

**Attenuierung von Pestiviren durch
gezielt ins Genom eingeführte
Mutationen:
In vitro und in vivo Experimente mit
CSFV und BVDV**

**INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Andreas T. Ege

Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie;
Detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Auflage 2007

© 2007 by Verlag: **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH**, Gießen
Printed in Germany

ISBN 978-3-939902-40-9

Verlag: DVG Service GmbH
Frankfurter Straße 89
35392 Gießen
0641/24466
geschaeftsstelle@dvg.net
www.dvg.net

**Attenuierung von Pestiviren durch
gezielt ins Genom eingeführte
Mutationen:
In vitro und in vivo Experimente mit
CSFV und BVDV**

**INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Andreas T. Ege

Aus dem Institut für Virologie
Betreuer: Prof. Dr. H.-J. Thiel

und

dem Friedrich-Loeffler-Institut
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Institut für Immunologie
Betreuer: PD Dr. G. Meyers

**Attenuierung von Pestiviren durch gezielt ins Genom
eingeführte Mutationen:
In vitro und in vivo Experimente mit CSFV und BVDV**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Andreas T. Ege
Tierarzt aus Mannheim

Giessen 2007

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan:

Prof. Dr. M. Reinacher

Gutachter:

Prof. Dr. H.-J. Thiel
PD Dr. G. Meyers

Tag der Disputation:

21.02.2007

Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht worden:

Martina von Freyburg, Andreas Ege, Armin Saalmüller und Gregor Meyers
Comparison of the effects of RNase-negative and wild-type classical swine fever virus on peripheral blood cells of infected pigs
J. Gen. Virol. 2004 Jul;85(Pt 7):1899-908

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	11
1.1	Pestiviren	11
1.1.1	Klassische Schweinepest	12
1.1.2	BVD	13
1.2	Genom und Genomorganisation der Pestiviren	15
1.3	E ^{rns}	20
1.4	Zielsetzung der Arbeit	22
2	Material & Methoden	23
2.1	Material	23
2.1.1	Antikörper	23
2.1.2	Bakterien	24
2.1.3	Enzyme	24
2.1.4	Geräte	24
2.1.5	Vorgefertigte Reagenziensysteme („Kits“)	27
2.1.6	Plasmide	28
2.1.7	Primer	28
2.1.8	Radiochemikalien	30
2.1.9	Reagenzien	30
2.1.10	Software	33
2.1.11	Stammlösungen und Medien	34
2.1.12	Verbrauchsmaterialien	40
2.1.13	Versuchstiere	41
2.1.14	Virusstämme und -mutanten	42
2.1.14.1	CSFV	42
2.1.14.2	BVDV	42
2.1.14.3	weitere Viren	43
2.1.15	Zellkultur	43

2.1.16	Zellkulturmedien	43
2.2	Methoden	45
2.2.1	Gewebekultur	45
2.2.1.1	Bestimmung der Zahl lebender Zellen	45
2.2.1.2	Infektion von Gewebekulturzellen	45
2.2.1.3	Indirekte Immunfluoreszenz	46
2.2.1.4	Titration von Viren und Titerberechnung	46
2.2.1.5	Transfektion von BHK-Zellen mit RNS	47
2.2.1.6	Transiente Expression viraler Proteine im T7-Vacciniavirus-System	48
2.2.2	Mikrobiologische Methoden	48
2.2.2.1	Anzucht von Bakterien	48
2.2.2.2	Herstellung transformationskompetenter Bakterien	49
2.2.2.3	Hitzeschock-Transformation von kom- petenten Bakterien mit Plasmid-DNS	49
2.2.2.4	Plasmidpräparation für Testzwecke („Mi- nipröp“)	49
2.2.2.5	Plasmidpräparation zur Gewinnung hoch gereinigter DNS in größeren Mengen („Mi- dipröp“)	50
2.2.3	Photometrische Analyse von Nukleinsäuren	51
2.2.4	Methoden zur Isolierung und Analyse von RNS	51
2.2.4.1	Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Behandlung von Lösungen	51
2.2.4.2	RNS-Isolierung aus Zellen	51
2.2.4.3	RNS-Agarosegelelektrophorese	52
2.2.4.4	Northern Blot	53
2.2.4.5	Radioaktive Markierung von DNS durch „Nick-Translation“	54
2.2.4.6	Test auf RNase-Aktivität	55
2.2.5	Standard DNS-Techniken	55
2.2.5.1	Phenol-/Chloroform-Extraktion von Nu- kleinsäuren	55
2.2.5.2	Ethanol-fällung von DNS	56

2.2.5.3	Isopropanolfällung von DNS	56
2.2.5.4	Spaltung von DNS mit Restriktionsen- zymen	56
2.2.5.5	Herstellung glatter Enden an DNS-Mo- lekülen	56
2.2.5.6	Ligation von DNS-Fragmenten mit T4- DNS-Ligase	57
2.2.5.7	DNS-Agarosegelelektrophorese	57
2.2.5.8	Isolierung von DNS-Fragmenten aus Aga- rosegelen	58
2.2.6	Polymerasekettenreaktion (PCR) ausgehend von DNS Matrizen	58
2.2.6.1	Polymerasekettenreaktion (PCR)	58
2.2.6.2	Reverse Transkription-Polymeraseketten- reaktion (RT-PCR)	59
2.2.7	Sequenzierung von DNS	59
2.2.7.1	PCR	59
2.2.7.2	Elektrophorese von Sequenzreaktionen im Harnstoff-Acrylamid-Gel	60
2.2.8	In vitro Transkription	60
2.2.9	In vitro Translation	61
2.2.10	Proteinanalytische Methoden	61
2.2.10.1	Radioimmunpräzipitation (RIP)	61
2.2.10.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS- PAGE)	63
2.2.10.3	Gelbehandlung und Fluorografie	63
2.2.11	Expressionskonstrukte E ^{rms}	64
2.2.11.1	Affinity® System	64
2.2.11.2	Impact™-CN System	66
2.2.11.3	Sindbis-Expressionssystem	68
2.2.12	Tierexperimentelle Methoden	68
2.2.12.1	Infektion	68
2.2.12.2	Erhebung klinischer Parameter	69
2.2.12.3	Nasentupfer	69
2.2.12.4	Blutproben	69

2.2.12.5	Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl	70
2.2.12.6	„buffy coat“ Gewinnung	70
2.2.12.7	Serumneutralisationstest (SNT)	70
2.2.12.8	FACS-Analyse von Blutproben	72
2.2.12.9	Fötale Organproben	73
2.2.12.10	Virusnachweis	74
3	Ergebnisse	75
3.1	CSFV	75
3.1.1	Tierexperimentelle Arbeiten zum CSFV E ^{rns} . . .	75
3.1.1.1	Studien zur RNase Funktion	75
3.1.1.1.1	TV 16a	76
3.1.1.1.2	Zellkultur	82
3.1.1.1.3	TV19	82
3.1.1.1.4	TV 20	88
3.1.1.2	Versuche zur trans-Komplementierung der RNase-Funktion	96
3.1.1.2.1	TV 17	96
3.1.1.2.2	TV 18	107
3.1.1.3	Versuche zur Expression und Aufreini- gung von E ^{rns}	115
3.1.1.3.1	Impact™-System	115
3.1.1.3.2	Affinity®-System	120
3.1.1.3.3	Sindbisvirus-Vektor-System	125
3.1.2	Funktionsanalysen zu N ^{pro}	128
3.1.2.1	TV 16b	129
3.2	BVDV	138
3.2.1	Studien zum Schutz vor diaplazentarer Übertragung	138
3.2.1.1	RNase negative Mutante XIKE-B	140
3.2.1.2	N ^{pro} Deletionsmutante XIKE-A-NdN . .	143
3.2.1.3	RNase negative, N ^{pro} -deletierte Doppel- mutante XIKE-B-NdN	147
3.2.2	Studien zur Überprüfung der Vakzinierungseffizienz	149
3.2.2.1	Erster Belastungsversuch	150
3.2.2.2	Zweiter Belastungsversuch	161

4 Diskussion	182
Zusammenfassung/ Summary	200
Literaturverzeichnis	204
Abkürzungsverzeichnis	223
Abbildungsverzeichnis	224
Tabellenverzeichnis	226

1 Einleitung

1.1 Pestiviren

Pestiviren gehören zur Familie *Flaviviridae* [30], welche neben dem Genus *Pestivirus* noch die Genera *Flavivirus* und *Hepacivirus* umfaßt. Mitglieder des Genus *Flavivirus* sind human- und tierpathogene Viren wie z.B. das Gelbfieber-, Louping-III- und Dengue Virus. Das einzige voll anerkannte Mitglied des Genus *Hepacivirus* ist das humane Hepatitis-C Virus. Das GB Virus B wurde vorläufig als Mitglied dieses Genus eingeordnet. Die GB Viren A und C sind derzeit nichtklassifizierte Mitglieder der Familie *Flaviviridae* [67].

Zum Genus *Pestivirus* gehören neben wirtschaftlich unbedeutenden Viren bei Giraffen, Rentieren [10] und Antilopen [110] die wirtschaftlich bedeutenden Erreger „Virus der klassischen Schweinepest (CSFV - Classical Swine Fever Virus)“, „Virus der bovinen Virusdiarrhoe und der Mucosal Disease (BVDV - Bovine Virus Diarrhoe Virus)“ mit zwei offiziellen Spezies und das „Virus der Border Disease der Schafe (BDV - Border Disease Virus)“.

Eine Besonderheit der Pestiviren ist, daß jede Virusspezies in zwei Biotypen vorkommt. Diese werden durch ihr Verhalten in der Zellkultur als zytopathogen (zp) und nicht-zytopathogen (nzp) unterschieden [7, 34, 58, 61, 105]. Entsprechend replizieren nzp Viren ohne sichtbaren Effekt in der Zellkultur. Zp Viren führen zu Apoptose und Lysis der Zelle.

Nach der Infektion trächtiger Wirtstiere sind alle Pestiviren in der Lage, die Plazenta der Tiere zu passieren und die Föten zu infizieren [78, 103]. Auf Grund der anatomischen Begebenheiten der Plazenta von Wiederkäuern und Schweinen können die mütterlichen Antikörper (Ak) dagegen nicht auf die Föten übertreten. Bis zu der Ausbildung eines kompetenten Immunsystems sind diese weitgehend ungeschützt da eine erregerspezifische Immunreaktion nicht möglich ist. Die Übertragung auf die Föten

führt in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Trächtigkeit zu Aborten, der Geburt mißgestalteter, schwacher, scheinbar gesunder oder gesunder Jungtiere. Von besonderer Bedeutung ist die Fähigkeit nicht-zytopathogener Viren, nach Infektion der Föten in diesen persistente Infektionen hervorzurufen [4, 63, 68, 69, 80, 85]. Persistent infizierte (p.i.) Tiere sind immuntolerant gegenüber dem persistierenden Virus. Bei Wiederkäuern, vor allem bei mit BVDV persistent infizierten Kälbern, kann die persistente Infektion für Monate bis Jahre zu klinisch unauffälligen Ausscheidertieren führen. Persistent infizierte Ferkel sterben dagegen im Allgemeinen nach wenigen Wochen bis einigen Monaten [14, 108].

1.1.1 Klassische Schweinepest

Die klassische Schweinepest (KSP) ist ein hämorrhagisches Fieber der Schweine, einhergehend mit Fieber, Leukopenie, B-Zell Depletion, Durchfall, Anorexie, zentralnervösen Symptomen, Blutungen, Kümern und Tod [78, 98, 103]. Nach Berichten aus dem 19. Jhd. verlief die Krankheit damals meist perakut bis akut mit einer kurzen Inkubationszeit und hoher Mortalitätsrate [25]. Der perakute Verlauf tritt heute nur noch sehr selten auf, und die Mortalitätsraten beim akuten Verlaufs sind drastisch gesunken. Im Gegensatz dazu sind chronische Verläufe häufig [106, 116]. Nach deutschem und EU Tierseuchenrecht gehört die KSP zu den anzeigepflichtigen Tierseuchen, und muß auch dem OIE (Office internationale des épizooties) gemeldet werden.

In Deutschland und weiteren Ländern der EU stellen Wildschweinrotten ein wichtiges Reservoir für CSFV dar. Von Zeit zu Zeit kommt es zu Schweinepestausbüchen in Zucht- und Mastbeständen. So kam es z.B. 1997/98 in den Niederlanden, Spanien, Deutschland, Belgien und Italien zu einer größeren Epidemie. Kleinere Ausbüche kamen und kommen in diesen und auch anderen Ländern immer wieder vor [28], zuletzt in Niedersachsen im Fröhjahr 2006.

Ziel der Bekämpfungsmaßnahmen der Schweinepest ist die Tilgung der Seuche. Daher werden beim Ausbruch der Schweinepest die gesamten Bestände der betroffenen Betriebe getötet (gekeult), die Tierkörper und Ein-

streu sicher entsorgt und die Betriebe desinfiziert. Transport von Tieren in und aus dem Gebiet um den Infektionsherd wird untersagt und die Einhaltung der Maßnahmen wird streng kontrolliert. Mittels epidemiologischer Untersuchungen wird versucht, Quellen und Verbreitungswege des Erregers zu ermitteln.

Impfungen sind nur im Notfall nach einem Seuchenausbruch rings um die betroffenen Gebiete als sogenannte Ringimpfungen zulässig. Nach einer Simulation der Christian-Albrechts-Universität in Kiel kann eine Ringimpfung den Epidemieverlauf verbessern, wenn sie spätestens am 18. Tag nach der amtlichen Feststellung durchgeführt wird [51]. Mit konventionellen Impfstoffen ist eine Unterscheidung der geimpften von mit Feldvirus infizierten Tieren nicht möglich. Abhilfe dagegen könnten sogenannte Markervakzinen schaffen. Von konventionellen Vakzinen unterscheiden sich Markervakzinen durch Negativ- (Deletions-) oder Positivmarker, die zu einer unterschiedlichen Antikörperbildung führen. Im Gegensatz zum Wildtypvirus bleibt im Fall der Negativmarker die Bildung von Ak gegen ein bestimmtes Epitop des Virus aus. So z.B. bei dem von Moormann et al entwickelten Markervakzinen [79]. Bei Positivmarker werden Ak gegen ein Epitop ausgebildet, daß dem Wildtypvirus fehlt, z.B. gegen peptide-KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) im Fall eines Mykoplasmen-Impfstoffs [111]. Gegen die klassische Schweinepest sind in der EU derzeit zwei Markervakzinen und ein Testsystem zugelassen [28, 29]. Allerdings kann die Impfung dazu führen, daß die Schweinepopulation zumindest über einen begrenzten Zeitraum nicht vollständig immunisiert ist, und es trotz Impfung zu einer zunächst unbemerkten Weiterverbreitung des Wildtypvirus kommt [79].

1.1.2 BVD

Die Bovine Virusdiarrhoe verläuft bei adulten, immunkompetenten Rindern in der Regel harmlos. In den meisten Fällen ist der Verlauf subklinisch und wird nicht bemerkt. Der überwiegende Teil der Rinder erleidet im Laufe des Lebens eine BVDV-Infektion, wie seroepidemiologische Untersuchungen gezeigt haben [38, 95]. Im akuten Verlauf treten transien-

te Leukopenie, Fieber, leichter Durchfall, respiratorische Symptome und Immunsuppression auf [103].

1993 kam es zu Ausbrüchen einer neuen Form von BVD in Quebec und Ontario (Kanada), mit schwerem akuten Verlauf [15, 83]. Infizierte Tiere aller Altersklassen hatten Fieber, Pneumonie und Durchfall. In Ontario starben, je nach Betrieb, 10-20% der Tiere, in Quebec ca. 25% der Mastkälber [3]. Die serologische Kreuzreaktion zwischen den klassischen BVDV-Stämmen und diesen neuen Isolaten war recht gering. Die in diesen Fällen isolierten Virusstämme wiesen einen Unterschied von ca. 25% in der Sequenz der 5'-nicht-translatierten Region (5'-NTR) zu den klassischen Stämmen auf. Soweit untersucht, weichen auch die kodierenden Sequenzen erheblich von denen klassischer BVDV-Stämme ab, während sowohl diese als auch die neuen Isolate untereinander signifikant höhere Homologie aufweisen. Aufgrund dieser unterschiedlichen Charakteristika wurde eine Unterscheidung in zwei Spezies, BVDV-1 („klassische“ Stämme) und BVDV-2 („neue“ Isolate) vorgenommen [83, 88]. Weitergehende Untersuchungen zeigten, daß BVDV-2 schon vor den oben genannten Ausbrüchen in Kanada in verschiedenen Regionen verbreitet waren, und daß nicht alle BVDV-2 Stämme schwerwiegende Krankheiten auslösen. Auch Viren mit einer Virulenz vergleichbar zu BVDV-1 gehören dem Typ 2 an.

Kommt es bei Kühen während der Gravidität zu einer Infektion mit BVDV, kann es zu Resorptionen, Aborten oder der Geburt mißgestalteter oder persistent infizierter Kälber kommen [5, 23, 89]. Diese Probleme bei trächtigen Tieren sind hauptsächlich ausschlaggebend für die wirtschaftliche Bedeutung dieses Erregers. Bei Kälbern und Jungkühen tritt vereinzelt, in der Regel im Alter zwischen 6 Monaten und 2 Jahren eine Erkrankung auf, die als Mucosal Disease (MD) bezeichnet wird. Sie geht mit ausgedehnter Ulzeration des Gastrointestinaltraktes als hauptsächlich pathologischer Veränderung einher. Charakteristisch ist die hohe Mortalität. Der Tod tritt gewöhnlich innerhalb von 2 Wochen nach Auftreten der klinischen Symptome ein [5, 78].

Laut Tierseuchengesetz ist BVD/MD seit November 2004 eine anzeigepflichtige Tierseuche. Eine bundesweite amtliche Bekämpfungsverordnung ist derzeit noch in der Planung, das Vorgehen der einzelnen Bundeslän-

der ist nicht einheitlich. Auf Länderebene liegen zumindest für Sachsen-Anhalt und Brandenburg solche Verordnungen vor, für Bayern hat die bayrische Tierseuchenkasse ab 2006 ein Bekämpfungsprogramm aufgestellt. Bekämpfungsmaßnahmen gegen BVD konzentrieren sich auf die Vermeidung und Elimination von p.i. Tieren um die Infektionskette zu durchbrechen [77]. Dafür notwendige Maßnahmen gliedern sich in Bestandsdiagnostik und Impfprogramme. Um eine Bewertung als „Bestand frei von Virämikern“ zu erhalten, dürfen keine Tiere mehr als positiv getestete Virämiker (persistent infizierte Tiere) im Bestand vorhanden sein. Vorhandene Virämiker müssen unverzüglich geschlachtet werden. In BVDV-freien Betrieben dürfen keine BVDV-Vakzinen eingesetzt werden, der Einsatz von BVD-Impfstoffen ist nur in Verbindung mit der Identifikation und Elimination der Virämiker sinnvoll.

In Deutschland sind drei Lebendvakzinen mit und ohne systemische Virusvermehrung sowie sechs inaktivierte Vakzinen zugelassen. Erstere induzieren eine gute Immunantwort mit Schutz vor Infektion und diaplazentarer Übertragung. Von Nachteil ist die mögliche Impfinfektion der Föten bei Immunisierung während der Gravidität und die Ausscheidung der Impfviren mit Gefährdung gravider Nachbartiere. Bei Lebendvakzinen ohne systemische Vermehrung und inaktivierten Vakzinen fällt die Immunantwort schwächer und weniger lange anhaltend aus. Die Zuverlässigkeit des Schutzes der Föten vor diaplazentarer Übertragung bei Infektion des graviden Tiers ist bei einigen Impfstoffen jedoch nur über einen relativ kurzen Zeitraum und unter Umständen nicht vollständig [11, 13, 123] gegeben. Ein weiteres Problem ist die mangelhafte Kreuzprotektivität der Antikörper gegen BVDV-1 oder BVDV-2 [83], die meisten am europäischen Markt erhältlichen Vakzinen basieren auf BVDV-1.

1.2 Genom und Genomorganisation der Pestiviren

Das Genom der Pestiviren besteht aus einer Einzelstrang RNS positiver Polarität [18, 64] von ca. 12,5 kB Länge [22]. Es wurden jedoch auch Genome beschrieben, die in Folge von Rekombinationen erheblich größer

1 Einleitung

oder kleiner als 12,5 kB sind [54, 75]. Diese Rekombinationen führen zur Insertion zellulärer Sequenzen [72], Duplikation [8, 72, 73, 86, 101] oder Deletion von Teilen des Virusgenoms [52, 74, 76, 102].

An beiden Enden der *Pestivirus* RNS befinden sich nicht-translatierte Regionen (NTR), dazwischen liegt ein einzelnes, großes Leseraster (ORF, „open reading frame“). Die 5'-NTR umfaßt ca. 385 Nukleotide, deren Sequenz bei allen Pestiviren große Ähnlichkeit aufweist. Diese Region der RNS kann haarnadelförmige Sekundärstrukturen ausbilden [60] und enthält eine interne Ribosomenbindungsstelle (IRES, „internal ribosomal entry site“) [84].

An die 5'-NTR schließt sich der ORF an, welcher für ein Polyprotein von ca. 4000 Aminosäuren (AS) kodiert [17]. Das Polyprotein wird ko- und posttranslational von Proteasen der Wirtszelle und des Virus in mindestens 12 reife Proteine gespalten [55, 64] (Abbildung 1.1).

Als erstes Protein ist das Nichtstrukturprotein N^{pro} (N-terminale Protease)

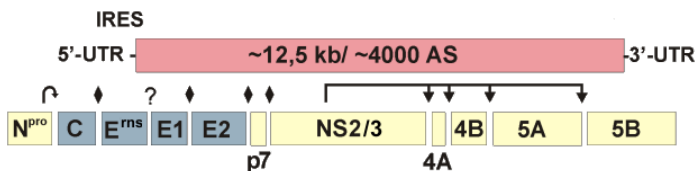


Abbildung 1.1: Genom und Polyprotein mit Spaltstellen der Pestiviren (am Beispiel des CSFV)

5' - 5'-Ende; 3' - 3'-Ende; IRES - interne Ribosomenbindungsstelle; UTR - nichttranslatierte Region; kB - Kilobasen; AS - Aminosäuren; N^{pro}, C, E^{rns}, E1, E2, p7, NS2/3, 4A, 4B, 5A, 5B - Virale Proteine (s. Text); Pfeile - weisen auf Spaltungsstellen durch viruseigene Proteine; Rauten - weisen auf Spaltungsstellen durch Wirtszell Proteasen; ? - weisen auf Spaltungsstellen, deren Spaltungsprotein noch nicht (sicher) geklärt ist

im Polyprotein enthalten. N^{pro} spaltet sich autoproteolytisch von dem folgenden Kapsidprotein C ab [94]. N^{pro} besitzt wahrscheinlich immunmodulatorische Eigenschaften. In Makrophagen in Zellkultur verhindert es Apoptose und Interferonbildung[90]. Ob N^{pro}-Deletionsmutanten attenu-

iert sind, ist derzeit noch in der Diskussion. Ergebnisse aus Tierversuchen mit CSFV-N^{pro}-Deletionsmutanten mit vollständiger Deletion zeigten Attenuierung, aber auch eine signifikante Wachstumseinschränkung der Viren [66]. Erste Versuche mit N^{pro}-teildeletierten CSFV Mutanten deuten darauf hin, daß diese Attenuierung zumindest teilweise die Folge der Wachstumseinschränkung sein könnte (von Freyburg & Meyers, unveröffentlichte Ergebnisse und vorliegende Arbeit).

Im Anschluß an N^{pro} liegt das Kapsidprotein (C) im Polyprotein. C besitzt ein Molekulargewicht von ca. 14 kD. Es ist ein basisches Protein, dient vermutlich der Verpackung der viralen RNS und der Interaktion mit den Hüllproteinen [104]. Auf das Kapsidprotein folgen drei weitere Strukturproteine: E^{ms}, E1 und E2. Alle drei sind Glykoproteine, für E1 und E2 sind putative Membrananker identifiziert worden, die typische Merkmale von Transmembransequenzen besitzen [91]. Wie E^{ms} im Viruspartikel verankert ist, ist dagegen zur Zeit noch nicht geklärt, ein klassischer Transmembrananker fehlt ihm [91]. Es gibt Hinweise, daß die carboxyterminale Region des Proteins eine amphipatische Helix ausbildet, die als Membrananker fungiert [31].

Gegen E^{ms} und E2 werden neutralisierende Antikörper gebildet; gegen letzteres fällt die Immunantwort jedoch stärker aus [24, 82, 107, 114, 115]. Sowohl für E^{ms} als auch für E2 wird eine Funktion bei der Virusbindung an die Zielzellen und die nachfolgende Infektion diskutiert, wobei E2 vermutlich das Rezeptor bindende Protein darstellt [41, 46, 47, 65]. Alle drei Glykoproteine liegen sowohl in Zellen als auch in Virionen als Disulfidverbundene Homodimere (E^{ms}, E2) und/ oder Heterodimere (E^{ms}, E1, E2) vor [59, 104].

Auf die Strukturproteine folgt das Protein p7, welches in virusinfizierten Zellen, nicht jedoch in Virionen nachgewiesen werden konnte [27]. Die Spaltung zwischen E2 und p7 verläuft unvollständig, was zu zwei Formen von E2 mit unterschiedlichem C-Terminus führt. Wird die Spaltung von E2 und p7 vollständig unterdrückt, kommt es nicht mehr zur Bildung von infektiösem Virus, obwohl die RNS-Replikation weiterhin abläuft [37].

An p7 schließen sich 6 Nichtstrukturproteine an, welche für year=1996, die Polyprotein-Prozessierung und/ oder RNS-Replikation essentiell sind

[35, 36, 99, 100, 113, 119, 121]. Zum Teil sind die genauen Funktionen der einzelnen Proteine noch nicht geklärt.

NS2/3 ist das erste dieser Nichtstrukturproteine. NS2/3 wird teilweise in NS2 und NS3 gespalten [6, 17, 53, 55, 72, 93, 101]. Bei nzp-Stämmen von BVDV kommt es nur während der ersten ca. sechs Stunden post infectionem zu einer deutlichen Spaltung des Proteins [55]. Bei zp-Stämmen können auch später als sechs Stunden post infectionem hohe NS3-Spiegel nachgewiesen werden. Nicht bei allen zp-BVDV-Stämmen jedoch führt eine Spaltung von NS2/3 zu NS3, sondern NS3 wird bei manchen dieser Isolate zumindest zum überwiegenden Teil von einer duplizierten Genom-region exprimiert. NS2 enthält im C-terminalen Bereich des Genoms ein Zinkfinger ähnliches Motiv [21], das vermutlich an Metallionenbindung beteiligt ist. Es ist anzunehmen, daß die vermutete Fähigkeit des NS2, Metallionen zu binden wie beim HCV für die proteolytische Aktivität des Proteins wichtig ist. Die NS2 Protease ist für die Spaltung des NS2-3 in NS2 und NS3 bei den nzp BVDV und vermutlich auch einer Reihe von zp BVDV verantwortlich. Diese Spaltung ist essentiell für die RNS Replikation [55].

Auch das NS3 besitzt Proteaseaktivität. Es ist für die Prozessierung des Polyproteins am eigenen C-Terminus und stromab davon verantwortlich [101, 121]. NS3 kann aber nicht nur als Serinprotease [119] fungieren, sondern besitzt auch Helikase- [113] und NTPase-Aktivität[99]. Die Helikase übernimmt nach der gängigen Theorie bei der RNS-Replikation die Aufgabe, RNS-Doppelstränge zu trennen.

Die letzten beiden Proteine des Polyproteins sind NS4 und NS5. Diese beiden Nichtstrukturproteine werden jeweils nochmals gespalten, es entstehen NS4A und NS4B, bzw. NS5A und NS5B [17, 19]. NS4A fungiert als Kofaktor des NS3 und ist für einen Teil der NS3 Proteasespaltungen essentiell [101, 121]. Welche Rolle NS4B bei der Virusreplikation spielt ist nicht bekannt. Interessanterweise wurde gezeigt, daß eine Mutation im NS4B in der Lage ist, die Zytopathogenität eines zp-BVDV zu unterdrücken [87]. Die Funktion, die NS4B offensichtlich für die Zytopathogenität hat, ist aber noch nicht näher definiert. Beim nahe verwandten HCV ist das NS4B an der Umgestaltung der intrazellulären Membransysteme beteiligt [26].

Die Funktion von NS5A ist noch nicht gut untersucht. Es ist essentiell für die Replikation der viralen RNS, ist aber im Gegensatz zu den anderen Komponenten der Replikase in trans supplementierbar. Zusätzlich zu seiner Rolle bei der viralen RNS Replikation scheint NS5A auch eine Rolle bei der Interaktion mit der Wirtszelle zu spielen. So wurde nachgewiesen, daß es an den eukaryotischen Translations-Elongations-Faktor 1A (eEF1A, eucaryotic translation elongation factor 1A) bindet [49]. Vor kurzer Zeit wurde zudem eine Funktion bei der Bildung von Viruspartikeln vorgeschlagen [2]. NS5A ist ein stabiles Protein und wird in der infizierten Zelle phosphoryliert [19]. Im Gegensatz dazu besitzt NS5B nur eine kurze Halbwertszeit. NS5B ist die virale RNS-abhängige RNS-Polymerase [36, 96, 120, 122].

1.3 E^{rns}

E^{rns}, früher auch als E0 bezeichnet, ist das dritte Protein im pestiviralen Polyprotein. Die Polypeptidkette des E^{rns} umfaßt ca. 230 Aminosäuren und besitzt ein rechnerisches Molekulargewicht von ca. 28 kD. In der mit CSFV infizierten Zelle beträgt das Molekulargewicht jedoch ungefähr 44 - 48 kD. Die Differenz ist Folge der auffallend starken Glykosylierung des E^{rns} Proteins; der Kohlenhydratanteil erhöht sich während der Reifung des Proteins deutlich [104]. In der infizierten Zelle liegt E^{rns} als Monomer und Homodimer vor. E^{rns} Homodimere konnten auch im Viruspartikel nachgewiesen werden [104]. Es besitzt 4 intra- und in der Regel eine intermolekulare Disulfidbrücke. Beim C-Stamm des CSFV wird die intermolekulare Disulfidbrücke durch das Cystein an Position 171 gebildet, das als einziges Cystein im E^{rns} nicht vollständig zwischen den bekannten Pestivirussequenzen konserviert ist. Das Cystein 171 fehlt bei einigen CSFV-Stämmen, gleiches gilt bei BVDV für das korrespondierende Cystein [57].

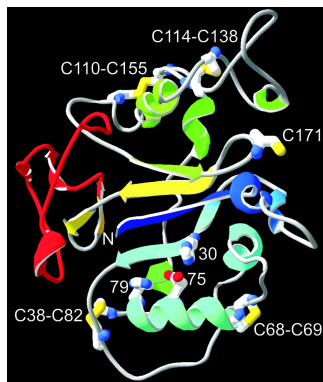


Abbildung 1.2: 3D Modell des CSFV E^{rns} [57]

E^{rns} besitzt keinen klassischen Transmembrananker und wird in beträchtlichen Mengen von infizierten Zellen sezerniert [91]. Reines E^{rns} kann ab einer Konzentration von ca. 100 µg/ml die Infektion empfindlicher Zellen durch CSFV verhindern. Vermittelt wird diese Eigenschaft durch die irreversible Bindung von E^{rns} an einen zellulären Rezeptor. Diese Bindung findet auch an nicht für CSFV-Infektion empfänglichen Zellen statt [41]. Dies ist ein Hinweis darauf, daß E^{rns} für die Bindung des Virus an die Zelloberfläche mit verantwortlich ist, für den eigentlichen Eintritt in die Zelle aber noch andere Faktoren eine Rolle spielen. Der Zellrezept-

tor, mit dem E^{ms} interagiert, ist mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Glykosaminoglykan, z.B. Heparansulfat. Sowohl für BVDV als auch CSFV wurde gezeigt, daß E^{ms} an Glykosaminoglykane und auf Agarose fixiertes Heparin bindet, dagegen nicht an Zellen, die keine Glykosaminoglykane ausbilden [43, 46]. Zumindest CSFV erwirbt diese Eigenschaft jedoch erst nach einigen Zellkulturpassagen. Aus infizierten Schweinen isoliertes und nur kurz in SK6 Zellen passagiertes Virus scheint nicht an Heparin oder Heparansulfat zu binden [43]. Sowohl das Maul- und Klauenseuche Virus als auch Simian Virus erwerben in der Zellkultur ebenfalls eine Bindungsfähigkeit für Heparansulfat. Diese Mutation geht bei beiden Viren mit einer Attenuierung einher, was für CSFV jedoch nicht zutrifft [44]. Als essentiell für die Bindung von Glykosaminoglykanen wurden für CSFV der Austausch eines Serins gegen ein Arginin an Position 476 [43] sowie eine Aminosäuresequenz im C-terminalen Bereich von E^{ms} (AS 480 - 487) identifiziert [47]. Mit Hilfe von pseudotypisierten Retroviren konnte gezeigt werden, daß E^{ms} für den Eintritt in die Zelle nicht unabdingbar ist sondern die Glykoproteine E1 und E2 dafür ausreichend sind [112]. Dagegen ist E^{ms} essentiell für die Bildung infektiöser Pestiviren [117].

Die ungewöhnlichste Eigenschaft des E^{ms} ist, daß es Ribonukleaseaktivität (RNase-Aktivität) aufweist. Der Besitz einer RNase als Hüllprotein ist bisher ein Unikat der Pestiviren. Die RNase besitzt eine Substratspezifität für Uridin und wird durch Zinkionen inhibiert [39, 92]. Mit Hilfe von rekombinantem E^{ms} konnte gezeigt werden, daß weder die Bildung von Homodimeren noch die Anwesenheit von Kohlenhydrat-Anteilen für die Funktion als Enzym notwendig sind [118]. Monoklonale Antikörper (mAb, monoclonal Antibody) gegen E^{ms} , die CSFV neutralisieren, weisen eine starke Inhibition der Ribonuklease-Aktivität auf [118]. Inaktivierung der RNase-Aktivität durch gezielte Mutagenese führt bei BVDV und CSFV zu lebensfähigen Virusmutanten. Die RNase ist also für die Replikation von Pestiviren in der Zellkultur nicht essentiell. Die Wachstumskurven der RNase-negativen Mutanten sind vergleichbar mit denen der Wildtyp-Viren [42, 70, 71]. In Tierversuchen erwiesen sich diese Mutanten aber als teilweise oder völlig attenuiert [70, 71]. Die Vermutung liegt nahe, daß die E^{ms} RNase mit der Immunantwort des Wirtes interferiert.

Die genauen Mechanismen dieser vermuteten Immunsuppression sind jedoch noch unklar.

Als weiteres besitzt E^{ms} die Fähigkeit, von außen durch die Zellmembran zu gelangen und so in Zellen einzudringen. In der Zelle verteilt sich das E^{ms} im perinukleären Raum an zytoplasmatischen Membranen [56]. Verantwortlich für diese Fähigkeit sind die 37 C-terminalen Aminosäuren. Sie ermöglichen auch den Transport daran gebundener Fremdproteine durch die Zellmembran und dann weiter zum Nukleus und zu zytoplasmatischen Membranen [56].

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, weitere Erkenntnisse zur Funktion des Glykoproteins E^{ms} der Pestiviren zu sammeln. In Tierversuchen mit Schweinen und Rindern wurden verschiedene Mutanten mit RNase-negativem E^{ms} untersucht. Weiterhin wurden Experimente durchgeführt, mit denen die Beteiligung von N^{pro} und E^{ms} bei der Etablierung von persistenten Infektionen untersucht wurde. Zur Vorbereitung weiterer Arbeiten wurden verschiedene Möglichkeiten erprobt, das E^{ms} des Virus der klassischen Schweinepest in heterologen Systemen zu exprimieren und anzureichern.

2 Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antikörper

24/16 (anti-(α)-CSFV IgG _{2a})	E0; FLI (Weiland et al., 1992)
a18 (α -CSFV E2; IgG _{2a})	FLI (Weiland et al., 1990)
IgG _{2b} ALEXA 488	Invitrogen, Karlsruhe
α -CBD	NEB, Frankfurt/M.
α -CD21	Pharmingen, San Diego, California, USA
α -Sindbis	FLI (Enzmann)
α -SWC3	Lunney, 1993
α -CSFV E0 (Baculovirus- exprimiertes Protein)	FLI (Meyers et al., 1999)
BVDV-Mix gegen E2 (1a5, 1a16, 1b8, 1b31, 1c17)	FLI (Weiland et al., 1989)
IgG ₁ -PE	Southern Biotech, Birmingham, Alaba- ma, USA
IgG _{2a} -PE	Southern Biotech, Birmingham, Alaba- ma, USA
Kaninchen- α -Maus IgG, FITC- konjugiert	Dianova, Hamburg
Kaninchen- α -Maus IgG, PO- konjugiert	Dianova, Hamburg
mAk Code4	Dr. E. Dubovi
Ziege- α -Kaninchen IgG, FITC- konjugiert	Dianova, Hamburg

2 Material & Methoden

Ziege- α -Kaninchen IgG, PO-
konjugiert Dianova, Hamburg

2.1.2 Bakterien

E. coli Top10F⁺ Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.1.3 Enzyme

DNase I (10.000 U/ml)	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Klenow-Fragment (5.000 U/ml)	NEB, Frankfurt/M.
Restriktionsendonukleasen	NEB, Frankfurt/M.
	Fermentas, St. Leon-Rot
	Gibco BRL, Eggenstein
RNAguard (Porcine, 39.800 U/ml)	Amersham-Pharmacia, Freiburg
RNase A	Amersham-Pharmacia, Freiburg
T4-DNA-Ligase (400.000 U/ml)	NEB, Frankfurt/M.
T4-DNA-Polymerase (3.000 U/ml)	NEB, Frankfurt/M.
T4-Polynukleotidkinase (10.000 U/ml)	NEB, Frankfurt/M.
SP6-RNA-Polymerase (20.000 U/ml)	NEB, Frankfurt/M.
Tfl-DNA-Polymerase (5 U/ μ l)	Promega, Mannheim

Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Reaktionen mit diesen Enzymen entsprechend der Hersteller-Protokolle mit den gelieferten Komponenten durchgeführt.

2.1.4 Geräte

Abzug Variolab Mobilon W90	Waldner, Wangen
ABI-PRISM 377 DNA Sequencer und Zubehör	Applied Biosystems, Weiterstadt

Begasungsbrutschrank 3166	Forma Sci., Marietta, Ohio, USA
Begasungsbrutschrank Stericult 200	Forma Sci., Marietta, Ohio, USA
Branson Ultraschallgerät Sonifier B-30, B-15	Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Coulter® A ^C •T diff TM Analysator	Coulter Corporation, Miami, Florida, USA
Diavert-Invertmikroskop	Leitz, Wetzlar
Eismaschine AF 10	Scotsman
Filmkassetten	Agfa, Köln
Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axioskop	Zeiss, Oberkochen
Elektroporationsküvetten	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Gelelektrophoresekammern, horizontal	FLI-Eigenbau
Gelelektrophoresekammern, vertikal	FLI-Eigenbau
Geltrockner SE 1160	Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA, USA
Genepulser TM	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Glaswaren	Schott, Mainz
Herolab E.A.S.Y. Geldokumentationssystem	Herolab, Wiesloch
Inkubationsschüttler G-25	New Brunswick, Edison, NJ, USA
Kühlwasserbad	Haake, Karlsruhe
Kühlschrank Liebherr	Liebherr, Ochsenhausen
Laminar-flow-Reinraumplatz, LFR 80 VU	Prettl, Pfullingen
Laminar-flow-Reinraumplatz	Heraeus, Osterode
Liquid Scintillation Analyser, Trio Carb 2100 TR	Packard, Groningen, Niederlande

2 Material & Methoden

Magnetrührer, beheizbar: IKA-MAG RCT	IKA Labortechnik, Staufen i. Br.
Mettler J-Serie Waagen	Mettler-Toledo, Gießen
Microcomputer Electrophoresis Power Supply 250 / 1000	Renner, Dannstadt
Mikroprozessor-pH-Meter 743, Knick	Bachofer, Reutlingen
Mikrowellengerät HMG 760/62.B	Bosch, Gerlingen
Phosphoimager Fujifilm BAS 1500	Fujifilm, Düsseldorf
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Gilson, Villiers-le Bel, Frankreich
Power Supply PS 500 X	Vitaris AG, Baar
Ultra Turax	Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA, US
Röntgenfilmentwicklungsma-	Janke & Kunkel KG, Staufen i. Br.
schine QX 130	Konika, Hohenbrunn
Sartorius Analytic A 200 S (Feinwaage)	Sartorius, Göttingen
Schüttler VariShaker	Dunn Labortechnik
Semi-Phor TE70 (Semi-dry transfer unit)	Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA, USA
Spectrophotometer Ultraspec 3000	Pharmacia Biotec
Speed Vac Concentrator (Savant)	Bachhofer, Reutlingen
Sterilbank Lamin Air HLP 2472 GS / HB 2472	Heraeus, Osterode

Tiefkühlschrank (-20°C)	Liebherr	Liebherr, Ochsenhausen
Tiefkühlschrank UF 75-450S		Colora Meßtechnik GmbH, Lorch
Thermomixer 5436		Eppendorf, Hamburg
Transilluminator (254 nm)		Bachhofer, Reutlingen
Transilluminator (302 nm)		R. Vetter, Ammerbuch
Transilluminator (Weißlicht)		Messinginstrumentebau GmbH, Erlangen
Trio-Thermoblock (für PCR)		Biometra, Göttingen
Typhoon 9410 Variable Mode Imager		Amersham Biosciences
Typhoon Blue Laser Module		Amersham Biosciences
Ultraspec 3000 (UV/VIS-Spektrophotometer)		Amersham-Pharmacia, Freiburg
UV-Leuchte		Bachhofer, Reutlingen
Vortex Vibrofix VF1 (IKA)		Bachhofer, Reutlingen
Wasserbad Julabo U3/ F20/ SW20C		Bachhofer, Reutlingen
Zentrifugen:		
Kühltschzentrifuge 5402		Eppendorf, Hamburg
Laborzentrifuge: Minifuge GL, Varifuge RF		Heraeus, Osterode
Tischultrazentrifuge TL-100		Beckman, München
Tischzentrifuge 5415 C		Eppendorf, Hamburg
Rotor TLA 45		Beckman, München

2.1.5 Vorgefertigte Reagenziensysteme („Kits“)

Affinity®Protein Expression and Purification System	Stratagene, La Jolla, CA, USA
ABI™ PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt

2 Material & Methoden

Impact™-CN Protein Purification System	NEB, Beverly, MA, USA
Nick Translation Kit	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Nucleobond AX Plasmid purification protocol	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin Extract	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin® RNAII	Macherey-Nagel, Düren
NucleoTrap Kit	Macherey-Nagel, Düren
OneStep RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden
RNA-Isolations Kit	Macherey-Nagel, Düren
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce, Rockford, IL, USA
TNT T7 Coupled Reticulocyte Lysate System	Promega, Madison, WI, USA
TNT T7 Coupled Wheat Germ System	Promega, Madison, WI, USA

2.1.6 Plasmide

DH-EB	Gabe von Sondra Schlesinger, Washington University, St. Louis
pCAL-n-Ek	Stratagene, La Jolla, CA, USA
pCITE2a	AGS, Heidelberg
pSinRep5	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pTYB1, 4	NEB, Beverly, MA, USA

2.1.7 Primer

„Sense“-Primer		
Name	Sequenz	Position
BVD32III	AAA TcT cTg cTg TAc ATg gcA cAt g	von G. Meyers; 342 ^a
CAL5-BAMH	cAT <u>gg</u> A Tcc ATg AAg cgA cgA Tgg AAA AAg AAT TTc ATA g	89 in pCAL-n-EK; <u>BamHI</u> Schnittstelle

^ain BVDV Newyork

2.1 Material

CM28 E05- BNE	ggA gAg AAT ATc Acc cAg Tg gcc ccA Tcc <u>gcg gcc gcg</u> Atg Acg Acg AcA Agg AgA AcA TAA cTc AAT ggA Acc TgA g	von C. Meyer; 1.171 ^a 1.174 ^b ; <u>NotI</u> Schnittstelle; <i>EK-Target</i>
E05SII HCV- E0-XbaI PanPesti 5'	cAt gcc ATg gcc cTg TTg GcT Tgg gcg gTg ggT gTc TAG AAA ccA TgA Ag ccc TgT Tgg cTT <u>ggg cg</u> ATg ccc wTA cTA ggA cTA gcA	1.120 ^c 1.118 ^d ; <u>XbaI</u> Schnittstelle
PS17.1 T7	Acc Tgc Agg TAT gAc AA Tcg AgA ATA cgA cTc AcT ATA	von M. v. Freyburg; 99 ^e von G. Meyers Anfang T7-Promotor
„Antisense“-Primer		
Name	Sequenz	Position
AE01	AAA gAT ATc TgT TAG cAg ccg gAT ccc c	7.339 im pTYB4
BVD33II	gcA ccA Acc ATg TTT gTT ccA TTc ATg	1.419 ^f
c19.1r	ccT ggc cTg ggT gAc cAc gTT gAc	1.560 ^g
CAL3- NOT	Acc <u>gcg gcc gcg</u> AgA Tcc Acg cgg AAC cAg AAg Tgc c	187 in pCAL-n-EK; <u>NotI</u> Schnittstelle
CM21	cTc cAc Tcc gcA gtA Tgg AcT Tgc	von C. Meyer; 1.879 ^{hi}
CM26	TcT ATc cTA TcT ggc TTA ggc Tgc	von C. Meyer; 926 ^j
E03-MX	cAg Acg cgT TcT AgA ggc ATA ggc Acc AAA ccA ggT TTT g	1.854 ^k ; <u>MluI</u> , <i>XbaI</i> Schnittstelle
E0Stop	ggA ATT cTc Agg cAT Agg cAc cAA Acc Agg	1.854 ^l

^ain BVDV Newyork

^bin CSFV Alfort Tue

^cin CSFV Alfort Tue

^din CSFV Alfort Tue

^ein CSFV Alfort Tue

^fin BVDV Newyork

^gin CSFV Alfort Tue

^hin BVDV Newyork

ⁱin BVDV Newyork

^jin BVDV Newyork

^kin CSFV Alfort Tue

^lin CSFV Alfort Tue

2 Material & Methoden

HCV- E0-SapI PanPesti 3'	cgg AAT TcG cTc TTc cgc Agg cAT Agg cAc cAA Acc Agg T TcA AcT ccA TgT gcc ATg TAc	1.850 ^a ; <u>SapI</u> Schnittstelle von M. v. Freyburg; ^b
SS3- BAMH	cTc ggA Tcc ggc Tgc TAc Agg cTG gTA cAg cAA g	1.174 ^c ; <u>BamHI</u> Schnitt- stelle

^ain CSFV Alfort Tue

^bin CSFV Alfort Tue

^cin CSFV Alfort Tue

2.1.8 Radiochemikalien

³⁵ S Trans-Label (1.175 Ci/mmol, 10,5 mCi/ml)	ICN, Eschwege
L- ³⁵ -Cystein (1.075 Ci/mmol, 10 mCi/ml)	ICN, Eschwege
L- ³⁵ -Methionin (1.175 Ci/mmol, 10 mCi/ml)	ICN, Eschwege
α- ³² P dCTP (3.000 Ci/mmol, 1.000 mCi/ml)	ICN, Eschwege
¹⁴ C-Protein-Molekulargewichtsstandard	Amersham-Buchler, Braunschweig

2.1.9 Reagenzien

0.24-9.5 Kb RNA Ladder	GibcoBRL, Eggenstein
1 Kb Plus DNA Ladder	GibcoBRL, Eggenstein
Acridinorange (research grade)	Serva, Heidelberg
Acrylamid-Stammlösungen	AppliChem, Darmstadt
Agarose für die Gelelektrophorese	GibcoBRL, Eggenstein
Aminoethylcarbazol (AEC)	Fluka, Taufkirchen
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt
Ampicillin (Amp)	Serva, Heidelberg
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Bacto-Agar	Difco Lab., Detroit, MI, USA
Bacto-Hefeextrakt	Difco Lab., Detroit, MI, USA
Bacto-Trypton	Difco Lab., Detroit, MI, USA

Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad, München
BlueDextran/ EDTA	Perkin Elmer, Überlingen
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA (Rinderserumalbumin; Fraktion V)	Sigma, Deisenhofen
Cäsiumchlorid	Gibco BRL, Eggenstein
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue G250	Serva, Heidelberg
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma, Deisenhofen
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)	Amersham-Pharmacia, Freiburg
DMF (N, N-Dimethylformamid)	Fluka, Taufkirchen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
DTT (Dithiothreitol)	Boehringer Mannheim
EDTA (Ethylendiaminotetraacetat-dinatriumsalz)	Serva, Heidelberg
EGTA (Ethylen-bis-(oxyethylennitriolo)-Tetraessigsäure)	Sigma, Deisenhofen
Erythrosin B	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure (HAc)	Hoechst, Frankfurt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid (EtBr)	Merck, Darmstadt
FCS (fötales Kälberserum)	PAA, Seromed
Formalin	Merck, Darmstat
Formamid	GibcoBRL, Eggenstein
Glycerin (87%)	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Glyoxal (40%)	Fluka, Taufkirchen
Guanidiniumisothiocyanat	GibcoBRL, Eggenstein
Harnstoff	Merck, Darmstadt

2 Material & Methoden

HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethan-sulfonsäure)	Fluka, Taufkirchen
IPTG (Isopropylthiogalaktosid)	Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat (KAc)	Riedel de Haen, Taufkirchen
Kanamycin (Kan)	Sigma, Deisenhofen
Lauryl-Sarcosinat (N-Lauryl-Sarcosin)	Sigma, Deisenhofen
LipofectAMINE Reagent	GibcoBRL, Eggenstein
Lipofectin Reagent	GibcoBRL, Eggenstein
Lithiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat-Trihydrat (NaAc)	Roth, Karlsruhe
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdesoxycholat (95%) (DOC)	Sigma, Deisenhofen
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Ni ²⁺ -NTA-Agarose	Qiagen, Hilden
Nonidet P40	Boehringer Mannheim
NOVALyse	Dianova, Hamburg
Nukleosidtriphosphate (NTPs)	PeqLab, Erlangen
Orange G	Fluka, Taufkirchen
PAGE-Plus 40% Concentrate	AMRESCO, Solon, Ohio, USA
Pefablock SC (AEBSF)	Boehringer Mannheim
Penicillin G	Grünenthal, Stolberg
Phenol für DNA-Extraktion, Tris-gesättigt	AppliChem, Darmstadt
Phenol für RNA-Extraktion, H ₂ O-gesättigt	AppliChem, Darmstadt

Phenolrot	Merck, Darmstadt
Poly(U)	Pharmacia
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Roth, Karlsruhe
Proteingrößenstandard, gefärbt, für PAGE	NEB, Frankfurt/M.
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Merck, Darmstadt
Sephadex G-50 und G-15 Säulenmaterial	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Streptomycin (Strep)	Hefa Pharma, Werne
Sucrose (Saccharose)	Serva, Heidelberg
SuperFect Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Serva, Heidelberg
Tricin	ICN, Eschwege
Tris (Trishydroxymethylaminomethan)	GibcoBRL, Eggenstein
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Trizol Reagenz	GibcoBRL, Eggenstein
tRNA (aus Hefe)	Boehringer Mannheim
Tween-20	Sigma, Deisenhofen
Ultima Gold, Szintillationsflüssigkeit	Packard., Groningen, Niederlande
Xylencyanol FF	Fluka, Taufkirchen

2.1.10 Software

Auswertung von Sequenzdaten erfolgte mit DNS Sequencing Analysis Software, Version 2.1.1., Applied Biosystems.

