

**Parapockenvirus ORF-Virus D1701:  
Attenuierung und Herstellung einer  
Vektorvakzine  
gegen die Borna'sche Krankheit**

der Fakultät für Biologie

der EBERHARD KARLS UNIVERSITÄT TÜBINGEN

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

von

**Marco Henkel**

aus Sindelfingen

vorgelegte

**DISSERTATION**

**2007**

Tag der mündlichen Prüfung:	20.07.2007
Dekan:	Professor Dr. F. Schöffl
1. Berichterstatter:	Professor Dr. E. Pfaff
2. Berichterstatter:	Professor Dr. F. Götz

Die vorliegende Arbeit wurde an der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere (BFAV), dem heutigen Friedrich-Löffler-Institut (FLI) in Tübingen unter Anleitung von Herrn Dr. H.-J. Rziha und Herrn Prof. Dr. E. Pfaff angefertigt.

Dem Präsidenten des Friedrich-Löffler-Instituts Herrn Prof. Dr. T.C. Mettenleiter danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit am FLI anfertigen zu können.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. H.-J. Rziha für die Bereitstellung des Themas, seine ständige Diskussionsbereitschaft, seine Geduld und die vertrauensvolle Zusammenarbeit, die mir ein hohes Maß an selbständiger Arbeit in einem hervorragenden Umfeld ermöglichten.

Herrn Prof. Dr. E. Pfaff und Herrn Prof. Dr. F. Götz danke ich für die Bereitschaft, diese Arbeit zu begutachten und vor der Fakultät für Biologie zu vertreten.

Herrn Prof. Dr. L. Stitz und Herrn Prof. Dr. O. Planz möchte ich für die praktische Unterstützung, die stete Diskussionsbereitschaft, die kritische Beurteilung der Arbeit danken und die Bereitstellung von Virusmaterial und Antikörpern.

Herrn Prof. Dr. M. Büttner danke ich für das Bereitstellen von Virus- und Zellmaterial, seine praktischen Ratschläge und für die sehr freundschaftliche und vertrauensvolle Zusammenarbeit.

Ebenfalls möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. A. Mercer und Dr. S. Fleming von der University of Otago, Dunedin, New Zealand bedanken, die meinen Aufenthalt in Neuseeland zu einem unvergesslichen Erlebnis gemacht haben.

Besonders bedanken möchte ich mich bei der guten „Seele“ des Labors, Frau B. Bauer, für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft und das freundschaftliche Verhältnis, das wir über die Jahre gewonnen haben.

Bei meinen Arbeitskollegen Timo Fischer, Rosita Cottone, Katja Oesterle, Tanja Twardawa, Bärbel Hoegen, Mandy Lauckner, Karina Mildner, Eduard Hettich, Roger Bernhard, und Christine Hepper bedanke ich mich für die Mithilfe bei verschiedenen Arbeiten und die tolle Arbeitsatmosphäre, die viel Spaß in den Laboralltag brachte.

Ein großes Dankeschön gilt Herrn W. Kramer für seine geduldige Hilfe und die hervorragende Ausführung aller Fotoarbeiten.

Vor allem jedoch bedanke ich mich bei meinen Eltern und meiner Familie für alles, was diesen Weg überhaupt ermöglichte.

Für TWAIN  
und BARBARA



---

## Inhaltsangabe

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>11</b>
1.1	Klinische Manifestationen nach Parapockenvirus (PPV)-Infektionen	12
1.2	Morphologie der PPV	13
1.3	Genomorganisation der PPV	14
1.4	Replikationszyklus, Gen- und Promotorstrukturen der PPV	17
1.5	Interaktion zwischen dem PPV ORFV und dem Immunsystem des Wirtes	19
1.6	Verhalten von PPV in nicht-permissiven Wirten	22
1.7	PPV als virale Vektoren	23
1.8	Klassifizierung, Klinik, Struktur und Genomorganisation des Borna Disease Virus (BDV)	25
1.9	Vakzinierung	29
1.10	Ziel der Arbeit	29
<b>2</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>31</b>
2.1	Bakterienstämme	31
2.2	Kulturmedien für Bakterien	31
2.3	Plasmide und Vektoren	33
2.4	Zelllinien und Zellkulturmedien	35
2.5	Viren	38
2.6	Puffer und Lösungen für DNA	39
2.7	Puffer und Lösungen für RNA	43
2.8	Lösungen für DNA-Hybridisierungen	44
2.9	Lösungen für RNA-Hybridisierungen	44
2.10	Lösungen für in situ Hybridisierungen	45
2.11	Lösungen für PCR	47
2.12	Lösungen für Proteinanalysen	47
2.13	Western-Blot-Puffer und -Lösungen:	49
2.14	Lösungen für immunhistochemische Analysen	50
2.15	Lösungen für die Isolierung von Gehirnlymphozyten:	51
2.16	Weitere Puffer und Lösungen	52

2.17	Lösungen für ELISA .....	53
2.18	Substratlösung für BDV FFU-Test: .....	54
2.19	Reagenzien.....	54
2.20	Nukleinsäuren-Längenstandards und Protein-Molekulargewichts-Marker.....	56
2.21	Radioaktive Substanzen .....	56
2.22	Enzyme .....	56
2.23	Antikörper und Konjugate .....	57
2.24	Oligonukleotide.....	57
2.25	Kits.....	58
2.26	Geräte und Laborhilfsmittel.....	59
2.27	Tiere.....	61
<b>3</b>	<b>METHODEN.....</b>	<b>62</b>
3.1	<b>Methoden zur Präzipitation von Nukleinsäuren.....</b>	<b>62</b>
3.1.1	Ethanol-fällung mit Ammoniumacetat .....	62
3.1.2	Ethanol-fällung mit Natriumacetat .....	62
3.1.3	Propanol-fällung.....	62
3.2	DNA-Extraktion.....	62
3.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	63
3.4	DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen .....	63
3.5	DNA-Agarosegelelektrophorese .....	63
3.6	Southern-Transfer .....	64
3.7	<b>Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....</b>	<b>65</b>
3.7.1	Isolierung von DNA-Fragmenten aus LMT-Agarose .....	65
3.7.2	„Qiaex“ Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	65
3.8	<b>Klonierung bakterieller DNA-Fragmente und Oligonukleotid-Linker .....</b>	<b>65</b>
3.8.1	Phosphatase-Behandlung der Vektor-DNA (CIP-Behandlung).....	65
3.8.2	Klenow-Behandlung .....	66
3.8.3	Herstellung von Oligonukleotid-Linkern .....	66
3.8.4	Ligation.....	66
3.8.5	Herstellung kompetenter Bakterien.....	67
3.8.6	Herstellung tiefgefrorener kompetenter Bakterien.....	67
3.8.7	Transformation von Bakterien .....	67
3.8.8	Klonierung und Transformation der DNA des Phagen M13.....	68
3.8.9	Herstellung und Präparation von ssDNA und dsDNA aus Plaques des Phagen M13 .....	68
3.9	<b>Lagerung von Bakterien.....</b>	<b>69</b>
3.10	<b>Identifizierung rekombinanter Klone.....</b>	<b>69</b>
3.10.1	TENS-Plasmid-Schnellpräparation .....	69
3.10.2	„Qiagen“ Plasmid-Präparation .....	69

<b>3.11</b>	<b>Koloniefilterhybridisierung .....</b>	<b>69</b>
<b>3.12</b>	<b>Synthetische Oligonukleotide.....</b>	<b>70</b>
<b>3.13</b>	<b>DNA-Doppelstrangsequenzierung.....</b>	<b>71</b>
3.13.1	Sequenzierung mit dem T7-Sequenzier-Kit .....	71
3.13.2	Automatische Sequenzierung .....	72
3.13.3	Sequenzgele.....	72
<b>3.14</b>	<b>Polymerase Kettenreaktion (PCR).....</b>	<b>73</b>
3.14.1	Klonierung von PCR-Produkten .....	74
<b>3.15</b>	<b>Zellkultur und Virusanzucht.....</b>	<b>74</b>
3.15.1	Zellen .....	74
3.15.2	Virusanzucht .....	75
3.15.3	Virustitration .....	75
<b>3.16</b>	<b>Transfektionen .....</b>	<b>76</b>
3.16.1	Transfektion: Dospoer.....	76
3.16.2	Herstellung rekombinanter Parapockenviren .....	76
<b>3.17</b>	<b>Selektion rekombinanter Parapockenviren.....</b>	<b>77</b>
3.17.1	Selektion auf lacZ und Xgpt Expression .....	77
3.17.2	Negativ-Selektion durch fehlende lacZ Expression .....	78
3.17.3	Selektion auf inseriertes Fremdgen .....	78
3.17.4	Plaquareinigung und Zwischenvermehrung .....	78
<b>3.18</b>	<b>Untersuchungen zum Wachstumsverhalten rekombinanter PPV.....</b>	<b>79</b>
3.18.1	Einschrittwachstumskurven .....	79
3.18.2	Mischungsexperiment rekombinanter und parentaler PPV .....	79
3.18.3	Detektion lacZ <sup>+</sup> Plaques im Mischungsexperiment.....	80
3.18.4	Immunhistochemische Färbung D1701-infizierter Zellen.....	80
<b>3.19</b>	<b>Isolierung von PPV-DNA .....</b>	<b>80</b>
3.19.1	PPV-DNA Isolierung aus Zellkultur (Esposito et al., 1981) .....	81
3.19.2	PPV-DNA-Isolierung aus Zellkultur (Methode II) .....	82
3.19.3	PPV-DNA Isolierung aus Zellkultur (Inoshima et al., 2000).....	82
<b>3.20</b>	<b>Infektion von Zellen zur Isolierung von Gesamtzell-RNA.....</b>	<b>83</b>
3.20.1	RNA-Isolierung mittels Trizol .....	83
3.20.2	RNA Isolierung durch Guanidiniumisothiocyanat und CsCl-Gradient.....	83
3.20.3	RNA-Agarosegelelektrophorese .....	84
3.20.4	Northern-Transfer .....	84
<b>3.21</b>	<b>Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren.....</b>	<b>84</b>
3.21.1	DNA-Markierung.....	84
3.21.2	Abtrennung nicht eingebauter Radionukleotide .....	85
3.21.3	In vitro Synthese von cRNA .....	85
<b>3.22</b>	<b>Hybridisierungsmethoden.....</b>	<b>86</b>
3.22.1	Hybridisierung von radioaktiv markierter DNA .....	86
3.22.2	Hybridisierung radioaktiv markierter cRNA.....	87
3.22.3	Rehybridisierung von Nylonmembranen .....	87
3.22.4	Autoradiographie.....	88
<b>3.23</b>	<b>Primer Extension .....</b>	<b>88</b>
3.23.1	Primer-Markierung.....	88
3.23.2	Primer-Hybridisierung und cDNA-Synthese .....	89
<b>3.24</b>	<b>Proteinanalytische Methoden .....</b>	<b>89</b>
3.24.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	89

3.24.2	Western Blot.....	90
3.24.3	Coomassie-Färbung.....	90
3.24.4	Analyse von Seren im Western Blot .....	90
3.24.5	Western Blot Analyse der Hirnhomogenate.....	91
<b>3.25</b>	<b>Tierexperimente: Schafe .....</b>	<b>91</b>
3.25.1	Immunsupprimierung der Schafe .....	91
3.25.2	Narkose und Infektion von Schafen mit rekombinanten PPV ORFV .....	92
3.25.3	Klinische Beurteilung der Infektion .....	92
3.25.4	Serumgewinnung.....	93
3.25.5	Reisolation von PPV aus Stanzbiopsien.....	93
<b>3.26</b>	<b>Tierexperimente: Mäuse und Ratten .....</b>	<b>93</b>
3.26.1	Narkotisierung von Mäusen und Ratten.....	93
3.26.2	Immunisierung von Mäusen mit rekombinanten ORFV .....	93
3.26.3	Serumgewinnung bei Mäusen .....	94
3.26.4	Immunisierung von Ratten mit rekombinanten ORFV .....	94
3.26.5	Serumgewinnung bei Ratten .....	94
3.26.6	Analyse der Seren im Enzym-Linked Immunosorbent-Assay (ELISA) .....	95
3.26.7	Depletion von Immunzellen bei Ratten.....	95
<b>3.27</b>	<b>Infektion von Ratten mit Borna Disease Virus (BDV) .....</b>	<b>96</b>
3.27.1	Klinische Beurteilung der Ratten nach BDV-Infektion.....	96
3.27.2	Gewichtsbestimmung.....	96
<b>3.28</b>	<b>Präparation von Rattengehirnen.....</b>	<b>97</b>
3.28.1	Herstellung von Hirnhomogenaten .....	97
3.28.2	Isolierung von Lymphozyten aus Rattengehirnen.....	97
3.28.3	Virustitration von BDV aus Hirnhomogenaten.....	98
3.28.4	Immunhistochemische Färbung BDV-infizierter Zellen .....	98
3.28.5	Vorbereitung der Rattengehirne für Gefrierschnitte.....	99
3.28.6	Herstellung von Gefrierschnitten (Rattengehirn) .....	99
3.28.7	Vorbehandlung von Gefrierschnitten .....	100
3.28.8	Einbetten der Gehirne in Paraffin.....	100
3.28.9	Herstellung von Paraffinschnitten (Rattengehirn).....	100
3.28.10	Vorbehandlung der Paraffinschnitte (Rattengehirn).....	100
<b>3.29</b>	<b>Immunhistochemische Analysen .....</b>	<b>101</b>
3.29.1	Haematoxilin-färbung, Einbetten und Konservieren von Präparate .....	102
<b>3.30</b>	<b><i>In situ</i> Hybridisierung mit Digoxigenin-markierter cRNA.....</b>	<b>102</b>
3.30.1	Prähybridisierung .....	103
3.30.2	Herstellung Digoxigenin-markierter cRNA .....	103
3.30.3	Hybridisierung von cRNA auf Gehirnschnitte .....	103
3.30.4	Detektion Digoxigenin-markierten cRNA .....	104
<b>3.31</b>	<b>Durchflusszytometrie .....</b>	<b>104</b>
3.31.1	Isolierung von Lymphozyten aus lymphatischen Organen (Ratte) .....	105
3.31.2	Phänotypische Charakterisierung von Zellen anhand von Oberflächenantigenen .....	105
3.31.3	Charakterisierung von T-Zellen im Rattenblut.....	105
<b>3.32</b>	<b>Nachweis spezifischer zellulärer Immunzellen (Zytotoxizitätstest).....</b>	<b>106</b>
3.32.1	Vorbereitung der Effektorzellen.....	106
3.32.2	Markierung der Zielzellen.....	106
3.32.3	Zytotoxizitätstest .....	107
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>108</b>
4.1	Selektion von D1701-VrV.....	108

<b>4.2</b>	<b>Herstellung und Selektion von D1701-VrVres .....</b>	<b>109</b>
<b>4.3</b>	<b>Charakterisierung von D1701-VrV und D1701-VrVres <i>in vitro</i> .....</b>	<b>109</b>
4.3.1	Überprüfung der Rekombinanten/Revertanten durch PCR .....	109
4.3.2	Southern Blot Hybridisierung: D1701-V, D1701-VrV und D1701-VrVres .....	111
4.3.3	Northern Blot Hybridisierung: D1701-V und D1701-VrV .....	112
4.3.4	Primer Extension .....	114
4.3.5	Ein-Schritt-Wachstumskurven von D1701-V, -VrV, -VrVres .....	116
<b>4.4</b>	<b>Charakterisierung von D1701-V, D1701-VrV und D1701-VrVres im Schaf .....</b>	<b>119</b>
<b>4.5</b>	<b>Vergleich des D1701-B und D1701-V Genoms .....</b>	<b>122</b>
<b>4.6</b>	<b>Vergleichende transkriptionelle Analysen zwischen D1701-B, D1701-V und NZ2 im Bereich der del2 .....</b>	<b>123</b>
4.6.1	Transkriptionelle Organisation der Gene D3L bis D9R (A28L-A35R) .....	124
4.6.2	Transkriptionelle Organisation der Gene rpo132 (A24R) und ati2 (A25L) .....	128
<b>4.7</b>	<b>Herstellung und Selektion von D1701-BrV .....</b>	<b>133</b>
<b>4.8</b>	<b>Herstellung und Selektion von D1701-BrVres .....</b>	<b>133</b>
<b>4.9</b>	<b>Charakterisierung von D1701-BrV und D1701-BrVres .....</b>	<b>133</b>
4.9.1	PCR-Analysen .....	133
4.9.2	Southern Blots .....	134
4.9.3	Einschrittwachstumskurve: D1701-B und D1701-BrV .....	136
4.9.4	Mischungsexperiment von D1701-B und D1701-BrV .....	138
<b>4.10</b>	<b>Charakterisierung von D1701-B, D1701-BrV und D1701-BrVres im Schaf .....</b>	<b>140</b>
<b>4.11</b>	<b>Herstellung der BORNA-Vakzine D1701-VrVp40 (Dp40) .....</b>	<b>143</b>
<b>4.12</b>	<b>Konstruktion des Transferplasmids pMT40 .....</b>	<b>143</b>
<b>4.13</b>	<b>Herstellung und Selektion des rekombinanten Dp40 .....</b>	<b>144</b>
4.13.1	Selektion mittels Southern Blothybridisierung .....	145
4.13.2	Selektion mittels Immuno-Dot-Blot .....	146
<b>4.14</b>	<b>Charakterisierung von Dp40 durch Southern Blothybridisierung .....</b>	<b>147</b>
<b>4.15</b>	<b>Genexpression des p40-Proteins <i>in vitro</i> .....</b>	<b>148</b>
<b>4.16</b>	<b>Immunogenität und Protektivität der ORFV Vektorvakzine Dp40 in der Ratte .....</b>	<b>149</b>
4.16.1	Impfschema .....	149
4.16.2	Klinik .....	150
4.16.3	Körpergewichtsentwicklung .....	153
4.16.4	Nachweis von BDV im Gehirn .....	155
4.16.5	Nachweis von BDV-Antigen im Gehirn .....	157
4.16.6	Humorale BDV-spezifische Immunantwort .....	159
4.16.7	Verteilung von BDV im Gehirn immunisierter Tiere .....	164
<b>4.17</b>	<b>Kurze Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse: .....</b>	<b>168</b>
<b>4.18</b>	<b>Zelluläre Immunantwort nach Dp40 Immunisierung .....</b>	<b>169</b>
4.18.1	Infektion von nicht-permissiven Maus-Zellen mit ORFV .....	169
4.18.2	Untersuchungen zur zellulären Immunantwort im Mausmodell .....	171
4.18.3	Untersuchungen zur zellulären Immunantwort im Rattenmodell .....	174
<b>4.19</b>	<b>Charakterisierung peripherer Immunzellen in poplietalen Lymphknoten .....</b>	<b>176</b>
<b>4.20</b>	<b>Immunhistochemische Untersuchungen an Gehirnschnitten Dp40 immunisierter Tiere .....</b>	<b>177</b>

4.20.1	Morphologische Auffälligkeiten bei den immunhistochemischen Analysen .....	177
4.20.2	Immunhistochemische Analysen 20 Tage nach der Infektion.....	179
4.20.3	Immunhistochemische Analysen 140 Tage nach der Infektion.....	185
<b>4.21</b>	<b>Immunisierung mit Dp40 bei partieller Depletion des Immunsystems.....</b>	<b>187</b>
4.21.1	Klinik .....	188
4.21.2	Gewichtskurven.....	189
4.21.3	Nachweis von BDV im Gehirn .....	191
4.21.4	Nachweis von BDV-Antigen im Gehirn .....	192
4.21.5	Serumanalysen .....	193
4.21.6	Immunhistochemische Analysen an Gehirnschnitten.....	196
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>202</b>
5.1	Fremdgeninsertion in das ORFV vegf-e Gen .....	202
5.2	Zusätzliche Deletionen im Genom des ORFV D1701-V .....	207
5.3	Vergleichende Transkriptionsanalysen zwischen attenuiertem D1701-B, D1701-V und Wildtyp NZ-2 .....	210
5.4	Schutz gegenüber der Borna'schen Erkrankung durch das Rekombinante ORFV D1701-VrVp40 .....	216
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>227</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>229</b>
<b>8</b>	<b>EIGENE PUBLIKATIONEN .....</b>	<b>231</b>
8.1	Publikation mit Erstautorenschaft.....	231
8.2	Weitere Publikationen.....	231
<b>9</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>232</b>
<b>10</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>267</b>

## 1 Einleitung

Die Familie der Poxviridae umfasst große, komplexe DNA-Viren, welche ausschließlich im Cytoplasma von Vertebraten- oder Insektenzellen replizieren und wird in die beiden Subfamilien Chordopoxvirinae (Pockenviren der Wirbeltiere) und Entomopoxvirinae (Pockenviren der Insekten) untergliedert. Die Chordopoxvirinae werden in die acht verschiedenen Genera Ortho-, Para-, Avi-, Capri-, Lepori-, Sui-, Mollusci- und Yatapoxvirus (Moss, 1996a) und die Entomopoxvirinae die drei Genera der Entomopoxvirus A bis C unterteilt. Das Genus Parapoxvirus (PPV) beschreibt inzwischen fünf Spezies (Van Regenmortel et al., 2000): Parapoxvirus ovis (Orf Virus, ORFV), Parapoxvirus bovis 1 (Stomatitis papulosa Virus, BPSV), Parapoxvirus bovis 2 (Melkerknoten, Paravaccinia, Pseudokuhpocken, PCPV) und das Parapoxvirus des Rotwildes in Neuseeland (PVNZ; Robinson & Mercer, 1995). Das Parapockenvirus der Eichhörnchen wird zwar ebenfalls als eigene Spezies beschrieben (Van Regenmortel et al., 2000), jedoch zeigen neuere Untersuchungen, dass es sich dabei möglicherweise um eine eigene Gattung innerhalb der Chordopoxvirinae handeln könnte (Thomas et al., 2003). Weitere Spezies sind bis heute nicht differenziert, obwohl PPV-Infektionen bei anderen Wiederkäuern, wie Kamelen, Gamsen, Moschusochsen und asiatischen Antilopen, als auch bei Nicht-Ungulaten wie Robben nachgewiesen werden konnten (Übersicht Büttner und Rziha, 2002). Eine Ursache dafür ist, dass eine Zuordnung dieser Isolate zu bekannten Spezies nicht in allen Fällen geklärt werden konnte (Nettleton et al., 1995; Haig & Mercer, 1998; Inoshima et al., 2001).

Eine Zuordnung von Parapockenviren zu einer der fünf Spezies erfolgte ursprünglich unter Berücksichtigung der befallenen Wirte, dem klinischen Verlauf und serologischen Untersuchungen (Rosenbusch und Reed, 1983). Jedoch zeigte sich, dass das natürliche Wirtsspektrum und eine klinische Symptomatik nicht immer für eine eindeutige Klassifizierung von PPV-Isolaten ausreichend waren (Robinson & Lyttle, 1992; Sentsui et al., 1999; Inoshima et al., 2001). Gleiches galt für eine Klassifizierung über serologische Parameter, da es Kreuzreaktivitäten zwischen den einzelnen Spezies gibt und ein differenzielles Verfahren nicht etabliert ist (Wittek et al., 1980; Lard et al., 1991; Czerny et al., 1997; Housawi et al., 1998). Eine zuverlässigere Einteilung basiert daher auf einer Kombination verschiedener molekularbiologischer Methoden wie DNA/DNA Hybridisierungen (Gassmann et al., 1985), Restriktionsendonuklease-Verdau (Gangemi und Sharp, 1976; Müller et al., 1978; Esposito et al., 1978; Mackett and Archard, 1979; Wittek et al., 1980) und PCR-Analysen (Robinson & Mercer, 1995; Mercer et al., 1997; Inoshima et al., 2001).

### **1.1 Klinische Manifestationen nach Parapockenvirus (PPV)-Infektionen**

Der Prototyp des Genus Parapockenvirus ist das Orf Virus (ORFV) und verursacht, wie die anderen Vertreter der Parapocken, eine kontagiöse Dermatitis (Ecthyma contagiosum), die sich in der Regel als mild verlaufende, lokal begrenzte Haut- und Schleimhautläsionen an Maul und Euter manifestiert. Die Infektion erfolgte über Läsionen der Haut, in welche das Virus eindringen kann, um sich hauptsächlich in regenerativen Epithelzellen (Keratinozyten) der Epidermis zu erreichen (McKeever et al., 1988; Jenkinson et al., 1990). Nach einer Inkubationszeit von drei bis vier Tagen treten an diesen infizierten Bereichen Rötung und Schwellung auf, bevor sich kleinere Bläschen bilden, die zu größeren, virushaltigen Krusten koagulieren. Ursache für diesen Prozess ist u.a. das massive Einwandern von polymorphkernigen Leukozyten und hier vor allem von Neutrophilen (Abdussalam und Cosslett, 1957, Robinson und Balassu, 1981). Neben vielen degenerierten Epithelzellen am Infektionsort sind in den angrenzenden Bereichen proliferierende Zellen zu erkennen (Lear et al., 1996). Nach vier bis sechs Wochen heilen die Pusteln ohne Narbenbildung ab (Robinson und Balassu, 1981). Selbst in seltenen Fällen von schweren ORFV-Infektionen, in denen es zum Teil zu pathologischen Veränderungen der inneren Organe kam, konnte keine systemische Ausbreitung von PPV im Wirtsorganismus gezeigt werden. Ursache für die pathologischen Veränderungen können Komplikationen durch Sekundärinfektionen mit Bakterien, Pilzen oder Parasiten sein (Darbyshire, 1961; Valder et al., 1979; Robinson & Balassu, 1981; Snider et al., 1982; Gumbrell & McGregor, 1997). Gegen eine systemische Virusausbreitung spricht weiterhin die Tatsache, dass eine intravenöse Applikation von ORFV im Schaf nicht zur Induktion von Hautläsionen führte (Hussain und Burger, 1989). Der Nachweis und die Isolation von PPV aus Leukozyten (Sentsui et al., 1999) hingegen schließt eine Persistenz von ORFV im Wirtsorganismus nicht völlig aus. Weiter Untersuchungen müssen diese widersprüchlichen Daten erklären.

Da PPV unter günstigen Bedingungen über Jahre hinweg in Krustenmaterial infektiös bleiben kann (McKeever und Reid, 1986) und auch nach Erkrankung keinen langanhaltenden Immunschutz gegenüber einer Reinfektion hinterlässt (Mayr & Büttner, 1990), kann die Morbidität in Schafherden 100% betragen (Gardiner et al., 1967). Die Mortalität liegt hingegen nur bei 1% und betrifft in der Regel Jungtiere. Die Kontrolle von ORFV Infektionen ist somit in Ländern mit intensiver Schafzucht und -haltung ein wichtiger wirtschaftlicher Faktor. So werden neugeborene Tiere durch Skarifikation mit in Zellkultur attenuierten Stämmen geimpft (Mayr et al., 1981; Nettleton et al., 1996). Dies mindert zwar die klinische



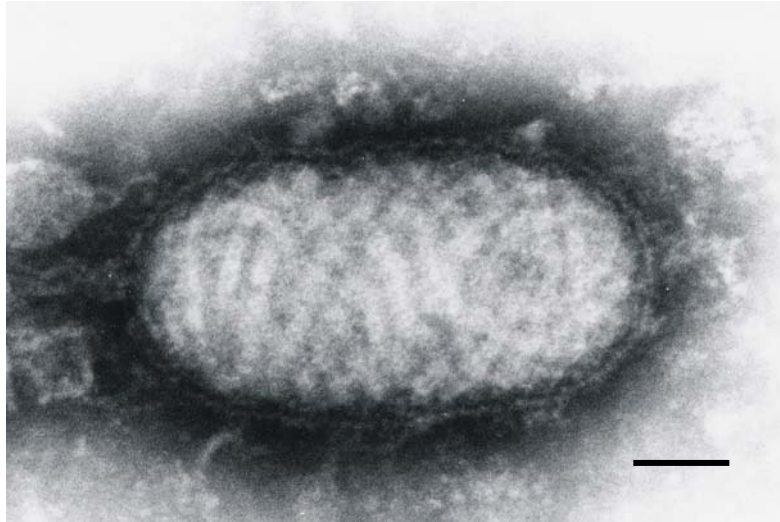
Symptomatik einer ORFV-Infektion, verhindert aber nicht eine Reinfektion (Haig & Mercer, 1998), obwohl es nachweislich zu einer inflammatorischen Immunreaktion des Wirtes kommt (Yirrell et al., 1989; McKeever et al., 1988; Haig et al., 1997). Ursache dafür ist ein nur ca. 5 Monate anhaltender Impfschutz (Schmidt, 1967). Ziel der Vakzinierung ist es daher schwere Infektionen bei Jungtieren und damit eine Übertragung auf das Euter von Muttertieren zu verhindern, um somit die Verluste unter den Jungtieren möglichst gering zu halten.

Parapockenviren sind in seltenen Fällen auch auf den Menschen übertragbar, wodurch man von einer Zoonose durch PPV sprechen kann (Mercer et al., 1997). Für alle Spezies außer dem PPV der Rothirsche in Neuseeland sind Infektionen des Menschen beschrieben. So verursacht das PPV bovis 2 (Pseudokuhpocken) beim Menschen den sogenannten Melkerknoten, welcher meist an den Händen lokalisiert ist (Friedman-Kein et al., 1963; Mayr & Büttner, 1990) und zwar harmlose, jedoch manchmal schmerzhaft und juckende Hautläsionen hervorruft. Für Erreger der bovinen papulösen Stomatitis konnte gezeigt werden, dass humane Virusisolate auch Rinder infizieren können (Carson et al., 1968). Humane ORFV-Infektionen verlaufen in der Regel ebenfalls komplikationslos und heilen binnen weniger Wochen ab. Die wenigen, beschriebenen schwereren Verlaufsformen traten bei immunsupprimierten Personen oder nach schweren Verbrennungen auf (Robinson und Balassu, 1981; McKeever et al., 1988; Robinson & Lyttle, 1992; Mercer et al., 1997).

## 1.2 Morphologie der PPV

Parapockenviren besitzen neben sehr ähnlichen Merkmalen auch deutliche Unterschiede im Vergleich zu den anderen Genera der Familie Poxviridae. Unterschiede werden vor allem im Vergleich der Morphologien deutlich und zeigen eine signifikante Divergenz.

Die Virionen zeigen eine ovale Gestalt mit einer Größe von circa 260 x 160 nm (Abdussalam & Cosslett, 1957). Analog zu allen anderen Pockenviren befindet sich das Virusgenom im Core, einem Proteinnukleoid, in welchem viele für die cytoplasmatische Replikation notwendigen Enzyme und Faktoren enthalten sind. Dieses Core wird von einer Lipoprotein-Doppelmembran umschlossen, in deren äußerer Membran tubuläre Proteinfilamente eingelagert sind. Sie geben durch ihre charakteristische spiralige Anordnung den PPV das typische Bild einer Wollknäuel-Struktur (Abb.1.1). Dieses Charakteristikum ermöglicht mittels Elektronenmikroskopie einen zuverlässigen Nachweis der PPV (Robinson & Lyttle, 1992). Da diese tubulären Filamente keine Präparationsartefakte darstellen, wurde kürzlich mittels Cryo-Elektronenmikroskopie gezeigt (Spehner et al., 2004).



**Abb. 1.1 Orf Virus. Elektronenmikroskopische Aufnahme eine PPV ORFV. Deutlich ist die wollknäuelartige, spirale Anordnung der tubulären Proteinfilamente zu erkennen. Der unten rechts angegebene Balken entspricht einer Länge von ca. 50 nm. Mit freundlicher Genehmigung von Dr. F. Weiland, BFAV Tübingen.**

In Analogie zum Prototyp der Orthopockenviren, dem Vaccinia Virus (VACV) werden die zwei Partikelformen IMV ("intracellular mature virion") und EEV ("extracellular enveloped virus") unterschieden. Letztere besitzen bei VAC eine zusätzliche, äußere, circa 9-18 nm dicke Membran, die vom Golgi Apparat gebildet wird (Schmelz et al., 1994). In ihr sind mindestens 10 EEV-spezifische Proteine lokalisiert (Rosenbusch und Reed, 1983; Smith & Vanderplassen, 1998; Vanderplassen et al., 1998b, Del Mar Lorenzo et al., 1998). In beiden Fällen handelt es sich um infektiöse Partikel, die entweder pH-abhängig (EEV; Ichihashi, 1996) oder pH-unabhängig (IMV; Vanderplassen et al., 1998a; Sanderson et al., 1998) in die Zelle gelangen.

### **1.3 Genomorganisation der PPV**

Parapockenviren weisen im Vergleich zu anderen Pockenviren neben deutlichen Parallelen in der Genomorganisation konservierter zentraler Genombereiche auch klare Unterschiede in den terminalen variablen Genomabschnitten auf. Durch die Veröffentlichung der *HindIII*- und *EcoRI*-Restriktionskarten des bovinen Stomatitis papulosa Virus wurden die ersten Informationen über das PPV Genom bekannt (Menna et al., 1979). Es besteht aus einer doppelsträngigen, linearen DNA von etwa 135 kbp. Der Prototyp der Spezies PPV, das Orf Virus (ORFV), zeigt dabei eine ähnliche Genomgröße von ungefähr 140 kbp. Berücksichtigt werden muss, dass es in der Spezies PPV eine Größenvariabilität gibt und Genomgrößen von 130 bis 160 kbp auftreten, die im Vergleich mit dem Vaccinia Virus (VACV) ein

durchschnittlich etwa 40 kbp kleineres Genom darstellen. Ein anderer Unterschied zwischen ORFV und VACV besteht im Guanin/ Cytosin-Basengehalt, der beim Orf Virus mit 63% (Wittek et al., 1979) wesentlich höher ist als bei den anderen Genera der Chordopoxvirinae, mit Ausnahme der Molluscipockenviren (Moss 1996a). Einen Überblick über das Genom des ORFV Stammes D1701 gibt die Abbildung 1.3. Ähnlich dem Genom der Orthopockenviren, sind die beiden DNA-Stränge an ihren Enden über etwa 60 bp lange Haarnadelstrukturen kovalent miteinander verknüpft und bilden so eine Art telomere Struktur (Menna et al., 1979; Baroudy et al., 1982; De Lange, 1986; Mercer et al., 1987). Diese ermöglicht aufgrund ihrer abweichenden Denaturierungseigenschaften eine schnelle Identifizierung der terminalen DNA-Restriktionsfragmente (Gassmann et al., 1985). Die terminalen ITR-Regionen ("Inverted Terminal Repetitions"), deren Sequenz identisch aber umgekehrt orientiert sind (Mercer et al., 1987; Fraser et al., 1990), umfassen bei ORFV 2,8-3,4 kbp, enthalten unterschiedliche Sequenzwiederholungsmotive und sind ebenfalls für die DNA-Replikation von Bedeutung (Moyer & Graves, 1981). Rekombinationsereignisse werden als Ursache für die Entstehung solcher repetitiven Sequenzanordnungen gesehen (Baroudy & Moss, 1982).

In Analogie zu den Orthopockenviren befinden sich auch bei den PPV im zentralen Bereich des Genoms hochkonservierte Gene, die für die Replikation und Vermehrung der Pockenviren essentiell sind. In den variablen terminalen Abschnitten des Genoms kodieren dagegen Gene, die für die Pathogenität, Virulenz und Wirtsspezifität der Pockenviren *in vivo*, jedoch nicht für die Vermehrung zumindest *in vitro* von Bedeutung sind (Turner & Moyer 1990; Buller & Palumbo, 1991). Daher treten insbesondere bei verschiedenen Pockenviren in den terminalen Bereichen des Virusgenoms größere Deletionen (bis 38 kbp) auf (Moyer & Rothe, 1980; Moyer et al., 1980a und b; Drillien et al., 1981; Pickup et al., 1984). Ursache dafür können Rekombinationsereignisse zwischen nicht homologen Genbereichen sein, die zu Transpositions-Deletionsmutanten führen können (Pickup et al., 1984; Fleming et al., 1995; Cottone et al., 1998). In Folge dessen lassen sich beim Vergleich der Genkarten vom PPV ORFV und dem Orthopockenvirus VACV vor allem im zentralen Bereich des Genoms sehr hohe Übereinstimmungen in Verteilung, Orientierung und Abstand homologer Gene finden. In den terminalen Abschnitten befinden sich hingegen ORFV-spezifische Gene, die möglicherweise für die besonderen biologischen Eigenschaften der Orf Viren von Bedeutung sind (Fleming et al., 1993; Mercer et al., 1995).

Ungeachtet einer verwandten genomischen Organisation zeigen die PPV eine größere genetische Heterogenität im Vergleich zu anderen Pockenviren (Wittek et al., 1980; Gassmann et al., 1985; Robinson & Mercer, 1995), die innerhalb der Spezies bei ORFV-

Isolaten am größten ist (Wittek et al., 1980; Robinson et al., 1982; Rafii & Burger, 1985; Mazur et al., 2000). Diese Heterogenität beruht auf unterschiedlichen Restriktionsmustern und ist hauptsächlich auf eine wechselnde Verteilung der Restriktionsschnittstellen in den terminalen Bereichen des Genoms zurückzuführen (Robinson et al., 1987; Robinson & Mercer, 1995). Diese Variabilität in den Genomenden wird als mögliche Ursache von genomischen Umstrukturierungen durch mehrere Zellkulturpassagen diskutiert und ist für verschiedene ORFV Stämme beschrieben worden (Fleming et al., 1995; Cottone et al., 1998; McInnes et al., 2001). In den für PPV beschriebenen Fällen erfolgte stets eine Duplikation des rechten Genomendes mit einer anschließenden Translokation zum linken Ende. Gene die *in vitro* nicht essentiell waren, konnten durch dieses Ereignis deletiert werden. Bei allen untersuchten ORFV-Zellkulturvarianten war das dem VACV 5K-homologe E2L Gen deletiert (Mercer et al., 1996), dessen Funktion bisher nicht bekannt ist. Zusätzlich konnten weitere Gene in der Nachbarschaft betroffen sein. Das ORFV E3L Gen, welches jedoch kein Homolog zum VACV E3L darstellt, kodiert für eine funktionelle dUTPase (Cottone et al., 2002) und konnte ebenso wie das G2L Gen mit noch unbekannter Funktion (Sullivan et al., 1995b) in unterschiedlichen Zellkulturvarianten deletiert sein (McInnes et al., 2001). Aufgrund der attenuierten Phänotypen dieser ORFV Zellkulturvarianten *in vivo* wird ein funktioneller Zusammenhang mit der Virulenz, Pathogenität und Wirtsspezifität dieser Gene vermutet, wie dies z.B. für dUTPasen anderer Viren bereits gezeigt werden konnte (Lichtenstein et al., 1995; Jöns & Mettenleiter, 1996; Liang et al., 1997; Turelli et al., 1997). Durch das beschriebene Duplikations-Translokationsereignis erfolgte zudem eine Expansion der entsprechenden ITR-Regionen. Diese führte im Fall von ORFV D1701 zu einer Verdopplung von Genen (Cottone et al., 1998), die ebenfalls im Zusammenhang mit der Virulenz von ORFV diskutiert werden. Es handelt sich dabei um Gene, die Orthologe des ovinen IL-10 (Fleming et al., 1997) oder des VEGF der Säugetiere (Lyttle et al., 1994) darstellen. Von diesem Translokationsereignis war ferner eine Gengruppe betroffen, die keine Homologie zu bekannten Pockengenen aufweist, sich durch repetitive Ankyrin Sequenzen auszeichnet und deren Gene daher mit ANK1 bis ANK 3 bezeichnet wurden (Rziha et al., 2003). Über einen Einfluss auf die Virulenz von PPV kann hier nur spekuliert werden. Da Ankyrinsequenzen von vielen pro- und eukaryotischen Proteinen für Protein-Protein Wechselwirkungen genutzt werden und beim Zellzyklus, der Zelldifferenzierung und der Immunantwort des Wirtes eine Rolle spielen (Ghosh et al., 1998; Rubtsov & Lopina, 2000), lässt sich ein Einfluss von ANK1 bis ANK3 auf die Virulenz von PPV vermuten.

Solche genomischen Veränderungen sind bereits für mehrere attenuierte Orthopockenviren beschrieben (Dumbell & Archard, 1980; Moyer et al., 1980; Esposito et al., 1981; Archard et al., 1984; Pickup et al., 1984; Kotwal & Moss, 1988), so dass man darin einen Mechanismus vermuten kann, der eine schnellere Adaption der Pockenviren an veränderte physiologische Bedingungen beinhaltet.

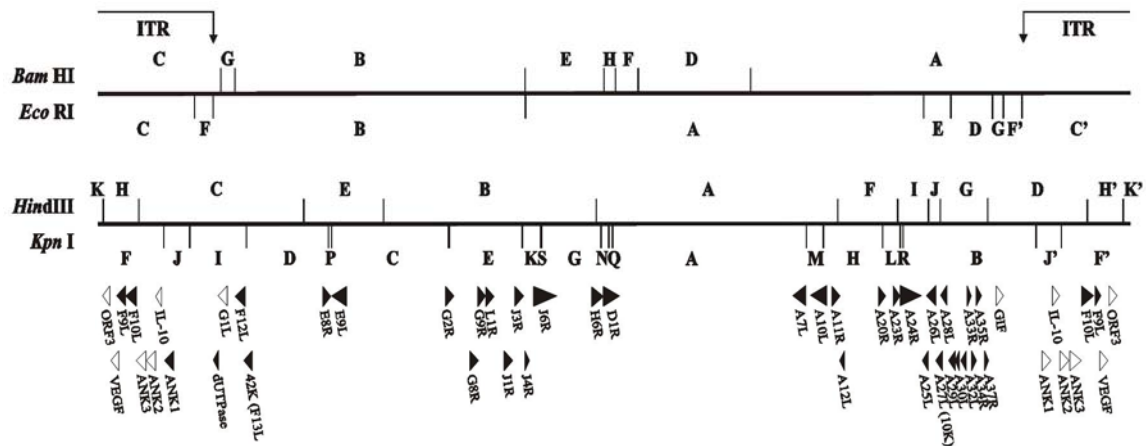


Abb. 1.2: Genomkarte des ORFV-Stammes D1701 für die Restriktionsenzyme *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III und *Kpn*I. Die oberen Pfeile markieren die ca. 18 kbp großen sogenannten "Inverted Terminal Repetitions" (ITR), die den zentralen Bereich des Genoms einschließen. Dargestellt ist auch die Lokalisation und Orientierung der bislang bekannten Gene, wobei Gene, für die keine Homologe bei anderen Pockenviren bekannt ist, mit einem offenen Dreieck dargestellt sind. Gene, deren Bezeichnung in Analogie zu homologen VACV-Genen gewählt wurden, sind dagegen mit einem ausgefüllten Dreieck markiert.

#### 1.4 Replikationszyklus, Gen- und Promotorstrukturen der PPV

Detaillierte Untersuchungen über den Replikationszyklus von PPV sind nicht bekannt, jedoch wird aufgrund bisheriger genomischer Untersuchungen vermutet, dass er analog zu den anderen Pockenviren abläuft. Eine ausführliche Darstellung des Replikationszyklus erfolgte von Moss, 1996a. Demnach findet die Replikation ausschließlich im Cytoplasma der infizierten Zellen statt. Es kommt zu einer Fusion der Virushülle mit der Zellmembran und der Freisetzung des Core in das Cytoplasma der Zelle. Neben dem viralen Genom sind im Core alle Proteine für eine frühe Genexpression enthalten, so dass die Transkription früher Gene schnell nach der Infektion der Zellen beginnen kann. Primär werden Gene exprimiert, die für Wachstumsfaktoren, immunmodulatorische Proteine, als auch Enzyme und Faktoren kodieren, welche für die Transkription und Expression intermediärer Gene sowie die DNA-Replikation benötigt werden. Die DNA-Replikation beschließt die Phase der frühen Genexpression und findet im Unterschied zu VACV (1-2 h nach der Infektion) bei ORFV erst ca. 10 h nach der Infektion statt. Intermediäre Genprodukte bewirken die Transkription später

Gene und kodieren für virale Strukturproteine, Enzyme und frühe Transkriptionsaktivatoren. Genomische Einheiten, sog. DNA Konkatemere, die während der DNA-Replikation entstehen, werden zusammen mit den für die Reifung und die frühe Genexpression notwendigen Proteinen in unreifen Virionen verpackt. In einem Reifungsprozeß innerhalb der Zelle entstehen dann intrazelluläre infektiöse Partikel, sogenannte IMV (intracellular mature virions, Sodeik & Krijnse-Locker, 2002). Ein Teil der reifen Virionen wird mit einer zusätzlichen Hülle versehen, die vom Golgi-Apparat stammt, und anschließend an die Zellperipherie transportiert. Der Vermehrungszyklus wird durch die Evasion der umhüllten Virionen durch Knospung („budding“) abgeschlossen. Diese Form der Virionen wird mit EEV (extracellular enveloped virus) bezeichnet und ist für eine Ausbreitung des Virus von Zelle zu Zelle verantwortlich.

Neben den beschriebenen Parallelen in Genomorganisation, Genausstattung und Replikationszyklus, sind auch Übereinstimmungen in der Regulation der Genexpression, Genstruktur und den Kontrollelementen der Transkription zwischen VACV und ORFV zu finden (Moss, 1990, 1996). Bei Pockenviren sind die Promotoren früher Gene etwa 30 bp stromaufwärts vom eigentlichen Transkriptionsstart lokalisiert und können in drei Regionen unterteilt werden. Sie bestehen aus einer 15bp langen A-reichen Sequenz, gefolgt von einer T-reichen Region worauf sich weitere 7 bp anschließen, in denen das Translationsstartmotiv ATG zu finden ist (Davison & Moss; 1989). Das typische Terminationssignal früher Gene besteht aus dem Motiv TTTTTNT, wobei N für ein beliebiges Nukleotid steht (Yuen & Moss, 1987). Analoge Transkriptionskontrollelemente wurden auch für frühe Gene der PPV mehrfach beschrieben (Mercer et al., 1989; Fraser et al., 1990; Fleming et al., 1991; Lyttle et al., 1994; Sullivan et al., 1995b; Cottone et al., 1998; Fleming et al., 2000).

Für späte virale Promotoren gibt es bei Pockenviren das konservierte Transkriptionsstartmotiv TAAAT, welches sich an eine 20 bp große, A/T-reiche Sequenz anschließt (Weir & Moss, 1984; Weir & Moss, 1987; Bertholet et al. 1985, 1986; Davison & Moss, 1989). Auf dieses Motiv folgt in der Regel ein Guanin, wodurch das Translationsstartmotiv ATG gebildet wird (Rosel et al., 1986). Solche Promotorstrukturen später Gene sind auch bei PPV beschrieben (Fleming et al., 1993; Klemperer et al., 1995; Naase et al., 1991). Am 5'-Ende tragen späte Transkripte häufig nicht translatierte Poly(A)-Leitsequenzen (Schwer et al., 1987; Ahn & Moss., 1989). Ein Überlesen von Transkriptionsterminations-signalen führt zu einem Längenpolymorphismus später mRNAs (Bertholet et al., 1987; Yuen & Moss, 1987), wie dies auch für späte Transkripte des ORFV postuliert wurde (Sullivan et al., 1994). Eine logische

Konsequenz aus diesen Homologien zwischen den Pockenviren zeigt sich darin, dass die Transkriptionskontrollelemente und Promotormotive früher Gene *in vitro* und *in vivo* zwischen VACV und ORFV ausgetauscht werden können und von den jeweiligen Transkriptionsapparaten erkannt werden (Vos et al., 1992; Fleming et al., 1992). Die Transkriptionsmaschinerie von ORFV erkennt zudem optimierte synthetische VACV Promotoren (Rziha et al., 2000).

### **1.5 Interaktion zwischen dem PPV ORFV und dem Immunsystem des Wirtes**

Durch die ORFV-Infektion der Haut kommt es zur Aktivierung des unspezifischen Abwehrsystems im Wirt (Mayr & Büttner, 1992). Entsprechend kommt es zur Stimulierung der Phagozytose und des Komplementsystems sowie zu einer verstärkten Zytotoxizität und Vermehrung von T-Zellen (Haig et al., 1996b), sowie der Einwanderung von neutrophilen Leukozyten und der Induktion von Cytokinen und Chemokinen (Haig et al. 1992, Haig et al., 1996a; Haig & Mercer 1998). Als ein Bestandteil der inflammatorischen Immunantwort des Wirts gegenüber der Infektion spielen wahrscheinlich die Interleukine IL-1 und IL-8 eine Rolle bei der Rekrutierung von Neutrophilen und Lymphozyten (Haig et al., 1994). Bei IL-1 handelt es sich um wichtiges proinflammatorisches Cytokin, welches durch die Infektion induziert wird. Für das IL-1 gibt es drei verschiedene zelluläre Rezeptoren, die mit den drei IL-1 Formen der Wirtszelle interagieren (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-1-Rezeptorantagonist). Durch Bindung des Rezeptorantagonisten an den IL-1 Rezeptor wird die Funktion des IL-1 reguliert, indem eine Signaltransduktion verhindert wird. Das VACV kodiert für ein IL-1 $\beta$ -Bindeprotein, welches IL-1 $\beta$  bindet und dadurch inaktiviert (Alcami & Smith, 1992, Spriggs et al., 1992, Alcamí et al., 1998). Für PPV ist ein dem VACV IL-1 $\beta$  Bindeprotein homologes Gen bisher nicht beschrieben. Die infektionsbedingte Freisetzung von Typ 1 Interferonen, wie Interferon  $\alpha$ , als potentielle antivirale Mediatoren sind für Pockenviren *in vitro* und *in vivo* beschrieben (Yirrell et al., 1991a, b; Haig et al., 1992; Büttner et al., 1995). Weiterhin ist bekannt, dass Interferone starke Immunmodulatoren sind und antivirale Aktivität besitzen (Stäheli, 1990; Samuel, 1991).

Der Epitheliotropismus des ORFV und die Induktion einer kutanen inflammatorischen Immunantwort induzieren die Akkumulation von MHC II-positiven dendritischen Zellen der Haut, sog. Langerhans'schen Zellen (LHZ), um Orf Läsionen herum (Lear et al., 1996). Den LHZ kommt vermutlich bei der Kontrolle der ORF Infektion als professionelle antigenpräsentierende Zellen eine bedeutende Rolle in der Induktion der spezifischen Immunantwort zu (Strobl et al., 1998). Dabei erfolgt deren Rekrutierung vermutlich durch die

Induktion des Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Factors (GM-CSF) am Infektionsort (Haig & Mercer, 1998). Ebenfalls können immunologische Abwehrreaktionen von den Keratinocyten der Haut beeinflusst werden. Sie bilden *in vivo* eine Reihe von Cytokinen (z.B. TNF- $\alpha$ ), welche die Funktion der LHZ modulieren und eine inflammatorische Reaktion auslösen können (Luger et al., 1988; Luger et al., 1989). So bewirkt TNF- $\alpha$  eine Reduktion der LHZ-Dichte und eine Anhäufung von dendritischen Zellen in den lokalen Lymphknoten (Cumbertatch & Kimber, 1992), während nach IFN- $\gamma$  Induktion Keratinocyten den T-Zellen vermehrt Antigene auf den MHC-II-Molekülen präsentieren können (Dustin et al., 1988).

Ein weiteres Charakteristikum der ORFV-spezifischen Immunantwort ist, dass es zur Akkumulation von B- und T-Zellen (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  sowie  $\gamma\delta$  T-Zellen) an der Infektionsstelle kommt, die eine maximale Ausprägung ungefähr 72 Stunden nach der Infektion erreicht (Jenkinson et al., 1992). B-Zellen, die in die dichte Matrix aus dendritischen Zellen am Infektionsort einwandern, sind meist in Nachbarschaft mit dermalen Blutgefäßen lokalisiert. Sie produzieren wahrscheinlich ORFV-spezifische Antikörper, die anschließend im Blut detektiert werden können (Yirrell et al., 1989). CD4<sup>+</sup> T-Zellen spielen bei der spezifischen Antikörperproduktion und bei der Viruseliminierung *in vivo* ebenfalls eine wichtige Rolle, während den CD8<sup>+</sup> oder  $\gamma\delta$  Zellen bislang keine protektive Funktion zugeordnet werden konnte (Lloyd et al., 2000).

Trotz der ausgeprägten unspezifischen und adaptiven Immunantwort des Wirtstieres nach einer Primärinfektion ist das Schaf nicht gegenüber ORFV-Reinfektionen geschützt (Mayr & Büttner, 1990). Einer effizienten Vakzinierung sind somit Grenzen gesetzt und auch die Präsenz zirkulierender neutralisierender Antikörper schützen adulte Tiere nicht vor einer Reinfektion (Buddle et al., 1984; McKeever et al., 1987). Ein analoges Bild zeigt sich im Zusammenhang mit einer passiven Immunität, wie sie durch maternale Antikörper vermittelt wird. Neugeborene Schafe sind nicht gegen eine ORFV-Infektion geschützt (Buddle & Pulford, 1984). Jedoch ist eine verminderte Pathogenität nach einer Reinfektion zu beobachten, die Läsionen sind weniger stark ausgeprägt und heilen schneller ab (Haig & Mercer, 1998). Dies korreliert mit hohen Titern ORFV-spezifischer humoraler Antikörper (Lloyd et al., 2000), der Zunahme von zytolytischen T-Zellen (Haig et al., 1996b) und einer INF- $\gamma$  Expression an der Infektionsstelle (Anderson et al., 2001).

Gründe für die unvollständige Immunität, die eine Primärinfektion im Schaf hinterlässt, könnten in der Tatsache beruhen, dass es in der Familie der Pockenviren zahlreiche Gene gibt, die für Faktoren mit immunmodulatorischen Eigenschaften kodieren und mit den



Komponenten des wirtseigenen Immunsystems interferieren (Smith et al., 1993; Alcami & Smith, 1995; Spriggs, 1996). Bei einer Anzahl von Genen lässt sich der Ursprung in homologen Genen der Wirtsorganismen vermuten, die im Laufe der Evolution in das virale Genom integriert und modifiziert wurden. Verschiedene Orthopocken exprimieren lösliche Rezeptoren, welche u.a. inflammatorische Cytokine, Chemokine, Komplementfaktoren oder antivirale Interferone inhibieren (Smith, 1996; Smith, 1999; Lalani & McFadden, 1997; Alcami et al., 1999). Die inflammatorische Antwort kann durch virale Serin-Proteinase-Inhibitoren, sogenannte Serpine, blockiert werden. Sie verhindern zum einen das Einwandern inflammatorischer Zellen bei einer Primärinfektion (Kotwal & Moss, 1989; Smith et al., 1989), zum anderen inhibieren sie Kaspasen in den Pockenvirus-infizierten Zellen. Ein vorzeitiger programmierter Zelltod, die Apoptose der Wirtszelle als antiviraler Mechanismus, wird damit abgewendet (Gillet & Brun, 1996).

Für das ORFV als Prototyp der Spezies Parapockenviren sind ebenfalls einige immunmodulatorische Faktoren beschrieben. Ein GM-CSF-inhibitorischer Faktor (GIF) bindet und inhibiert die ovinen Cytokine GM-CSF und Interleukin-2 (Deane et al., 2000). GM-CSF stimuliert die Reifung und Aktivierung von Monozyten, neutrophilen und eosinophilen Zellen aus hämatopoetischen Stammzellen, was durch GIF inhibiert wird (Lear, 1995; Haig, 1998). Ein funktionelles Homolog zum VACV E3L stellt das ORFV Interferonresistenzgen (OVIFNR) dar (McInnes et al., 1998; Haig et al., 1998). Ein wahrscheinlich während der Evolution in das virale Genom integriertes IL-10 Gen, ist dem ovinem IL-10 homolog (Fleming et al., 1997; Rziha et al., 2003). Es kann *in vitro* eine inflammatorische Reaktion unterdrücken (Fleming et al., 2000; Imlach et al., 2002) und die antivirale Immunantwort von einer Th-1 Effektorfunktion in Richtung einer Th-2 Antwort modulieren (Mossman, 1994). Außerdem führt die Infektion mit einer IL-10 Deletionsmutante zur erhöhten *in vivo* IFN- $\gamma$  Produktion verglichen zu WT ORFV (Fleming et al., 2000).

Das ORFV vegf-e stellt einen bis dahin für virale Erreger neuartigen Virulenzfaktor dar, welcher zuerst für den Stamm ORFV NZ-2 beschrieben wurde (Lyttle et al., 1994) und ebenfalls im Genom von D1701, jedoch in zwei Kopien, vorkommt (Cottone et al., 1998; Rziha et al., 1999). Es handelte sich dabei um ein Ortholog des humanen vegf-a. Ein Vergleich zwischen dem humanen vegf-a (Ferrara & Davis-Smyth, 1997) und dem ORFV vegf-e zeigte, dass beide Proteine die Freisetzung von Gewebefaktor bewirken, eine Zellproliferation in humanen Endothelzellen (HUVEC, human umbilical vein endothelial cells) induzieren und chemoattraktiv auf vaskuläre Endothelzellen wirken (Ogawa et al., 1998;

Meyer et al., 1999; Wise et al., 1999). Da *vegf-e* sowohl *in vitro* (Ogawa et al., 1998; Meyer et al., 1999; Wise et al., 1999) als auch *in vivo* (Savory et al., 2000) Angiogenese vermittelt, wird es mit dem Auftreten blutiger und proliferierender Läsionen im Zuge einer ORFV Infektion in Zusammenhang gebracht. Inwieweit die Verdopplung der Virulenzfaktoren IL-10 und *vegf-e* in dem Zellkultur-adaptierten Stamm D1701 mit seiner verminderten Pathogenität *in vivo* korrelieren, ist bislang unklar.

Weiterführende Analysen dieser Immunmodulatoren bzw. Virulenzfaktoren der Orf Viren *in vivo* können zeigen, welchen Einfluss sie auf das klinische Erscheinungsbild der ORFV-induzierten Läsionen haben und weshalb trotz einer ausgeprägten Immunantwort eine Primärinfektion sowie eine Reinfektion nicht abgewendet werden kann. Des Weiteren stellen diese frühen Gene, die *in vitro* nicht essentiell sind, interessante Loci für eine Fremdgeninsertion zur Entwicklung rekombinanter Parapockenviren dar (Rziha et al., 1999, 2000; Cottone et al., 2002).

## 1.6 Verhalten von PPV in nicht-permissiven Wirten

Parapockenviren besitzen im Vergleich zu den Orthopockenviren ein sehr limitiertes natürliches Wirtsspektrum. Trotzdem konnte durch Verwendung eines rekombinanten, *lacZ+* ORFV *in vitro* gezeigt werden, dass es nach Infektion zu einer funktionellen Expression der  $\beta$ -Galaktosidase von *E. coli* in nicht-permissiven Zellen kommt (Büttner & Rziha, 2002; Henkel, unveröffentlicht). Mit derselben Rekombinanten konnte in der Maus, die keine produktive ORFV-Replikation unterstützt, gezeigt werden, dass eine  $\beta$ -Galaktosidase-spezifische humorale Immunantwort induziert werden kann. Voraussetzung dafür war eine frühe Genexpression in den infizierten Zellen, da bei Verwendung einer durch  $\beta$ -Propiolacton inaktivierten Rekombinanten, keine spezifische Immunantwort induziert werden konnte (Rziha et al., 2000). Selbst die hochdosierte experimentelle Infektion von Ratten (Henkel, unveröffentlicht) sowie des Schweins als nicht-permissive Wirte führt nicht zur Bildung von ORFV-spezifischen Läsionen (Büttner & Rziha 2002). Eine abortive Replikation von Orf Viren in nicht-permissiven Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* könnte eine Ursache für diese Beobachtungen sein. Vergleichbares wurde für andere Pockenviren mit restringiertem Wirtsspektrum beschrieben (Taylor et al., 1988, 1991, 1995; Somogyi et al., 1993; Stannard et al., 1998) und auch bei nichtreplizierenden Vaccinia Viren gezeigt (Sutter & Moss, 1992; Tartaglia et al., 1992; Holzer et al., 1999; Ober et al., 2002). Zwei Stellen für die Unterbrechung des Replikationszyklus sind dabei beschrieben: Entweder in einer frühen Phase vor der DNA Replikation (Holzer et al., 1999; Taylor et al., 1995; Ober et al., 2002)

oder in einer späten Phase bei der Reifung der Viruspartikel (Sutter & Moss, 1992; Somogyi et al., 1993; Stannard et al., 1998). Erste *in vitro* Untersuchungen des ORFV in nicht-permissiven Zellen deuten auf einen abortiven Replikationszyklus erst zu einem späten Zeitpunkt der Virusreplikation hin (Fischer, 2002). Eine unvollständige Umhüllung der Virionen, wie bei Penguinpox (Stannard et al., 1998) bzw. die Ineffizienz mehrerer Schritte während der Virusreifung, wie bei Fowlpox (Somogyi et al., 1993), wären denkbar.

Ein weiterer Begriff, der im Zusammenhang mit ORFV genannt wird, ist die sogenannte Paramunität. Hiermit wird eine Stimulierung der unspezifischen Immunantwort durch Verwendung inaktivierter ORFV in nicht permissiven Organismen bezeichnet. Die Applikation inaktivierter Orf Viren des Stammes D1701 besitzen demnach eine präventive Wirkung gegenüber infektiösen Erkrankungen in verschiedenen Spezies (Strube et al., 1989; Hammert et al., 1995; Ziebell et al., 1997; Castrucci et al., 1998; Kyriakis et al., 1998). Des Weiteren wurde ein therapeutischer Effekt bei der Behandlung von Katzen nach Infektion mit dem Felinen Leukämievirus gezeigt (Hartmann et al., 1999). Diese Beobachtungen resultierten aus der Zulassung des aus inaktivierten Orf Viren bestehenden Baypamun (Bayer AG, Leverkusen) als sogenannten Paramunitäts-induzierenden Wirkstoff. Der zugrundeliegende Mechanismus dieser Paramunität, der auch bei anderen attenuierten Pockenviren beobachtet wurde (Mayr, 2001a), ist jedoch noch nicht verstanden. Eine Erklärungsmöglichkeit diskutieren Fachinger et al. (2000) mit einer Superantigen-ähnlichen Stimulierung der Proliferation von porcinen T-Helferzellen *in vitro* und einer damit verbundenen erhöhten Sekretion von Cytokinen, die auch für mononukleäre Zellen des peripheren Bluts anderer Spezies gezeigt wurden (Büttner et al., 1995).

## 1.7 PPV als virale Vektoren

Den Pockenviren kommt unter den viralen Vektoren bei der Bekämpfung von infektiösen Erkrankungen oder Tumoren eine große Bedeutung zu (Perkus et al., 1995; Paoletti, 1996; Moss, 1996b; Bonnet et al., 2000; Hu et al., 2001). So wurden sie unter anderem erfolgreich als Impfstoff gegenüber Pockeninfektionen beim Menschen eingesetzt. Dies führte dazu, dass vor allem das Vaccinia-Virus (VACV) als Vakzinevektor in verschiedenen Modellsystemen erprobt wurde (Moss, 1991; Cox et al., 1992; Flexner & Moss, 1996). Ein Nachteil des VACV ist sein ausgesprochen breitgefächertes Wirtsspektrums und das sporadische Auftreten von zum Teil schweren Nebenwirkungen bei der Pockenimpfung des Menschen (Lane et al., 1969; Gurvich, 1992). Eine kritische Sichtweise bei der Verwendung von VACV als Vektor zur Impfstoffentwicklung oder Gentherapie war die Folge (Wiktor et al. 1988). Um diesen

kritischen Gesichtspunkten entgegenzuwirken, wurden hochattenuierte, replikationsdefiziente Stämme auf der Basis des Vaccinia-Virus entwickelt (Tartaglia et al., 1992, 1994; Sutter et al., 1994; Paoletti, 1996; Ramirez et al., 2000a; Ohishi et al., 2000). Zur Verbesserung der Impfstoffsicherheit wurde das Augenmerk auf die Nutzung von Pockenviren gelegt, die ein restringiertes Wirtsspektrum besitzen und sowohl im permissiven als auch nicht-permissiven Wirt als Vektoren verwendet werden können (Esposito et al., 1988; Taylor et al., 1988, 1991; Letellier et al., 1991; Tripathy, 1996; 1999; Romero et al., 1994; van der Leek et al., 1994; Kerr & Jackson, 1995; Hahn et al., 2001; Paoletti et al., 1995; Limbach & Paoletti, 1996; Fries et al., 1996; Hu et al., 1996; Fischer et al., 1997; Pardo et al., 1997). Beide Strategien verfolgen das Ziel, die Ausbreitung des Virus im immunisierten Tier zu reduzieren und eine Übertragung auf nicht-immunisierte Tiere oder andere potentielle Wirtsspezies zu verhindern. Vielversprechende Kandidaten zur Generierung neuartiger viraler Vakzinevektoren sind daher auch die Parapockenviren und hier vor allem das Orf Virus (Robinson & Lyttle, 1992; Haig & Mercer, 1998; Rziha et al., 1999). Besondere Eigenschaften der ORFV sind in diesem Kontext das sehr enge Wirtsspektrum, das Ausbleiben einer systemischen Virusausbreitung sowie die schnelle Induktion unspezifischer bzw. paramunischer Immunmechanismen im infizierten Tier (Mayr & Büttner, 1992; Büttner, 1993; Haig et al., 1997; Rziha et al., 2000). Ein weiterer interessanter Gesichtspunkt ist die Tatsache, dass die virusspezifische Immunantwort nach einer Primärinfektion eine Reinfektion nicht verhindern kann. Die Möglichkeit der Mehrfachimmunisierung gegen verschiedene Pathogene auf der Basis von ORFV ist damit gegeben. Hinsichtlich Impfstoffsicherheit erscheint die Etablierung einer spezifischen Immunreaktion gegen ein viruskodiertes Fremdanigen in für ORFV nicht-permissiven Wirten sehr interessant. Schließlich erlaubt die Identifizierung von Virulenzgenen sowie von Genen für immunmodulatorische Faktoren die Basis für eine gezielte fortschreitende Attenuierung von ORF Viren.

Die Verwendung des hochattenuierten, zugelassenen ORFV-Impfstammes D1701 (Mayr et al., 1981) wurde daher erstmals zur Entwicklung eines rekombinanten Orf Virus verwendet (Rziha et al., 1999, 2000). Die Konstruktion von rekombinanten ORFV war mit der klassischen, für andere Pockenviren-Rekombinanten beschriebenen Methode nicht möglich. Grund dafür ist, dass im Genom des ORFV D1701 kein Thymidinkinase (Tk)-Gen identifiziert werden konnte (Rziha et al., 1999), welches häufig zur Konstruktion anderer Pockenvirus-Rekombinanten als Insertionsort für Fremdgene genutzt wurde (Mackett et al., 1984). Eine Selektionsstrategie mit Hilfe eines Selektivmediums zur spezifischen Selektion TK-negativer Viren (Buller et al., 1985; Moss, 1992) war somit nicht möglich.

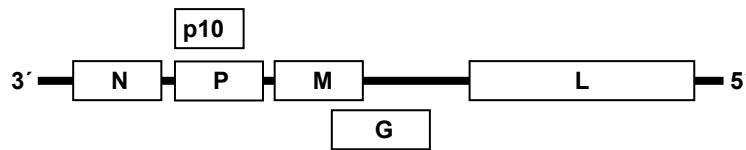
Als alternativer Genlokus zur Insertion von Fremdgenen wurde daher das *vegf-e* Gen des PPV ORFV gewählt. Die Identifizierung des frühen ORFV *vegf-e*-Gens (Lyttle et al., 1994; Cottone et al., 1998) sowie seine Charakterisierung als nicht-essentielles Gen erlaubte die Entwicklung eines Vektors nach gezielter *vegf-e* Deletion. Die erfolgreiche Insertion des *lacZ*- und des *xgpt*-Gens von *E. coli* im *vegf-e* Genlokus und deren Expression induziert von dem originären, frühen *vegf-e* ORFV-Promotor bzw. synthetischen früh/späten eP1 Promotor von VACV (Pleiderer et al., 1995) konnte *in vitro* gezeigt werden (Henkel, 1997). Zur Selektion wurde eine abgewandelte Form der *xgpt* Selektion (Mulligan & Berg, 1981) in Kombination mit der *lacZ* Expression verwendet. Das Prinzip beruht auf der Blockade der Purin-Nukleotidsynthese durch Aminopterin und Mycophenolsäure im Selektivmedium. Die Synthese kann jedoch durch die bakterielle XGPT und Xanthin als Substrat im Medium wieder aufgenommen werden, da das zelluläre XGPT nur sehr begrenzt in der Lage ist, Xanthin als Substrat zu nutzen. Rekombinante Viren bieten den Wirtszellen und damit sich selbst einen Wachstumsvorteil (Falkner & Moss, 1990).

Ebenfalls konnte die Induktion einer  $\beta$ -Galaktosidase-spezifischen Immunantwort in der Maus als einer vermutlich nicht-permissiven Wirtsspezies nachgewiesen werden (Rziha et al., 2000). Untersuchungen zur Immunogenität einer ORFV Vektorvakzine gegen ein klinisch relevantes Pathogen im nicht-permissiven Wirt sind seit kurzer Zeit vorhanden (Fischer, 2002). So schützt ein rekombinantes ORFV, welches ein Glykoprotein des Pseudorabiesvirus (PRV) trägt, Mäuse bereits nach einmaliger Immunisierung gegenüber einer tödlichen Belastungsinfektion (Fischer et al., 2003).

## **1.8 Klassifizierung, Klinik, Struktur und Genomorganisation des Borna Disease Virus (BDV)**

Das Borna Disease Virus (BDV) bildet als einziger Vertreter die Familie der Bornaviridae innerhalb der Ordnung der einzelsträngigen, Negativ-Strang RNA-Viren (Mononegavirales). Weitere Familien dieser Ordnung sind u.a. die Filoviridae (Ebola Virus, Lassa Virus, Marburg Virus), die Paramyxoviridae (Parainfluenza Virus, Masern und Mumps Virus) und Rhabdoviridae (Rabies Virus) (Pringle, 1997; Mayo & Pringle, 1998). Bei BDV handelt es sich um ein 85-125 nm großes Virus (Elford & Galloway, 1933; Compans et al., 1994; Zimmermann et al., 1994; Kohno et al., 1999; Heinig, 1969). Die Größe seiner genomischen RNA beträgt 8,9 kb (Cubitt et al., 1994; Briese et al., 1994), die Replikation findet im Zellkern der infizierten Zellen statt (Briese et al., 1992; Cubitt & de la Torre, 1994; Pyper et

al., 1998). Seinen Namen erhielt BDV aufgrund eines seuchenhafte Auftretens der Krankheit in den Jahren 1894 bis 1896 in einem Pferdegestüt im Kreis Borna, Sachsen (Heinig, 1969).



**Abb. 1.3: Genomorganisation von BDV.** Die gezeigten Boxen bezeichnen die Lokalisation der entsprechenden offenen Leseraster im BDV Genom: G: Glykoprotein; L: RNA-abhängige RNA Polymerase; M: Matrixprotein; N: Nukleoprotein; P: Phosphoprotein; p10: Nichtstrukturprotein p10. Die Produktion der funktionalen L Polymerase wird durch getrennte mRNAs hervorgerufen; ORF p190 (nicht gezeigt) enthält 153 AS-Reste, die an den N-Terminus des L ORF angehängt sind und sich aus der Genomsequenz herleiten lässt. In Anlehnung an de la Torre (2006).

Im Genom von BDV konnten bislang 6 offenen Leseraster („open reading frame“: ORF) identifiziert werden (Briese et al., 1995; Gonzales-Dunia et al., 1997), die als acht verschiedene mono-, di-, tri- oder polycistronische mRNAs transkribiert werden und teilweise posttranskriptional einen Splicing-Prozess durchlaufen (Briese et al., 1994, Schneider et al., 1994; Schneemann et al., 1994, 1995). ORF I kodiert dabei für das p40 Nukleoprotein (Haas et al., 1986) und der ORF II für ein p24 Phosphoprotein (Ludwig & Becht, 1977; Hsu et al., 1994). Für das Protein p10 kodiert der ORF X1, welcher mit ORF II überlappt. Es besitzt eine Kerntransportfunktion und interagiert mit dem p40 Nukleoprotein bzw. dem p24 Phosphoprotein (Wehner et al., 1997; Schwemmler et al., 1998; Malik et al., 1999, 2000; Wolff et al., 2000). Der ORF III kodiert für das p16 Matrixprotein (Schädler et al., 1985), welches glykosiliert (gp18) wird (Cubitt et al., 1994; Briese et al., 1994, 1995). Es induziert virusneutralisierende Antikörper, weshalb seine Lokalisation in der Virushülle vermutet wird (Kliche et al., 1994; Hatalski et al., 1995; Stoyloff et al., 1997). Ein 57 kDa großes Protein, welches in seiner glykosilierten Form als gp94 oder als C-terminales Spaltprodukt (gp43) vorliegt, wird von dem ORF IV kodiert (Schneider et al., 1997; Gonzales-Dunia et al., 1997a, 1998; Stoyloff et al., 1998; Richt et al., 1998). Das 43 kDa großen Spaltprodukt gelangt auf die Zelloberfläche virusinfizierter Zellen und besitzt eine Funktion im Zusammenhang mit dem Viruseintritt in die Zelle (Richt et al., 1998). Der ORF V kodiert für die virale RNA-abhängige Polymerase, die eine Größe von ca. 190 kDa hat (Cubitt et al., 1994; Briese et al., 1994, 1995; Walker et al., 2000).

Die natürliche Infektionsroute von BDV ist noch unbekannt, jedoch wird vermutet, dass die Infektion über die Riechschleimhaut von Tieren erfolgt und durch kontaminiertes Futter, Wasser oder direkten Kontakt mit Virusträgern verursacht wird (Morales et al., 1988; Herzog et al., 1994; Stitz & Rott, 1994; Rott & Becht, 1995; Bilzer et al., 1995). Als Eintrittspforten

dienen vermutlich die Neuronen des Riechepithels von denen eine intraaxonale Ausbreitung über den Nervus olfactorius ins Zentralnervensystem (ZNS) erfolgt (Carbone et al., 1987; Morales et al., 1988; Ludewig et al., 1988). Alternativ könnte eine orale Aufnahme über den Nervus trigeminus in das ZNS geschehen (Morales et al., 1988; Bilzer et al., 1995). Durch intraaxonale und transsynaptische Ausbreitung (Carbone et al., 1987; Shankar et al., 1992; Rott & Becht, 1995) infiziert BDV vorrangig den Cerebralcortex und Bereiche des limbischen Systems, insbesondere den Hippocampus (Carbone et al., 1989, 1991; Morales et al., 1988; Bilzer & Stitz, 1993; Gosztanyi & Ludwig, 1995).

Das Wirtsspektrum, welches ursprünglich als auf endemische Regionen und vorrangig auf Schafe und Pferde beschränkt betrachtet wurde (Zwick 1939; Metzler et al., 1976), wird heute anders beurteilt, und man geht von einer weltweiten Verbreitung innerhalb vieler Spezies aus (Kao et al., 1984, 1993; Bilzer et al., 1995, 1999; Berg et al., 1998; Hagiwara et al., 2000). Die genetische Stabilität, die bei unterschiedlichen Isolaten in verschiedenen Spezies beobachtet wurde, könnte durch das Vorhandensein eines natürlichen Reservoirs erklärt werden. Neue Erkenntnisse deuten dabei auf die Feldspitzmaus (*Crocidura leucodon*) als eine mögliche Reservoir-Spezies hin (Hilbe et al., 2006). Das nun weiter gefasste Wirtsspektrum schließt auch den Menschen ein, in dem BDV-spezifische Antikörper gefunden wurden (Amsterdam et al., 1985; Rott et al., 1985; Bode et al., 1988; Vande Woude et al., 1990; Rott et al., 1991), die in Korrelation mit psychiatrischen Symptomen gebracht werden (Bechter, 1998). Daneben konnte auch das Genom im Blut von Menschen detektiert werden (Rott et al., 1985, 1991; Kitani et al., 1996; Sauder et al., 1997; Planz et al., 1998, 1999; Chen et al., 1999; Planz et al., 2003). Dies gilt für Menschen aus unterschiedlichen Herkunftsländern und lässt eine größere Verbreitung von BDV im Menschen vermuten (Schwemmler, 2001) als noch vor Jahren angenommen (Stitz & Rott, 1999).

Die Infektion mit BDV löst abhängig von der befallenen Spezies unterschiedliche Krankheitsbilder aus. Deutliche klinische Symptome zeigen dabei u.a. Pferde, Ratten, Kaninchen und Rhesusaffen, die sich in Beeinträchtigungen des Bewegungsapparates bis hin zu Paresen äußern (Stitz et al., 1980; Grabner & Fischer, 1991; Rott & Becht, 1995; Stitz et al., 2002). Mäuse und Hamster hingegen zeigen meist keine Symptome (Kao et al., 1984; Schilken et al., 1990). Ein geeignetes Modellsystem für die Untersuchungen zur Pathogenese von BDV stellt die Ratte dar. Nach Infektion zeigt sich ein biphasischer Krankheitsverlauf. Die erste, akute Phase tritt etwa zwei Wochen nach der intracranialen Infektion auf und ist durch Koordinations- und Gleichgewichtstörungen, Paresen sowie Paralysen der Hinterextremitäten und eine erhöhte Schreckhaftigkeit gekennzeichnet. Gleichzeitig treten

entzündliche Veränderungen im Gehirn auf, die 20 bis 30 Tage nach der Infektion ihren Höhepunkt erreichen. Die anschließende, chronische Krankheitsphase ist mit zunehmender Somnoleszenz, Demenz, Apathie und einer Reduktion des Lernvermögens charakterisiert (Dittrich et al., 1989; Stitz et al., 2002). Es kommt zur Ausbildung einer chronischen Gehirnatrophie (Bilzer & Stitz, 1996; Nöske et al., 1998). Zusätzlich zeigen einige Tiere das Obesitas Syndrom (Kao et al., 1983, Herden et al., 2000).

Durch histopathologische Untersuchungen lässt sich die Borna'sche Erkrankung (BD) als schwere nichteitrigte Menigoenzephalomyelitis beschreiben, die durch perivaskuläre und parenchymatöse Infiltrate gekennzeichnet ist. Perivaskulär dominieren  $CD4^+$  T-Zellen und Makrophagen, während im Parenchym vorrangig  $CD8^+$  Lymphozyten auftreten (Bilzer & Stitz, 1993, 1994; Stitz et al., 1993, 1995; Bilzer et al., 1995; Sobbe et al., 1997; Nöske et al., 1998). Die BD wurde aufgrund der anteilmäßig hohen Population an  $CD4^+$  T-Zellen und Makrophagen als eine Entzündungsreaktion vom verzögerten Typ („delayed type hypersensitivity reaction“: DTH) eingestuft (Richt et al., 1990).

Die immunpathologische Natur der BD wurde erstmals durch Experimente mit immuninkompetenten Ratten gezeigt, die trotz BDV-Infektion nicht erkrankten (Herzog et al., 1984; Stitz et al., 1989, 1992). Der adoptive Transfer von *in vitro* etablierten  $CD4^+$  T-Zelllinien löste in infizierten immunsupprimierten Ratten klinische Symptome aus (Richt et al., 1989, 1990; Planz et al., 1995). Im Gegensatz dazu zeigte die Depletion bzw. selektive Hemmung von endogenen  $CD8^+$  Lymphozyten eine Reduktion der Entzündungsreaktion im ZNS, die in Folge der BDV Infektion auftritt (Stitz et al., 1991; Bilzer & Stitz, 1994). Die Interpretation dieser Ergebnisse geht dahin, dass den  $CD8^+$  Lymphozyten während der Immunreaktion eine Effektorrolle und den  $CD4^+$  T-Zellen eine Helferfunktion zukommt. Die Effektorfunktion der MHC Klasse I-restringierten Lymphozyten, isoliert aus den Gehirnen akut erkrankter Ratten, konnte *in vitro* gezeigt werden, während MHC Klasse II-restringierte T-Zellen aus dem gleichen Organ nicht cytotoxisch aktiv sind (Planz et al., 1993; Sobbe et al., 1997). Die Abhängigkeit der cytolytischen  $CD8^+$  Lymphozyten von virusspezifischen  $CD4^+$  T-Zellen konnte durch adoptive Transferexperimente gezeigt werden (Nöske et al., 1998). Außerdem konnten funktionell aktive T-Zellen in der Peripherie infizierter Tiere nachgewiesen werden (Batra, 2000).

Die BDV Infektion löst in der Ratte stets auch eine humorale Immunantwort aus, virusneutralisierende Serumantikörper treten jedoch erst in einem späten Stadium der BD auf (Hatalski et al., 1995a, Furrer et al., 2000). Ihre Präsenz hat auf die Ausprägung der BD keinen Einfluss (Hirano et al., 1983; Stitz et al., 1989), jedoch scheinen die Serumantikörper



bei der Kontrolle der Infektion bezüglich einer Ausbreitung des BDV in nicht-neurale Gewebe eine Rolle zu spielen (Stitz et al., 1998, 2002).

## 1.9 Vakzinierung

Um eine Vakzinierung gegen eine BDV Infektion zu ermöglichen, müssen die hauptimmunogenen Strukturen des Erregers bekannt sein. Einen interessanten Kandidaten stellt dabei das p40 Nukleoprotein (N) von BDV dar. Es induziert eine starke spezifische humorale und zelluläre Immunantwort (Briese et al., 1995; Ludwig et al., 1988). T-Zell-spezifische Epitope für CD8<sup>+</sup> Lymphozyten der Ratte (Planz et al., 2001) und der Maus (Schamel et al., 2001) sind bekannt. Ferner zeigten rekombinante VACV in vielen viralen Systemen die erfolgreiche Induktion einer Immunreaktion gegenüber dem rekombinanten Protein (Moss, 1996b; Paoletti, 1996). So konnte mittels des Nukleoproteins des Influenzavirus eine Kreuzimmunität zwischen verschiedenen Influenzavirus-Stämmen bei Mäusen induziert werden (Endo et al., 1991). Eine VACV-Rekombinante, die das Nukleoprotein des Masernvirus exprimiert, verhinderte allein durch Induktion einer CD4<sup>+</sup>-spezifischen Immunantwort im Rattensystem die Entstehung einer Enzephalitis, nach intracerebraler Infektion mit einem neurotrophen Masernvirus-Stamm (Bankamp et al., 1991). Die Expression eines immundominanten Epitops des Lymocytischen Choriomenigitisvirus (LCMV) Nukleoproteins in einer VACV-Rekombinante schützte, MHC I restringiert, Mäuse vor einer tödlichen Belastungsinfektion (Klavinskis et al., 1989). Aufgrund dieser Publikationen wurden erste Versuche mit einem rekombinanten VACV, welches das BDV Nukleoprotein exprimiert, durchgeführt (Lewis et al., 1999). Dabei konnte eine Reduktion der Viruslast in immunisierten Tieren erreicht werden, die klinischen Symptome der Erkrankung wurden jedoch nicht verhindert, sondern sogar verstärkt. Eine erfolgreiche prophylaktische Immunisierung gegen die BD ist bis heute nicht beschrieben.

## 1.10 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des vegf-e Gens im Zusammenhang mit der Virulenz von PPV *in vitro* und *in vivo*. Grundlage für diese Analysen waren der hoch attenuierten Impfstämme D1701-B und eine sich aus D1701-B ableitende Variante D1701-V, die durch multiple Passagen an das Wachstum auf Vero-Zellen adaptiert wurde (Rziha et al., 2000). In einem ersten Schritt sollten die vegf-e Gene der beiden Stämme durch homologe Rekombination eliminiert und durch die bakteriellen Reportergene lacZ und xgpt substituiert werden, um vegf-e negative Rekombinanten zu erhalten. Der zweite Schritt sah eine

Rückinsertion der vegf-e Gene an die Stelle der bakteriellen Reportergene vor, um die Kausalität einer potentiell veränderten Virulenz in Abhängigkeit vom vegf-e Gen abschließend zu zeigen.

Transkriptionelle Analysen der beiden D1701-Stämme im Vergleich zum virulenten neuseeländischen Stamm NZ2 sollten potentielle Unterschiede, die sich auf genomischer Ebene gezeigt haben, bestätigen. Zusätzlich sollte die funktionelle Expression und der Einfluss der Kombination des originären vegf-e und des synthetischen VACV Promotor durch die lacZ/xgpt positiven Rekombinanten *in vitro* getestet werden

Zur Überprüfung des Potentials von PPV ORFV als Vektorvakzine sollte eine Rekombinante, die das p40 Nukleoprotein des Borna Disease Virus (BDV) unter der Kontrolle des ORFV vegf-e Promoters exprimiert, hergestellt, charakterisiert und im nicht permissiven Rattenmodell getestet werden. Durch unterschiedliche Immunisierungsstrategien sollte die protektive Wirkung dieser ORFV-Rekombinanten (D1701-VrVp40) gegenüber einer BDV-Belastungsinfektion in Ratten untersucht werden.

Neben der Beobachtung klinischer Parameter sollten serologische und virologische Analysen verschieden D1701-VrVp40-immunisierter und BDV-infizierter Ratten durchgeführt werden. Erste Analysen der Zell-vermittelten, BDV-spezifischen Immunantwort nach Immunisierung mit D1701-VrVp40 können dabei die Bedeutung von humoraler und zellulärer Immunantwort in diesem System besser einordnen.

Der Einfluss der durch die ORFV-Rekombinante induzierten Immunantwort auf die Vermehrung und Ausbreitung des BDV im Gehirn sollte durch RNA-*in situ* Hybridisierungen, immunhistochemischen Nachweis von BDV sowie Virusnachweis geführt werden. Parallel hierzu sollten erste Nachweise bestimmter B- und T-Zellpopulationen im Gehirn der Tiere erfolgen.

## 2 Material

### 2.1 Bakterienstämme

Für die Plasmidklonierungen wurde der Bakterienstamm *Escherichia coli* K12 DH5 $\alpha$ F' (Invitrogen Life Technologies) verwendet. Die Klonierungen eines PCR-Produktes erfolgten mit dem Stamm *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen).

### 2.2 Kulturmedien für Bakterien

#### ***Ampicillin-Stammlösung (10 mg/ml):***

100 mg Ampicillin in 10 ml H<sub>2</sub>O bidest. lösen und steril filtrieren. Lagerung bei -20°C.

#### ***LB-Medium:***

10 g Bacto-Trypton

5 g Bacto-Hefeextrakt

5 g NaCl

2 ml 2 N NaOH (pH 7,0-7,2)

ad 1 l mit H<sub>2</sub>O bidest. und autoklavieren.

#### ***LB/Amp-Medium:***

LB-Medium mit 1% (v/v) Ampicillin-Stammlösung

#### ***LB/Amp-Platten:***

20 g LB Broth Base

10 g Agarose

ad 1 l mit H<sub>2</sub>O bidest. und autoklavieren.

Nach Abkühlen auf etwa 50°C werden 10 ml Ampicillin-Stammlösung zugegeben und sterile Petrischalen befüllt.

#### ***Hogness modified freezing medium (HMFM):***

3,6 mM H<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

1,6 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

2 mM Natriumcitrat

1 mM MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O

4,4% Glycerol

nach Herstellung autoklavieren

***SOB-Medium:***

20 g Bacto-Trypton

5 g Bacto-Hefeextrakt

580 mg NaCl

190 mg KCl

ad 1 l mit H<sub>2</sub>O bidest und autoklavieren.

Zugabe von je 10 ml steril filtrierten 1 M MgSO<sub>4</sub> und 1 M MgCl<sub>2</sub> Lösung.

***SOC-Medium:***

20 mM Glucose in SOB

***TFB:***

10 mM K-MES (pH 6,2)

100 mM RbCl<sub>2</sub>

45 mM MnCl<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O

10 mM CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O

3 mM Hexamin-Kobalt(III)-Chlorid

***TFB-1:***

30 mM Kaliumacetat

50 mM MnCl<sub>2</sub>

100 mM RbCl<sub>2</sub>

10 mM CaCl<sub>2</sub>

15% Glycerol

pH 5,8 einstellen

***TFB-2:***

10 mM MOPS (pH 7,0)

75 mM CaCl<sub>2</sub>

10 mM RbCl<sub>2</sub>

15% Glycerol

## 2.3 Plasmide und Vektoren

### ***Plasmid pSPT18:***

Das Plasmid pSPT19 trägt die „multiple cloning site“ (mcs; Bereich mit vielen singulären Restriktionsschnittstellen) des pUC19 Plasmids (Roche Molecular Biochemicals), flankiert von den SP6- und T7-Promotoren. Es ist die Basis für die Plasmide pdV550, pdVATG, pdVRec1, pORF-PA, pDH-H1, pVEGF und Plasmide pD3L – pD6L, bzw. pD7R – pD9R.

### ***Plasmid pORF-PA:***

Das Plasmid pORF-PA enthält das 3,2 kbp große *HindIII-PstI*-Subfragment des ORFV D1701 *HindIII*-H Fragments.

### ***Plasmid pdV550:***

Das Plasmid pdV550 entspricht im wesentlichen dem Plasmid pORF-PA enthält jedoch ein partiell deletiertes *vegf-e* Gen. Der *vegf-e*-spezifische Promotor, sowie das (T)<sub>5</sub>NT-Motiv als Transkriptionsstoppsignal für die frühe *vegf-e*-mRNA blieben dabei erhalten (Henkel, 1997; Rziha et al., 2000).

### ***Plasmid pdVATG und pdVRec:***

Multiple Klonierungsstellen (multiple cloning site; mcs) wurden durch Insertion doppelsträngiger Oligonukleotidlinker (2.24) in die *EcoRV* Restriktionstelle des pdV550 erhalten und resultierten in den rekombinanten Transferplasmiden pdVRec1 bzw. pdVATG (Rziha et al., unveröffentlicht). Die Plasmide pdVRec1 bzw. pdVATG dienen der Herstellung von Transfervektoren zur Entwicklung BDV-spezifischer ORFV Vektorvakzinen. Dabei konnte das Plasmid pdVRec1 zur Klonierung kompletter Gene verwendet werden. Das Plasmid pdVATG besitzt ein Translationsstartsignale und Terminationssignale in allen drei Leserastern, so dass Gene partiell exprimiert werden können.

### ***Plasmid pMT10.***

Das Grundgerüst für das Plasmid pMT10 stellt das Plasmid pdV550 dar, in welches das 3186 bp große *NotI*-Fragment des Plasmids pZgpt-a kloniert wurde, welches freundlicherweise von Dr. F. Falkner (Fa. Baxter, Wien) zur Verfügung gestellt worden ist. Nach Auffüllen der überhängenden *NotI*-Enden erfolgte die Klonierung in die *EcoRV* Schnittstelle von pdV550.

***Plasmid p40H/E1:***

Diese Plasmid entstand durch Klonierung des 1140 bp großen PCR Amplifikates vom Nukleoprotein p40 des BDV (verwendeten Oligonukleotide siehe 2.14) in den pCR<sup>®</sup>II-TOPO Vektor der Fa. Invitrogen. Es wurde in Zusammenarbeit mit der AG Dr. O. Planz der BFAV Tübingen hergestellt.

***Plasmid pMT40:***

Basis dieses Konstruktes war das Plasmid pdVATG, welches zuerst mit *HindIII* linearisiert, anschließend die Überhänge mittels Klenow-Polymerase abgedaut und in einer zweiten enzymatischen Restriktion mit *EcoRV* gespalten wurde. Es folgte die Insertion des 1188 bp großen *BstXI*-Fragments von p40H/E, bei dem die überhängenden Enden analog dem Vektor entfernt worden waren. Dieses Fragment trägt das p40 Nukleoproteingen von BDV.

***Plasmid pDH-H1:***

Das Plasmid pDH-H1 enthält das 5,519 kbp große *HindIII*-Fragment des ORFV D1701 Genoms.

***Plasmid pTZ18ati und pTZ18rpo:***

Diese Plasmide tragen Genfragmente aus den N-terminalen Bereichen des *ati* Gens und des *rpo132* Gens von ORFV D1701. Die Genfragmente wurden durch eine PCR mit den entsprechenden Oligonukleotiden (2.14) hergestellt und waren 774bp (*rpo132*), bzw. 734 bp (*ati*) groß. Ihre Klonierung erfolgte über *BamHI* in den Vektor pTZ18R (Amersham Pharmacia Biotech; nicht mehr erhältlich).

***Plasmide pSPT18ati und pSPT18rpo:***

Sie entstanden durch Reklonierung der PCR-Amplifikate von pTZ18ati/rpo über *BamHI* in den pSPT18 Vektor.

***M13mp18(19)RF, M13ati, M13rpo:***

Bei M13mp18(19)RF handelt es sich um die doppelsträngige, zirkuläre, infektiöse DNA des Phagen M13, in welchen die PCR Fragmente der Gene *ati* und *rpo132* über *BamHI*, wie bei den anderen Plasmiden, kloniert wurden. Transformation in kompetente Bakterien führte zur Bildung von M13 Phagen, welche die klonierten Gene trugen, M13ati, bzw. M13rpo.

**Plasmide pD3L – pD6L und pD7R – pD9R:**

Sie entstanden durch Reklonierung der ORFV Gene D3L – D6L und D7R – D9R als *Bam*HI Fragmente aus den entsprechenden pTZ18 Klonen in den Vektor pSPT18. Die pTZ18 Klone wurden freundlicherweise von Dr. S. B. Fleming (Virus Research Unit and Centre for Gene Research, Department of Microbiology, University of Otago, Dunedin, New Zealand) zur Verfügung gestellt. Die Größe der einzelnen *Bam*HI-Fragmente können aus der Tabelle 2.3 entnommen werden.

Gen	Größe des <i>Bam</i> HI-Fragments aus den pTZ18 Klonen
D3L	423 bp
D4L	945 bp
D5L	183 bp
D6L	801 bp
D7R	486 bp
D8R	498 bp
D9R	597 bp

Tab. 2.3: Größe der *Bam*HI-Fragmente aus den entsprechenden pTZ18 Klonen von Dr. S.B. Fleming

**2.4 Zelllinien und Zellkulturmedien**

Zur Virusvermehrung dienten folgende Zellen, mit denen in Zellkultur wie folgt verfahren wurde:

Zelle	Medium
BK-K13A, permanente Rindernierenzelllinie	MEM mit 3-5% FCS
Vero, permanente Affennierenzelllinie, ATCC, CCL-81	BFA-37 mit 3-5% FCS
MC57, eine Mauszelllinie mit dem Haplotyp H2 <sup>d</sup> , passend zur C57/Bl6 Maus	BFA-37 mit 5 % FCS
3T3, eine Mauszelllinie mit dem Haplotyp H2 <sup>c</sup> , passend zur Balb/c Maus	BFA-37 mit 5 % FCS
Lewis NL, einer Fibroblastenzelllinie der Lewis-Ratte	BFA-37 mit 5 % FCS
CRL, eine Meerschweinchenzelllinie	BFA-37 mit 5 % FCS
T-Zellen (Ratte: Milz oder Gehirn)	T-Zell-Medium, siehe unten

Tab. 2.4: Übersicht verwendeter Zelllinien und ihrer Kulturmedien.

Für alle Zellen galt, dass nach Erreichen eines konfluenten Zellrasens die Zellen mit BFA-40 trypsiniert, im Verhältnis 1:3 bis 1:7 geteilt und mit neuem Kulturmedium, welches mit Penicillin/Streptomycin und 3-5% FCS versetzt war, bei 37°C angezogen wurden.

***Peptidbeladung der MHCI-Moleküle:***

Die Beladung der MHCI Moleküle von  $2 \times 10^6$  Lewiszellen erfolgte mit 1 µg Peptid 9048 für eine Stunde bei 37°C und wurde parallel zur  $^{51}\text{Cr}$  Markierung der Zellen durchgeführt.

***MEM:***

9,6 g Minimum Essential Medium (MEM)

2 g  $\text{NaHCO}_3$

ad 1,0 l  $\text{H}_2\text{O}$  bidest., steril filtrieren.

***IMDM***

17,70 g IMDM

3,02 g  $\text{NaHCO}_3$

ad 1,0 l dd $\text{H}_2\text{O}$ , steril filtrieren.

***HAT-Salze:***

Die HAT-Salze der Fa. Sigma (eine Portion 50x konzentriert) in 10 ml BFA-37 (P/S) gelöst führen zu einer Konzentration von:

Hypoxanthin:  $5 \times 10^0$  mM

Aminopterin:  $2 \times 10^{-2}$  mM

Thymidin:  $8 \times 10^{-1}$  mM

***Selektivmedium:***

Die HAT-Salze (Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin, 1 Portion (50x konzentriert) der Fa. Sigma) wurden in 500 ml BFA-37 gelöst. Dem Selektivmedium (SM) wurde, kurz bevor es auf die Zellen gegeben wurde 25 µl/ml Xanthinstammlösung, Mycophenolsäurestammlösung und 3% FCS zugegeben. Die Konzentration der Mycophenolsäure im SM war dabei abhängig von dem verwendeten Zelltyp. Für Vero-Zellen betrug die Endkonzentration 40 µg/ml und für BK-K13A-Zellen 15-25 µg/ml. Der pH-Wert des SM wurde mit 2,5 M sterilem HEPES-Puffer auf pH 7,0 eingestellt. Während der Selektion wurde das Medium alle zwei Tage erneuert.



***T-Zell-Medium:***

Gebrauchsfertiges IMDM Medium wurde mit 4mM L-Glutamin, 100U/ml Gentamycin, sowie 5% syngemem Rattenserum versetzt. Des weiteren wurden 0,025%  $\beta$ -Mercaptoethanol sowie 5% Überstand Concanavalin A stimulierter Milzzellen zugesetzt. Vor dem Gebrauch wurde das Medium steril filtriert.

***BFA-37:***

9,6 g Minimum Essential Medium (MEM) mit Earle´s Salzen, nicht-essentiellen Aminosäuren und L-Glutamin (Invitrogen Life Technologies)

2 g NaHCO<sub>3</sub>

ad 1,0 l H<sub>2</sub>O bidest., steril filtrieren,

***BFA-40:***

0,125% Trypsin

0,025% EDTA

0,4% NaCl

0,01% KCl

0,01% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

0,057% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

***Cycloheximid (10 mg/ml):***

Cycloheximid in H<sub>2</sub>O bidest. lösen und steril filtrieren. Portionen in -20°C lagern.

***FCS:***

Steril-filtriertes, Endotoxin-getestetes fötales Kälberserum (FCS) wurde vor Gebrauch zur Komplementinaktivierung 30 Minuten bei 56°C inkubiert.

