<sub>50</sub>/ml (erste Immunisierung) bzw.  $10^{6,125}$  KID<sub>50</sub>/ml (zweite Immunisierung). Im zweiten Tierversuch lagen die Titer nach Rücktitration bei  $10^6$  bzw.  $10^{5,875}$  KID<sub>50</sub>/ml.

Tierversuch 1 (TV 1): Die Vakzinegruppe (Gruppe 1) wurde **zweimal** im Abstand von 29 Tagen mit jeweils 2 ml oben genannter Immunisierungslösung **intramuskulär** (i.m.) und **intranasal** (i.n.) immunisiert. Die Kontrollgruppe (Gruppe 2) wurde nicht immunisiert (Abbildung 4).

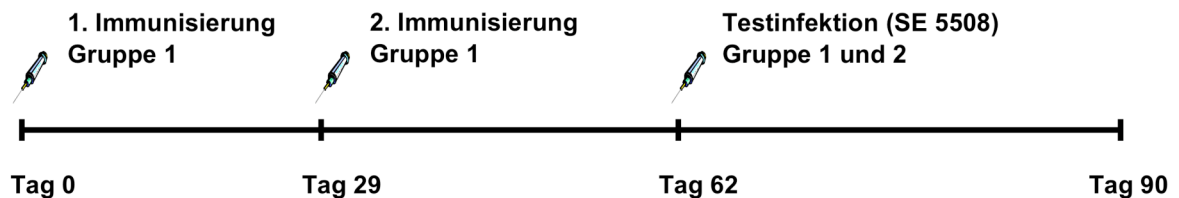


Abbildung 4: Immunisierungsschema in Tierversuch 1

Tierversuch 2 (TV 2): Gruppe 3 wurde **zweimal** im Abstand von 28 Tagen mit jeweils 2 ml oben genannter Immunisierungslösung **i.m.** immunisiert. Gruppe 5 wurde **einmal** an Tag 28 des Versuches mit 2 ml Immunisierungslösung **i.m.** immunisiert. Die Kontrollgruppe (Gruppe 4) wurde nicht immunisiert (Abbildung 5).

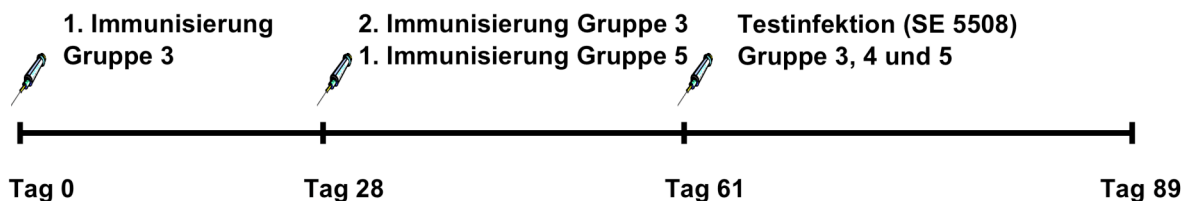


Abbildung 5: Immunisierungsschema in Tierversuch 1

Die i.m.-Immunisierungen erfolgten jeweils als Injektion in den M. quadriceps. Die intranasale Applikation der Immunisierungslösung erfolgte mittels auf eine Glasspritze aufgesetzten Zerstäuber.

#### 3.2.3.2.4 Testinfektion

Als Virus für die Testinfektion diente der Stamm SE5508 (BVDV Typ Ib, Wolfmeyer *et al.*, 1997).

Die Infektion erfolgte, den natürlichen Infektionsweg nachahmend, intranasal mittels auf eine Glasspritze aufgesetzten Zerstäuber. Beide Geräte wurden vor Gebrauch ausgekocht und mit sterilem PBS<sup>-</sup> ausgespült. Es wurden 2 ml einer auf 10<sup>6</sup> KID<sub>50</sub>/ml verdünnten, auf Eis transportierten Virussuspension an Tag 61 (TV 1), bzw. an Tag 62 (TV 2) appliziert. Die Verdünnung der Virussuspension erfolgte vor Ort, bzw. im Labor auf Eis in Zellkulturmedium. Nach der Applikation wurde eine

geringe Menge der Lösung im Labor zur erneuten Titerstimmung auf KOP-Zellen im 8-fach Ansatz rücktitriert.

### 3.2.3.3 Probengewinnung, -verarbeitung, -lagerung

#### 3.2.3.3.1 EDTA-Blut- und Serumproben

Die für die virologischen und serologischen Tests benötigten Serum- und mit EDTA gerinnungsgehemmten Blutproben wurden durch Punktion der V. jugularis gewonnen und bis zur Verarbeitung und endgültigen Lagerung auf Eis transportiert.

Nach gründlichem Durchmischen wurde in der EDTA-Blutprobe per automatischer Zählung (CellDyn 3700, Abbott) die Leukozytenzahl bestimmt und ein Differentialblutbild erstellt.

Für die virologische Untersuchung der Leukozyten wurde anschließend in jeder Blutprobe eine  $10^7$  Leukozyten enthaltende Menge Blut entnommen und 1:4 in Lysispuffer verdünnt. Nach Erythrolyse bei 4°C wurde nach zweimaligem Waschen mit PBS<sup>-</sup> und Zentrifugationsschritten von 10 Minuten bei 2000 x g das Leukozytenpellet in 1 ml PBS<sup>-</sup> resuspendiert.

Je  $10^6$  Leukozyten wurden am Tag der Probenentnahme im Doppelansatz auf Zellkulturplatten mit KOP-R-Zellen verimpft und für 4-5 Tage bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Die Lagerung der verbleibenden Leukozyten und des restlichen EDTA-Blutes erfolgte bei -70°C.

Die Seren wurden nach Übernachtslagerung bei 4°C für 15 Minuten bei 2000 x g zentrifugiert und der Überstand in Kunststoffröhrchen überführt. Je ein Probenröhrchen pro Tier und Tag der Serumgewinnung wurde bei 56°C für 30 Minuten im Wasserbad inaktiviert. Die Lagerung erfolgte bis zur Durchführung von ELISA und SNT bei -20°C.

#### 3.2.3.3.2 Nasentupfer

Für die virologische Untersuchung wurden mittels Wattestab, der tief in den Nasenraum eingeführt und darin kurz gedreht wurde, Zellen und Sekret des Nasenschleimhautepithels entnommen und in 1 ml Transportmedium auf Eis ins Labor transportiert.

Dort wurde die Probe vor Überführung der Flüssigkeit in ein 2 ml-Kunststoffröhrchen für eine Minute gründlich mittels Vortex geschüttelt. Zur virologischen Untersuchung wurden pro Tier 100  $\mu$ l Nasentupferprobe im Doppelansatz am Tag der Probengewinnung auf KOP-R-Zellen angeimpft. Bis zur Auswertung mittels Immunfluoreszenzfärbung wurden die Proben 4-5 Tage bei 37°C und 5 % Co<sub>2</sub> inkubiert.

Die restliche Flüssigkeit wurde bei –70°C gelagert.

#### 3.2.3.4 Virusisolierung

Die Virusisolierung aus Nasentupfern und Leukozyten erfolgte in 24-Lochplatten. Dafür wurde das Medium der am Vortag ausgesäten Zellen (KOP-R) gewechselt und jeweils 100  $\mu$ l Nasentupferprobe bzw. Leukozytensuspension (10<sup>6</sup> Leukozyten) zugegeben. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>. Die Zellen wurden täglich auf Pilzkontamination oder mögliche Zytotoxizität kontrolliert. Nach 4-5 Tagen wurde der Überstand abgenommen und bis zur Auswertung bei –70°C gelagert. Vorhandene Virusproteinexpression wurde mittels Immunfluoreszenz-Färbung der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. Im Falle des Virusnachweises wurde der vorher gesicherte Überstand weiterpassagiert und nach 4-5 Tagen erneut mittels Immunfluoreszenz untersucht.

#### 3.2.3.5 Serumneutralisations-Test

Der Serumneutralisations-Test (SNT) wurde in 96-Lochplatten durchgeführt. Bei jedem Test wurde jeweils ein negatives und ein positives Kontrollserum mitgeführt, und der Titer des Virus per Rücktitration in log<sub>10</sub> Schritten als 8-fach-Ansatz überprüft. Je Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Nach Vorlage von 50  $\mu$ l Medium in alle Vertiefungen außer denen der Reihe A, wurde in die Reihe A 100  $\mu$ l Serum pipettiert. 50  $\mu$ l davon wurden per Mehrkanalpipette in Reihe B überführt. Nach Spitzenwechsel wurde die Flüssigkeit in Reihe B durch 10maliges Auf- und Niederpipettieren gemischt und 50  $\mu$ l davon in Reihe C überführt. Dies wurde wiederholt, bis die gewünschte Verdünnungsstufe erreicht war. 50  $\mu$ l der letzten Verdünnungsreihe wurden verworfen. Anschließend wurden 100 KID<sub>50</sub> einer Viruslösung zugegeben und alles zusammen für 2 Stunden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden in 100  $\mu$ l ca. 20000 Zellen (KOP-R) dazu gegeben und

der Ansatz 4-5 Tage bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Auswertung erfolgte mittels indirekter Immunfluoreszenz.

### 3.2.3.6 Immunezymatischer Nachweis von Antikörpern und Antigen

#### 3.2.3.6.1 Nachweis von Strukturprotein-spezifischen Antikörpern

Zum Nachweis von Antikörpern gegen BVDV-Strukturproteine wurde ein kommerziell erhältlicher indirekter ELISA (Herdcheck® BVDV Antikörper, IDEXX) verwendet. Es wurde bei der Durchführung nach Herstellerangaben gearbeitet, wobei die Inkubationszeit stets 90 Minuten bei Raumtemperatur betrug.

#### 3.2.3.6.2 Nachweis von Nichtstrukturprotein-Antikörpern

Zum Nachweis von Antikörpern gegen das Nichtstrukturprotein NS3 wurde ebenfalls ein kommerziell erhältlicher *blocking*-ELISA (Ceditest® BVDV, Cedi Diagnostics B.V.) entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

#### 3.2.3.6.3 Nachweis von E<sup>RNS</sup>-Antigen (Capture-ELISA)

Zum Nachweis von E<sup>RNS</sup>-Antigen wurde ein kommerziell erhältlicher Antigen-*capture*-ELISA (BVD-Virus III Chekit®, Bommeli Diagnostics) verwendet. Die Testdurchführung erfolgte nach Herstellerangaben, wobei immer eine Inkubationsdauer von 90 Minuten bei 37°C gewählt wurde.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 *In vitro*-Charakterisierung von ncp7 $\Delta$ C

Ausgangskonstrukt für die Charakterisierung war der Replikon-Klon ncp7 $\Delta$ C (Reimann, 2004). Es handelt sich hierbei um eine Mutante mit einer Deletion von 126 Nukleotiden im Bereich der Basen 969 bis 1095 (Abbildung 6). Ncp7 $\Delta$ C basiert auf dem infektiösen cDNA-Klon pA/BVDV/Ins- (Meyers *et al.*, 1996), der das Vollängen-Genom des Stammes ncp7 enthält.

#### 4.1.1 Transkription und Transfektion

Die ncp7 $\Delta$ C-cDNA wurde *in vitro*-transkribiert, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und durch anschließende Ethidiumbromid-Färbung detektiert (Abbildung 6). Die transkribierte RNA wurde per Elektroporation in Rinderzellen transfiziert, um Replikation und Proteinexpression zu überprüfen. Die transfizierten Rinderzellen wurden nach 24 Stunden mit Hilfe des indirekten Immunfluoreszenz-Tests beurteilt. Da es bisher keine Kapsid-spezifischen Antikörper gibt, erfolgte die Beurteilung der Replikation und Proteinexpression durch den Nachweis der Proteine NS3, E<sup>RNS</sup> und E2, für die monoklonale Antikörper (mAk) existieren. Zum Vergleich wurden jeweils ein Vollängen-ncp7-Klon, eine replikationsdefiziente Mutante (ncp7 $\Delta$ AatII) und zusätzliche replikationskompetente Deletionsmutanten (ncp7 $\Delta$ E<sup>RNS</sup> und ncp7 $\Delta$ E2) transfiziert (Reimann *et al.*, 2003; Reimann, 2004). Bei den Mutanten ncp7 $\Delta$ E<sup>RNS</sup> und ncp7 $\Delta$ E2 konnte die Deletion bei gleichzeitiger Replikation durch die Nicht-Anfärbbarkeit der Proteine E<sup>RNS</sup> bei ncp7 $\Delta$ E<sup>RNS</sup> und E2 im Fall von ncp7 $\Delta$ E2 gezeigt werden. Für ncp7 $\Delta$ C konnte die Replikation und Expression von NS3, E<sup>RNS</sup> und E2 mittels indirekter IF nachgewiesen werden (Abbildung 6).



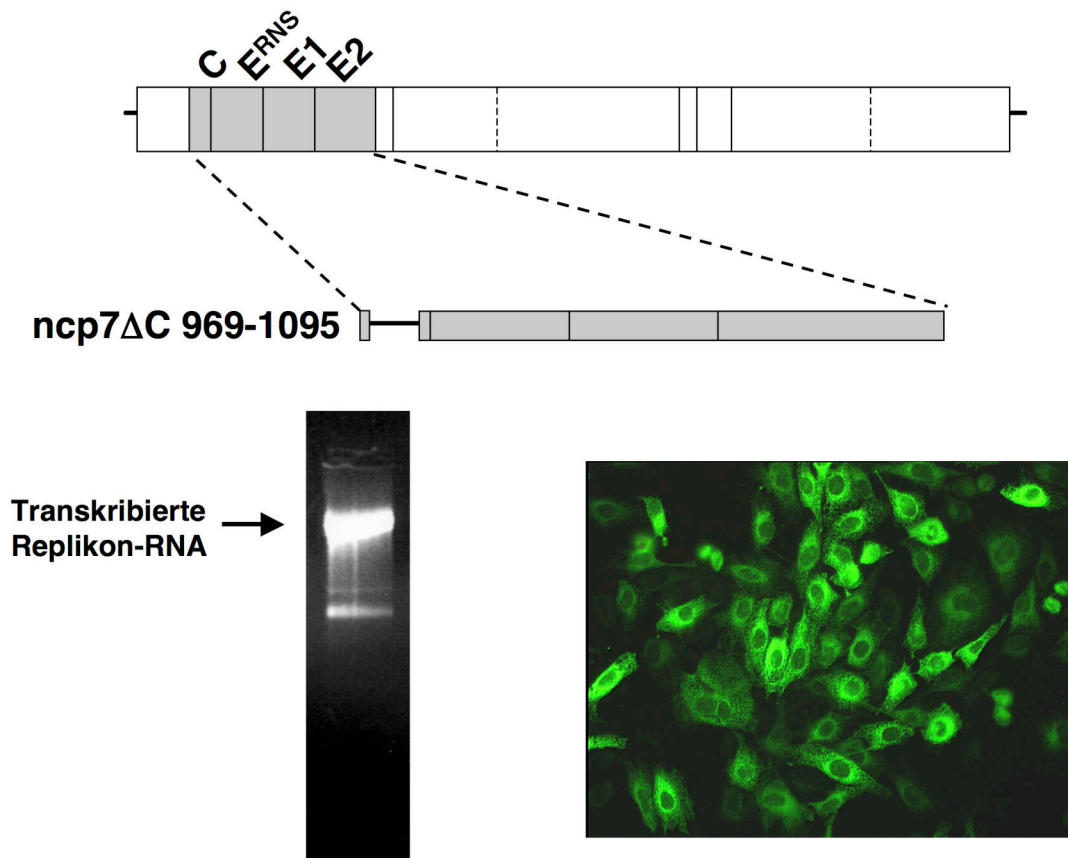


Abbildung 6: Schematische Darstellung der BVDV-Deletionsmutante *ncp7ΔC 969-1095*; Darstellung der transkribierten *ncp7ΔC*-RNA im Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel und Replikationsnachweis über den NS3-Antikörper C16 24 Stunden nach Transfektion von transkribierter *ncp7ΔC*-RNA in Rinderzellen.

#### 4.1.2 Komplementierung auf PT 805-Zellen

Durch die Transfektion in komplementierende Rinderzellen, die sämtliche BVDV-Strukturproteine exprimieren (PT 805), entstanden Pseudovirionen, die jeweils 24 und 48 Stunden nach der Transfektion geerntet werden konnten. Die durch Titration der 24- und 48-Stundenwerte auf nicht-komplementierenden Rinderzellen ermittelten Titer lagen bei maximal  $10^{6,125}$  KID<sub>50</sub>/ml (durchschnittlich  $10^5$  KID<sub>50</sub>/ml, n = 18; Abbildung 7).

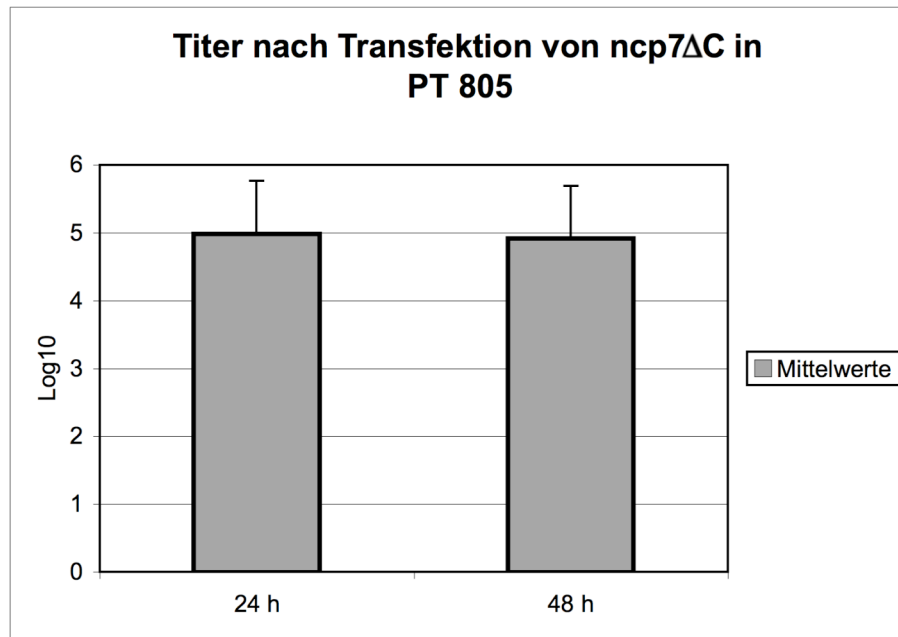


Abbildung 7: Titer nach Transfektion von ncp7 $\Delta$ C in PT 805 (n=18).

Durch Passagen auf nicht-komplementierenden Rinderzellen konnten Rekombinationen mit den BVDV-Typ Ic-Stukturproteinen der Zelllinie und Kontaminationen mit replikationskompetenten BVDV ausgeschlossen werden. Eine Infektion der empfänglichen Rinderzellen mit Pseudovirionen führte in der Regel zu 80-100 % infizierten Zellen. Nach der ersten Passage konnten dagegen nur noch Einzelzellen infiziert werden, da sich die Viren nicht mehr von Zelle zu Zelle ausbreiten konnten und keine neuen Virionen gebildet wurden. Ab der dritten Passage waren schließlich keine infizierten Zellen mehr mittels indirekter Immunfluoreszenz detektierbar (Abbildung 8).

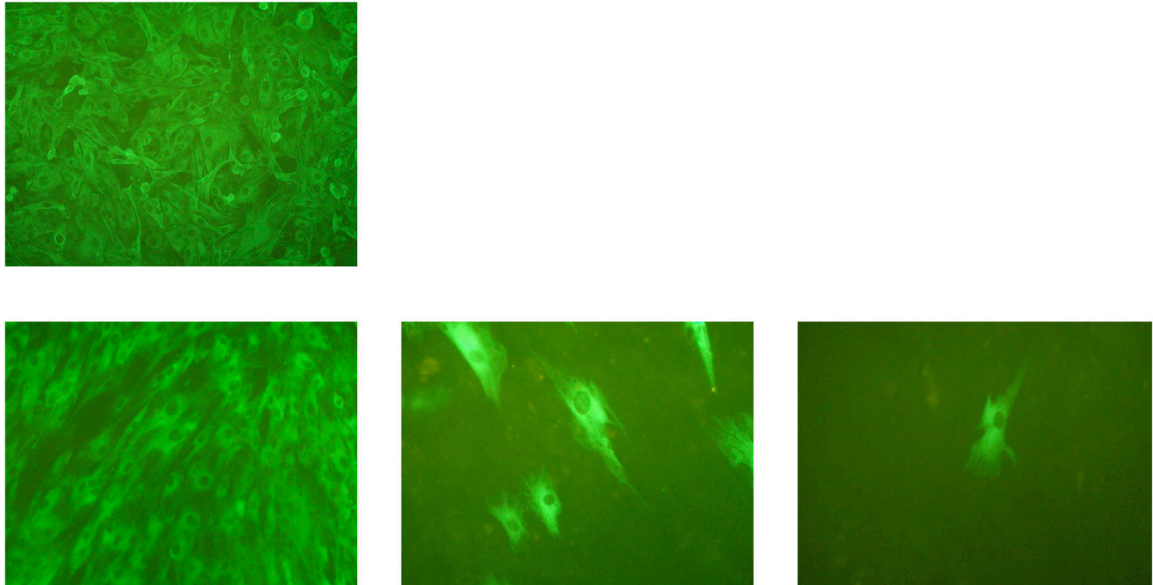


Abbildung 8: Indirekte Immunfluoreszenzfärbung: oben links ncp7 $\Delta$ C 24 h nach Transfektion in PT 805-Zellen, unten von links nach rechts: Infektion (=0. Passage), 1. und 2. Passage von *trans*-komplementiertem ncp7 $\Delta$ C auf KOP-R-Zellen.

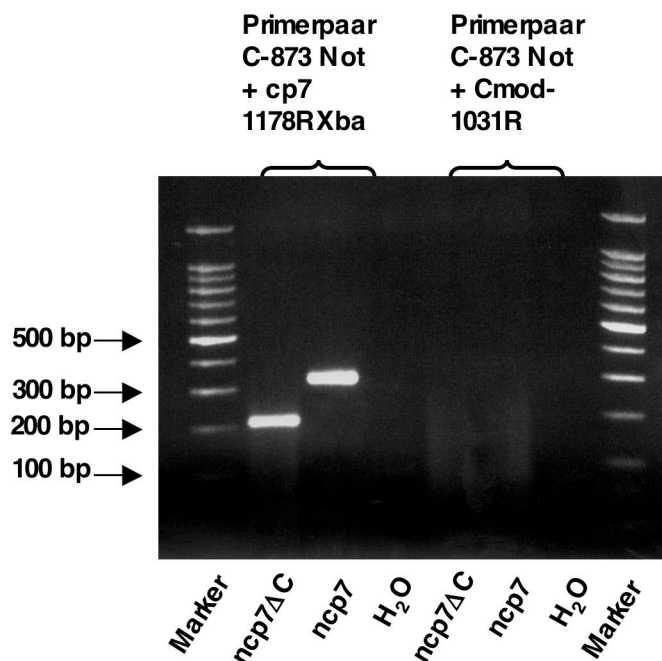
Zur weiteren Absicherung wurde RNA per Trizolreagent aus mit ncp7 $\Delta$ C-Pseudovirionen infizierten, nicht komplementierenden Rinderzellen gewonnen und mittels RT-PCR analysiert. Dabei wurden verschiedene Primerpaare gewählt, um mögliche Kontamination und Rekombination aufzudecken (Tabelle 6).