Die Analyse und der Vergleich der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen wurde mit Hilfe der University of Wisconsin Genetics Computer Group (UW-GCG) Software (Devereux et al., 1984), Version 10.0 durchgeführt.

Die graphische Darstellung von Plasmidkonstrukten wurde mit pDRAW32 1.0 (<http://www.acaclone.com>) durchgeführt.

Ethidiumbromid-Lösung:

10 mg/ml

FACS-Puffer:

3% FCS in PBS-A

Fixier-Lösung für PAGE:

10% Essigsäure

30% Methanol

Glyoxal:

8,8 M Glyoxal (40% in H₂O)

mit SERDOLIT MB-1 entionisieren

Hybridisierungslösung, 5%:

1 mM EDTA

40 mM Phosphatpuffer, pH 7,0

0,25 M Na₂HPO₄ x 2 H₂O

1 mM EDTA

0,25 M NaH₂PO₄ x H₂O

5% SDS

Hybridisierungswaschlösung, 1%:

40 mM Phosphatpuffer, pH 7,0

1 mM EDTA

1 % SDS

Impact™ Column Buffer:

500 mM NaCl

20 mM Na-HEPES

Impact™ Cleavage Buffer A:

500 mM NaCl

50 mM DTT

20 mM Na-HEPES

Impact™ Cleavage Buffer B:

500 mM NaCl

50 mM Hydroxylamin

20 mM Na-HEPES

Jagow-Anodenpuffer (10x):

0,2 M Tris-HCl, pH 8,9

Jagow-Gelpuffer:

0,3% SDS

3 M Tris-HCl

pH 8,45

Jagow-Kathodenpuffer (10x):

2 Material & Methoden

0,1% SDS	0,1% Tricin
0,1 M Tris-HCl	pH 8,25
<i>Klenow-Puffer, 10x:</i>	
50 mM MgCl ₂	10 mM DTT
100 mM Tris-HCl	pH 8,5
<i>Kristallviolett-Lösung:</i>	
1% Kristallviolett	50% Ethanol
<i>Ligasepuffer, 10x:</i>	
100 mM DTT	100 mM MgCl ₂
250 µg/ml BSA	500 mM Tris-HCl
pH 7,8	
<i>Laemmli Puffer:</i>	
8% (w/v) SDS	40% (v/v) Glycerin
700 mM β-Mercaptoethanol	250 mM Tris-HCl
pH 6,8	
<i>Laemmli-Elektroden-Puffer (10x):</i>	
0,25 M Tris	1,92 M Glycin
pH 8,3 vor SDS-Zugabe mit HCl	10% SDS
<i>LB (Luria Bertrani)-Agar:</i>	
LB-Medium + 1,5% (w/v) Agar	
<i>LB-Medium:</i>	
0,5% (w/v) NaCl 5 g/l	0,5% (w/v) Hefeextrakt 5 g/l
1,0% Bacto-Trypton 10 g/l	pH 7,3 mit NaOH
<i>LB++-Medium:</i>	
20 mM MgSO ₄	10 mM KCl
in LB-Medium	
<i>„Minipräp“ Lösung 1:</i>	
10 mM EDTA	50 mM Glukose
50 mM Tris-HCl	pH 8,0

„Minipräp“ Lösung 2:	
0,2 M NaOH	
„Minipräp“ Lösung 3:	
1% Triton X-100	3 M NaAc
pH 4,8	
<i>NucleoBond®S1:</i>	
10 mM EDTA	100 µg/ml RNase A
50 mM Tris-HCl	pH 8,0
<i>NucleoBond®S2:</i>	
1% SDS	200 mM NaOH
<i>NucleoBond®S3:</i>	
2,8 M KAc	pH 5,1
<i>NucleoBond®N2:</i>	
15% Ethanol	900 mM KCl
0,15% Triton X-100	100 mM Tris
pH 6,3 mit H ₃ PO ₄	
<i>NucleoBond®N3:</i>	
15% Ethanol	1,15 M KCl
100 mM Tris	pH 6,3 mittels H ₃ PO ₄
<i>NucleoBond®N5:</i>	
15% Ethanol	1 M KCl
100 mM Tris	pH 6,3 mittels H ₃ PO ₄
<i>PBS (Poly Buffered Saline):</i>	
2,7 mM KCl	6,7 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
1,5 mM KH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	0,7 mM CaCl ₂ x 2 H ₂ O
0,5 mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O	137 mM NaCl
<i>PBS/A:</i>	
2,7 mM KCl	6,7 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
1,5 mM KH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	137 mM NaCl
<i>Phenol:</i>	

2 Material & Methoden

Phenollösung gesättigt mit 100 mM Tris-HCl, pH 7,5 mit
0,1% Hydroxychinolin

Phosphatpuffer (50x):

250 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O pH mit NaOH auf 6,8 - 7 einstellen

Polynukleotidkinase-Puffer (10x):

100 mM MgCl₂ 50 mM DTT

700 mM Tris-HCl pH 7,6

Probenpuffer für DNA-Agarose-Gele (10x):

20 mM EDTA, pH 8,0 50% Glycerol

0,2% Xylencyanol 0,2% Orange G

0,1% Bromphenolblau

Probenpuffer f. DNA-Sequenzgele (1x):

80% Formamid 20% BlueDextran/ EDTA

Probenpuffer f. RNA-Agarose-Gele (1x):

0,25% Xylencyanol FF 0,1% Orange G

30% Glycerin 0,25% Bromphenolblau

in DEPC-H₂O lösen

Probenpuffer für PAGE (1x):

62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8 20% β-Mercaptoethanol

10% Glycerin 2% SDS

0,01% Bromphenolblau 0,01% Phenolrot

6 M Harnstoff

RIP-Grundpuffer:

100 mM NaCl 1 mM EDTA

2 mg/ml BSA 20 mM Tris

pH 7,6

RNA-Lysis-Mix:

4 M Guanidiniumisothiocyanat 0,5% Lauryl-Sarcosinat

25 mM Lithiumcitrat 0,1 M β-Mercapthoethanol

RNase-Puffer:

40 mM Tris	0,5 mM EDTA
5 mM Dithiothreitol	
<i>SP6-RNA-Polymerase-Puffer:</i>	
NEB, Frankfurt/M.	
<i>SSC-Puffer (20x):</i>	
3 M NaCl	0,3 M Na-Citrat
mit NaOH auf pH 7,0	
<i>Sucrose 25%:</i>	
1% Triton X100	0,5 % Desoxycholat
0,1% SDS	25% Sucrose
in RIP-Grundpuffer	
<i>Triton 0,2%:</i>	
0,2% Triton in RIP-Grundpuffer	
<i>Triton (alt) 1%:</i>	
0,1% Desoxycholat	0,1% SDS
1% Triton X-100	in RIP-Grundpuffer
<i>Triton (neu) 1%:</i>	
0,5% Desoxycholat	0,1% SDS
1% Triton X-100	in RIP-Grundpuffer
<i>RNase A-Lösung:</i>	
10 mg/ml RNase A in 1 x TE	
aliquotiert nach mehrmaligem Erhitzen und Abkühlen	
<i>TAE-Puffer (50x):</i>	
250 mM Natriumacetat	50 mM Na ₂ -EDTA
3 M NaCl	2 M Tris
pH 7,8 mit Essigsäure	
<i>TBE-Puffer (10x):</i>	
500 mM Borat	20 mM Na ₂ -EDTA
500 mM Tris-HCl	pH 8,3
<i>TE-Puffer (10x):</i>	

2 Material & Methoden

10 mM Na ₂ -EDTA	100 mM Tris-HCl
pH 7,5	
<i>Tetracyclin (500x):</i>	
50 mg/ml in 70% Ethanol	
Lagerung in Aliquots bei -20 °C	
<i>Translations-Reaktionsgemisch, 12,5x (Boehringer Mannheim):</i>	
37,5 mM Fructose-1,6-	30,0 mM cAMP
bisphosphat	
12,5 mM dATP	2,5 mM dGTP
100 mM Creatinphosphat	312,5 µM Aminosäuren (ohne Met)
250 mM Hepes	pH 7,6
<i>Transkriptionspuffer (5x):</i>	
30 mM MgCl ₂	50 mM NaCl
10 mM Spermidin	300 mM Tris-HCl
pH 7,5	

2.1.12 Verbrauchsmaterialien

Einmalspritzen 1, 5, 10, 20 ml	Braun, Melsungen
Gewebekultur-Kunststoff-	Henke Sass Wolf GmbH, Tuttlingen
Einmalartikel	Greiner, Frickenhausen
	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ
	USA
Einmalkanülen 18, 22G	Terumo, Leuven, Belgien
(Halb-)Mikroreaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Nitrozellulose BA 83 (Ref.-#	Schleicher & Schuell, Dassel
401396, 0,2 µM)	
Pipettenspitzen	Greiner, Frickenhausen
	Abimed, Langenfeld
Polaroid-Filme Typ 665, 667	Polaroid, Cambridge, MA, USA
Probenröhrchen „Blue Cap“ 15,	Greiner, Frickenhausen
50 ml	

Probenröhrchen 6, 14 ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ USA
Röntgenfilme BioMax MR	Kodak, Rochester, NY, USA
Zentrifugenröhrchen, Polyallomer-Röhrchen	Beckman, München

2.1.13 Versuchstiere

Sechs bis acht Wochen alte Ferkel (deutsche Landrasse) wurden vom Versuchsgut „Unterer Lindenhof“ der Universität Hohenheim oder vom „Reberhof“ in Schwäbisch-Hall- Gailenkirchen bezogen.

Tragende Sauen (deutsche Landrasse) wurden über die Viehzentrale Südwest GmbH bezogen.

Die Tiere wurden vor Versuchsbeginn klinisch untersucht und für mindestens drei Tage an die Stallbedingungen adaptiert. Seren der Versuchstiere wurden zunächst auf neutralisierende Antikörper gegen Schweinepestvirus getestet.

2.1.14 Virusstämme und -mutanten

2.1.14.1 CSFV

230/1	RNase negative (RNase [⊖]) attenuierte Mutante H346 deletiert (Δ), auf Basis CSFV Alfort/Tübingen.
255/1	RNase [⊖] attenuierte Mutante W300G, auf Basis CSFV Alfort/Tübingen.
283/3	RNase [⊖] attenuierte Mutante H297K, auf Basis CSFV Alfort/Tübingen.
666 Δ -H132	RNase [⊖] attenuierte Mutante H132 Δ , auf Basis CSFV Alfort/Tübingen.
E38 I2	Alfort/Tübingen mit Ubiquitinsequenz zwischen N ^{pro} und C.
E38 I6	CSFV-N ^{pro} Δ mit Ubiquitinsequenz, auf Basis CSFV Alfort/Tübingen.
Riems	Riemser Impfstamm
SP50	Alfort/Tübingen, Passage #50.
W300GR	Reisolat gewonnen aus einem Schwein nach Infektion mit 255/1.

2.1.14.2 BVDV

KE9	nzp BVDV Typ 1
KE13	nzp BVDV Typ 2
NY93/C	nzp BVDV Typ 2
XIKE-A	nzp BVDV Typ 2, von Christiane Meyer auf Basis NY93/C hergestellt, Wildtyp(wt)-Sequenz, vom infektiösen cDNA Klon erhalten.
XIKE-A-NdN	nzp BVDV Typ 2, Mutante von Christiane Meyer auf Basis NY93/C, Δ N ^{pro} .
XIKE-B	nzp BVDV Typ 2, H349-Deletionsmutante von Christiane Meyer auf Basis NY93/C, RNase [⊖] .

XIKE-B-NdN nzp BVDV Typ 2, H349-Deletionsdoppelmutante von Christiane Meyer auf Basis NY93/C, ΔN^{pro} und RNase $^{\ominus}$.

2.1.14.3 weitere Viren

14.1 attenuierte Tollwutvirus-Mutante auf Basis von Impfstamm SAD B19 mit RNase $^{\oplus}$ -E $^{\text{rms}}$.
Mu1 attenuierte Tollwutvirus-Mutante auf Basis von Impfstamm SAD B19 mit RNase $^{\ominus}$ -E $^{\text{rms}}$.
Vacciniavirus modifizierter Stamm Ankara, T7-Polymerase exprimierend (MVA-T7) erhalten von Dr. B. Moss.

2.1.15 Zellkultur

38A₁D (Schweinelymphom-) Zellen [97]: erhalten von Prof. Dr. Schäfer (MPI für Virusforschung, Tübingen).

BHK-21 (Baby Hamster Kidney, Baby-Hamsternieren) Zellen, erhalten von T. Rümenapf (Universität Giessen).

MAX (Porcine Transformed Kidney, transformierte Schweinenieren) Zellen: hergestellt im FLI Tübingen von T. Pauly und M. König.

MDBK-(Marbin Darby Bovine Kidney-, MD Rindernieren-)B2 Zellen : Zellklon im FLI etabliert von G. Meyers, auf Basis der American Type Culture Collection Linie CCL 22.

SK6 (Schweinenierenzellen Linie 6) Zellen, erhalten von A. Summerfield.

STE (Swine Testis Epithelioid, Schweinehoden Epithel) Zellen (STE): erhalten von Dr. R. Ahl, FLI Tübingen.

2.1.16 Zellkulturmedien

BFA-34T: Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium mit folgenden Zusätzen:

2 Material & Methoden

0,0178 g/l L-Alanin	0,03 g/l L-Asparaginsäure
0,07 g/l Glycin	0,075 g/l L-Glutaminsäure
0,025 g/l L-Prolin	0,1 mg/l Biotin
0,025 g/l Hypoxanthin	3,7 g/l NaHCO ₃

Vor Gebrauch Zugabe von 10% fötalem Kälberserum (FCS), 0,04 g/l Penicillin und 0,07 g/l Streptomycin.

BFA-35 (Trypsinlösung):

8,0 g/l NaCl	0,2 g/l KCl
1,44 g/l Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	0,2 g/l KH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O
2,5 g/l Trypsin 1:300	1,23 g/l EDTA Na ₂ x 2 H ₂ O
0,016 g Phenolrot	

Dulbecco's Modified Eagle's Medium: SIGMA, Steinheim

2.2 Methoden

2.2.1 Gewebekultur

Gewebekulturzellen wurden in BFA-34T Medium mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) bei 37°C und 7% CO₂ in feuchter Atmosphäre gehalten. Die am Boden der Gewebekulturschale anhaftende Zellen wurden alle 3-4 Tage (bei Erreichen eines konfluenten Zellrasens) durch Trypsinbehandlung abgelöst und in geeigneten Verdünnungen (MDBK-B2 & SK6 1:10, BHK-21 1:15) in neue Gewebekulturschalen eingesät und weiter inkubiert.

2.2.1.1 Bestimmung der Zahl lebender Zellen

Zur Bestimmung der Zahl lebender Gewebekulturzellen wurden diese mit Trypsin 8-10 min im Brutschrank inkubiert. Nach dem Ablösen der Zellen vom Boden der Gewebekulturschale erfolgte die Suspension der Zellen mit einer Glaspipette bis einzelne Zellen vorlagen. Durch Zugabe des doppelten Volumens an FCS-haltigem Medium wurde die Trypsinbehandlung gestoppt.

Zur Bestimmung der Zahl an lebenden Zellen wurde die Zellsuspension 1:10 in Erythrosin B (1mg/ml in PBS) verdünnt. Im Gegensatz zu lebenden Zellen nehmen tote Zellen das Erythrosin B auf und färben sich dadurch rötlich. In einer Neubauer Zählkammer wurden die in 4 Eckquadranten befindlichen nicht angefärbten Zellen unter dem Mikroskop gezählt. Die Berechnung der Zellzahl (in Zellen/ml) erfolgte mittels folgender Formel:

$$\text{Zellzahl} \times \frac{1,0}{0,4} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^3$$

2.2.1.2 Infektion von Gewebekulturzellen

Gewebekulturzellen wurden in der Regel am Vortag der Infektion so eingesät, daß zum Zeitpunkt der Infektion ein Zellrasen mit ca. 80% Dichte erhalten wurde. Die Infektion der Zellen erfolgte bei 37°C in 20% des normalen Kulturvolumens bei einer m.o.i. von 0,01-1. Nach einstündiger Inkubation wurde der Überstand abgenommen, neues Medium zugegeben

und der Ansatz in der Regel 72 bis 120 h im Brutschrank stehengelassen. Die mit zytopathogenen Viren infizierten Zellen wurden nach Auftreten des zytopathischen Effektes geerntet.

2.2.1.3 Indirekte Immunfluoreszenz

Zum spezifischen Nachweis einer Virusinfektion von Kulturzellen wurde die indirekte Immunfluoreszenz (IF) durchgeführt. Dazu wurde das Gewebekulturmedium abgenommen und der Zellrasen dreimal mit PBS gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgte mit Aceton/Methanol (1:1) für 15 min bei -20°C . Danach wurden die Zellen im kalten Luftstrom getrocknet. Nach Rehydrierung des Zellrasens mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper (a18 oder 24/16 1:10 bei CSFV, α -BVDV-Mix 1:10 bei BVDV oder α -sindbis bei Sindbis-Virus in PBS verdünnt) für mindestens 1 h bei 37°C . Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 1 h bei 37°C mit dem zweiten Antikörper (anti-Spezies IgG-Antikörper, FITC-konjugiert; 1:100 in PBS) inkubiert. Die Zellen wurden erneut dreimal mit PBS gewaschen und im Fluoreszenzmikroskop beurteilt.

Im Unterschied zur oben beschriebenen Vorgehensweise wurden die Zellen für IF mit mAk Code 4 wie folgt behandelt:

Fixierung mit 4% PFA für 20 min bei 4°C , Waschen mit PBS und Permeabilisation mit 0,1% Saponin für 5 min bei 4°C .

Code 4 wurde zwischen 1:2 und 1:5 verdünnt. Alle weiteren Schritte erfolgten wie bei der obengenannte IF.

2.2.1.4 Titration von Viren und Titerberechnung

Die Endpunkttitrations von Viren wurde in 96-Loch-Platten durchgeführt. Die Titration erfolgte in Verdünnungsstufen von 1:10. Für jeden Verdünnungsschritt wurden in Glasröhrchen 1,8 ml FCS-haltiges BFA-34-T vorgelegt. In das erste Röhrchen wurden 200 μl Virussuspension zugegeben und gründlich gemischt. Dann wurden fortlaufend 200 μl in das nächste Röhrchen überführt und gemischt, bis die gewünschte Endverdünnungsstufe erreicht wurde. Angeimpft wurden 4 oder 8 Reihen im Doppel-

ansatz mit je 100 μl pro Vertiefung. Die so vorbereiteten Platten wurden auf Eis gelagert bis die Zellen vereinzelt und ausgezählt waren. Dann wurden in jede Vertiefung $1,5 \times 10^4$ SK6- oder $1,75 \times 10^4$ MDBK-B2-Zellen in 100 μl BFA-34-T zupipettiert.

Anschließend wurden die Platten für 5 Tage im Brutschrank inkubiert. Die Auswertung erfolgte mittels indirekter Immunfluoreszenz. Der Titer, bezogen auf einen Milliliter, wurde nach der Formel von Spearman/ Karber wie folgt geschätzt:

$$x_0 - \frac{1}{2} + \frac{1}{n} \sum x_1,$$

wobei x_0 der positive Exponent der höchsten Verdünnung war, bei der alle Testobjekte positiv reagierten,

n die Anzahl der pro Verdünnung eingesetzten Testobjekte und

$\sum x_1$ die Summe aller auf die Infektion positiv reagierenden Testobjekte, ab und einschließlich x_0 .

2.2.1.5 Transfektion von BHK-Zellen mit RNS

Die Transfektion von BHK-Zellen mit RNS erfolgte mittels Elektroporation. Am Arbeitstag wurden sie mit BFA-35 vom Schalenboden abgelöst und bei 400g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in eiskaltem DEPC-PBS/A resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde noch zweimal wiederholt und zuletzt die Zellen wieder resuspendiert. Die Zellzahl wurde bestimmt und 10^7 Zellen pro 500 μl DEPC-PBS/A in die Elektroporationsküvetten (4 mm Elektrodenabstand) gefüllt. Die BHK-Suspension wurde mit 20 μl RNS, die vom rekombinanten pSinRep5 transkribiert worden war, und 20 μl Sindbis-Helfer (DH-EB) - RNS vermenget. Elektroporiert wurde mit einer Kondensatorspannung von 850 V bei einer Kapazität von 25 μF . Die Halbwertszeit der Entladung lag zwischen 0,5 - 0,9 ms. Die Zellen wurden zweimal elektroporiert und nach 10 min Lagerung auf Eis in 25 cm^2 Zellkulturflaschen ausgesät. Bis zum Auftreten eines zytopathischen Effektes wurden die kotransfizierten Zellen (Konstrukt- und Helfer-RNS) bei 37°C unter 5% CO_2 -Atmosphäre inkubiert.

Der virushaltige Transfektionsüberstand wurde nach Auftreten des zytopathischen Effekts abgenommen und bei -70°C gelagert.

2.2.1.6 Transiente Expression viraler Proteine im T7-Vacciniavirus-System

Die Transfektion wurde mit dem „SuperFect® Transfection Reagent“ von Qiagen durchgeführt. Am Vortag umgesetzte BHK-Zellen (3,5 cm Schale, 80% konfluent) wurden einmal mit BFA-34T Medium ohne FCS gewaschen und mit MVA-T7-Vacciniavirus mit einer m.o.i. von 5 infiziert. Während der einstündigen Inkubation bei 37°C mit 7 % CO₂ wurden die DNS-Proben für die Transfektion vorbereitet. Hierzu wurden 4 µg Plasmid-DNS in 75 µl BFA-34T ohne FCS mit 10 µl SuperFect®-Reagenz vermischt und 5-10 min bei RT inkubiert. In dieser Zeit wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Danach wurden 600 µl Medium mit FCS zum Transfektionsansatz zugegeben, gemischt und der Ansatz in die entsprechende Gewebekulturschale gegeben. Nach 4 h Inkubation bei 37°C wurde der Transfektionsansatz verworfen. Die Zellen wurden mit 1 ml Dulbecco's Modified Eagle's Medium ohne Cystein/ Methionin bedeckt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert, um die intrazellulären Vorräte an nicht radioaktivem Cystein und Methionin zu reduzieren. Der Überstand wurde verworfen und mit einer Mischung aus 500 µl Dulbecco's Modified Eagle's Medium ohne Cystein/ Methionin und 17 µl ³⁵S-Trans-Label (178 µCi) bedeckt. Die Zellen wurden über Nacht inkubiert.

2.2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.2.1 Anzucht von Bakterien

Sämtliche Bakterienstämme wurden bei 37°C unter Schütteln (175 UpM) in oder auf Platten mit LB-Medium angezogen. Die Selektion plasmidhaltiger Bakterien erfolgte durch Zugabe des entsprechenden Antibiotikums. (100 mg Ampicillin / Liter Medium).

2.2.2.2 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Von einer entsprechenden Agarplatte mit dem gewünschten Stamm bzw. aus einer Dauerkultur wurde eine Vorkultur in LB-Medium angeimpft und über Nacht inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurde dann morgens auf eine OD (optische Dichte) von 0,05-0,1 die Hauptkultur angeimpft und bei 37°C unter Schütteln inkubiert und das Wachstum über die OD₆₀₀ regelmäßig verfolgt. Die E. coli Zellen wuchsen bis zu einer OD₆₀₀ = 0,6 und wurden dann bei 4°C abzentrifugiert (10 min, 3.000 UpM, Minifuge GL). Die Bakterien wurden in 1/4 des Ausgangsvolumens eiskalter CaCl₂-Lösung resuspendiert und 40 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden erneut wie oben beschrieben abzentrifugiert, in 1/20 des Ausgangsvolumens in eiskalter CaCl₂-Lösung resuspendiert und erneut 1-3 h auf Eis inkubiert. Die nun transformationskompetenten Bakterien wurden bis zur Verwendung in Aliquots bei -70°C gelagert.

2.2.2.3 Hitzeschock-Transformation von kompetenten Bakterien mit Plasmid-DNS

Zur Transformation wurde der Ligationsansatz bzw. 10-50 ng Plasmid-DNS zu 50 µl kompetenten E. coli Bakterien gegeben und 20 min auf Eis inkubiert. Nach Durchführung eines Hitze-/Kälteschocks (2 min, 42°C, 1 min auf Eis) erfolgte die Zugabe von 200 µl LB++-Medium. Anschließend wurde der Ansatz 40-50 min bei 37°C inkubiert, danach auf einer LB-Agarplatte mit dem gewünschten Selektions-Antibiotikum ausplattiert und 12-16 h bei 37°C inkubiert. Ausgehend von den entstandenen Kolonien wurden „Minipräps“ angeimpft.

2.2.2.4 Plasmidpräparation für Testzwecke („Minipräp“)

Die Isolierung der Plasmid-DNS erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim, 1979). 1,5 ml einer 4 ml Übernachtskultur der zu testenden Bakterienklone wurden 5 min bei 5.000 UpM (Eppendorf-Zentrifuge) abzentrifugiert. Die pelletierten Bakterien wurden in 100 µl Lösung I resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Lösung II zugegeben, der Ansatz durch kurzes Vortexen gemischt und für 5

min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte die Neutralisation mit 150 μ l Lösung III für 10 min auf Eis und das Pelletieren der Proteine und der chromosomalen DNS (10 min, 14.000 UpM). Der plasmidhaltige Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die Plasmid-DNS mit 400 μ l Isopropanol 5 min bei RT gefällt. Die Plasmid-DNS wurde abzentrifugiert (5 min, 14.000 UpM), einmal mit 200 μ l Isopropanol gewaschen und in der „Speed Vac“ getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 50 μ l H₂O das 250 ng RNase A enthielt, aufgenommen und durch Schütteln gelöst. Für die Spaltung mit Restriktionsendonukleasen wurden 1,5 μ l der DNS-Lösung in einem 10 μ l Ansatz mit der gewünschten Endonuklease für 30-60 min behandelt und anschließend der Reaktionsansatz in einem Agarosegel aufgetrennt.

2.2.2.5 Plasmidpräparation zur Gewinnung hoch gereinigter DNS in größeren Mengen („Midipräps“)

Größere Plasmidpräparationen wurden mit dem NucleoBond®-AX-Kit - durchgeführt. 100 ml LB/AMP Medium wurden mit 25 μ l Plasmidlösung angeimpft. Die Kultur wurde ca. 16 Stunden bei 37°C geschüttelt und dann 15 min bei 5.000 UpM (Minifuge RF) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 4 ml kalter Lösung S1 resuspendiert. Nach Zugabe von 4 ml S2 wurde der Ansatz durch vorsichtiges, mehrmaliges Invertieren des Röhrchens gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 4 ml Lösung S3. Der Ansatz wurde erneut vorsichtig gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurde der Ansatz bei 4°C und 12.000g für 25 min zentrifugiert um die denaturierten Proteine und die chromosomale DNS abzutrennen. Der Überstand wurde auf die vorher mit 2,5 ml Lösung N2 äquilibrierte Säule pipettiert. Nachdem der Überstand vollständig durchgelaufen war, wurde einmal mit 10 ml Lösung N3 gewaschen und schließlich die DNS mit 5 ml Lösung N5 von der Säule eluiert. Durch Zugabe des 0,7-fachen Volumens Isopropanol erfolgte die Fällung der DNS. Anschließend wurde die DNS durch Zentrifugation bei 4°C und 15.000g pelletiert, mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in H₂O gelöst.

2.2.3 Photometrische Analyse von Nukleinsäuren

Die Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren wurde anhand der UV Absorption der DNS- oder RNS-Proben ermittelt (Sambrook et al., 1989). Dabei wurden in 100 μ l Volumen am Photometer in Quarz-Küvetten Verdünnungen (meist 1:100) der Proben in Wasser gegen Wasser als Nullwert bei den Wellenlängen 260 / 280 nm gemessen. Die Konzentration von Nukleinsäure-Lösungen errechnet sich aus der Extinktion der Lösung bei 260 nm. Eine Extinktion 260 nm von 1,0 entspricht bei einer Schichtdicke von 1 cm nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz einer Konzentration von 50 μ g/ ml bei doppelsträngiger DNS, 33 μ g/ ml bei einzelsträngiger DNS und 40 μ g/ ml bei einzelsträngiger RNS.

Die Reinheit von Nukleinsäure-Lösungen läßt sich anhand des Verhältnisses der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm abschätzen. Das Verhältnis ist 1,8 - 2,0 bei reiner DNS und 1,9 - 2,1 bei reiner RNS.

2.2.4 Methoden zur Isolierung und Analyse von RNS

Beim Umgang mit RNS wurde stets mit Handschuhen gearbeitet, um den Abbau der RNS durch Kontamination mit RNasen zu vermeiden.

2.2.4.1 Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Behandlung von Lösungen

Alle beim Arbeiten mit RNS verwendeten Lösungen (außer Tris-Lösungen und Elektrophoresepuffer) wurden mit DEPC behandelt. Durch das DEPC werden in den Lösungen befindliche RNasen irreversibel inaktiviert. Nach Zugabe von 0,1% DEPC wurde über Nacht bei RT gerührt und das DEPC anschließend durch Autoklavieren inaktiviert.

2.2.4.2 RNS-Isolierung aus Zellen

Zur RNS-Isolierung aus Zellen wurden in der Regel entweder das RNeasy Mini Kit von Qiagen oder das NucleoSpin®RNS II Kit von Macherey-Nagel verwendet.

Die Zellen wurden in einem Puffer mit hohem Anteil chaotroper Ionen lysiert. Gleichzeitig deaktiviert der Puffer RNasen und stellt die Bedingungen für eine Adsorption der RNS an die Silika-Membran her. Mit DNase I wird ebenfalls gebundene DNS von der Membran entfernt. Waschen mit weiteren Puffern entfernt Salz, Zellmetaboliten und andere Zellbestandteile. Am Ende wird die reine RNS mit RNase-freiem Wasser eluiert.

Alle Präparationen wurden getreu den Protokollen der Hersteller mit den mitgelieferten Materialien durchgeführt.

RNS-Isolierung mittels CsCl-Gradienten Zentrifugation

Alternativ wurde die RNS über einen Cäsium-Chlorid Gradienten mittels Ultrazentrifugation isoliert.

Das Kulturmedium der Zellen einer 8,5 cm Kulturschale wurde verworfen und die Zellen in 6 ml RNS-Lysis-Mix resuspendiert, wodurch eine Zellyse und eine Inaktivierung von RNasen erreicht wurde (Chirgwin et al., 1979). Die Zellsuspension wurde in einem Polyallomer-Röhrchen auf ein 4,5 ml CsCl-Kissen geschichtet und für 21 h bei 32.000 UpM und 20°C im SW41-Rotor zentrifugiert. Aufgrund ihres hohen spezifischen Gewichtes ($> 1,8 \text{ g/ml}$) wird die RNS pelletiert, während die anderen zellulären Komponenten (DNS, Lipide, Proteine) im Überstand bleiben. Nach Beendigung der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen, das Zentrifugenröhrchen auf den Kopf gestellt und der Boden mit einem heißen Skalpell abgeschnitten. Die RNS wurde in $320 \mu\text{l H}_2\text{O}$ gelöst und durch Zugabe von $40 \mu\text{l 2 M KAc}$, pH 5,6 und $800 \mu\text{l}$ absolutem EtOH für 30 min bei -70°C gefällt. Nach einmaligem Waschen mit 80% EtOH wurde die RNS in H_2O gelöst. Die Lagerung der RNS-Lösung erfolgte bei -20°C .

2.2.4.3 RNS-Agarosegelelektrophorese

Zur Vermeidung intramolekularer Rückfaltungen der RNS und damit verbundenem verändertem Laufverhalten im Agarosegel wurde die RNS vor dem Auftragen mit Glyoxal behandelt und ein Formaldehyd-haltiges Agarosegel verwendet (Keil et al., 1984).

1-5 μg Gesamtzell-RNS oder 3 μl aus dem in vitro Transkriptionsansatz

wurden mit 3 μ l 5 x Phosphatpuffer und 1,8 μ l 40% Glyoxal in einem Gesamtansatz von 12,3 μ l für 35-45 min bei 56°C denaturiert und anschließend mit 3 μ l Probenpuffer versetzt. Für die Herstellung eines 1%igen Agarosegels wurden 1,5 g Agarose mit 140 ml H₂O im Mikrowellengerät aufgekocht. Unter Rühren erfolgte die Zugabe von 3 ml 50 x Phosphatpuffer. Nach Abkühlen auf 60°C wurden 21 ml einer mindestens 36,5%igen Formaldehydlösung zugegeben und das Gel gegossen (Horizontalgel der Größe 14 x 25 cm). Nach Zugabe von 1 x Phosphatpuffer in die Kammer wurden die Geltaschen mit den Proben beladen. Die Auftrennung der RNS erfolgte bei einer Spannung von 4 V/cm mit ständiger Pufferumwälzung für etwa 4 h. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel 5-10 min in einer Acridinorangelösung gefärbt und anschließend 3 x 15 min in 1 x Phosphatpuffer entfärbt. Die denaturierte RNS wurde im UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht, und das Gel mit dem Typhoon Imager dokumentiert.

2.2.4.4 Northern Blot

Transfer von RNS auf Filter: Im Anschluß an die Färbung des RNS-Gels erfolgte der Transfer auf die N+-Nylonmembran. Dazu wurde eine Gelgießkammer mit der offenen Seite nach unten in eine große Wanne gestellt, die etwa 1 cm hoch mit Transferpuffer (20 x SSC) gefüllt war. Auf die Gelkammer wurden zwei Lagen mit 20 x SSC befeuchtetes Filterpapier (Whatman 3MM) gelegt, dessen Länge so bemessen war, daß die Enden des Filterpapiers in die Transferlösung tauchten. Das Gel wurde mit den Taschen nach oben auf das Filterpapier gelegt. Als nächstes folgten der genau gelgroße Nylonfilter und zwei gleich große Filterpapiere, die mit 20 x SSC angefeuchtet waren. Anschließend wurde ein Stoß trockenes, saugfähiges Papier aufgelegt und mit einem Gewicht (ca. 1 kg) beschwert. Über die Kapillarkräfte des Papiers wurde die Transferlösung durch das Gel gesaugt und die RNS auf die Nylonmembran transferiert (Sambrook et al., 1989). Das Gel wurde mindestens 12 h „geblottet“. Nach dem Transfer wurde die „RNS-Leiter“ auf der Membran unter einer UV-Lampe (254 nm) sichtbar gemacht und mit einem Kugelschreiber markiert. Zur Zerstörung des Glyoxal, das die Hybridisierung beeinträchtigt, und zur Fixierung

der RNS auf der Membran, wurde diese für 3-4 h bei 80°C im Vakuum gebacken.

RNS / DNS-Hybridisierung: Die Hybridisierungen wurden in Glasröhren durchgeführt, die in Wärmeschränken mit 6 UpM rotierten. Die Hybridisierungstemperatur betrug 68°C für homologe Sonden. Alle verwendeten Lösungen wurden im Wasserbad auf 68°C vorgewärmt. Zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen und Auswaschen von Acridinorange wurde die Nylonmembran mit der fest gebundenen RNS für 2 x 20 min in ungefähr 20 ml Hybridisierungslösung vorhybridisiert. Danach wurde die Vorhybridisierungslösung verworfen und durch 8 ml Hybridisierungslösung ersetzt und die hitzedenaturierte radioaktive Sonde zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht. Danach wurde der Filter einmal 30 min in 5% Hybridisierungswaschlösung und zweimal 30 min in 1% Hybridisierungswaschlösung gewaschen, getrocknet und autoradiographisch ausgewertet.

2.2.4.5 Radioaktive Markierung von DNS durch „Nick-Translation“

Zur radioaktiven Markierung durch „Nick-Translation“ werden durch das Enzym DNase I zufallsmäßig offene Phosphodiesterbindungen („nicks“) in einem doppelsträngigen DNS-Molekül erzeugt. Mit Hilfe der 5'-3'-Exonukleaseaktivität der DNase I werden weitere Nukleotide entfernt und bei der Polymerasereaktion durch neue Nukleotide ersetzt. Da die eingesetzten dCTP-Nukleotide an der α -Position ^{32}P -markiert sind, wird die neu synthetisierte DNS radioaktiv markiert (RIGBY, 1977). Die Markierungsreaktion wurde mit dem „Nick Translation Kit“ durchgeführt. Das zu markierende DNS-Fragment wurde aus einem Agarosegel eluiert. Maximal 50 ng des Fragmentes wurden mit 4 μl dNTP-Mix, 30 μCi $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP und 2 μl Enzymlösung in einem Gesamtansatz von 20 μl für 60-90 min bei 15 °C inkubiert. Durch Zugabe von 80 μl TES (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 5 mM EDTA, 0,5% SDS) wurde die Reaktion gestoppt und die freien Nukleotide durch Zentrifugation über eine Sephadex G-50 Säule abgetrennt. Die Messung der radioaktiven Markierung erfolgte im Mini-Assay Typ 6-20. Die Sonde wurde vor der Zugabe in die Hybridisierungslösung 4 min

auf 95°C erhitzt, um die DNS-Doppelstränge in Einzelstränge zu trennen.

2.2.4.6 Test auf RNase-Aktivität

SK6 Zellen wurden mit einer m.o.i. von 0,01 mit der entsprechenden Virusmutante infiziert. Als positiv Kontrolle wurden Zellen mit Wildtyp Virus infiziert, als negativ Kontrolle fungierten nicht infizierte Zellen. 48h nach Infektion wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in 400 µl Triton(alt) lysiert. Das Lysat wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und für 20 sec im 4°C Wasserbad beschallt (Branson Ultraschallgerät, 100 Watt). Zur Klärung wurden die Proben zentrifugiert (5 min, 14.000 UpM, 4°C), der Überstand wurde ultrazentrifugiert (1h, 45.000 UpM, 4°C).

Für die Feststellung der RNase-Aktivität wurde in einem Gesamtvolumen von 200 µl gearbeitet. 50 µl des Überstandes der Ultrazentrifugation wurden mit 80 µg Poly(U) und 20 µl 10 x RNase Puffer versetzt und mit DEPC-Wasser auf 200 µl aufgefüllt. Die Mischung wurde für 1h bei 37°C inkubiert. Im Anschluß wurde die Reaktion mit 200 µl 1,2 M Perchlorsäure / 20 mM Lanthansulfat für 15 min auf Eis gestoppt und für 15 min zentrifugiert (14.000 UpM, 4°C, Eppendorf 5402).

100 µl des Überstandes wurden zu 300 µl DEPC-Wasser pipettiert und die optische Dichte bei 260 nm im Photometer gemessen.

2.2.5 Standard DNS-Techniken

2.2.5.1 Phenol-/ Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren

Um Proteine aus wässrigen Nukleinsäurelösungen zu entfernen, wurden diese mit 1 Volumen Phenol ausgeschüttelt (Sambrook et al., 1989). Die Proteine gelangen dabei in die Phenol- oder Interphase. Durch Zentrifugation bei 14.000 UpM (Eppendorf-Zentrifuge) für 4 min erfolgte die Phasentrennung. Nach Abnahme der nukleinsäurehaltigen wässrigen oberen Phase und Überführung in ein frisches Gefäß wurde in gleicher Weise noch zweimal extrahiert: Eimal mit 1:1 Phenol/ Chloroform und abschließend nur mit Chloroform. Durch eine anschließende Ethanol-fällung wurde die Nukleinsäure weiter gereinigt und konzentriert.

2.2.5.2 Ethanolfällung von DNS

Die DNS-Lösung wurde mit 1/10 Volumen 3 M NaAc (pH 5,4) und dem 2,5fachen Volumen absolutem EtOH vermischt und für 30 min bei -70°C oder auf Trockeneis inkubiert. Anschließend wurde die DNS 15 min mit 14.000 UpM bei 4°C (Eppendorf-Zentrifuge) pelletiert. Zum Entfernen vorhandener Salzreste wurde die DNS mit 70% EtOH gewaschen, danach im Vakuum getrocknet und in H₂O gelöst.

2.2.5.3 Isopropanolfällung von DNS

Die DNS-Lösung wurde mit 1/10 Volumen 3 M NaAc (pH 5,4) und dem 0,7-fachen Volumen Isopropanol vermischt und für 5 min bei RT inkubiert. Die Pelletierung und das Waschen der gefällten DNS erfolgten wie bei der EtOH-Fällung.

2.2.5.4 Spaltung von DNS mit Restriktionsenzymen

Zur Analyse von Plasmid-DNS oder zur Herstellung von rekombinanter DNS wurde die DNS mit Restriktionsendonukleasen des Typs II behandelt, die spezifische Sequenzen in doppelsträngiger DNS erkennen und spalten können. Die Spaltung von DNS erfolgte nach den Vorschriften der Hersteller der entsprechenden Enzyme unter Verwendung der mitgelieferten Puffer. Dabei wurden DNS-Konzentrationen von 0,25 µg µl nicht überschritten. Die Volumina betrugen 10 - 15 µl für analytische Verdaue mit bis zu 0,3 µg DNS und 50 oder 100 µl für präparative Verdaue mit 1-5 µg DNS. Die Enzyme wurden mit 2-5 U für 30 min bis 5 h eingesetzt.

2.2.5.5 Herstellung glatter Enden an DNS-Molekülen

Für die Ligation nicht kompatibler Enden nach Restriktionsenzymspaltung ist es z. T. notwendig, an DNS mit Einzelstrang-Überhängen glatte Enden zu erzeugen. Hierzu wurde das große Fragment der DNS-Polymerase I (Klenow-Fragment) verwendet, dem die 5'-3'-Exonukleaseaktivität fehlt. Mit Hilfe der noch vorhandenen 3'-5'-Exonukleaseaktivität und der 5'-3'-Polymeraseaktivität können nicht kompatible Enden durch Abbau eines

3'-Überhangs bzw. durch Auffüllen eines 5'-Überhangs glatte Enden hergestellt werden.

Zum Auffüllen von 5'-Überhängen wurde die DNS (bis zu 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) in 1 x Klenow-Puffer gelöst und mit 1 Einheit Klenow-Fragment pro μg DNS bei 37°C 15 min mit dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 125 μM) inkubiert. Sollten 3'-Überhänge entfernt werden, so wurden die dNTPs erst nach 5 min Inkubation von DNS mit Enzym bei 37°C zugegeben. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde eine Phenol-/Chloroformextraktion mit anschließender Ethanolfällung der DNS durchgeführt. Eine alternative Methode stellt die Verwendung von T4-DNS-Polymerase dar. DNS-Mengen, Nukleotidkonzentrationen und Inkubationszeiten entsprechen denen bei der Behandlung mit Klenow-Polymerase, aber mit T4-DNS-Polymerase kann i. d. R. im Puffer des vorhergehenden DNS-Verdaus gearbeitet werden.

2.2.5.6 Ligation von DNS-Fragmenten mit T4-DNS-Ligase

Die T4-DNS-Ligase katalysiert mit Hilfe von ATP und Mg^{2+} -Ionen die Ausbildung einer kovalenten Phosphodiesterbindung zwischen der 5'-Phosphatgruppe und der 3'-Hydroxylgruppe von DNS-Molekülen. Für die Ligation wurden ungefähr 100-500 ng DNS pro Reaktionsansatz (30 μl) in 1 x Ligationspuffer mit 3 U T4-DNS-Ligase versetzt. Die Ligation erfolgte entweder für 16 h bei 14 °C oder für 4 h bei RT. Die molaren Verhältnisse der Ligationspartner (Insert : Plasmid) lagen bei 3 : 1 für die gerichtete Klonierung („sticky end“) und bei 5 : 1 für die Ligation glatter Enden („blunt end“).

2.2.5.7 DNS-Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wurde als Standardmethode zur Analyse und Reinigung von DNS-Fragmenten eingesetzt.

Für die Auftrennung von DNS-Fragmenten wurden horizontale 0,6-1,5% (w/v) Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer (mit 100 ng/ml EtBr) in der Mikrowelle durch Kochen gelöst und in die Horizontalgelapparaturen gegossen. Nach dem Erstarren wurde das Gel

mit 1 x TAE (mit 100 ng/ml EtBr) überschichtet, die DNS-Proben mit 0,2-fachem Volumen Probenpuffer versetzt und aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 4-8 V/cm (i.d.R. 105 V konstant). Als Längenstandard wurde parallel zu den Proben ein kommerzieller Standard elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Gellauf konnten die DNS-Fragmente im UV-Licht (254/302 nm) sichtbar gemacht und fotografiert werden.

2.2.5.8 Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNS aus der Agarose erfolgte mit Hilfe des NucleoTrap Kits oder des NucleoSpin Kits nach Angaben der Hersteller. Das Prinzip beider Kits beruht auf der Bindung von Nukleinsäuren an Glaspartikel (Vogelstein und Gillespie, 1979). Nach der Restriktionsenzymspaltung wurden die DNS-Fragmente im Agarosegel aufgetrennt, das gewünschte DNS-Fragment unter UV-Licht (302 nm) aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach Auflösung der Agarose in einer Lösung chaotroper Salze und Zugabe der Glaspartikelsuspension erfolgten mehrere Waschschrte und die Ablösung der DNS vom Trägermaterial durch Inkubation in Wasser bzw. einem niedermolaren Tris-Puffer mit pH 7,5.

2.2.6 Polymerasekettenreaktion (PCR) ausgehend von DNS Matrizen

2.2.6.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Es wurden ca. 1-10 ng des DNS-Templates mit je 13 pMol Plus- und Minusstrang Primer, 5,0 μ l 10 x PCR-Puffer mit $MgCl_2$ (Appligene), 1 μ l 10 mM dNTPs, 1 μ l DMSO sowie 1 U Tfl-Polymerase versetzt und auf ein Gesamtvolumen von 50 μ l mit H_2O aufgefüllt. Für Standardansätze wurden die Reaktionsparameter abgeschätzt mit den Annahmen, dass Tfl-Polymerase etwa 1 kb je min synthetisiert und die Hybridisierungstemperatur der Primer mit der „2+4-Regel“ bestimmt werden kann.

2.2.6.2 Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

RT-PCR wurde mit dem OneStep RT-PCR Kit von Qiagen getreu dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Standardansätze erfolgten i.d.R. mit folgenden Zyklusparametern:

Reverse Transkription: 50°C 30 min

Initiierung Taq-Pol. und Inaktivierung reverse Transkriptasen 95°C 15 min

Denaturierung: 94°C 1 min

Annealing: 52°C 45 sec

Elongation: 72°C 90 sec (abhängig von der erwarteten Fragmentgröße)

Zahl der Zyklen: 30-35

letzte Verlängerung: 72°C 10 min

2.2.7 Sequenzierung von DNS

2.2.7.1 PCR

Für Sequenzierungen von Plasmid-DNS und PCR-Fragmenten wurde der „BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“ von Perkin Elmer verwendet. Dabei handelt es sich um ein PCR-Kettenabbruch-System (Sanger et al., 1977), bei dem die zum Abbruch führenden Nukleotidderivate 4 verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe tragen (Smith et al., 1986). Somit ist die Analyse einer Sequenz in einer Gelspur möglich. Zur Sequenzierung von Plasmid-DNS wurde 1 µg DNS pro Ansatz verwendet, DNS aus (RT-)PCR-Ansätzen wurde gereinigt und dann 5 µl der jeweiligen gereinigten DNS eingesetzt.

Reaktionsansatz:

DNS

3,6 pM Oligonukleotid-Primer

3,0 µl Reaktionsmix BigDye-Kit

ad 10µl Aqua bidest

Die Sequenzreaktionen wurden im 9600-PCR System von Perkin-Elmer durchgeführt. Reaktionsbedingungen: 24 Zyklen mit:

30 sec 96°C

15 sec 50°C

4 min 60°C

Kühl- und Lagerschritt auf 4°C.

Der Reaktionsansatz wurde anschließend mit 25 µl Ethanol (100%) und 1,1 µl NaAc (pH 5,4; 3 M) gemischt, vier Minuten bei RT gefällt, 20 Minuten mit 14.000 UpM zentrifugiert (Eppendorfzentrifuge), mit 150 µl Ethanol (75%) gewaschen und getrocknet. Dieses getrocknete Pellet wurde bei - 20°C gelagert bis zur gelelektrophoretischen Analyse. Hierzu wurde die Probe in 3,5 µl Probenpuffer für DNS-Sequenzgele resuspendiert, drei Minuten bei 95°C denaturiert und 1,7 µl auf das Gel aufgetragen.

2.2.7.2 Elektrophorese von Sequenzreaktionen im Harnstoff-Acrylamid-Gel

Die Sequenzreaktionen der DNS-Proben wurden mit 7 M Harnstoff-5,25%-Acrylamid-Gelen (Long Ranger, Applied Biosystems) in 1x TBE im ABI PRISM 377 DNS Sequencer mit einer Trennstrecke von 48 cm analysiert. Das System wurde nach Angaben des Herstellers installiert. Die Mischung wurde durch Nitrocellulose mit 0,2 µm Porendurchmesser filtriert und entgast, 310 µl APS (10%) und 40 µl TEMED zupipettiert und das Sequenzgel zwischen den montierten Glasplatten gegossen. Nach Auspolymerisieren des Gels erfolgte der Einbau in die Apparatur mit 1 x TBE als Elektrophorese-Puffer.