***Penicillin/Streptomycin:***

1 Mio I.E. Penicillin und 1g Streptomycin in 20 ml PBS lösen, steril filtrieren und bei -20°C lagern. Die Kultermedien wurden mit einer 1:500 Verdünnung der Antibiotika-Stammlösung versetzt.

**PBS:**

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

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

pH 7,2 - 7,4, steril filtrieren

**Concanavalin A Überstand**

Concanavalin A ist ein mitogen wirkendes Lectin, mit dessen Hilfe man Milzzellen zur Il-2 Produktion anregen kann.  $1 \times 10^7$  Milzzellen der Maus wurden für 24 Stunden in IMDM/0,1% Maus Serum mit dem Zusatz von 5 µg/µl Concanavalin A kultiviert. Der Überstand wurde abgenommen und die Il-2 Aktivität im CTLL-Bioassay getestet. Die Lagerung erfolgte bei -20°C. Dieser Überstand wurde uns von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. L. Stitz (ursprünglich von Prof. Dr. R. Zinkernagel, Zürich) zur Verfügung gestellt.

**Mycophenolsäurestammlösung:**

10 mg/ml Mycophenolsäure (MPA) wurden in 0,1 N NaOH gelöst, steril filtriert, aliquotiert und bei -20°C gelagert-

**Xanthinstammlösung:**

10 mg/ml Xanthin wurden in 0,1 N NaOH gelöst, steril filtriert, aliquotiert und bei -20°C gelagert-

**2.5 Viren**

Zur Herstellung von rekombinanten Parapocken ORFV wurden der an die permanente Rindernierenzelllinie BK-K13A adaptierte Stamm D1701-B und der von Prof. Dr. M Büttner an Vero-Zellen adaptierte Stamm D1701-V verwendet (Rziha et al., 2000). Von beiden Stämmen wurden vegf-e negative Rekombinante hergestellt, die mit D1701-BrV, bzw. D1701-VrV bezeichnet werden. Revertante Viren, in denen das vegf-e Gen rekonstituiert worden ist, werden mit D1701-BrVres, bzw. D1701-VrVres bezeichnet.

Die Herstellung einer Vektorvakzine gegen das Borna disease virus (BDV) erfolgte mit dem Stamm D1701-VrV. Es entstand die Rekombinante D1701-VrVp40 (Dp40), die das p40 Nukleoprotein von BDV unter der Kontrolle des originären vegf-e Promotors trägt.

Für Immunisierungsexperimente von Mäusen und Ratten, wurde eine Vaccinia Virus Rekombinante verwendet, welche ebenfalls das Nukleoprotein p40 des Borna Disease Virus trägt, VVp40 (Lewis et al., 1999).

Zusätzlich wurden zwei Parapocken Wildtypviren verwendet. Zum einen das schottische, hochvirulente OV Feldisolat MRI, zum anderen der virulente neuseeländische Stamm NZ2. Die Viren wurden freundlicherweise von Dr. D. Haig (Moredun Research Institute, Schottland; MRI) und Prof. Dr. A. A. Mercer (Virus Research Unit and Centre for Gene Research, Department of Microbiology, University of Otago, Dunedin, New Zealand; NZ2) zur Verfügung gestellt.

Zur Überprüfung einer erfolgreichen Anwendung der Vektorvakzine D1701-VrVp40 im Rattenmodell, wurden die Tiere durch intracraniale Infektion mit dem BD Virus BDV-4p adult, welches freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. L. Stitz zur Verfügung gestellt wurde, infiziert.

## **2.6 Puffer und Lösungen für DNA**

### ***Acrylamidstammlösung für Sequenzgele (40%):***

38% Acrylamid

2% N,N'-Methylen-Bisacrylamid

in H<sub>2</sub>O bidest gelöst und anschließend mit dem Kationenaustauscher Amberlite MB-1 30 min gerührt, filtriert und bei 4°C gelagert.

### ***BSE (Probenauftragspuffer für Nukleinsäuregele):***

50% Sucrose

50 mM EDTA (pH 8,0)

0,5% SDS

0,06% Bromphenolblau

### ***CIP (calf intestinal phosphatase) –Puffer:***

50 mM Tris-HCl (pH 8,0)

0,1 mM EDTA (pH 8,0)

***Elektrophoresepuffer für DNA-Agarosegele:***

(50-fach konzentrierte Stammlösung)

2,0 M Tris

250 mM Natriumacetat

50 mM EDTA

pH 7,8 mit Essigsäure einstellen.

***Ethidiumbromid (Stammlösung):***

10 mg/ml in H<sub>2</sub>O bidest lösen und filtrieren

***Glucose-EDTA-LysozymbLösung:***

50 mM Glucose

10 mM EDTA (pH 8,0)

25 mM Tris-HCl (pH 8,0)

Lösung autoklavieren und vor Gebrauch 2mg/ml Lysozym zugeben.

***Isoamylalkohol-Chloroform (IAC):***

24 Teile Chloroform

1 Teil Isoamylalkohol

***Ligasepuffer (5x; Invitrogen Life Technologies):***

250 mM Tris-HCl (pH 7,6)

50 mM MgCl<sub>2</sub>

5 mM DTT

5 mM ATP

25% (w/v) Polyethylenglykol 8000

***NaOH/SDS:***

0,2 N NaOH

1% SDS

***PEG/NaCl:***

20% PEG (6000-8000)

2,5 M NaCl

***PMQN:***

500 g Phenol

0,5 g 8-Hydroxychinolin

70 ml m-Cresol

55 ml TEN

nach Extraktion mit Tris-HCl (pH 8,0) pH 8,0 einstellen und die Lösung mit TE (pH 8,0) absättigen, bei 4°C aufbewahren.

***RNase A (10 mg/ml):***

10 mg/ml in 10 mM Tris-HCl (pH 7,4), für 10 Minuten kochen, in Portionen bei -20°C aufbewahren.

***Sequenzgele (6% Acrylamid/7 M Harnstoff):***

21 g Harnstoff

7,5 ml Acrylamidstammlösung (40%)

5 ml 10x TBE

21,5 ml H<sub>2</sub>O

Lösung 15 Minuten unter Vakuum rühren, filtrieren und vor dem Gießen 300 µl Ammoniumpersulfatlösung (10%) und 30 µl TEMED zugeben.

***Stop-Lösung:***

0,3% Bromphenolblau

0,3% Xylen-Cyanol

0,4% EDTA

in deionisiertem Formamid

***TE-Puffer (0,01 M):***

10 mM Tris-HCl

1 mM EDTA

pH 7,4 oder 8,0 mit HCl einstellen.

**TEN:**

20 mM Tris-HCl (pH 7,4)

1 mM EDTA

150 mM NaCl

**TENS-Lösung (Plasmid-Präparation):**

0,01 M TE-Puffer (pH 7,4)

0,1 N NaOH

0,5% SDS

**Tris-EDTA/Rnase A:**

50 mM Tris-HCl (pH 7,5)

10 mM EDTA

100 µg/ml Rnase A

**Tris/SDS:**

50 mM Tris (pH 12,6 mit NaOH eingestellt)

3% SDS

Lösung für 30 Minuten bei 55°C erwärmen, dann bei RT aufbewahren.

**Tris-Borat-Elektrophoresepuffer (TBE) für Sequenzgele:**

(10-fach konzentriert):

89 mM Tris

89 mM Borat

2,5 mM EDTA

ad 1 l mit H<sub>2</sub>O bidest

TEAB (1 M):

mit H<sub>2</sub>O bidest. eine 2 M Triethanolaminlösung herstellen. Lösung über Nacht auf Eis rühren und CO<sub>2</sub> einleiten bis pH 7,2 erreicht ist. Dann 1:1 mit H<sub>2</sub>O bidest verdünnen.

## 2.7 Puffer und Lösungen für RNA

### ***AGPC-Stammlösung:***

250 g Guanidinium Isothiocyanat

293 ml H<sub>2</sub>O/DEPC

17,6 ml 0,75 M Natriumtriat (pH 7,0)

26,4 ml 10% Sarkosyl NL97 zugeben

bei 65°C lösen und in dunkler Flasche aufbewahren.

### ***Cäsiumchlorid:***

5,7 M CsCl/EDTA

95,9 g CsCl und 1,86 g EDTA 2H<sub>2</sub>O in 100 ml DEPC/H<sub>2</sub>O unter Erhitzen lösen, pH auf 7,0 einstellen und autoklavieren.

### ***DEPC/H<sub>2</sub>O:***

0,1% Diethylpyrocarbonat in H<sub>2</sub>O über Nacht rühren lassen, dann autoklavieren.

### ***Elektrophoresepuffer für RNA-Formaldehydgel:***

1x MOPS/EDTA in DEPC/H<sub>2</sub>O

### ***Formamid-Dye:***

0,1% Bromphenolblau

0,1% XylenCyanol

10 mM EDTA

Die Lösung wird in deionisiertem Formamid gelagert.

### ***Lösung D (RNA-Isolierung):***

50 ml AGPC-Stammlösung

0,36 ml β-Mercaptoethanol

bei RT in dunklem Gefäß ca. 1 Monat haltbar.

### ***MOPS/EDTA (10x):***

0,2 M MOPS

50 mM Natriumacetat

10 mM EDTA

---

pH 7,0 mit Eisessig einstellen und autoklavieren.

***Probenpuffer für Formaldehydgele (RNA):***

200 µl 10x MOPS/EDTA

1 ml Formamid deionisiert (Invitrogen Life Technologies)

354 µl Formaldehyd (37%)

5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml)

100 µl Formamid-Dye

***SSC (20x):***

3,0 M NaCl

0,3 M Natriumcitrat

## **2.8 Lösungen für DNA-Hybridisierungen**

***Abkochlösung für hybridisierte Southern-Blots:***

0,1x SSC

0,5% SDS

0,2 M Tris-HCl (pH 7,4)

***Anneal-Mix für DNA-Hybridisierung:***

0,5% (w/v) Magermilchpulver

1,5x SSPE

1,0% (w/v) SDS

0,5 mg/ml denaturierte Kalbsthymus-DNA

vor dem Gebrauch 50% Formamid (GIBCO-BRL Life Technol.) zugeben. Diese Lösung wurde sowohl zum Pre-Annealing, als auch zum Annealing verwendet.

## **2.9 Lösungen für RNA-Hybridisierungen**

***Anneal-Mix für RNA-Hybridisierung:***

1% Milch

3x SSPE

1% (w/v) SDS

0,5% (w/v) DEPC



---

7% (w/v) Dextransulfat

vor dem Gebrauch 50% deionisiertes Formamid zugeben.

***Preanneal-Mix für RNA-Hybridisierung:***

0,5 g Trockenmilch

7,5 ml 20x SSPE

0,25 ml DEPC

0,8 ml Hefe-tRNA (30 mg/ml)

5 ml denaturierte Kalbsthymus-DNA (10 mg/ml)

ad 45 ml mit H<sub>2</sub>O bidest auf 60°C erhitzen und 5 ml 20% SDS zugeben. Vor Gebrauch 50% Formamid hinzufügen.

***Probenpuffer für Formaldehydgele (RNA):***

200 µl 10x MOPS/EDTA

1 ml Formamid deionisiert (GIBCO-BRL Life Technol.)

354 µl Formaldehyd (37 %)

5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml)

100 µl Formamid-Dye

***SSPE:***

einfach konzentriert:

0,18 M NaCl

10 mM PP

1 mM EDTA (pH7,4)

**2.10 Lösungen für in situ Hybridisierungen**

Soweit nicht anders angemerkt, wurden alle Lösungen mit DEPC-H<sub>2</sub>O angesetzt.

***B1-Puffer:***

100 mM Tris

150 mM NaCl

mit HCl auf pH 7,5 einstellen und autoklavieren (Lösung wurde als 10x Konzentrat angesetzt)

***Blockreagenz:***

Das Blockreagenz (Boehringer Mannheim) wurde als 10% (w/v) Stammlösung in B1-Puffer angesetzt, aliquotiert und bei -20°C gelagert

***B2-Puffer:***

Lösen der 10% Blockreagenz-Stammlösung auf 1% in B1-Puffer

***B3-Puffer:***

100 mM Tris

100 mM NaCl

50 mM MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O

pH auf 9,5 justieren und autoklavieren

***B3-Färbelösung:***

0,3375 mg/ml NBT (Boehringer Mannheim)

0,175 mg/ml X-Phosphaat/BCIP (Boehringer Mannheim)

0,25 mg/ml Levamisol (Sigma)

in B3-Puffer gelöst.

***B4-Puffer:***

10 mM Tris

1 mM EDTA

mit HCl auf pH 8,0 eingestellt

**X-Phosphat/BCIP** (50 mg/ml) in N,N Dimethylformamid, **NBT** (75 mg/ml) in 70% N,N Dimethylformamid, **Blockreagenz** und **Proteinase K** (10 mg/ml) wurden fertig von Boehringer Mannheim bezogen, **Formamid** (ultrapur) von Gibco BRL und **Levamisol** (250 mg/ml) von Sigma.

***50x Denhardt's:***

1% BSA

1% PVP

1% Ficoll<sub>400</sub>

steril filtrieren, aliquotieren und bei -20°C lagern

***Prähybridisierungslösung:***

5x SSC

5x Denhardt's

0,25 mg/ml Hefe-t-RNA

mit DEPC-H<sub>2</sub>O in 50% des Ansatzvolumens gemischt. Kurz vor Verwendung werden 50% Formamid zugegeben.

**2.11 Lösungen für PCR*****dNTP-Mischung:***

Die dNTPs wurden in einer Konzentration von je 25 mM portioniert und bei -20°C aufbewahrt. Kurz vor Gebrauch wurde diese Stammlösung mit sterilem, doppelt autoklaviertem H<sub>2</sub>O auf eine Konzentration von je 0,2 mM verdünnt.

***MgCl<sub>2</sub>:***

Die 50 mM Stammlösung (GIBCO-BRL Life Technol.) wurde bei 65°C für 10 Minuten gelöst und anschließend bei 4°C aufbewahrt.

***PCR-Puffer (10x):***

500 mM KCl

100 mM Tris-HCl (pH 8,3)

Alternativ wurde der zehnfach konzentrierte PCR-Puffer von GIBCO-BRL Life Technol. verwendet.

**2.12 Lösungen für Proteinanalysen*****30% Acrylamidstammlösung:***

29,2% (w/v) Acrylamid

0,8% (w/v) N,N'-Methylen-Bisacrylamid

in H<sub>2</sub>O bidest. gelöst und anschließend mit dem Kationenaustauscher Amberlite MB-1 30 min gerührt, filtriert und bei 4°C gelagert

***Entfärbelösung:***

10% Methanol

10% Essigsäure

in H<sub>2</sub>O bidest.

***Coomassie-Blau Färbelösung:***

2,0 g Coomassie Brilliant Blau R 250

0,5 g Coomassie Brilliant Blau G 250

425 ml Ethanol

50 ml Methanol

100 ml Essigsäure

900 ml H<sub>2</sub>O bidest.

Über Nacht unter Rühren lösen, gegebenenfalls filtrieren

***Laufpuffer (pH 8,3):***

0,4 M Glycin

0,05 M Tris-Base

0,1% SDS

in H<sub>2</sub>O bidest.

***Samplepuffer (denaturierend):***

10% Sucrose

125 mM Tris-HCl (pH 6,8)

2,5% SDS

0,01% (w/v) Bromphenolblau

5 % (v/v) β-Mercaptoethanol

in H<sub>2</sub>O bidest.; bei Raumtemperatur aufbewahren.

***Sammelgel-Puffer (für SDS-PAGE, denaturierend):***

0,13 M Tris-HCl (pH 6,8)

0,1% SDS

***Trenngel-Puffer (für SDS-PAGE, denaturierend):***

0,375 M Tris-HCl (pH 8,8)

0,1% SDS

**Tris/Tricine/SDS-Laufpuffer (für SDS-PAGE, denaturierend) (10x):**

121 g Tris

179 g Tricine

1% SDS

ad 1000 ml mit H<sub>2</sub>O bidest

**2.13 Western-Blot-Puffer und -Lösungen:****Block-Lösung:**

5% (w/v) Magermilchpulver

0,05% (v/v) Tween 20 (rein)

in 1x PBS

Alternativ zur Magermilchpulver-Lösung wurde auch eine 3% BSA-Lösung verwendet.

**BSA-Lösung:**

3% (w/v) BSA Pulver (Serva)

in 1x PBS oder TBS, je nach Waschlösung

**CND-Substratlösung:**

30 mg 4-Chloro-1-Naphtol in 5 ml Methanol lösen

10 mg Diaminobenzidin (DAB) in 5 ml Methanol lösen. Beide Lösungen im Verhältnis 1:1 mischen. Direkt vor Anwendung 40 ml PBS und 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) zugeben.

**Peroxidase-Substratlösung:**

30 mg 4-Chloro-1-Naphtol in 10 ml Methanol lösen

direkt vor Gebrauch 40 ml PBS-A und 50 µl Perhydrol (30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) zugeben und vortexen

**FACS-Puffer:**

2% FCS in PBS

**Transfer-Puffer:**

22 mM Tris

193 mM Glycin

20% Methanol

***Transfer-Puffer:***

200 ml 5x Laufpuffer für SDS-PAGE

200 ml Methanol

800 ml H<sub>2</sub>O bidest.

***TBS-T:***

50 mM Tris, pH 7,5

150 mM NaCl

0,05% Tween 20

***Waschlösung:***

0,05% (v/v) Tween 20 (rein)

in 1x PBS

## **2.14 Lösungen für immunhistochemische Analysen**

***Blockpuffer:***

Je nach Protokoll mit TNB oder 5% Magermilch in TBS oder PBS

***Puffer für Erstantikörper:***

Je nach Antikörper wurden unterschiedliche Konditionen verwendet:

a) TNB

b) TBS mit 1-3% (w/v) Magermilchpulver

***Puffer für Zweitantikörper***

Abhängig von den Konditionen des Erst-Antikörper wurden unterschiedliche Puffer verwendet:

a) TNB

b) TBS mit 1-3 % (w/v) Magermilchpulver

Beide Puffer wurden mit 15 µl/ml Blockserum (αSpezies-Serum des Zweitantikörpers, zur Reduktion des unspezifischen Hintergrunds) versetzt.

***Waschpuffer:***

TBS-T (TBS mit 0,05% Tween-20) oder PBS-T (PBS mit 0,05% Tween-20)

***Substratlösungen:***

Diaminobenzidin (DAB) von der Fa. NEN unter Verwendung des empfohlenen Puffers.

***TNB:***

0,5% Blockreagenz (Fa. NEN)

0,1 M Tris-HCl pH 7,5

0,15 M NaCl

Blockreagenz unter Rühren bei RT einwiegen, dann auf 60°C erwärmen bis alles gelöst ist, aliquotieren und bei -20°C lagern

***TSA-Verstärker:***

Die Verwendung des TSA-Verstärkersystems erfolgte streng nach Angaben des Herstellers (Fa. NEN) und nur unter der Verwendung von TNB als Block-, Erst-Antikörper- und Zweit-Antikörperpuffer.

***X-Gal-Färbelösung (Staining Solution):***

2 µl 1 M MgCl<sub>2</sub>

16 µl 1 M K-Ferricyanid

32 µl 0,5 M K-Ferrocyanid

2 µl 10% NP-40

948 µl PBS-A

Kurz vor Gebrauch wurden diesem Medium 16 µl einer X-Gal Stammlösung (2.16) addiert.

**2.15 Lösungen für die Isolierung von Gehirnlymphozyten:*****Enzymmedium:***

0,24 g HEPES

50 mg CollagenaseD

1 mg DNase

2 µl Trypsininhibitor

ad 100 ml BSS

***Gradientenmedium:***

75% Ficoll

25% RPMI 1640 mit 10% FCS

0,24 g HEPES / 100 ml RPMI

## **2.16 Weitere Puffer und Lösungen**

### ***Acetonitril / TEAB:***

30% Acetonitril

0,01 M TEAB

### ***Dextran T500-Lösung:***

6% Dextran T500 (w/v) in PBS; steril filtrieren

### ***DNase-Puffer:***

20 mM Tris-HCl (pH 8,4)

50 mM KCl

2 mM MgCl<sub>2</sub>

in H<sub>2</sub>O-DEPC

### ***DTT/Kaliumacetat:***

2,25 M DTT

40 mM Kaliumacetat (pH 6,0)

steril filtriert und bei -20°C gelagert.

### ***Glutaraldehyd (0,5%):***

0,5% Glutaraldehyd (v/v) in PBS (Fixativ B).

### ***Kaliumacetat / Essigsäure***

3 M Kaliumacetat

2 M Essigsäure

### ***Kaliumphosphatpuffer:***

0,17 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

0,72 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

### ***PBS-A:***

PBS ohne zweiwertige Kationen



***Paraformaldehyd:***

0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4; aus gleichen Teilen  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  und  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) wird auf 60°C (max. 70°C) erhitzt und 4g pro 100 ml Paraformaldehyd zugegeben. Nach Rühren bis die Lösung klar war, wurde sie auf 4°C abgekühlt, das Endvolumen eingestellt und bei 4°C gelagert.

***RNaseA:***

1 mg/ml in 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) 10 Minuten kochen; in Portionen bei -20°C aufbewahren.

***RNase-Puffer:***

10 mM tris-HCl (pH 7,4)

5 mM EDTA

300 mM NaCl

***STEN (2x):***

10 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,4)

0,4 ml 0,5 M EDTA (pH 7,4)

12,5 ml 5 M NaCl

10 ml 10 % Sarcosyl

ad  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. und autoklaviert.

***X-Gal Stammlösung:***

Zur Herstellung wurden 60 mg/ml des X-Gal oder Bluo-Gal in DMSO gelöst.

**2.17 Lösungen für ELISA*****Beschichtungspuffer:***

0,1 M  $\text{NaHCO}_3$ , pH 9,6

0,03 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$

0,07 M

***Block-Puffer:***

PBS / 0,2% BSA / 0,05% Tween-20

***Substrat-Lösung (ABTS):***0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 4,0

0,01% (w/v) ABTS

0,4 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30% /ml)**2.18 Substratlösung für BDV FFU-Test:**

25 mM Zitronensäure

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

0,04% OPD

0,6 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ml**2.19 Reagenzien**ChemikalienFirma

Acetonitril

Sigma-Aldrich

Acrylamid

Serva

Agarose (LMT)

Invitrogen Life Technologies

Agarose (NuSieve)

FMC Bioproducts

Agarose (SeaPlaque)

FMC Bioproducts

Ampicillin

Invitrogen Life Technologies

Bacto-Tryptone

Difco Lab.

Bacto-Yeast-Extrakt

Difco Lab.

Bind-Silane

Amersham Pharmacia Biotech

Bromphenolblau

Sigma-Aldrich

BSA (Bovines Serum Albumin, nukleasefrei)

Amersham Pharmacia Biotech

4-Chloro-1-Naphtol

Sigma-Aldrich

Coomassie Brilliant Blue G250 und R250

Serva

Concanavalin A (ConA)

Amersham Pharmacia Biotech

Diaminobenzidin (DAB)

Sigma-Aldrich

Desoxynukleotidtriphosphate (dNTP)

Roche Applied Sciences

Dextransulfat

Sigma-Aldrich

Diethyläther

Roth

DDT

Invitrogen Life Technologies

Dextransulfat

Sigma-Aldrich

---

DMSO	Sigma-Aldrich
Dosper Transfektions Reagenz	Roche Applied Sciences
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure Dikaliumsalz)	Invitrogen Life Technologies
Ethidiumbromid	Serva
FCS (Foetales Rinderserum)	PAN Biotech.
Formamid (deionisiert)	Invitrogen Life Technologies
Harnstoff	Roth
Heparin (186 IU / mg)	Serva
Kationenaustauscher Amberlite MB-1 (20-50)	Serva
Ketamin	Bayer AG
LB broth base	Invitrogen Life Technologies
Magermilchpulver	Frema Reform
Magnesiumchlorid für PCR (50mM)	Invitrogen Life Technologies
3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)	Merck
Paraformaldehyd (PFA)	Fluka
PEG	Roche Applied Sciences
Penicillin	Grünthal
ProSieve® 50 Gel Solution FMC	Bioproducts
Repel-Silane	Amersham Pharmacia Biotech
Roentogen (Entwickler)	Tetenal
Rompun	Bayer AG
Superfect Transfection Reagent	Qiagen
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Merck
Silikonlösung in Isopropanol	Serva
Streptomycin	Heyl
Sucrose	Serva
Superfix (Schnellfixierer)	Tetenal
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyldiamin)	Serva
Tris	Invitrogen Life Technologies
Tricine	Roth
Tris	Invitrogen Life Technologies
TriZOL-Reagenz (RNA-Isolierung)	Invitrogen Life Technologies
Trypanblau	Sigma-Aldrich
Trypton	Invitrogen Life Technologies



RNasin (20-40 U/ul)	Promega
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs.
Taq DNA-Polymerase	Invitrogen Life Technologies
SuperScriptII™ Reverse Transkriptase	Invitrogen Life Technologies

### 2.23 Antikörper und Konjugate

Antikörper/Konjugat	Firma/Verwendung
Ox-8-PE ( $\alpha$ CD8 der Ratte) Ox-52-FITC ( $\alpha$ Ratte Pan T-Zellen) Ox-35-CyChrome ( $\alpha$ CD4 der Ratte)	PharMingen, Hamburg; verwendet für FACS-Analysen
Ox-8 ( $\alpha$ CD8 der Ratte) Ox-22 ( $\alpha$ CD45RC der Ratte) Ox-38 ( $\alpha$ CD4 der Ratte) Ox-35 ( $\alpha$ CD4 der Ratte) Ox-33 ( $\alpha$ CD45RA der Ratte)	Aus eigenen Hybridoma-Zellkulturen gereinigt (L. Stitz, BFAV Tübingen); verwendet zur Depletion thymektomierter Tiere und/oder in der IHC
Ox-52 ( $\alpha$ Ratte Pan T-Zellen) Ox-38 ( $\alpha$ CD4 der Ratte)	für IHC Chemicon; für IHC
mAk-4: Gemisch aus mAk gegen p40 (38/17C1; 38/15H7) und p24 (24/31A6; 24/30H8IIB5; 24/29H7) von BDV.	Eigene Produktion aus dem Labor von Prof. L. Stitz und Dr. O. Planz. Die Hybridomüberstände der Klone wurden in gleichen Verhältnissen gemischt, portioniert und bei -20°C gelagert.
$\alpha$ Maus-POD $\alpha$ Spezies-Biotin (Maus, Ratte)	Dianova
$\alpha$ DIG Fab fragment AP	Roche Applied Sciences für in situ Hybridisierung

### 2.24 Oligonukleotide

Bezeichnung	Nukleotidsequenz 5' → 3'	Verwendungszweck
42K-E3	GTAATTGAATTCGTTCTCCTC CATCCCCCT	PCR des 42K-Gens von OV
42K-B5	TGATCAGGATCCTTAATTTAT TGGCTTGCA	PCR des 42K-Gens von OV
ORF15	CATTCTAAGCTCTCGTCGTT	PCR zur Detektion des vegf Gens in Rekombinanten
ORF26	CTGCTGAACGCGGACAGCAC GA	PCR zur Detektion des vegf Gens in Rekombinanten

eIP1-RZ	TTTGCACGAACCATATGTAA GGAATTC	PE zur Bestätigung der Verwendung des Pvegf in D1701-VRV.
LZ-R	TTTTCCCAGTCACGACGTT	PE zur Bestimmung des lacZ mRNA Starts in D1701-VRV
LZ-KR1	GGCCGCGATCCCCGATTC	PE zur Bestimmung des lacZ mRNA Starts in D1701-VRV
p40-H	CAAAAGCTTCACACGCAATG CCAC	PCR zur Amplifikation des BDV p40 Gens
p40-E	TCATGAATTCTTAGTTTAGAC CAGT	PCR zur Amplifikation des BDV p40 Gens
rpoF	GCGGGATCCCGACGAGACCG AGCTGCCCTACGA	PCR zur Amplifikation des rpo Genfragments
rpoRC	GCGGGATCCGTCCTGCTTCTC GAACTCCACG	PCR zur Amplifikation des rpo Genfragments
atiF	GCGGGATCCAGTCGCCGCG CACGTGCGGCGG	PCR zur Amplifikation des ati Genfragments
atiRC	GCGGGATCCAATGGACGGAC TATGCTTTACTGC	PCR zur Amplifikation des ati Genfragments
Rec1-Linker	AAGCTTGATATCTGCAGGAT CCAGGTACCGAATT	Doppelsträngiger Oligonukleotidlinker zur Herstellung des Transferplasmids pdV-Rec1 aus pdV550 (Rziha et al., unveröffentlicht)
ATG-Linker	AAGCTTGGATGATATCGGAT CCGGTACCTGCAGAATTCTG AT	Doppelsträngiger Oligonukleotidlinker zur Herstellung des Transferplasmids pdV-ATG aus pdV550 (Rziha et al., unveröffentlicht)

Tab. 2.24: Auflistung der genutzten Primer, deren Sequenz und deren Verwendung.

## 2.25 Kits

ABI Prism™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit	Perkin Elmer Corp.
ABI Prism™ 377 DNA Sequenziersystem	Perkin Elmer Corp.
JETstar Plasmid Purification Kit	Genomed
Plasmid Isolation Kit (Midi und Maxi)	Qiagen
Qiaex Gel Extraction Kit II	Qiagen
Rediprime DNA Labelling System	Amersham Life Science
SP6/T7 Transkriptions Kit	Roche Applied Sciences
TOPO TA-Cloning Kit	Invitrogen Life Technologies
T7-Sequencing Kit	Amersham Pharmacia Biotech
NEN Enhancer Kit für IHC	NEN
Vectastain Elite αMaus POD	Vector Laboratories
Vectastain Elite αMaus AP	Vector Laboratories
Vector® NovaRed™ Substrat Kit für Peroxidase	Vector Laboratories
VectorVIP Peroxidase-Substrat Kit	Vector Laboratories

## 2.26 Geräte und Laborhilfsmittel

Apparat für Kryoschnitte (2800 Frigocut E)	Reichert-Jung
Apparat für Paraffinschnitte (Leica RM 2145)	Leica
Bakterienschüttler Model G25	New Brunswick Scientific Company
Brutschränke für Bakterien- und Insektenzellkulturen	Heraeus
Brutschränke für PBMC-Kulturen	Forma Scientific
Corex-Glaszentrifugenröhrchen (15 ml und 30 ml)	DuPont-Instruments
Dot-Blotapparatur SRC 96 D	Schleicher & Schuell
Digitalkamera DC120 Zoom	Kodak
Durchflußzytometer FACSCalibur	Becton Dickinson
DNA Synthesizer Biosearch 8700	New Brunswick
Einbettautomat (Paraffinpräparate)	Technicon Corporation
Einmalspritzen und Kanülen Braun	Braun
Eismaschine AF 20	Scotsman
Elektroblotkammer MilliBlot™ -SDE System	Millipore
ELISA-Reader DigiScan	Asys Hitech
Eppendorf-Reaktionsgefäße (0,5; 1,5 ml und 2,0 ml)	Eppendorf
Eppendorf Kühlzentrifuge	Eppendorf
Feinwaagen M160 / M80 und SM1000	Sauter
Filter 0,2 µm und 0,45 µm	Nalgene Inc.
Folienschweißgerät C400	Joisten und Kettenbaum
Gewebekulturflaschen	Greiner
Gießapparatur für Macromould Sequenzgele 2010-100	Amersham Pharmacia Biotech
Glas-Küvetten	Roth
Heizplatte (für Paraffinschnitte)	Bachofer
Horizontale Gelelektrophoresesysteme	Invitrogen Life Technologies
Hybond-N <sup>+</sup> -Nylonmembran	Amersham Pharmacia Biotech
Hybridisierbrutschränke	Bachofer
Kühlwasserbad Frigomix 1495	Braun-Melsungen
Kühlzentrifuge J2-21 (Rotoren JA-10, -14 und -17)	Beckman
Laboruhren	Junghans
Laborzentrifugen (Eppendorf-Gefäße)	Bachofer
Land Camera MP-4	Polaroid

---

Magnetrührer	IKA Combimag
Makro- und Mikrotiterplatten	Greiner
Mikropipetten, verstellbar	Gilson, Abimed, Eppendorf
Mikrowellenherd Micromat	AEG
Mini-Protean II Multiscreen Apparatur	Bio-Rad
Neubauer Zählkammer	Brandt
Nylonmembran Hybond-N <sup>+</sup>	Amersham Life Science
Oligonukleotidsynthesizer	Biosearch
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Costar
pH-Meßgerät pH 521	WTW
Pipettierhilfe Acuboy	Tecnorama
Polaroidfilme 665, 667	Polaroid
Polypropylenprobenröhrchen (steril, 15 ml und 50 ml)	Greiner
PVDF (Polyvinyliden-Difluorid)-Membran	Roche Applied Sciences
Röntgenfilme Hyperfilm $\beta$ -Max	Amersham Life Science
Röntgenfilme X-OMAT AR; BIOMAX MR	Kodak
Röntgenfilmkassetten mit Verstärkerfolien	AGFA
Schüttler SM 25	Bachofer
SDS-PAGE Apparatur "Minigel-Twin"	Biometra
Sephadex G50-Säule (Nick <sup>TM</sup> Column)	Amersham Pharmacia Biotech
SepPak C18-Kartuschen	Waters, Millipore-Corporation
Sequenzapparatur Macrohor 2010	Amersham Pharmacia Biotech
Sequenzapparatur ABI-PRISM Modell 377	Perkin Elmer Corporation
Spannungsgerät Power Pack P25	Biometra
Spannungsgerät Modell 200/2.0	Bio-Rad
Spannungsgerät MACDRIVE 5 (für Sequenzgele)	Amersham Pharmacia Biotech
Spannungsgeräte PTN 23, PTN 2011	Invitrogen Life Technologies
Speed Vac Concentrator	Savant
Spektrophotometer DU-64	Beckman
Spektrophotometer Gene Quant	Amersham Pharmacia Biotech
Sterile Arbeitsbänke	CEAG, BDK
Szintillationszähler BF betaszint 8000	Berthold
Taumler Reax 2	Heidolph
Thermostaten (Eppendorf-Gefäße)	Bachofer



---

Thermomixer 5437	Eppendorf
Transilluminator (254nm)	Biometra
Transilluminator (366nm)	Bachofer
TRIO-Thermoblock™	Biometra
Ultraschallgerät Cell Disruptor B 15	Branson
Ultrazentrifuge L5	Beckmann
Ultrazentrifuge TGA 65	Kontron
Umkehrmikroskop Diavert	Leitz
UV-Stratalinker	Stratagene
Vakuumofen	Heraeus
Vakuumzentrifuge	Savant
Vortex	Scientific Industries
Wärmeschrank (60°C)	W. Memmert, Schwabach
Wasserbad (paraffin section mounting bath)	Electrothermal
Wasserbäder / Schüttelwasserbäder	Köttermann
Whatman-Blottingpapier	Schleicher & Schuell
Zentrifuge J2-21 (Rotoren JA-10, -14 und -17)	Beckman
Zentrifuge 5415C, 5417R	Eppendorf
Zentrifugenrotoren SW41	Beckmann
Zentrifugenrotoren TFT65.13, VTI 65.2	Kontron
Z-Gel Probenröhrchen zur Serumgewinnung	Sarstedt

## 2.27 Tiere

Balb/c, C57/Bl6 Mäuse und Lewis-Ratten wurden von der Kleintierzucht der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen, bezogen. Es wurden Tiere beiderlei Geschlechts verwendet, wobei das Alter der Tiere zum jeweiligen Versuchsbeginn bei 4 bis 10 Wochen lag. Während der gesamten Versuchsdauer war Futter und Wasser frei verfügbar.

Es wurden Schafe der Rasse Merino Landschaf von einer Schäferei bezogen. Das Alter der Schafe lag bei 5-7 Monaten. Futter und Wasser waren ebenfalls frei verfügbar.

## 3 Methoden

### 3.1 Methoden zur Präzipitation von Nukleinsäuren

#### 3.1.1 Ethanolfällung mit Ammoniumacetat

Zu den DNA/ oder RNA Nukleinsäurelösungen wurde  $\frac{1}{2}$  Volumen 7,5 M Ammoniumacetat und 3 Volumina 100% Ethanol gegeben, mindestens 20 Minuten oder über Nacht bei  $-20^{\circ}\text{C}$  inkubiert und anschließend mindestens 20 Minuten bei  $14.000\times g$  zentrifugiert. Das Pellet wurde ein- bis zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und im gewünschten Volumen 0,01 M TE (pH 8,0) oder  $\text{H}_2\text{O}$ -DEPC (bei RNA) resuspendiert.

#### 3.1.2 Ethanolfällung mit Natriumacetat

Durch Zugabe von  $\frac{1}{10}$  Volumen 3 M Natriumacetat (pH 4,8) und 2-3 Volumina 100% Ethanol zur wässrigen DNA- bzw. RNA-Lösung und mindestens 30 Minuten Inkubation bei  $-20^{\circ}\text{C}$  konnte die Nukleinsäure gefällt und anschließend durch 30 minütige Zentrifugation bei  $14.000\times g$  und  $4^{\circ}\text{C}$  pelletiert werden. Nach ein- bis zweimal Waschen in 70% Ethanol wurde das Pellet getrocknet. Die Natriumacetat-Methode wurde bevorzugt bei der Fällung von RNA eingesetzt. Entsprechend wurde das Pellet in  $\text{H}_2\text{O}$ -DEPC aufgenommen.

#### 3.1.3 Propanolfällung

Durch Zugabe von  $\frac{1}{10}$  Volumen 3 M Natriumacetat (pH 4,8) und 1 Volumen Isopropanol kommt es durch 30 minütige Inkubation auf Eis zur Fällung der Nukleinsäure. Die weiteren Schritte wurden analog zur Ethanolfällung durchgeführt.

### 3.2 DNA-Extraktion

Nukleinsäurelösungen wurden durch Zugabe von einem Volumen PMQN oder alternativ mit  $\frac{1}{2}$  Volumen PMQN und  $\frac{1}{2}$  Volumen IAC von Proteinen gereinigt. Der Ansatz wurde gemischt, 5 Minuten auf Eis stehen gelassen und 5 Minuten bei  $14.000\times g$  zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde zweimal mit einem Volumen IAC extrahiert, zentrifugiert und die Nukleinsäure anschließend aus der wässrigen Phase mittels Ethanol gefällt.

### 3.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Nukleinsäurekonzentration wurde photometrisch bestimmt. Hierzu wurden kleine Mengen der DNA- oder RNA-Lösungen mit H<sub>2</sub>O bidest verdünnt und gegen H<sub>2</sub>O bidest als Referenz gemessen. Es wurden UV-Absorptionsspektren im Bereich von 320 bis 220 nm Wellenlänge aufgenommen. Nach folgenden Gleichungen konnte aus der Extinktion bei  $\lambda = 260$  nm ( $OD_{260}$ ) die Konzentration der Nukleinsäurelösung bestimmt werden:

$$OD_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \mu\text{g doppelsträngige DNA} / \text{ml}$$

$$OD_{260} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \mu\text{g einzelsträngige RNA} / \text{ml}$$

Zusätzlich wurde eine Konzentrationsabschätzung von DNA-Fragmenten im Vergleich zu bekannten Mengen linearisierter Vektor-DNA in Ethidiumbromidgelen durchgeführt. Dabei nimmt die Fluoreszenz-Intensität proportional zur DNA-Menge zu.

### 3.4 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

DNA-Doppelstränge werden von bakteriellen Restriktionsendonukleasen an jeweils enzymespezifischen, palindromen Nukleotidsequenzen von meist 4 bis 6 Nukleotiden Länge erkannt und geschnitten. Die entstehenden Fragmente haben entweder glatte Enden („blunt ends“) oder 5'-Phosphat- bzw. 3'-OH-Überhänge („sticky ends“). Die Restriktionsendonukleasen werden zur physikalischen Kartierung oder zur Klonierung viraler DNA-Fragmente in Plasmiden benutzt. In TE resuspendierte DNA wurde in Volumina von 10-100  $\mu\text{l}$  mit 10U/ $\mu\text{g}$  DNA gespalten. Um eine Beeinträchtigung der Enzymaktivität durch das im Reaktionspuffer enthaltene Glycerol zu vermeiden, hat die eingesetzte Enzymmenge max. 10% des Gesamtvolumens betragen. Entsprechend der Herstellerangaben wurden für die einzelnen Enzyme Reaktionspuffer mit unterschiedlicher Salzkonzentration verwendet. Die Inkubation erfolgte bei entsprechender, vom Hersteller empfohlener Temperatur für 1,5 bis 4,5 Stunden. Durch Zusatz von 1/5 Volumen BSE oder 10 minütigem Erhitzen des Restriktionsansatzes auf 65°C wurden die Enzyme inaktiviert, sofern eine Gelelektrophorese zur Auftrennung der DNA-Fragmente folgte. Alternativ wurde in manchen Fällen eine Phenolextraktion mit anschließender Ethanolfällung durchgeführt.

### 3.5 DNA-Agarosegelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrem Molekulargewicht wurden horizontale Elektrophorese-Apparaturen unterschiedlicher Größe verwendet. Die

Agarosekonzentration der Gele betrug zwischen 0,8% (Agarose) und 2,0% (Agarose oder NuSieve Agarose). Für eine gute Auftrennung von DNA-Fragmenten geringer Größe (kleiner als 400 bp) wurde ein Gel verwendet, welches 1% Agarose und 1% NuSieve-Agarose enthielt und vor allem bei der elektrophoretischen Analyse von PCR-Produkten genutzt wurde. Die entsprechende Menge Agarose wurde in Elektrophoresepuffer mit 0,3 µg/ml Ethidiumbromid aufgeköcht und nach Abkühlung auf etwa 60°C zu 4-6 mm dicken Gelen gegossen. Nach Polymerisation wurde das Gel mit Elektrophoresepuffer und 0,3 µg/ml Ethidiumbromid überschichtet, der Kamm gezogen und die mit 1/10 Volumen BSE-versetzten DNA-Proben aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte während 0,5 bis 24 Stunden bei 15-100 Volt. Bei mehrstündigen Läufen erfolgte ein Umwälzen des Puffers und dessen Erneuerung nach 8-12 h. Anschließend konnten die Gele unter kurzweiligem UV-Licht ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) mit einer Polaroidkamera und Orangefilter photographiert werden. Anhand eines mitaufgetragenen Größenmarkers konnten die Größen der DNA-Fragmente über eine halblogarithmische Eichgerade bestimmt werden. Dazu wurde die Laufstrecke (in cm) gegen den Logarithmus der Größe der bekannten DNA-Größenmarkerfragmente (in kbp) aufgetragen. Mit dieser Eichgerade konnte die Größe von DNA-Fragmenten unbekannter Größe genauer bestimmt werden. Sofern die DNA-Fragmente zur Klonierung aus dem Gel ausgeschnitten werden sollten, wurden die Gele nur langwelligem UV-Licht ( $\lambda = 366 \text{ nm}$ ) ausgesetzt, um DNA-Strangbrüche zu vermeiden.

### **3.6 Southern-Transfer**

Die durch Agarosegelelektrophorese getrennte DNA wurde vor dem Transfer für 10 Minuten in 0,25 M HCl depurinisiert und anschließend für 20 Minuten in 0,5 N NaOH / 1,5 M NaCl denaturiert. Als Transfer-Puffer diente 0,25 N NaOH / 1,5 M NaCl. Durch Diffusion des Puffers durch untergelegtes Whatman-Papier wurde die DNA aus dem Agarosegel auf die aufliegende Nylonmembran übertragen. Auf der Membran aufgelegte Whatman-Filter, mehrere Lagen von Zellstoff-Papier und ein Gewicht verstärkten den Diffusionseffekt, so daß nach 8-12 Stunden die Nylonmembran für 5 Minuten in 2x SSC neutralisiert und im UV-Stratalinker mit UV-Licht (um die DNA kovalent an die Membran zu binden) bestrahlt werden konnte. Im Anschluss daran konnte die Membran direkt zur Hybridisierung durch einstündige Vorbehandlung in 0,1% SSC / 0,5% SDS bei 65°C genutzt oder alternativ durch zweistündiges Backen bei 80°C im Vakuumofen getrocknet und zwischen Whatman-Papier in Kunststofffolie eingeschweißt im Dunkeln gelagert werden.

### **3.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

#### **3.7.1 Isolierung von DNA-Fragmenten aus LMT-Agarose**

Um DNA-Fragmente aus Agarosegelen zu isolieren, wurden diese in LMT-Agarose (LMT: „low melting temperature“) wie oben beschrieben aufgetrennt. Das gewünschte Fragment wurde unter langwelligem UV-Licht ( $\lambda = 366 \text{ nm}$ ) ausgeschnitten, pro mg Agarose wurden 3  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  bidest zugegeben und die Agarose für 10-15 Minuten bei  $65^\circ\text{C}$  verflüssigt. Ein kleiner Teil der Probe wurde zur Konzentrationsbestimmung auf ein Mini-Gel aufgetragen, der Rest bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

#### **3.7.2 „Qiaex“ Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Entsprechend der Vorschrift des Herstellers (Qiagen) wurden pro 100 mg isolierten Gels 300  $\mu\text{l}$  Puffer QX1 und 10  $\mu\text{l}$  QiaexII-Suspension zugegeben. Die Agarose wurde durch Erwärmen auf  $50^\circ\text{C}$  (10 Minuten) gelöst und dabei gleichzeitig die DNA an die Silicagelpartikel der QiaexII-Suspension gebunden. Dabei wird die Löslichkeit der Agarose und die selektive Adsorption von DNA an Silicagelpartikel in der Gegenwart von chaotropen Salzen ausgenutzt. Nach Zentrifugation (eine Minute) bei  $14.000\times g$  erfolgte ein einmaliges Waschen des Pellets mit 500  $\mu\text{l}$  Puffer QX1 zur Entfernung restlicher Agarose. Nach erneuter Zentrifugation wurde zweimal mit dem Waschpuffer PE gewaschen. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet bis es weiß erschien. Die DNA wurde nach Zugabe von 20  $\mu\text{l}$  0,01 M TE (pH 8,0), vorsichtiges Durchmischen und Inkubation bei Raumtemperatur (10-15 Minuten) von den Silicagelpartikeln durch einminütige Zentrifugation bei  $14.000\times g$  eluiert. Ein Teil des Überstandes (2  $\mu\text{l}$ ) wurde zur Konzentrationsbestimmung auf ein Mini-Gel aufgetragen, der Rest bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren. Anschließend wurde die Elution wiederholt, wobei die DNA-Ausbeute stets deutlich geringer war als im ersten Durchgang.

### **3.8 Klonierung bakterieller DNA-Fragmente und Oligonukleotid-Linker**

#### **3.8.1 Phosphatase-Behandlung der Vektor-DNA (CIP-Behandlung)**

Bei der Klonierung viraler DNA-Fragmente in Plasmidvektoren war darauf zu achten, dass die entstehenden Enden der zu fusionierenden Partner kompatibel waren. Um die Rezirkulation des Vektors zu verhindern, wurde eine CIP-Behandlung („calf intestinal phosphatase“) zur Entfernung der 5'-Phosphatgruppen der Vektor-DNA durchgeführt. Der Restriktionsansatz wurde mit CIP-Puffer auf 50  $\mu\text{l}$  aufgefüllt, mit 1  $\mu\text{l}$  CIP (10U/ $\mu\text{l}$ ) 30

Minuten bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung der Phosphatase erfolgte durch Zugabe von 1 µl 0,1 M EDTA und Erhitzen auf 75°C für 10 Minuten. Anschließend wurde eine PMQN-Extraktion und Ethanol-fällung durchgeführt. Das getrocknete Sediment wurde in einer entsprechenden Menge 0,01 M TE (pH 8,0) aufgenommen.

### 3.8.2 Klenow-Behandlung

Um nicht kompatible DNA-Fragmente zu ligieren, wurden zunächst die 5'-Überhänge der DNA aufgefüllt bzw. die 3'-Überhänge abgedaut. Die Auffüllreaktion erfolgte durch die 5' nach 3'-Polymeraseaktivität; der Abbau durch die 3' nach 5' Exonukleaseaktivität des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase I aus *Escherichia coli*. Hierzu wurde die DNA in einem 10 µl Ansatz, welcher 1 µl 10x Klenow-Puffer und 1 µl Nukleotid-Mix (alle dNTPs je 5 mM) enthielt, mit 2U Klenow-Polymerase für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend für 5 Minuten bei 65°C inaktiviert.

### 3.8.3 Herstellung von Oligonukleotid-Linkern

Zwei kurze synthetische DNA-Stränge mit komplementäre Sequenz wurden in äquimolaren Verhältnissen (je 1,25 µg) in einem Annealing-Puffer (0,1M TE, pH 8,0; 0,1 M NaCl) aufgenommen, für 10 Minuten bei 65°C inkubiert und anschließend für 30-60 Minuten im Wasserbad auf Raumtemperatur abgekühlt. Dadurch konnten die komplementären DNA-Stränge aneinander hybridisieren. Dieser Linker konnte direkt oder nach enzymatischer Restriktion zur Ligation verwendet werden.

### 3.8.4 Ligation

CIP-behandelte Vektor-DNA und isoliertes DNA-Fragment wurden im molaren Verhältnis von ungefähr 1:5 (Vektor : Insert) ligiert. Als Kontrolle wurde die Vektor-DNA ohne Insert ligiert. Die DNA-Endkonzentration sollte etwa 5-10 µg/ml betragen. Die Ligation erfolgte in einem Ansatzvolumen von 10 µl unter Zugabe von 1 µl T4-DNA-Ligase (2U/µl) und 2 µl des vom Hersteller (Invitrogen) mitgelieferten 5x Ligationspuffers. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 14°C im Wasserbad. Der Ligationsansatz wurde entweder bei 4°C gelagert oder 1:4 mit 0,01 M TE (pH 7,4) verdünnt und zur Transformation eingesetzt.

### 3.8.5 Herstellung kompetenter Bakterien

Als Wirtsbakterien für rekombinante Plasmide wurde der *Escherichia coli*-Stamm K12 DH5 $\alpha$ F' verwendet. In 2-3 ml LB-Medium wurde bei 37°C eine Übernachtskultur angezogen. Diese wurde 1:25 in SOB-Medium verdünnt und solange bei 37°C weitergeschüttelt bis die Bakterienkultur zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4-0,5 herangewachsen war. Die Bakterien wurden 15 Minuten auf Eis gekühlt, 5 Minuten bei 4°C und 3.500x g sedimentiert, der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in 8 ml eiskaltem TFB auf Eis resuspendiert. Nach weiteren 15 Minuten auf Eis wurde erneut zentrifugiert, das Bakteriensediment in 2 ml eiskaltem TFB aufgenommen, 70  $\mu$ l DMSO zugegeben und 5 Minuten auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 70  $\mu$ l DTT-Kaliumacetat und 10 Minuten Inkubation auf Eis, wurden erneut 70  $\mu$ l DMSO zugegeben. Nach 5 Minuten Kühlung auf Eis konnten die Bakterien zur Transformation eingesetzt werden. Pro Ansatz wurden 200  $\mu$ l kompetenter Bakterien verwendet.

### 3.8.6 Herstellung tiefgefrorener kompetenter Bakterien

Eine frische Übernachtskultur des unter 3.8.4 genannten Bakterienstammes wurde 1:100 in LB-Medium verdünnt und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4-0,5 inkubiert. Danach wurden die Bakterien 10 Minuten auf Eis gekühlt und anschließend 10 Minuten mit 3.500x g bei 4°C abzentrifugiert. Die weiteren Schritte erfolgten alle auf Eis mit vorgekühlten Lösungen. Das Bakterienpellet wurde in 1/10 des Ausgangsvolumens der Kultur TFB I resuspendiert, 10 Minuten auf Eis gestellt und erneut zentrifugiert. Nachdem das Bakterienpellet in 4 ml TFB II aufgenommen worden war, wurden 60  $\mu$ l Portionen aliquotiert und sofort bei -70°C eingefroren. Die Bakterien konnten frühestens eine Stunde nach ihrer Herstellung zur Transformation verwendet werden.

### 3.8.7 Transformation von Bakterien

Vor der Transformation wurde der Ligationsansatz zuerst 1:4 mit 0,01 M TE (pH 7,4) verdünnt, für 5-10 Minuten auf 65°C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Vom Ligationsansatz wurden 5–20  $\mu$ l zu 200  $\mu$ l frischen oder 60  $\mu$ l gefrorenen kompetenten Bakterien gegeben und für mindestens 20 Minuten auf Eis belassen. Es erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für exakt 2 Minuten mit anschließender kurzer Inkubation auf Eis. Nach Zugabe von 200-800  $\mu$ l SOC wurden die Bakterien 1 bis 2 Stunden bei 37°C im

Schüttler angezogen. Je 100 µl des Ligationsansatzes wurden auf LB/Amp-Platten ausplattiert und über Nacht (12 bis 18 Stunden) bei 37°C inkubiert. Als Negativkontrolle wurden die Vektor-DNA, das zur Ligation eingesetzte DNA-Fragment und der verwendete *E. coli* Stamm DH5αF' ohne Zusätze auf separaten Platten ausplattiert.

### **3.8.8 Klonierung und Transformation der DNA des Phagen M13**

Mit dem zirkulär geschlossenen, doppelsträngigen Genom des Phagen M13, welches wie Plasmid-DNA aus Bakterien isoliert wurde, wurde bei der Klonierung und der Transformation behandelt wie Plasmid-DNA.

### **3.8.9 Herstellung und Präparation von ssDNA und dsDNA aus Plaques des Phagen M13**

Zur Herstellung von spezifischen ssDNA Proben wurde das Gen oder Genfragment wie bei einer normalen Plasmidklonierung in die DNA des Phagen M13 kloniert. Die zirkulär geschlossene DNA wurde in Bakterien (*E. coli* DH5αF') transformiert. Anschließend wurden die transformierten Bakterien in Weichagar (0,4 g Agar, Difco; 0,5 g Tryptone; BBL; 0,4 g NaCl in 50 ml H<sub>2</sub>O auf 45°C äquilibriert) eingegossen und auf normale LB/Amp Agarplatten geschichtet. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C konnten die Lysehöfe einzelner Phagenklone erkannt werden. Zur Präparation der ssDNA und dsDNA der jeweiligen Klone wurden diese mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und in eine frische Übernachtskultur von *E. coli* DH5αF' (1:100 verdünnt) überführt und für 6 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 5 Minuten bei 14.000x g pelletiert. Aus dem Zellsediment konnte analog zur Plasmid-DNA Präparation die infektiöse dsDNA der Phagenklone isoliert werden. Aus den Phagen im Überstand der Bakterienkultur konnte die ssDNA mit spezifischer Orientierung isoliert werden. Hierzu wurden zu 1,5 ml Kulturüberstand 300 µl 2.5 M NaCl, 20% PEG 6000 gegeben, gemischt und 15 Minuten bei RT inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren bei 14.000x g für 5 Minuten wurde der Überstand sehr sorgfältig entfernt und das ssDNA Pellet in 100 µl TE-Puffer am Vortex-Schüttler resuspendiert. Nach Phenol- und Chloroform-Extraktion schloss sich eine Ethanol-Fällung an. Das ssDNA Pellet wurde in 30 µl TE resuspendiert und der DNA-Gehalt bestimmt.



### **3.9 Lagerung von Bakterien**

Bakterienklone sind bei 4°C nur für wenige Tage bis Wochen in Flüssigkultur, auf Agarplatten für Wochen bis wenige Monate lebensfähig. Zur längerfristigen Aufbewahrung wurden frische Übernachtskulturen in Glycerol bei -70°C eingefroren. Hierzu wurden sie 1:20 in LB-Medium verdünnt, zwei Stunden bei 37°C geschüttelt und 5 Minuten bei 4.000 rpm und 4°C sedimentiert. Das Sediment wurde im halben Ausgangsvolumen HMF-Medium resuspendiert und bei -70°C gelagert.

### **3.10 Identifizierung rekombinanter Klone**

#### **3.10.1 TENS-Plasmid-Schnellpräparation**

Eine Bakterienübernachtskultur (1,5 ml), welche unter dem Selektionsdruck der jeweils plasmidkodierten Antibiotikaresistenz gewachsen war, wurden etwa 20 Sekunden bei 14.000x g zentrifugiert und der Überstand bis auf 50-100 µl dekantiert. Das Bakteriensediment wurde im verbleibenden Medium am Vortexschüttler resuspendiert und mit 300 µl TENS-Lösung zur Denaturierung genomischer DNA und zellulärer Proteine gemischt. Danach erfolgte die Zugabe von 150 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) zur Ausfällung der Proteine. Die Lösung wurde kurz gevortext und nach kurzer Inkubation auf Eis erneut bei 14.000x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit dem doppelten Volumen -20°C kaltem 100% Ethanol zur Fällung der Plasmid-DNA und RNA versetzt und 10 Minuten mit 14.000x g zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 10-20 µl 0,01 M TE pH 8,0 resuspendiert.

#### **3.10.2 „Qiagen“ Plasmid-Präparation**

Neben dem beschriebenen Plasmid-Isolierungsverfahren wurden auch Plasmid-DNA-Präparations-Kits verwendet, die auf dem Prinzip der Säulenaffinitätschromatographie basieren (Genomed, Qiagen). Ihre Verwendung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

### **3.11 Koloniefilterhybridisierung**

Zur schnellen Identifizierung einzelner rekombinanter Bakterienklone wurden Einzelkolonien mit einem sterilen Zahnstocher nach einem bestimmten Muster auf eine frische LB/Amp-Agarplatte übertragen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde ein Nitrozellulose-Rundfilter aufgelegt und mit den anhaftenden Kolonien vorsichtig

abgenommen. Um ein Nachwachsen der Bakterien zu ermöglichen, wurde die Agarplatte erneut über Nacht inkubiert. Ebenso der Nitrozellulose-Filter, der mit der kolonietragenden Seite nach oben auf einer LB-Kasugamycin-Agarplatte aufgelegt wurde. Dadurch erfolgte eine Vervielfachung der Kopienzahl der Plasmide, wobei die genomische DNA der Bakterien nicht weiter replizieren konnte. Durch die Behandlung des Koloniefilters mit 10% SDS und 0,5 N NaOH/1,5 M NaCl (5 Minuten) wurden die Bakterien lysiert und denaturiert. Es folgten weitere 5 Minuten Neutralisation mit 0,5 M Tris-HCl/1,5 M NaCl und 2x SSC für 5 Minuten. Die Behandlung des Nitrozellulose-Filters erfolgte auf den mit den entsprechenden Lösungen getränktem Whatman-Papier. Der Koloniefilter wurde anschließend im Vakuumofen für 2 Stunden bei 80°C gebacken und zur Hybridisierung mit spezifischen <sup>32</sup>P-markierten Sonden weiter verwendet. Positive Signale der Hybridisierung wurden den Kolonien auf der Agarplatte zugeordnet und die entsprechenden Klone zur weiteren Anzucht in der Flüssigkultur benutzt.

### 3.12 Synthetische Oligonukleotide

Synthetische Oligonukleotidprimer (Primer) wurden zur Sequenzierung von Doppelstrang-DNA, sowie zur Amplifikation von DNA-Fragmenten über PCR verwendet. Die Primer wurden entweder käuflich erworben oder im Haus selbst produziert. Ihre Herstellung erfolgte am Oligonukleotidsynthesizer der Firma Biosearch. Die Abspaltung der Oligonukleotide vom Trägerharz erfolgte in 1 ml 25% Ammoniaklösung für 1 Minute bei Raumtemperatur. Anschließend wurde 5 Minuten bei 14.000x g abzentrifugiert und der Überstand zur Abspaltung der Schutzgruppe über Nacht bei 56°C inkubiert. Die Lösung wurde sodann in flüssigem Stickstoff eingefroren und in der Vakuumzentrifuge eingetrocknet. Das Sediment wurde in 100 µl H<sub>2</sub>O bidest resuspendiert, 10 Minuten bei 14.000x g zentrifugiert, anschließend der Überstand in ein neues Gefäß überführt und zur spektrophotometrischen DNA-Konzentrationsbestimmung eingesetzt. Die Abtrennung unvollständig synthetisierter Oligonukleotide erfolgte durch Reinigung in einem denaturierenden Polyacrylamidgel (20% PAA / 7 M Harnstoff), in einer Elektrophorese-Apparatur für Sequenzgels in 1x TBE-Puffer bei 500 V und 56°C. Nach 30 Minuten Vorlauf des Gels, wurde die Oligonukleotid-enthaltende Lösung 1:1 mit deionisiertem Formamid und 1 µl Stop-Lösung des T7-Sequenzier-Kits (Pharmacia) versetzt, für 3 Minuten bei 95°C denaturiert und aufgetragen. Die Trenndauer richtete sich nach der Größe der Oligonukleotide. Der Orientierung diente die Wanderung von Bromphenolblau (entspricht ca. 10 Basen) und Xylencyanol (entspricht ca. 28 Basen), die in der Stop-Solution enthalten sind. Nach dem Lauf wurde das Gel auf eine mit

UV-Fluoreszenzindikator beschichtete Kieselgelplatte gelegt, um die bei  $\lambda = 254$  nm sichtbare Oligonukleotidbande zu isolieren. Die Elution aus dem Gelstück erfolgte in 1,0 ml 1 M TEAB über Nacht bei 56°C.

Die erforderliche Reinigung der Oligonukleotide erfolgte über eine "Reversed-Phase-Chromatographie". Hierfür wurden SepPak C18-Kartuschen auf Einwegspritzen mit je 1 ml Acetonitril, 10 mM TEAB und 1 M TEAB vorbehandelt. Dann wurde die Oligonukleotid-Lösung auf die Kartusche gegeben und mit 20 ml 10 mM TEAB gespült. Die Oligonukleotide wurden mit 3 ml Acetonitril / TEAB eluiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und erneut in der Vakuumzentrifuge eingetrocknet. Das Pellet wurde in 100  $\mu$ l H<sub>2</sub>O bidest resuspendiert und nach photometrischer DNA-Konzentrationsbestimmung bei -20°C gelagert. Unter Berücksichtigung der Verdünnung gilt für ein 20mer Oligonukleotid, dass eine OD<sub>260</sub> von 1,0 einer Konzentration von 5  $\mu$ M entspricht. Sequenzprimer wurden mit H<sub>2</sub>O bidest auf 5 ng/ $\mu$ l, Primer für die PCR auf 15 ng/ $\mu$ l und Primer für die Extensionversuche auf eine Konzentration von 25 ng/ $\mu$ l eingestellt.

### 3.13 DNA-Doppelstrangsequenzierung

#### 3.13.1 Sequenzierung mit dem T7-Sequenzier-Kit

Für die DNA-Doppelstrang-Sequenzierung wurde der T7-Sequenzier-Kit der Firma Pharmacia-LKB verwendet. Nach der Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977) wurde, ausgehend von einem Primer, einzelsträngige DNA mit Hilfe der T7-Polymerase zum Doppelstrang ergänzt. Dabei ist außer dTTP, dGTP und dCTP, auch  $\alpha$ -<sup>35</sup>S dATP zur Synthese angeboten worden, was zur radioaktiven Markierung des neusynthetisierten Stranges führte. In vier verschiedenen Teilreaktionen kam es zum Kettenabbruch durch die Anwesenheit je eines Didesoxynukleotides. In jedem Reaktionsansatz entstand somit eine Mischung aus unterschiedlich langen Fragmenten, die alle mit dem jeweiligen in der Reaktion vorhandenen Didesoxynukleotid endeten. Die Fragmentenden repräsentierten somit das entsprechende Nukleotid der Sequenz. Eine Auftrennung der Fragmente erfolgte im Sequenzgel. Neben SP6- und T7-Primern, die an die entsprechenden Promotoren des Vektors pSPT18 binden, wurden auch synthetisch hergestellte Primer verwendet.

Doppelsträngige DNA musste vor der Sequenzreaktion zu einzelsträngiger DNA denaturiert werden. Hierzu wurden 2-4  $\mu$ g der zu sequenzierenden DNA mit H<sub>2</sub>O bidest auf 14  $\mu$ l aufgefüllt, 2  $\mu$ l 2 N NaOH und 2  $\mu$ l 2 mM EDTA (pH 7,4) zugegeben und der Ansatz fünf Minuten auf 85°C erhitzt. Dann wurden 2  $\mu$ l eiskaltes 2 mM Ammoniumacetat (pH 4,6) und

60 µl 100 % Ethanol zugegeben und die DNA 15 Minuten auf Eis gefällt. Nach 20 Minuten Zentrifugation bei 4°C und 14.000x g wurde das Sediment einmal mit 70% Ethanol gewaschen, das Pellet im Vakuum getrocknet und in 10 µl H<sub>2</sub>O bidest resuspendiert. Zu 10 µl denaturierter DNA wurden 2 µl Primer (5 ng / µl) und 2 µl Anneal-Puffer gegeben, der Ansatz 1 Stunde bei 37°C und 10 bis 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dem Ansatz wurden 3 µl Markierungs-Mix, 2 µl α-<sup>35</sup>S dATP und 2 µl T7-Polymerase (2U / µl) zugegeben und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden je 4,5 µl des Ansatzes zu je 2,5 µl, der auf Raumtemperatur vorgewärmten Terminationsmische pipettiert, die neben den 4 dNTPs jeweils ein 2'3'-Didesoxynukleotid enthielten. Nach exakt 5-minütiger Inkubation bei 37°C wurden die Reaktionen mit 5 µl Stop-Solution beendet und bis zur Elektrophorese bei -20°C aufbewahrt.

### 3.13.2 Automatische Sequenzierung

Parallel zur aufgeführten Sequenziermethode wurde ein automatisches Sequenziersystem verwendet. Das hier zu Grunde liegende Prinzip beruht ebenfalls auf der Kettenabbruchmethode. Dabei dient eine spezifische Markierung der Didesoxynukleotide mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen zur Zuordnung der Basenabfolge aufgrund deren charakteristischer Emissionsspektren. Es wurden 0,5 µg Plasmid-DNA und je 1 pmol Primer für die Sequenzreaktion entsprechend der Herstellerangaben eingesetzt (Perkin Elmer Corporation).

### 3.13.3 Sequenzgele

Zur Auftrennung der Sequenzreaktion wurden 6-8% Polyacrylamid / 7 M Harnstoff-Gele verwendet. Die Gele wurden in Schräglage zwischen eine Thermostatisierplatte und eine Ohrenplatte gegossen. Die Ohrenplatte, die als Gelträgerplatte fungierte, wurde vor jeder Benutzung zweimal mit 5 ml einer Lösung aus 10 ml 100% Ethanol, 260 µl 10% Essigsäure und 30 µl Bind-Silanen (Amersham Pharmacia Biotech) beschichtet und danach mit 100% Ethanol poliert. Zwischen der Beschichtung der Gelträgerplatte und dem Polyacrylamidgel bildeten sich kovalente Bindungen aus. Bei der Thermostatisierplatte war eine Beschichtung nur nach jedem fünften Gebrauch notwendig. Um ein Anhaften des Gels zu vermeiden, wurde die Platte zweimal mit 5 ml Repel-Silanen (Amersham Pharmacia Biotech) behandelt und anschließend zweimal mit 100% Ethanol poliert. Die Elektrophorese erfolgte in 1x TBE bei

2500 V und 56°C. Die Geltaschen wurden mit einer Einmalspritze sorgfältig gespült, um Luftblasen und Gelreste zu entfernen. Bevor die denaturierten Proben aufgetragen wurden (2 Minuten Denaturierung bei 95°C), erfolgte ein Vorlauf des Gels von 30 Minuten. Die Auftrenndauer der Proben richtete sich nach der Länge der zu untersuchenden Sequenz und lag zwischen 90 Minuten und 4 Stunden. Nach dem Lauf wurde das an der Ohrenplatte haftende Gel für 20 Minuten in 10% Essigsäure fixiert, wobei gleichzeitig der Harnstoff hydrolysiert wurde. Anschließend wurde es 10 Minuten gewässert und 1 Stunde im Umluftofen bei 80°C getrocknet. Auf das Gel wurde anschließend ein Röntgenfilm für 1-3 Tage ausgelegt. Durch die Autoradiographie konnte die DNA-Sequenz anhand der Signalabfolge in den 4 Spuren gelesen werden.

### 3.14 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Durch die PCR können *in vitro* innerhalb weniger Stunden bestimmte DNA-Abschnitte (Matrizen-DNA) bis zu 10<sup>6</sup>-fach vervielfältigt werden. Die gewünschte DNA-Sequenz wird mit Hilfe zweier antiparalleler Oligonukleotid-Primer, die an Strang und Gegenstrang der DNA hybridisieren, und dem Enzym Taq-Polymerase (aus dem thermophilen Bakterium *Thermophilus aquaticus*) vervielfacht. Der Reaktionszyklus lässt sich in Denaturierung, Anlagerung („Annealing“) und Kettenverlängerung (Elongation) unterteilen. Die Denaturierung doppelsträngiger DNA-Matrizen („templates“) erfolgt für 60 Sekunden bei 96°C. Die Hybridisierungstemperatur ist von der Schmelztemperatur der verwendeten Primer abhängig. Sie errechnet sich für Oligonukleotide bis zu 100 Basen Länge nach folgender Gleichung:

$$T_m = 16,6 \times (\log \text{ des monovalenten Salzes}) + 0,41 (\% \text{ G+C}) + 81,5 - (675/n)$$

n = Basenlänge des jeweiligen Primers; Das monovalente Salz im PCR-Puffer ist KCl mit einer Endkonzentration von 50 mM.

Die Kettenverlängerung wurde für 1 Minute bei 72°C durchgeführt. Die Reaktionsdauer ist von der Länge des Amplifikates abhängig, die Temperatur vom % G+C Gehalt der DNA. Die Anzahl der Reaktionszyklen lag zwischen 25 und 40. Die Primer- bzw. DNA-Matrizen-Konzentrationen („template“), die Hybridisierungstemperatur und die Puffereigenschaften (Salzkonzentration) wurde in Vorversuchen ermittelt und optimiert.

PCR-Ansätze wurden in einem Endvolumen von 50 µl durchgeführt. Hierfür wurden in Standard-Reaktionen 5 µl 10x PCR-Puffer ohne MgCl<sub>2</sub> (GIBCO-BRL Life Technol.), 5 µl

dNTP's (je 0,2 mM), 2 µl Primer-Mix (je 15 ng/µl beider Primer) und 1,5 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM; GIBCO-BRL Life Technol.) mit dem gewünschten Menge an Matrizen-DNA versetzt und mit doppelt autoklaviertem H<sub>2</sub>O bidest auf 50 µl aufgefüllt. Die Proben wurden im Thermocycler für 5 Minuten auf 98°C erhitzt und weiter bei 80°C inkubiert. Bei dieser Temperatur wurden 0,5 µl Taq-Polymerase (5 U/µl) zugegeben ("Hot-Start") und anschließend das Programm ausgeführt.

### **3.14.1 Klonierung von PCR-Produkten**

Die direkte Klonierung amplifizierter DNA-Fragmente wurde mit dem „TOPO TA Cloning Kit“ (Invitrogen) durchgeführt. Da die Taq-Polymerase während der PCR einen template-unabhängigen 3'-Desoxyadenosinüberhang an die Amplifikationsprodukte anhängt, können diese in einen Klonierungsvektor inseriert werden, der einen singulären 3'-Desoxythymidinüberhang an der Insertionsstelle trägt. Nach Ligation und Transformation in kompetente Bakterien nach Empfehlung des Herstellers, erfolgte die Selektion rekombinanter Plasmide über die Expression des plasmidcodierten β-Galaktosidase Gens (lacZ Gen), welches durch Insertion des PCR-Fragmentes zerstört wurde. Durch die β-Galaktosidase konnte das dem Medium zugesetzt Substrat X-Gal in ein blaues Produkt umgesetzt werden. Nicht rekombinante Bakterien hatten ein funktionelles lacZ Gen und erschienen als blaue Kolonien, während rekombinante Bakterien durch Zerstörung des lacZ Gens und der damit fehlenden Umsetzung des X-Gal weiß waren.

## **3.15 Zellkultur und Virusanzucht**

### **3.15.1 Zellen**

BK-K13A Zellen wurden in MEM unter Zusatz von 3-7% FCS bei 37°C kultiviert. Hatten die Zellen einen konfluenten Zellrasen gebildet, wurde das Medium entfernt und die Zellen mit BFA-40 (2-3 ml/2x10<sup>7</sup> Zellen) trypsiniert. Die gut resuspendierten Zellen wurden in den Verhältnissen 1:3 bis 1:7 mit frischem Medium umgesetzt. Die Zellen waren somit nach 2-5 Tagen wieder zu einem dichten Zellrasen herangewachsen.

Im Unterschied zu den BK-K13A Zellen wurde bei Vero, 3T3, MC57, Lewis, F10 und CRL Zellen BFA-37 Medium verwendet, die weitere Behandlung und Kultivierung war identisch.

Zur Lagerung wurden 1x10<sup>7</sup> Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase in 10 ml kaltem MEM bei 1200 rpm und 4°C zentrifugiert und anschließend in 1,5 ml eiskaltem

Einfriermedium (BFA-37 mit 15% FCS und 10% DMSO) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen 1-2 Stunden bei -20°C, danach 1-2 Tage bei -70°C aufbewahrt, bevor eine Lagerung in flüssigem N<sub>2</sub> erfolgte. Alternativ konnten die Zellen auch direkt mittels einem speziellen Einfrierhilfe (Mr. Frost, Fa. Nunc) in -70°C positioniert werden.

Zur Anzucht wurden die tiefgefrorenen Zellen schnell in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut, das Einfriermedium durch Zentrifugation (1200 rpm, RT, 5 min) entfernt, in 25 ml frischen Kulturmedium resuspendiert und erneut angezogen.

### 3.15.2 Virusanzucht

Die Anzucht von ORFV D1701-B, -V und den aus ihnen hervorgegangenen Virusmutanten erfolgte auf den jeweils entsprechenden Zellen. Dabei wurde ein zu 90% konfluenten Zellrasen mit einer  $MOI$  von 0,1–1,0 infiziert. Nachdem 50-80% der Zellen durch die Virusvermehrung lysiert worden waren und 90-100% der verbliebenen Zellen mit Virus infiziert waren (Zellen kugeln sich ab), wurde der Zellkulturüberstand und die abtrypsinieren Zellen vereinigt und 2 Stunden bei 4°C mit 12.000x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1/50 bis 1/100 des Ausgangsvolumen PBS oder Zellkulturmedium aufgenommen, die Zellen mittels Ultraschall (Sonifier cell disruptor mit 3 Schallstößen von 30% Leistung) aufgeschlossen und die Zelltrümmer durch Zentrifugation (10 min, 2000 rpm, 4°C) abgetrennt. Die so erhaltene Virusstammlösung wurde titriert und bei -70°C gelagert.

### 3.15.3 Virustitration

Ausgehend von der Virusstammlösung wurde eine Verdünnungsreihe (log 10) angesetzt. Jeweils vier Replikate à 100 µl jeder Verdünnungsstufe wurden in 24-Lochplatten pipettiert und ca.  $1 \times 10^5$  Vero-Zellen, nach Trypsinbehandlung in 900 µl BFA-37 mit 5% FCS aufgenommen, zugegeben (Simultaninfektion). Nach 4-5 Tagen bei 37°C wurde der Virustiter nach Spearman und Kaerber (Mayr et al., 1974) bestimmt. Der Virustiter in Gewebekultur-infektiösen Einheiten (TCID<sub>50</sub>) berechnet sich aufgrund des in der Zellkultur zu beobachtenden cytopathogenen Effekts nach folgender Formel:

$$TCID_{50}/ml = x_0 - \frac{d}{2} + \frac{d}{n} \times \sum x_i$$

**x<sub>0</sub>:** Der positive Exponent der höchsten Verdünnung, bei welcher alle Vertiefungen positiv bezüglich der Ausprägung eines cpe sind; **d:** Dosisabstand der Verdünnungsstufen in Logarithmen (hier: 10); **n:** Anzahl

---

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

Für die Ein-Schritt-Wachstumskurve (siehe 3.18.1) wurde in Verdünnungen einer Virussuspension die Anzahl der Plaque-bildenden Einheiten bestimmt, woraus sich die Titerangabe als pfu (plaque forming units) pro ml ergab.

### 3.16 Transfektionen

Transfektionen wurden durchgeführt, um fremde DNA mit Hilfe von polykationischen Lipiden (Felgner et al., 1994) in Säugerzellen zu schleusen. Dadurch ist es unter anderem möglich, rekombinante Viren unter Ausnutzung der homologen Rekombination zwischen gleichen DNA-Sequenzen zu generieren.

#### 3.16.1 Transfektion: Dosper

Bei dieser Transfektionsmethode nutzt man die Fähigkeiten eines polykationischen Lipides zur DNA-Bindung und anschließendem Transfer durch die Zellmembran von Säugerzellen aus. Bei DOSPER (1,3-Dioleoyloxy-2,6-carboxy-spermyl)-propylamid,  $C_{58}H_{113}O_{13}N_5$ ) handelt es sich um ein liposomales Transfektionsreagenz der Fa. Roche. Es lagert sich mit seinen 4 positiv geladenen Amin-Gruppen an die negativ geladenene DNA, während die beiden Ölsäure-Ketten die DNA und das Molekül selbst durch die Zellmembran schleusen.

Die Transfektion wurde in 6-Loch-Gewebekulturplatten mit einem zu 70-80% konfluenten Zellrasen durchgeführt. Pro Vertiefung einer 6-Loch-Gewebekultur-Platte wurden 2  $\mu$ g Plasmid-DNA mit HBS in 50  $\mu$ l gelöst, 4-8  $\mu$ g DOSPER wurden separat in 50  $\mu$ l HBS verdünnt. Beide Lösungen wurden vorsichtig gemischt und 15 Minuten bei RT inkubiert. In dieser Zeit wurde 1 ml frisches Medium ohne Serum zu den Zellen gegeben. Nach Zugabe von 100  $\mu$ l des DOSPER/DNA-Komplexes mittels einer abgeschnittenen Pipettenspitze wird für 3-4 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde der Transfektionsansatz gegen frisches Medium mit Serum ausgetauscht (3 ml/Vertiefung) und weiter inkubiert.

#### 3.16.2 Herstellung rekombinanter Parapockenviren

Zur Herstellung rekombinanter PPV wurden die Zellen 2 Stunden vor der in 3.16.1 beschriebenen Transfektion mit einer moi von 0,05- 0,1 in 1,5 ml Medium infiziert. In den



verwendeten Plasmiden war die zu inserierende DNA von mindestens 1,5 kbp großen PPV-DNA Sequenzen flankiert, welche eine homologe Rekombination mit dem Virus-Genom erlaubten. Die infizierten und transfizierten Zellen wurden nach Lyse von 50-80 % der Zellen geerntet, über dreimaliges Frieren und Tauen aufgeschlossen und anschließend in einer Titration eingesetzt.

### **3.17 Selektion rekombinanter Parapockenviren**

#### **3.17.1 Selektion auf lacZ und Xgpt Expression**

Durch Insertion der beiden *E. coli* Gene *lacZ* und *xgpt* in rekombinante PPV konnten zwei voneinander unabhängige Selektionsstrategien verfolgt werden:

Das *lacZ* Gen, welches unter dem frühen/späten synthetischen Promotor *eIP1* von *Vaccinia* steht (Pfleiderer et al., 1995), war in der Lage das farblose Substrat Bluo-Gal in einen blauen Indigo-Farbstoff umzusetzen. Dem Agarosemedium war als Substrat 50 µl einer Bluo-Gal Stammlösung (60 mg/ml) zugegeben. Rekombinante Viren, welche das *lacZ* Gen inseriert trugen, konnten somit als blaue Plaques gepickt, vermehrt und Plaque-gereinigt werden.

Durch die zusätzliche Insertion des *xgpt* Gens (unter der Kontrolle eines zweiten *eIP1*-Promoters) konnte eine weitere Selektionsstrategie verfolgt werden. Das *xgpt* Gen vermittelte den Rekombinanten PPV durch Verwendung eines Selektivmediums (siehe unten) einen Wachstumsvorteil gegenüber dem parental Wildtyp-Virus. Durch das Aminopterin und die Mycophenolsäure des Selektivmediums (SM) wurde die Purin-Nukleotid-Synthese der Zellen inhibiert, da das zelluläre *xgpt* Gen nicht in der Lage ist, das dem SM zugesetzte Xanthin für die Zelle in adäquaten Mengen in Xanthinmonophosphat umzuwandeln. Das rekombinante Virus, welches das bakterielle *xgpt* Gen exprimiert, versetzt die Zelle in die Lage, ihre Purin-Nukleotid-Synthese über das Xanthin als Substrat wieder aufzunehmen. Die *xgpt*<sup>+</sup> Rekombinante vermittelt der Zelle und somit sich selbst einen Wachstumsvorteil in Zellkultur.

Vier bis sechs Stunden nach der in 3.16.1 beschriebenen Transfektion wurde Selektivmedium anstelle des normalen Mediums zugegeben. Das SM wurde alle zwei Tage erneuert. Bei beginnendem cythopathischem Effekt (CPE) wurden die Zellen mit Agarosemedium (siehe 3.17.4) überschichtet. Sobald eine Blaufärbung von Plaques zu erkennen war, wurden diese gepickt und unter Selektionsbedingungen vermehrt und Plaque-gereinigt.

### 3.17.2 Negativ-Selektion durch fehlende lacZ Expression

Diese Strategie wurde bei der Herstellung revertanter Viren (Rescue-Viren) aus rekombinanten lacZ<sup>+</sup>/xgpt<sup>+</sup> PPV bzw. der Generierung neuer Virusrekombinanten angewendet. Dabei wurden die bakteriellen Gene lacZ und xgpt durch das parentale vegf-e Gen substituiert, wodurch die Viren nicht mehr in der Lage waren, blaue Plaques zu bilden bzw. unter Selektivmedim zu wachsen. Folglich wurden unter normalen Zellkultur-Bedingungen weiße, lacZ<sup>-</sup>/xgpt<sup>-</sup>/vegf-e<sup>+</sup> positive Revertanten bzw. mit Fremdgen-inserierte Rekombinanten erhalten.

### 3.17.3 Selektion auf inseriertes Fremdgen

Diese Selektion beruht auf demselben Prinzip wie die Negativ-Selektion durch fehlende lacZ Expression. Zusätzlich zu diesem Prinzip wurde jedoch der Zellkulturüberstand weißer und zwischenvermehrter Viruskandidaten nach jeder Runde der Plaquereinigung mittels DNA-Hybridisierung auf das Vorhandensein Fremdgen-spezifischer DNA und durch Immunfärbung die Expression des Fremdgens untersucht. Zur DNA-Hybridisierung wurden 100 µl des Zellkulturüberstandes mittels einer Dot Blot Apparatur auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert und anschließend eine DNA-Hybridisierung mit <sup>32</sup>P-markierten Sonden durchgeführt (siehe unten). Zum Nachweis der Expression des Fremdproteins wurden die Virusüberstände mit der Dot Blot Apparatur auf eine Teflon-Membran (PVDF Membran) aufgetragen. Anschließend wurde die Fremdgenexpression mittels Fremdgen-spezifischer monoklonaler Antikörper detektiert (3.24.4). Auf diese Weise war es möglich aus einer großen Anzahl, potentielle rekombinante Viruskclone schnell zu isolieren.

### 3.17.4 Plaquereinigung und Zwischenvermehrung

Zur Plaquereinigung rekombinanter Viren wurde zuerst einen Virustitration in 6-Loch-Gewebekultur-Platten durchgeführt. Nach Auftreten erster kleiner Plaques (2-5 Tage nach der Infektion) wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 2 ml eines 37°C warmen und 0,8%igem Agarosemediums (1:1 Gemisch aus 2x MEM ohne Phenolrot und 1,6% LMT-Agarose), welchem Bluo-Gal (8,5 µl einer 60 mg/ml Stocklösung) zugesetzt war, überschichtet. Nach 4–18 Stunden Inkubation bei 37°C wurden weiße oder blaue Einzelplaques mit Hilfe von Pasteurpipetten ausgestochen, in 200µl Zellkulturmedium aufgenommen und über Nacht bei 4°C inkubiert, um die Viren aus diesen Agaroseblöckchen zu eluieren. Die Eluate wurden mit neuen Zellen in einer 24-Loch-Gewebekultur-Platte

ausgesät und inkubiert bis 50-80% der Zellen einen cytopathischen Effekt (cpe) zeigten. Nach Ernte dieser zwischenvermehrten Einzelplaques wurde erneut eine Virustitration durchgeführt und die hier beschriebene Prozedur wiederholt. Nach drei bis vier Runden war die Plaquereinigung abgeschlossen und einzelne Klone wurden molekular charakterisiert.

### **3.18 Untersuchungen zum Wachstumsverhalten rekombinanter PPV**

#### **3.18.1 Einschrittwachstumskurven**

Um das Wachstum der rekombinanten und revertanten Viren mit dem parentalen Wildtypviren *in vitro* zu vergleichen, wurden 6-Loch-Gewebekultur-Platten, die zu 90% konfluent bewachsen waren mit einer moi von 1,0 oder 2,0 infiziert. Nach einer Stunde Inkubation wurden im Zellkulturüberstand verbliebene Viren durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt und die Zellen mit Zellkulturmedium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (0 bis 144 Stunden) wurde der Zellkulturüberstand und die Zellen getrennt voneinander geerntet. Dabei wurden Zelltrümmer aus dem Überstand durch 5 Minuten Zentrifugation bei 3.000 rpm und 4°C entfernt und mit den trypsinierten Zellen vereinigt. Dieses Zellpellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert. Beide Fraktionen (Zellkulturüberstand und Zellen) wurden bis zur Bestimmung des Virustiters bei -70°C aufbewahrt. Die Bestimmung des Virustiters in beiden Fraktionen erfolgte durch vier unabhängige Virustitrationen.

#### **3.18.2 Mischungsexperiment rekombinanter und parentaler PPV**

Nach Mischen von parentalem Wildtypvirus und rekombinantes lacZ<sup>+</sup> Virus wurde untersucht, ob ein Virus einen Wachstumsvorteil gegenüber dem anderen *in vitro* hat. Hierzu wurden die Zellen, wie oben beschrieben (3.18.1) mit einer moi von 2,0 infiziert. Das Virusinokulum enthielt jeweils Mischungen von Wildtyp Virus und rekombinantes Virus in den Verhältnissen 5:1, 1:1 und 1:5. Nach gemeinsamer Ernte von Zellkulturüberstand und infizierten Zellen zu verschiedenen Zeiten pi, wurden die noch intakten Zellen durch dreimaliges Frieren und Tauen aufgeschlossen. Anschließend wurde diese homogene Suspension in 24-Loch Gewebekulturplatten titriert, um die Gesamtzahl der Virusnachkommen zu bestimmen. Zur Differenzierung von parentalem Wildtypvirus und rekombinantes lacZ<sup>+</sup> Virus wurden unterschiedliche Nachweisverfahren verwendet.

### 3.18.3 Detektion lacZ<sup>+</sup> Plaques im Mischungsexperiment

Die Detektion lacZ<sup>+</sup> Virusplaques erfolgte nach Fixierung der Zellen mit dem Fixativ B (2.16) für 15 Minuten bei RT. Nach Waschen der Zellen mit PBS-A wurde mit frisch angesetzter „Staining solution“ (2.14) gefärbt (0,5–1,0 ml/Loch einer 24 Loch-Gewebekultur-Platte). Die Zellen wurden solange bei 37°C mit der Staining solution inkubiert, bis eine deutliche Färbung der virusinfizierten Zellen erfolgt war. Gestoppt wurde die Färbereaktion durch Waschen mit PBS und dreimaligem Nachspülen mit 70% EtOH. Anschließend konnten die Plaques gezählt werden oder bis zur immunhistochemischen Färbung in PBS bei 4°C gelagert werden (ca. 1 Woche).

### 3.18.4 Immunhistochemische Färbung D1701-infizierter Zellen

Die bei 4°C, in PBS gelagerten und lacZ gefärbten Zellen wurden einmal mit frischen PBS gewaschen. Pro Vertiefung wurden 500 µl der Waschlösung bzw. je 100 µl aller anderen Lösungen eingesetzt. Nach zweimaligem Waschen in H<sub>2</sub>O bidest erfolgte durch dreiminütige Behandlung mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (in H<sub>2</sub>O bidest) bei RT die Inaktivierung interner Peroxidasen. Nach Waschen in H<sub>2</sub>O bidest (zweimal) und PBS (einmal) wurden die unspezifischen Antikörper-Bindungsstellen mit 5% Milchpulver in TBS-Tween und 5% Normalserum der Spezies des Zweitantikörpers für 20-30 Minuten bei RT geblockt. Die Blocklösung wurde abgenommen und mit dem Erstantikörper (4D9; 1:100 in 1% Milch in TBS-T mit 1% Normalserum) für eine Stunde bei RT oder bei 4°C über Nacht bewegt. Anschließend wurden die Zellen fünfmal für 2 Minuten in TBS-T gewaschen. Die Inkubation mit dem Zweitantikörper erfolgte für 30 Minuten bei RT (αMause IgG; 1:500 in 1% Milch in TBS-T und 1% Normalserum) unter Verwendung des Vectastain Elite Kits (Fa. Vector). Die weiteren Schritte erfolgten nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll. Die Antikörperreaktion wurde mit Hilfe des Substrates DAB (Diaminobenzidine; 1mg/ml in PBS: 1ml einer 25mg/ml DAB Stocklösung mit 24 ml PBS und 15µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) sichtbar gemacht und durch Waschen mit PBS konnte die Färbereaktion gestoppt werden. Parentale Virusplaques (braun) konnten und von denen rekombinanter lacZ<sup>+</sup> Viren (blau und braun) gut unterschieden werden.

### 3.19 Isolierung von PPV-DNA

Zur Isolierung viraler DNA wurden verschiedenen Methoden herangezogen, um das aufwendige, für die Präparation von Orthopocken-DNA angewandte Verfahren (Esposito et al., 1981) zu verkürzen und die Ausbeute viraler DNA zu erhöhen. Die Methode von Esposito

ergab reproduzierbar die qualitativ reinste DNA. Die anderen genannten Methoden zeigten unterschiedliche Ergebnisse in der Qualität der erhaltenen viralen DNA.

Die Infektion der Zellen (BK-K13A oder Vero) erfolgte mit einer  $MOI$  von 1,0 bis 2,0. Hierzu wurde entweder der zu 80% konfluent gewachsene Zellrasen durch einstündige Adsorption oder die Zellsuspension simultan infiziert. Nach Ablösen von 50-80% der Zellen (3-5 Tage nach der Infektion) wurden der Zellkulturüberstand und die, trypsinisierten Zellen geerntet und die virale DNA, wie im Folgendem beschrieben, präpariert:

### **3.19.1 PPV-DNA Isolierung aus Zellkultur (Esposito et al., 1981)**

Die geernteten Zellen und der Zellkulturüberstand wurden 2 Stunden bei 12.000 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellsediment in isotonem Puffer (TEN) oder PBS resuspendiert. Nach Beschallung erfolgte für 30 Minuten ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 3.000 rpm und 4°C. Das Sediment wurde in 9 ml hypotonem Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM KCl, 5 mM EDTA) aufgenommen und 10 Minuten auf Eis stehend gelassen. Nach Zugabe von 25 µl β-Mercaptoethanol und 1 ml 10% (v/v) Triton X-100 wurde bei gelegentlichem Mischen erneut für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Dabei kam es zur Auflösung der Zellplasmamembranen und der Freisetzung viraler Partikel und Zellorganellen. Die Zellkerne wurden durch 5 Minuten Zentrifugation bei 4°C und 2.000 rpm entfernt, und der erhaltene Überstand mit den Viruspartikeln erneut 1 Stunde bei 4°C und 13.000 rpm sedimentiert. Die Virushüllen konnten durch Mischen mit 0,8 ml „Cold Buffer“ (TE Puffer, 4°C), dem 15 µl β-Mercaptoethanol, 50 µl Proteinase K (10 mg/ml), 0,2 ml 20% (w/v) N-Lauryl-Sarcosinat zugefügt wurden, bei Inkubation auf Eis für 30 Minuten entfernt werden, so dass die virale DNA in freier Form vorlag. Die Proteine wurden nach Mischen mit 1,4 ml einer 54% (w/v) Saccharose-Lösung während 2 Stunden bei 55°C denaturiert. Die Zugabe von 0,4 ml 5 M NaCl-Lösung verhinderte die unspezifische Bindung von Proteinresten an die DNA. Durch dreimalige vorsichtige Phenol/IAC- (1:1) und zweimalige IAC-Extraktion sowie anschließender DNA-Präzipitation mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und 1 Volumen Isopropanol, gelang die weitere Aufreinigung der PPV-DNA. Die Fällung erfolgte bei -20°C über Nacht und die Sedimentation der DNA bei 15.000 rpm und 4°C für 30 Minuten. Nach abschließendem zweimaligen Waschen mit 70% Ethanol und Trocknen wurde die DNA in 0,01 M TE pH 8,0 resuspendiert.

### 3.19.2 PPV-DNA-Isolierung aus Zellkultur (Methode II)

Nachdem 50-80% der infizierten Zellen lysiert waren, wurden Zellen und Zellkulturüberstand geerntet, 2 Stunden bei 12.000 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellsediment in 3-5 ml PBS resuspendiert. Nach Beschallung erfolgte für 30 Minuten ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 3.000 rpm und 4°C. Um die Viren zu sedimentieren, wurde der Überstand bei 13.000x g, 90 Minuten, 4°C zentrifugiert und das Sediment in 0,5 ml PBS aufgenommen. Zur weiteren Reinigung des Viruspellets wurde es über 3 ml eine 36% (w/v) Succroslösung (pH 7,4) geschichtet, die Röhrchen entsprechend aufgefüllt und bei 20.000 rpm, 4°C, 30 Minuten zentrifugiert. Das Sediment wurde in 0,5 ml 4 M Guanidinium-Isothiocyanat (GIT)-Lösung resuspendiert, in Eppendorf-Gefäße überführt und für 1 Stunde bei 37°C auf einem Thermomixer rotiert. Während dieser Inkubationszeit wurde eine 40% (w/v) CsCl-Lösung in sterilem TE-Puffer (pH 8,0) hergestellt und in Beckman „tabletop tubes“ für die Ultrazentrifuge vorgelegt. Die GIT-Lösung wurde darrübergeschichtet und die Gefäße mit TE-Puffer aufgefüllt. Es folgte die Aufreinigung der viralen Partikel in einem Gradienten durch Zentrifugation bei 35.000 rpm und RT, während 16 Stunden. Anschließend wurde der Überstand verworfen, die Viren in TE-Puffer (100 µl) suspendiert und mit 5 µl (10mg/ml) RNase gemischt und 30 Minuten bei RT inkubiert. Es folgte nach Zugabe von 5 µl (10 mg/ml) Proteinase K eine Inkubation für 1 Stunde bei 37°C. Anschließend wurden die Proteine durch jeweils zweimalige Phenol/IAC und IAC Extraktion entfernt, die DNA mit Ethanol gefällt und in TE-Puffer resuspendiert.

### 3.19.3 PPV-DNA Isolierung aus Zellkultur (Inoshima et al., 2000)

Dieses Protokoll wurde ursprünglich zur Isolierung von großen Plasmiden verwendet (Kado und Liu, 1981) und für die Extraktion viraler DNA aus infizierten Zellen modifiziert. Zellen und Zellkulturüberstand einer Gewebekulturflasche (150 cm<sup>2</sup>, ca. 2x10<sup>7</sup> Zellen) wurden geerntet, 5 Minuten bei 400x g zentrifugiert und das Zellsediment in 0,5 ml 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM EDTA mit 100 µg/ml RNase A resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert, indem sie nach Zugabe von 1 ml 50 mM Tris-HCl (pH mit NaOH auf 12,6 justiert) und 3% SDS (w/v) kurz geschüttelt und 30 Minuten bei 55°C erhitzt worden waren. Die virale DNA wurde durch wiederholte Extraktion (4-8 Mal) mit 3 ml Phenol/IAC (25:24:1) von Proteinen befreit und mit Ethanol oder Isopropanol (3.1.2, 3.1.3) gefällt und in 0,01 M TE pH 8,0 aufgenommen.

### **3.20 Infektion von Zellen zur Isolierung von Gesamtzell-RNA**

Ein zu 90-100% konfluenten Zellkulturrasen wurde mit einer  $MOI$  von 10,0 durch Adsorption in Medium mit 3% FCS infiziert und anschließend mit neuem Zellkulturmedium weiter inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion wurde der Zellkulturüberstand verworfen und die Gesamtzell-RNA aus den infizierten Zellen isoliert. Um eine Anreicherung von frühen Virus-Transkripten in den infizierten Zellen zu erhalten, wurden die zu infizierenden Zellen zwei Stunden vor und während der Infektion mit Cycloheximid (100  $\mu\text{g/ml}$ ) behandelt, einem Inhibitor der zellulären Proteinsynthese.

#### **3.20.1 RNA-Isolierung mittels Trizol**

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus infizierten Zellen erfolgte unter Verwendung des "Trizol-Reagenz" nach Herstellerangaben. Es wurden stets sterile und silikonisierte Reaktionsgefäße verwendet. Außerdem wurden alle Plastikmaterialien für Arbeiten mit RNA separat gehalten und immer Latex-Handschuhe getragen. Es wurde nur DEPC-behandeltes Wasser verwendet. Diese Maßnahmen dienen dem Schutz vor ubiquitären RNasen.