Ein Vorwärtsprimer mit ncp7-Sequenz unmittelbar vor der Deletion (Primer C-873Not) kombiniert mit einem Rückwärtsprimer innerhalb der Kapsid-Sequenz des BVDV-Stammes, der für die Generierung der komplementierenden Zelllinie verwendet wurde (Primer Cmod-1031R) und der heterolog zu ncp7 ist, ergab kein RT-PCR-Produkt (Abbildung 9).

Ein Vorwärtsprimer mit ncp7-Sequenz unmittelbar vor der Deletion (Primer C-873Not) kombiniert mit einem ncp7-Rückwärtsprimer hinter der Kapsid-Deletion (Primer C-1178RXba) ergab ein verkürztes PCR-Fragment, das der Länge der Genomsequenz minus der 126 Basenpaar-Deletion entsprach (Abbildung 9).

Tabelle 6: Theoretische Größen der PCR-Produkte nach Amplifizierung mit zwei verschiedenen Primerpaaren für ncp7 $\Delta$ C und ncp7.

Virus	PCR-Primer	Erwartete Fragmentgröße (inkl. Primerüberhänge)	Fragmentgröße bei Kontamination	Fragmentgröße bei Rekombination
Ncp7 $\Delta$ C	C-873Not C-1178RXba	212 bp	338 bp	Kein Fragment zu erwarten
ncp7 (Kontrolle)	C-873Not C-1178RXba	338 bp	338 bp	338 bp
Ncp7 $\Delta$ C	C-873Not Cmod-1031R	Kein Fragment zu erwarten	Kein Fragment zu erwarten	188 bp
ncp7 (Kontrolle)	C-873Not Cmod-1031R	Kein Fragment zu erwarten	Kein Fragment zu erwarten	Kein Fragment zu erwarten

Abbildung 9: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel der PCR-Produkte mit zwei unterschiedlichen Primerpaaren, zum Ausschluss von Kontamination und Rekombination nach *Trans*-Komplementierung von ncp7 $\Delta$ C mit PT 805 (Trizolaufreinigung von RNA nach der 0. Passage auf KOP-R-Zellen).

#### 4.1.3 Komplementierung auf PT 875

Zusätzlich zur Komplementierung auf PT 805 wurde untersucht, ob sich die Transfektionseffizienz unter der Verwendung einer weiteren komplementierenden Zelllinie steigern lässt. Im Gegensatz zu PT 805, die sämtliche BVDV-Strukturproteine exprimiert, exprimiert PT 875 nur die Strukturproteine C und E<sup>RNS</sup>. Es konnten jedoch durch die Transfektion von ncp7 $\Delta$ C-RNA in PT 875 keine höheren Transfektionstiter erreicht werden als in PT 805. Die erreichten Titer lagen mit durchschnittlich  $10^3$  KID<sub>50</sub>/ml sogar um den Faktor 100 niedriger als bei

lich  $10^3$  KID<sub>50</sub>/ml sogar um den Faktor 100 niedriger als bei Verwendung der Zelllinie PT 805 (Abbildung 10).

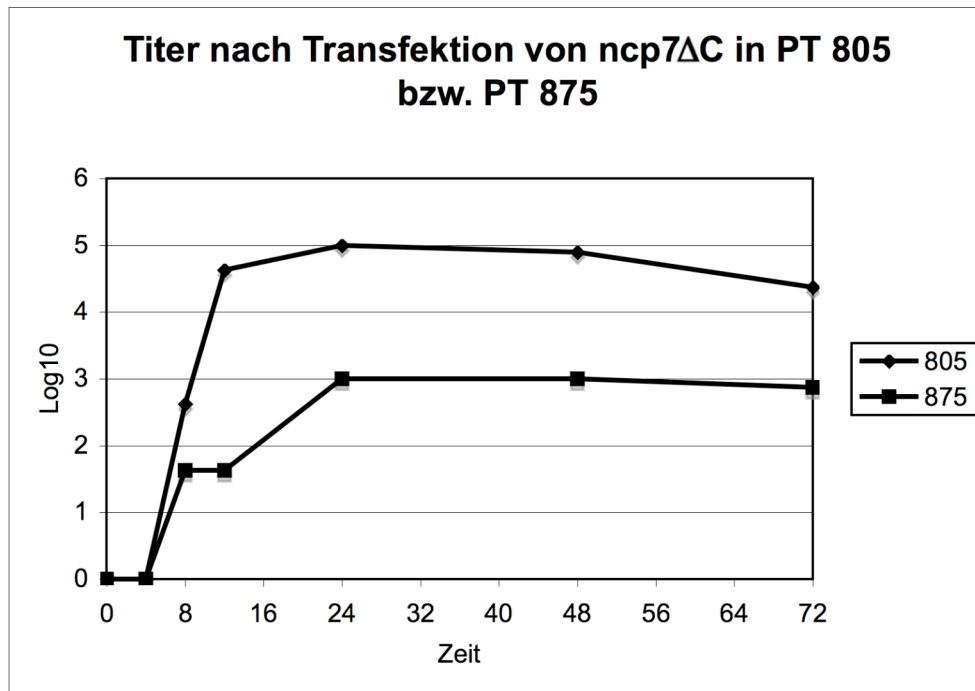


Abbildung 10: Titer nach Transfektion von *ncp7ΔC* in PT 875 im Vergleich zur Transfektion in PT 805.

#### 4.1.4 Versuche zur Passagierbarkeit von komplementierten Replikons auf komplementierenden Zelllinien

Um infektiöse Pseudovirionen für die Immunisierung der Tiere zu erhalten, war es grundsätzlich nötig, die *in vitro*-transkribierte *ncp7ΔC*-RNA in komplementierende Zellen zu transfizieren. Der virionenhaltige Überstand ließ sich ohne Titerabfall jeweils 24 und 48 Stunden nach Transfektion ernten. Um häufige Transfektionen zu vermeiden, wurde untersucht, ob sich die Replikons auf komplementierenden Zelllinien weiter passagieren lassen und so kontinuierlich infektiöse Pseudovirionen zur Verfügung stehen. Es wurden die Zelllinien PT 805 und PT 875 verwendet. Es gelang allerdings auf keiner der beiden Zelllinien, das Virus über mehr als 3 Passagen zu erhalten. Der Titer fiel rasch von  $10^6$  KID<sub>50</sub>/ml auf unter  $10^{1,5}$  KID<sub>50</sub>/ml ab, so dass in der 3. Passage nur noch Einzelzellen infiziert wurden und sich das Virus nicht weiter ausbreiten konnte.

## 4.2 Tierversuche

### 4.2.1 Konzept

Es wurden zwei Tierversuche im Abstand von 7 Monaten durchgeführt. Ziel des ersten Versuches (TV 1 mit den Gruppen 1 und 2) war, herauszufinden, ob *trans*-komplementierte ncp7 $\Delta$ C-Pseudoviren im Stande sind, eine belastbare Immunität zu induzieren. Der Tierversuch erfolgte an 10 Kälbern. Es wurden zwei Gruppen zu je fünf Tieren gebildet. Eine Gruppe (Gruppe 1) wurde zweimal im Abstand von 29 Tagen (an Tag 0 und Tag 29) jeweils intramuskulär (i.m.) und intranasal (i.n.) mit *trans*-komplementiertem ncp7 $\Delta$ C immunisiert. Die zweite Gruppe (Gruppe 2) diente als Kontrolle und wurde nicht immunisiert. Die Testinfektion mit einem heterologen BVDV Typ Ib (Stamm SE 5508) erfolgte an Tag 61.

Der zweite Tierversuch (TV 2 mit den Gruppen 3-5) baute auf den ersten Tierversuch auf. Es sollte untersucht werden, ob erstens eine einmalige Applikation mit *trans*-komplementierten ncp7 $\Delta$ C-Pseudovirionen ausreichend für einen Schutz gegen heterologen BVDV-Typ I ist und zweitens, ob die für die Praxis leichter zu handhabende i.m.-Immunsierung ausreichend für die Ausbildung einer protektiven Immunität ist. Es wurden drei Gruppen zu je fünf Tieren gebildet. Gruppe 3 wurde zweimal im Abstand von 28 Tagen i.m. mit *trans*-komplementierten ncp7 $\Delta$ C-Pseudovirionen immunisiert. Gruppe 4 diente als Kontrollgruppe für die Testinfektion. Gruppe 5 wurde einmalig am Tag 28 des Versuchs i.m. mit *trans*-komplementierten ncp7 $\Delta$ C-Pseudovirionen immunisiert. Die Testinfektion mit heterologem BVDV Typ Ib wurde bei allen drei Tiergruppen an Tag 62 des Versuches durchgeführt. Der Versuch begann an Tag null mit der ersten Immunsierung von Gruppe 3.

### 4.2.2 Ergebnisse nach Immunisierung

#### 4.2.2.1 Klinische und hämatologische Parameter

Nach den Applikationen der Pseudovirionen blieben die Kälber aller drei Immunisierungsgruppen beider Versuche klinisch unauffällig. Die Tiere zeigten kein gestörtes Allgemeinbefinden, keine erhöhte Körpertemperatur (Abbildung 11 und Abbildung 12) und keinerlei sichtbaren oder fühlbaren Reaktionen an der Impfstelle. Im Differentialblutbild konnten keine erheblichen Abweichungen im Vergleich zu den Tagen

vor der Immunisierung festgestellt werden. Die Leukozytenzahlen blieben stabil bei Werten um 100 % bezogen auf Werte von Tag 0 und -5 (Abbildung 13). Auch im zweiten Tierversuch konnte bei keiner der Tiergruppen (Gruppe 3, 2x immunisiert; Gruppe 4, Kontrollgruppe; Gruppe 5, die in demselben Raum wie Gruppe 3 aufgestellt war, 1x immunisiert) Abweichungen hinsichtlich der Körpertemperatur beobachtet werden (Abbildung 12). Die Tiergruppen 3 (1. Immunisierung an Tag 0) und 5 (1. Immunisierung an Tag 28) zeigten unabhängig von der Immunisierung einen geringgradigen Abfall der relativen Leukozytenzahlen, wobei insbesondere Gruppe 3 (zweimal immunisiert) bis zur Testinfektion auf dem etwas niedrigen Niveau verblieb. Zudem zeigte auch die Kontrollgruppe geringgradige Schwankungen in den relativen Leukozytenzahlen, z.B. zwischen Tag 35 und 42 nach der 1. Immunisierung der Gruppe 3 (Abbildung 14).

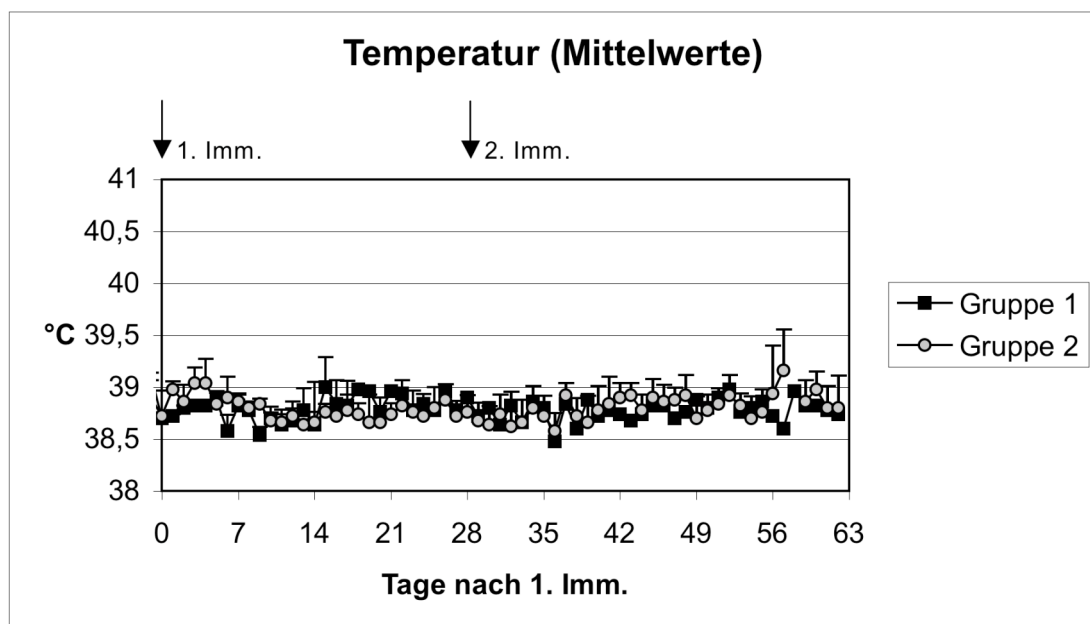


Abbildung 11: Temperaturmittelwerte der Gruppen 1 (zweimal immunisiert an Tag 0 und 29) und 2 (Kontrollgruppe) nach 1. und 2. Immunisierung in TV 1.

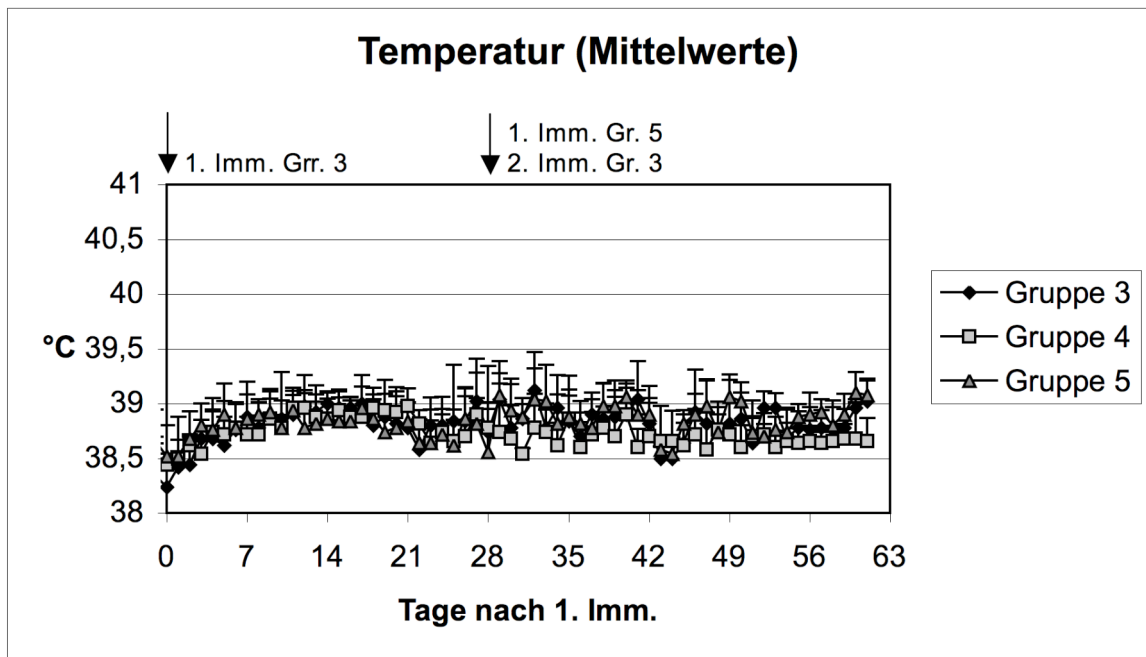


Abbildung 12: Temperaturmittelwerte der Gruppen 3 (zweimal immunisiert an Tag 0 und 28), 4 (Kontrollgruppe) und 5 (einmal immunisiert an Tag 28) nach 1. und 2. Immunisierung in TV 2.

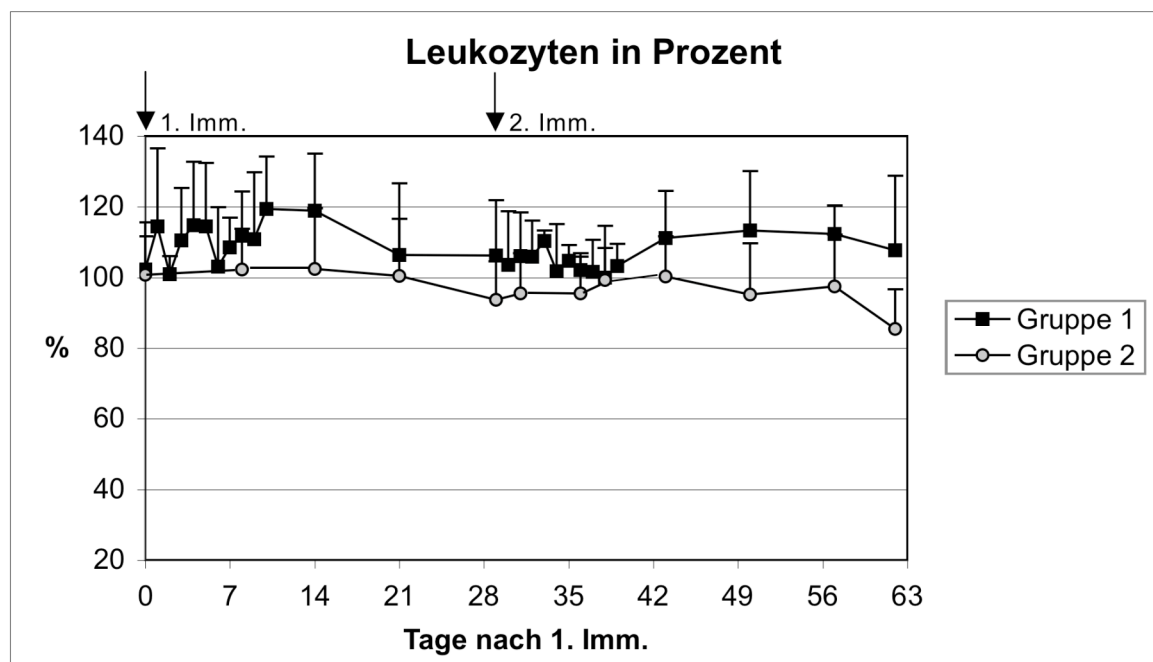


Abbildung 13: Leukozytenzahlen in Prozent als Mittelwerte für die Gruppen 1 (zweimal immunisiert an Tag 0 und 29) und 2 (Kontrollgruppe) in TV 1 nach 1. und 2. Immunisierung.



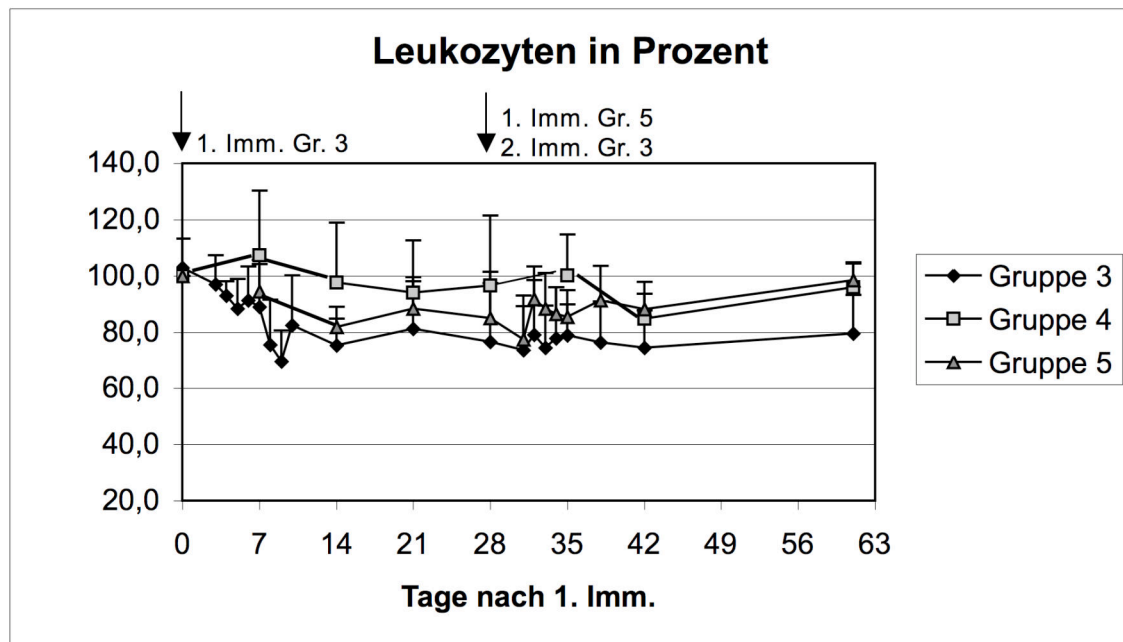


Abbildung 14: Leukozytenzahlen in Prozent als Mittelwerte für die Gruppen 3 (zweimal immunisiert an Tag 0 und 28), 4 (Kontrollgruppe) und 5 (einmal immunisiert an Tag 28) in TV 2 nach 1. und 2. Immunisierung.

#### 4.2.2.2 Virusisolierung aus Leukozyten und Nasentupfern

Nach den Immunisierungen wurden von allen Tieren jeweils  $10^6$  Leukozyten und 100  $\mu$ l Nasentupferflüssigkeit im Doppelansatz auf Rinderzellen angeimpft. Es konnte bei keinem der geimpften Tiere, weder in TV 1 noch in TV 2, Virus aus Leukozyten oder Nasentupferproben isoliert werden.

#### 4.2.2.3 Antikörper-Entwicklung

Alle Tiere reagierten zu Beginn der Versuche im BVDV Typ I- und II-spezifischen Neutralisationstest Antikörper-negativ.

##### 4.2.2.3.1 TV 1

Erste spezifische Antikörper konnten an Tag 21 nach der 1. Immunisierung im NS3-*blocking*-ELISA detektiert werden (Abbildung 15). Die Werte von Tier Nummer 173 lagen an Tag 14 mit 42% allerdings bereits nahe am ELISA-Schwellenwert von 50 %. Im Serumneutralisationstest (SNT) erreichten die vakzinierten Kälber gegen den Impfstamm am Tag der zweiten Immunisierung (Tag 29) Titer zwischen 1:16 und 1:64 (Abbildung 17). Gegen den heterologen BVDV-Stamm SE5508, der für die Testinfektion eingesetzt wurde, waren durchschnittliche Titer um 1:6 ausgebildet

worden. Nach der zweiten Immunisierung stiegen die Werte im NS3-*blocking*-ELISA bis Tag 5 nach der zweiten Immunisierung auf durchschnittlich 93 %. An Tag 16 nach der zweiten Immunisierung war die Sättigungsgrenze von etwa 100 % bei allen Tieren erreicht (Abbildung 15). Im indirekten Vollvirus-ELISA konnten Antikörper oberhalb des Schwellenwertes von 30 % erst ab Tag 5 nach der zweiten Immunisierung nachgewiesen werden. Ab Tag 7 nach der zweiten Immunisierung wurden hier durchschnittliche Werte um 80 % ermittelt, die bis zur Testinfektion nicht überschritten wurden (Abbildung 16). Im SNT gegen den homologen BVDV-Stamm ncp7 konnten am Tag der zweiten Immunisierung von Gruppe 1 mittlere Titer von 1:34 ermittelt werden. Am Tag der Testinfektion wurden bereits Titer zwischen 1:256 und 1:1024 gegen ncp7 detektiert (Abbildung 17). Gegen den heterologen Testinfektionsstamm SE5508 lagen die neutralisierenden Titer am Tag der zweiten Immunisierung bei 1:6,4 und stiegen nach der zweiten Immunisierung bis zum Tag der Testinfektion bei allen Kälbern auf über 1:256 (Abbildung 18).