Sobald beim Vorlauf (1.000 V, 50 W, 35 mA) eine Betriebstemperatur von 51°C erreicht war, wurden die Proben aufgetragen und der Hauptlauf gestartet (1.200 V, 150 W, 50 mA). Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte automatisch (Programm: DNS Sequencing Analysis Software, Version 2. 1.1).

2.2.8 In vitro Transkription

4 µg Plasmid-DNS wurden am 3'-Ende durch einen Restriktionsenzym-schnitt, der nicht zu überhängenden Enden führt, linearisiert und mit Phenol/Chloroform extrahiert. Für die Ethanol-fällung wurde die für Nukleinsäurefällungen übliche Menge an EtOH aber 1/8 Volumen 2 M KAc, pH

5,6, statt des sonst verwendeten 1/10 Volumens 3 M NaAc zugesetzt. Die getrocknete DNS wurde in 25 μ l H₂O-DEPC aufgenommen und für die in vitro Transkription mit der SP6-RNS-Polymerase eingesetzt.

In einem Gesamtansatz von 50 μ l wurden neben der linearisierten DNS 5 μ l 10x SP6 Puffer NEB-Biolabs, 2,3 μ g BSA (DNase und RNase frei), 20 U des RNase-Inhibitors RNSguard, 20 U SP6-RNS-Polymerase und 10 μ l NTP-Mix (10mM) eingesetzt. Das restliche Volumen wurde mit DEPC-Wasser aufgefüllt.

Der Transkriptionsansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert. Da die transkribierte RNS zur Transfektion von Zellen eingesetzt wurden, erfolgte anschließend eine Aufreinigung über eine Sephadex G-50 Säule. Nach Phenol-/Chloroformextraktion und Ethanolfällung wurde die getrocknete RNS in 20 μ l H₂O-DEPC aufgenommen. Zum Test wurden 3,5 μ l in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und nach Acridinorange-Färbung die Qualität der RNS bewertet. Für die Transfektion in BHK-Zellen wurden 3 μ l der transkribierten RNS eingesetzt.

2.2.9 In vitro Translation

Die in vitro Translation wurde mit dem „TNT T7 Coupled Reticulocyte Lysate System“ gemäß den Angaben des Herstellers (Promega) durchgeführt. Ausgehend von zirkulärer Plasmid-DNS erfolgt hierbei in einem 25 μ l Reaktionsansatz sowohl die in vitro Transkription der RNS mit Hilfe der T7-RNS-Polymerase als auch die in vitro Translation. Die radioaktive Markierung der translatierten Proteine erfolgte mit ³⁵S-Methionin. Die Analyse erfolgte über SDS-PAGE.

2.2.10 Proteinanalytische Methoden

2.2.10.1 Radioimmunpräzipitation (RIP)

Die radioaktiv markierten Zellen wurden in 500 μ l 1% Triton(alt)-Puffer mit 2% SDS lysiert, 10 min bei 95°C inkubiert und danach 20 sec im Ultraschallbad behandelt. Für den Einsatz unter nicht-denaturierenden Bedingungen unterblieb der Inkubationsschritt bei 95°C. Anschließend wurde

das Antigenmaterial zunächst bei 5.000 UpM in der Eppendorffzentrifuge abzentrifugiert und der Überstand in Ultrazentrifugenröhrchen überführt. Die Pelletierung von unlöslichen Zellbestandteilen erfolgte für 60 min bei 45.000 UpM (TLA45-Rotor, TL100-Zentrifuge).

Die Überstände wurden mit dem 4fachen Volumen an 1% Triton(alt)-Puffer verdünnt und die Radioaktivität eines 5 μ l Aliquots mit 50 μ l H₂O und 2 ml Szintillationsgemisch in einem Szintillationszähler bestimmt. Zu einer Probenmenge von 10⁶ cpm wurde der erste Antikörper (5 μ l der Kaninchenserum, 5-8 μ l der mAk, die nach Herstellerangaben vorbereitet waren) zugegeben. Nach je einstündiger Inkubation bei 37°C und 4°C erfolgte die Zugabe einer Staphylococcus aureus Protein A Suspension (Kessler, 1981). Die Proben wurden danach für 30 min bei RT inkubiert und dabei alle 10 min geschüttelt. Anschließend wurden die Proben 30 min oder über Nacht bei 4°C inkubiert.

Über die Wechselwirkung zwischen dem Staphylococcus aureus Protein A und dem Fc-Teil der Antikörper kommt es zur Ausbildung von Proteinkomplexen, die durch Zentrifugation angereichert werden können. Durch Waschen werden die Bakterien-Protein-Komplexe von ungebundenem Protein und freien, markierten Aminosäuren getrennt. Dazu wurden die Präzipitate resuspendiert, mit einem Sucrose-Kissen (25%, 500 μ l) unterschichtet und pelletiert (25% Sucrose, 5 min, 4.500 UpM, Eppendorf 5410 C). Die Überstände wurden abgesaugt und die Präzipitate in 1 ml 1% Triton(neu)-Puffer resuspendiert und bei 4.000 UpM (Eppendorf 5410 C) für 4 min abzentrifugiert. Nach erneutem Waschen der Präzipitate mit 0,2% Triton-Puffer wurden die Pellets in 10 μ l einer Mischung aus 3 ml 0,2% Triton und 7 ml H₂O aufgenommen. Nach Zugabe von 40 μ l Probenpuffer mit 5% β -Mercaptoethanol wurden die Proben für 3 min auf 95°C erhitzt und 10 min bei 10.000 UpM (Eppendorf 5410 C) zentrifugiert.

Der Überstand mit den freigesetzten Proteinen wurde in ein neues Eppendorffgefäß überführt und die Radioaktivität von 5 μ l Aliquots mit einem Szintillationszähler bestimmt. Entsprechend der Radioaktivitätsmenge wurde die Menge des Probenmaterials ermittelt, die dann in einer SDS-PAGE aufgetrennt wurde.

2.2.10.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE folgte der Anleitung von Schägger & von Jagow (1987). Die Glasplatten (18 cm x 16 cm) für die Proteingele wurden mit Aceton gereinigt und nach Einlage von zwei 1,5 mm „Spacern“ in die Gießvorrichtung (SE 6015, Hoefer Sci.) eingespannt. Anschließend wurde die Trenngellösung (i. d. R. 10-12% für Jagow-Gele) im Vakuum entgast, das Gel nach APS- und TEMED-Zugabe bis ca. 3,5 cm unter den oberen Rand der Glasplatten gegossen und mit H₂O überschichtet. Das Trenngel wurde 2-24 h nach dem Gießen mit einem 4%igen Sammelgel überschichtet und ein 15- oder 10-Taschen-Kamm (SE 511-15-1,5, Hoefer Sci.) eingesetzt.

Nach 30 min wurde der Kamm aus dem polymerisierten Sammelgel entfernt, die Geltaschen mehrfach mit H₂O und Kathodenpuffer gespült und anschließend die zuvor für 3 min auf 95°C erhitzten Proben aufgetragen. Nach uberschichtung der Proben mit Kathodenpuffer wurde das Gel in die Vertikalapparatur eingespannt und 600 ml Kathodenpuffer in die obere Kammer (SE 6054, Hoefer Sci.) und 1,4 l Anodenpuffer in die untere Kammer (SE 6056) eingefüllt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei konstanter Spannung (45-55 V) über eine Dauer von 12-16 h. Als Molekulargewichtsstandards (Amersham-Buchler) dienen C¹⁴ radioaktiv markierte Proteine (N-terminale Methylierung).

2.2.10.3 Gelbehandlung und Fluorografie

Nach der Elektrophorese wurde das Gel 1 h in Fixierlösung mit Coomassie-Farbstoff und anschließend ca. 3 h in Entfärbelösung geschwenkt. Danach wurde das Gel auf Whatmann 3MM-Filterpapier im Vakuum getrocknet (Geltrockner SE 1160 (Hoefer Scientific Instruments) 2 h, 60°C). Die Exposition gegen Röntgenfilme erfolgte bei Raumtemperatur (RT) für variable Zeiträume. Die Filme wurden in einer Entwicklermaschine automatisch entwickelt und getrocknet. Alternativ zur Filmentwicklung wurde gegen eine Phospho-Imager-Platte bei RT über Nacht oder für 1,5 Tage exponiert.

2.2.11 Herstellung von Konstrukten für die Expression von E^{rms}

2.2.11.1 Affinity® Protein Expression and Purification System (Stratagene)

Aus dem Vektor pCal-n-Ek wurde mittels PCR die für das Calmodulin-bindende Peptid (CBP) kodierende Sequenz amplifiziert und dabei am 5'-Ende mit einer BamHI- und am 3'-Ende mit einer NotI-Schnittstelle versehen. Dafür wurden die Primer CAL5-BAMH und CAL3-NOT eingesetzt. Die DNS Sequenz des Vektors, die für ein Enterokinase(Ek) Spaltsignal kodiert, wurde mittels PCR an das 5'-Ende der E^{rms} kodierenden Sequenz des CSFV fusioniert. Weiterhin wurde eine NotI-Schnittstelle am 5'- sowie eine XbaI-Schnittstelle am 3'-Ende eingefügt. Hierfür wurden die Primer E05-BNE und E03-MX eingesetzt. Die kodierende Sequenz für die E^{rms} -Signalsequenz (SSeq) wurde ebenfalls mittels PCR amplifiziert und eine NcoI- und BamHI-Schnittstelle am 5'- bzw. 3'-Ende eingeführt. Hierfür wurde das Primerpaar E05SII und SS3-BAMH verwendet. Zum Einsatz kamen die für E^{rms} -Wildtyp kodierende Sequenz aus CSFV Alfort/ Tübingen und Sequenzen von zwei RNase-negativen Mutanten: E^{rms} -H346Δ und E^{rms} -H297K.

Konstrukt	Bestandteile
K11	E^{rms} -SSeq und pCal-n-Ek CBP
K12	E^{rms} -SSeq-CBP und Ek- E^{rms} -WT
K13	E^{rms} -SSeq-CBP und Ek- E^{rms} -H346Δ
K14	E^{rms} -SSeq-CBP und Ek- E^{rms} -H297K
K15	E^{rms} -SSeq-CBP-Ek- E^{rms} -WT und pCITE 2a
K16	E^{rms} -SSeq-CBP-Ek- E^{rms} -H346Δ und pCITE 2a
K17	E^{rms} -SSeq-CBP-Ek- E^{rms} -H297K und pCITE 2a

Tabelle 2.1: Konstrukte Affinity

CBP = DNS-Sequenz die für Calmodulin bindendes Peptid kodiert, Ek = DNS-Sequenz die für die Enterokinaspalstelle kodiert, E^{rms} -H346Δ = DNS-Sequenz die für E^{rms} -H346Δ kodiert, E^{rms} -H297K = DNS-Sequenz die für E^{rms} -H297K, E^{rms} -WT = DNS-Sequenz die für E^{rms} -WT, SSeq = DNS-Sequenz die für Signalsequenz kodiert

Die verschiedenen PCR-Produkte wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen gespalten und in folgenden Schritten miteinander ligiert: die DNS der Signalsequenz mit der des Calmodulin-bindenden Peptids zu dem Konstrukt K11. Die verschiedenen E^{ms}-kodierenden Sequenzen jeweils mit dem Konstrukt K11 zu den Konstrukten K12 - K14. Diese DNS wiederum wurde in den mit NcoI und XbaI linearisierten Vektor pCITE-2a ligiert, resultierend in den Konstrukten K15 - K16.

Zur Aufreinigung von Proteinen mit CBP wurden 100 µl Calmodulin Resin in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben, der Überstand nach 2 min Zentrifugieren bei 1.000 UpM abgenommen. Das Calmodulin Resin wurde vier mal mit je 400 µl Bindungspuffer gewaschen. 400 µl Überstand einer Probe, die analog der unter Radioimmunpräzipitation (2.2.10.1) beschriebenen Methode durch beschallen und Ultrazentrifugation erhalten worden war, wurde zu dem Calmodulin Resin gegeben und gemischt. Dann folgte eine Inkubation für 2 Stunden bei 4°C.

Nach der Inkubation wurde fünf mal mit je 600 µl Bindungspuffer gewaschen. Im Anschluß daran wurde vier mal mit jeweils 400 µl Elutionspuffer gewaschen und die jeweiligen Überstände als Ü1 - Ü4 in neue Reaktionsgefäße überführt. Zuletzt wurde das Calmodulin Resin mit 200 µl Laemmli-Puffer 5 min bei 95°C erhitzt. Der Proteingehalt der jeweiligen Fraktionen wurde später durch PAGE in einem 10%igen Jagow-Gel untersucht.

Ein Beispiel für den Aufbau der Konstrukte am Bild des K15:

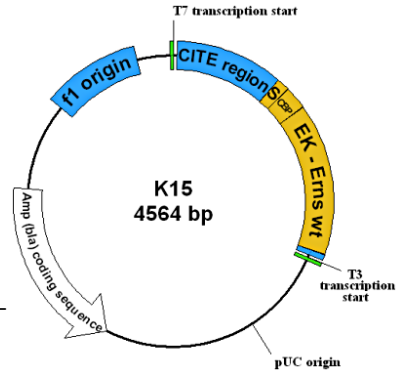


Abbildung 2.1: Konstrukt K15

S - Signalsequenz, *CBP* - Calmodulin bindendes Peptid, *Ek* - Enterokinase-Spaltstelle

2.2.11.2 Impact™-Protein Purification System (NEB)

Zur Herstellung der Expressionskonstrukte wurde die DNS-Sequenz des E^{rms} mit den Primern HCV-E0-XbaI und HCV-E0-SapI amplifiziert. Zum Einsatz kamen die Sequenz des E^{rms} -Wildtyp aus CSFV Alfort/ Tübingen und von zwei RNase-negativen Mutanten: E^{rms} -H346 Δ und E^{rms} -H297K. Die resultierenden Produkte wurden mit SapI geschnitten, der 5'-Überhang mittels Klenow-Fragment zu einem glatten Ende aufgefüllt. Die Reaktion wurde durch Phenolextraktion beendet und durch Ethanolfällung gereinigt und gefällt. Anschließend wurde die DNS mit XbaI geschnitten.

Ein Beispiel für den Aufbau der Konstrukte am Bild des K2:

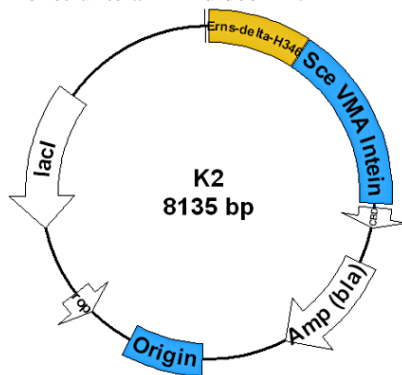


Abbildung 2.2: Konstrukt K2

Der Vektor pTYB4 wurde mit SmaI und XbaI geschnitten, im präparativen Agarosegel aufgetrennt, die erwünschte Bande ausgeschnitten und die DNS eluiert. pTYB4 und die jeweiligen E^{rms} -DNS-Sequenzen wurden ligiert. Daraus entstanden die Konstrukte K2 - K4.

Konstrukt	Bestandteile
K2	E^{rms} -H346 Δ und pTYB4
K3	E^{rms} -H297K und pTYB4
K4	E^{rms} -WT und pTYB4

Tabelle 2.2: Konstrukte Impact™

E^{rms} -H346 Δ = DNS-Sequenz die für E^{rms} -H346 Δ kodiert, E^{rms} -H297K = DNS-Sequenz die für E^{rms} -H297K kodiert, E^{rms} -WT = DNS-Sequenz die für E^{rms} -WT kodiert, pTYB4 = Vektorsequenz

Die Konstrukte K2 - K4 wurden mit den Restriktionsendonukleasen BlnI und XbaI behandelt. Die entstandenen DNS-Stücke wurden im präparativen Agarosegel aufgetrennt. Die Bande, die der DNS-Sequenz des E^{rms} - Sce VMA Intein - Chitin bindende Domäne entsprach (ca. 2400 kB) wurde ausgeschnitten und die DNS eluiert. Die so erhaltene DNS wurde zuerst mit dem Klenow-Fragment der E. coli DNS-Polymerase und dann mit XbaI behandelt. Der Vektor pSinRep5 wurde mit StuI und XbaI linearisiert und mit der E^{rms} - Sce VMA Intein - Chitin bindende Domäne - DNS zu den Konstrukten K8, K9 und K10 ligiert.

Konstrukt	Bestandteile
K8	E^{rms} -H346Δ Intein, CBD und pSinRep5
K9	E^{rms} -H297K, Intein, CBD und pSinRep5
K10	E^{rms} -WT, Intein, CBD und pSinRep5

Tabelle 2.3: Konstrukte Impact™ 2

E^{rms} -H346Δ = DNS-Sequenz die für E^{rms} -H346Δ kodiert, E^{rms} -H297K = DNS-Sequenz die für E^{rms} -H297K kodiert, E^{rms} -WT = DNS-Sequenz die für E^{rms} -WT kodiert, Intein = DNS-Sequenz die für Sce VMA Intein aus Vektor pTYB4 kodiert, CBD = DNS-Sequenz die für Chitin bindende Domäne aus Vektor pTYB4 kodiert, pSinRep5 = Vektorsequenz

Für die Funktionskontrolle der Chitin-Bindung und Trennung der Proteine vom Chitin wurde nach einem modifizierten Protokoll auf Basis des Herstellerprotokolls wie folgt verfahren:

Die Proteine wurden mittels Vaccinia-Virus-T7-Expression exprimiert. Als erster Schritt der Reinigung wurde eine Aufarbeitung analog der Probenvorbereitung für eine RIP durchgeführt (siehe 2.2.10.1). 100 μ l des Überstandes wurden für eine RIP verwendet.

300 μ l Chitin Beads wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gefüllt und bei 12.000 UpM für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Chitin Kügelchen dreimal mit je 1 ml Säulenpuffer gewaschen.

Die restlichen 400 μ l des Überstandes aus dem ersten Schritt wurden zusammen mit 440 μ l Säulenpuffer zu den Chitin Kügelchen gegeben und bei Raumtemperatur für 1 h leicht geschüttelt. Im Anschluß wurde der

Ansatz wieder bei 12.000 UpM für 1 min zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß als Ü1 überführt.

Die Kügelchen wurden zweimal mit je 1 ml Spaltungspuffer gewaschen und schließlich mit 1 ml Spaltungspuffer resuspendiert. Diese Suspension wurde bei 4°C über Nacht stehen gelassen. Nach erneutem Zentrifugieren am nächsten Tag wurde der Überstand als Ü2 in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Kügelchen wurden erneut mit 1 ml Spaltungspuffer resuspendiert und ca. 8 h bei RT leicht geschüttelt, zentrifugiert und der Überstand als Ü3 in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zuletzt wurden die Chitin Kügelchen mit 450 µl Laemmli-Puffer 5 min gekocht und der daraus resultierende Überstand auch in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

2.2.11.3 Sindbis-Expressionssystem

Zum Aufbau der rekombinanten Sindbis-Virus cDNS Konstrukte wurde der Vektor pSinRep5 mit StuI und XbaI linearisiert.

Die DNS-Sequenz des E^{ms} wurde mit den Primern HCV-E0-XbaI und HCV-E0-SapI amplifiziert. Zum Einsatz kamen die Sequenzen des E^{ms}-Wildtyp aus CSFV Alfort/ Tübingen und von zwei RNase-negativen Mutanten: E^{ms}-H346Δ und E^{ms}-H297K. Die resultierenden Produkte wurden mit SapI behandelt, der 5'-Überhang mittels Klenow-Fragment zu einem glatten Ende aufgefüllt. Die DNS wurde durch Phenolextraktion und Ethanol-fällung gereinigt und gefällt. Anschließend wurde sie mit XbaI geschnitten.

pSinRep5 und die jeweilige CSFV cDNS wurde zu den Konstrukten K18, K19 und K20 ligiert.

2.2.12 Tierexperimentelle Methoden

2.2.12.1 Infektion

Schweine wurden, wenn nicht anders beschrieben, mit ca. 2×10^5 KID₅₀ infiziert. Dazu wurden 1/3 der Dosis intramuskulär (i.m.) in der Musku-

Konstrukt	Bestandteile
K18	E^{rms} -wt und pSinRep5
K19	E^{rms} -H346 Δ und pSinRep5
K20	E^{rms} -H297K und pSinRep5

Tabelle 2.4: Konstrukte Sindbis

E^{rms} -wt = DNS-Sequenz die für E^{rms} -wt kodiert, E^{rms} -H346 Δ = DNS-Sequenz die für E^{rms} -H346 Δ kodiert, E^{rms} -H297K = DNS-Sequenz die für E^{rms} -H297K kodiert, pSinRep5 = Vektorsequenz

latur des Ohrgrundes und je 1/3 der Dosis je Nasenloch intranasal (i.n.) appliziert.

2.2.12.2 Erhebung klinischer Parameter

Körpertemperatur, Nasenausfluß, Futter- und Wasseraufnahme, Kot- und Harnabsatz, Verhalten und Aussehen wurden ab 5 - 3 Tage vor Infektion bis mindestens 14 Tage nach Infektion täglich gemessen bzw. beobachtet. Die Körpertemperatur wurde während der Fütterung rektal erfaßt.

2.2.12.3 Nasentupfer

Zur Entnahme von Nasentupfern wurde die Watte von sterilen Vaginaltupfern auf herkömmliche Wattestäbchen gewickelt und diese erneut sterilisiert. Die Tupfer wurden unmittelbar nach der Entnahme mit 1 ml Kulturmedium (ohne FCS) für 15 min ausgeschüttelt und die erhaltene Suspension bei 4°C für 5 min mit 1.500 g (Heraeus Minifuge) zentrifugiert. Nach Filtration durch 0,2 μM Einmalsterilfilter konnte das Filtrat direkt zum Virusnachweis auf SK6 Zellen eingesetzt werden.

2.2.12.4 Blutproben

Blutproben beim Schwein wurden zu vorgegebenen Zeitpunkten, i.d.R. an Tag 0 post infectionem (pi), 3, 5, 7, 10, usw. bis zum Schlachttag, unter sterilen Bedingungen aus der Vena jugularis externa gewonnen. Wurde

versehentlich die Arteria jugularis getroffen, wurde stattdessen dieses Blut verwendet.

Für die Serumgewinnung wurde das Blut unmittelbar nach der Entnahme zur Gerinnung in 15 ml Glasröhrchen überführt. Nach der Gerinnung des Bluts (1h bei 37°C) wurden die Glasröhrchen zentrifugiert (6.000 UpM, 4°C, 10 min, Heraeus Minifuge). Der Überstand wurde abgenommen, in 2 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -70°C gelagert.

Für die Gewinnung von „buffy coat“ wurden die Spritzen vor der Blutentnahme mit 1 ml Heparinlösung (356 IU Heparin/ ml in PBS) gefüllt.

2.2.12.5 Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl

Aus heparinisiertem Vollblut wurde mit dem Coulter Analysator oder im Zählkammervorgahren mit Neubauer-Zählkammer die Gesamtleukozytenzahl ermittelt. Die angegebenen Werte entstanden beim Einsatz der Zählkammer durch Mittelung der Ergebnisse zweier Einzelbestimmungen. Bei einer Differenz der beiden Werte um mehr als 10% wurde die Bestimmung wiederholt.

2.2.12.6 „buffy coat“ Gewinnung

Heparinisiertes Vollblut wurde für 15 min bei RT mit 1.800 UpM in einer Heraeus Minifuge zentrifugiert und das Plasma abgenommen. Zur Lyse der Erythrozyten wurde das Restblut mit 4 ml Lysispuffer vermischt und für 5 - 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurde das Gemisch bei 4°C mit 1.800 UpM (Heraeus Minifuge) für 5 min zentrifugiert. Dieser Lysisschritt wurde 1 - 2 mal wiederholt. Anschließend wurde das Zellpellet 2 mal in 5 ml kaltem PBS-A gewaschen. Die Zellzahl des „buffy coat“ (BC) wurde mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt und auf 10^7 Zellen pro ml eingestellt.

2.2.12.7 Serumneutralisationstest (SNT)

Das Serum wurde für 30 min bei 56°C inaktiviert. In 96-Loch Platten wurde, außer in der ersten Reihe, 50 µl Medium pro Loch vorgelegt. In die er-

ste Reihe wurden 100 μl Serum pipettiert, je drei Ansätze für jede Probe. 50 μl davon wurden in die nächste Reihe überführt. Die Pipettenspitzen wurden gewechselt, das Serum-Medium-Gemisch vermischt und wieder 50 μl in die nächste Reihe übertragen. Dies wurde fortgesetzt bis zur letzten Reihe. So entstand eine Verdünnungsreihe in 2er Schritten. Bis zur Zugabe des Virus wurden die Platten auf Eis gelagert. Es wurden ca. 100 KID₅₀ des Testvirus in 50 μl Medium pro Loch zugegeben. Für Schweineseren wurde CSFV Alfort/ Tübingen, für Rinderseren NY93c (BVDV-2) oder KE9 (BVDV-1) verwendet. Die Proben wurden für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurden bei Schweineseren 2×10^4 SK6 Zellen und bei Rinderseren $1,75 \times 10^4$ MDBK-B2 Zellen in 100 μl Medium pro Loch zugegeben und für 5 Tage bei 37°C inkubiert. Zur Kontrolle, ob die Virusverdünnung korrekt war, wurde parallel eine Virustitration der verwendeten Verdünnung durchgeführt.

Die Auswertung erfolgte mittels indirekter Immunfluoreszenz (siehe 2.2.1.3).

Zum Nachweis von Antikörpern gegen Tollwutvirus wurde wie folgt vorgegangen:

Die Seren wurden nicht inaktiviert, die Verdünnungsschritte erfolgten als 5er Reihe (50 μl Serum wurden mit 200 μl Medium gemischt, davon 50 μl überführt, usw.). Die Proben wurden in die Vertiefungen einer 96-Loch Platte gegeben, in der ersten Zeile (A) der Platte wurde eine serumfreie Kontrolle angelegt. Tollwutvirus wurde so eingestellt, daß bei Zugabe von 50 μl Virusverdünnung nach 24 Stunden ca 40 - 50% der Zellen deutliche Fluoreszenz zeigten. In jede Vertiefung wurden 50 μl des Tollwutvirus gegeben. Die Platte wurde für 90 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 100 μl Zellsuspension (10^6 Zellen/ ml) pro Vertiefung zugegeben und die Platte für 24 Stunden bei 37°C inkubiert.

Danach wurde die Platte mit PBS gespült, mit kaltem 80% Aceton fixiert (30 min, 4°C) und getrocknet. Zum Färben wurde 1 Tropfen Tollwut-Konjugat/ Vertiefung zugegeben, 30 min bei 37°C inkubiert, noch dreimal gewaschen und die Proben dann unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Der Titer wurde als 1:x und in Internationalen Einheiten (IU, international unit) angegeben.

2.2.12.8 FACS-Analyse von Blutproben

Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) oder flow cytometry ist eine gute Möglichkeit, Zellgemische im Hinblick auf ihre Zusammensetzung zu analysieren bzw. einzelne Zellspezies aus solchen Gemischen zu isolieren. Einzelne Zellen werden dazu in einem Flüssigkeitsstrom so durch das Gerät geleitet, daß statistisch gesehen nur Einzelzellen den Analyse-raum im Analysezeitintervall passieren. Die Zellen werden im Analyse-raum durch einen oder mehrere Laserstrahlen geleitet. Dadurch kommt es zu einer Streuung des Lichts. Zudem werden Fluoreszenzfarbstoffe, mit denen Zellen spezifisch markiert werden, angeregt. Photomultiplier tubes wandeln das Streulicht, bzw. das emittierte Fluoreszenzlicht in elektrische Signale um und ermöglichen so die Sammlung und Auswertung der Daten, z.B. Gesamtzellzahl, Zahl der spezifisch markierten Zellen, Größe der Zellen, u.a.

Im Zusammenhang mit den Tierversuchen wurden zwei Arten der FACS Analyse durchgeführt.

Zum einen wurden die prozentualen Anteile einzelner Zellspezies an den Zellen des peripheren Blutes bestimmt. Dazu erfolgte die Markierung von Oberflächen-Antigenen mit spezifischen Antikörpern zur Erkennung und Zählung der B-Zellen. Dazu wurden je 50 µl CD21- und SWC3-Antikörper in 1:5 bzw. 1:400 Gebrauchsverdünnung in FACS-Röhrchen vorgelegt. Es wurden 100 - 200 µl heparinisiertes Vollblut zugegeben und für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Dann wurden die Zellen mit 100 µl NOVALyse (Dianova, Hamburg) fixiert. Zur Erythrozytenlyse wurden 2 ml H₂O zugegeben, das ganze gemischt und wieder 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden für 5 min bei 1.800 UpM (Heraeus Minifuge) und 4°C pelletiert. Danach wurden je 50 µl der zweiten Antikörper in Gebrauchsverdünnung (IgG₁-PE- 1:100 und IgG_{2b} ALEXA 488-Antikörper 1:50) zugegeben und wieder für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden im Anschluß erneut pelletiert und zweimal mit je 2 ml PBS-A gewaschen. Abschließend wurde das Zellpellet in 200 µl PBS-A aufgenommen, die Röhrchen mit Alufolie abgedeckt und bis zur Messung im Kühlschrank aufbewahrt.

Als zweites wurden intrazelluläre virale Antigene zum Nachweis der

CSFV Infektion detektiert. Dazu wurden die Zellen aus 100 - 200 μ l heparinisiertem Vollblut mit 100 μ l NOVALyse (Dianova, Hamburg) fixiert (15 min, RT, dunkel) und mit 2 ml H₂O die Erythrozyten lysiert (15 min, RT, dunkel). Die Zellen wurden pelletiert (5 min, 4°C, 1.800 UpM, Heraeus Minifuge) und in 100 μ l 0,0025% Digitoninlösung aufgenommen. Nach 5 min bei RT wurde das Gemisch mit 2 ml PBS-A aufgefüllt und die Zellen erneut pelletiert. Das Pellet wurde mit 50 μ l mAk a18 (1:10 vorverdünnt in PBS-A) aufgenommen und bei RT für 20 min inkubiert. Danach wurde erneut wie oben pelletiert, zweimal mit je 2 ml PBS-A gewaschen und das Pellet in 50 μ l des vorverdünnten (1:100 vorverdünnt in PBS-A) IgG_{2a}-PE gelöst. Die Inkubation erfolgte wie beim ersten Antikörper (RT, 20 min). Die Zellen wurden wieder pelletiert, zweimal mit je 2 ml PBS-A gewaschen, in 200 μ l FACS-Puffer aufgenommen, die FACS Röhrchen mit Alufolie abgedeckt und bis zur Messung im Kühlschrank aufbewahrt.

Die FACS-Messungen wurden üblicherweise von Dr. Armin Saalmüller durchgeführt. Die Vorgehensweise war wie von Parks et al [81] und Alberti et al [1] beschrieben.

2.2.12.9 Fötale Organproben

Organproben wurden nur in Versuchen mit trächtigen Tieren analysiert.

Folgende fötale Organproben wurden steril entnommen: Bauch- und Abdominalhöhlenflüssigkeit (wenn vorhanden), Milz, Niere, Jejunum, mesenteriale Lymphknoten, Thymus, sternales Knochenmark, Kleinhirn und Plazenta. Wurde kein Fötus gefunden, wurde eine Probe des Uterus entnommen. Die Proben wurden bei -70°C gelagert.

Aufbereitung der Proben erfolgte entweder mit Mörsern oder mit dem Ultra-Turrax.

Im ersten Fall wurde das gefrorene Gewebe zusammen mit sterilem Sand zermörsert, in 2 ml kaltem PBS-A suspendiert, die Suspension in Röhrchen überführt und der Mörser erneut mit 2 ml PBS-A gespült. Die Organ-Sand Suspension wurde zentrifugiert (2.000 - 4.000 UpM, 4°C, 10 min), der Überstand zuerst durch ein 0,45 μ M und dann durch ein 0,2 μ M Sterilfilter passiert. Das Filtrat wurde bei -70°C gelagert.

Mit dem Ultra-Turrax wurden die Proben als Sammelprobe aller Organe

eines Fötus in 50 ml Blue Caps zerkleinert und mit 10 ml kaltem PBS-A vermischt. Die Organsuspension wurde zentrifugiert (6.000 UpM, 4°C, 10 min, Heraeus Minifuge), in 14 ml Röhrchen aliquotiert und bei -70°C gelagert. Die Stäbe des Ultra Turrax wurden zwischen den verschiedenen Proben in Desinfektionsmittel (Mikrozid) laufen gelassen, für 5 min im Desinfektionsmittel getaucht, luftgetrocknet und in destiliertem Wasser gespült. Zwischen den Proben von Tieren verschiedener Gruppen wurden sie autoklaviert. Vor dem Animpfen auf Zellen wurden 2 ml des Homogenats abgenommen, bei 4°C mit 14.000 UpM (Eppendorf Centrifuge 5402) zentrifugiert und die Animpfung mit dem Überstand durchgeführt.

2.2.12.10 Virusnachweis

Für den Virusnachweis im Blut bzw. Organmaterial infizierter Tiere wurden 24-Loch Zellkulturplatten so mit Zellen eingesät, daß sie am Arbeitstag zu ca. 70 - 80% dicht waren. Für den Nachweis von BVDV wurden MDBK-B2 Zellen, für den Nachweis von CSFV SK6 Zellen verwendet. Es wurden 10⁶ „buffy coat“ Zellen, 100 µl Organhomogenat oder 100 µl Nasentupferfiltrat im Doppelansatz angeimpft. Die Platten wurden für 5 Tage bei 37°C inkubiert, dann dreimal gefroren und getaut und 100 µl der Ansätze auf frische Zellen überführt. Diese wurden wiederum 5 Tage inkubiert und dann mit IF analysiert.

3 Ergebnisse

3.1 CSFV

3.1.1 Tierexperimentelle Arbeiten zum CSFV E^{rns}

3.1.1.1 Studien zur RNase Funktion

Alle bisher in unserem Labor hergestellten und getesteten RNase[⊖]-Mutanten des CSFV waren in vitro und in vitro genetisch stabil. Sie variierten nur im Ausmaß der Attenuierung, wobei sich 2 Typen unterscheiden ließen. Wurde das Histidin an Position 297 verändert, kam es zu einer deutlichen Attenuierung. Nach Mutation bzw. Deletion des Histidin an Position 346 trat vollständige Attenuierung auf.

In den nachfolgend beschriebenen Versuchen wurde mit CSFV 255/1 eine weitere RNase[⊖]-Mutante mit Austausch des Tryptophan an Position 300 gegen ein Glycin in vitro und in vivo untersucht. In zuvor von Martina von Freyburg durchgeführten Versuchen wurde in der Zellkultur auf SK6-Zellen kein Unterschied der Wachstumseigenschaften im Vergleich zum RNase[⊕]-Wildtyp festgestellt.

Es wurden vier Tierversuche mit CSFV 255/1 durchgeführt. In den ersten beiden Versuchen, durchgeführt von Martina von Freyburg, zeigte sich, daß diese Mutante nur teilweise attenuiert ist. Die Tiere hatten transient Fieber bis 41°C und eine verminderte Futteraufnahme (FA). Eine Virämie ließ sich über drei Tage nachweisen. Leukopenie trat transient über drei bis vier Tage auf. Es kam zu einer deutlichen Ausbildung von neutralisierenden Antikörpern (nAk). Diese Ergebnisse waren vergleichbar zu denen, die mit Viren erhalten worden waren, die eine Mutation an Position 297 aufwiesen (H297L oder H297K). Überraschend war dann aber der Befund, daß reisoliertes Virus sich im Enzymtest als RNase[⊕] erwies. Durch Analyse der E^{rns}-Sequenz der reisolierten Viren konnte bestätigt werden, daß das Virus revertiert war. Sowohl phänotypische als auch ge-

notypische Analysen deuteten darauf hin, daß eine vollständige Reversion zum Wildtyp erfolgt war.

Zur weiteren Untersuchung dieser Ergebnisse wurden zwei weitere Tierversuche, TV16a und TV19, durchgeführt.

3.1.1.1.1 TV 16a Vier Ferkel wurden mit 2×10^5 KID₅₀ CSFV 255/1 in 6 ml Medium infiziert. 2 ml wurden i.m., 4 ml intranasal (je 2 ml pro Nasenloch) appliziert.

Klinisch wiesen die Tiere ein heterogenes Bild auf. Die Tiere 46/3 und 46/4 waren an Tag 10 p.i. abgeschlagen und ansonsten über den gesamten Beobachtungszeitraum ohne Auffälligkeiten.

Tier 46/1 war an den Tagen 10, 12, 14, 15, 17 und 18 p.i. abgeschlagen oder hatte ein deutlich schlechtes Allgemeinbefinden (AB) und schlechte FA. An Tag 17 p.i. hatte es blutige Fäces.

Tier 46/2 hatte von Tag 9 p.i. bis Tag 14 p.i. ein schlechtes AB mit deutlich verminderter FA. An Tag 11 trat zusätzlich noch Diarrhoe auf, an Tag 18 p.i. fand keine FA statt. Sowohl Tier 46/1 als auch Tier 46/2 wurden an Tag 18 p.i. aufgrund des schlechten Allgemeinzustandes geschlachtet.

Die Tiere hatten von Tag 6 p.i. an Fieber mit Temperaturen bis über 41°C. Bis auf Tier 46/2 fiel die Temperatur zwischen Tag 9 und 11 p.i. wieder ab. An den Tagen 16 und 17 war dann ein zweiter Fieberanstieg zu beobachten. Bei Tier 46/2 stieg die Temperatur an Tag 11 auf über 41,5°C an, fiel bis Tag 15 auf unter 40°C um dann erneut über 41°C zu steigen (Abbildung 3.1).

Tiere 46/1 und 46/2 zeigten zwischen Tag 5 und 10 p.i. einen deutlichen Abfall der Leukocytenzahl, die bis Tag 12 wieder leicht zu steigen begann. Bei Tier 46/1 brach die Leukozytenzahl an Tag 18 p.i. wieder deutlich ein, bei Tier 46/2 bereits an Tag 14 p.i. Tier 46/3 bewegte sich bis Tag 9 p.i. auf dem Niveau der Nullkontrolle, um dann einen deutlichen Anstieg der Leukozyten zu erfahren. Bei Tier 46/4 fielen die Leukozyten auf unter 10 G/l an Tag 7 p.i. ab, um sich danach deutlich zu erholen (Abbildung 3.2).

Die B-Zellen fielen bei den Tieren 46/1 und 46/2 von Tag 0 bis Tag 17 p.i. stetig ab, um am Tag ihrer Schlachtung wieder drastisch anzusteigen. Die B-Zellen der Tiere 46/3 und 46/4 fielen erst ab Tag 3 p.i. ab, erreichten

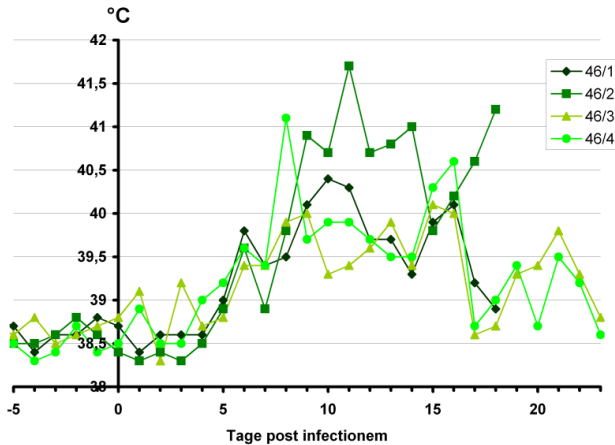


Abbildung 3.1: TV 16a: Körperkerntemperatur der Tiere in °C

an Tag 8 p.i. ihr Minimum, und stiegen dann wieder auf ihr Ausgangsniveau an (Abbildung 3.3).

Zur Untersuchung, ob und wann revertiertes Virus im Blut bzw. im Nasensekret der Tiere nachweisbar war, wurde der Virusnachweis aus Abstrichen der Nasenschleimhaut und aus buffy coat Zellen durchgeführt. In den buffy coat Zellen konnte bei allen Tieren an Tag 7 p.i. CSFV nachgewiesen werden. Die kürzeste Virämie-Phase hatte Tier 46/4 (drei Tage von Tag 5 bis Tag 7 p.i.). Tier 46/3 hatte von Tag 5 bis 12 p.i. (8 Tage) und Tier 46/2 von Tag 7 bis zu seinem Schlachttag (10 Tage) Virämie. Tier 46/1 hatte mit 13 Tagen, von Tag 7 bis zu seiner Schlachtung an Tag 18 p.i., die längste Virämiephase.

Aus den Nasenabstrichen ließ sich nur bei drei Tieren CSFV nachweisen: für Tier 46/3 blieben die Abstriche über den gesamten Versuchszeitraum negativ. Tier 46/1 schied von Tag 7 bis 14 p.i., Tier 46/2 von Tag 7 bis 17 p.i. und Tier 46/4 an Tag 17 p.i. CSFV über die Nase aus.

Aus früh und spät CSFV-positiven buffy coat- und Nasenabstrichproben von jedem Tier reisoliertem Virus wurde RNS isoliert, mittels RT-PCR in

3 Ergebnisse

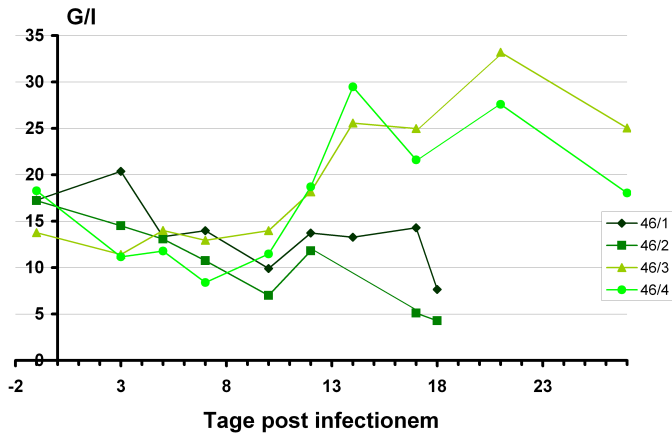


Abbildung 3.2: TV 16a: Leukozytenzahl der Tiere in G/l

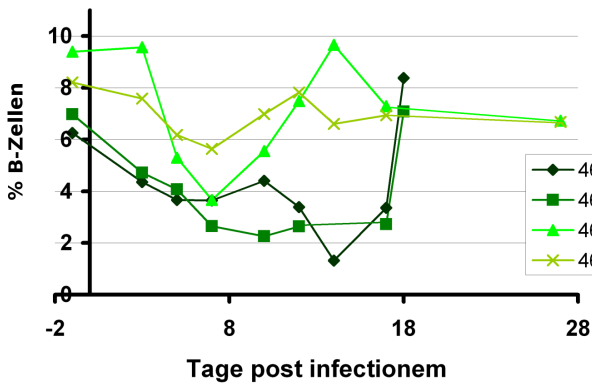


Abbildung 3.3: TV 16a: B-Zellen der Tiere in % der Gesamtleukozytenzahl

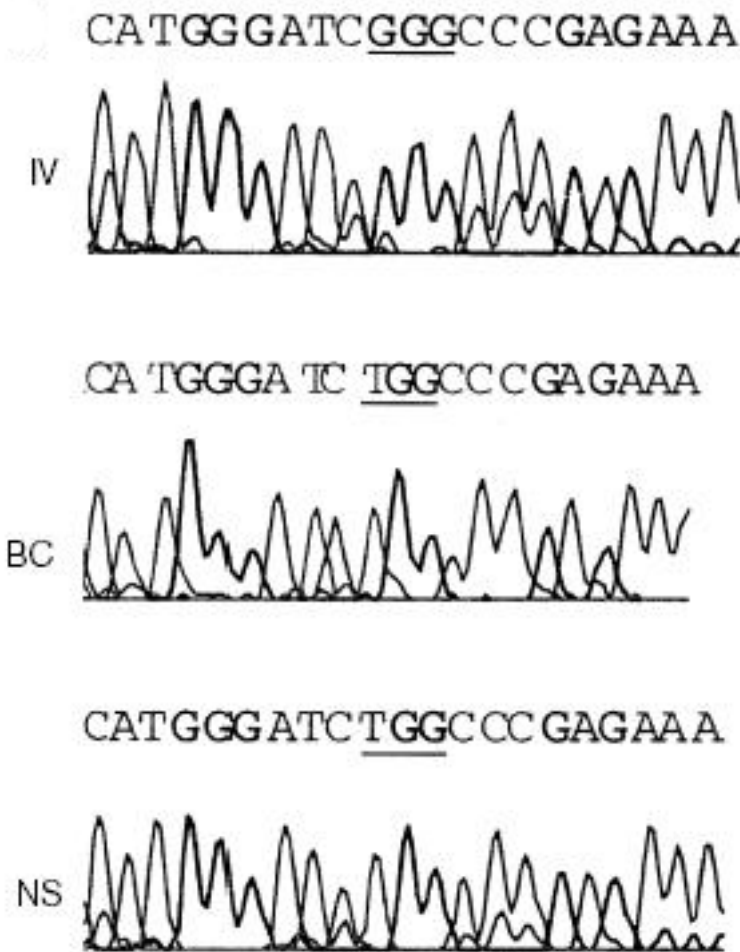


Abbildung 3.4: Sequenzvergleich E^{ns} TV 16a, reisoliertes Virus von Tier 46/1
 IV - Infektionsvirus; BC - aus buffy coat isoliertes Virus an Tag 5 p.i.; NS - aus
 Nasenabstrich isoliertes Virus an Tag 10 p.i.; Codon 300 ist unterstrichen

3 Ergebnisse

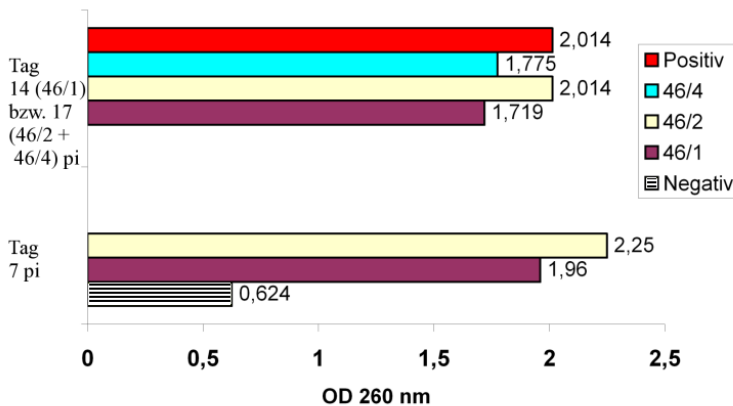


Abbildung 3.5: RNase-Test von Viren isoliert aus Nasentupfern von Tieren aus TV 16a
 Lichtabsorption bei 260 nm Wellenlänge, gemessen wird die Bildung säurelöslicher niedermolekularer RNS aus dem Substrat Poly(U).
 Negativ - Negativkontrolle; Positiv - Positivkontrolle; 46/1 - Probe von Tier 46/1, Tag 7 und 14 p.i.; 46/2 - Probe von Tier 46/2, Tag 7 und 17 p.i.; 46/4 - Probe von Tier 46/4, Tag 17 p.i.

DNS umgeschrieben und amplifiziert. Es wurde das Primerpaar E05SII und E0Stop eingesetzt, um den Sequenzbereich des E^{rns} vollständig abzudecken. Im Anschluß daran wurde die amplifizierte cDNS mit den selben Primern sequenziert. In allen Fällen konnte nur die Sequenz von Wildtyp E^{rns} nachgewiesen werden (Beispiel in Abbildung 3.4).

Eine phänotypische Untersuchung auf RNase-Aktivität wurde durchgeführt. Dazu wurden reisolierte Viren aus den buffy coat- und Nasenabstrichproben von jedem Tier auf SK6-Zellen in 3,5 cm Zellkulturschalen überimpft und nach 48 Stunden Inkubation ein RNase-Test durchgeführt. Mit Ausnahme einer Probe (BC von Tier 46/2, 7 p.i.), die unter der Negativkontrolle lag, waren alle Proben RNase-positiv (Abbildungen 3.5 und 3.6).

Alle Tiere entwickelten neutralisierende Antikörper gegen CSFV. Der

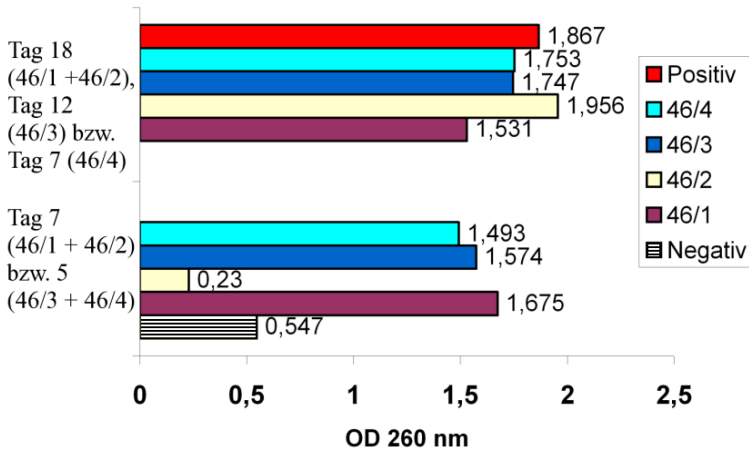


Abbildung 3.6: RNase-Test von Viren isoliert aus buffy coat Zellen von Tieren aus TV 16a. Lichtabsorption bei 260 nm Wellenlänge, gemessen wird die Bildung säurelöslicher niedermolekularer RNS aus dem Substrat Poly(U).
 Negativ - Negativkontrolle; Positiv - Positivkontrolle; 46/1 - Probe von Tier 46/1, Tag 7 und 18 p.i.; 46/2 - Probe von Tier 46/2, Tag 7 und 18 p.i.; 46/3 - Probe von Tier 46/3, Tag 5 und 12 p.i.; 46/4 - Probe von Tier 46/4, Tag 5 und 7 p.i.