#### **3.20.2 RNA Isolierung durch Guanidiniumisothiocyanat und CsCl-Gradient**

Die infizierten Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion mit Hilfe eines Gummischabers von der Flasche in das Zellkulturmedium gekratzt. Diese Suspension wurde anschließend bei 4°C und 800x g zentrifugiert, das Zellsediment dreimal mit kaltem PBS gewaschen und schließlich in 100  $\mu\text{l}$  PBS resuspendiert. Pro  $1 \times 10^7$  Zellen wurden 3 ml 12 M Guanidinium-Isothiocyanat (vorgewärmt auf 42°C) zugegeben (enthält 7,8  $\mu\text{l/ml}$   $\beta$ -Mercaptothanol). Nach 10 Minuten Inkubation bei leichter Bewegung konnte die Probe entweder bei -20°C gelagert oder auf einen CsCl-Gradienten geschichtet werden. Die Reinigung über einen CsCl-Gradienten erfolgte in autoklavierten 13 x 51mm Beckman Polyallomer Zentrifugenröhrchen. Nach Überschichtung von 2 ml 5,7 M CsCl mit 3 ml der Nukleinsäure-Probe, wurden die Proben für 20 Stunden bei 15°C und 40.000 rpm in einem SW50:1 Rotor zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. Das Sediment wurde sorgsam mit DEPC-Wasser gewaschen, um das restliche Guanidinium-Isothiocyanat und CsCl zu entfernen. Zweimaliges Waschen mit 70% EtOH erfolgte auf die gleiche Weise. Anschließend wurde das Pellet in 200  $\mu\text{l}$  TE pH 7,4/1% SDS gelöst und mit 20  $\mu\text{l}$  5 M NaCl und 440  $\mu\text{l}$  EtOH präzipitiert, zweimal mit 70% EtOH gewaschen, vorsichtig getrocknet und in wenigen  $\mu\text{l}$  0,01 M TE pH 7,4 aufgenommen. Nach

photometrischer Bestimmung des RNA-Gehaltes wurde die RNA mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf 3 mg/ml eingestellt und bei -80°C gelagert.

### 3.20.3 RNA-Agarosegelelektrophorese

Einzelsträngige RNA-Moleküle bilden im nativen Zustand Sekundärstrukturen aus, die das Laufverhalten der RNA während der Elektrophorese beeinträchtigen. Die RNA wird daher vor ihrer Größenauftrennung durch Zugabe eines fünffachen Volumens formaldehydhaltigen Probenpuffers und Erhitzen auf 65°C während 15 Minuten denaturiert. Die elektrophoretische Auftrennung der RNA erfolgte in 0,8-1,2 % Agarosegelen. Dazu wurde Agarose in 80 ml H<sub>2</sub>O/DEPC aufgeköcht, auf etwa 60°C abgekühlt und 10 ml 10x MOPS/EDTA sowie 3 ml Formaldehyd zugemischt und mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf 100 ml aufgefüllt. Nach 30 Minuten Vorlauf des Gels bei 50 V wurden die Proben aufgetragen und je nach Größe der Gelapparatur 4-8 Stunden bei 80 V aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 1x MOPS/EDTA.

### 3.20.4 Northern-Transfer

Der Transfer von RNA aus dem Gel auf eine Nylonmembran erfolgte mit Hilfe von 10x SSC als Transferpuffer, Whatman-Filtern und Zellstofftüchern als Saugmaterial. Durch Auflegen eines Gewichtes konnte so über Nacht die Nukleinsäure auf die Membran transferiert werden. Nach dem Transfer wurde die Nukleinsäure auf der Membran durch UV-Bestrahlung fixiert (UV-cross linking), die Membran 10 Minuten in 2x SSC bewegt und anschließend für 2 Stunden im Vakuumofen bei 80°C gebacken. Zwischen zwei Whatman-Filtern gelegt und in Folie eingeschweißt, konnte die Membran bei RT bis zur Hybridisierung aufbewahrt werden.

## 3.21 Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren

### 3.21.1 DNA-Markierung

Die Markierung von DNA erfolgte mit Hilfe des „Rediprime DNA labelling system“. Hierbei wird ein Gemisch verschiedener Oligonukleotide von 9 nt Länge an die denaturierte DNA hybridisiert und die dadurch entstehenden DNA-Doppelstränge in Anwesenheit der Klenow-Polymerase und eines radioaktiv markierten Nukleotids ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P dCTP) verlängert (Feinberg und Vogelstein, 1983). Etwa 10-30 ng der zu markierenden DNA wurden mit H<sub>2</sub>O bidest auf ein Gesamtvolumen von 45  $\mu$ l gebracht, 10 Minuten im Wasserbad gekocht und anschließend auf Eis sehr schnell abgekühlt. Die DNA-Lösung wurde mit dem im Kit enthaltenem



Markierungs-Mix (enthält dNTPs und Klenow-Polymerase) und 5  $\mu\text{l}$   $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$  dCTP (ca. 50 $\mu\text{Ci}$ ) gemischt. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 37°C inkubiert und die Reaktion mit 3  $\mu\text{l}$  0,5 M EDTA pH 8,0 gestoppt.

### 3.21.2 Abtrennung nicht eingebauter Radionukleotide

Nach allen radioaktiven *in vitro* Markierungen erfolgte eine Abtrennung der nicht eingebauten Radionukleotide. Dazu wurden Sephadex G-50 Säulen verwendet. Bei dieser Ausschlusschromatographie können kleinere Moleküle in die Poren des Säulenmaterials eindringen und werden bei der Elution zurückgehalten, während größere Moleküle nicht ins Säulenmaterial eindringen können. Die Säule wurde mit 3 ml 10 mM TE pH 7,4 äquilibriert, bevor die radioaktive Probe in 400  $\mu\text{l}$  TE aufgetragen wurde. Das erste Eluat nach Zugabe von 400  $\mu\text{l}$  10 mM TE pH 7,4 wurde verworfen. Mit weiteren 400  $\mu\text{l}$  konnte die gereinigte Sonde eluiert werden und 2  $\mu\text{l}$  zur Bestimmung der spezifischen Aktivität (cpm/ $\mu\text{g}$  DNA) im Szintillationszähler verwendet werden.

### 3.21.3 In vitro Synthese von cRNA

Die Synthese komplementärer radioaktiver RNA (cRNA) mittels phagenspezifischer RNA-Polymerasen lieferte strangspezifische Sonden mit hoher spezifischer Aktivität. Die Phagen-RNA-Polymerasen nutzen keine normalen pro- und eukaryotische Terminationssequenzen und initiieren ausschließlich an ihrem spezifischen Promotor. Die „multiple cloning site“ (MCS) des verwendeten Plasmids pSPT18 wird von den Sequenzen der SP6- und T7- Promotoren flankiert. Je nachdem welche RNA-Polymerase zugegeben wurde, konnte in Anwesenheit von  $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$  UTP eine radioaktiv markierte cRNA mit gewünschter Orientierung synthetisiert werden.

Die eingesetzten Plasmide wurden zuerst mit einer Restriktionsendonuklease an der gewünschten Position, an welcher die cRNA enden sollte, linearisiert und die vollständige Spaltung im Agarosegel überprüft. Danach wurden die Enzyme entweder durch Hitze inaktiviert oder der Spaltansatz wurde einer Proteinase-K Behandlung unterzogen, um das Enzym und mögliche RNAsen zu entfernen. Der Spaltansatz wurde dazu mit  $\text{H}_2\text{O}$  bidest auf 75  $\mu\text{l}$  aufgefüllt, 10  $\mu\text{l}$  10% SDS, 10  $\mu\text{l}$  Proteinase-K-Puffer, sowie 5  $\mu\text{l}$  Proteinase-K (10 mg/ml) zugegeben, 15 min bei RT inkubiert, einmal mit 1 Volumen Phenol/ IAC (1:1) und zweimal mit je 1 Volumen IAC extrahiert. Die DNA wurde anschließend mit Ethanol gefällt,

im Vakuum getrocknet und in 10-20 µl DEPC-H<sub>2</sub>O resuspendiert. 1-2 µg zu markierende DNA wurden mit 3 µl „UTP“-Mix (1:1 Mischung von 10 mM Stocklösungen ATP, GTP und TTP), 2 µl 10x Reaktionspuffer, 1 µl RNase-Inhibitor, 6 µl α-<sup>32</sup>P UTP (3000 Ci/mM), 1 µl UTP (10 mM Stocklösung 1:50 verdünnt) gemischt und mit H<sub>2</sub>O/DEPC auf 19 µl aufgefüllt. Zuletzt wurde 1 µl SP6- oder T7-Polymerase (10U/µl) zugegeben. Nach 1 Stunde Inkubation bei 37°C wurden 2 µl tRNA (25 µg/µl) sowie 2 µl DNase RQ1 (10U/µl) zugegeben. Gestoppt wurde die Reaktion nach weiteren 30 Minuten bei 37°C mit 2 µl 0,2 M EDTA (pH 8,0). Abschließend erfolgte eine Reinigung der markierten cRNA über eine Sephadex G50-Säule und die Bestimmung der spezifischen Aktivität (cpm) der Probe (3.21.2).

## 3.22 Hybridisierungsmethoden

### 3.22.1 Hybridisierung von radioaktiv markierter DNA

Sämtliche Hybridisierungen wurden in einem Glasrohr im temperierten Rollerschrank durchgeführt. Vor der Hybridisierung wurde die Nylonmembran 1 Stunde bei 65°C in 0,1x SSC/0,5% SDS vorinkubiert. Danach wurde die Membran in ein Glasrohr überführt. Die Hybridisierungstemperatur sollte etwa 25°C (5°C für Oligonukleotide) unter der Schmelztemperatur der Doppelstränge liegen. Diese kann durch Zugabe von Formamid erniedrigt werden. Die Schmelztemperatur ist außerdem abhängig vom GC-Gehalt der Sonde und der Konzentration einwertiger Kationen in der Hybridisierungslösung. Sie wurde aus folgenden Gleichungen errechnet:

$$T_m = 81,5^\circ\text{C} + 16,61 (\log[\text{Na}^+]) + 0,41 (\%G+C) - 0,63 (\% \text{ Formamid})$$

(für DNA/DNA-Hybride)

Bei Northern-Blothybridisierungen lag die Hybridisierungstemperatur 30°C unter der mittleren Schmelztemperatur des DNA/RNA Hybrids, die nach folgender Formel berechnet wurde:

$$T_m = 79,8^\circ\text{C} + 18,5 (\log[\text{Na}^+]) + 0,58 (\%G+C) - 0,50 (\% \text{ Formamid}) + 0,0012 (\%GC)^2$$

(für DNA/RNA-Hybride)

$$T_m = 79,8^\circ\text{C} + 18,5 (\log[\text{Na}^+]) + 0,58 (\%G+C) - 0,35 (\% \text{ Formamid}) + 0,0012 (\%GC)^2$$

(für RNA/RNA-Hybride)

Die Vorhybridisierungs- und Hybridisierungslösungen enthielten 50% (Southern-Blothybridisierung) bzw. 60% (Northern-Blothybridisierung) deionisiertes Formamid. Die Membran wurde mit 5 ml Preanneal-Mix für 2-18 Stunden bei entsprechender Temperatur vorhybridisiert. Zur Hybridisierung von Northern Blots wurde der Preanneal-Mix durch Anneal-Mix, der zusätzlich 7% Dextransulfat enthielt, ersetzt. Dextransulfat dient der Erhöhung der Hybridisierungseffizienz. Mindestens  $10^5$  -  $10^6$  cpm radioaktiv markierter Probe pro ml Anneal-Mix wurden 10 Minuten in kochendem Wasserbad denaturiert, auf Eis kurz abgekühlt und zur Nylonmembran gegeben. Die im Preanneal-Mix und Anneal-Mix enthaltenen Kalbthymus-DNA und Milch dienten zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen der Membran. Nach der Hybridisierung wurde nicht oder unspezifisch gebundene Radioaktivität durch Waschen entfernt. Die Waschtemperatur lag dabei etwa  $10^\circ\text{C}$  unter der berechneten Schmelztemperatur der Hybride. Die Membran wurde zunächst zweimal 20 Minuten im Wasserschüttelbad mit  $2\times$  SSC/ $0,1\%$  SDS, darauf zweimal 20 Minuten in  $0,1\times$  SSC/ $1\%$  SDS und schließlich zwei- bis fünfmal 20 Minuten in  $0,1\times$  SSC/ $0,1\%$  SDS gewaschen bis keine Radioaktivität mehr in der Waschlösung gemessen werden konnte. Zuletzt wurden die Membranen bei Raumtemperatur in  $0,1\times$  SSC gespült. Stringente Hybridisierungsbedingungen für PPV-spezifische Proben bestanden aus einem Formamidgehalt von 50% in der Hybridisierungslösung und einer Hybridisierungstemperatur von  $56^\circ\text{C}$ . Für eine lacZ-spezifische Hybridisierung wurde die Hybridisierungstemperatur auf  $45^\circ\text{C}$  abgesenkt.

### **3.22.2 Hybridisierung radioaktiv markierter cRNA**

Abweichend von der Hybridisierung mit DNA Proben (3.22.1) wurde die Membran nach der Hybridisierung zweimal 15 Minuten bei RT in  $2\times$  SSC gewaschen und optional mit  $1\mu\text{g}$  RNase A/ml  $2\times$  SSC behandelt, bevor mit den weiteren Waschschrritten bei ermittelter Temperatur fortgefahren wurde.

### **3.22.3 Rehybridisierung von Nylonmembranen**

Durch Behandlung der hybridisierten Southern Blots mit  $0,4\text{ N}$  NaOH bei  $45^\circ\text{C}$  für 30 Minuten und anschließendem kurzem Aufkochen in Blotabkochlösung (2.8) konnte die spezifisch gebundene radioaktive Sonde von der Membran entfernt werden. Dabei war jedoch wichtig, dass die Membran während der Autoradiographie nicht eintrocknete. Durch die milde Behandlung mit Detergenzien und dem nur kurzzeitigen Erhitzen der Abkochlösung

kommt es nicht zum Aufbrechen der kovalent an den Nylonfilter gebundenen DNA. Es verblieb nur die radioaktive Sonde im Waschwasser. Nach Trocknen und Vorbehandlung des Southern Blots mit 0,1x SSC/0,5% SDS konnte mit einer neuen Sonde hybridisiert werden.

#### **3.22.4 Autoradiographie**

Nach den Waschschritten wurde überschüssiges Waschwasser mittels einem Whatman-Papier abgesaugt, die Membran auf ein frisches Filterpapier gelegt und in Haushaltsfolie eingewickelt. Unter Rotlicht wurde der Röntgenfilm in einer Filmkassette mit Verstärkerfolie aufgelegt und bei -70°C für 1–14 Tage, abhängig von der Strahlungsintensität der Membran, exponiert. Der Film wurde wiederum bei Rotlicht für 2 Minuten in Roentogen entwickelt, kurz gewässert und 5 Minuten in Superfix fixiert. Fixierreste wurden durch Wässern entfernt und der Film an der Luft getrocknet.

#### **3.23 Primer Extension**

Die Primer-Extension-Methode dient zur genauen Bestimmung des Transkriptionsstarts einer mRNA. Dazu muss die Nukleotidsequenz dieser Region bekannt sein. Ein synthetisches Oligonukleotid, dessen Sequenz komplementär aber umgekehrt orientiert zur mRNA ist und bis zu 100 Nukleotide vor dem Transkriptionsstart liegen kann, wird an seinem 5'-Ende radioaktiv markiert. Der Primer wird anschließend an die RNA hybridisiert und mit Hilfe von Reverser Transkriptase davon ausgehend eine cDNA synthetisiert. Die RNA/cDNA Hybride werden denaturiert und in einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Anhand einer Sequenzreaktion mit demselben Primer, die gleichzeitig mit der cDNA aufgetrennt wird, kann der exakte Transkriptionsstartpunkt der mRNA bestimmt werden.

Es wurde die Reverse Transkriptase des „avian myeloblastosis virus“ (AMV) verwendet. Entsprechend der Körpertemperatur des natürlichen Wirtes (Geflügel) des AMV betrug die Inkubationstemperatur für die cDNA-Synthese 42°C.

##### **3.23.1 Primer-Markierung**

1 µl Primer (30-60 ng/µl) wurden mit 2 µl 10x Kinase-Mix, 0,1 M DTT, 9 µl H<sub>2</sub>O bidest und 5 µl γ-<sup>32</sup>P ATP (32-75 pM) gemischt. Die Markierungsreaktion wurde durch Zugabe von 1 µl T4-Polynukleotidkinase (10 U/µl) gestartet. Die T4-Polynukleotidkinase überträgt die γ-<sup>32</sup>Phosphat-Gruppe des ATP auf das 5'-Ende der dephosphorylierten DNA. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion mit 2 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) gestoppt und 10

Minuten auf 65°C erhitzt. Nach Zugabe von 1 µl tRNA (10µg/µl) als unspezifischen Träger für die cDNAs wurden die nicht eingebauten Nukleotide durch Sephadex-Chromatographie abgetrennt.

### **3.23.2 Primer-Hybridisierung und cDNA-Synthese**

Zwischen 20 und 30 µg Gesamtzell-RNA wurden mit  $10^6$ - $10^7$  cpm markierten Primern gemischt und mit Natriumacetat und Ethanol für 20-30 Minuten auf Eis gefällt. Das Sediment wurde einmal mit 70% Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet, in 8 µl H<sub>2</sub>O/DEPC resuspendiert und 3 Minuten auf 85°C erhitzt. Darauf wurde der Ansatz unverzüglich in ein 56°C Wasserbad überführt, 2 µl auf 56°C vorgewärmter 5x Anneal-Mix zugegeben und über Nacht inkubiert. Zur cDNA-Synthese wurden 40 µl Extension-Mix addiert. Die Extension-Reaktion erfolgte für 2 Stunden bei 42°C im Thermoblock. Mit 5 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) und einem halben Volumen 7,5 M Ammoniumacetat wurde die Synthesereaktion gestoppt. Die Proteine wurden anschließend mit einem Volumen PMQN/IAC und einmal IAC extrahiert, die cDNA aus dem wässrigen Ansatz mit Ethanol gefällt und mit 70% Ethanol gewaschen. Das Sediment wurde getrocknet und in 8 µl 0,01 M TE pH 8,0 und 2 µl Stop-Lösung resuspendiert. Die Auftrennung auf dem 6% Polyacrylamid/7 M Harnstoffgel erfolgt wie oben beschrieben (Sequenzgele, 3.13.3), wobei die parallel durchgeführte Sequenzreaktion, die direkte Lokalisation der Transkriptionsstartstelle ermöglichte.

### **3.24 Proteinanalytische Methoden**

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrem Molekulargewicht, dabei unterschieden sich die Proteine in ihren Wanderungseigenschaften innerhalb eines elektrischen Feldes je nach ihrer Form, Größe und elektrischer Ladung. Durch die Anlagerung von Natriumdodecylsulfat-Molekülen wird bei dieser Methode eine einheitliche negative Ladung aller Proteine erreicht und dem entsprechend wandern sie alle abhängig von ihrem Molekulargewicht und dem Grad der Vernetzung der Gelmatrix unterschiedlich schnell zum positiven Pol.

#### **3.24.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Der Aufbau der Apparatur sowie Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel erfolgten nach Herstellerangaben (Fa. BIORAD). Soweit im Text nicht anders vermerkt, wurden Gele

mit einer Konzentration von 12% Acrylamid verwendet. Vor dem Auftrag wurden die Proben 1:1 mit 2x SDS-PAGE Probenpuffer (Fa. Roth) gemischt und im Wasserbad 5 Minuten aufgeköcht. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 150 V in Tris-Tricine-Elektrophorese-Puffer.

### **3.24.2 Western Blot**

Unter einem Western Blot versteht man den Transfer von in einer Gelmatrix elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf eine Membranoberfläche zum spezifischen Nachweis von Antigen oder Antikörpern. Der Transfer erfolgte in einer BIO-RAD Transferkammer nach den Angaben des Herstellers und einer Spannung von 100 V für 30 Minuten auf eine PVDF- (Polyvinyl-Difluorid) Membran. Zuvor wurde die Membran durch einminütige Inkubation in Methanol und anschließendem Waschen in Transferpuffer benetzbar gemacht. Nach dem Transfer wurden die restlichen im Gel verbliebenen Proteine mittels Coomassie-Färbung nachgewiesen. Die Membran wurde entweder getrocknet und bei 4°C gelagert oder in TBS-T/ 5% Milch bzw. PBS/0,05% Tween/2% BSA/10% FCS über Nacht bei 4°C zur Absättigung unspezifischer Antikörperbindungsstellen geschwenkt.

### **3.24.3 Coomassie-Färbung**

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden durch Färben mit Coomassie-Färbelösung sichtbar. Hierfür wurde das Gel 10-20 Minuten in der Färbelösung geschwenkt und anschließend solange in SDS-PAGE-Fix entfärbt, bis die Proteinbanden zu erkennen waren. Analog konnte mit den PVDF-Membranen nach Antikörperreaktionen verfahren werden.

### **3.24.4 Analyse von Seren im Western Blot**

Um Seren auf spezifische Antikörper hin zu analysieren, wurde BDV-spezifisches Antigen (10% Hirnhomogenat BDV infizierter Ratten 20 Tage nach der Infektion) über SDS-Page aufgetrennt, auf einer Teflonmembran (PDVF, Boehringer) transferiert und über Nacht freie Bindungsstellen mit PBS/0,05% Tween/2% BSA/10% FCS abgesättigt. Die Membran wurde darauf hin in die Mini-Protean II Multiscreen Apparatur (Bio-Rad) eingespannt und mit den Seren, die 1:100 in PBS/0,05% Tween/5% FCS verdünnt wurden, für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimal fünfminütigem Waschen mit PBS-T, wurde in

Blockierungspuffer 1:1000 verdünnter anti-Spezies-Biotin gekoppelter Antikörper zur Detektion spezifischer Antikörper für 1 Stunde bei RT zugegeben. Darauf folgten erneut drei Waschschriffe in PBS-T und eine anschließende 45-minütige Inkubation bei RT mit 1:1000 in Blockierungslösung verdünntem Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase Konjugates. Überschüssiges Konjugat wurde abgewaschen (dreimal PBS-T) und die Antikörperbindung mittels Chloronaphtol oder einer 1:1 Mischung aus Diaminobenzidine/Chloronaphtol sichtbar gemacht. Die Farbe-Reaktion wurde mit Leitungswasser gestoppt.

### **3.24.5 Western Blot Analyse der Hirnhomogenate**

Die Hirnhomogenate (3.28.1) wurden im SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Teflon Membran (PVDF, Boehringer Mannheim) transferiert und die unspezifischen Antikörperbindungsstellen über Nacht mit TBS-T/5% Milch bei 4°C abgeblockt. Alle weiteren Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Die Blocklösung wurde verworfen und die Membran mit dem Erstantikörper (mAK-4; 1:100 in TBS-T/1% Milch) eine Stunde inkubiert. Nach 5 Waschschriffen von je 3 Minuten mit TBS-T erfolgte die Reaktion mit dem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper ( $\alpha$ Maus-PO, 1:3000 in TBS-T/1% Milch) ebenfalls für 1 Stunde. Danach wurden die Membranen erneut mit TBS-T fünfmal gewaschen. Parallel dazu wurde das ECL-Substrat LumiLight auf Raumtemperatur gebracht. Je 1 ml der beiden ECL-Komponenten pro Membran (ca. 70 cm<sup>2</sup>) wurden daraufhin gemischt und für 10 Minuten inkubiert. Nach dem Waschen wurde die überschüssige Waschlösung mittels Whatman-Filter von der Membran entfernt, die Membran auf eine Glasscheibe gelegt (Proteinseite nach oben) und mit dem ECL-Substrat für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurde das Substrat durch einen Whatman-Filter abgesaugt und die feuchte Membran in eine dickere Haushaltsfolie eingeschlagen. Die Exposition gegenüber Chemilumineszenz-hyperempfindlichen Filmen erfolgte für wenige Sekunden bis Minuten in der Dunkelkammer. Die Entwicklung der Filme erfolgte im Anschluss daran, wie für die Röntgenfilme (3.22.4) bereits beschrieben.

## **3.25 Tierexperimente: Schafe**

### **3.25.1 Immunsupprimierung der Schafe**

ORFV D1701 stellt ein durch multiple Zellkulturpassagen sehr stark attenuiertes Parapockenvirus dar (Mayr et al., 1981), welches unter natürlichen Bedingungen in immunkompetenten Tieren keine typische ORFV-spezifische Erkrankung (Pustelbildung) mehr hervorrufen kann. Um eine Pustelbildung durch Skarifikation zu ermöglichen, wurden

die Tiere mittels Cyclosporin A (CsA) immunsupprimiert (Haig et al., 1996). Jedem Tier wurde hierzu 25 mg/kg Körpergewicht CsA intra venös (iv) appliziert. Die Applikation des CsA erfolgte dabei über eine für diesen Zeitraum in der Halsvene (Vena jugularis interna, innere Drosselvene) der Tiere gelegte Venenverweilkanüle, die vor und nach der CsA Applikation sorgfältig mit steriler 0,9% NaCl Lösung gespült wurde. Die Applikation erfolgte einen Tag vor und über einen Zeitraum von 6-9 Tagen nach der Infektion im täglichen Rhythmus.

### **3.25.2 Narkose und Infektion von Schafen mit rekombinanten PPV ORFV**

Zur Infektion wurden die Tiere mit 0,1 mg/kg Körpergewicht Rompun (2%) sediert, wobei darauf geachtet wurde, dass die Infektion zeitlich ein paar Stunden versetzt zur CyclosporinA-Gabe erfolgte, um den Kreislauf der Tiere nicht zu stark zu belasten. Vor der Infektion wurden die in Frage kommenden fellfreien Hautflächen an den Schenkelinnenseiten der hinteren Extremitäten gut gesäubert und mit 70% EtOH desinfiziert. Die Infektion der Schafe geschah durch Aufrauen der Hautoberfläche mit einem scharfen Löffel (Skarifikation), vergleichbar mit dem Setzen einer künstlichen Schürfwunde. Die obersten Hautschichten wurden dabei soweit abgetragen, dass die Schicht mit den Keratinocyten möglichst frei lag, jedoch noch keine Blutung entstanden war. In die Skarifikationslinien wurden 0,5–1,0 ml einer Titration der entsprechenden Viren in  $\log_{10}$  Stufen aufgetragen. Parallel wurde ein Skarifikationsfeld, eine großflächige Hautregion infiziert, aus welcher später Stanzbiopsien für eine Reisolation oder immunhistochemische Untersuchungen entnommen werden konnten. Auf diese Weise konnten pro Tier zwei verschiedene Viren, auf gegenüberliegenden Schenkeln vergleichend untersucht werden.

### **3.25.3 Klinische Beurteilung der Infektion**

Die klinische Beurteilung der Infektion erfolgte in Anlehnung an Nettleton et al. (1996). Aufgrund der milden Infektion der D1701-Viren, selbst in immunsupprimierten Schafen war eine Beurteilung klinischer Symptome, wie Erythembildung (differenzierend zu den normalen Wundheilungsprozessen) und Vesikelbildung, kaum bzw. gar nicht möglich. Als Folge wurde lediglich ein erkennbarer Bläschen-/Pusteldurchmesser als Wert für den klinischen Score verwendet. Der klinische Score entspricht somit dem erkennbaren Pusteldurchmesser in mm.



### **3.25.4 Serumgewinnung**

Zur Gewinnung von Serum wurde den Schafen Blut aus der Halsvene (Vena jugularis interna, innere Drosselvene) entnommen. Durch leichtes Verdrehen des Kopfes wurde die Halsvene gestreckt und durch festen Druck des Daumens gestaut. Nach Desinfektion wurde eine Kanüle eingestochen und das Blut in einem sterilen Reagenzglas aufgefangen. Anschließend wurde das Blut ein bis zwei Stunden bei RT inkubiert, die festen Bestandteile abzentrifugiert (20 bis 30 Minuten, 2.000 rpm), das Serum aliquotiert und bei -20°C gelagert.

### **3.25.5 Reisolation von PPV aus Stanzbiopsien**

Zur Reisolation von PPV aus Stanzbiopsien wurden die in -80°C gelagerten Proben in gefrorenem Zustand mit flüssigem Stickstoff in einem Mörser zerrieben und in Zellkulturmedium aufgeschwemmt. Die festen Bestandteile wurden bei 1.300 rpm, 4°C für 5 Minuten abzentrifugiert und der Überstand für eine Virustitration verwendet.

## **3.26 Tierexperimente: Mäuse und Ratten**

### **3.26.1 Narkotisierung von Mäusen und Ratten**

Für eine kurzweilige Narkose wurden die Tiere mit Diethyläther narkotisiert, indem sie einzeln in ein Gefäß mit Diethyläther getränkten Zellstofftüchern gehalten wurden. Sobald die Tiere relaxierten, wurden sie aus dem Gefäß entnommen. Die Narkose hielt wenige Sekunden bis zu ca. 1 Minute an, währenddessen die Tiere immunisiert werden konnten.

Für eine länger anhaltende Narkose wurde den Mäusen eine Mischung aus 2% Ketamin und 2% Rompun (200-300µl/pro Tier) intraperitoneal appliziert.

### **3.26.2 Immunisierung von Mäusen mit rekombinanten ORFV**

Zur Immunisierung mit den unterschiedlichen PPV ORFV-Stämmen wurden die narkotisierten Tiere mit Daumen und Zeigefinger vorsichtig im Nacken ergriffen, mit dem Rücken über die geschlossenen Faust der gleichen Hand gelegt und der Schwanz der Tiere mit dem kleinen Finger fixiert. Durch diese leicht überstreckte Haltung ließen sich die Tiere einfach intraperitoneal (ip) oder intramuskulär (im) in die Oberschenkelmuskulatur immunisieren. Bei der intramuskulären Immunisierung wurde ein Impfvolumen von 50 µl pro Oberschenkel nicht überschritten.

Die Immunisierung von Mäusen mit dem rekombinanten Vaccinia Virus (VVp40) erfolgte durch intravenöse (iv) Applikation. Hierzu wurden die Tiere unter einem Rotlicht erwärmt, um eine Expansion der Schwanzvenen zu erreichen. Waren diese deutlich zu erkennen, wurden die Tiere in einer Röhre fixiert und die Virusdosis (100-200 $\mu$ l) langsam in die Schwanzvene appliziert.

### **3.26.3 Serumgewinnung bei Mäusen**

Den tief narkotisierten Tieren wurde über eine Spritze mittels Herzpunktion das Körperblut entnommen und in ein Z-Gel Probengefäß überführt, welches einen Gerinnungsaktivator enthält. Aus dem geronnenen Blut wurde durch Zentrifugation bei 10.000x g für 5 Minuten Serum gewonnen und bei -20°C gelagert.

### **3.26.4 Immunisierung von Ratten mit rekombinanten ORFV**

Junge Ratten wurden analog der für die Mäuse beschriebenen Prozedur (3.26.2) behandelt. Leicht narkotisierte größere Ratten (ab einem Alter von acht Wochen) wurden vorsichtig auf den Bauch gelegt. Die hinteren Extremitäten waren nach außen abgewinkelt und die Tiere wurden mit einer Hand auf der Unterlage fixiert. Die Immunisierung erfolgte in den Oberschenkel der Tiere. Das zu applizierende Volumen überschritt 200  $\mu$ l pro Oberschenkel nicht.

### **3.26.5 Serumgewinnung bei Ratten**

Zur Gewinnung von Serum wurden die Tiere analog zur iv Applikation von Virus (3.26.2) unter Rotlicht erwärmt und Blut aus der Schwanzvene entnommen. Alternativ konnten narkotisierte Tiere aus dem Retroorbital-Plexus geblutet werden. Hierzu wurde eine Pasteurpipette vorsichtig zwischen Augenlid und Auge gebracht und durch eine sanfte Bewegung von hinten nach vorne auf den Augenhintergrund abgestellt. Durch vorsichtigen Druck und leichtes Drehen der Pipette wurde eine Läsion erzeugt, aus welcher wenige Tropfen Blut aufgefangen wurden. Das Blut wurde unmittelbar in ein Z-Gel Probengefäß überführt, zentrifugiert und bei -20°C gelagert.

### 3.26.6 Analyse der Seren im Enzym-Linked Immunosorbent-Assay (ELISA)

Mit Hilfe der ELISA Technik lassen sich Antikörper oder Antigen quantitativ nachweisen. Um den Serumtiter BDV-spezifischer Antikörper zu bestimmen, wurden 96 Loch-Rundbodenplatten mit BDV-spezifischem Antigen beschichtet. Das BDV-spezifische Antigen wurde aus den Gehirnen infizierter Ratten gewonnen (3.30.1), 1:1000 in ELISA-Beschichtungspuffer verdünnt und 100 µl pro Vertiefung bei 4°C über Nacht inkubiert. Danach wurde die Flüssigkeit aus der Platte ausgeschlagen und freie Bindungsstellen mittels 100 µl PBS-T/0,2% BSA pro Vertiefung während 30 Minuten Inkubation bei 37°C abgesättigt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS-T (PBS/0,05% Tween) wurden die Verdünnungsreihen der Seren, ausgehend von 1:40 bis 1:5120 in PBS-T/0,2% BSA in Duplikaten angelegt. Als Kontrollen wurde auf jeder Platte je ein Nullserum zur Bestimmung des unspezifischen Hintergrundes und ein positives Serum mit bekanntem Titer mitgeführt. Die Platte wurde mit den Serumverdünnungen 1 Stunde bei 37°C inkubiert, nicht gebundene Antikörper anschließend durch dreimaliges Waschen mit PBS-T entfernt. Daran schloss sich eine Inkubation für 45 Minuten bei 37°C mit 100 µl eines 1:1000 in PBS-T/0,2% BSA verdünntem, biotinyliertem anti-Spezies-Antikörper an. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T folgte die Inkubation mit 100 µl einer 1:1000 in PBS-T/0,2% BSA verdünnten Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase bei 37°C für 30 Minuten. Nach abschließendem Waschen mit PBS-T (dreimal) wurden je Vertiefung 80 µl einer ABTS enthaltenden Substratlösung zugegeben. Die enzymatische Umsetzung des Substrates war an der Entstehung eines grünen Farb-Produktes zu erkennen, dessen Adsorption bei 405 nm mit einem Photometer gemessen wurde.

### 3.26.7 Depletion von Immunzellen bei Ratten.

Lewis-Ratten wurde im Alter von 5 Wochen der Thymus chirurgisch entfernt, um die Bildung neuer Thymozyten zu verhindern (Die chirurgischen Arbeiten wurden dankenswerterweise von Prof. Dr. L. Stitz durchgeführt.). In der Peripherie befindliche Thymozyten wurden selektiv durch Applikation von spezifischen monoklonalen Antikörpern neutralisiert. So wurden mittels Ox-38 CD4<sup>+</sup>-Thymozyten und durch Ox-8 CD8<sup>+</sup>-Thymozyten depletiert. Die Gabe von je 2 mg spezifischer mAKs/Tier erfolgte drei und ein Tag vor der ersten Immunisierung. Der Erfolg der Depletion wurde mittels durchflusszytometrischer Untersuchungen der Immunzellen vor Beginn der Immunisierung getestet. Dieser Status wurde vor jeder weiteren Immunisierung, vor der BDV Infektion und zu Versuchsbeginn erneut

bestimmt. Im Fall der Depletion der peripheren CD4<sup>+</sup>-T-Lymphocyten erfolgte vor der Infektion mit BDV eine erneute Gabe von 1 mg Ox-35 mAks/Tier.

### **3.27 Infektion von Ratten mit Borna Disease Virus (BDV)**

Nach Narkotisierung der Ratten (3.26.1) erfolgte die Infektion durch intracraniale (ic) Injektion mit 50 µl ( $5 \times 10^3$  bis  $1 \times 10^4$  ffu) einer Virusverdünnung des Stammes Giessen He/80 BDV 4p (Herzog & Rott, 1980) in den Lobus frontalis der linken Gehirnhemisphäre.

#### **3.27.1 Klinische Beurteilung der Ratten nach BDV-Infektion**

Die klinische Beurteilung der BDV-infizierten Ratten erfolgte täglich im Vergleich zu nicht-infizierter Geschwistertieren, unabhängig von drei verschiedenen Personen. Die klinischen und die BDV-spezifischen Symptome wurden in Abhängigkeit vom allgemeinen Gesundheitszustand und dem Auftreten neurologischer Ausfallserscheinungen nach folgenden Kriterien mit einer Skala von 0 bis 3 beurteilt:

- Stufe 0: ohne Befund
- Stufe 1: leicht gestörtes Allgemeinbefinden, gesträubtes Fell und mangelhafte Fellpflege, leichte Bewegungskoordination, leichter Gewichtsrückgang
- Stufe 2: stark gestörtes Allgemeinbefinden, deutliche Inkoordination und Ataxien, starker Gewichtsrückgang, hohe Schreckhaftigkeit
- Stufe 3: Paresen, Paralysen, z.T. Festliegen der Tiere, moribunder Zustand

Zur individuellen Differenzierung innerhalb der einzelnen Tiere einer Gruppe und zwischen den Gruppen wurden Abstufungen in 0,25 Schritten getroffen.

#### **3.27.2 Gewichtsbestimmung**

Das Gewicht der Tier wurde durch einfaches Wiegen auf einer Haushaltswaage überprüft und tabellarisch festgehalten. Dabei wurde das Körpergewicht der Ratten am Tag der Infektion (Tag Null) gleich 100% gesetzt und die Gewichtsveränderung der Tiere als prozentuale Gewichtsveränderung angegeben. Ein objektiver Vergleich der individuellen Gewichtsverläufe der Tiere war somit möglich.

### **3.28 Präparation von Rattengehirnen**

Zur Präparation des Gehirns wurden die toten Tiere dekaptiert, das Fell vom Schädel präpariert und verbliebenes Gewebe im Bereich des Hinterhauptsloches mit den restlichen Wirbelkörpern entfernt. Die Öffnung der Schädeldecke erfolgte mittels einer kleinen Knochenschere über das Hinterhauptsloch. Die Schnitte wurden entlang der Schädelnähte (Sutura lambdoidea: Lambdanaht; Sutura squamosa: Schuppennaht; Sutura coronalis: Kranznaht) geführt, so dass zuerst das Os occipitale (Hinterhauptbein) und anschließend das Os parietale (Scheitelbein) entfernt werden konnte. Nach dem Entfernen der Meningen wurde der Schädel mit der Öffnung nach unten gedreht und die ventralen Nervenstränge durchtrennt, so dass das Gehirn herausgenommen werden konnte. Das Gehirn wurde für die Herstellung von Homogenaten (3.28.1) und Gefrierschnitten (3.28.6) oder Paraffinschnitten (3.28.8) verwendet.

#### **3.28.1 Herstellung von Hirnhomogenaten**

Zur Herstellung von Hirnhomogenaten wurde stets die linke Gehirnhälfte steril in ein 15 ml Plastikgefäß auf Eis überführt, gewogen und mit entsprechend 9 Volumina BSS aufgefüllt. Anschließend erfolgte die Homogenisierung des Gehirns mittels Ultraschall (Sonifier Cell Disruptor, 50 % Leistung, permanent). Dieses Hirnhomogenat (10%) wurde 15 Minuten bei 3000 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand portionsweise bei -70°C gelagert, bevor es zur Virustitration oder Western Blot Analysen eingesetzt wurde

Analog wurde das BDV-Antigen als Homogenat (10%) des gesamten Gehirns aus Ratten am Tag 20 nach BDV Infektion hergestellt. Es wurde als BDV spezifisches Antigen für die Beschichtung von ELISA-Platten (3.26.6) bzw. als Antigen zur Charakterisierung von Rattenserum im Western Blot (3.24.4) verwendet.

#### **3.28.2 Isolierung von Lymphozyten aus Rattengehirnen**

Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion mit BDV He/80 4p wurde der Thorax der narkotisierten Tiere entlang des Brustbeines eröffnet. Durch Injektion von 50 ml sterilem BSS in die linke Herzkammer, bei gleichzeitiger Durchtrennung der Vena cava erfolgte die Perfusion des Gehirns, wodurch die peripheren Immunzellen ausgespült wurden. Anschließend wurde der Schädel abgetrennt und das Gehirn präpariert (3.28). Durch Passieren des Gehirns durch ein feinmaschiges Edelstahlsieb erhielt man eine Einzelzellsuspension, welche in 25 ml BSS mit 0,05 % Collagenase D, 0,1 µg/ml

Trypsininhibitor Typ I-S, 10 µg/ml DNase I und 0,1 mM Hepes (pH 7,4) aufgenommen wurde. Die Suspension wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend für 30 Minuten stehen gelassen, um verbliebene, größere Zellverbände absinken zu lassen. Danach wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und die Zellen bei 200x g für 5 Minuten abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml/Gehirn PBS-A aufgenommen und je 5 ml dieser Suspension auf ein 10 ml Gradientenmedium (2.15) in einem 50 ml Röhrchen geschichtet. Die Zentrifugation des Gradienten erfolgte für 30 Minuten bei 500x g und 4°C und diente der Aufreinigung der Lymphozyten. Die im Sediment enthaltenen Lymphozyten wurden resuspendiert und zweimal gewaschen (BSS). Anschließend wurden die Zellen in T-Zell-Medium (1 ml/Gehirn) aufgenommen, die Zellzahl bestimmt und auf die gewünschte Konzentration eingestellt.

### **3.28.3 Virustitration von BDV aus Hirnhomogenaten**

Der Nachweis von infektiösem BDV in Gehirnlysaten erfolgte in einer modifizierten Form nach Battegay et al. (1991). Bei diesem Nachweis wurde die Fähigkeit des BDV genutzt, *in vitro* CRL 1405 Zellen (Meerschweinchen-Zellen) zu infizieren.

Die Hirnhomogenate (10%) wurden in einer 96 Loch-Gewebekultur-Flachbodenplatte titriert (1:6 in IMDM mit 10% FCS, Schritte in 100 µl). Anschließend wurden pro Loch 50 µl Zellsuspension ( $1 \times 10^5$  Zellen/ml in IMDM mit 10% FCS) gegeben und die Platten 3-4 Stunden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. In dieser Zeit konnten die Zellen durch BDV infiziert werden und an dem Plattenboden anwachsen. Danach wurden die Zellen mit einer 1:1 Mischung aus 2x DMEM/10% FCS und Methylcellulose (2%) überschichtet, um zu gewährleisten, dass eine Infektion nur über direkten Zell-Zell-Kontakt erfolgen konnte. Nach einer Inkubationszeit von 5 bis 7 Tagen wurden die infizierten Zellen mittels einer immunhistochemischen Färbung (3.28.4) nachgewiesen.

### **3.28.4 Immunhistochemische Färbung BDV-infizierter Zellen**

Soweit nicht anders vermerkt erfolgten alle Inkubationen bei RT und es wurden 100 µl Volumen/Vertiefung der 96-Loch-Gewebekultur-Platte verwendet. Der Medium/Methylcellulose-Overlay wurde durch Ausschlagen entfernt und die Zellen mittels 4% Formalin-Lösung für 30 Minuten fixiert. Anschließend wurde das Formalin verworfen und die Zellen durch PBS/1% Triton-X 100 während 30 Minuten permeabilisiert. Nach einmaligem Waschen der Zellen mit PBS wurden unspezifische Bindungsstellen für 90

Minuten durch PBS/10% FCS abgeblockt. Anschließend wurde die Block-Lösung gegen den Erstantikörper, einem Gemisch monoklonaler BDV-spezifischer Mausantikörper (mAk-4, 1:100 in PBS/1% FCS) ausgetauscht und die Zellen für 1 Stunde inkubiert. Durch dreimaliges Waschen mit PBS wurden nicht gebundene Erstantikörper entfernt. Anschließend erfolgte die Zugabe des Zweitantikörpers (Biotin-markierter Ziege $\alpha$ Maus mAk; 1:1000 in PBS/1% FCS) für 45 Minuten. Nach dreimal Waschen (PBS) wurde für 30 Minuten mit 80  $\mu$ l eines Streptavidin-Meerrettich-Peroxidas-Konjugats (1:1000 in PBS/1% FCS) inkubiert, wiederum dreimal gewaschen (PBS) und pro Vertiefung 80  $\mu$ l OPD-Substrat zugegeben. Die Farbreaktion wurde nach ungefähr 20 Minuten durch Spülen der Platten mit Leitungswasser gestoppt. Die bräunlich gefärbten BDV-infizierten CRL-Zellen ließen sich von den nicht infizierten Zellen gut differenzieren. Einzelne Foci wurden ausgezählt und der Titer nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Titer (log10)/ml} = \log \left( \frac{\text{Anzahl ffu}}{\text{Vol. im Well (ml)}} \times \frac{1}{\text{Verdünnung}} \right)$$

$$\text{Titer (log10)/g Organ} = \log \left( \frac{\text{Anzahl ffu}}{\text{Vol. im Well (ml)}} \times \frac{1}{\text{Verdünnung}} \times \frac{100}{\% \text{ Homogenat}} \right)$$

**ffu = Foci-bildende Einheiten (focus forming units)**

### 3.28.5 Vorbereitung der Rattengehirne für Gefrierschnitte

Das unter 3.28 präparierte Gehirn wurde nach Abtrennen des Cerebellums der Länge nach halbiert und im rechten Winkel zum ersten Schnitt ein etwa 5-7 mm dickes Stück aus dem Bereich des Hippocampus von dorsal nach ventral ausgeschnitten. Mittels einem Gewebekleber (Tissue-Tek O.C.T. Compound, Miles Inc., Napperville, III/USA) wurde es auf ein Korkplättchen geheftet, in Isopentan bei ca. -150°C schockgefroren und bei -70°C gelagert.

### 3.28.6 Herstellung von Gefrierschnitten (Rattengehirn)

Zur Herstellung von Gefrierschnitten wurden die auf dem Kork befestigten Hirnstücke auf einen speziellen Metall-Träger des Kryostaten bei -20°C mittels Tissue-Tek aufgefroren, in die Schneidevorrichtung eingespannt und 5 $\mu$ m dicke Schnitte angefertigt. Diese Schnitte wurden auf einen Objektträger (SuperFrost<sup>TM</sup>, Melzer) aufgebracht und bei -70°C gelagert.

### **3.28.7 Vorbehandlung von Gefrierschnitten**

Nach Lagerung bei  $-70^{\circ}\text{C}$  wurden die Gefrierschnitte aufgetaut und 30 bis 60 Minuten bei RT getrocknet. Anschließend wurden die einzelnen Schnitte mit einem Fettstift (DAKO PEN, Sigma) umrandet und 10 Minuten in 4% PFA (in PBS-A) fixiert. Nach fünfmaligem Waschen für 2 Minuten in PBS unter Bewegen erfolgte die Inaktivierung zellulärer Peroxidasen. Dazu wurden die Präparate zweimal für je 2 Minuten in  $\text{H}_2\text{O}$  bidest, für 1 Minute in 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Methanol (vergällt) und wiederum zweimal in  $\text{H}_2\text{O}$  bidest inkubiert. Zur Verwendung der Präparate in der Immunhistochemie wurden sie nun für eine Stunde bei RT mit TNB geblockt oder direkt mit TNB und verdünntem Erstantikörper inkubiert.

### **3.28.8 Einbetten der Gehirne in Paraffin**

Hierzu wurde das unter 3.28 präparierte Gehirn der Länge nach halbiert und in 4% Paraformaldehyd für 24 Stunden bis Monate fixiert. Anschließend wurde das Gehirn mit Hilfe eines Einbettautomaten (Fa. Technicon Corporation) über eine aufsteigende Alkoholreihe (50%, 70%, 95%, 100%, 100%, Rotihistol und Rotihistol) entwässert und in Paraffin ( $60^{\circ}\text{C}$ ) überführt. Nach weiterer Inkubation in flüssigem Paraffin (12-18 Stunden,  $60^{\circ}\text{C}$ ) wurden die Gehirne einzeln in kleine Paraffinblöcke gegossen. Die Gehirne wurden dabei so eingebettet, dass der innere zentrale Bereich flach an einer Seite des Blockes zu liegen kam. Nach Erkalten des Paraffins wurden die Blöcke bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **3.28.9 Herstellung von Paraffinschnitten (Rattengehirn)**

Die unter 3.28.8 beschriebenen Blöcke wurden in das Mikrotom eingespannt, getrimmt und 3  $\mu\text{m}$  dicke Schnitte hergestellt. Die Schnitte wurden mit der glänzenden Seite auf der Wasseroberfläche eines Wasserbades ( $50^{\circ}\text{C}$ ) geglättet und auf einen Objektträger (SuperFrost<sup>TM</sup>, Melzer) überführt. Auf diese Weise konnten bis zu drei Schnitte auf einem Objektträger platziert werden. Abschließend wurden die Objektträger für 24–72 Stunden bei  $60^{\circ}\text{C}$  im Wärmeschrank schräg gelagert, um überschüssiges Paraffin ablaufen zu lassen. Die Lagerung der fertigen Präparate erfolgte bei  $4^{\circ}\text{C}$ .

### **3.28.10 Vorbehandlung der Paraffinschnitte (Rattengehirn)**

Vor der Immunhistochemie oder in situ Hybridisierung wurden die Schnitte deparaffinisiert und rehydriert. Es folgte zweimaliges Eintauchen für je 15 Minuten in Roticlear und je 5 min



in einer absteigenden Alkoholreihe von 95%, 95%, 85%, 70% und 40% Äthanol (vergällt). Die Präparate wurden während dieser Prozedur alle 2 Minuten leicht bewegt. Die deparaffinisierten Präparate konnten dann in PBS oder TBS-T bei 4°C mehrere Tage aufbewahrt werden. Zur Verwendung der Präparate in der Immunhistochemie wurden die endogenen Peroxidasen, wie unter 3.28.7 beschrieben, inaktiviert.

### 3.29 Immunhistochemische Analysen

Nach Inaktivierung endogener Peroxidasen und blocken der vorbehandelten Gefrierschnitte (3.28.7) oder Paraffinschnitte (3.28.10), konnten immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt werden. Zur Detektion der antigenen Strukturen wurde der „ABC-Kit“ der Firma Vectastain verwendet und je nach Bedarf mit dem TSA-Verstärker-System der Fa. NEN gekoppelt. Wurde das Verstärker-System verwendet, konnte der 1. Antikörper 5-10 mal höher verdünnt werden bzw. wurden schwache Signale um den gleichen Faktor verstärkt. Als Blockmedium zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen und für alle Antikörperverdünnung wurde der TNB-Puffer (0,5% Block Reagenz Fa. NEN; 0,1 M Tris-HCl pH 7,5; 0,15 M NaCl) verwendet. Als Waschpuffer diente TBS-T (0,1 M Tris-HCl pH 7,5; 0,15 M NaCl; 0,05% Tween-20). Die fertigen *in situ* Präparate (3.30.4) wurden vor der immunhistochemischen Analyse zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen erneut geblockt. Nach dem Block unspezifischer Bindungsstellen (TNB, 30-60 Minuten, RT) wurde das TNB abgekippt, die Schnitte unverzüglich mit 300µl/Objekträger oder 100 µl/Schnitt der Erstantikörperverdünnung überschichtet und bei 4°C über Nacht oder bei 37°C für 1 Stunde (Tabelle 3.29) inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen für je 2 Minuten in TBS-T wurde mit dem biotinylierten Zweitantikörper (1:500 mit 1,5% spezies-spezifischem Nullserum des Zweitantikörpers) 45-60 Minuten bei RT inkubiert. Auf erneutes Waschen (fünfmal) folgte die Inkubation mit dem ABC-Komplex für weitere 30 Minuten bei RT, wie vom Hersteller empfohlen. Durch fünfmaliges Waschen wurden nicht gebundene Komplexe entfernt und die Antikörperreaktionen konnten mit dem DAB-Substrat (Fa. NEN) während der folgenden 10-30 Minuten nachgewiesen und letztlich mit H<sub>2</sub>O bidest gestoppt werden. Alternativ konnte vor der Substratreaktion noch eine Signalverstärkung eingebaut werden, indem die ABC-Komplexe durch biotinylierte Tyramide (1:50 in Biotin-Tyramid-Amplifikationslösung, 5 Minuten RT) überschichtet wurden. Nach Waschen (5 mal) und Detektion der ABC/Tyramid-Komplexe (SA-HRP, 1:200 in TNB für 30 Minuten bei RT) schloss sich die bereits erwähnte Substratreaktion an.

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die verwendeten 1. Antikörper:

I. Antikörper	Verdünnung	Temperatur	Zeit	Verstärker	Kryo	Paraffin
38/17C1 ( $\alpha$ p40)	1:1000	4°C	o/n	nein	+	+
38/17C1 ( $\alpha$ p40)	1:1000	37°C	1 h	nein	+	+
38/17C1 ( $\alpha$ p40)	1:3000	4°C	o/n	ja	+	+
Ox-22 ( $\alpha$ CD45RC)	1:200	4°C	o/n	ja	+	+
Ox-8 ( $\alpha$ CD8)	1:1000	4°C	o/n	ja	+	+
$\alpha$ ratIgG	1:1000	4°C	o/n	ja	nd	+
4D9 ( $\alpha$ 42K)	1:100	RT/4°C	1 h / o/n	nein	Zellen	Zellen

**Tab. 3.29: Antikörperverdünnungen. +: erfolgreich; -: nicht erfolgreich; o/n: über Nacht; nd: not done – nicht gemacht; Zellen, wurde nur an fixierten Zellen verwendet.**

### 3.29.1 Haematoxilin-färbung, Einbetten und Konservieren von Präparate

Um die Zellkerne in den Gewebestrukturen hervorzuheben, wurden die Präparate nach IHC und/oder der *in situ* Hybridisierung mittels Haematoxilin angefärbt. Hierzu wurden die Schnitte in H<sub>2</sub>O bidest für zweimal 3 Minuten inkubiert, um zweiwertige Metallionen zu entfernen, anschließend 1 Minute in Haematoxilin gefärbt, erneut in H<sub>2</sub>O bidest geschwenkt und danach 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser (enthält die dafür notwendigen Metallionen) entwickelt. Nach Stopp der Reaktion durch H<sub>2</sub>O bidest wurden die Präparate durch eine aufsteigende Alkoholreihe (50%, 70%, 95%, 100%, 100%, Rotihistol, Rotihistol) dehydriert und mittels Entellan permanent eingebettet. Nach einer Trockenzeit von 24 Stunden konnten die Präparate im Mikroskop ausgewertet werden.

### 3.30 *In situ* Hybridisierung mit Digoxigenin-markierter cRNA

Die *in situ* Hybridisierung ist ein Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren in Gewebeschnitten. Es können sowohl Gefrier-, als auch Paraffinschnitte verwendet werden. Zum RNA-Nachweis mittels *in situ* Hybridisierung wurden alle im weiteren Verlauf genannten Lösungen in DEPC-H<sub>2</sub>O angesetzt.

Gefrierschnitte wurden im Anschluss an die Nachfixierung und Inaktivierung interner Peroxidasen (3.28.7) zweimal für 5 Minuten in PBS-A gewaschen, anschließend für 10 Minuten in 0,1 M HCl bei RT inkubiert und erneut 3 mal in PBS-A gewaschen. Die Acetylierung erfolgte durch 5 Minuten Inkubation in 0,1 M TEA und anschließender tropfenweiser Zugabe von 625  $\mu$ l Essigsäureanhydrid und weiterer Inkubation für 20 Minuten

in leicht bewegter Lösung (Magnetrührer). Nach dreimaligem Waschen mit PBS waren die Präparate zur Prähybridisierung vorbereitet.

Um die Paraffinschnitte in der *in situ* Hybridisierung einzusetzen, erfolgte unmittelbar nach der Alkoholreihe ein fünfminütige Inkubation in DEPC-H<sub>2</sub>O, eine Nachfixierung mit 4% PFA für 10 Minuten, gefolgt von dreimaligem Waschen in PBS (je 5 Minuten), Inkubation für 10 Minuten in 0,1 M HCl, waschen und fünfminütiger Inkubation in DEPC-H<sub>2</sub>O. Anschließend wurden die Schnitte für 5 Minuten in 20 mM Tris-HCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4 äquilibriert und weiter in dem gleichen Puffer, dem zusätzlich 10µg/ml Proteinase K zugesetzt war, für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Daran schlossen sich wieder drei Waschschritte und eine Nachfixierung an. Die Acetylierung erfolgte wie für die Gefrierschnitte beschrieben. Danach konnten die Präparate ebenfalls prähybridisiert werden.

### **3.30.1 Prähybridisierung**

Zur Prähybridisierung wurde jeder Schnitt mit 100 µl Prähybridisierungslösung bedeckt und 4 Stunden bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Kammer wurde mit einer Mischung aus 5x SSC und Formamid (1:1) angefeuchtet.

### **3.30.2 Herstellung Digoxigenin-markierter cRNA**

Digoxigenin-markierte RNA wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Dr. Planz zur Verfügung gestellt. Daher nur kurz zum Prinzip: Die Herstellung erfolgte mittels dem SP6/T7 Transkriptionskit der Fa. Roche Applied Sciences und der Erfolg des Einbaus von Digoxigenin-markierten Nukleotiden in die cRNA wurde in einer Dot Blot Hybridisierung überprüft.

### **3.30.3 Hybridisierung von cRNA auf Gehirnschnitte**

Zur Hybridisierung wurde die Digoxigenin-markierte cRNA auf 25 ng/ml in Prähybridisierungs-Lösung eingestellt und die benötigte Menge 5 Minuten bei 85°C denaturiert und anschließend schnell auf Eis abgekühlt. Die Prähybridisierungslösung wurde vorsichtig abgeklopft und 5 – 10 µl der Hybridisierungslösung auf die Schnitte gegeben. Nach Abdecken der Schnitte mit der hydrophoben Seite eines Gel Bond-Films, wurden die Präparate in die feuchte Kammer (3.30.1) überführt. Die feuchte Kammer wurde im

Wasserbad auf 85°C für 15 Minuten erwärmt und anschließend auf die Inkubationstemperatur von 65°C gebracht und über Nacht inkubiert. Ein Zelt aus Aluminiumfolie verhinderte ein Betropfen der Präparate mit Kondenswasser. Nach der Hybridisierung wurden die Präparate bei 65°C zuerst für 5 Minuten in 5x SSC gewaschen (Gel-Bond-Film löst sich), dann 1 Stunde in 0,2x SSC inkubiert und anschließend in frischem 0,2x SSC auf RT abgekühlt. Es folgte die Detektion der Digoxigenin-markierten cRNA.

#### **3.30.4 Detektion Digoxigenin-markierten cRNA**

Nach dem Waschen wurden die Präparate 5 Minuten in B1-Puffer äquilibriert und anschließend unspezifische Bindungsmöglichkeiten durch den Puffer B2 für 1 Stunde abgeblockt. Danach wurde der Puffer B2 gegen Puffer B2 mit dem 1:500 verdünntem antiDig Fab-Fragment Antikörper (gekoppelt mit alkalischer Phosphatase) ausgetauscht und eine weitere Stunde inkubiert (100 µl/Schnitt). Nicht gebundene Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen mit Puffer B1 entfernt. Daran schloss sich eine fünfminütige Inkubation in Puffer B3 an, gefolgt von 4-72 Stunden Inkubation in der B3-Färbelösung. Die Färbereaktion wurde durch Schwenken der Objektträger in Puffer B4 gestoppt. Im weiteren Verlauf konnten die Präparate entweder mit Haematoxilin gefärbt und Entellan eingebettet werden oder nach Inaktivierung endogener Peroxidasen und blocken unspezifischer Antikörperbindungsstellen für immunhistochemische Analysen (3.29) eingesetzt werden. Wurden immunhistochemische Anlysen mit der *in situ* Hybridisierung kombiniert, wurde stets mit der *in situ* Hybridisierung begonnen.

#### **3.31 Durchflusszytometrie**

Bei der Durchflusszytometrie werden in Suspension befindliche Zellen an einem fokussiertem Laserstrahl vorbeigeleitet. In Abhängigkeit vom Typ und der Art der Aufbereitung senden die Zellen durch den Laser angeregt charakteristische Lichtsignale aus, die von den Detektoren aufgenommen werden. Die Zellen lassen sich bezüglich ihrer Größe, ihrer Granulierung, sowie aufgrund intra- und extrazellulär exprimierten antigenen Strukturen charakterisieren. Auf diese Weise erfolgte in dieser Arbeit die Charakterisierung frisch isolierter Lymphozyten aus Blut und aus den poplietalen Lymphknoten. Dazu wurde ein FACScan Gerät der Firma Becton Dickinson, Heidelberg, verwendet und die Daten mit Hilfe des Programms „Cellquest“ an einem Computer ausgewertet.

### **3.31.1 Isolierung von Lymphozyten aus lymphatischen Organen (Ratte)**

Zur Entnahme der Milz wurde das Fell der getöteten Ratten im Bereich des Organ flach eingeschnitten und von der Muskulatur abpräpariert. Im Bereich des Abdomen erfolgte mittels einer kleinen Schere ein flacher Schnitt von ventral nach dorsal, über die linke Körperhälfte hinweg. Die Milz wurde freipräpariert und entnommen. Die poplietalen Lymphknoten wurden nach Durchtrennen des Oberschenkelbeugers aus dem Bereich der Kniekehle isoliert. Eine Verreibung der Organe durch ein feinmaschiges Edelstahlsieb erzeugte eine Einzelzellsuspension, welche in BSS aufgenommen wurde. Kurze Zentrifugation (30 Sekunden bei 4°C und 500x g) ermöglichte das Absaugen größerer Zelltrümmer mittels Pasteurpipette. Anschließend wurden die Zellen mit BSS gewaschen (Zentrifugation bei 4°C, 500x g für 5 Minuten), die Zellzahl bestimmt und in gewünschter Konzentration im T-Zell-Medium oder FACS-Puffer aufgenommen.

### **3.31.2 Phänotypische Charakterisierung von Zellen anhand von Oberflächenantigenen**

Zur Charakterisierung von Zellen wurden Antikörper verwendet, die gegen spezifische Oberflächenantigene gerichtet waren und mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE) oder Cytochrom (Cy-Chrom) gekoppelt waren.

Die zu untersuchenden Zellen wurden als Einzelzellsuspension in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen /100  $\mu$ l FACS-Puffer (PBS-A mit 3% FCS) resuspendiert und mit den entsprechenden Antikörpern für 25 Minuten auf Eis inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden durch zweimalige Zentrifugation mit FACS-Puffer bei 500x g für 5 Minuten (4°C) entfernt, die Zellen in 300 $\mu$ l FACS-Puffer aufgenommen, durch ein sehr feinmaschiges Edelstahlnetz pipettiert und im FACS-Gerät analysiert. Zur Analyse wurden 10.000 Einzelereignisse aufgenommen und ausgewertet.

### **3.31.3 Charakterisierung von T-Zellen im Rattenblut**

Die Charakterisierung peripherer T-Zellen erfolgte aus 100  $\mu$ l EDTA-Blut durch Zugabe der entsprechenden Antikörpern und Inkubation für 25 Minuten auf Eis. Danach wurde jedem Ansatz 2 ml gebrauchsfertige FACS-Lyselösung (Fa. Becton Dickinson) zugegeben und für weitere 10 Minuten bzw. bis die Lösung klar erschien, bei RT inkubiert. Die Entfernung nicht gebundener Antikörper bis zur Analyse im Durchflusszytometer verlief analog zu 3.28.2.

### **3.32 Nachweis spezifischer zellulärer Immunzellen (Zytotoxizitätstest)**

Mit Hilfe dieser Methode konnte die spezifische funktionelle Aktivität von T-Lymphozyten nachgewiesen werden. Zytotoxische T-Zellen wurden mit radioaktiv markierten, syngenen Zielzellen ko-inkubiert. Dabei war die Menge des aus den Zielzellen freigesetzten  $^{51}\text{Cr}$  proportional der Anzahl der lysierten Zellen (Brunner et al., 1968). Es wurden frisch isolierte Lymphozyten aus den Gehirnen oder den lymphatischen Organen von Lewis Ratten, Balb/c oder C57/Bl6 Mäusen als Effektoren eingesetzt. Bei den Zielzellen handelte es sich um  $^{51}\text{Cr}$ -markierte VVp40-, D1701-V-, D1701-VrVp40-infizierte Zellen. Weiterhin wurden nicht infizierte, Peptid-beladene (nur bei der Ratte) syngene Zellen oder Yac-Zellen zum Nachweis von NK-Zellen eingesetzt. Effektor- und Zielzellen wurden in unterschiedlichen Verhältnissen (3.32.3) miteinander inkubiert.

#### **3.32.1 Vorbereitung der Effektorzellen**

Die frisch isolierten und aufgereinigten Lymphozyten (3.28.2 oder 3.31.1) wurden soweit nicht anders vermerkt auf  $1 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt. Anschließend wurde mit ihnen in zwei unabhängigen Ansätzen eine Verdünnungsreihe in 1:3 Schritten über vier Stufen in einer Mikrotiterplatte (100  $\mu\text{l}$ /Vertiefung) durchgeführt. Dies diente als Grundlage für die Inkubation mit den Zielzellen in unterschiedlichen zellulären Verhältnissen. Für die Titration wurde das Kulturmedium der entsprechenden Zielzellen verwendet.

#### **3.32.2 Markierung der Zielzellen**

Die Markierung der Zielzellen erfolgte durch Inkubation mit 0,2 mCi  $^{51}\text{Cr}$  bei 37°C für 1 Stunde. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit Medium (BSS/2% FCS) gewaschen, um im Überstand vorliegendes, von den Zellen nicht inkorporiertes  $^{51}\text{Cr}$  zu entfernen. Parallel zur  $^{51}\text{Cr}$ -Markierung konnte eine Infektion der Zielzellen mit entsprechenden Viren (moi von 1,0 bis 5,0) bzw. eine Beladung mit dem synthetischem Peptid ASYAQMTTY (Planz et al., 2001; entspricht dem Peptid 9045,  $1 \mu\text{g}/2 \times 10^6$  Zellen) erfolgen. Nach Inkubation von einer Stunde wurden die Zellen dreimal mit Zellkulturmedium gewaschen und in einer Konzentration von  $10^5$  Zellen/ml Zellkulturmedium aufgenommen.

### 3.32.3 Zytotoxizitätstest

Nach Zugabe von  $1 \times 10^4$  Zielzellen in  $100 \mu\text{l}$  zu den Effektorzell-Verdünnungen (3.32.1), wurden Effektoren und Zielzellen durch Zentrifugation für 3 Minuten bei  $400 \times g$  miteinander in Kontakt gebracht. Während der folgenden 5 Stunden (Maus) bzw. 10 Stunden (Ratte) konnten die spezifischen T-Lymphozyten die syngenen Zielzellen lysieren. Zur Kontrolle der spontanen Freisetzung aus markierten Zellen wurden markierte Zellen ohne Effektoren über den selben Zeitraum inkubiert und ein anderer Teil mittels  $1 \text{ N HCl}$  zur vollständigen Lyse gebracht, um die maximal mögliche Freisetzung (100%) zu bestimmen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden  $50 \mu\text{l}$  Zellkulturüberstand eines jeden Ansatzes in ein Zählröhrchen überführt und das in den Zellkulturüberstand freigesetzte  $^{51}\text{Cr}$  in einem Messgerät für Gammastrahlen gemessen. Die spezifische Lyse errechnete sich dabei nach folgender Formel:

$$(\text{cpm Effektor} - \text{cpm Medium}) : (\text{cpm Maximal} - \text{cpm Medium}) \times 100 = \% \text{ spezifische Lyse}$$

cpm Effektor: counts pro Minute (cpm) im Ansatz mit den zu testenden Lymphozyten; cpm Medium: spontane Freisetzung markierter Zellen; cpm Maximal: maximal mögliche Freisetzung nach Lyse durch  $1 \text{ N HCl}$ .

Da die Ausbeute bei der Isolierung von Effektoren aus Organen oder Blut unterschiedlich erfolgreich war, variierten die Ausgangsverhältnisse zwischen Effektor- und Zielzellen. Das Ausgangsverhältnis zwischen Effektoren und Zielzellen lag bei Effektoren aus der Milz bei 100:1, bei Effektoren aus Lymphknoten und Gehirnlymphozyten bei 30:1.

## 4 Ergebnisse

Teil A

### 4.1 Selektion von D1701-VrV

Bei ersten Arbeiten zur Herstellung eines rekombinanten, vegf-e-negativen PPV ORFV D1701 wurde das bakterielle  $\beta$ -Galaktosidase Gen (*lacZ*) von *E. coli* an Stelle des deletierten vegf-e Gens inseriert. Die Selektion über den Nachweis der *lacZ* Expression (Blaufärbung) führte nicht zu einer homogenen Population, weshalb die Insertion eines zweiten Selektionsmarkers, dem Xanthin-Guanosin Phosphoribosyltransferase Gens (*xgpt*) von *E. coli* erfolgte. Dadurch konnte ein Selektivmedium verwendet werden, welchem Aminopterin, Mycophenolsäure und Xanthin zugesetzt waren. Aminopterin und Mycophenolsäure blockieren die de novo Purinnukleotidsynthese, wodurch die Replikation der Zellen, als auch der Wildtypviren gehemmt wird. Die bakterielle Phosphoribosyltransferase ist hingegen in der Lage, Xanthin als Substrat zur Purinnukleotidsynthese in ausreichendem Maße zu nutzen. Rekombinante *xgpt*-positive Viren vermitteln der Zelle und damit sich selbst einen Wachstumsvorteil. Der Anteil *xgpt*-negativer Wildtypviren kann somit um den Faktor 1000 reduziert werden. Die Konzentration der Mycophenolsäure musste dabei für jede Zelle bestimmt werden, da eine zu hohe Konzentration toxisch für die gesamte Zellkultur ist (siehe 2.4). Diese Strategie wurde schon erfolgreich zur Selektion rekombinanter Vaccinia Viren eingesetzt (Falkner & Moss, 1988, Boyle & Coupar, 1988). Durch die Kombination der beiden bakteriellen Selektionsmarker (*lacZ* und *xgpt*) und Verwendung geeigneter Selektionsbedingungen war es gelungen, eine homogene Population *lacZ*-exprimierender Virusnachkommen zu erhalten (Henkel, 1997). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden aus dieser Population von *lacZ*<sup>+</sup>/*xgpt*<sup>+</sup>/*vegf-e*<sup>-</sup> Viren nach vier Plaquereinigungen verschiedene *lacZ*<sup>+</sup>/*xgpt*<sup>+</sup>/*vegf-e*<sup>-</sup> ORFV isoliert, deren DNA gewonnen und eine molekulare Charakterisierung durchgeführt.

Zur Selektion wurden stets Vero-Zellen verwendet, die 2 Tage im Selektivmedium vorinkubiert worden waren. Bei längeren Inkubationen, wie der Zwischenvermehrung von Einzelplaques, wurde das Selektivmedium alle 2 Tage erneuert. Nach vier Runden der Plaquereinigung erfolgte die Vermehrung und Passagierung einzelner Rekombinanten ohne Selektivmedium. Alle resultierenden Viren waren in der Lage das Substrat Bluo-Gal in einen blauen Indigofarbstoff umzusetzen, was den ersten Hinweis darauf gab, dass die Rekombinanten auch unter nicht selektiven Bedingungen stabil waren (nicht gezeigt). Die



beschriebenen  $lacZ^+/xgpt^+/vegf-e^-$  Rekombinanten wurden in Vero-Zellen hergestellt und erhielten die Bezeichnung: **D1701-VrV** (Vero adaptiert, rekombinant im *vegf-e* Genlokus).

## 4.2 Herstellung und Selektion von D1701-VrVres

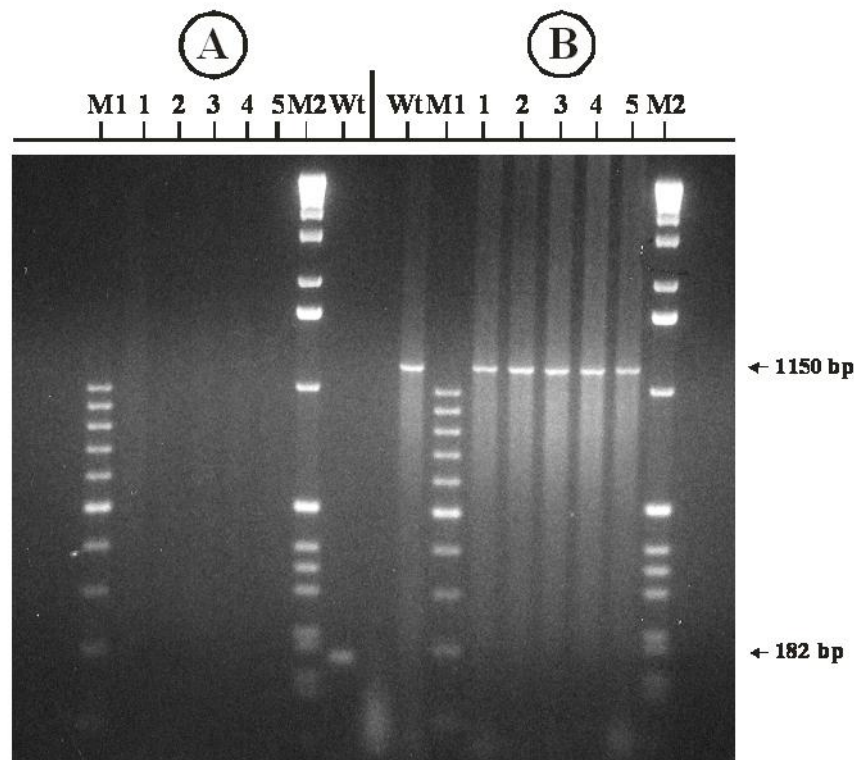
Bei der Herstellung der Revertanten D1701-VrVres wurde nach dem gleichen Prinzip verfahren wie bei der Konstruktion der Rekombinanten D1701-VrV (Henkel, 1997). Durch liposomalen Transfer des Plasmids pORF-PA (Abb. 4.3.2E) in D1701-VrV infizierte Zellen erfolgte nach homologer Rekombination zwischen Plasmid und viralem Genom der Austausch der Gene *lacZ* und *Xgpt* von *E. coli* gegen das originäre ORFV *vegf-e* Gen.

Die Selektion der Revertanten geschah ebenfalls auf Vero Zellen unter Verwendung der blau/weiß Selektion ohne MPA Selektionsdruck. Jedoch wurden die Zellkulturüberstände von Einzelplaques über Southern Blot Hybridisierung auf die Anwesenheit der *lacZ/xgpt* Gene bzw. des *vegf-e* Gens untersucht. Weiße  $lacZ^-/xgpt^-/vegf^+$  Revertanten wurden nach Plaquereinigung über vier Runden angezogen, deren DNA isoliert und molekular charakterisiert (siehe 4.3). In Analogie zur Rekombinanten D1701-VrV erhielt die Revertante die Bezeichnung **D1701-VrVres**.

## 4.3 Charakterisierung von D1701-VrV und D1701-VrVres *in vitro*

### 4.3.1 Überprüfung der Rekombinanten/Revertanten durch PCR

Als Nachweis für die erfolgreiche Deletion des *vegf-e* Gens in den D1701-VrV Rekombinanten bzw. seiner Reinsertion in die Revertanten D1701VrVres, wurden die entsprechenden viralen DNAs als Matrizen („Templates“) für eine *vegf-e*-spezifische PCR genutzt. Die für die PCR verwendeten, synthetischen Primer ORF15 und ORF26 (siehe 2.3.1) lagen innerhalb der Deletion des *vegf-e* Gens von D1701. Im Falle der erfolgreichen Deletion konnte es somit nicht zur Produktion eines spezifischen 182 bp großen Amplifikates kommen (Abb. 4.3.1A, Spuren 1 bis 5), das mit parentaler Virus-DNA erhalten wurde (Abb. 4.3.1A, Spur WT).



**Abb. 4.3.1: Vegf-e und 42K PCR mit viralen DNAs als Matrizen. A: vegf-e spezifische PCR mit den synthetischen Primern ORF15 und ORF26. Die DNAs der verschiedenen Virusklone (Spuren 1-5) führten nicht zur Amplifikation des 182 bp großen vegf-e spezifischen Produktes, das mit parentaler Virus-DNA (Spur WT) auftrat. B: 42K Kontroll-PCR mit den gleichen viralen DNAs unter Verwendung der synthetischen Oligonukleotiden 42KE3' und 42KB5' (siehe Material 2.3.1). Mit den Matrizen der rekombinanten Virusklone (Spuren 1.5) wurde das gleiche Ergebnis erhalten, wie mit der WT Virus-DNA (Spur WT). Die Qualität aller getesteten DNAs war somit vergleichbar.**

Zur Kontrolle wurde die Qualität der template-DNAs in einer zweiten PCR durch Amplifikation eines 1150 bp großen Fragments des 42K Gens überprüft, welches für das Haupthüllprotein von ORFV kodiert (Sullivan et al., 1994). Wie in der Abbildung 4.3.1B zu erkennen ist, kam es in allen Fällen (Spuren 1-5 und WT) zu einer vergleichbaren Amplifikation des spezifischen 1150 bp großen PCR-Produktes. Zusätzlich wurde nach Transfer der DNA auf eine Nylonmembran mit einer  $^{32}\text{P}$ -markiertem, vegf-e-spezifischen Sonde hybridisiert, um die Sensitivität dieses Nachweisverfahrens zu erhöhen. Das Ergebnis zeigte in zwei von fünf Fällen ein sehr schwaches, jedoch vegf-e-spezifisches Signal für zwei der fünf getesteten rekombinanten Virusklone, welche anschließend verworfen wurden (nicht gezeigt). Als Ursache für die Signale lässt sich entweder eine nicht homogene Population von rekombinanten Viren oder die Deletion von nur einem der beiden vegf-e Gene im Genom von D1701 vermuten. Analog wurde mit D1701-VrVres verfahren. Hier war die PCR, wie im Fall der parentalen Kontroll-DNA positiv für die spezifische Amplifikation eines 182 bp großen

Fragmentes und auch die 42K Kontroll-PCR zeigte eine vergleichbare Qualität zwischen den DNAs (nicht gezeigt).

#### 4.3.2 Southern Blot Hybridisierung: D1701-V, D1701-VrV und D1701-VrVres

Zur Überprüfung der korrekten Insertion der Markergen-Kassette (3,86 kbp) in D1701-VrV bzw. deren vollständiger Elimination in D1701-VrVres wurden die entsprechenden viralen DNAs mit den Restriktionsendonukleasen *Hind*III, *Eco*RI, *Bam*HI und *Kpn*I verdaut. Nach Auftrennung der Fragmente im Ethidiumbromid-gefärbten Gel und Transfer auf eine Nylonmembran, wurde eine Southern Blot Hybridisierung durchgeführt. Eine <sup>32</sup>P-markierte, vegf-e-spezifische Sonde (Abb. 4.3.2D, schraffiert) detektierte bei D1701-V und D1701-VrVres die Fragmente *Hind*III H/H', *Eco*RI C/C', *Bam*HI A und C und *Kpn*I F/F' (Abb. 4.3.2A), welche die vegf-e kodierenden Sequenzen enthalten. Im Gegensatz dazu wurde mit der D1701-VrV DNA kein Hybridisierungssignal erhalten. Wie erwartet, wurden mit der <sup>32</sup>P-markierten lacZ-spezifischen Sonde von D1701-V bzw. D1701-VrVres keine Hybridisierungssignale erhalten (Abb. 4.3.2B), sondern nur mit D1701-VrV. Die Insertion der lacZ/xgpt Kassette führte je eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle der genannten vier Enzyme ein (Abb. 4.3.2D, unterstrichene Enzyme). Dies hatte zur Folge, dass an die Stelle der ursprünglichen DNA Fragmente *Hind*III H/H', *Eco*RI C/C', *Bam*HI A und C und *Kpn*I F/F' die neuen Fragmente *Hind*III H1/H1' (5,7 kbp) H2/H2' (3,5 kbp), *Eco*RI C1/C1' (12,1 kbp) C2/C2' (6,6 kbp), *Bam*HI A1 (52,0 kbp) und A2 (2,8 kbp), C1 (20,0 kbp) und C2 (2,8 kbp) und *Kpn*I F1/F1' (11,8 kbp) und F/F'. (3,1 kbp) traten. Die Hybridisierung mit der lacZ-spezifischen Sonde detektierte jedoch nur eines der zwei neuen DNA-Fragmente von D1701-VrV. Beide neuen Fragmente wurden detektiert, wenn das komplette *Hind*III Fragment H (pDH-H1, Abb. 4.3.2D) des parentalen D1701-V verwendet wurde (Abb. 4.3.2C). Im Gegensatz dazu zeigten die DNAs des parentalen D1701-V und der Revertanten D1701-VrVres wie erwartet ein identisches Restriktionsspalt- und Hybridisierungsmuster (Abb. 4.3.1A und C). Zusammenfassend kann man sagen, dass die Southern Blot Ergebnisse die erfolgreiche Deletion beider Kopien des vegf-e Gens, sowie die korrekte Insertion der Markergen-Kassette in D1701-VrV, als auch die erfolgreiche und korrekte Re-Insertion des vegf-e Gens in D1701-VrVres zeigten. Des weiteren ist die Homogenität der einzelnen Populationen gezeigt, da es zu keiner Hybridisierung der lacZ-spezifischen Sonde mit der Revertanten D1701-VrVres kam und ein Hybridisierungssignal mit einer vegf-e-spezifischen Sonde bei D1701-VrV fehlte.

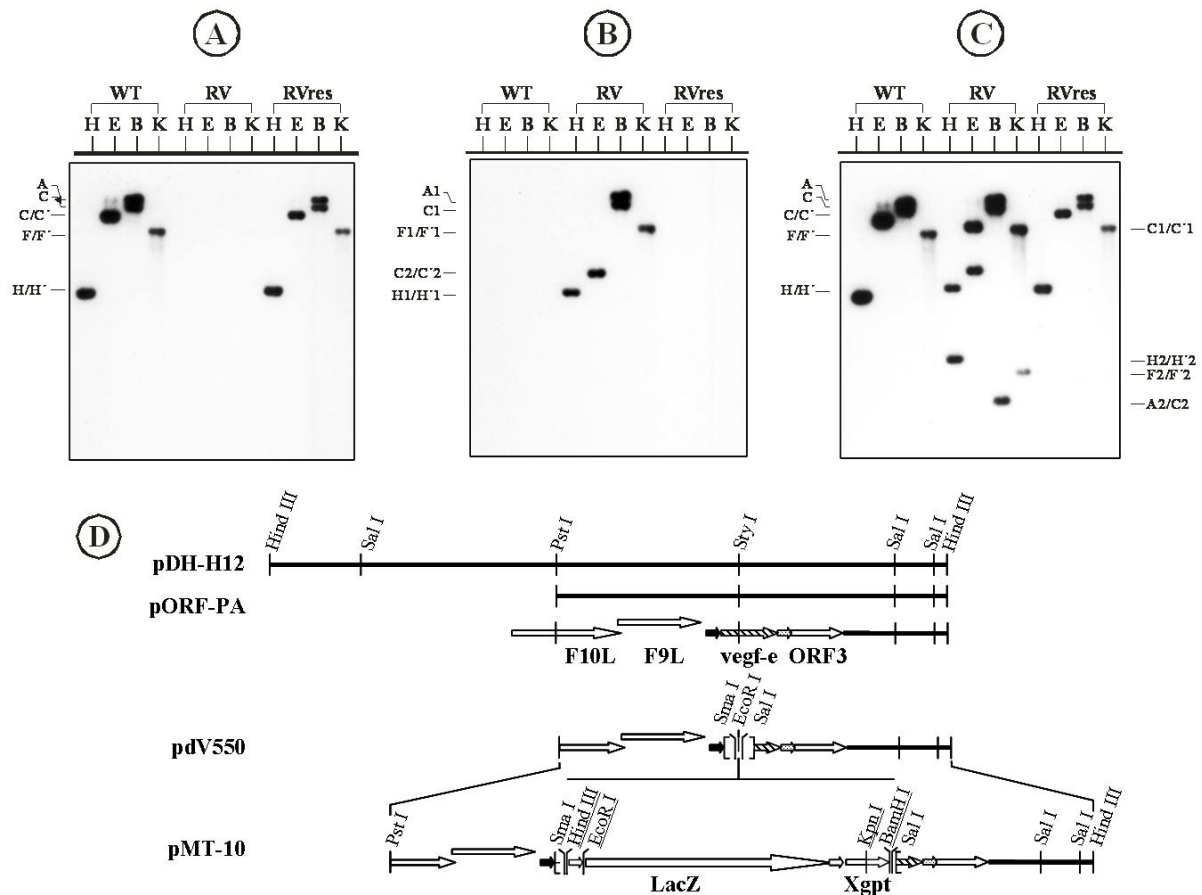
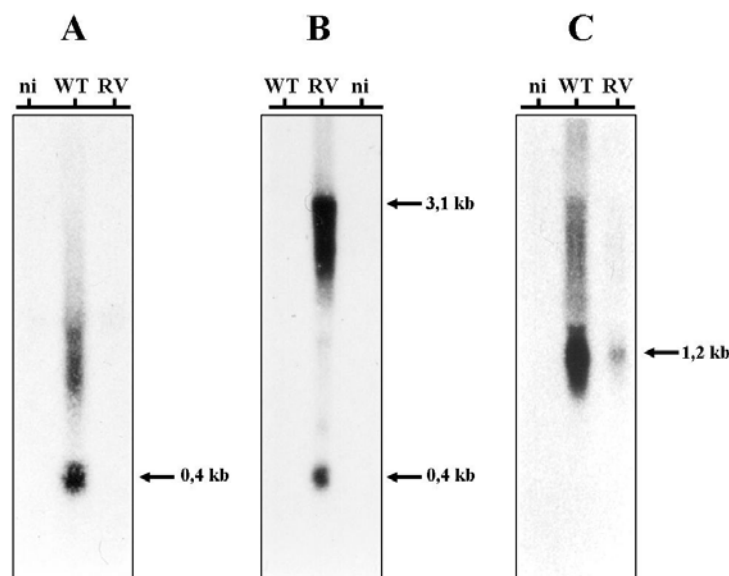


Abb. 4.3.2: Charakterisierung von D1701-V, -VrV und -VrVres durch Southern Blot Hybridisierung. Virale DNA von D1701-V, -VrV und -VrVres wurde mit den Restriktionsendonukleasen *HindIII*, *EcoRI*, *BamHI* und *KpnI* verdaut und im 0,7% EtBr-Agarosegel aufgetrennt. Nach Transfer der Fragmente wurde der Filter nacheinander mit  $^{32}\text{P}$ -markierten, spezifischen Sonden hybridisiert. A: Vegf-e-spezifische Sonde, B: LacZ-spezifische Sonde, C: pDH-H1 spezifische Sonde. Die entsprechenden Fragmente sind im Text genauer beschrieben. D: Darstellung der verwendeten Sonden (pDH-H1; vegf-e, schraffiert, lacZ/xgpt aus pMT10), sowie schematisch die Herstellung von pMT10 aus pV550 (Henkel, 1997). Unterstrichen sind die neu eingeführten Schnittstellen der Enzyme *HindIII*, *EcoRI*, *BamHI* und *KpnI* bei D1701-VrV.

### 4.3.3 Northern Blot Hybridisierung: D1701-V und D1701-VrV

Zur Gewinnung von Gesamtzell-RNA wurden Vero-Zellen mit einer MOI von 10,0 infiziert und 24 Stunden bzw. bei Anwesenheit von Cycloheximid zur Anreicherung früher Transkripte 12 Stunden nach der Infektion (p.i.) Gesamtzell-RNA mittels Trizol aus D1701-V oder D1701-VrV infizierten Zellen isoliert. Nach Auftrennung der RNAs im Northern Gel (3.21) und Transfer auf eine Nylonmembran (3.21) erfolgte eine Hybridisierung mit  $^{32}\text{P}$ -markierten DNA-Sonden. Vegf-e-spezifische Transkripte mit einer Größe von ca. 0,4 kb konnten nur im Fall von D1701-V infizierten Zellen nachgewiesen werden (Abb. 4.3.3A,

WT) und nicht nach Infektion mit D1701-VrV (Abb. 4.3.3A, RV). Das  $^{32}\text{P}$ -markierte *NotI* Fragment aus pZgpt-a (3,86 kbp, Material 2.3), das die bakteriellen Gene für lacZ und xgpt enthält, reagiert dagegen mit den lacZ- und xgpt-spezifischen Transkripten in D1701-VrV infizierten Zellen. Die Transkripte für das lacZ Gen besaßen eine Größe von ca. 3,1 kb, die für das xgpt-Gen eine Größe von ca. 0,4 kb (Abb. 4.3.3B). Da die lacZ und xgpt Gene unter der Kontrolle des starken, synthetischen early/late Promoters eP1 stehen (Pfleiderer et al., 1995), konnte mRNA zu frühen (Abb. 4.3.3B) und zu späten Zeitpunkten nach der Infektion nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Als Test einer vergleichbaren Infektion der Zellen mit D1701-V bzw. D1701-VrV wurden die RNAs mit dem  $^{32}\text{P}$ -markiertem 42K PCR-Produkt hybridisiert. Die Sonde zeigte in beiden Fällen die spezifischen späten Transkripte des Haupthüllproteins von ORFV mit einer Größe von ca. 1,2 kb (Abb. 4.3.3C).



**Abb. 4.3.3: Northern Blot Hybridisierung.** In jeder Spur sind 10 $\mu\text{g}$  Gesamtzell-RNA nicht infizierter (ni), mit parentalem D1701-V (wt) infizierter und mit der rekombinanten D1701-VrV (RV) infizierter Zellen aufgetragen. Die Isolierung der RNA erfolgte nach 12 Stunden unter der Verwendung von Cycloheximid (12+CH) zur Ansammlung früher Transkripte oder nach 24 Stunden (24) zur Untersuchung später mRNAs. Die Hybridisierung erfolgte mit  $^{32}\text{P}$ -markierter (A) vegf-e spezifischer Sonde, (B) lacZ und xgpt spezifischer Sonde (*NotI*-Fragment aus pZgpt-a), (C) 42K-spezifischer Sonde (Hüllprotein von ORFV).

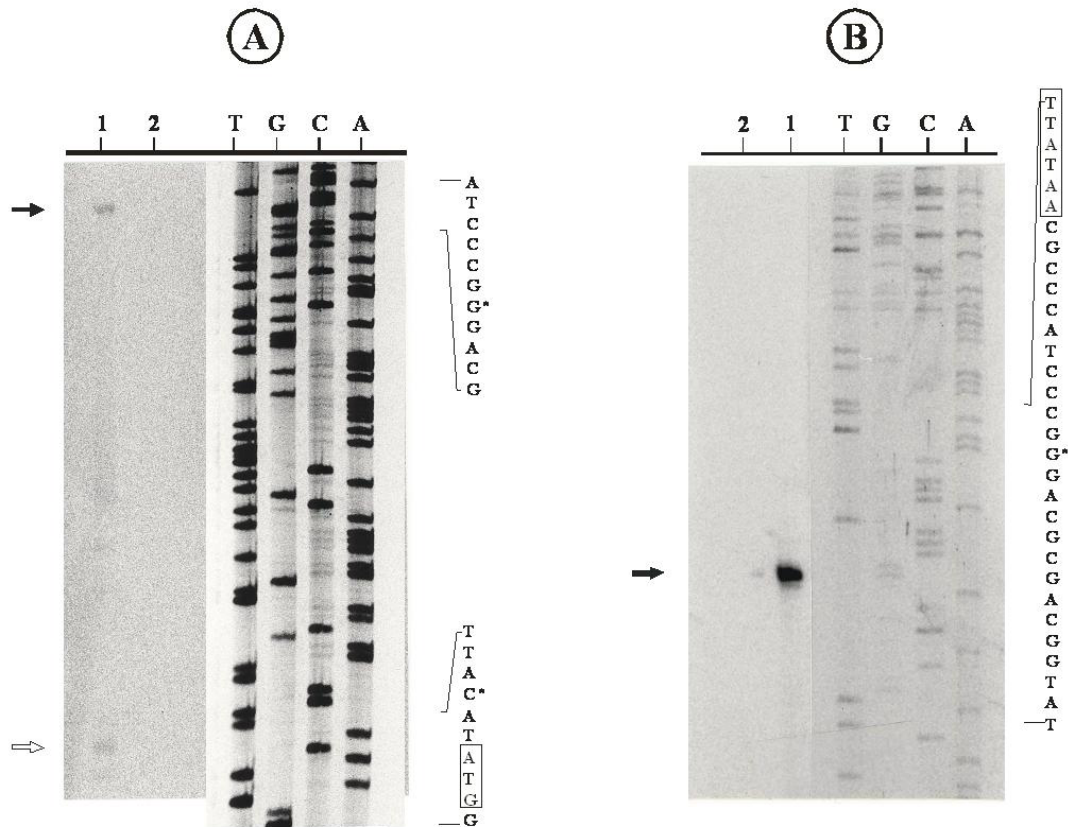
Es zeigte sich in diesem Experiment, dass in D1701-VrV-infizierten Zellen offensichtlich weniger späte virale Transkripte nachweisbar waren, als nach D1701-V Infektion. Dies lässt sich einerseits mit der Möglichkeit erklären, dass D1701-VrV *in vitro* ein anderes Wachstumsverhalten besitzt als D1701-V, andererseits könnte auch eine unterschiedliche Virusmenge bei der Infektion der Zellen Ursache für diesen Unterschied sein. Bei der Analyse früher Transkripte ist dieser Unterschied nicht zu sehen, da sich binnen 12 Stunden bei einem

Block der späten Transkription genügend frühe spezifische mRNA anreichern konnte. Eine vergleichende Untersuchung der *in vitro* Wachstumskurven von D1701-V und D1701-VrV (siehe Ein-Schritt-Wachstums-Kurve, 4.3.6) erklärt dieses Ergebnis. Aufgrund einer gegenüber D1701-V verzögerten Replikation von D1701-VrV konnten zum hier untersuchten Zeitpunkt weniger späte virale Transkripte nachgewiesen werden.

#### 4.3.4 Primer Extension

Im Plasmid pMT10 wurde die lacZ/xgpt Markergen-Kassette 42 nt stromabwärts des vegf-e Promoters kloniert (Abb. 4.3.2D, Abb. 4.3.4C). Damit kam es zur Hintereinanderschaltung des originären  $P_{\text{vegf}}$  und des synthetischen eIP1 Promoters. Es stellte sich die Frage, ob beide Promotoren nebeneinander funktionell waren oder nur einer der beiden für die Induktion der Transkripte verantwortlich war. Diese Frage sollte mit Hilfe einer Primer Extension Reaktion geklärt werden. Hierzu wurde Gesamtzell-RNA aus D1701-VrV infizierten, Cycloheximid-behandelten Zellen 12 Stunden p.i. isoliert und mit den synthetischen Oligonukleotiden („Primern“) LZ-R (2.3.1, Abb. 4.3.4A) und LZ-KR1 (2.3.1, nicht gezeigt) eine entsprechende komplementäre cDNA synthetisiert, die zwangsläufig am Start der mRNA terminierte. Eine parallel durchgeführte Sequenzreaktion mit denselben Primern und deren Auftrennung zusammen mit den Produkten der Primer Extension in einem Acrylamid-Gel, zeigte unmittelbar den mRNA-Start (Abb. 4.3.4A). Durch den Abstand der mRNA-Startstellen zu den jeweiligen Promotoren, ließ sich beurteilen, welcher von beiden letztendlich genutzt wurde.

Mit den genannten Oligonukleotiden wurden unabhängig voneinander zwei spezifische Produkte erhalten. Wie in Abb. 4.3.4A und 4.3.4C zu erkennen ist, konnte eine mRNA-Startstelle 3 nt aufwärts des Translationsinitiationskodons AUG des vegf-e Gens lokalisiert werden (offener Pfeil). Der zweite Transkriptionsstart konnte 81 nt weiter stromaufwärts, oder 12 nt stromabwärts des  $P_{\text{vegf}}$  bestimmt werden (gefüllter Pfeil). Zur Bestätigung, dass  $P_{\text{vegf}}$  ebenfalls Transkripte induzieren konnte, wurde eine weitere Primer Extension mit dem Primer eIP-RZ, welcher unmittelbar stromaufwärts des eIP1 Promoters hybridisierte, durchgeführt. Das Ergebnis bestätigte die Transkriptionsinitiation 12 nt stromabwärts des  $P_{\text{vegf}}$  (Abb. 4.3.4B; 4.3.4C, roter Stern).



(C)

```

3413
vegf-e Promotor
I 5' AAAATGTAAA TTATAACGCC CAACTTTTAA GGGTGAGGCG CCATGAAGTT
II 5' AAAATGTAAA TTATAACGCC CATCCCAGGA CGCGACGGTA TCGATAAGCT
3463
Vegf-e
TCTCGTCGGC ATACTGGTAG CTGTGTGCTT GCACCAGTAT CTGCTGAACG
TGATGGGTAA AGATTGAAAA TATATTTCTA TGCTATAAAT AAGTTAACGA
3513
eIP1-Promotor-Region 3' CT
CGGACAGCAC GAAAACATGG TCCGAAGTGT TTGAAAACAG CGGGTGCAAG
ATTCCTTACA TATGGTTCGT GCAAACAAAC GCAACGAGGC TCTACGGAAT
TAAGGAATGT ATACCAAGCA CGTTT 5'
3563
* eIP1-RZ-Primer
CCAAGGCCGA TGGTCTTTTCG AGTACACGAC GAGCACCCGG AGCTAACTTC
CGGGGATCGC GGCCATGGCC GCGATCCCGT CGTTTTACAA CGTCGTGACT
3' TT GCAGCACTGA
3613
LZ-R-Primer
TCAGCGGTTC AACCCGC 3'
GGGAAAACCC TGGCGTT
CCCTTTT 5'
    
```

Abb. 4.3.4: Primer Extension mit den Primern LZ-R (A) und eIP-RZ (B). Beide Primer ( $10^6$  cpm) wurden mit 15  $\mu$ g Gesamtzell-RNA hybridisiert (12 Stunden nach der Infektion, unter Cycloheximid). Spuren 1: RNA 12hpi+CH. Spuren M: Negativ-Kontrolle, Mock-RNA; Sequenzreaktion mit dem Primer LZ-R (A); Sequenzreaktion mit dem Primer eIP-RZ (B). Zur Orientierung sind in (C) die Ergebnisse in der Sequenz, als Vergleiche zwischen parentaler (I) und rekombinanter (II) DNA dargestellt. \*: Startstellen der vegf-mRNA. \*: Startstellen der lacZ-mRNAs. Grau unterlegt sind die Promotor-Regionen des vegf-e- und des eIP1-Promotors. Rot hervorgehoben sind die Translationsstartstellen.

Der Transkriptionsstart ist in der Rekombinante D1701-VrV damit gegenüber der mRNA-Startstelle im parentalen D1701-V, um 1 nt stromaufwärts verschoben (Abb. 4.3.4C). Damit war gezeigt, dass in D1701-VrV die Induktion der lacZ-spezifischen mRNA von beiden Promotoren ( $P_{\text{vegf}}$  und eP1) erfolgte. Auch wenn eine genauere quantitative Bestimmung der von  $P_{\text{vegf}}$  bzw. eP1 gesteuerten Transkripte durchgeführt wurde, schien vor allem  $P_{\text{vegf}}$  die Transkription der nachfolgenden Fremdgene zu steuern.