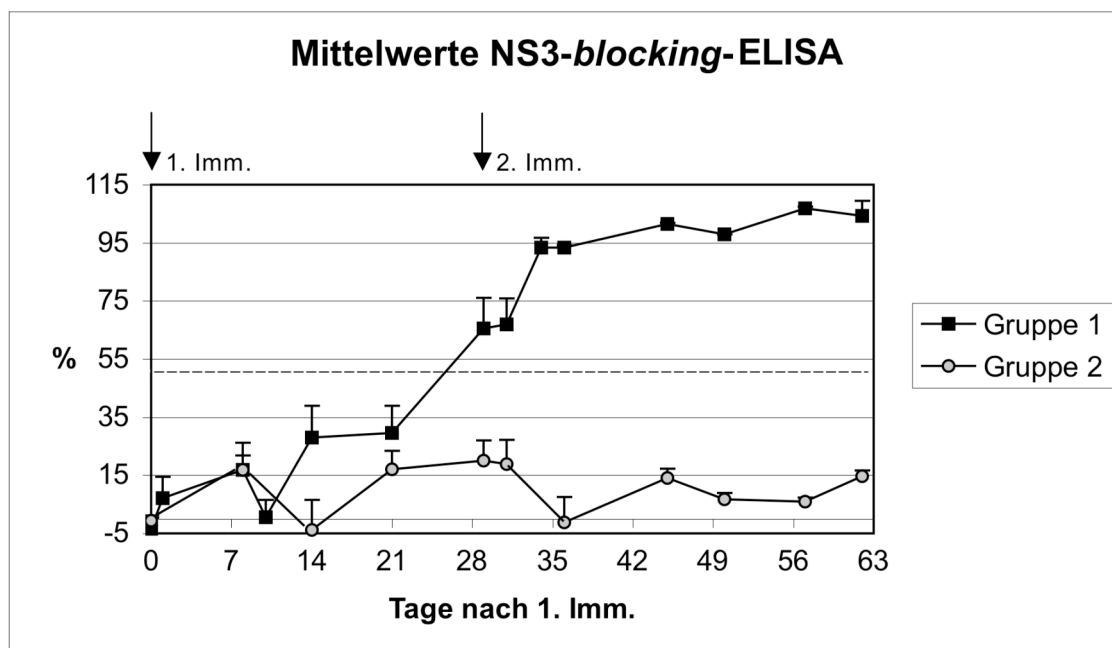


Abbildung 15: Mittelwerte nach 1. und 2. Immunisierung für die Gruppen 1 (zweimal immunisiert an Tag 0 und 29) und 2 (Kontrollgruppe) im NS3-*blocking*-ELISA in TV 1. Die gestrichelte Linie markiert den Grenzwert zum positiven Bereich des ELISA bei 50%.

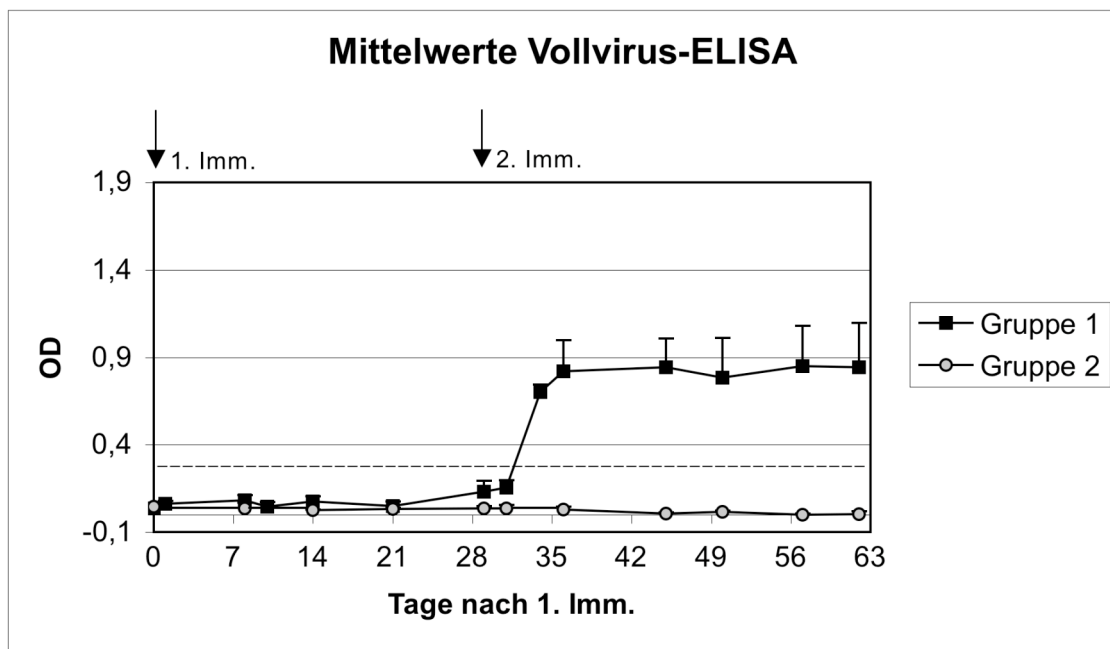


Abbildung 16: Mittelwerte nach 1. und 2. Immunisierung für die Gruppen 1 (zweimal immunisiert an Tag 0 und 29) und 2 (Kontrollgruppe) im Vollvirus-ELISA in TV 1. Die gestrichelte Linie markiert den Grenzwert zum positiven Bereich des ELISA bei einer OD von 0,3.

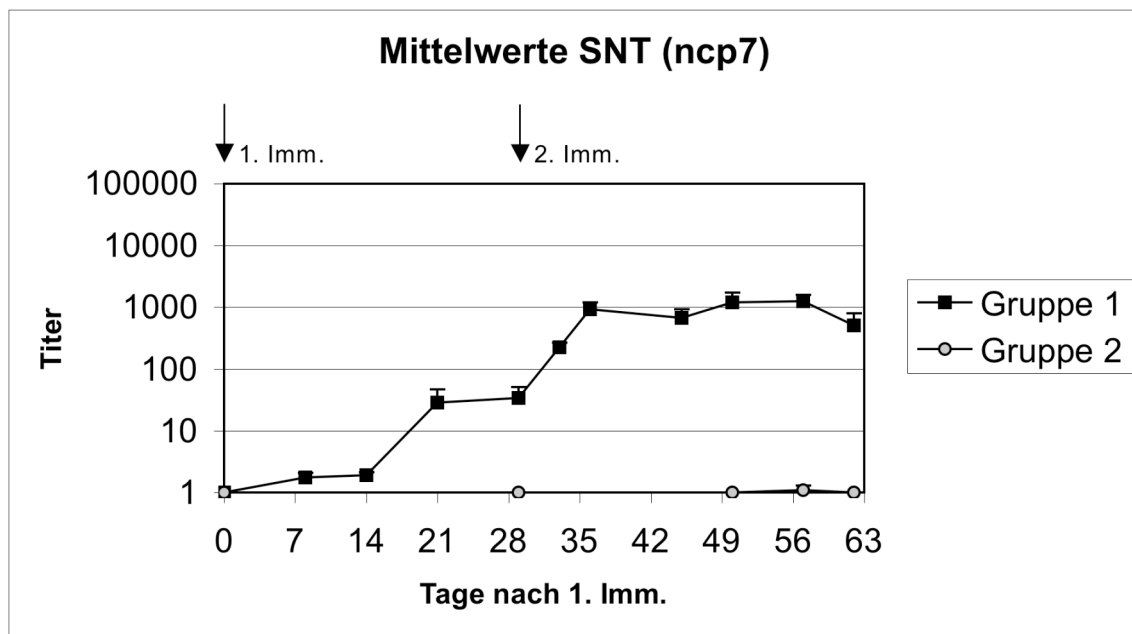


Abbildung 17: Mittelwerte der neutralisierenden Titer nach 1. und 2. Immunisierung, getestet mit dem homologen Impfstamm ncp7 für die Gruppen 1 (zweimal immunisiert) und 2 (Kontrollgruppe) in TV 1.

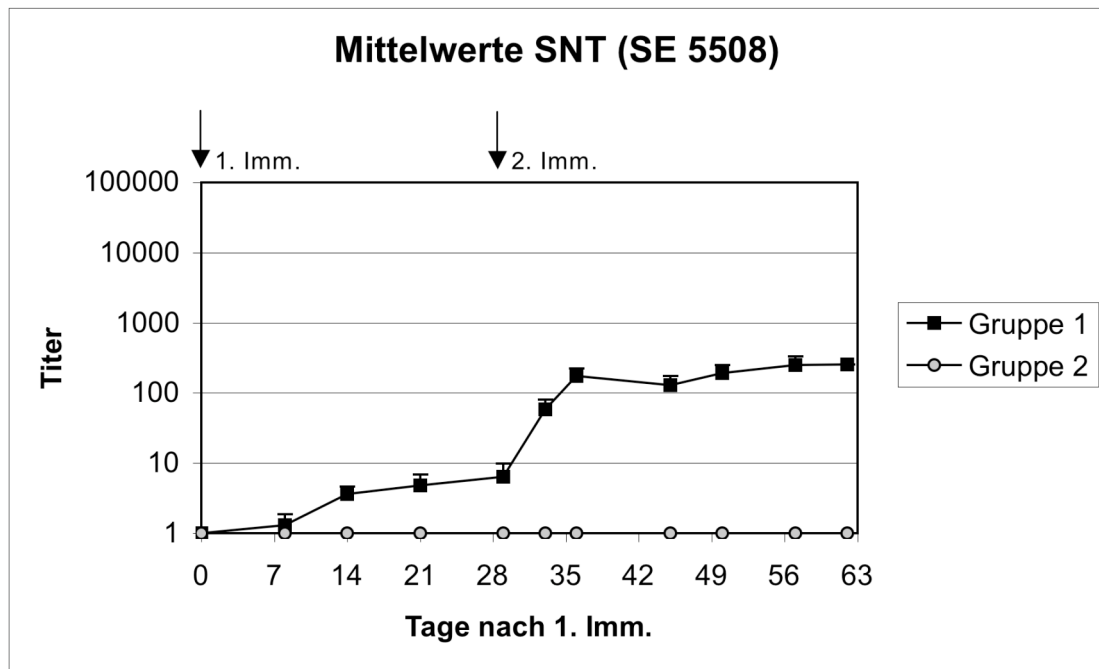


Abbildung 18: Mittelwerte der neutralisierenden Titer nach 1. und 2. Immunisierung, getestet mit dem heterologen Testinfektionsstamm SE5508 für die Gruppen 1 (zweimal immunisiert) und 2 (Kontrollgruppe) in TV 1.

#### 4.2.2.3.2 TV 2

Erste BVDV-spezifische Antikörper waren im NS3-*blocking*-ELISA oberhalb des Schwellenwertes von 50 % ab Tag 28 bei einem Tier (Nr. 3), das bereits an Tag 21 nach der ersten Immunisierung mit 43 % deutlich über dem Gruppenmittel von 28,8 % lag, nachweisbar. Ab Tag 3 nach der 2. Immunisierung konnten spezifische Antikörper bei allen zweimal immunisierten Tieren (durchschnittlicher Wert 50,6 %) beobachtet werden (Abbildung 19). Auch im zweiten Versuch konnten im Vollvirus-ELISA erst ab Tag 7 nach 2. Immunisierung spezifische Werte über dem Schwellenwert von 0,3 nachgewiesen werden und pendelten sich bis zur Testinfektion bei knapp 0,8 ein (Abbildung 20). Im SNT stellte sich die zweimal immunisierte Gruppe 3 folgendermaßen dar: Bis zur zweiten Immunisierung wurden gegen das homologe Impfvirus ncp7 Titer von durchschnittlich 1:13 gebildet, die nach der zweiten Immunisierung nochmals anstiegen, so dass am Tag der Testinfektion Titer von durchschnittlich 1:1083 erreicht wurden (Abbildung 21). Gegen den heterologen SE5508 wurde nach einmaliger Immunisierung in Gruppe 3 ein Titer von 1:3 und in Gruppe 5 von 1:14 erreicht. Die zweite Immunisierung bei Gruppe 3 führte zu einem sprunghaften Titeranstieg auf bis zu maximal 1:512 bei Tier Nummer 3 und zu 1:305 im Durchschnitt am Tag der Testinfektion (Abbildung 22).

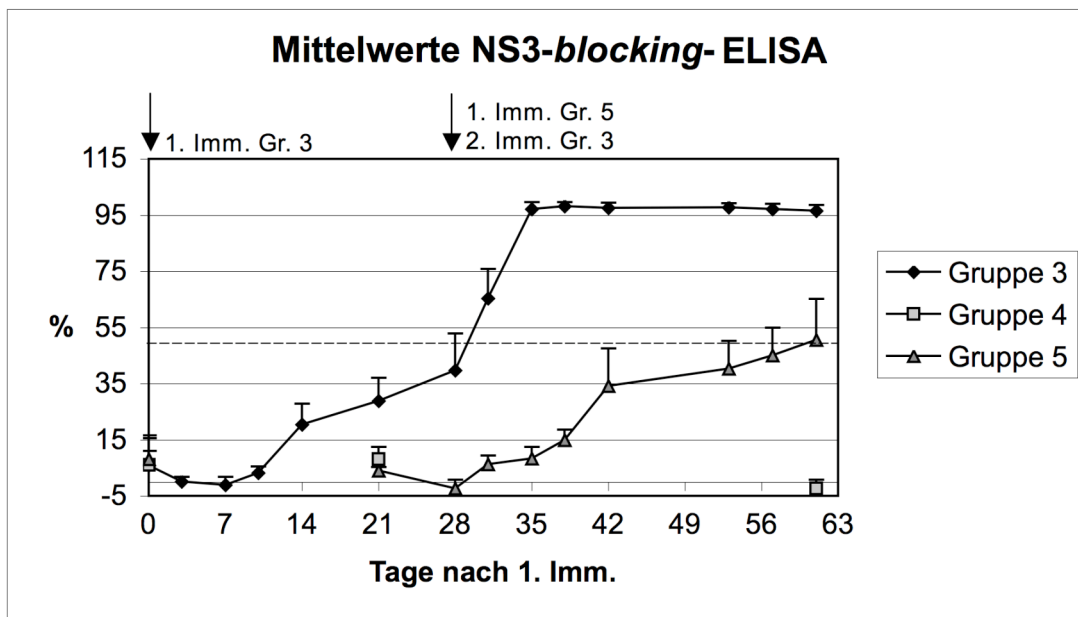


Abbildung 19: Mittelwerte nach 1. und 2. Immunisierung für die Gruppen 3 (zweimal immunisiert), 4 (Kontrollgruppe) und 5 (einmal immunisiert) im NS3-blocking-ELISA in TV 2. Die gestrichelte Linie markiert den Grenzwert zum positiven Bereich des ELISA bei 50%.

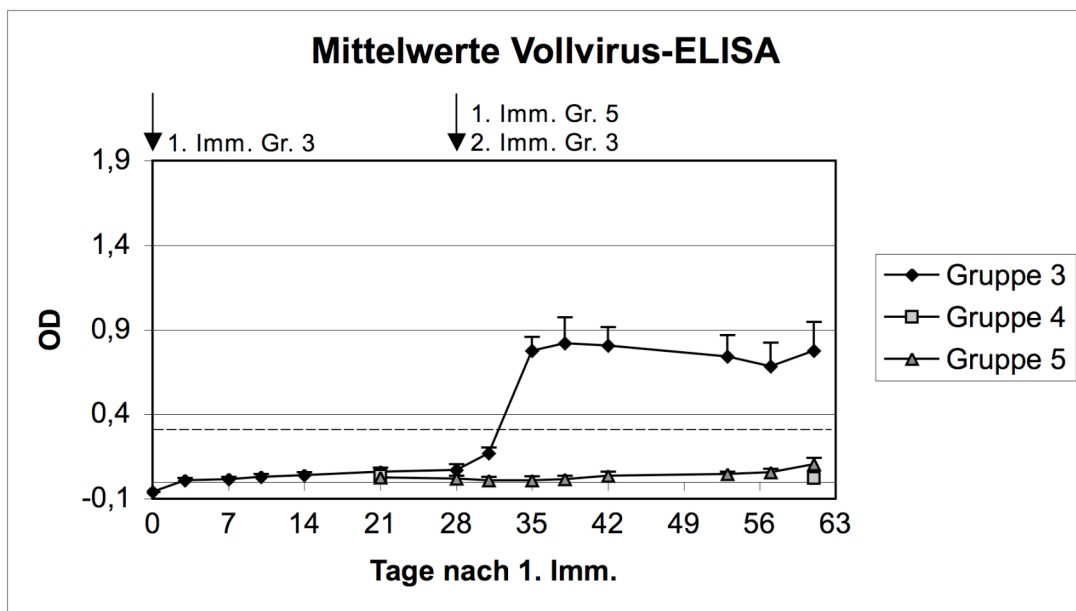


Abbildung 20: Mittelwerte nach 1. und 2. Immunisierung für die Gruppen 3 (zweimal immunisiert), 4 (Kontrollgruppe) und 5 (einmal immunisiert) im Vollvirus-ELISA in TV 2. Die gestrichelte Linie markiert den Grenzwert zum positiven Bereich des ELISA bei einer OD von 0,3.

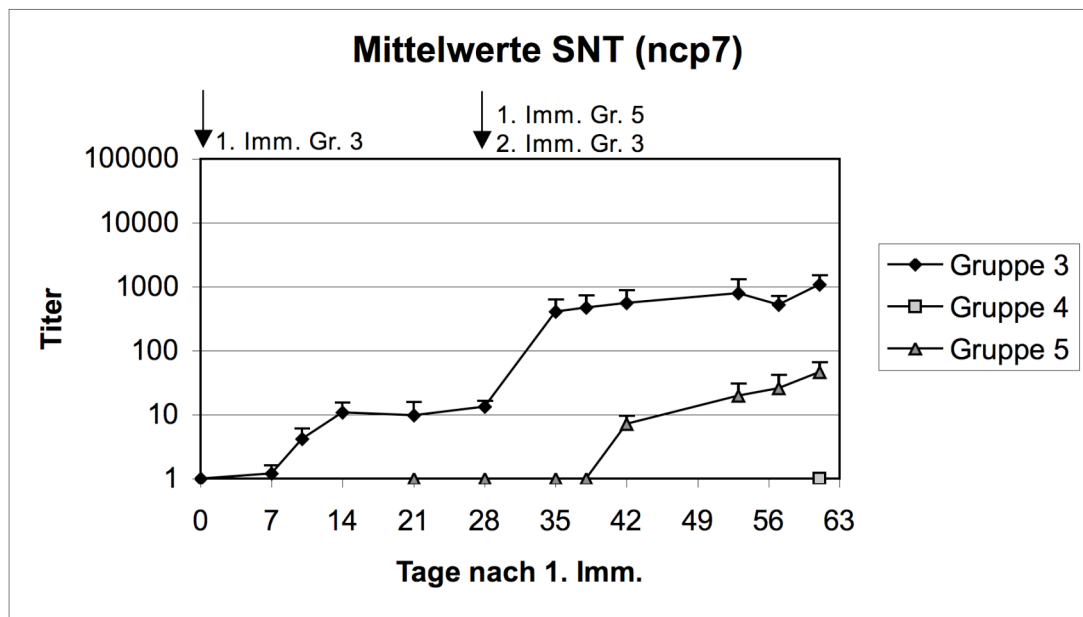


Abbildung 21: Mittelwerte der neutralisierenden Titer nach 1. und 2. Immunisierung, getestet mit dem homologen Impfstamm ncp7 für die Gruppen 3 (zweimal immunisiert), 4 (Kontrollgruppe) und 5 (einmal immunisiert) in TV 2.

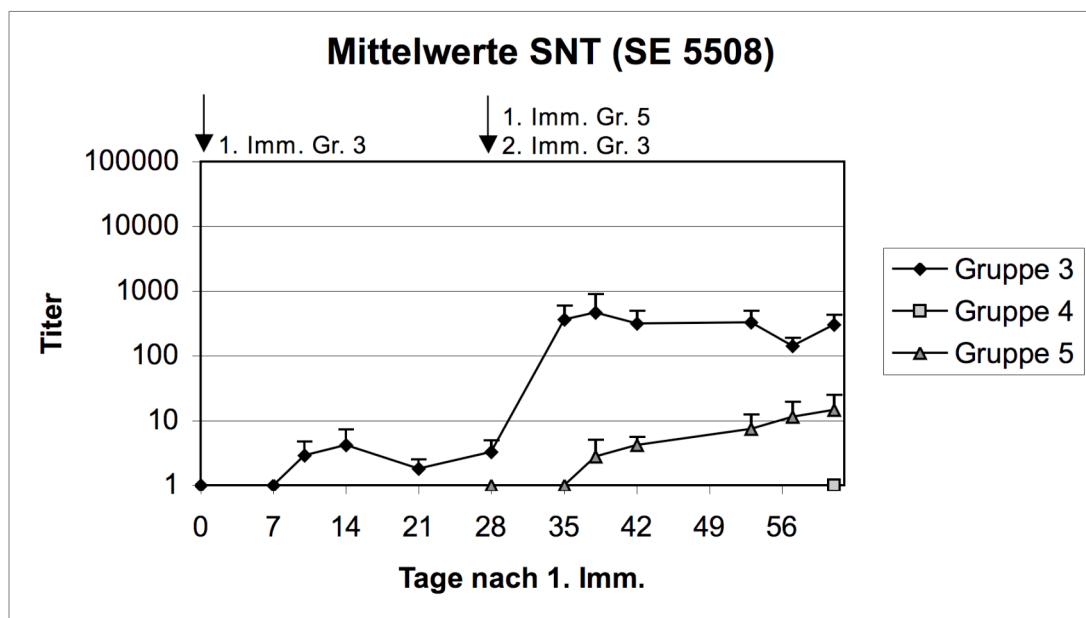


Abbildung 22: Mittelwerte der neutralisierenden Titer nach 1. und 2. Immunisierung, getestet mit dem heterologen Testinfektionsstamm SE5508 für die Gruppen 3 (zweimal immunisiert), 4 (Kontrollgruppe) und 5 (einmal immunisiert) in TV 2.

#### 4.2.2.4 Antikörper gegen weitere BVDV-Stämme

Es folgten weiterhin Untersuchungen zur Antikörperentwicklung gegen weitere heterologe Virusstämme. Dafür wurden SNTs mit den BVDV-Stämmen PT810 (Typ Ic) und CS8644 (Typ II) jeweils am Tag der Testinfektion durchgeführt. Dabei erreichten die zweimal immunisierten Gruppen 1 und 3 gegen PT810 Titer von 1:43 bzw. 1:46. Gegen den BVDV-Typ II- Stamm CS8644 wurden für die Gruppen 1 und 3 Titer von 1:3 und 1:7 ermittelt. Gruppe 5 aus TV 2, die nur einmalig immunisiert worden war, wies gegen PT810 lediglich einen Titer von 1:2 und gegen CS8644 einen Titer kleiner 1:2 auf (Abbildung 23).