Titer lag an Tag 18 p.i., dem Tag, an dem die ersten beiden Tiere geschlachtet wurden, zwischen 1:100 und 1:1000 (Daten nicht gezeigt).

Dieser Versuch bestätigte im Wesentlichen die Ergebnisse des vorherigen, von Martina von Freiburg durchgeführten Experiments. Allerdings war der Krankheitsverlauf in TV 16a stark heterogen. Zwei Tiere erkrankten schwer und mußten vor Ende des Versuchs euthanasiert werden. Die anderen beiden Tiere erkrankten weniger stark und erholten sich zum Ende des Versuchs hin wieder. Sowohl systemisch (aus Blutleukozyten) als auch lokal (aus Abstrichen der Nasenschleimhaut) ließ sich nur Virus reisolieren, das zum Wildtyp revertiert war.

3.1.1.1.2 Zellkultur In den Tierversuchen hatte die CSFV-Mutante - 255/1 früh nach Infektion eine vollständige Reversion gezeigt, während die Mutation bei Passagen in SK6 Zellen stabil blieb. Um festzustellen, ob sich die CSFV-Mutante in verschiedenen Zelllinien ebenso stabil verhält wie in SK6-Zellen, wurden parallel zu den Tierexperimenten Versuche mit Passagen der Mutante in verschiedenen Zelllinien in Kultur durchgeführt.

CSFV 255/1 wurde in SK6-, 38A1D-, STE- und MAX-Zellen mehrfach passagiert. In SK6 Zellen konnte nach mehr als 16 Passagen keine Sequenzveränderung beobachtet werden, ebenso in 38A1D Zellen nach 8 Passagen. In STE und MAX Zellen hingegen wurden erste Zeichen einer Reversion in einem RNase Test nach der 6. Passage entdeckt. Hinweise auf eine vollständige Reversion wurden nach der 8. Passage beobachtet (Abbildung 3.7). Diese Hinweise wurden durch RT-PCR und Sequenzierung der erhaltenen DNS bestätigt (Daten nicht gezeigt).

3.1.1.1.3 TV19 Die aus dem vorherigen Tierversuch (TV16a) reisolierten Viren wiesen sowohl phäno- als auch genotypisch eine Reversion zum Wildtyp auf. Diese Reversion trat bereits vollständig bei den frühesten Isolaten auf. Trotzdem erkrankte ein Teil der Tiere nur schwach und erholte sich zum Ende des Versuchs wieder. Dafür sind zwei Erklärungen möglich. Zum einen kann das Virus an einer anderen Stelle des Genoms eine Mutation aufweisen, die für diese Teilattenuierung verantwortlich ist. Zum anderen kann die kurze Zeitspanne, die das Virus für die Reversion

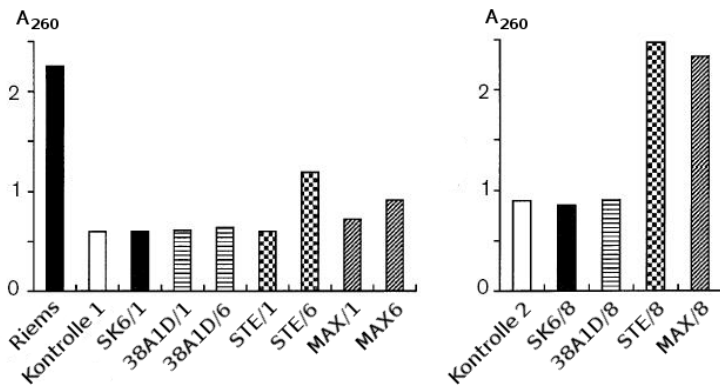


Abbildung 3.7: RNase-Aktivität von 255/1 in Zellkultur-Passagen.

Lichtabsorption bei 260 nm Wellenlänge, gemessen wird die Bildung säurelöslicher niedermolekularer RNS aus dem Substrat Poly(U).

Zellextrakte verschiedener mit CSFV 255/1 infizierter Zellen. Hinter dem Schrägstrich folgt jeweils die Passagezahl des Virus. Riems - Wildtyp E^{rns} als Positivkontrolle; Kontrolle (1 und 2) - Zellextrakt nicht-infizierter Zellen als Negativkontrolle

benötigt, dem Immunsystem des Wirtes genug Zeit geben, eine ausreichende Immunantwort zur Elimination der Infektion auszubilden. Um die erste Erklärung auszuschließen, wurde ein Tierversuch mit reisoliertem CSFV aus Versuch TV16a durchgeführt. Hierzu wurden drei Ferkel mit dem aus Tierversuch 16a reisolierten, revertierten CSFV 255/1R infiziert. Die Infektionsdosis betrug 2×10^5 KID₅₀ in 3 ml Medium. 2 ml wurden intranasal (1 ml pro Nasenloch), 1 ml i.m. appliziert.

Alle drei Tiere entwickelten deutliche klinische Zeichen. Tier 1 hatte ab Tag 8 p.i. Durchfall, schlechte bis fehlende FA und ein mittel- bis hochgradig gestörtes AB. An Tag 10 p.i. blutete das Tier aus dem After, an Tag 14 waren am rechten Ohr Ekchymosen zu erkennen, es entwickelten sich Nasenausfluß und deutliche Atemgeräusche. An Tag 16 war der Kot wäßrig, das Tier zitterte und taumelte. An Tag 17 p.i. war das Tier festliegend, mit Ekchymosen an beiden Ohren, den Kronsäumen, Tarsal-, Karpalgelenken und den Schinken. Tier 2 hatte an Tag 4 p.i. leichte Diarrhoe, ab Tag 10 ein geringgradig bis hochgradig gestörtes AB und schlechte FA. An Tag 16 und 17 war der Kot dünnbreiig. Beide Tiere wurden an Tag 17 p.i. aufgrund des schlechten ABs geschlachtet. Tier 3 wies an Tag 10 und 11 p.i. ein geringgradig gestörtes AB und schlechte FA auf. An Tag 12 war das AB hochgradig gestört. Die linke Hintergliedmaße wurde nicht belastet. Die Haut über dem Tarsalgelenk wies eine offene Schürfwunde auf, das Gelenk war geschwollen und auf Druck fluktuierend. Aufgrund der rasanten Verschlechterung des ABs wurde das Tier geschlachtet.

In der pathologischen Untersuchung waren bei Tier 1 alle Lymphknoten blutig imbibiert, nach kaudal hin zunehmend. In beiden Nieren fanden sich zahlreiche Petechien, keilförmige Blutungen in der Leber, die sich vereinzelt bis 0,5 cm tief in das Parenchym zogen. In der Blasen- und Magenschleimhaut fanden sich vereinzelt Petechien. Bei Tier 2 fanden sich nur vereinzelt Petechien in der Blasen- und Magenschleimhaut. Bei Tier 3 fand sich dorsal über dem linken Tarsalgelenk eine blutig-schwartige Verdickung von ca. 1 cm Tiefe, 3 cm Breite und 6 cm Länge. Das Tarsalgelenk selbst war ohne besonderen Befund.

Alle drei Tiere bekamen Fieber bis über 41°C, das bis zum jeweiligen Schlachtermin anhielt, beginnend mit Tag 5 p.i. (Abbildung 3.8).

Die Leukozytenzahlen im Blut der Tiere fielen zwischen Tag 3 und 10

p.i. auf rund 5 G/l ab. Auf diesem Niveau stagnierten sie bis zur Schlachtung. Ebenso verringerte sich die Zahl der B-Zellen, sie erreichten an Tag 3 p.i. bereits ein durchschnittliches Niveau von 1,3% der Gesamtleukozyten, erholte sich an Tag 5 p.i. kurzfristig und fiel dann für den restlichen Verlauf auf Werte zwischen 2,8% und 0,9% (Abbildungen 3.9 und 3.10).

Virämie konnte ab Tag 3 (Tier 4) bzw. Tag 5 (Tiere 1 und 2) bis zum Versuchsende nachgewiesen werden. Mittels „Fluorescence Activated Cell Sorting“ (FACS) wurden die peripheren Blutleukozyten auf CSFV-Infektion hin untersucht. Dazu werden die infizierten Zellen und eventuell vorhandenes Virus mit Fluoreszenzfarbstoffen spezifisch markiert. Die markierten Zellen werden dann in einem Flüssigkeitsstrom durch den Analyserraum im FACS-Analysator geleitet. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden durch Laser angeregt. Weiterhin kommt es zu einer Streuung des eingestrahlten Lichts. Nach Umwandlung des emittierten Lichts und des Streulichts in elektrische Signale ist so die Differenzierung u.a. nach Zellart, Zellgröße und CSFV-Infektion möglich. Der Anteil infizierter Leukozyten, der mittels FACS nachweisbar war, lag ab Tag 10 p.i. im Durchschnitt zwischen 13,6 und 25,5% (Abbildung 3.11).

Keines der Tiere entwickelte nAk gegen CSFV.

Nach den Ergebnissen dieses Tierversuchs läßt sich sicher sagen, daß das Virus 255/1 aus TV16a zu hoch pathogenem Wildtyp CSFV revertiert ist. Alle 3 Tiere entwickelten akute, tödlich verlaufende Schweinepest ohne Ausbildung neutralisierender Antikörper gegen CSFV.

3 Ergebnisse

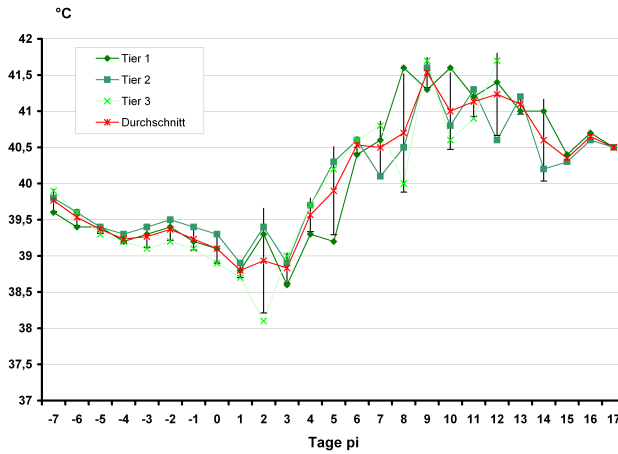


Abbildung 3.8: Körperkerntemperatur der Tiere aus TV19 in °C

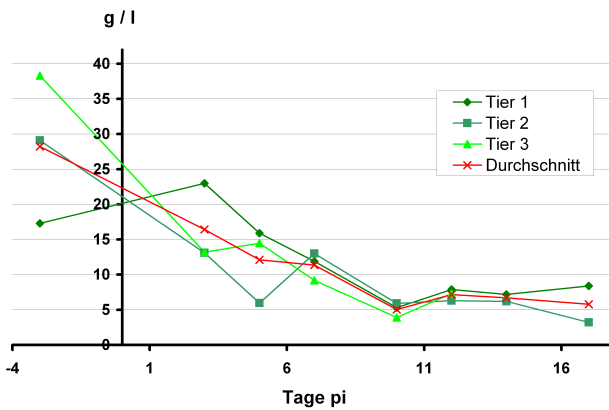


Abbildung 3.9: Gesamtleukozyten der Tiere aus TV19 in G/l

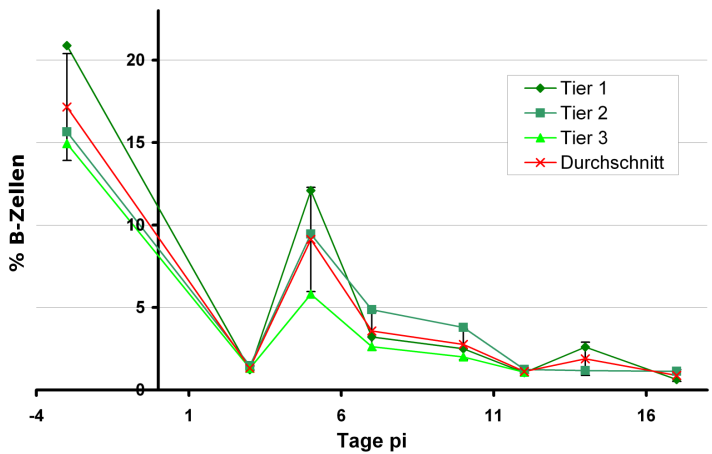


Abbildung 3.10: B-Zellen der Tiere aus TV19 in % der Gesamtleukozyten

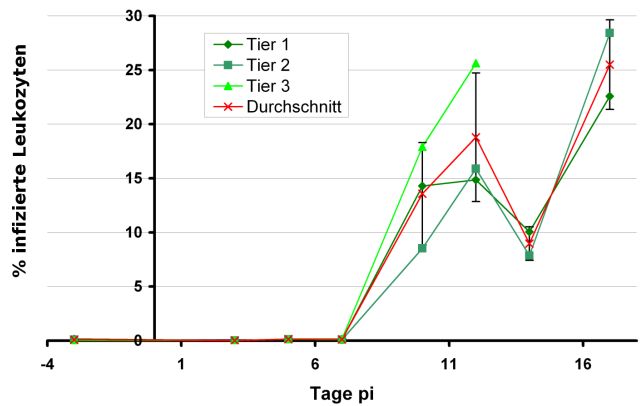


Abbildung 3.11: CSFV-infizierte Leukozyten der Tiere aus TV19 in % der Gesamtleukozyten

3.1.1.1.4 TV 20 Die transplazentare Übertragung von Virus auf den Fötus im trächtigen Tier gehört zu den zentralen Problemen von pestiviralen Infektionen. Da die Inaktivierung der E^{rns} RNase des CSFV Alfort/Tübingen durch Deletion der AS 346 zur vollständigen Attenuierung des Virus führte und zudem die Virusmutante nahezu keine Virämie erzeugte, lag nahe zu überprüfen, ob diese Mutation auch die transplazentare Infektion verhindert.

In einem weiteren Tierversuch sollte deshalb untersucht werden, wie sich die Inaktivierung der RNase-Aktivität des E^{rns} bei der Infektion gravidier Sauen auf die Föten auswirkt.

Es wurden zwei Gruppen zu je 4 trächtigen Sauen gebildet. Die Tiere waren bei der Ankunft am 54. Tag der Trächtigkeit, die Infektion wurde acht Tage später durchgeführt. Die erste Gruppe wurde als Kontrollgruppe mit CSFV Riems (Riemser Schweinepest Vakzine) mit folgendem Infektionsschema infiziert: 2×10^5 KID₅₀ in 3 ml BFA-34 mit FCS, 2 ml intranasal (je 1 ml je Nasenloch) und 1 ml intramuskulär. Die zweite Gruppe wurde mit der RNase-negativen attenuierten CSFV-Mutante 230/1 nach dem gleichen Schema infiziert. Die Körperkerntemperatur wurde von Tag -3 bis Tag 7 p.i. erfaßt. Blutproben wurden an Tag 0 und 6 post infectionem ebenso wie am Schlachttag entnommen und auf Virämie untersucht. Zusätzlich wurden an Tag 0 p.i. und am Schlachttag Serumproben gewonnen und auf neutralisierende Antikörper gegen CSFV untersucht. Von weiteren Blutprobenentnahmen wurde abgesehen, um die Tiere nicht unnötig zu stressen und damit das Risiko für Aborte oder Frühgeburten zu erhöhen.

Nach der Infektion entwickelte keines der Tiere Fieber (Tabelle 3.1 und Grafik 3.12). Virämie ließ sich nur bei einem der mit CSFV 230/1 Tiere (Tier 883, an Tag 6 p.i.) nachweisen. Zu Beginn des Versuchs hatte keines der Tiere neutralisierende Antikörper gegen CSFV. Bis zum Ende des Versuchs stieg der Antikörpertiter auf Werte zwischen 1:40 und 1:320.

Euthanasiert wurden die Tiere 3 Tage (Gruppe CSFV Riems) bzw. 2 Tage (Gruppe CSFV 230/1) vor dem errechneten Abferkeltermin mit Pentobarbital (Eutha® 77, Essex Tierarznei, München).

Die Föten wurden entnommen und Gewebe als Sammelproben genommen wie unter Methoden beschrieben. Bei mumifizierten Früchten wurden, soweit möglich, die gleichen Proben entnommen. Als bereits vor der

Euthanasie tote Föten wurden nur Föten eingestuft, die aufgrund ihres Zustandes (Mumifizierung, beginnende Mumifizierung) sicher als tot klassifiziert werden konnten.

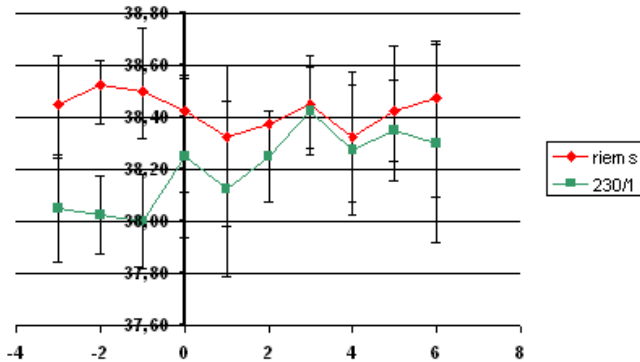


Abbildung 3.12: Durchschnittliche Körperkerntemperaturen der Tiere aus TV 20 in °C
riems = Gruppe CSFV Riems; 230/1 = Gruppe 230/1

In der Kontrollgruppe hatten die Sauen insgesamt 55 Ferkel, von denen 5 bereits tot oder mumifiziert waren. In keinem der Ferkel ließ sich Virus nachweisen (Tabelle 3.2).

In der Gruppe, die mit CSFV 230/1 infiziert worden war, hatten die Sauen 44 Ferkel, von denen 6 bereits tot oder mumifiziert waren. Eines der vermutlich noch lebenden Ferkel hatte Petechien auf Haut und Nieren. In 15 Ferkeln aus 3 verschiedenen Sauen ließ sich Virus nachweisen (Tabelle 3.3).

3 Ergebnisse

<i>Tag pi</i>										
<i>Tier</i>	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6
<i>Gruppe CSFV Riems</i>										
882	38,5	38,4	38,2	38,3	38,2	38,4	38,4	38,2	38,1	38,4
886	38,3	38,6	38,4	38,6	38,6	38,4	38,6	38,2	38,5	38,4
888	38,3	38,5	38,7	38,4	38	38,4	38,2	38,2	38,4	38,3
889	38,7	38,6	38,7	38,4	38,5	38,3	38,6	38,7	38,7	38,8
<i>Gruppe 230/I</i>										
881	38	38,2	37,9	38,6	37,8	38,3	38,4	38,3	38,2	38
883	38,1	37,9	38,2	38,1	38,1	38,3	38,5	38,2	38,2	38
884	37,8	37,9	37,8	37,9	38	38	38,2	38	38,4	38,4
887	38,3	38,1	38,1	38,4	38,6	38,4	38,6	38,6	38,6	38,8

in °C

Tabelle 3.1: Körperkerntemperatur der Tiere aus TV20 in °C

Gruppe CSFV Riems

<i>Nr. Muttersau</i>	<i>Fötus-Nr.</i>	<i>Virus</i>	<i>Pathologie</i>
882	1	//	
	2	//	mumifiziert
	3	//	
	4	//	
	5	//	
	6	//	
	7	//	
	8	//	
	9	//	
	10	//	
	11	//	
	12	//	
886	1	//	
	2	//	
	3	//	
	4	//	
	5	//	mumifiziert
	6	//	
	7	//	
	8	//	Tot
	9	//	
	10	//	
	11	//	
	12	//	
	13	//	

Fortsetzung auf nächster Seite

Fortsetzung von letzter Seite

<i>Nr. Muttersau</i>	<i>Fötus-Nr.</i>	<i>Virus</i>	<i>Pathologie</i>
	14	//	
	15	//	
888	1	//	
	2	//	
	3	//	
	4	//	
	5	//	
	6	//	
	7	//	
	8	//	
	9	//	
	10	//	
	11	//	
889	1	//	Mumifiziert
	2	//	
	3	//	
	4	//	
	5	//	
	6	//	
	7	//	Tot
	8	//	
	9	//	
	10	//	
	11	//	
	12	//	Tot, Purpura in der Plazenta
	13	//	

Fortsetzung auf nächster Seite

Fortsetzung von letzter Seite

<i>Nr. Muttersau</i>	<i>Fötus-Nr.</i>	<i>Virus</i>	<i>Pathologie</i>
	14	//	
	15	//	
	16	//	
	17	//	

Tabelle 3.2: *Daten zu den Föten der Tiere aus Gruppe CSFV Riems, TV 20*

/ = Virus negativ; + = Virus positiv, Virusnachweis erfolgte in Doppelbestimmung

Gruppe CSFV 230/1

<i>Nr. Muttersau</i>	<i>Fötus-Nr.</i>	<i>Virus</i>	<i>Pathologie</i>
881	1	//	Tot
	2	++	
	3	//	
	4	+/	
	5	//	Mumifiziert
	6	+/	
	7	++	
	8	++	
	9	++	Lebend; Petechien auf Haut und Nieren
	10	/+	
	11	//	Tot
	12	//	
	13	//	
	14	//	
883	1	++	
	2	++	
	3	++	
	4	//	Tot, Purpura in der Plazenta
	5	//	
	6	++	
	7	//	Tot, Purpura in der Plazenta
	8	//	

Fortsetzung auf nächster Seite

Fortsetzung von letzter Seite

<i>Nr. Muttersau</i>	<i>Fötus-Nr.</i>	<i>Virus</i>	<i>Pathologie</i>
	9	++	
	10	++	
884	1	//	
	2	//	
	3	+/	
	4	//	
	5	//	
	6	+/	
	7	//	
887	1	//	
	2	//	
	3	//	
	4	//	
	5	//	
	6	//	
	7	//	
	8	//	
	9	//	
	10	//	
	11	//	
	12	//	
	13	//	Kümmerner

Tabelle 3.3: Daten zu den Föten der Tiere aus Gruppe CSFV 230/1, TV 20

/ = Virus negativ; + = Virus positiv, Virusnachweis erfolgte in Doppelbestimmung

3.1.1.2 Versuche zur trans-Komplementierung der RNase-Funktion

Es ist möglich, daß E^{ms} als Virulenzfaktor seine Funktion nicht unmittelbar am Ort der Virusreplikation, sondern in der Umgebung des Infektionsherdes oder weiter davon entfernt im Organismus ausübt. Dafür sprechen zwei Eigenschaften des E^{ms} , namentlich das Fehlen eines bekannten Membranankers und die vermutlich damit verbundene Sezernierung, sowie die Fähigkeit der C-terminalen Sequenz die Plasmamembran passagieren zu können, und damit von außen in Zellen zu gelangen. Ist diese Theorie richtig, müßte man $RNase^{\ominus}$ -CSFV-Mutanten mit wt- E^{ms} in trans supplementieren und damit den pathogenen Phänotyp wieder regenerieren können. Um diese Theorie zu überprüfen wurden zwei vergleichbare Tierversuche (TV 17 und TV 18) durchgeführt.

In beiden Versuchen wurde mit zwei Gruppen zu je 4 Ferkeln gearbeitet. Alle Schweine wurden mit 10^5 KID₅₀ der $RNase^{\ominus}$ -Mutante CSFV H297K in 3ml Medium infiziert. 1/3 der Dosis wurde i.m., 2/3 i.n. verabreicht. Zum gleichen Zeitpunkt bekam die erste Gruppe die attenuierte Tollwut-Mutante Mu1, und die zweite Gruppe die attenuierte Tollwut-Mutante 14.1. Mu1 exprimiert $RNase^{\ominus}$ - E^{ms} , während 14.1 die durch Deletion der AS 346 erzeugte $RNase^{\oplus}$ Variante des Proteins exprimiert (Herstellung der Mutanten in Kooperation mit der AG Conzelmann, LMU München). Die Infektion mit den Tollwutviren fand i.m. im M. glutaeus statt.

Die Infektionsdosis für die Tollwut-Mutanten betrug im ersten Versuch jeweils 5×10^6 KID₅₀, im zweiten Versuch je 6×10^7 KID₅₀.

3.1.1.2.1 TV 17 Die Tiere aus Gruppe 26 wurden zusätzlich zur $RNase^{\oplus}$ -Mutante mit der $RNase^{\ominus}$ -Tollwut-Mutante Mu1 (5×10^6 KID₅₀), die Tiere aus Gruppe 28 mit der $RNase^{\oplus}$ -Tollwut-Mutante 14.1 (5×10^6 KID₅₀) infiziert.

Tier 26/3 wieß bereits zum Infektionsdatum eine reduzierte FA und leichtes Niesen, an Tag 1 p.i. kamen wäßrige Diarrhoe und mittelgradig gestörtes AB hinzu. Am 4. Tag p.i. fand keine Futteraufnahme mehr statt, an Tag 5 p.i. wurde Tier 26/3 aus tierschützerischen Gründen geschlachtet. In der Pathologie fand sich eine Polyserositis, generalisierte Lymphadeni-

tis und Bursitis am linken Knie. Die anderen Tiere der Gruppe 26 zeigten von Tag 3 bis Tag 6 p.i., Tier 26/4 wieder von Tag 8 bis Tag 11 p.i. eine Körperkerntemperatur $> 40^{\circ}\text{C}$ (Tabelle 3.4 und Bild 3.13). Die weitere klinische Zeichen traten nicht auf.

Schweinepest-Virus konnte an Tag 5 und 7 p.i., bei Tier 26/4 von Tag 5 p.i. bis zur Schlachtung an Tag 17, aus dem BC reisoliert werden.

Zur sichereren Kontrolle der Antikörperentwicklung wurden die Tiere über die Erfassung der anderen Parameter hinaus (bis Tag 12 p.i.) erst nach ca 3,5 Wochen p.i. geschlachtet.

Die Tiere aus Gruppe 28 zeigten ab Tag 3 bis Tag 12 p.i. eine Körperkerntemperatur von über 40°C an. Bei den einzelnen Tieren dauerte diese Phase zwischen 4 und 9 Tagen (Tabelle 3.5 und Bild 3.13). Durchfall hatte Tier 28/4 an Tag 3 und von Tag 7 bis 10 p.i., Tier 28/3 an Tag 6 bis 8 und Tag 10 bis 13 p.i., Tier 28/1 an Tag 8, 10 und 11 p.i.. Tier 28/2 hatte keinen Durchfall. Tier 28/1 wies ab Tag 6, die anderen Tiere ab Tag 7 p.i. eine schlechte FA auf. Bei allen Tieren war das AB an Tag 6 p.i. mittelgradig gestört, mit tageweisen Schwankungen zwischen hochgradig gestört und ungestörtem AB zog sich dies bis Tag 10 p.i.. Tier 28/4 wurde aufgrund des schlechten ABs an Tag 10 p.i. geschlachtet, die anderen Tiere erhielten sich zwischen Tag 12 und 14 p.i.

Schweinepest-Virus konnte zwischen Tag 5 und 12 p.i. aus dem BC reisoliert werden.

In beiden Gruppen kam es zu einer deutlichen, transienten Leukopenie zwischen Tag 5 und 10 p.i. (Tabelle 3.6 und Bild 3.14) und ebenso zu einer B-Zell-Depletion zwischen Tag 5 und 10. Danach erholten sich beide Gruppen, aber Gruppe 26 hatte an Tag 12 noch einmal einen Einbruch der B-Zell Zahlen (Tabelle 3.7 und Bild 3.15).

Das reisolierte Virus war in allen Fällen noch RNase[⊖] (Bild 3.16). Zur Kontrolle des Genotyps wurde RNS der reisolierten Viren aufgereinigt, eine RT-PCR mit den Primern E05SII und E0Stop durchgeführt und im Anschluß mit den selben Primern der für das E^{ms} kodierende Bereich sequenziert. In allen Fällen war der Austausch des Histidin Codons 297 gegen ein Lysin Codon (CAT → AAA) erhalten.

Bei keinem Tier konnte intrazelluläres Virus mittels FACS in Leukozyten nachgewiesen werden.

Zur Kontrolle, ob sich die Tollwut Virus Mutanten vermehrt hatten, oder ob sie gleich nach der Infektion vom Immunsystem eliminiert worden waren, wurde der Antikörperstatus gegen Tollwut Virus an Tag 0 p.i. mit dem am Tag der Schlachtung verglichen. Dabei lagen die Werte an Tag 0 p.i. bei allen Tieren bei 1,5 IU und am Schlachttag bei den meisten Tieren bei 7,5 IU. Bei Tier 28/2 lagen sie bei 1,5 IU und bei Tier 28/4 bei 37,5 IU.

Zusammenfassend ergab TV 17, daß die Tiere beider Gruppen eine CSFV-Infektion mit im Vergleich zum klassischen Bild milder Symptomatik durchliefen. Bis auf ein Tier erholten sie sich nach kurzer Krankheitsphase wieder von der Infektion. Die Tiere der mit $\text{RNase}^{\ominus}\text{-E}^{\text{ms}}$ supplementierten Kontrollgruppe erschienen sowohl vom persönlichen Eindruck als auch von den erfaßten Parametern her weniger schwer erkrankt als die $\text{RNase}^{\oplus}\text{-E}^{\text{ms}}$ supplementierte Gruppe. Da die Abweichungen der beiden Gruppen voneinander jedoch noch innerhalb der statistischen Streuung lagen, wurde ein weiterer Tierversuch unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführt.

Tag pi / Tier	26/1	26/2	26/3	26/4
-2	39,7	38,8	40,2	39,4
-1	39	39,2	40,7	39,4
0	38,9	39	40,2	39,3
1	39,2	39,3	41,7	39,5
2	39,4	39,8	41,3	39,5
3	40,5	39,7	40,7	39,9
4	40,1	40,3	40,8	40,2
5	40,8	40,4	41*	40,4
6	40,2	40,3		40,5
7	39,8	39,8		39,5
8	39,9	39,8		40,7
9	40,2	39,8		40,8
10	39,6	39,7		40,3
11	39	39,2		40,6
12	39,5	39,2		39,5
13	39,6	39,5		39,3
14	39,3	39,2		39,5
15	39,4	39,3		39,3
16	39	38,9		39,2
17	38,9	38,8		39,1

in °C

Co-Infiziert Tollwut Virus Mu1

* Tier geschlachtet.

Tabelle 3.4: TV 17; Körperkerntemperatur der Tiere in Gruppe 26

3 Ergebnisse

Tag pi / Tier	28/1	28/2	28/3	28/4
-2	39	39,2	39,2	39,4
-1	39,2	39,3	39,4	39,3
0	39	39,8	39,2	39
1	39,3	39,8	39,3	39
2	39,6	40	39,6	39,7
3	40,7	39,7	39,6	39,5
4	40,3	40,6	39,6	39,3
5	40,6	40,9	40,3	40,2
6	41,5	41,4	40,8	40,2
7	40,6	41,6	40,2	41,2
8	41,1	41,2	40,5	40,9
9	40,9	41	40,5	39,7
10	40,2	40,6	39,6	39,4*
11	39,1	40	39,8	
12	38,9	40,2	39,2	
13	39	39,6	39,2	
14	39	39,4	39,1	
15	39,2	39,1	39,3	
16	39,2	38,8	39	
17	39,1	38,9	39,1	

in °C

Co-Infiziert mit Tollwut Virus 14.1

* Tier geschlachtet.

Tabelle 3.5: TV 17; Körperkerntemperatur der Tiere aus Gruppe 28

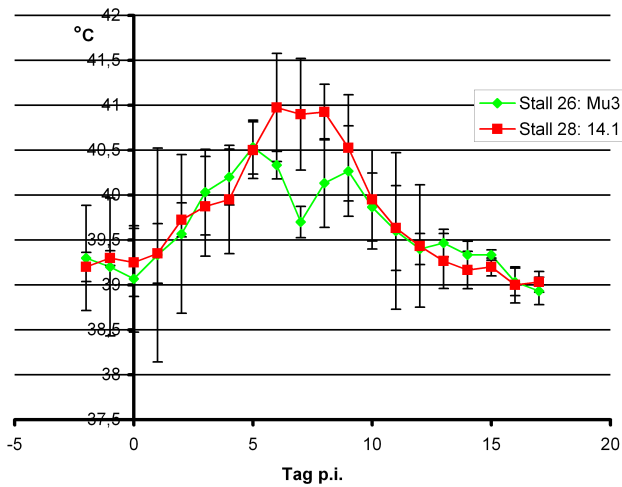


Abbildung 3.13: Körperkerntemperatur der Tiere aus TV 17, Durchschnitt in °C
 Gruppe 26: CSFV H297K + RNase[⊖]Tollwut Virus Mu1
 Gruppe 28: CSFV H297K + RNase[⊖]Tollwut Virus 14.1

3 Ergebnisse

Tag pi / Tier	26/1	26/2	26/3	26/4	28/1	28/2	28/3	28/4
0	12,1	25,95	14,3	27,03	24,34	29,26	26,07	16,52
3	13,76	12,49	20,41*	19,09	17,94	35,42	15,02	23,17
5	9,63	9,46		9,84	12	13,1	8,86	15,17
7	8,13	8,36		7,47	14,79	6,3	9,57	17
10	21,57	16,22		2,37	12,62	9,47	11,62	23,6*
12	27,07	27,86		2,38	26,44	11,86	17,06	
14	29,95	20,91		1,86	16,13	9,78	34,58	

in G/l

Tiere 26/1-26/4: Co-Infiziert Tollwut Virus Mu1; Tiere 28/1-28/4: Co-Infiziert mit Tollwut Virus 14.1

* Tiere geschlachtet.

Tabelle 3.6: Gesamtleukozyten der Tiere aus TV 17

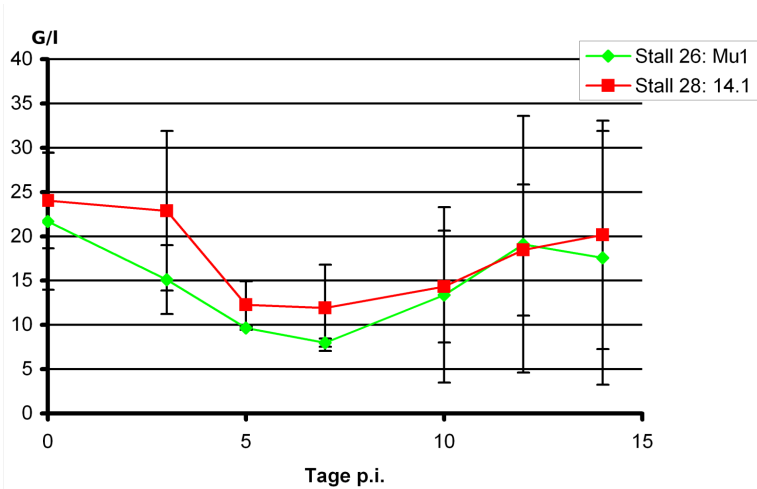


Abbildung 3.14: Gesamtleukozytenzahlen der Tiere aus TV 17, Durchschnitt in G/l
Gruppe 26: CSFV H297K + RNase[⊖]Tollwut Virus Mu1
Gruppe 28: CSFV H297K + RNase[⊖]Tollwut Virus 14.1

3 Ergebnisse

Tag pi / Tier	26/1	26/2	26/3	26/4	28/1	28/2	28/3	28/4
0	10,64	6,14	0,64	1,69	6,63	2,41	1,53	2,33
3	5,68	3,94	0,6*	1,94	3,81	4,76	8,76	2,99
5	3,4	2,2		2,18	1,67	2,26	3,46	1,49
7	1,06	3,67		1,66	2,1	0,6	1,9	0,5
10	10,46	2,97		0,57	3,02	0,71	5,69	0,49*
12	2,171	2,86		2,66	3,4	1,24	4,49	
14	6,29	6,53		3,27	2,42	4,02	4,13	

in % Gesamtleukozyten

Tiere 26/1-26/4: Co-Infiziert Tollwut Virus Mu1; Tiere 28/1-28/4: Co-Infiziert mit Tollwut Virus 14.1

* Tiere geschlachtet.

Tabelle 3.7: *B-Zellen der Tiere aus TV 17*

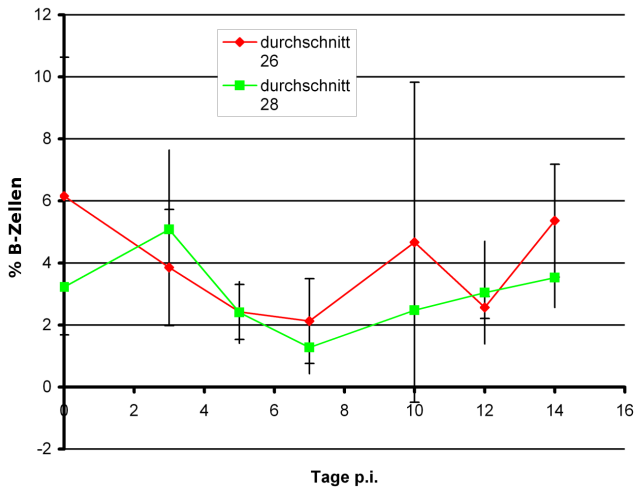


Abbildung 3.15: B-Zellzahlen der Tiere aus TV 17, Durchschnitt in % der Gesamtleukozyten
Gruppe 26: CSFV H297K + RNase[⊖]Tollwut Virus Mul
Gruppe 28: CSFV H297K + RNase[⊕]Tollwut Virus 14.1

3 Ergebnisse

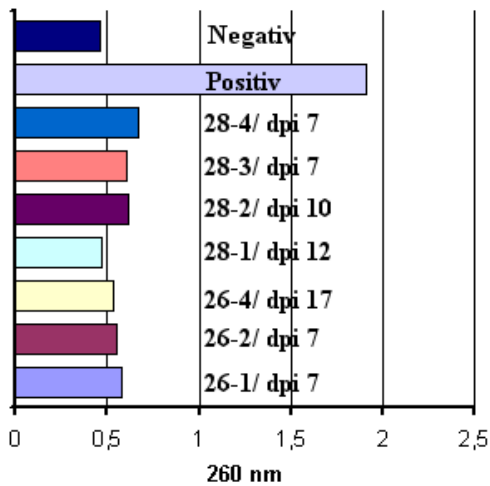


Abbildung 3.16: RNase-Test der reisolierten Viren aus buffy coat Zellen in TV 17.

Lichtabsorption bei 260 nm Wellenlänge, gemessen wird die Bildung säurelöslicher niedermolekularer RNS aus dem Substrat Poly(U).

Stallnummer-Tiernummer/ Tag p.i.

Gruppe 26: infiziert mit CSFV H297K + RNase[⊖] Tollwut Virus Mu1

Gruppe 28: infiziert mit CSFV H297K + RNase[⊕] Tollwut Virus 14.1

3.1.1.2.2 TV 18 Dieser zweite Versuch zur Supplementierung von RNase[⊖]-E^{rns} CSFV mit wt-E^{rns} wurde durchgeführt, da der erste Versuch zwar andeutete, daß die Supplementierung zur Verstärkung der Krankheitssymptome führt, die Ergebnisse aber aufgrund der geringen Tierzahl auch als statistische Streuung erklärt werden könnten. In der Erwartung, den Unterschied zwischen der mit RNase[⊖]-E^{rns} und der mit wt-E^{rns} supplementierten Gruppe verstärkt zum Ausdruck bringen zu können, wurde in diesem Versuch die Infektionsdosis für das Tollwut-Virus im Vergleich zum Versuch TV 17 höher gewählt (6×10^7 KID₅₀ statt 5×10^6 KID₅₀).

Die Tiere aus Gruppe 52 wurden zusätzlich zur CSFV RNase[⊕]-Mutante mit der RNase[⊖]-Tollwut-Mutante Mu1 (6×10^7 KID₅₀), die Tiere aus Gruppe 50 mit der RNase[⊕]-Tollwut-Mutante 14.1 (6×10^7 KID₅₀) infiziert.

In Gruppe 52 hatten alle Tiere an Tag 6 p.i. schlechte FA und mittelgradig gestörtes AB, an Tag 8 p.i. hatten drei Tiere (52/1 - 52/3) leichte Diarrhoe, bei gleichzeitig guter FA und gutem AB. An Tag 10 p.i. hatte Tier 52/3 schlechte FA, AB und leichte Diarrhoe, an Tag 11 p.i. wiesen alle Tiere eine schlechte FA auf. Danach waren die klinischen Zeichen bis zum Tag der Schlachtung o.b.B. Temperatur über 40°C hatten Tier 52/1 und 52/2 an Tag 6 p.i., und Tier 52/3 von Tag 10 bis zur Schlachtung (Tabelle 3.8 und Abb. 3.17). Schweinepest-Virus konnte an Tag 5 und 7 p.i. (52/3; Tag 5 und 10 p.i.) aus BC reisoliert werden.

Tier 52/3 entwickelte an Tag 8 p.i. eine hochgradige Lahmheit der hinteren rechten Extremität mit fluktuierender Schwellung am Tarsalgelenk. Über die nächsten 12 Tage wechselte der Grad der Lahmheit zwischen leicht und mittelgradig. Von Tag 11 bis Tag 14 p.i. wurde das Tier antibiotisch behandelt (1ml Baytril / d i.m.). Nach anfänglicher Besserung lag das Tier an Tag 18 p.i. fest und wurde geschlachtet. Bei der pathologischen Untersuchung ließen sich 7 ml dickflüssiger Eiter aus der Schwellung entnehmen, die Achillessehne war teilweise eingeschmolzen. Das Tarsalgelenk selbst war o.b.B. Der restliche Tierkörper war ebenfalls o.b.B.

Zur sichereren Kontrolle der Antikörperentwicklung wurden die anderen Tiere über das Erfassen der anderen Parameter hinaus (bis Tag 12 p.i.) erst nach ca 3,5 Wochen p.i. geschlachtet.

In Gruppe 50 hatte eines der Tiere an Tag 6 p.i. leichte Diarrhoe: es ließ

3 Ergebnisse

sich nicht zuordnen welches. An Tag 8 p.i. hatte Tier 50/3 leichte Diarrhoe. Alle anderen Tiere waren über den Beobachtungszeitraum klinisch o.b.B. Fieber hatten nur die Tiere 50/2 und 50/4 an Tag 5 p.i. (Tabelle 3.9).

Schweinepest-Virus konnte an Tag 5 und 7 p.i. (50/2: Tag 7 und 10 p.i.) aus BC reisoliert werden.

Die Tiere beider Gruppen hatten an Tag 5 und 7 p.i. eine transiente Leukopenie und B-Zell-Depletion (Tabellen 3.10 und 3.11, Bilder 3.18 und 3.19). Mittels FACS ließ sich kein intrazelluläres CSFV in Leukozyten nachweisen. Die Kontrolle des Genotyps der reisolierten Viren wies in allen Fällen einen Erhalt des Austausches H297K und keine „second site“ Mutationen auf. Die Kontrolle des Phänotyps auf RNase-Aktivität wurde daher nicht durchgeführt.

Der Antikörpertiter gegen Tollwut stieg von durchschnittlich 1,08 IU (0,3 - 1,5) auf 2,46 IU (0,5 - 4,2).

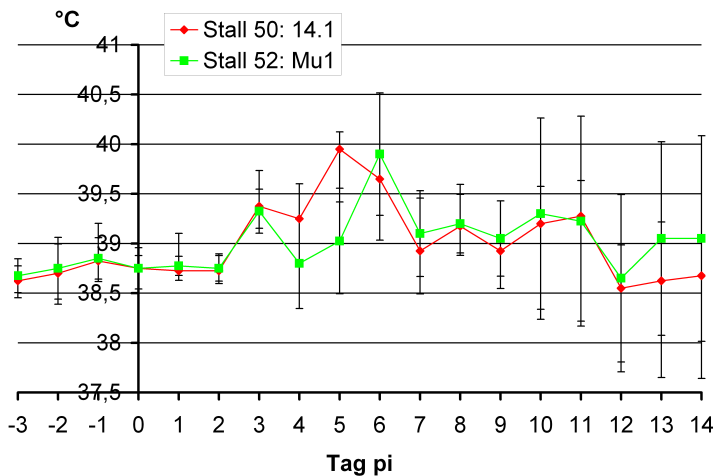


Abbildung 3.17: Körperkerntemperatur der Tiere aus TV 18, Durchschnitt der jeweiligen Gruppe in °C

Gruppe 50: CSFV H297K + RNase[⊕]Tollwut Virus 14.1

Gruppe 52: CSFV H297K + RNase[⊖]Tollwut Virus Mu1

Tag pi / Tier	52/1	52/2	52/3	52/4
-3	38,6	38,9	38,7	38,5
-2	38,5	38,7	38,6	39,2
-1	38,9	38,6	38,8	39,1
0	38,7	38,5	38,8	39
1	38,8	38,7	38,7	38,9
2	38,6	38,7	38,9	38,8
3	39,2	39,4	39,6	39,1
4	38,5	39,4	38,4	38,9
5	38,8	38,4	39,6	39,3
6	40,6	40	39,9	39,1
7	39,3	39,1	39,5	38,5
8	39,5	39,2	39,3	38,8
9	39,1	39,3	39,3	38,5
10	38,3	39	40,6	39,3
11	38,2	38,9	40,7	39,1
12	38,4	38,2	39,9	38,1
13	38,6	38,7	40,5	38,4
14	38,5	38,5	40,6	38,6

in °C

Co-infiziert mit Tollwut Virus Mu1

Tabelle 3.8: TV 18; Körperkerntemperatur der Tiere aus Gruppe 52

3 Ergebnisse

Tag pi / Tier	50/1	50/2	50/3	50/4
-3	38,5	38,8	38,7	38,5
-2	38,8	39	38,3	38,7
-1	38,9	38,7	38,4	39,3
0	38,8	38,9	38,6	38,7
1	38,2	38,7	39	39
2	38,5	38,7	38,9	38,8
3	39,2	39,1	39,3	39,9
4	39	39,6	38,9	39,5
5	39,8	40,1	39,8	40,1
6	39,3	39,6	39,7	40
7	38,5	38,7	38,8	39,7
8	38,9	39	39	39,8
9	38,8	39	39	38,9
10	39,2	39,1	38,8	39,7
11	39,2	39	39,1	39,8
12	38,2	38,7	38,2	39,1
13	38	38,4	38,7	39,4
14	38,4	38,3	38,8	39,2

in °C

Co-infiziert mit Tollwut Virus 14.1

Tabelle 3.9: TV 18; Körperkerntemperatur der Tiere aus Gruppe 50

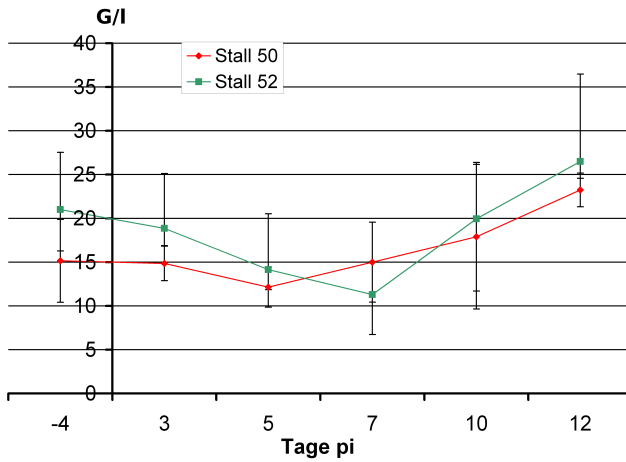


Abbildung 3.18: Gesamtleukozyten der Tiere aus TV 18, Durchschnitt der jeweiligen Gruppe in G/l

Gruppe 50: CSFV H297K + RNase[⊕]Tollwut Virus 14.1

Gruppe 52: CSFV H297K + RNase[⊖]Tollwut Virus Mu1

3 Ergebnisse

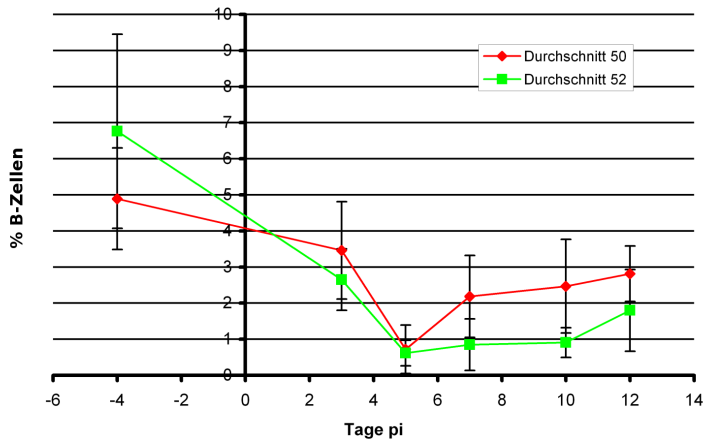


Abbildung 3.19: B-Zellen der Tiere aus TV 18, Durchschnitt der jeweiligen Gruppe in % der Gesamtleukozyten

Gruppe 50: CSFV H297K + RNase⁺Tollwut Virus 14.1

Gruppe 52: CSFV H297K + RNase⁻Tollwut Virus Mu1

Tag pi/ Tier	50/1	50/2	50/3	50/4	52/1	52/2	52/3	52/4
-4	9,6	12,9	18,4	19,7	28,8	22,8	19,2	13,2
3	12,3	14,4	15,9	16,8	28,1	14,2	16,9	16,2
5	9,7	13,4	14,7	10,8	20,1	9,1	8,2	19,2
7	5,9	14,7	12,2	12,4	18,7	9,9		16,4
10	28,6	18,8	8,8	15,4	18	11,7	24,6*	25,5
12	22,2	24,5	21,1	25,2	38	20,1		21,4

in G/l

Tiere 50/1 - 50/4: Co-infiziert mit Tollwut Virus 14.1; Tiere 52/1 - 52/4:
Co-Infiziert mit Tollwut Virus Mu1

Leere Felder: kein Blut gewonnen

* Tier geschlachtet.

Tabelle 3.10: Gesamtleukozyten der Tiere aus TV 18

3 Ergebnisse

Tag pi/ Tier	50/1	50/2	50/3	50/4	52/1	52/2	52/3	52/4
-4	4,4	3,12	6	6,05	5,52	7,03	10,38	4,12
3	4,91	1,7	3,95	3,28	1,52	3,46	3,12	2,5
5	1,67	0,44	0,66	0,11	0,27	0,74	1,06	0,4
7	2,23	0,62	3,31	2,58	0,21	1,62		0,71
10	2,44	1,4	4,3	1,73	0,7	0,75	0,66*	1,52
12	3,7	2,3	3,2	2,06	0,6	1,95		2,85

in % Gesamtleukozyten

Tiere 50/1 - 50/4: Co-infiziert mit Tollwut Virus 14.1; Tiere 52/1 - 52/4: Co-Infiziert mit Tollwut Virus Mu1

Leere Felder: kein Blut gewonnen

* Tier geschlachtet.