#### 4.3.5 Ein-Schritt-Wachstumskurven von D1701-V, -VrV, -VrVres

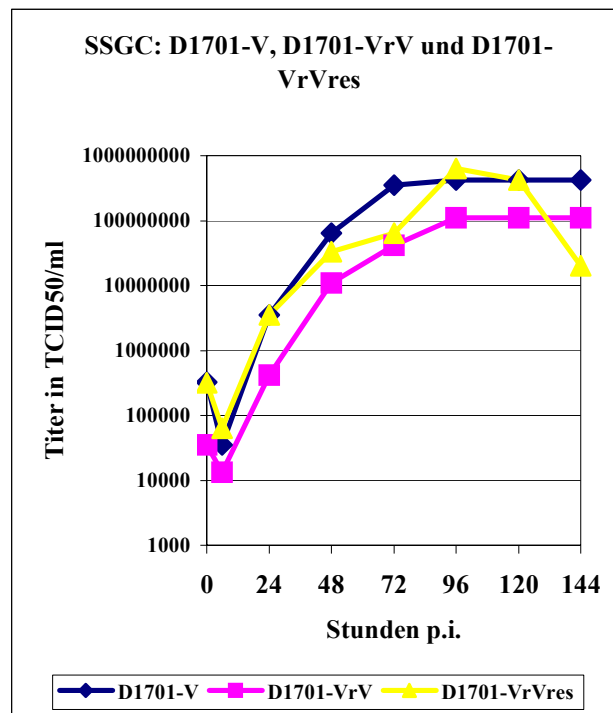
Nach der transkriptionellen Charakterisierung von D1701-V, D1701-VrV und D1701-VrVres in bezug auf das vegf-e Gen, wurde nun der Einfluss des Vegf-e auf das Wachstumsverhalten der drei Viren *in vitro* untersucht. Hierzu wurde eine Ein-Schritt-Wachstumskurve (SSGC: single step growth curve), wie beschrieben durchgeführt (Methoden, 3.18.1).

Die Plaquemorphologie von D1701-V zeigte keinen Unterschied zu D1701-VrV oder D1701-VrVres (nicht gezeigt), und alle Viren erreichten nach 5-7 Tagen in den einzelnen Experimenten vergleichbare Titer (zwischen  $1 \times 10^7$  und  $1 \times 10^8$  pfu/ml) nach Infektion von Vero- oder BK-KL3A- Zellen.

In einem ersten Vergleich der drei ORFV D1701-V, D1701-VrV und D1701-VrVres wurden in zwei parallelen Experimenten Wachstumskurven der Viren angefertigt. Zu unterschiedlichen Zeiten nach der Infektion wurde der Zellkulturüberstand und die Zellen der infizierten Zellkulturen geerntet und der Titer durch jeweils eine Virustitration bestimmt (Titer als TCID<sub>50</sub>/ml). Jeder Wert der Abbildung 4.3.6A beruht somit auf zwei unabhängigen Ergebnissen. Das Wachstumsverhalten von D1701-V, D1701-VrV und D1701-VrVres ist *in vitro* annähernd gleich. Die Kurven verlaufen im Wesentlichen parallel. Zu erkennen ist jedoch, dass D1701-V und D1701-VrVres mit einer Animpfdosis in den Experimenten eingesetzt wurde, die sich von D1701-VrV um eine log-Stufe unterschieden. Diese Differenz blieb bis 72 Stunden nach der Infektion bestehen, verringerte sich anschließend auf eine halbe log-Stufe. Ein eindeutiger Unterschied zwischen dem vegf-e negativen D1701-VrV und den vegf-e positiven D1701-V bzw. D1701-VrVres, war in diesen Experimenten nicht zu erkennen. Da nur zwei unabhängige Experimente durchgeführt worden sind und nur die Gesamtvirusproduktion bestimmt worden war, wurde ein weiterer Versuch durchgeführt.



A



**Abb. 4.3.6A: Ein-Schritt-Wachstumskurve. Vergleich von D1701-V mit D1701-VrV und -VrVres. Die Infektion der Zellen erfolgte durch einstündige Adsorption mit einer MOI von 1,0. Zu angegebenen Zeitpunkten wurden der Zellkulturüberstand und die Zellen gemeinsam geerntet und anschließend titriert. Der Titer wurde als TCID<sub>50</sub>/ml bestimmt. Die Werte basieren auf zwei unabhängigen Ereignissen.**

In dieser Untersuchung erfolgte ein Vergleich zwischen dem rekombinanten D1701-VrV und dem parentalen D1701-V Stamm. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion wurde jetzt der Zellkulturüberstand getrennt von den Zellen untersucht, um zwischen der Virusreplikation und Virusfreisetzung differenzieren zu können. Dazu wurden drei parallele Wachstumskurven durchgeführt und jeder Zeitwert in 4 unabhängigen Titrationsanalysen analysiert (Titer als pfu/ml). Jeder Wert im Diagramm beruht somit auf 12 unabhängigen Ergebnissen. Hier sei angemerkt, dass sich in vielen Experimenten gezeigt hat, dass es keine Unterschiede zwischen einer Titerbestimmung nach TCID<sub>50</sub> und pfu gab, ein direkter Vergleich der beiden Einheiten war somit möglich. Die Ergebnisse zeigten, dass zum Zeitpunkt 0 Stunden p.i. ungefähr viermal mehr D1701-VrV im Experiment eingesetzt wurde als D1701-V (Abb. 4.3.6B und C). Trotzdem erzielte das D1701-V Wildtypvirus binnen 24 Stunden die zehnfache Nachkommenschaft (Abb. 4.3.6C) im Vergleich zu D1701-VrV und setzte um den gleichen Faktor mehr Viren in den Zellkulturüberstand frei (Abb. 4.3.6B). Die Rekombinante D1701-VrV erreichte diese Werte erst mit einer 24 stündigen Verzögerung. Diese Differenz

blieb bis 72 Stunden nach der Infektion erhalten, bis sich jedoch 96 Stunden nach der Infektion die Titer beider Viren angleichen, D1701-V und D1701-VrV erreichten zu diesem Zeitpunkt vergleichbare Mengen intrazellulärer und freigesetzter Virusnachkommen.

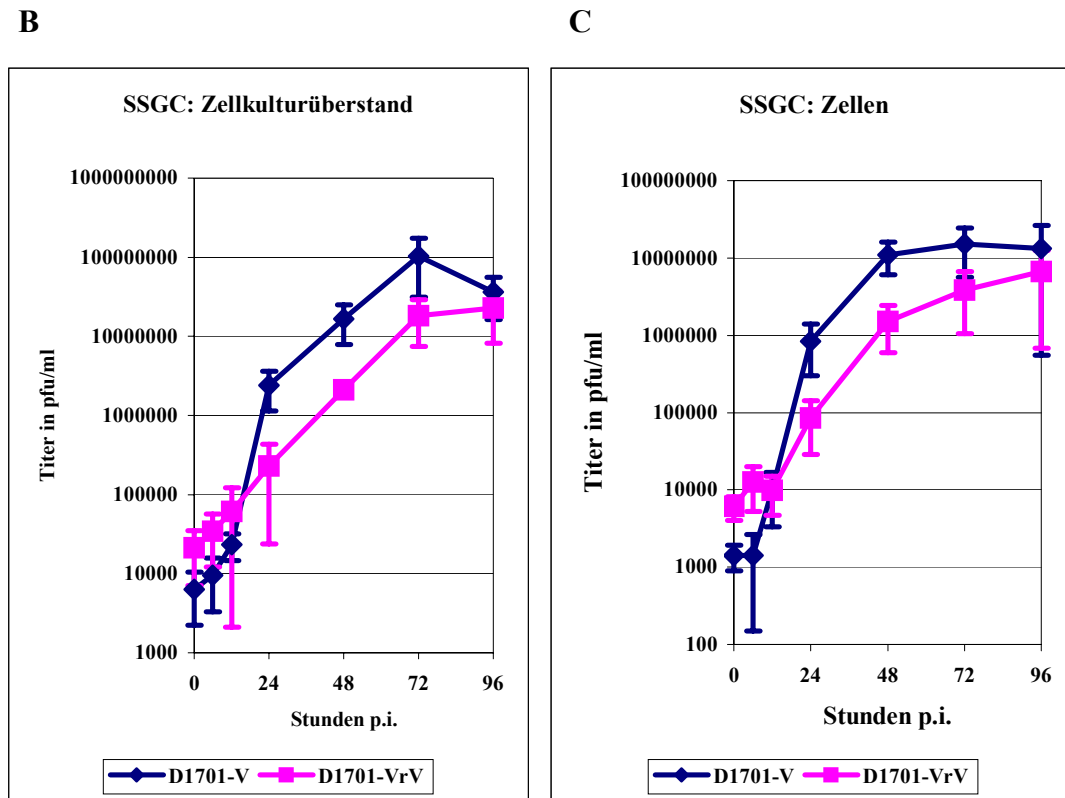


Abb. 4.3.6 B und C: Ein-Schritt-Wachstumskurve. Vergleich des *in vitro* Wachstumsverhalten von D1701-V und D1701-VrV in Bezug auf Virusfreisetzung (B) und Virusreplikation (C). Die Einzelwerte sind der Durchschnitt von 12 unabhängigen Ergebnissen. Die Vero-Zellen wurden mit einer MOI von 1,0 während einer einstündigen Adsorption infiziert, die Zellen und der Zellkulturüberstand nach angegebenen Zeiten getrennt voneinander geerntet und titriert. Angegeben ist der durchschnittliche Titer in pfu/ml in Abhängigkeit von der Zeit.

Abschließend kann man zu diesem Versuchteil sagen, dass D1701-V und D1701-VrVres *in vitro* das gleiche Wachstumsverhalten zeigten. Ein leicht verzögertes Wachstum von D1701-VrV gegenüber D1701-V war im zweiten Experiment zu erkennen (Abb. 4.3.6B und C). Dieses verzögerte Wachstum wird durch die Ergebnisse der Northern Blot Hybridisierung unterstützt (4.3.3), 24 Stunden p.i. waren bei D1701-VrV weniger spezifische Transkripte gefunden worden. Die Virusfreisetzung von D1701-VrV aus infizierten Zellen war jedoch nicht beeinträchtigt, sie verlief parallel zur Virusreplikation.

#### 4.4 Charakterisierung von D1701-V, D1701-VrV und D1701-VrVres im Schaf

Bei ORFV D1701 handelt es sich um ein attenuiertes Impfvirus, welches bereits erfolgreich zur Immunisierung von Lämmern eingesetzt worden war (Mayr et al., 1981). Um nach der Infektion mit D1701 klinische Erscheinungen zu provozieren, war es notwendig das Immunsystem der Tiere durch Behandlung mit Cyclosporin A zu unterdrücken. Die Infektion der narkotisierten Tiere mit den verschiedenen ORFV erfolgte durch Skarifikation der Haut auf der Schenkelinnenseite der hinteren Extremitäten in Skarifikationslinien, wobei unterschiedliche Verdünnungen der entsprechenden Viren je Skarifikationslinie aufgetragen wurden. In drei unabhängigen Experimenten wurden so an insgesamt 9 Schafen die unterschiedlichen D1701-Stämme in unterschiedlichen Kombinationen miteinander verglichen. D1701-V wurde einmal, D1701-VrV fünfmal und D1701-VrVres zweimal, sowie die Kontrollen D1701-B dreimal und MRI zweimal zur Skarifikation verwendet. Die Viren wurden alleine pro Tier oder im Vergleich mit Kontrollvirus, dann auf den gegenüberliegenden Schenkeln appliziert. Abweichend von der klinischen Beurteilung von Nettleton et al. (1996), wurde hier der Score nur aufgrund des Durchmessers der entstandenen ORFV-typischen Pusteln bestimmt. Die anderen Parameter, wie Auftreten eines Erythems und Vorhandensein von fest anhaftenden Krusten konnten nicht zuverlässig bestimmt werden, da sie von den üblichen Prozessen der normalen Wundheilung überlagert wurden. In der Tabelle 4.4.1 sind die klinischen Scores als Intervall von minimalem bis maximalen Score bei allen Tieren einer Gruppe angegeben.

dpi	0	3	5	6	7	8	9	// 20-22
D1701-V	0	0	0	0-1	1	0-1	0	0
D1701-VrV	0	0	0	0	0	0	0	0
D1701-VrVres	0	0	0	0-1	1	0-1	0	0
D1701-B	0	0-1	1-2	1-3	1-3	0-3	0-3	0
MRI	0	1	3	>3	>3	>3	>3	3

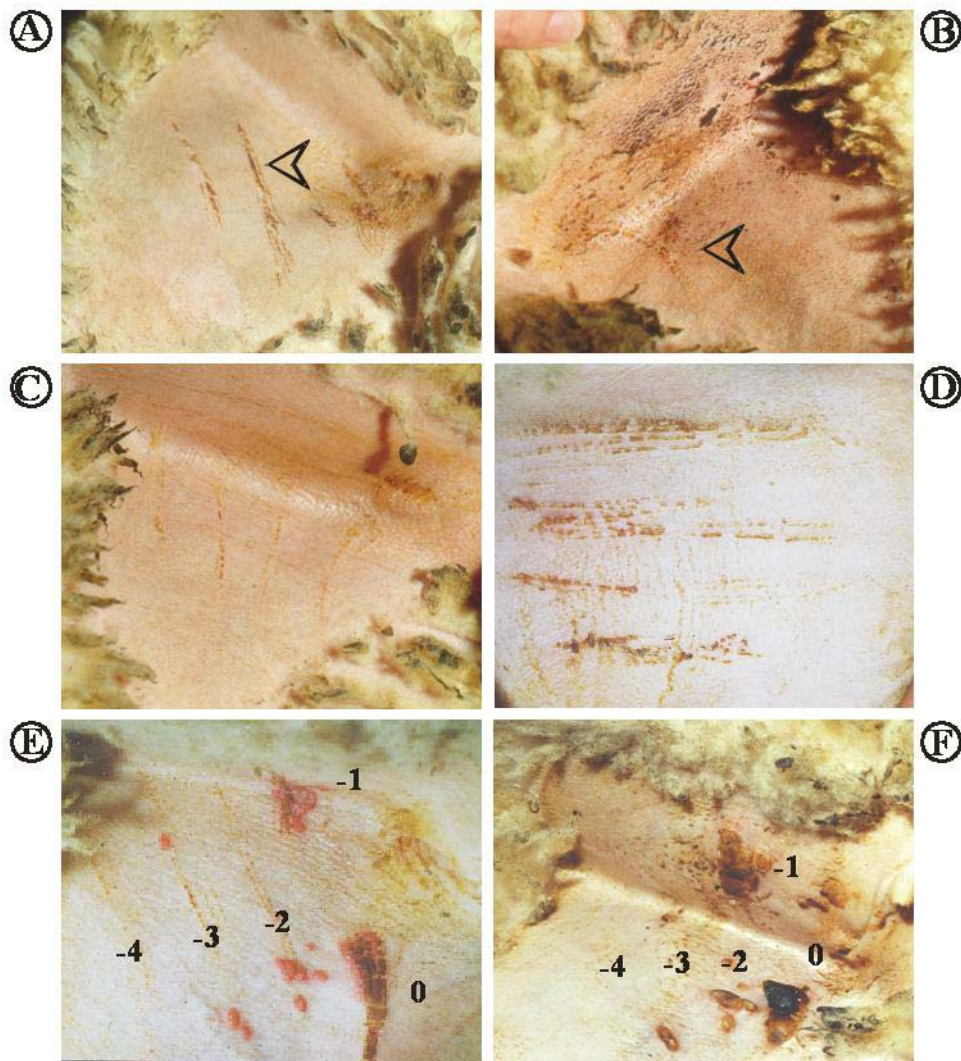
**Tab. 4.4.1:** Dargestellt ist die klinische Beurteilung der Läsionen anhand des Durchmessers einzelner ORFV-spezifischer Pusteln in Abhängigkeit von der Zeit. dpi: Tage nach der Infektion; Zahl 1, 2 und 3 entspricht dem jeweiligen Pusteldurchmesser in mm.

Das plaquegereinigte, an Vero-Zellen adaptierte Virus D1701-V und die aus dem vegf-e<sup>-</sup> D1701-VrV hervorgegangene vegf-e<sup>+</sup> Revertante D1701-VrVres haben sich in diesen Experimenten gleich verhalten. Sie waren nicht mehr in der Lage ein deutliches klinisches Bild einer ORFV-Infektion, selbst unter immunsupprimierenden Bedingungen zu induzieren

(Abb. 4.4A und B). Lediglich um den Tag 7 nach der Infektion waren 1-3 pustelähnliche Strukturen zu erkennen, aus denen jedoch durch Reisolation in Zellkultur und in elektronenmikroskopischen Untersuchungen kein ORFV nachweisbar war. Eine Reisolation beider Viren war nur 4 Stunden nach der Skarifikation gelungen. Die Skarifikationslinien bzw. -felder waren nach 12–20 Tagen vollständig abgeheilt (nicht gezeigt).

Die vegf-e negative Mutante D1701-VrV, zeigte in allen 5 Ansätzen nie klinische Anzeichen einer ORFV Infektion (Abb. 4.4C und D). Ebenso blieben alle Reisolationsversuche und elektronenmikroskopische Untersuchungen negativ. Die Infektionsstellen waren nach 9-12 Tagen vollständig abgeheilt.

Die Kontrolle D1701-B, ein ausschließlich in BK-K13A Zellen vermehrtes Virus, aus welchem D1701-V hervorging, zeigte im Gegensatz dazu teilweise schon ab dem Tag 3 nach der Infektion die Ausbildung ORFV-typischer Pusteln. Am Tag 7 p.i. erreichten diese eine maximale Größe mit einem Durchmesser von 3 mm (Abb. 4.10A und C), anschließend bildeten sich typische Krusten aus, die 20 Tage nach der Infektion fast vollständig verheilt waren (nicht gezeigt). Eine Reisolation von D1701-B war 4 Stunden und 6 Tage nach der Infektion möglich, ebenso war die elektronenmikroskopische Untersuchung 6 Tage und 20 Tage nach der Infektion positiv. Zu anderen Zeitpunkten der Infektion wurden keine Virusisolierungsversuche durchgeführt. Im Vergleich zu dem hochvirulenten, nicht an Zellkultur adaptierbaren ORFV Feldisolat MRI zeigte D1701-B jedoch eindeutig geringere klinische Symptome. Das Feldisolat MRI zeigte den klassischen Verlauf einer PPV ORFV Infektion (Abdussalam und Cosslett, 1957; Robinson und Balassu, 1981). Ab Tag 3 nach der Infektion bildete sich ein deutliches Erythem und geschwollene Vesikel, die ab Tag 6 (Abb. 4.4E, 0) zu einer konfluenten Pustel verschmolzen. Selbst am Tag 20 nach der Infektion waren noch dicke, fest adhärierende Krusten an den Infektionsstellen vorhanden, welche erst langsam verheilten (Abb. 4.4F). Das klinische Bild korrelierte mit der Menge aufgetragenem Virus in den unterschiedlichen Skarifikationslinien und zeigte bei unverdünntem Auftrag, die stärkste Symptomatik.



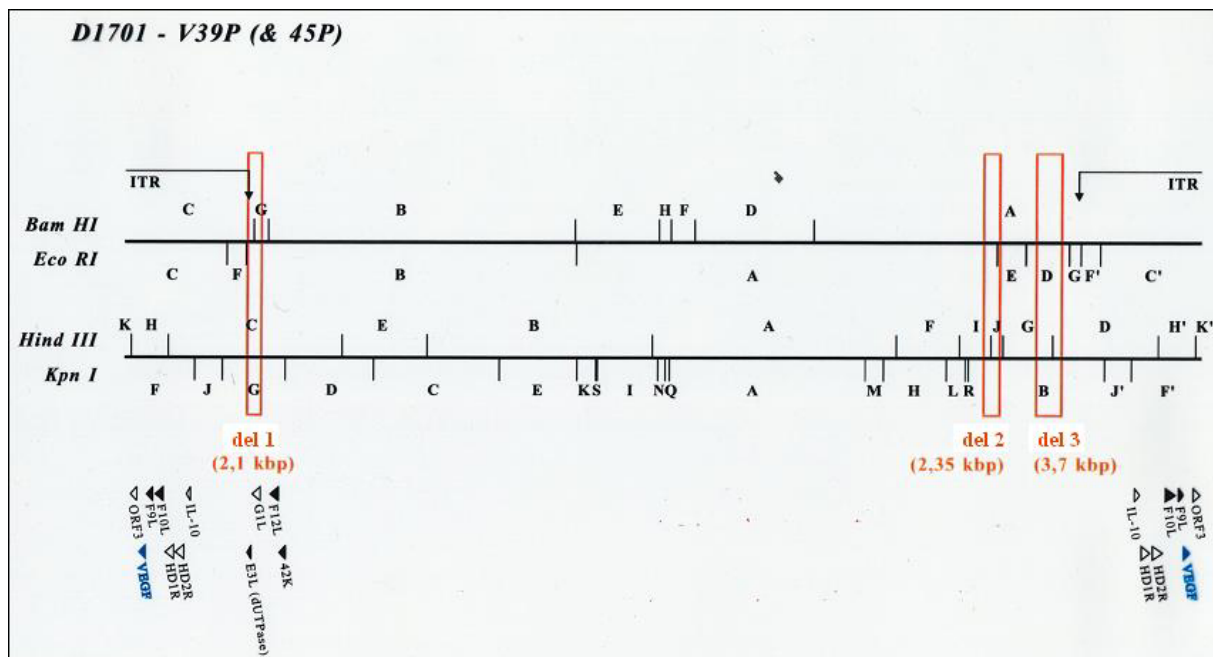
**Abb. 4.4** Charakterisierung *in vivo*. Infektion von Schafen an der Schenkelinnenseite der hinteren Extremitäten mit verschiedenen Orf Viren durch Skarifikation der Haut. In den Skarifikationslinien („Scare lines“) wurden unterschiedliche Verdünnungen, beginnend mit  $10^7$  pfu/ml (0), in log-Stufen appliziert. Die Abbildungen A-E zeigen das klinische Bild nach 7 Tage p.i., F 20 Tage p.i.. A: D1701-V; B: D1701-VrVres; C und D: zwei verschiedene Tiere mit D1701-VrV; E: virulentes Feldvirus MRI; F: MRI, 20 Tage nach der Infektion. Einzig im Fall des MRI Stammes ist ein Titrationseffekt in den Scare lines offensichtlich. Einzelne kleine Pusteln sind mit offenen Pfeilspitzen markiert.

Die Ergebnisse zeigten keinen nennenswerten Unterschied zwischen dem parental D1701-V und der vegf-e negativen Mutanten D1701-VrV. Lediglich das schnellere Abheilen der Skarifikationslinien und die negativen Ergebnisse der Virus-Reisolation bzw. den elektronenmikroskopischen Untersuchungen ließen eine weitere Attenuierung von D1701-VrV gegenüber D1701-V vermuten und deuteten auf eine möglicherweise verminderte Replikationsfähigkeit von D1701-VrV *in vivo* hin.

Das im Schaf eindeutig avirulentere Verhalten des an Vero Zellen adaptiertem Stammes D1701-V gegenüber dem originären D1701-B ließ vermuten, dass es zwischen beiden Viren Unterschiede geben muss, die unabhängig von der Deletion des *vegf-e* Gens sind.

#### 4.5 Vergleich des D1701-B und D1701-V Genoms

Vergleichende Genomuntersuchungen mittels Southern Blot Hybridisierungen und Sequenzierung wurden von Dr. Hanns-Joachim Rziha und Bertel Bauer durchgeführt und werden hier nur zusammengefasst, um Erklärungen unterschiedlichen Virulenzverhaltens von D1701-V und D1701-B zu liefern. Bei D1701-V ließen sich drei größere Deletionen in den terminalen Bereichen des Genoms, vor der ITR-Region, zeigen (Abb. 4.5). Am rechten Genomende entstanden zwei Deletionen mit Größen von ca. 2,35 kbp (*del2*) bzw. ca. 3,7 kbp (*del3*), während am linken Ende eine dritte ca. 2,1 kbp große Deletion (*del1*) zu finden war.



**Abb.: 4.5:** Lokalisation der drei Deletionen im Genom von D1701-V. Durch multiple Passagierung wurde das parentale D1701-B an Vero Zellen adaptiert. In diesem Zusammenhang entstanden drei Deletionen im Genom von D1701-B. Die Lokalisationen dieser Deletionen *del1- del3* im Genom von D1701-V sind hier dargestellt. Analysiert wurde das Genom nach 39 Passagen auf Vero-Zellen und Plaquereinigung eines Klons. Die Buchstaben geben die Bezeichnung der einzelnen Fragmente nach Spaltung mit den unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen (*HindIII*, *EcoRI*, *BamHI* und *KpnI*) an. ITR: „inverted terminal repeat“ Region.

Von diesen Deletionen waren einige Gene betroffen, die daher ebenfalls mit der Virulenz von ORFV in Zusammenhang gebracht werden können. Eines der betroffenen Gene ist das für einen GM-CSF inhibierenden Faktor kodierende GIF-Gen, dass durch die Bindung an GM-

CSF und IL-2 immunmodulatorisch wirkt (Deane et al., 2000). Durch die Deletion del3 (Abb. 4.5) wurde es partiell zerstört. Vermutlich waren durch diese genomischen Veränderungen weitere Gene, die mit der Virulenz von D1701 assoziiert sind, betroffen. Deren Deletion beeinflusste die Replikation *in vitro* jedoch nicht negativ. *In vivo* führten diese Veränderungen zu einem Ausbleiben der Orf-spezifischen Klinik selbst unter immunsupprimierenden Bedingungen. Bei D1701-V handelt es sich damit um ein nach Wechsel der zur Virusanzucht benutzten Zellkultur weiter attenuiertes, avirulentes Virus.

Die Rolle des Vegf-e im Zusammenhang mit Virulenz von ORFV muss allerdings aufgrund dieser Erkenntnisse neu beurteilt werden und bleibt zu diesem Zeitpunkt noch ungeklärt. Es war daher erforderlich, das vegf-e im parentalen D1701-B zu deletieren, um eine Aussage über dessen Einfluss auf die Virulenz von D1701 treffen zu können. Diese Versuche sind weiter unten beschrieben.

Zunächst wurde die transkriptionelle Organisation im Bereich der del2 zwischen D1701-B und D1701-V sowie dem virulenten neuseeländischen Feldisolat NZ2 verglichen.

#### **4.6 Vergleichende transkriptionelle Analysen zwischen D1701-B, D1701-V und NZ2 im Bereich der del2**

Wie unter 4.5 beschrieben, gab es durch Passagierung des attenuierten ORFV D1701-B auf Vero Zellen drei zusätzliche Deletionen im Stamm D1701-V im Übergangsbereich zwischen dem singulären und duplizierten Teil des Genoms. Diese Übergangsregion scheint in einem gewissen Rahmen recht variabel und leicht veränderbar zu sein, so dass es schon bei D1701-B (Cottone et al., 1998, Rziha et al., 1999) sowie anderen PPV Stämmen (Rziha, unveröffentlicht) zu genomischen Veränderungen kam. Neben essentiellen, zu vielen Stämmen der Familie Poxviridae homologen Genen kommen in diesem Bereich auch Gene vor, die möglicherweise im Laufe der Evolution des ORFV vom Wirt in das virale Genom übernommen worden sind. Beispiele dafür sind das vegf-e Gen mit einem deutlich vom Orf Genom abweichenden GC-Gehalt von 56,1% (Lyttle et al., 1994; Rziha et al., 2003) und das Homolog zum IL-10 Gens des Schafes von 47,1% (Fleming et al., 1997; Flemming et al., 2000, Rziha et al., 2003). Das Interesse richtete sich somit unter anderem auf die genomische und transkriptionelle Organisation dieser Region und auf etwaige Besonderheiten, die eine Veränderung durch Passagierung in Zellkultur in diesem Bereich ermöglichten. Vergleichende Analysen zwischen dem attenuierten Stamm D1701-B und der Variante D1701-V einerseits und dem virulenten Stamm NZ2 andererseits, sollten darüber erste Informationen liefern.

Die Untersuchungen erfolgten mit spezifischen cRNAs, die mit Hilfe des SP6/T7 Transkriptionssystem oder mit dem Phagen M13 hergestellt worden waren. Die untersuchte Region umfasste das Gen rpo132 (A24R), welches links der del2 in D1701-V liegt, über den Bereich der Deletion hinweg und die rechts der Deletion lokalisierten Gene ati2 und ati1 bis hin zum Gen D9R (A35R) (Abb. 4.6.1). In Anlehnung an die Genomorganisation des Vaccinia Virus (Johnson et al., 1993) werden den hier genannten Genen des ORFV D1701, sofern sie homolog zu VV waren, die gleichen Funktionen zugeordnet. Demnach codiert das rpo132 (A24R) Gen für eine RNA Polymerase Untereinheit, die Gene A25L und A26L für die Gene ati2 und ati1 (ati: A-type-inclusion body), 10K (A27L) für das Fusionsprotein, welches zur Bildung von EEVs essentiell ist (Hsiao et al., 1998; Sanderson et al., 2000). Abweichend zum Vaccinia Virus konnte bei PPV ORFV kein Homolog zum A31R Gen gefunden werden. Die anschließenden Gene hingegen sind wiederum mit dem Vaccinia Virus vergleichbar angeordnet und zeigten eine entsprechende Sequenzhomologie (nicht gezeigt). Eine funktionelle Analyse der Gene steht jedoch aus.

#### **4.6.1 Transkriptionelle Organisation der Gene D3L bis D9R (A28L-A35R).**

Die Analyse der Transkripte in diesem Genomabschnitt erfolgte mit cRNAs, die komplementär zu den entsprechenden mRNA der Gene waren. Als Matrizen zur Herstellung der spezifischen cRNAs fungierten die Plasmide pD3L bis pD9R (Material, 2.3). In diesen Plasmiden waren die genannten Gene jeweils zwischen die SP6 und T7 Promotorsequenzen des Plasmids pSPT18 kloniert, wodurch cRNAs sense und antisense zur mRNA der jeweiligen Gene vom ORFV Stamm NZ2 geschrieben werden konnten.

Die Gesamtzell-RNA aus virus-infizierten Zellen wurde nach dem Standardprotokoll entweder mit Hilfe von Guanidinium-Chlorid oder Trizol präpariert (3.20.1/3.20.2). Die Northern Blothybridisierung erfolgte mit <sup>32</sup>P-markierten cRNAs nach den Standardbedingungen für RNA-RNA Hybridisierungen unter Berücksichtigung des GC-Gehalts (3.24.1). Die Ergebnisse dieser Analysen sind in der Abbildung 4.6.1, Abbildung 4.6.3 und Tabelle 4.6.1 zusammengefasst.



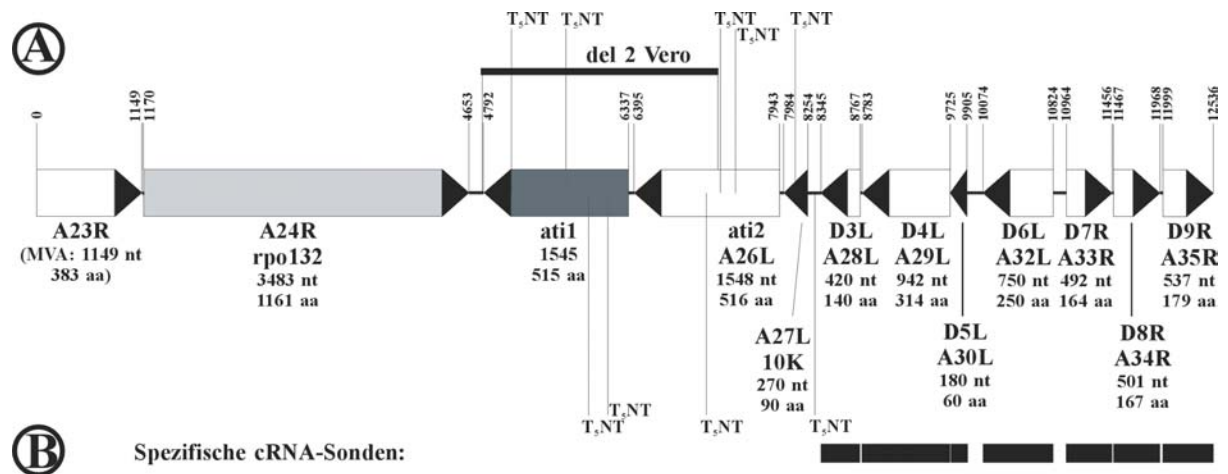


Abb. 4.6.1: Transkriptionelle Analyse der ORFV Gene D3L bis D9R. Dargestellt ist die Anordnung der Gene A23R bis D9R im Genom von D1701-B (A) in den Fragmenten *Hind*III IJG. Zusätzlich sind für die Interpretation der mRNAs typische Pocken-spezifische Terminationssequenzen früherer Gene angegeben (T<sub>5</sub>NT, Yuen and Moss, 1987). B: cRNAs der jeweiligen Gene, die spezifisch die mRNAs der jeweiligen Gene detektierten und zur Hybridisierung eingesetzt worden sind. Die Ergebnisse der Hybridisierung mit den unterschiedlichen cRNAs sind in Tab. 4.6.1 zusammengefasst.

Frühe virusspezifische RNAs konnten mit den cRNAs für die Gene D3L, D4L, D7R und D9R detektiert werden. Dabei detektierte die D3L-spezifischen cRNAs, eine schwache Bande von ca. 2,5 kb, sowohl in NZ2- als auch in D1701-B-infizierten Zellen. Dieses Transkript könnte hinter der AT-reichen Promotorsequenz des D3L Gens starten und sich bis in den Bereich des *ati2* Gens erstrecken und dort das pockenvirus-spezifische Transkriptionsterminationsignal T<sub>5</sub>NT nutzen. Aufgrund der Deletion bei D1701-V ist diese mRNA verkürzt und nur ca. 1,8 kb lang. Möglicherweise wird ein verändertes Terminationssignal (TATTTCT) am 3'-Ende des *rpo* Gens für das 1,8 kb lange Transkript benutzt (Abb.4.6.1, Abb. 4.6.3). Ein weiteres, deutliches Transkript mit einer Länge von ca. 1,6 kb konnte bei D1701-B gefunden werden. Da ebenfalls eine D4L spezifische cRNA ein frühes Transkript vergleichbarer Länge detektierte, lag die Vermutung nahe, dass es sich um die mRNA für die beiden Gene D3L und D4L handelte (Abb.4.6.1, Abb. 4.6.3). Für NZ2 konnte mit der gleichen cRNA ein Transkript von ca. 1,5 kb gefunden werden, bei dem es sich um die gleiche, hier etwas verkürzte mRNA der beiden Gene handeln könnte. Das Fehlen einer mRNA dieser Größe mit der D3L-spezifischen cRNA bei NZ2, kann damit erklärt werden, dass in diesem Ansatz weniger NZ2 Gesamtzell-RNA verwendet wurde.

Als weiteren Unterschied zwischen D1701-B und D1701-V konnte mit der D3L-spezifischen cRNA bei D1701-V ein kleineres Transkript von ca. 1,2 kb gefunden werden, wobei es sich ebenfalls um ein durch die Deletion verändertes Transkript der Gene D3L und 10K handeln

könnte. Unterstützt wird dies dadurch, dass mit einer D4L-spezifischen cRNA, diese mRNA nicht detektiert werden konnte, der Start folglich im Bereich des D3L Gens lag.

Bei der Analyse der späten Transkripte mit der D3L-spezifischen Sonde ergab sich folgendes Bild für NZ2 und D1701-B bzw. D1701-B und D1701-V. Bei D1701 konnten schwache Transkripte von ca. 2,5 kb (D1701-B) und ca. 1,8 kb (D1701-V) gefunden werden, vergleichbar mit den Größen früher mRNAs, so dass diese möglicherweise von ein und dem selben Promotor induziert wurden, der früh und spät aktiv war (Abb.4.6.1, Abb. 4.6.3). Alternativ könnte diese Transkript von dem späten viralen Promotor des D5L Gens (A30L) induziert werden, da mRNAs vergleichbarer Größe auch mit den spezifischen cRNAs für die Gene D4L und D5L gefunden worden sind. Weitere Versuche müssen diese Frage noch klären. Im Fall des ca. 1,2 kb großen späten Transkripts von D1701-V kann wieder eine frühe und späte Aktivität des verantwortlichen Promotors vermutet werden.

Die Gene D5L, D6L und D7R zeigten keine bemerkenswerten Unterschiede in der transkriptionellen Organisation der untersuchten ORFV-Stämme. Aufgrund der Analysen kann man sagen, dass es sich bei den Genen D5L und D6L eher um späte Gene handelt und bei D7R um ein Gen, welches früh und spät transkribiert wird. Die Größen der gefundenen mRNAs sind in Tabelle 4.6.1 und Abbildung 4.6.3 zusammengefasst.

Einen auffälligen Unterschied zwischen dem virulenten neuseeländischen Stamm NZ2 und dem attenuierten Stamm D1701 gab es bei dem späten Gen D8R (A34R). Hier konnten mit der NZ2-spezifischen cRNA keine Transkripte bei D1701 detektiert werden, was die Vermutung nahe legte, dass sich die DNA-Sequenzen der beiden Gene soweit unterscheiden, dass die NZ2-spezifische Sonde die mRNA des Gens bei D1701 nicht mehr detektieren konnte (Tab. 4.6.1). So wurden nur bei NZ2 neben einem deutlichen Transkript mit einer Größe von ca. 1,5 kb fünf weitere mRNAs unterschiedlicher Länge detektiert. Wie Sequenzvergleiche zeigten, besaßen die Gene D8R (A34R) und D7R (A33R) der Stämme NZ2 und D1701 eine Homologie von nur 58,9% bzw. 69,3% (sonst >88%). Mit den verwendeten Hybridisierungsbedingungen und den NZ2-spezifischen Sonden ließen sich zwar noch für D7R, nicht jedoch für D8R D1701-spezifische Transkripte detektieren. Erst doppelsträngige D1701-B spezifische DNA Sonden zeigten auch bei D1701 mRNAs vergleichbarer Größe (nicht gezeigt).

	NZ2		D1701-B		D1701-V	
Gen	early	late	early	late	early	late
D3L	2,5 F		6,6 2,5 F	2,5 F 1,8 F	1,8 F 1,26	1,8F 1,26
D4L	1,5	1,5	3,1 2,5 <b>1,6 S</b>	1,7	1,6	1,7
D5L		1,65	2,8 F	2,0 1,8 1,65		1,65
D6L		1,8 1,35	2,8	1,8 1,35		1,8 1,35
D7R	0,75 <b>0,56 S</b>	4,8 1,15 0,56	0,75 <b>0,6 S</b>	1,15 0,75 0,6	0,75 <b>0,6 S</b>	4,9 1,15 0,75 0,6
D8R		5,0 4,8 2,85 <b>1,5 S</b> 1,2 0,75				
D9R	1,7 F 1,05 F <b>0,63 S</b> 0,39	1,7 diffus	0,85		0,85	4,2 3,0 diffus

Tab. 4.6.1: Zusammenfassung der Ergebnisse nach Hybridisierung mit den spezifischen cRNAs. S: „strong“ = starkes Signal; F: „faint“ = schwaches Signal; diffus: Bezeichnet eine Vielzahl unterschiedlicher mRNAs, die ineinander verlaufen und sich als Schmier darstellen.

Einfacher war die Erklärung der kürzeren mRNAs (1,2 kb, Tab. 4.6.1, Abb. 4.6.3), die sich mit dem gemeinsamen Ablesen benachbarten Gene, z.B. D7R und D8R, erklären ließen. Um eine Aussage über die übrigen größeren mRNAs treffen zu können, sind weitere Untersuchungen in bezug auf deren Transkriptionsstart und -ende notwendig.

Eine veränderte Situation stellte sich bei dem frühen Gen D9R (A35R) dar. Die D9R Gene beider Stämme (D1701 und NZ2), sind bis kurz vor dem Translationsstoppsignal nahezu identisch, jedoch waren im D9R Gen von D1701 zwischen dem Stopp Signal und der frühen Terminationssequenz T<sub>5</sub>NT, 119 nt und ein weiteres Stoppsignal zusätzlich eingeführt

worden. Dieser Umstand erklärt hier die unterschiedliche Transkriptlänge für dieses Gen in den Stämmen D1701 (ca. 0,85 kb) und NZ2 (ca. 0,63 kb) (Abb.4.6.1, Abb. 4.6.3). Eine klare Aussage bezüglich später D9R-spezifischer Transkripte ließ sich mit den bisherigen Untersuchungen nicht treffen.

Abschließend kann man zu diesen ersten transkriptionellen Analysen sagen, dass die frühen NZ2-spezifischen mRNAs der untersuchten Gene stets kürzer zu sein schienen, als die vergleichbaren RNAs von D1701. Generell ist die nahe Verwandtschaft der Stämme NZ2 und D1701 zueinander auch in der transkriptionellen Organisation in diesem Bereich klar zu erkennen. Unterschiede zwischen den Stämmen D1701-V und D1701-B zeigten sich nur bei den D3L-spezifischen Transkripten, die unmittelbar im Zusammenhang mit der del2 von D1701-V standen. Sie waren bei D1701-V (~1,8 kb, early) im Vergleich zu D1701-B und NZ2 (je ~2,5 kb, early) verkürzt.

#### **4.6.2 Transkriptionelle Organisation der Gene *rpo132* (A24R) und *ati2* (A25L)**

Die transkriptionelle Analyse dieser Gene erfolgte gesondert, da sich die Transkriptionsrichtung zwischen den beiden Genen A24R und A25L umkehrt und die Transkripte der Gene dadurch aufeinander zulaufen. Zur Analyse der mRNAs wurden ca. 750 bp große Teilsequenzen der Gene *rpo132* und *ati2* genutzt, die über PCR amplifiziert worden sind. Verwendet wurden hierzu die beiden Primerpaare *rpo132F* – *rpo132RC* und *atiF* – *atiRC* (Material, 2.5) und die virale DNA von D1701-B als Matritzen-DNA. Die PCR Produkte von 774 bp (*rpo*) und 734 bp (*ati*) wurden anschließend in den Phagen M13 bzw. in das Plasmid pSPT18 kloniert. Diese Genfragmente lagen 71 bp (*rpo132*) und 97 bp (*ati2*) vom 3'-Ende der jeweiligen Gene entfernt (Abb. 4.6.2). Durch beide Transkriptionssysteme war es möglich, cRNAs in beiden Orientierungen herzustellen, wodurch mRNAs, die über den intergenischen Bereich hinwegreichten, detektiert werden konnten.

Neben der Analyse der Transkripte sollte die Frage geklärt werden, ob es bei ORFV eine post-transkriptionelle Modifikation des 3' Endes der späten mRNA des *ati2* Gens gab. Bei dieser für das Kuhpockenvirus beschriebenen Modifikation handelt es sich um eine gezielte Restriktion des 3'-Endes der mRNA für die ein Motiv innerhalb des *AluI-XbaI*-Fragments (AX-Element) an dieser Position verantwortlich ist (Howard et al., 1999; Antczak et al., 1992). Durch Deletionsanalysen konnte im AX-Element die Region auf 43 Nukleotide um die RNA-Schnittstelle herum eingegrenzt werden und es zeigte sich, dass in dieser Sequenz zwei essentielle Sequenzmotive (zwei Subelemente) vorhanden sind, die für eine gerichtete Restriktion der RNA verantwortlich sind (Howard et al., 1999). Die intergenische Region

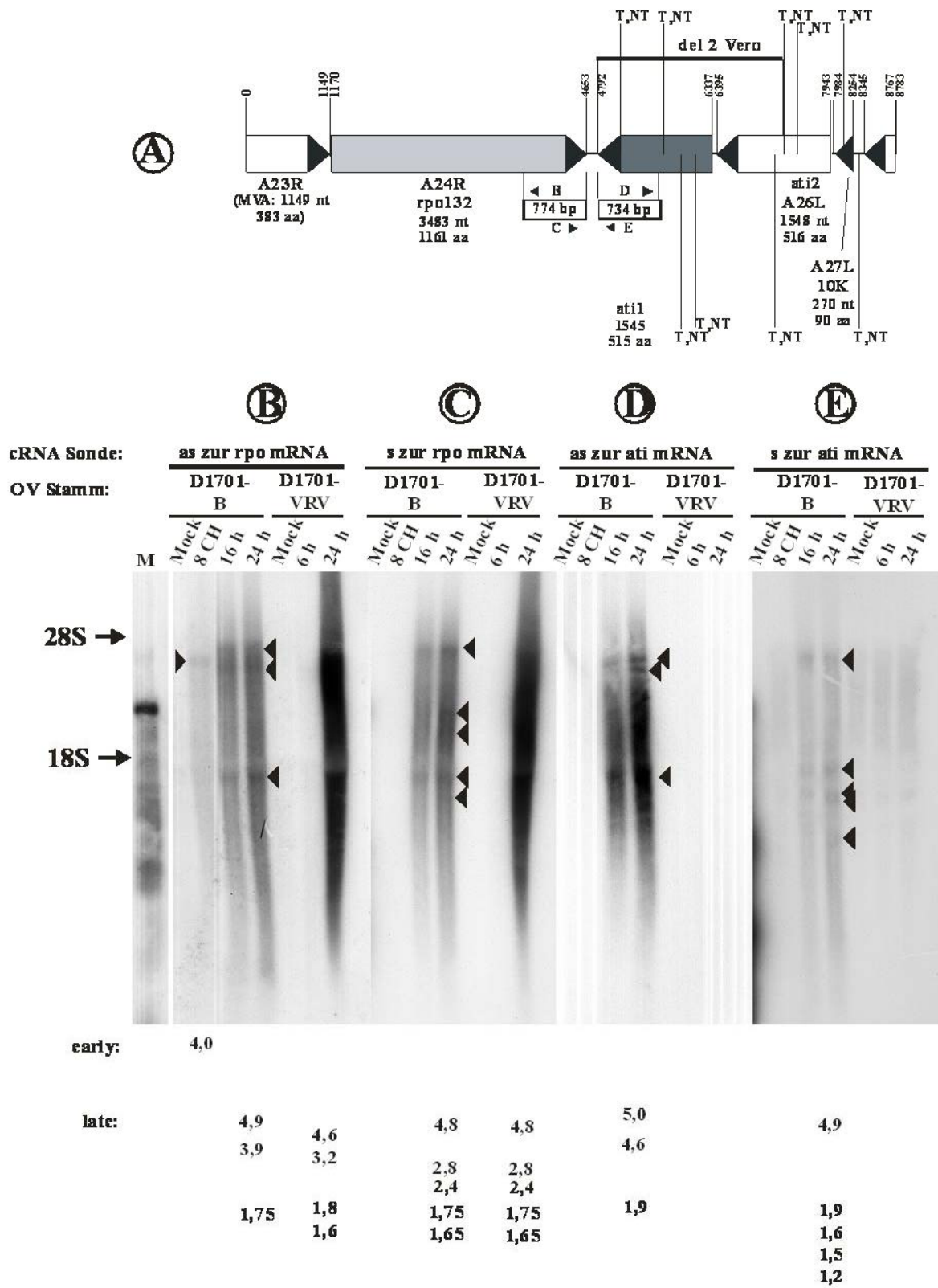
zwischen den Genen *rpo132* und *ati2* wurde auf dieses 43 Nukleotide große Motiv und speziell auf die zwei essentiellen Subelemente hin untersucht.

In den vergleichenden Sequenzanalysen wurden die entsprechenden Genombereiche des Kuhpockenvirus, der Stämme Western Reserve und MVA des Vaccinia Virus, des Variola Virus, des Schafpockenvirus und des Molluscum contagiosum Virus einbezogen. Nur in den vier zuerst genannten Viren war das AX-Element vorhanden. In dem Schafpockenvirus, dem Molluscum contagiosum und dem Orf Virus konnten keine Sequenzhinweise auf das Vorhandensein dieser beiden Subelemente gefunden werden. Diese Ergebnisse wurden durch die transkriptionellen Daten gestützt, die keine diskrete Bande für das *ati2* Gens zu späten Zeitpunkten der viralen Replikation zeigten (Abb. 4.6.2D). Eine posttranskriptionelle Modifikation in Form einer gezielten Restriktion des 3'-Endes des *ati2* Gens erschien somit bei ORFV unwahrscheinlich.

Die transkriptionellen Analysen der Gene *rpo132* und *ati2* erfolgte vergleichend zwischen D1701-B und der Variante D1701-V. In der Abbildung 4.6.2 sind die Hybridisierungsergebnisse mit den verschiedenen cRNAs dargestellt. Es ist zu erkennen, dass mit der cRNA Sonde, die antisense (as) zur *rpo132* mRNA orientiert war, bei D1701-B vier unterschiedlich große Transkripte detektiert werden konnten. Dabei handelte es sich um eine ca. 4,0 kb große frühe mRNA und drei späte Transkripte mit Längen von ca. 1,75 kb, 3,9 kb und 4,9 kb. Die 4,9 kb große RNA lässt sich als mRNA interpretieren, welche ausgehend von dem A23R Gen über das *rpo132* Gen und den intergenischen Bereich zwischen A24R und *ati2* transkribiert wird (Abb.4.6.1, Abb. 4.6.3). Somit konnte sie auch von der cRNA Probe, die sense zu *ati2* Gen orientiert ist, detektiert werden. Das kleinere, 3,9 kb große Transkript codiert vermutlich für ein kürzeres Transkript, welches nicht von der sense cRNA des *ati2* erkannt wurde. Diese beiden Transkripte konnten durch dsDNA Sonden bestätigt werden (nicht gezeigt).

Bei D1701-V konnten mit der as cRNA des *rpo132* ähnliche Transkripte nachgewiesen werden, die jedoch aufgrund der Deletion verkürzt sind (4,6 kb, bzw. 3,2 kb). Das frühe, ca. 4,0 kb große Transkript konnte hingegen nicht detektiert werden. Eine Interpretation dieser mRNA ist schwierig, da sie in keinem weiteren Experiment bestätigt werden konnte. Zudem zeigt das *rpo132* Gen eine der späten Promotorregion von Pockenviren ähnlichen Sequenz (TAAATATG). Ebenfalls schwer zu erklären war das kleine späte Transkript von ca. 1,75-1,8 kb, welches sowohl in D1701-B als auch in D1701-V detektiert wurde (Abb. 4.6.2B) und sich mit dsDNA Sonden bestätigen ließ (nicht gezeigt). Dieses Transkript passte jedoch zu keinem der hier beschriebenen Gene. Ein neues, bisher nicht beschriebenes Gen ließ sich

jedoch aus der Sequenz nicht ableiten. Die Deletion in D1701-V schien sich aufgrund einer vergleichbaren Größe der Transkripte in den Stämmen D1701-B und D1701-V hier nicht auszuwirken. Weitere Untersuchungen müssen die Herkunft dieser mRNA klären.



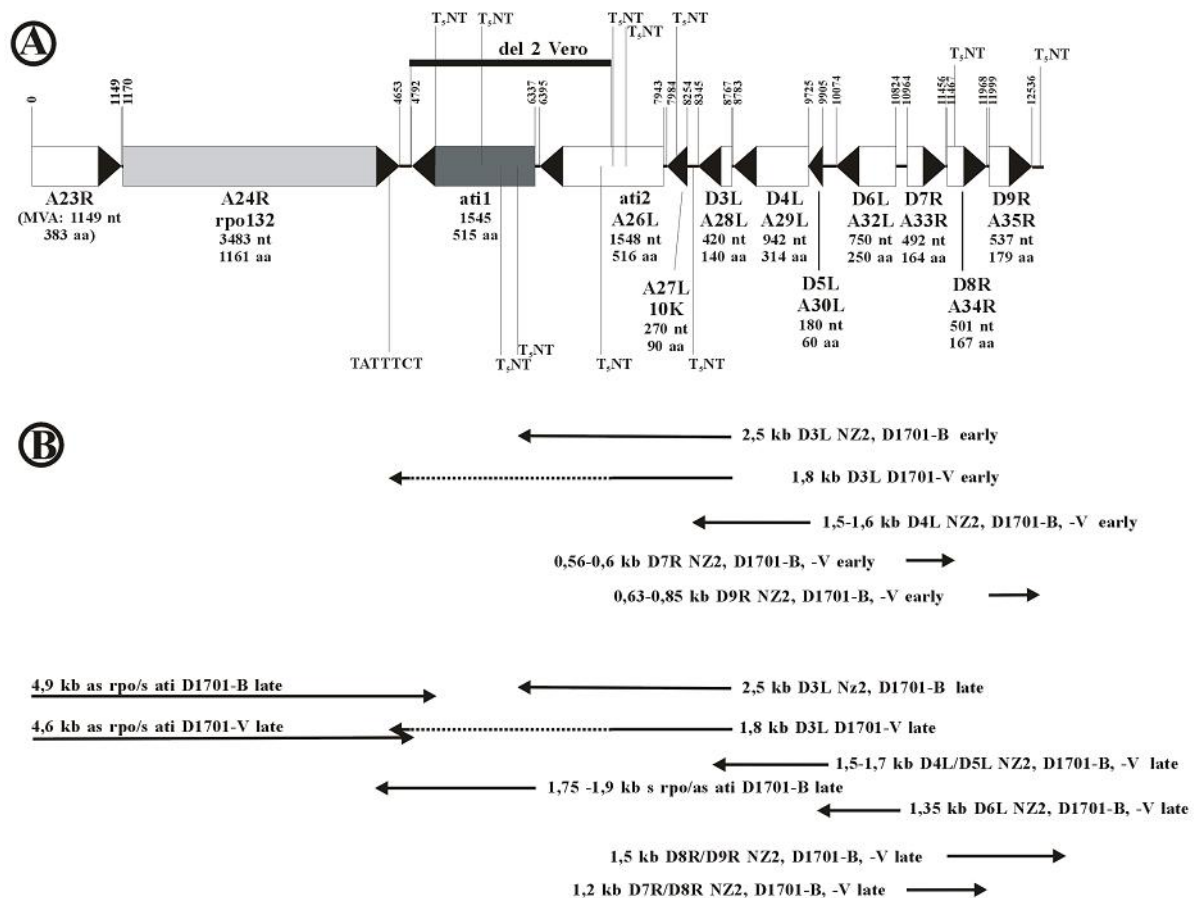
**Abb. 4.6.2 Transkriptionelle Organisation im Bereich der intergenischen Region zwischen *ati2* und *rpo*.** Dargestellt ist ein Ausschnitt der Genkarte von Abb. 4.6.1 in welchem die beiden Gen-Fragmente des *ati2* und *rpo* Gens eingezeichnet sind, die zur Herstellung spezifischer cRNA-Sonden verwendet wurden. Die Buchstaben B, C, D und E geben dabei einerseits die Transkriptionsrichtung der spezifischen cRNA-Sonden an (A), andererseits bezeichnen sie den Teil der Abbildung in dem der Northern Blot der entsprechenden Sonde gezeigt wird. Die Größen der detektierten mRNAs sind tabellarisch unter den Abbildungen B-E angegeben. Die mRNA Größe wurden für jedes dieser Gele getrennt kalkuliert; da die Gele ein unterschiedliches Laufverhalten besaßen, wurde zur optischen Groborientierung die Laufrichtung der 18S und 28S rRNA angezeigt. CH: RNA aus Cycloheximid behandelte Zellen. Mock: RNA aus nicht infizierten, unbehandelten Zellen. 18S und 28S: Größen der beiden rRNA Banden. s: sense Orientierung zur mRNA. as: antisense orientiert zur mRNA.

Mit der schon beschriebenen Sonde, die sense zum *ati2* Gen orientiert war, ließen sich noch weitere, kleine späte Transkripte detektieren, die, vergleichbar mit der ca. 4,9 kb großen RNA nur sehr schwache Hybridisierungssignale ergaben (Abb. 4.6.2E) und eine Länge zwischen 1,2 und 1,9 kb besaßen. Sie ließen sich mit den bisherigen Analysen, da auch keine Bestätigung mit dsDNA Sonden erfolgte, noch nicht erklären. Sehr wahrscheinlich handelt es sich aber um spezifische virale Transkripte, die im Genbereich der Deletion des D1701-V exprimiert werden, da eine Hybridisierung mit RNA aus D1701-V infizierten Zellen keine Signale ergab.

Gleiches galt für die cRNA mit einer Orientierung antisenses zur *ati2* mRNA, die mit D1701-V RNA ebenfalls nicht hybridisierte. Im Stamm D1701-B ließen sich hingegen drei späte Transkripte mit Größen von ca. 5,0 kb, 4,6 kb und 1,9 kb detektieren (Abb. 4.6.2D), die sich mit einer dsDNA Sonde bestätigen ließen (nicht gezeigt). Bei dem kleinen 1,9 kb großen Transkript könnte es sich demnach um die mRNA des *ati2* Gens handeln (Abb.4.6.1, Abb. 4.6.3). Die größeren RNAs waren hingegen schwer zu erklären. Ihre Initiation lag vermutlich im Bereich der Deletion von D1701-V, da dort keine Transkripte nachweisbar waren, und liefen über den intergenischen Bereich hinweg, weit in das A24R Gen hinein. Gestützt wird diese Vermutung durch die Detektion eines Transkripts vergleichbarer Größe (ca. 4,8 kb) mit einer cRNA, die sense zur mRNA des *rpo* Gens orientiert war (Abb. 4.6.2C, D1701-B).

Mit dieser Sonde, sense zur *rpo* mRNA konnten noch weitere kleinere mRNAs nachgewiesen werden (ca. 1,65 kb, 1,75 kb, 2,4 kb und 2,8 kb), deren Größen zwischen den Stämmen D1701-B und D1701-V nicht variierten. Folglich konnte es sich um Transkripte handeln, die von der Deletion in D1701-V nicht betroffen waren. Eine Zugehörigkeit dieser Transkripte zu bekannten Genen ließ sich mit den bisherigen Daten nicht finden. Ähnliches galt für die ca. 4,8 kb große mRNA, die bei D1701-V nicht detektierbar war und aufgrund der Deletion in

D1701-V fehlt oder verändert ist. Zusätzliche Experimente sind notwendig, um die Transkripte zu charakterisieren.



**Abb. 4.6.3: D1701 HindIII IJG-Region. Zusammenfassung der gesicherten Ergebnisse aller untersuchten mRNAs. Dargestellt sind die mRNAs, die sich über ss cRNA- als auch dsDNA-Sonden nachweisen und sich mit vorhandenen Sequenzinformationen abstimmen ließen. Pfeil: Länge und Orientierung der unterschiedlichen mRNAs; gepunkteter Pfeil: Länge und Orientierung von mRNAs, die durch die Deletion beeinflusst scheinen.**

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im intergenischen Bereich der Gene A24R (rpo132) und ati2 sich die Deletion des Stammes D1701-V durch fehlende Transkripte im Vergleich zu D1701-B dokumentieren ließ (Abb. 4.6.2D, E). Weiter konnten mRNAs nachgewiesen werden, die offensichtlich von beiden Orientierungen ausgehend (ati2 und rpo132) in der späten Phase der Virusreplikation über den intergenischen Bereich hinweg transkribiert werden. Eine besondere Situation wie bei den oben genannten Kuhpockenvirus in bezug auf ein regulatorisches Element zur Modifikation später Transkripte ließ sich aus den Ergebnissen für ORFV D1701 nicht ableiten.



#### 4.7 Herstellung und Selektion von D1701-BrV

Aufgrund der Tierexperimente (4.4) und der genomischen Veränderungen in D1701-V (4.5 und 4.6) konnte die Frage nach der biologischen Funktion von *vegf-e* für D1701 *in vivo* nicht beantwortet werden. Daher sollte nun in einem neuen Ansatz das *vegf-e* Gen im Stamm D1701-B zuerst deletiert und in einem zweiten Schritt wieder restauriert werden.

Zur Herstellung des rekombinanten, *vegf-e*<sup>-</sup> ORFV D1701-BrV wurde das Plasmid pMT10 (Henkel 1997) und das an BK-Kl 3A adaptierte D1701-B Virus verwendet, in welchem die für D1701-V beschriebenen Deletionen nicht vorhanden waren. Die Herstellung und Selektion eines *vegf-e*-negativen und *lacZ*/*xgpt*-positiven D1701-B erfolgte wie bereits für D1701-V beschrieben (4.1) mit den Bedingungen für BK-Kl3A-Zellen (3.16.1 und 2.4). Aus dieser Selektion ging das *vegf-e*<sup>-</sup>/*lacZ*<sup>+</sup>/*xgt*<sup>+</sup>, auf BK-Kl3a Zellen adaptierte Orf Virus **D1701-BrV** hervor.

#### 4.8 Herstellung und Selektion von D1701-BrVres

Die Herstellung und Selektion der Revertanten D1701-BrVres erfolgte analog dem für D1701-VrVres beschriebenen Weg (4.2) unter Verwendung von BK-Kl3A Zellen und der Rekombinanten D1701-BrV. Die Plaquereinigung erfolgte wiederum über vier Runden mit blau/weiß Selektion ohne die Verwendung von Selektivmedium. Nach Plaquereinigung, Anzucht einiger Klone und DNA Präparation wurden verschiedene Kandidaten molekular charakterisiert. Die daraus hervorgehende *vegf-e*<sup>+</sup>/*lacZ*/*xgpt*<sup>-</sup> Revertante erhielt die Bezeichnung **D1701-BrVres**.

#### 4.9 Charakterisierung von D1701-BrV und D1701-BrVres

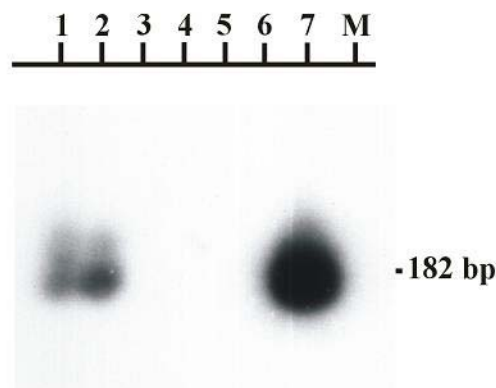
Zur molekularen Charakterisierung wurden PCR Analysen und Southern Blot Hybridisierungen mit der viralen DNAs der verschiedenen Virusklone durchgeführt.

##### 4.9.1 PCR-Analysen

Die PCR-Analysen wurden wie beschriebenen (4.3.1) durchgeführt. Hier gezeigt ist die PCR für die *vegf-e* negative Rekombinante D1701-BrV. Als Kontrolle wurde die parentale D1701-B DNA (Abb. 4.9.1, Spur 1) und die DNA des an Vero-Zellen adaptierten D1701-V (Abb. 4.9.1, Spur 2) verwendet. Desweiteren wurde das Plasmid pORF-PA als Amplifikationskontrolle mitgeführt (Spur 7). Nach Auftrennung der Amplifikate im Agarosegel (nicht gezeigt) und Transfer der DNAs auf eine Nylonmembran erfolgte eine Hybridisierung mit der *vegf-e* spezifischen Sonde (Abb. 4.9.1). Es ist zu erkennen, dass nach

Hybridisierung des 182 bp großen Amplifikats mit Hilfe der viralen DNAs der Wildtypen (Spuren 1 und 2) detektiert werden konnte, ebenso wie mit pORF-PA DNA (Spur 7). Ferner zeigte die Hybridisierung, dass in drei unterschiedlichen D1701-BrV Klonen beide Kopien des *vegf-e* Gens erfolgreich deletiert worden waren (Spuren 3 bis 5).

Parallel hierzu wurde, wie unter 4.3.1 beschrieben, eine 42K-spezifische PCR durchgeführt, welche bei allen viralen DNAs das erwartete 1150 bp große 42K-spezifische Fragment amplifizierte (nicht gezeigt).



**Abb.: 4.9.1: Vegf-e spezifische PCR mittels der Primer ORF15 und ORF 26. Nach Transfer der DNA auf eine Nylonmembran wurde eine Southern Blot Hybridisierung mit einer  $^{32}\text{P}$ -markierten *vegf-e* spezifischen Sonde durchgeführt (Exposition des Röntgenfilms: über Nacht). Als Matrizen-DNA wurde jeweils 100 ng eingesetzt: Spur 1: D1701-B DNA; Spur 2: D1701-V DNA, Spuren 3-5: 3 verschiedenen D1701-BrV Klone; Spur 6: Negativkontrolle, Wasser an Stelle von DNA; Spur 7: Positivkontrolle, Plasmid pORF-PA; M: 1 kb Größenmarker. Zu erkennen ist ein starkes Signal des Amplifikates mit der Plasmid-DNA (Spur 7) und zwei schwächere spezifische Signale der PCR-Produkte der beiden Wildtyp-DNAs (Spuren 1 und 2).**

#### 4.9.2 Southern Blots

Die viralen DNAs von D1701-B, D1701-BrV und D1701-BrVres wurden mit den Restriktionsendonukleasen *Hind*III, *Eco*RI, *Bam*HI und *Kpn*I gespalten und mittels Southern Blot Hybridisierung die korrekte Insertion der Markergen-Kassette (*lacZ/xgpt*, 3,86 kbp) überprüft. Die Insertion der *lacZ-xgpt* Kassette führte je eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle der genannten vier Enzyme ein (Abb. 4.3.2E, unterstrichene Enzyme). Wie schon in 4.3.2 für D1701-VrV beschrieben, hatte dies zur Folge, dass an

die Stelle der ursprünglichen DNA Fragmente *Hind*III H/H', *Eco*RI C/C', *Bam*HI A und C und *Kpn*I F/F' die neuen Fragmente *Hind*III H1/H1' (5,7 kbp) H2/H2' (3,5 kbp), *Eco*RI C1/C1' (12,1 kbp) C2/C2' (6,6 kbp), *Bam*HI A1 (58,0 kbp) und A2 (2,8 kbp), C1 (20,0 kbp) und C2 (2,8 kbp) und *Kpn*I F1/F1' (11,8 kbp) und F/F' (3,1 kbp) treten. Im Unterschied zu D1701-VrV war das *Bam*HI Fragment A1 jedoch entsprechend der Deletionen in D1701-VrV und dem damit veränderten Restriktionsmuster, um ca. 6,0 kbp vergrößert. Bei der ORFV-Rekombinanten D1701-VrV war ebenfalls das *Bam*HI Fragment C1 von der Deletion betroffen, jedoch erfolgte durch die Deletion am linken Genomende eine Fusion mit dem benachbarten *Bam*HI G Fragment, wodurch die Fragmentgröße des neuen Fragments C annähernd gleich blieb.



Abb. 4.9.2: Charakterisierung von D1701-B, -BrV und -BrVres durch Southern Blot hybridisierung. Virale DNA von D1701-B, -BrV und -BrVres wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Hind*III, *Eco*RI, *Bam*HI und *Kpn*I verdaut und im 0,7% EtBr-Agarosegel aufgetrennt. Nach Transfer der Fragmente auf einen Nylon Membran (N<sup>+</sup>-Hybond, Fa Amersham) wurde der Blot nacheinander mit <sup>32</sup>P-markierten, spezifischen Sonden hybridisiert. A: lacZ-spezifische Sonde; B: vegf-e spezifische Sonde; Die entsprechenden Fragmente sind im Text genauer beschrieben.

Wie erwartet, zeigten die Restriktionsfragmente von D1701-B und D1701-BrVres keine Hybridisierungssignale mit einer <sup>32</sup>P-markierten lacZ-spezifischen Sonde (Abb. 4.9.2A). Bei D1701-BrV wurde nur jeweils eines der beiden neu entstandenen Fragmente detektiert (vgl. 4.3.2), da die neuen Schnittstellen außerhalb des lacZ Gens lagen und somit nur das Fragment, welches das lacZ Gen trägt detektiert wurde. Eine <sup>32</sup>P-markierte, vegf-e

spezifische Sonde detektierte die Fragmente *Hind*III H/H', *Eco*RI C/C', *Bam*HI A und C und *Kpn*I F/F' (Abb. 4.9.2B), welche die *veg*f-e kodierenden Sequenzen enthalten. Im Gegensatz dazu wurde mit der D1701-BrV DNA kein Hybridisierungssignal erhalten. (Abb. 4.9.2B). Die Ergebnisse zeigten, dass die authentischen Fragmente der parentalen D1701-B DNA und der Revertanten D1701-BrVres mit der *veg*f-e spezifischen Sonde hybridisierten.

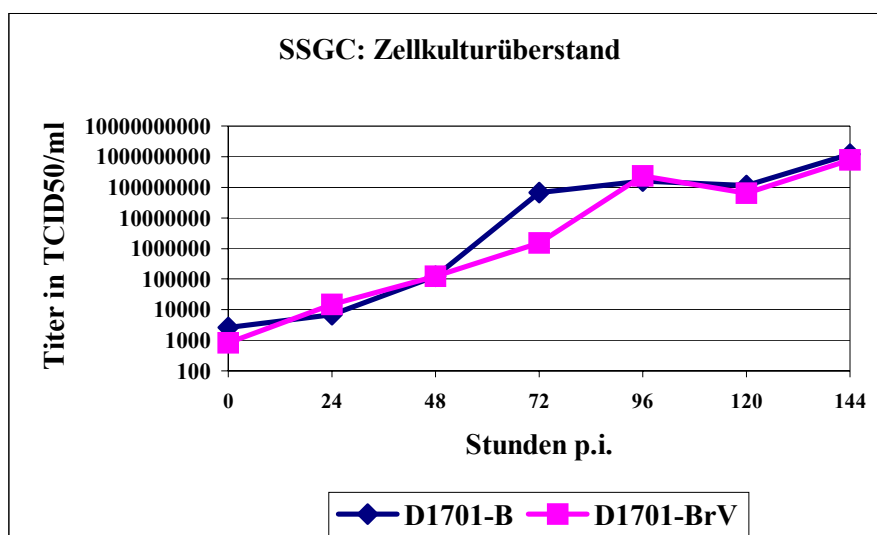
Zusammenfassend kann man sagen, dass auch in diesem Fall die Southern Blothybridisierung Ergebnisse die erfolgreiche Deletion beider Kopien des *veg*f-Gens, sowie die korrekte Insertion der Markergen-Kassette in D1701-BrV, als auch umgekehrt die erfolgreiche Deletion der Markergen-Kassette und korrekte Re-Insertion des *veg*f-e Gens in D1701-BrVres zeigten. Des weiteren ist auch hier die Homogenität der einzelnen Populationen gezeigt, da es zu keiner Hybridisierung der *lac*Z-spezifischen Sonde mit dem parentalen Virus D1701-B bzw. mit der Revertanten D1701-BrVres kam und umgekehrt ein Hybridisierungssignal mit einer *veg*f-e spezifischen Sonde bei D1701-BrV fehlte.

#### 4.9.3 Einschrittwachstumskurve: D1701-B und D1701-BrV

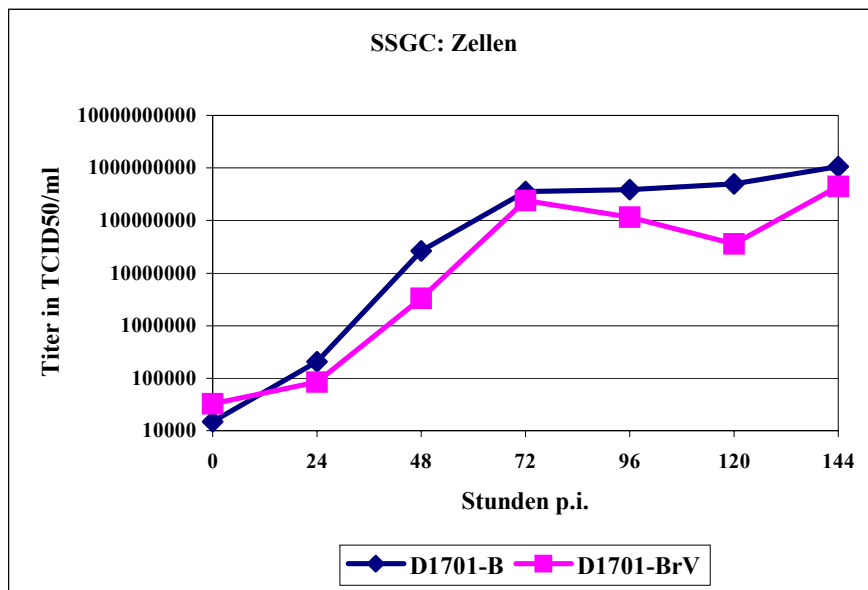
Nach der molekularen Analyse zur Überprüfung der korrekten Insertion der Markergenkassette, erfolgte auch für D1701-BrV ein Vergleich der Wachstumseigenschaften mit dem parentalen D1701-B *in vitro*. Hierzu wurde, wie bereits unter 4.3.6 beschrieben, eine Einschrittwachstumskurve durchgeführt, wobei der Titer der einzelnen Zeitpunkte durch drei unabhängige Titrationen als TCID<sub>50</sub> bestimmt wurde.

Plaquemorphologie und Plauegröße unterschieden sich zwischen D1701-BrV und D1701-B nicht (nicht gezeigt).

A



B



C

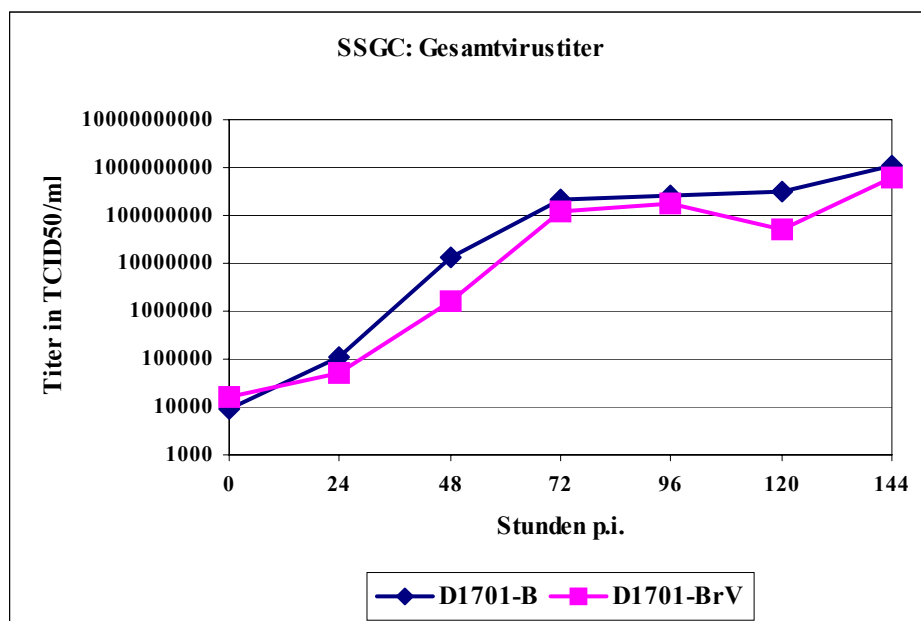


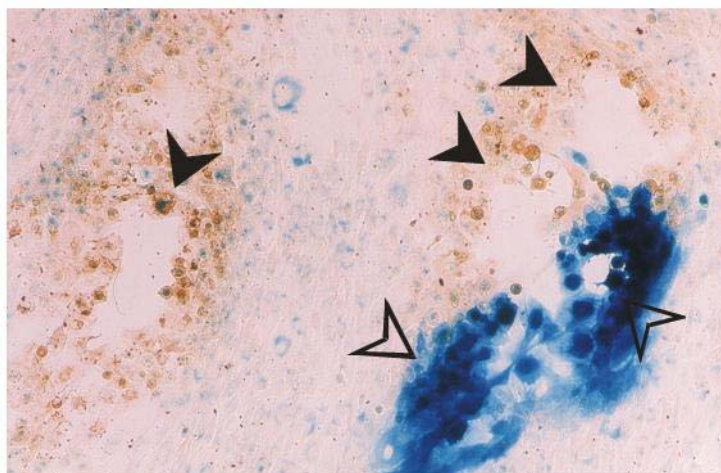
Abb. 4.9.3: Ein-Schritt-Wachstumskurve. Vergleich des *in vitro* Wachstumsverhalten von D1701-B und D1701-BrV in Bezug auf Virusfreisetzung (A) und Virusreplikation (B). Die Einzelwerte sind der Durchschnitt von drei unabhängigen Ereignissen. Die BK-K13A Zellen wurden mit einer MOI von 2,0 durch einstündige Adsorption infiziert, die Zellen und der Zellkulturüberstand nach angegebenen Zeiten getrennt voneinander geerntet und titriert. Angegeben ist der durchschnittliche Titer in TCID<sub>50</sub>/ml („tissue culture infectious dose“).

Die Ergebnisse zeigten zwischen D1701-B und der Rekombinanten D1701-BrV nur einen geringen Unterschied im Wachstumsverhalten. Dieser Unterschied zeigte sich in einer verlangsamt Replikation 48 Stunden (Abb. 4.9.3B) bzw. in einer verzögerten

Virusfreisetzung in den Zellkulturüberstand 72 Stunden nach der Infektion (Abb. 4.9.3A). Jeweils 24 Stunden später war diese Verzögerung wieder kompensiert. Eine deutliche Verzögerung in Replikation und Virusfreisetzung, wie bei D1701-VrV beschrieben (4.3.6), war im Vergleich von D1701-BrV und D1701-B nicht zu erkennen. Der Gesamtvirustiter von D1701-BrV und D1701-B betrug ca.  $2 \times 10^8$  pfu/ml (Abb. 4.9.3C) und war damit vergleichbar mit den Virustitern, die für D1701-VrV und D1701-V nach diesen Zeiten (144 h pi) erreicht worden waren.

#### 4.9.4 Mischungsexperiment von D1701-B und D1701-BrV

Da die Unterschiede zwischen D1701-BrV und D1701-B geringer waren, als bei D1701-V und D1701-VrV, wurden die beiden Viren im direkten Vergleich in einem Mischungsexperiment getestet. D1701-B und D1701-BrV wurden in den Verhältnissen 5:1, 1:1 und 1:5 gemischt und diese Mischungen zur Infektion von BK-K13A Zellen verwendet. Die BK-K13A Zellen wurden in zwei parallelen Ansätzen mit einer MOI von 2,0 infiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Infektion geerntet. Nach Freisetzung der Viren aus den Zellen durch Frieren und Tauen wurden beide Ansätze in jeweils zwei Titrationen analysiert (vgl. 4.3.6, Titrationsschema), so dass jeder Wert aus vier unabhängigen Einzelergebnissen bestand.



**Abb. 4.9.4.1: Mischinfektion.** Zur Differenzierung zwischen Wildtyp-Plaques (D1701-B, volle Pfeilspitzen, braun<sup>+</sup>/blau<sup>-</sup>) und Plaques rekombinanter Viren (D1701-BrV, offene Pfeilspitzen, braun<sup>+</sup>/blau<sup>+</sup>) in der Zellkultur wurden zuerst die rekombinanten D1701-BrV über eine lacZ-Färbung (3.27.6) und anschließend die Wildtyp-Plaques (D1701-B) mit Hilfe des mAk 4D9 (1:100; detektiert das Haupthüllprotein von ORFV, 3.27.5), markiert und immunhistochemisch dargestellt. Eine gute Differenzierung zwischen rekombinanten und Wildtyp Plaques, sowie eine quantitative Analyse war somit möglich.

Die Auswertung der Titrationsen erfolgte 6 Tage nach Infektion durch Fixierung der Zellen mit dem Fixativ B (3.27.5) und anschließender lacZ-spezifischer bzw. ORFV spezifischer Färbung. Rekombinante Plaques von D1701-BrV ließen sich durch ein lacZ-spezifisches Detektionsverfahren über Kalium-ferri-/Kalium-ferrocyanid und Blaufärbung sichtbar machen (3.27.6). Anschließend wurden alle infizierten Zellen mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers 4D9 (Czerny et al., 1997), der das Haupthüllprotein 42K von ORFV erkennt, markiert und immunhistochemisch nachgewiesen (3.27.5). Eine gute Differenzierung zwischen blau- und braun-gefärbten D1701-BrV bzw. nur braun-gefärbten D1701-B Plaques ermöglichte eine Quantifizierung der verschiedenen Plaques zur Bestimmung des tatsächlichen Verhältnisses der Viren zueinander. In der Abbildung 4.9.4.2 sind die Ergebnisse der drei verwendeten Mischungsverhältnisse von D1701-B und D1701-BrV in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Die Grafik zeigt, dass sich in den ersten 24 Stunden bei allen Mischungsverhältnissen ein Wert einstellte, der bis zum Beobachtungsende relativ konstant blieb. So bleibt das Mischungsverhältnis von 1:1 (D1701-B : D1701-BrV) bei einem Wert von ca. 1,0. Die beiden anderen Mischungsverhältnisse 5:1 und 1:5 bewegten sich während des Beobachtungszeitraumes in einem konstanten Bereich. Es gab somit keinen nachweisbaren Wachstumsvorteil des Wildtyps D1701-B (braune Plaques) gegenüber der Rekombinanten D1701-BrV (blaue Plaques) und umgekehrt.

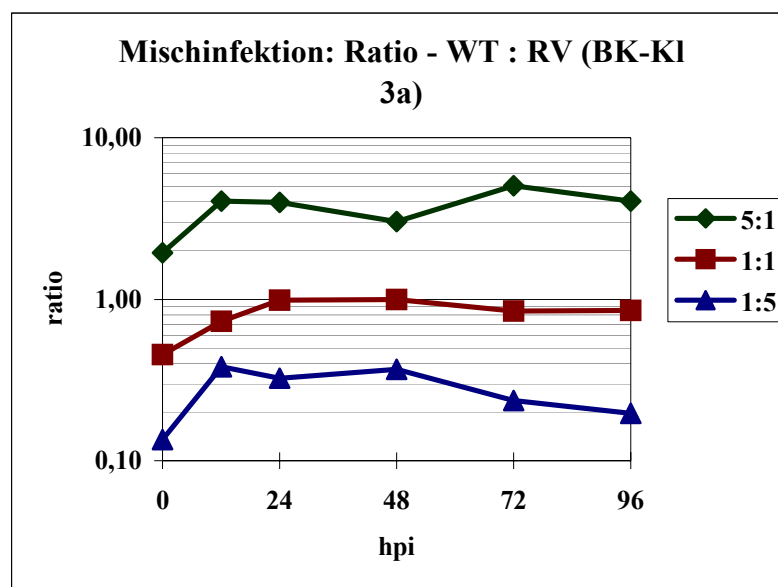


Abb. 4.9.4.2: Mischinfektion von D1701-B und D1701-BrV. D1701-B und D1701-BrV wurden in den Verhältnissen 5:1, 1:1 und 1:5 miteinander gemischt und zur Infektion von BK-KI3A Zellen durch einstündige Adsorption verwendet (MOI 2,0). Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden der Zellkulturüberstand und die Zellen zusammen geerntet und titriert. Durch die Anordnung der

Experimente lagen jedem Wert vier unabhängige Einzelwerte zu Grunde. Aus diesen Werten wurde anschließend das tatsächliche Verhältnis (ratio) der beiden Viren zueinander berechnet.

#### 4.10 Charakterisierung von D1701-B, D1701-BrV und D1701-BrVres im Schaf

Da sich die Deletion des *veg-f* nicht nachteilig auf die *in vitro* Replikation von D1701-BrV D1701-B auswirkte, sollten vergleichende *in vivo* Experimente zeigen, ob die Infektion des natürlichen Wirtes, dem Schaf, ein unterschiedliches Virulenzverhalten der beiden Viren zeigt. In einem ersten Experiment wurde die Rekombinante D1701-BrV mit dem parentalen D1701-B (n=1 Tier) und in einem zweiten Tierexperiment D1701-B mit der Revertanten D1701-BrVres (n=1 Tier) verglichen. Der Versuchsaufbau und -ablauf entsprach dem unter 4.4 beschriebenen. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 4.10 zusammengefasst.

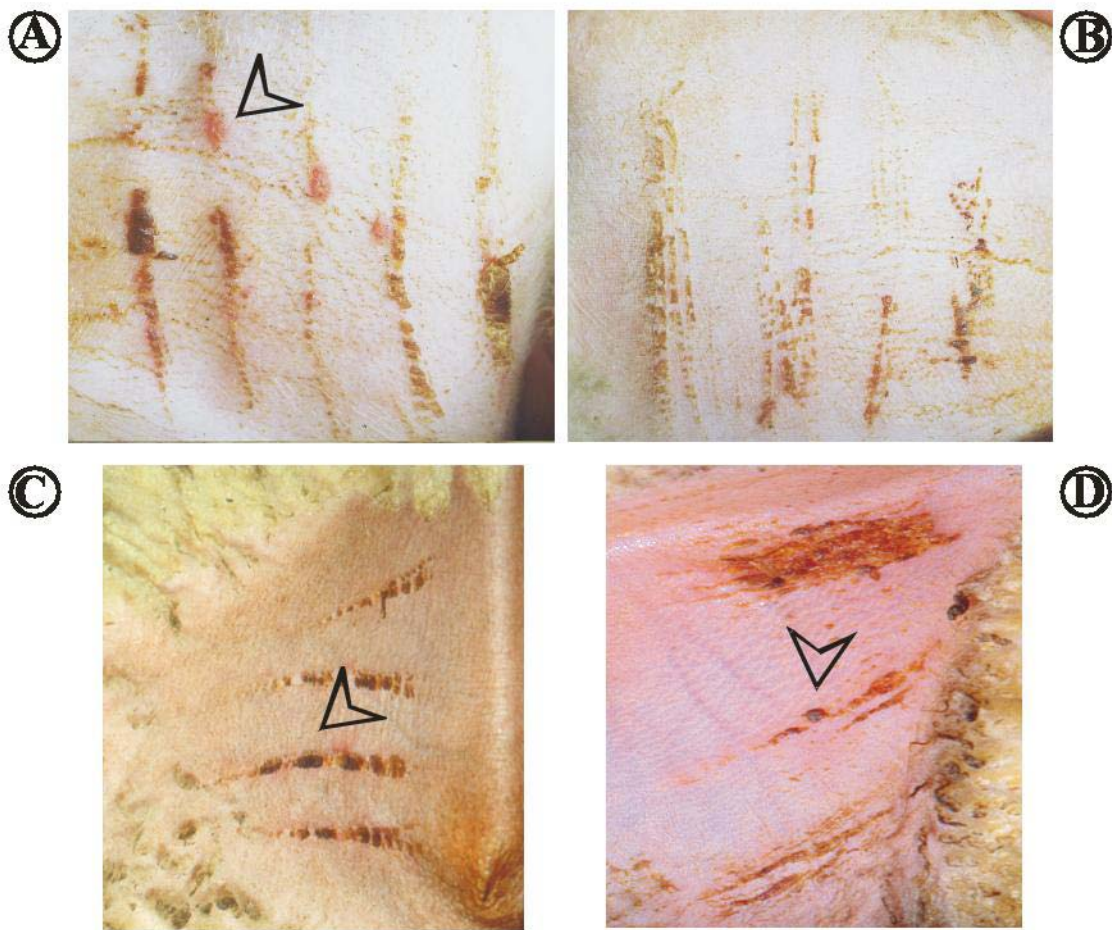
dpi	D1701-BrV	D1701-B	D1701-B	D1701-BrVres
	Exp. 1	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 2
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	1	0	0
4	0	3	1	1
5	0	>3	1	1
6	0	>3	2	2
7	0	>3	2	1
8	0	3	1	0
9	0	2	0	0
10	0	1		
11	0	0		

**Tab. 4.10: Vergleich zwischen D1701-BrV, D1701-B und D1701-BrVres: Dargestellt ist die klinische Beurteilung der Läsionen anhand des Durchmessers einzelner ORFV-spezifischer Pusteln in Abhängigkeit von der Zeit. dpi: days post infectionem (Tage nach der Infektion); die Zahlen 1, 2 und 3 entsprechen dem jeweiligen Pusteldurchmesser in mm.**

Die klinische Bewertung, erfolgte ebenfalls in Anlehnung an Nettleton et al., 1996 und zeigte für das parentale D1701-B als auch für die Revertante D1701-BrVres um den Tag 6 nach der Infektion den höchsten klinischen Score von 2-3. Im Gegensatz dazu fand sich nach Infektion mit der Rekombinanten D1701-BrV keinerlei Orf-typische Läsionsbildung (Abb. 4.10B). Im zweiten Experiment zeigte D1701-B weniger ausgeprägte Läsionen als im Experiment 1, was mit individuellen Unterschieden zwischen den Tieren der einzelnen Experimente erklärt



werden kann. Entscheidend bei den Experimenten was daher der Vergleich von D1701-B zu den Rekombinanten D1701-BrV und D1701-BrVres.



**Abb. 4.10 Charakterisierung *in vivo*. Infektion von Schafen an der Schenkelinnenseite der hinteren Extremitäten mit verschiedenen Orf Viren durch Skarifikation der Haut. In alle Skarifikationslinien („Scare lines“) wurden  $10^7$  pfu/ml der verschiedenen ORFV appliziert. Die Abbildungen A-D zeigen den Stand der Infektion nach 7 Tagen. A und C: D1701-B, mit unterschiedlicher klinischer Beurteilung; B: D1701-BrV; D: D1701-BrVres; Einzelne kleine Pusteln sind mit offenen Pfeilspitzen markiert.**

In den Abbildungen 4.10A und C sind die Skarifikationslinien von zwei Tieren abgebildet, welche 6 Tage zuvor mit D1701-B skarifiziert worden waren. Es ist zu erkennen, dass beide Tiere, obwohl sie mit der identischen Viruspräparation des parentalen D1701-B infiziert worden waren, eine unterschiedliche klinische Beurteilung zeigten. In der Abbildung A sind deutlich ORFV-spezifische Pusteln zu erkennen, die einen Durchmesser von 3 mm besaßen, in der Abb. B wurden die leichten Rötungen mit 1 mm beurteilt. Erklärt werden kann dieser Unterschied mit einer individuell differenten Empfänglichkeit der Tiere gegenüber einer ORFV Infektion oder mit einer eventuell weniger erfolgreichen Skarifikation. Entscheidend war jedoch, dass es einen deutlichen Unterschied zwischen dem parentalen D1701-B und der

vegf-e-negativen Mutante D1701-BrV in der Läsionsbildung gab. So waren bei D1701-BrV die Skarifikationslinien nach 12 Tagen vollständig verheilt. Die Revertante D1701-BrVres, in welcher das vegf-e Gen wieder restauriert worden war, verhielt sich analog dem parentalen D1701-B (Tab. 4.10.2, Abb. 4.10D). Aber auch hier waren die Skarifikationslinien noch vor dem Tag 20 nach der Infektion verheilt. Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass das vegf-e Gen bei der Virulenz bzw. Läsionsbildung im Schaf eine wichtige Rolle spielt.

## Teil B

**4.11 Herstellung der BORNA-Vakzine D1701-VrVp40 (Dp40)**

Erste Immunisierungsexperimente mit D1701-VrV in nicht permissiven Tieren (Maus) zeigten, dass nach dreimaliger intramuskulärer Applikation, im Abstand von 4 Wochen spezifische Antikörpertiter gegenüber dem inserierten lacZ Gen von D1701-VrV nachgewiesen werden konnten (Rziha et al., 2000). Um das Potential eines auf D1701-VrV basierenden viralen Vektors im nicht permissiven System zu testen, wurde das Modell der Borna Disease Virus (BDV)-Infektion bei der Ratte gewählt. Hierbei handelt es sich, um eine zentralnervöse Erkrankung mit immunpathologischem Verlauf. So führt die intracraniale (i.c.) Applikation von  $5 \times 10^3$  bis  $1 \times 10^4$  ffu an BDV in 6 Wochen alten Ratten nach ca. 20 Tage zum Tod der infizierten Tiere. Welchen Einfluss eine auf D1701-VrV basierende BDV-spezifische Rekombinante auf den Verlauf der Erkrankung nach unterschiedlicher Immunisierung hat, soll in diesem zweiten Teil der Promotionsarbeit gezeigt werden.

Ausgehend von D1701-VrV wurde eine Rekombinante konstruiert, in welcher die bakteriellen Gene lacZ und xgpt gegen das p40 Gen (Nukleoprotein) des BDV ausgetauscht wurde. Das p40 Nukleoprotein wurde ausgewählt, da u.a. gegen dieses als erstes nach einer BDV Infektion eine humorale Immunantwort erfolgte (Hatalski et al., 1995) und das Hauptziel der zellulären, CD8<sup>+</sup> vermittelten Immunantwort in der Ratte darstellt (Planz & Stitz 1999).

**4.12 Konstruktion des Transferplasmids pMT40**

Aus dem Gehirn BDV infizierter Tiere wurde Gesamtzell-RNA isoliert und in einer RT-PCR eingesetzt, um cDNAs zu generieren. Diese cDNAs wurden freundlicherweise von Dr. O. Planz, BFAV) zur Verfügung gestellt und als Matrizen für eine PCR genutzt. Mit je 30 ng der beiden partiell bindenden Primer p40H und p40E (2.24), 4,5 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 5 µl dNTP-Mix (jedes Nukleotid 0,25 mM), 5 µl 10x Reaktionspuffer, 2 µl des cDNA-Ansatzes und 0,5 µl (2,5 Einheiten) Taq-Polymerase in einem Gesamtansatz von 50 µl konnten nach einem sog., „hot-start“, einem Annealing bei 50°C für 1 Minute und einer Elongation bei 72°C für eine Minute und insgesamt 40 Zyklen die beste Amplifikation des p40-spezifischen 1140 bp großen Fragments erzielt werden (nicht gezeigt). Dieses Fragment wurde mit dem Klonierungs-Kits von Invitrogen gemäß den Herstellerangaben in das Plasmid pCR<sup>®</sup>II TOPO kloniert. Es entstand das Plasmid p40H/E1 (Abb. 4.12).

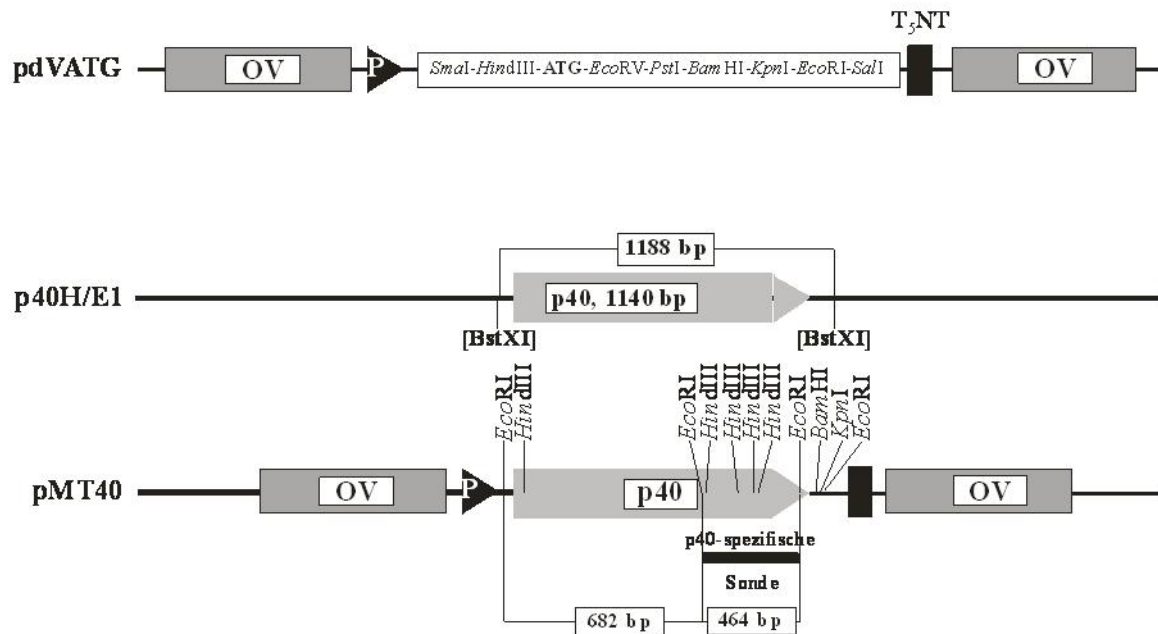


Abb. 4.12: Konstruktion des Transferplasmids pMT40. pdVATG: Transferplasmid zur Generierung von rekombinanten ORFV. Das 1188 bp großes *Bst*XI Fragment aus p40H/E1 wurde in den *Hind*III und *Eco*RI geschnittenen Transfervektor pdVATG kloniert. Es entstand das Plasmid pMT40; MCS: „multiple cloning site“ (Bereich vieler Restriktionsendonukleaseschnittstellen); P: originärer, frühe Promoter des *veg*-e Gens; OV: dem *veg*-e Gen benachbarte, dem ORFV D1701-V Genom homologe Bereiche für die homologe Rekombination zwischen Plasmid- und Virus-DNA.

Aus diesem Plasmid wurde das p40 Gen als 1188 bp großes *Bst*XI Fragment herausgeschnitten und in den neu konstruierten Vektor pdVATG (~6,0 kbp, 2.3) umklont. Hierzu war das Plasmid pdVATG mit den Restriktionsendonukleasen *Hind*III und *Eco*RV geschnitten, so dass das künstliche Translationsstartcodon ATG entfernt wurde. Die entstandenen Einzelstrang-Überhänge wurden mit Hilfe der Klenow-Polymerase durch Inkubation ohne dNTPs abgedaut. Die Ligation von Vektor und Insert erfolgte in einem Verhältnis von 1:5 bei 14°C über Nacht im Wasserbad. Daraus resultierte das ~7,15 kbp große Transferplasmid pMT40 (Abb. 4.12). Die richtige Insertion von p40 wurde über asymmetrische Restriktionsspaltungen und Sequenzierung geprüft (nicht gezeigt).