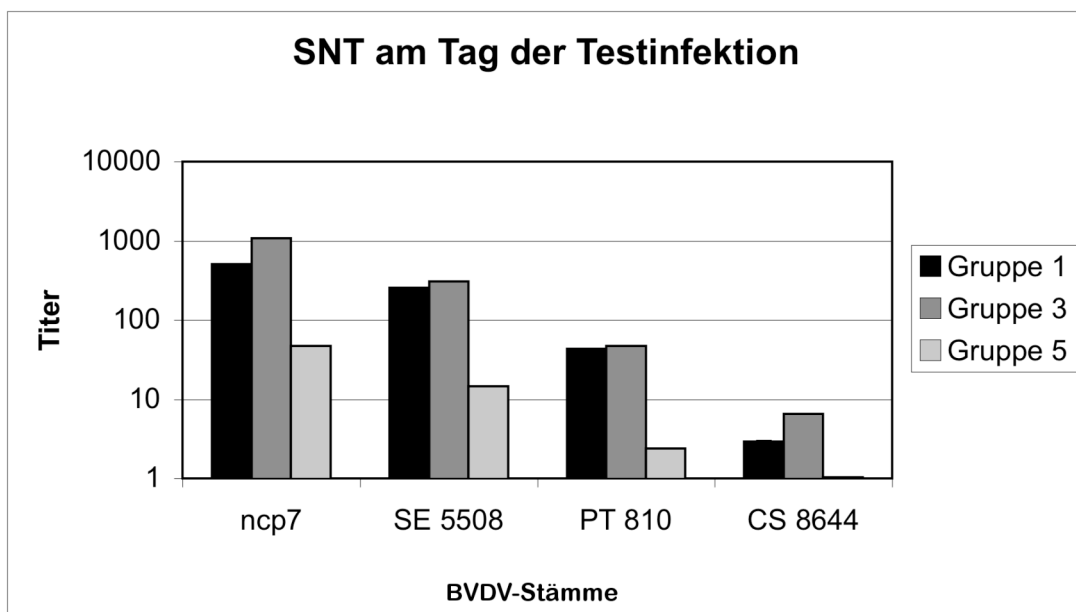


Abbildung 23: Neutralisierende Titer aller drei immunisierten Tiergruppen (Gruppe 1 = zweimal immunisiert in TV 1; Gruppe 3 = zweimal immunisiert in TV 2 und Gruppe 5 = einmal immunisiert in TV 2) am Tag der Testinfektion gegen die BVDV-Stämme ncp7 (Typ Ib), SE5508 (Typ Ib), PT810 (Typ Ic) und CS8644 (Typ II).

### 4.2.3 Ergebnisse nach Testinfektion

#### 4.2.3.1 Klinische und hämatologische Parameter

In beiden Tierversuchen konnten bei den zweimal immunisierten Tieren, gleichgültig ob i.m. und i.n. oder nur i.m. immunisiert, keine BVDV-spezifischen Krankheitssymptome nachgewiesen werden, wohingegen drei von fünf Tieren in der einmalig i.m.-immunisierten Gruppe 3 in TV 2 leichten Nasenausfluss und Husten zeigten. Die zweimal immunisierten Tiere hatten im gesamten Versuchsverlauf kontinuierliche, nicht von der Norm abweichende Temperaturwerte

che, nicht von der Norm abweichende Temperaturwerte (Abbildung 24 und Abbildung 25). Die Leukozytenzahlen dieser Kälber lagen um 100 %, bezogen auf den Mittelwert von Tag -5 und 0 nach der Testinfektion in TV 1 (Abbildung 26) bzw. von Tag -23, -20 und 0 nach der Testinfektion in TV 2 (Abbildung 27). Alle Tiere der einmal immunisierten Gruppe zeigten eine kurzfristig Leukopeniephase, bei der die Leukozytenzahlen auf durchschnittlich 46 % (42,2 - 48,6 %) an Tag 4 nach der Testinfektion absanken, aber innerhalb von 4 Tagen wieder Werte von 80% erreichten und zu Versuchsende wieder bei etwa 100 % lagen (Abbildung 27). Nur das Tier mit der Nummer 11 zeigte mit 71 % der ursprünglichen Leukozytenzahl am Versuchsende einen reduzierten Wert (Tag 89).

In beiden Versuchen erkrankten alle Tiere der Kontrollgruppen akut mit BVDV-spezifischen Symptomen wie Nasenausfluss, Augenausfluss, Husten und Fieber bis 41.2°C (Abbildung 24 und Abbildung 25). Zudem konnte eine deutliche Leukopenie mit Werten unter 30 % ihrer Normalwerte beobachtet werden, die sich bis zum Versuchsende an Tag 90 (TV 1) bzw. 89 (TV 2) nur bei zwei Tieren im ersten und bei einem Tier im zweiten Versuch wieder auf 100 % einstellten (Abbildung 26 und Abbildung 27).

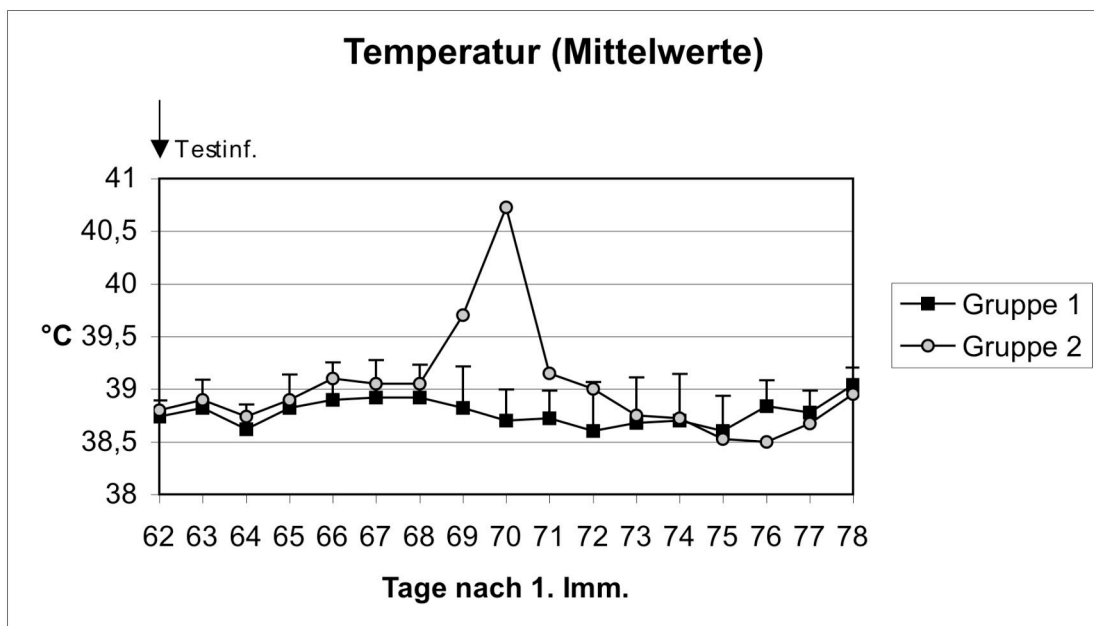


Abbildung 24: Temperaturmittelwerte der Gruppen 1 (zweimal immunisiert) und 2 (Kontrollgruppe) nach Testinfektion in TV1.



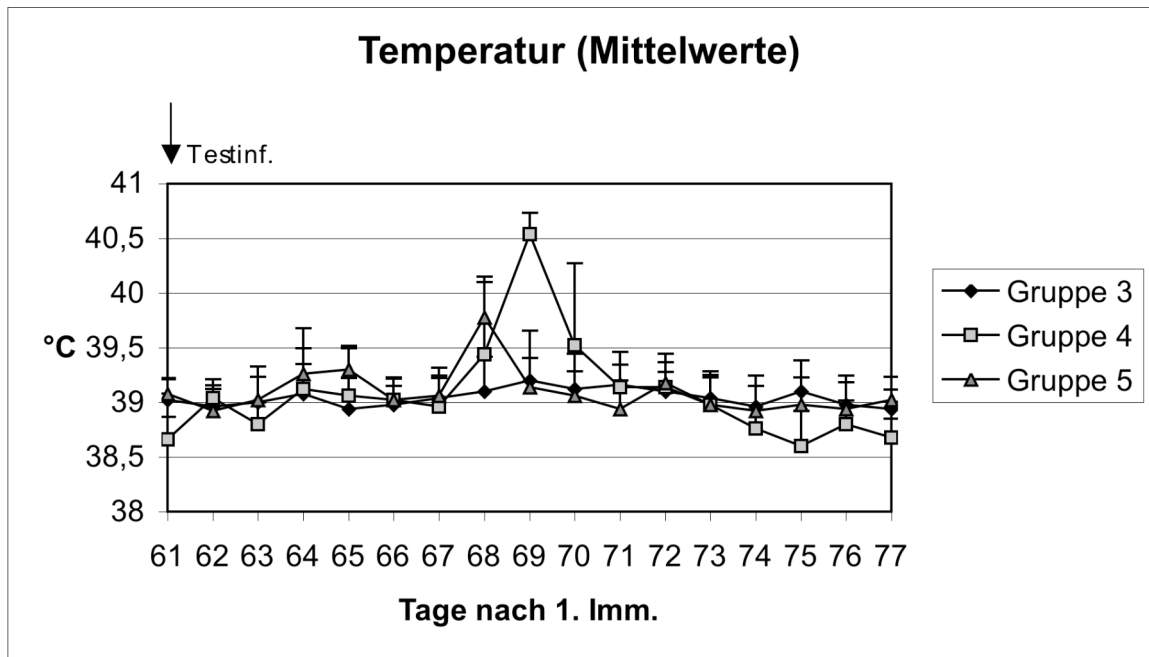


Abbildung 25: Temperaturmittelwerte der Gruppen 3 (zweimal immunisiert), 4 (Kontrollgruppe) und 5 (einmal immunisiert) nach Testinfektion in TV 2.

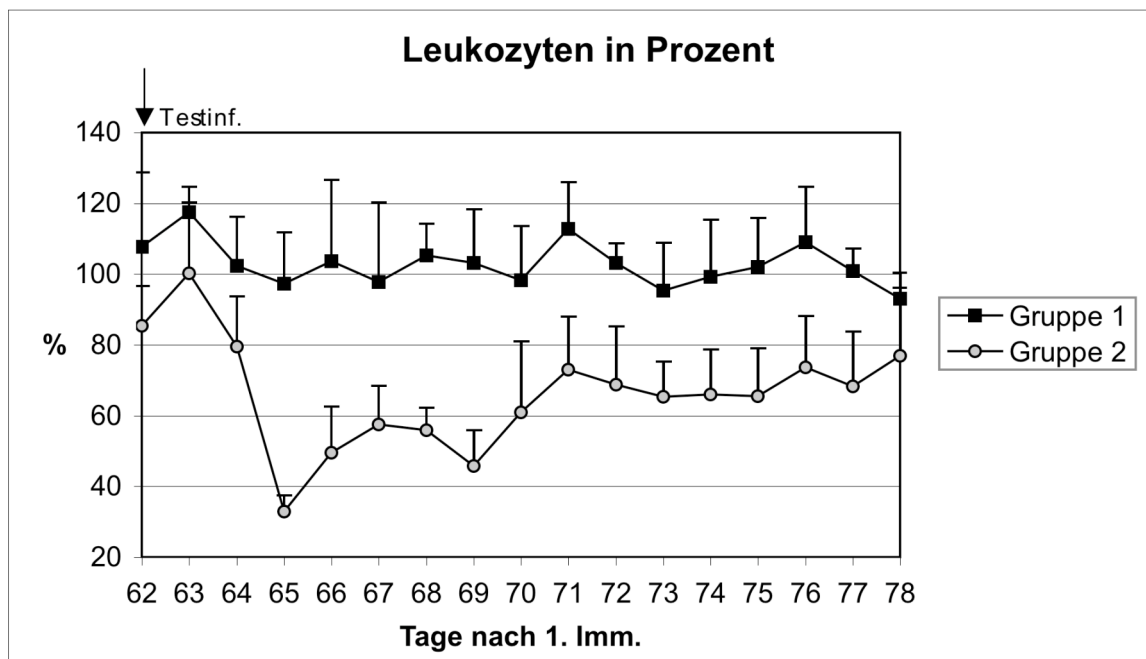


Abbildung 26: Leukozytenzahlen in Prozent für die Gruppen 1 (zweimal immunisiert) und 2 (Kontrollgruppe) in TV 1 nach Testinfektion.

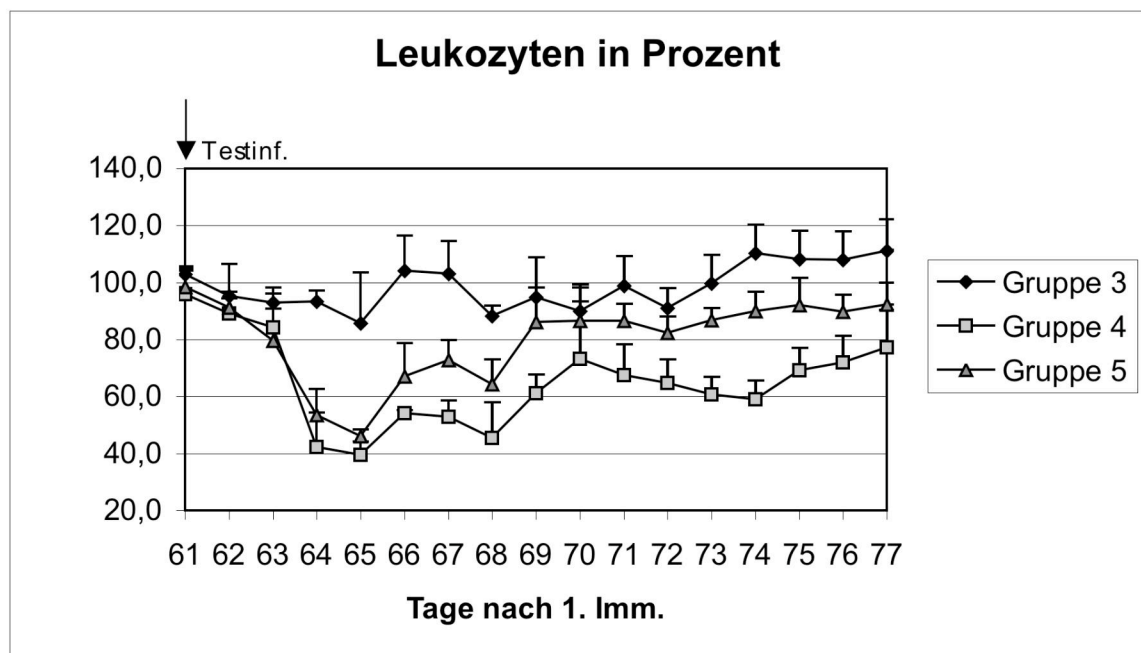


Abbildung 27: Leukozytenzahlen in Prozent für die Gruppen 3 (zweimal immunisiert), 4 (Kontrollgruppe) und 5 (einmal immunisiert) in TV 2 nach Testinfektion.

#### 4.2.3.2 Virusisolierung aus Leukozyten und Nasentupfern

Nach der Testinfektion wurden von jedem Tier je im Doppelansatz  $10^6$  Leukozyten und 100  $\mu$ l Nasentupferflüssigkeit auf Rinderzellen verimpft.

Nach der Testinfektion mit BVDV SE5508 konnte über 10 Tage in beiden Kontrollgruppen pro Tier für 6-7 Tage Virus sowohl aus Leukozyten als auch aus Nasentupfern isoliert werden. Im zweiten Tierversuch wurde zusätzlich in der Tiergruppe, die nur einmalig i.m. immunisiert worden war, kurzzeitig (für 1-3 Tage pro Tier) Virus aus Leukozyten und in vier von fünf Kälbern auch aus Nasentupfern mittels Anzucht auf Zellkultur nachgewiesen (Tabelle 7 und Tabelle 8).

Mittels Sequenzierung von aus Leukozyten und Nasentupfern isolierter RNA, konnte das Virus, das für die Testinfektion eingesetzt wurde, als Agens für die Erkrankung bestätigt werden.

Tabelle 7: Virusisolierung an den Tagen 1 bis 11 nach der Testinfektion in TV 1 aus Leukozyten (a) und Nasentupfern (b) durch Animpfung im Doppelansatz auf Zellkultur; positive Ereignisse wurden mit 1 bzw. 2 (Virusnachweis im Doppelansatz) gekennzeichnet, negative Ereignisse mit 0. Gruppe 1 wurde zweimal immunisiert. Gruppe 2 diente als nicht immunisierte Kontrollgruppe.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Gruppe 1	173	0 <sup>a</sup> /0 <sup>b</sup>	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	537	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	554	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	758	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	997	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Gruppe 2	99	0/0	0/0	2/2	2/1	2/2	2/1	2/2	0/2	0/1	0/1	0/0
	97	0/0	0/0	2/0	2/2	2/2	2/2	0/2	1/2	0/2	0/0	0/0
	172	0/0	0/0	0/0	1/-	2/-	2/2	1/2	2/2	0/2	0/0	0/0
	610	0/0	0/0	1/2	2/2	2/1	2/1	2/2	2/0	1/1	0/0	0/0
	611	0/1	2/2	1/1	1/2	2/2	2/2	2/2	0/1	0/0	0/0	0/0

Tabelle 8: Virusisolierung an den Tagen 1 bis 11 nach der Testinfektion in TV 2 aus Leukozyten (a) und Nasentupfern (b) durch Animpfung im Doppelansatz auf Zellkultur; positive Ereignisse wurden mit 1 bzw. 2 (Virusnachweis im Doppelansatz) gekennzeichnet, negative Ereignisse mit 0. Gruppe 3 wurden zweimal immunisiert, Gruppe 4 diente als nicht immunisierte Kontrollgruppe, Gruppe 5 wurde einmal immunisiert.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Gruppe 3	1	0 <sup>a</sup> /0 <sup>b</sup>	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	2	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	3	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	4	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	5	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Gruppe 4	6	0/0	0/0	1/0	2/0	1/0	2/0	1/0	2/1	0/0	0/0	0/0
	7	0/0	0/0	2/0	1/0	2/1	2/2	1/2	1/0	0/0	0/0	0/0
	8	0/0	0/0	0/0	1/0	2/0	2/2	1/1	0/0	0/0	0/0	0/0
	9	0/0	0/0	0/0	2/0	1/0	0/1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	10	0/0	0/0	0/0	1/0	2/1	2/1	2/0	1/2	1/0	1/0	0/0
Gruppe 5	11	0/0	0/0	0/0	1/1	1/1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	12	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	13	0/0	0/0	0/0	2/0	2/1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	14	0/0	0/0	0/0	2/0	1/1	1/1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	15	0/0	0/0	0/0	0/0	1/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0

#### 4.2.3.3 Antigennachweis mittels ELISA

Zusätzlich wurde ein E<sup>RNS</sup>-Antigen-*capture*-ELISA mit EDTA-Blutproben durchgeführt. Mit diesem ELISA wurden deutlich erhöhte OD-Werte für die virämische Kontrollgruppe gemessen. Allerdings erreichten nur vier von fünf Tieren im ersten Tierversuch und drei von fünf Tieren im zweiten Tierversuch für mindestens einen Tag Werte über dem testspezifischen Schwellenwert von 30 %, so dass die Mittelwerte nur an Tag 8 p. inf. im zweiten Tierversuch positiv für BVDV-Antigen waren. Im

zweiten Tierversuch lag das Tier mit der Nummer 15 mit 22 % in der Gruppe der einmalig Immunisierten knapp unter dem Schwellenwert, während sich alle anderen Kälber dieser Gruppe deutlich unterhalb der Nachweisgrenze des Antigen-ELISA bewegten (Abbildung 28 und Abbildung 29).

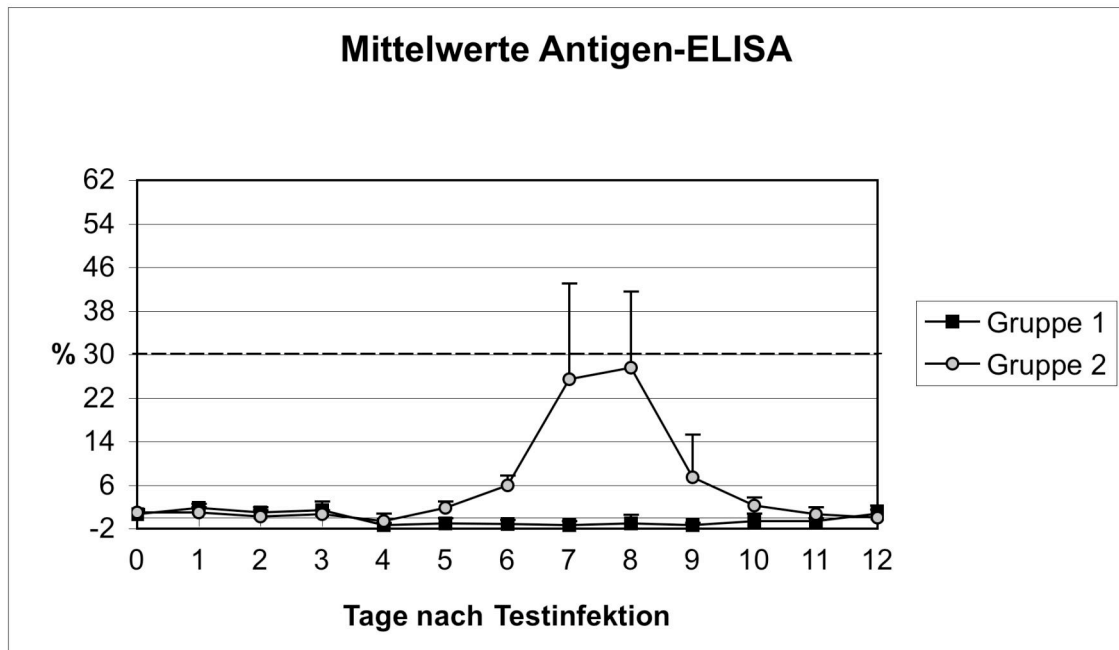


Abbildung 28: Antigen-ELISA der Gruppen 1 (zweimal immunisiert) und 2 (Kontrollgruppe) nach der Testinfektion in TV 1. Die gestrichelte Linie markiert den Grenzwert von 30% zum positiven Bereich des ELISAs.

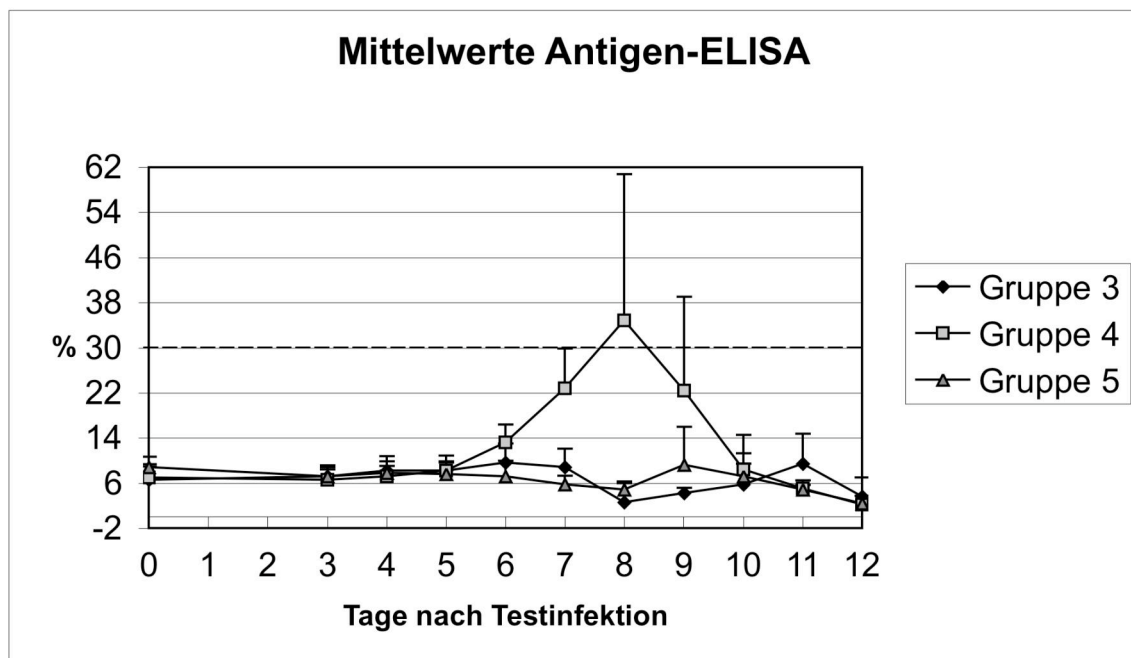


Abbildung 29: Antigen-ELISA der Gruppen 3 (zweimal immunisiert), 4 (Kontrollgruppe) und 5 (einmal immunisiert) nach der Testinfektion in TV 2. Die gestrichelte Linie markierte den Grenzwert von 30% zum positiven Bereich des ELISAs.