Tabelle 3.11: *B-Zellen der Tiere aus TV 18*

3.1.1.3 Versuche zur Expression und Aufreinigung von E^{rns}

Bisher wurde reines E^{rns} durch die Expression in Insektenzellen mit Hilfe eines Baculovirus- [39, 40], *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus- [41] oder *Drosophila*-Expressionssystems [46] gewonnen. Dies führt zu einer Glykosylierung des Proteins, die nicht identisch mit der in der Säugerzelle stattfindenden Glykosylierung von E^{rns} ist. Es sollte deshalb der Versuch unternommen werden, CSFV-E^{rns} in BHK-Zellen zu exprimieren. Es ist zu erwarten, daß die Expression des Proteins in Säugerzellen zu einer Glykosylierung führt, wie sie auch nach der Infektion im natürlichen Wirt auftritt.

Zu diesem Zweck wurde mit drei Expressionssystemen experimentiert. In den Fällen der ersten beiden Expressionssysteme wurde die für E^{rns} kodierende Sequenz in einem Expressionsvektor mit der für einen genetischen Marker („tag“) kodierenden Sequenz fusioniert. Es wurde entweder ein an Chitin (ImpactTM-Protein Purification System) oder ein an Calmodulin (Affinity[®]-System) bindender tag verwendet. Im folgenden Schritt wurden die Sequenzen beider Proteine in den pSinRep-Vektor des Sindbis-Virus-Expressionssystems kloniert. Mit diesem System sollte auf relativ einfache Art und Weise eine größere Menge Protein aus Säugerzellen zu gewinnen sein.

Nach der Expression des Fusionsproteins bindet der tag dann entweder an eine mit Chitin oder an eine mit Calmodulin beschichtete Matrix und nicht markierte, ungewünschte Proteine können abgewaschen werden. Im Anschluß läßt sich das Fusionsprotein von der Matrix eluieren und der tag sich abspalten.

3.1.1.3.1 ImpactTM-System Das ImpactTM-Expressionssystem exprimiert das in den Vektor pTYB4 klonierte Protein zusammen mit einer Chitin bindenden Domäne (CBD) als C-terminalem tag. Zwischen dem Protein und dem tag wird das Sce VMA Intein exprimiert. Die CBD bindet an Chitin, das an kleinen Kügelchen immobilisiert ist. Über Waschschritte lassen sich so kontaminierende Proteine entfernen. Das Zielprotein läßt sich über die selbstabspaltende Eigenschaft des Inteins unter Anwesenheit von Thiolen (z.B. DTT, β -Mercaptoethanol) wieder von der Matrix

eluieren.

Die Vektoren der pTYB-Serie sind dazu gedacht Proteine in *E. coli* zu exprimieren. Da für uns eine Expression in Säugerzellen, speziell in BHK-Zellen, erwünscht war, mußte die Gen-Sequenz des Proteins, des Inteins und der CBD in einen entsprechend geeigneten Vektor transferiert werden. Auf Grund der guten Erfahrungen im Labor wurde dafür der Vektor pSinRep 5 gewählt.

Die Plasmide K2 bis K4 wurden wie in Material & Methoden beschrieben konstruiert. Die Sequenzen, die für das jeweilige E^{rms} kodieren, wurden mittels PCR amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen SmaI und XbaI in den Vektor pTYB4 inseriert. Eine Testspaltung der Plasmide mit den Enzymen XbaI und BlnI zeigte Fragmente in der zu erwartenden Größe von ca. 5800 und 2400 Basenpaaren (Abbildung 3.20).

Aus diesen Konstrukten wurde die Sequenz, die für E^{rms}, das Intein und die CBD kodieren, mit den Enzymen BlnI und XbaI herausgeschnitten und in den Vektor pSinRep 5 kloniert. Das Ergebnis waren die Konstrukte K8, K9 und K10. Testspaltungen mit den Enzymen XbaI und NotI ergaben die erwarteten Banden von ca. 9600 und 2800 Basenpaaren Größe (Abbildung 3.21).

Die E^{rms}Sequenz und die daran angrenzenden kodierenden Bereiche wurden mit den Primern E05SII, ps17.1, c19.1r und E0Stop sequenziert. Für die weiteren Experimente wurden nur Konstrukte verwendet, die keine Abweichungen in den sequenzierten Bereichen enthielten.

Mit dem Plasmid K3 wurde eine transiente Expression mittels Vaccinia-T7-Transfektion in BHK-Zellen durchgeführt und die dabei anfallenden Proteine mit ³⁵S radioaktiv markiert. In der indirekten Immunfluoreszenz mit mAb 24/16 und anti-mouse conjugated FITC ließ sich die Expression des

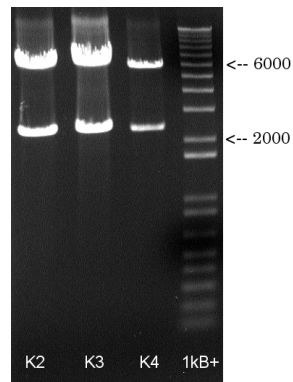


Abbildung 3.20: Testspaltung der E^{rms}-pTYB4 Plasmide mit XbaI und BlnI

Spur 1: K2, Spur 2: K3, Spur 3: K4, Spur 4: Größenmarker 1kB+

E^{rns} nachweisen (Daten nicht gezeigt).

Im Weiteren wurde die Protein-Aufreinigung durchgeführt, wobei ein gegenüber dem Herstellerprotokoll entsprechend der Beschreibung in Material & Methoden modifiziertes Verfahren durchgeführt wurde. Teilmengen der dabei anfallenden Fraktionen wurden in Immunpräzipitationsexperimenten (RIP) eingesetzt (Abbildungen 3.22 und 3.23).

In der RIP direkt aus Zellextrakt läßt sich das Fusionsprotein (ca. 100 kD) mit dem gegen E^{rns} gerichteten mAb 24/16 nachweisen (Abbildung 3.22; Spur 3). Nach Inkubation des entsprechenden Zellextraktes mit den Chitinkügelchen wurden die nicht gebundenen Proteine abgetrennt (Ü1, Abbildung 3.22, Spuren 5-7 und Abbildung 3.23, Spuren 2-4). Mittels RIP läßt sich das Fusionsprotein im entsprechenden Überstand nicht, E^{rns} ohne CBD hingegen nachweisen (Abbildung 3.22, Spuren 9 bzw. 10). Die gewaschenen Chitinkügelchen wurden mit Spaltungspuffer behandelt, wodurch gebundenes E^{rns} in den Überstand (Ü2) gelangen sollte. Jedoch läßt sich in dem Ü2 keine spezifische Bande nachweisen (Abbildung 3.23, Spuren 6 und 7). Zur Freisetzung von nicht gespaltenem CBD- E^{rns} wurden die Chitinkügelchen anschließend mit Laemmli-Puffer bei 95°C für 5 min in Anwesenheit von SDS behandelt (SDS). Diese Behandlung zerstört nicht kovalent verbundene Proteinkomplexe. In diesem Überstand taucht das CBD- E^{rns} Fusionsprotein wieder auf (Abbildung 3.23, Spuren 9 und 10). Damit war offensichtlich, daß die Abspaltung des gebundenen Proteins nicht funktioniert hatte. Es wurde mit zwei verschiedenen, vom Hersteller des Systems empfohlenen Spaltungs-Puffern vergeblich versucht das Intein zur Abspaltung zu bewegen (Abbildung 3.23, Spuren DTT bzw. HA).

Die Selbstabspaltung des Inteins, und damit die Trennung des E^{rns} von

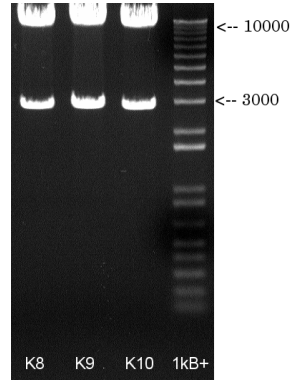


Abbildung 3.21: Testspaltung der E^{rns} -Intein-CBD-pSinRep5 Plasmide mit *XbaI* und *NotI*
Spur 1: K8, Spur 2: K9, Spur 3: K10, Spur 4: Größenmarker 1kB+

3 Ergebnisse

der CBD, funktionierte in diesen Experimenten eindeutig nicht. Somit erwies sich das Impact™-System als für unsere Zwecke nicht geeignet.

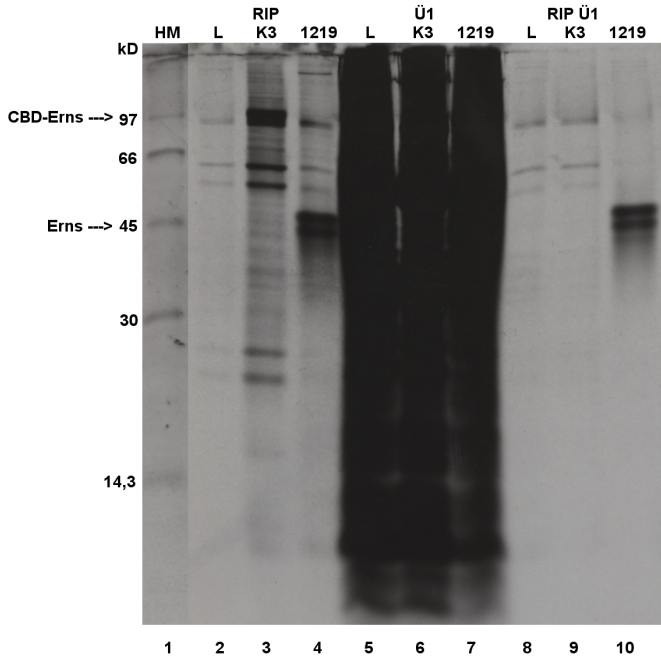


Abbildung 3.22: 1. Nachweis des Fusionsproteins CBD- E^{tns}

Aufarbeitung des radioaktiv markierten Zellysats einer transienten Vacciniavirus-Expression unter denaturierenden Bedingungen direkt aus dem Zellysat und nach der Bindungsreaktion an eine Chitin-Matrix.

HM = High molecular weight marker

RIP = Radioimmunpräzipitation mit gegen E^{tns} gerichtetem mAb 24/16

Ü1 = Überstand nach Proteinbindung an eine Chitin-Matrix (= nicht gebundene Proteine)

RIP Ü1 = das Ü1 wurde mit gegen E^{tns} gerichtetem mAb 24/16 präzipitiert

L = Zellkontrolle ohne Testplasmid

K3 = Fusionskonstrukt CBD- E^{tns} K3

1219 = E^{tns} -wt Positivkontrolle

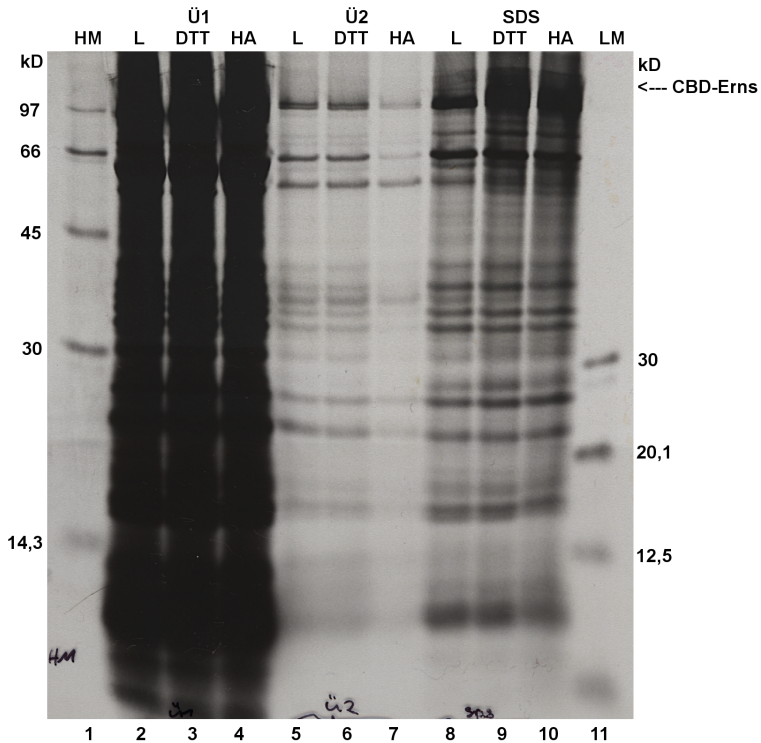


Abbildung 3.23: 2. Nachweis des Fusionsproteins CBD-E^{Erns}

Aufarbeitung des radioaktiv markierten Zellysats einer transienten Vacciniavirus-Expression unter denaturierenden Bedingungen von nicht an die Chitin-Matrix gebundener, nach Intein Spaltung eluierter und nach Intein Spaltung auf der Säule verbliebener Proteine direkt aus dem Überstand. Die Intein-Spaltungsreaktion wurde mit zwei verschiedenen, vom Hersteller empfohlenen Spaltungspuffern durchgeführt.

HM = High molecular weight marker

Ü1 = Überstand nach Proteinbindung an Chitin-Matrix (= nicht gebundene Proteine)

Ü2 = Überstand nach Inkubation mit Spaltungspuffer (= nach Intein Spaltung eluierte Proteine)

SDS = nach Aufkochen mit Laemmli-Puffer (= Proteine, die nach der Intein Spaltung auf der Matrix verblieben waren)

L = Zellkontrolle ohne Testplasmid

DTT = Spaltungspuffer mit DTT

HA = Spaltungspuffer mit Hydroxylamin

LM = Low molecular weight marker

3.1.1.3.2 Affinity®-System Bei dem Affinity®-Expressionssystem wird ein Calmodulin bindendes Peptid (CBP) als „tag“ verwendet. Die aus dem Vektor pCAL-n-EK genommene CBP kodierende Sequenz wurde 5'- oder 3'-terminal an das gewünschte cDNS-Fragment angefügt. Zur Aufreinigung des Ziel-Proteins wird das Zell-Homogenat nach transients Expression über eine mit Calmodulin beschichtete Matrix gegeben; das Fusionsprotein bindet an das Calmodulin. Nach einem Waschschritt kann das Zielprotein entweder mit Enterokinase oder mit Thrombin von dem CBP abgespalten und von der Matrix gewaschen werden.

Konstrukte K15 bis K17 wurden wie in Material & Methoden beschrieben konstruiert. Eine Testspaltung der Plasmide mit XbaI und NcoI zeigte Fragmente in der zu erwartenden Größe von ca. 3700 und 900 Basenpaaren (Abbildung 3.24).

Die E^{ms}Sequenz sowie die angrenzenden Bereiche wurden mit den Primern E05SII, ps17.1, c19.1r und E0Stop sequenziert. Für die weiteren Experimente wurden nur Konstrukte benutzt, die keine Mutationen in diesen Bereichen aufwiesen.

Mit dem mAb 24/16 ließ sich nach Vaccinia-T7-Expression E^{ms} mit indirekter Immunfluoreszenz nachweisen.

In der RIP war das Fusionsprotein mit der zu erwartenden Größe von ca. 50 kD kaum zu detektieren. Stattdessen fanden sich drei Banden bei ca. 27, 29 und 31 kD (nicht gezeigt).

Das gleiche Bandenmuster findet sich nach einer RIP aus dem Überstand nach der Bindungsreaktion an das Calmodulin (Abbildungen 3.25 und 3.26, Spuren 2 - 4).

Das Ergebnis ist unabhängig davon, ob das Zellysat unter denaturierenden oder nicht-denaturierenden Bedingungen gewonnen wurde und von der Konzentration der Kalzium-Ionen, die auf die Calmodulinbindung großen

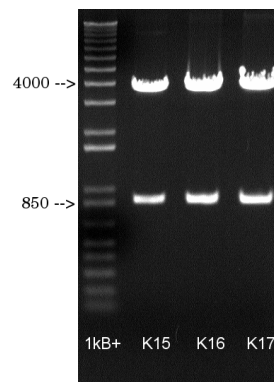


Abbildung 3.24: Testspaltung der Plasmide E^{ms}CBP-pCITE mit XbaI und NcoI
Spur 1: Größenmarker, Spur 2: K15, Spur 3: K16, Spur 4: K17

Einfluß haben sollten.

Im Überstand nach der Spaltung mit Enterokinase findet sich keine spezifische Proteinbande (Abbildungen 3.25 und 3.26, Spuren 5 - 7). Ebenso wenig nach dem Aufkochen des Calmodulins mit Laemmli-Puffer (Abbildungen 3.25 und 3.26, Spuren 8 - 10).

Zur weiteren Abklärung der Frage, ob das gewünschte Fusionsprotein aufgrund von Instabilität in der transienten Expression nicht nachweisbar war, wurde eine *in vitro* Translation durchgeführt. Dabei wies nur die Vektor-Kontrolle (Abbildung 3.27, Spur 4) eine spezifische Bande bei ca. 14 kD auf. Es ist also nicht gelungen das Konstrukt mit den verwendeten Methoden korrekt zu exprimieren.

3 Ergebnisse

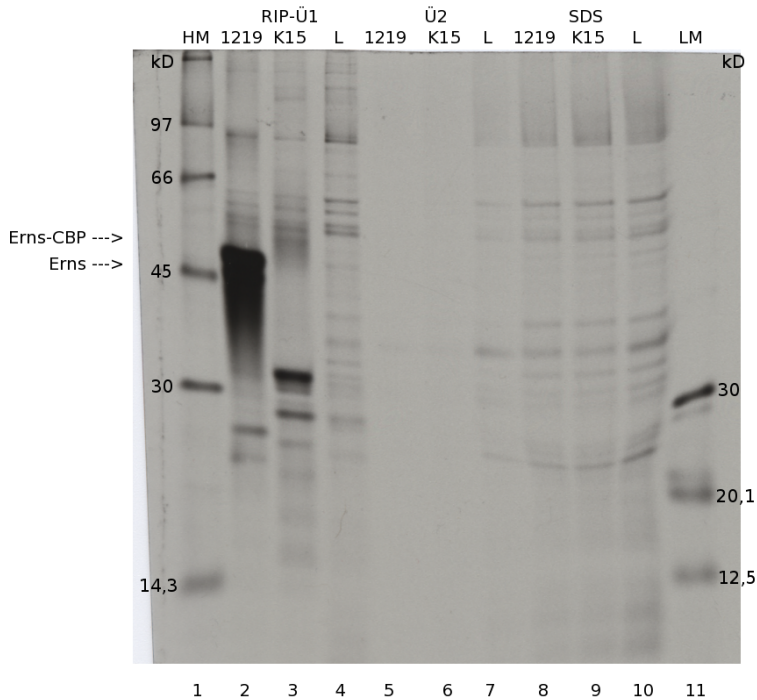


Abbildung 3.25: 1. Nachweis des Fusionsproteins CBP-E^{tns}

Aufarbeitung des radioaktiv markierten Zellysats einer transienten Vacciniavirus-Expression unter denaturierenden Bedingungen; Bindungsreaktion an eine Calmodulin-Matrix mit 2 mM CaCl₂-Bindungspuffer.

HM = High molecular weight marker; RIP-Ü1 = RIP mit gegen E^{tns} gerichtetem mAb 24/16 aus dem Überstand nach Bindungsreaktion an Calmodulin (= nicht gebundene Proteine), Ü2 = Überstand nach der ersten Elution mit Enterokinase enthaltendem Spaltungspuffer (= eluierte Proteine), SDS = Überstand nach Aufkochen mit Laemmli-Puffer (= auf der Matrix verbliebene Proteine), LM = Low molecular weight marker, 1219 = E^{tns}-wt Positivkontrolle, K15 = Fusionskonstrukt CBP-E^{tns} K15, L = Zellkontrolle ohne Testplasmid

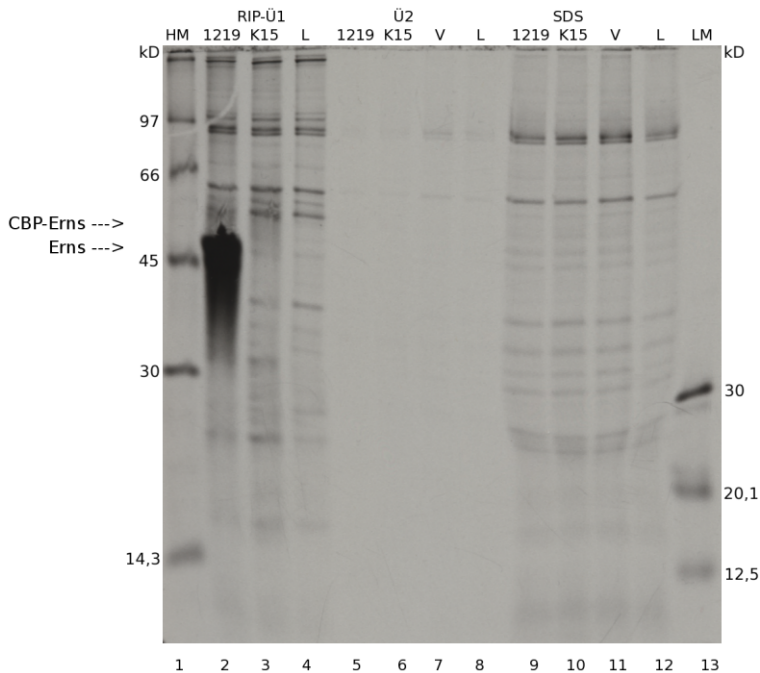


Abbildung 3.26: 2. Nachweis des Fusionsproteins $CBP-E^{tns}$

Aufarbeitung des radioaktiv markierten Zelllysats einer transienten Vacciniavirus-Expression unter nicht-denaturierenden Bedingungen; Bindungsreaktion an eine Calmodulin-Matrix mit 10 mM $CaCl_2$ -Bindungspuffer.

HM = High molecular weight marker, RIP-Ü1 = RIP mit gegen E^{tns} gerichtetem mAb 24/16 aus dem Überstand nach Bindungsreaktion an Calmodulin (= nicht gebundene Proteine), Ü2 = Überstand nach der ersten Elution mit Enterokinase enthaltendem Spaltungspuffer (= eluierte Proteine), SDS = Überstand nach Aufkochen mit Laemmli-Puffer (= auf der Matrix verbliebene Proteine), LM = Low molecular weight marker, 1219 = E^{tns} -wt Positivkontrolle, K15 = Fusionskonstrukt $CBP-E^{tns}$ K15, V = Vektorkontrolle, L = Zellkontrolle ohne Testplasmid

3 Ergebnisse

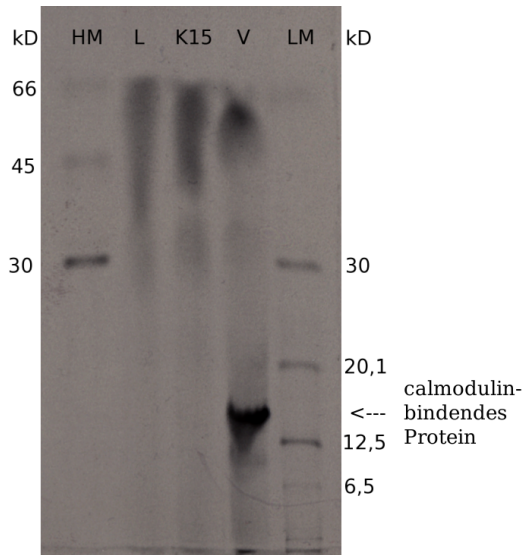


Abbildung 3.27: Analyse der *in vitro* Translation des Konstrukts K15 in einem 10%igen Jagow Gel.

HM = High molecular weight marker, L = Leerkontrolle, K15 = Fusionskonstrukt CBP-
E^{tns} K15, v = pCal-n-Ek Vektorkontrolle, LM = Low molecular weight marker

3.1.1.3.3 Sindbisvirus-Vektor-System In einem weiteren Ansatz, E^{rns} in Säugerzellen zu exprimieren, wurde versucht das Protein über ein Sindbis-Vektor-System in BHK-Zellen ohne weitere Veränderungen zu exprimieren.

Die Konstrukte K18 - K20 wurden wie unter Material und Methoden beschrieben hergestellt. In die für E^{rns} kodierende Sequenz wurden eine XbaI und eine SapI Schnittstelle mittels PCR eingefügt und die Sequenz amplifiziert. Über diese Schnittstellen wurde die E^{rns} kodierende Sequenz in den Vektor pSinRep5 inseriert. Dieser Vektor kodiert nur für den Replikationsapparat des Sindbisvirus, der in der Lage ist, die inserierten Proteine zu vermehren (Replikon). Zur Generierung infektiöser Viruspartikel ist die Zugabe eines Helferplasmids notwendig, welches für die Hüllproteine kodiert. In Kombination dieser beiden Plasmide entsteht so ein zur autonomen Vermehrung kompetentes Virussystem, daß über ein segmentiertes Genom verfügt. Eine Testspaltung der rekombinanten pSinRep5 Plasmide mit XbaI und NotI ergab die zu erwartenden Banden von ca. 9500 und 1100 Basenpaaren (Abbildung 3.28).

Eine Sequenzierung der DNS mit den Primern E05SII, PS17.1, c19.1r, E0Stop wurde durchgeführt, um „second-site“ Mutationen in der für E^{rns} oder die Signalsequenz kodierenden Sequenz auszuschließen. Es wurde nur mit Konstrukten ohne solche Mutationen weitergearbeitet.

Zu Testzwecken wurde zunächst nur mit K18 weitergearbeitet und eine in vitro Transkription mit dem Konstrukt und der Helfer-DNS (DH-EB) als Matrice wie unter Methoden beschrieben durchgeführt. Der Erfolg der in vitro Transkription wurde mit einem RNS-Gel überprüft. Für K18 zeigte sich eine Bande bei ca. 9 kB, für DH-EB zeigten sich zwei Banden die bei

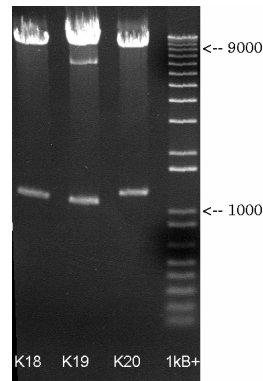


Abbildung 3.28: Testspaltung der pSinRep5- E^{rns} Plasmide K18 - K20 mit XbaI und NotI
Spur 1: Größenmarker; Spur 2: K18, Spur 3: K19, Spur 4: K20

3 Ergebnisse

ca. 7,5 bzw. ca. 6 kB laufen (Abbildung 3.29), anstelle einer einzelnen zu erwartenden Bande bei ca. 6 kB.

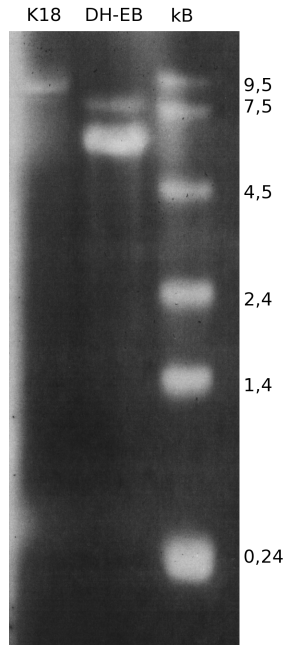


Abbildung 3.29: RNS-Gel mit Proben der *in vitro* transkribierten RNS ausgehend von K18 und DH-EB

Spur 1: K18, Spur 2: DH-EB, Spur 3: Größenmarker

BHK-Zellen wurden mittels Elektroporation mit der K18-RNS und der DH-EB-RNS cotransfiziert. Nach einer ersten Passage der transfizierten Zellen in Gewebekulturflaschen bis zum Auftreten eines zytopathogenen Effekts (zpe) wurden frische BHK-Zellen in 3,5 cm Gewebekulturschalen mit 100 μ l Überstand aus der 1. Passage infiziert. Die Gewebekulturfla-

schen wurden bei -70°C gelagert.

Nach dem Auftreten eines zpe in den Schalen wurden die Zellen mit Aceton/Methanol fixiert und anschließend eine Immunfluoreszenz durchgeführt. Als erster Antikörper kamen mAb 24/16 oder ein gegen Sindbis Virus gerichtetes polyklonales Kanincheserum zum Einsatz. Als zweiter Antikörper wurden entweder α -mouse/ oder α -rabbit/FITC eingesetzt. Als Positivkontrolle für den E^{ms} Nachweis wurden mit CSFV SP50 infizierte SK6-Zellen eingesetzt und mit mAb 24/16 und α -mouse/FITC gefärbt. Als Positivkontrolle für den Nachweis von Sindbis Virus Strukturproteinen wurden BHK-Zellen mit Sindbis-Virus infiziert und mit α -Sindbis und α -rabbit/FITC gefärbt.

In der Immunfluoreszenz leuchteten die mit Transfektionsüberstand infizierten Zellen der beiden Positivkontrollen deutlich grün. Die mit α -Sindbis behandelten Zellen, die mit Überstand von K18 RNA transfizierten Zellen infiziert worden waren, fluoreszierten zu ca. 50% schwach. In den mit mAb 24/16 behandelten Parallelschalen waren nur vereinzelte Zellen fluoreszierend. Auch nach mehreren Passagen der in trans komplementierten Sindbis Virus Replikons ließ sich E^{ms} nur in vereinzelten Zellen nachweisen, Sindbis Virus Strukturproteine hingegen in der überwiegenden Zahl der Zellen.

3.1.2 Funktionsanalysen zu N^{pro}

Aus publizierten Daten gibt es Hinweise, daß N^{pro} modulierend in das Pathogenitätsgeschehen eingreift und somit eventuell einen Pathogenitätsmarker darstellt [66, 90]).

In einem ersten Tierversuch, durchgeführt von Martina von Freyburg, erhielt unsere Arbeitsgruppe keinen Hinweis auf eine Attenuierung von CSFV durch Deletion des N^{pro}. In diesem Versuch wurden vier Schweine mit der CSFV-Mutante E38I6 infiziert. Im Genom dieser Mutante auf Basis des CSFV-Alfort Tübingen ist der überwiegende Teil des N^{pro} Gens durch Ubiquitin ersetzt. Das Ubiquitin dient in dieser Konstruktion als Prozessierungssignal, das für die Generierung des C-Proteins mit korrektem Aminoterminus sorgt.

Als Kontrolle wurden vier Ferkel mit der Mutante E38I2 (N^{pro}-Wildtyp, Ubiquitin-Sequenz eingefügt) infiziert. Die Mutante E38I2 beruht ebenfalls auf CSFV-Alfort Tübingen. In diesem Fall wurde das wt-N^{pro} erhalten. C-Terminal des N^{pro} wurde auch bei dieser Mutante eine Ubiquitin-Sequenz eingefügt. Dies dient dazu, Ubiquitin-Effekte auf Infektiosität und Pathogenität des Virus auszuschließen. Die Infektionsdosis betrug 10⁵ KID₅₀ in 6 ml Medium. 4 ml wurden intranasal (2 ml je Nasenloch), 2 ml i.m. appliziert. Tiere beider Gruppen entwickelten mit Tag 5 p.i. beginnend Fieber über 40°C. Ab Tag 6 p.i. bekamen Tiere aus beiden Gruppen Durchfall, der zum Teil blutig war, wiesen schlechte FA auf, hatten zum Teil Nasenausfluß und alle ein schlechtes AB. Bei allen Tieren kam es zu einer über den gesamten Versuchszeitraum zunehmenden Leukopenie und B-Zell Depletion.

Im Gegensatz zu den oben genannten Ergebnissen erzielten Mayer et al. durch vollständige Deletion des N^{pro} Gens eine vollständige Attenuierung von CSFV Alfort/187 und CSFV Eystруп [66]. In diesen Experimenten wurden die Tiere, im Gegensatz zu dem oben beschriebenen von Martina von Freyburg durchgeführten Versuch, ausschließlich intra nasal infiziert. Aus diesem Grund wiederholten wir die Experimente mit unseren CSFV-ΔN^{pro}-Mutanten mit ausschließlich intra nasaler Infektion (TV 16b, 3.1.2.1).

3.1.2.1 TV 16b

Dieser Versuch diene dazu, daß Ergebnis des oben genannten Tierversuchs (durchgeführt von Martina von Freyburg) zu erhärten. In diesem Versuch wurde jedoch ein höherer Infektionstiter verwendet. Vier Ferkel wurden mit der CSFV-Mutante E38I6 infiziert (Gruppe 45). Als Kontrolle wurden vier Ferkel mit der Mutante E38I2 infiziert (Gruppe 44).

Die Infektionsdosis betrug 5×10^5 KID₅₀ in 4 ml Medium. Die Applikation erfolgte intranasal (2ml je Nasenloch).

In Gruppe 45 wies nur ein Tier (45/2) klinische Zeichen auf. Von Tag 7 p.i. bis Tag 14 p.i. war das AB mittel- bis hochgradig gestört und es hatte Diarrhoe. Ab Tag 10 p.i. trat Nasenausfluß auf, ab Tag 11 p.i. war die FA eingeschränkt oder fehlte ganz. An Tag 14 p.i. wurde das Tier aufgrund des schlechten Allgemeinzustandes geschlachtet.

In Gruppe 44 wies ein Tier (44/2) über 9 Tage, eines (44/4) über 5 und eines (44/3) an zwei Tagen klinische Zeichen auf. Tier 44/2 hatte von Tag 9 bis 17 p.i. ein mittel- bis hochgradig gestörtes AB. An Tag 9 p.i. hatte es blutigen Kot, Durchfall trat an Tag 11 und 15 bis 17 auf. Nasenausfluß trat an den Tagen 10 bis 12 und 14 auf. Von Tag 11 bis Tag 17 p.i. war die FA reduziert oder blieb ganz aus. An Tag 17 p.i. wurde das Tier aufgrund des schlechten Allgemeinzustandes geschlachtet. Tier 44/3 hatte an Tag 10 p.i. Diarrhoe und an Tag 24 p.i. blutigen Kot. Tier 44/4 hatte von Tag 11 bis Tag 13 p.i. Nasenausfluß, an Tag 12 p.i. eine schlechte FA und mittelgradig gestörtes AB. An Tag 19 p.i. hatte es blutigen Kot und ein mittelgradig gestörtes AB. An den Tagen 20 und 22 p.i. war das AB geringgradig gestört.

Die Tiere beider Gruppen entwickelten ab Tag 4 (Gruppe 44) bzw. Tag 6 (Gruppe 45) Fieber über 39°C. In Gruppe 45 traten Temperaturen bis über 40°C, in Gruppe 44 bis über 41°C auf. In beiden Gruppen sank die Temperatur ab Tag 15 (Gruppe 45) bzw. Tag 21 wieder (Tabelle 3.12 und Abbildung 3.30).

In beiden Gruppen kam es zu einem deutlichen Abfall der Leukozytenzahlen, in Gruppe 45 um mehr als 50% auf 5,03 G/l an Tag 7 p.i., in Gruppe

3 Ergebnisse

Tag pi	44/1	44/2	44/3	44/4	45/1	45/2	45/3	45/4
-5	38,3	38,6	39,3	38,8	38,5	38,4	38,7	38,4
-4	38,9	38,6	38,8	38,9	38,6	38,5	38,5	38,6
-3	38,8	38,7	38,5	38,6	38,3	38,6	38,6	38,4
-2	39	38,4	38,7	38,8	38,6	38	38,2	38,1
-1	39,2	38,6	38,8	39	38,5	38,5	38,3	38,6
0	39,1	38,3	38,6	38,9	38,8	38,2	38,6	38,7
1	39,2	38,9	39,6	39,6	39	38	38,7	38
2	39,2	38,9	38,8	39,3	38,9	38	39,3	38,4
3	38,7	38,6	38,7	38,9	38,7	38,5	38,8	39,5
4	39,5	39,1	39	39,4	39,1	38,3	38,6	38,3
5	39,7	39,2	39,4	39,2	38	38,2	38,7	37,9
6	39,5	40,1	39,1	39,2	38,8	39,6	39,3	38,3
7	39,1	39,4	38,9	39,5	38,6	38,8	38,3	38,7
8	39,8	40,3	39,4	39,2	39,1	40	39	38,7
9	39,5	40,4	39,9	39,2	39,1	40,1	39,7	38,8
10	39,5	40,2	40	39,3	39,5	40,3	38,4	39
11	39,9	41,8	40,9	40,1	39,2	40,4	39,3	39,3
12	39,8	40,5	39,6	41,6	39,3	39,8	39,9	39,8
13	39,6	39,8	40,1	39,8	39,4	39,8	38,9	39,8
14	39,2	40,5	40,3	40,3	40,4	40,2*	38,7	39,1
15	40	41,4	40,2	39,8	39	*	38,8	39,1
16	39,8	41,8	40,4	40,2	38,6	*	38,5	38,6
17	39,3	40,2*	40,5	41,1	38,4	*	38,3	38,4
18	39,4	*	40	40,3	38,6	*	38,7	38,5
19	39,1	*	40,3	40,3	38,6	*	38,5	38,4
20	39,4	*	40,3	40,9	38,8	*	38	38,3
21	38,4	*	40,3	40,4	38,3	*	38,4	38,5
22	38,7	*	39	39,1	38,3	*	38,5	38,6
23	39,3	*	40,3	39,5	38,5	*	38,4	38,4

Tabelle 3.12: Körperkerntemperatur der Tiere aus TV 16b in °C

Gruppe 44 = N^{pro} + Ubiquitinsequenz Wildtyp, Gruppe 45 = ΔN^{pro} + Ubiquitinsequenz infiziert

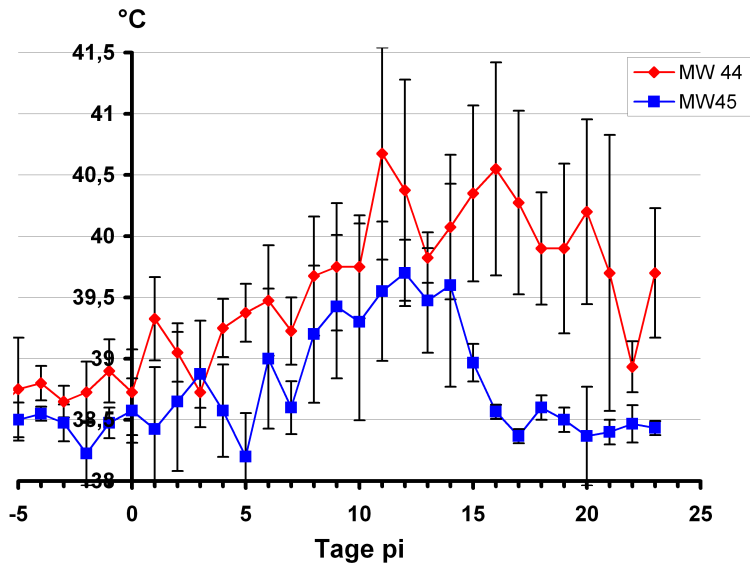


Abbildung 3.30: Körperkerntemperatur der Tiere aus TV 16b

Gruppendurchschnitte, in °C

Gruppe 44 = N^{pro} + Ubiquitinsequenz Wildtyp, Gruppe 45 = ΔN^{pro} + Ubiquitinsequenz

44 mit 9,99 G/l um fast 50%. In Gruppe 45 erholten sich die Leukozytenwerte nach Tag 7 p.i. wieder, und stiegen im Mittel auf 39,93 G/l an. In Gruppe 44 erholten sich die Leukozytenwerte bis zum Versuchsende nicht mehr und bewegten sich immer um etwa 10 G/l (Tabelle 3.13 und Abbildung 3.31).

Die B-Zellzahlen beider Gruppen fielen von Anfangs durchschnittlich 6,2% der Gesamtleukozyten auf 2,21% (Gruppe 44, Tag 12 p.i.) bzw. auf 2,05% (Gruppe 45, Tag 7 p.i.). In Gruppe 45 erholten sich die B-Zellen ab Tag 17 p.i. wieder und stiegen auf Werte über 5%. In Gruppe 44 pendelten sich Werte um 3% bis Versuchsende ein (Tabelle 3.14 und Abbildung 3.32).

Virämie trat bei allen Tieren beider Gruppen auf. In Gruppe 45 dauerte

3 Ergebnisse

Tag pi	44/1	44/2	44/3	44/4	45/1	45/2	45/3	45/4
-1	13,61	14,51	23,82	20,74	13,75	22,27	18,16	19,61
3	8,06	13	14,21	16,1	11,6	14,52	10,13	17,13
5	10,62	8,85	7,34	23,94	7,36	8,13	7,1	12,39
7	8,55	11,94	10,73	8,72	5,37	6,28	2,21	6,24
10	6,83	14,03	14,15	12,6	15,61	15,3	8,75	13,91
12	11,17	6,24	9,16	13,34	19,88	17,54	19,14	16,65
14	13,88	8,92	9,73	6,75	30,89	11,22*	35,52	13,32
17	13,78	5,2*	9,78	14,51	17,59	*	17,41	24,76
21	14,17	*	3,17	7,98	22,5	*	17,11	24,69
26	20,96	*	4,74	8,97	35,09	*	31,4	53,3

in G/l

Gruppe 44 = N^{pro} + Ubiquitinsequenz Wildtyp; Gruppe 45 = Δ N^{pro} + Ubiquitinsequenz infiziert

Tabelle 3.13: *Gesamtleukozytenzahlen der Tiere aus TV 16b*

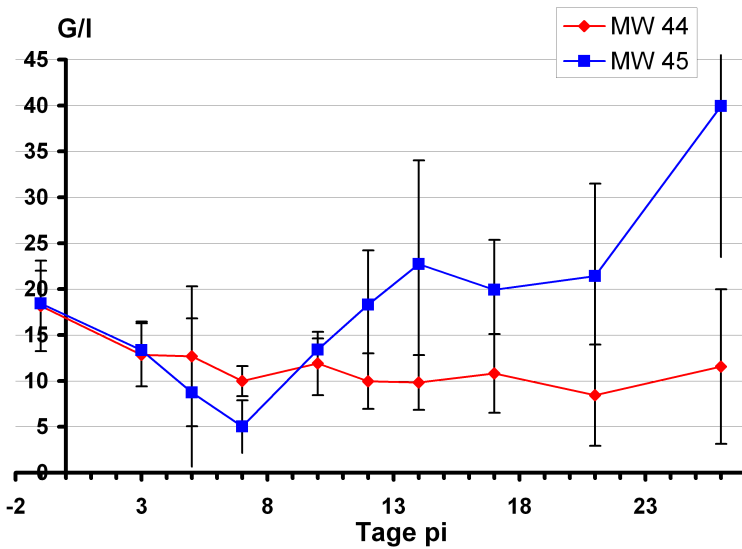


Abbildung 3.31: Leukozytenzahlen der Tiere aus TV 16b

Gruppendurchschnitte, in G/l

Gruppe 44 = N^{pro} + Ubiquitinsequenz Wildtyp, Gruppe 45 = ΔN^{pro} + Ubiquitinsequenz

3 Ergebnisse

Tag pi	44/1	44/2	44/3	44/4	45/1	45/2	45/3	45/4
-1	7,31	4,85	6,86	5,62	9,21	2,56	8,03	4,96
3	9,24	3	6,4	5,34	8,36	12,69	7,68	7,82
5	9,4	3,96	5,52	3,82	4,79	4,88	4,05	4,38
7	3,52	2,9	3,31	5,75	3,1	1,05	1,2	2,86
10	1,81	6,38	1,32	6,16	4,11	0,97	3,78	3,81
12	3,82	2,18	2,82	0,02	4,13	1,04	2,98	1,98
14	8,9	1,38	1,1	1,89	2,4	0,38*	5,26	2,3
17	6,81	1,45*	0,71	2,36	7,78	*	3,62	3,75
26	4,94	*	0,54	2,62	6,52	*	6,6	3,4

Tabelle 3.14: B-Zellzahlen der Tiere aus TV 16b in % der Gesamtleukozyten
 Gruppe 44 = N^{pro} + Ubiquitinsequenz Wildtyp, Gruppe 45 = ΔN^{pro} + Ubiquitinsequenz
 infiziert
 * geschlachtet

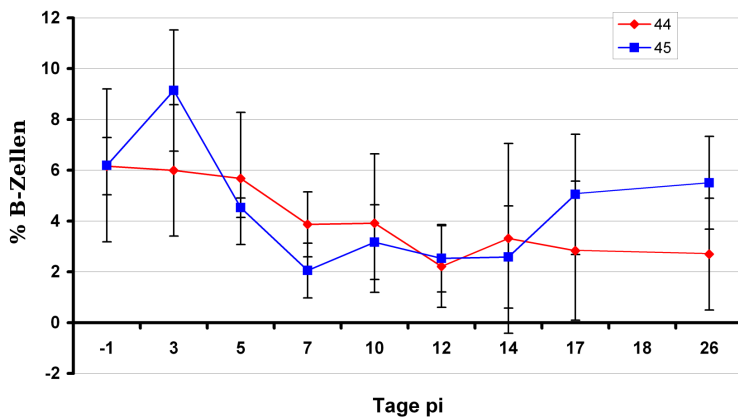


Abbildung 3.32: B-Zellzahlen der Tiere aus TV 16b
 Gruppenschnitt, in % der Gesamtleukozyten; Gruppe 44 = N^{pro} + Ubiquitinsequenz
 Wildtyp, Gruppe 45 = ΔN^{pro} + Ubiquitinsequenz

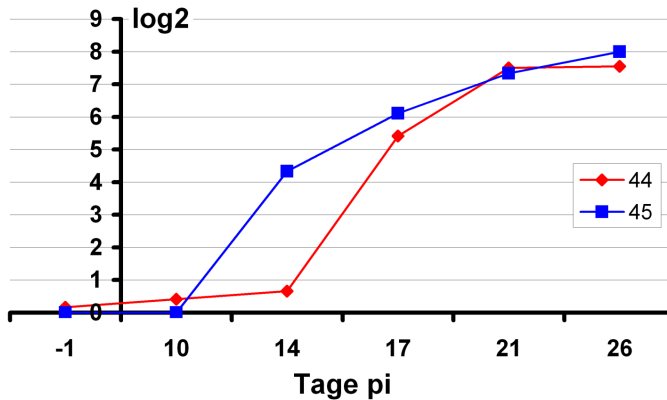


Abbildung 3.33: Durchschnittlicher Antikörpertiter der Tiere aus TV 16b
 Titer in log2, Gruppe 44 = N^{pro} + Ubiquitinsequenz Wildtyp, Gruppe 45 = ΔN^{pro} + Ubiquitinsequenz

die Virämie zwischen 9 und 16 Tagen, bei Tier 45/2 bis zur Schlachtung. In Gruppe 44 dauerte die Virämie zwischen 7 und 24 Tagen, allerdings nur bei Tier 44/1 nicht bis zur Schlachtung (Tabelle 3.15).

Auch aus den Nasenabstrichen ließ sich bei allen Tieren wenigstens an einem Tag CSFV isolieren. In der Gruppe 45 zwischen einem und drei Tagen, in Gruppe 45 bei einem Tier (44/1) an einem, bei den anderen von Tag 10 p.i. an bis zur Schlachtung (Tabelle 3.16).

Die Tiere beider Gruppen entwickelten vergleichbare Titer von neutralisierenden Antikörpern gegen CSFV (Abbildung 3.33).

Dieser Versuch gibt Hinweise auf eine Attenuierung von CSFV durch die Deletion des N^{pro} , die aber nur schwach ausgeprägt ist. Der Krankheitsverlauf war in beiden Gruppen für eine CSFV-Infektion in verschiedenen Beziehungen atypisch. Die Symptomatik der Einzeltiere war stark heterogen. Es läßt sich sagen, daß beim CSFV Alfort Tübingen die Attenuierung durch die Deletion des N^{pro} , wie sie bei der Mutante E38I6 durchgeführt wurde, auch bei intranasaler Infektion nur partiell ist und nicht dazu führt, daß keine Krankheitssymptome mehr auftreten.

3 Ergebnisse

Tage pi	44/1	44/2	44/3	44/4	45/1	45/2	45/3	45/4
0	//	//	//	//	//	//	//	//
3	/+	++	//	/+	++	//	++	//
5	++	++	++	++	++	++	++	++
7	++	++	++	++	//	++	++	++
10	++	//	++	++	/+	++	++	++
12	//	++	++	++	/+	/+	/+	//
14	//	++	++	++	//	++*	/+	/+
17	//	++*	++	++	//	*	//	//
21	//	*	++	++	//	*	//	++
26	//	*	++	++	//	*	//	//

/ = Virusnegativ, + = Viruspositiv

Gruppe 44: N^{pro} Wildtyp + Ubiquitinsequenz, Gruppe 45: ΔN^{pro} + Ubiquitinsequenz

* geschlachtet

Tabelle 3.15: Virusnachweis aus „buffy coat“ Zellen der Tiere aus TV 16b

Tage pi	44/1	44/2	44/3	44/4	45/1	45/2	45/3	45/4
0	//	//	//	//	//	//	//	//
3	//	//	//	+/	//	//	//	//
5	//	//	//	//	//	//	//	//
7	//	//	//	//	//	//	//	//
10	+/	++	++	++	//	+/	++	//
12	//	++	++	++	/+	++	//	++
14	//	++	++	++	//	++*	+/	//
17	//	++*	++	++	//	*	//	//
21	//	*	++	++	//	*	//	//

/ = Virusnegativ, + = Viruspositiv
Gruppe 44: N^{pro} Wildtyp + Ubiquitinsequenz, Gruppe 45: ΔN^{pro} + Ubiquitinsequenz
* geschlachtet

Tabelle 3.16: Virusnachweis aus Nasenabstrichen der Tiere aus TV 16b

3.2 BVDV

Die Planung der beschriebenen Versuche, die Vermehrung und Charakterisierung der Viren für die Infektionen waren Bestandteil der vorliegenden Arbeit. Die Infektion von Rindern, Erfassung klinischer Parameter und Probenentnahmen für die Laboruntersuchungen wurden in Felcsút, Ungarn, durchgeführt. Die Laboruntersuchungen wurden dann im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt und ausgewertet.