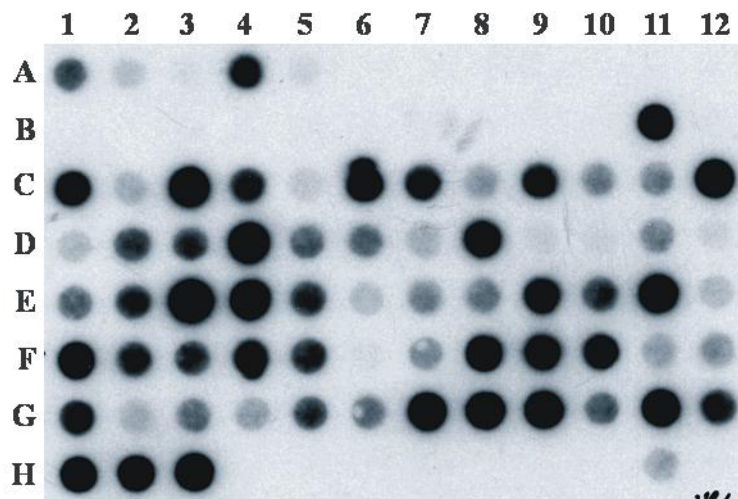
#### 4.13 Herstellung und Selektion des rekombinanten Dp40

Die Herstellung des rekombinanten, p40-positiven ORFV Dp40 erfolgte wie beschrieben. Durch homologe Rekombination zwischen pMT40 und D1701-VrV entstand das rekombinante ORFV Dp40, in welchem das Nukleoprotein p40 des BDV unter der Kontrolle des authentischen, frühen VEGF-E Promotors steht und gegen die bakteriellen Gene *lacZ* und *xgpt* ersetzt wurde. Die Selektion erfolgte wie für die Rekombinante D1701-VrVres bereits

beschrieben (4.2) über blau/weiß Selektion ohne Selektivmedium und vier Plaquereinigungsschritte. Zusätzlich zur blau/weiß Selektion wurden im Rahmen der Plaquereinigung, nach den jeweiligen Zwischenvermehrungen der Einzelplaques deren Zellkulturüberstand auf DNA- (Southern Blothybridisierung) und Protein-Ebene (Immunhistochemie) analysiert.

#### 4.13.1 Selektion mittels Southern Blothybridisierung

DNA aus dem Zellkulturüberstand der Einzelplaques (100 µl) wurden in einer Slot Blot oder Dot Blot Apparatur an eine Hybond N<sup>+</sup> Nylonmembran kovalent gebunden. Die Hybridisierung erfolgte mit einer p40-spezifischen <sup>32</sup>P-markierten Sonde (435 nt großes *Eco*RI Fragment von p40H/E1) bei 52°C und 40% Formamid nach dem für die Southern Blothybridisierung bereits beschriebenen Protokoll. In der Abbildung 4.13.1 sind die Zellkulturüberstände von 93 verschiedenen Einzelplaques nach Dot Blothybridisierung dargestellt. Die Zwischenvermehrung der Einzelplaques war zum Zeitpunkt der Ernte unterschiedlich weit vorangeschritten (die Lyse der Zellen lag zwischen 20 und 80%), was die unterschiedlichen Signalstärken der Einzelplaques erklärt (Abb. 4.13.1).



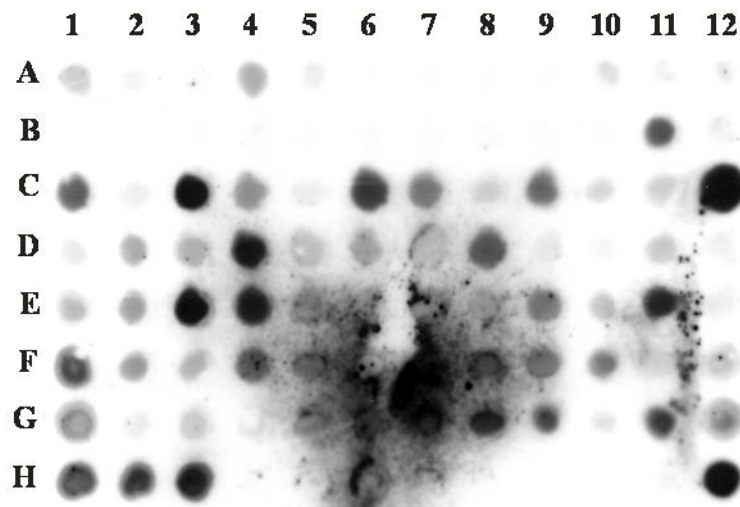
**Abb. 4.13.1:** Southern Blothybridisierung von Zellkulturüberständen nach Zwischenvermehrung von Einzelplaques. H10: Negativ-Kontrolle (nicht infizierte Vero-Zellen); H11 und H12 sind Positiv-Kontrollen; H11: 10 ng pMT40; H12: 1 ng pMT40. Als Sonde wurde ein 464 nt großes p40 *Eco*RI Subfragment verwendet.

Als Negativ-Kontrolle wurde der Zellkulturüberstand von nicht infizierten Zellen (Abb. 4.13.1, H10) und als Positiv-Kontrolle das Transferplasmid pMT40 in Konzentrationen von

10 bis 1 ng (Abb. 4.14.1, H11, H12) aufgetragen. Wie aus der Abbildung 4.13.1 zu ersehen ist, zeigten die Plaques C3, C12, D4, E3-4, G7-9, G11 und H1-3 die stärksten Hybridisierungssignale. Aus diesen Einzel-Plaques erfolgte die weitere Selektion p40-positiver rekombinanter D1701-Klone. Das Signal der Positiv-Kontrolle war erst nach längerer Filmexposition deutlich zu erkennen (nicht gezeigt).

#### 4.13.2 Selektion mittels Immuno-Dot-Blot

Parallel zur Slot Blothybridisierung wurden 100 µl des Zellkulturüberstandes jedes Einzelplaqueisolates in einer Dot Blot Apparatur auf eine Teflonmembran (PVDF Membran) aufgebracht und nach dem ECL-Protokoll für Western Blots mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen das Nukleoprotein p40 getestet. Analog zu der Dot Blothybridisierung zeigten die Klone auch nach der ECL-Reaktion aufgrund unterschiedlicher Virustiter unterschiedliche Signalstärken (Abb. 4.13.2). Die Gründe hierfür wurden bereits oben genannt.



**Abb. 4.13.2: Immuno-Dot-Blot der Zellkulturüberstände nach Zwischenvermehrung der Einzelplaques.** Es sind die gleichen Einzelplaques aufgetragen wie in Abb. 4.14.1; jedoch wurden andere Kontrollen mitgeführt. H10 und H11 sind Negativ-Kontrollen: H10: nicht infizierte Vero-Zellen; H11: nicht infizierte CRL-Zellen (Hamsterzellen); Positiv-Kontrolle waren persistent mit BDV infizierte CRL-Zellen (H12). 1. mAk-4 (1:100), 2. Antikörper rabbit $\alpha$ mousePO (1:3000). Expositionszeit: 20 Sekunden.

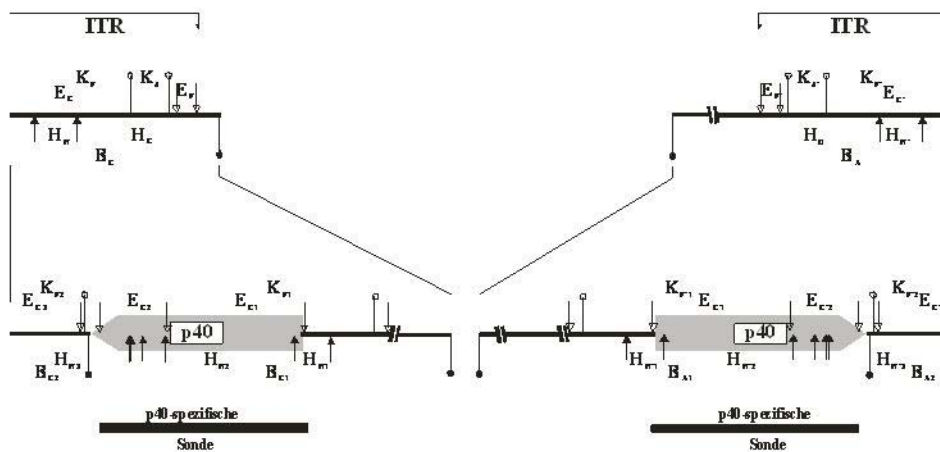
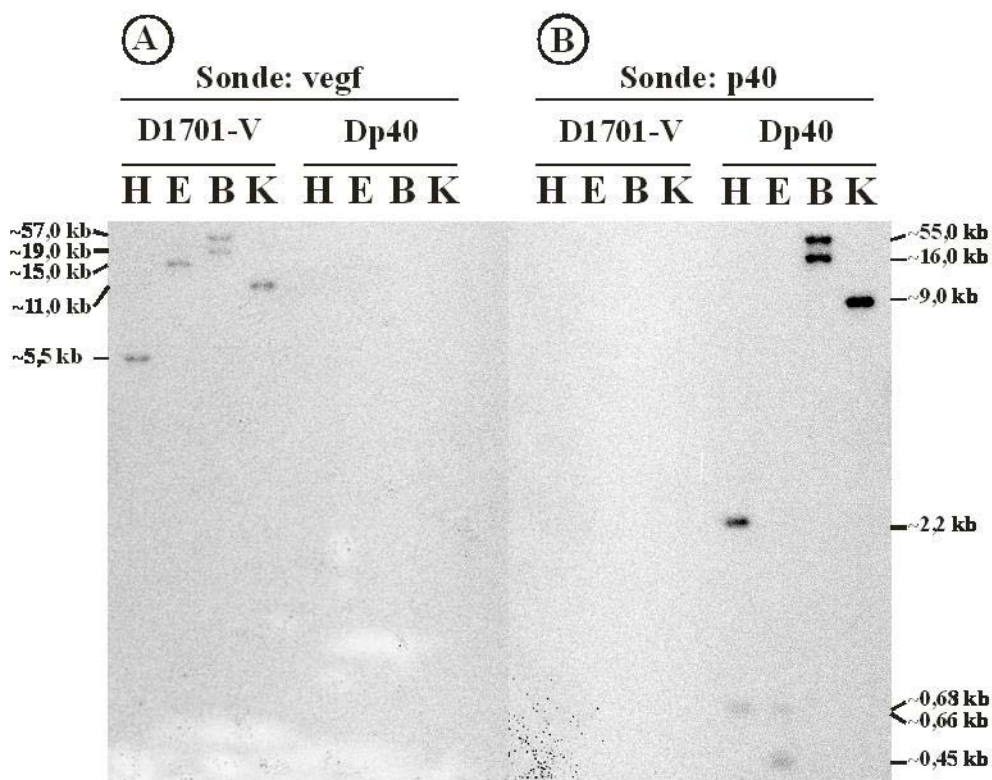
Die deutlichsten Signale wurden bei den gleichen Virusklonen gefunden, die auch in der Slot Blothybridisierung am stärksten waren (C3, C12, D4, E3, E4, G7-9, G11 und H1-3). Als Kontrollen wurden permanent BDV-infizierte (Abb. 4.13.2, H12) sowie nicht infizierte Zellen mitgeführt (Abb. 4.13.2, H10-11). Diese kombinierten Analysen gestalteten die Selektion der



Virusrekombinanten sehr effektiv und führten schnell zur Isolierung des rekombinanten p40-positiven ORFV D1701-VrVp40 (im Folgenden Dp40 abgekürzt).

#### 4.14 Charakterisierung von Dp40 durch Southern Blothybridisierung

Die viralen DNAs von D1701-V und Dp40 wurden mit den Restriktionsendonukleasen *Hind*III, *Eco*RI, *Bam*HI und *Kpn*I verdaut, die Fragmente im 0,7%igem Agarosegel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit der schon beschriebenen <sup>32</sup>P-markierten vegf-e-spezifischen Sonde hybridisiert. Sie detektiert für D1701-V die bereits geschilderten Fragmente (4.3.2 und Abb. 4.14).



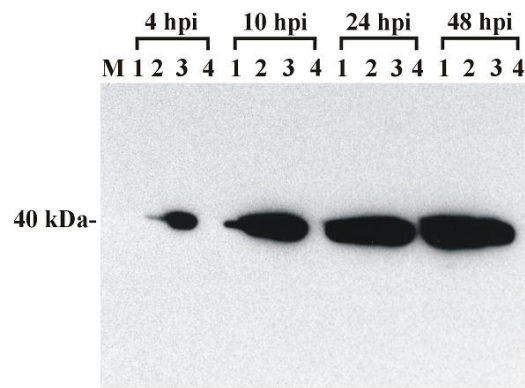
**Abb. 4.14: Charakterisierung von Dp40 durch Southern Blot Hybridisierung. Restriktionsspaltung mit den Endonukleasen *HindIII*(H), *EcoRI* (E), *BamHI* (B) und *KpnI*(K) der viralen DNAs von ORFV D1701-V (WT) und der Rekombinanten Dp40. A: Hybridisierung mit einer <sup>32</sup>P-markierten vegf-e-spezifischen Sonde (4.3.2); B: Hybridisierung mit einer <sup>32</sup>P-markierten p40-spezifischen Sonde (1140 bp PCR-Fragment). C: Schematische Darstellung des Bereichs innerhalb der ITR-Region von D1701-V und der Rekombinanten Dp40, in welcher die Substitution des vegf-e Gens durch das BDV p40 Gen erfolgte. Es wurden nur die für das Verständnis der gezeigten Restriktionsanalysen notwendigen Schnittstellen von *EcoRI* (E), *HindIII* (H), *KpnI* (K) und *BamHI* (B) eingezeichnet (nicht maßstabsgetreu).**

Bei der Rekombinante Dp40 wird kein Signal induziert, da hier das vegf-e Gen durch das p40 Nukleoproteing von BDV ersetzt wurde. Umgekehrt können mit einer <sup>32</sup>P-markierten p40-spezifischen Sonde bei Dp40 die erwarteten Banden detektiert werden (Abb. 4.14B), während die Hybridisierung mit der WT DNA negativ blieb. Die neuen, im Vergleich zum WT veränderten Banden, erklären sich durch die Einführung neuer *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI*, *KpnI* Schnittstellen (Abb. 4.12 und Abb. 4.14C) und durch die unterschiedliche Größe des p40 Gens (1188 nt) im Vergleich zu dem originären vegf-e Gen (323 nt). Die ~5,5 kbp großen *HindIII* Fragmente H/H' wurden durch Einführung von jeweils 5 Schnittstellen in ihre Größe veränderten, so dass an deren Stelle u.a. die Fragmente von 2,2 kbp (H<sub>H1</sub>/H<sub>H'1</sub>) und 0,66 kbp (H<sub>H2</sub>/H<sub>H'2</sub>) Größe entstanden (Abb. 4.14B, Dp40, Spur H). Durch die Insertion von drei neuen *EcoRI* Schnittstellen wurden u.a. neue Fragmente von 0,68 kbp (E<sub>C1</sub>/E<sub>C'1</sub>) und 0,45 kbp (E<sub>C2</sub>/E<sub>C'2</sub>) aus dem ursprünglich 15 kbp großen Fragment generiert (Abb. 4.14B, Dp40, Spur E). Die neuen Schnittstellen für *BamHI* und *KpnI* veränderten die Größen der Fragmente bei Dp40 von ~57,0 kbp und ~19 kbp auf 55,0 kbp (B<sub>A1</sub>) bzw. 16,0 kbp (B<sub>C1</sub>) für *BamHI* (Abb. 4.14B, Dp40, Spur B) und von ~11,0 kbp auf ~9,0 kbp (K<sub>F1</sub>/K<sub>F'1</sub>) für *KpnI* (Abb. 4.14B, Dp40, Spur K). Die Restriktionsanalysen zeigten, dass die Insertion des Nukleoproteins p40 von BDV, auf beiden Seiten des ORFV Genoms erfolgreich war.

#### 4.15 Genexpression des p40-Proteins *in vitro*

Zur Überprüfung ob und wann die Expression des BDV p40 in Dp40 infizierten Zellen erfolgte, wurden Vero-Zellen mit unterschiedlicher moi (1, 10, 100) infiziert, zu unterschiedlichen Zeitpunkten (4, 10, 24 und 48 Stunden) nach der Infektion geerntet und durch Western Blot Analysen mit p40-spezifischen mAk getestet.





**Abb. 4.15:** Expressionskinetik von p40 in Dp40 infizierten Vero-Zellen. Die Western Blot Analysen wurden mit einer Mischung monoklonaler Mausantikörper (mAk-4, 1:100) und einem Peroxidasegekoppelten Kaninchen $\alpha$ Maus Zweitantikörper (1:3000) durchgeführt; die mit einer moi von 1 infizierten Zellen sind in den Spuren 1, die mit moi 10 in den Spuren 2 und die mit moi 100 in den Spuren 3 aufgetragen worden. Als Negativ-Kontrolle fungierten nicht infizierte Zellen (Spuren4); M: Marker. In jeder Spur wurden ca.  $5 \times 10^4$  Zellen aufgetragen.

In Abbildung 4.15 ist zu erkennen, dass bereits 4 Stunden nach der Infektion in Zellen, die mit einer moi von 10 infiziert wurden, das p40 Protein nachweisbar war und dessen Expression von 10 Stunden bis 24 Stunden nach der Infektion zunahm. In Zellen, die mit niedriger moi (1,0) infiziert worden waren, konnte ein p40-spezifisches Signal ca. 10 Stunden nach der Infektion nachgewiesen werden. Ein klares Signal war in den mit einer moi von 100 infizierten Zellen bereits nach 4 Stunden eindeutig detektierbar. Diese Ergebnisse zeigten, dass eine unterschiedlich starke Expression von p40 in Abhängigkeit von der Zeit und der verwendeten Inokulationsdosis (moi) zu erkennen war. Weiter konnte gezeigt werden, dass eine p40-spezifische Expression bereits früh nach der Infektion stattfindet, entsprechend der Regulation des Fremdgens durch den frühen vegf-e Promoter.

## 4.16 Immunogenität und Protektivität der ORFV Vektorvakzine Dp40 in der Ratte

### 4.16.1 Impfschema

Da es keine Daten für die Verwendung von ORFV D1701 als Vektor gab, erfolgte eine Orientierung an der Literatur, in der andere Vertreter der Pockenviren schon als Vektoren beschrieben worden sind (Taylor & Paoletti, 1988, Paoletti et al., 1984) und an den publizierten Daten von Rziha et. al. (1999). Es wurde somit eine lokale, intramuskuläre (i.m.) und eine systemische, intravenöse (i.v.) Applikation sowie unterschiedliche Anzahlen (1x, 2x und 3x) von Immunisierungen im zweiwöchigem Abstand bei unterschiedlichen Virusdosen ( $1 \times 10^5$  pfu bzw.  $1 \times 10^7$  pfu pro Dosis) zur Immunisierung gewählt. Als Kontrollen wurden

PBS bzw. DgC (D1701-V Rekombinante, Fischer 2002) immunisierte Tiere in den Experimenten mitgeführt. Der Immunisierungseffekt wurde durch intracraniale (i.c.) Belastungsinfektion (sog. Challenge) mit  $5 \times 10^3$  bis  $1 \times 10^4$  ffu an BDV 14 Tage nach der letzten Immunisierung überprüft.

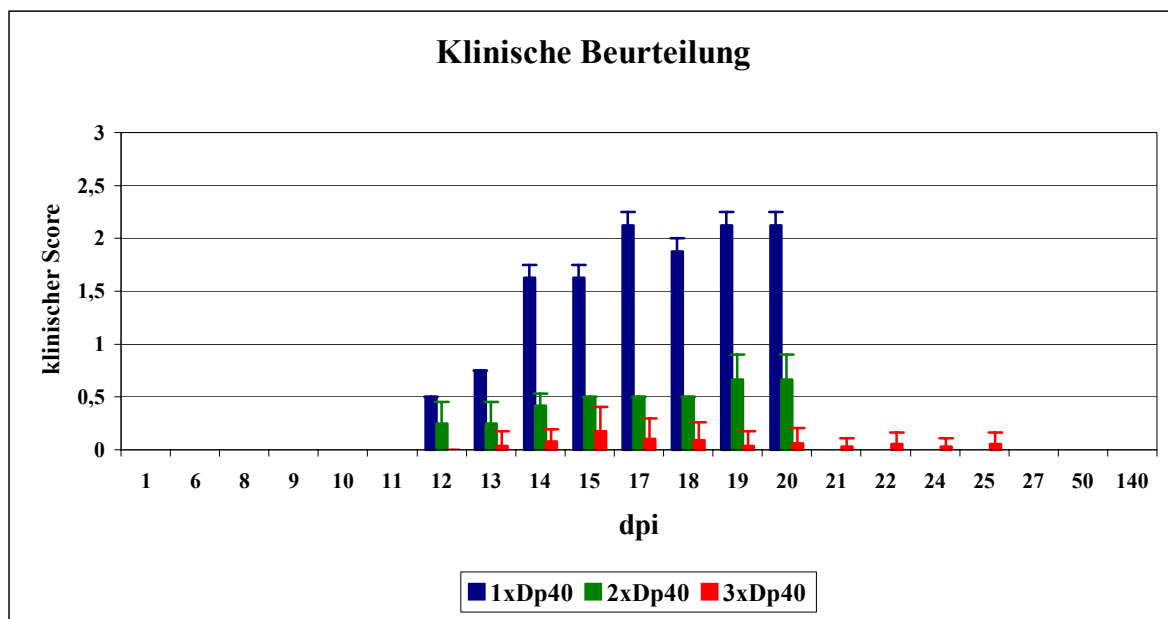
In mehreren unabhängigen Experimenten wurden dabei als erste Parameter die klinischen Symptome und die Entwicklung des Körpergewichts in unterschiedlich langen Beobachtungszeiträumen (20, 50 oder 140 Tagen nach der Infektion) untersucht. Bei Versuchende bzw. bei Auftreten eines moribunden Zustandes der BDV-infizierten Ratten wurden die Tiere getötet und die Gehirne mit unterschiedlichen Methoden (s.u.) vergleichend analysiert. Die im folgendem beschriebenen Parameter haben ergeben, dass eine dreimalige Immunisierung (i.m.) mit je  $10^7$  pfu Dp40 im Abstand von 14 Tagen die erfolgreichste Immunisierungsstrategie darstellte.

#### 4.16.2 Klinik

Der klinische Verlauf der BDV-Erkrankung wurde entsprechend der publizierten Literatur (Nöske et al., 1998; Stitz et al., 1998, Furrer et al., 2001) bewertet. Demnach entspricht ein BDV-spezifischer klinischer Score von 1 einer leichten Unkoordiniertheit und Ängstlichkeit, ein Score von 2 distinkten Ataxien und leichten Paresen und ein Score von 3 deutlich ausgeprägte Paresen und Paralysen. Allgemeine nicht BDV-spezifische Symptome wie struppiges Fell, gedrungene Haltung und die Abgabe von leicht blutigem Sekretfluss aus der Nase wurden mit Bewertungen unter 1 beurteilt. Zur individuellen Differenzierung erfolgte zusätzlich eine Abstufung in Schritten von 0,25. Die im folgendem dargestellten Ergebnisse ließen sich in drei unabhängigen Experimenten reproduzieren. Die Beurteilung der klinischen Symptome erfolgte von 3 unabhängigen Beobachtern. Insgesamt wurden 13 Tiere dreimal mit Dp40 i.m. immunisiert. Anzahl und Bezeichnung der Tiere einer jeden Gruppe, die in der Arbeit beschrieben wird, ist in der Tabelle 4.16.4 angegeben.

Die Abbildung 4.16.2 zeigt den Verlauf der klinischen Scores einzelner Gruppen nach im Immunisierung. Es erfolgte ein Vergleich zu nicht immunisierten Tieren (PBS) und Tieren, die mit der D1701-V Rekombinanten D1701-VrVgC (= DgC), welche das Glykoprotein gC des Pseudorabiesvirus (Suid Herpes Virus 1) exprimiert, geimpft wurden.

A



B

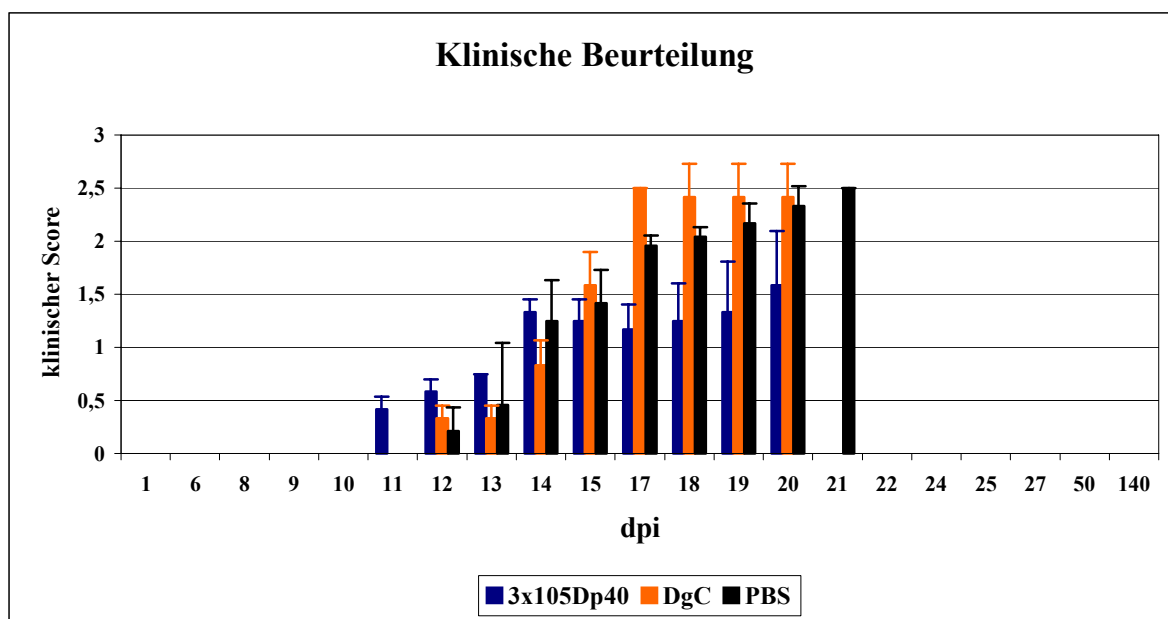


Abb. 4.16.2: Klinische Beurteilung immunisierter und nicht immunisierter Lewis Ratten nach BDV Infektion. A: Tiere nach Immunisierung (1x: einmal, 2x: zweimal; 3x: dreimal) mit Dp40. B: Immunisierung mit  $10^5$  pfu Dp40 je Dosis ( $3 \times 10^5$  Dp40), DgC-immunisierter und nicht-immunisierte (PBS) Kontrollen. Klinischer Score <1: Schreckhaftigkeit, struppiges Fell, gedrungene Sitzhaltung, leicht blutiges Nasensekret, leicht hervorstehende Augen; Score 1: leichte Unkoordiniertheit, starke Schreckhaftigkeit; Score 2: Ataxien und Paresen; Score 3: Paresen und Paralysen; dpi: days post infection (Tage nach der Infektion).

Erste allgemein klinische Symptome traten bei allen Gruppen zwischen dem Tag 12 und 13 nach der Infektion auf. In den Kontrollgruppen (PBS und DgC, 4.16.2B) waren ab dem Tag

14 bis 15 erste, sichere BDV-spezifische Symptome zu erkennen, die während des Beobachtungszeitraumes zunahmten und bei Versuchende 20 bzw. 21 Tage nach der Infektion ein Maximum an Paresen und Paralysen erreichten. Die Tiere wurden im moribunden Zustand getötet. Da die Kontrolle mit der für BDV irrelevanten Rekombinanten DgC den gleichen Verlauf zeigte, kann man sagen, dass das Vektorvirus D1701-V alleine keinen Schutz vor der BDV-Erkrankung vermittelte. Eine einmalige Immunisierung (Abb. 4.16.2A, 1x Dp40) verhinderte ebenso wenig das Auftreten BDV-spezifischer klinischer Symptome wie die Applikation von dreimal einer niedrigen Dosis ( $10^5$  pfu) von Dp40 (Abb. 4.16.2B). Im ersten Fall war der Verlauf der Klinik analog dem der Kontrollen. Nach Immunisierung (i.m.) mit niedriger Impfdosis und Belastungsinfektion zeigte sich ein biphasischer Verlauf. Bereits ab dem Tag 11 nach der Infektion waren bei diesen Tieren erste Symptome erkennbar, die bis zum Tag 14 zunahmten. Um den Tag 17 war ein leichter Rückgang der klinischen Symptome zu erkennen, dem ein steter Anstieg bis zum Versuchende am Tag 20 folgte. Die Gruppe der zweimal i.m. immunisierten Tiere (Abb. 4.16.2A, 2xDp40) entwickelte ebenfalls ab Tag 12 nach der Infektion klinische Symptome, die sich in einem struppigem Fell und leicht blutigem Nasensekretfluss äußerten. Sie wurden als nicht BDV-spezifisch und daher mit einem Score kleiner eins beurteilt. Erst am Ende des Beobachtungszeitraums (Tag 19 bis 20) zeigten sich schwache BDV-spezifische Symptome wie erhöhte Schreckhaftigkeit und leichte Ataxien (Score ~1). Im Vergleich zu den kontroll-immunisierten Tieren (PBS und DgC) waren die Symptome jedoch deutlich abgeschwächt. Die Gruppe der dreimal immunisierten Tiere (Abb. 4.16.2A, 3xDp40) zeigte dagegen ein eindeutiges Bild. Eine dreimalige Immunisierung i.m. verhinderte zwar nicht das Auftreten leichter klinischer Symptome (Score: <0,5), die jedoch bis zum Tag 20 pi völlig verschwanden. Die Tiere verhielten sich bis zum Tag 50 pi gesund. Erst während eines Langzeitexperiments zeigten zwei von sechs Tieren (#432 und #433, vgl. Tab. 4.16.4) um den Tag 70 nach der Belastungsinfektion wieder leichte klinische Symptome (Score: 0,5 bis 1,0). Eine Ratte (#433) zeigte über 1 Woche hin leichte BDV-spezifische Symptome (Score: 1,0) die anschließend wieder in eine unspezifische Symptomatik übergingen (nicht gezeigt). Ein zweites Tier (#432) zeigte ab 80 Tagen pi über einen Zeitraum von ca. 15 Tagen leichte BDV-unspezifische Symptome (Score: 0,5), die anschließend ebenfalls wieder verschwanden (nicht gezeigt).

Die Beurteilung der klinischen Symptome lässt somit den Schluss zu, dass eine dreimalige Immunisierung (i.m.) in einem Beobachtungszeitraum von 140 Tagen nach intracranialer BDV Belastungsinfektion, Ratten vor dem Auftreten einer BDV-spezifischen Klinik praktisch

komplett schützt. Die BDV-Infektion scheint von den immunisierten Tieren kontrolliert zu werden.

#### 4.16.3 Körpergewichtsentwicklung

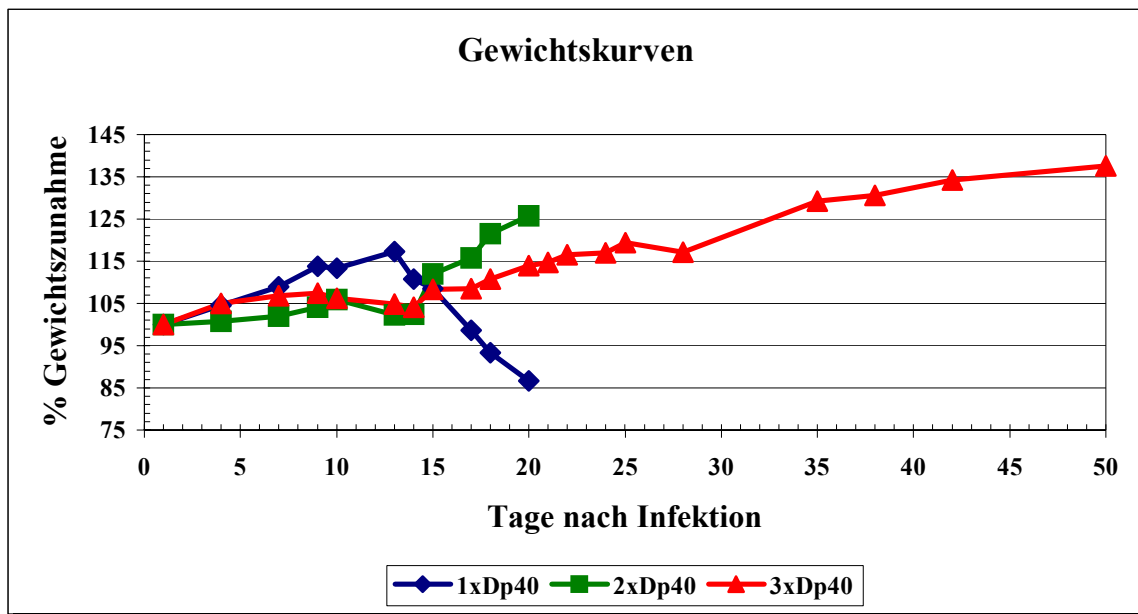
Neben der Klinik ist der Verlauf der Körpergewichtsentwicklung der Ratten nach BDV-Infektion als Parameter für das Voranschreiten der Infektion beschrieben (Nöske et al., 1998; Sobbe et al., 1997). In der Abbildung 4.16.3 ist die Körpergewichtsentwicklung der oben (Tab. 4.16.2) bereits beschriebenen Gruppen dargestellt. Die Körpergewichtsentwicklung wird als prozentuale Gewichtszunahme bezogen zum Ausgangsgewicht dargestellt.

Die Tiere der Kontrollgruppen (PBS und DgC) zeigten mit Auftreten der ersten klinischen Symptome (Tag 12 nach der Belastungsinfektion, Abb. 4.16.2B) auch den Beginn der Körpergewichtsreduktion, die sich über die Versuchsdauer hinweg fortsetzte (Abb. 4.16.3B). Dieser Verlust an Körpergewicht und die klinischen Symptome gaben den Anlass die Tiere, um den Tag 20 nach der Infektion, zu töten.

Analog verlief die Körpergewichtsentwicklung bei den einmal immunisierten Tieren (Abb. 4.16.3B). Mit dem Auftreten erster klinischer Symptome begann auch der Körpergewichtsverlust (Tag 13 nach der Belastungsinfektion), der sich bis zum Versuchsende am Tag 20 nach der Infektion fortsetzte. Auch der biphasische Verlauf in der Klinik der Tiere, die mit geringer Impfdosis immunisiert worden waren, spiegelt sich in den Gewichtskurven wieder (Abb. 4.16.3B, 3x10<sup>5</sup>Dp40). So erfolgte bei Zunahme der klinischen Symptome ein Rückgang des Körpergewichts und umgekehrt. Eine andere Situation konnte für die mehrfach immunisierten Ratten beschrieben werden. Die zweimal immunisierten Ratten zeigten zwar ebenfalls mit dem Auftreten klinischer Krankheitszeichen eine Gewichtsreduktion (ab Tag 10 nach der Belastungsinfektion, Abb. 4.16.3A, 2xDp40), diese kehrte sich jedoch nach vier Tagen in eine überproportionale Gewichtszunahme um und deutete damit auf eine beginnende Verfettung hin (siehe unten). Dieser Aspekt wurde jedoch zu dem damaligen Zeitpunkt nicht weiter verfolgt.

Eine dreimalige Immunisierung führte bei den geschützten Tieren zu einem normalen Verlauf der Gewichtskurven mit einer kontinuierlichen Gewichtszunahme. Die einzige Auffälligkeit lag, wie bei den zweimal immunisierten Tieren, zwischen den Tagen 10 und 15 nach der Infektion und zeigte sich in einem kurzfristigen, minimalen Gewichtsverlust (Abb. 4.16.3B; 3xDp40).

A



B

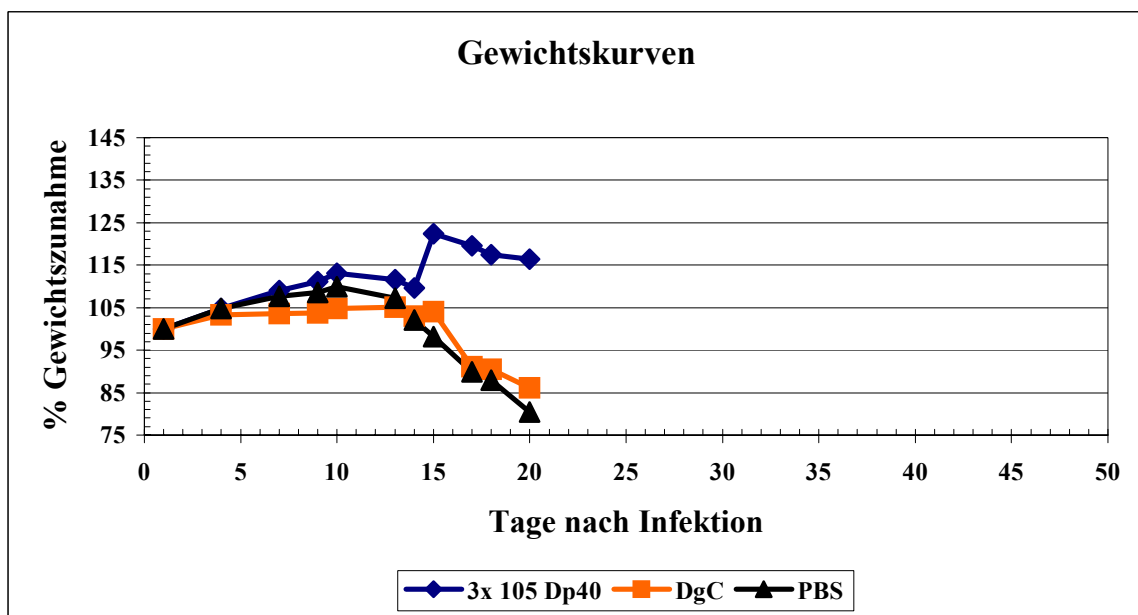


Abb. 4.16.3: Gewichtskurven immunisierter und nicht immunisierter Tiere. % Gewichtszunahme: Körpergewichtszunahme in Prozent bezogen auf das Ausgangsgewicht bei Versuchsbeginn. dpi: days post infection (=Tage nach Belastungsinfektion). A und B: Beschrieben sind die gleichen Gruppen, wie in Abb. 4.16.2A und B dargestellt.

Ein weiteres interessantes Phänomen, welches sich schon bei den zweimal (i.m.) immunisierten Tieren angedeutet hatte, wurde auch bei den Tieren beobachtet, die dreimal mit je  $10^7$  pfu Dp40 intravenös immunisiert worden waren. Wie in Abbildung 4.16.3C zu sehen, zeigten einzig die intravenös immunisierten Tiere eine ungewöhnlich starke

Gewichtszunahme (Abb. 4.16.3C, Dp40 i.v.). Diese Symptomatik könnte auf eine persistente BDV Infektion hinweisen, wobei häufig ein sogenanntes Obesitas-Syndrom auftritt (Kao et al., 1983, Herden et al., 2000).

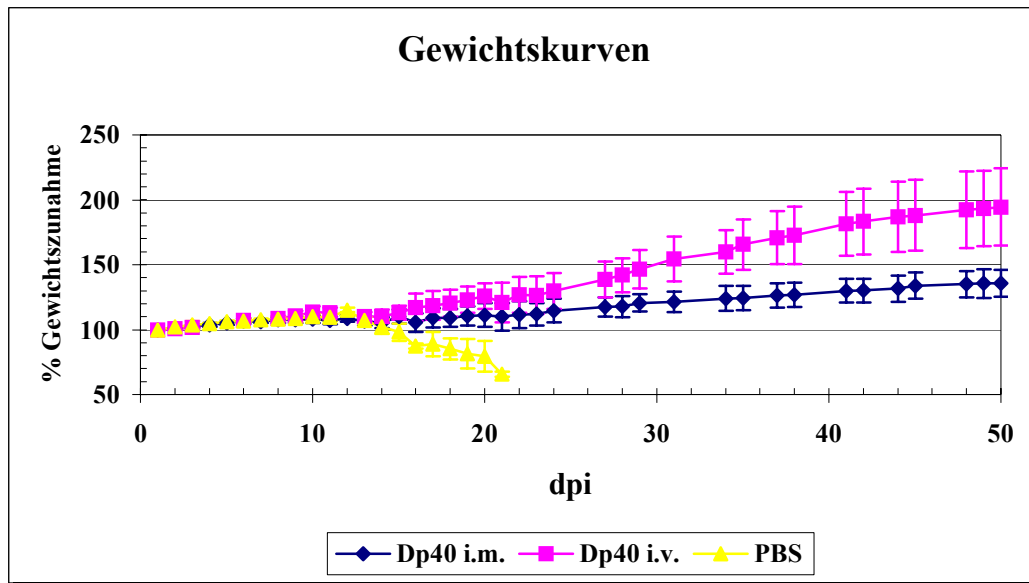


Abb. 4.16.3C: Gewichtskurven immunisierter und nicht immunisierter Tiere. % Gewichtszunahme: Körpergewichtszunahme in Prozent bezogen auf das Ausgangsgewicht bei Versuchsbeginn. dpi: days post infection (=Tag nach Infektion).

Die Beurteilung der Gewichtsentwicklung immunisierter Tiere nach BDV Infektion zeigt, dass lediglich bei den dreimal i.m. immunisierten Tieren eine normale Körpergewichtsentwicklung stattgefunden hat. Damit werden die Beobachtungen beim klinischen Verlauf der Erkrankung soweit bestätigt, dass einzig diese Tiere in der Lage waren, eine Infektion mit BDV zu kontrollieren.

#### 4.16.4 Nachweis von BDV im Gehirn

Nachdem eine dreimalige Immunisierung von Ratten klinische BDV-spezifische Symptome verhinderte und eine normale Körpergewichtsentwicklung zeigte, war es wichtig zu testen, in wie weit die Immunisierung das Vorhandensein von BDV bzw. BDV Antigen im Gehirn beeinflusste. Hierzu wurde BDV im Gehirn der immunisierten und infizierten Tiere, sowie der verschiedenen Kontrolltiere mittels Virustitration in Duplikaten nachgewiesen.

Die Ergebnisse der Virustitrationen zum Nachweis von replikationsfähigem BDV sind in der Tabelle 4.16.4 zusammengefasst und zeigen, dass sich 50 (Gruppe E) und 140 (Gruppe G) Tage nach Belastungsinfektion der dreimal i.m. immunisierten und 50 Tage nach Belastungsinfektion der dreimal i.v. immunisierten Tiere (Gruppe F) kein Virus mehr

nachweisen ließ. Weiter ist zu erkennen, dass mit der Anzahl der Immunisierungen die Virusbelastung bis zum Tag 20 nach der Infektion abnahm und nach dreimaliger Immunisierung im Durchschnitt um 99,3% (Gruppe C) gegenüber der Kontrolltiere (Gruppe H) reduziert wurde. In den Gehirnen der Tiere #231 und #233 konnte 20 Tage pi kein Virus nachgewiesen werden. Neben den hier dargestellten Tieren der Gruppe C wurden vergleichbare Ergebnisse bei insgesamt 9 weiteren Tieren erhalten (nicht gezeigt).

Tiergruppe	Immunisierung (Analyse)	Tiernummer	VT in ffu	Ø VT in ffu	Red. %	WB	
						p24	p40
A)	1x 10 <sup>7</sup> pfu, i.m. (20 dpi)	211	2,7x10 <sup>5</sup>	2,6x10 <sup>5</sup>	88,1	+	+
		212	2,4x10 <sup>5</sup>			+	+
B)	2x je 10 <sup>7</sup> pfu, i.m. (20 dpi)	221	7,9x10 <sup>4</sup>	9,1x10 <sup>4</sup>	95,8	-	-
		222	1,8x10 <sup>5</sup>			-	+
		223	1,4x10 <sup>4</sup>			-	-
C)	3x je 10 <sup>7</sup> pfu, i.m. (20 dpi)	231	nn	1,6x10 <sup>4</sup>	99,3	-	-
		232	4,9x10 <sup>4</sup>			+	+
		233	nn			-	-
		243	1,6x10 <sup>4</sup>			-	-
D)	3x je 10 <sup>5</sup> pfu, i.m. (20 dpi)	251	8,7x10 <sup>4</sup>	5,3x10 <sup>4</sup>	97,5	-	+
		252	2,3x10 <sup>4</sup>			-	+
		253	4,9x10 <sup>4</sup>			+	+
E)	3x je 10 <sup>7</sup> pfu, i.m. (50 dpi)	111	nn	nn	(100)	-	-
		112	nn			-	-
		112	nn			-	-
F)	3x je 10 <sup>7</sup> pfu, i.v. (50 dpi)	121	nn	nn	(100)	-	-
		122	nn			-	-
		123	nn			-	-
G)	3x je 10 <sup>7</sup> pfu, i.m. (140 dpi)	423	nn	nn	(100)	-	-
		431	nn			-	-
		432	nn			-	-
		433	nn			-	-
		462	nn			-	-
H)	PBS (20 dpi)	691	4,2x10 <sup>6</sup>	2,2x10 <sup>6</sup>	0,0	+	+
		692	1,5x10 <sup>6</sup>			+	+
		693	7,6x10 <sup>5</sup>			+	+

**Tab. 4.16.4: Virustiter von BDV in Gehirnen immunisierter und nicht immunisierter Tiere. Die Angabe des Virustiters erfolgte in ffu: Fokus bildende Einheiten („focus forming unit“)/g Gehirn. pfu: Plaque bildende Einheiten („plaque forming units“). nn: nicht nachweisbar; nd: nicht getestet („not done“); Ø VT: Durchschnittlicher Virustiter (VT) nach Belastungsinfektion; Red. %: Reduktion der Viruslast in %; WB: Western Blot Analyse; p40: Nachweis des p40 Nukleoproteins von BDV; p24: Nachweis des p24 Phosphoproteins von BDV.**



Eine einmalige Immunisierung mit  $10^7$  pfu Dp40 (Gruppe A) war in der Lage die Viruslast im Durchschnitt um 88,1% im Vergleich zum Wert der Kontrolltiere, zu senken. Wie sich an den bisherigen Daten (Klinik, Gewichtskurven) zeigte, war diese Reduktion nicht ausreichend, um die Tiere gegenüber einer BDV Belastungsinfektion zu schützen. Die Tiere dieser Gruppe A wiesen im Vergleich zu den dreimal immunisierten Tieren (Gruppe C) eine höhere Viruslast auf.

In der Gruppe der zweimal immunisierten Tiere (Gruppe B) erfolgte eine durchschnittliche Reduktion des Virustiters um 95,8% gegenüber den Kontrolltieren (Gruppe H). Eine Korrelation mit den klinischen Daten und den Gewichtskurven bestand ebenfalls. Die Tiere der Gruppe B zeigten einen geringeren klinischen Score und eine normale Gewichtsentwicklung im Vergleich zu der Gruppe A. Dies ist an dem Tier #222, Gruppe B, zu erkennen, dessen Virusbelastung im Gehirn über  $1 \times 10^5$  ffu lag und die klarsten klinischen Symptome in dieser Gruppe zeigte (Score von 1,0 am Tag 20). Die Gewichtskurve dieses Tieres zeigte zwar keine Abnahme, aber eine schwankende Gewichtszunahme (nicht gezeigt). Die dreimalige Immunisierung mit einer niederen Dosis ( $10^5$  pfu) bewirkte eine Reduktion der Viruslast, die im Durchschnitt in der gleichen Größenordnung wie bei den zweimal immunisierten Tieren lag (Reduktion um 97,5% gegenüber den Kontrolltieren). Trotz des geringeren Virustiters wurden die Tiere der Gruppe D in der klinischen Beurteilung deutlich über dem der zweimal immunisierten Tiere (Gruppe B) bewertet. Die Viruslast im Gehirn korrelierte in der Gruppe D ebenfalls mit dem klinischen Score. Dies ist am Tier #251 zu erkennen war, welches neben der größten Viruslast ( $8,7 \times 10^4$  ffu) auch den ausgeprägtesten klinischen Score (2,25) in seiner Gruppe besaß, jedoch im Gegensatz zum Tier #222 der Gruppe B an Gewicht verlor (nicht gezeigt).

Die Analysen der Viruslast in den Gehirnen der Tiere aller Gruppen korrelierten mit den bisherigen Ergebnissen (Klinik, Gewichtsentwicklung) und zeigen den Erfolg einer dreimaligen Immunisierung mit Dp40 gegenüber einer BDV-Belastungsinfektion.

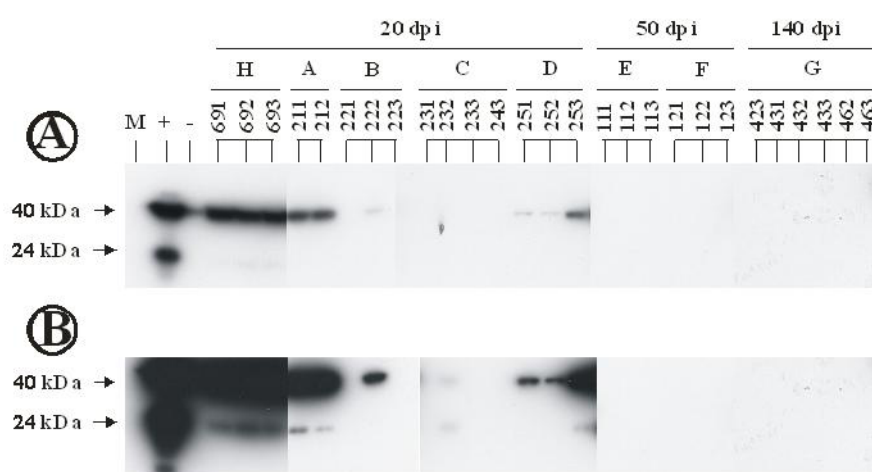
#### **4.16.5 Nachweis von BDV-Antigen im Gehirn**

Ergänzend zur Virustitration wurde das Material der Hirnhomogenate für Western Blot Untersuchungen verwendet. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 4.16.5 dargestellt und in 4.16.4 zusammengefasst. Es ist zu erkennen, dass in den Gehirnhomogenaten der Kontrolltiere (Gruppe H) das Nukleoprotein p40 deutlich nachweisbar war (Abb. 4.16.5A). Das p24 Phosphoprotein von BDV konnte in diesen Homogenaten ebenfalls detektiert werden, was auf eine BDV-Vermehrung in diesen Gehirnen hinweist (Abb. 4.16.5B).

Analog bestätigten diese Ergebnisse die bisherigen Daten für einmal immunisierte Tiere (Gruppe A). Deutliche Signale für die BDV Proteine p40 und p24 resultierten aus einer hohen Viruslast und decken sich mit den Daten des klinischen Verlaufs und der Gewichtsentwicklung.

Weiter bestätigte der Western Blot die bisherigen Ergebnisse der Tiere, welche dreimal mit  $10^7$  pfu Dp40 (Gruppen C, E, G) immunisiert worden waren. So konnte 50 bzw. 140 Tage nach der Belastungsinfektion kein BDV-Antigen in den Gehirnhomogenaten dieser Tiere mehr nachgewiesen werden. Einzig bei dem Tier #232 der Gruppe C fanden sich 20 Tage nach der BDV-Infektion schwache p40- und p24-spezifische Signale. Entsprechend war bei diesem Tier auch das Ergebnis der Virustitration in seiner Gruppe am höchsten ausgefallen ( $4,9 \times 10^4$  ffu, Tab. 4.16.4). Bei den übrigen Tieren war weder p40 noch p24 in den Gehirnen 20 Tage nach der BDV-Infektion nachweisbar.

In der Gruppe B zeigte das Tier #222 ein eindeutiges p40-spezifisches Signal (Abb. 4.16.5B). Die Western Blot Analysen mit den Homogenaten der beiden anderen Tiere dieser Gruppe (#221 und #223) führten zu keinem Signal. Deren Virustiter waren im Vergleich zu Tier #222 um 56,2% (Tier #221) bzw. 92,3% (Tier #223) reduziert.



**Abb. 4.16.5: Western Blot von 10%igen Ratten-Hirnhomogenaten. Die Anfertigung des Blots und die Detektion mittels ECL Technik sind im Material und Methoden Teil beschrieben. Pro Spur wurden ca. 10µg Homogenat aufgetragen; PBS: Kontrolltiere mit PBS immunisiert; 1x, 2x, 3x: Anzahl der Impfdosen; 3x\*: Immunisierung mit  $3 \times 10^5$  pfu Dp40; M: Protein-Größenmarker; +: Hirnhomogenat einer BDV infizierten Ratte (20 dpi); -: Gehirn einer nicht infizierten Ratte; dpi: Tage nach der Infektion (days post infection); A: kurzes Exponat (ca. 5 sec); B: langes Exponat (ca. 25 sec).**

Ähnlich verhielt es sich in der Gruppe D. Hier zeigten die Ratten entsprechend ihrer zuvor beschriebenen Virustiter unterschiedliche Signalstärken für p40. Im Gehirn des Tieres #253

konnte zusätzlich ein p24-spezifisches Signal detektiert werden, was auf eine Vermehrung von BDV hinweist.

Neben der qualitativen Aussage, ob eine BDV-Infektion der Gehirnen stattgefunden hatte und welche Antigene von BDV (p40 und p24) auftraten, zeigten die Ergebnisse, dass eine BDV-Infektion ab einer Viruslast von  $5 \times 10^4$  ffu/Gramm Gehirn im Western Blot sicher nachweisbar war.

#### **4.16.6 Humorale BDV-spezifische Immunantwort**

Während der Immunisierung und der anschließenden BDV-Belastungsinfektion wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Seren der Versuchstiere gewonnen, um die humorale Immunantwort gegen BDV zu untersuchen.

##### **4.16.6.1 Nachweis BDV-spezifischer Serumantikörper mittels ELISA**

BDV-spezifische Serumantikörper wurden in einem ELISA quantifiziert. Von jedem Tier wurden hierzu die Serumproben mehrmals in je zwei parallelen Ansätzen unabhängig voneinander analysiert. Untersucht wurden Seren nach Abschluss der letzten Immunisierung (vor der BDV-Belastungsinfektion) und zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion. In der Abbildung 4.16.6 sind die durchschnittlichen reziproken Serumverdünnungen der einzelnen Tiergruppen verglichen. Die Gruppe A (1xDp40 i.m.) besaß zum Zeitpunkt der BDV-Belastungsinfektion keine im ELISA messbaren BDV-spezifischen Serumantikörper. Erst ab Tag 8 nach der Infektion konnte bei einem Tier (#212) ein BDV-spezifischer Titer von 1:40 gemessen werden, welcher bis zum Tag 20 auf 1:80 anstieg. Bei dem zweiten Tier der Gruppe (#211) konnten im gesamten Versuchszeitraum keine spezifischen Serumantikörper gegen BDV nachgewiesen werden.

In der Gruppe B (2xDp40 i.m.) zeigten alle Tiere einen im ELISA messbaren Antikörpertiter von 1:160 vor der BDV-Infektion (Abb. 4.16.6). Dieser stieg im Versuchszeitraum deutlich an und lag 20 Tage pi zwischen 1:640 (#221 und #222) und 1:1280 (#223). Das Tier #222 besaß in dieser Gruppe am Tag 8 pi zwar einen höheren Titer wie vor der BDV-Infektion, jedoch war er im Vergleich zu den anderen Tieren der Gruppe mit 1:320 am niedrigsten. In Korrelation mit den klinischen Daten zeigte sich bei diesem Tier #222 einzig eine BDV-assoziierte Klinik. Dies kann als Hinweis darauf gedeutet werden, dass BDV-spezifische Serumantikörpern bei der Infektionsabwehr in diesem System eine gewisse Rolle zukommt.

Eine niedrige Impfdosis von  $10^5$  pfu Dp40, wie sie in der Gruppe D verwendet wurde, führte erst bei Versuchende (Tag 20 pi) zur Induktion von BDV-spezifischen Antikörpern, die einen Titer von 1:40 (#251, #252) bis 1:80 (#253) im ELISA ergaben. Da diese Tiere zu diesem Zeitpunkt ebenfalls einen BDV-spezifischen klinischen Score zwischen 1,0 und 2,25 besaßen, unterstützt dies die Vermutung, dass ein frühes Auftreten (Tag 8 pi) von Serumantikörpern beim Schutz vor einer BDV-Infektion eine Rolle spielt. Dies wird beim Vergleich der Gruppen D und B deutlich. Die Gruppe B (2xDp40) besaß schon vor der Infektion einen hohen Titer an BDV-spezifischen Antikörpern und damit nach den bisherigen Untersuchungen den entscheidenden Vorteil gegenüber der Gruppe 3x10<sup>5</sup>Dp40. Eine zweimalige, hochdosierte im Applikation von Dp40 induziert folglich eine deutlich stärkere humorale Immunantwort, als die dreimalige Gabe einer niedrigen Dosis.

Die Tiere der Gruppen C, E und G (3xDp40 i.m.) wiesen ebenfalls vor der Belastungsinfektion spezifische Serumantikörper gegen BDV auf, die zwischen 1:40 (#111) und 1:640 (#231) lagen. Der durchschnittliche spezifische Antikörpertiter nahm über den Beobachtungszeitraum hinweg bis zum Tag 20 pi zu und lag zwischen 1:640 (#232) und 1:5120 (#112). Anschließend reduzierte sich der Titer an BDV-spezifischen Antikörpern auf 1:320 (#423) bis 1:2560 (#112) am Tag 50 pi und 1:160 (#423) bis 1:640 (#431, #463, #463) am Tag 140 pi. Dieser durchschnittliche hohe BDV-spezifische Serumantikörper bei den dreimal immunisierten Tieren korreliert mit den klinischen Ergebnissen. Alle Tiere außer dem Tier #433, welches außer am Tag 50 pi einen nachweisbaren Titer von 1:320 besaß (sonst 1:160) zeigten zu keinem Zeitpunkt BDV-spezifische klinische Symptome. Dies könnte andeuten, dass BDV-spezifischen Serumantikörpern, induziert von Dp40, in diesem Modell eine gewisse Rolle spielen.

BDV-spezifische Serumantikörper konnten in der Gruppe F (3xDp40 i.v.) erst 8 Tage nach der Belastungsinfektion detektiert werden (<1:40 bis 1:320), jedoch stieg der Titer deutlich an und erreichte 50 Tage nach der Infektion ähnliche Werte (1:320 bis 1:640) wie in den Gruppen C, E und G der i.m. immunisierten Tiere. In der Gruppe F schien somit eine verzögerte humorale Antwort gegen BDV stattgefunden zu haben. Da es trotz der niedrigen BDV-spezifischen Antikörpertiter am Tag 8 pi nicht zu einer BDV-spezifischen Klinik kam (Score <1), lässt sich für diese Gruppe F vermuten, dass die humorale Immunantwort nach i.v. Immunisierung mit Dp40 eine im Vergleich zur i.m. Immunisierung untergeordnete Rolle spielt.

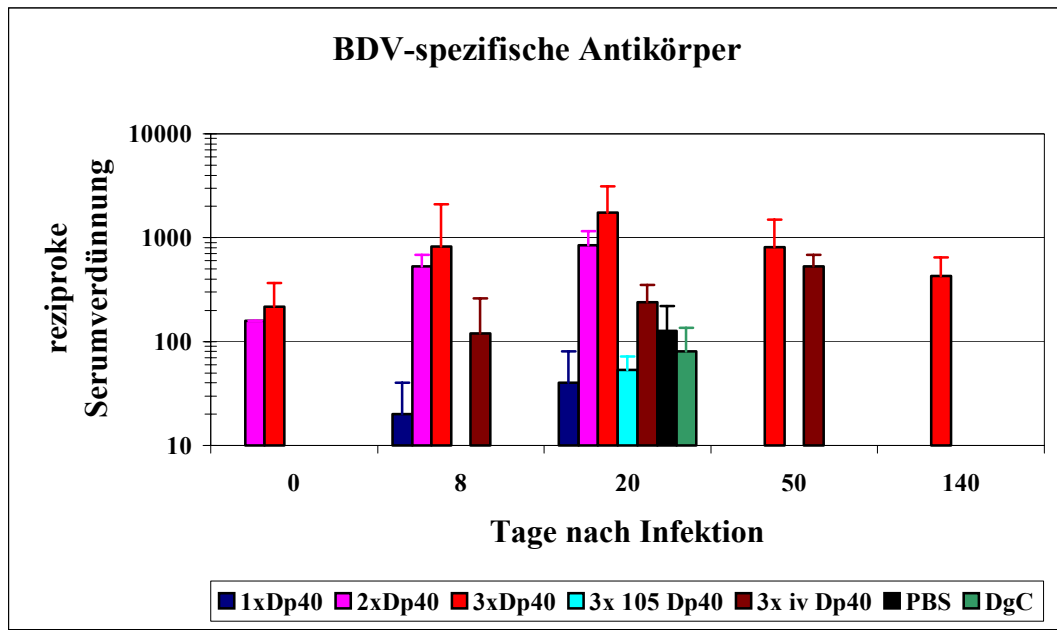


Abb. 4.17.5: Detektion aller BDV-spezifische Serumantikörper der unterschiedlich immunisierten Gruppen nach BDV-Infektion. Die Angabe der Serumtiter erfolgt als Durchschnitt der Werte aller Tiere einer Gruppe. Die Standardabweichung ist als standard error of the mean angegeben. Es sind die gleichen Gruppen, wie in Tab. 4.16.4 beschrieben dargestellt.

Die Tiere der Kontrollgruppen DgC und H (PBS) zeigten wie die Gruppe D erst bei Versuchende (Tag 20 pi) einen messbaren Antikörpertiter, welche zwischen 1:40 und 1:320 lagen. Die Tiere der Gruppen waren nicht in der Lage, die Infektion zu kontrollieren und zeigten die bereits beschriebenen klinischen Auffälligkeiten.

Die Ergebnisse dieser BDV-spezifischen Serumantikörper Analysen zeigten, dass i.m. immunisierte Tiere, die eine Woche nach der Belastungsinfektion einen BDV-ELISA-Titer kleiner als 1:100 besaßen, die Infektion nicht handhaben konnten. Sie wurden krank oder starben (PBS, DgC, 1xDp40 und teilweise 3x105Dp40). Tiere hingegen, die ab dem Tag 8 nach der Infektion einen BDV-spezifischen Serumantikörpertiter größer 1:100 besaßen oder i.v. immunisiert waren, konnten die Erkrankung kontrollieren (3xDp40, 2xDp40, 3xDp40 i.v.).

Diese Ergebnisse implizierten, dass dem Vorhandensein BDV-spezifischer Antikörper vor der Infektion eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von Schutz gegenüber der BDV Infektion zukommt. Ebenso wurde bestätigt, dass die zuverlässigste Immunisierungsstrategie die dreimalige intramuskuläre Immunisierung mit je  $1 \times 10^7$  pfu Dp40 war.

#### 4.16.6.2 Qualitative Untersuchung der induzierten Serumantikörper

Die Spezifität der beschriebenen Seren (4.16.6) wurden im Western Blot mit BDV-Kontrollantigen (10 %iges Hirnhomogenat von nicht-immunisierten, BDV-infizierten Ratten, 20 Tage nach der Infektion) analysiert. Die Tabelle 4.16.6.2 zeigt, dass die Seren aller dreimal intramuskulär mit  $10^7$  pfu Dp40 immunisierten Tiere (Gruppen C, E und G) mit einer Ausnahme (Tier #231) schon vor der BDV-Infektion nachweisbare p40-spezifische Antikörper aufwiesen. Am Tag 20 pi konnten in einigen Tieren dieser Gruppen p24-spezifische Serumantikörper nachgewiesen werden. Dieses heterogene Bild zeigte, dass sich BDV in einem Teil der Tiere vermehrt und damit die Bildung p24-spezifischer Antikörper hervorgerufen hat. Das trotzdem in allen Tieren eine BDV-Vermehrung stattgefunden hat, ist an den Gruppen E und G zu erkennen, da ab dem Tag 50 pi in allen Tieren p24-spezifische Serumantikörper nachzuweisen waren. Der Schluss lag nahe, dass die Vermehrung von BDV und damit die Verfügbarkeit von p24 Antigen zur Bildung spezifischer Antikörper nach der Infektion nur langsam statt fand, so dass erst später als am Tag 20 pi bei allen Tieren p24-spezifische Antikörper gefunden wurden.

In der Gruppe B (2xDp40) konnten nach Abschluss der Immunisierung keine p40-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Erst ab dem Tag 8 nach der Infektion waren diese bei zwei (#221 und #223) von drei Tieren im Western Blot zu detektieren. Die Tatsache, dass nur zwei von drei Tieren bei Versuchende p24 spezifische Antikörper entwickelt haben, lässt in der Gruppe B analog zu den Gruppen C, E und G ebenfalls eine geringere Vermehrung und damit Präsenz von p24-Antigen vermuten. Die Ergebnisse der Virustitration von den Gehirnen dieser Tiere unterstützen diese Vermutung, da sie eine im Vergleich zu den Kontrolltieren (PBC) deutliche Reduktion der Viruslast gezeigt haben (Tab. 4.16.4) und das Tier mit der geringsten Viruslast (#223) im Western Blot für p24-spezifische Antikörper negativ blieb.

In der Gruppe D ( $3 \times 10^5$  Dp40), deren Tiere mit einer niedrigen Dosis immunisiert worden waren, konnten bei einem Tier (#252) 8 Tage nach der Infektion p40-spezifische Serumantikörper nachgewiesen werden. Erst am Tag 20 pi zeigten alle Tiere p40- und p24-spezifische BDV-Antikörper. Dies zeigte, dass eine Immunisierung mit einer niedrigen Dosis Dp40 nicht ausreichend war, um vor der Belastungsinfektion und auch früh (Tag 8 pi) nach der Infektion p40-spezifische Serumantikörper in allen Tieren zu indizieren. Eine Vermehrung von BDV konnte durch den Nachweis von p24-spezifischen Antikörpern gezeigt werden.

Die Seren der Kontrolltiere (Gruppen PBS und DgC) und der einmal immunisierten Tiere (Gruppe A) wiesen erst um den Tag 20 nach der Infektion sowohl p40- als auch p24-spezifische Antikörper auf. BDV konnte sich in den Tieren dieser Gruppen vermehren, was durch den Nachweis der p24-spezifischen Serumantikörper gezeigt wurde. Desweiteren reicht eine einmalige Immunisierung nicht aus um zu einem frühen Zeitpunkt (Tag 8 pi) p40-spezifische Antikörper zu induzieren. Die Tiere konnten somit die Infektion nicht kontrollieren und mussten getötet werden.

Die verzögerte humorale Immunantwort der intravenös immunisierten Tiere (Gruppe F) war auch in den Western Blot Analysen zu erkennen. Die Tiere zeigten erst ab dem Tag 8 pi p40-spezifische Antikörper und waren 20 Tage pi im Gegensatz zu den i.m. immunisierten Tieren alle bereits für Antikörper gegen das p24 Phosphoprotein positiv.

Gruppe	Immunisierung	Protein	Tage nach der Infektion				
			0	8	21	50	140
A	Dp40: 10 <sup>7</sup> , i.m., 1x	p40	--	--	++		
		p24	--	--	++		
B	Dp40: 10 <sup>7</sup> , i.m., 2x	p40	---	+ - +	+++		
		p24	---	---	+-		
C	Dp40: 10 <sup>7</sup> , i.m., 3x (20)	p40	-+++	++++	++++		
		p24	----	----	-+-		
D	Dp40: 10 <sup>5</sup> , i.m., 3x	p40	---	-+-	+++		
		p24	---	---	+++		
E	Dp40: 10 <sup>7</sup> , i.m., 3x (50)	p40	+++	+++	+++	+++	
		p24	---	---	+--	+++	
F	Dp40: 10 <sup>7</sup> , i.v., 3x	p40	---	+++	+++	+++	
		p24	---	---	+++	+++	
G	Dp40: 10 <sup>7</sup> , i.m., 3x (140)	p40	++++++	++++++	nd	++++++	++++++
		p24	-----	-----	nd	++++++	++++++
H	PBS	p40	-----	-----	++++++		
		p24	-----	-----	++++++		
	DgC: 10 <sup>7</sup> , i.m., 3x	p40	---	---	+++		
		p24	---	---	+++		

Tab. 4.17.4: Analyse der Ratten-Seren im Western Blot. p40: Nukleoprotein p40 von BDV; p24: Phosphoprotein p24 von BDV; i.m.: intra muskuläre Applikation von D1701-VRVp40; nd: nicht gemacht („not done“); alle anderen Bezeichnungen wie oben beschrieben. + und – stehen für die Einzeltiere.

Die qualitativen Analysen der Seren haben die bisherigen Ergebnisse insofern bestätigt, dass die dreimal immunisierten Tiere am besten vor einer BDV-Infektion geschützt sind. In Korrelation mit den klinischen Daten (4.16.2) zeigte sich, dass die Tiere, die vor der Belastungsinfektion mit BDV im Western Blot nachweisbare, p40-spezifische BDV-Serumantikörper besaßen, vor einer BDV-Infektion geschützt waren. Tiere die am Tag 8 pi

p40 –spezifische Antikörper besaßen, wiesen eine im Vergleich zu den anderen Tieren der gleichen Gruppe klar reduzierte Klinik auf. Dies bestätigt, dass p40-spezifische Serumantikörper induziert durch Immunisierung mit Dp40 in der Immunantwort der Ratten gegen eine BDV-Belastungsinfektion von Bedeutung sind.

#### 4.16.7 Verteilung von BDV im Gehirn immunisierter Tiere

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass die dreimal mit  $10^7$  pfu Dp40 i.m. immunisierten Tiere vor dem Auftreten klinischer Symptome nach intracranialer Infektion mit BDV geschützt waren. Die Zunahme des Körpergewichts verlief normal, Virusmenge und virales Antigen waren im Gehirn reduziert und die Seren wiesen hohe BDV-spezifische Antikörpertiter auf. Somit stellte sich die Frage, ob und wieviel BDV in den einzelnen Gehirnarealen der infizierten Tiere vorlag. Der Nachweis von BDV erfolgte mittels *in situ* Cytohybridisierung an Gefrierschnitten der Rattengehirne. Als Sonde wurde eine cRNA positiver Polarität verwendet, die im Bereich des p40 Nukleoproteins an das Genom (negative Polarität) hybridisieren konnte.

Die Infektion der Ratten erfolgte stets im Bereich des Hippocampus der linken Gehirnhemisphäre. Da BDV vorzugsweise in Neuronen, Astrozyten und endymalen Zellen repliziert und sich intraaxonal im ZNS ausbreitet (Carbone et al., 1991; Carbone et al., 1989; Deschl et al., 1990), handelt es sich beim Nachweis von BDV auf der contralateralen Seite (rechte Gehirnhemisphäre) um die Nachkommenschaft der inokulierten Viren. Eine Ausbreitung und Replikation von BDV im Gehirn hat somit stattgefunden. BDV ist sowohl während der akuten als auch der chronischen Phase der Infektion bei Ratten überall im Gehirn detektierbar (Carbone et al., 1987; Herzog et al., 1984; Stitz et al., 1998). Bevorzugt werden der Kortex und der Hippocampus infiziert.

Zur Orientierung ist in der Abbildung 4.16.7 ein Rattengehirn abgebildet, an welchem die einzelnen Schnittebenen eingezeichnet (Abb. 4.16.7A) und verschiedene schematische Übersichten in den wesentlichen Teilen beschriftet sind (Abb. 4.16.7B-D).



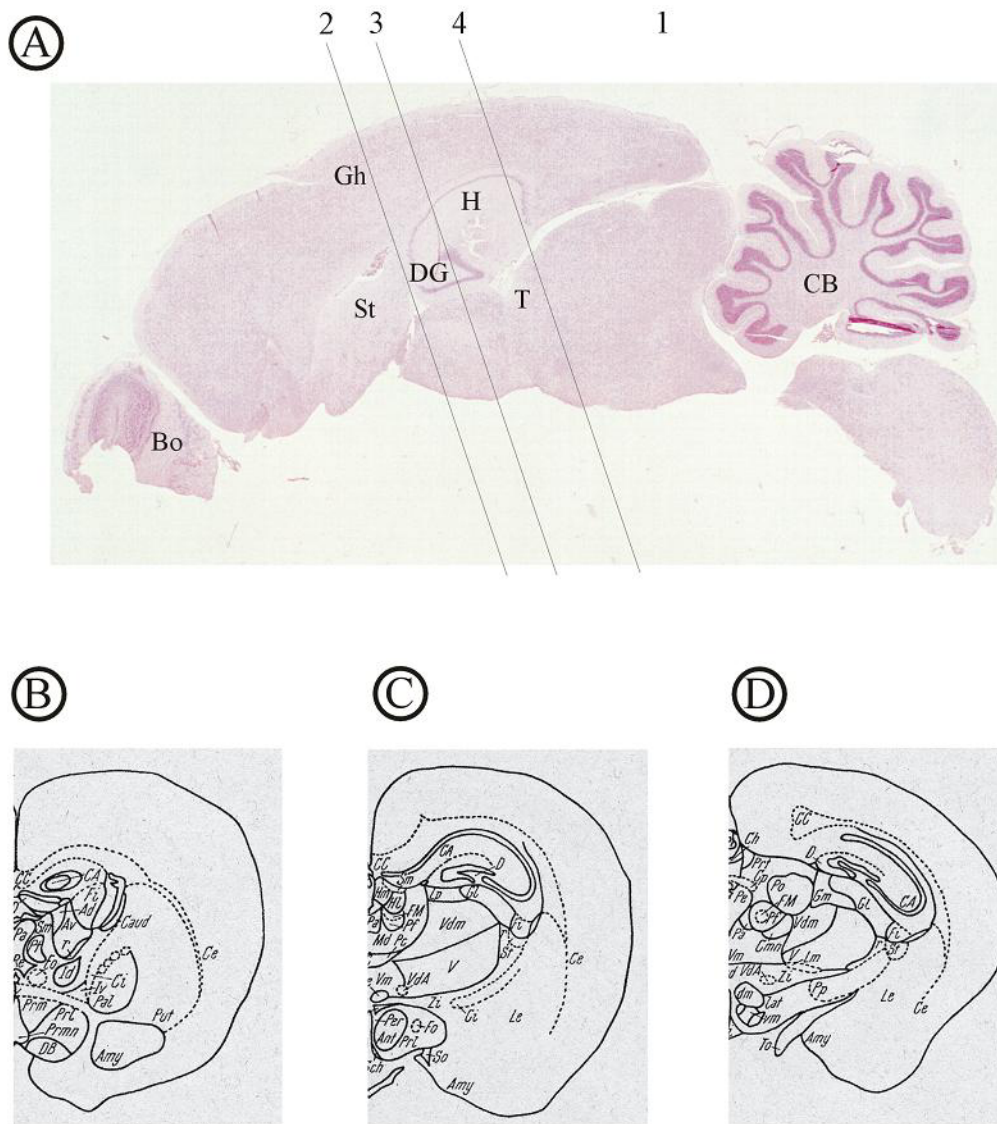


Abb. 4.16.7: Rattengehirn mit Übersicht über die Schnittebenen. A: Schnittebene 1, sie entspricht der Abbildungsebene A und wird von dorsal nach ventral, längst des kompletten Gehirns geführt; B: Schema der Schnittebene 2; C: Schema der Schnittebene 3; D: Schema de Schnittebene 4; Gh: Großhirnrinde, H: Hippocampus; DG/D: Gyrus dentatus (gezähnte Windung); T: Thalamus; St: Streifenkörper; Bo: Bulbus olfactorius (Riechkolben); CB: Cerebellum (Kleinhirn); CA: Cornu ammonis (Teil des Hippocampus).

Die Abbildung 4.16.7A zeigt die vier Hauptschnittebenen der Einzelpräparate. Die Schnittebene 1 zeigt das gesamte Gehirn in einer Übersicht durch einen Schnitt von dorsal nach ventral längst der Gehirnhemisphären. Die Schnittebenen 2, 3 und 4 liegen senkrecht zur Bildebene im Bereich des Hippocampus und geben einen Überblick über den Querschnitt der rechten Gehirnhälfte. Die verschiedenen Areale der Schnittebenen 2 - 4 sind in den Teilen B - D der Abbildung genauer bezeichnet.

Die Ergebnisse der Hybridisierungen sind in der Abbildung 4.16.8 A-F dargestellt. Sie zeigen die Verbreitung von BDV im Verlauf der Infektion der dreimal immunisierten Tiere (10, 13,

20, 50 Tage nach der Infektion) im Vergleich zu einem nicht immunisiertem Kontrolltier (Tag 20 nach der Infektion). Dargestellt ist der Querschnitt der rechten Gehirnhälfte in einer Gesamtübersicht und entsprechenden Detailvergrößerungen. Die Abbildungen zeigen, dass die Anzahl der BDV positiven Neuronen bis zum Tag 20 nach der Infektion zunahm (Pfeile). BDV spezifische Signale waren in allen Hirnarealen, jedoch vor allem im Hippocampus detektierbar. Aufgrund der untersuchten Zeitpunkte und der Analyse verschiedener Präparate konnte die Aussage getroffen werden, dass es bis zum Tag 20 nach der Infektion zur stärksten Ausbreitung von BDV in den Gehirnen der immunisierten Tiere gekommen war. Im Vergleich zu nicht immunisierten Tieren (PBS, Abb. 4.16.8F) war die Anzahl BDV positiver Zellen bei den immunisierten Tiere in allen untersuchten Hirnarealen erheblich verringert.

Im weiteren Verlauf der Infektion konnten BDV spezifische Signale nur noch im Hippocampus der Tiere detektiert werden, was auf die Elimination der BDV Infektion aus dem Neocortex hinwies und durch die Analyse mehrere Präparate bestätigt wurde (Abb. 4.16.8, 50 dpi). Darüber hinaus zeigten immunohistochemische Analysen von Paraffinpräparaten der Gehirne immunisierter Tiere 140 Tage nach der Infektion, dass auch eine Reduktion von BDV im Hippocampus stattgefunden hat. Es konnten nur noch einzelne positive Neuronen im Hippocampus oder Teilen des limbischen Systems gefunden werden (Vgl. 4.20.3, IHC). Eine dreimalige Immunisierung mit dem rekombinanten PPV ORFV Dp40 induzierte bei Verwendung von  $10^7$  pfu pro Dosis eine Impfschutz, der in der Lage ist eine intracraniale Infektion mit  $3 \times 10^5$ - $1 \times 10^4$  ffu BDV nicht nur zu kontrollieren, sondern das Virus mit der Zeit zu eliminieren.

Die Tiere der Gruppen A, B und D zeigten keinen entscheidenden Unterschied zu den nicht immunisierten Kontrolltieren der Gruppe H (nicht gezeigt). In den vergleichenden Analysen zwischen Tieren der Gruppen E (3xDp40 i.m.) und F (3xDp40 i.v.) zeigte sich, dass in beiden Gruppen in den untersuchten Schnitten der Neocortex frei von einer BDV Infektion war. Als Unterschied war jedoch augenscheinlich der Hippocampus der Gruppe E klar weniger stark infiziert als der von Tieren der Gruppe F. Es kam offensichtlich dort nicht zur Reduktion der BDV-infizierten Neuronen (nicht gezeigt). Es scheint, dass eine persistente BDV-Infektion durch die i.v. Immunisierung mit Dp40 nicht verhindert werden kann.

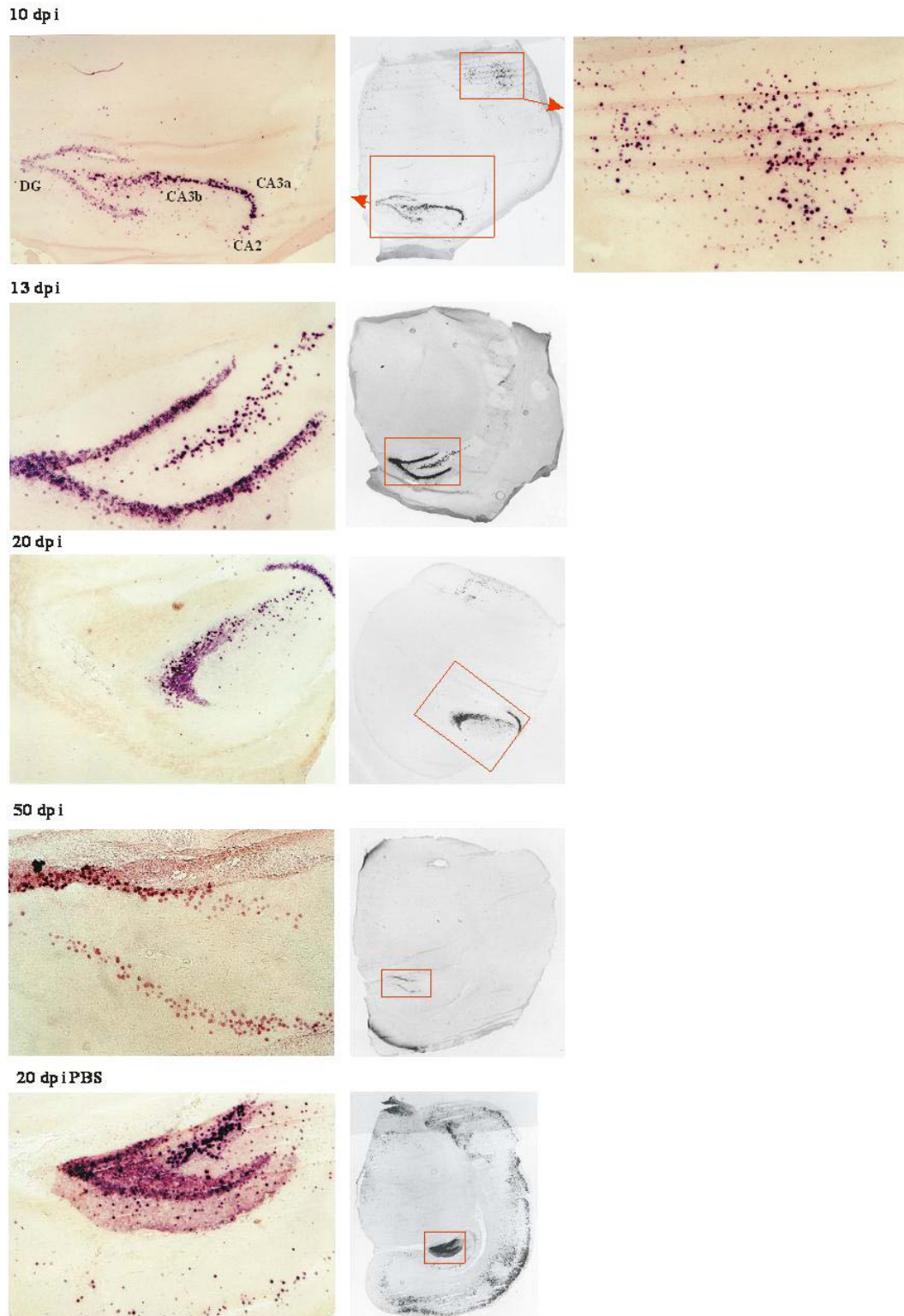


Abb. 4.16.8 *In situ* Hybridisierungen mit einer  $^{32}\text{P}$ -markierten cRNA, positiver Orientierung. Dargestellt ist der Verlauf der BDV Infektion in der rechten Gehirnhälfte immunisierter Tiere (A-E) im Vergleich zu einem Kontrolltier (PBS, F). Die Region der Schnittebene 2 ist dabei in der Abbildung D, die der Ebene 4 in der Abbildung C und die der Ebene drei in den anderen Fällen getroffen. Die Pfeile deuten auf BDV infizierte Zellen. CA3a, CA3b und CA2 geben Unterregionen des cornu ammonis, einem Teil des Hippocampus, an.

#### 4.17 Kurze Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse:

Nach Zusammenfassung aller bisherigen Ergebnisse kann man bei den unterschiedlich immunisierten Ratten drei Gruppen unterscheiden:

**1) Geschützte Tiere:** Dies waren Ratten, die nach der Immunisierung mit Dp40 keine BDV-spezifischen Symptome über einen Zeitraum von 140 Tagen nach der Infektion zeigten, eine normale Gewichtsentwicklung im Beobachtungszeitraum besaßen, am Tag 8 nach der Infektion BDV-spezifische Serumantikörper mit Titern größer als 1:160 hatten und in der Lage waren, die BDV-Infektion innerhalb der 140 Tage auf sehr wenige, einzelne Neuronen zurückzudrängen. Bei diesen Tieren handelte es sich ausschließlich um Tiere, die dreimal intramuskulär mit je  $1 \times 10^7$  pfu Dp40 immunisiert worden waren.

**2) Nicht geschützte Tiere:** Dabei handelte sich um Ratten, die ab dem Tag 13-14 nach der Infektion BDV-spezifische Symptome zeigten (Score >1), welche im Beobachtungszeitraum zunahmen und die Tiere daher getötet werden mussten. Diese Tiere besaßen am Tag 8 nach der Infektion niedrige BDV-spezifische Antikörpertiter im Serum (< 1:160), verloren ab dem Tag 11-12 nach der Infektion beständig an Körpergewicht und waren nicht in der Lage die Infektion zu kontrollieren. BDV breitete sich in allen Hirnarealen aus. Neben den kontroll-immunisierten Tieren (Gruppe H) handelte es sich hierbei um solche Ratten, die einmal mit  $1 \times 10^7$  pfu Dp40 i.m. immunisiert worden waren (Gruppe A), sowie ein Tier (#251) der Gruppe D welches mit  $3 \times 10^5$  pfu Dp40 i.m. immunisiert worden war.

**3) Partiiell geschützte Tiere:** Ratten, die sich nicht unter 1) bzw. 2) einordnen ließen, wurden als partiell geschützt Tiere bezeichnet. Zu diesen Tieren gehörten die Tiere der Gruppe B mit einer überdurchschnittlichen Körpergewichtszunahme, die auf eine Obesitas hinwies (Kao et al. 1983, Herden et al., 2000) und deren Gehirn in allen Hirnarealen mit BDV infiziert war. Ferner gehörten die Tiere #252 und #253 der Gruppe D dazu, da deren klinische BDV-spezifischen Symptome bis zum Tag 20 stetig zunahmen (Score 1,0 und 1,5), die Tiere jedoch keinen moribunden Zustand erreichten. Des weiteren waren im Western Blot BDV-spezifische Serumantikörper erst am Tag 20 nach der Belastungsinfektion detektierbar. Als ebenfalls partiell geschützt wurden die Tiere der Gruppe F eingestuft, da zwei Tiere (#121 und #122) eine überproportionale Körpergewichtszunahme zeigten und das Gehirn aller Tiere 50 Tage nach der Belastungsinfektion stärker mit BDV infiziert war als bei Tieren der Gruppe E, was auf eine persistente BDV-Infektion hinwies.

Nach diesen Ergebnissen spielte die adäquate Induktion einer humoralen Immunantwort bei der Vermittlung des Schutzes gegenüber einer BDV-Erkrankung eine Rolle. In wieweit dies zutrifft und welche Bedeutung der zellvermittelten Immunantwort nach Immunisierung im Zusammenhang mit der Vermittlung von Schutz zukommt, sollte in den folgenden Versuchen geklärt werden. Des Weiteren sollte die Frage nach dem Schutzmechanismus, welcher der Immunisierung zu Grunde liegt, geklärt werden, d.h. welche Immunzellen werden nach der Immunisierung aktiviert und welche Immunzellen wandern nach der Infektion mit BDV in das Gehirn dieser Tiere ein. Die dazu nötigen Untersuchungen wurden nur an Tieren durchgeführt, die gegenüber einer BDV-Belastungsinfektion geschützt waren.

#### **4.18 Zelluläre Immunantwort nach Dp40 Immunisierung**

In den vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass durch eine Immunisierung mit Dp40 eine gute humorale Immunantwort gegen das BDV p40 Nukleoprotein induziert wurde. Bekannt ist zudem, dass p40 das Hauptziel für eine zelluläre Immunantwort gegen BDV darstellt (Planz und Stitz, 1999) und dass p40 exprimierende VACV-Rekombinanten in der Lage sind, neben einer spezifischen humoralen auch eine zelluläre Immunantwort gegen BDV zu induzieren (Cox et al., 1992). Da cytotoxischen, CD8<sup>+</sup> T-Zellen während der BDV Infektion eine Effektorfunktion zukommt und für den immunpathologischen Verlauf der Erkrankung verantwortlich sind (Übersichtsartikel: Bilzer & Stitz, 1994, Stitz et al., 1995), stellte sich die Frage, ob solche klassischen cytotoxischen T-Zellen nach Immunisierung mit Dp40 induziert werden. Wie gezeigt, konnte durch Immunisierung der Ratten (3x mit je 10<sup>7</sup> pfu Dp40 im) ein immunpathologischer, symptomatischer Verlauf der BDV Infektion verhindert werden. Ein direkter Nachweis der Aktivität cytotoxischen, CD8<sup>+</sup> T-Zellen, sollte mittels eines BDV p40-spezifischen Cytotoxizitätstests erbracht werden.

Die Frage der Induktion dieser cytotoxischen T-Zellen nach Immunisierung mit Dp40 wurde primär im Mausmodell erörtert. Grundlegende Fragen, wie Infizierbarkeit und Fremdgenexpression in den nicht-permissiven Zellen (Maus und Ratte) mussten zuvor abgeklärt werden.

##### **4.18.1 Infektion von nicht-permissiven Maus-Zellen mit ORFV**

Für die Etablierung eines Cytotoxizitätstests war es notwendig, im Maus-System interessante Zielzellen auf ihre Infizierbarkeit mit rekombinanten ORFV und eine effiziente Fremdgenexpression zu untersuchen. Da von Pockenviren bekannt ist, dass die Virionen die

für eine frühe Genexpression notwendigen Faktoren enthalten (Golini & Kates, 1985; Rohrmann et al. 1985, 1986), sollte auch hier die Möglichkeit bestehen, Mauszellen zu infizieren und eine frühe Genexpression erfolgen. Zur Infektion wurde die oben beschriebene (4.3) lacZ<sup>+</sup> Rekombinante D1701-VrV verwendet, deren bakterielles lacZ-Gen nach Zugabe von X-Gal eine Blaufärbung der infizierten Zellen bewirkte. Die Tabelle 4.18.1 gibt einen Überblick über die Genexpression des lacZ-Gens in zwei nicht-permissiven Mauszellen im Vergleich zu den für ORFV D1701-V permissiven Vero-Zellen. Bei den verwendeten Mauszelllinien MC57 und 3T3 handelt es sich um syngene Zellen der Mausstämme C57/Bl6 (H-2<sup>b</sup>) bzw. Balb/C (H-2<sup>d</sup>).

	Vero			MC57			3T3		
	4h pi	24h pi	48h pi	4h pi	24h pi	48h pi	4h pi	24h pi	48h pi
moi 1	0	5	10	0	<5	<5	0	0	<5
moi 10	<5	25	50(†)	0	5	10	<5	<5	<5 (†)
moi 100	25	80	†	10	30 (†)	30 (†)	20	†	††

**Tab 4.18.1: Fremdgenexpression von lacZ in nicht permissiven Mauszellen verglichen zu permissiven Vero-Zellen nach Infektion mit dem rekombinanten ORFV D1701-VrV. Nachweis der Enzymaktivität von lacZ durch das Substrat X-Gal. Die Angaben bezeichnen den prozentualen Anteil an lacZ-positiven Zellen zur Gesamtzahl der Zellen. h pi: Stunden nach Infektion. moi: „multiplicity of infection“ – Anzahl der Viren die pro Zelle zur Infektion eingesetzt wurden. (†): Zustand der Zellen schlecht, d.h. ein Teil der Zellen ist abgekugelt; †: viele Zellen sind abgekugelt, tote Zellen sind auf die Virusinfektion zurückzuführen; ††: alle Zellen sind tot, kein unmittelbarer Zusammenhang mit der Virusinfektion gegeben.**

Die Tabelle 4.18.1 zeigt, dass die Anzahl infizierter, lacZ<sup>+</sup> Vero-Zellen in Abhängigkeit von der verwendeten moi und der Inkubationsdauer zunahm. Bei einer moi von 10 waren nach 48 Stunden 50% der Zellen lacZ-positiv, jedoch war ein Teil der Zellen abgekugelt, was auf die verwendete hohe moi zurückzuführen war. Bei einer moi von 100 waren bereits nach 24 Stunden 80% der Zellen lacZ-positiv und nach 48 Stunden waren die Zellen durch die Infektion vollständig lysiert.

Die infizierten Mauszellen wiesen ebenfalls einen Zusammenhang zwischen der Anzahl positiver Zellen und verwendeter moi auf, jedoch konnte in höchstens 30% der infizierten MC57 Zellen eine Blaufärbung nachgewiesen werden (moi 100, 24h, 48h pi). Ein großer Teil der Zellen war zu diesem Zeitpunkt bereits abgekugelt, jedoch war ein virusbedingter

cytopatischer Effekt nicht zu erkennen. Noch schlechter ließen sich die 3T3 Mausezellen infizieren. Hier konnte im besten Fall bei 20% der Zellen (4h, moi 100) eine positive Blaufärbung erzielt werden. Zu späteren Zeitpunkten und höherer moi starben alle Zellen ab. Dies war jedoch nicht auf eine virusbedingte Lyse der Zellen, sondern auf einen virotoxischen Effekt zurückzuführen, da in Titrationsexperimenten weder im Kulturüberstand noch intrazellulär infektiöses ORFV nachgewiesen werden konnte (Fischer, 2002).

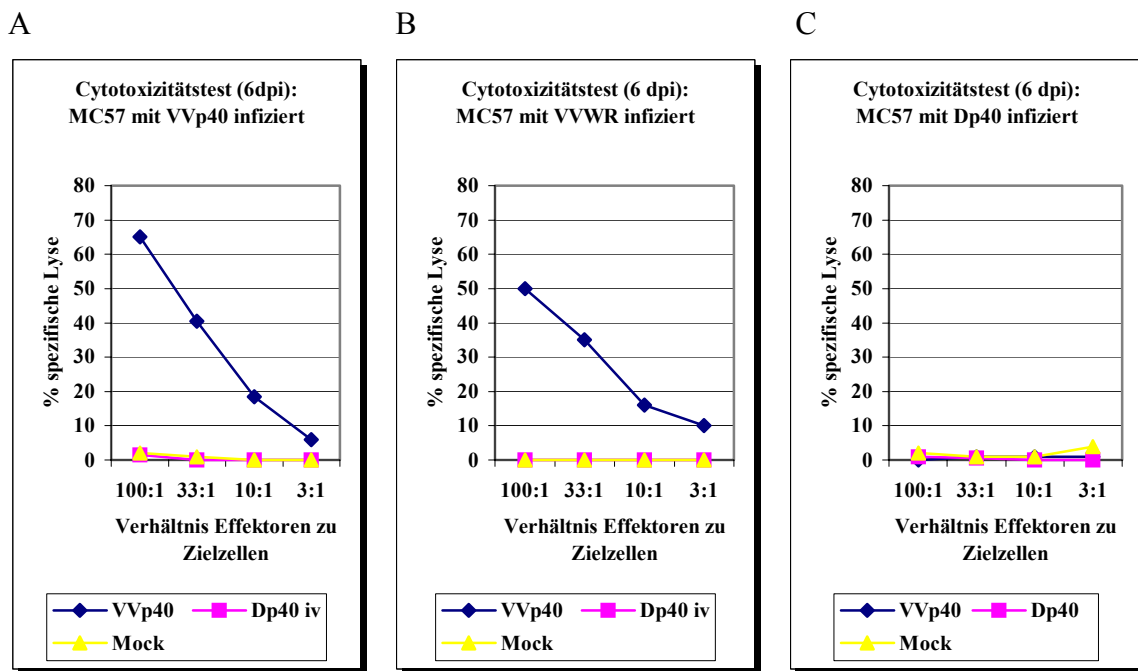
Die Versuche haben gezeigt, dass maximal 30% der murinen Zellen mit rekombinantem ORFV infizierbar waren und das Fremdgen lacZ exprimierten. Eine Nutzung muriner ORFV-infizierter Zellen für den Nachweis spezifischer cytotoxischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist daher aufgrund der geringen Zahl verfügbarer Zielzellen problematisch.

Hingegen zeigten diese Experimente die erfolgreiche Fremdgenexpression in Zellen, die für eine ORFV D1701-V Infektion nicht-permissiv sind.

#### **4.18.2 Untersuchungen zur zellulären Immunantwort im Mausmodell**

Von Interesse bei diesen Untersuchungen war, neben der grundsätzlichen Möglichkeit von Dp40 p40-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu induzieren, auch die Frage, ob es eine Kreuzreaktivität zwischen VACV und ORFV gibt.

Zur Induktion cytotoxischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden Mäuse (C57/Bl6) mit  $1 \times 10^7$  pfu Dp40 intravenös oder intramuskulär immunisiert. Nach 6 bzw. 8 Tagen wurden die Milzen der Tiere zum Nachweis peripherer CD8<sup>+</sup> cytotoxischer T-Zellen (Effektoren) entnommen. Die Effektoren wurden mit infizierten syngenen, <sup>51</sup>Cr-markierten MC57-Zielzellen in unterschiedlichen Verhältnissen zusammengebracht. Die Zielzellen waren mit einer p40 exprimierenden VACV-Rekombinanten (VVp40; moi 5), dem VACV Stamm Western Reserve (VVWR; moi 5), mit Dp40 (moi 100) 1 Stunde (Abbildung 4.18.1) oder mit Dp40 20 Stunden (Abbildung 4.18.2) vor dem Versuch infiziert worden. Als Kontrolle wurden Effektoren von VVp40 ( $1 \times 10^7$  pfu, i.v.) und nicht-immunisierten Tieren sowie nicht infizierte Zielzellen in den Versuchen mitgeführt. Eine Inkubationszeit von 6 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> ermöglichte den spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die virusinfizierten Zielzellen zu lysieren, worauf das <sup>51</sup>Cr in den Zellkulturüberstand freigesetzt wurde und gemessen werden konnte.



**Abb. 4.18.1:** Cytotoxizitätstest (6 dpi) mit peripheren Lymphocyten der Milz von VVp40, Dp40 oder Mock immunisierten Tieren. Die Tiere sind 6 Tage vor Entnahme der peripheren Effektoren standardmäßig immunisiert worden. Je Gruppe wurden 2 Tiere verwendet (Mock: n=1). Die Zielzellen (MC57) wurden mit VVp40 (A, moi 5), VVWR (B, moi 5) oder Dp40 (C; moi 100) parallel zur  $^{51}\text{Cr}$ -Markierung infiziert. Die Testdauer betrug 6 Stunden. Spontane  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzung: A) 11%; B) 14%; C) 19%.