#### 4.2.3.4 Antikörper-Entwicklung

Nachdem bereits nach der zweiten Applikation von Pseudovirionen bei den zweimal immunisierten Tieren im NS3-*blocking*-ELISA der Sättigungswert erreicht war, konnte nach der BVDV-Testinfektion keine Steigerung mehr beobachtet werden. In der Gruppe der einmal immunisierten Kälber von TV 2 konnte ein kontinuierlicher Antikörperanstieg von einem Wert von 50,5 % am Tag der Testinfektion bis hin zur Sättigungsgrenze von 100 % an Tag 10 p. inf. gemessen werden. Die bis zur Testinfektion Antikörper-freien Kontrolltiere entwickelten NS3-spezifische Antikörper mit einem durchschnittlichen Wert von 62,8 % innerhalb der ersten 14 Tage und Werten von bis zu 96 % an Tag 21 (Abbildung 30 und Abbildung 31).

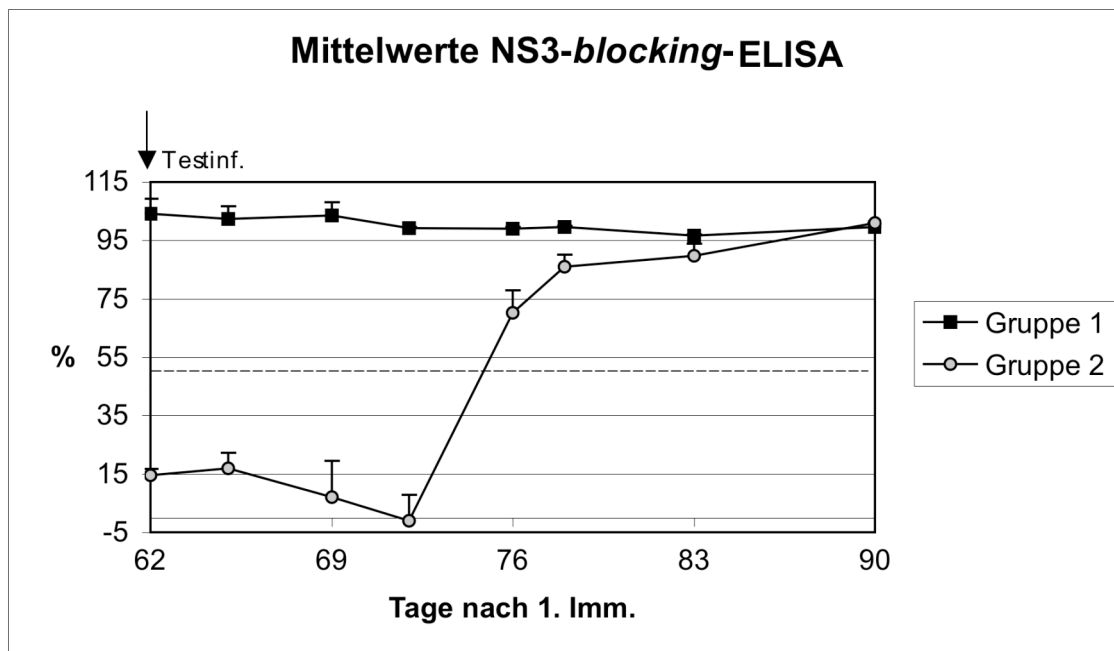


Abbildung 30: Mittelwerte nach der Testinfektion im NS3-blocking-ELISA für die Gruppen 1 (zweimal immunisiert) und 2 (Kontrollgruppe) in TV 1. Die gestrichelte Linie markiert den Grenzwert zum positiven Bereich des ELISAs bei 50%.

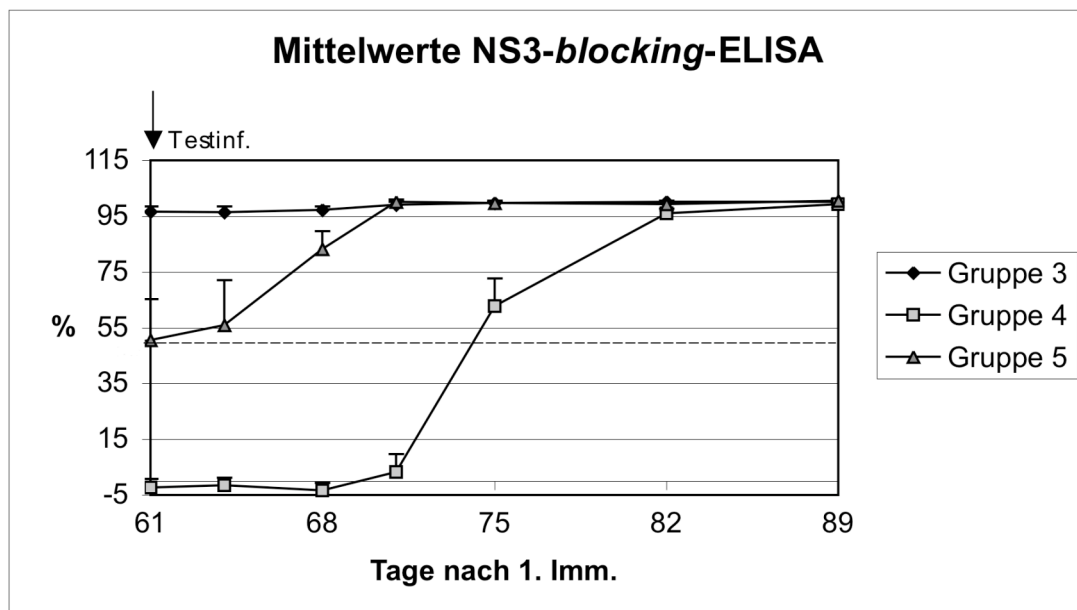


Abbildung 31: Mittelwerte nach der Testinfektion im NS3-blocking-ELISA für die Gruppen 3 (zweimal immunisiert), 4 (Kontrollgruppe) und 5 (einmal immunisiert) in TV 2. Die gestrichelte Linie markiert den Grenzwert zum positiven Bereich des ELISAs bei 50%.

Im indirekten Vollvirus-ELISA stellte sich die Antikörper-Entwicklung anders dar. Bei der Gruppe mit den zweimal immunisierten Kälbern in TV 1, die vor der Testinfektion OD-Werte von im Durchschnitt 0,8 (0,57-1,13) hatte, blieb der Wert zunächst

konstant und stieg an Tag 10 auf durchschnittlich 1,4 (1,2-1,6) und von da aus kontinuierlich auf 1,9 (1,5-2,3) an Tag 90 an (Abbildung 32). Die relativ breite Streuung der Minimal- und Maximal-Werte resultiert aus den unterschiedlich starken Reaktionen der einzelnen Tiere, die individuell aber sehr konstant waren: das Tier mit der Ohrmarke 173 hatte immer die höchsten Werte, während das Tier mit der Ohrmarke 997 immer die niedrigsten Werte aufwies.

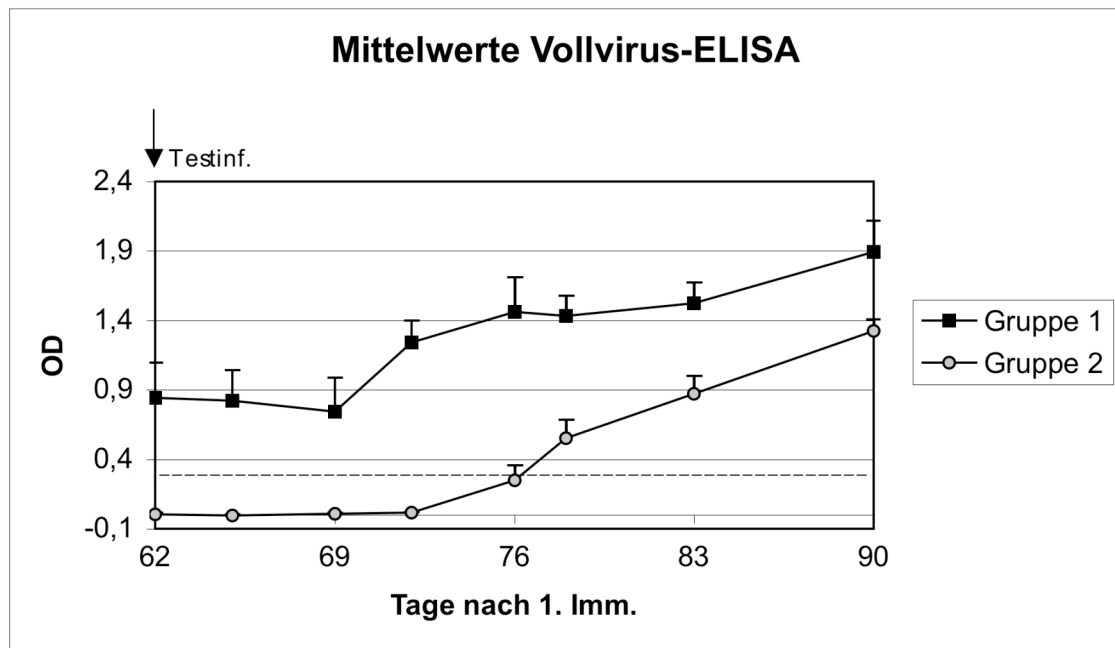


Abbildung 32: Mittelwerte nach der Testinfektion im Vollvirus-ELISA für die Gruppen 1 (zweimal immunisiert) und 2 (Kontrollgruppe) in TV 1. Die gestrichelte Linie markiert den Grenzwert zum positiven Bereich des ELISAs bei einer OD von 0,3.

Im zweiten Tierversuch war ein sehr ähnlicher Verlauf in Gruppe 3 (zweimal immunisiert) zu beobachten. Der durchschnittliche OD-Wert von 0,77 (0,6-1,0) blieb einige Tage nach der Testinfektion unverändert und stieg an Tag 10 p. inf. plötzlich auf durchschnittlich 1,1 (0,6-1,7) und von dort kontinuierlich auf 1,8 (1,6-2,1) an Tag 21 und leicht abfallend auf 1,7 (1,4-2,6) an Tag 28 p. inf. (Versuchsende) an. Auch innerhalb dieser Tiergruppe lag eine gewisse Streuung der Werte vor, wobei aber beim Einzeltier kontinuierliche Messwerte zu beobachten waren (Abbildung 33).

Gruppe 5 (einmal immunisiert) erreichte vor der Testinfektion eine mittlere OD von 0,1 (0,03-0,17), stieg ab Tag 7 p. inf. steil an auf 1,8 (1,5-2,1) an Tag 24 p. inf. und fiel bis Tag 89 wieder leicht auf durchschnittlich 1,4 (1,6-2,2) ab (Abbildung 33).

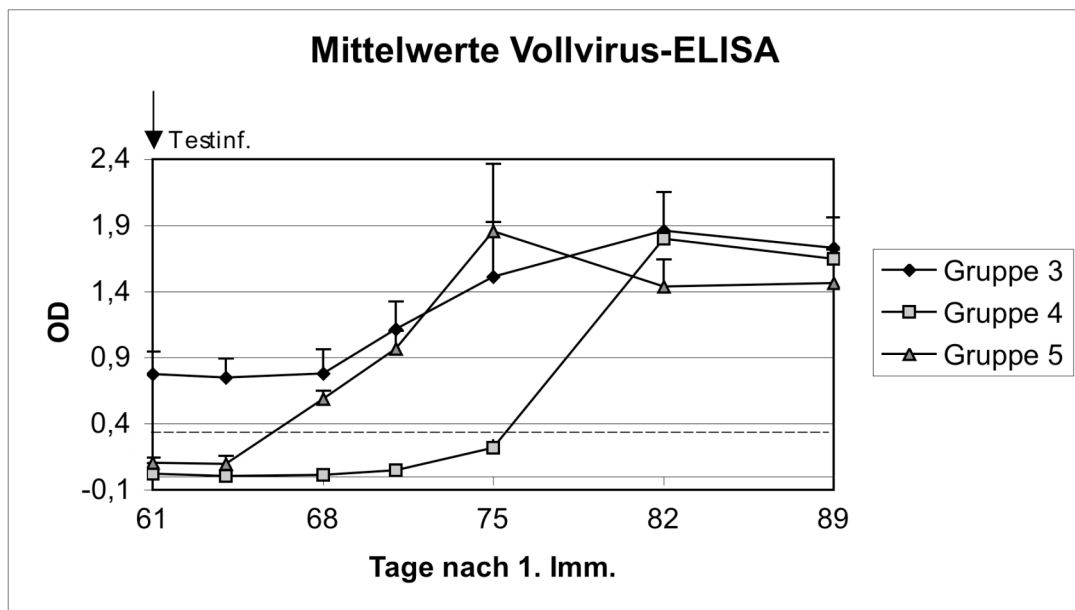


Abbildung 33: Mittelwerte nach der Testinfektion im Vollvirus-ELISA für die Gruppen 3 (zweimal immunisiert), 4 (Kontrollgruppe) und 5 (einmal immunisiert) in TV 2. Die gestrichelte Linie markiert den Grenzwert zum positiven Bereich des ELISAs mit einer OD von 0,3.

Im SNT gegen den Impfstamm ncp7 verhielten sich beide zweimal immunisierten Gruppen relativ konstant. Sie hielten noch knapp zwei Wochen lang ihren durch die Immunisierungen erworbenen Titer, um an Tag 14 sprunghaft anzusteigen (Gruppe 1 von 1:508 auf 1:5517 im Durchschnitt; Gruppe 3 von 1:1083 auf 1:6278 im Durchschnitt). Gruppe 1 des ersten Tierversuches pendelte sich in den folgenden zwei Wochen auf 1:7562 ein, wohingegen Gruppe 3 auf einen durchschnittlichen Titer von 1:2736 abfiel. Die einmal immunisierte Gruppe 5 in Tierversuch 2 machte einen Titeranstieg unmittelbar nach der Testinfektion durch und stieg auf Werte von 1:15193 im Durchschnitt, was deutlich über den Titern der zweimal immunisierten Tiere lag. Die Kontrollgruppen beider Versuche blieben bis zur Testinfektion BVDV-Antikörper-frei. An Tag 14 nach der Testinfektion ließen sich bei ihnen erstmals Titer gegen den Stamm ncp7 messen, die für Gruppe 2 bei 1:87 und für Gruppe 4 bei 1:44 lagen (Abbildung 34 und Abbildung 35).



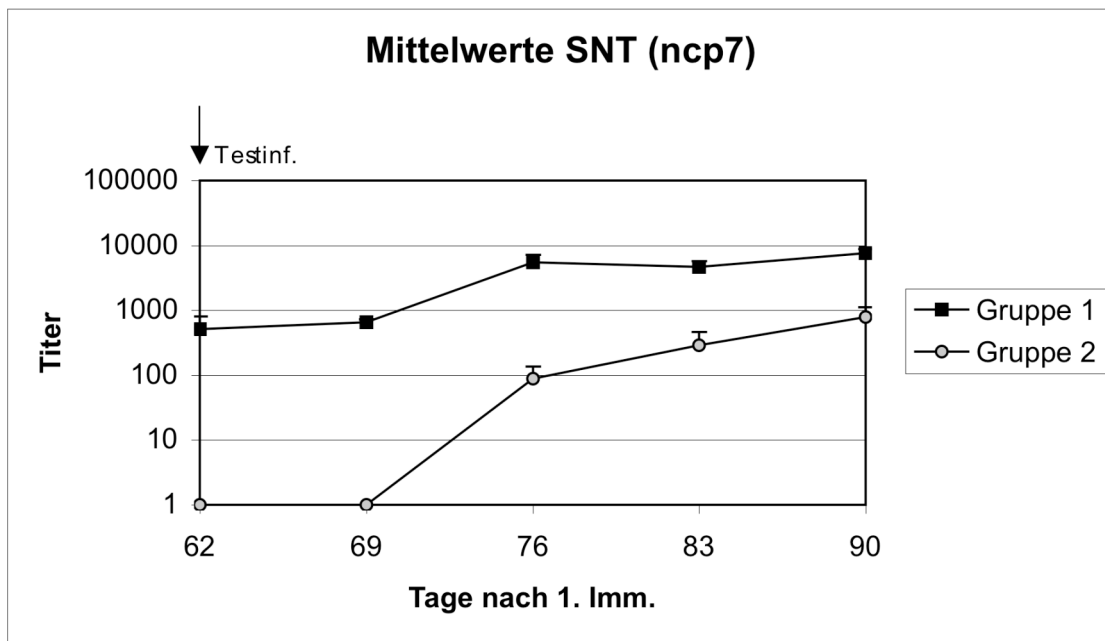


Abbildung 34: Mittelwerte der neutralisierenden Titer nach der Testinfektion, getestet mit dem homologen Impfstamm ncp7 für die Gruppen 1 (zweimal immunisiert) und 2 (Kontrollgruppe) in TV 1.

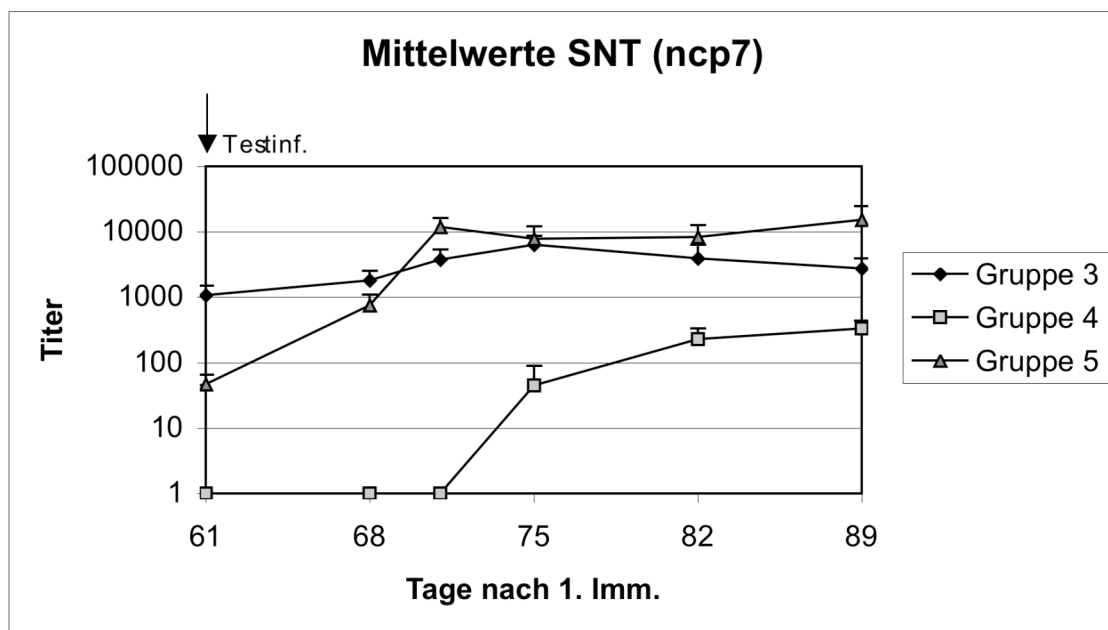


Abbildung 35: Mittelwerte der neutralisierenden Titer nach der Testinfektion, getestet mit dem homologen Impfstamm ncp7 für die Gruppen 3 (zweimal immunisiert), 4 (Kontrollgruppe) und 5 (einmal immunisiert) in TV 2.

Gegen den Testinfektionsstamm SE5508 bildete Gruppe 2 an Tag 14 nach der Testinfektion Titer von durchschnittlich 1:90, Gruppe 4 von 1:150 aus. Zu Versuchsende erreichte Gruppe 2 durchschnittliche neutralisierende Titer von 1:792 gegen

ncp7 und 1:1644 gegen SE5508. Ähnlich verhielt sich Gruppe 4 aus TV 2. Dort waren zu Versuchsende gegen ncp7 durchschnittliche neutralisierende Titer von 1:333 und gegen SE5508 Titer von 1:1271 nachweisbar (Abbildung 36 und Abbildung 37). Im SNT gegen den Testinfektionsstamm SE5508 stiegen in Gruppe 1 des ersten Tierversuches die Titer nach anfänglicher Stabilität bei durchschnittlich 1:508 an Tag 14 nach der Testinfektion auf 1:5514 und auf 1:7562 an Tag 28 nach der Testinfektion. Die neutralisierenden Titer in Gruppe 3 des zweiten Tierversuchs, die ebenfalls zweimal vor der Testinfektion immunisiert worden war, stiegen ebenfalls nach einer Stagnation bei durchschnittlich 1:305 an Tag 14 sprunghaft auf 1:4590 und auf 1:7081 an Tag 21 nach der Testinfektion. Von da an begann allerdings ein Abfall auf 1:2234 an Tag 28 nach der Testinfektion (Abbildung 36 und Abbildung 37).

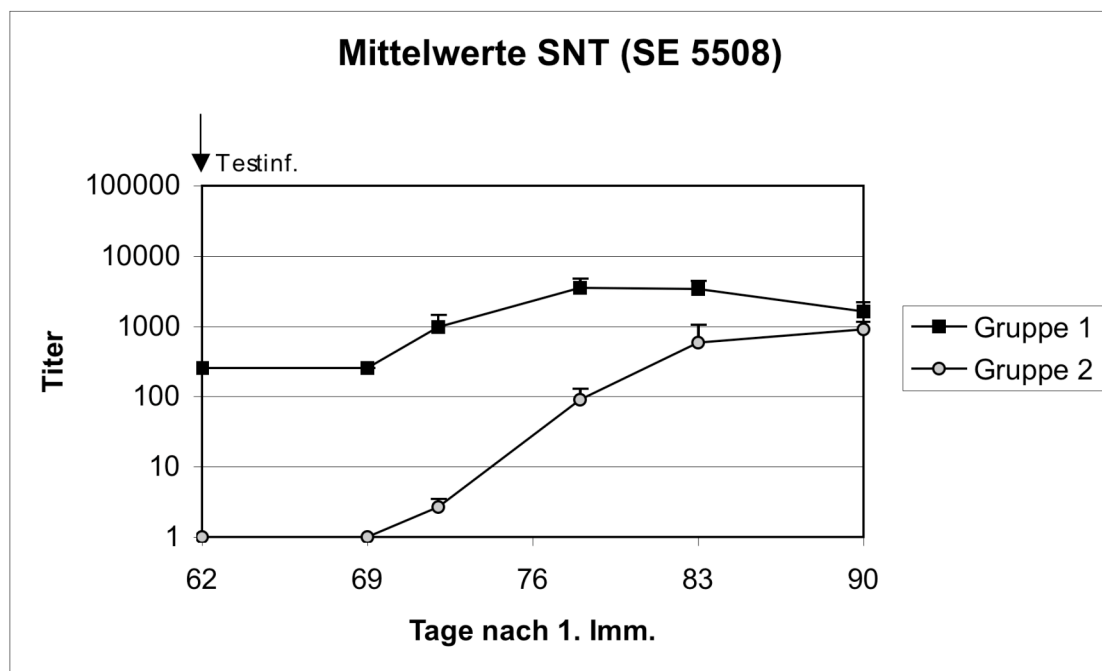


Abbildung 36: Mittelwerte der neutralisierenden Titer nach der Testinfektion, getestet mit dem heterologen Testinfektionsstamm SE5508 für die Gruppen 1 (zweimal immunisiert) und 2 (Kontrollgruppe) in TV 1.