3.2.1 Studien zum Schutz vor diaplazentarer Übertragung

Eines der zentralen Probleme bei pestiviralen Infektionen, insbesondere bei Infektionen mit BVDV, ist die diaplazentare Infektion der Föten. Diese fötale Infektion führt in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Infektion während der Trächtigkeit zum Fruchttod, Geburt lebensschwacher oder mißgebildeter Kälber oder zur Geburt persistent infizierter, scheinbar gesunder Kälber. Das Ziel jeder BVDV Vakzineentwicklung ist deshalb, durch die Impfung eine belastbare Immunität zu induzieren. Bei Lebendimpfstoffen sollte zudem erreicht werden, daß das Impfvirus selber nicht zu einer diaplazentaren Infektion des Fötus führt.

Zu diesem Zweck wurden in unserem Labor verschiedene BVDV-Mutanten entwickelt. Alle hier eingesetzten Mutanten basieren auf dem nzp BVDV-2 NY93/C und wurden von Christiane Meyer konstruiert. XIKE-A besitzt wt-Sequenz, bei XIKE-A-NdN wurde das N^{pro} bis auf die ersten 4 Kodons deletiert. XIKE-B ist eine Mutante, deren E^{ms} durch Deletion des H349 keine RNase-Aktivität mehr aufweist, und XIKE-B-NdN weist sowohl die Deletion des H349 als auch die oben genannte Deletion des N^{pro} auf.

Während die Deletion des H349 in XIKE-B keinen Einfluß auf die Wachstumseigenschaften des Virus hatte [70], bewirkte die Einführung der N^{pro}-Deletion eine Reduktion des Endtiters um ca. 1 log Stufe bei XIKE-A-NdN, bzw. um ca. 1,5 log Stufen bei XIKE-B-NdN (Daten nicht gezeigt, Publikation in Vorbereitung).

Die Tierversuche im Rahmen der fötalen Schutzstudien wurden durchgeführt, um zu untersuchen, ob die jeweiligen Virusmutanten in der Lage

sind, im graviden Tier auf den Fötus überzugehen und diesen zu infizieren. Dazu wurden tragende Rinder zwischen dem 60. und 90. Tag der Trächtigkeit infiziert. Eine tierärztliche Kontrolle der Trächtigkeit erfolgte vor der Infektion, einen Monat danach und zu Ende der Versuche. Geschlachtet wurden die Tiere zwei Monate nach der Infektion.

Die folgenden klinischen Parameter wurden erfaßt: Appetitlosigkeit, Tränenfluß, Konjunktivitis, Nasenausfluß, orale Erosionen und Haemorrhagien, Durchfall, Husten und Atemfrequenz sowie Erosionen im Klauenbereich.

3.2.1.1 RNase negative Mutante XIKE-B

Drei trächtige Rinder wurden mit der RNase[⊖] BVDV-Mutante XIKE-B infiziert. Die Infektionsdosis betrug 2×10^5 KID₅₀ in 2 ml Volumen, die Applikation erfolgte intramuskulär.

Tier # 1464 wies keinerlei klinische Symptomatik auf. Tier # 1438 hatte an Tag 12 p.i. Husten, Tier # 1585 hatte an Tag 10 eine reduzierte FA und an den Tagen 10 - 13 Husten.

Eines der Tiere (# 1438) wies an Tag 2 p.i. eine erhöhte Temperatur von 39,0°C auf, ein weiteres (# 1585) hatte an Tag 9 p.i. Fieber von 40,8°C. Bei den anderen Tieren, und an den anderen Tagen blieb die Temperatur unter 39°C.

Nur eines der Tiere (# 1464) hatte an drei Tagen eine Leukopenie (Tab. 3.17).

Bei keinem der Tiere konnte Virus im „buffy coat“ nachgewiesen werden.

Zwei Monate nach der Infektion (zwischen dem 120. und 150. Tag der Trächtigkeit) wurden die Tiere getötet, von den Föten die unter Methoden (2.2.12.9) genannten Organe entnommen und auf BVDV hin untersucht. Bei zwei Tieren konnte Virus in den fötalen Gewebeproben nachgewiesen werden, während die Plazenta in allen drei Fällen virusnegativ blieb (Tab. 3.18).

Aus jeweils einer viruspositiven Probe je Tier wurde RNS extrahiert. Nach einer RT-PCR mit den Primern BVD32III und CM21 wurde das amplifizierte cDNS Fragment mit denselben Primern sequenziert. Weder in den Bereichen der für E^{rns} noch der für N^{pro} kodierenden Sequenzen wurden unerwünschte Mutationen gefunden, die Deletion des H349 war in allen Fällen erhalten.

Nach diesen Ergebnissen ist es offensichtlich, daß für BVDV die alleinige Elimination der RNase-Aktivität des E^{rns} die diaplazentare Infektion der Föten nicht verhindert, selbst wenn das Virus für das adulte Tier weitgehend apathogen ist.

<i>Tiernummer</i>	<i>Tag post infectionem</i>														
	-2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1438	8,4	12,8	17,4	10,1	5,4	5,6	7,3	5,7	7,0	10,4	15,1	15,3	13,2	9,6	10,0
1464	10,2	12,5	11,7	9,0	6,0	8,7	5,4	6,6	6,1	11,8	12,5	9,9	11,2	6,6	8,8
1585	6,9	7,5	7,9	8,9	8,9	4,4	8,4	5,2	7,6	8,7	16,8	15,3	6,7	7,7	6,4
in G/l															

Tabelle 3.17: Gesamtleukozyten (in G/l) von XIKE-B infizierten Tieren

Tier Nr.	Abdominal- Flüssigkeit	Thorakal- Flüssigkeit	Mesenterial- Lymphknoten	Dünndarm	Milz	Thymus	Niere	sternales		Kleinhirn	Plazenta
								Knochenmark			
1438	NA	NA	//	//	//	//	//	//		//	//
1464	++	NA	++	++	++	++	++	++		++	//
1585	++	++	++	++	++	++	++	++		++	//

Doppelanimpfung, / = Virusnegativ, + = Viruspositiv, NA = nicht vorhanden

Tabelle 3.18: Virusnachweis in fötalem Gewebe nach Infektion der Muttertiere mit XIKE-B

3.2.1.2 N^{pro} Deletionsmutante XIKE-A-NdN

Es ist publiziert, daß die Anwesenheit von pestiviralem N^{pro} mit einer Inhibition der Interferonantwort der infizierten Zelle korreliert [90]. Interferon ist ein wichtiger Botenstoff der angeborenen Immunität im Kampf gegen Infektionserreger. Da die Unterbindung der Interferonantwort eine zentrale Rolle bei der Etablierung einer persistenten Infektion nach diaplazentarer Übertragung von BVDV auf den Fötus spielen soll [12], ist es möglich, daß N^{pro} eine entscheidende Rolle bei der Generierung persistent infizierter Kälber spielt.

Mit der für adulte Tiere apathogenen, N^{pro}deletierten BVDV-2 Mutante XIKE-A-NdN sollte im Tierexperiment kontrolliert werden, ob eine diaplazentare Infektion der Föten ohne N^{pro} verhindert werden kann.

Fünf trächtige Rinder wurden zwischen Tag 60 und 90 der Trächtigkeit mit der N^{pro}deletierten BVDV-2-Mutante XIKE-A-NdN infiziert. Die Infektionsdosis betrug 2×10^5 KID₅₀ in 2 ml Volumen, die Applikation erfolgte intramuskulär.

Als einziges Tier zeigte Tier # 1583 an Tag 8 p.i. eine reduzierte FA, weitere Symptome traten nicht auf.

In einem der Tiere (# 1637) wurde kein Fötus gefunden.

Tier # 1583 hatte an Tag 8 p.i. Fieber von 39,9°C, Tier # 1621 zeigte an Tag 5 p.i. erhöhte Temperatur von 39,0°C. Bei den anderen Tieren, und an den anderen Tagen blieb die Temperatur unter 39°C.

Drei der Tiere (# 1562, 1583 und 1596) hatten an mindestens einem Tag einen Abfall der Leukozytenzahl von mindestens 40%. Die beiden anderen Tiere wiesen keine Leukopenie auf (Tab. 3.19).

Bei keinem der Tiere konnte Virus im „buffy coat“ nachgewiesen werden.

Zwei Monate nach der Infektion (zwischen dem 120. und 150. Tag der Trächtigkeit) wurden die Tiere getötet, von den Föten die unter Methoden (2.2.12.9) genannten Organe entnommen und auf BVDV hin untersucht. In den Gewebeproben der vier vorhandenen Föten (von den Tieren # 1562, 1583, 1596 und 1621) konnte bei den Föten der Tiere # 1583, 1596 und 1621 BVDV nachgewiesen werden. Das fünfte Tier (#1637) war zum Zeitpunkt der Schlachtung trotz vorangegangener, positiver Träch-

keitsuntersuchung nicht tragend, der wahrscheinlich stattgefundenen Abort ist nicht beobachtet worden. Von diesem Tier wurden Gewebeprobe des Uterus untersucht, die BVDV-frei waren (Tab. 3.20).

Aus jeweils einer virulativen Probe je Tier wurde RNS extrahiert. Nach einer RT-PCR mit den Primern BVD32III und CM21 wurde mit denselben Primern eine Sequenzierung des amplifizierten cDNA Fragments durchgeführt. Im Bereich der für E^{ms} kodierenden Aminosäuren wurde keine Mutation gefunden. Die N^{pro}-Deletion war erhalten und in den verbliebenen für N^{pro} kodierenden AS war keine Mutation.

<i>Tiernummer</i>	<i>Tag post infectionem</i>													
-2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1562	8,5	9,9	7,3	8,6	7,6	5,2	4,7	5,5	6,0	7,3	13,5	10,6	11,8	8,3 7,4
1583	9,8	8,2	9,1	10,9	7,1	5,4	5,5	5,8	5,5	6,2	9,2	8,7	7,5	6,4 7,1
1596	7,8	5,5	5,0	4,5	9,1	4,3	5,3	4,1	5,0	7,5	9,9	7,2	6,0	6,6 5,4
1621	5,8	7,3	8,5	8,4	6,2	5,7	7,0	6,0	8,0	6,3	12,6	8,6	6,9	7,4 8,6
1637	9,0	15,7	13,9	12,9	11,7	9,7	12,4	9,1	11,4	12,0	16,8	14,9	13,9	11,0 13,0
in G/l														

Tabelle 3.19: Gesamtleukozyten in G/l von Tieren infiziert mit XIKE-A-NdN

Tier Nr.	Abdominal-	Thorakal-	Mesenterial-	Dünndarm	Milz	Thymus	Niere	steriles		
	Flüssigkeit	Flüssigkeit	Lymphknoten					Knochenmark	Kleinhirn	Plazenta
1562	NA	NA	//	//	//	//	//	//	//	//
1583	++	NA	//	//	++	++	++	+/	++	//
1596	++	++	++	++	++	/+	++	++	++	//
1621	++	++	//	++	++	++	++	++	++	//
1637*	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	//*

Doppelanimpfung, / = Virusnegativ, + = Viruspositiv, NA = nicht vorhanden

* Kein Fötus vorhanden, Uterusprobe

Tabelle 3.20: Virusnachweis in fötalem Gewebe nach Infektion der Muttertiere mit XIKE-A-NaIV

3.2.1.3 RNase negative, N^{pro}-deletierte Doppelmutante XIKE-B-NdN

Die Untersuchungen zur transplazentaren Übertragbarkeit von entweder RNase[⊖] oder N^{pro}-deletierter BVDV-2 Mutanten auf Föten ergab, daß keine der beiden Veränderungen alleine die Infektion der Föten verhindern konnte. Da sowohl N^{pro} als auch E^{rms} in der Diskussion stehen, mit der angeborenen Immunreaktion der Zelle zu interferieren, wurde als weiterer Ansatzpunkt eine Kombination beider Marker in einem Virusgenom erstellt und weitere Experimente mit der davon abgeleiteten RNase[⊖], ΔN^{pro} BVDV-2 Doppelmutante (XIKE-B-NdN) durchgeführt.

Fünf trächtige Rinder wurden mit der RNase[⊖], N^{pro}-deletierten BVDV-2 Mutante XIKE-B-NdN infiziert. Die Infektionsdosis betrug 10⁵ KID₅₀ in 6 ml Volumen, die Applikation erfolgte intranasal.

Bei keinem der Tiere trat eine Störung des Allgemeinbefindens auf, die Körpertemperaturen blieben innerhalb der physiologischen Grenzen und es kam zu keiner Leukopenie.

Bei keinem der Tiere konnte Virus im „buffy coat“ nachgewiesen werden.

Zwei Monate nach der Infektion (zwischen dem 120. und 150. Tag der Trächtigkeit) wurden die Tiere getötet, von den Föten die unter Methoden (2.2.12.9) genannten Organe entnommen und auf BVDV hin untersucht. Es konnte in keiner der fötalen Gewebeproben Virus nachgewiesen werden (Tab. 3.21). Trotzdem ist davon auszugehen, daß die Infektion erfolgreich war, denn alle Tiere entwickelten neutralisierende Ak.

<i>Tier Nr.</i>	<i>Abdominal- Flüssigkeit</i>	<i>Thorakal- Flüssigkeit</i>	<i>Mesenterial- Lymphknoten</i>	<i>Dünndarm</i>	<i>Milz</i>	<i>Thymus</i>	<i>Niere</i>	<i>sternales Knochenmark</i>	<i>Kleinhirn</i>	<i>Plazenta</i>
0921	//	NA	NA	//	//	//	//	//	//	//
1013	//	NA	NA	//	//	//	//	//	//	//
1015	//	NA	NA	//	//	//	//	//	//	//
1055	//	NA	NA	//	//	//	//	//	//	//
1075	//	NA	NA	//	//	//	//	//	//	//

Doppelanimpfung, / = Virusnegativ, + = Viruspositiv, NA = nicht vorhanden

Tabelle 3.21: Virusnachweis in fötalem Gewebe nach Infektion der Muttertiere mit XIKE-B-NIN

3.2.2 Studien zur Überprüfung der Vakzinierungseffizienz

Die nachfolgend beschriebenen Tierversuche wurden durchgeführt, um zu sehen ob mit BVDV XIKE-B-NdN geimpfte Tiere nach erfolgreicher Bedeckung und Belastungsinfektion Schutz vor Krankheitssymptomen und diaplazentarer Übertragung zeigen würden. Die ausgewählten Tiere wurden intramuskulär einmalig immunisiert, die Impfdosis betrug in allen Fällen 10^5 KID₅₀ .

Ca. vier Wochen nach der Immunisierung erfolgte die Besamung. Eine tierärztliche Kontrolle der Trächtigkeit erfolgte vor der Infektion, einen Monat danach und zu Ende der Versuche. Die Infektion für den Belastungstest erfolgte zwischen dem 60. und 90. Tag der Gravidität.

Die folgenden klinischen Parameter wurden erfaßt: Appetitlosigkeit, Tränenfluß, Konjunktivitis, Nasenausfluß, orale Erosionen und Haemorrhagien, Durchfall, Husten und Atemfrequenz sowie Erosionen im Klauenbereich.

Es wurden zwei voneinander unabhängige Belastungsversuche durchgeführt.

3.2.2.1 Erster Belastungsversuch

In diesem Versuch wurden je fünf Tiere mit XIKE-B beziehungsweise mit XIKE-B-NdN geimpft (Gruppe 2 und Gruppe 4). Nach der Impfung traten weder lokal an der Impfstelle noch systemisch Reaktionen auf.

Der Belastungstest erfolgte in der Gruppe 2 mit dem Typ 1 BVDV KE9 und in der Gruppe 4 mit dem Typ 2 BVDV KE13. Zusätzlich wurden jeweils zwei trächtige, nicht geimpfte Tiere als Kontrollen mit BVDV KE9 (Gruppe 1) oder mit BVDV KE13 (Gruppe 3) infiziert. Zwischen Tag 0 und 42 post challenge (pc) wies keines der Tiere klinische Symptome auf.

Die Körperkerntemperatur der Tiere betrug bei allen zwischen 37,9 und 38,6°C von Tag -5 p.i. bis einschließlich Tag 21 pc. Danach wurde auf eine weitere Aufzeichnung der Werte verzichtet.

Die beiden Tiere der Gruppe 1 wiesen von Tag 4 bis Tag 8 pc eine deutliche Leukopenie auf. Die Tiere der Gruppe 2, mit Ausnahme der Tiere #1214 und #1218, hatten keinen signifikanten Abfall der Leukozytenzahl (Tab. 3.22 und Abbildung 3.34). Tier 1214 hatte an den Tagen 10 und 14 - 16, das Tier 1218 an den Tagen 4 - 8 pc eine geringgradige Leukopenie.

Die Gruppe 3 hatte von Tag 4 bis 8 pc eine leichte Depression der Leukozyten, die Gruppe 4 wiederum hatte, mit einer Ausnahme, keinen signifikanten Abfall der Leukozytenzahl (Tab. 3.23 und Abbildung 3.34). Tier #1156 der Gruppe 4 wies an den Tagen 2 sowie 12 - 16 eine leichte Leukopenie auf.

Bis auf die drei Ausreißer der Gruppen 2 und 4 war der Verlauf der Leukozyten-Zahlen nur geringen Schwankungen innerhalb der jeweiligen Gruppen unterworfen.

In den Kontrollgruppen waren die „buffy coat“ Zellen aller Tiere an mindestens drei Tagen viruspositiv. Am längsten hielt die Virämie bei Tier #1126 mit dreizehn Tagen an, bei dem zweiten Tier der Gruppe 1 (#1249) nur drei Tage. In der Gruppe 3 dauerte die Virämie bei Tier #1104 sieben, bei Tier #1108 fünf Tage lang an (Tab. 3.24 und 3.25).

Bei den Tieren der beiden geimpften Gruppen ließ sich keine Virämie nachweisen (Tab. 3.24 und 3.25).

Zwei Monate nach der Belastungsinfektion (zwischen dem 120. und 150. Tag der Trächtigkeit) wurden die Tiere getötet, von den Föten die

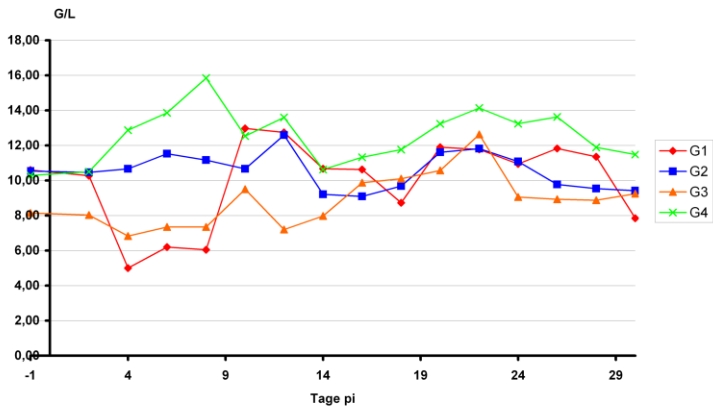


Abbildung 3.34: Durchschnittliche Gesamtleukozytenzahl der Tiere aus dem 1. Belastungsversuch

G1 = Kontrollgruppe, KE9 infiziert; G2 = Impfgruppe XIKE-B, KE9 infiziert; G3 = Kontrollgruppe, KE13 infiziert; G4 = Impfgruppe XIKE-B-NdN, KE13 infiziert

Tiernummer	Gruppe 1															
	Tage nach Belastungsinfektion															
	-1	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30
1249	11.2	12.25	4.9	6.3	6.6	12.75	11.3	10.4	9.6	8.6	11.2	12.2	12.0	11.8	10.35	7.45
1126	10.0	8.3	5.1	6.1	5.5	13.2	14.2	10.95	11.65	8.85	12.6	11.35	9.9	11.85	12.35	8.25
Tiernummer	Gruppe 2															
	Tage nach Belastungsinfektion															
	-1	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30
1200	13.2	13.1	15.2	14.75	17.3	13.65	16.5	12.8	10.6	11.5	13.25	13.2	13.75	11.2	10.05	11.75
1217	9.35	8.00	9.4	14.25	10.4	11.05	15.0	10.35	8.05	8.15	12.70	10.8	11.75	10.3	12.2	7.95
1197	11.25	11.05	12.5	11.8	8.4	11.70	8.95	6.1	8.45	8.8	9.45	12.15	12.05	9.05	9.75	8.5
1214	8.85	9.35	9.2	10.2	12.8	7.45	10.6	7.7	7.6	11.05	10.7	10.85	8.75	9.1	7.8	10.2
1218	10.05	10.8	7.0	6.65	6.9	9.45	11.9	9.1	10.75	8.9	11.95	12.1	9.1	9.2	7.9	8.7
in G/L																
Gruppe 1: Kontrolle, Gruppe 2: XIKE-B geimpft, beide Gruppen KE9 belastet																

in G/L

Gruppe 1: Kontrolle, Gruppe 2: XIKE-B-geimpft;
beide Gruppen KE9 belastet

Tabelle 3.22: Gesamteukozytenzahlen der Tiere aus den Gruppen 1 und 2 des ersten Belastungsversuchs

Gruppe 3															
Tage nach Belastungsinfektion															
Tiernummer	-1	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	30
1108	8,5	8,3	7,65	8,5	9,4	8,75	8,8	7,95	11,65	11,8	12,9	14,05	10,65	9,95	10,4
1104	7,8	7,75	6	6,2	5,3	10,25	5,6	8,0	8,1	8,4	8,25	11,2	7,45	7,9	8,1
Gruppe 4															
Tage nach Belastungsinfektion															
Tiernummer	-1	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	30
1152	10,1	9,85	12,2	12,25	14,7	12,9	15,4	9,2	10,5	12,6	14,8	13,3	15,7	10,7	13,2
1151	9,85	8,30	11,75	14,35	15,55	12,2	13,75	10,85	13,55	9,35	13,5	20,1	16,15	13,75	10,8
1145	13,3	15,6	15,00	15,9	21,3	13,4	16,9	14,05	10,9	14,0	13,8	14,35	12,5	14,25	12,0
1156	10,1	9,3	16,85	16,0	15,9	15,75	9,55	9,3	9,5	12,6	13,75	12,35	12,3	17,85	11,45
1216	8,1	9,45	8,55	10,85	11,8	8,45	12,4	9,75	12,2	10,25	10,35	10,6	9,6	11,6	9,96

in G/L

Gruppe 3: Kontrolle, Gruppe 4: XIKE-B-NdN geimpft;
beide Gruppen KE13 belastet

Tabelle 3.23: Gesamtleukozytenzahlen der Tiere aus den Gruppen 3 und 4 des ersten Belastungsversuchs

Gruppe 1																	
Tiernummer		Tage nach Belastungsinfektion															
		0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30
1126		//	//	++	+ /	++	/ +	//	/ +	/ +	//	//	//	//	//	//	//
1249		//	//	//	//	++	/ +	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//
Gruppe 2																	
Tiernummer		Tage nach Belastungsinfektion															
		0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30
1214		//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//
1218		//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//
1197		//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//
1217		//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//
1200		//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//
Doppelanimpfung, / = Virusnegativ, + = Viruspositiv																	
Gruppe 1: Kontrolle, Gruppe 2: XIKE-B geimpft;																	
beide Gruppen KE9 belastet																	

Tabelle 3.24: Virusnachweis in „buffy coat“ Zellen von Tieren aus den Gruppen 1 und 2

Gruppe 3															
Tage nach Belastungsinfektion															
Tiernummer	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	30
1104	//	//	++	+/	++	/+	//	/+	/+	//	//	//	//	//	//
1108	//	//	//	//	++	/+	//	//	//	//	//	//	//	//	//
Gruppe 2															
Tage nach Belastungsinfektion															
Tiernummer	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	30
1145	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//
1151	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//
1152	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//
1156	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//
1216	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//

Doppelanimpfung, / = Virusnegativ, + = Viruspositiv
Gruppe 3: Kontrolle, Gruppe 4: XIKE-B-NdN geimpft;
beide Gruppen KEI3 belastet

Tabelle 3.25: Virusnachweis in „buffy coat“ Zellen von Tieren aus den Gruppen 3 und 4

unter Methoden (2.2.12.9) genannten Organe entnommen und auf BVDV hin untersucht. Für Tier # 1218 wurde trotz vorheriger positiver Trächtigkeitsuntersuchung kein Fötus gefunden. Ein Abort wurde nicht beobachtet. Zur Untersuchung wurde eine Probe des Uterus entnommen. In nahezu allen Gewebeproben der Föten beider Kontrollgruppen wurde Virus reisoliert. Einzig aus der Plazenta-Probe von Tier #1108 in Gruppe 3 konnte kein BVDV isoliert werden (Tab. 3.26 und 3.27). Dagegen war es nicht möglich, in den Gewebeproben der Föten der geimpften Gruppen BVDV nachzuweisen (Tab. 3.26 und 3.27).

Serumproben wurden bei Versuchsbeginn und einen Monat nach der Impfung, direkt vor und einen Monat nach der Belastungsinfektion sowie am Versuchsende gewonnen. Es wurden zwei Neutralisationstests durchgeführt. Im ersten wurde auf neutralisierende Antikörper gegen BVDV-2 untersucht, im zweiten auf nAk gegen BVDV-1.

Antikörper gegen BVDV-2 stiegen nach der Impfung in Gruppe 2 (Impfung: XIKE-B, Belastungsinfektion: Typ 1 BVDV KE9) auf Werte zwischen $1:2^{8,7}$ und $1:2^{10,7}$, die der Gruppe 4 (Impfung: XIKE-B-NdN, Belastungsinfektion: Typ 2 BVDV KE13) zwischen $1:2^6$ und $1:2^{10}$. Nach der Belastungsinfektion erreichten die Titer am Ende des Versuchs nur geringfügig höhere Werte in Gruppe 2, in Gruppe 4 hingegen stiegen die Werte um das vier- bis achtfache. In Gruppe 1 blieben die Titer mit $1:2^{5,3}$ und $1:2^8$ deutlich unter denen der geimpften Gruppe und denen der Gruppe 3, die mit $1:2^{10,7}$ und $1:2^{10,3}$ das gleiche Maximum erreichten wie die geimpften Tiere (Abbildung 3.35).

Antikörper gegen BVDV-1 stiegen nach der Impfung zunächst gar nicht oder nur minimal. Einzig in Gruppe 2 erreichten drei Tiere Werte um $1:2^3$. Zum Zeitpunkt der Belastungsinfektion waren die Titer der Gruppe 2 auf $1:2^5$ bis $1:2^6$ angestiegen, die der Gruppe 4 auf etwa $1:2^2$, mit Tier #1156 als Ausreißer mit einem Antikörper-Titer von $1:2^6$. Die Tiere der Kontrollgruppen wiesen mit einer Ausnahme keinen nennenswerten Titer auf, nur Tier #1249 hatte einen Anfangstiter von $1:2^6$, was darauf schließen läßt, daß dieses Tier bereits vor dem Versuch eine BVDV-1 Infektion hatte. Die dabei erworbene Immunität war allerdings nicht ausreichend um die Infektion der Föten zu verhindern (Tab. 3.26). Nach der Belastungsinfektion stiegen die Titer in allen Gruppen deutlich an. In den geimpften Gruppen

Gruppe 1										
Tier Nr.	Abdominal- Flüssigkeit	Thorakal- Flüssigkeit	Mesenterial- Lymphknoten	Dünndarm	Milz	Thymus	Niere	sternales Knochenmark	Kleinhirn	Plazenta
1126	++	NA	++	++	++	++	++	++	++	++
1249	++	NA	++	++	++	++	++	++	++	/ +
Gruppe 2										
Tier Nr.	Abdominal- Flüssigkeit	Thorakal- Flüssigkeit	Mesenterial- Lymphknoten	Dünndarm	Milz	Thymus	Niere	sternales Knochenmark	Kleinhirn	Plazenta
1214	NA	NA	//	//	//	//	//	//	//	//
1218*	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	//*
1197	//	NA	//	//	//	//	//	//	//	//
1217	//	NA	//	//	//	//	//	//	//	//
1200	//	NA	//	//	//	//	//	//	//	//

Doppelanimpfung, / = Virusnegativ, + = Viruspositiv, NA = nicht vorhanden, * = kein Fötus, stattdessen Probe der Gebärmutter

Gruppe 1: Kontrolle, Gruppe 2: XIKE-B geimpft;
beide Gruppen KE9 belastet

Tabelle 3.26: Virusnachweis in Organproben von Föten aus Tieren der Gruppen 1 und 2

Gruppe 3										
Tier Nr.	Abdominal- Flüssigkeit	Thorakal- Flüssigkeit	Mesenterial- Lymphknoten	Dünndarm	Milz	Thymus	Niere	sternales Knochenmark	Kleinhirn	Plazenta
1108	+/	NA	++	++	++	++	++	++	++	//
1104	++	NA	++	++	++	++	++	++	++	/+
Gruppe 4										
Tier Nr.	Abdominal- Flüssigkeit	Thorakal- Flüssigkeit	Mesenterial- Lymphknoten	Dünndarm	Milz	Thymus	Niere	sternales Knochenmark	Kleinhirn	Plazenta
1145	//	NA	//	//	//	//	//	//	//	//
1156	//	NA	//	//	//	//	//	//	//	//
1216	//	NA	//	//	//	//	//	//	//	//
1151	NA	NA	//	//	//	//	//	//	//	//
1152	//	NA	//	//	//	//	//	//	//	//

/ = Virusnegativ, + = Viruspositiv, NA = nicht vorhanden

Gruppe 3: Kontrolle, Gruppe 4: XIKE-B-NDN geimpft, beide Gruppen KEI3 belastet

Tabelle 3.27: Virusnachweis in Organproben von Föten aus Tieren der Gruppen 3 und 4

/ = Virusnegativ, + = Viruspositiv, NA = nicht vorhanden
Gruppe 3: Kontrolle, Gruppe 4: XIKE-B-NdN getimpft;
beide Gruppen KEI.3 belastet

erreichten sie ihr Maximum einen Monat nach der Belastung, um bis zum Ende des Versuchs auf Werte von $1:2^7$ bis $1:2^{10}$ (Gruppe 2), bzw. von $1:2^4$ bis $1:2^{5,3}$ (Gruppe 4) zu fallen. Die beiden Kontrollgruppen erreichten ihr Maximum erst am Ende des Versuchs, mit Werten von $1:2^{11}$ und $1:2^{11,3}$ (Gruppe 1), bzw. von $1:2^{5,7}$ bis $1:2^{8,3}$ (Gruppe 3) (Abbildung 3.36).

Zusammenfassend läßt sich die Schlußfolgerung ziehen, daß mit BVDV infizierte trächtige Kühe, die zuvor mit den BVDV-2-Mutanten geimpft worden waren, gegen die Belastungsinfektion geschützt waren. Dabei ist festzuhalten, daß die XIKE-B geimpften Tiere einer Belastung mit heterologem Virus (BVDV-1) ausgesetzt wurden, während bei den mit der Doppelmutterante immunisierten Tieren ein anderer BVDV-2 Stamm für die Belastung verwendet wurde. Die Immunität war ausreichend, um die Föten vor einer Infektion zu schützen.

3 Ergebnisse

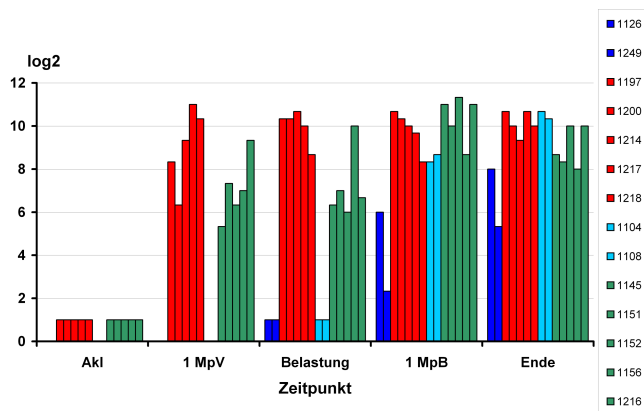


Abbildung 3.35: *SNT gegen BVDV-2 KE13*

Gruppe 1 (Kontrolle, KE9): 1126, 1249; Gruppe 2 (geimpft XIKE-B, KE9): 1197, 1200, 1214, 1217, 1218; Gruppe 3 (Kontrolle, KE13): 1104, 1108; Gruppe 4 (geimpft XIKE-B-NdN, KE13): 1145, 1151, 1152, 1156, 1216

Akl = Akklimation, 1 MpV = 1 Monat nach Impfung, Belastung = Belastungsinfektion, 1 MpB = 1 Monat nach Belastungsinfektion, Ende = Versuchsende

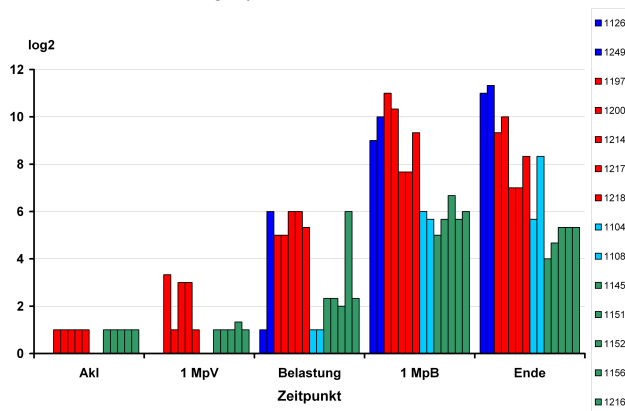


Abbildung 3.36: *SNT gegen BVDV-1 KE9*

Gruppe 1 (Kontrolle, KE9): 1126, 1249; Gruppe 2 (geimpft XIKE-B, KE9): 1197, 1200, 1214, 1217, 1218; Gruppe 3 (Kontrolle, KE13): 1104, 1108; Gruppe 4 (geimpft XIKE-B-NdN, KE13): 1145, 1151, 1152, 1156, 1216

Akl = Akklimation, 1 MpV = 1 Monat nach Impfung, Belastung = Belastungsinfektion, 1 MpB = 1 Monat nach Belastungsinfektion, Ende = Versuchsende

3.2.2.2 Zweiter Belastungsversuch

In diesem Versuch wurden 19 Kühe mit BVDV XIKE-B-NdN geimpft. Für die Belastungsinfektion wurden 12 dieser Kühe mit BVDV-1 KE9 (Gruppe 1) und sieben mit BVDV-2 KE13 (Gruppe 3) infiziert. Zusätzlich wurden jeweils vier ungeimpfte Kühe als Kontrollen mit KE9 (Gruppe 2) oder KE13 (Gruppe 4) infiziert.

Nach der Impfung waren weder lokal an der Impfstelle noch systemisch Reaktionen zu erkennen.

Eine Leukozytenzählung wurde an den Tagen 0, 3, 6, 9, 12 und 15 post vaccinationem durchgeführt. In Gruppe 1 hatte nur ein Tier (# 3679) eine Leukopenie an Tag 6 pv (Tab. 3.28). In Gruppe 3 hatten zwei Tiere (# 3628 und 3680) eine Leukopenie, ebenfalls an Tag 6 pv (Tab. 3.29).

Nach der Impfung hatte nur ein Tier der Gruppe 1 an Tag 12 pv nachweisbare Virämie, die Leukozyten aller anderen Tiere waren zu jedem Probenzeitpunkt Virus negativ (Tab. 3.30 und 3.31).

Die Belastungsinfektion erfolgte zwischen dem 60. und 90. Tag der Trächtigkeit (zwischen dem 88. und 118. Tag nach der Impfung) mit 10^5 KID₅₀ der o.g. Viren. Außer Fieber wurden bei keinem der Tiere nach der Belastungsinfektion klinische Symptome beobachtet. Jedoch abortierte eines der mit XIKE-B-NdN geimpften und KE9 belasteten Tiere (Gruppe 1: Tier # 3667). Von dem Fötus konnte nur der Kopf asserviert werden.

In beiden geimpften Gruppen (Gruppe 1 und 3) trat mit einer Ausnahme (Gruppe 3, Tier # 3605: 39,2°C an Tag 10 pc) keine erhöhte Temperatur oder Fieber auf.

In den Kontrollgruppen hatte in Gruppe 2 auch nur ein Tier (# 3767) an Tag 10 pc Fieber von 39,7°C, während in Gruppe 4 alle Tiere um die Tage 8 - 11 pc Fieber zwischen 39,2 und 41,2°C.

Nach der Belastungsinfektion trat bei Tieren aus allen Gruppen Leukopenie auf (Tabellen 3.32, 3.33, 3.34 und Abbildung 3.37). In Gruppe 1 war die Leukopenie am wenigsten stark ausgeprägt, 5 Tiere hatten an zwischen einem und fünf Zeitpunkten Leukopenie (Tab. 3.32). In Gruppe 3 hatten alle Tiere einen deutlichen Abfall der Leukozytenzahlen zu einem bis vierzehn Zeitpunkten (Tab. 3.34).

In den Kontrollgruppen hatten alle Tiere eine Leukopenie. In Gruppe 2

3 Ergebnisse

Gruppe 1						
<i>Tiernummer</i>	<i>Tag post vaccinationem</i>					
	0	3	6	9	12	15
3602	13,3	13,2	6,7	8,8	10,9	10,7
3606	11,3	10,9	8,6	7,5	12,9	15,0
3607	12,4	12,3	10,7	7,8	18,2	18,4
3626	13,6	11,6	10,5	11,8	11,7	19,2
3629	12,7	11,5	11,7	8,0	16,7	15,7
3649	4,9	10,0	8,0	12,6	21,9	17,9
3652	14,0	13,9	10,8	9,9	19,5	13,3
3667	6,0	12,8	9,4	9,2	19,5	10,9
3679	14,2	10,9	8,2	9,5	13,0	12,6
3693	5,7	14,5	10,8	10,7	19,1	19,9
3702	8,8	15,6	7,6	8,0	16,9	15,5
3713	14,2	17,6	12,1	19,7	23,1	20,2

in G/l, mit XIKE-B-NdN geimpft

Tabelle 3.28: *Gesamtleukozytenzahl post vaccinationem der Tiere aus Gruppe 1*

zu vier bis fünf Zeitpunkten und in Gruppe 4 zu zwei bis fünfzehn Zeitpunkten (Tabellen 3.33 und 3.34).

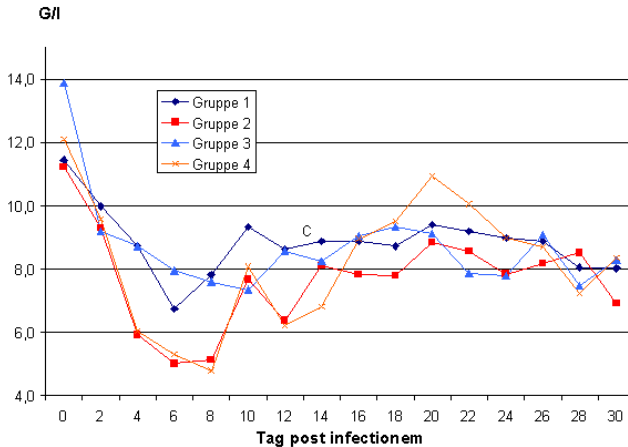


Abbildung 3.37: Durchschnittliche Leukozytenzahl aller Tiere.

Gruppe 1: XIKE-B-NdN geimpft, KE9 belastet; Gruppe 2: ungeimpft, KE9 belastet; Gruppe 3 XIKE-B-NdN geimpft, KE13 belastet; Gruppe 4: ungeimpft, KE13 belastet

Nach der Belastungsinfektion wies von den beiden geimpften Gruppen nur ein Tier in Gruppe 3 (# 3605) an Tag 10 BVDV in den „buffy coat“ Zellen auf. In den beiden ungeimpften Kontrollgruppen war jedes Tier zumindest an einem Tag Virus positiv, die meisten an zwei oder drei Tagen (Tabellen 3.35, 3.36 und 3.37). Außer dem oben bereits beschriebenen Fall traten nach der Belastungsinfektion keine Aborte auf.

Zwei Monate nach der Belastungsinfektion (zwischen dem 120. und 150. Tag der Trächtigkeit) wurden die Tiere getötet, von den Föten die unter Methoden (2.2.12.9) genannten Organe entnommen und auf BVDV hin untersucht. In beiden Kontrollgruppen konnte BVDV in den Organproben der Föten aller Rinder nachgewiesen werden (Tab. 3.38 und 3.39). Bei den geimpften Tieren ließ sich in der mit KE9 belasteten Gruppe in vier von

zwölf Fällen BVDV nachweisen. Von dem abortierten Fötus wurden Proben des Kleinhirns und des Submandibular-Lymphknotens entnommen. Beide Proben waren virusnegativ, ebenso der Uterus des Muttertieres (Tab. 3.40). In der geimpften, mit KE13 belasteten Gruppe konnte in keiner Probe Virus nachgewiesen werden (Tab. 3.41). Allerdings war ein Tier (Tier # 3680) ohne Fötus, eine spezifische Ursache für den offensichtlich unbemerkt erfolgten Abort konnte nicht nachgewiesen werden. Der Uterus des fraglichen Tieres war virusnegativ.

Die gewonnenen Serumproben wurden auf neutralisierende Ak untersucht. Als Testviren wurden dabei ein zum Impfvirus heterologes BVDV-2 (KE13) und ein BVDV-1 (KE9) verwendet.

Nach der Belastungsinfektion stiegen die Antikörper gegen BVDV-2 in allen Gruppen an. Am schwächsten war der Anstieg in der ersten Kontrollgruppe (Gruppe 2, ungeimpft und KE9 belastet), in den anderen drei Gruppen stiegen die Titer auf bis zu 1:2048 an (Tab. 3.42, 3.43 und Abbildung 3.38). Gegen BVDV-1 blieb die Antikörperbildung während der ersten 30 Tage aus. Erst am Tag 54 pc kam es in allen Gruppen zu einem erkennbaren Antikörpertiter, in den mit KE9 belasteten Gruppen 1 und 2 sehr deutlich, mit Titern bis zu 1:2048. In den mit KE13 belasteten Gruppen hingegen nur zu maximal 1:51 (Tab. 3.42, 3.43 und Abbildung 3.39).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß eine Impfung von Kühen mit der RNase[⊖]-ΔN^{pro} Doppelmutante XIKE-B-NdN bei einer Infektion trächtiger Tiere mit BVDV-2 sowohl Muttertier als auch Fötus zuverlässig zu schützen scheint. Eine Kreuzprotektivität gegenüber BVDV-1 ist dagegen nach einmaliger Vakzination nur unzuverlässig ausgebildet.

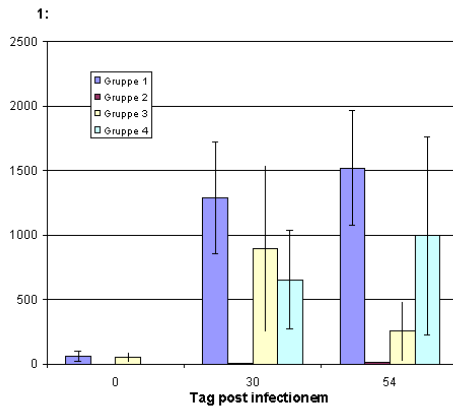


Abbildung 3.38: SNT gegen BVDV-2 KE13

Gruppe 1: XIKE-B-NdN geimpft, KE9 belastet; Gruppe 2: ungeimpft, KE9 belastet; Gruppe 3 XIKE-B-NdN geimpft, KE13 belastet; Gruppe 4: ungeimpft, KE13 belastet

Gruppe 3						
<i>Tag post vaccinationem</i>						
<i>Tiernummer</i>	0	3	6	9	12	15
3628	13,3	9,4	7,4	12,1	15,7	15,7
3637	14,0	13,4	11,8	11,5	14,1	18,3
3645	6,3	12,0	7,0	8,8	15,3	15,0
3653	10,7	9,4	9,7	11,2	12,3	11,5
3680	16,7	12,6	7,3	11,0	13,8	15,6
3708	13,2	9,7	12,2	9,5	16,6	14,2
in G/I, mit XIKE-B-NdN geimpft						

Tabelle 3.29: *Gesamtleukozytenzahl post vaccinationem der Tiere aus Gruppe 3*

Gruppe 1							
Tag post vaccinationem							
Tiernummer	0	3	6	9	12	15	30
3602	//	//	//	//	//	//	//
3606	//	//	//	//	//	//	//
3607	//	//	//	//	//	//	//
3626	//	//	//	//	//	//	//
3629	//	//	//	//	//	//	//
3649	//	//	//	//	//	//	//
3652	//	//	//	//	//	//	//
3667	//	//	//	//	//	//	//
3679	//	//	//	//	//	//	//
3693	//	//	//	//	//	//	//
3702	//	//	//	//	+/	//	//
3713	//	//	//	//	//	//	//
Doppelanimpfung; / = Virus negativ; + = Virus positiv XIKE-B-NdN geimpft.							

Tabelle 3.30: *Virusnachweis post vaccinationem in Leukozyten der Tiere aus Gruppe 1*

3 Ergebnisse

Gruppe 3							
<i>Tag post vaccinationem</i>							
<i>Tiernummer</i>	0	3	6	9	12	15	30
3605	//	//	//	//	//	//	//
3628	//	//	//	//	//	//	//
3637	//	//	//	//	//	//	//
3645	//	//	//	//	//	//	//
3653	//	//	//	//	//	//	//
3680	//	//	//	//	//	//	//
3708	//	//	//	//	//	//	//

Doppelanimpfung; / = Virus negativ; + = Virus positiv

XIKE-B-NdN geimpft.