Wie erwartet, konnten durch die Immunisierung mit VVp40 (Kontrolle) cytotoxische  $\text{CD8}^+$  T-Zellen induziert werden, die entsprechend infizierte oder mit VVWR-infizierte Zielzellen lysierten. Die Effektoren erzielten dabei im Durchschnitt eine spezifische Lyse von 65% auf VVp40 (Abb. 4.18.1A) und von 50% auf VVWR (Abb. 4.18.1B) infizierten Zielzellen. D1701-VRVp40 infizierte Zielzellen wurden hingegen nicht lysiert (Abb. 4.18.1C). Eine Differenzierung zwischen VACV-spezifischen und p40-spezifischen cytotoxischen T-Zellen war aufgrund einer fehlenden Lyse der Dp40 infizierten Zielzellen somit nicht möglich. Ein vergleichbares Bild zeigten Milzzellen 8 Tage nach der Immunisierung (Abb. 4.18.2A-C). Hier konnten die Effektoren der VVp40 immunisierten Tiere die VVp40 und VVWR infizierten Zielzellen durchschnittlich zu 72% bzw. 61% lysieren. Dp40 infizierte Targets wurden nicht lysiert.



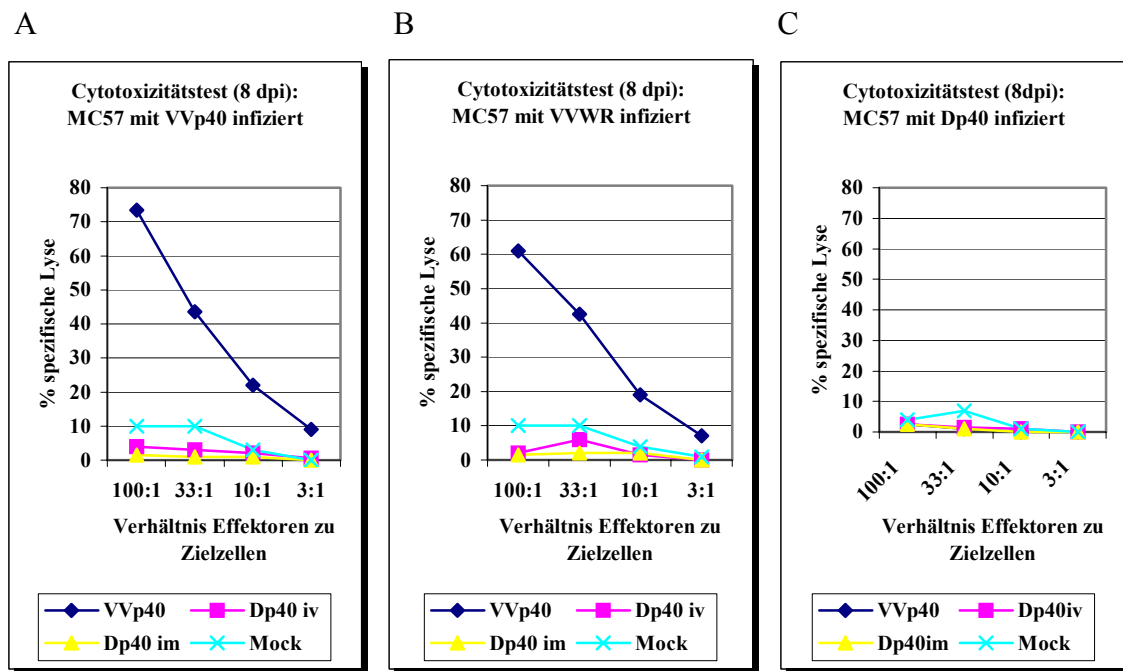


Abb. 4.18.2: Cytotoxizitätstest (8 dpi) mit peripheren Lymphocyten der Milz von VVp40, Dp40 oder Mock immunisierten Tieren. Die Tiere sind 8 Tage vor Entnahme der peripheren Effektoren standardmäßig immunisiert worden. Je Gruppe wurden 2 Tiere verwendet (Mock: n=1). Die Zielzellen (MC57) wurden im Rahmen der  $^{51}\text{Cr}$ -Markierung mit VVp40 (A, moi 5), VVWR (B, moi 5) infiziert oder im Fall von Dp40 bereits 20 Stunden vor Versuchsbeginn (C; moi 100). Die Testdauer betrug 6 Stunden. Spontane  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzung: A) 13%; B) 15%; C) 21%.

Eine i.m. oder i.v. Immunisierung mit Dp40 führte in diesem Versuchsaufbau zu keiner messbaren Induktion spezifischer, cytotoxischer T-Zellen. Da die Zielzellen durch Dp40 nicht sehr gut infizierbar waren (Tabelle 4.18.1), wurde nur eine geringere spezifische Lyse der entsprechenden Zielzellen erwartet. Das Fehlen selbst einer geringen spezifischen Lyse der Zielzellen deutete daraufhin, dass entweder keine oder nur geringste Mengen cytotoxische T-Zellen durch Dp40 induziert worden waren. Die Induktion spezifischer  $\text{CD8}^+$  peripherer T-Zellen bleibt daher fraglich. Ebenso konnte die Frage nach einer Kreuzreaktivität zwischen ORFV- und VACV-spezifischen cytotoxischer T-Zellen in diesem Versuch nicht beantwortet werden, da sowohl Dp40 infizierte Zielzellen von den Effektoren der VV immunisierten Tiere, als auch die Effektoren der Dp40 immunisierten Tiere die VV infizierten Zielzellen nicht lysierten. Da auch eine minimale Lyse in den dargestellten Kombinationen ausblieb, scheint jedoch eine Kreuzreaktivität zwischen den VV- und ORFV-spezifischen CTLs eher unwahrscheinlich.

### 4.18.3 Untersuchungen zur zellulären Immunantwort im Rattenmodell

Weiterhin wurden Analysen zur zellulären Immunantwort in Lewis-Ratten durchgeführt. Die Ratten wurden hierzu mit  $1 \times 10^7$  pfu D1701-VrVp40 je Oberschenkel intramuskulär (i.m.) immunisiert, die peripheren Immunzellen aus der Milz zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Tag 3, 6, 9, 12, 15 und 18 nach der Infektion) isoliert und mit syngenen  $^{51}\text{Cr}$ -markierten F10-Zellen (Rattenastrocyten) inkubiert (12 bis 16 Stunden,  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ). Die Überprüfung der Infizierbarkeit der Astrocyten und der Fremdgenexpression entfiel hier, da die MHC I Moleküle dieser Zellen mit einem immunogenen Peptid 9048 des p40 Nukleoproteins von außen beladen werden konnten (Planz et al., 2001). Die Versuche lieferten jedoch zu keinem Zeitpunkt ein reproduzierbares Ergebnis. Eine klare Aussage über die Induktion von cytotoxischen  $\text{CD8}^+$  T-Zellen nach Dp40 Immunisierung konnte somit nicht getroffen werden. Tendenziell war zu erkennen, dass am Tag 9 nach der Immunisierung eine geringe Aktivität spezifischer cytotoxischer T-Zellen zu finden war (Daten nicht gezeigt). In Anlehnung an die Daten von Batra, 2000, sollte in zukünftigen Versuchen durch einmalige oder mehrmalige Stimulation der Effektoren *in vitro* über einen längeren Zeitraum der Nachweis von peripheren BDV-spezifischen cytotoxischen  $\text{CD8}^+$  T-Zellen versucht werden. Daraufhin wurden die lokalen Immunzellen, die in das Gehirn immunisierter Tiere nach der BDV-Infektion einwanderten (Tag 9 nach der Infektion) analysiert. Es erfolgte ein Vergleich der Gehirnlymphocyten von Dp40 immunisierten Tieren ( $n=3$ ), mit D1701-V Wildtyp Virus immunisierten ( $n=3$ ) und nur BDV infizierten Tieren ( $n=3$ ). Als Kontrolle fungierten Lymphocyten aus BDV infizierten Tieren vom Tag 19 nach der Infektion ( $n=3$ ), von denen bekannt war, dass sie peptidbeladene Zellen lysierten (Planz et al., 2001). Die Gehirnlymphocyten der Tiere einer Gruppe wurden vereinigt und über Nacht in T-Zell Medium kultiviert. Aufgrund der geringen Zellzahlen nach der Isolation der Gehirnlymphocyten wurden die Effektoren (Gehirnlymphocyten) mit den Zielzellen, die mit dem Peptid 9048 beladen (9048-F10) oder unbehandelt (NL-F10) waren, beginnend bei einem Verhältnis von 20:1 miteinander inkubiert.

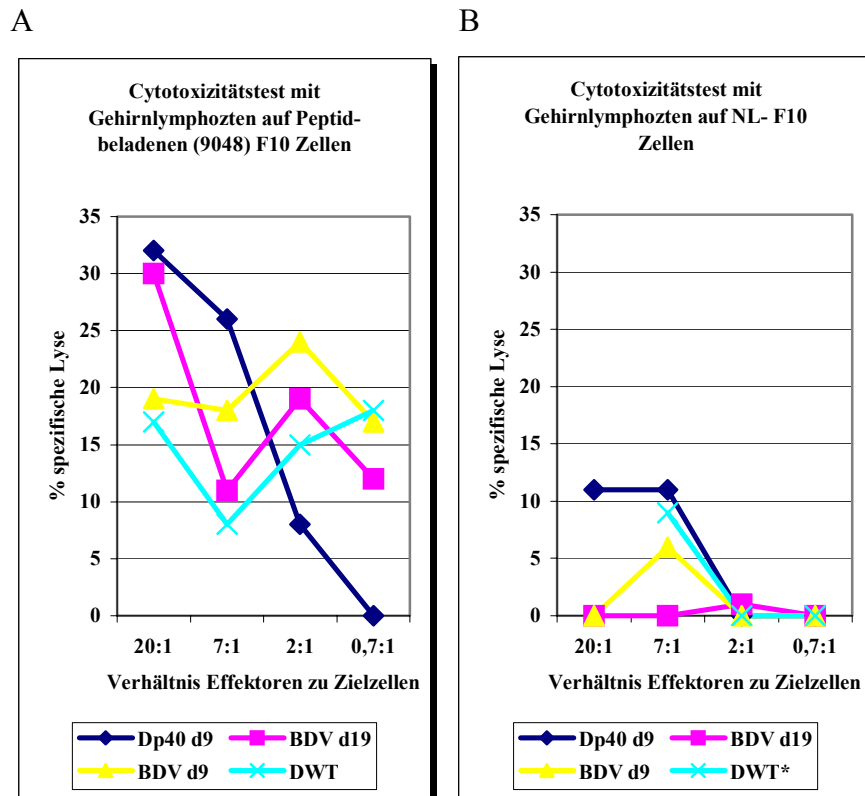


Abb. 4.18.3: Cytotoxizitätstest mit Gehirnlumphocyten aus Tieren, die immunisiert (Dp40 oder DWT) und BDV oder nur BDV infiziert waren (BDV d19, d9). Die Gehirnlumphocyten wurden über Nacht in T-Zell-Medium kultiviert und anschließend in den angegebenen Verhältnissen mit den Zielzellen inkubiert. Die MHC I Moleküle der F10 Zellen wurden mit Peptid 9048 während der  $^{51}\text{Cr}$ -Markierung beladen ( $1\mu\text{g}/10^6$  Zellen), A; B: nicht beladenen F10 Zellen; Spontane  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzung: 9048-F10: 58%; NL-F10: 51%.

Die Abbildung 4.18.3A zeigt, dass die Gehirnlumphocyten der Dp40 i.m. immunisierten Tiere 9 Tage nach der Belastungsinfektion (Dp40 d9) eine cytotoxische Aktivität für Peptid-beladenen F10-Zellen besaßen. Diese war vergleichbar mit der BDV Positiv-Kontrolle, BDV d19, während die cytotoxische Aktivität der Gehirnlumphocyten der Gruppen BDV d9 deutlich geringer war und die der Gruppe DWT als Hintergrundaktivität interpretiert werden konnte. Ein klarer Titrationseffekt, wie bei den Effektoren der Dp40 immunisierten Tiere zu erkennen (Dp40 d9), fehlt bei den Gruppen BDV d19, BDV d9 und DWT aufgrund eines Funktionsfehlers der Multikanalpipette. Die Verhältnisse zwischen Effektoren und Zielzellen waren dadurch verändert und die Kurven zeigten keinen geradlinigen Verlauf. Auf nicht Peptid-beladenen F10-Zellen besaßen die Gehirnlumphocyten aller Gruppen keine cytotoxische Aktivität (Abb. 4.18.3B). Da die Spontanlyse der Zielzellen sehr hoch war (9048-F10: 58% und NL-F10: 51%), konnten die Ergebnisse nur richtungsweisend interpretiert werden und könnten anzeigen, dass die Immunisierung der Tiere mit Dp40 auch eine Induktion cytotoxischer  $\text{CD8}^+$  T-Zellen bewirkt hatte. Im Gegensatz zum normalen

Verlauf der BDV Erkrankung erscheinen die spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in den immunisierten Tieren früher im Gehirn (Tag 9 nach der Infektion). Diese Ergebnisse geben einen ersten Hinweis darauf, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen auch bei der Immunisierung mit Dp40 und damit bei der Vermittlung von Schutz gegenüber der BD Erkrankung eine Rolle spielen.

#### 4.19 Charakterisierung peripherer Immunzellen in poplietalen Lymphknoten

Neben dem Nachweis von funktionellen Immunzellen, wie unter 4.18 beschrieben, war von Interesse, welche Immunzellen in den lokalen Lymphknoten nach Immunisierung mit Dp40 verstärkt auftraten. Durch diese Charakterisierung sollten sich Anhaltspunkte ergeben, welche Populationen von Immunzellen zu einem frühen Zeitpunkt nach der Immunisierung mit Dp40 für die Vermittlung des Schutzes bedeutsam sein könnten.

Sechs Wochen alte Lewis Ratten wurden hierzu mit einer Dosis von 10<sup>7</sup> pfu Dp40 je Oberschenkel einmal oder im Abstand von 14 Tagen zweimal immunisiert. Die lokalen, poplietalen Lymphknoten wurden anschließend zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Immunisierung isoliert und in der Durchfluscytometrie (FACS) mittels verschiedener monoklonaler Antikörper charakterisiert. In den Experimenten wurden verschiedene Antikörperkombinationen gegen folgende Oberflächenmoleküle der Immunzellen verwendet:

Antikörper	Zellen
αCD3/αCD4:	Zur Bestimmung der CD4 <sup>+</sup> T-Zellen
αCD3/αCD8:	Zur Bestimmung der CD8 <sup>+</sup> T-Zellen
αCD4/αCD25:	Zur Bestimmung der aktivierten, Il-2-Rezeptor positiven CD4 <sup>+</sup> Zellen
αCD8/αCD25:	Zur Bestimmung der aktivierten, Il-2-Rezeptor positiven CD8 <sup>+</sup> Zellen

Die Experimente wurden mit Hilfe nicht immunisierter Kontrolltiere und mit Lymphozyten, welche über Nacht mit ConA stimuliert worden waren, überprüft. Die Zellen, die für die ConA-Stimulierung verwendet wurden, stammten ebenfalls aus unbehandelten Tieren.

Die Untersuchungen der Kontrollen zeigten die erwarteten Ergebnisse. Die unbehandelten Nulltiere (n=8) hatten das bei Ratten bekannte Verteilungsmuster von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Die CD4<sup>+</sup> T-Zellen besaßen dabei einen Anteil von ca. 20% an den peripheren Blutzellen und von 40% in den poplietalen Lymphknoten, die CD8<sup>+</sup> T-Zellen jeweils einen Anteil von ca. 9%. Der Anteil der aktivierten Zellen betrug bei den CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Peripherie im Durchschnitt 1,65% und in den Lymphknoten 2,13%. Im Fall der CD8<sup>+</sup>T-Zellen lag dieser im Durchschnitt bei 0,67% bzw. 0,54%. Durch die Stimulierung mit ConA (n=7) konnte der Anteil der aktivierten CD4<sup>+</sup> Zellen um den Faktor 14 und der der CD8<sup>+</sup> Zellen um

den Faktor 12 gesteigert werden. Ohne ConA-Stimulierung zeigten die Zellen vergleichbare Werte mit den Nulltieren.

Die Analyse der peripheren und lokalen Immunzellen einmal immunisierter Tiere zeigte 6, 9, 12 und 16 Tage nach der Immunisierung keine signifikanten Unterschiede zu den nicht immunisierten Tieren. Eine zweite Immunisierung im Abstand von 14 Tagen und Analyse der peripheren und lokalen Immunzellen 6, 9 und 12 Tage später zeigte ebenfalls keine Veränderung in den beschriebenen Parametern. In diesen Experimenten war somit keine Induktion oder Aktivierung von CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut oder den lokalen Lymphknoten nach Dp40-Immunisierung zu messen.

#### **4.20 Immunhistochemische Untersuchungen an Gehirnschnitten Dp40 immunisierter Tiere**

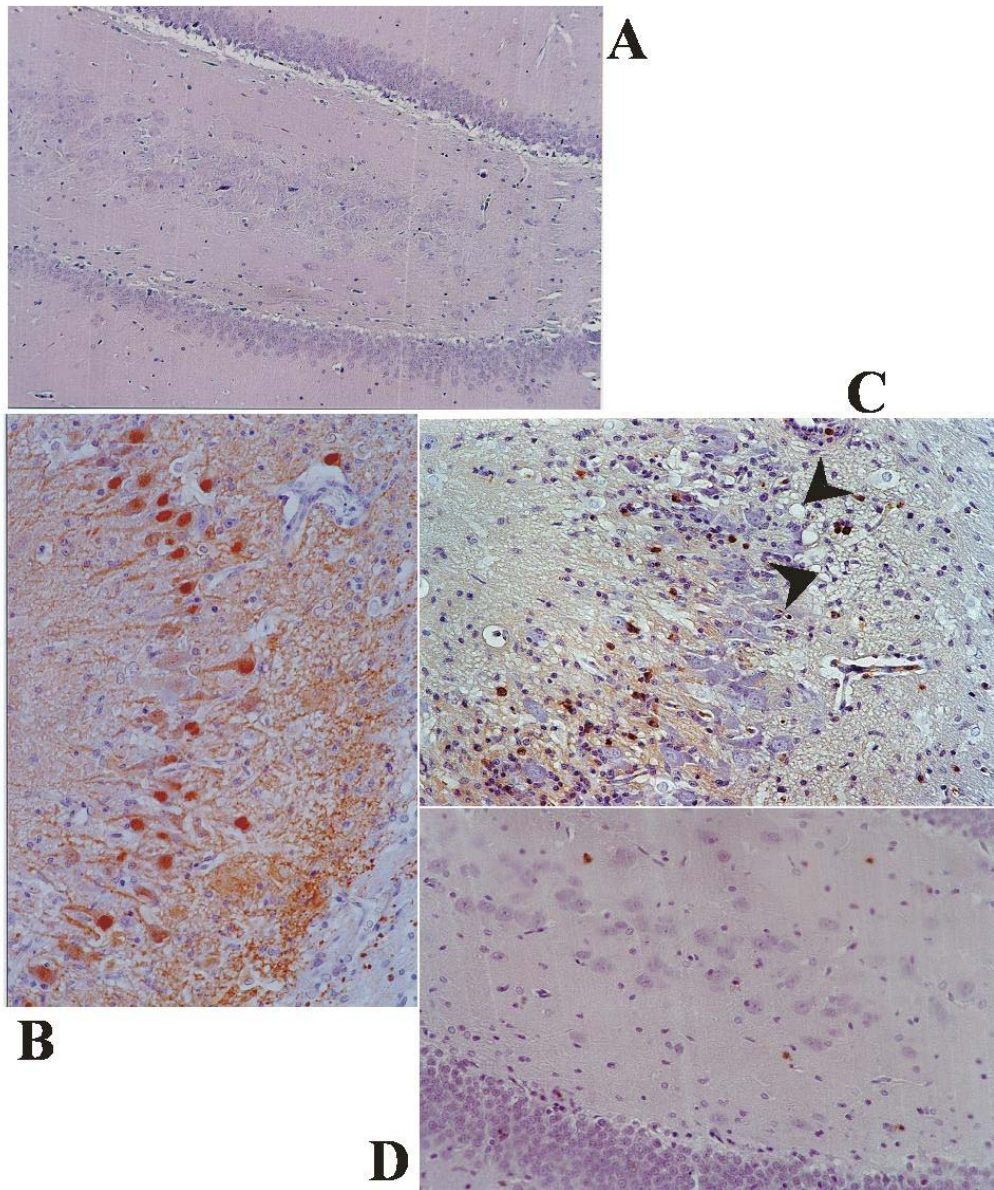
Nachdem der Nachweis in Dp40 immunisierten Tieren für cytotoxischer T-Zellen in der Peripherie nicht und im Gehirn nur unter Vorbehalt gelungen war, als auch eine Charakterisierung der Immunzellen im lokalen Lymphknoten mit den verwendeten Parametern nicht erfolgreich war, wurden die Immunzellen in den Gehirnen der Tiere immunhistochemisch analysiert. Hierzu wurden Gehirnschnitte immunisierter/infizierter, infizierter und nicht-infizierter Tiere miteinander verglichen. Es sollte eine Differenzierung zwischen CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD45RC<sup>+</sup> und BDV-infizierten Zellen vorgenommen werden. Insbesondere sollten Areale des Gehirns differenziert werden, in welchen sich eventuell bestimmte Immunzellen nach BDV-Belastungsinfektion ansammelten.

Die immunhistochemischen Analysen wurden an Paraffin-Dünnschnitten von Gehirnen 20 und 140 Tage nach der BDV-Infektion durchgeführt.

##### **4.20.1 Morphologische Auffälligkeiten bei den immunhistochemischen Analysen**

Die morphologische Beurteilung der Schnitte ergab deutliche Unterschiede zwischen den nicht infizierten und BDV-infizierten Tieren. So kam es nach BDV-Infektion sowohl in den immunisierten, als auch nicht-immunisierten Ratten zur Einwanderung von Immunzellen in das Gehirn, während keine Immunzellen in den nicht-immunisierten und nicht-infizierten Tieren gefunden werden konnten (Ab. 4.20.1A). Die auffälligsten morphologischen Veränderungen gab es hierbei in der Hippocampusregion, im Gyrus dentatus (gezähnten Windung, Abb. 4.20.1). Diese Struktur der gezähnten Windung setzt sich aus regelmäßig angeordneten Neuronen zusammen und war in den nicht-immunisierten/BDV infizierten Tieren sowie den immunisierten/BDV infizierten Ratten deutlich mit zellulären Infiltraten

durchsetzt (Abb. 4.20.1B –BDV-Kontrolltier- und C – Tier #231). Teilweise waren sogar löchrige Muster, mit einer Art spongiformen Charakter zu erkennen (Abb. 4.20.1C, Pfeilspitzen).



**Abb. 4.20.1: Morphologische Veränderungen im Hippocampus nach BDV-Infektion.** Dargestellt sind Paraffinschnitte der Gehirne verschiedener Tiere. **A:** Negativkontrolle (nicht-immunisiert, nicht-infiziert); **B:** Positivkontrolle (nicht-immunisiert, BDV-infiziert); **C:** immunisiertes/infiziertes Tier nach 20 Tagen (Tier #231) und **D:** nach 140 Tagen (Tier #423). Die Färbung der Präparate A und D erfolgte mit dem mAk Ox-8, bei B mit 38/17C1 und C mit einem  $\alpha$ IgG mAk. Die Kontrastierung der Präparate wurde durch Haematoxin-Färbung erreicht. Antikörper: A und D: Ox-8 (1:1000); B: 38/17C1 (1:3000); C:  $\alpha$  IgG (1:1000); In allen Fällen wurde das Tyramid-Verstärker-System der Fa. NEN verwendet. **A:** gleichmäßiger Aufbau des Dentate gyrus (DG) mit einer vielschichtigen, regelmäßigen Neuronenstruktur ohne zelluläre Infiltrate, **B und C:** starke Beeinträchtigung der regelmäßigen Struktur des DG durch zelluläre Infiltrate 20 dpi; **D:** Regeneration der typischen Strukturen des Hippocampus 140 dpi; Vergrößerungen: A: 100x; B-D: 200x.

Diese regelmäßige Anordnung der Neuronen im Hippocampus war bei immunisierten Ratten 10 dpi noch zu erkennen, schien sich um den Tag 20 aufzulösen (Abb. 4.20.1C, Tier #231), trat 50 dpi wieder in regelmäßiger, wenn auch noch nicht in der Form wie vor der Infektion auf, und erreichte 140 dpi wieder die ursprüngliche Struktur (Abb. 4.20.1D, Tier #423). Eine Differenzierung aufgrund morphologischer Unterschiede zwischen immunisierten und nicht-immunisierten, infizierten Tieren war nicht möglich. Die morphologischen Veränderungen im Dentate Gyrus sowie das Bild der Infiltrate um den Tag 20 nach der Infektion, waren zwischen immunisierten Tieren und nicht-immunisierten Kontrollen vergleichbar.

#### **4.20.2 Immunhistochemische Analysen 20 Tage nach der Infektion**

Klare Unterschiede zwischen immunisierten und nicht-immunisierten Tieren ergaben sich bei der Analyse des p40-Antigens in den Gehirnschnitten der Tiere. So zeigte sich bei den nicht immunisierten Kontrolltieren das bekannte Bild der BDV-Infektion. Alle Hirnareale waren stark mit BDV infiziert, besonders das Cerebellum und der Hippocampus (Abb. 4.20.2A, B). Im Gegensatz dazu wurde in keinem Gehirn der zuvor immunisierten Ratten eine vergleichbare BDV-Ausbreitung beobachtet, auch wenn individuelle Unterschiede auftraten (Abb. 4.20.2C-E). Es fanden sich immunisierte Tiere mit relativ wenigen BDV-positiven Neuronen nur im Hippocampus (Abb. 4.20.2C, Tier #231), während bei anderen Tieren alle Gehirnareale BDV-infizierte Zellen aufwiesen (Abb. 4.20.2E, Tier #232). Insgesamt zeigte sich, dass am Tag 20 pi bei allen immunisierten Ratten der Hippocampus infiziert war (Abb. 4.20.2D, Tier #233) und verglichen zu den nicht-immunisierten Tieren, benachbarte Bereiche des Neocortex eher moderat infiziert waren.

Der Einsatz des mAk Ox-8 erlaubte den spezifischen Nachweis des CD8 Moleküls auf cytotoxischen T-Zellen, NK-Zellen und Microglia-Zellen. Wie erwartet ergab die Analyse der Gehirnschnitte von nicht-immunisierten und nicht-infizierten Tieren kaum CD8<sup>+</sup> positive Zellen (Abb. 4.20.3A).



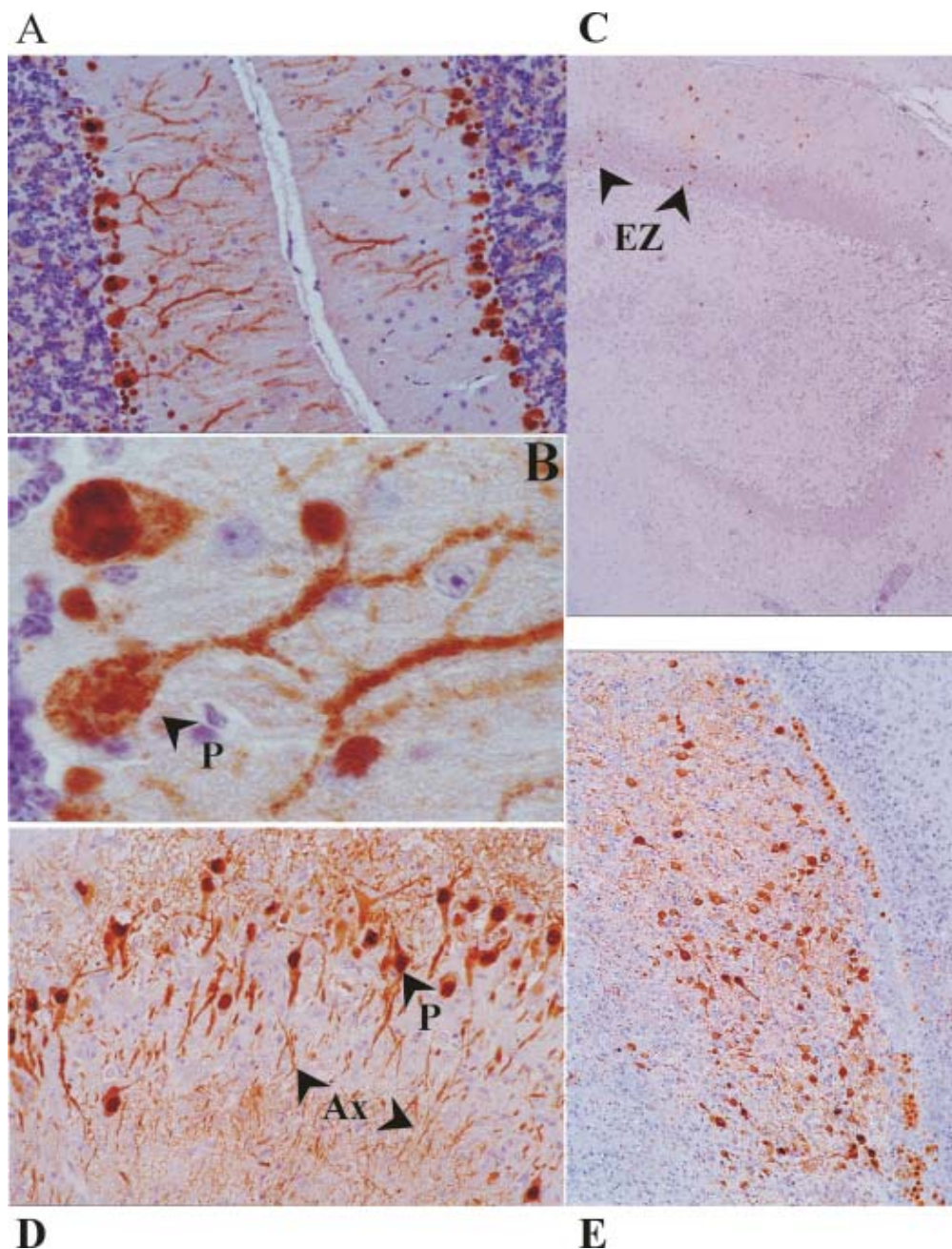


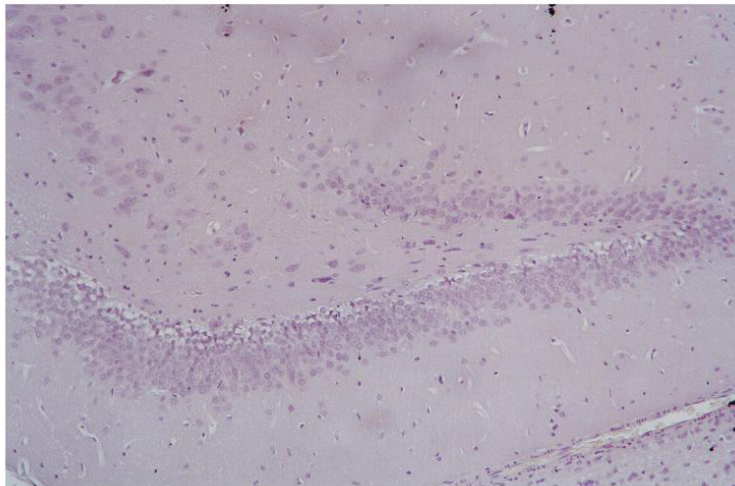
Abb.: 4.20.2: Individuelle Verteilung von BDV im Gehirn immunisierter Tiere. Immunhistochemische Nachweis der BDV Infektion mit Hilfe des mAk 38/17C1 (1:3000 verdünnt), der spezifisch das p40 Nukleoprotein detektiert. Alle Paraffin-Präparate wurden nach der Antikörperfärbung durch eine Kernfärbung über Haematoxilin kontrastiert. A: Cerebellum der Positivkontrolle, nur BDV-infiziert (Vergrößerung: 200x); B: Ausschnittvergrößerung des Präparates A (Vergrößerung 1000x); C: gering (Tier #231) und D: stark infizierter Hippocampus eines immunisierten Tieres (Tier #233); C: Anfärbung weniger Einzelzellen (EZ); D: Anfärbung der Purkinje-Zellen (P) und das den DG umgebende axonale Geflecht der Neuronen (Ax), Vergrößerung: 200x; E: Verlängerung des Hippocampus in Richtung des Streifenkörpers (Tier #232, Vergrößerung: 200x).

In Gehirnen BDV-infizierter, nicht-immunisierter Ratten schien die Bluthirnschranke für  $CD8^+$ -Zellen permeabel.  $CD8^+$  Zellen konzentrierten sich vor allem in den Bereichen BDV-

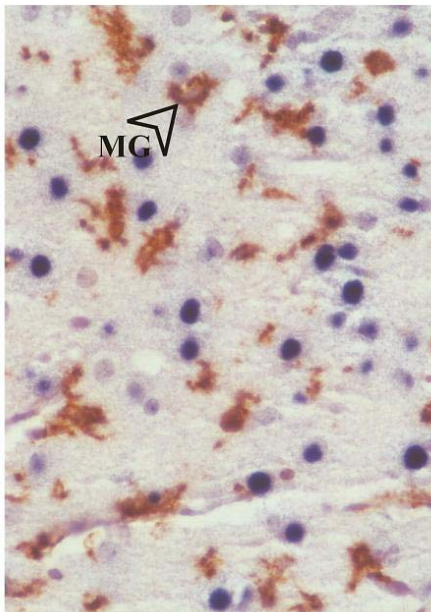


infizierter Zellen (nicht gezeigt). Durch die Infektion werden die Blutgefäße für aktivierte Immunzellen, hier  $CD8^+$  Zellen, permeabel, so dass sie in das Gehirn der infizierten Tiere einwandern können (vaskuläre Infiltration). Das BDV-Genom infizierter Zellen wurde durch *in situ* Hybridisierung nachgewiesen (blau), während  $CD8^+$  Zellen immunhistochemisch braun gefärbt wurden.

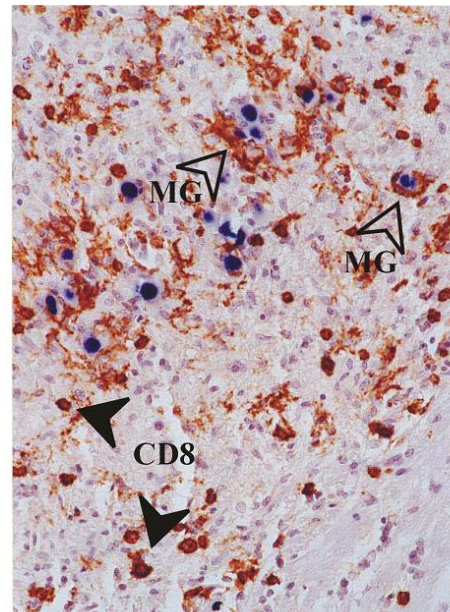
A



B



C



**Abb.: 4.20.3: Doppelmarkierung von Paraffin-Gehirndünnschnitten. Nachweis der BDV Infektion durch *in situ* Hybridisierung (intensiv blau-lila gefärbte Zellen) und der  $CD8^+$  Immunzellen durch mAk Ox-8 (1:1000 verdünnt), die sich aus  $CD8^+$  T-Zellen (CD8) und  $CD8^+$  Microglia-Zellen (MG) zusammensetzen. A: Nulltier (nicht immunisiert/nicht infiziert), es trat keine Reaktion des Ox-8 mAk auf (Vergrößerung 100x). B: Ausschnitt aus den Riechbahnen (Bulbus olfactorius) eines BDV-Kontrolltieres, es sind hier nur  $CD8^+$  MG zu sehen (Vergrößerung 200x); C: Hippocampusregion eines immunisierten und BDV infizierten Tieres (#233), deutlich können T-Zellen (CD8) von Microglia-Zellen (MG) differenziert**

---

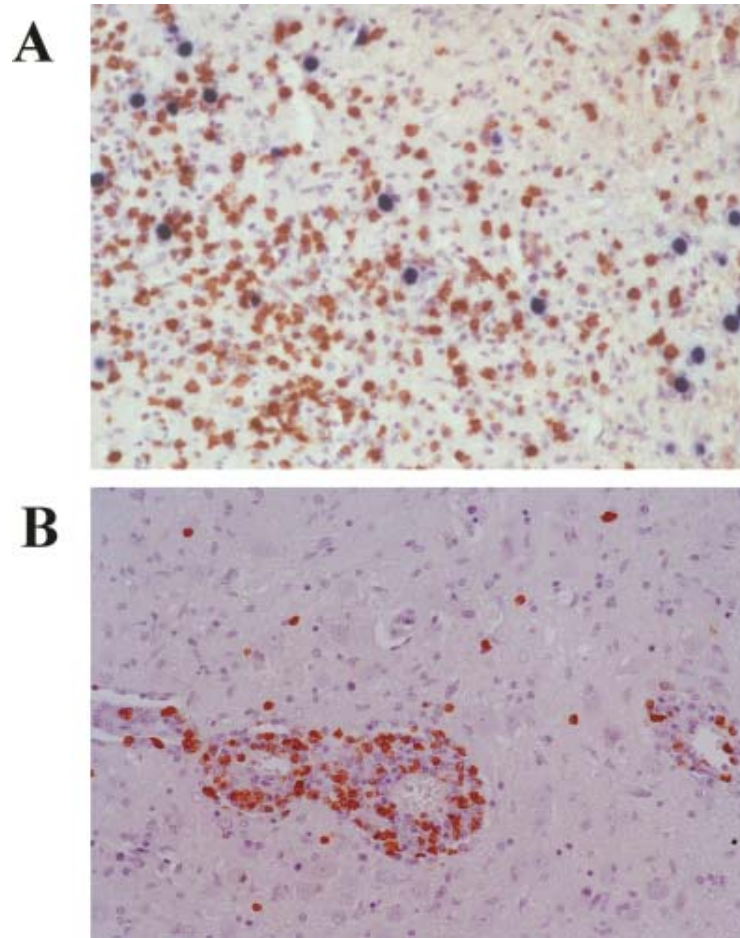
werden. Gut ist zu erkennen, wie MG infizierte Neuronen zum Teil umschließen. (Vergrößerung 200x).  
**Histologische Färbung mit Haematoxinilin.**

Durch die Ox-8 Antikörper wurden weiterhin Microglia-Zellen oder sogenannte Gehirnmakrophagen detektiert (Abb. 4.20.3B: BDV-Kontrolle und C: Tier #233, offener Pfeil). Diese sind größer als  $CD8^+$  Immunzellen und zeigen eine eher amöboide Morphologie. Sie waren ebenfalls mit infizierten Neuronen assoziiert (Abb. 4.20.3B, offener Pfeil). Eine Quantifizierung beider Population von  $CD8^+$  Zellen war aufgrund dieser Färbung jedoch nicht möglich.

Eine ähnliche Situation stellte sich in den Gehirnen der immunisierten Tiere dar. Abhängig von der Viruslast kam es zu einer unterschiedlich starken Einwanderung von  $CD8^+$ -Zellen in Assoziation mit BDV-infizierten Neuronen (Abb. 4.20.3C, Tier #233). Hierbei handelte es sich sowohl um  $CD8^+$  Immunzellen (Pfeile) als auch Microglia-Zellen (offene Pfeile). Im Gegensatz zu den Gehirnen nicht-immunisierter, BDV- infizierter Ratten schienen in den Gehirnen der immunisierten Tiere die Microglia-Zellen einen größeren Anteil an der Population der  $CD8^+$  Zellen auszumachen.

Ein klarer Unterschied zwischen immunisierten und nicht-immunisierten Tieren ergab sich bei der Verwendung des mAk Ox-22, der  $CD45RC^+$  Immunzellen erkennt. Dieses Molekül wird auf  $CD4^+$  T-Zellen, präB-Zellen, B-Zellen und einer Subpopulation von  $CD8^+$  T-Zellen exprimiert. Bei Ratten ist bekannt, dass dieser Marker auf  $CD4^+$  T-Zellen variabel exprimiert werden kann, so dass drei verschiedene  $CD4^+$  T-Zell Populationen unterschieden werden. Zum einen naive  $CD4^+$  T-Zellen, die  $CD45RC$  hoch exprimieren ( $CD45RC^{high}$ ), zum anderen  $CD4^+$  T-Gedächtniszellen, die  $CD45RC$  niedrig exprimieren ( $CD45RC^{low}$ ), von kurzfristiger Lebensdauer und für eine schnelle spezifische Immunantwort bei noch persistierendem Antigen zuständig sind. Die dritte Population zeigt wiederum eine starke Expression des  $CD45RC$ , stellt jedoch langlebige  $CD4^+$ -Gedächtniszellen der Ratte dar (Bunce & Bell, 1997). Stark  $CD45RC$ -positive Immunzellen, die diesen Marker auf der Oberfläche tragen, ließen sich fast ausschließlich in den Gehirnen immunisierter Tiere in hoher Anzahl und eindeutig assoziiert mit BDV-infizierten Neuronen finden (Abb. 4.20.4A, Tier #232).

$CD45RC^+$  Immunzellen fanden sich in den Gehirnen nicht immunisierter, BDV-infizierter Tiere dagegen sehr vereinzelt, hauptsächlich perivaskulär in Assoziation mit Blutgefäßen (Abb. 4.20.4B).

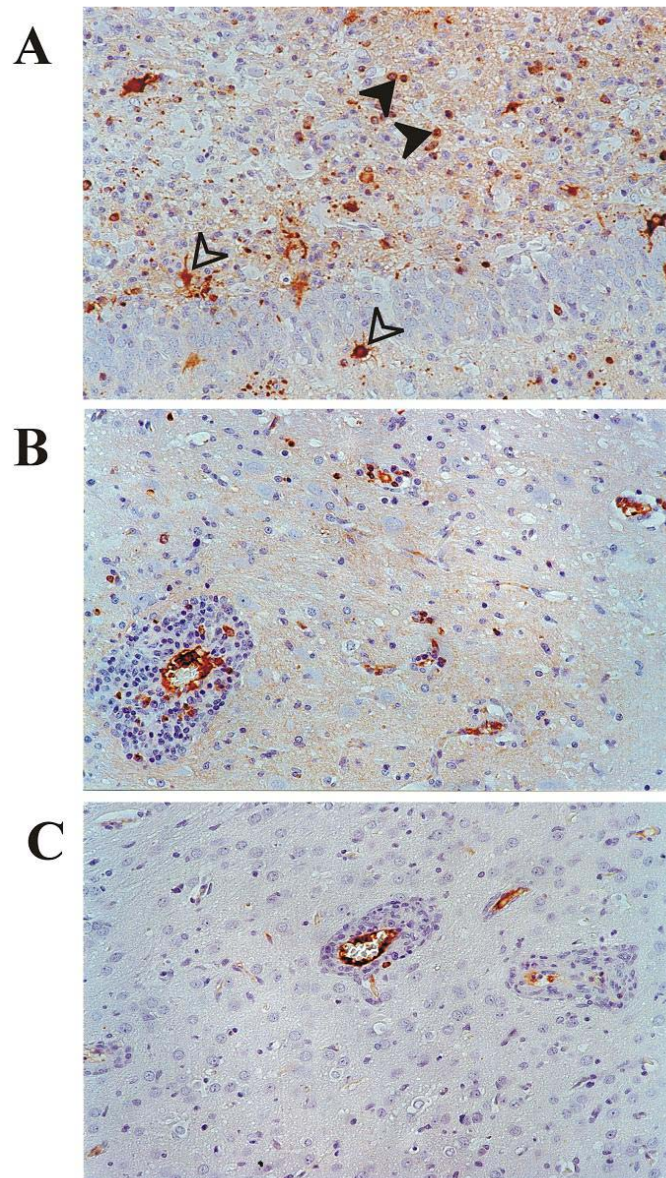


**Abb. 4.20.4:** Immunhistochemie mit Ox-22 (1:200 verdünnt). **A:** Doppelmarkierung der Gehirndünnschnitte zum Nachweis BDV-infizierten Neuronen mittels *in situ* Hybridisierung (lila-blau) und immunhistochemisch von CD45RC<sup>+</sup> Immunzellen (braun). Darstellung der Assoziation von CD45RC<sup>high</sup> Zellen mit BDV infizierten Neuronen im Hippocampus (Vergrößerung 200x); **B:** Einfachmarkierung zeigt das Auswandern naiver CD45RC<sup>high</sup> T-Zellen aus einem Gefäß im Neocortex in die Bereiche der BDV-Infektion (BDV-Kontrolle, Vergrößerung 200x). Präparate Haematoxilin gefärbt.

Eine Differenzierung zwischen T-Zellen und B-Zellen war mit dem Ox-22 Antikörper nicht möglich. Versuche, mit Hilfe weiterer B-Zell-spezifischer Antikörper schlugen bisher aufgrund ihrer schlechten Bindungseigenschaften in Paraformaldehyd-fixierten und Paraffin-eingebetteten Präparaten fehl. Ein indirekter Nachweis von B-Zellen in den Gehirnen der immunisierten Tiere war durch die Verwendung eines monoklonalen Antikörpers möglich, der spezifisch den Fc-Teil von IgG-Antikörpern der Ratte erkennt. Da IgG Antikörper sowohl ungebunden (sekretiert von Antikörper-bildenden Plasmazellen) als auch membranständig auf B-Zellen (naive B-Zellen und B-Gedächtniszellen) vorkommen, konnten so einerseits B-Zellen und andererseits von den IgG Antikörpern markierte, antigene Strukturen in den Gehirnen der Tiere nachgewiesen werden. IgG konnte vor allem im Hippocampus (Abb. 4.20.5A, Tier #243), dem Ort der stärksten BDV-Infektion, aber auch in anderen



Infektionsherden nachgewiesen werden. Lokalisiert wurden IgG Antikörper sowohl auf kleinen nicht neuronalen Zellen, wahrscheinlich B-Zellen (Abb. 4.20.5A, Pfeil), als auch direkt auf Neuronen-ähnlichen Zellen (Abb. 4.20.5A, offener Pfeil). Dies könnte bedeuten, dass BDV-infizierte Neuronen mit Antikörpern für das Immunsystem markiert werden und hierdurch eine antikörperabhängige zellvermittelte Cytotoxizität (ADCC) induziert werden könnte.



**Abb.4.20.5:** Nachweis von IgG Antikörpern der Ratte mit Hilfe eines gegen der Fc-Teil der IgG Antikörper reagierenden mAk (Verdünnung der  $\alpha$ FcIgG mAk: 1:1000). A: Hippocampus einer immunisierten Ratte nach BDV Infektion (Tier #243). Der Nachweis von IgG Antikörpern gelang auf kleinen nicht neuronalen Zellen möglicherweise B-Gedächtniszellen (B, Pfeil) und Neuronen (N, offener Pfeil). B: Thalamusregion mit aus Blutgefäßen auswandernden B-Zellen (Tier #232). C: Kontrollhirn ohne auswandernde Immunzellen, nur Anfärbung des Gefäßlumens. Vergrößerung aller Abbildungen 200x, Haematoxilin-Färbung.

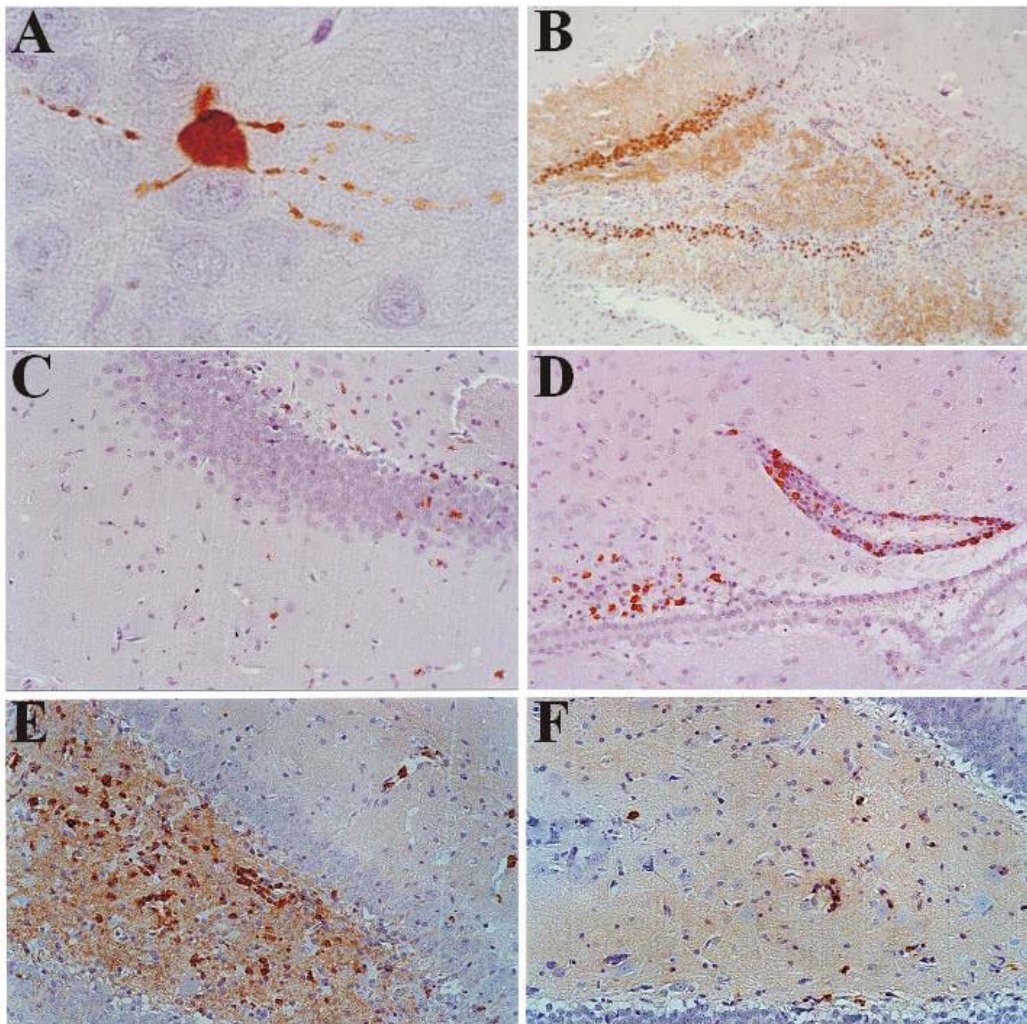
In den Gehirnschnitten der nicht-infizierten und BDV-infizierten Tiere konnte eine IgG-spezifische Färbung nur vereinzelt entlang von Blutgefäßen gezeigt werden (Abb. 4.20.5C). Eine massive parenchymatöse Einwanderung IgG-positiver Zellen war nie zu beobachten.

### 4.20.3 Immunhistochemische Analysen 140 Tage nach der Infektion

Die Ergebnisse der *in situ* Hybridisierung zeigten bereits (4.16.7), dass in immunisierten Ratten BDV 50 Tage nach der Infektion aus dem Neocortex eliminiert und auf den Hippocampus zurückgedrängt worden war. Im Hippocampus selbst waren 20 Tage pi im Vergleich zu nicht-immunisierten Tieren deutlich weniger Zellen für das BDV-Genom positiv. Der Nachweis von BDV p40 Antigen durch die Immunhistochemie hat ergeben, dass in einem von 6 Tieren 140 Tage nach Belastungsinfektion kein BDV p40-Antigen mehr detektierbar war (Tier #423), in 3 von 6 Tieren (#431, #432, #433) nur 1-3 Einzelzellen für das p40 Antigen im Hippocampus positiv (Abb. 4.20.6A, Tier #433) und nur bei einem weiteren Tier zusätzlich wenige einzelne Neuronen im Neocortex bzw. in basalen Hirnarealen BDV trugen (Tier #462, nicht gezeigt). Die Ergebnisse deuten an, dass BDV mit zunehmender Zeit nach der Infektion aus den Gehirnen immunisierter Tiere eliminiert wurde. Lediglich in einem Fall (Tier #463) wies der Hippocampus eine hohe Zahl BDV-positiver Neuronen noch 140 Tage nach der Belastungsinfektion auf. Die Neuronen im DG dieses Tieres waren deutlich BDV-positiv und auch die regelmäßige Struktur des DG war durch Infiltrate aufgelockert (Abb. 4.20.6B). Dieses Tier war schon vor Versuchsende, durch eine überproportionale Gewichtszunahme auffällig geworden und würde somit in das Bild einer persistenten BDV-Infektion im Hippocampus mit gleichzeitiger Fettsucht (Obesitas-Syndrom) passen (Kao et al., 1983, Herden et al., 2000).

Unter den nachweisbaren Immunzellen in den Gehirnen immunisierter Ratten schienen, 140 Tage nach der Infektion CD8<sup>+</sup> Zellen zu dominieren. Sie kamen bei vier (Tiere #431, #433, #462 und #463) von sechs Tieren noch in allen Gehirnarealen vor, jedoch war deren Anzahl verglichen mit der Situation 20 Tage nach der Infektion deutlich geringer (Abb. 4.20.6C). Bei einem Tier (#432) war das Auftreten CD8<sup>+</sup> Zellen auf das limbische System und die Riechbahnen, bei einem anderen Tier (#423) zusätzlich auf den Neocortex beschränkt (nicht gezeigt). Morphologisch konnten CD8<sup>+</sup> T-Zellen und Microglia-Zellen auch hier differenziert werden. Dabei entstand der Eindruck, dass sich das Verhältnis zwischen Microglia-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu Gunsten der CD8<sup>+</sup> T-Zellen verschoben hatte. CD8<sup>+</sup>-Microglia-Zellen

waren nur sehr vereinzelt zu finden. Quantitative Analysen zur Bestätigung dieses Eindrucks wurden nicht durchgeführt.



**Abb.: 4.20.6:** Die verwendeten mAKs wurden wie in den vorangegangenen Abbildungen verdünnt. **A:** Nachweis von BDV durch 38/17C1. In diesem Präparat wurde nur in einem Neuron des Hippocampus das p40 Nukleoprotein nachgewiesen (Tier #433). **B:** Der Hippocampus des Tieres #463 ist stark infiziert, die übrigen Hirnareale sind dagegen weitgehend virusfrei (mAk: 38/17C1). **C:** Wenige CD8<sup>+</sup> Immunzellen sind ausschließlich im Hippocampus des Tieres #433 darstellbar. **D:** Ox.22 markierte, CD45RC<sup>+</sup> Immunzellen assoziiert mit einem Gefäß im limbischen System. Im Gehirn selbst konnten nur sehr wenige Zellen detektiert werden (Tier #423). **E:** Nachweis von IgG Antikörpern im Hippocampus des Tieres #463. Deutlich zu erkennen sind B-Zellen, während markierte Neurone nicht zu identifizieren waren. **F:** Wenige IgG<sup>+</sup> B-Zellen im Hippocampus eines immunisierten Tieres (Tier #433). Vergrößerung aller Abbildungen: 200x, Haematoxin-Färbung.

Die Anzahl der CD45RC<sup>+</sup> Zellen ging im Vergleich zum Tag 20 nach der Infektion und vor allem im Vergleich zur Reduktion der CD8<sup>+</sup> Zellen am Tag 140 nach der Infektion noch deutlicher zurück. Ihr Vorkommen beschränkte sich im Wesentlichen auf das limbische



System (Abb. 4.20.6D, Tier #423) und im Fall des „fetten“ Tieres (#463) zusätzlich auf die Thalamusregion unterhalb des Hippocampus (nicht gezeigt). Eine eindeutige Assoziation mit BDV-infizierten Neuronen lag nicht vor.

Die Detektion von B-Zellen erfolgte über den indirekten Nachweis membrangebundener IgG Antikörper, da die Bindungseigenschaften B-Zell-spezifischer Antikörper in Paraffinpräparaten zu deren Nachweis nicht ausreichend waren. Einzig im Tier #463 fand sich eine Anhäufung von IgG positiven Zellen im Hippocampus (Abb. 4.20.6E). Sonst traten sie nur als Einzelzellen sehr sporadisch vor allem im Hippocampus (Abb. 4.20.6F, Tier #433) und angrenzenden Hirnregionen auf. Neuronen wurden jedoch nicht von IgG-Antikörpern markiert. Ein Zusammenhang von BDV-Infektion und IgG-positiven Zellen war nicht mehr gegeben.

Zusammenfassend kann man sagen, dass möglicherweise die Immunisierung mit Dp40 langlebige CD45RC<sup>+</sup> B-Gedächtniszellen induzierte, die zusammen mit den CD8<sup>+</sup> T-Zellen und verstärkter IgG Produktion in der Lage sein könnten, eine BDV-Infektion zu kontrollieren.

#### **4.21 Immunisierung mit Dp40 bei partieller Depletion des Immunsystems**

Um die Rolle von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>- T-Zellen bei dem Dp40 vermittelten Schutz zu untersuchen, wurden diese beiden T-Zell Populationen in einem ersten Experiment gezielt in Lewis-Ratten depletiert.

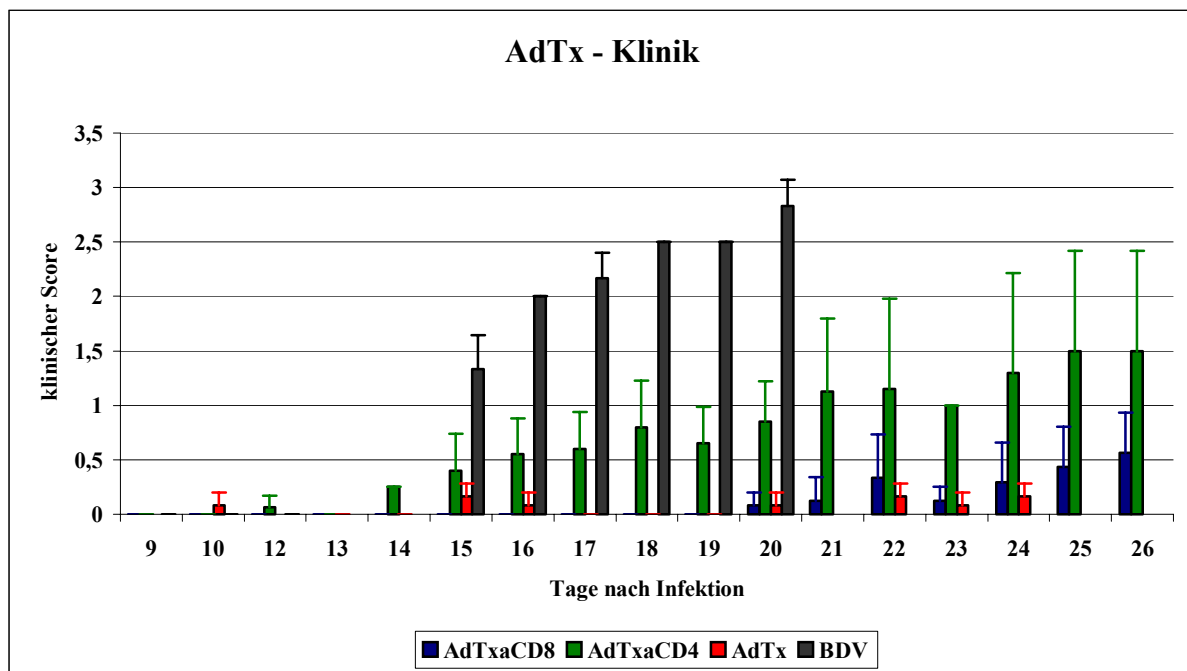
Die separate Depletion von Teilen des Immunsystems wurde erreicht, indem drei Wochen alten Lewis-Ratten der Thymus chirurgisch entfernt wurde und die verbliebenen peripheren Lymphocyten durch neutralisierende mAKs entfernt wurden (3.26.7). Die CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden durch mAk Ox-35 und CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch mAk Ox-8 eliminiert. Dies geschah bei den thymektomierten Tieren durch intraperitoneale (i.p.) Applikation von je 1,5 mg der entsprechenden Antikörper (Ox-35, Ox-8) drei und einen Tag vor der ersten Immunisierung. Die Depletion der CD4<sup>+</sup> peripheren Lymphocyten erforderte aufgrund der schwächeren neutralisierenden Eigenschaften der mAKs Ox-35 eine zusätzliche Applikation von 1 mg Ox-35/Tier direkt vor der BDV Infektion (i.p.).

Die Tiere wurden nach bekanntem Schema dreimal intramuskulär immunisiert und 14 Tage nach der letzten Applikation mit BDV ( $5 \times 10^3$ - $1 \times 10^4$  ffu) infiziert. Eine Auswertung der Ergebnisse erfolgte anschließend nur bei solchen Tieren deren Thymus bei Versuchende nicht rekonstituiert war und bei denen die Depletion von CD4<sup>+</sup>- (Zellpopulation <8%) bzw. CD8<sup>+</sup>- Lymphocyten (Zellpopulation <2%) nach FACS-Analysen deutlich reduziert war (nicht

gezeigt). An den Tieren wurden alle bereits beschriebenen Untersuchungen, wie Beurteilung der Klinik, Gewichtskurven, Serumanalysen, Viruslastbestimmung, Antigennachweis im Gehirn als auch immunhistochemische Analysen durchgeführt. Die Ergebnisse sind im Einzelnen in den folgenden Abschnitten beschrieben.

#### 4.21.1 Klinik

Die klinische Beurteilung wurde, wie in 4.16.2 beschrieben, durchgeführt und ergab das in der Abbildung 4.21.1 dargestellte Bild. Die Kontrolltiere (BDV, Abb. 4.21.1) zeigten das bereits beschriebene Verhalten (4.16.2). Ab dem Tag 15 nach der Infektion waren klare BDV-spezifische Symptome zu erkennen, die bis zum Tag 20 nach der Infektion beständig zunahmten und zu einem moribunden Zustand der Ratten führten.



**Abb. 4.21.1: Klinik thymektomierter Tiere nach partieller Depletion des Immunsystems. Angabe des klinischen Scores wie beschrieben (Abb. 4.16.2). AdTx $\alpha$ CD8:** thymektomierte Tiere deren CD8<sup>+</sup> Zellen depletiert worden sind (n=6); **AdTx $\alpha$ CD4:** thymektomierte Tiere deren CD4<sup>+</sup> Zellen depletiert worden sind (n=5). **AdTx:** nur thymektomierte Tiere (n=3); **BDV:** unbehandelte Lewis-Ratten als Kontrollen (n=3). Alle Tiere wurden mit  $5 \times 10^3$ - $1 \times 10^4$  ffu BDV nach Abschluss der entsprechenden Vorbehandlungen (Depletion, Immunisierung) infiziert.

Die zweite Gruppe, die eine eindeutige BDV-Symptomatik zeigte, war die Gruppe der thymektomierten Tiere, deren CD4<sup>+</sup> Immunzellen depletiert worden waren (AdTx $\alpha$ CD4, Abb. 4.21.1). Bei diesen Tieren traten BDV-unspezifische Symptome zwar schon früher als bei den BDV-Kontrollen auf, jedoch war ein BDV-spezifischer Score (>1) erst ab dem Tag 20



nach der Infektion zu erkennen. Über den Beobachtungszeitraum nahmen die klinischen Symptome kontinuierlich zu, erreichten aber nicht das Niveau der BDV-Kontrollen.

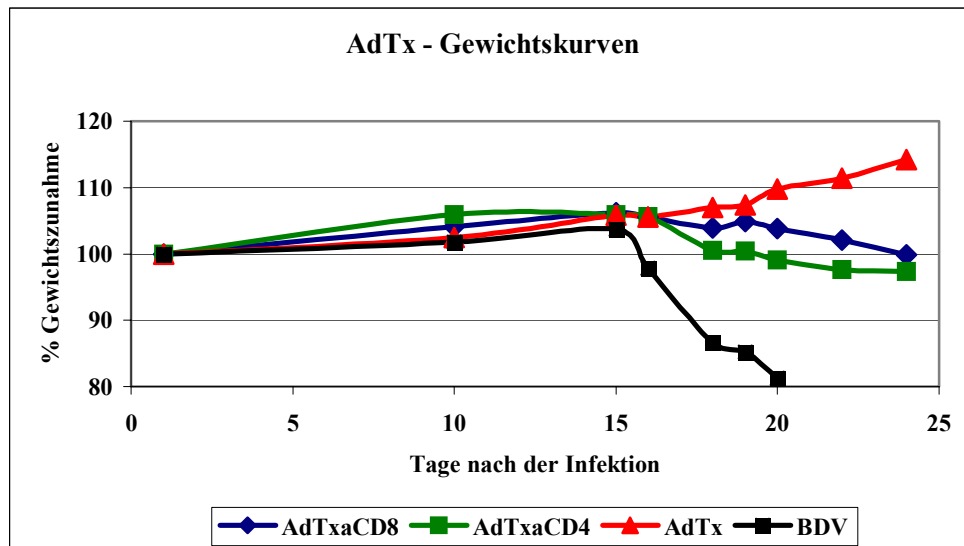
Die Tiere, deren CD8<sup>+</sup> Zellen depletiert worden waren (AdTx $\alpha$ CD8), zeigten vergleichbar mit den Tieren der Gruppe AdTx keine BDV-spezifische Symptomatik während des Beobachtungszeitraums.

Diese Ergebnisse zeigten, dass bei einer Immunisierung mit Dp40 und gleichzeitiger Depletion von CD4<sup>+</sup> Zellen ein immunpathologischer Prozess hervorgerufen wurde, der vermutlich auf die unkontrollierte Reaktion BDV-spezifischer CD8<sup>+</sup>, cytotoxischer T-Zellen mit BDV infizierten Neuronen zurückgeführt werden kann (Gruppe AdTx $\alpha$ CD4, Abb. 4.21.1). Eine über CD4<sup>+</sup> T-Zellen vermittelte Hilfe, wie sie in den Gruppen AdTx $\alpha$ CD8 und AdTx noch induziert werden konnte, fehlte. Ein immunpathologischer Prozess bzw. die klinischen Folgen der BDV-Infektion wurden nicht verhindert. Den BDV-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen scheint somit, ähnlich dem bereits für BDV beschriebenen Modell (Nöske et al., 1998), auch hier eine entscheidende Rolle zu zukommen. Die weiteren Versuche müssen zeigen, in wie weit sich, die von der BD Erkrankung bekannten Situationen auf dieses Immunisierungsmodell übertragen lassen.

#### **4.21.2 Gewichtskurven**

Die Analyse der Körpergewichtsentwicklung ergab für die Negativ-Kontrolle (BDV, Abb. 4.21.2) den erwarteten Kurvenverlauf. Mit dem Auftreten klinischer Symptome (Tag 15 nach der Infektion) ging auch eine Reduktion des Körpergewichts einher. Die Tiere wurden am Tag 20 nach der Infektion in moribundem Zustand getötet.

Thymektomierte und immunisierte Tiere, deren peripheres Immunsystem jedoch noch vorhanden war (AdTx, Abb. 4.21.2), zeigten wie erwartet eine normale Gewichtsentwicklung. Die restlichen in der Peripherie vorhandenen Immunzellen schienen auszureichen, um einen Schutz vor klinischen Symptomen zu induzieren und einen Gewichtsverlust zu verhindern.



**Abb. 4.21.2:** Gewichtskurven thymektomierter Tiere nach partieller Depletion des Immunsystems. Angabe der prozentualen Gewichtszunahme, bezogen auf das Ausgangsgewicht bei Versuchsbeginn. Es handelt sich um die gleichen Gruppen wie in Abb. 4.21.1 beschrieben.

Die Tiere, deren Thymus entfernt worden war und deren periphere Immunzellen selektiv depletiert worden waren (AdTx $\alpha$ CD4, AdTx $\alpha$ CD8, Abb. 4.21.2), zeigten in der Entwicklung ihrer Gewichtskurven einen ähnlichen Verlauf. Ab dem Tag 15 nach der Infektion kam es zu einer leichten Gewichtsreduktion, die sich bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes hin fortsetzte. Die Reduktion erfolgte jedoch langsamer als bei den BDV-Kontrolltieren und die Tiere erreichten bei Versuche wieder die Ausgangswerte des Gewichts. Aufgrund dieser Gewichtsentwicklung könnte man einen verzögerten Verlauf der BD Erkrankung in diesen Gruppen vermuten. Im Zusammenhang mit den klinischen Daten ergab sich jedoch ein differenzierteres Bild.

Die thymektomierten, CD4<sup>+</sup> depletierten Ratten (AdTx $\alpha$ CD4, Abb. 4.21.2) zeigten deutliche BDV-spezifische Symptome, die auf die Präsenz BDV-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen hinwiesen. Eine fehlende Induktion BDV-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen führte somit im Gehirn zu einer „unkontrollierten“ Elimination der BDV-infizierten Neuronen durch CD8<sup>+</sup> Zellen und damit zu immunpathologischen Prozessen. Inwieweit eine Induktion spezifischer CD8<sup>+</sup> Zellen (T-Zellen, MG) ohne eine CD4 vermittelte Hilfe in diesem Modell möglich ist, müssen weitere Versuche zeigen.

In der Gruppe AdTx $\alpha$ CD8 kam es zu einer mit der Gruppe AdTx $\alpha$ CD4 vergleichbaren Gewichtsentwicklung, wenn auch die klinischen Symptome in zweiterer ausgeprägter waren.

### 4.21.3 Nachweis von BDV im Gehirn

Der Nachweis von replikationsfähigem BDV in den einzelnen Gehirnen erfolgte wie beschrieben (4.16.4). In der Tabelle 4.21.3 sind die individuellen Ergebnisse der Virustitrationen und der Western Blot Analysen dargestellt. Die Tiere der Infektionskontrolle (Gruppe BDV) erreichten einen mit früheren Experimenten vergleichbaren (4.16.4) BDV Titer und zeigten damit eine erfolgreiche Infektion.

Tiergruppe	Immunisierung (Analyse)	Tiernummer	VT in ffu	Ø VT in ffu	Red. %	WB	
						p24	p40
BDV	3x 10 <sup>7</sup> pfu, i.m. (20 dpi)	6101	1,3x10 <sup>5</sup>	3,7x10 <sup>6</sup>	0	+	+
		6102	7,7x10 <sup>6</sup>			+	+
		6103	3,3x10 <sup>6</sup>			+	+
AdTxαCD8	3x je 10 <sup>7</sup> pfu, i.m. (25 dpi)	611	6,1x10 <sup>6</sup>	4,3x10 <sup>6</sup>	+16	+	+
		612	9,1x10 <sup>6</sup>			+	+
		613	3,6x10 <sup>6</sup>			+	+
		615	3,4x10 <sup>6</sup>			+	+
		622	3,1x10 <sup>6</sup>			+	+
		623	5,6x10 <sup>5</sup>			+	+
AdTxαCD4	3x je 10 <sup>7</sup> pfu, i.m. (25 dpi)	632	5,7x10 <sup>4</sup>	3,2x10 <sup>6</sup>	-14	-	+
		633	5,5x10 <sup>4</sup>			+	+
		634	3,8x10 <sup>4</sup>			+	+
		635	7,3x10 <sup>6</sup>			+	+
		641	7,6x10 <sup>6</sup>			+	+
AdTx	3x je 10 <sup>5</sup> pfu, i.m. (25 dpi)	671	4,5x10 <sup>4</sup>	1,3x10 <sup>5</sup>	-96	-	-
		672	5,1x10 <sup>2</sup>			-	-
		673	3,5x10 <sup>5</sup>			+	+

**Tab. 4.21.3: BDV-Last in den verschiedenen Gehirnen. Die Angabe des Virustiters erfolgte in ffu: Fokus bildende Einheiten („focus forming unit“)/g Gehirn. Bei den Tiergruppen AdTxαCD4, AdTxαCD8, AdTx und BDV handelt es sich um die bereits oben beschriebenen Gruppen; pfu: Plaque bildende Einheiten („plaque forming units“); Ø VT: Durchschnittlicher Virustiter (VT) nach Belastungsinfektion; Red. %: Reduktion der Viruslast in %; WB: Western Blot Analyse; p40: Nachweis des p40 Nukleoproteins von BDV; p24 Nachweis des p24 Phosphoproteins von BDV.**

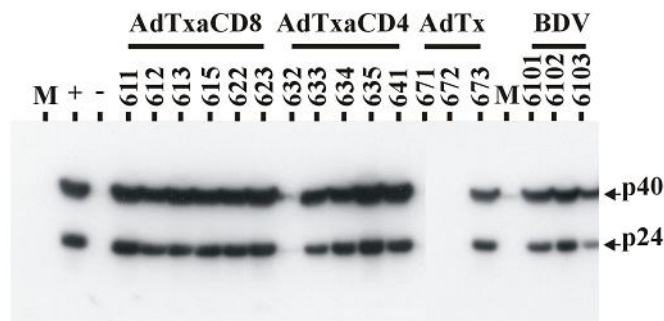
In der Gruppe AdTx korrelierten die klinischen Daten mit der Körpergewichtsentwicklung und der Viruslast. Die Viruslast wurde in dieser Gruppe durchschnittlich um 96% im Vergleich zur Infektionskontrollen (Gruppe BDV) reduziert.

Interessant war, dass die Viruslast der Tiere der Gruppe AdTxαCD4 im Durchschnitt um 14% gegenüber der BDV Gruppe reduziert war. Diese im Vergleich zur Gruppe AdTx (Reduktion um 96%) geringe Reduzierung der Viruslast, lässt den CD4+ Lymphozyten eine wichtige Rolle zukommen.

Die im Vergleich zur Infektionskontrolle durchschnittlich höhere Viruslast (+16%) im Gehirn der Tiere der Gruppe AdTx $\alpha$ CD8 ist mit der Depletion der CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu erklären. Ein Fehlen dieser für die Eliminierung virusinfizierter Neuronen verantwortlicher Immunzellen, führte zu einer uneingeschränkten Ausbreitung von BDV im Gehirn.

#### 4.21.4 Nachweis von BDV-Antigen im Gehirn

Die in 4.21.3 verwendeten Hirnhomogenate wurden für weitere Analysen im Western Blot genutzt. Die Tiere der Infektionskontrolle (Gruppe BDV) zeigten durch die Detektion der beiden BDV-Proteine p40 und p24 die erfolgreiche Infektion und Vermehrung des Virus im Gehirn. Die Banden beider Proteine waren deutlich zu erkennen (Abb. 4.21.4).



**Abb. 4.21.4:** Western Blot von 10%igen Ratten-Hirnhomogenaten 25 Tage nach der Infektion. Die Anfertigung des Blots und die Detektion mittels ECL Technik sind im Material und Methoden Teil beschrieben. Pro Spur wurden ca. 7,5  $\mu$ g Homogenat aufgetragen; AdTx $\alpha$ CD8: thymektomierte, CD8<sup>+</sup> depletierte, immunisierte und BDV infizierte Tiere; AdTx $\alpha$ CD4: thymektomierte, CD4<sup>+</sup> depletierte, immunisierte und BDV infizierte Tiere; AdTx: thymektomierte, immunisierte und BDV infizierte Tiere; BDV: unbehandelte, nur BDV infizierte Tiere (Infektionskontrolle); p40: p40 Nukleoprotein von BDV, p24: p24 Phosphoprotein von BDV; M: Protein-Größenmarker; +: Hirnhomogenat einer BDV infizierten Ratte (20 Tage nach BDV-Infektion, Positiv-Kontrolle); -: Hirnhomogenat einer nicht infizierten Ratte (Negativ-Kontrolle); Expositionsdauer: ca. 20 sec.

Die Kontrollgruppe der thymektomierten Tiere (Gruppe AdTx) zeigte im Western Blot das erwartete Bild. Das Tier mit der höchsten Viruslast im Gehirn (#673,  $3,5 \times 10^5$  ffu/g) rief auch im Western Blot deutliche Signale für die BDV Proteine p40 und p24 hervor. In den Hirnhomogenaten der anderen Tiere war kein BDV-Protein nachweisbar.

Der Nachweis der Proteine p40 und p24 von BDV gelang auch in den Hirnhomogenaten der Tiere der Gruppe AdTx $\alpha$ CD8. Passend zur hohen Viruslast in den Gehirnen waren die

Signale für die BDV-Proteine entsprechend deutlich. Die Detektion von p24 zeigte somit eine Vermehrung von BDV an.

Ebenso fand in den Gehirnen der Gruppe AdTx $\alpha$ CD4 eine Virusvermehrung statt, wobei die Signalstärken für p24 und p40 mit der vorhandenen Viruslast korrelierten. So liegt das Tier #632 mit einem Titer von  $5,7 \times 10^4$  ffu an der Nachweisgrenze und liefert nur schwache bis keine Signale für die BDV-Proteine.

Aufgrund der Daten der Virustitration und des Western Blots kann man sagen, dass die Depletion der CD8<sup>+</sup> Zellen zu einer gesteigerten Virusvermehrung führte (AdTx $\alpha$ CD8) verglichen zu den Infektionskontrollen (BDV). Die CD8<sup>+</sup> Zellen scheinen somit auch nach der Immunisierung mit Dp40 eine entscheidende Rolle bei der Reduktion der Viruslast in den Gehirnen zu spielen.

#### **4.21.5 Serumanalysen**

Zur quantitativen und qualitativen Analyse BDV-spezifischer Antikörper wurde von den einzelnen Tieren Seren vor und nach der Belastungsinfektion entnommen. Die Untersuchungen im BDV-spezifischen ELISA und Western Blot sollten die Seren in bezug auf eine humorale Immunantwort gegen BDV charakterisieren.

##### **4.21.5.1 ELISA Untersuchungen**

Die Gruppe der Infektionskontrolle (BDV, Abb. 4.21.5) zeigte in allen Serumanalysen keine BDV-spezifischen Antikörper. Erwartet wurden zwar geringe BDV-spezifische Antikörpertiter gegen Ende des Versuchs, jedoch sind in allen vorangegangenen Experimenten Tiere bei den Infektionskontrollen aufgetreten, die keinen im ELISA messbaren BDV-spezifischen Antikörpertiter besaßen. Individuelle Unterschiede können dieses Bild somit erklären.

Die Gruppe AdTx, deren peripheren Immunzellen komplett vorhanden waren, zeigten tendenziell das bereits bekannte Bild immunisierter Tiere. Die Ratten dieser Gruppe besaßen vor der BDV-Infektion einen geringen, jedoch spezifischen p40-Antikörpertiter (<1:40-1:40), der bei Versuchende angestiegen war (<1:40-1:160). Es zeigte sich, dass das Tier #672 mit der geringsten Viruslast ( $5,1 \times 10^2$  ffu, 4.21.3) sowohl bei Versuchsbeginn (1:40) als auch bei Versuchende (1:160) den höchsten BDV p40-spezifischen Antikörpertiter besaß. Für das Tier #673 wurden im ELISA keinen BDV-spezifischen Antikörper detektiert. Es besaß die höchste Viruslast ( $3,5 \times 10^5$  ffu) innerhalb der Gruppe und zeigte auch bei der Analyse der

Hirnhomogenate als einzigstes seiner Gruppe die p24 und p40 spezifischen Proteinbanden (Abb. 4.21.4).

Die Tiere der Gruppe AdTx $\alpha$ CD8 besaßen den durchschnittlich höchsten Antikörpertiter. Er reichte von 1:40 (#623) bis 1:640 (#622) vor der BDV-Belastungsinfektion und lag bei Versuchende am Tag 25 pi bei 1:160 (#623) bis 1:1280 (#622). Zu erklären ist dies mit einer intakten CD4-vermittelten T-Hilfe, was aber im Widerspruch zu den Titerunterschieden im Vergleich mit der Gruppe AdTx steht. Weitere Versuche müssen diese Ergebnisse erklären.

Tiere der Gruppe AdTx $\alpha$ CD4 zeigten trotz depletierter T-Hilfe, die Ausbildung einer humoralen Immunantwort mit höheren spezifischen Antikörpertitern als in der AdTx Gruppe. Die ELISA-Titer der Gruppe AdTx $\alpha$ CD4 lagen nach der Immunisierung mit Dp40 zwischen <1:40 (#633, #635, #641) und 1:80 (#632, #634). 25 Tage pi konnten Titer von 1:80 (#635, #641) bis 1:320 (#632, #634) bestimmt werden. Da eine CD4-vermittelte Hilfe hier ausgeschlossen werden sollte, kann alternativ eine CD4-Hilfe unabhängige Antikörperantwort diskutiert werden, die möglicherweise durch Dp40 induziert wird.

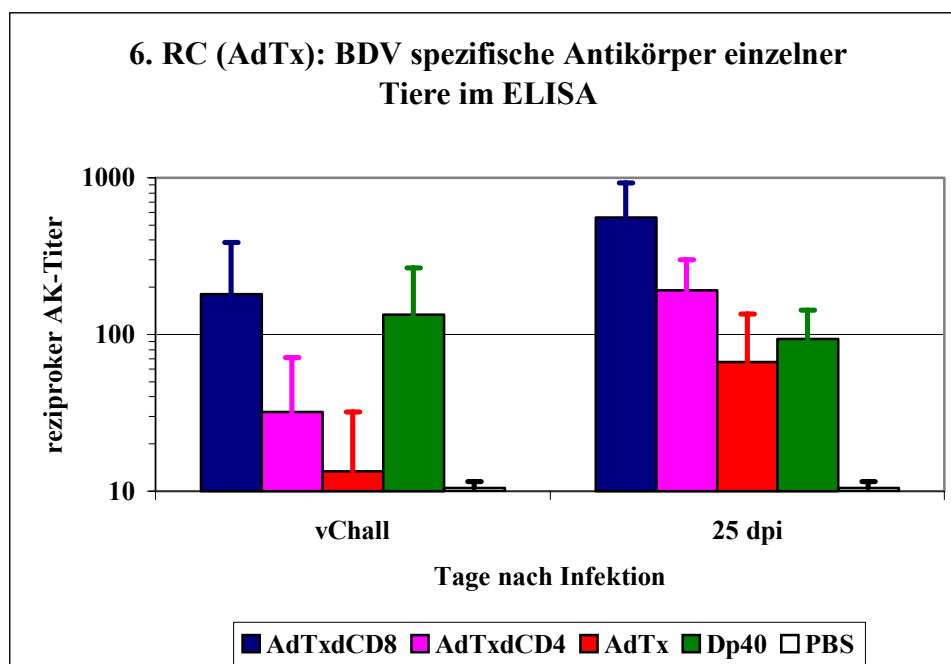


Abb. 4.21.5.1: Detektion aller BDV-spezifische Serumantikörper der thymektomierten, z.T. partiell depletierten und immunisierten Gruppen nach BDV-Infektion. Die Angabe der Serumtiter erfolgt als Durchschnitt der Werte aller Tiere einer Gruppe. Es sind die gleichen Gruppen, wie in Abb. 4.21.1 beschrieben, dargestellt; PBS-Balken sind hier nur Platzhalter, Tiere hatten keinen nachweisbaren Titer.

#### 4.21.5.2 Qualitativer Nachweis BDV-spezifischer Antikörper

Die qualitative Analyse der Seren erfolgte, wie oben beschrieben (4.17.6.2), im Western Blot durch Inkubation der individuellen Seren mit bekanntem BDV-Antigen. Die Infektionskontrollen (Gruppe BDV) besaßen vor der BDV-Infektion keine spezifischen Antikörper gegen die BDV-Proteine p40 und p24. Bei Versuchende hingegen konnten spezifische Antikörper für beide Proteine nachgewiesen werden, was für eine erfolgreiche Infektion und Vermehrung von BDV spricht.

Gruppe	Protein	Tage nach der Infektion	
		0	25
AdTx $\alpha$ CD8	p40	+++--+	++++++
	p24	-----	++-++-
AdTx $\alpha$ CD4	p40	+----	+++++
	p24	-----	+--++-
AdTx	p40	++-	+++
	p24	---	-+-
BDV	p40	---	+++
	p24	---	+++

Tab. 4.21.5.1: Analyse der Ratten-Seren im Western Blot. p40: Nukleoprotein p40 von BDV; p24: Phosphoprotein p24 von BDV; jedes Symbol steht für ein Individuum in der Reihenfolge wie in 4.21.3 aufgelistet; Die Gruppenbezeichnungen entsprechen denen aus Abb. 4.21.1; + und – steht für Einzeltiere.

In der Gruppe der thymektomierten Tiere mit komplettem peripherem Immunsystem (AdTx) zeigte sich, dass die Mehrzahl der Tiere (zwei von drei, #671 und #672) bereits durch die Immunisierung im Western Blot detektierbare p40-spezifische Antikörper besaßen. Am Ende des Beobachtungszeitraumes waren alle Tiere für p40-spezifische Antikörper positiv und auch für die Virusvermehrung relevante Antikörper gegen p24 von BDV ließen sich in einem Tier (#672) nachweisen. Das nicht alle Tier nach der Immunisierung p40-spezifische Antikörper hatten, erklärt die im ELISA gemessenen geringen BDV-spezifischen Serumantikörpertiter.

In der Gruppe AdTx $\alpha$ CD8, in der die peripheren CD8<sup>+</sup> Immunzellen depletiert worden waren, bot sich ein mit der Gruppe AdTx vergleichbares Bild. Die verbliebenen CD4<sup>+</sup> T-Zellen sorgten bei der Immunisierung und während der Infektion für eine p40- bzw., p24-spezifische Antikörperantwort. Periphere Lymphocyten waren, wie in der Gruppe AdTx, somit genügend vorhanden, so dass die CD4-Hilfe zur Generierung einer humoralen Immunantwort möglich war.

Eine überraschende Situation stellte sich in der Gruppe AdTx $\alpha$ CD4 dar, die Gruppe in der neben dem Thymus auch die peripheren CD4<sup>+</sup> Immunzellen entfernt worden waren. Wie die ELISA-Ergebnisse bereits zeigten, waren diese Tiere jedoch sehr wohl zu einer spezifischen humoralen Immunantwort fähig. Zwar zeigte nach der Immunisierung mit Dp40 nur ein Tier (#632) p40 spezifische Antikörper, aber am Tag 25 nach der BDV Infektion besaßen alle Tiere der Gruppe p40 spezifische und die Mehrheit auch p24-spezifische Serumantikörper.

#### **4.21.6 Immunhistochemische Analysen an Gehirnschnitten**

Immunhistochemischen Analysen erfolgten an Paraffinschnitten von den Gehirnen der Tiere der einzelnen Gruppen, wobei die unter 4.20 beschriebenen Zellpopulationen untersucht wurden. Als Positiv-Kontrolle wurde das Gehirn einer BDV infizierten Ratte (Tag 20 pi) und als Negativ-Kontrolle das einer nicht infizierten Ratte verwendet.

##### **4.21.6.1 Morphologische Auffälligkeiten bei den immunhistologischen Analysen**

Morphologisch waren keine auffälligen Unterschiede zwischen den einzelnen, BDV-infizierten Gruppen zu erkennen. In allen Gruppen, außer in der Gruppe der nicht infizierten Tiere, kam es nach Infektion zur Einwanderung von Immunzellen, vor allem in der Region des Hippocampus. Hier gab es augenscheinlich die auffälligsten Unterschiede im Vergleich zu den nicht-infizierten Tieren. Die Struktur der gezähnten Windung (DG, Gyrus dentatus) war dabei in allen infizierten Tieren mehr oder weniger stark durch Infiltrate aufgelockert und es traten deutlich kleine Blutgefäße hervor (Vergleiche mit 4.20.1). Eine Dilatation der Gefäße oder das Einsprossen neuer Gefäße in die infizierten Bereiche ließ sich somit vermuten. Eine morphologische Differenzierung der eingewanderten Immunzellen aufgrund histologischer Parameter, wie Granularität oder Größe war nicht möglich. Lediglich zusammen mit den immunhistologischen Parametern waren Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen zu erkennen.

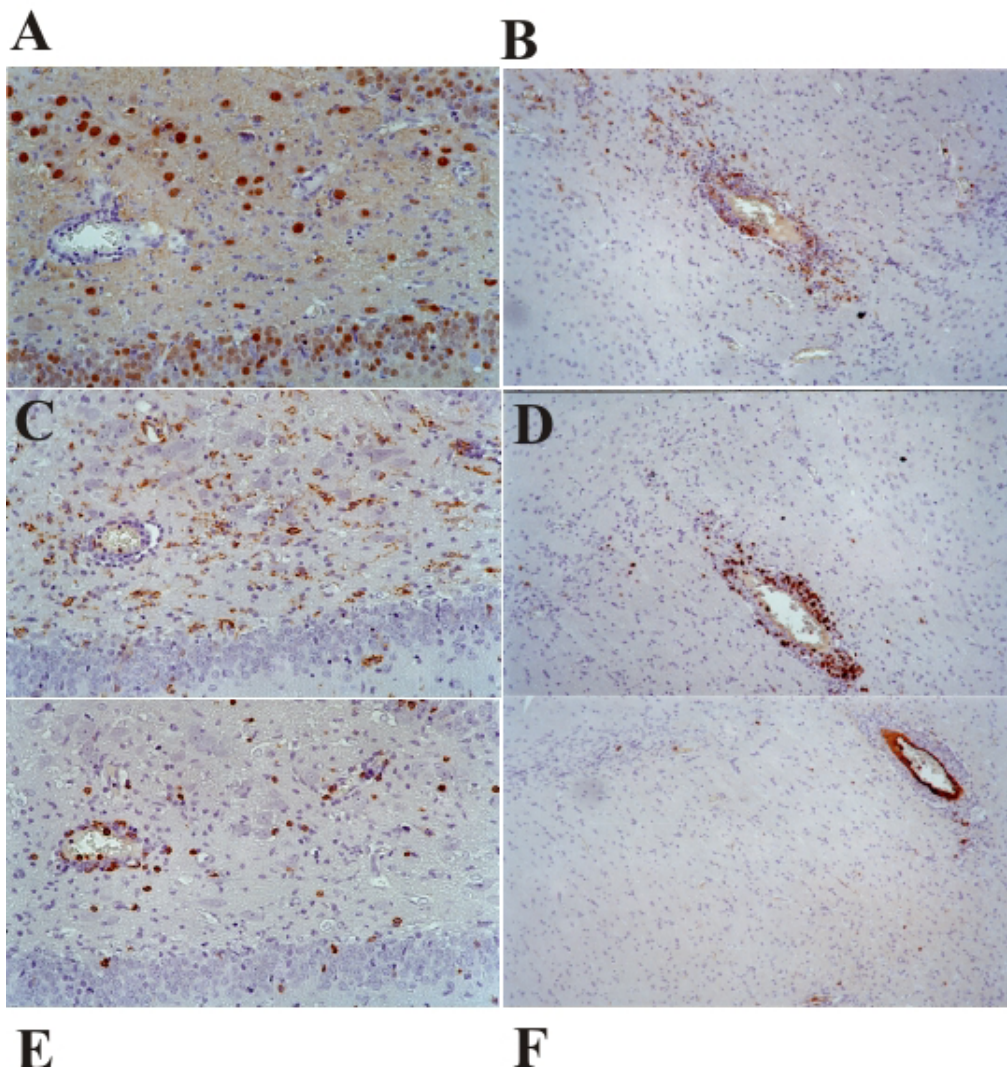
##### **4.21.6.2 Immunhistologische Untersuchungen in der Gruppe der CD8 depletierten Tiere (AdTx $\alpha$ CD8)**

Die Analyse zum Nachweis der Verteilung von BDV p40-Antigen in den Gehirnen dieser Tiere hat ergeben, dass alle untersuchten Areale stark mit BDV infiziert waren, wobei der Hippocampus zu den am stärksten infizierten Bereichen gehörte (Abb. 4.21.6A, Tier #622).



Ein quantitativer Unterschied zu den BDV-infizierten Kontrolltieren war jedoch nicht zu erkennen.

In allen Gehirnen konnten  $CD8^+$  Zellen nachgewiesen werden, die aufgrund der Morphologie als Microglia-Zellen identifiziert wurden (Abb. 4.21.6C, Tier #622).  $CD8^+$  Microgliazellen, können durch ihre Lokalisation im Gehirn nicht durch die neutralisierenden mAks Ox-8 erfasst werden. In ihrer Verteilung gibt es zwar individuelle Unterschiede bei den verschiedenen Ratten, die Markierung war aber stets im Hippocampus und Neocortex, sowie in drei von sechs Fällen in den basalen Bereichen der Gehirne erfolgreich. Augenscheinlich war das Auftreten dieser  $CD8^+$  Zellen außerhalb des Hippocampus mit dem Vorhandensein von Gefäßen assoziiert, was möglicherweise auf eine Interaktion mit chemoattraktiven proinflammatorischen Mediatoren des innate Immunsystems zurückzuführen ist (Mueller et al., 2003) (Abb. 4.21.6B, Tier #622).



**Abb.: 4.21.6: Immunhistochemische Analysen in Gehirnen von Tieren der Gruppe AdTx $\alpha$ CD8. Es wurden die bekannten mAks mit den entsprechenden Verdünnungen verwendet. Alle Abbildungen**

stammen von dem Tier #622. A: Nachweis von einer starken BDV Infektion mit 38/17C1 im Hippocampus . B: CD8<sup>+</sup> Microglia-Zellen (Ox-8 markiert), die außerhalb des Hippocampus mit Gefäßen assoziiert auftreten – keine Assoziation mit der Infektion in diesem Bereich. C: CD8<sup>+</sup> Immunzellen (Microglia-Zellen), die im Hippocampus mit der BDV Infektion assoziiert scheinen. D: Ox-22 markierte, CD45RC<sup>+</sup> Immun-Zellen assoziiert mit einem Gefäß im Neocortex und E: im Hippocampus. Augenscheinlich liegen weniger CD45RC<sup>+</sup> Zellen als in nicht depletierten Tieren (Abb. 4.21.8B) im Verhältnis zur Stärke der BDV Infektion vor. F: IgG<sup>+</sup> B-Zellen in Assoziation mit Gefäßen. Vergrößerungen der Abbildungen: A, C, E: 200x; B, D, F: 100x. Kontrastierung durch Haematoxilin-Färbung.

Die Markierung mit Ox-22 zeigte das Auftreten CD45RC<sup>+</sup> Zellen hauptsächlich im Hippocampus (Abb. 4.21.6E, Tier #622) und an Gefäße assoziiert im Cortex (Abb. 4.21.6D, Tier #622). Insgesamt schien ihre Anzahl im Vergleich zu den nicht-depletierten Tieren jedoch geringer zu sein. Da sich die Morphologie der CD8 bzw. CD45RC markierten Zellen deutlich unterschied, kann man davon ausgehen, dass hier mindestens zwei verschiedene Zellpopulationen durch die beiden Antikörper detektiert worden sind. Dabei handelt es sich vermutlich um CD8<sup>+</sup> Microglia-Zellen und CD4<sup>+</sup> T-Zellen, was in weiteren Untersuchungen noch bestätigt werden muss.

Anzumerken ist, dass in allen Tieren der Gruppe IgG<sup>+</sup> markierte Zellen gefunden wurden, die vor allem im Hippocampus und nahe angrenzenden Hirnarealen auftraten. Durch die Analyse von Serienschnitten war zu erkennen, dass IgG<sup>+</sup> und CD45RC<sup>+</sup> Zellen in unterschiedlicher Anzahl und Bereichen lokalisiert waren, wobei deutlich weniger IgG<sup>+</sup> (Abb. 4.21.6F, Tier #622) als CD45RC<sup>+</sup> (Abb. 4.21.6D, Tier #622) Zellen detektiert wurden.

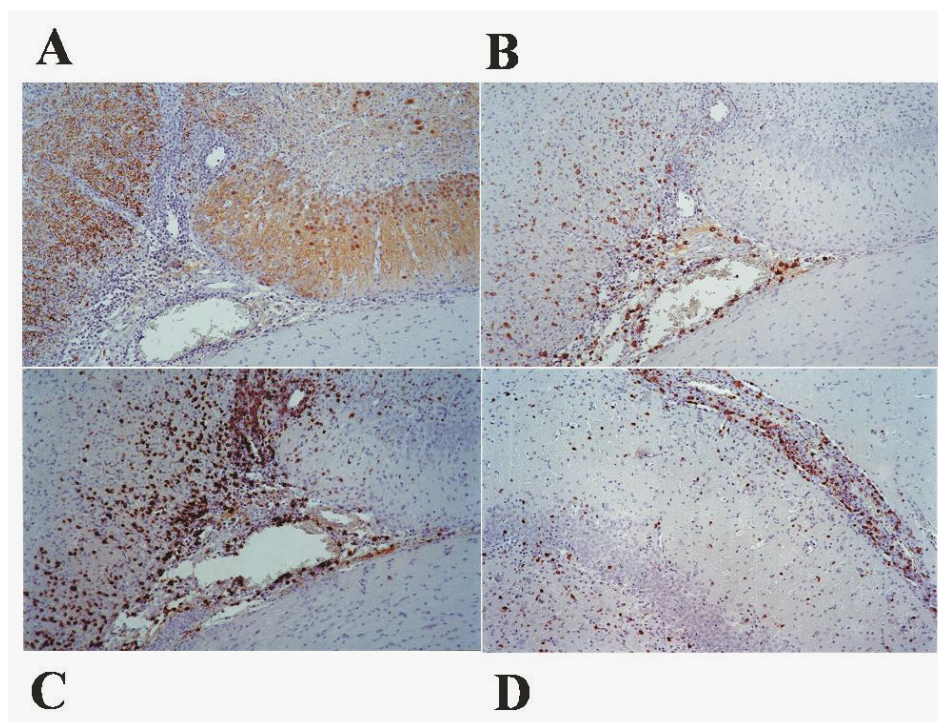
#### **4.21.6.3 Immunhistologische Untersuchungen in der Gruppe der CD4 depletierten Tiere (AdTxαCD4)**

Die Verteilung von BDV p40-Antigen in den Gehirnen dieser Tiere erwies sich im Vergleich zu den CD8 depletierten Tieren als sehr ähnlich. Mit Ausnahme von Tier #632 (Abb. 4.21.7A), bei dem nur der Hippocampus infiziert war, waren alle Hirnareale von der BDV-Infektion betroffen. Bei zwei weiteren Tieren (#633, #641) ergab sich der subjektive Eindruck, dass die Anzahl BDV-positiver Neurone geringer war als in den Gehirnen der zuerst beschriebenen Tiere (AdTxαCD8). Dieser Eindruck wird prinzipiell von den Ergebnissen der Bestimmung der Viruslast in diesen Gehirnen untermauert. So besaß z.B. das Tier #632 die geringste Viruslast im Gehirn ( $5,7 \times 10^4$  ffu/g Gehirn).

Die Mehrzahl der CD8<sup>+</sup> Immunzellen befand sich im Hippocampus (Abb. 4.21.7B, Tier #632), während andere BDV-infizierte Bereiche eindeutig weniger stark infiltriert waren.