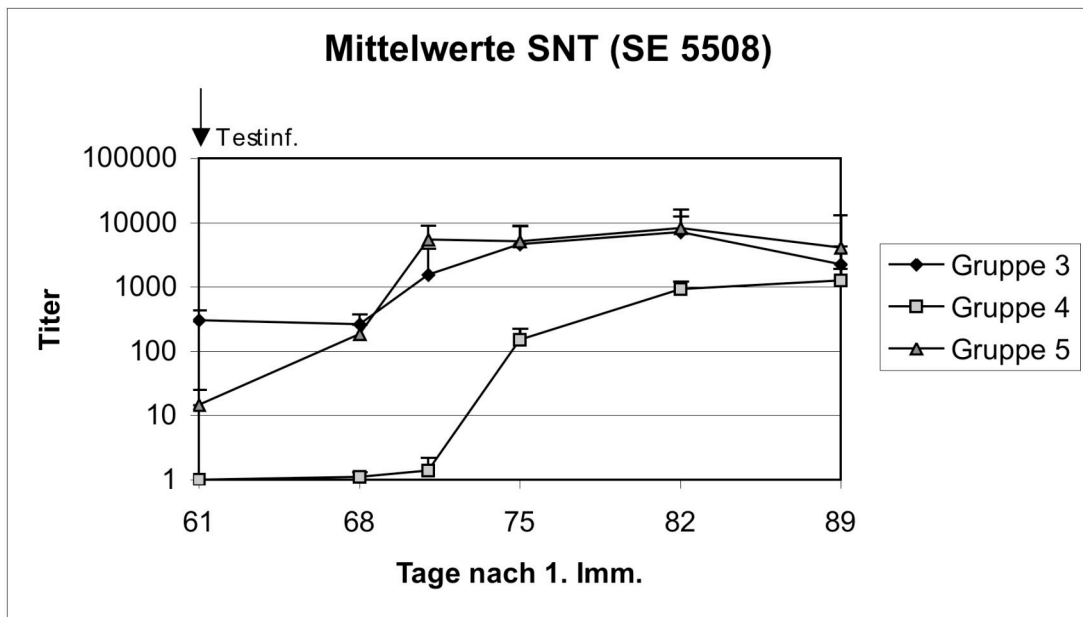


Abbildung 37: Mittelwerte der neutralisierenden Titer nach der Testinfektion, getestet mit dem heterologen Testinfektionsstamm SE5508 für die Gruppen 3 (zweimal immunisiert), 4 (Kontrollgruppe) und 5 (einmal immunisiert) in TV 2.

## 5 Diskussion

Die Entwicklung neuer BVDV-Impfstoffe ist angesichts der Schwächen der vorhandenen Formulierungen – konventionelle „Tot- und Lebendvakzinen“ - ein wichtiges Ziel für die Begrenzung von BVDV-bedingten Schäden, aber auch für die Unterstützung einer gezielten Eradiaktion. Entwicklungsziel können dabei nur Impfstoffe sein, die einerseits keine Schäden verursachen und andererseits so wirksam sind, dass sie eine BVDV-bedingte Virämie blockieren und fetale Protektion erwarten lassen (Beer und Wolf, 2003; Greiser-Wilke *et al.*, 2003).

Während konventionelle Ansätze keine zusätzlichen Erfolge mehr versprechen, bieten neue gentechnische Konstrukte erweiterte Möglichkeiten. So sind seit der Existenz von sogenannten infektiösen Klonen für BVDV direkte Eingriffe in die Genomstruktur dieser RNA möglich (Meyers *et al.* 1996; Vassilev *et al.*, 1997). Durch die Deletion von Genomabschnitten, die für essentielle virale Proteine kodieren, können dabei Deletionsmutanten konstruiert werden, die zwar noch zur RNA-Replikation und Protein-Expression, aber nicht mehr zur Generierung infektiöser Nachkommen-Viren befähigt sind (sog. Replikons; Harada *et al.*, 2000; Reimann *et al.*, 2003). Die deletierten Abschnitte dieser Replikons können allerdings durch Helferzellen *in-trans* zur Verfügung gestellt werden, was die Herstellung sogenannter Pseudovirionen erlaubt, die in einer vollständigen Virushülle das zur Genexpression befähigte Defektgenom beherbergen (Grassmann *et al.*, 2001; Harada *et al.*, 2000; Reimann *et al.*, 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurden solche Pseudovirionen auf der Basis eines BVDV Defektgenomes des nichtzytopathogenen BVDV-Stammes ncp7 (pA/BVDV/Ins-; Meyers *et al.*, 1996) hergestellt, wobei zunächst die genetische Information für das Kapsidprotein partiell deletiert worden war (ncp7 $\Delta$ C-Replikon). Ncp7 $\Delta$ C-Replikon-RNA wurde durch Transfektion in eine alle BVDV-Strukturproteine exprimierende Helferzelle *trans*-komplementiert. Auf diese Weise wurden einmal-infektiöse, replikationskompetente Pseudovirionen generiert, die in keinem Fall zu einer Rekombination oder Reversion führten, was mittels RT-PCR und Passagen auf nicht-komplementierenden Zellen überprüft wurde. Diese Pseudovirionen wurden steril gewonnen und zur Immunisierung an Kälber verabreicht. In einem ersten Tierver-

sich konnte erstmals für BVDV gezeigt werden, dass ncp7 $\Delta$ C-Pseudovirionen in der Lage sind, nach zweimaliger intramuskulärer und intranasaler Applikation eine Immunantwort zu induzieren, ohne im Tier zu einer sich ausbreitenden Infektion zu führen oder von den Impfungen wieder ausgeschieden zu werden. Die Immunantwort erwies sich zudem nach der Belastungsinfektion mit einem heterologen BVDV als protektiv. Im zweiten Tierversuch konnte demonstriert werden, dass auch eine zweimalige i.m.-Immunisierung mit einmal infektiösen, replikationskompetenten ncp7 $\Delta$ C-Pseudovirionen zu einer belastbaren Immunität führte, die ebenfalls gegen die Infektion mit heterologem BVDV schützte. Gleichzeitig zeigte sich, dass die einmalige i.m.-Immunisierung nicht ausreichend vor einer heterologen Testinfektion schützte, jedoch eine verkürzte Krankheitsphase mit deutlich verminderter Virusausscheidung zur Folge hatte.

## 5.1 Komplementierung von ncp7 $\Delta$ C-Replikons

Für Flaviviren konnte das Prinzip der *Trans*-Komplementierung bereits 1998 (Khromykh *et al.*, 1998) gezeigt werden, als Kunjin-Replikons mit Hilfe von Kunjin-Strukturprotein-exprimierenden SFV-Replikons verpackt wurden. Die *Trans*-Komplementierung mit Hilfe einer Zelllinie konnten für Pestiviren Widjoatmodjo und Mitarbeiter (2000) erstmals mit CSFV nachweisen. Sie zeigten, dass sich CSFV-Replikons mit Deletionen im E<sup>RNS</sup>-codierenden Bereich erfolgreich durch eine komplementierende, E<sup>RNS</sup>-exprimierende Schweine-Nieren-Zelllinie verpacken lassen und einmal-infektiöse Pseudovirionen bilden.

Van Gennip und Mitarbeiter (2002) etablierten ein System, in dem sich CSFV-E2-Deletionsmutanten effektiv mit Hilfe *trans*-komplementierender Zellen verpacken ließen. Zu diesem Zweck testeten sie drei  $\Delta$ E2-Replikons auf jeweils drei Zelllinien, die das E2-Protein von CSFV exprimierten. Interessanterweise ließen sich die Replikons nur mit einer der drei E2-exprimierenden Zelllinien komplementieren. Die Transfektionseffizienz lag jeweils bei unter 10 PFU/ml, ließ sich aber bei einer Zelllinie durch serielle Passagen auf dieser Zelllinie auf bis zu 10<sup>4,5</sup> KID<sub>50</sub>/ml steigern. Leider gelang es van Gennip und Mitarbeitern nicht, die Unterschiede zwischen der komplementationsfähigen und den nicht-komplementationsfähigen Zelllinien darzulegen. Im Gegensatz zu dieser Studie, ließen sich die hier beschriebenen ncp7 $\Delta$ C-Replikons durch Transfektion in C-E2-exprimierende Rinderzellen (PT 805) sehr

effizient *trans*-komplementieren, wobei die Titer 24 - 48 Stunden nach der Transfektion bei  $10^{4.5}$ - $10^{5.5}$  KID<sub>50</sub>/ml, in Ausnahmefällen bei über  $10^6$  KID<sub>50</sub>/ml, lagen. Allerdings war es nicht möglich, die erreichten Titer durch Passagen auf den komplementierenden Zellen aufrecht zu erhalten. Sowohl auf der sämtliche BVDV-Strukturproteine exprimierenden Zelllinie PT 805 als auch auf der Zelllinie, die nur C und E<sup>RNS</sup> von BVDV exprimierte (PT 875), fielen die einmal nach der Transfektion erreichten Titer innerhalb von 3-5 Passagen auf weniger als  $10^{1.5}$  KID<sub>50</sub>/ml ab. Die Ursache dafür konnte bisher nicht ermittelt werden.

Van Gennip und Mitarbeiter (2002) äußerten die Vermutung, dass die Expression des Strukturproteins E2 zu einer Hemmung der Infizierbarkeit der Zellen führt, da bereits Hulst und Moormann (1997) gezeigt hatten, dass sich durch die Zugabe von E2 in Zellkulturmedium die Infizierbarkeit von Zellen mit Pestiviren dosisabhängig reduzieren lässt. Gegen diese Theorie als alleinige Ursache spricht allerdings, dass sich auch auf der nur die BVDV-Strukturproteine C und E<sup>RNS</sup> exprimierenden Zelllinie PT 875 die Pseudovirionen ncp7ΔC nicht passagieren lassen. Harada und Mitarbeiter (2000) konnten zudem demonstrieren, dass bereits die konstitutive p7-Expression zu dem oben beschriebenen Phänomen der Interferenz mit Blockierung der Passagierbarkeit von Pseudovirionen führte. Die gleiche Beobachtung wurde auch von Reiman und Mitarbeitern (2003) für eine BVDV-E2-Deletionsmutante beschrieben. Interessanterweise war die Infizierbarkeit von PT 805-Zellen bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten zunächst auch für komplette, nicht veränderte BVDV stark reduziert. Nach einigen Passagen waren allerdings Virusmutanten entstanden, die problemlos und ohne Interferenzerscheinungen auf den Helferzellen weiterpassagiert werden konnten (Daten nicht gezeigt).

Um das „Interferenzphänomen“ genauer zu klären, sind weitere Studien auf verschiedenen Zelllinien, auch solchen, die nur einzelne Strukturproteine exprimieren, geplant. Hierbei gilt es zu bedenken, dass die Nutzung von BVDV-Pseudovirionen als kommerzielle Vakzinen eher wahrscheinlich ist, wenn eine Passagierung möglich wird.

Als positiv-strängige RNA Viren besitzen Pestiviren eigentlich das Potential zur Rekombination und Mutationen (Donis *et al.* 1998; Meyers und Thiel, 1996). So konnten Becher und Mitarbeiter beschreiben, dass es nach der Applikation eines cp

Impfvirus an persistierend infizierte Tiere zur Rekombiantion beider BVDV im Bereich der Nichtstrukturproteine kommen kann, was bei den betroffenen Tieren sogar zu tödlicher Mucosal Disease führte (Becher *et al.*, 2001). Erfreulicherweise bestätigten die Versuche mit ncp7 $\Delta$ C-Pseudovirionen die Rekombinations-, Reversions-, und Mutationsvermutungen nicht. Werden verpackte Replikons als Vakzinen eingesetzt, sollten Rekombinationen ausgeschlossen sein, da die Pseudovirionen möglicherweise ihre Replikationskompetenz durch Reversion zurückerlangen würden und es zu Virämie und Kontakttierinfektionen im Impfbestand, mit den damit verbundenen Schäden, kommen könnte. Nach zahlreichen Transfektionen von ncp7 $\Delta$ C-Replikons konnten mittels RT-PCR und nicht-komplementierenden Rinderzellen, auf denen sich einmal-infektiöse Pseudovirionen nicht seriell passagieren lassen, in keinem Fall Rekombinationen im Bereich der Deletion und die damit verbundene Generierung von infektiösen Revertanten festgestellt werden. Dies spricht für eine hohe Stabilität der ncp7 $\Delta$ C-Pseudovirionen, insbesondere im Bereich der Kapsid-kodierenden Region. Auch Reimann und Mitarbeiter (2003) beobachteten keine Revertanten nach Komplementierung von ncp7 $\Delta$ E2-Replikons. Zwei Ursachen für die extrem geringe oder sogar fehlende Reversions- und Rekombinationsmöglichkeit können diskutiert werden: (1) das für die PT 805-Zelllinien verwendete synthetische Gen ist deutlich weniger homolog zu der ncp7-Sequenz, was eine homologe Rekombination erheblich erschwert, und (2) im Bereich der Strukturproteine ist die RNA-abhängige RNA-Polymerase von BVDV nicht mehr in der Lage, den notwendigen Sprung (*switch*) zwischen zwei verschiedenen Ausgangsmatrizen zu vollführen, was ihr offensichtlich im Bereich der Nichtstrukturproteine gelingt (Becher *et al.*, 2001).

Bei der Verpackung der meisten anderen Replikon-Systeme, z.B. dem Sindbis oder Semliki-Forest Systemen, treten stets Reversionen mit einer hohen Frequenz auf (Weiss und Schlesinger, 1991). Selbst die günstigsten Verpackungsvarianten führen zu etwa einer Revertante je 10<sup>4</sup> Pseudoviren (Bredenbeek *et al.*, 1993).

BVDV Pseudoviren auf der Basis des ncp7 $\Delta$ C-Replikons können somit durch Transfektion in die Helferzelle PT 805 in ausreichender Menge produziert werden, allerdings ist eine Passagierung bisher nicht möglich. Die Voraussetzungen für eine sichere Immunisierung ohne Virämie und Virusausscheidung sind erfüllt, da in kei-

nem Fall infektiöse Revertanten auftraten. Die hergestellten Pseudovirionen wurden daher in zwei Immunisierungs- und *Challenge*-Experimenten eingesetzt.

## **5.2 Immunisierung von Kälbern mit dem trans-komplementierten Replikon ncp7 $\Delta$ C zur sicheren Protektion vor einer BVDV-Infektion**

Für die Immunisierung von Rindern zum Schutz gegen eine BVDV-Infektion existieren zwei Systeme: inaktivierte Vakzinen und attenuierte Lebendvakzinen (Beer und Wolf, 2003). Totvakzinen haben den Vorteil, dass sie sehr sicher sind, da nach ihrer Applikation keine Virusvermehrung und –ausbreitung im Tier stattfindet, was sowohl Kontakttierinfektionen als auch die diaplazentare Infektion eines eventuell vorhandenen Fetus verhindert. Totvakzinen bieten jedoch unter Umständen selbst nach mehrfacher Immunisierung keinen zuverlässigen Schutz gegen eine Infektion mit BVDV (Pichler, 1995; Wolf *et al.*, 1996). Hingegen induziert die einmalige Immunisierung mit einer gut replikationsfähigen Lebendvakzinen in der Regel eine belastbare Immunität. Dies ist allerdings mit dem Risiko einer Virämie nach der Immunisierung verbunden, was zu diaplazentarer Infektion mit den Konsequenzen des Aborts und der Geburt lebensschwacher, permanent-infizierter Kälber und der Kontakttierinfektion (11-28% laut Thierauf, 1995) infolge Impfvirusausscheidung führen kann (Cortese *et al.*, 1998).

Um Lebendvakzinen sicherer zu machen, werden verschiedene Modelle zur Attenuierung gewählt. Makoschey und Mitarbeiter (2004) konstruierten BVDV-Mutanten mit Deletionen in der 5'UTR, die *in vitro* durch reduzierte Plaquegrößen und niedrigere Titer auffielen. Nach der Infektion von Rindern mit diesen Deletionsmutanten wurde eine im Vergleich zu einer Feldvirusinfektion deutlich verkürzte Leukopenie und eine reduzierte Virämiephase beobachtet. Klinische Symptome konnten in dieser Veröffentlichung nur vorsichtig bewertet werden, da sie sowohl in der Infektionsgruppe als auch in der Kontrollgruppe auftraten. Gegen eine Virämie bei einer zweiten Infektion mit dem Wildtypvirus waren die Impflinge geschützt.

Eine weitere Möglichkeit der Attenuierung von Lebendvakzinen ist die Eliminierung der RNase-Aktivität des Glykoproteins E<sup>RNS</sup>, wie von Freyburg und Mitarbeiter (2004) zeigten. Jedoch kam es sowohl *in vitro* als auch *in vivo* relativ schnell zur Bildung von Revertanten, die sich nach Reisolierung und erneutem Verimpfen in



Schweine als virulent herausstellten (Frey *et al.*, 2004). Beide sehr interessanten Systeme haben allerdings den Nachteil, dass die genetischen Veränderungen gering sind, keine essentiellen Bereiche betroffen sein dürfen und daher Reversionen, insbesondere nach mehreren Tierpassagen, zu erwarten sind. Ein echter Vorteil zu den derzeit erhältlichen BVDV-Lebendvakzinen ist daher nicht unbedingt zu erwarten.

Das Ziel, Sicherheit und Effektivität zu kombinieren, wird daher eher durch die hier beschriebenen *trans*-komplementierten Replikons (Pseudovirionen) ermöglicht. Sie besitzen einerseits die Fähigkeit zur RNA-Replikation und Protein-Expression, haben andererseits aber mangels der Möglichkeit zur Bildung von Virusnachkommen nicht das Potential zur Ausbreitung im Impfling. Widjoatmodjo und Mitarbeiter (2000) untersuchten erstmals *trans*-komplementierte CSFV-Replikons auf ihre Eignung als Vakzine und zeigten, dass Schweine trotz Leukopenie und klinischer Symptome zumindest partiell vor einer tödlichen CSFV-Testinfektion geschützt waren. Allerdings wurde in diesen Experimenten nur eine einmalige Applikation der Pseudovirionen geprüft, und die besten Ergebnisse wurden nach intradermaler Anwendung beobachtet.

Für die vorliegende Arbeit wurden Kälber mit Pseudovirionen immunisiert und anschließend testinfiziert. Die Immunisierung mit ncp7 $\Delta$ C-Pseudovirionen wurde von allen immunisierten Kälbern gut vertragen. Sie zeigten anschließend weder eine mit der Impfung in Zusammenhang stehende Leukopenie noch eine erhöhte Körpertemperatur. Ebenso wenig konnte nach den Immunisierungen Impfvirus in Blutleukozyten oder Nasensekret nachgewiesen werden. Das spricht dafür, dass das Virus weder ausgeschieden wurde noch sich systemisch im Organismus ausgebreitet hat. Diese Ergebnisse lassen zudem darauf schließen, dass die Immunisierung mit *trans*-komplementierten ncp7 $\Delta$ C-Pseudovirionen nicht zu Kontakttierinfektionen führen kann und eine diaplazentare Übertragung des Impfvirus auf den Fetus im Falle der Immunisierung von tragenden Rindern nicht wahrscheinlich ist, da es hierfür zur nachweisbaren Virämie kommen müsste (Thierauf, 1993; Wolf *et al.*, 1996). Somit scheint die Sicherheit der ncp7 $\Delta$ C-Pseudovirionen vergleichbar mit der von Totimpfstoffen zu sein (Bolin, 1995), ist aber in jedem Fall derjenigen von replikationskompetenten Lebendvakzinen überlegen. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von

Widjoatmodjo und Mitarbeitern (2000) bei CSFV überein, die nach der Immunisierung von Schweinen mit *trans*-komplementierten CSFV $\Delta E^{\text{RNS}}$ -Replikons weder Fieber noch klinische Symptome feststellen konnten. Angaben zu Leukopenie oder Impfvirus-Reisolierung nach der Immunisierung liegen in dieser Veröffentlichung allerdings nicht vor.

Die zweimalige i.m.- bzw. i.n.- und i.m.-Immunisierung mit ncp7 $\Delta$ C-Pseudovirionen führte nachweislich zur Induktion einer BVDV-spezifischen Immunantwort, wie mittels indirektem und *blocking*-ELISA sowie im homologen wie heterologen SNT nachgewiesen werden konnte. Das Erscheinen von NS3-Antikörpern (im *blocking*-ELISA) spricht für die Replikationskompetenz der applizierten Pseudovirionen, ähnlich wie bei attenuierten Lebendimpfstoffen. So werden nach der Applikation einer BVDV-Totvakzine zwar ebenfalls NS3-Antikörper beobachtet, allerdings sind dazu je nach Reinheit der Vakzinen mehrere Verabreichungen notwendig, und die Titer sind häufig gering (Beer *et al.*, 2000). Neutralisierende Antikörpertiter von 1:508 (Gruppe 1, TV 1, zweimal immunisiert) bzw. 1:1083 (Gruppe 3, TV 2, zweimal immunisiert) gegen den homologen Impfstamm und von 1:256 (Gruppe 1) bzw. 1:305 (Gruppe 3) gegen den heterologen Testinfektionsstamm ließen einen Schutz bereits vor der Testinfektion mit heterologem BVDV-Typ Ib vermuten. Nach SNT mit den heterologen BVDV-Typen Ic und II am Tag der Testinfektion zeigte sich allerdings, dass selbst eine zweimalige Immunisierung mit ncp7 $\Delta$ C-Pseudovirionen wie erwartet nur eine schwache Immunantwort gegen den sehr heterologen BVDV-Typ II Stamm induziert, die vermutlich nur zum partiellen Schutz führen dürfte. Allerdings sind derzeit auch keine konventionellen BVDV-Vakzinen in Deutschland auf dem Markt, die BVDV-Typ II berücksichtigen (Beer und Wolf, 2003). Die Berücksichtigung von BVDV-Typ II bei der Vakzineentwicklung ist daher notwendig, auch wenn in Deutschland noch sehr geringe BVDV-Typ II Prävalenzen von 1 bis 5% beobachtet werden (Beer *et al.*, 1996; Wolfmeyer *et al.*, 1997). Allerdings existieren bereits Berichte zu inaktivierten Prototypvakzinen, die beide BVDV-Genotypen enthalten (Beer *et al.*, 2000)

Nach der Testinfektion der mit Pseudovirionen vakzinierten Rinder konnte in beiden Tierversuchen bei den zweimal immunisierten Tiergruppen weder eine Leukopenie

noch ein Anstieg der Körpertemperatur festgestellt oder *Challenge*-Virus aus Blutleukozyten und Nasensekret isoliert werden.