Tabelle 3.31: *Virusnachweis post vaccinationem in Leukozyten der Tiere aus Gruppe 3*

<i>Tiernummer</i>	Gruppe 1														
	<i>Tag post challenge</i>														
	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	30
3602	9,0	8,0	6,4	6,7	6,4	7,4	6,3	9,2	7,1	7,4	8,9	6,5	7,5	6,9	6,8
3606	9,8	8,0	5,9	7,4	6,6	5,9	6,0	8,0	6,2	7,2	7,5	9,4	7,8	8,2	7,3
3607	10,1	8,9	8,6	7,6	8,2	8,7	10,3	8,6	9,4	8,2	9,6	7,5	9,0	9,3	7,9
3626	11,8	12,3	9,3	7,7	9,0	9,2	7,9	9,6	11,0	9,5	10,0	9,2	10,6	11,0	8,9
3629	10,9	8,3	6,8	5,7	6,4	5,7	8,6	8,2	7,1	6,8	8,1	8,6	7,3	6,5	5,8
3649	12,8	9,1	9,2	7,2	7,6	8,3	8,1	7,7	7,3	9,3	9,7	10,4	8,7	8,8	7,4
3652	10,3	9,7	11,8	4,7	5,7	10,6	8,8	8,7	7,9	8,7	7,9	7,9	9,3	9,0	8,3
3667	11,5	9,8	10,2	6,9	7,6	12,6	8,7	10,2	9,8	8,2	8,8	9,4	8,9	8,3	7,1
3679	12,8	10,6	5,2	4,6	8,2	8,7	8,2	9,1	8,3	7,6	10,0	10,2	6,0	9,0	8,8
3693	12,2	9,8	16,7	6,6	7,8	12,0	10,0	8,2	11,0	8,7	9,0	10,3	11,1	9,1	9,4
3702	11,4	11,5	10,0	8,0	9,8	9,9	10,0	7,5	9,7	11,5	12,0	10,4	10,5	9,1	8,7
3713	15,1	14,0	4,8	8,3	10,7	13,2	11,0	11,8	12,1	11,8	11,4	10,9	11,3	11,8	10,2
in G/l															
Gruppe 1: XIKE-B-NdN geimpft, KE9 belastet															

Tabelle 3.32: Gesamtleukozytenzahl der Tiere aus Gruppe 1 post challenge

Tiernummer	Gruppe 2															
	Tag post challenge															
	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30
3756	16,0	10,9	6,2	6,8	7,9	10,2	8,0	11,6	10,7	11,1	12,3	11,2	9,4	13,4	6,3	11,1
3760	9,3	8,2	5,0	4,6	3,7	5,7	5,9	6,0	5,1	5,5	6,5	8,5	6,6	5,9	10,1	4,8
3767	10,2	9,4	8,6	4,3	4,8	7,2	5,9	7,7	8,5	8,2	8,3	6,7	8,4	6,1	11,2	6,7
3808	9,5	8,8	4,0	4,4	4,2	7,7	5,7	7,2	7,1	6,5	8,3	7,9	7,0	7,4	6,6	5,3

in G/l

Gruppe 2: ungeimpft, KE9 belastet

Tabelle 3.3.3: Gesamtleukozytenzahl der Tiere aus Gruppe 2 post challenge

Gruppe 3

<i>Tiernummer</i>	<i>Tag post challenge</i>																
	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	
3605	14,1	10,3	12,0	7,9	7,9	10,3	11,3	9,5	11,1	9,8	10,7	6,3	9,5	11,2	9,7	10,8	
3628	11,4	8,5	7,2	7,8	9,5	5,9	6,2	7,4	6,5	9,7	8,4	9,5	8,5	10,1	6,5	7,5	
3637	11,8	9,1	10,9	7,3	7,0	7,1	11,5	8,2	10,2	7,8	9,3	7,6	8,5	9,0	8,6	7,8	
3645	19,9	10,3	8,4	9,3	8,8	8,5	9,4	10,3	9,9	11,2	10,0	11,3	6,1	7,4	6,5	12,3	
3653	12,4	8,3	8,4	6,9	6,4	5,4	7,8	8,7	7,9	7,7	7,2	6,8	8,2	10,1	8,3	6,7	
3680	15,7	9,5	8,5	8,1	7,2	6,8	9,1	7,4	10,2	11,4	10,6	6,2	7,0	7,9	7,3	7,7	
3708	11,9	8,5	5,9	8,7	6,5	7,6	4,8	6,3	7,8	8,0	7,8	7,4	6,8	8,1	5,7	5,4	

Gruppe 4

<i>Tiernummer</i>	<i>Tag post challenge</i>															
	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30
3768	8,5	8,3	4,7	4,4	2,8	4,6	3,2	3,0	5,0	8,6	8,8	7,1	8,4	7,0	6,7	6,1
3783	8,9	8,8	4,9	4,9	5,7	6,0	5,9	9,2	12,4	9,6	11,6	9,0	9,6	7,1	7,6	9,0
3804	14,0	11,1	7,1	5,4	5,2	13,7	9,5	7,6	10,5	10,5	14,1	14,4	10,4	10,7	7,4	10,4
3833	17,1	10,2	7,5	6,6	5,7	8,1	6,3	7,5	8,1	9,4	9,3	9,8	7,6	10,1	7,3	8,0

in G/l

Gruppe 3: XIKE-B-NdN geimpft, KEI13 belastet; Gruppe 4: ungeimpft, KEI13 belastet

Tabelle 3.34: Gesamtleukozytenzahl der Tiere aus den Gruppen 3 und 4 post challenge

Tiernummer	Gruppe 1															
	Tag post challenge															
	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30
3702	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//
3649	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//
3667	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//
3652	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//
3607	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//
3693	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//
3626	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//
3629	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//
3713	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//
3602	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//
3679	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//
3606	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//
Doppelanimpfung: / = Virus negativ; + = Virus positiv																
Gruppe 1: XIKE-B-NdN geimpft, KE9 belastet																

Tabelle 3.35: Virusnachweis in Leukozyten der Tiere aus Gruppe 1 post challenge

Gruppe 2																
Tiernummer	Tag post challenge															
	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30
3808	//	//	//	+/	++	+	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//
3760	//	//	//	//	++	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//
3767	//	//	//	//	+	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//
3756	//	//	//	++	//	+	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//

Doppelimpfung: / = Virus negativ; + = Virus positiv
Gruppe 2: ungeimpft, KE9 belastet

Tabelle 3.36: Virusnachweis in Leukozyten der Tier aus Gruppe 2 post challenge

Gruppe 3																
Tiernummer	Tag post challenge															
	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30
3708	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//
3628	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//
3653	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//
3637	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//
3680	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//
3605	//	//	//	//	//	//	-/+	//	//	//	//	//	//	//	//	//
3645	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//
Gruppe 4																
Tiernummer	Tag post challenge															
	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30
3804	//	//	//	+ /	++	/ +	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//
3768	//	//	//	++	++	++	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//
3833	//	//	//	+ /	++	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//
3783	//	//	//	++	++	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//	//

Doppelimpfung: / = Virus negativ; + = Virus positiv
Gruppe 3: XIKE-B-NDN geimpft, KEI3 belastet; Gruppe 4: ungeimpft, KEI3 belastet

Tabelle 3.37: Virusnachweis in Leukozyten der Tier aus den Gruppen 3 und 4 post challenge

Tier Nr.	Abdominal-		Mesenterial-			sternales				Kleinhirn	Plazenta
	Flüssigkeit	Milz	Dünndarm	Lymphknoten	Niere	Thymus	Knochenmark				
3808	NA	//	//	//	++	++	//		++		//
3760	NA	++	++	++	++	++	++	++	++		++
3767	NA	++	++	++	++	++	++	++	++		++
3756	NA	++	++	++	++	++	++	++	++		++
Doppelanimpfung, / = Virusnegativ, + = Viruspositiv, NA = nicht vorhanden											

Tabelle 3.38: Virusnachweis in Organproben der Föten aus Tieren der Gruppe 2 (nicht geimpft, BVDV-I belastet)

Tier Nr.	Abdominal-			Mesenterial-					sternales		
	Flüssigkeit	Milz	Dünndarm	Lymphknoten	Niere	Thymus	Knochenmark	Kleinhirn	Plazenta		
3804	NA	++	++	++	++	++	++	++	++	NA	
3768	NA	++	++	++	++	++	++	++	++	NA	
3833	++	++	++	++	++	++	++	++	++	NA	
3783	NA	++	++	++	++	++	++	++	++	NA	

Doppelanimpfung, / = Virusnegativ, + = Viruspositiv, NA = nicht vorhanden

Tabelle 3.39: Virusnachweis in Organproben der Föten aus Tieren der Gruppe 4 (nicht geimpft, BVDV-2 belastet)

Tier Nr.	Abdominal-		Mesenterial-			sternales			
	Flüssigkeit	Milz	Dünndarm	Lymphknoten	Niere	Thymus	Knochenmark	Kleinhirn	Plazenta
3702	NA	//	//	//	//	//	//	//	//
3649	NA	//	//	//	//	//	//	//	//
3667*	NA	NA	//	NA	NA	NA	NA	NA	// [§]
3652	NA	//	//	//	//	//	//	//	//
3607	NA	++	++	++	++	++	++	++	++
3693	NA	//	//	//	//	//	//	//	//
3626	NA	//	//	//	//	//	//	//	//
3629	NA	++	++	++	++	++	++	++	++
3713	NA	//	//	//	//	//	//	//	//
3602	NA	//	//	//	//	//	//	//	//
3679	NA	++	++	++	++	++	++	++	++
3606	NA	++	//	//	++	++	//	++	//

Doppelanimpfung, / = Virusnegativ, + = Viruspositiv, NA = nicht vorhanden
* nach Abort konnte nur der Kopf des Fötus asserviert werden, d.h. Submandibular-Lymphknoten und Uterus

Tabelle 3.40: Virusnachweis in Organproben der Föten aus Tieren der Gruppe 1 (XIKE-B-NdN geimpft, BVDV-I belastet)

Tier Nr.	Abdominal-			Mesenterial-			sternales		
	Flüssigkeit	Milz	Dünndarm	Lymphknoten	Niere	Thymus	Knochenmark	Kleinhirn	Plazenta
3708	NA	//	//	//	//	//	//	//	//
3628	//	//	//	//	//	//	//	//	//
3653	NA	//	//	//	//	//	//	//	NA
3637	NA	//	//	//	//	//	//	//	//
3680*	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	//
3605	NA	//	//	//	//	//	//	//	//
3645	NA	//	//	//	//	//	//	//	//

Doppelanimpfung, / = Virusnegativ, + = Viruspositiv, NA = nicht vorhanden

* Kein Fötus gefunden, nur eine Gewebeprobe des Uterus entnommen

Tabelle 3.41: Virusnachweis in Organproben der Föten aus Tieren der Gruppe 3 (XIK-E-B-NdN geimpft, BVDV-2 belastet)

Gruppe 1						
	vs BVDV-2			vs BVDV-1		
Tiernummer	Tag post infectionem					
	0	30	54	0	30	54
3602	51	1629	2048	1	0	2048
3606	80	1024	2048	0	0	2048
3607	51	815	1629	0	0	1629
3626	40	1629	1629	0	0	1629
3629	64	1629	1629	0	0	1629
3649	64	815	1024	0	0	1024
3652	20	1024	815	0	0	815
3667	32	1629	1629	0	0	1629
3679	32	644	815	0	0	815
3693	128	1287	2048	5	0	2048
3702	128	2048	1629	0	0	1629
3713	16	1287	1287	0	0	1287

Gruppe 2						
	vs BVDV-2			vs BVDV-1		
Tiernummer	Tag post infectionem					
	0	30	54	0	30	54
3756	0	5	16	4	0	2048
3760	0	4	16	4	0	1629
3767	0	8	16	0	0	2048
3808	0	6	16	4	0	2048

Tabelle 3.42: SNT Gruppen 1 und 2 gegen KE13 (BVDV-2) und KE9 (BVDV-1)
 Titer als 1:x

Gruppe 1: XIKE-B-NdN geimpft, KE9 belastet;

Gruppe 2: ungeimpft, KE9 belastet

3 Ergebnisse

Gruppe 3						
Tiernummer	vs BVDV-2			vs BVDV-1		
	Tag post infectionem					
	0	30	54	0	30	54
3605	20	64	102	0	0	6
3628	13	1024	80	0	0	16
3637	64	1024	128	2	0	8
3645	51	1024	256	0	0	10
3653	32	256	64	0	0	6
3680	64	815	644	0	0	204
3708	128	2048	512	0	0	32

Gruppe 4						
Tiernummer	vs BVDV-2			vs BVDV-1		
	Tag post infectionem					
	0	30	54	0	30	54
3768	0	815	2048	0	0	25
3783	0	1024	1024	0	0	51
3833	0	128	256	0	0	10
3804	0	644	644	0	0	40

Tabelle 3.43: SNT Gruppen 3 und 4 gegen KE13 (BVDV-2) und KE9 (BVDV-1)
Titer als 1:x
 Gruppe 3: XIKE-B-NdN geimpft, KE13 belastet;
 Gruppe 4: ungeimpft, KE13 belastet

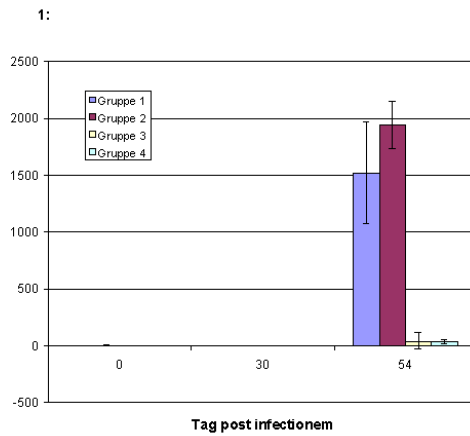


Abbildung 3.39: SNT gegen BVDV-1 KE9

Gruppe 1: XIKE-B-NdN geimpft, KE9 belastet; Gruppe 2: ungeimpft, KE9 belastet; Gruppe 3 XIKE-B-NdN geimpft, KE13 belastet; Gruppe 4: ungeimpft, KE13 belastet

4 Diskussion

„Es gibt keine Fakten, nur Interpretationen.“

– Friedrich Nietzsche (1844-1900)

Die Zielsetzung dieser Arbeit war die Charakterisierung von attenuierenden Mutationen bei Pestiviren, vor allem bezüglich des Glykoproteins E^{rms} und des Nichtstrukturproteins N^{pro}. Es sollte untersucht werden, welche Mutationen sich für den Einsatz in attenuierten Lebendvakzinen eignen und zudem versucht werden, Hinweise auf die mechanistische Ursache der Attenuierung zu erhalten.

Pestiviren sind die Erreger einer Reihe wirtschaftlich bedeutsamer Erkrankungen bei landwirtschaftlichem Nutzvieh. In Rinderbeständen löst das BVD-Virus bei adulten Tieren i.d.R. eine subklinische Infektion aus. Unter Umständen kommt es zu Durchfall (Bovine Virus Diarrhoe, BVD) und zu Sekundärinfektionen auf Grund einer Immunsuppression durch das BVDV. Ferner kommt es nach Infektion mit bestimmten BVDV-2 Stämmen häufig zu einem hämorrhagischen Fieber mit schweren Erkrankungen und Todesfällen bei Rindern aller Altersklassen.

Bei Infektionen trächtiger Kühe kann es zu einer diaplazentaren Infektion des Fötus kommen. Es können Fruchttod und die Geburt mißgebildeter, persistent infizierter oder gesunder Kälber auftreten, Abhängig in erster Linie vom Zeitpunkt der Infektion während der Gravidität. Das größte Problem bei der Bekämpfung der BVDV-Infektion ist die Ausbildung persistenter Infektionen nach der diaplazentare Infektion der Föten. Daraus resultierende lebensfähige Kälber sind Zeit ihres Lebens infiziert, scheiden fortwährend BVDV aus und sind klinisch zunächst nicht von gesunden, nicht-infizierten Kälbern zu unterscheiden. Allerdings erkranken diese Kälber in der Regel im Alter zwischen 6 Monaten und 2 Jahren an der Mucosal Disease. Diese Erkrankung geht mit ausgedehnter Ulzeration des

Gastrointestinaltraktes als hauptsächlichlicher Veränderung einher. Charakteristisch ist die hohe Mortalität. Der Tod tritt für gewöhnlich innerhalb von 2 Wochen nach Auftreten der klinischen Symptome ein.

Das Virus der klassischen Schweinepest (CSFV) ist in seinem Infektionsverlauf in der Regel aggressiver als das BVDV. Ähnlich dem BVDV-2 verursacht es ein hämorrhagisches Fieber, charakterisiert durch Fieber, Leukopenie, B-Zell Depletion, Durchfall, Anorexie, zentralnervöse Symptome, Blutungen, Kümern und Tod. Im 19. Jhd. verlief die Erkrankung meist perakut bis akut mit kurzer Inkubationszeit und einer hohen Mortalität. Dieses Bild hat sich im Laufe der Zeit gewandelt. Heute sind chronische Verläufe mit unspezifischer Symptomatik eher die Regel, akute Verläufe treten seltener auf, und die Mortalitätsrate dieser Verläufe ist drastisch gesunken. Nur vereinzelt kommt es noch zu Ausbrüchen mit perakutem Verlauf.

Auch das CSFV kann bei einer Infektion während der Trächtigkeit die Föten infizieren. Im Gegensatz zu BVDV kommt es beim CSFV jedoch nur selten zur Etablierung einer persistenten Infektion [14]. In der Regel treten Fruchttod mit Aborten und Mummifikationen, Geburt mißgebildeter oder lebensschwacher, oder gesunder Ferkel, welche die Infektion überwinden konnten, auf.

Das dritte relevante Pestivirus ist das Border Disease Virus (BDV) der Schafe. Auch bei dem BDV kommt es bei Infektion immunkompetenter Tiere i.d.R. zu subklinischer, transientser Infektion mit anschließender Immunität gegen homologe BDV-Stämme. Wie BVDV und CSFV kommt es bei Infektionen während der Trächtigkeit zu diaplazentarer Übertragung auf den Fötus. Analog zur für BVDV beschriebenen Situation kommt es in Abhängigkeit des Trächtigkeitsstadiums zu Fruchttod, Geburt mißgebildeter, persistent infizierter oder gesunder Lämmer. Die persistent infizierten Lämmer sind meist lebensschwach und sterben noch vor dem Absetzen. Sie sind meist zu klein für ihr Alter, weisen exzessiven Haarwuchs auf, das Vließ ist oft hyperpigmentiert, und es tritt oft unkontrolliertes Muskelzittern auf („hairy shaker“ Lämmer). Auch die persistent infizierten Lämmer sind zeitlebens Ausscheider von BDV.

Die zentrale Problematik bei pestiviralen Infektionen sind zum einen das immer häufigere Auftreten von schwach virulenten Feldstämmen, und

die damit einhergehenden diagnostischen Probleme. Zum anderen die lang anhaltende persistente Infektion vor allem der Kälber, aber auch der Lämmer. Wirtschaftlich besonders relevant sind in Europa die durch die Infektion verursachten Fruchtbarkeitsstörungen und, im Falle des CSFV, die Kosten infolge der Keulung infizierter Bestände.

Die Überlebensstrategie der Pestiviren läßt sich wohl am besten am Beispiel des BVDV formulieren. Durch die schwach virulenten Feldstämme und die entsprechend unauffällig verlaufende Infektion bei adulten Tieren kommt es zu einer Verbreitung des Virus, ohne daß der Wirt nachhaltig geschädigt wird. Wird eine Kuh zwischen Mitte des ersten und Anfang des zweiten Trimesters (40. bis 120. Tag) der Gravidität infiziert, kann das Virus die Plazentarschranke überschreiten, den Fötus infizieren und eine persistente Infektion etablieren. Nach der Geburt dieses persistent infizierten Kalbes kommt es durch die dauernde Ausscheidung von BVDV seitens des Kalbes zu einer anhaltenden Verbreitung des Virus, ohne daß klinische Symptome erkennbar wären.

Zur Etablierung der Persistenz ist die Entwicklung einer spezifischen Immuntoleranz gegen das entsprechende BVD Virus notwendig. Dies erfolgt zum Zeitpunkt der Infektion, während das adaptive Immunsystem reift und es zur Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen kommt. Da das Virus sich zu diesem Zeitpunkt bereits im Gewebe befindet, wird es als körpereigen erkannt. Zur Aufrechterhaltung der Persistenz muß sich das Virus dann nur noch mit der angeborenen Immunreaktion auseinandersetzen.

Diese Immuntoleranz gegen das persistierende Virus ist hochspezifisch. Gelangen durch Superinfektion BVDV in den Organismus, welche sich antigenetisch deutlich genug vom persistierenden Ursprungsvirus unterscheiden, kann das Immunsystem gegen diese antigenetisch anderen Erreger eine normale Immunantwort mit der Bildung von Antikörpern ausbilden, und unter Umständen das persistierende Virus aufgrund von Kreuzreaktivität sogar eliminieren [20]. Dagegen konnten Fray et al. keine gegen BVDV gerichteten Antikörper im Serum persistent infizierter (pi.) Kälber nachweisen. Allerdings treten in den Keimzentren der Lymphknoten von pi Kälbern Immunkomplexe mit E^{ms} auf [32]. Ursächlich dafür ist vermutlich eine nicht vollständige B-Zell Toleranz gegenüber dem persi-

stierenden Virus. Das Ausbleiben zirkulierender Antikörper gegen E^{rns} ist möglicherweise zum Teil auf eine nicht erfolgende Reifung der B-Zellen aufgrund der großen Menge löslichen Antigens zurückzuführen [32]. Diese Hypothese erklärt allerdings nicht das Ausbleiben einer gegen E2 gerichteten Ak-Antwort, so daß wahrscheinlich weitere virale Abwehrmechanismen für die Aufrechterhaltung der Toleranz erforderlich sind.

Entscheidend für die Etablierung der Immuntoleranz sind vor allem zwei Faktoren. Der erste ist der Zeitpunkt der Infektion. Nur zwischen dem 40. und etwa 120. Tag der Trächtigkeit kann das BVDV eine persistente Infektion ausbilden, da der Fötus in diesem Zeitraum noch nicht immunkompetent ist. Der zweite Faktor ist der Biotyp des BVDV. Alle Pestiviren kommen als zytopathogene (zp) und nicht-zytopathogene (nzp) Biotypen vor. Zur Etablierung einer persistenten Infektion ist nur der nzp Biotyp befähigt. Beide Biotypen unterscheiden sich *in vivo* nicht nur in ihrer Fähigkeit infizierte Zellen zu zerstören. Intranasale Infektion mit zp BVDV im immunkompetenten Kalb führt nicht zu erkennbaren Serumspiegeln von Interferon (IFN), während es nach Infektion mit nzp BVDV zu hohen, anhaltenden Serumspiegeln kommt ?? . Wahrscheinlich bleibt die Infektion mit zp BVDV auf die Gewebe der Mucosa und Submucosa begrenzt, mit einer schnellen und starken lokalen Interferonantwort.

Dagegen umgeht nzp BVDV die lokale Immunabwehr und gelangt als freies Virus in die Lymphknoten wo es über die Interaktion mit plasmazytoiden dendritischen Zellen (plasmacytoid dendritic cells, PDC) zur Induktion von IFN α kommt. Zu diesem Zeitpunkt, ca. 24 - 36 h nach der Infektion, hat sich das BVDV allerdings schon im Gewebe des Wirtstieres weiträumig verteilt [12].

Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal zwischen zp und nzp BVDV ist die Fähigkeit, das NS2-3 Protein in NS2 und NS3 zu spalten. Nzp BVDV spaltet NS2-3 nur in der frühen Phase der Infektion, zp BVDV während des gesamten Verlaufs der Infektion [55]. Die intrazelluläre NS3-Konzentration wiederum korreliert mit der Anreicherung intrazellulärer viraler RNS [9], [109], so daß es nach Infektion mit zp BVDV zur Akkumulierung von viralen RNS Molekülen kommt, bis die Apoptose der Zelle eintritt. Durch die zeitliche Einschränkung der Prozessierung des NS2-3 dagegen kann das nzp Virus seine Replikationsrate kontrollieren und so-

mit den Tod der infizierten Zelle verhindern. Offensichtlich ist dies eine Grundvoraussetzung, um dem angeborenen Immunsystem zu entkommen und eine persistente Infektion zu etablieren.

Allerdings geht die Virusreplikation auch bei nzp BVDV nicht ohne die Bildung von dsRNS (doppelstrang RNS) einher, die als ein Hauptsignal für die Induktion von Interferon durch die infizierte Zelle gilt. Die Anwesenheit auch von geringen Mengen an dsRNS sollte zu einer Interferonantwort als Reaktion seitens der Zelle führen und damit die Bekämpfung des Virus einleiten. Das bedeutet, daß die kontrollierte Replikation der nzp Viren nicht der alleinige Weg sein kann, den das Virus beschreitet, um dem Immunsystem des Wirts zu entkommen. Das Virus muß folglich weitere Mechanismen entwickelt haben, um die angeborene Immunantwort zu behindern oder zu umgehen.

Das nahe verwandte Hepatitis C Virus (HCV) etabliert ebenfalls eine persistente Infektion als Überlebensstrategie. Bei diesem Mitglied der Flaviviridae dient das Nichtstrukturprotein-Paar NS3/4A und das Nichtstrukturprotein NS5A der Unterbindung einer Interferonantwort. NS3/4a bilden zusammen einen Enzymkomplex, der als Serin-Protease und RNS-Helikase fungiert. Zur Unterbindung der Interferonantwort kommt es durch Proteolyse der TRIF (Toll-IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN β). Der TRIF verbindet den Toll-like receptor 3 (TLR3) mit Kinasen welche den IFN regulatory factor 3 (IRF-3) und NF- κ B aktivieren. Durch die Proteolyse des TRIF unterbleibt die Aktivierung von IRF-3 und NF- κ B, und dadurch die Bildung von IFN β [62]. NS5A unterbindet die IFN-induzierte Proteinkinase (PKR), in dem es mit deren katalytischem Zentrum interagiert [33].

Pestiviren besitzen ebenfalls einen NS3/4A-Proteinkomplex, welcher als Serin-Protease und RNS-Helikase fungiert [113, 119]. Für das pestivirale NS3 gibt es bisher keinen Hinweis, daß es mit dem Immunsystem interagiert. Allerdings wurden bislang auch noch keine direkten Untersuchungen in dieser Hinsicht durchgeführt. Im Gegensatz zu HCV besitzen die Pestiviren jedoch zwei zusätzliche Proteine, N^{pro} und E^{rns}, die beide in der Diskussion stehen, an der Umgehung des Immunsystems des Wirts beteiligt zu sein.

Das Glykoprotein E^{ms} der Pestiviren besitzt vielfältige Funktionen, und seine Bedeutung für die Pestiviren ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Es ist eines der viralen Strukturproteine [104] und Ziel neutralisierender Antikörper [114], besitzt jedoch keinen klassischen Membrananker und wird somit in beträchtlichen Mengen von infizierten Zellen sezerniert [91]. Weiterhin ist es wahrscheinlich an der Bindung der Pestiviren an die Zelloberfläche mit verantwortlich, da es mit Glykosaminoglykanen auf der Zelloberfläche interagiert [46]. Für den Eintritt in die Zelle dagegen ist E^{ms} vielleicht nicht unabdingbar [112], für die Bildung infektiöser Pestiviren ist es jedoch essentiell [117].

Eine weitere Eigenschaft des E^{ms} ist die Fähigkeit Zellmembranen zu passieren, in die Zelle einzudringen und sich im perinukleären Raum an zytoplasmatischen Membranen zu verteilen [56]. Die wohl ungewöhnlichste Funktion des E^{ms} jedoch ist die als Ribonuklease, welche eine Besonderheit der Pestiviren darstellt, die bisher bei anderen RNS Viren nicht gefunden wurde [39, 92]. CSFV neutralisierende Antikörper weisen zum Teil eine starke Inhibition der RNase-Aktivität auf [118]. Die Inaktivierung der RNase-Aktivität führt sowohl in vitro als auch in vivo zu lebensfähigen BVDV und CSFV Mutanten. Welche Rolle die RNase für das Virus spielt ist noch nicht geklärt, es kann allerdings als gesichert gelten, daß sie an der Pathogenität der Pestiviren beteiligt ist. RNase-negative Mutanten, sowohl von BVDV als auch von CSFV, erwiesen sich im Tierexperiment als weitgehend bis völlig attenuiert [70, 71].

Interessanterweise ist der Grad der Attenuierung, zumindest bei CSFV, abhängig von der Lokalisation der die RNase inaktivierenden Mutation. Wird das Histidin an Position 346 des ORF deletiert oder durch ein Lysin oder Leucin ersetzt, kommt es zu einer vollständigen Attenuierung des Virus. Wird hingegen das Histidin an Position 297 verändert, kommt es zu Krankheitssymptomen, die allerdings deutlich schwächer ausgeprägt sind als bei einer Infektion mit wt CSFV. Im Gegensatz zu wt Infektionen erholen sich die Tiere um Tag 10, einem Zeitpunkt, der mit der Bildung neutralisierender Antikörper korreliert, plötzlich wieder [71]. Da verschiedene Mutationen, die die RNase-Funktion des E^{ms} eliminieren, zu einer Attenuierung führen, ist es sehr wahrscheinlich, daß diese Attenuierung auf den Verlust der RNase Aktivität zurückzuführen ist. Der Unterschied in

der Attenuierung zwischen den H346 und den H297 Mutanten läßt jedoch vermuten, daß mit einer Veränderung des H346 noch ein weiterer, bisher ungeklärter Pathogenitätsmechanismus beeinträchtigt wird. Um dieses Problem genauer zu beleuchten, wurde die RNase-Funktion über Mutation an einer weiteren Stelle, der Position 300, ausgeschaltet.

Die resultierende Mutante, CSFV 255/1 mit Austausch des Tryptophan an Position 300 gegen ein Glycin, war bei der Vermehrung in Zellkultur (SK6-Zellen) stabil und wies vergleichbare Wachstumseigenschaften wie das wt Virus auf. In vorhergehenden Experimenten zeigte die Mutante eine teilweise Attenuierung im Vergleich zu CSFV Alfort/ Tübingen und die infizierten Schweine bildeten neutralisierende Antikörper gegen CSFV aus. Reisoliertes Virus wurde phänotypisch und genotypisch analysiert und wies eine Reversion zum Wildtyp CSFV auf.

Auch in dem im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experiment (TV 16a, 3.1.1.1.1) erwies sich die Mutante als teilweise attenuiert. Die Tiere entwickelten transientes Fieber. Zwei der Tiere zeigten an einem Tag deutliche Abgeschlagenheit als weiteres klinisches Zeichen und erholten sich danach. Die anderen beiden Tiere entwickelten ein deutlich schlechtes Allgemeinbefinden mit sistierender Futteraufnahme und Diarrhoe. Beide mußten an Tag 18 p.i. geschlachtet werden. Das Bild der Leukopenie und B-Zell Depletion spiegelt die klinischen Symptome wieder, die überlebenden Tiere hatten keine oder transiente, die schwer erkrankten Tiere eine anhaltende B-Zell Depletion. Bei allen Tieren konnte Virämie nachgewiesen werden, und bei drei von vier Tieren wurde Virus aus Nasenabstrichen isoliert. Reisoliertes Virus erwies sich genotypisch als zum Wildtyp revertiert; die Untersuchung der RNase-Aktivität korrelierte mit dem Ergebnis der Sequenzierung. In einem nachfolgenden Experiment (TV 19 3.1.1.1.3), in dem Schweine mit dem reisolierten wt Virus CSFV W300G-R infiziert wurden, erkrankten alle Tiere schwer an klassischer Schweinepest. Das erste Tier mußte an Tag 12, die anderen beiden an Tag 17 p.i. aus Gründen des Tierschutzes geschlachtet werden. Keines dieser Tiere hatte nAk gegen Schweinepest ausgebildet.

In der Zellkultur verhält sich die Mutante unterschiedlich (3.1.1.1.2). In manchen Zelllinien bleibt die Mutation stabil (SK6 und 38A1D), in anderen revertiert sie ebenfalls (STE und MAX). Eine Tendenz die RNase-

Aktivität wieder herzustellen ist wahrscheinlich nicht die Folge eines Vorteils des RNase positiven Virus. Bei anderen RNase[⊖] CSFV Mutanten tritt nämlich keine Reversion auf, obwohl die H297L oder K und H346L oder K Mutanten ebenfalls nur eine bzw. zwei Basen austauschen müßten um zu revertieren. Das bedeutet, daß die Revertanten in bestimmten Zelltypen, und in vivo, aufgrund eines Vorteils selektiert werden, der auf einer anderen Eigenschaft des E^{ms} beruht. Möglicherweise betrifft das seine Funktion während der Infektion der Zelle oder der Virusmorphogenese.

Die Schnelligkeit der Reversion zeigt, daß das wt Virus einen signifikanten Vorteil bei der Vermehrung am primären Replikationsort gegenüber der Mutante haben muß. Bisher ist über die Funktion des E^{ms} als Strukturprotein und seine Interaktion mit der Wirtszelle nur bekannt, daß es mit zellulären Glykosaminoglykanen interagiert [45, 46]. Daher wäre eine Diskussion über die molekulare Basis dieser Ergebnisse voreilig.

Eine interessantere Frage ist, warum CSFV W300G trotz der schnellen Reversion offensichtlich attenuiert ist. Von CSFV Lebend-Vakzinen ist bekannt, daß sie innerhalb kürzester Zeit zumindest in einigen Tieren eine protektive Immunität hervorrufen [50]. Es könnte daher möglich sein, daß die kurze Zeitspanne zwischen der Infektion und dem Auftauchen einer signifikanten Menge an Revertanten ausreichend ist, um das Immunsystem in die Lage zu versetzen eine protektive Immunantwort auszubilden. Alternativ wäre es möglich, daß der Effekt der E^{ms} RNase ein frühes Ereignis im Infektionsgeschehen ist und daß ein spezifisches, noch unbekanntes Ziel während der initialen Phase der Infektion getroffen werden muß, um eine Hemmung der Immunantwort auszulösen. Für die Klärung dieses Sachverhaltes sind weitere Experimente nötig.

Außer der Funktion der E^{ms} RNase als ein Pathogenitätsmarker von Pestiviren ist über die Bedeutung und den Wirkmechanismus der RNase bisher wenig bekannt. Eine der Eigenschaften des Proteins ist, daß es von infizierten Zellen in signifikanten Mengen sezerniert wird [91]. Zusammen mit der Fähigkeit des C-Terminus Zellmembranen zu durchdringen und so das restliche Protein in die Zelle zu transportieren [56] könnte dies darauf hin deuten, daß das Protein seine Aufgabe zumindest nicht ausschließlich am Ort der Virusreplikation erfüllt. Sollte diese Hypothese richtig sein,

müßte man durch Bereitstellung der aktiven RNase in trans den pathogenen Phänotyp in Tieren, die mit RNase[⊖] CSFV infiziert sind, wieder herstellen können.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde in zwei Experimenten modifiziertes attenuiertes Tollwutvirus als Vektor für E^{rns} eingesetzt. Schweine wurden mit RNase[⊖] CSFV und mit rekombinantem Tollwutvirus koinfiziert. Die Kontrollgruppe erhielt ein Tollwutvirus mit RNase[⊖] E^{rns}, die zweite Gruppe ein Tollwutvirus mit RNase[⊕] E^{rns}.

In dem ersten Experiment (TV 17, 3.1.1.2.1) zeigte die Gruppe mit dem RNase[⊕] Tollwutvirus ein etwas stärker ausgeprägtes klinisches Bild als die Kontrollgruppe. In dem zweiten Experiment (TV 18, 3.1.1.2.2) hingegen ließ sich dieses Ergebnis nicht reproduzieren, beide Gruppen zeigten Krankheitssymptome, die sich nicht signifikant unterschieden. Bei den meisten Tieren traten nur geringe Symptome auf. Lediglich Tier 52/3 der Kontrollgruppe zeigte schwere Symptomatik, die allerdings wohl nur indirekt auf die CSFV Infektion zurückzuführen war. Unter antibiotischer Therapie wurde die Lahmheit und das Allgemeinbefinden kurzzeitig besser. Nach der Schlachtung wurde dickflüssiger Eiter aus einer Schwellung am rechten Tarsalgelenk gewonnen, und es konnte eine teilweise Einschmelzung der Sehne festgestellt werden. Vermutlich ist dieser Abszess auf eine Hautverletzung mit anschließender bakterieller Besiedlung zurückzuführen, wobei eine CSFV bedingte Immunsuppression die Therapieresistenz bedingt haben dürfte. Der zweite Versuch zeigte, daß die im ersten Versuch aufgetretene stärkere Symptomatik der RNase[⊕]-Gruppe sich nicht reproduzieren ließ. Damit ist mit dem gewählten Versuchsansatz kein Beweis für die o.g. Hypothese geliefert worden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß E^{rns} nicht in trans zur Verfügung gestellt werden kann. Eine andere Möglichkeit besteht darin, daß das Tollwutvirus System nicht geeignet ist, um diese Fragestellung zu bearbeiten. Es könnte sein, daß die Tollwutviren nicht ausreichend E^{rns} produzieren um die Komplementation zu erreichen. Ebenso wenig läßt sich nach diesen Experimenten eine Aussage darüber treffen, wie sich das von den Tollwutviren produzierte E^{rns} im Wirt verteilt. Es ist daher durchaus denkbar, daß das von den Tollwutviren produzierte E^{rns} nicht seinen bisher unbekannten Wirkort erreicht. Eine weitere Erklärung besteht in der Eliminationsgeschwindigkeit

der Tollwutviren. Die Antikörperwerte der Serum-Nullkontrolle bewegten sich mit durchschnittlich 1,5 IU (TV 17) bzw. 0,8 IU (TV 18) bereits zu Beginn des Versuchs in Höhe der Positivkontrolle des SNT, vermutlich auf Grund einer hohen unspezifischen Immunreaktion der Schweine gegenüber Tollwutvirus. Dies könnte zu einer schnellen Elimination der Tollwutviren, und damit zu einer zu niedrigen Konzentration oder zeitlich zu kurzen Verfügbarkeit von E^{ms} im Organismus geführt haben. Eine Vermehrung der Tollwutviren hat jedoch wahrscheinlich stattgefunden, die Antikörper-Titer stiegen in beiden Versuchen deutlich an.

Zusammengefasst ist jedoch zu sagen, daß dieser Versuchsansatz die Frage nach der Komplementierung in trans nicht beantworten konnte. Zur Klärung der Frage nach dem Wirkprinzip der E^{ms} RNase sind weitere Experimente mit einem anderen Vektorsystem oder isoliertem E^{ms} notwendig.

Zu diesem Zweck wurde der Versuch unternommen, CSFV E^{ms} in Gewebekultur so zu exprimieren, daß seine Glykosylierung möglichst dem Muster in der natürlichen Wirtszelle entspricht. Bisherige Ansätze zur Gewinnung von E^{ms} wurden mit verschiedenen Insektenzellen Expressionssystemen durchgeführt [39, 40, 41, 46]. Dies führt zu Abweichungen im Glykosylierungsmuster. Es ist gut möglich, daß eine veränderte Glykosylierung des E^{ms} zu einer Veränderung seiner Eigenschaften führt. Wir haben daher versucht, E^{ms} in BHK-Zellen zu exprimieren, um authentisch glykosyliertes Protein zu erhalten.

In einem ersten Versuch wurde dafür das „ImpactTM-Protein Purification System“ von NEB verwendet (3.1.1.3.1). Das Zielprotein wird mit einer Chitin-bindenden Domäne als C-terminalem Marker versehen. Zwischen dem Protein und der CBD wurde das Sce VMA Intein eingefügt. Nach der Expression kann das Protein über die CBD an eine Chitin-Matrix gebunden und von kontaminierenden Proteinen gereinigt werden. Die Abspaltung des Zielproteins von der CBD, und damit der Chitin-Matrix, erfolgt unter Anwesenheit von Thiolen durch die selbstabspaltende Eigenschaft des Inteins.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit hergestellten Expressionsvektoren zeigten sowohl in Restriktionsenzymsspaltungen Banden der zu er-

wartenden Größe, als auch in der Sequenzanalyse der E^{rms}-Sequenz und der angrenzenden Bereiche die richtige Sequenz. In ersten Expressionsexperimenten konnte ich mittels Immunfluoreszenz E^{rms} nachweisen. In weiteren Expressionsexperimenten mit ³⁵S radioaktiv markiertem Fusionsprotein konnte gezeigt werden, daß das E^{rms}-Intein-CBD-Fusionsprotein spezifisch an die Chitinkügelchen des ImpactTM-Protein Purification System bindet. Die Abspaltung des E^{rms} vom Intein, und somit von der CBD und den Chitinkügelchen in Anwesenheit von Thiolen hingegen fand nicht statt. Es wurden zwei verschiedene vom Hersteller des ImpactTM-Protein Purification System empfohlene Spaltungspuffer unter verschiedenen, - ebenfalls vom Hersteller empfohlenen Spaltungsbedingungen verwendet. In keinem Experiment konnte eine Abspaltung des E^{rms} festgestellt werden. Nach dem Aufkochen mit Laemmli-Puffer hingegen fand sich das Fusionsprotein wieder im Überstand, so daß nachgewiesen war, daß das Fusionsprotein gebunden hatte. Damit ist klar, daß die Spaltung nicht funktioniert hatte.

Die wahrscheinlichste Ursache für die fehlende Spaltung dürfte in der Struktur des E^{rms}, bzw. des Fusionsproteins zu suchen sein. Möglicherweise führt die Faltung des E^{rms} oder des Fusionsproteins zu einer Maskierung der Spaltstelle, so daß die Thiole nicht, oder nicht in ausreichendem Maße an das Intein gelangen können. Die vom Hersteller empfohlene Erhöhung des pH und der Temperatur während der Spaltungsreaktion führte ebenso wenig zum Erfolg wie eine Verlängerung der Inkubationszeit oder eine höhere Konzentration an DTT. Auch der Wechsel zu Hydroxylamin als Spaltungsreagenz brachte nicht den gewünschten Erfolg. Für die C-terminale Aminosäure Alanin (Basensequenz: GCC) besteht laut Hersteller eine Spalteffizienz von 75 - 100%. Allerdings wurde das Expressionssystem für den Einsatz in Bakterien etabliert, daher ist es gut denkbar, daß die hier aufgetretenen Probleme eine Folge der Adaptation an das eukaryotische System sind.

Da das ImpactTM-Protein Purification System nicht zu dem gewünschten Ergebnis führte, wechselten wir das Expressionssystem und setzten das „Affinity® Protein Expression and Purification System“ ein (3.1.1.3.2). Bei diesem Verfahren wird das Zielprotein N-terminal mit einem Calmodulin-

bindenden Peptid (CBP) und einer Spaltstelle für die Protease Enterokinase (Ek) versehen. Da die Enterokinase eine nur extrem selten zufällig in Proteinen vorkommende Spaltsequenz erkennt, wird sie in verschiedenen Systemen zur spezifischen Spaltung von Fusionsproteinen eingesetzt. Nach der Expression kann das Fusionsprotein über das CBP an eine Calmodulin-Matrix gebunden werden. Nach der Abtrennung von kontaminierenden Proteinen erfolgt die Abspaltung des Zielproteins durch Inkubation mit Enterokinase. Da auch dieses System ursprünglich für den Einsatz in *E. coli* etabliert wurde, habe ich mit einer Modifikation des Systems gearbeitet. Die Sequenzen, die für das CBP und die Ek-Spaltstelle kodieren, wurden über PCR isoliert und amplifiziert und zwischen die E^{ms} Signalsequenz und die Sequenz des E^{ms} inseriert. Dieses Fusionsprotein wiederum wurde in den Vektor pCITE 2a ligiert, um eine Expression in Säugetierzellen durchführen zu können.

Die so hergestellten Expressionsvektoren zeigten sowohl in Restriktionsenzymsspaltungen Banden der zu erwartenden Größe, als auch in der Sequenzanalyse der E^{ms} -Sequenz und der angrenzenden Bereiche die richtige Sequenz. In Expressionsexperimenten konnte die Expression von E^{ms} mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Nach der Expression mit ^{35}S markiertem Fusionsprotein ließen sich geringe Mengen des vollständig glykosylierten Fusionsproteins bei ca. 50 kD nachweisen. Weitaus stärker exprimiert wurden allerdings Proteine mit Molekulargewichten von ca. 27, 29 und 31 kD, was nicht bzw. nur teilweise glykosyliertem E^{ms} -CBP-Fusionsprotein entsprechen könnte. Nach Inkubation mit einer Calmodulin-Matrix in Bindungspuffern mit verschiedenen, vom Hersteller empfohlenen $CaCl_2$ Konzentrationen fanden sich immer geringe Mengen des Fusionsproteins ungebunden im Überstand. Nach einem ersten Elutionsschritt fanden sich nur minimalste Mengen des Fusionsproteins, nach Aufkochen der Calmodulin-Matrix überhaupt kein Fusionsprotein im Überstand. Versuche, das Testkonstrukt mittels einer in-vitro Translation darzustellen, scheiterten. Der Vektor pCal-n-Ek ließ sich problemlos translatieren, in der Spur des Testkonstrukts fand sich keine spezifische Bande. Über die Ursache dieses Problems läßt sich derzeit nur spekulieren.

Es ist möglich, daß es mit dem modifizierten „Affinity® Protein Expression and Purification System“ zu einer Behinderung der Glykosylierung

des Fusionsproteins kommt. Entscheidend aber ist, daß die Bindung an die Calmodulin-Matrix bestenfalls marginal stattfand. Zur Feststellung der Ursache für diese Behinderung wären weitere Untersuchungen notwendig, die von mir nicht durchgeführt wurden, da sie am Ergebnis zunächst nichts geändert hätten. Die fehlende Bindung des Fusionsproteins läßt sich mit der fehlerhaften Glykosylierung nicht erklären. Wahrscheinlich liegt in diesem Fall eine räumliche Struktur des Fusionsproteins vor, die die Ausbildung einer entsprechenden Bindungsstelle verhindert.

In einem letzten Versuch E^{rns} in Säugetierzellen zu exprimieren wurde mit einem Sindbis-Vektor-System gearbeitet (3.1.1.3.3). Auch hier ergaben Spaltungen der Expressionsvektoren mit Restriktionsenzymen Banden der erwarteten Größe, und die Analyse der DNS-Sequenz des E^{rns} und des Markers wies die korrekte Sequenz auf. Nach der in-vitro Transkription ließ sich die RNS sowohl für das Testkonstrukt K18 als auch für das defekte Helferkonstrukt (DH-EB) nachweisen. Nach der co-Transfektion von BHK-Zellen mit K18 und DH-EB und Inkubation der transfizierten BHK-Zellen bis zum zpe konnte eine deutlich Infektion der Zellen mit DH-EB nachgewiesen werden. Die vom K18 abgeleiteten Proteine hingegen fanden sich nur in einzelnen Zellen. Das Helferkonstrukt stellt nur die Hüllproteine zur Verfügung, die für die Bildung infektiöser Viruspartikel und die Infektion neuer Zellen notwendig sind. Ohne die vom Vektor pSINrep5 zur Verfügung gestellten Nichtstrukturproteine, welche für die RNS Replikation und Transkription notwendig sind, kann sich das DH-EB nicht vermehren. Vor diesem Hintergrund ist es nicht nachvollziehbar, warum zwar das DH-EB Konstrukt sich in der Kultur ausbreiten konnte, die Expression des E^{rns} aber nur in wenigen Zellen erfolgte. Eine mögliche Erklärung wäre, daß die vom Plasmid pSinRep5 abgeleitete RNS durch Rekombination die Fremdsequenz eliminiert hat, und so ein Fremd-gen freies replikationskompetentes System generiert wurde.

Weitere Versuche werden notwendig sein, um ein System zu finden, das es ermöglicht, möglichst natürlich glykosyliertes E^{rns} in ausreichender Menge für die Komplementierungsversuche isolieren zu können.

Nach den bisherigen Tierversuchen ist es ganz deutlich, daß die E^{rns} RNase ein Pathogenitätsmarker ist. Ein Ausschalten der RNase Aktivität

führt in Versuchen mit Kälbern oder Ferkeln zum (weitgehenden) Ausbleiben von Krankheitssymptomen. Als Folgerung daraus wollten wir testen ob, ein Ausschalten der RNase allein ausreichend ist, um bei Infektion gravider Tiere eine Infektion der Föten, und damit die Etablierung einer persistenten Infektion zu verhindern. Ein Hinweis auf diese Möglichkeit liegt darin, daß auch E^{ms} in der Diskussion steht, die Interferonantwort auf dsRNS zu blockieren [48]. Aus diesen Gründen haben wir sowohl für BVDV als auch für CSFV Tierversuche mit $RNase^{\ominus}-E^{ms}$ Mutanten in trächtigen Tieren durchgeführt.

Trächtige Kühe wurden mit der attenuierten $RNase^{\ominus}$ BVDV Mutante XIKE-B infiziert (3.2.1.1). Die adulten Tiere zeigten nur minimale klinische Symptome, Virämie ließ sich bei keiner der Kühe nachweisen. Allerdings konnte aus Organproben von zwei der drei Föten BVDV XIKE-B isoliert werden. Trächtige Sauen wurden mit der attenuierten $RNase^{\ominus}$ CSFV Mutante 230/1 infiziert (3.1.1.1.4). Sowohl in der mit CSFV 230/1 als auch in der mit CSFV Riems infizierten Kontrollgruppe kam es zu mumifizierten und retardierten Föten. In den offensichtlich schon länger toten Föten ließ sich in beiden Gruppen kein Virus nachweisen. Bei den erst kurz vor der Schlachtung verstorbenen, oder zum Zeitpunkt der Schlachtung eingeschlaferten Föten, ließ sich nur in der mit CSFV 230/1 infizierten Gruppe Virus nachweisen, bei insgesamt 15 von 44 Föten.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind eindeutig: Die alleinige Elimination der E^{ms} RNase ist nicht ausreichend, im trächtigen Tier die Föten vor einer Infektion zu schützen. Daß sich in den mumifizierten Schweineföten kein Virus nachweisen läßt, ist kaum überraschend, da das Virus auf lebende Zellen zur Vermehrung angewiesen ist und im toten Gewebe wohl durch lytische Prozesse schnell eliminiert wird. Das Riemser Impfvirus ließ sich nicht in den bis zur Schlachtung lebenden Föten nachweisen. Offensichtlich sterben hier alle infizierten Früchte frühzeitig ab, oder die Föten, die nicht absterben, sind in der Lage die Infektion zu eliminieren. Im Fall der ebenfalls attenuierten Mutante CSFV 230/1 ist dies nicht der Fall. Wahrscheinlich konnte die Mutante erfolgreich eine persistente Infektion etablieren.

N^{pro} ist die N-terminale Protease, ein Nichtstrukturprotein, das im vi-

ralen Polyprotein am Aminoterminus zu finden ist. Es spaltet sich autolytisch vom nachfolgenden Kapsid-Protein C ab. Als besonderes Merkmal läßt sich N^{pro} nahezu vollständig deletieren, ohne die Lebensfähigkeit der Pestiviren *in vitro* und *in vivo* nachhaltig einzuschränken. In der Zellkultur verhindert es Apoptose und IFN-Bildung in Makrophagen [90]. Diese Eigenschaft führt zwangsläufig zu der Frage, ob ein Verlust des N^{pro} zu einer Attenuierung von Pestiviren führt.

In einem von Martina von Freyburg in der Arbeitsgruppe durchgeführten ersten Versuch fand sich kein Hinweis auf eine deutlich Attenuierung von CSFV N^{pro} Deletionsmutanten (Daten nicht veröffentlicht). Im Gegensatz dazu fanden Schweizer Kollegen (Mayer et al, [66]) eine vollständige Attenuierung von CSFV Alfort/187 und CSFV Eystrupp, nachdem sie das virale N^{pro} Gen durch ein murines Ubiquitin Gen ersetzt hatten. Im Gegensatz zu dem von Martina von Freyburg durchgeführten Versuch erfolgte hier die Infektion der Schweine rein auf intranasalem Weg. Da die Infektionsroute erhebliche Bedeutung für die Entwicklung der Krankheit haben könnte, erfolgte in dem zweiten von uns durchgeführten Versuch (TV 16b, 3.1.2.1) die Infektion ebenfalls nur intranasal. In diesem Versuch stellten sich die mit N^{pro}-Virus infizierten Tiere subjektiv stärker krank dar, als die mit Δ N^{pro} CSFV infizierten Tiere. Die Streuung der Befunde war in beiden Versuchsgruppen aber sehr hoch. Im Mittel hatte die mit N^{pro}-CSFV infizierte Gruppe höheres Fieber über einen längeren Zeitraum, eine länger andauernde Leukopenie und B-Zell Depletion, eine später eintretende Serokonversion und eine länger anhaltende Virämie als die Δ N^{pro} CSFV infizierten Tiere. Allerdings wiesen auch die mit Δ N^{pro} CSFV infizierten Tiere deutliche Krankheitssymptome auf, erholten sich aber schneller und besser von der Infektion, als die mit N^{pro}-CSFV infizierte Gruppe.

Neben der Infektionsroute gibt es auch in der Konstruktion der Deletionsmutanten Unterschiede. Die von Mayer et al. durchgeführte Deletion des N^{pro} ist eine vollständige Deletion, während in unserer CSFV-Mutante die ersten 29 Kodons des N^{pro} erhalten geblieben sind. Es wäre denkbar, daß es diese verbliebenen Kodons sind, welche für den Pathogenitätsmechanismus eine entscheidende Rolle spielen. In dieser Hinsicht wäre es interessant, die Experimente von Ruggli et al. [90] zur Unterdrückung der

Apoptose infizierter Zellen und der Unterdrückung der IFN-Antwort *in vitro* mit unseren ΔN^{pro} Mutanten zu wiederholen.

Ein weiterer und eventuell entscheidenderer Unterschied zwischen den verwendeten Virusmutanten liegt jedoch in der Wachstumskinetik der Mutanten. Die von Mayer et al. eingesetzten Deletionsmutanten erreichen in der SK6 Zellkultur nach 72 h zwar in etwa den gleichen Endtiter wie das Wildtyp Virus, allerdings haben sie in den ersten 12 - 24 h eine Wachstumsverzögerung von über 1 log-Stufe. Diese Wachstumsverzögerung - könnte dem Immunsystem die notwendige Zeit geben, eine Immunität aufzubauen. Nach oraler Immunisierung von Schweinen tritt bereits nach zwei Tagen eine partieller Schutz der Tiere vor Infektion auf [50]. Somit könnte eine Attenuierung der N^{pro} -Deletionsmutante nicht nur auf dem Verlust der Funktion des N^{pro} basieren, sondern auch Folge eines sekundären Wachstumsnachteils sein.

Die Ergebnisse unserer beiden Versuche zusammengekommen führten uns zu dem Schluß, daß die Deletion des N^{pro} zumindest beim Virus der klassischen Schweinepest höchstens zu einer teilweisen Attenuierung des Virus führt. Eine Beteiligung des N^{pro} an den Pathogenitätsmechanismen ist somit weiter in der Diskussion, muß aber in zusätzlichen Studien erhärtet werden. Offen bleibt in jedem Fall die Frage worin die Funktion des N^{pro} genau liegt, und wie es gegebenenfalls mit dem E^{rns} oder anderen Pathogenitätsmarkern interagiert.