CD8<sup>+</sup> Zellen traten vor allem im Neocortex als Einzelzellen oder punktuell gehäuft auf. In den basalen Bereichen der Gehirne waren sie nur vereinzelt zu finden. Die nachgewiesenen CD8<sup>+</sup> Zellen (Abb. 4.22.6B, Tier #632) konnten aufgrund ihrer Morphologie vor allem als CD8<sup>+</sup> T-Zellen und weniger als Microglia-Zellen identifiziert werden.

Auffällig war die geringe Anzahl CD45RC<sup>+</sup> Zellen in diesen Gehirnschnitten. Es handelte sich stets um sehr wenige Einzelzellen, die vor allem im Hippocampus, hier dargestellt die einzige auffällige Ansammlung von CD45RC<sup>+</sup> Zellen im ganzen Gehirn eines Tieres #632 (Abb. 4.21.7C), dem Neocortex und in den basalen Bereichen des Gehirns unterhalb des Streifenkörpers detektiert wurden. Sie traten in der Regel perivaskulär auf (Abb. 4.21.7C, Tier #632, Pfeil).



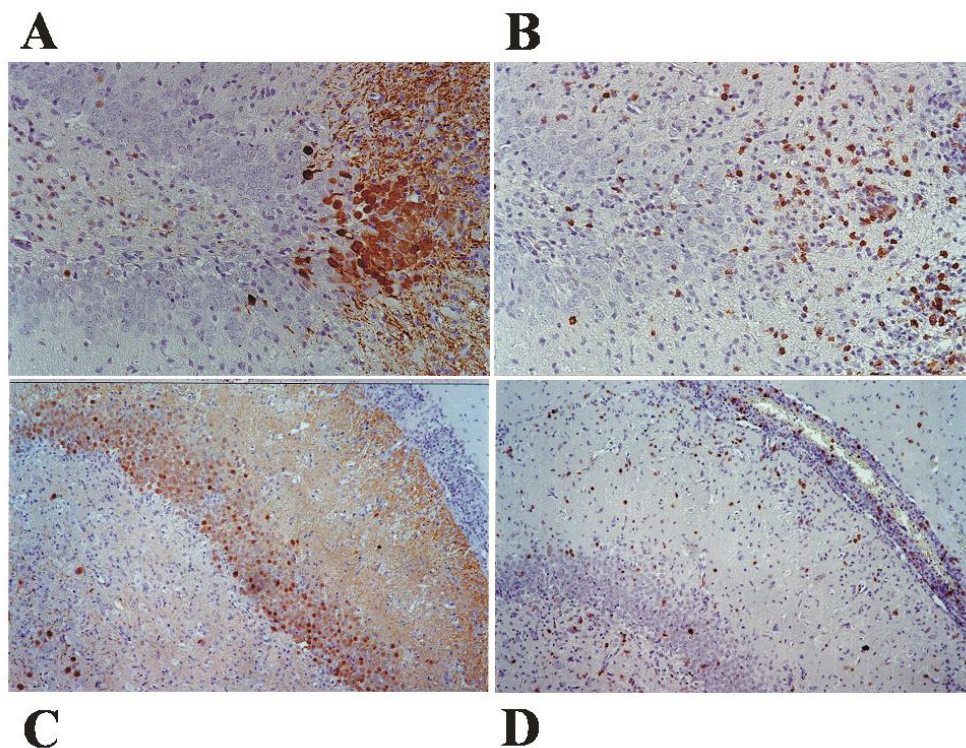
**Abb.: 4.21.7: Immunhistochemische Analysen in Gehirnen von Tieren mit CD8 depletiertem Immunsystem. Es wurden die bekannten mAbs mit den entsprechenden Verdünnungen verwendet. A-C: Serienschritte des Tieres #632. A: Durch 38/17C1 markierte BDV infizierte Neurone im Bereich zwischen Hippocampus und Thalamus. B: Ox-8 markierte, CD8<sup>+</sup> T-Zellen. C: Einzige auffällige Ansammlung CD45RC<sup>+</sup> Zellen, wobei eine klare Aussage, ob es sich um verbliebene CD4<sup>+</sup> T-Zellen, naive CD4<sup>+</sup> Lymphocyten oder B-Zellen handelte nicht möglich war. In der Regel standen sie mit Gefäßen in Verbindung (Pfeil). Vergrößerung der Abbildungen: 100x. Kontrastierung durch Haematoxylin-Färbung.**

Ebenfalls deutlich reduziert im Vergleich zu den Tieren der Gruppe AdTx $\alpha$ CD8 war die Anzahl der IgG<sup>+</sup>, potentiellen B-Zellen. Das durch die Verwendung von  $\alpha$ IgG und  $\alpha$ CD45RC Antikörpern zwei unterschiedliche Zellpopulationen markiert wurden, zeigte die teilweise unterschiedliche Verteilung der entsprechenden Zellen in den Gehirnen (nicht gezeigt).



#### 4.21.6.4 Immunhistologische Untersuchungen in der Gruppe der nur thymektomierten Tiere (AdTx)

In diesen Tieren mit intaktem peripherem Immunsystem konnten die in früheren Experimenten (4.20.2) gemachten Beobachtungen, dass es individuelle Unterschiede innerhalb einer Tiergruppe gibt, ebenfalls gezeigt werden. Die Unterschiede reichten von nicht nachweisbaren BDV-infizierten Neuronen bei einem Tier (#682, nicht gezeigt), über eine weniger starke Infektion des Hippocampus (Abb. 4.21.8A, Tier #683) und angrenzender Hirnareale bis hin zur starken Infektion des Hippocampus und Ausbreitung in alle Gehirnregionen (Tier #673, nicht gezeigt). Jedoch wurde nie die Infektionsintensität erreicht, wie sie in den Gehirnen von unbehandelten Lewis-Ratten oder den Gruppen AdTx $\alpha$ CD4 bzw. AdTx $\alpha$ CD8 zu beobachten war.



**Abb.: 4.21.8: Immunhistochemische Untersuchungen an Tieren mit intaktem peripheren Immunsystem.** Es wurden die bekannten Antikörper in den entsprechenden Verdünnungen verwendet. Durch 38/17C1 dargestellt ist eine leichte (Tier #683) A) und starke (Tier #671) C) BDV-Infektion im Hippocampus. Eine Assoziation von CD45RC<sup>+</sup> Zellen mit BDV-infizierten Neuronen ist in B) (Serienschnitt zu A) zu sehen. D) Serienschnitt zu C zeigt die Assoziation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit der BDV-Infektion. Vergrößerung A und B: 200x; C und D: 100x, Haematoxylin-Färbung.

---

Mit der Stärke der Infektion korrelierte auch ein zunehmendes Auftreten von CD45RC<sup>+</sup> Zellen, vor allem in der Nähe BDV-infizierter Neuronen (Serienschnitte der Abb. 4.21.8A und B, Tier #683). Die Anzahl der CD45RC<sup>+</sup> Zellen war in diesen Gehirnen in Abhängigkeit von der Infektionsstärke wesentlich höher als in den Gruppen der thymektomierten und partiell depletierten Tieren. Gleiches galt für die CD8<sup>+</sup> Zellen, die in den Bereichen BDV-infizierter Neuronen und in Abhängigkeit der Infektionsintensität auftraten (Abb. 4.21.8C, D, Tier #671). Ebenfalls waren im Vergleich mit den Gruppen AdTxαCD4 und AdTxαCD8 deutlich mehr IgG<sup>+</sup> Zellen vorhanden und ihre Verteilung im Gehirn überlagerte sich teilweise mit dem Auftreten BDV-infizierter Zellen (nicht gezeigt).

## 5 Diskussion

Seit wenigen Jahren werden Parapockenviren (PPV), insbesondere das Orf-Virus (ORFV) als potentielle Vektorviren diskutiert (Robinson & Lyttle, 1992; Rziha et al., 1999, 2000). Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines viralen Vektorsystems auf der Basis rekombinanter ORFV. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden für das Wachstum der ORFV nicht-essentielle Genbereiche gesucht und vergleichende Transkriptionsanalysen von verschiedenen ORFV-Stämmen durchgeführt. Weiterhin wurden ORFV Deletionsmutanten und Revertanten hergestellt und *in vitro* bzw. *in vivo* (Schaf) charakterisiert. Schließlich gelang die Herstellung einer ORFV-Rekombinanten, die das p40 (N) Protein des Virus der Borna'schen Erkrankung (BDV, Borna Disease Virus) exprimiert. Sie wurde erfolgreich als Impfvirus zum Schutz gegenüber einer BDV-Infektion von Ratten eingesetzt. Als parentaler Impfstamm für die verschiedenen ORFV-Rekombinanten wurde das durch multiple Zellkulturpassagen attenuierte ORFV D1701 (Mayr et al., 1981) verwendet. Dieser ORFV Stamm ist an das Wachstum in der bovinen Rindernierenzelllinie BK-K1 3A adaptiert und wurde daher mit D1701-B bezeichnet. Dies diente der Differenzierung gegenüber dem ORFV Stamm D1701-V, welcher ausgehend von D1701-B durch 40 weitere Zellkulturpassagen in Vero-Zellen (Affennieren-Zelllinie) zum Wachstum in dieser Zelllinie angepasst wurde (Rziha et al., 1999, 2000; Büttner & Rziha, 2002). Da das für die Insertion von Fremdgen-DNA bei anderen Pockenviren für die Herstellung rekombinanter Viren verwendete Thymidin-Kinase (Tk)-Gen (Mackett et al., 1984; Wertz et al., 1987; Paoletti, 1996; Moss, 1996), in ORFV D1701 sowie anderen untersuchten PPV-Stämmen und vegf-e Virus Mutanten nicht vorhanden ist (Rziha et al., 2003; Delhon et al., 2004), wurde als viel versprechender Zielort für die Insertion von Fremdgen-DNA das virus-kodierte vegf-e Gen (Meyer et al., 1999; Wise et al., 1999; Savory et al., 2000) gewählt.

### 5.1 Fremdgeninsertion in das ORFV vegf-e Gen

Das vegf-e Gen besitzt im Vergleich zum ORFV D1701 Genom (ca. 63% GC-Gehalt) einen deutlich niedrigeren GC-Gehalt von ca. 57%, was zu der Hypothese führte, dass es im Zuge der Evolution vom natürlichen Wirt, dem Schaf, in das virale Genom übernommen worden ist (Lyttle et al., 1994). Der niedrige GC-Gehalt und die Lokalisation dieses Gens im terminalen Bereich des Genoms, welcher bei Pockenviren als variable Gen-Region beschrieben ist, in der auch nicht-essentielle Gene lokalisiert sind (Turner & Moyer, 1990; Buller & Palumbo, 1991) ließ vermuten, dass es zumindest für die *in vitro* Replikation des ORFV nicht essentiell sein

könnte. Durch erste prinzipielle Arbeiten (Henkel, 1997) zeigte sich, dass die Selektion rekombinanter ORFV mit Hilfe des bakteriellen LacZ-Gens (Chakrabarti et al., 1985) in Kombination mit der dominant-positiven Selektion durch das Xanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Gen (Mulligan & Berg, 1981, Falkner & Moss, 1988; 1990) am Erfolg versprechendsten waren. Diese Strategie wurde zwischenzeitlich wiederholt bei ORFV D1701 (Rziha et al., 1999, 2000; Fischer et al., 2003; Henkel et al., 2005), als auch bei der Selektion einer vegf-e negativen Rekombinanten des virulenten Wildtypstammes NZ2 erfolgreich verwendet (Savory et al., 2000).

In dieser Arbeit wurden sowohl ausgehend von dem parentalen D1701-B als auch von dem an Vero-Zellen angepassten D1701-V ORFV-Stamm nach homologer Rekombination und Plaquereinigung rekombinante, vegf-e negative, lacZ/xgpt positive ORFV isoliert. Diese wurden in Anlehnung an ihre Herkunft mit ORFV D1701-BrV bzw. D1701-VrV bezeichnet. Zur besseren Beurteilung und Interpretation der Deletion des vegf-e Gens und zur Kontrolle eines vegf-e bedingten Effektes *in vitro* oder *in vivo*, wurden in einem weiteren Schritt die bakteriellen Gene lacZ und xgpt wiederum durch das originäre vegf-e ersetzt. Es entstanden so genannte Revertanten mit den Bezeichnungen D1701-BrVres bzw. D1701-VrVres. Durch Southern Blothybridisierung konnte gezeigt werden, dass jeweils beide Kopien des vegf-e Gens in D1701-BrV und D1701-VrV erfolgreich durch die bakteriellen Gene lacZ und xgpt ersetzt worden sind. Ferner wurde ebenfalls durch Southern Blothybridisierungen und PCR-Analysen gezeigt, dass in den Revertanten eine erfolgreiche Rückinsertion des vegf-e an den jeweiligen Genomenden stattgefunden hat. Damit konnte erstmals demonstriert werden, dass dieses für andere Pockenviren bereits etablierte Selektionssystem (Chakrabarti et al., 1985; Falkner & Moss, 1988; 1990, Boyle & Coupar, 1988) auch bei ORFV anwendbar war (Rziha et al., 1999, 2000).

Interessanter Weise kam es in der Rekombinanten D1701-BrV und D1701-VrV durch Insertion der Selektionsmarker lacZ und xgpt, die jeweils unter der Kontrolle des synthetischen VACV Promoter eP1 stehen (Pfleiderer et al., 1995), zur Hintereinanderschaltung des originären ORFV vegf-e Promoters ( $P_{\text{vegf-e}}$ ) und des synthetischen VACV Promoters. Dass diese Kombination keinen negativen Einfluss auf die lacZ Expression und Funktion hatte, zeigte sich an der Blaufärbung rekombinanter, lacZ/xgpt positiver und vegf-e negativer ORFV Plaques. Jedoch war für die Verwendung von D1701-BrV bzw. D1701-VrV als Vektorvakzine von Interesse, welcher der beiden Promotoren eine Transkription induziert. Primer Extension Experimente haben im Fall der Rekombinanten

D1701-VrV klar gezeigt, dass ausgehend von beiden Promotoren *in vitro* Transkripte induziert wurden. Dadurch wurde erstmalig gezeigt, dass ein synthetischer VACV Promoter im ORFV-System in der Lage war, Transkripte zu induzieren. Bisher war nur bekannt, dass originäre Promotoren der Pockenspezies VACV und ORFV *in vitro* und *in vivo* austauschbar waren (Vos et al., 1992, Fleming et al., 1992). Quantitative Analysen zur Effizienz der Transkriptinduktion der hintereinander geschalteten Promotoren und eine qualitative Untersuchungen der Transkripte erfolgten im Rahmen dieser Arbeit nicht. Entscheidend für die Arbeit war, dass keine nachweisbare Konkurrenz des frühen vegf-e und des synthetischen VACV eLP1 Promoters vorlag.

Zur Überprüfung, welchen Einfluss das vegf-e Gen des ORFV auf das Virus-Wachstum *in vitro* hat, wurden mit allen Rekombinanten und Revertanten vergleichende Einschnittwachstumskurven durchgeführt. Dabei war zu erkennen, dass sich das parentale D1701-V und die Revertante D1701-VrVres in Zellkultur, sowohl in der Virusfreisetzung als auch in der Virusvermehrung nicht unterschieden. Jedoch zeigte die Rekombinante D1701-VrV gegenüber D1701-V im Zeitraum von 12 Stunden bis 72 Stunden nach der Infektion ein um ca. 24 Stunden verzögertes Wachstum, welches sich erst 96 Stunden nach der Infektion egalisierte. Diese Verzögerung könnte sich mit der proliferationsinduzierenden Wirkung von vegf-e erklären lassen (Meyer et al., 1999). Durch vegf erfolgt u.a. die PI3Kinase-vermittelte Aktivierung von Akt, einer zentralen Serin/Threonin Kinase, die in der Zelle auch für die Vermittlung von Überlebenssignalen zuständig ist (Zachary, 2003). In Folge dessen wird über Akt der zentrale Sensor mTOR durch Phosphorylierung aktiviert, welcher in der Translationskontrolle und der Zellgröße eine wichtige Rolle spielt (Fingar et al., 2002). Möglicherweise ist dieser Effekt verantwortlich dafür, dass ORFV-infizierte Zellen und deren Nachbarn morphologisch vergrößert erscheinen. Durch die Aktivierung der Translation wäre somit eine gute Voraussetzung für deren eigene Replikation in benachbarten Zellen geschaffen, die ein schnelleres Wachstum des D1701-V erklären könnten. Dass die Rekombinante nach 96 Stunden ebenfalls gleiche Titer wie das parentale Virus erreicht, kann mit den limitierenden Faktoren wie Zellen und Nährstoffe im *in vitro* System erklärt werden. Das parentale ORFV D1701-V, als auch die Revertante D1701-VrVres besitzen somit gegenüber der Rekombinante D1701-VrV innerhalb der ersten 72 Stunden in Zellkultur einen Wachstumsvorteil. Transkriptionsanalysen des späten 42K Haupthüllproteins (Sullivan et al., 1994) stützten diese Beobachtung eines verzögerten Wachstums. So wurden nach Isolation von Gesamtzell-RNA in D1701-VrV infizierten Zellen nach 24 Stunden weniger 42K-



spezifische Transkripte nachgewiesen, als in D1701-V infizierten Zellen. Diese Vermutung wird durch Untersuchungen bei anderen Pockenviren mit Deletion unterschiedlicher Wachstums und Virulenzfaktoren gestützt. So wuchs VACV Wachstumsfaktor (VGF)–negative Rekombinante in in ruhenden Swiss 3T3 Zellen zu geringeren Titern (Buller et al., 1988a). Einen klaren Unterschied sah man beim Vergleich des Myxoma Virus (MYXV) mit einer Myxoma-Rekombinante, in welcher ein Virulenzgen mit antiapoptotischer Funktion, das M11L Gen (Su et al., 2006), deletiert worden war. Diese M11L-negative Rekombinante wuchs *in vitro* zu deutlich geringeren Titern als das parentale MYXV (Opgenorth et al., 1992).

Interessanter Weise konnten nun aber zwischen dem parentalen D1701-B bzw. der Revertanten D1701-BrVres und dem vegf-e negativen D1701-BrV keine auffälligen Wachstumsunterschiede *in vitro* beobachtet werden. Dies ließ vermuten, dass der Verlust des vegf-e *in vitro* keinen offensichtlichen Nachteil darstellte. Es bot sich damit ein vergleichbares Bild zum Wachstumsverhalten der VGF-negativen VACV Rekombinanten in proliferierenden Zellen bzw. zum SFGF-negativen MRV-Rekombinanten (malignant rabbit fibroma virus: MRV) (Buller et al., 1988; Opgenorth et al., 1992b). Dieses unterschiedliche Wachstumsverhalten der von D1701-B ausgehenden Rekombinanten bzw. Revertanten und der von ORFV D1701-V ausgehenden ORFV erforderte an dieser Stelle weitere Untersuchungen.

Die weiteren vergleichenden Untersuchungen zwischen Rekombinanten, Revertanten und parentalen ORFV erfolgten *in vivo*, wobei der Einfluss der Deletion des vegf-e *in vivo* auch deshalb von besonderem Interesse war, weil es sich bei D1701 um einen attenuierten Impfstamm handelte (Mayr et al., 1981) und während den hier beschriebenen Arbeiten von einer anderen Arbeitsgruppe gezeigt worden ist, dass die Deletion des vegf-e-Gens im pathogenen Wildtyp ORFV Stamm NZ2 eine verminderte Virulenz *in vivo* aufwies (Savory et al., 2000). Im Gegensatz zu dem virulenten Stamm NZ2 (Savory et al., 2000), der in Schafen das typische ORFV-spezifische Erscheinungsbild zeigte (McKeever et al., 1988, Robinson & Balassu, 1981), war es bei einer Infektion mit dem attenuierten, nahezu apathogenen ORFV Stamm D1701 notwendig, das Immunsystem der Schafe für die Dauer des Versuches partiell auszuschalten, um zumindest eine messbare klinische Symptomatik zu induzieren. Die Immunsupprimierung erfolgte durch die Gabe von Cyclosporin A (CsA, Haig et al., 1996a, 1996b), welches durch Inhibition der IL-2 Synthese eine T-Zellproliferation verhindert und somit eine apparente Infektion mit D1701 ermöglichte (Haig et al., 1996b). Überraschenderweise zeigten alle an Vero-Zellen adaptierten Stämme trotz

Immunsupprimierung der Schafe keine ORFV-spezifische Klinik, wie z.B. Pustelbildung. Ein Unterschied zwischen der vegf-e negativen Rekombinanten D1701-VrV und dem parentalen D1701-V bzw. der Revertanten D1701-VrVres, war nicht zu erkennen. Im Gegensatz dazu rief die Infektion mit D1701-B zwar wenige, aber deutlich messbare virus-induzierte Pusteln hervor. Da multiple Zellkulturpassagen traditionell zur Generierung attenuierter Pockenviren verwendet wurden (Mayr, 1967; Stickl et al., 1974; Moss et al., 1981; El-Zein et al., 1983; El-Awar & El-Zein, 1986) und sich später zeigte, dass diese Attenuierung im Zusammenhang mit der Deletion für die Virulenz verantwortlicher Gene einherging (Kotwal & Moss, 1988), lag die Vermutung nahe, dass durch die Adaption von D1701-B und der damit verbundenen Passagierung auf Vero-Zellen in dem daraus resultierenden ORFV Stamm D1701-V weitere genomische Veränderungen aufgetreten sein könnten. Diese bewirkten dann bereits unabhängig von der Deletion des vegf-e Gens einen vollständigen Verlust der Virulenz von D1701-V *in vivo* und verursachten möglicherweise in Kombination mit Selbiger ein verzögertes Wachstumsverhalten von D1701-VrV *in vitro*. Dies bleibt allerdings in weiteren Versuchen noch zu erörtern.

Ein klareres Bild ergab die vergleichende *in vivo* Charakterisierung von D1701-B, D1701-BrVres und der vegf-e-negativen Rekombinanten D1701-BrV. Nach Applikation der Viren durch Skarifikation in immunsupprimierte Schafe wurde klar, dass die Deletion des vegf-e Virulenzgens zu einem vollständigen Verlust der klinischen Symptomatik bei D1701-BrV führte. Es entstanden keine ORFV-spezifischen Pusteln und die Skarifikationslinien waren nach 8 Tagen vollständig abgeheilt. Das parentale D1701-B bzw. die Revertante D1701-BrVres zeigten hingegen eine schwache, aber deutliche ORFV-spezifische Pustelbildung. Zwar unterschied sich die Intensität in der klinischen Beurteilung von D1701-B und D1701-BrVres in den beiden Experimenten etwas, was mit dem unterschiedlichen Erfolg der Skarifikation bei den einzelnen Tieren begründete werden kann, jedoch korrelierten die Unterschiede zwischen D1701-B und D1701-BrV bzw. D1701-BrVres und D1701-BrV. Es konnte somit eindeutig gezeigt werden, dass die Deletion des vegf-e bei D1701-BrV mit dem Verlust einer klinischen Symptomatik *in vivo* einhergeht, während ein auffälliger Wachstumsnachteil *in vitro* nicht zu beobachten war. Die Auswirkungen des Verlusts des vegf-e Virulenzgens im attenuierten Stamm D1701-BrV waren somit wesentlich deutlicher als in dem virulenten neuseeländischen ORFV Stamm NZ2 (Savory et al., 2000). Dass vegf-e eine elementare Rolle in der Pathogenese der ORFV spielt und maßgeblich an der Pustelbildung beteiligt ist, konnte bereits für den virulenten neuseeländischen Wildtypstamm NZ2 gezeigt werden. Dieser war noch in der Lage unter nicht-immunsupprimierenden

Bedingungen typische ORFV Läsionen zu induzieren (Savory et al., 2000). Im Unterschied zu NZ2 Wildtypvirus zeigten die Pusteln der vegf-e-negativen Rekombinante von NZ2 weniger inflammatorische Zellinfiltrate, ein Ablösen der Pusteln von der Epidermis und eine geringere Hyperplastizität der Epidermis in histologischen Präparationen, jedoch noch eine ORFV-spezifische Klinik. Ferner war eine um den Faktor 2 bis 6 geringere Vaskularisation der Läsionen, die durch die vegf-e negative NZ2-Rekombinante induziert worden war, beobachtet worden. Diese Analysen erfolgten im Fall von D1701 nicht, lassen sich jedoch aufgrund der hohen Homologie (95%) zwischen den vegf-e Genen der Stämme D1701 und NZ2 vermuten, da zudem unabhängig voneinander für beide Gene die gleiche biologische Funktionen nachgewiesen wurden (Meyer et al., 1999; Wise et al., 1999). Sie demonstrierten den Einfluss des viralen vegf-e analog zum humanen vegf-a auf die Angiogenese, die Vaskularisation und das zielgerichtete Auswachsen von Blutgefäßen. Vermittelt werden diese Fähigkeiten durch die alleinige Interaktion des viralen vegf-e mit dem Vegf-Rezeptor-2 (VEGFR-2, Flk1 oder KDR), der maßgeblich für die Induktion der Mitogenese von vaskulären endothelialen Zellen verantwortlich ist (Meyer et al. 1999, Wise et al., 1999), trotzdem die vegf-Gene verschiedener Parapockenviren ein heterogenes Proteingruppe bilden und unterschiedliche Bindungsaffinitäten zum VEGFR-2 besitzen (Mercer et al., 2002; Wise et al., 2003). Diese Fähigkeiten gehen der Rekombinanten D1701-BrV durch die Deletion des vegf-e Gens verloren. Die Ausbildung von neuen Blutgefäßen und damit eine verbesserte Versorgung der Epidermis, sowie deren Verdickung bleiben aus (Savory et al., 2000). Die Zellpopulation der Epidermis in der das ORFV repliziert (McKeever et al., 1988), die Keratinocyten, proliferieren nicht, wodurch diesem attenuierten ORFV D1701 die Grundlage für eine Vermehrung entzogen wird bzw. auf ein nicht detektierbares Maß reduziert wird. Da ein Ausbleiben der klinischen Symptomatik auch bei dem ORFV Stamm D1701-V zu beobachten war und die Deletion des vegf-e Gens im virulenten Stamm NZ2 nur zu einer Reduktion der klinischen Symptomatik führte (Savory et al., 2000), liegt die Vermutung nahe, dass auch die anderen Gene, die bei D1701-V möglicherweise deletiert worden sind, im Infektionsverlauf und im Wachstumsverhalten von ORFV wahrscheinlich eine Rolle spielen.

## **5.2 Zusätzliche Deletionen im Genom des ORFV D1701-V**

Vergleichende Southern Blot-Hybridisierungen und DNA-Sequenzanalysen bewiesen schließlich, dass die Adaption von D1701-B an Vero-Zellen in genomischen Veränderungen resultierte (Büttner & Rziha, 2002; Rziha & Bauer, unveröffentlicht; Rziha et al., 2000). Es zeigte sich, dass im Genom von D1701-V im Vergleich zu D1701-B drei zusätzliche

Deletionen im nicht duplizierten Teil vor der ITR-Region entstanden waren. Dabei handelt es sich um eine Deletion am linken Genomende (del1, ca. 2,1 kb) und zwei Deletionen am rechten Genomende (del2, ca. 2,35kb und del3, ca. 3,7 kb). Sie sind möglicherweise auf genomische Neuarrangements während der Adaptionsphase zurückzuführen, wie sie für D1701 bereits beschrieben sind (Cottone et al., 1998).

Bei einem dieser Gene handelt es sich um das bereits beschriebene nicht essentielle Gen G1L (del1), welchem noch keine Funktion in ORFV als auch anderen Pockenviren zugeordnet ist. Der nicht-essentielle Charakter des G1L wurde auch durch die Insertion von Fremdgen-DNA gezeigt (Marsland et al., 2003). Für die ORFV Vermehrung *in vitro* ist es nicht essentiell und führte zusammen mit der Deletion seiner benachbarten Gene E2L, E3L und G2L im ORFV Stamm Orf-11 zu einer Attenuierung *in vivo*, verglichen zu dem virulenten MRI Wildtypvirus (McInnes et al., 2001).

Durch die Deletion 2 (del2, ca. 2,35 kbp) wird das ati1 Gen komplett und das ati2 Gen partiell deletiert. Von beiden Genen ist bekannt, dass sie bei diversen Pockeviren genomischen Veränderungen unterliegen sind (Meyer & Rziha, 1993; Meyer et al., 1997; Boulanger et al., 2001). Hier konnte durch die del2 gezeigt werden, dass die ati Gene einen *in vitro* nicht-essentiellen Charakter besitzen. Interessanter Weise wurde in dem attenuierten Orthopockenvirus BAV (Marques et al., 2001), welches einer in Brasilien verwendeten VACV Vakzine verwandt scheint, ebenfalls kein ati-Gen gefunden. Dies lässt die Vermutung zu, dass es sich bei den ati Genen möglicherweise ebenfalls um Virulenzgene handelt. Das benachbarte A27L homologe Gen (10k-Gen), welches sich an die ati-Gene anschließt ist von der del2 nicht betroffen und spielt eine essentielle Rolle bei der Virusfreisetzung. Seine Deletion führt zu einem sehr langsamen Wachstum der Rekombinante bei fehlender Virus-Freisetzung in den Zellkulturüberstand (Spehner et al., 2004)

Die Charakterisierung der del3 zeigte eine partielle Deletion des GIF-Gens (GM-CSF, granulocyte/monocyte-colony stimulating factor inhibierender Faktor; Rziha unveröffentlicht), dessen Genprodukt durch Bindung an GM-CSF und IL-2 immunmodulatorisch wirkt, indem es die biologische Funktion von GM-CSF und IL-2 inhibiert (Deane et al., 2000; McInnes et al., 2005). Eine fehlende GIF Aktivität, bleibt jedoch in D1701 noch zu zeigen. GM-CSF wird von einer Vielzahl von Zellen, einschließlich T-Zellen gebildet und stimuliert die Myelopoese von Neutrophilen, Monozyten und Eosinophilen sowie die Einwanderung dieser Zellen und deren Aktivierung (McNiece, 1997). Ebenso ist GM-CSF an der frühen Immunantwort durch Regulation der Differenzierung und Funktion von Antigen-präsentierenden Zellen beteiligt. IL-2 wird von TH1-Zellen

synthetisiert und stimuliert eine T-Zell- und NK-Zell-Aktivierung als auch die Proliferation bzw. Aktivierung von B-Zellen (Farner et al., 1997). Da diese frühen Prozesse der Immunantwort durch die Deletion von GIF nicht verhindert werden, könnte darin oder im Zusammenhang mit der zusätzlichen Deletion von G1L die Ursache für eine angemessene Immunantwort des Schafes gegenüber der ORFV-Infektion liegen. Eine ORFV-spezifische Klinik könnte somit nach Infektion mit D1701-V verhindert werden. Allerdings dürfte der Effekt von GIF auf die IL-2-abhängige Stimulierung von T-Zellen eine untergeordnete Rolle bei der ORFV-Infektion in unserem System spielen, da die IL-2 Synthese während der Versuche ohnehin durch die Applikation von Cyclosporin A unterdrückt wurde. Das zum D1701-V parentale D1701-B Virus mit intaktem GIF und G1L zeigte hingegen in den immunsupprimierten Tieren eine ORFV-spezifische Pustelbildung.

Ein weiterer Aspekt, der mit dem GIF-Gen in Zusammenhang gebracht werden kann, ist die Tatsache, dass eine Immunisierung mit ORFV nicht zu einer lang anhaltenden Immunität gegenüber dem Virus in seinem natürlichen Wirt führt (Haig & McInnes, 2002). Dies ermöglicht eine Reinfektion, die zwar milder verläuft als eine Primärinfektion (Robinson & Balassu, 1981; McKeever et al., 1988; Haig et al., 1996a), jedoch die Möglichkeit bietet rekombinante ORFV-Vektoren für eine weitere oder wiederholte Immunisierung im gleichen Individuum zu verwenden. Ursache für dieses Verhalten, welches jedoch in nicht-permissiven Wirten, in denen ORFV natürlicherweise nicht replizieren können, noch zu zeigen bleibt, begründet sich in der besonderen Fähigkeit von ORFV das wirtseigenen Immunsystem entsprechend zu manipulieren. ORFV kodiert nach den bis heute vorliegenden genomischen Untersuchungen nicht für spezifische Rezeptor-ähnlichen Faktoren wie sie für andere Pockenviren beschrieben sind und u.a. gegen die inflammatorischen Cytokine IL-1 $\beta$ , IL-18, TNF- $\alpha$  oder IFN- $\gamma$  oder Komplement gerichtet sind (Symons et al., 2002; Panus et al., 2002; Alcamì et al., 2000; Rosengard et al., 1999; Alcamì & Smith, 1992; Smith et al., 2000, Johnston & McFadden, 2003). Eine durch ORFV induzierte Manipulation des Wirts-Immunsystems könnte durch gezielte Inhibition einer TH1-vermittelten Immunantwort durch das ORFV-IL10 in Kooperation mit dem GIF erfolgen (Fleming et al., 1997; Deane et al., 2000). ORFV-IL-10 verhindert die Reifung von immaturren zu maturaen humanen dendritischen Zellen (DC) sowie die Antigenaufnahme und Antigenpräsentation (Lateef et al., 2003). Dieser Effekt wird durch das GIF Gen verstärkt, welches GM-CSF und IL-2 bindet. Beiden Faktoren sind für DC wichtig, da IL-2 von DCs gebildet wird und die Antigenpräsentation verstärkt (Granucci et al., 1992), während GM-CSF DCs in das periphere Gewebe rekrutiert (Kaplan et al., 1992). PPV ORFV besitzen damit als einzige bis heute

beschriebene Pockenviren die Möglichkeit eine TH1-Immunantwort zu unterdrücken und könnte erklären, dass keine lang anhaltende, ORFV-spezifische Immunität induziert werden kann. Der Verlust des GIF-Gens könnte sich für das Überleben des D1701-V *in vivo* zwar nachteilig auswirken, jedoch auch dem Immunsystems des Wirtes die Möglichkeit lassen in abgeschwächter Form auf die Infektion zu reagieren. Dies wäre von Vorteil bei der Verwendung von D1701-V als viralen Vektor, insofern, dass potentielle Fremddantigene eine bessere immunogene Wirkung entfalten könnten.

Die Deletion dieser potentiellen Virulenzgene führte zu einer weiteren Attenuierung von D1701-V *in vivo* und steigert vor allem in Bezug auf die biologische Sicherheit die Attraktivität von D1701-V als neuen viralen Vektor. Einen weiteren Vorteil, den PPV ORFV und hier der hochattenuierte Stamm D1701 gegenüber anderen Pockenviren (Moss, 1996, Paoletti, 1996) besitzt. Der Vollständigkeit wegen sei erwähnt, dass es im Genom von D1701-V durch die Adaption an Vero-Zellen auch in anderen genomischen Bereichen noch zu Veränderungen gekommen sein kann, die bisher nicht identifiziert und charakterisiert worden sind.

### **5.3 Vergleichende Transkriptionsanalysen zwischen attenuiertem D1701-B, D1701-V und Wildtyp NZ-2**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde nun die bei D1701-V aufgetretene Deletion del2, in Bezug auf ein verändertes Transkriptionsmuster hin analysiert. Untersucht wurde dabei Transkripte zu beiden Seiten der Deletion, um festzustellen welche Veränderungen im Zusammenhang mit der Deletion des *ati2* Gens auftraten und um eine Charakterisierung der benachbarten Gene hinsichtlich einer frühen bzw. späten Genexpression vorzunehmen. In einem Nebenaspekt sollte die Region auf das Vorhandensein eines im AluI-XbaI Fragment des Kuhpockenvirus gelegenen, cis-wirkenden Elements hin untersucht werden. Das so genannte AX-Element verursacht eine posttranskriptionelle Modifikation des 3'-Endes der mRNAs, besteht aus einer 45 Nukleotide großen Region mit zwei Subelementen und ist am 3'-Ende des *rpo132* Gens lokalisiert. Es stellt damit eine Komponente eines neuen Mechanismus zur Bildung von 3' Enden später mRNAs dar (Antczak et al., 1992, Howard et al., 1999).

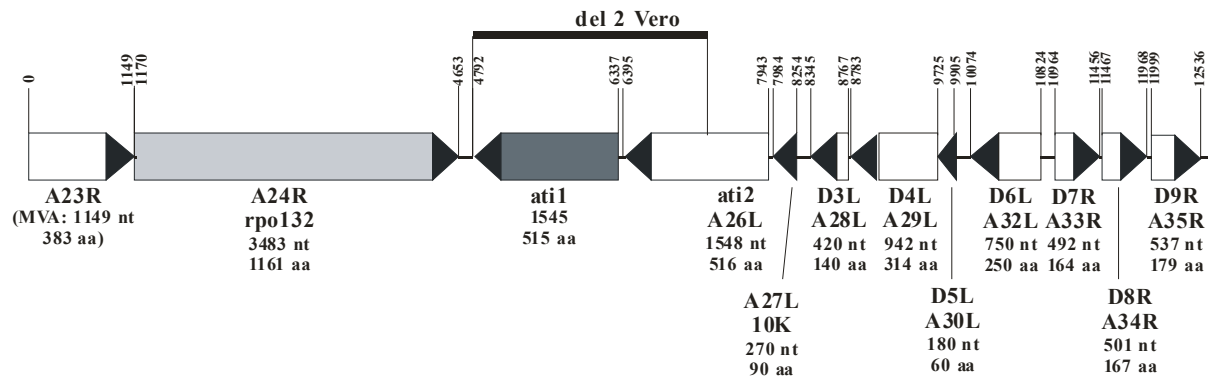
Sequenzvergleiche zwischen der bekannten Region des Kuhpockenvirus und anderen Pockenviren haben gezeigt, dass dieses AX-Element bei den VACV Stämmen Western Reserve und MVA sowie dem Variola Virus vorhanden war, während es sich im Schafpockenvirus, dem Molluscum contagiosum Virus und dem ORFV nicht detektieren ließ.

Northern Blot-Hybridisierungen mit RNA aus ORFV infizierten Zellen bestätigten diese Sequenzanalysen insofern, dass mit einer für das *ati2* Gen spezifischen Sonde keine *ati2*-spezifische mRNA mit diskreter Bande, sondern nur späte Transkripte detektiert werden konnten, die die für Pockenviren beschriebene Heterogenität in ihrer Größe zeigten (Cooper et al., 1981; Mahr & Roberts, 1984). Somit kann ein vom Kuhpockenvirus her bekanntes AX-Element für das PPV ORFV D1701 in diesem Genombereich ausgeschlossen werden und späte Transkripte des *rpo132* Gens und *ati1* Gens können mit den 3'-Enden ihrer mRNAs partiell überlappen, wodurch sich dsRNA bilden kann. Von dsRNA ist bekannt, dass sie in nicht-infizierten Zellen, nicht oder nur in sehr geringen Mengen auftritt. In Virus-infizierten Zellen induziert dsRNA hingegen die Expression von Interferon (IFN, Jacobs & Langland, 1996). Durch IFN werden unter anderem die Expression von 2'-5'-oligoadenylat Synthase (2'-5'A Synthase) und die dsRNA-abhängige Proteinkinase (PKR) induziert (Pestka et al., 1987; Sen & Lengyel, 1992). Deren Aktivierung ist von der Präsenz der dsRNA abhängig und führt im Fall der 2'-5'A Synthase zur Aktivierung von RNase L bzw. durch PKR zur Phosphorylierung des Elongationsinitiationsfaktors eIF2 $\alpha$  und I $\kappa$ B, einen Inhibitor von NF $\kappa$ B. Das Resultat ist eine Inhibierung der viralen und teilweise auch der wirtzeigenen Proteinsynthese, was im Weiteren zur Apoptose führt (Kibler et al., 1997). Verschiedene Viren besitzen daher spezielle Proteine, um diesen IFN-induzierten Abwehrmechanismus zu umgehen (Lee et al., 1992; Mathews & Shenk, 1991) oder Apoptosesignalwege zu inhibieren (Sabbatini et al., 1995; Henderson et al., 1993, 1991; Tewari et al., 1995). Bei Orthopockenviren sind inzwischen mehrere Proteine beschrieben, die eine Apoptose verhindern können (Johnston & McFadden, 2003). Zu diesen gehört das *crmA* Gen des Kuhpockenvirus, ein Proteaseinhibitor, der eine FAS- und TNF $\alpha$ -vermittelte Apoptose inhibiert (Tewari & Dixit, 1995; Bird, 1998). Ferner kodiert das VACV K3L Gen für ein Homolog des Elongationsinitiationsfaktor eIF2 $\alpha$  (Beattie et al., 1991), welches einen kompetitiven Inhibitor der eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung darstellt (Davies et al., 1992; Beattie et al., 1991). Ein weiteres Gen ist das VACV E3L Gen, welches dsRNA bindet und somit eine Aktivierung der PKR verhindert (Chang et al., 1992; Davies et al., 1993, Jacobs & Langland, 1996). Bei diesem handelt es sich um ein Interferon-Resistenzgen, welches die Aktivierung der IFN-induzierten dsRNA-abhängigen Protein Kinase (PKR), des 2-5A Synthetase/RNase L Systems und andere dsRNA-abhängige Signalwege inhibiert (Garcia et al., 2002). Von ORFV ist bekannt, dass sie ein dem VACV homologes E3L Gen kodieren (McInnes et al., 1998). Die anti-apoptischen und oncogene Eigenschaften des VACV E3L (Garcia et al., 2002) lassen sich somit vermutlich auf das ORFV-spezifische E3L Gen übertragen. Dadurch könnte

die Apoptose-induzierende Wirkung von dsRNA, die in der späten Replikationsphase durch überlappende Transkripte des rpo132 und ati1 Gens entstehen kann, verhindert werden. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass das ORFV E3L Homolog in der Lage ist, die Funktion des VACV E3L *in vitro*, jedoch nicht *in vivo* zu komplementieren (Vijaysri et al., 2003).

Die transkriptionelle Analyse des ORFV rpo132 Gens, welches dem A24R von VACV homolog ist, ergab, dass in D1701 keine frühen Transkripte für das rpo132 Gen detektiert werden konnten, obwohl die homologen Gene im Schweinepocken- und Geflügelpockenvirus als früh beschrieben sind (Afonso et al., 2002, 2000). Das homologe VACV Gen (Stamm Western Reserve) besitzt zwei Transkriptionsstartstellen von denen eine ausschließlich zum späten Zeitpunkt, die zweite (80 Nukleotide stromabwärts) früh und spät im viralen Replikationszyklus verwendet werden (Patel & Pickup, 1989, Amegadzie et al., 1991). Da bekannt ist, dass die RNA-Polymeraseuntereinheiten früh und spät transkribiert werden (Condit & Niles, 2002, Broyles, 2003) müssen weitere Untersuchungen zeigen, inwieweit dies auf die Transkripte von rpo132 des ORFV zutrifft. Die bei ORFV D1701-B detektierten Transkripte des rpo 132 Gens mit 4,9 kb wurden durch die Deletion in D1701-V um ca. 0,3 kb verkürzt. Dies hatte jedoch keinen negativen Einfluss auf die Funktionalität der essentiellen RNA Polymeraseuntereinheit *in vitro*, da D1701-V im Vergleich zu D1701-B im entsprechenden Zeitraum vergleichbare Virustiter erreichte. Die Deletion des ati1 Gens und des 3'-Endes des benachbarten ati2 Gens (A26L) führte in D1701-V zum Verlust ati-spezifischer Transkripte. Da die ati Gene innerhalb der Pockenviren sehr unterschiedliche Größen und genetische Veränderungen aufweisen (de Carlos & Paez, 1991; Meyer & Rziha, 1993; Osterrieder et al., 1994), scheinen sie *in vitro* einen nicht essentiellen Charakter zu besitzen (de Carlos & Paez, 1991). Einen nicht-essentiellen Charakter der ati Gene kann man auch in der *in vivo* Situation vermuten, da die Gene unter anderem in dem Genom des Schweinepockenvirus, des Schafpockenvirus und des Ziegenpockenvirus fehlen (Afonso et al., 2002, Tulman et al., 2002). Ein verändertes Wachstumsverhalten *in vitro* und *in vivo* steht somit wahrscheinlich nicht im Zusammenhang mit der Deletion der ati Gene bei D1701-V.





**Abb. 5.1:** Genkarte der transkriptionell untersuchten Region im Genom von PPV ORFV D1701-B. Dargestellt ist die Anordnung der Gene, die Größe und Orientierung. Del2 Vero: Bezeichnet die Lokalisation und Größe der Deletion 2 im Genom des an Vero-Zellen adaptierten ORFV D1701-V.

Die weiteren transkriptionellen Analysen erstreckten sich auf die Gene D3L bis D9R anschließend an das ati2 und 10K Gen im Genom von ORFV D1701. Stromaufwärts des 10K Gens ist das ORFV D3L Gen lokalisiert. Es ist das dem VACV A28L homologe Gen, von dem sich aus der Sequenz ableiten ließ, dass es möglicherweise eine Transmembrandomäne besitzt. Funktionelle Daten dieses Gens sind nicht publiziert. Die Transkripte des D3L Gens scheinen von der Deletion in D1701-V, wie schon das rpo132 Gen, betroffen. In D1701-V infizierten Zellen verkürzten sie sich die spezifischen mRNAs von 2,5 kb (D1701-B) auf 1,8 kb. Im Unterschied zu der Analyse verschiedener Genome der Pockenviren (Afonso et al., 2000, 2002, Tulman et al., 2002) konnten mit einer D3L spezifischen Sonde in D1701 infizierten Zellen neben späten auch frühe Transkripte für dieses als spät beschriebene Gen detektiert werden. Da sich aus unseren Sequenzanalysen keine Pockenviren-spezifische Promotorstruktur für das D3L Gen ableiten ließ, müssen weitere Untersuchungen das zu anderen Pockenviren differente Transkriptionsverhalten klären. Im Anschluss an das D3L Gen ist der offene Leserahmen des D4L Gens, welches dem VACV A29L homolog ist und für die rpo35 Untereinheit der RNA-Polymerase kodiert. Für das ORFV D4L Gen wurde während des gesamten Replikationszyklus von D1701 und NZ2 spezifische Transkripte detektiert. Das A29L Gen ist zwar als frühes Gen des Schweinepockenvirus und Geflügelpockenvirus in der Literatur beschrieben (Afonso et al., 2000, 2002), jedoch zeigen aktuelle Publikationen, dass die aus neun Komponenten bestehenden RNA-abhängigen Polymeraseuntereinheiten prä- und postreplikativ transkribiert und exprimiert werden (Condit & Niles, 2002, Broyles, 2003). Dabei zeigte sich, dass die präreplikative Transkription und Expression der Komponenten der RNA-Polymerase für die postreplikative Transkription notwendig sind, während postreplikativ transkribierte und exprimierte Untereinheiten der RNA-Polymerase in neue Virionen verpackt werden und im nächsten Replikationszyklus für

die Transkription früher Gene verantwortlich sind (Condit & Niles, 2002). Dies bestätigt das Auftreten früher und später Transkripte des ORFV D4L Gens. Stromaufwärts des D4L Gens ist das dem VACV A30L homologe Gen D5L lokalisiert. In Korrelation mit den Daten vom VACV A30L (Szajner et al., 2001) besitzt das D5L Gen einen typischen Pockenvirus-spezifischen Promoter später Gene. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass dem D5L homologen VACV A30L Gen bei der Virus Reifung eine wichtige Rolle zukommt. Es spielt bei der Zusammenführung von neu entstandenen, sichelförmigen Virusmembranen und dem elektronendichten granulären Viroplasma wahrscheinlich in direkter Interaktion mit einem weiteren bisher nicht charakterisierten VACV Gen, dem G7L, eine essentielle Rolle (Szajner et al., 2001, 2003). So führten Mutationen in beiden Genen zu einem Auseinanderrücken von Membranen und Viroplasma in elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Dadurch kam es zur Bildung von leeren immaturren Virionen (IMV), während reife Virionen komplett fehlten (Szajner et al., 2001). Da Gene, die bei der Reifung und dem Zusammenbau von Virionen beteiligt sind, während der späten Phase der Virusreplikation transkribiert werden, korrelieren die publizierten Daten mit den hier gezeigten Ergebnissen für das ORFV D5L Gen. Eine funktionelle Homologie zwischen dem VACV A29L und dem ORFV D5L muss jedoch noch in weiteren Experimenten gezeigt werden.

Von dem stromaufwärts zum D5L gelegenen D6L, welches zum A32L Gen anderer Pockenviren homolog ist (Afonso et al., 2000, 2002; Tulman et al., 2002; Johnson et al., 1993), ist bekannt, dass es bei der Verpackung der viralen DNA in die Virionen und ebenfalls beim Zusammenbau der Virionen eine Rolle spielt (Koonin et al., 1993; Cassetti et al., 1998). Im Geflügelpockenvirus ist das entsprechende Homolog als spätes Gen beschrieben (Tulman et al., 2002). Diese Daten korrelieren mit der Tatsache, dass die Transkripte für dieses Gen bei den PPV Stämmen D1701 und NZ2 ebenfalls erst in der späten Phase nach der Virusreplikation detektiert werden konnten, obwohl die für späte Gene typische Initiationssequenz TAAAT (Broyles, 2003) bei den PPV fehlt.

In fortlaufender Homologie zu anderen Pockenviren schließt sich nach Umkehr der Transkriptionsrichtung nach dem D6L Gen das ORFV D7R Gen an welches zum VACV A33R homolog ist. Von dem VACV A33R Gen ist bekannt, dass es sowohl prä- als auch postreplikativ exprimiert wird (Roper et al., 1998). Ferner ist bekannt, dass es in der Hülle von extrazellulär umhüllten Virionen detektiert werden konnte (Roper et al., 1996), zwar für die Virusreplikation nicht essentiell ist, jedoch bei der Induktion von speziellen Aktinfasern, die die intrazellulär umhüllten Virionen (IEV) an die Peripherie bringen und damit für eine Zell zu Zell Ausbreitung der Virionen wichtig sind, eine Rolle spielt (Roper et al., 1998). Diese

Rolle besteht in einer Interaktion mit einem weiteren Hüllprotein von EEVs, dem A36R Genprodukt (Rottger et al., 1999; Ward et al., 2003). Die Vermutung geht dahin, dass das A33R Protein das A36R Protein von der Golgi-Membran in die IEV Membran transportiert und phosphoryliert, wodurch das Signal für die Aktinfaserbildung gegeben wird. Das A33R fungiert somit als ein Chaperon (Wolffe et al., 2001). In wie weit diese Funktionen auf das ORFV homologe D7R Gen zutreffen, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Die Detektion früher und später Transkripte des ORFV D7R Gen steht jedoch im Einklang mit den Ergebnissen für das VACV A33R Gen. Gleiches gilt auch für das anschließend an das D7R Gen kodierende D8R Gen, das PPV Homolog des A34R Gen von VACV. Bei A34R handelt es sich um ein glykosiliertes Hüllprotein von EEVs, welches bei dem Verbleib der Virusnachkommen an der Zelloberfläche und möglicherweise bei der Anhaftung von Viren an nicht-infizierte Zellen eine Rolle spielt (Blasco et al., 1993). Durch eine Deletionsmutante konnte ferner gezeigt werden, dass sich die Plaqueformation ändert und die Freisetzung von EEVs erhöht wird. Im Gegensatz dazu waren deren Infektiosität und somit auch deren Virusvirulenz deutlich verringert (McIntosh & Smith, 1996). Durch Untersuchungen von IEV Membranproteinen im Zusammenhang mit ihrer Funktion beim Zusammenbau und Aktinfaser-Bildung von IEVs zeigte sich, dass A34R in die Organisation und den Zusammenbau der IEV involviert ist, jedoch eher nicht in die Bildung von Aktinfasern (Rottger et al., 1999). Diese Zuordnung des A34R Gens zu späten Prozessen der Virusvermehrung stehen im Einklang mit der Detektion von späten Transkripten des ORFV D8R Gens. Interessanterweise zeigten die beiden D8R Gene der ORFV Stämme NZ2 und D1701 nur eine geringe Homologie zueinander, was sich neben den Sequenzvergleichen auch in einer fehlenden Detektion von D1701-spezifischen Transkripten mit einer NZ2-spezifischen Sonde zeigte. Durch vergleichende funktionelle Analysen der D8R Gene der ORFV Stämme D1701 und NZ2 kann möglicherweise eine Ursache für deren unterschiedliche Virulenz gefunden werden, die auf Veränderungen im D8R Gen zurückzuführen sind.

Beim dem letzten im Rahmen dieser Arbeit transkriptionell analysierten Gen handelte es sich um das D9R Gen, ein Homolog zum VACV A35R Gen. Von dem Homolog im Schweinepockenvirus ist nur bekannt, dass es sich um ein frühes Gen handelt (Afonso et al., 2002), was sich durch die transkriptionellen Analysen für das ORFV D9R Gen bestätigen ließ. Die Sequenz des D9R Gens zeigt das Vorhandensein von einer AT reichen Promotorsequenz an Position -20 bis -30 vor dem Translationsstartcodon, sowie wiederholt das von Pockenviren bekannte frühe Transkriptionsterminationssignal T<sub>5</sub>NT (Yuen & Moss,

1987). Die D9R Gene von ORFV D1701 und NZ2 sind in ihrem codierenden Bereich fast identisch, jedoch wurden bei D1701 nach dem Translationsterminationssignal und dem Stopp-Codon 119 weitere Nukleotide, sowie ein zusätzliches Terminationssignal gefunden. Dieser Umstand erklärt die unterschiedlichen Transkriptlängen in diesen beiden ORFV Stämmen für das D9R Gen. Welche Bedeutung diese genomische Veränderung auf transkriptioneller und funktioneller Ebene hat, müssen weitere Analysen zeigen.

Abschließend kann man zu der transkriptionellen Organisation der Gene in der Umgebung der del2 sagen, dass nur die direkt benachbarten Gene rpo132 und at1 bei D1701-V im Vergleich zu D1701-B veränderte Transkriptlängen zeigten. Auffällig war, dass die Transkripte des attenuierten ORFV Stammes D1701 im Vergleich zu dem virulenten ORFV Stamm NZ2 länger zu sein schienen. Dass es unterschiedliche lange RNAs vor allem in der späten Replikationsphase der Pockenviren gibt ist unbestritten (Cooper et al., 1981; Mahr & Roberts, 1984). Ebenso ist bekannt, dass die transkribierten, nicht-codierenden 5'- und 3'-Bereiche der mRNA auf die Translation Einfluss nehmen (Condit & Niles, 2002). Inwieweit jedoch die unterschiedliche Länge der nicht-kodierenden Bereiche der untersuchten Genomregion auf die Translationsregulation Einfluss nehmen und an einer veränderten, abgeschwächten Virulenz des PPV ORFV D1701 beteiligt sind, müssen weitere Versuche zeigen.

#### **5.4 Schutz gegenüber der Borna'schen Erkrankung durch das Rekombinante ORFV D1701-VrVp40**

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde gezeigt, dass man das PPV ORFV Virus prinzipiell als viralen Vektor benutzen kann. Während der Arbeiten hat sich gezeigt, dass der an Vero-Zellen adaptierte ORFV Stamm D1701-V, dem durch diese Adaption mehrere Gene verloren gingen, durch die Deletion des GIF-Gens möglicherweise eine verbesserte TH1-vermittelte Immunantwort in einem Wirtsorganismus zulässt. Das Potential des PPV ORFV D1701-V als Impfvektor sollte im zweiten Teil dieser Arbeit in einem etablierten System überprüft werden. Hierbei handelte es sich um ein Rattenmodell, indem die immunpathologische Erkrankung, die durch das Borna disease Virus (BDV) ausgelöst wird, sehr gut charakterisiert ist. Das BDV gehört zu der Ordnung der Mononegavirales, zu denen auch die hoch ansteckenden Masern- und Ebolaviren gehören, aber mit den Bornaviridae eine eigene Familie erhalten hat (Briese et al., 1994; Cubitt et al., 1994; de la Torre, 1994; Schneemann et al., 1995). BDV infiziert das zentrale Nervensystem einer Vielzahl von Vertebraten (Rott & Becht, 1995; Staeheli et al., 2000; Richt & Rott, 2001) und kann zu einer persistenten Virusinfektion des

Gehirns, trotz der Anwesenheit eines intakten Immunsystems führen (Stitz et al., 2002). Dabei bleiben die meisten Gehirnregion in der Ratte lebenslang infiziert. Neben einem breiten Spektrum an Zellen, die durch BDV infiziert werden können, sind vor allem Neuronen, Astrocyten und Mikrogliazellen in allen korticalen Regionen und vor allem im Stammhirn befallen (Carbone et al., 1987, 1989, 1991). Das BDV in der Ratte repräsentiert ein exzellentes und gut untersuchtes Modell, um diese Viruspersistenz im zentralen Nervensystem und den damit verbundenen Störungen zu untersuchen (Pletnikov et al., 2002; Hornig et al., 1999; Hornig et al., 2001; Gonzales-Dunia et al., 1997b).

Der Prototyp der Spezies Parapockenvirus, das ORFV, besitzt ein sehr enges Wirtsspektrum (Schaf und Ziege), in welchem sein Wachstum auf die Haut beschränkt ist (McKeever et al., 1988; Jenkinson et al., 1990). Eine systemische Infektion wurde bis heute nicht beschrieben. Zudem bewirken ORFV eine außergewöhnlich starke Stimulation der schnellen angeborenen Immunmechanismen am Ort der Infektion (Büttner & Rziha, 2002; Haig et al., 1997, 1998). Dies waren Gründe dieses Vektorsystem auf seine Fähigkeit hin zu untersuchen, einen Schutz gegen eine persistierende BDV-Infektion im ZNS von Ratten zu vermitteln.

Für die Herstellung einer rekombinanten ORFV Vakzine wurde das BDV p40 (N) Nukleoprotein ausgewählt, da gegen dieses Protein im Modellsystem der Ratte sowohl eine gute humorale, als auch eine zelluläre Immunantwort ausgelöst wird (Briese et al., 1995; Hatalski et al., 1995; Ludwig et al., 1988, Planz & Stitz 1999). Die Insertion des p40 Gens erfolgte in Analogie zur Herstellung der vegf-e Revertanten von D1701-V, durch homologe Rekombination in die ursprünglichen vegf-e Genloki an beiden Enden des viralen Genoms. Reguliert wurde die p40 Expression in der so entstandenen ORFV p40-Rekombinanten (Dp40) von dem beschriebenen frühen vegf-e Promoter. Das von vegf-e bekannte Expressionsmuster konnte für die *in vitro* Expression von p40 nach Infektion von Vero-Zellen mit Dp40 gezeigt werden und korreliert somit mit der des vegf-e Gens in D1701-V (Henkel, 1997). Die frühe und späte Promotoraktivität des vegf-e Promoters wird damit in Dp40 bestätigt. Von Pockenviren ist bekannt, dass sie eine Vielzahl verschiedener Zellen infizieren, sich aber dort nicht unbedingt vermehren können, eine für das Virus so genannte nicht-permissive Situation vorliegt. Die frühe Phase ihrer Virusreplikation findet jedoch aufgrund der komplexen Ausstattung der infizierenden Virionen trotzdem statt. Damit sind sie in der Lage Fremdgene unter der Kontrolle früher viraler Promotoren auch in nicht-permissiven Systemen zu exprimieren (Taylor et al., 1988, 1991, 1995; Hu et al., 1996; Fischer et al., 1997; Pardo et al., 1997). So konnte auch gezeigt werden, dass rekombinante ORFV D1701 in der Lage sind nicht permissive murine NIH/3T3, L929 und MC57 Zellen zu infizieren, rekombinante Gene

zu exprimieren, ohne jedoch infektiöse Nachkommenschaften zu produzieren (Fischer, 2002, Rziha et al., 1999). In Rattenzellen ließ sich daher ein ähnliches Verhalten für das rekombinante ORFV Dp40 vermuten. Bei einer Immunisierung mit Dp40 war es daher wichtig festzustellen, ob eine Immunantwort (zellulär, humoral oder beides) gegenüber dem p40 Antigen induziert werden kann. Die BDV Infektion der Ratte ist dabei von besonderem Interesse, da sich in diesem Infektionsmodell die Infektion im ZNS von immunkompetenten Tieren manifestiert. Die Belastungsinfektion wurde durch direkte Inokulation des Zielorgans (Gehirn) durchgeführt, was ein valides Testsystem darstellt, um den Schutz gegenüber der BDV-Erkrankung deutlich zeigen zu können. Da für die Verwendung des PPV ORFV als viralen Vektor keine Daten vorlagen, erfolgte ein Vergleich unterschiedlicher Immunisierungsstrategien in Anlehnung an die Protokolle von anderen Pockenviren in nicht permissiven Systemen (Taylor & Paoletti, 1988, Paoletti et al., 1984). Durch die Dokumentation der Körpergewichtsentwicklung und die Beurteilung der klinischen Symptome, wie für die BDV-Infektion in der Ratte etabliert (Nöske et al., 1998; Stitz et al., 1998, Furrer et al., 2001), wurde der Erfolg der Immunisierungsstrategien mit Dp40 nach BDV-Belastungsinfektion beurteilt. Zusätzlich erfolgten die Untersuchung der humoralen Immunantwort vor und nach der Belastungsinfektion, sowie die Analyse der Viruslast in den Gehirnen bei Versuchende. Ferner konnte durch die *in vivo* Applikation eine direkte Korrelation zwischen der für die Immunisierung verwendeten Dp40 Dosis, der Häufigkeit der Applikation, dem Weg der Immunisierung und den spezifischen Serum-Antikörpertitern beobachtet werden. Durch Analyse dieser Parameter konnten zwei Gruppen von Ratten mit unterschiedlichen Charakteristika differenziert werden (vgl. 4.17).

Die ersten Gruppe umfasste Tiere, die nach unterschiedlichen Immunisierungsstrategien keinen oder nur einen unzureichenden Schutz gegenüber einer BDV Belastungsinfektion aufwiesen. Hierzu gehörten die Ratten, die nur einmal i.m. mit einer hohen Dosis ( $10^7$  pfu), dreimal i.m. mit einer niedrigen Dosis ( $3 \times 10^5$  pfu) oder dreimal mit einer hohen Dosis ( $3 \times 10^7$  pfu) i.v. immunisiert worden waren. Die Tiere zeigten entweder die bekannte Gewichtsreduktion nach Auftreten erster BDV-spezifischer Symptome, oder aber eine überdurchschnittliche Gewichtszunahme, die auf eine Obesitas hinweisen (Kao et al., 1983; Herden et al., 2000; Dhurandhar, 2004). Trotzdem in einigen Ratten niedrige BDV-spezifischer Antikörpertiter vorhanden waren, waren die Tiere dieser Gruppen nicht frei von BDV-spezifischen klinischen Symptomen. BDV schien in den Gehirnen dieser Tiere nur teilweise reduziert. Dies kann dahingehend interpretiert werden, dass durch die Dp40-Immunisierung ein nicht ausreichender Schutz gegen die Belastungsinfektion vorlag.

Als beste Immunisierungsstrategie mit der Rekombinanten Dp40 stellte sich eine dreimalige, intramuskuläre Immunisierung mit je einer Dosis von  $1 \times 10^7$  pfu im Abstand von jeweils 14 Tagen heraus und konnte unabhängig hiervon inzwischen im Maussystem ebenfalls gezeigt werden (Fischer et al., 2003). Diese Immunisierungsstrategie resultierte in spezifischen Serumantikörpertitern und einem kompletten Schutz gegenüber der Borna'schen Erkrankung. Die Notwendigkeit größerer Mengen von Dp40 für einen stabilen Schutz gegenüber einer BDV Belastungsinfektion zu applizieren, kann mit dem Fehlen einer produktiven Infektion der Rekombinanten erklärt werden. Daneben könnte die Verabreichung größerer Mengen rekombinanten Virus lokal (im Muskel) zu einer frühen Expression großer Mengen von Fremdantigen führen, um eine solide Immunantwort zu induzieren. Die Korrelation zwischen der Menge und Fortdauer der Antigenexpression sowie der Stärke einer effizienten und spezifischen Immunantwort wurde bereits berichtet (Ochsenbein et al., 2000). Die Überlegenheit der i.m. Applikationsroute gegenüber der i.v. Route ist möglicherweise mit dem Hauttropismus des ORFV zu erklären. Die i.m. Route erlaubt dabei möglicherweise eine effizientere Antigenprozessierung sowie Antigenpräsentation, als auch die Antigenerkennung durch angelockte Immunzellen, als dies bei einer i.v. Applikation erreicht werden kann.

Die schützende Wirkung der induzierten p40-spezifischen Immunantwort wurde durch Belastungsinfektionen getestet. Es zeigte sich, dass Ratten nach der letzten Immunisierung über einen langen Zeitraum gegen eine BDV Belastungsinfektion geschützt waren. Eine Belastungsinfektion zwei Wochen nach der letzten Immunisierung als auch 8 Monate später zeigte den kompletten Schutz der Tiere gegenüber der BDV Erkrankung (Henkel et al., 2005). In diesem Zusammenhang muss betont werden, dass die p40-spezifische T-Zell Antwort bis jetzt als der wichtigster Mechanismus beschrieben wurde, der sowohl für den Schutz vor einer immunpathologischen Erkrankung, als auch die Viruseliminierung aus dem Wirt notwendig ist. Weitere Untersuchungen zeigten jedoch, dass die lokale Zell-vermittelte Immunantwort, die durch die Anwesenheit von T-Zellen repräsentiert wird, in den Gehirnen der immunisierten Tieren eher limitiert war. Während in Fällen einer experimentell induzierten BDV Erkrankung oder nach dem Transfer von Gehirnlymphocyten stets eine Vielzahl von T-Zellen im gesamten Gehirn gefunden wurden, was in der Regel von degenerativen Gehirnläsionen begleitet wurde (Bilzer & Stitz, 1994; Deschl et al., 1990; Hirano et al., 1983; Planz et al., 1995; Sobbe et al., 1997; Stitz et al., 1991), war die Anzahl der T-Zellen in den Gehirnen Dp40-immunisierter Ratten weniger auffallend. Weder im Cortex noch im Hippocampus immunisierter Tiere waren auffallende Läsionen oder ausgeprägte Entzündungen zu finden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die lokale Immunantwort

im Gehirn immunisierter Ratten nach BDV-Infektion unterschiedlich zu derjenigen in nicht-immunisierten BDV-infizierten Ratten ist.

Dass keine auffälligen Läsionen in den Gehirnen immunisierter und infizierter Ratten gefunden wurden kann durch die Tatsache erklärt werden, dass die Immunisierung mit Dp40 keine peripheren p40-spezifischen cytotoxischen T-Zellen induzierte. So konnten im hier vorgestellten Mausmodell zwar mit dem VACV, nicht jedoch mit Dp40 cytotoxische T-Zellen induziert werden, die gegen PPV oder p40 reagierten bzw. VACV kreuzreagierten. Lediglich in einem Experiment ergaben sich Hinweise darauf, dass in den Gehirnen Dp40 immunisierter Ratten, cytotoxische CD8<sup>+</sup> Zellen auftraten, die in der Lage waren Peptid-beladene Zielzellen zu lysieren. Weitere Versuche müssen nun klären, ob sich im Rattenmodell tatsächlich keine peripheren cytotoxischen T-Zellen induzieren lassen oder sie nur in der hier verwendeten Versuchsanordnung nicht zu detektieren waren. Dass sich prinzipiell in einem für BDV suszeptiblen Mausmodell durch Dp40 periphere, cytotoxische T-Zellen induzieren lassen, konnte kürzlich gezeigt werden (Hausmann et al., 2005).

Die immunhistochemischen Analysen lassen vermuten, dass es sich bei diesen cytotoxischen T-Zellen um Microgliazellen handeln könnte, was aber noch zu zeigen bleibt. Alternativ könnte es sich natürlich auch um CD8<sup>+</sup> T-Zellen handeln, die sehr früh in die infizierten Gehirnen immunisierter Tiere einwandern und beginnen die Virus-infizierten Zellen zu eliminieren, bevor sich ausgeprägte Läsionen bilden können. Dass es sich hierbei um einen anderen, bisher ungeklärten Mechanismus der Viruseliminierung handeln muss, als den für das p40 rekombinante VACV (VVp40) beschriebenen, liegt auf der Hand.

Bei Verwendung des Vaccinia Virus als viralen Vektor erfolgte eine fulminantere Immunantwort des Wirtes gegenüber der BDV-Infektion durch aktivierte, cytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Lewis et al. 1999), die für den immunpathologischen Verlauf der BDV-Infektion verantwortlich gemacht werden (Planz et al., 1995; Sobbe et al., 1997). Im Gegensatz zu den VVp40 immunisierten Tieren, bei denen eine erhöhte Zahl CD8<sup>+</sup> T-Zellen in den Gehirnen detektiert wurde (Lewis et al., 1999), war dies im Gehirn Dp40 immunisierter Tiere nicht zu finden. An Stelle der CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden hier verstärkt CD8<sup>+</sup> Microgliazellen detektiert, deren Anzahl sich in VVp40 immunisierten nicht von der im nicht-immunisierten Tier unterschied. PPV führt eventuell zu einer Immunantwort, die möglicherweise hauptsächlich Microgliazellen zu BDV-Eliminierung rekrutiert und einen fulminanten, immunpathologischen Verlauf und eine überschießende antivirale Typ 1 Immunantwort verhindert (Haig & Mercer, 1998; Anderson et al., 2001; Haig, 2006).



Veränderungen im pathologischen und klinischen Bild wurden nach Immunisierung mit einer VACV Rekombinanten, die das BDV p40 Nukleoprotein exprimiert, und anschließender BDV Belastungsinfektion beschrieben (Lewis et al., 1999). Hier wurde die Virusreplikation von BDV besser kontrolliert, was durch die Reduktion detektierbarer BDV Nukleinsäure und durch eine Virustiterreduktion im Gehirn der Ratten um den Faktor zehn bis hundert gezeigt wurde. Diese eingeschränkte Virusreplikation wurde jedoch auf Kosten einer starken Zunahme der inflammatorischen Immunantwort im Gehirn erreicht, die dadurch zu einer ausgeprägteren Klinik der Tiere führte. Dies steht im absoluten Gegensatz zu den Effekten nach der ORFV Dp40 induzierten Immunantwort, wie hier gezeigt. Drei Wochen nach der Infektion lag der BDV Titer in zwei der immunisierten Tiere unter der Nachweisgrenze und eine Ratte zeigte einen um den Faktor 100 reduzierten Titer im Vergleich zu den Kontrolltieren. Ungefähr zwei Monate nach der Infektion konnte infektiöses BDV aus keinem Gehirnhomogenat der untersuchten, immunisierten Tiere mehr isoliert werden. Diese Ergebnisse korrelieren mit dem Nachweis der BDV Nukleinsäure durch *in situ* Hybridisierung und dem Nachweis von BDV Antigen durch die Immunhistochemie. Beide Techniken zeigten einen kontinuierlichen Rückgang BDV-positiver Zellen in den Gehirnen immunisierter Ratten verglichen zu den Kontrolltieren. Zu späteren Zeitpunkten, zwei und fünf Monate nach der Infektion, waren die Gehirne der immunisierten Ratten fast frei von nachweisbarem BDV, nur in zwei von sechs Tieren konnten sehr wenige Einzelzellen detektiert werden, die noch infiziert waren. Keine der immunisierten und infizierten Ratten entwickelte einen verstärkten oder einen verzögerten Ausbruch der Erkrankung. Bei der Verwendung von VACVp40 konnte durch Lewis et al., (1999) gezeigt werden, dass sich die virale Replikation nur für einen kurzen Zeitraum von ungefähr 21 Tagen unterdrücken ließ. Daher kann man schließen, dass der PPV Vektor eine schnellere und nachhaltigere anti-p40 Immunantwort induziert als der VACV Vektor, ohne eine verstärkte Zunahme inflammatorischer Prozesse im Gehirn zu verursachen.

Interessanterweise wurde in allen Hippocampi der immunisierten und gesunden Ratten virales Antigen und Nukleinsäure bis zum Tag 50, in einem Fall bis zum Tag 140 nach der Belastungsinfektion detektiert, wenn auch in deutlich geringeren Mengen als bei den nicht-immunisierten Tieren. In fast allen anderen Hirnarealen wurde BDV bis zum Tag 50 nach der Belastungsinfektion eliminiert. Der Hippocampus ist als die primäre Zielstruktur der BDV-Infektion im Gehirn beschrieben und erkrankte Ratten zeigen einen dramatischen Verlust an Neuronen im Hippocampus (Carbone et al., 1989; Gosztonyi & Ludwig, 2001; Hornig et al., 1999; Sobbe et al., 1997), welcher bei Dp40 immunisierten Tieren in vergleichbarer Weise

niemals beobachtet wurde. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass der Hippocampus in der Lage ist, die geschädigte neuronale Zellschicht durch Einwanderung neuronaler Vorläuferzellen zu rekonstituieren (Ogita et al., 2005; Parent et al., 2006). Dieser Prozess würde möglicherweise durch die rechtzeitige adäquate Immunreaktion nach Immunisierung mit Dp40 begünstigt. So ist es denkbar, dass BDV-spezifische periphere CD45RC Gedächtnis-Zellen in immunisierten Tieren in das Gehirn einwandern können und somit schnell lokale Microglia-Zellen zur Reaktion gegenüber BDV-infizierten Neuronen stimulieren. Der Verlust an Neuronen wäre somit geringer und eine Rekonstitution der Hippocampus-Struktur leichter. Eine derartige lokale antivirale Immunantwort könnte somit das Überleben dieser zentralen Hirnstruktur ermöglichen. Allgemein lässt sich sagen, dass eine Restriktion von BDV in Gehirnen von Dp40-immunisierten Ratten um den Tag 20 nach der Belastungsinfektion offensichtlich war und die Eliminierung bis ungefähr zum Tag 50 p.i. dauerte. Diese Art der Kinetik einer BDV Eliminierung scheint sich von der zu unterscheiden, welche durch die Infektion mit hohen Dosen einer BDV Infektion erreicht wird (Oldach et al., 1995). Dies kann mit der Induktion des gesamten Spektrums der antiviralen Immunantwort erklärt werden, die aufgrund der Anwesenheit großer Mengen aller viraler Antigene möglich ist und somit die effektivste Immunantwort einschließlich einer frühen cytotoxischen T-Zellantwort ermöglicht (Furrer et al., 2001). In der hier vorgestellten Arbeit wurde jedoch nur das p40 Antigen für die Immunisierung verwendet, welches eventuell für eine schnelle, komplette Eliminierung von BDV nicht ausreicht, jedoch eine Virusausbreitung verhindert und in einer späten Eliminierung von BDV resultiert. In diesem Zusammenhang soll darauf hingewiesen werden, dass zusätzlich zur p40-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort andere Effektormechanismen von Bedeutung sein könnten. So kann weder eine cytotoxische T-Zellantwort gegenüber dem gp94 von BDV (Planz & Stitz, 1999), noch die kürzlich gegenüber dem p10 beschriebenen cytotoxische Immunreaktion ausgeschlossen werden (Hashimoto et al., 2003). Daher ist es vorstellbar, dass die durch das rekombinante ORFV induzierte p40-spezifische Immunantwort in der Lage ist, die BDV Replikation früh nach der Belastungsinfektion einzugrenzen und die Viruseliminierung durch die anschließend induzierte Immunantwort gegenüber dem kompletten BDV zu erleichtern.

Die Zeit, die notwendig war, um das Virus der Belastungsinfektion aus dem Gehirn zu eliminieren, gleicht der, die nach dem Transfer von BDV-erfahrenen CD4<sup>+</sup> T-Zellen für die Eliminierung von BDV benötigt wurde (Nöske et al., 1998). Daher lässt sich vermuten, dass die Immunisierung mit dem rekombinanten ORFV Dp40 nach Belastungsinfektion eine frühe und schnelle Immunantwort durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen vermittelt, die zu einer effizienten Hilfe für

CD8<sup>+</sup> T-Zellen führt. Da die Immunisierung mit der ORFV Rekombinanten in der Peripherie initiiert wurde, mag dies durch die Situation im Gehirn nicht vollständig repräsentiert werden, in welchem zwischen dem Tag 5 und 20 nach der Belastungsinfektion kein signifikanter Anstieg an CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu den nicht-immunisierten Ratten detektiert werden konnte. Jedoch wurde eine beträchtliche Anzahl von OX22-positiven Lymphocyten ausschließlich in den Gehirnen immunisierter Tiere gefunden. Diese CD45RC positiven Lymphocyten akkumulieren in enger Assoziation mit p40 Antigen an Stellen an denen auch CD8<sup>+</sup> Zellen im Parenchym gefunden wurden. Eine hohe Expression des CD45RC Oberflächenproteins ist für B-Zellen und T-Lymphocyten beschrieben (Woollett et al., 1985; Bell et al., 1998). Dieser Phänotyp repräsentiert entweder naive CD4<sup>+</sup> Ratten T-Zellen, die eine Hilfefunktion für B-Zellen während der ersten Phase der Immunantwort vermitteln, oder ruhende langlebige CD4<sup>+</sup> T-Zellen, deren Mehrheit CD45RC exprimiert. Diese Subpopulation Antigen-erfahrener CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die schnell aus einem Zustand der niedrigen CD45RC Expression in einen mit hoher CD45RC Expression revertieren können, wenn das Antigen verschwunden ist, werden auch in cervikalen Lymphknoten gefunden (Richt et al., 1994). Sie können leicht durch endotheliale Gefäße migrieren (Sparshott & Bell, 1998) und ebenfalls eine immunoprotektive Funktion besitzen (Bell et al., 1998). Die Rolle der cervikalen Lymphknoten während der Borna'schen Erkrankung wurde kürzlich gezeigt (Batra et al., 2003). Aus den jetzigen Ergebnissen kann aber noch nicht geschlossen werden, dass die Immunisierung mit Dp40 die Generierung dieser sehr potenten Population von T-Gedächtniszellen induziert hat oder zu einer schnellen Induktion von spezifischen B-Zellen und Antikörper-produzierenden Plasmazellen geführt hat oder beidem. Alternativ könnte es sich bei den CD45 positiven Zellen ebenfalls um eine Population CD3<sup>+</sup> T-Lymphocyten handeln, die nach neuronalem Schaden auf den Plan gerufen werden und dass einige dieser aktiven T-Lymphocyten durch die Produktion des Nervenwachstumsfaktor (NGF: nerve growth factor) eine neuronalen Regeneration begünstigen (Mizuma et al., 1999).

Dass sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> Lymphocyten einen maßgeblichen Anteil in der Vermittlung des Schutzes nach Dp40 Immunisierung besitzen, zeigten die Experimente mit thymektomierten Ratten, deren periphere CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> Immunzellen depletiert waren. Die in den thymektomierten Ratten verbliebenen peripheren Lymphocyten reichten aus, um nach Immunisierung mit Dp40 gegenüber einer BDV-Belastungsinfektion zu schützen. Sie zeigten keine klinischen Symptome. BDV war in allen Hirnarealen nachweisbar, wenn auch deutlich weniger stark als in den BDV-infizierten Kontrolltieren. Wurden hingegen CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> periphere T-Zellen ebenfalls depletiert, zeigten die Tier klinische Symptome. Die Viruslast

war dabei in den Tieren mit zusätzlich CD8 depletierten Zellen höher als in den BDV-infizierten Kontrolltieren, was darauf hindeutet, dass CD8<sup>+</sup> Zellen bei der Eliminierung der BDV-Infektion eine Rolle spielen. Wird durch Depletion der CD4<sup>+</sup> Zellen die T-Hilfe ausgeschaltet, erfolgt keine deutliche BDV-Reduktion im Gehirn und die verbliebenen BDV-Titer waren nur unwesentlich geringer als in den BDV-Kontrolltieren. Dieses Experiment zeigte, dass für die Bekämpfung der BDV-Infektion ein intaktes Immunsystem in den Tieren vorhanden sein muss und Immunzellen, welche nur über CD4 und CD8 differenziert werden, alleine nicht ausreichend sind, um einen Schutz zu vermitteln.

Da die Vermittlung des Schutzes gegenüber der BDV-Belastungsinfektion nicht allein mit der zellulären Immunantwort zu erklären ist, wurden weitere Parameter untersucht. Interessanterweise zeigte die Immunhistochemie in den Arealen CD45RC positiver Zellen die Präsenz großer Mengen von Immunglobulinen. Ähnliches gilt für die Akkumulation von B-Zellen in Gehirnen von BDV-infizierten Ratten nach adoptivem Transfer von CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Richt et al., 1994). Die Anwesenheit von B-Zellen und lokale Anreicherungen von Immunglobulinen in kortikalen Gehirnregionen sowie im Hippocampus von BDV-infizierten Ratten wurde schon früher berichtet (Deschl et al., 1990; Hatalski et al., 1998a), jedoch ohne deren Spezifität zu beweisen. In Mäusen können Antigen-erfahrene B-Zellen restimuliert werden, so dass sie außerhalb von lymphatischen Organen zu Plasmazellen differenzieren (Ochsenbein et al., 2000) und CD4<sup>+</sup> T-Zellen benötigen, um eine langanhaltende humorale Immunreaktion hervorzurufen (Crotty et al., 2003). Die Arbeiten von Hatalski et al. (1998b) deuten auf eine Verschiebung einer initialen TH1 vermittelten zellulären Immunantwort zu einer TH2-ähnlichen humoralen Immunantwort während der chronischen Phase BDV-infizierter Ratten, was anscheinend mit einer Abnahme der inflammatorischen Reaktion korreliert. Auch wenn weitere Untersuchungen notwendig sind, scheint eine bemerkenswerte Eigenschaft dieses neuen Vektorsystems zu sein, eine balancierte TH1/TH2 Immunität hervorzurufen. So konnte gezeigt werden, dass inaktiviertes PPV ORFV D1701 in der Lage ist über IFN- $\gamma$  eine Typ I Immunantwort zu induzieren, die später durch eine IL-4 und IL-10 Produktion kontrolliert wird (Weber et al., 2003). Replikationsfähiges ORFV hingegen ist über verschiedene Mechanismen in der Lage, eine Typ I Immunantwort zu unterdrücken. So wirkt das ORFV-IL-10 immunosuppressiv und verhindert eine TH1-Immunantwort durch Suppression von T-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen (Haig et al., 2002; Haig 2006). Ferner exprimiert das ORFV ein Chemokin-bindendes Protein (CBP, Seet et al., 2003), welche CC-Chemokine, wie RANTES, Monocyten chemotaktisches Protein-1 und Makrophagen inflammatorisches Protein 1 $\alpha$  bindet und somit die Monocyten/Makrophagen

und T-Zell Rekrutierung kontrolliert. Zusätzlich bindet ORFV CBP noch Lymphotaktin und verhindert somit die Rekrutierung von T-, B-Zellen und Neutrophilen (Yoshida et al., 1998). Die Expression des ORFV GIF als immunmodulatorisches Protein, welches GM-CSF und IL-2 bindet und deren biologische Funktion inhibieren kann (Deane et al., 2000), wurde vorher diskutiert. Eine TH1 Antwort könnte somit unterdrückt werden und die Stimulation von Makrophagen verhindern. Da das GIF-Gen in D1701-V teilweise deletiert ist, könnte eine verbesserte Hilfe und Antigenpräsentation im lokalen Umfeld der Infektion erfolgen. Dieser veränderte virale Hintergrund in Dp40 könnte somit einen entscheidenden Vorteil bei der Immunisierung darstellen.

Die Teilnahme von nicht-neutralisierenden antiviralen Antikörpern bei der Vermittlung von Schutz gegenüber der BDV Erkrankung wurde bisher noch nicht untersucht. Unter Berücksichtigung der hier dargestellten Ergebnisse erscheint die Untersuchung notwendig, welche Rolle nicht-neutralisierenden Antikörpern, die gegen definierte virale Antigene gerichtet sind, während der BDV Infektion oder der Kontrolle der viralen Replikation bzw. Viruselimination zukommt. Für andere neurotrope Viren wie das Sindbis Virus, das Flavivirus (TBEV) oder das murine Coronavirus JHM konnte für antivirale Antikörper, auch solche ohne virus-neutralisierende Wirkung, eine herausragende Rolle gegenüber einer nicht-destruktiven Viruseliminierung aus dem Gehirn durch Restriktion oder durch Verhindern einer viralen Genexpression gezeigt werden (Doerries, 2001; Griffin et al., 1997; Guidotti & Chisari, 2001; Kreil et al., 1998). Es gibt zunehmend mehr Anhaltspunkte dafür, dass B-Zellen für die Viruseliminierung nach primärer Infektion des ZNS notwendig sind. Die Rolle der Antikörper als primäre Mediatoren einer nicht-cytolytischen Viruseliminierung muss noch aufgeklärt werden. Wie kürzlich berichtet wurde (Dietzschold et al., 2001; Griffin et al., 1997), kann die Bindung von Antikörpern auf der Zelloberfläche oder deren Internalisierung in die infizierte Zelle intrazelluläre Signalkaskaden auslösen. Als eine Folge davon können angelockte T-Zellen und aktivierte Microglia-Zellen Cytokine wie IFN- $\gamma$  oder TNF- $\alpha$  produzieren, die in einer Cytokin-vermittelten Viruseliminierung durch nicht-cytolytische T-Zellen (Binder & Griffin, 2001; Dorries, 2001; Griffin et al., 1997; Kundig et al., 1993), einschließlich nicht-cytolytischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen resultieren kann (Guidotti & Chisari, 2001). Die Bedeutung von IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  oder TNF- $\alpha$  in der Dp40 vermittelten Eliminierung von BDV erscheint jedoch fraglich, da keine bedeutenden Unterschiede in der Transkription der mRNAs dieser Cytokine im Vergleich zu nicht-immunisierten Tieren im Gehirn gefunden werden konnten (Henkel et al., 2005). Weitere detailliertere Untersuchungen müssen zeigen,

welche anderen protektiven oder regenerativen Faktoren nach Immunisierung mit Dp40 induziert werden.

Schließlich können Antikörper, die zu einer Opsonierung apoptotischer Zellen führen, auch eine leichtere Inkorporation durch Makrophagen bewirken (Peng et al., 2005), so dass die Induktion von nekrotischen und damit inflammatorischen Reaktionen verhindert wird. Das Auftreten von Immunglobulinen in den Gehirnen immunisierter Raten könnte damit der erste Hinweis für solch einen Prozess im BDV Rattenmodell sein.

Das ORFV Vektorsystem kann somit eine Aufklärung der immunologischen Effektormechanismen ermöglichen, die für eine nicht-cytolytische BDV-Eliminierung aus dem Gehirn infizierter Ratten verantwortlich ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass erstmals ein Schutz gegenüber neuropathologischen Prozessen nach BDV Infektion durch die Applikation eines neuen rekombinanten Virusvektors, der nur das p40 Antigen von BDV exprimiert, erreicht werden konnte. Dies sollte ein wichtiger Schritt in Richtung einer idealen Vakzine sein, die in der Lage ist, eine effektive und lang anhaltende spezifische Immunität zu induzieren, was wiederum zu einer Restriktion und Eliminierung dieser persistenten Virusinfektion führt, ohne einen messbaren bleibenden neuronalen Schaden hervorzurufen. Derzeit finden Untersuchungen statt durch diese ORFV Rekombinante induzierte Cytokine und mögliche Immunmodulatoren zu identifizieren, die für ein optimiertes Zusammenspiel mit der bekannten anti-BDV T-Zell-vermittelten Komponente verantwortlich sind und möglicherweise auch die frühen Phasen der Virusinfektion beeinflussen (Planz et al., 2003). Darüber hinaus kann die Verwendung dieses Vektorsystems intensivere Untersuchungen zur Rolle der lokalen Antikörperantwort bei der Eliminierung des persistierenden Virus ermöglichen. Schließlich zeigte die vorliegende Arbeit ein weiteres Beispiel für die außerordentlichen Fähigkeiten des ORFV Vektorsystems in der Vermittlung einer schützenden antiviralen Immunität.

## 6 Zusammenfassung

Der Prototyp des Genus Parapockenvirus (PPV) ist das Orf Virus (ORFV), welches in seinem natürlichen Wirt (Schaf, Ziege) ulzerative Hautläsionen (Ecthyma contagiosum) hervorruft. Um das ORFV als viralen Vektor verwenden zu können wurden nicht-essentielle Gene im Virusgenom identifiziert, die als Insertionsorte für Fremdgene genutzt werden sollten. Der interessanteste Kandidat war das vegf-e Gen. Es konnte gezeigt werden, dass sich im attenuierten ORFV-Stamm D1701 die bakteriellen Gene lacZ und Xgpt im vegf-e Locus inserieren und exprimieren ließen und mittels lacZ/Xgpt Selektion rekombinante D1701 Viren isoliert werden konnten.

Im Gegensatz zu anderen Pockenviren besitzen die PPV ein sehr enges Wirtsspektrum. Immunmodulatorische ORFV Proteine erleichtern die lokale Infektion und verhindern die Induktion einer lang anhaltenden Immunantwort des Wirtes gegenüber ORFV. Diese immunmodulatorischen Gene erhöhen somit die Virulenz des Virus. Durch Eliminierung solcher Virulenzgene, wie z.B. des viralen vegf-e oder des GIF Gens von ORFV D1701 erfolgte eine zusätzliche Attenuierung. Die in dieser Arbeit hergestellten unterschiedlichen ORFV Rekombinanten zeigten, dass Deletionen im Genom des in Vero-Zellen adaptierten ORFV-Stammes D1701-V zum gleichen apathogenen Phänotyp führten wie nach Deletion des vegf-e Gens.

Das Potential einer auf D1701-V basierenden Vektorvakzine wurde im für ORFV nicht-permissiven Rattenmodell der Borna Disease Virus (BDV) Infektion überprüft. Hierzu wurde das p40 Nukleoprotein von BDV erfolgreich in das ORFV Genom an Stelle des vegf-e Gens inseriert und Ratten mit der Rekombinanten D1701-VrVp40 (Dp40) nach unterschiedlichen Protokollen immunisiert. Eine dreimalige intramuskuläre Immunisierung mit je  $10^7$  pfu Dp40 induzierte eine sehr gute, lang anhaltende Immunantwort gegen BDV und die Tiere waren gegenüber einer BDV-Belastungsinfektion vollständig geschützt. Darüber hinaus führte die Immunisierung zu einer deutlichen Virusreduktion in den Gehirnen der immunisierten Tiere nach BDV-Infektion bis hin zur Eliminierung von nachweisbarem BDV. Immunhistochemische Analysen zeigten eine große Anzahl CD45RC<sup>+</sup> Lymphozyten, B-Zellen, Immunglobuline und CD8<sup>+</sup> Microglia-Zellen in Assoziation mit BDV-infizierten Neuronen in den Gehirnen der immunisierten und infizierten Tiere, die in den Gehirnen der Kontrolltiere nicht auftraten. Die Immunisierung mit Dp40 scheint eine ausgeglichene TH1/TH2 Immunantwort gegen BDV zu vermitteln, wodurch erstmals durch eine Lebendschutzimpfung eine Immunpathogenese durch BDV-spezifische cytotoxische T-Zellen

verhindert wurde. Mechanismen dieser nicht-zytolytischen, schützenden Immunantwort nach Applikation der ORFV-Rekombinanten bleiben weiter zu klären.

Zusammenfassend zeigten die Experimente den erfolgreichen Einsatz dieses neuen ORFV Vektorsystems in einem Wirt, der keine Replikation des Vektorvirus erlaubt und somit ein entscheidendes Sicherheitskriterium erfüllt. Weiterhin erlaubt die kurzlebige Immunität gegen ORFV Mehrfachimmunisierung mit ORFV-Rekombinanten und schließlich lassen sich die rekombinanten ORFV unter kontrollierbaren Bedingungen produzieren als andere nicht-replizierende Pockenvirusvektoren.



## 7 Summary

The Orf virus (ORFV) represents the prototype species of the genus Parapoxvirus (PPV) and infection of its natural host (sheep and goat) causes a contagious pustular dermatitis (contagious Ecthyma). For the use of ORFV as a viral vector non-essential genes were detected within the viral genome suitable as insertion sites for foreign genes. The most interesting candidate was the vegf-e gene. The bacterial genes lacZ and xgpt could be inserted into the vegf-e locus and expressed in the attenuated ORFV D1701 and lacZ/xgpt selection allowed the generation of recombinant D1701 viruses.

In contrast to other poxviruses the PPV contain a very restricted host range. Immune modulating ORFV proteins facilitate local infection of the host and prevent a long lasting immune response of the host against ORFV. Thus, immune modulating proteins increase virus virulence. Deletion of those virulence genes (like the viral vegf-e or GIF) resulted in additional attenuation of ORFV D1701. Furthermore, the different ORFV recombinants described in this thesis demonstrated that deletions in the genome of Vero cell-adapted strain D1701-V resulted in a similar apathogenic phenotype as after deletion of the vegf-e gene.

The potential of a D1701-V based vector vaccine was proven in rats, which are non-permissive for ORFV and represent an excellent model for Borna disease virus (BDV) infection. The p40 (N) nucleoprotein of BDV was inserted in the vegf-e gene locus and the resulting D1701-VrVp40 recombinant (Dp40) was used for immunisation of rats. A threefold intramuscular application of  $10^7$  pfu Dp40 resulted in an excellent, long lasting immune response against BDV and mediated complete protection against BDV challenge infection. Moreover, the immunisation reduced the virus in the brain of immunised animals after BDV challenge up to the point of elimination of detectable BDV.

Immunohistochemical analyses illustrated a close association of numerous CD45RC<sup>+</sup> lymphocytes, B-cells, immunoglobulin and CD8<sup>+</sup> microglia cells with BDV infected neurons in the brain of immunized and infected rats, which were not seen in the brain of control animals. The data indicate that the immunization with Dp40 mediates a balanced TH1/TH2 immune response. For the first time, a life vaccination could prevent the immunopathogenesis caused by BDV-specific cytotoxic T-cells. Underlying mechanisms of the Dp40-induced non-cytolytic protective immunity remain to be solved.

In conclusion, the presented experiments demonstrate the successful use of the novel ORFV vector system in a host that does not support the replication of the vector virus, which is

important for safety reasons. Additionally, the short-term ORFV immunity will allow multiple applications of recombinant ORFV vaccines, and finally the possibility of economic production of ORFV under controlled conditions is superior to other non-replicating pox viruses.

## 8 Eigene Publikationen

### 8.1 Publikation mit Erstautorenschaft

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

### 8.2 Weitere Publikationen

1) Heinzelmann, F., Jendrossek, V., Lauber, K., Nowak, K., Eldt, T., Boras, R., Handrick, R., Henkel, M., Martin, C., Uhlig, S., Köhler, D., Eltzhig, H.K., Wehrmann, M., Budach, W., Belka, C.:

Irradiation induced pneumonitis is mediated by the CD95/CD95-ligand system.  
J Natl Cancer Inst. 98 (2006), 1248-1251.

2) Gruber, C., Henkel, M., Budach, W., Belka, C., Jendrossek, V.:  
Involvement of tyrosine kinase p56/Lck in apoptosis induction by anticancer drugs.  
Biochem Pharmacol. 67 (2004) 1859-72.

3) Rziha, H.-J., Adam, K.-H., Röttgen, M., Cottone, R., Henkel, M., Dehio, C., Büttner, M.:  
Relatedness and heterogeneity at the near-terminal end of the genome of a parapoxvirus bovis 1 strain (B177) compared with parapoxvirus ovis (Orf virus).  
J Gen Virol. 84 (2003) 1111-1116.

4) M.Büttner, T. Fischer, A. Saalmüller, M.Henkel and H.-J. Rziha:  
A gelatine sponge implantation model in swine for the determination of local immune reactions.  
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr 113 (2000) 41-45.

5) H.-J. Rziha, M. Henkel, R. Cottone, B. Bauer, U. Auge, F. Götz, E. Pfaff, M. Röttgen, C. Dehio, M. Büttner: Generation of recombinant parapoxviruses: non-essential genes suitable for insertion and expression of foreign genes.  
J Biotechnology 83 (2000) 137-145.

6) Hanns-Joachim Rziha, Marco Henkel, Rosita Cottone, Marlene Meyer, Christoph Dehio, Matthias Büttner:  
Parapoxviruses: potential alternative vectors for directing the immune response in permissive and non-permissive hosts.  
J Biotechnology 73 (1999) 235-242.

7) Rosita Cottone, Mathias Büttner, Berthilde Bauer, Marco Henkel, Eduard Hettich, Hanns-Joachim Rziha:  
Analysis of genomic rearrangement and subsequent gene deletion of the attenuated Orf virus strain D1701.  
Virus Research 56 (1998) 53-67.

9) Diplomarbeit: Parapockenvirus Orf D1701: Versuche zur Herstellung einer vegf-negativen Mutante, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen, Deutschland (1997).

## 9 Literaturverzeichnis

- Abdussalam, M., Cosslett, V.E.** (1957):  
Contagious pustular dermatitis. I. Studies on morphology.  
*J.Comp.Pathol.* 67, 145-156.
- Afonso, C.L., Tulman, E.R., Lu, Z., Zsak, L., Kutish, G.F., Rock, D.L.** (2000):  
The genome of fowlpox virus.  
*J.Virol.* 74, 3815-3831.
- Afonso, C.L., Tulman, E.R., Lu, Z., Zsak, L., Rosario, F.A., Balinsky, C., Kutish, G.F., Rock, D.L.** (2002):  
The genome of swinepox virus.  
*J.Virol.* 76, 783-790.
- Ahn, B.-Y., Moss, B.** (1989):  
Capped poly(A) leaders of variable lengths at the 5' ends of vaccinia virus late mRNAs.  
*J.Virol.* 63, 226-232.
- Alcami, A., Khanna, A., Paul, N.L., Smith, G.L.** (1999):  
Vaccinia virus strain Lister, USSR and Evans express soluble and cell-surface tumor necrosis factors.  
*J.Gen.Virol.* 80, 949-959.
- Alcami, A., Smith, G.L.** (1992):  
A soluble receptor for interleukin-1 $\beta$  encoded by vaccinia virus: a novel mechanism of virus modulation of the host immune response to infection.  
*Cell* 71, 163-167.
- Alcami, A., Smith, G.L.** (1995):  
Cytokine receptors encoded by poxviruses: a lesson in cytokine biology.  
*Immunol. Today* 16, 474-478.
- Alcami, A., Symons, J.A., Khanna, A., Smith, G.L.** (1998):  
Poxviruses: Capturing cytokines and chemokines.  
*Sem.Virol.* 5, 419-427.
- Alcami, A., Symons, J.A., Smith, G.L.** (2000):  
The vaccinia virus soluble alpha/beta interferon (IFN) receptor binds to the cell surface and protects cells from the antiviral effects of IFN.  
*J.Virol.* 74, 11230-11239.
- Aloisi, F., Ria, F., Columba-Cabezas, S., Hess, H., Penna, G., Adorini, L.** (1999):  
Relative efficiency of microglia, astrocytes, dendritic cells and B cells in naive CD4<sup>+</sup> T cell priming and TH1/Th2 cell restimulation.  
*Eur.J.Immunol.* 29; 2705-2714.
- Aloisi, F., Ria, F., Penna, G., Adorini, L.** (1998):  
Microglia are more efficient than astrocytes in antigen processing and Th1 but not Th2 cell activation.  
*J.Immunol.* 160; 4671-4680.
- Amegadzie, B.Y., Holmes, M.H., Cole, N.B., Jones, E.V., Earl, P.L., Moss, B.** (1991):  
Identification, sequence, and expression of the gene encoding the second-largest subunit of the vaccinia virus DNA-dependent RNA polymerase.  
*Virology* 180, 88-98.
- Amsterdam, J.D., Winokur, A., Dyson, W., Herzog, S., Gonzales, F., Rott, R., Koprowski, H.** (1985):  
Borna disease virus. A possible etiologic factor in human affective disorders?  
*Arch.Gen.Psychiatry* 42, 1093-1096.