Die vorliegenden Daten zeigen daher überzeugend, dass eine zweimalige Immunisierung mit komplementiertem ncp7 $\Delta$ C zu einer vollständigen Protektion gegen eine Testinfektion mit BVDV-Typ I führte. Nicht nur klinisch sondern auch auf Basis des Viurnachweises in Blutleukozyten und Nasentupfern konnte dieser Schutz bestätigt werden. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass ncp7 $\Delta$ C-Pseudovirionen ähnlich wirksam sind wie replikationsfähige, attenuierte BVDV-Lebendvakzinen, ohne allerdings deren Schadenspotential zu besitzen (Cortese et al., 1998b; Orban et al., 1983). Der Vakzineprototyp übertrifft dabei die Schutzwirkung der CSFV-Replikons (Widjoatmodjo et al., 2000), wobei die zweimalige Applikation hier eine große Rolle zu spielen scheint. So konnte aus den beiden Tierversuchen abgeleitet werden, dass eine einmalige Applikation der Vakzine zwar bereits messbare neutralisierende Antikörper induzierte, diese jedoch nicht ausreichend für einen Schutz gegen eine Infektion mit heterologem BVDV vom gleichen Subtyp waren. Die zweimalige Applikation scheint somit für die erstrebenswerte sogenannte „sterile Immunität“ essentiell zu sein, und der notwendige Schutz vor Virämie und damit die Chance auf „fetale Protektion“ sind gegeben. Hierbei verhielt sich die vorgestellte Replikon-Vakzine wiederum wie eine Totvakzine, da auch hier ein klarer *Prime-Boost*-Effekt durch die zweifache Applikation im Abstand von 28 Tagen zu beobachten war (Beer et al., 2000; Brownlie et al., 1995; Howard et al., 1994).

Die einmalige Immunisierung mit komplementiertem ncp7 $\Delta$ C führte hingegen nur zum Aufbau einer partiellen Immunität, die einer Testinfektion mit heterologem BVDV nur teilweise standhielt. Es konnte beobachtet werden, dass die einmalig immunisierten Kälber im Vergleich zu den nicht immunisierten Kontrolltieren eine deutlich verkürzte Leukopeniephase, eine verkürzte Phase der Temperaturerhöhung und eine verkürzte Virämie und Virusausscheidung durchmachten.

Dabei ist der Applikationsweg nicht vorrangig von Bedeutung. Zumindest konnte gezeigt werden, dass die zweimalige i.m.-Applikation von komplementiertem ncp7 $\Delta$ C eine vergleichbar gute Immunität gegen die Testinfektion hervorrief wie die zweimalige i.m. und intranasale Applikation, die im ersten Versuch gewählt wurde, um den natürlichen Infektionsverlauf nachzuahmen. Die zunächst schneller anstei-

genden und höheren Titer nach der ersten Immunisierung im ersten Tierversuch, die intramuskulär und intranasal erfolgte, sind vermutlich auf die höhere Impfvirusmenge ( $2 \times 10^6$  KID<sub>50</sub> i.m. plus  $2 \times 10^6$  KID<sub>50</sub> intranasal statt nur  $2 \times 10^6$  KID<sub>50</sub> i.m. im zweiten Versuch) zurückzuführen.

Im Vergleich dazu untersuchten van Gennip und Mitarbeiter (2002) in Schweinen drei unterschiedliche Applikationswege (intradermal, intramuskulär und intranasal) für die einmalige Immunisierung mit *trans*-komplementierten CSFV-Replikons. Dabei konnte gezeigt werden, dass nur die intradermale Immunisierung vor einem tödlichem Ausgang der CSV-Challenge-Infektion schützen konnte. Die intramuskuläre Immunisierung bewirkte bei den Schweinen lediglich einen partiellen Schutz, während die intranasale Immunisierung wirkungslos blieb. Hierbei sind die Daten der i.m. Applikation mit den hier gezeigten Daten zur einmaligen Verabreichung vergleichbar. Leider fehlen bisher andere Vergleichsarbeiten mit pestiviralen Pseudovirionen als Impfstoff.

Zukünftige Untersuchungen mit den vorgestellten BVDV-Pseudovirionen auf Basis des ncp7ΔC-Replikons werden sich insbesondere auf die Dauer der Immunität und die Möglichkeiten zur fetalen Protektion konzentrieren. Auch die Testinfektion mit weiteren heterologen BVDV-Stämmen (z.B. Ic oder II) muss für eine weitere Charakterisierung der Replikon-Vakzine erfolgen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass im Vergleich zu inaktivierten Vakzinen und attenuierten Lebendvakzinen ncp7ΔC-Pseudovirionen erstmalig eine völlig neue Art von BVDV-Vakzine repräsentieren, die die Vorteile beider bisher angewandten Systeme – nämlich Sicherheit bei der Applikation für Impftier, Fetus und Kontakttiere und Effizienz der Immunitätsinduktion bei zweimaliger Immunisierung – in sich vereint.

## 6 Zusammenfassung

Die aktive Immunisierung gegen eine Infektion mit dem Virus der Bovinen Virusdiarrhoe (BVDV) ist wichtiger Bestandteil der BVD-Bekämpfung. Die derzeit verfügbaren konventionellen Impfstoffe zeigen aber entweder Schwächen bei der Wirksamkeit (inaktivierte Vakzinen) oder sind nicht vollkommen unschädlich (replikationsfähige Lebendvakzinen). In der vorliegenden Arbeit wurde daher ein vollkommen neuer Ansatz der Immunisierung gegen BVDV untersucht.

Autonom replizierende BVDV-Defektgenome – sogenannte Replikons – mit einer Deletion innerhalb der Kapsid-kodierenden Region wurden mittels einer Helferzelllinie, die alle BVDV-Strukturproteine (Kapsid, E<sup>RNS</sup>, E1, E2) konstitutiv exprimiert, effizient in Virionen verpackt. Die Charakterisierung dieser *trans*-komplementierten Pseudovirionen zeigte, dass die Verpackung einerseits zu Virustitern von bis zu 10<sup>6</sup> infektiösen Einheiten/ml führte, aber andererseits keine unerwünschten, replikationskompetenten Revertanten entstanden waren. Die charakterisierten BVDV-Pseudovirionen oder „verpackten Replikons“ wurden in zwei Tierexperimenten an 15 Rinder verabreicht, um Immunogenität wie auch Unschädlichkeit im Vergleich mit 10 Kontrolltieren zu prüfen. Die Belastbarkeit der Replikon-induzierten Immunität wurde zusätzlich durch eine Testinfektion aller Rinder mit heterologem BVDV Typ I getestet. Es konnte dabei gezeigt werden, dass die Immunisierung mit Pseudovirionen in allen Tieren symptomlos und ohne messbare Virämie oder Impfvirusausscheidung verlief. Alle Tiere der zweimalig im Abstand von 4 Wochen intranasal und/oder intramuskulär immunisierten Tiergruppen zeigten eine „sterile Immunität“ und waren im Vergleich zu den nicht immunisierten Kontrolltieren komplett vor klinischen Symptomen, Virämie und Testvirusausscheidung geschützt. Die einmalige intramuskuläre Applikation von Pseudovirionen induzierte hingegen nur einen partiellen Schutz gegen die heterologe BVDV-Testinfektion mit gemilderten klinischen Symptomen und einer deutlich reduzierten Virämie und Ausscheidungsphase.

Die hier erstmals zur Immunisierung gegen BVDV vorgestellten Pseudovirionen stellen somit eine neuartige Form von BVD-Vakzine dar, die eine sinnvolle und vielversprechende Alternative zu den bisher vorhandenen Systemen bietet. Sie kombiniert die Eigenschaften der inaktivierten Impfstoffe (zweimalige Applikation, Unschädlichkeit) mit denen der Lebendimpfstoffe (Wirksamkeit).

Ncp7ΔC-Pseudovirionen stellen somit eine neuartige Form einer Pestivirus-Vakzine dar, die eine sinnvolle Alternative zu den bisher vorhandenen Systemen bietet.

Die hier erstmals zur Immunisierung gegen BVDV vorgestellten Pseudovirionen stellen somit eine neuartige Form von BVD-Vakzine dar, die eine sinnvolle und vielversprechende Alternative zu den bisher vorhandenen Systemen bietet. Sie kombiniert die Eigenschaften der inaktivierten Impfstoffe (zweimalige Applikation, Unschädlichkeit) mit denen der Lebendimpfstoffe (Wirksamkeit).

Ncp7 $\Delta$ C-Pseudovirionen stellen somit eine neuartige Form einer Pestivirus-Vakzine dar, die eine sinnvolle Alternative zu den bisher vorhandenen Systemen bietet.

## 7 Summary

### **Packaged bovine viral diarrhea virus (BVDV) replicons as a novel BVDV vaccine**

Immunisation against bovine viral diarrhea virus is a major part of BVDV eradication efforts in Germany. However, the available conventional BVDV-vaccines have disadvantages concerning efficacy (inactivated vaccines) or safety (live attenuated vaccines) of the different preparations. In the here presented study, a completely novel kind of BVDV-vaccine was investigated.

Autonomously replicating deleted genomes of BVDV – so called replicons – with a partial deletion within the capsid-encoding region were efficiently packaged into virions using a helper cell line which constitutively expressed all structural proteins (Capsid, E<sup>FN5</sup>, E1 and E2) of BVDV. It could be demonstrated that these *trans*-complemented pseudovirions reached titers of up to 10<sup>6</sup> infectious units/ml, and no replication competent, reverted virus mutants were generated. In an efficacy and safety experiment, the characterised BVDV-pseudovirions or “packaged replicons” were administered to 15 cattle in three groups, and the immunised animals were compared with naive control animals (n=10). Subsequently, all cattle were challenged with a heterologous BVDV type I wildtype strain. It could be shown, that immunisation with pseudovirions did neither induce any clinical signs nor detectable viremia or shedding of the vaccine virus. In comparison to the naïve controls, all animals of the groups with two intranasal and/or intramuscular immunisations in an interval of 4 weeks had a „sterilising immunity“ and were completely protected against clinical symptoms, viremia or shedding of challenge virus. In contrast, the single intramuscular immunisation induced only partial protection against BVDV challenge infection in combination with mild clinical signs and a markedly reduced viremia as well as virus shedding.

The here for the first time presented novel kind of BVDV-vaccine, which is based on pseudovirions, represents an interesting and promising alternative to the existing approaches. Pseudovirions combine the properties of inactivated vaccines (“two shot” strategy, safety) with those of live attenuated vaccines (efficacy).

In conclusion ncp7ΔC-pseudovirions are a new type of vaccine that is a reasonable alternative to the actually existing systems.

The here for the first time presented novel kind of BVDV-vaccine, which is based on pseudovirions, represents an interesting and promising alternative to the existing approaches. Pseudovirions combine the properties of inactivated vaccines („two shot“ strategy, safety) with those of live attenuated vaccines (efficacy).

In conclusion ncp7 $\Delta$ C-pseudovirions are a new type of vaccine that is a reasonable alternative to the actually existing systems.



## 8 Literaturverzeichnis

- Allison, S.L., Schlich, J., Stiasny, K. und Mandl, C.W.** (2001)  
Mutational evidence for an internal fusion peptide in flavivirus envelope protein E  
J. Virol. 75, 4268-4275
- Anraku, I., Harvey, T.J., Linedale, R., Gardner, J., Harrich, D., Suhrbier, A. und Khromykh, A.A.** (2002)  
Kunjin virus replicon vaccine vectors induce protective CD8+ T-cell immunity  
J. Virol. 76, 3791-3799
- Ansardi, D.C., Porter, D.C. und Morrow, C.D.** (1993)  
Complementation of a poliovirus defective genome by a recombinant vaccinia virus which provides poliovirus P1 precursor in trans  
J. Virol. 75, 6256-6264
- Becher, P., Orlich, M., Kosmidou, A., König, M., Baroth, M. und Thiel, H.J.** (1999)  
Genetic diversity of pestiviruses: identification of novel groups and implications for classification  
Virology 262, 64-71
- Becher, P., Orlich, M., Shannon, A.D., Horner, G., König, M. und Thiel, H.J.** (1997)  
Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants  
J. Gen. Virol. 78, 1357-1366
- Becher, P., Orlich, M. und Thiel, H.J.** (2000)  
Mutations in the 5' nontranslated region of bovine viral diarrhea virus result in altered growth characteristics  
J. Virol. 74, 7884-7894
- Becher, P., Orlich, M. und Thiel, H.J.** (2001)  
RNA recombination between persisting pestivirus and a vaccine strain: generation of cytopathogenic virus and induction of lethal disease  
J. Virol. 75, 6256-6264
- Beer, M.** (2000)  
Entwicklung und Prüfung einer Vektorvakzine gegen die Bovine Virusdiarrhoe / Mucosal Disease  
Habil. Vet. Med. München
- Beer, M., Hehnen, H.R., Wolfmeyer, A., Poll, G., Kaaden, O.R. und Wolf, G.** (2000)  
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. und Wolf, G.** (1999)  
Selection of BVDV genotype II isolates using a monoclonal antibody and FACS analysis  
Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 112, 345-350

- Beer, M. und Wolf, G.** (2003)  
Vaccines against an infection with Bovine Viral Diarrhea Virus/Mucosal Disease (BVDV/MD): A short overview  
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 116, 252-258
- 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
- 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
- Bitsch, V. und Ronsholt, L.** (1995)  
Control of bovine viral diarrhea virus infection without vaccines  
Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 11, 627-640
- Bolin, S.R.** (1995)  
Control of bovine viral diarrhea infection by use of vaccination  
Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 11, 615-625
- Bolin, S.R., McClurkin, A.W., Cutlip, R.C. und Coria, M.F.** (1985)  
Response of cattle infected with noncytopathic bovine viral diarrhea virus to vaccination for bovine viral diarrhea and to subsequent challenge exposure with cytopathic bovine viral diarrhea virus  
Am. J. Vet. Res. 46, 2467-2470
- Bolin, S.R. und Ridpath, J.F.** (1996)  
Glycoprotein E2 of bovine viral diarrhea virus expressed in insect cells provides calves limited protection from systemic infection and disease  
Arch. Virol 141, 1463-1477
- Bredenbeek, P.J., Frolov, I., Rice, C.M. und Schlesinger, S.** (1993)  
Sindbis virus expression vectors: packaging of RNA replicons by using defective helper RNAs  
J. Virol. 67, 6439-6446
- Brown, E.A., Zhang, H., Ping, L.H. und Lemon, S.M.** (1992)  
Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs  
Nucleic Acids Res. 20, 5041-5045
- 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., 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

- Bruschke,C.J., Weerdmeester,K., van Oirschot,J.T. und van Rijn,P.A.** (1998)  
Distribution of bovine virus diarrhoea virus in tissues and white blood cells of cattle during acute infection  
Vet. Microbiol. 64, 23-32
- Bruschke,C.J., Weerdmeester,K., 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  
Vet. Microbiol. 17, 1983-1991
- Castrucci,G., Frigeri,F., Ferrari,M. und Traldi,V.** (1991)  
The vaccination and challenge with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) of calves previously infected with a non-cytopathic BVDV  
Comp. Immunol. Microbiol.Infect.Dis. 14, 31-38
- Chapek,M.L., McClaughry,L.E. und Wilkins,L.M.** (1978)  
Evaluation of a bovine virus diarrhoea vaccine  
Mod. Vet. Pract. 59, 755-757
- Cheng,W.F., Hung,C.F., Hsu,K.F., Chai,C.Y., He,L., Polo,J.M., Slater,L.A., Ling,M. und Wu,T.C.** (2002)  
Cancer immunotherapy using Sindbis virus replicon particles encoding a VP22-antigen fusion  
Hum. Gene Ther. 13, 553-568
- Chu,H.J. und Zee,Y.C.** (1984)  
Morphology of bovine viral diarrhoea virus  
Am. J. Vet. Res. 45, 845-850
- Collen,T. und Morrison,W.I.** (2000)  
CD4(+) T-cell responses to bovine viral diarrhoea virus in cattle  
Virus Res. 67, 67-80
- Collen,T., Carr,V., Parsons,K., Charleston,B. und Morrison,W.I.** (2002)  
Analysis of the repertoire of cattle CD4(+) T cells reactive with bovine viral diarrhoea virus  
Vet. Immunol. Immunopathol. 87, 235-238
- 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., Belzer,S.K. und Retzel,E.** (1988b)  
Proteins encoded by bovine viral diarrhoea virus: the genomic organization of a pestivirus  
Virology 165, 200-208
- Coria,M.F., Schmerr,M.J. und McClurkin,A.W.** (1983)  
Characterization of the major structural proteins of purified bovine viral diarrhoea virus  
Arch. Virol. 76, 335-339

- Cortese, V.S., Whittaker, R., Ellis, J., Ridpath, J.F. und Bolin, S.R.** (1998a)  
Specificity and duration of neutralizing antibodies induced in healthy cattle after administration of a modified-live virus vaccine against bovine viral diarrhoea  
Am. J. Vet. Res. 59, 848-850
- Cortese, V.S., Grooms, D.L., Ellis, J., Bolin, S.R., Ridpath, J.F. und Brock, K.V.** (1998b)  
Protection of pregnant cattle and their fetuses against infection with bovine viral diarrhoea virus type 1 by use of a modified-live virus vaccine  
Am. J. Vet. Res. 59, 1409-1413
- de Smit, A.J., Bouma, A., de Kluijver, H.G., Terpstra, C. und Moormann, R.J.** (2000)  
Prevention of transplacental transmission of moderate-virulent classical swine fever virus after single or double vaccination with an E2 subunit vaccine  
Vet. Q. 22, 150-153
- de Smit, A.J., van Gennip, H.G., Miedema, G.K., van Rijn, P.A., Terpstra, C. und Moormann, R.J.** (2000)  
Recombinant classical swine fever (CSF) viruses derived from the Chinese vaccine strain (C-strain) of CSF virus retain their avirulent and immunogenic characteristics  
Vaccine 18, 2351-2358
- Dean, H.J. und Leyh, R.** (1999)  
Cross-protective efficacy of a bovine viral diarrhoea virus (BVDV) type 1 vaccine against BVDV type 2 challenge  
Vaccine 17, 1117-1124
- Donis, R.O.** (1995)  
Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus and its interactions with the host  
Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 11, 393-423
- 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. und Dubovi, E.J.** (1987)  
Molecular specificity of the antibody responses of cattle naturally and experimentally infected with cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhoea virus biotypes  
Am. J. Vet. Res. 48, 1549-1554
- Doyle, L.G. und Heuschele, W.P.** (1983)  
Bovine viral diarrhoea virus infection in captive exotic ruminants  
J. Am. Vet. Med. Assoc. 183, 257-259
- Enzmann, P.J. und Weiland, F.** (1978)  
Structural similarities of hog cholera virus with togaviruses  
Arch. Virol. 57, 339-348

- Fernelius,A.L., Amtower,W.C., Lambert,G., McClurkin,A.W. und Matthews P.J.** (1973)  
Bovine viral diarrhea virus in swine: characteristics of virus recovered from naturally and experimentally infected swine  
Can. J. Comp. Med. 37, 13-20
- Fernelius,A.L., Classick,L.G. und Smith,R.L.** (1971)  
Evaluation of a soluble antigen vaccine prepared from bovine viral diarrhea-mucosal diseases virus-infected cell cultures  
Am. F. Vet. Res. 32, 1963-1979
- Fleeton,M.N., Liljeström,P., Sheahan,B.J. und Atkins,G.J.** (2000)  
Recombinant Semliki Forest virus particles expressing louping ill virus antigens induce a better protective response than plasmid-based DNA vaccines or an inactivated whole particle vaccine  
J. Gen. Virol. 81, 749-58
- Frey,H.R., Eicken,K., Grummer,B., Kenklies,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
- Freyburg,M.v.** (1999)  
Glykoprotein E2 des Virus der Bovinen Virusdiarrhoe (BVDV): Expression und Immunisierung mit rekombinanten Sindbis-Virus-Vektoren  
Diss. Vet. Med. München
- Fricke,J., Gunn,M. und Meyers,G.** (2001)  
A family of closely related bovine viral diarrhea virus recombinants identified in an animal suffering from mucosal disease: new insights into the development of a lethal disease in cattle  
Virology 291, 77-79
- Frink,S., Grummer,B., Pohlenz,J.F. und Liebler-Tenorio,E.M.** (2002)  
Changes in distribution and numbers of CD4+ and CD8+ T-lymphocytes in lymphoid tissues and intestinal mucosa in the early phase of experimentally induced early onset mucosal disease in cattle  
J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health 49, 476-493
- 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 isolate  
Vet. Microbiol. 46, 285-294
- Garry,R.F. und Dash,S.** (2003)  
Proteomics computational analyses suggest that hepatitis C virus E1 and pestivirus E2 envelope glycoproteins are truncated class II fusion proteins  
Virology 307, 255-265

- Giangaspero, M., Harasawa, R. und Verhulst, A.** (1997)  
Genotypic analysis of the 5'-untranslated region of a pestivirus strain isolated from human leucocytes  
Microbiol. Immunol. 41, 829-834
- 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., Tautz, N. und Behrens, S.E.** (2001)  
Genetic analysis of the pestivirus nonstructural coding region: defects in the NS5A unit can be complemented in trans  
J. Virol. 75, 7791-7802
- Gray, E.W. und Nettleton, P.F.** (1987)  
The ultrastructure of cell cultures infected with border disease and bovine viral diarrhoea virus  
J. Gen. Virol. 68; 2339-2346
- Greiser-Wilke, I., Grummer, B. und Moennig, V.** (2003)  
Bovine viral diarrhoea eradication and control programmes in Europe  
Biologicals 31, 113-118
- Grummer, B., Beer, M., Liebler-Tenorio, E. und Greiser-Wilke, I.** (2001)  
Localization of viral proteins in cells infected with bovine viral diarrhoea virus  
J. Gen. Virol. 82, 2597-2605
- Grummer, B., Bendfeldt, S., Wagner, B. und Greiser-Wilke, I.** (2002)  
Induction of the intrinsic apoptotic pathway in cells infected with cytopathic bovine virus diarrhoea virus  
Virus Res. 90, 143-153
- Harada, T., Tautz, N. und Thiel, H.J.** (2000)  
E2-p7 region of the bovine viral diarrhoea 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 Veterinarmed. 29, 701-704
- Hariharan, M.J., Driver, D.A., Townsend, K., Brumm, D., Polo, J.M., Belli, B.A., Catton, D.J., Hsu, D., Mittelstaedt, D., McCormack, J.E., Karavodin, L., Dubensky, T.W. Jr., Chang, S.M. und Banks, T.A.** (1998)  
DNA immunization against herpes simplex virus: enhanced efficacy using a Sindbis virus-based vector  
J. Virol. 72, 950-958