Unabhängig von der Frage nach der Attenuierung der Pestiviren im adulten Tier durch Deletion des N^{pro} könnte dieses Protein eine entscheidende Rolle bei der Etablierung einer persistenten Infektion spielen. Ruggli et al. haben gezeigt, daß N^{pro} die Resistenz von SK6-Zellen gegenüber einer durch Polyinosin-Polycytidin (poly(IC)) ausgelösten Apoptose um den Faktor 100 erhöht. Ebenso konnten sie zeigen, daß N^{pro} die Bildung von $\text{IFN}\alpha/\beta$ verhindert [90]. Nach Beobachtungen von Charleston et al. ist die Unfähigkeit von zp BVDV im Fötus eine persistente Infektion zu etablieren mit der Tatsache korreliert, daß die zp Viren, im Gegensatz zum nzp Biotyp, im Fötus eine Interferonantwort auslösen [16]. Zythopathogene BVDV Stämme entstehen durch Insertionen zellulären oder viralen Ursprungs oder Deletionen im viralen Genom, was dazu führt, daß sie die

Fähigkeit verlieren, ihre eigene Replikation zu kontrollieren [55].

Um zu prüfen ob N^{pro} deletiertes nzp BVDV, welches ja analog zu den Ergebnissen von Rüggli et al. ebenfalls eine Interferonantwort auslösen sollte, noch in der Lage ist eine persistente Infektion zu etablieren, wurden fünf trächtige Kühe mit der N^{pro} deletierten BVDV-Mutante XIKE-A-NdN infiziert (3.2.1.2). Schwache klinische Zeichen traten nur bei zwei Kühen auf, die restlichen blieben symptomlos. Eine Leukopenie trat drei Tieren auf, Virämie ließ sich in keinem Fall nachweisen. Eines der Tiere trug zum Versuchsende keinen Fötus mehr, ein Abort war nicht beobachtet worden und in der Sektion fanden sich keine Hinweise auf die Ursache des Aborts. Aus Gewebeproben der übrigen vier Föten konnte in drei Fällen BVDV isoliert werden. Nach Virusanzucht, RNS Isolierung und RT-PCR konnte bestätigt werden, daß es sich bei dem isolierten Virus um XIKE-A-NdN handelt. BVDV XIKE-A-NdN besitzt im Vergleich zu wt BVDV deutlich schlechtere Wachstumseigenschaften, ähnlich wie die Konstrukte von Mayer et al. Somit bleibt auch bei XIKE-A-NdN die Frage, ob die Attenuierung des Virus tatsächlich eine Folge der N^{pro} Deletion ist, oder ob es die schlechtere Wachstumskinetik der Mutante nur dem Immunsystem ermöglicht zu reagieren, bevor klinische Symptome einer BVDV Infektion auftreten können.

Trotz der im adulten Tier attenuierten Natur von BVDV XIKE-A-NdN ist es dem Virus offensichtlich möglich, die Plazenta zu überschreiten und im Fötus eine persistente Infektion zu etablieren. Falls N^{pro} auch in vivo die Aktivierung von Typ 1 IFN verhindert, muß noch einer, oder mehrere andere Mechanismen vorhanden sein, die es dem Virus ermöglichen die Plazentarschranke zu überschreiten und in dem Fötus eine persistente Infektion zu etablieren. Da XIKE-A-NdN einen deutlichen Wachstumsnachteil gegenüber dem wt Virus aufweist, ist mit dem von uns durchgeführten Versuch auch gezeigt, daß ein solcher Wachstumsnachteil die Etablierung einer persistenten Infektion nicht verhindert.

Aus den Ergebnissen der Versuche mit N^{pro} Deletionsmutanten und E^{ms} RNase[⊖] Mutanten ergab sich die Überlegung ob eine Doppelmutation mit N^{pro} Deletion und Eliminierung der E^{ms} RNase eher zu dem gewünschten Erfolg der Unterbindung einer persistenten Infektion der Föten

bei Infektion trächtiger Muttertiere führt. Da beide Proteine offensichtlich etwas mit der Blockade der Interferon-Antwort zu tun haben, könnten die Systeme partiell redundant sein, oder sich gar gegenseitig verstärken. Ausgehend von dieser Überlegung wurde für BVDV die ΔN^{pro} RNase[⊖] Doppelmutante BVDV XIKE-B-NdN erzeugt und im Tierversuch getestet (3.2.1.3).

Nach der Infektion von trächtigen Rindern mit XIKE-B-NdN traten keinerlei klinische Symptome auf, Virämie ließ sich nicht nachweisen. Diese Befunde zeigen, daß die Doppelmutante wie die Einzelmутante attenuiert ist. Als entscheidender Unterschied wurde aber festgestellt, daß sich in keiner der fötalen Organproben BVDV nachweisen ließ.

Zumindest für BVDV bedeutet dies einen deutlichen Hinweis, daß beide Proteine an der Etablierung einer persistenten Infektion beteiligt sind und diese unabhängig von einander etablieren können.

Die vorgestellte Doppelmutante XIKE-B-NdN stellt eine gute Basis für die Entwicklung eines attenuierten BVDV-Lebendimpfstoffes dar. Sie ist apathogen und kann keine persistente Infektion etablieren, aber es wird durch Impfung mit der Mutante eine schützende Immunität gegen BVDV-2 Belastung erzeugt, die zuverlässig vor diaplazentarer Infektion schützt. Da es sich bei dem Impfvirus um ein nzp BVDV handelt, ist zudem nicht zu erwarten, daß die zufällige Impfung von pi Tieren zu Impfzwischenfällen durch Auslösung einer MD führt.

Weitere Arbeiten sind erforderlich, um die hoch interessanten Mechanismen aufzuklären, die hinter den hier vorgestellten attenuierenden Mutationen stehen.

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt *in vitro* und *in vivo* Studien, mit denen der Einfluß verschiedener Punktmutationen in Pestivirusgenomen auf die Virulenz der Erreger und deren Fähigkeit zur diaplazentaren Infektion von Föten in trächtigen Tieren untersucht werden sollte. Dabei wurden Versuche mit dem Virus der klassischen Schweinepest (CSFV) und dem Virus der bovinen viralen Diarrhöe (BVDV) durchgeführt. Angriffspunkte für die Mutationen waren die Genombereiche, die für das als RNase fungierende Strukturglykoprotein E^{ms} und die Protease N^{pro} kodieren.

Für CSFV wurde das Verhalten der RNase[⊖] Mutante W300G untersucht. Diese Mutante ist zwar in der standardmäßig verwendeten permanenten Schweinenieren-(SK6)-Zelllinie stabil, revertiert aber in infizierten Tieren umgehend zu wt Virus. Diese Reversion erfolgte so schnell, daß die Mutante in Proben aus infizierten Tieren nie nachweisbar war. Die Reversion scheint offensichtlich Zell-spezifisch zu sein, da auch in zwei Linien von Gewebekulturzellen die Restauration der Wildtypsequenz beobachtet werden konnte.

Die RNase[⊖] CSFV Mutante H346Δ, für die in früheren Versuchen gezeigt wurde, daß sie im infizierten Tier keine nennenswerte Virämie erzeugt, wurde in einem Experiment mit trächtigen Schweinen daraufhin untersucht, ob sie zu einer diaplazentaren Infektion der Föten fähig ist. Dabei zeigte sich, daß die RNase Mutation nicht ausreicht, die Infektion der Föten zu verhindern.

Weiterhin wurde versucht, nähere Informationen über das Wirkprinzip der E^{ms}-RNase zu erhalten, indem Schweine mit einem RNase[⊖] Virus infiziert und die RNase *in trans* durch ein Vektor-Virus zur Verfügung gestellt wurde. Ziel dieses Versuches war, zu überprüfen, ob durch Supplementierung der RNase die attenuierende Wirkung der RNase-Mutation im Virus aufgehoben werden kann. Diese Versuche führten nicht zu einer klaren Aussage, weil vermutlich die *in trans* bereitgestellte Menge an RNase

nicht ausreichte oder das Protein seinen Zielort nicht erreichte. Um diese Probleme lösen zu können, wurden Versuche unternommen, die RNase in vitro zu exprimieren und zu reinigen. Drei verschiedene Expressionssysteme wurden getestet, die sich aber aus unterschiedlichen Gründen alle als nicht tauglich erwiesen.

Zur Klärung der strittigen Frage, ob die Deletion des Proteins N^{pro} zu einer Attenuierung des CSFV führt, wurde ein Tierexperiment mit einer N^{pro} Deletionsmutante des CSFV durchgeführt. Trotz heterogenen Verlaufs der Erkrankungen bei den einzelnen infizierten Tieren war offensichtlich, daß die verwendete Deletionsmutante anders als ähnliche in der Literatur beschriebene Mutanten nicht apathogen ist. Dieses Ergebnis bestätigte die Daten aus früheren Experimenten in unserem Labor.

Die drei BVDV-2 Mutanten XIKE-B (E^{ms} RNase[⊖]), XIKE-A-NdN (N^{pro}-deletiert) und XIKE-B-NdN (E^{ms} RNase[⊖] und N^{pro}-deletiert) wurden in Experimenten mit trächtigen Tieren auf ihre Fähigkeit zur diaplazentaren Infektion der Föten untersucht. Dabei zeigte sich, daß die beiden Einzelmутanten im Gegensatz zur Doppelmутante eine persistente Infektion in den Föten etablieren können. Parallel dazu wurden Studien durchgeführt, die der Überprüfung der Vakzinierungseffizienz dieser Mutanten dienten. Diese Versuche ergaben Hinweise darauf, daß XIKE-B eine protektive Immunität gegen BVDV-1 und BVDV-2 induzieren kann, während Vakzinierung mit XIKE-B-NdN nur vor den Folgen einer BVDV-2 Infektion schützt.

Summary

The present thesis describes *in vitro* and *in vivo* studies to analyse the influence of different point mutations in pestiviral genomes on the virulence of the viruses and their ability to establish diaplacental infection of foetuses in pregnant animals. Experiments with classical swine fever virus (CSFV) and with bovine virus diarrhoea virus (BVDV) were conducted. Targets for mutations were those genome areas that encode structural glycoprotein E^{ms}, acting as a RNase, and protease N^{pro}.

In case of CSFV, behaviour of RNase[⊖] mutant W300G was examined. This mutant is stable in routinely used permanent swine kidney (SK6) cell line, but reverted almost instantly to wt virus in infected animals. The reversion happened so fast that mutant virus was not detectable in samples of infected animals. This reversion was apparently cell specific, as restoration of wildtype sequence could be observed in two tissue culture cell lines.

Earlier experiments showed that RNase[⊖] CSFV H346Δ does not induce noteworthy viremia in infected animals. This mutant was examined in an experiment with pregnant sows for its ability to establish diaplacental infection of foetuses. Thereby it was shown that the RNase mutation is not sufficient to prevent fetal infection.

Furthermore, it was tried to gather more information concerning the detailed function of E^{ms}-RNase. To this end pigs were infected with RNase[⊖] virus and the RNase was supplemented *in trans* via a vector virus. Purpose of this experiment was to test, if supplementation of the RNase could abrogate the attenuating effect of the RNase mutation in the virus. This experiment yielded no conclusive answer, probably because *in trans* delivered RNase did not suffice, or because the protein did not reach its site of action. To solve these problems, experiments were accomplished to express and to purify the RNase. Three different expression systems were tested, but each of them proved not to be suitable for varying reasons.

To clarify the question in dispute if deletion of protein N^{pro} leads to attenuation of CSFV, an animal experiment with a N^{pro} deletion mutant of CSFV was conducted. Despite heterogeneous course of disease in individual infected animals, the used deletion mutant was obviously not apa-

thogen, in contrast to similar mutants described in literature. This result confirmed data of earlier experiments in our laboratory.

The three BVDV-2 mutants XIKE-B ($E^{rns} RNase^{\ominus}$), XIKE-A-NdN (N^{pro} -deleted) and XIKE-B-NdN ($E^{rns} RNase^{\ominus}$ and N^{pro} -deleted) were examined in an experiment with pregnant animals to investigate if they were able to establish diaplacental infection of foetuses. It was shown that both single mutants, in contrast to the double mutant, were able to establish persistent infection in foetuses. In parallel, studies were accomplished to control vaccination efficiency of these mutants. The experiments indicated that XIKE-B is able to induce protective immunity versus BVDV-1 and BVDV-2, while vaccination with XIKE-B-NdN protects only versus BVDV-2 infection.

Literaturverzeichnis

- [1] S. Alberti, D. R. Parks, and L. A. Herzenberg. A single laser method for subtraction of cell autofluorescence in flow cytometry. *Cytometry*, 8:114 to 119, 1987.
- [2] I. H. Ansari, L.-M. Chen, D. Liang, L. H. Gil, W. Zhong, and R. O. Donis. Involvement of a Bovine Viral Diarrhea Virus NS5B Locus in Virion Assembly. *J. Virol.*, 78(18):9612–9623, 2004.
- [3] C. Baker. BVDV infection: clinical manifestations. *Michigan Dairy Review*, 17, 1996.
- [4] J. A. Baker and B. E. Sheffy. A persistent hog cholera viremia in young pigs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 105:675 to 678, 1960.
- [5] J. C. Baker. Bovine viral diarrhea virus: a review. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 190, 1987.
- [6] P. Becher, G. Meyers, A. D. Shannon, and H.-J. Thiel. Cytopathogenicity of border disease virus is correlated with integration of cellular sequences into the viral genome. *J. Virol.*, 70(5):2992–2998, 1996.
- [7] P. Becher, M. Orlich, M. König, and H.-J. Thiel. Nonhomologous RNA recombination in bovine viral diarrhea virus: Molecular characterization of a variety of subgenomic RNAs isolated during an outbreak of fatal mucosal disease. *J. Virol.*, 73:5646 to 5653, 1999.
- [8] P. Becher, M. Orlich, and H.-J. Thiel. Ribosomal S27a Coding Sequences Upstream of Ubiquitin Coding Sequences in the Genome of a Pestivirus. *J. Virol.*, 72(11):8697–8704, 1998.

- [9] P. Becher, M. Orlich, and H.-J. Thiel. RNA Recombination between Persisting Pestivirus and a Vaccine Strain: Generation of Cytopathogenic Virus and Induction of Lethal Disease. *JV*, 75(14):6256–6264, 2001.
- [10] P. Becher, R. A. Ramirez, M. Orlich, S. C. Rosales, M. König, M. Schweizer, H. Stalder, H. Schirrmeier, and H.-J. Thiel. Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. *Virology*, 311:96 to 104, 2003.
- [11] M. Beer and G. Wolf. Vaccines against infection with bovine viral diarrhea virus/mucosal disease (BVDV/MD): a short overview. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.*, 116:252 to 258, 2003.
- [12] L. S. Brackenbury, B. V. Carr, and B. Charleston. Aspects of the innate and adaptive immune responses to acute infections with bvdv. *Vet. Microbiol.*, 96:337 to 344, 2003.
- [13] C. Bruschke, J. van Oirschot, and P. van Rijn. An experimental multivalent bovine virus diarrhea virus e2 subunit vaccine and two experimental conventionally inactivated vaccines induce partial fetal protection in sheep. *Vaccine*, 17:1983 to 1991, 1999.
- [14] E. A. Carbrey, W. C. Stewart, J. I. Kresse, and M. L. Snyder. Persistent hog cholera infection detected during virulence typing of 135 field isolates. *Am. J. Vet. Res.*, 41:946 to 949, 1980.
- [15] S. Carman, T. van Dreumel, J. Ridpath, M. Hazlett, D. Alves, E. Dubovi, R. Tremblay, S. Bolin, A. Godkin, and N. Anderson. Severe acute bovine viral diarrhea in ontario, 1993-1995. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 10:27 to 35, 1998.
- [16] B. Charleston, M. D. Fray, S. Baigent, B. V. Carr, and W. I. Morrison. Establishment of persistent infection with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus in cattle is associated with a failure to induce type I interferon. *J. Gen. Virol.*, 82(8):1893–1897, 2001.

- [17] M. S. Collett, R. Larson, S. K. Belzer, and E. Retzel. Proteins encoded by bovine viral diarrhea virus: the genomic organization of a pestivirus. *Virology*, 165:200 to 208, 1988.
- [18] M. S. Collett, R. Larson, C. Gold, D. Strick, D. K. Anderson, and A. Purchio. Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhea virus. *Virology*, 165:191 to 199, 1988.
- [19] M. S. Collett, M. Wiskerchen, E. Welniak, and S. K. Belzer. Bovine viral diarrhea virus genomic organization. *Arch. Virol. Suppl.*, 3:19 to 27, 1991.
- [20] M. E. Collins, M. Desport, and J. Brownlie. Bovine viral diarrhea virus quasispecies during persistent infection. *Virology*, 259:85 to 98, 1999.
- [21] L. De Moerlooze, M. Desport, A. Renard, C. Lecomte, J. Brownlie, and J. Martial. The coding region for the 54-kda protein of several pestiviruses lacks host insertions but reveals a zinc finger-like domain. *Virology*, 177:812 to 815, 1990.
- [22] R. Deng and K. V. Brock. Molecular cloning and nucleotide sequence of a pestivirus genome, noncytopathic bovine viral diarrhea virus strain sd-1. *Virology*, 191:867 to 869, 1992.
- [23] J. T. Done, S. Terlecki, C. Richardson, J. W. Harkness, J. J. Sands, D. S. Patterson, D. Sweasey, I. G. Shaw, C. E. Winkler, and S. J. Duffell. Bovine virus diarrhoea-mucosal disease virus: pathogenicity for the fetal calf following maternal infection. *Vet. Rec.*, 106, 1980.
- [24] R. O. Donis, W. Corapi, and E. J. Dubovi. Neutralizing monoclonal antibodies to bovine viral diarrhoea virus bind to the 56k to 58k glycoprotein. *J. Gen. Virol.*, 69:77 to 86, 1988.
- [25] H. W. Dunne. Hog cholera (European swine fever). *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*, 17:315 to 359, 1973.

- [26] D. Egger, B. Wolk, R. Gosert, L. Bianchi, H. E. Blum, D. Moradpour, and K. Bienz. Expression of Hepatitis C Virus Proteins Induces Distinct Membrane Alterations Including a Candidate Viral Replication Complex. *J. Virol.*, 76(12):5974–5984, 2002.
- [27] K. Elbers, N. Tautz, P. Becher, D. Stoll, T. Rümenapf, and H.-J. Thiel. Processing in the pestivirus E2-NS2 region: identification of proteins p7 and E2p7. *J. Virol.*, 70:4131 to 4135, 1996.
- [28] Europakommission. Fragen und Antworten zur klassischen Schweinepest. *Press Releases European Commission*, MEMO/01/422, 2001.
- [29] Europakommission. Klassische Schweinepest: Neuer Test zugelassen. *Press Releases European Commission*, IP/03/1665, 2003.
- [30] C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, and L. A. Ball. Family flaviviridae. In *Virus Taxonomy. VIIIth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, San Diego, Calif., 8th edition, 2005.
- [31] C. Fetzter, B. A. Tews, and G. Meyers. The Carboxy-Terminal Sequence of the Pestivirus Glycoprotein Erns Represents an Unusual Type of Membrane Anchor. *J. Virol.*, 79(18):11901–11913, 2005.
- [32] M. D. Fray, E. A. Supple, W. I. Morrison, and B. Charleston. Germinal centre localization of bovine viral diarrhoea virus in persistently infected animals. *J. Gen. Virol.*, 81(7):1669–1673, 2000.
- [33] J. Gale, Michael, C. M. Blakely, B. Kwieciszewski, S.-L. Tan, M. Dossett, N. M. Tang, M. J. Korth, S. J. Polyak, D. R. Gretch, and M. G. Katze. Control of PKR Protein Kinase by Hepatitis C Virus Nonstructural 5A Protein: Molecular Mechanisms of Kinase Regulation. *Mol. Cell. Biol.*, 18(9):5208–5218, 1998.
- [34] J. H. Gillespie, B. E. Sheffy, and J. A. Baker. Propagation of hog cholera virus in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 105:679 to 681, 1960.

- [35] C. W. Grassmann, O. Isken, and S.-E. Behrens. Assignment of the Multifunctional NS3 Protein of Bovine Viral Diarrhea Virus during RNA Replication: an In Vivo and In Vitro Study. *J. Virol.*, 73(11):9196–9205, 1999.
- [36] C. W. Grassmann, O. Isken, N. Tautz, and S.-E. Behrens. Genetic Analysis of the Pestivirus Nonstructural Coding Region: Defects in the NS5A Unit Can Be Complemented in trans. *J. Virol.*, 75(17):7791–7802, 2001.
- [37] T. Harada, N. Tautz, and H.-J. Thiel. E2-p7 Region of the Bovine Viral Diarrhea Virus Polyprotein: Processing and Functional Studies. *J. Virol.*, 74(20):9498–9506, 2000.
- [38] J. Harkness, J. Sands, and M. Richards. Serological studies of mucosal disease virus in england and wales. *Ret Vet Sci.*, 24:98 to 103, 1978.
- [39] Y. Hausmann, G. Roman-Sosa, H.-J. Thiel, and T. Rumenapf. Classical Swine Fever Virus Glycoprotein E^{ms} Is an Endoribonuclease with an Unusual Base Specificity. *J. Virol.*, 78(10):5507–5512, 2004.
- [40] M. M. Hulst, G. Himes, E. Newbigin, and R. J. Moormann. Glycoprotein e2 of classical swine fever virus: expression in insect cells and identification as a ribonuclease. *Virology*, 200:558 to 565, 1994.
- [41] M. M. Hulst and R. J. Moormann. 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 to 2787, 1997.
- [42] M. M. Hulst, F. E. Panoto, A. Hoekman, H. G. van Gennip, and R. J. Moormann. Inactivation of the rnase activity of glycoprotein e(rns) of classical swine fever virus results in a cytopathogenic virus. *J. Virol.*, 72:151 to 157, 1998.

- [43] M. M. Hulst, H. G. P. van Gennip, and R. J. M. Moormann. Passage of Classical Swine Fever Virus in Cultured Swine Kidney Cells Selects Virus Variants That Bind to Heparan Sulfate due to a Single Amino Acid Change in Envelope Protein E^{ms}. *J. Virol.*, 74(20):9553–9561, 2000.
- [44] M. M. Hulst, H. G. P. van Gennip, A. C. Vlot, E. Schooten, A. J. de Smit, and R. J. M. Moormann. Interaction of Classical Swine Fever Virus with Membrane-Associated Heparan Sulfate: Role for Virus Replication In Vivo and Virulence. *J. Virol.*, 75(20):9585–9595, 2001.
- [45] M. M. Hulst, H. G. P. van Gennip, A. C. Vlot, E. Schooten, A. J. de Smit, and R. J. M. Moormann. Interaction of Classical Swine Fever Virus with Membrane-Associated Heparan Sulfate: Role for Virus Replication In Vivo and Virulence. *J. Virol.*, 75(20):9585–9595, 2001.
- [46] M. Iqbal, H. Flick-Smith, and J. W. McCauley. Interactions of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein E^{ms} with cell surface glycosaminoglycans. *J. Virol.*, 81(2):451–459, 2000.
- [47] M. Iqbal and J. W. McCauley. Identification of the glycosaminoglycan-binding site on the glycoprotein E^{ms} of bovine viral diarrhoea virus by site-directed mutagenesis. *J Gen Virol*, 83(9):2153–2159, 2002.
- [48] M. Iqbal, E. Poole, S. Goodbourn, and J. W. McCauley. Role for Bovine Viral Diarrhea Virus E^{ms} Glycoprotein in the Control of Activation of Beta Interferon by Double-Stranded RNA. *J. Virol.*, 78(1):136–145, 2004.
- [49] C. M. Johnson, D. R. Perez, R. French, W. C. Merrick, and R. O. Donis. The NS5A protein of bovine viral diarrhoea virus interacts with the alpha subunit of translation elongation factor-1. *J Gen Virol*, 82(12):2935–2943, 2001.

- [50] V. Kaden and B. Lange. Oral immunisation against classical swine fever (csf): onset and duration of immunity. *Vet. Microbiol.*, 82:301 to 310, 2001.
- [51] S. Karsten, G. Rave, and J. Krieter. Monte carlo simulation of classical swine fever epidemics and control i. general concepts and description of the model. *Vet. Microbiol.*, 108:187 to 198, 2005.
- [52] H. Kupfermann, H.-J. Thiel, E.-J. Dubovi, and G. Meyers. Bovine viral diarrhea virus: characterization of a cytopathogenic defective interfering particle with two internal deletions. *J. Virol.*, 70(11):8175–8181, 1996.
- [53] B. M. Kümmerer, D. Stoll, and G. Meyers. Bovine Viral Diarrhea Virus Strain Oregon: a Novel Mechanism for Processing of NS2-3 Based on Point Mutations. *J. Virol.*, 72(5):4127–4138, 1998.
- [54] B. M. Kümmerer, N. Tautz, P. Becher, H.-J. Thiel, and G. Meyers. The genetic basis for cytopathogenicity of pestiviruses. *Vet. Microbiol.*, 77:117–128, 2000.
- [55] T. Lackner, A. Müller, A. Pankraz, P. Becher, H.-J. Thiel, A. E. Gorbalenya, and N. Tautz. Temporal Modulation of an Autoprotease Is Crucial for Replication and Pathogenicity of an RNA Virus. *J. Virol.*, 78:10765–10775, 2004.
- [56] J. P. M. Langedijk. Translocation Activity of C-terminal Domain of Pestivirus E^{rns} and Ribotoxin L3 Loop. *J. Biol. Chem.*, 277(7):5308–5314, 2002.
- [57] J. P. M. Langedijk, P. A. van Veelen, W. M. M. Schaaper, A. H. de Ru, R. H. Meloen, and M. M. Hulst. A Structural Model of Pestivirus E^{rns} Based on Disulfide Bond Connectivity and Homology Modeling Reveals an Extremely Rare Vicinal Disulfide. *J. Virol.*, 76(20):10383–10392, 2002.
- [58] H. Laude and J. Gelfi. Properties of border disease virus as studied in a sheep cell line. *Arch. Virol.*, 62:341 to 346, 1979.

- [59] C. Lazar, N. Zitzmann, R. A. Dwek, and N. Branza-Nichita. The pestivirus E^{trns} glycoprotein interacts with e2 in both infected cells and mature virions. *Virology*, 314:696 to 705, 2003.
- [60] S. Y. Le, N. Sonenberg, and J. V. M. Jr. Unusual folding regions and ribosome landing pad within hepatitis c virus and pestivirus rnas. *Gene*, 154:137 to 143, 1995.
- [61] K. M. Lee and J. H. Gillespie. Propagation of virus diarrhea virus of cattle in tissue culture. *Am. J. Vet. Res.*, 18:952 to 953, 1957.
- [62] K. Li, E. Foy, J. C. Ferreon, M. Nakamura, A. C. M. Ferreon, M. Ikeda, S. C. Ray, J. Gale, Michael, and S. M. Lemon. Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *PNA*, 102(8):2992–2997, 2005.
- [63] B. Liess, S. Orban, H. R. Frey, G. Trautwein, W. Wiefel, and H. Blindow. Studies on transplacental transmissibility of a bovine virus diarrhoea (BVD) vaccine virus in cattle. II. Inoculation of pregnant cows without detectable neutralizing antibodies to BVD virus 90-229 days before parturition (51st to 190th day of gestation). *Zentralbl. Veterinarmed. B.*, 31:669 to 681, 1984.
- [64] B. D. Lindenbach and C. M. Rice. Flaviviridae: The viruses and their replication. In *Fields virology*.
- [65] K. Maurer, T. Krey, V. Moennig, H.-J. Thiel, and T. Rumenapf. CD46 Is a Cellular Receptor for Bovine Viral Diarrhea Virus. *J. Virol.*, 78(4):1792–1799, 2004.
- [66] D. Mayer, M. A. Hofmann, and J.-D. Tratschin. Attenuation of classical swine fever virus by deletion of the viral N^{pro} gene. *Vaccine*, 22:317 to 328, 2004.
- [67] Universal Virus Database of the International Committee on Taxonomy of Viruses. ICTVdB Index of Viruses: Flaviviridae. *Online Quelle*.

- [68] A. W. McClurkin, E. T. Littledike, R. C. Cutlip, G. H. Frank, M. F. Coria, and S. R. Bolin. Production of cattle immunotolerant to bovine viral diarrhea virus. *Can J Comp Med.*, 48:156 to 161, 1984.
- [69] W. L. Mengeling and N. F. Cheville. Host response to persistent infection with hog cholera virus. *Proc Annu Meet U S Anim Health Assoc.*, 72:283 to 296, 1968.
- [70] C. Meyer, M. von Freyburg, K. Elbers, and G. Meyers. Recovery of Virulent and RNase-Negative Attenuated Type 2 Bovine Viral Diarrhea Viruses from Infectious cDNA Clones. *J. Virol.*, 76(16):8494–8503, 2002.
- [71] G. Meyers, A. Saalmüller, and M. Büttner. Mutations Abrogating the RNase Activity in Glycoprotein E^{ms} of the Pestivirus Classical Swine Fever Virus Lead to Virus Attenuation. *J. Virol.*, 73(12):10224–10235, 1999.
- [72] G. Meyers, N. Tautz, E. J. Dubovi, and H.-J. Thiel. Viral cytopathogenicity correlated with integration of ubiquitin-coding sequences. *Virology*, 180:602 to 616, 1991.
- [73] G. Meyers, N. Tautz, R. Stark, J. Brownlie, E. J. Dubovi, M. S. Collett, and H.-J. Thiel. Rearrangement of viral sequences in cytopathogenic pestiviruses. *Virology*, 191:368 to 386, 1992.
- [74] G. Meyers and H.-J. Thiel. Cytopathogenicity of classical swine fever virus caused by defective interfering particles. *J. Virol.*, 69(6):3683–3689, 1995.
- [75] G. Meyers and H.-J. Thiel. Molecular characterization of pestiviruses. *Adv. Virus Res.*, 47:53 to 118, 1996.
- [76] C. Mittelholzer, C. Moser, J. D. Tratschin, and M. A. Hofmann. Generation of cytopathogenic subgenomic rna of classical swine fever virus in persistently infected porcine cell lines. *Virus Res.*, 51:125 to 137, 1997.

- [77] V. Moennig and I. Greiser-Wilke. Perspectives on bvd eradication in germany. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.*, 116:222 to 226, 2003.
- [78] V. Moennig and P. G. Plagemann. The pestiviruses. *Adv. Virus Res.*, 41:53 to 98, 1992.
- [79] R. J. M. Moormann, A. Bouma, J. A. Kramps, C. Terpstra, and H. J. D. Smit. Development of a classical swine fever subunit marker vaccine and companion diagnostic test. *Vet. Microbiol.*, 73:209 to 219, 2000.
- [80] M. Nagai, M. Sato, H. Nagano, H. Pang, X. Kong, T. Murakami, T. Ozawa, and H. Akashi. Nucleotide sequence homology to bovine viral diarrhea virus 2 (bvdv 2) in the 5' untranslated region of bvdvs from cattle with mucosal disease or persistent infection in japan. *Vet. Microbiol.*, 60:271 to 276, 1998.
- [81] D. R. Parks, L. L. Lanier, and L. A. Herzenberg. In D. M. Weir and L. A. Herzenberg and C. C. Blackwell, editor, *The Handbook of Experimental Immunology.*, page 29.1 to 29.21. Blackwell, Edinburgh., 4th edition, 1986.
- [82] D. J. Paton, J. P. Lowings, and A. D. Barrett. Epitope mapping of the gp53 envelope protein of bovine viral diarrhea virus. *Virology*, 190:763 to 772, 1992. Erratum in *Virology* 1992 Dec; 191(2):1013.
- [83] C. Pellerin, J. van den Hurk, J. Lecomte, and P. Tussen. Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology*, 203, 1994.
- [84] T. L. Poole, C. Wang, R. A. Popp, L. N. Potgieter, A. Siddiqui, and M. S. Collett. Pestivirus translation initiation occurs by internal ribosome entry. *Virology*, 206:750 to 754, 1995.
- [85] B. J. Potts, L. J. Berry, B. I. Osburn, and K. P. Johnson. Viral persistence and abnormalities of the central nervous system after congenital infection of sheep with border disease virus. *J. Infect. Dis.*, 151:337 to 343, 1985.

- [86] F. Qi, J. F. Ridpath, T. Lewis, S. R. Bolin, and E. S. Berry. Analysis of the bovine viral diarrhea virus genome for possible cellular insertions. *Virology*, 189:285 to 292, 1992.
- [87] L. Qu, L. K. McMullan, and C. M. Rice. Isolation and Characterization of Noncytopathic Pestivirus Mutants Reveals a Role for Nonstructural Protein NS4B in Viral Cytopathogenicity. *J. Virol.*, 75(22):10651–10662, 2001.
- [88] J. F. Ridpath, S. R. Bolin, and E. J. Dubovi. Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes. *Virology*, 205, 1994.
- [89] C. E. Ross, E. J. Dubovi, and R. O. Donis. Herd problem of abortions and malformed calves attributed to bovine viral diarrhea. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 188, 1986.
- [90] N. Ruggli, J.-D. Tratschin, M. Schweizer, K. C. McCullough, M. A. Hofmann, and A. Summerfield. Classical Swine Fever Virus Interferes with Cellular Antiviral Defense: Evidence for a Novel Function of Npro. *J. Virol.*, 77:7645–7654, 2003.
- [91] T. Rümenapf, G. Unger, J. H. Strauss, and H.-J. Thiel. Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses. *J. Virol.*, 67:3288 to 3294, 1993.
- [92] R. Schneider, G. Unger, R. Stark, E. Schneider-Scherzer, and H.-J. Thiel. Identification of a structural glycoprotein of an rna virus as a ribonuclease. *Science*, 261:1169 to 1171, 1993.
- [93] R. Stark. Virus der klassischen Schweinepest - Nachweis der virus-kodierten Proteine und Aufklärung der Genomorganisation. *Dissertation der Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen*, 1994.
- [94] R. Stark, G. Meyers, T. Rümenapf, and H.-J. Thiel. Processing of pestivirus polyprotein: cleavage site between autoprotease and nucleocapsid protein of classical swine fever virus. *J. Virol.*, 67:7088 to 7095, 1993.

- [95] F. Steck, S. Lazary, H. Fey, A. Wandeler, C. Huggler, G. Oppliger, H. Baumberger, R. Kderli, and J. Martig. Immune responsiveness in cattle fatally affected by bovine virus diarrhea-mucosal disease. *Zentralbl. Veterinarmed. B.*, 27:429 to 445, 1980.
- [96] S. Steffens, H.-J. Thiel, and S.-E. Behrens. The RNA-dependent RNA polymerases of different members of the family Flaviviridae exhibit similar properties in vitro. *J Gen Virol*, 80(10):2583–2590, 1999.
- [97] H. Strandstrom, P. Veijalainen, V. Moennig, G. Hunsmann, H. Schwarz, and W. Schäfer. C-type particles produced by a permanent cell line from a leukemic pig. i. origin and properties of the host cells and some evidence for the occurrence of c-type-like particles. *Virology*, 57:175 to 178, 1974.
- [98] M. Susa, M. König, A. Saalmüller, M. J. Reddehase, and H.-J. Thiel. Pathogenesis of classical swine fever: B-lymphocyte deficiency caused by hog cholera virus. *J. Virol.*, 66:1171 to 1175, 1992.
- [99] J. K. Tamura, P. Warrenner, and M. S. Collett. Rna-stimulated ntpase activity associated with the p80 protein of the pestivirus bovine viral diarrhea virus. *Virology*, 193:1 to 10, 1993.
- [100] N. Tautz, A. Kaiser, and H.-J. Thiel. Ns3 serine protease of bovine viral diarrhea virus: characterization of active site residues, ns4a cofactor domain, and protease-cofactor interactions. *Virology*, 273:351 to 363, 2000.
- [101] N. Tautz, G. Meyers, R. Stark, E. Dubovi, and H.-J. Thiel. Cytopathogenicity of a pestivirus correlates with a 27-nucleotide insertion. *J. Virol.*, 70(11):7851–7858, 1996.
- [102] N. Tautz, H.-J. Thiel, E. J. Dubovi, and G. Meyers. Pathogenesis of mucosal disease: a cytopathogenic pestivirus generated by an internal deletion. *J. Virol.*, 68:3289 to 3297, 1994.

- [103] H.-J. Thiel, G. W. Plagemann, and V. Moennig. The pestiviruses. In B.N. Fields, D.M. Knipe and P.M. Howley, editor, *Fields virology*, page 1059 to 1073. Lippincott-Raven Philadelphia, 3 edition, 1996.
- [104] H.-J. Thiel, R. Stark, E. Weiland, T. Rümenapf, and G. Meyers. Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus. *J. Virol.*, 65:4705 to 4712, 1991.
- [105] N. R. Underdahl, O. D. Grace, and A. B. Hoerlein. Cultivation in tissue-culture of cytopathogenic agent from bovine mucosal disease. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 94:795 to 797, 1957.
- [106] J. T. van Oirschot. Diseases of swine 7th. In *Diseases of Swine 7th*, page 274 to 285. Iowa State University Press, Ames, IA, 7 edition, 1992.
- [107] P. A. van Rijn, H. G. van Gennip, E. J. Meijer, and R. J. Moormann. Epitope mapping of envelope glycoprotein e1 of hog cholera virus strain brescia. *J. Gen. Virol.*, 74:2053 to 2060, 1993.
- [108] P. Vannier, E. Plateu, and J. P. Tillon. Congenital tremor in pigs farrowed from sows given hog cholera virus during pregnancy. *Am. J. Vet. Res.*, 42:135 to 137, 1981.
- [109] V. B. Vassilev and R. O. Donis. Bovine viral diarrhea virus induced apoptosis correlates with increased intracellular viral RNA accumulation. *Vet. Rec.*, 69:95 to 107, 2000.
- [110] S. Vilcek, J. F. Ridpath, H. V. Campen, J. L. Cavender, and J. Warg. Characterization of a novel pestivirus originating from a pronghorn antelope. *Vet. Rec.*, 108:187–193, 2005.
- [111] B. Walders, A. Raschke, M. Neugebauer, E. Geuther, W. Bertling, C. Reiser, A. Buck, S. Strich, and J. Hess. Blending of a conventional mycoplasma hyopneumoniae vaccine with a positive marker: tracking of immunised pigs by peptide-specific antibodies raised to the marker component. *Ret Vet Sci.*, 78:135 to 141, 2005.

- [112] Z. Wang, Y. Nie, P. Wang, M. Ding, and H. Deng. Characterization of classical swine fever virus entry by using pseudotyped viruses: E1 and E2 are sufficient to mediate viral entry. *Virology*, 330:332 to 341, 2004.
- [113] P. Warrener and M. S. Collett. Pestivirus NS3 (p80) protein possesses RNA helicase activity. *J. Virol.*, 69:1720 to 1726, 1995.
- [114] E. Weiland, R. Ahl, R. Stark, F. Weiland, and H.-J. Thiel. A second envelope glycoprotein mediates neutralization of a pestivirus, hog cholera virus. *J. Virol.*, 66:3677 to 3682, 1992.
- [115] E. Weiland, R. Stark, B. Haas, T. Rümenapf, G. Meyers, and H.-J. Thiel. Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer. *J. Virol.*, 64:3563 to 3569, 1990.
- [116] G. Wensvoort and C. Terpstra. Swine fever: a changing clinical picture. *Tijdschr. Diergeneesk.*, 110:263 to 269, 1985.
- [117] M. N. Widjoatmodjo, H. G. P. van Gennip, A. Bouma, P. A. van Rijn, and R. J. M. Moormann. Classical Swine Fever Virus E^{ms} Deletion Mutants: trans-Complementation and Potential Use as Non-transmissible, Modified, Live-Attenuated Marker Vaccines. *J. Virol.*, 74(7):2973–2980, 2000.
- [118] J. M. Windisch, R. Schneider, R. Stark, E. Weiland, G. Meyers, and H.-J. Thiel. RNase of classical swine fever virus: biochemical characterization and inhibition by virus-neutralizing monoclonal antibodies. *J. Virol.*, 70:352 to 358, 1996.
- [119] M. Wiskerchen and M. S. Collett. Pestivirus gene expression: protein p80 of bovine viral diarrhea virus is a proteinase involved in polyprotein processing. *Virology*, 184:341 to 350, 1991.
- [120] M. Xiao, C. Y. Zhang, Z. Pan, H. X. Wu, and J. Q. Guo. Classical swine fever virus NS5B-GFP fusion protein possesses an RNA-dependent RNA polymerase activity. *Arch. Virol.*, 147:1779 to 1787, 2002.

- [121] J. Xu, E. Mendez, P. Caron, C. Lin, M. Murcko, M. Collett, and C. Rice. Bovine viral diarrhea virus NS3 serine proteinase: polyprotein cleavage sites, cofactor requirements, and molecular model of an enzyme essential for pestivirus replication. *J. Virol.*, 71(7):5312–5322, 1997.
- [122] W. Zhong, L. L. Gutshall, and A. M. Del Vecchio. Identification and Characterization of an RNA-Dependent RNA Polymerase Activity within the Nonstructural Protein 5B Region of Bovine Viral Diarrhea Virus. *J. Virol.*, 72(11):9365–9369, 1998.
- [123] G. Zimmer, G. Wentik, J. Brinkhof, C. Bruschke, F. Westerbrink, A. Crauweis, and I. de Goey. Model for testing efficacy of bovine viral diarrhea vaccines against intrauterine infection. proceedings of the 14th world congress on diseases of cattle. *Proceedings of the 14th World Congress on Diseases of Cattle*.

Abkürzungsverzeichnis

Δ	deletiert
38A ₁ D	Schweinelymphomzellen
α -	anti-
RNase [⊖]	RNase negativ
RNase [⊕]	RNase positiv
AB	Allgemeinbefinden
AS	Aminosäure
BC	Buffy Coat
BDV	Border Disease Virus der Schafe
BHK	Baby Hamster Kidney Cells
BVDV	Bovine Virus Diarrhoe Virus, Virus des Virusdurchfalls der Rinder
CBD	Chitin bindende Domäne
CBP	Calmodulin-bindendes Peptid
CSFV	Classical Swine Fever Virus, Virus der klassischen Schweinepest
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dsRNS	doppelstrang RNS
DTT	Dithiothreitol

Abkürzungsverzeichnis

eEF1A	eucaryotic translation elongation factor 1A, eukaryotischer Translations-Verlängerungs-Faktor 1A
Ek	Enterokinase
FA	Futterraufnahme
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	fetal calf serum, fötales Kälberserum
FLI	Friedrich Loeffler Institut
h	Stunde
HCV	Hepatitis C Virus
i.m.	intramuskulär
i.n.	intranasal
IF	indirekte Immunfluoreszenz
IFN	Interferon
IRES	internal ribosomal entry site
IRF-3	IFN regulatory factor 3
IU	International Unit, internationale Einheit
K	Lysin
kB	kilo Basen
KID	Kultur infektiöse Dosis
KSP	Klassische Schweinepest, Classical swine fever, Hog cholera
L	Leucin
LB	Luria Bertrani

m.o.i.	multiplicity of infection
mAb	monoclonal Antibody, monoklonaler Antikörper
MAX	Porcine Transformed Kidney Cells
MD	Mucosal Disease
MDBK	Marbin Darby Bovine Kidney Cells
min	Minute
ml	Milliliter
MPI	Max Planck Institut
nAk	neutralisierende Antikörper
NTR	nicht-translatierte Region
nzp	nicht-zytopathogen
o.b.B.	ohne besonderen Befund
o.g.	oben genannt
OD	optische Dichte
OIE	Office internationale des épizooties
ORF	open reading frame, offenes Leseraster
p.i.	persistent infiziert
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Poly Buffered Saline
pc	post challenge, nach Belastungsinfektion
PDC	plasmacytoid dendritic cells, plasmazytoide dendritische Zellen

Abkürzungsverzeichnis

pi	post infectionem
PKR	IFN-induzierte Proteinkinase
RIP	Radioimmunpräzipitation
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s.u.	siehe unten
SK	Swine Kidney Cells
SSeq	Signalsequenz
STE	Swine Testis Epithelioid Cells
TLR3	Toll-like receptor 3
TRIF	Toll-IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN- β
UpM	Umdrehungen pro Minute
W	Tryptophan
wt	Wildtyp
zp	zytopathogen
zpe	zytopathogener Effekt

Abbildungsverzeichnis

1.1	Genom Pestiviren	16
1.2	CSFV E ^{rns} 3D	20
2.1	Konstrukt K15	65
2.2	Konstrukt K2	66
3.1	Fieber TV 16a	77
3.2	Leukozyten TV 16a	78
3.3	B-Zellen TV 16a	78
3.4	Sequenz TV 16a	79
3.5	RNase Nase TV 16a	80
3.6	RNase BC TV 16a	81
3.7	RNase 255/1 Zellkultur	83
3.8	Fieber TV19	86
3.9	Leukozyten TV19	86
3.10	B-Zellen TV19	87
3.11	infizierte Leukozyten TV19	87
3.12	Fieber TV 20	89
3.13	Fieber TV 17	101
3.14	Leukozyten TV 17	103
3.15	B-Zellen TV 17	105
3.16	RNase-Test TV 17	106
3.17	Fieber TV 18	108
3.18	Leukozyten TV 18	111
3.19	B-Zellen TV 18	112
3.20	Test Impact 1	116
3.21	Test Impact 2	117
3.22	Impact B	118

3.23 Impact A	119
3.24 Test Affinity	120
3.25 Affinity A	122
3.26 Affinity B	123
3.27 Affinity C	124
3.28 Test Sindbis	125
3.29 RNS Sindbis	126
3.30 Fieber TV 16b	131
3.31 Leukozyten TV 16b	133
3.32 B-Zellen TV 16b	134
3.33 Antikörper TV 16b	135
3.34 Leukzyten 1. Belastungsversuch	151
3.35 SNT vs BVDV-2, 1. Belastungsversuch	160
3.36 SNT vs BVDV-1, 1. Belastungsversuch	160
3.37 Leukozyten 2. Belastungsversuch	163
3.38 SNT vs BVDV-2, 2. Belastungsversuch	165
3.39 SNT BVDV-1, 2. Belastungsversuch	181

Tabellenverzeichnis

2.1	Konstrukte Affinity	64
2.2	Konstrukte Impact™	66
2.3	Konstrukte Impact™2	67
2.4	Konstrukte Sindbis	69
3.1	Fieber TV 20	90
3.2	Föten Riems, TV 20	93
3.3	Föten 230/1, TV 20	95
3.4	Fieber TV 17 Gr. 26	99
3.5	Fieber TV 17 Gr. 28	100
3.6	Leukozyten TV 17	102
3.7	B-Zellen TV 17	104
3.8	Fieber TV 18 Gr. 52	109
3.9	Fieber TV 18 Gr. 50	110
3.10	Leukozyten TV 18	113
3.11	B-Zellen TV 18	114
3.12	Fieber TV 16b	130
3.13	Gesamtleukozyten TV 16b	132
3.14	B-Zellen TV 16b	134
3.15	Virusnachweis BC TV 16b	136
3.16	Virusnachweis Nase TV 16b	137
3.17	Leukozyten XIKE-B	141
3.18	Virusnachweis XIKE-B	142
3.19	Leukozyten XIKE-A-NdN	145
3.20	Virusnachweis XIKE-A-NdN	146
3.21	Virusnachweis XIKE-B-NdN	148
3.22	Leukozyten G1 & G2 1. Belastungsversuch	152
3.23	Leukozyten G3 & G4 1. Belastungsversuch	153

3.24 buffy coat G1 und G2 1. Belastungsversuch	154
3.25 buffy coat G3 und G4 1. Belastungsversuch	155
3.26 Organe G1 und G2 1. Belastungsversuch	157
3.27 Organe G3 und G4 1. Belastungsversuch	158
3.28 Leukozyten G1 pv 2. Belastungsversuch	162
3.29 Leukozyten 3 pv 2. Belastungsversuch	166
3.30 BC G1 pv 2. Belastungsversuch	167
3.31 BC G3 pv 2. Belastungsversuch	168
3.32 Leukozyten G1 pc 2. Belastungsversuch	169
3.33 Leukozyten G2 pc 2. Belastungsversuch	170
3.34 Leukozyten G3 und G4 pc 2. Belastungsversuch	171
3.35 BC G1 pi 2. Belastungsversuch	172
3.36 BC G2 pi 2. Belastungsversuch	173
3.37 BC G3 u. 4 pi 2. Belastungsversuch	174
3.38 Virusnachweis G2 2. Belastungsversuch	175
3.39 Virusnachweis G4 2. Belastungsversuch	176
3.40 Virusnachweis G1 2. Belastungsversuch	177
3.41 Virusnachweis G3 2. Belastungsversuch	178
3.42 SNT G1 u. G2 2. Belastungsversuch	179
3.43 SNT G3 u. G4 2. Belastungsversuch	180

Danksagung

Mein Dank gilt:

PD Dr. Gregor Meyers, für die Bereitstellung des Themas und die Unterstützung während der Bearbeitung,

Dr. Martina von Freyburg, für die Einarbeitung in die Tierversuche und die molekularbiologische Arbeit,

Dr. Roger Bernhard, Janett Wieseler, Maren Ziegler, Birke Tews, Tine Luttermann und Petra Wulle, für die gute Zusammenarbeit und gegenseitige Hilfe im Laboralltag,

Prof. Dr. H.-J. Thiel, für die Bereitschaft das Erstgutachten zu erstellen, meinen *Eltern*, die mich immer unterstützt haben,

und natürlich meiner *Verlobten*, die bisher mit mir zusammen durchgehalten hat.

Weiterhin bedanke ich mich bei der Firma *Boehringer Ingelheim*, aus deren Kassen das Geld floß, durch das diese Arbeit ermöglicht wurde, und bei den *Tierpflegern* und weiteren *Kollegen* im FLI Tübingen, die immer bereit waren mit Rat und Tat zu helfen.

Und zuletzt sollen auch die *Tiere, Rinder und Schweine*, die für diese Versuche ihr Leben gelassen haben, nicht fehlen.

Erklärung

nach §10(5) der Promotionsordnung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

ISBN 978-3-939902-40-9



Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH
35392 Gießen · Frankfurter Str. 89 · Tel. 0641 / 24466 · Fax: 0641 / 25375
e-mail: Geschaeftsstelle@dvg.net · Homepage: <http://www.dvg.net>