- 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
- Harpin,S., Talbot,B., Mbikay,M. und Elazhary, Y.** (1997)  
Immune response to vaccination with DNA encoding the bovine viral diarrhoea virus major glycoprotein gp53 (E2)  
FEMS Microbiol. Lett. 146, 229-234
- Herd,K.A., Hervey,T., Khromykh,A.A. und Tindle,R.W.** (2003)  
Recombinant Kunjin virus replicon vaccines induce protective T-cell immunity against human papillomavirus 16 E7-expressing tumour  
Virology 319, 237-248
- Hoff,H.S. und Donis,R.O.** (1997)  
Induction of apoptosis and cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by cytopathic bovine viral diarrhoea virus infection  
Virus Res. 49, 101-113
- Hoffman,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. München
- Horzinek,M., Reczko,E. und Petzoldt,K.** (1967)  
On the morphology of hog cholera virus  
Arch. Gesamte Virusforsch. 21, 475-478
- 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., 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. und Moormann,R.J.** (1997)  
Inhibition of pestivirus infection in cell culture by envelope proteins E(rns) and E2 of classical swine fever virus: E(rns) and E2 interact with different receptors  
J. Gen. Virol. 78, 2779-2787
- Ikeda,M., Yi,M., Li,K. und Lemon,S.M.** (2002)  
Selectable subgenomic and genome-length dicistronic RNAs derived from an infectious molecular clone of the HCV-N strain of hepatitis C virus replicate efficiently in cultured Huh7 cells  
J. Virol. 76, 2997-3006
- Iqbal,M., Flick-Smith,H. und McCauley,J.W.** (2000)  
Interactions of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein E(rns) with cell surface glycosaminoglycans  
J. Gen. Virol. 81, 451-459

- 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
- Johanning,F.W., Conry,R.M., LoBuglio,A.F., Wright,M., Sumarel,L.A., Pike,M.J. und Curiel,D.T. (1995)**  
A Sindbis virus mRNA polynucleotide vector achieves prolonged and high level heterologous gene expression in vivo  
Nucleic Acids Res. 23, 1495-1501
- Kamstrup,S., Roensholt,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
- Kaplan,G. und Racaniello,V.R. (1988)**  
Construction and characterization of poliovirus subgenomic replicons  
J. Virol. 62, 1687-1696
- Khromykh,A.A. und Westaway,E.G. (1997)**  
Subgenomic replicons of the flavivirus Kunjin: construction and applications  
J. Virol. 71, 1497-1505
- Khromykh,A.A., Varnavski,A.N. und Westaway,E.G. (1998)**  
Encapsidation of the flavivirus kunjin replicon RNA by using a complementation system providing Kunjin virus structural proteins in trans  
J. Virol. 72, 5967-5977
- Khromykh,A.A., Sedlak,P.L., Guyatt,K.J., Hall,R.A. und Westaway,E.G. (1999)**  
Efficient trans-complementation of the flavivirus kunjin NS5 protein but not of the NS1 protein requires its coexpression with other components of the viral replicase  
J. Virol. 73, 10272-10280
- Khromykh,A.A., Sedlak,P.L. und Westaway,E.G. (1999)**  
Trans-Complementation analysis of the flavivirus Kunjin NS5 gene reveals an essential role for translation of its N-terminal half in RNA replication  
J. Virol. 53, 9247-9255
- Khromykh,A.A. (2000)**  
Replicon-based vectors of positive strand RNA viruses  
Curr. Opin. Mol. Ther. 2, 555-569
- Kofler,R.M., Heinz,F.X. und Mandl,C.W. (2002)**  
Capsid protein C of tick-borne encephalitis virus tolerates large internal deletions and is a favorable target for attenuation of virulence  
J. Virol. 76, 3537-3543



- Kofler, R.M., Leitner, A., O'Riordain, G., Heinz, F.X. und Mandl, C.W.** (2003)  
Spontaneous mutations restore the viability of tick-borne encephalitis virus mutants with large deletions in protein C  
J. Virol. 77, 443-451
- Korn, G.** (1977)  
Zur Wirkung des Proteinase-Inhibitors Trasylol auf den Verlauf der Schweinepestkrankung sowie zur Nachweis der Antigene (Virus und einer Chymotrypsin-like Protease) und der verschiedenen Antikörperarten  
Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 90, 469-472
- Kühne, S.** (2000)  
Die Strukturgenregion (Kapsid, Erns, E1 und E2) des Virus der Bovinen Virusdiarrhoe (BVDV): Expression und Immunisierung mit rekombinanten Sindbisvirus- und cDNA-Vektoren  
Diss. Vet. Med. München
- 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
- Kweon, C.H., Kang, S.W., Choi, E.J. und Kang, Y.B.** (1999)  
Bovine herpes virus expressing envelope protein (E2) of bovine viral diarrhea virus as a vaccine candidate  
J. Vet. Med. Sci. 61, 395-401
- 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
- Levings, R.L. und Wessman, S.J.** (1991)  
Bovine viral diarrhea virus contamination of nutrient serum, cell cultures and viral vaccines  
Dev. Biol. Stand. 75, 177-181
- 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
- Liess, B.** (1985)  
Significance of immune tolerance for the pathogenesis of bovine virus diarrhea  
Berl Münch. Tierärztl. Wochenschr. 98, 420-423
- Liess, B., Frey, H.R., Orban, S. und Hafez, S.M.** (1983)  
Bovine virus diarrhea (BVD)-"mucosal disease": persistent BVD field virus infection in serologically selected cattle  
Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 90, 261-266

- Liess,B., Frey,H.R., Trautwein,G. und Peters,W.** (1987)  
Frequency of appearance of persistent BVD virus infections and their effects on the cattle population  
Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 94, 583-585
- Liljeström,P. und Garoff,H.** (1991)  
A new generation of animal cell expression vectors based on the Semliki Forest virus replicon  
Biotechnology (N.Y.) 9, 1356-1361
- Lindberg,A.L. und Alenius,S.** (1999)  
Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations  
Vet. Microbiol. 64, 197-222
- Lohmann,V., Körner,F., Koch,J., Herian,U., Theilmann,L. und Bartenschlager,R.** (1999)  
Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line  
Science 285, 110-113
- Mayr,A., Bachmann,P.A., Bibrack,B. und Wittmann,G.** (1974)  
Virologische Arbeitsmethoden
- Makoschey,B., Janssen,M.G., Vrijenhoek,M.P., Korsten,J.H. und Marel,P.** (2001)  
An inactivated bovine virus diarrhoea virus (BVDV) type 1 vaccine affords clinical protection against BVDV type 2  
Vaccine 19, 3261-3268
- Makoschey,B., Becher,P., Janssen,M.G., Orlich,M., Thiel,H.J. und Lutticken,D.** (2004)  
Bovine viral diarrhea virus with deletions in the 5'-nontranslated region: reduction of replication in calves and induction of protective immunity  
Vaccine 22, 3285-3294
- Mandl,C.W., Allison,S.L., Holzmann,H., Meixner,T. und Heinz,F.X.** (2000)  
Attenuation of tick-borne encephalitis virus by structure-based site-specific mutagenesis of a putative flavivirus receptor binding site  
J. Virol. 74, 9601-9609
- Maurer,K., Krey,T., Moennig,V., Thiel,H.J. und Rügenapf,T.** (2004)  
CD46 is a cellular receptor for bovine viral diarrhea virus  
J. Virol. 78, 1792-1799
- McClurkin,A.W., 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
- McKnight,K.L. und Lemon,S.M.** (1996)  
Capsid coding sequence is required for efficient replication of human rhinovirus 14 RNA  
J. Virol. 70, 1941-1952

- Meyers,G., Rümenapf,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., Becher,P., Thiel,H.J. und Kümmerer,B.M.** (1997)  
Recovery of cytopathogenic and noncytopathogenic bovine viral diarrhea viruses from cDNA constructs  
J. Virol. 70, 8606-8613
- Meyers,G. und Thiel,H.J.** (1996)  
Molecular characterization of pestiviruses  
Adv. Virus Res. 47, 53-118
- Meyers,G., Thiel,H.J. und Rümenapf,T.** (1996)  
Classical swine fever virus: recovery of infectious viruses from cDNA constructs and generation of recombinant cytopathogenic defective interfering particles  
J. Virol. 70, 1588-1595
- Moennig,V** (1990)  
Pestiviruses: a review  
Vet. Microbiol. 23, 35-54
- Moennig,V., Bolin,S.R., Coulibaly,C.O.Z., Kelso,G.N., Liess,B., Mateo,A., Peters,W. und Greiser-Wilke,I.** (1987)  
Investigation of the antigenic structure of pestiviruses by means of monoclonal antibodies  
Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 48
- 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
- Moennig,V. und Plagemann,P.G.** (1992)  
The pestiviruses  
Adv. Virus Res. 41, 53-98
- Molenkamp,R., Kooi,E.A., Lucassen,M.A., Greve,S., Thijssen,J.C., Spaan,W.J. und Bredenbeek,P.J.** (2003)  
Yellow fever virus replicons as an expression system for hepatitis C virus structural proteins  
J. Virol. 77, 1644-1648
- Moser,C., Stettler,P., Tratschin,J.D. und Hofmann,M.A.** (1996)  
Cytopathogenic and noncytopathogenic RNA replicons of classical swine fever virus  
J. Virol. 73, 7787-7794
- 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

- Moormann,R.J., Bouma,A., Kramps,J.A., Terpstra,C. und de Smit,H.J. (1990)**  
Development of a classical swine fever subunit marker vaccine and companion diagnostic test  
Vet. Microbiol. 73, 209-219
- Nagai,M., Hayashi,M., Sugita,S., Sakoda,Y., Mori,M., Murakami,T., Ozawa,T., Yamada,N. und Akashi,H. (2004)**  
Phylogenetic analysis of bovine viral diarrhoea viruses using five different genetic regions  
Virus Res. 99, 103-113
- Nettleton,PF. und Entrican,G. (1980)**  
Ruminant pestiviruses  
Br. Vet. J. 151, 615-642
- Nettleton,P.F., Herring,J.A. und Corrigall,W. (1980)**  
Isolation of bovine virus diarrhoea virus from a Scottish red deer  
Vet. Rec. 107, 425-426
- Ohmann,H.B. (1990)**  
Electron microscopy of bovine virus diarrhoea virus  
Rev. Sci. Tech. 9, 61-73
- Olafson,P., MacCallum,A.D. und Fox,F.H. (1946)**  
An apparently new transmissible disease of cattle  
Cornell Vet. 36, 205-213
- Orban,S., Liess,B., Hafez,S.M., Frey,H.R., Blindow,H. und Sasse-Patzer,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. Veterinärmed. B 30, 619-634
- 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
- Pestova,T.V. und Hellen,C.U. (1999)**  
Internal initiation of translation of bovine viral diarrhoea virus RNA  
Virology 258, 249-256
- Pichler,J. (1995)**  
Humorale lokale und systemische Immunität nach unterschiedlicher Immunisierung gegen das Bovine Virusdiarrhoe/Mucosal Disease Virus  
Diss. Med. Vet. München
- Pietschmann,T. und Bartenschlager,R. (2001)**  
The hepatitis C virus replicon system and its application to molecular studies  
Curr. Opin. Drug. Discov. Devel. 4, 657-664

- Polo, J.M., Belli, B.A., Driver, D.A., Frolov, I., Sherrill, S., Hariharan, M.J., Townsend, K., Perri, S., Mento, S.J., Jolly, D.J., Chang, S.M., Schlesinger, S. und Dubensky, T.W. Jr.** (1999)  
Stable alphavirus packaging cell lines for Sindbis virus and Semliki Forest virus-derived vectors  
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96, 4598-4603
- Poole, T.L., Wang, C., Popp, R.A., Potgieter, L.N., Siddiqui, A. und Collett, M.S.** (1995)  
Pestivirus translation initiation occurs by internal ribosome entry  
Virology 206, 750-754
- Potgieter, L.N.** (1995)  
Immunology of bovine viral diarrhoea virus  
Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 11, 501-520
- Pringle, C.R.** (1998)  
The universal system of virus taxonomy of the International Committee on Virus Taxonomy (ICTV), including new proposals ratified since publication of the Sixth ICTV Report in 1995  
Arch. Virol. 143, 203-210
- Reimann, I.** (2004)  
Charakterisierung und trans-Komplementierung von Replikons des Virus der Bovinen Virusdiarrhoe  
Diss. Universität Greifswald
- Reimann, I., Meyers, G. und Beer, M.** (2003)  
Trans-complementation of autonomously replicating bovine viral diarrhoea virus replicons with deletions in the E2 coding region  
Virology 307, 213-227
- Reimann, I., Depner, K., Trapp, S. und Beer, M.** (2004)  
An avirulent chimeric pestivirus with altered cell tropism protects pigs against lethal infection with classical swine fever virus  
Virology 322, 143-157
- 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.F. und Bolin, S.R.** (1998)  
Differentiation of types 1a, 1b and 2 bovine viral diarrhoea virus (BVDV) by PCR  
Mol. Cell Probes 12, 101-106
- Rijnbrand, R., van der Straaten, T., van Rijn, P.A., Spaan, W.J. und Bredenbeek, P.J.** (1997)  
Internal entry of ribosomes is directed by the 5' noncoding region of classical swine fever virus and is dependent on the presence of an RNA pseudoknot upstream of the initiation codon  
J. Virol. 71, 451-457

**Rümenapf, T. (2000)**

Identifizierung von CD46 als zellulärer Rezeptor für bovine Pestiviren  
Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, 57

**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

**Rypula, K. (2003)**

The effects of experimental infection with bovine diarrhoea virus (BVDV) on lymphocyte subpopulations in the peripheral blood of pigs  
Pol. J. Vet. Sci. 6, 189-193

**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

**Schlesinger, S. und Dubensky, T.W. (1999)**

Alphavirus vectors for gene expression and vaccines  
Curr. Opin. Biotechnol. 10, 434-439

**Schmitt, J., Becher, P., Thiel, H.J. und Keil, G.M. (1999)**

Expression of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein E2 by bovine herpesvirus-1 from a synthetic ORF and incorporation of E2 into recombinant virions  
J. Gen. Virol. 80, 2839-2848

**Stark, R., Meyers, G., Rümenapf, 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

**Stettler, P., Devos, R., Moser, C., Tratschin, J.D. und Hofmann, M.A. (2002)**

Establishment and application of bicistronic classical swine fever virus genomes for foreign gene expression and complementation of E2 deletion mutants  
Virus Res. 85, 173-185

**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., 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., Meyers,G. und Thiel,H.J.** (1998)  
Pathogenesis of mucosal disease, a deadly disease of cattle caused by a pestivirus  
Clin. Diagn. Virol. 10, 121-127
- Tautz,N., Thiel,H.J., Dubovi,E.J. und Meyers,G.** (1997)  
Pathogenesis of mucosal disease: a cytopathogenic pestivirus generated by an internal deletion  
J. Virol. 68, 3289-3297
- Taylor,W.P., Okeke,A.N. und Shidali,N.N.** (1977)  
Experimental infection of Nigerian sheep and goats with bovine virus diarrhoea virus  
Trop. Anim. Health Prod. 9, 249-251
- Thierauf,P.** (1993)  
Untersuchungen zur Epidemiologie, Diagnose und Immunprophylaxe von BVD/MD-Virusinfektionen in Milchviehzuchtbeständen  
Diss. Vet. Med. München
- Thomas,P.C. und Jones,R.H.** (1985)  
Duration of immunity afforded by one dose of killed-virus bovine viral diarrhoea vaccine  
Agri. Practice 6, 34-37
- van Gennip,H.G., Bouma,A., van Rijn,P.A., Widjojoatmodjo,M.N. und Moormann,R.J.** (2002)  
Experimental non-transmissible marker vaccines for classical swine fever (CSF) by trans-complementation of E(rns) or E2 of CSFV  
Vaccine 20, 1544-1556
- van Gennip,H.G., van Rijn,P.A., Widjojoatmodjo,M.N., de Smit,A.J. und Moormann,R.J.** (2001)  
Chimeric classical swine fever viruses containing envelope protein E(RNS) or E2 of bovine viral diarrhoea virus protect pigs against challenge with CSFV and induce a distinguishable antibody response  
Vaccine 19, 447-459
- van Oirschot,J.T.** (1999)  
Diva vaccines that reduce virus transmission  
J. Biotechnol. 73, 195-205
- van Oirschot,J.T., Brusckke,C.J. und van Rijn,P.A.** (1999)  
Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea  
Vet. Microbiol. 64, 169-183
- van Regenmortel,M.H.V., Fauquet,C.M., Bishop,D.H.L., Carstens,E., Estes, M., Lemon,S., Maniloff,J., Mayo,M.A., McGeoch,D., Pringle,C.R.,A. und Wickner, R.B.** (2000)  
Virus Taxonomie. Seventh Report of the international committee on taxonomy of viruses  
Academic Press

- van Rijn,P.A.,van Gennip,H.G. und Moormann,R.J. (1999)**  
An experimental marker vaccine and accompanying serological diagnostic test both based on envelope glycoprotein E2 of classical swine fever virus (CSFV)  
Vaccine 17, 433-440
- Varnavski,A.N. und Khromykh,A. A. (1999)**  
Noncytopathic flavivirus replicon RNA-based system for expression and delivery of heterologous genes  
Virology 255, 366-375
- Varnavski,A.N., Young,P.R. und Khromykh,A.A. (2000)**  
Stable high-level expression of heterologous genes in vitro and in vivo by noncytopathic DNA-based Kunjin virus replicon vectors  
J. Virol. 76, 4394-4403
- Vassilev,B.V., Collet,M.S. und Donis,R.O. (1997)**  
Authentic and chimeric full-length genomic cDNA clones of bovine viral diarrhea virus that yield infectious transcripts  
J. Virol. 71, 471-478
- Vassilev,V.B. und Donis,R.O. (2000)**  
Bovine viral diarrhea virus induced apoptosis correlates with increased intracellular viral RNA accumulation  
Virus Res. 69, 95-107
- Wang,C., Le,S.Y., Ali,N. und Siddiqui,A. (1995)**  
An RNA pseudoknot is an essential structural element of the internal ribosome entry site located within the hepatitis C virus 5' noncoding region  
RNA. 1, 526-537
- 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. 1992 66, 3677-3682
- Weiland,E., Thiel,H.J., Hess,G., 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
- Weiss,B.G. und Schlesinger,S. (1991)**  
Recombination between Sindbis virus RNAs  
J. Virol. 65, 4017-4025
- 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



- Wolf,G., Thierauf,P., Wolfmeyer,A., Beer,M., Pichler,J. und Kaaden,O.R.** (1996)  
Indications and strategy for immunization against bovine viral diarrhoea virus  
Praktische.Tierarzt. 28 ref.
- 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
- 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 diarrhoea virus genome modulates translation as well as replication of the viral RNA  
J Virol. 74, 825-35
- Zhang,G., Aldridge,S., Clarke,M.C. und McCauley,J.W.** (1996)  
Cell death induced by cytopathic bovine viral diarrhoea virus is mediated by apoptosis  
J. Gen. Virol. 77, 1677-1681
- Zinkernagel,R.M.** (1994)  
Some general aspects of immunity to viruses  
Vaccine 12, 1493-1494

## 9 Abkürzungsverzeichnis

### A

A	Adenin
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
A. dest.	<i>Aqua destillata</i>
ATV	Alfevers Trypsin Versen

### B

BDV	<i>Border Disease Virus</i>
BHV1	Bovines Herpesvirus 1
BVDV	Bovines Virusdiarrhoe Virus
BSA	Bovines Serumalbumin

### C

C	Cytosin
C	Kapsid
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	<i>Copy DNA</i>
cp	Zytopathogen
CPE	Zytopathogener Effekt
CSFV	<i>Classical Swine Fever Virus</i>

### D

DI	<i>Difective Interfering</i>
DISC	<i>Defective In second Cycle</i>
DIVA	<i>Differentiating Infected from Vaccinated Animals</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure

### E

E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylamin-Tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum

**F**

FKS	Fetales Kälberserum
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut – Bundesinstitut für Tiergesundheit

**G**

G	Guanin
---	--------

**H**

HCV	Hepatitis C-Virus
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HPV	Humanes Papilloma Virus

**I**

IFN	Interferon
IFT	Immunfluoreszenz-Test
i.m.	Intramuskulär
Imm.	Immunisierung
Inf.	Infektion
IRES	<i>Internal Ribosomal Entry Site</i>
ISCOM	<i>Immuno-Stimulating Complex</i>
IU	<i>International Unit</i>

**K**

kb	Kilobasen
KID	Kulturinfektiöse Dosis
KUNV	Kunjün Virus

**L**

LB	Luria Bertani
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität

**M**

mAk	Monoklonaler Antikörper
MD	<i>Mucosal Disease</i>
MVA	Modifiziertes Vakzinia Virus Ankara

**N**

ncp	Nicht-zytopathogen
-----	--------------------

**O**

OD	Optische Dichte
ORF	<i>Open Reading Frame</i>

**P**

PBS <sup>-</sup>	<i>Phosphat Buffered Saline</i> (ohne Magnesium)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
PFU	<i>Plaque Forming Unit</i>
PI	Persistent infiziert
p. imm.	<i>Post immunisationem</i>
p. inf.	<i>Post infectionem</i>
PrV	Pseudorabies Virus

**R**

RNA	Ribonukleinsäure
RNA <sup>+</sup>	Plusstrang-RNA
RNA <sup>-</sup>	Minusstrang-RNA
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>

**S**

SDS	Sodiumdodecylsulfat
SFV	<i>Semliki-Forest-Virus</i>
SIN	Sindbis Virus
SNT	Serum-Neutralisationstest

**T**

T	Thymin
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBEV	<i>Tickborne Encephalitis</i>

**U**

UTR	<i>Untranslated Region</i>
UV	Ultraviolett

**V**

VEE	<i>Venezuelan Equine Encephalitis Virus</i>
-----	---

**Y**

YV *Yellowfever Virus*

**Z**

ZBV Zellbank für Zelllinien in der Veterinärmedizin

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Oskar-Rüger Kaaden danke ich für sein Interesse an dieser Arbeit und seine Flexibilität bei der Betreuung über die große Distanz hinweg.

Herrn Prof. Dr. Thomas C. Mettenleiter möchte ich für den Arbeitsplatz im Friedrich-Loeffler-Institut und seine interessierte Anteilnahme an dieser Arbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Martin Beer für seine motivierende Begeisterung an diesem Thema und für seine jederzeit entgegengebrachte Unterstützung und Geduld bei der Durchführung dieser Arbeit.

Ilona Reimann danke ich für die Einführung in das molekularbiologische Arbeiten und das freundschaftliche Klima in ihrem Labor.

Allen Mitarbeitern der Labore Dr. Beer und Dr. Reimann sei sehr herzlich für die angenehme Arbeitsatmosphäre gedankt.

Der Firma Intervet International (vertreten durch Frau Dr. Birgit Makoschey) bin ich für die finanzielle Unterstützung zu Dank verpflichtet.

## Lebenslauf

Ilia Semmler, geb. Werner-Jensen

Geboren am 18.12.1977 in Heidelberg

Verheiratet mit Arne Semmler

Eltern: Prof. Dr. Arnold Werner-Jensen  
Dr. Karin Werner-Jensen, geb. Schlee

Schulbildung:

1983-1987	Lindengrundschule Nußloch
1987-1996	Kurfürst-Friedrich-Gymnasium Heidelberg
Juni 1996	Allgemeine Hochschulreife

Studium:

1996-2002	Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin
Februar 2002	Tierärztliche Prüfung
April 2002	Approbation als Tierärztin

seit April 2002

Dissertationsarbeit am Institut für Virusdiagnostik des Friedrich-Loeffler-Institutes (ehem. Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere) auf der Insel Riems