- Anderson, I.E., Reid, H.W., Nettleton, P.F., McInnes, C.J., Haig, D.M.** (2001):  
Detection of cellular cytokine mRNA expression during orf virus infection in sheep: differential interferon- $\gamma$  mRNA expression by cells in primary versus reinfection skin lesions.  
Vet. Immunol. Immunopathol. 83, 161-176.
- Antczak, J.B., Patel, D.D., Ray, C.A., Ink, B.S., Pickup, D.J.** (1992) :  
Site-specific RNA cleavage generates the 3' end of a poxvirus late mRNA.  
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89, 12033-12037.
- Archard, L.C., Mackett, M., Barnes, D.E., Dumbell, K.R.** (1984):  
The genome structure of cowpox virus white pock variants.  
J. Gen. Virol. 65, 875-886.
- Bankamp, B., Brinckmann, U.G., Reich, A., Niewiesk, S., ter Meulen, V., Liebert, U.G.** (1991):  
Measles virus nucleocapsid protein protects rats from encephalitis.  
J.Virol. 72, 2491-2500.
- Baroudy, B.M., Moss, B.** (1982):  
Sequence homologies of diverse length tandem repetitions near ends of vaccinia virus genome suggest unequal crossing over.  
Nucl.Acids Res. 18, 5673-5679.
- Baroudy, B.M., Venkatesan, S., Moss, B.** (1982)  
Incompletely base-paired flip-flop terminal loops link the two DNA strands of the vaccinia virus genome into one uninterrupted polynucleotide chain.  
Cell 28, 315-324.
- Bas, J., Calopa, M., Mestre, M., Mollevi, D.G., Cutillas, B., Ambrosio, S., Buendia, E.** (2001):  
Lymphocyte populations in Parkinson's disease and in rat models of parkinsonism.  
J. Neuroimmunol. 113, 146-152.
- Batra, A.** (2000):  
In vivo und in vitro Untersuchungen zur Stimulation Borna Disease virusspezifischer CD8+ Lymphozyten der Ratte und Nachweis viraler Proteine in und auf infizierten Zellen mit Hilfe der Durchflußzytometrie.  
Inaugural-Dissertation, Gießen.
- Batra, A., Planz, O., Bilzer, T., Stitz, L.** (2003):  
Precursors of Borna disease virus-specific T cells in secondary lymphatic tissue of experimentally infected rats.  
J.Neurovirol. 9, 325-335.
- Battegay, M., Cooper, S., Althage, A., Banziger, J., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M.** (1992):  
Quantification of lymphocytic choriomeningitis virus with an immunological focus assay in 24- or 96-well plates [published errata appears in J Virol Methods 1991 Nov;35(1):115 and 1992 Aug;38(2):263].  
J.Virol.Methods 33,191-198.
- Beattie, E., Tartaglia, J., Paoletti, E.** (1991):  
Vaccinia virus-encoded eIF-2 alpha homolog abrogates the antiviral effect of interferon.  
Virology 183, 419-422.
- Bechter, O.E., Eisterer, W., Pall, G., Hilbe, W., Kuhr, T., Thaler, J.** (1998):  
Telomere length and telomerase activity predict survival in patients with B cell chronic lymphocytic leukemia.  
Canc.Res. 58, 4918-4922.
- Bell, E., Sparshott, S.M., Bunce, C.** (1998):  
CD4+ T-cell memory, CD45R subsets and the persistence of antigen – a unifying concept.  
Today 19, 60-64.
- Berg, A.L., Johannisson, A., Johansson, M., Berg, M., Dorries, R. et al.** (1999):  
Peripheral and intracerebral T cell immune response in cats naturally infected with Borna disease virus.  
Vet.Immunol.Immunopathol. 68, 241-253.

- Berg, M., Ehrenborg, C., Blomberg, J., Pipkorn, R., Berg, A.L.** (1998):  
Two domains of the Borna disease virus p40 protein are required for interaction with the p23 protein.  
*J.Gen.Virol.* 79, 2957-2963.
- Bertholet, C., Drillien, R., Wittek, R.** (1985):  
One hundred base pair of 5' flanking sequences of a vaccinia virus late gene are sufficient to temporally regulate late transcription.  
*Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 82, 2096-2100.
- Bertholet, C., Van Meir, E., Ten Heggeler-Bordier, B., Wittek, R.** (1987):  
Vaccinia virus produces late mRNAs by discontinuous synthesis.  
*Cell* 50, 153-162.
- Bilzer, T., Stitz, L.** (1996):  
Immunopathogenesis of virus disease affecting the central nervous system.  
*Crit.Rev.Immunol.* 16, 145-222.
- Bilzer, T., Stitz, L.** (1993):  
Brain cell lesions in Borna disease are mediated by T cells.  
*Arch.Virol.Suppl.* 7, 153-158.
- Bilzer, T., Stitz, L.** (1994):  
Immune-mediated brain atrophy: CD8+ T cells contribute to tissue destruction during Borna disease.  
*J-Immunol.* 153, 818-823.
- Bilzer, T., Planz, O., Lipkin, W.I., Stitz, L.,** (1995):  
Precedence of CD4+ and CD8+ cells and expression of MHC class I and MHC class II antigen in horses with Borna disease virus-induced encephalitis.  
*Brain Pathol.* 5, 223-230.
- Binder, G.K., Griffin, D.E.** (2001):  
Interferon-gamma-mediated site-specific clearance of alphavirus from CNS neurons.  
*Science* 293, 303-306.
- Bird, P.I.** (1998):  
Serpins and regulation of cell death.  
*Results.Probl.Cell.Differ.* 24, 63-89.
- Blasco, R., Sisler, J.R., Moss, B.** (1993):  
Dissociation of progeny vaccinia virus from cell membrane is regulated by a viral envelope glycoprotein: effect of a point mutation in the lectin homology domain of the A34R gene.  
*J.Virol.* 67, 3319-3325.
- Bode, L., Riegel, S., Ludwig, H., Amsterdam, J.D., Lange, W., Koprowski, H.** (1988):  
Borna disease virus-specific antibodies in patients with HIV infection and mental disorders.  
*Lancet* 2, 689.
- Bonnet, M.C., Tartaglia, J., Verdier, F., Kourilsky, P., Lindberg, A., Klein, M., Moingeon, P.** (2000):  
Recombinant viruses as a tool for therapeutic vaccination against human cancers.  
*Immunol. Letters* 74, 11-25.
- Boyle, D.B., Coupar, B.E.H.** (1988):  
A dominant selectable marker for the construction of recombinant poxviruses.  
*Gene* 65, 315-324.
- Briese, T., de la Torre, J.C., Lewis, A., Ludwig, H., Lipkin, W.I.** (1992):  
Borna disease virus, a negative-strand RNA virus, transcribes in the nucleus of infected cells.  
*Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 89, 11486-11489.

- Briese, T., Hornig, M., Lipkin, W.I.**, (1999):  
Bornavirus immunopathogenesis in rodents: models for human neurological diseases.  
*J.Neurovirol.* 5, 604-612.
- Briese, T., Lipkin, W.I., de la Torre, J.C.** (1995) :  
Molecular biology of Borna disease virus.  
*Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 1190, 1-16.
- Briese, T., Schneemann, A., Lewis, A.J., Park, Y.S., Kim, S., Ludwig, H., Lipkin, W.I.** (1994):  
Genomic organization of Borna disease virus.  
*PNAS*, 91, 4362-4366.
- Broyles, S.S.** (2003) :  
Vaccinia virus transcription.  
*J.Gen.Virol.* 84, 2293-2303.
- Brunner, K.T., Mael, J., Cerottini, J.C., Chapuis, B.** (1968) :  
Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs.  
*Immunology* 14,181-196.
- Buddle, B. M., Pulford, H. D.** (1984):  
Effects of passively acquired antibodies and vaccination on the immune response to contagious ecthyma virus.  
*Vet. Microbiol.* 9 515-522.
- Buddle, B. M., Pulford, H. D.** (1984):  
Effects of passively acquired antibodies and vaccination on the immune response to contagious ecthyma virus.  
*Vet. Microbiol.* 9, 515-522.
- Buddle, B.B., Dellers, R.W., Schurig, G.G.** (1984):  
Contagious ecthyma virus-vaccination failures.  
*Am. J. Vet. Res.* 45, 263-266.
- Buller, R.M., Palumbo, G.J.** (1991):  
Poxvirus pathogenesis.  
*Microbiol. Rev.* 55, 80-122.
- Buller, R.M., Smith, G.L., Cremer, K., Notkins, A.L., Moss, B.** (1985):  
Decreased virulence of recombinant vaccinia virus expression vectors is associated with thymidine kinase-negative phenotype.  
*Nature* 317, 813-815.
- Buller, R.M.L., Chakrabarti, S., Cooper, J.A., Twardzik, D.R., Moss, B.** (1988a):  
Deletion of the vaccinia virus growth factor gene reduces virus virulence.  
*J.Virol.* 62, 866-874.
- Buller, R.M.L., Chakrabarti, S., Moss, B. Fredrickson T.** (1988b):  
Cell proliferative response to vaccinia virus is mediated by VGF.  
*Virology* 164, 182-192.
- Bunce, C., Bell, E.B.** (1997):  
CD45RC isoforms define two isotypes of CD4 memory T cells, one of which depends on persisting antigen.  
*J.Exp.Med.* 185, 767-776.
- Büttner, M.** (1993):  
Principles of paramunization. Option and limits in veterinary medicine.  
*Comp.Immunol.Microbiol.Infect.Dis.* 16, 1-10.
- Büttner, M., Czerny, C.P., Lehner, K.H., Wertz, K.** (1995):  
Interferon induction in peripheral blood mononuclear leukocytes of man and farm animals by poxvirus vector candidates and some poxvirus constructs.  
*Vet. Immunol. Immunopathol.* 46, 237-250.

- Büttner, M., Rziha, H.-J.** (2002):  
Parapoxviruses: from the lesion to the viral genome.  
*J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health.* 49, 7-16.
- Carbone, K.M., B.D. Trapp, J.W. Griffin, C.S. Duchala, and O. Narayan** (1989):  
Astrocytes and Schwann cells are virus-host cells in the nervous system of rats with Borna disease.  
*J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 48:631-644.
- Carbone, K.M., C.S. Duchala, J.W. Griffin, A.L. Kincaid, and O. Narayan** (1987):  
Pathogenesis of Borna disease in rats: evidence that intra-axonal spread is the major route for virus dissemination and the determinant for disease incubation.  
*J. Virol.* 61:3431-3440.
- Carbone, K.M., T.R. Moench, W.I. Lipkin** (1991):  
Borna disease virus replicates in astrocytes, Schwann cells and ependymal cells in persistently infected rats: location of viral genomic and messenger RNAs by in situ hybridization.  
*J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 50:205-214.
- Carson, C.A., Kerr, K.M., Grumbles, L.C.** (1968):  
Bovine papular stomatitis: experimental transmission from man.  
*J. Am. Vet. Med. Assoc.* 29, 1783-1790.
- Cassetti, M.C., Merchinsky, M., Wolffe, E.J., Weisberg, A.S., Moss, B.** (1998):  
DNA packaging mutant: repression of the vaccinia virus A32 gene results in noninfectious, DNA-deficient, spherical, enveloped particles.  
*J. Virol.* 72, 5769-5780.
- Castrucci, G., Frigeri, F., Osburn, B.I., Ferrari, M., Barreca, F., Salvatori, D.** (1998):  
Further investigations on the efficacy of a non-specific defense inducer evaluated in calves exposed to infectious bovine rhinotracheitis virus.  
*Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 21, 155-163.
- Chakrabarti, S., Brechling, K., Moss, B.** (1985):  
Vaccinia virus expression vector: coexpression of  $\beta$ -galactosidase provides visual screening of recombinant virus plaques.  
*Mol. Cell Biol.* 5, 3403-3409
- Chang, H.W., Watson, J.C., Jacobs, B.L.** (1992):  
The E3L gene of vaccinia virus encodes an inhibitor of the interferon-induced, double-stranded RNA-dependent protein kinase.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 4825-4829.
- Chen, C.H., Chiu, Y.L., Shaw, C.K., Tsai, M.T., Hwang, A.L., Hsiao, K.J.** (1999):  
Detection of Borna disease virus RNA from peripheral blood cells in schizophrenic patients and mental health workers.  
*Mol. Psychiatry* 4, 566-571.
- Compans, R.W., Melsen, L.R., de la Torre, J.C.** (1994):  
Virus-like particles in MDCK-cells persistently infected with Borna disease virus.  
*Virus Res.* 33, 261-268.
- Condit, R.C., Niles, E.G.** (2002):  
Regulation of viral elongation and termination during vaccinia virus infection.  
*Biochimica et Biophysica Acta* 1577, 325-336.
- Cooper, J.A., Wittek, R., Moss, B.** (1981):  
Extension of the transcriptional and translational map of the left end of the vaccinia virus genome to 21 kilobase pairs.  
*J. Virol.* 39, 733-745.



- Cottone, R., Büttner, M., Bauer, B., Henkel, M., Hettich, E., Rziha, H.-J.** (1998):  
Analysis of genomic rearrangement and subsequent gene deletion of the attenuated Orf virus strain D1701.  
*Virus Res.* 56, 53-67.
- Cottone, R., Büttner, M., McInnes, C.J., Wood, A.R., Rziha, H.J.** (2002):  
Orf virus encodes a functional dUTPase gene.  
*J. Gen. Virol.* 83, 1043-1048.
- Cox, W.I., Tartaglia, J., Aletti, E.** (1992):  
Poxvirus recombinants as live vaccines.  
In M.M. Binns and G.L. Smith (ed.) *Recombinant Poxviruses*, p.132-162. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Crotty, S., Kersh, E.N., Cannons, J., Schwartzberg, P.L., Ahmed, R.** (2003):  
SAP is required for generating long-term humoral immunity.  
*Nature* 421, 282-287.
- Cubitt, B., de la Torre, J.C.** (1994a) :  
Borna disease virus (BDV), a nonsegmented RNA virus, replicates in the nuclei of infected cells where infectious BDV ribonucleoproteins are present.  
*J.Virol.* 68, 1371-1381.
- Cubitt, B., Oldstone, C., de la Torre, J.C.** (1994b):  
Sequence and genome organization of Borna disease virus.  
*J.Virol.* 68, 1382-1396.
- Cumberbatch, M., Kimber, I.** (1992):  
Dermal tumor necrosis factor-alpha induces dendritic cell migration to draining lymph nodes, and possibly provides one stimulus for Langerhans' cell migration.  
*Immunology* 75, 257-263.
- Czerny, C.-P., Waldmann, R., Scheubeck, T.** (1997):  
Identification of three distinct antigenic sites in parapoxviruses.  
*Arch.Virol.* 142, 807-821.
- Czygan, M., Hallensleben, W., Hofer, M., Pollak, S., Sauder, C., Bilzer, T., Blumcke, I., Riederer, P., Bogerts, B., Falkai, P., Schwarz, M.J., Masliah, E., Staeheli, P., Hufert, F.T., Lieb, K.** (1999):  
Borna disease virus in human brains with a rare form of hippocampal degeneration but not in brains of patients with commonneurosynaptic disorders.  
*J.Infect.Dis.* 180, 1695-1699.
- Darbyshire, J.H.** (1961):  
A fatal ulcerative mucosal condition of sheep associated with the virus of contagious pustular dermatitis. *British Vet.J.* 117, 97-105.
- Davies, M.V., Chang, H.W., Jacobs, B.L., Kaufman, R.J.** (1993):  
The E3L and K3L vaccinia virus gene products stimulate translation through inhibition of the double-stranded RNA-dependent protein kinase by different mechanisms.  
*J.Virol.* 67, 1688-1692.
- Davies, M.V., Elroy-Stein, O., Jagus, R., Moss, B., Kaufman, R.J.** (1992):  
The vaccinia virus K3L gene product potentiates translation by inhibiting double-stranded-RNA-activated protein kinase and phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2.  
*J.Virol.* 66, 1943-1950.
- Davison, A.J., Moss, B.** (1989):  
Structure of vaccinia virus early promoters.  
*J.Mol.Biol.* 210, 749-769.
- De Carlos, A., Paez, E.** (1991):  
Isolation and characterization of mutants of vaccinia virus with a modified 94-kDa inclusion protein.  
*Virology* 185, 768-778.

**de la Torre, J.C.** (1994):

Molecular biology of borna disease virus: prototype of a new group of animal viruses.  
*J.Virol.* 68, 7669-7675.

**de la Torre, J.C.** (2006):

Reverse-genetic approaches to the study of Borna disease virus.  
*Nat.Rev.Microbiol.* 4, 777-783.

**de Lange, A.M., Reddy, M., Scraba, D., Upton, C., McFadden, G.** (1986):

Replication and resolution of cloned poxvirus telomeres in vivo generates linear minichromosomes with intact viral hairpin termini.  
*J.Virol.* 59, 249-259.

**Deane, D., McInnes, C.J., Percival, A., Wood, A., Thomson, J., Lear, A., Gilray, J., Mercer, A.A. Haid, D.** (2000):

Orf virus encodes a novel secreted protein inhibitor of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-2.  
*J.Virol.* 74, 1313-1320.

**del Mar Lorenzo, M., Herrera, E., Blasco, R., Isaacs, S.N.** (1998):

Functional analysis of vaccinia virus B5R protein: role of the cytoplasmatic tail.  
*Virology* 252, 450-457.

**Delhon, G., Tulman, E.R., Afonso, C.L., Lu, Z., de la Concha-Bermejillo, A., Lehmkuhl, H.D., Piccone, M.E., Kutish, G.F., Rock, D.L.** (2004):

Genomes of parapoxviruses ORF virus and bovine papular stomatitis virus.  
*J.Virol.* 78, 168-177.

**Deschl, U., L. Stitz, S. Herzog, K. Frese, and Rott** (1990):

Determination of immune cells and expression of major histocompatibility complex class II antigen in encephalitic lesions of experimental Borna disease.  
*Acta Neuropathol. (Berlin)* 81:41-50.

**Dhurandhar, N.V.** (2004):

Contribution of pathogens in human obesity.  
*Drug News Perspect.* 17, 307-313.

**Dietzschold, B., Morimoto, K., Hooper, D.C.** (2001):

Mechanisms of virus-induced neuronal damage and the clearance of viruses from the CNS.  
*Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 253, 145-155.

**Dittrich, W., Bode, L., Ludwig, H., Kao, M., Schneider, K.** (1989):

Learning deficiencies in Borna disease virus-infected but clinically healthy rats.  
*Biol.Psychiatry* 26, 818-828.

**Dorries, R.** (2001):

The role of T-cell-mediated mechanisms in virus infections of the nervous system.  
*Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 253, 219-245.

**Drillien, R., Koehren, F., Kirn, A.** (1981):

Host range deletion mutant of vaccinia virus defective in human cells.  
*Virology* 111, 488-499.

**Dumbell, K.R., Archard, L.C.** (1980):

Comparison of white pox (h) mutants of monkeypoxvirus with parental monkeypox and variola-like viruses isolated from animals.  
*Nature* 286, 29-32.

- Dustin, M.L., Singer, K.H., Tuck, D.T., Springer, T.A. (1988):**  
Adhesion of T lymphoblasts to epidermal keratinocytes is regulated by interferon gamma and is mediated by intracellular adhesion molecule 1 (ICAM-1).  
*J.Exp.Med.* 167, 1323-1340.
- El-Awar, F., El-Zein, A. (1986):**  
Characterization of a sheep pox virus attenuated in cell culture.  
*Zentralbl Veterinarmed B* 33, 601-608.
- Elford, W.J., Galloway, I.A. (1933):**  
Filtration of the virus of Borna disease through graded collodion membranes.  
*Brit.J.Exp.Path.* 14, 196-205.
- El-Zein, A., Nehme, S., Singh, K.V. (1983):**  
Preparation and testing of a goat pox vaccine from a pathogenic field isolate attenuated in cell culture.  
*Zentralbl Veterinarmed B* 30, 341-348.
- Endo, A., Itamura, S., Inuma, H., Funahashi, S., Shida, H., Koide, F., Nerome, K., Oya, A. (1991):**  
Homotypic and heterotypic protection against influenza virus infection in mice by recombinant vaccinia virus expressing the haemagglutinin or nucleoprotein of influenza virus.  
*J.Gen.Virol.* 72, 699-703.
- Esposito, J.J., Cabradilla, C.D., Nakano, J.H. (1981):**  
Intragenomic sequence transposition in monkeypox virus.  
*Virology* 109, 231-243.
- Esposito, J.J., Knight, J.C., Shaddock, J.H., Novembre, F.J., Bauer, G.M. (1988):**  
Successful oral rabies vaccination of rancoons with rancoon poxvirus recombinants expressing rabies virus glycoprotein.  
*Virology* 165, 313-316.
- Esposito, J.J., Obijeski, J.F., Nakano, J.H. (1978):**  
Orthopoxvirus DNA: strain differentiation by electrophoresis of restriction endonuclease fragmented virion DNA.  
*Virology* 89, 53-66.
- Fachinger, V., Schlapp, T., Saalmüller, A. (2000):**  
Evidence for a parapox ovis virus-associated superantigen.  
*Eur.J.Immunol.* 30, 2962-2971.
- Falkner, F.G., Moss, B. (1988):**  
Escherichia coli gpt gene provides dominant selection for vaccinia virus open reading frame expression vectors.  
*J.Virol.* 64, 3108-3111.
- Falkner, F.G., Moss, B. (1990):**  
Transient dominant selection of recombinant vaccinia viruses.  
*J.Virol.* 64, 3108-3111.
- Farner, N.L., Hank, J.A., Sondel, P.M. (1997):**  
Interleukin-2: molecular and clinical aspects, p. 29-42.  
*In* D.G. Remick and J.S. Friedland (ed.), *Cytokines in health and disease*, 2<sup>nd</sup> ed. Marcel Dekker, Ann Arbor, Mich.
- Felgner, J.H., Kumar, R., Sridhar, C.N., Wheeler, C.J., Tsai, Y.J., Border, R., Ramsey, P., Martin, M., Felgner, P.L. (1994):**  
Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations.  
*J.Biol.Chem.* 269, 2550-2561.
- Ferrara, N., Davis-Smyth, T. (1997):**  
The biology of vascular endothelial growth factor.  
*Endocr.Rev.* 18, 4-25.

- Fingar, D.C., Salama, S., Tsou, C., Harlow, E., Blenis, J.** (2002):  
Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E.  
*Genes Dev.* 16, 1472-1487.
- Fischer, L., Le Gros, F.X., Mason, P.W., Paoletti, E.** (1997):  
A recombinant canarypox virus protects rabbits against a lethal rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) challenge.  
*Vaccine* 15, 90-96.
- Fischer, T.** (2002):  
Parapockenvirus (PPV) als neuartige Vektorvaccine: Entwicklung Pseudorabiesvirus (PRV)-spezifischer PPV-Rekombinanten und Untersuchung deren Immunogenität im Mausmodell.  
Dissertation, durchgeführt an der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen.
- Fischer, T., Planz, O., Stitz, L., Rziha, H.-J.** (2003):  
Novel recombinant parapoxvirus vectors induce protective humoral and cellular immunity against lethal herpesvirus challenge infection in mice.  
*J. Virol.* 77, 9312-9323.
- Fleming, S.B., Blok, J., Fraser, K.M., Mercer, A.A., Robinson, A.J.** (1993):  
Conservation of gene structure and arrangement between vaccinia virus and orf-virus.  
*Virology* 195, 175-184.
- Fleming, S.B., Fraser, K.M., Mercer, A.A., Robinson, A.J.** (1991):  
Vaccinia virus-like transcriptional control sequences flank an early gene in orf-virus.  
*Gene* 97, 207-212.
- Fleming, S.B., Haig, D.M., Nettleton, P., Reid, H.W., McCaughan, C.A., Wise, L.M., Mercer, A.** (2000):  
Sequence and functional analysis of a homolog of interleukin-10 encoded by the parapoxvirus orf virus.  
*Virus Genes* 21, 85-95.
- Fleming, S.B., Lyttle, D.J., Sullivan, J.T., Mercer, A.A., Robinson, A.J.** (1995):  
Genomic analysis of a transposition-deletion variant of orf virus reveals a 3.3kbp region of non-essential DNA.  
*J. Gen. Virol.* 76, 2969-2978.
- Fleming, S.B., McCaughan, C.A., Andrews, A.E., Nash, A.D., Mercer, A.A.** (1997):  
A homolog of interleukin-10 is encoded by the poxvirus orf virus.  
*J. Virol.* 4857-4861.
- Fleming, S.B., Mercer, A.A., Fraser, K.M., Lyttle, D.J., Robinson, A.J.** (1992):  
In vivo recognition of orf virus early transcriptional promoters in a vaccinia virus recombinant.  
*Virology* 187, 464-471.
- Flexner, C., Moss, B.** (1996)  
*In: Vaccinia Virus as a live vector for expression of immunogens.*  
Woodrow, G.C., Levine, M.M. (Eds.). Dekker, New York.
- Fraser, K.M., Hill, D.F., Mercer, A.A., Robinson, A.J.** (1990):  
Sequence analysis of the inverted terminal repetition in the genome of the parapox, orf virus.  
*Virology* 176, 379-389.
- Friedman-Kein, A.E., Rowe, W.P., Banfield, W.G.** (1963):  
Milker's nodules: isolation of a poxvirus from a human case.  
*Science* 140, 1335-1336.
- Fries, L.F., Tartaglia, J., Taylor, J., Kauffmann, E.K., Meignier, B., Paoletti, E., Plotkin, S.** (1996):  
Human safety and immunogenicity of a canarypox-rabies glycoprotein recombinant vaccine: an alternative poxvirus vector system.  
*Vaccine* 14, 428-434.

- Furrer, E., Bilzer, T., Stitz, L., Planz, O. (2001):**  
Neutralizing antibodies in persistent Borna disease virus infection: Prophylactic effect of gp94-specific monoclonal antibodies in preventing encephalitis.  
J.Virol. 75; 8884-8892.
- Furrer, E., Bilzer, T., Stitz, L., Planz, O., (2001):**  
Neutralizing antibodies in persistent Borna disease virus infection: Prophylactic effect of gp94-specific monoclonal antibodies in preventing encephalitis.  
J.Virol. 75, 943-951.
- Furrer, E., Bilzer, T., Stitz, L., Planz, O., (2001):**  
High-dose Borna disease virus infection induces a nucleoprotein-specific cytotoxic T-lymphocyte response and prevention of immunopathology.  
J.Virol. 75, 11700-11708.
- Gangemi, J.D., Sharp, D.G. (1976):**  
Use of a restriction endonuclease in analysing the genomes from two different strains of vaccinia virus.  
J.Virol. 20, 319-323.
- Garcia, M.A., Guerra, S., Gil, J., Esteban, M. (2002):**  
Anti-apoptotic and oncogenic properties of the dsRNA-binding protein of vaccinia virus, E3L.  
Oncogene 21, 8379-8387.
- Gardiner, M.R., Craig, J., Nairn, M.E. (1967):**  
An unusual outbreak of contagious ecthyma (scabby mouth) in sheep.  
Aust.Vet.J. 43, 163-165.
- Gassmann, U., Wyler, R., Wittek, R. (1985):**  
Analysis of parapoxvirus genomes.  
Arch.Virol. 83, 17-31.
- Gillet, G., Brun, G. (1996):**  
Viral inhibition of apoptosis.  
Trends Microbiol. 4, 312-317.
- Golini, F., Kates, J.R. (1985):**  
A soluble transcription system derived from purified vaccinia virions.  
Virology 53, 205-213.
- Gonzales-Dunia, D., Cubitt, B., Grässer, F.A., de la Torre, J.C. (1997a):**  
Characterization of Borna disease virus p56 protein, a surface glycoprotein involved in virus entry.  
J.Virol. 71, 3208-3218.
- Gonzales-Dunia, D., Sauder, C., de la Torre, J.C. (1997b):**  
Borna disease virus and the brain.  
Brain Res. 44, 647-664.
- Gonzales-Dunia, D., Watanabe, M., Syan, S., Mallory, M., Masliah, E., De la Torre, J.C (2000):**  
Synaptic pathology in Borna disease virus persistent infections.  
J.Virol. 74, 3441-3448.
- Gosztonyi, G., Ludwig H. (2001):**  
Interactions of viral proteins with neurotransmitter receptors may protect or destroy neurons.  
Curr.Top.Microbiol.Immunol. 253, 121-144.
- Grabner, A., Fischer, A. (1991):**  
Symptomatology and diagnosis of Borna encephalitis of horses. A case analysis of the last 13 years.  
Tierärztl.Prax 19, 68-73.

- Granucci, F., Andrews, D.M., Degli-Esposito, M.A., Ricciardi-Castagnoli, P.** (2002):  
IL-2 mediates adjuvant effect of dendritic cells.  
*Trends Immunol.* 23, 169-171.
- Griffin, D., Levine, B., Tyor, W., Ubol, S., Despres, P.** (1997):  
The role of antibody in recovery from alphavirus encephalitis.  
*Immunol.Rev.* 159, 155-161.
- Guidotti, L.G., Chiari, F.V.** (2001):  
Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response.  
*Annu.Rev.Immunol.* 19, 65-91.
- Gumbrell, R.C., McGregor, D.A.** (1997):  
Outbreak of severe fatal orf in lambs.  
*Vet.Rec.* 141, 150-151.
- Gurvich, E.B.** (1992):  
The age-dependent risk of postvaccination complications in vaccines with smallpox vaccine.  
*Vaccine* 10, 96-97.
- Haas, B., Becht, H., Rott, R.** (1986):  
Purification and properties of an intranuclear virus-specific antigen from tissue infected with Borna disease virus.  
*J.Gen.Virol.* 67, 235-241.
- Hagiwara, K., Kamitani, W., Takamura, S., Taniyama, H., Nakaya, T., Tanaka, H., Kirisawa, R., Iwai, H., Ikuta, K.** (2000):  
Detection of Borna disease virus in a pregnant mare and her fetus.  
*Vet.Microbiol.* 72, 207-216.
- Hahn, J., Park, S., Song, J., An, S., Ahn, B.** (2001):  
Construction of recombinant swinepox viruses and expression of the classical swine fever virus E2 protein.  
*J.Virol.Methods* 93, 49-56.
- Haig, D. M., McInnes, C.J., Wood, P.R. Seow, H.-F.** (1994):  
The cytokines: origin, structure and function. *In: Gooddeeris, B.M., Morrison, W.I. (Eds). Cell mediated immunity in ruminants.* CRC Press, Boca Raton, Florida. P. 75-92.
- Haig, D., Deane, D., Percival, A., Myartt, N., Thomson, J., Inglis, L., Rothel, J., Seow, H.-F., Wood, P., Miller, H.R.P., Reid, H.W.** (1996a):  
The cytokine response of afferent lymph following orf virus reinfection of sheep.  
*Vet.Dermatol.* 7, 11-20.
- Haig, D., Hutchison, G., Thomson, J., Yirrel, D., Reid, H.W.** (1996b):  
Cytolytic activity and associated serine protease expression by skin and afferent lymph CD8 + T cells during orf virus reinfection.  
*J.Gen.Virol.* 77, 953-961.
- Haig, D.M.** (1998):  
Orf.  
*Vet.Res.* 29,311-326.
- Haig, D.M.** (2006):  
Orf virus infection and host immunity.  
*Curr.Oppin. Infect. Dis.* 19, 127-131.
- Haig, D.M., Entican, G., Yirrell, D.L., Deane, D., Miller, H.R.P., Norval, M., Reid, H.W.** (1992):  
Differential appearance of interferon- and colony stimulating activity in afferent versus efferent lymph following orf virus infection of sheep.  
*Vet.Dermatol.* 3, 221-229.

- Haig, D.M., Mc Innes, C.J., Deane, D., Reid, W.H., Mercer, A.A.** (1997):  
The immune and inflammatory response to orf virus.  
*Comp.Immunol.Microbiol.Infect.Dis.* 20, 197-204.
- Haig, D.M., McInnes, C.J., Thomson, J., Wood, A., Bunyan, K., Mercer, A.A.** (1998):  
The orf virus OV20.0L gene product is involved in interferon resistance and inhibits an interferon-inducible, double-stranded RNA dependent kinase.  
*Immunology* 93, 335-340.
- Haig, D.M., Mercer, A.A.**, (1998):  
Ovine diseases. Orf.  
*Vet.Res.* 29, 311-326.
- Haig, D.M., Thomson, J., McInnes, C.J., Deane, D.L., Anderson, I.E., McCaughan, C.A., Imlach, W., Mercer, A.A., Fleming, S.B.** (2002):  
A comparison of the anti-inflammatory and immuno-stimulatory activities of the orf virus and ovine interleukin-10.  
*Virus Res.* 90, 303-316.
- Hallensleben, W., Schwemmle, M., Hausmann, J., Stitz, L., Volk, B., Pagenstecher, A., Staehli, P.** (1998):  
Borna disease virus-induced neurological disorder in mice: Infection of neonates results in immunopathology.  
*J.Virol.* 72; 4379-4386.
- Hammert, J., Wolf, G., Berner, H.** (1995):  
Klinische Untersuchungen zur Wirkung des Paramunitätsinducers Baypamuv als Prophylaxe beim MMA-Komplex der Sau.  
*Tierärztliche Umschau* 50, 383-386.
- Hanke, T., Blanchard T.J., Schneider, J., Hannan, C.M., Becker, M., Gilbert, S.C., Hill, A.V., Smith, G.L., McMichael, A.** (1998):  
Enhancement of MHC class I-restricted peptide-specific T cell induction by a DNA prime/MVA boost vaccination regime.  
*Vaccine* 16, 439-445.
- Hargreaves, M., Bell, E.B.** (1997):  
Identical expression of CD45R isoforms by CD45RC+ 'revertant' memory and CD45RC+ naïve CD4 T cells.  
*Immunology* 91, 323-330.
- Hartmann, K., Block, A., Ferck, G., Beer, B., Vollmar, A., Lutz, H.** (1999):  
Treatment of feline leukemia virus (FeLV) infection.  
*Vet.Microbiol.* 69, 111-113.
- Hashimoto, Y., Chen,H.S., Cunningham, C., Malik, T.H., Lai, P.K.** (2003):  
Two major histocompatibility cclass I-restricted epitopes of the Borna disease virus p10 protein identified by cytolytic T lymphocytes induced by DNA-based immunization.  
*J.Virol.* 77, 6076-6081.
- Hatalski, C.G., Hickey, W.F., Lipkin, W.I.** (1998a):  
Humoral immunity in the central nervous system of Lewis rats infected with Borna disease virus.  
*J.Neuroimmunol.* 90, 128-136.
- Hatalski, C.G., Hickey, W.F., Lipkin, W.I.** (1998b):  
Evolution of the immune response in the central nervous system following infection with Borna disease virus.  
*J.Neuroimmunol.* 90, 137-142.
- Hatalski, C.G., Kliche, S., Stitz, L., Lipkin, W.I.** (1995):  
Neutralizing antibodies in Borna disease virus-infected rats.  
*J.Virol.* 69; 741-747.

- Hausmann, J., Baur, K., Engelhardt, K.R., Fischer, T., Rziha, H.-J., Staeheli, P.** (2005):  
Vaccine-induced protection against Borna disease in wild-type and perforin-deficient mice.  
*J.Gen.Virol.* 86, 399–403.
- Hausmann, J., Pagenstecher, A., Baur K., Richter, K., Rziha, H.-J., Staeheli, P.** (2005):  
CD8 T cells require gamma interferon to clear Borna disease virus from the brain and prevent immune system-mediated neuronal damage.  
*J.Virol.* 79, 13509–13518.
- Heinig, A.** (1969):  
Die Bornasche Krankheit der Pferde und Schafe.  
Handbuch der Viruserkrankungen bei Tieren. (Herausgeber: H. Röhrer), VEB Fischer Verlag, Jena; 4, 83-148.
- Henderson, S., Huen, D., Rowe, M., Dawson, C., Johnson, G., Rickinson, A.** (1993):  
Epstein-Barr virus-coded BHRF1 protein, a viral homologue of Bcl-2, protects human B cells from programmed cell death.  
*Proc.Natl.Acad.Sci. USA.* 90, 8479-8483.
- Henderson, S., Rowe, M., Gregory, C., Croom-Carter, D., Wang, F., Longnecker, R., Kieff, E., Rickinson, A.** (1991):  
Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death.  
*Cell* 65, 1107-1115.
- Henkel, M.** (1997):  
Parapockenvirus Orf D1701: Versuche zur Herstellung einer VEGF-negativen Mutante.  
Diplomarbeit, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- Henkel, M., Planz, O., Fischer, T., Stitz, L., Rziha, H.-J.** (2005):  
Prevention of virus persistence and protection against immunopathology after Borna disease virus infection of the brain by a novel Orf virus recombinant.  
*J.Virol.* 314–325.
- Herden, C., Herzog, S., Richt, J.A., Nessler, A., Christ, M., Failing, K., Frese, K.** (2000):  
Distribution of Borna disease virus in the brain of rats infected with an obesity-inducing virus strain.  
*Brain Pathol.* 10, 39-48.
- Herden, C., Schluesener, H.J., Richt, J.A.** (2005):  
Expression of allograft inflammatory factor-1 and haeme oxygenase-1 in brains of rats infected with the neurotropic Borna disease virus.  
*Neuropathol. App. Neurobiol.* 31, 512–521.
- Herzog, S. Rott, R.** (1980):  
Replication of Borna disease virus in cell cultures.  
*Med.Microbiol.Immunol.* 168, 153-158.
- Herzog, S., C. Kompter, K. Frese, and R. Rott** (1984):  
Replication of Borna disease virus in rats: age-dependent differences in tissue distribution.  
*Med.Micriobiol.Immunol. (Berlin)* 173:171-177.
- Herzog, S., Kompter, C., Frese, K., Rott, R.** (1984):  
Replication of Borna disease virus in rats: age-dependent differences in tissue distribution.  
*Med.Microbiol.Immunol.* 173, 171-177.
- Hilbe, M. Herrsche, R., Kolodziejek, J., Nowotny, N., Zlinszky, K., Ehrensperger, F.** (2006):  
Shrews as reservoir hosts for borna disease virus.  
*Emerg.Infect.Dis.* 12, 675-677.
- Hirano, N., Kao, M., Ludwig, H.** (1983):  
Persistent, tolerant or subacute infection in Borna disease virus-infected rats.  
*J.Gen.Virol.* 64, 1521-1530.



**Holzer, G.W., Remp, G., Antoine, G., Pfeleiderer, M., Enzersberger, O.M., Emsenhuber, W., Hammerle, T., Gruber, F., Urban, C., Falkner, F.G., Forner, F. (1999):**  
Highly efficient induction of protective immunity by a vaccinia virus vector defective in late gene expression.  
*J.Virol.* 73, 4536-4542.

**Hornig, M., Briese T., Lipkin, W.I. (2003):**  
Borna disease virus.  
*J.Neurovirol.* 9, 259-273.

**Hornig, M., Solbrig, M., Horscroft, N., Weissenbock, H., Lipkin, W.I. (2001):**  
Borna disease virus infection of adult and neonatal rats: models for neuropsychiatric disease.  
*Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 253, 157-177.

**Hornig, M., Weissenbock, H., Horscroft, N., Lipkin, W.I. (1999):**  
An infection-based model of neurodevelopmental damage.  
*PNAS* 96, 12102-12107.

**Housawi, F.M.T., Roberts, G.M., Gilray, J.A., Pow, I., Reid, H.W., Nettleton, P.F., Sumption, K.J., Hibma, M.H., Mercer, A.A. (1998):**  
The reactivity of monoclonal antibodies against orf virus with other parapoxviruses and the identification of a 39 kDa immunodominant protein.  
*Arch.Virol.* 143, 2289-2303.

**Howard, S.T., Ray, C.A., Patel, D.D., Antczak, J.B., Pickup, D.J. (1999) :**  
A 43-nucleotide RNA cis-acting element governs the site-specific formation of the 3' end of a poxvirus late mRNA.  
*Virology* 255, 190-204.

**Hsiao, J.C., Chung, C.S., Chang, W. (1998):**  
Cell surface proteoglycans are necessary for A27L protein-mediated cell fusion: identification of the N-terminal region of A27L protein as the glycosaminoglycan-binding domain.  
*J.Virol.* 72, 8374-8379.

**Hsu, T.A., Carbone, K.M., Rubin, S.A., Vonderfecht, S.L., Eiden, J.J. (1994):**  
Borna disease virus p24 and p38/40 synthesized in a baculovirus expression system: virus protein interactions in insect and mammalian cells.  
*Virology* 204, 854-859.

**Hu, L., Esposito, J.J., Scott, F.W. (1996):**  
Raccoon poxvirus feline panleukopenia virus VP2 recombinant protects cats against FPV challenge.  
*Virology* 218, 248-252.

**Hu, Y., Lee, J., McCart, J.A., Xu, H., Moss, B., Alexander, H.R., Bartlett, D.L. (2001):**  
Yaba-like disease virus: An alternative replicating poxvirus vector for cancer gene therapy.  
*J.Virol.* 75, 10300-10308.

**Hussain, K.A., Burger, D. (1989):**  
In vivo and in vitro characteristics of contagious ecthyma virus isolates: host response mechanisms. *Vet. Microbiol.* 19: 23-26.

**Ichihashi, Y. (1996):**  
Extracellular enveloped vaccinia virus escapes neutralization.  
*Virology* 217, 478-485.

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

- Inoshima, Y., Murakami, K., Yokoyama, T., Sentsui, H.** (2001):  
Genetic heterogeneity among parapoxviruses isolated from sheep, cattle and Japanese serows (*Capricornis crispus*).  
*J.Gen.Virol.* 82, 1215-1220.
- Jacobs B.L., Langland, J.O.** (1996):  
When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular response to double-stranded RNA.  
*Virology* 219, 339-349.
- Jenkinson, D., Mc Ewan, P.E., Hutchison, G., Reid, H.W.** (1992):  
The B and T cell responses to orf virus infection.  
*Vet.Dermatol.* 2, 57-64.
- Jenkinson, D., McEwan, P.E., Moss, V.A., Elder, H.Y., Reid, H.W.** (1990):  
Location and spread of orf virus antigen in infected ovine skin.  
*Vet. Dermatol.* 1: 189-195.
- Johnson, G.P., Goebel, S.J., Paoletti, E.** (1993):  
An update on the vaccinia virus genome.  
*Virology* 196, 381-401.
- Johnston, J.B., McFadden, G.** (2003):  
Poxvirus immunomodulatory strategies: current perspectives.  
*J.Virol.* 77, 6093-6100.
- Jöns, A., Mettenleiter, T.C.** (1996):  
The UL49,5 gene of pseudorabies virus codes for an O-glycosylated structural protein of the viral envelope.  
*J.Virol.* 70, 1237-1241.
- Jordan, I., Lipkin, W.I.** (2001):  
Borna disease virus.  
*Rev.Med.Virol.* 11, 37-57.
- Kao, M., Gosztonyi, G., Ludwig, H.** (1983):  
Obesity syndrome in Borna disease virus infected rats.  
*Zbl.Bakt.Mikrobiol.Hygiene A*, 225, 173.
- Kao, M., Hamir, A.N., Rupprecht, C.E., Fu, Z.F., Shankar, V., Koprowski, H., Dietzschold, B.** (1993):  
Detection of antibodies against Borna disease virus in sera and cerebrospinal fluid of horses in the USA.  
*Vet.Rec.* 132, 241-244.
- Kao, M., Ludwig, H., Gosztonyi, G.** (1984):  
Adaption of Borna disease virus to the mouse.  
*J.Gen.Virol.* 65, 1845-1849.
- Kaplan, G., Walsh, G., Guido, L.S., Meyn, P., Burkhardt, R.A., Abalos, R.M., Barker, J., Frindt, P.A., Fajardo, T.T., Celona, R.** (1992):  
Novel responses of human skin to intradermal recombinant granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor: Langerhans cell recruitment, keratinocyte growth, and enhanced wound healing.  
*J.Exp.Med.* 175, 1717-1728.
- Kerr, P.J., Jackson, R.J.** (1995):  
Myxoma virus as a vaccine vector for rabbits: antibody levels to influenza virus haemagglutinin presented by a recombinant myxoma virus.  
*Vaccine* 13, 1722-1726.
- Kibler, K.V., Shors, T., Perkins, K.B., Zeman, C.C., Banaszak, M.P., Biesterfeldt, J., Langland, J.O., Jacobs, B.L.** (1997):  
Double-stranded RNA is a trigger for apoptosis in vaccinia virus-infected cells.  
*J.Virol.* 71, 1992-2003.

**Kitani, T., Kuratsune, H., Fuke, I., Nakamura, Y., Nakaya, T., Asahi, S., Tobiume, M., Yamaguti, K., Machii, T., Inagi, R., Yamanishi, K., Ikuta, K. (1996):**  
Possible correlation between Borna disease virus infection and Japanese patients with chronic fatigue syndrome.  
*Microbiol.Immunol.* 40, 459-462.

**Klavinskis, L.S., Whitton, J.L., Oldstone, M.B. (1989):**  
Molecularly engineered vaccine which expresses an immunodominant T-cell epitope induces cytotoxic T lymphocytes that confer protection from lethal virus infection.

**Klemperer, N., Lyttle, D.J., Tauzin, D., Traktman, P., Robinson, A.J. (1995):**  
Identification and characterization of the orf virus type I topoisomerase.  
*Virology* 206, 203-215.

**Kliche, S., Briese, T., Henschen, A.H., Stitz, L., Lipkin, W.I., (1994):**  
Characterization of a Borna disease virus glycoprotein, gp18.  
*J.Virol.* 68, 6918-1923.

**Kohno, T., Goto, T., Takasaki, T., Morita, C., Nakaya, T., Ikuta, K., Kurane, L., Sano, K., Nakai, M. (1999):**  
Fine structure and morphogenesis of Borna disease virus.  
*J.Virol.* 73, 760-766.

**Koonin, E.V., Senkevich T.G., Chernos, V.I. (1993):**  
Gene A32 product of vaccinia virus may be an ATPase involved in viral DNA packaging as indicated by sequence comparisons with other putative viral ATPases.  
*Virus Genes* 7, 89-94.

**Kotwal, G.J., Moss, B. (1988):**  
Analysis of a large cluster of nonessential genes deleted from a vaccinia virus terminal transposition mutant.  
*Virology* 167, 524-537.

**Kotwal, G.J., Moss, B. (1989):**  
Vaccinia virus encodes two proteins that are structurally related to members of the plasma serine protease inhibitor superfamily.  
*J.Virol.* 63, 600-606.

**Kreil, T.R., Maier, E., Fraiss, S., Eibl, M.M. (1998):**  
Neutralizing antibodies protect against lethal flavivirus challenge but allow for the development of active humoral immunity to a non-structural virus protein.  
*J.Virol.* 72, 3076-3081.

**Kundig, T.M., Hengartner H., Zinkernagel, R.M. (1993):**  
T cell-dependent IFN-gamma exerts an antiviral effect in the central nervous system but not in peripheral solid organs.  
*J.Immunol.* 150, 2316-2321.

**Kyriakis, S.C., Tzika, E.D., Lyras, D.N., Tsinas, A.C., Saoulidis, K. Sarris, K. (1998):**  
Effect of an inactivated parapoxvirus based immunomodulator (Baypamun) on post weaning diarrhoea syndrome and wasting pig syndrome of piglets.  
*Res.Vet.Sci.* 64, 187-190.

**Lalani, A.S., McFadden, G. (1997)**  
Secreted poxvirus chemokine binding proteins.  
*J.Leukoc.Biol.* 62, 570-576.

**Lane, J.M., Ruben, F.L., Neff, J.M., Millar, J.D. (1969):**  
Complications of smallpox vaccination, 1968.  
*N.Engl.J.Med.* 281, 1201-1208.

- Lard, S.L., Roehrig, J.T., Pearson, L.D.** (1991):  
Differentiation of parapoxviruses by application of orf virus-specific monoclonal antibodies against cell surface proteins.  
*Vet.Immunol.Immunopathol.* 28: 247-258.
- Lateef, Z., Fleming, S., Halliday, G., Faulkner, L., Mercer, A., Baird, M.** (2003):  
Orf virus-encoded interleukin-10 inhibits maturation, antigen presentation and migration of murine dendritic cells.  
*J.Gen.Virol.* 84, 1101-1109.
- Lear, A., Hutchison, G., Reid, H., Norval, M., Haig, D.M.** (1996):  
Phenotypic characterisation of the dendritic cells accumulating in ovine dermis following primary and secondary orf virus infection.  
*Eur.J.Derm.* 6, 135-140.
- Lear, A., Hutchison, G., Reid, H., Norval, M., Haig, D.M.** (1996):  
Phenotypic characterisation of the dendritic cells accumulating in ovine dermis following primary and secondary orf virus infection.  
*Eur.J.Derm.* 6, 135-140.
- Lee, T.G., Tomita, J., Hovanessian, A.G., Katze, M.G.** (1992):  
Characterization and regulation of the 58,000-dalton cellular inhibitor of the interferon-induced, dsRNA-activated protein kinase.  
*J.Biol.Chem.* 267, 14238-14243.
- Letellier, C., Burny, A., Meulemans, G.** (1991):  
Construction of a pigeonpox virus recombinant: expression of the Newcastle disease virus (NDV) fusion glycoprotein and protection of chickens against NDV challenge.  
*Arch.Virol.* 118, 43-56.
- Lewis A.J., Whitton, J.L., Hatalski, C.G., Weissenböck, H., Lipkin, W.I.** (1999):  
Effect of immune priming on Borna disease.  
*J.Virol.* 73; 2541-2546.
- Liang, X., Chow, B., Babiuk, L.A.** (1997):  
Study of immunogenicity and virulence of bovine herpesvirus 1 mutants deficient in the UL49 homolog, UL49.5 homolog and dUTPase genes in cattle.  
*Vaccine* 15, 1057-1064.
- Lichtensteins, D.L., Rushlow, K.E., Cook, R.F., Raabe, M.L., Swardson, C.J., Kociba, G.J., Issel, C.J., Montelaro, R.C.** (1995):  
Replication in vitro and in vivo of an equine infectious anemia virus mutant deficient in dUTPase activity.  
*J.Virol.* 69, 2881-2888.
- Limbach, K.J., Paoletti, E.** (1996):  
Non-replicating expression vectors: applications in vaccine development and gene therapy. *Epidemiol. Infect.* 116, 241-256.
- Liu, T., Chambers T.J.** (2001):  
Yellow fever virus encephalitis: properties of the brain-associated T-cell response during virus clearance in normal and gamma interferon-deficient mice and requirement for CD4<sup>+</sup> lymphocytes.  
*J.Virol.* 75, 2107-2118.
- Lloyd, J. B., Gill, H.S., Haig, D. M., Husband, A. J.** (2000):  
In vivo T-cell subset depletion suggests that CD4 + T-cells and a humoral immune response are important for the elimination of orf virus from the skin of sheep.  
*Vet.Immunol.Immunopathol.* 74, 249-262.
- Ludewig, B., Ehl, S., Karrer, U., Odermatt, B., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M.** (1998):  
Dendritic cells efficiently induce protective antiviral immunity.  
*J.Virol.* 72, 3812-3818.

**Ludwig, H., Becht, H.** (1977):

Borna, the disease – A summary of our present knowledge.

*In*: Slow virus infections of the central nervous system. (Herausgeber: ter Meulen, V. und Katz, M.), Seite 75, Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin.

**Ludwig, H., Bode, L., Gosztonyi, G.** (1988):

Borna disease: a persistent virus infection of the central nervous system.

*Prog. Med. Virol.* 35, 107-151.

**Luger, T.A., Ansel, J.C., Bab, T.** (1988):

Epidermal cytokines in dermatology in five continents.

Orfanos, C.E., Stadler, R., Gollnick, H. Eds. Springer Verlag, Berlin. 665-692.

**Luger, T.A., Kock, A., Kirnbauer, R., Schwarz, T., Ansel, J.C.** (1989):

Keratinocyte derived interleukin-3.

*Annals NY Acad. Sci.* 548, 253-262.

**Lyttle, D.J., Fraser, K.M., Fleming, S.B., Mercer, A.A., Robinson A.J.** (1994):

Homologs of vacular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf virus.

*J. of Virol.* 68, 84-92.

**Mackett, M., Archard, L.C.** (1979):

Conservation and variation in Orthopoxvirus genome structure.

*J. Gen. Virol.* 45, 683-701.

**Mackett, M., Smith, G.L., Moss, B.** (1984):

General Method for production and selection of infectious vaccinia virus recombinants expressing foreign genes.

*J. Virol.* 49, 857-864.

**Mahr, A., Roberts, B.E.** (1984):

Arrangement of late RNAs transcribed from a 7.1-kilobase EcoRI vaccinia virus DNA fragment.

*J. Virol.* 49, 510-520.

**Malik, T.H., Kishi, M., Lai, P.K.** (2000):

Characterization of the P protein-binding domain on the 10-kilo Dalton protein of the Borna disease virus.

*J. Virol.* 74, 3413-3417.

**Malik, T.H., Kobayashi, T., Ghosh, M., Kishi, M., Lai, P.K.** (1999):

Nuclear localization of the proteins from the open reading frame x1 of the Borna disease virus was through interactions with the viral nucleoprotein.

*Virology* 258, 65-72.

**Marques, J.T., Trindade, G.D., Da Fonseca, F.G., Dos Santos, J.R., Bonjardim, C.A., Ferreira, P.C., Kroon, E.G.** (2001):

Characterization of ATI, TK and IFN-alpha/betaR genes in the genome of the BeAn 58058 virus, a naturally attenuated wild orthopoxvirus.

*Virus Genes* 23, 291-301.

**Marsland, B.J., Tisdall, D.J., Heath, D.D., Mercer, A.A.** (2003):

Construction of a recombinant orf virus that expresses an *Echinococcus granulosus* vaccine antigen from a novel genomic insertion site.

*Arch. Virol.* 148, 555-562.

**Mathews, M.B., Shenk, T.** (1991):

Adenovirus virus-associated RNA and translation control.

*J. Virol.* 65, 5657-5662.

- Mayer, D., Fischer, H., Schneider, U., Heimrich, B., Schwemmle, M.** (2005):  
Borna disease virus replication in organotypic hippocampal slice cultures from rats results in selective damage of dentate granule cells.  
*J. Virol.* 79, 11716–11723.
- Mayo, M.A., Pringle, C.R.** (1998):  
Virus taxonomy –1997.  
*J. Gen. Virol.* 79, 649-657.
- Mayr A.** (1967):  
Production of high quality interferons by means of strains of smallpox virus, which had been attenuated in cell culture passages.  
*Zentralbl Bakteriol* 202, 183-190.
- Mayr, A.** (2001):  
Development of non-immunising, paraspecific vaccine from attenuated pox viruses: a new type of vaccine.  
*Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 114, 184-187.
- Mayr, A., Büttner, M.** (1990):  
Milker's node virus, p 29-32. in Z. Dinter und B Morein (ed.), *Virus infections in ruminants*. Elsevier Science Publishers, Amerstam, The Netherlands.
- Mayr, A., Büttner, M.** (1992):  
Paraspezifisches Immunsystem, Paraimmunisierung, Paraimmunität.  
*Vet.* 7, 31-37.
- Mayr, A., Herlyn, M., Mahnel, H., Danco, A., Zach, A., Bostedt, H.** (1981):  
Bekämpfung der ecthyma contagiosum (Pustular dermatitis) der Schafe mit einem neuen Parenteral-Zellkultur-Lebendimpfstoff.  
*Zentralblatt Veterinärmedizin B.* 28, 535-552.
- Mazur, C., Ferreira, I.I., Rangel Filho, F.B., Galler, R.** (2000):  
Molecular characterization of Brazilian isolates of orf virus.  
*Vet. Microbiol.* 73, 253-259.
- McCart, J.A., Ward, J.M., Lee, J., Hu, Y., Alexander, H.R., Libutti, S.K., Moss, B., Bartlett, D.L.** (2001):  
Systemic cancer therapy with a tumor-selective vaccinia virus mutant lacking thymidine kinase and vaccinia growth factor genes.  
*Cancer Res.* 61, 8751-8757.
- McInnes, C.J., Deane, D., Haig, D., Percival, A., Thomson, J., Wood A.R.** (2005):  
Glycosylation, disulfide bond formation, and the presence of a WSXWS-like motif in the orf virus GIF protein are critical for maintaining the integrity of Binding to ovine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-2.  
*J. Virol.* 79, 11205-11213.
- McInnes, C.J., Wood, A.R., Mercer, A.A.** (1998):  
Orf virus encodes a homolog of the vaccinia virus interferon-resistance gene E3L.  
*Virus Genes* 17, 107-115.
- McInnes, C.J., Wood, A.R., Nettleton, P.E., Gilray, J.A.** (2001):  
Genomic comparison of an avirulent strain of Orf virus with that of a virulent wild type isolate reveals that the Orf virus G2L gene is non-essential for replication.  
*Virus Genes* 22, 141-150.
- McIntosh, A.A., Smith, G.L.** (1996):  
Vaccinia virus glycoprotein A34R is required for infectivity of extracellular enveloped virus.  
*J. Virol.* 70, 272-281.
- McKeever, D.J., Jenkinson, D.M., Hutchison, G., Reid, H.W.** (1988):  
Studies on the pathogenesis of orf virus infection in sheep.  
*J. Comp. Pathol.* 99, 317-328.

**McKeever, D.J., Reid, H.W.** (1986):

Survival of orf virus under British winter conditions.  
*Vet.Rec.* 118, 613-614.

**McKeever, D.J., Reid, H.W., Inglis, N.F., Herring, A.J.** (1987):

A qualitative and quantitative assessment of the humoral antibody response of the sheep to orf virus infection.  
*Vet. Microbiol.* 15, 229-241.

**McNiece** (1997):

Interleukin-3 and the colony-stimulating factors, p. 41-53.

*In* D.G. Remick and J.S. Friedland (ed.), *Cytokines in health and disease*, 2<sup>nd</sup> ed. Marcel Dekker, Ann Arbor, Mich.

**Menna, A., Wittek, R., Bachmann, P.A., Mayr, A., Wyler, R.** (1979):

Physical characterization of a stomatitis papulosa virus genome: a cleavage map for the restriction endonuclease HindIII and EcoRI.

*Arch Virol.* 59, 145-156.

**Mercer, A., Fleming, S., Robinson, A., Nettleton, P., Reid, H.** (1997):

Molecular genetic analyses of parapoxviruses pathogenic for humans. *In*: Kaaden, O.-R., Czerny, C.-P., Eichhorn, W. (Eds.), *Viral zoonoses and food of animal origin*. Springer, Wien, pp. 25-34.

**Mercer, A.A., Fraser, K.M., Barns, G., Robinson, A.J.** (1987):

The structure and cloning of orf virus DNA.

*Virology* 157, 1-12.

**Mercer, A.A., Fraser, K.M., Esposito, J.J.** (1996):

Gene homology between orf virus and smallpox variola virus.

*Virus Genes.* 13, 175-178.

**Mercer, A.A., Fraser, K.M., Stockwell, P.A., Robinson, A.J.** (1989):

A homologue of retroviral pseudoproteases in the parapoxvirus, orf virus.

*Virology* 172, 665-668.

**Mercer, A.A., Lyttle, D.J., Whelan, E.M., Fleming, S.B., Sullivan, J.T.** (1995):

The establishment of a genetic map of orf virus reveals a pattern of genomic organization that is highly conserved among divergent poxviruses.

*Virology* 212, 698-704.

**Mercer, A.A., Wise, L.M., Scagliarini, A., McInnes, C.J., Buttner, M., Rziha, H.J., McCaughan, C.A., Fleming, S.B., Ueda, N., Nettleton, P.F.** (2002):

Vascular endothelial growth factors encoded by Orf virus show surprising sequence variation but have a conserved, functionally relevant structure.

*J.Gen.Virol.* 83, 2845-2855.

**Metzler, A., Frei, U., Danner, K.** (1976):

Virologically confirmed outbreak of Borna's disease in a Swiss herd of sheep.

*Schweiz Arch.Tierheilkd.* 118, 483-492.

**Meyer, H., Ropp, S.L., Esposito, J.J.** (1997):

Gene for A-type inclusion body protein is useful for a polymerase chain reaction assay to differentiate orthopoxviruses.

*J.Virol.Methods* 64, 217-221.

**Meyer, H., Rziha, H.-J.** (1993):

Characterization of the gene encoding the A-type inclusion protein of camelpox virus and sequence comparison with other orthopoxviruses.

*J.Gen.Virol.* 74, 1679-1684.

- Meyer, M., Lanz, C., Clauss, M., Lepple-Wienhues, A., Waltenberger, J., Augustin, H.G., Ziche, M., Lenz, C., Büttner, M., Rziha, H.-J., Dehio, C. (1999):**  
A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling by VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinase.  
EMBO J. 18: 363-374.
- Mizuma, H., Takagi, K., Miyake, K., Takagi, N., Ishida, K., Takeo, S., Nitta, A., Nomoto, H., Furukawa, Y., Furukawa, S. (1999) :**  
Microsphere embolism-induced elevation of nerve growth factor level and appearance of nerve growth factor immunoreactivity in activated t-lymphocytes in the brain.  
J. Neurosci. Res. 55, 749-761.
- Morales, J.A., Herzog, S., Kompter, C., Frese, K., Rott, R. (1988):**  
Axonal transport of Borna disease virus along olfactory pathways in spontaneously and experimentally infected rats.  
Med.Microbiol.Immunol. 177, 51-68.
- Mosman, T.R. (1994):**  
Properties and functions of interleukin-10.  
Adv.Immunol. 56, 1-25.
- Moss, B. (1990):**  
Regulation of vaccinia virus transcription.  
Annu. Rev. Biochem. 59, 661-688.
- Moss, B. (1991):**  
Vaccinia virus: a tool for research and vaccine development.  
Science 252, 1662-1667.
- Moss, B. (1992):**  
Poxviruses as eukaryotic expression vectors.  
Sem. In Virol. 3, 277-283.
- Moss, B. (1996a):**  
Poxviridae. The viruses and their replication. In: Fields Virology, Third Edition, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. P. 2637-2671.
- Moss, B. (1996b):**  
Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 93, 11341-11348.
- Moss, B., Winters, E., Cooper, J.A. (1981):**  
Deletion of a 9,000-base-pair segment of the vaccinia virus genome that encodes nonessential polypeptides.  
J.Virol. 40, 387-395.
- Mossman, K., Nation, P., Macen, J., Garbutt, M., Licas, A., McFadden, G. (1996):**  
Myxoma virus M-T7, a secreted homolog of the interferon- $\gamma$  receptor, is a critical virulence factor for the development of myxomatosis in European rabbits.  
Virology 215, 17-30.
- Moyer, R.W., Graves, R.L. (1981) :**  
The mechanism of cytoplasmic orthopoxvirus DNA replication.  
Cell 27, 391-401.
- Moyer, R.W., Graves, R.L., Rothe, C.T. (1980):**  
The white pock ( $\mu$ ) mutants of rabbit poxvirus. III. Terminal DNA sequence duplication and transposition in rabbit poxvirus.  
Cell 22, 545-553.
- Moyer, R.W., Rothe, C.T. (1980):**  
The white pock mmutants of rabbit poxvirus.  
Virology 102, 119-132.



- Müller, H.K., Wittek, R., Schaffner, W., Schumperli, D., Menna, A., Wyler, R. (1978):**  
Comparison of five poxvirus genomes by analysis with restriction endonucleases HindIII, BamI and EcoRI.  
J.Gen.Virol. 38, 135-147.
- Mulligan, R.C., Berg, P. (1981):**  
Selection for animal cells that express the Escherichia coli gene coding for xanthine-guanine phosphoribosyltransferase.  
PNAS 78, 2072-2076.
- Naase, M., Nicholson, B.H., Fraser, K.M., Mercer, A.A., Robinson, A.J. (1991):**  
An orf virus sequence showing homology to the 14K 'fusion' protein of vaccinia virus.  
J.Gen.Virol. 72, 1177-1181.
- Nakatomi, H., Kuriu, T., Okabe, S., Yamamoto, S., Hatano, O., Kawahara, N., Tamura, A., Kirino, T., Nakafuku, M. (2002):**  
Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neuronal progenitors.  
Cell 110, 429-441.
- Narayan, O., Herzog, S., Frese, K., Scheefers, H., Rott, R. (1983):**  
Pathogenesis of Borna disease in rats: immune-mediated viral ophthalmoencephalopathy causing blindness and behavioural abnormalities.  
J.Infect.Dis. 148, 305-315.
- Nettleton, P.F., Brebner, J., Pow, I., Gilray, J.A., Bell, G.D., Reid, H.W. (1996):**  
Tissue culture-propagated orfvirus vaccine protects lambs from orf virus challenge.  
Veterinary Record 138, 184-186.
- Nettleton, P.F., Munro, R., Pow, I., Gilray, J.A., Gray, E.W., Reid, H.W. (1995):**  
Isolation of a parapoxvirus from a grey seal (Halichoreus grypus).  
Vet. Rec. 137, 562-564.
- Nöske, K., Bilzer, T., Planz, O., Stitz, L. (1998):**  
Virus-specific CD4<sup>+</sup> T cells eliminate Borna disease virus from the brain via induction of cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells.  
J.Virol. 72; 4387-4395.
- Ober, B.T., Brühl, P., Schmidt, M., Wieser, V., Gritschenberger, W., Coulibaly, S., Savidis-Dacho, H., Gerencer, M., Falkner, F.G. (2002):**  
Immunogenicity and safety of defective vaccinia virus Lister: Comparison with Modified Vaccinia Virus Ankara.  
J. Virol. 76, 7713-7723.
- Ochsenbein, A.F. Pinschewer, D.D., Sierro, S., Horvath, E., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M. (2000):**  
Protective long-term antibody memory by antigen-driven and T help-dependent differentiation of long-lived memory B-cells to short-lived plasma cells independent of secondary lymphoid organs.  
PNAS 97, 13263-13268.
- Ogawa, S., Oku, A., Sawano, A., Yamaguchi, S., Yazaki, Y., Shibuya, M. (1998):**  
A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain.  
J. Biol. Chem. 273, 31273-31282.
- Ogita, K., Nishiyama, N., Sugiyama, C., Higuchi, K., Yoneyama, M., Yoneda, Y. (2005):**  
Regeneration of granule neurons after lesioning of hippocampal dentate gyrus: evaluation using adult mice treated with trimethyltin chloride as a model.  
J.Neurosci.Res. 82, 609-621.

- Ohishi, K., Inui, K., Barrett, T., Yamanouchi, K.** (2000):  
Long-term protective immunity to rinderpest in cattle following a single vaccination with a recombinant vaccinia virus expressing the virus haemagglutinin protein.  
J.Gen.Virol. 81, 1439-1446.
- Oldach, D., Zink, M.C., Pyper, J.M., Herzog, S., Rott, R., Narayan, O., Clements, J.E.** (1995):  
Induction of protection against Borna disease by inoculation with high-dose-attenuated Borna disease virus.  
Virology 206, 426-434.
- Opgenorth A., Graham, K., Nation, N., Strayer, D., McFadden, G.** (1992a):  
Deletion Analysis of two tandemly arranged virulence genes in myxoma virus, M11L and Myxoma growth factor.  
J.Virol. 66, 4720-4731.
- Opgenorth, A., Strayer, D., Upton, C., McFadden, G.** (1992b):  
Deletion of the growth factor gene related to EGF and TGF $\alpha$  reduces virulence of malignant rabbit fibroma virus.  
Virology 186, 175-191.
- Osterrieder, N., Meyer, H., Pfeffer, M.** (1994):  
Characterization of the gene encoding the A-type inclusion body protein of mousepox virus.  
Virus Genes 8, 125-135.
- Overwijk, W.W., Lee, D.S., Surman, D.R., Irvine, K.R., Touloukian, C.E., Chan, C.-C., Carroll, M.W., Moss, B., Rosenberg, S.A., Restifo N.P.** (1999):  
Vaccination with a recombinant vaccinia virus encoding a "self" antigen induces autoimmune vitiligo and tumor cell destruction in mice: Requirement for CD4<sup>+</sup> T lymphocytes.  
PNAS 96, 2982-2987.
- Panus, J.F., Smith, C.A., Ray, C.A., Smith, T.D., Patel, D.D., Pickup, D.J.** (2002):  
Cowpox virus encodes a fifth member of the tumor necrosis factor receptor family: a soluble, secreted CD30 homologue.  
Proc.Natl.Acad.Sci USA 99, 8348-8353.
- Paoletti, E.** (1996)  
Applications of pox virus vectors to vaccination: An update.  
PNAS 93, 11349-11353.
- Paoletti, E., Lipinskas, B.R., Samsonoff, C., Mercer, S., Panicali, D.** (1984):  
Construction of live vaccines using genetically engineered poxviruses: biological activity of vaccinia virus recombinants expressing the hepatitis B surface antigen and the herpes simplex virus glycoprotein D.  
Proc.Natl.Acad.Sci. 81, 193-197.
- Paoletti, E., Taylor, J., Meignier, B., Meric, C., Tartaglia, J.** (1995):  
Highly attenuated poxvirus vectors: NYVAC, ALVAC and TROVAC.  
Dev.Biol.Stand. 84, 159-163.
- Pardo, M.C., Bauman, J.E., Mackowiak, M.** (1997):  
Protection of dogs against canine distemper by vaccination with a canarypox virus recombinant expressing canine distemper virus fusion and hemagglutinin glycoproteins.  
Am.J.Vet.Res. 58, 833-836.
- Parent, J.M., von dem Bussche, N., Lowenstein, D.H.** (2006):  
Prolonged seizures recruit caudal subventricular zone glial progenitors into the injured hippocampus.  
Hippocampus 16, 321-328.
- Patel, D.D., Pickup, D.J.** (1989):  
The second-largest subunit of the poxvirus PNA polymerase is similar to the corresponding subunits of procaryotic and eucaryotic RNA polymerases.  
J.Virol. 63, 1076-1086.

- Peng, Y., Kowalewski, R., Kim, S., Elkon, K.B.** (2005):  
The role of IgM antibodies in the recognition and clearance of apoptotic cells.  
*Mol. Immunol.* 42, 781-787.
- Perkus, M.E., Tartaglia, J., Paoletti, E.** (1995):  
Poxvirus-based vaccine candidates for cancer, AIDS and other infectious diseases.  
*J.Leukoc.Biol.* 58, 1-13.
- Pestka, S., Langer, J.A., Zoon, K.C., Samuel, C.E.** (1987):  
Interferons and their actions.  
*Annu.Rev.Biochem.* 56, 727-777.
- Petitto, J.M., McNamara R.K., Gendreau, P.L., Huang, Z., Jackson, A.J.** (1999):  
Impaired learning and memory and altered hippocampal neurodevelopment resulting from interleukin-2 gene deletion.  
*J.Neurosci.Res.* 56, 441-446.
- Pfleiderer, M., Falkner, F.G., Dorner, F.** (1995):  
A novel vaccinia virus expression system allowing construction of recombinants without the need for selection markers, plasmids and bacterial hosts.  
*J.Gen.Virol.* 76, 2957-2962.
- Pickup, D.J., Ink, B.S., Parsons, B.L., Hu, W., Joklik, W.K.** (1984):  
Spontaneous deletions and duplications of sequences in the genome of cowpox virus.  
*PNAS* 81, 6817-6821.
- Planz, O., Bilzer, T., Sobbe, M., Stitz, L.** (1993):  
Lysis of major histocompatibility complex class I-bearing cells in Borna disease virus-induced degenerative encephalopathy.  
*J.Exp.Med.* 178, 163-174.
- Planz, O., Bilzer, T., Stitz, L.** (1995):  
Immunopathogenic role of T-cell subsets in Borna disease virus-induced progressive encephalitis.  
*J.Virol.* 69, 896-903
- Planz, O., Dumrese, T., Hülpiusch, S., Schirle, M., Stevanovic, S., Stitz, L.** (2001):  
A naturally processed rat major histocompatibility complex class I-associated viral peptide as target structure of Borna disease virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells.  
*J.Biol.Chem.* 276, 13689-13694.
- Planz, O., Pleschka, S., Oesterle, K., Berberich-Siebelt, F., Ehrhardt, C., Stitz, L., Ludwig, S.** (2003):  
Borna disease virus nucleoprotein interacts with CDC2-cyclin B1 complex.  
*J.Virol.* 77, 11186-11192.
- Planz, O., Pleschka, S., Oesterle, K., Berberich-Siebelt, F., Ehrhardt, C., Stitz, L., Ludwig, S.** (2005):  
Borna disease virus nucleoprotein interacts with the Cdc2-Cyclin B1 complex.  
*J.Virol.* 77, 11186-11192.
- Planz, O., Rentzsch, C., Batra, A., Rziha, H.-J., Stitz, L.** (1998):  
Persistence of Borna disease virus-specific nucleic acid in blood of psychiatric patient.  
*Lancet* 352, 623.
- Planz, O., Rziha, H.J., Stitz, L.** (2003):  
Genetic relationship of Borna disease virus isolates.  
*Virus Genes* 26, 25-30.
- Planz, O., Stitz, L.** (1999):  
Borna disease virus nucleoprotein (p40) is a major target for CD8<sup>+</sup>-T-cell-mediated immune response.  
*J.Virol.* 73; 1715-1718.

- Pletnikov, M.V., Moran, T.H., Carbone, K.M.** (2002):  
Borna disease virus infection of the neonatal rat: developmental brain injury model of autism spectrum disorders.  
*Front.Biosci.* 7, D593-D607.
- Pringle, C.R.** (1997):  
The order mononegavirales – current status.  
*Arch.Virol.* 142, 2321-2326.
- Pyper, J.M., Clements, J.E., Zink, M.C.** (1998):  
The nucleolus is the site of Borna disease virus RNA transcription and replication.  
*J.Virol.* 72, 7697-7702.
- Rafii, F., Burger, D.** (1985):  
Comparison of contagious ecthyma virus genomes by restriction endonucleases.  
*Arch.Virol.* 84, 283-289.
- Ramirez, F., Mason, D.** (2000):  
Recirculatory and sessile CD4+ T lymphocytes differ on CD45RC expression.  
*J.Immunol.* 165, 1816-1823.
- Ramirez, J.C., Gherardi, M.M., Esteban, M.** (2000°):  
Biology of attenuated modified vaccinia virus Ankara recombinant vector in mice: virus fate and activation of Band T-cell immune responses in comparison with the Western Reserve strain and advantages as a vaccine.  
*J.Virol.* 74, 923-933.
- Ramirez, J.C., Gherardi, M.M., Rodriguez, D., Esteban, M.** (2000b):  
Attenuated modified vaccinia virus Ankara can be used as an immunizing agent under conditions of pre-existing immunity to the vector.  
*J.Virol.* 74, 7651-7655.
- Richt, J., Stitz, L., Deschl, U., Frese, K., Rott, R.** (1990):  
Borna disease virus-induced meningoencephalomyelitis caused by a virus-specific CD4+ T cell-mediated immune reaction.  
*J.Gen.Virol.* 71, 2565-2573.
- Richt, J.A., Frese, K., Carbone, K.M., Narayan, O., Rott, R.** (1994):  
Borna disease virus –specific T cells protect against or cause immunopathological Borna disease.  
*J.Exp.Med.* 179, 1467-1473.
- Richt, J.A., Furbringer, T, Koch, A., Pfeuffer, I., Herden, C., Bause-Niedrig, I., Garten, W.** (1998):  
Processing of the Borna disease virus glycoprotein gp94 by the subtilisin-like endoprotease furin.  
*J.Virol.* 72, 4528-4533.
- Richt, J.A., Rott, R.** (2001):  
Borna disease virus: a mystery as an emerging zoonotic pathogen.  
*Vet. J.* 161, 24-40.
- Richt, J.A., Stitz, L., Wekerle, H., Rott, R.** (1989):  
Borna disease, a progressive meningoencephalomyelitis as a model for CD4+ T cell-mediated immunopathology in the brain.  
*J.Exp.Med.* 170,1045-1050.
- Robinson, A. J., Ellis, G., Balassu, T.** (1982) :  
The genome of orf virus: restriction endonuclease analysis of viral DNA isolated from lesions of orf in sheep.  
*Arch.Virol.* 71, 43-55.
- Robinson, A.J, Mercer, A.A.** (1995) :  
Parapoxvirus of red deer: evidence for its inclusion as a new member in the genus parapoxvirus.  
*Virology* 208, 812-815.

**Robinson, A.J., Balassu, T.C.** (1981):  
Contagious pustular dermatitis (orf).  
Vet. bulletin 51, 771-782.

**Robinson, A.J., Barns, G., Fraser, K., Carpenter, E., Mercer, A.A.** (1987):  
Conservation and variation in orf virus genomes.  
Virology 157, 13-23.

**Robinson, A.J., Lyttle, D.J.** (1992):  
Parapoxviruses: Their biology and potential as recombinant vaccines.  
In: Binns, M.M., Smith, G.L. (Eds.), Recombinant poxviruses. CRC Press Inc., Boca Raton, FL, pp. 285-327.

**Rohrmann, G., Moss, B.** (1985):  
Transcription of vaccinia virus early genes by a template-dependent soluble extract of purified virions.  
J.Virol. 56, 349-355.

**Rohrmann, G., Yuen, L., Moss B.** (1986):  
Transcription of vaccinia early genes by enzymes isolated from vaccinia virions terminates down-stream of a regulatory sequence.  
Cell 46, 1029-1035.

**Romero, C.H., Barrett, T., Chamberlain, R.W., Kitching, R.P., Fleming, M., Black, D.N.** (1994):  
Recombinant capripox virus expressing the hemagglutinin protein gene of rinderpest virus: protection of cattle against rinderpest and lumpy skin disease.  
Virology 204, 425-429.

**Roper, R.L., Payne, L.G., Moss, B.** (1996):  
Extracellular vaccinia virus envelope glycoprotein encoded by the A33R gene.  
J.Virol. 70, 3753-3762.

**Roper, R.L., Wolfe, E.J., Weisberg, A.S., Moss, B.** (1998):  
The envelope protein encoded by the A33R gene is required for formation of actin-containing microvilli and efficient cell-to-cell spread of vaccinia virus.  
J.Virol. 72, 4192-4204.

**Rosel, J.L., Earl, P.L., Weir, J.P., Moss, B.** (1986):  
Conserved TAAATG sequence at the transcriptional and translational initiation sites of vaccinia virus late genes deduced by structural and functional analysis of the HindIII H genome fragment.  
J.Virol. 60, 436-439.

**Rosenbusch, R.F., Reed, D.E.** (1983):  
Reaction of convalescent bovine antisera with strain-specific antigens of parapoxviruses.  
AmJ.Vet.Res. 44, 875-878.

**Rosengard, A.M., Alonso, L.C., Korb, L.C., Baldwin, W.M. 3rd, Sanfilippo, F., Turka, L.A., Ahearn, J.M.** (1999):  
Functional characterization of soluble and membrane-bound forms of vaccinia virus complements control protein (VCP).  
Mol.Immunol. 36, 685-697.

**Rott, R., Becht, H.** (1995):  
Natural and experimental Borna disease in animals.  
Curr.Top.Microbiol.Immunol. 190, 17-30.

**Rott, R., Herzog, S., Bechter, K., Frese, K.** (1991):  
Borna disease, a possible hazard for man?  
Arch.Virol. 118, 143-149.

- Rott, R., Herzog, S., Fleischer, B., Winokur, A., Amsterdam, J., Dyson, W., Koprowski, H.** (1985):  
Detection of serum antibodies to Borna disease virus in patients with psychiatric disorders.  
*Science* 228, 755-756.
- Rottger, S., Frischknecht, F., Reckman, I., Smith, G.L., Way, M.** (1999):  
Interactions between vaccinia virus IEV membrane proteins and their roles in IEV assembly and actin tail formation.  
*J.Virol.* 73, 2863-2875.
- Rowell, J.F., Griffin, D.E.** (1999):  
The inflammatory response to nonfatal Sindbis virus infection of the nervous system is more severe in SJL than in BALB/c mice and is associated with low levels of IL-4 mRNA and high levels of IL-10-producing CD4+ T cells.  
*J.Immunol.* 162; 1624-1632.
- Rubin, S.A., Waltrip, R.W. 2d, Bautista, J.R., Carbone, K.M.** (1993):  
Borna disease virus in mice: host-specific differences in disease expression.  
*J.Virol.* 67, 548-552.
- Rudolph, M.G., Kraus, I., Dickmanns, A., Eickmann, M., Garten, W., Ficner, R.** (2003):  
Crystal structure of the Borna disease virus nucleoprotein.  
*Structure* 11, 1219–1226.
- Rziha, H.-J., Bauer, B., Adam, K.-H., Röttgen M., Cottone, R., Henkel, M., Dehio, C., Büttner, M.** (2003):  
Relatedness and heterogeneity at the near-terminal end of the genome of a parapoxvirus bovis 1 strain (B177) compared with parapoxvirus ovis (Orf virus).  
*J.Gen.Virol.* 84, 1111–1116.
- Rziha, H.J., Henkel, M., Cottone, R., Bauer, B., Auge, U., Götz, F., Pfaff, E., Röttgen, M., Dehio, C., Büttner, M.** (2000):  
Generation of recombinant parapoxviruses: non-essential genes suitable for insertion and expression of foreign genes.  
*J.Biotechnology* 83, 137-145.
- Rziha, H.J., Henkel, M., Cottone, R., Meyer, M., Dehio, Chr., Büttner, M.** (1999):  
Parapoxviruses: potential alternative vectors for directing the immune response in permissive and non-permissive hosts.  
*J.Biotechnology* 73, 235-242.
- Sabbatini, P., Chiou, S.K., Rao, L., White, E.** (1995):  
Modulation of p53-mediated transcriptional repression and apoptosis by the adenovirus E1B 19K protein.  
*Mol.Cell.Biol.* 15, 1060-1070.
- Samuel, C.E.** (1991):  
Antiviral actions of interferon. Interferon-regulated cellular proteins and their surprisingly selective antiviral activities.  
*Virology* 183, 1-11.
- Sanderson, C.M., Frischknecht, F., Way, M., Hollinshead, M., Smith, G.L.** (1998):  
Roles of vaccinia virus EEV-specific proteins in intracellular actin tail formation and low pH-induced cell-cell fusion.  
*J.Gen.Virol.* 79, 1415-25.
- Sanderson, C.M., Hollinshead, M., Smith, G.L.** (2000):  
The vaccinia virus A27L protein is needed for the microtubule-dependent transport of intracellular mature virus particles.  
*J.Gen.Virol.* 81, 47-58.
- Sarawar, S.R., Sparshott, S.M., Sutton, p., Yang, C.P., Hutchinson, I.V., Bell, E.B.** (1993):  
Rapid re-expression of CD45RC on rat CD4 T cells in vitro correlates with a change in function.  
*Eur.J.Immunol.* 23, 103-109.

- Sauder, C., Muller, A., Cubit, B., Mayer, J., Steinmetz, J., Trabert, W., Ziegler, B., Wanke, K., Mueller-Lantzsch, N., de la Torre, J.C., Grasser, F.A.** (1996):  
Detection of Borna disease virus (BDV) antibodies and BDV RNA in □psychiatric patients: evidence for high sequence conservation of human blood-derived BDV RNA.  
*J.Virol.* 70, 7713-7724.
- Savory, L.J., Stacker, S.A., Fleming, S.B., Niven, B.E., Mercer, A.A.** (2000):  
Viral vascular endothelial growth factor plays a critical role in Orf virus infection.  
*J.Virol.* 74, 10699-10706
- Schädler, R., Diringer, H., Ludwig, H.** (1985):  
Isolation and characterization of a 14500 molecular weight protein from brains and tissue cultures persistently infected with borna disease virus.  
*J.Gen.Virol.* 66, 2479-2484.
- Schamel, K., Staeheli, P., Hausmann, J.** (2001):  
Identification of the immunodominant H-2K(k)-restricted cytotoxic T-cell epitope in the Borna disease virus nucleoprotein.  
*J.Virol.* 75, 8579-8588.
- Schmelz, M., Sodeik, B., Ericsson, M., Wolffe, E.J., Shida, H., Hiller, G., Griffiths, G.** (1994):  
Assembly of vaccinia virus: The second wrapping cisterna is derived from the Trans Golgi Network.  
*J.Virol.* 68, 130-147.
- Schmidt, D.** (1967):  
Experimental studies of contagious pustular dermatitis of sheep V. Development of immunity at various sites of the body surface.  
*Archiv Exp.Vet.Med.* 21, 937-942.
- Schneemann, A., Schneider, P.A., Kim, S., Lipkin, W.I.** (1994):  
Identification of signal sequences that control transcription of Borna disease virus, a nonsegmented, negative-strand RNA virus.  
*J.Virol.* 68, 6514-6522.
- Schneemann, A., Schneider, P.A., Lamb, R.A., Lipkin, W.I.** (1995):  
The remarkable coding strategy of Borna disease virus: a new member of the nonsegmented negative-strand RNA viruses.  
*Virology* 210, 1-8.
- Schneider, P.A., Hatalski, C.G., Lewis, A.J., Lipkin, W.I.** (1997):  
Biochemical and functional analysis of the Borna disease virus G protein.  
*J.Virol.* 71, 331-336.
- Schneider, P.A., Kim, R., Lipkin, W.I.** (1997):  
Evidence for translation of the Borna disease virus G protein by leaky ribosomal scanning and ribosomal reinitiation.  
*J.Virol.* 71, 5614-5619.
- Schneider, P.A., Schneemann, A., Lipkin, W.I.** (1994):  
RNA splicing in Borna disease virus, a nonsegmented, negative-strand RNA virus.  
*J.Virol.* 68, 5007-5012.
- Schneider, U., Schwemmler, M., Staeheli, P.** (2005):  
Genome trimming: A unique strategy for replication control employed by Borna disease virus.  
*PNAS* 102, 3441-3446.
- Schwemmler, M., Salvatore, M., Shi, L., Richt, J., Lee, C.H., Lipkin, W.I.** (1998):  
Interactions of the borna disease virus P, N, and X proteins and their functional implications.  
*J.Biol.Chem.* 273, 9007-9012.

- Schwer, B., Visca, P., Vos, J.C., Stunnenberg, H.G. (1987):**  
Discontinuous transcription or RNA processing of vaccinia virus late messengers results in a 5' poly(A) leader.  
Cell 50, 163-169.
- Seet, B.T., Johnston, J.B., Brunetti, C.R., Barrett, J.W., Everett, H., Cameron, C., Sypula, J., Nazarian, S.H., Lucas, A., McFadden, G. (2003):**  
Poxviruses and immune evasion.  
Annu.Rev.Immunol. 21, 377-423.
- Sen, G.C., Lengyel, P. (1992):**  
The interferon system. A bird's eye view of its biochemistry.  
J.Biol.Chem. 267, 5017-20.
- Sentsui, H., Murakami, K., Inoshima, Y., Shibahara, T., Yokomizo, Y. (1999):**  
Isolation of parapoxvirus from a cow treated with interferon-gamma.  
Vet.Microbiol. 70, 143-152.
- Shankar, V., Kao, M., Hamir, A.N., Sheng, H., Koprowski, H., Dietzschold, B. (1992):**  
Kinetics of virus spread and changes in levels of several cytokine mRNA in the brain after intranasal infection of rats with Borna disease virus.  
J.Virol. 66, 992-998.
- Smith, G.L. (1996):**  
Virus proteins that bind cytokines, chemokines or interferons.  
Curr.Opin.Immunol. 8, 467-471.
- Smith, G.L. (1999):**  
Vaccinia virus immune evasion.  
Immunol.Lett. 65, 55-62.
- Smith, G.L., Vanderplasschen, A. (1998):**  
Extracellular enveloped vaccinia virus. Entry, egress, and evasion.  
Adv.Exp.Med.Biol. 440, 395-414.
- Smith, K.A., Stallard, V., Roos, J.M., Hart, C., Cormier, N., Cohen, L.K., Roberts, B.E., Payne, L.G. (1993):**  
Host range selection of vaccinia recombinants containing insertions of foreign genes into non-coding sequences.  
Vaccine 11, 43-53.
- Smith, V.P., Bryant, N.A., Alcamí, A. (2000):**  
Ectromelia, vaccinia and cowpox viruses encode secreted interleukin-18-binding proteins.  
J.Gen.Virol. 81, 1223-1230.
- Smith, G.L., Howard, S.T., Chan, Y.S. (1989):**  
Vaccinia virus encodes a family of genes with homology to serine proteinase inhibitors.  
J.Gen.Virol. 70, 2333-2343.
- Snider, T.G., McConnell, S., Pierce, K.R. (1982):**  
Increased incidence of bovine papular stomatitis in neonatal calves.  
Arch.Virol. 71, 251-258.
- Sobbe, M., Bilzer, T., Gommel, S., Nöske, K., Planz, O., Stitz, L. (1997):**  
Induction of degenerative brain lesions after adoptive transfer of brain lymphocytes from Borna disease virus-infected rats: Presence of CD8<sup>+</sup> T cells and perforin mRNA.  
J.Virol. 71; 2400-2407.
- Sodeik, B., Krijnse-Locker, J. (2002):**  
Assembly of vaccinia virus revisited: *de novo* membrane synthesis or acquisition from the host?  
Trends Microbiol. 10, 15-24.



**Somogyi, P., Frazier, J., Skinner, M.A.** (1993):

Fowlpox virus host range restriction: gene expression, DNA replication and morphogenesis in nonpermissive mammalian cells.

Virology 197, 439-444.

**Sparshott, S.M., Bell, E.B.** (1998):

Lymphocyte trafficking: CD4 T cells with 'memory' phenotype (CD45RC-) freely cross lymph node high endothelial venules in vivo.

Immunology 93, 447-454.

**Spehner, D., DeCarlo, S., Drillien, R., Weiland, F., Mildner, K., Hanau, D., Rziha, H.-J.** (2004):

Appearance of the bona fide spiral tubule of ORF virus is dependent on an intact 10-kilodalton viral protein.

J.Virol. 78, 8085-8093.

**Spriggs, M.K.**, (1996):

One step ahead of the game: viral immunomodulatory molecules.

Ann.Rev.Immunol. 14, 101-130.

**Spriggs, M.K., Hruby, D.E., Maliszewski, C.R., Pickup, D.J., Sims, J.E., Buller, R.M., VanSlyke, J.** (1992):

Vaccinia and cowpox viruses encode a novel secreted interleukin-1-binding protein.

Cell. 71, 145-152.

**Staeheli, P.** (1990):

Interferon-induced proteins and the antiviral state.

Adv.Virus Res. 38, 147-200.

**Staeheli, P., Sauder, C. Hausmann, J., Ehrensberger, F., Schwemmler, M.** (2000):

Epidemiology of Borna disease virus.

J.Gen.Virol. 81, 2123-2135.

**Stannard, L.M., Marais, D., Kow, D., Dumbell, K.R.** (1998):

Evidence for incomplete replication of a penguin poxvirus in cells of mammalian origin.

J.Gen. Virol. 79, 1637-1646.

**Stickl, H., Hochstein-Mintzel, V., Mayr, A., Huber, H.C., Schafer, H., Holzner, A.** (1974):

MVA vaccination against smallpox: clinical tests with an attenuated live vaccinia strain (MVA) (author's transl.).

Deutsche medizinische Wochenschrift 99, 2386-2392.

**Stitz, L., Bilzer, T., Planz O.** (2002):

The immunopathogenesis of Borna disease virus infection.

Front Biosci. 1;7, 541-55. Review.

**Stitz, L., Bilzer, T., Richt, J.A., Rott, R.** (1993):

Pathogenesis of Borna disease.

Arch.Virol.Suppl. 7, 135-151.

**Stitz, L., Dietzschold, B., Carbone, K.M.** (1995):

Immunopathogenesis of Borna disease.

Curr.Top.Microbiol.Immunol. 190, 75-92.

**Stitz, L., Krey, H., Ludwig, H.**, (1981):

Borna disease in rhesus monkeys as a model for uveo-cerebral symptoms.

J.Med.Virol. 6, 333-340.

**Stitz, L., Planz, O., Bilzer, T., Frei, K., Fontana, A.** (1991):

Transforming growth factor- $\beta$  modulates T cell-mediated encephalitis caused by Borna disease virus.

J.Immunol. 147, 3581-3586.

- Stitz, L., Planz, O., Furrer, E., Lipkin, W.I., Bilzer, T. (1998):**  
A functional role for neutralizing antibodies in Borna disease: Influence on virus tropism outside the central nervous system.  
J.Virol. 72; 8884-8892.
- Stitz, L., Rott, R. (1999):**  
Borna disease virus (Bornaviridae)  
Encyclopedia of virology, second edition, volume 1, p. 167.
- Stitz, L., Schilken, D., Frese, K., (1990):**  
Atypical dissemination of the highly neurotropic Borna disease virus during persistent infection in cyclosporin A-treated, immunosuppressed rats.  
J.Virol. 65, 457-460.
- Stitz, L., Sobbe, M., Bilzer, T. (1992):**  
Preventive effects of early anti-CD4 or anti-CD8 treatment on Borna disease in rats.  
J.Virol. 66, 3316-3323.
- Stitz, L., Soeder, D., Deschl, U., Frese, K., Rott, R. (1989):**  
Inhibition of immune-mediated meningoencephalitis in persistently Borna disease virus-infected rats by cyclosporine A.  
J.Immunol. 143, 4250-4256.
- Stoyloff, R., Strecker, A., Bode, L., Franke, P., Ludwig, H., Hucho, F. (1997):**  
The glycosylated matrix protein of Borna disease virus is a tetrameric membrane-bound viral component essential for infection.  
Eur.J.Biochem. 246, 252-257.
- Strobl, H., Scheinecker, C., Riedl, E., Csmarits, B., Bello-Fernandez, C., Pickl, W.F., Majdic, O., Knapp, W. (1998):**  
Identification of CD68<sup>+</sup>lin<sup>-</sup> peripheral blood cells with dendritic precursor characteristics.  
J.Immunol. 161, 740-748.
- Strube, W., Kretzdorn, D., Grunmach, J., Bergle, R.D., Thein, P. (1989):**  
The effectiveness of the paramunity inducer Baypamun (PIND-ORF) for the prevention and metaphylaxis of an experimental infection with the infectious bovine rhinotracheitis virus in cattle.  
Tierärztliche Praxis 17, 267-272.
- Su, J., Wang, G., Barrett, J.W., Irvine, T.S., Gao, X., McFadden, G. (2006):**  
Myxoma virus M11L blocks apoptosis through inhibition of conformational activation of Bax at the mitochondria.  
J.Virol. 80, 1140-1151.
- Sullivan, J.T., Fleming, S.B., Robinson, A.J., Mercer, A.A. (1995):**  
Sequence and transcriptional analysis of a near-terminal region of the orf virus genome.  
Virus Genes 11, 21-29.
- Sullivan, J.T., Mercer, A.A., Fleming, S.B., Robinson, A.J. (1994):**  
Identification and characterization of an orf virus homologue of the vaccinia virus gene encoding the major envelope antigen p37K.  
Virology 202, 968-973.
- Sutter, G., Moss, B. (1992):**  
Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes.  
PNAS 89, 10847-10851.
- Sutter, G., Wyatt, L.S., Foley, P.L., Bennink, J.R., Moss, B. (1994):**  
A recombinant vector derived from the host range-restricted and highly attenuated MVA strain of vaccinia virus stimulates protective immunity in mice to influenza virus.  
Vaccine 12, 1032-1040.

**Symons, J.A., Tschärke, D.C., Price, N., Smith, G.L. (2002):**

A study of the vaccinia virus interferon-gamma receptor and its contribution to virus virulence.  
J.Gen.Virol. 83, 1953-1964.

**Szajner, P., Jaffe, H., Weisberg, A.S., Moss, B. (2003):**

Vaccinia virus G7L protein interacts with the A30L protein and is required for association of viral membranes with dense viroplasm to form immature virions.  
J.Virol. 77, 3418-3429.

**Szajner, P., Weisberg, A.S., Wolffe, E.J., Moss, B. (2001):**

Vaccinia virus A30L protein is required for association of viral membranes with dense viroplasm to form immature virions.  
J.Virol. 75, 5752-5761.

**Tartaglia, J., Cox, W.I., Pincus, S., Paoletti, E. (1994):**

Safety and immunogenicity of recombinants based on the genetically-engineered vaccinia strain, NYVAC.  
Dev.Biol.Stand. 82, 125-129.

**Tartaglia, J., Perkus, M.E., Taylor, J., Norton, E.K., Audonnet, J.C., Cox, W.I., Davis, S.W., Vanderhoeven, J., Meignier, B., Riviere, M., Languet, B., Paoletti, E. (1992):**

NYVAC: a highly attenuated strain of vaccinia virus.  
Virology 188, 217-232.

**Taylor, J., Meignier, B., Tartaglia, J., Languet, B., Vanderhoeven, J., Franchini, G., Trimarchi, C., Paoletti, E. (1995):**

Biological and immunogenic properties of a canarypox-rabies recombinant, ALVAC-RG (vCP65) in non-avian species.  
Vaccine 13, 539-549.

**Taylor, J., Paoletti, E. (1988):**

Fowlpox virus as a vector in non-avian species.  
Vaccine 6, 466-468.

**Taylor, J., Trimarchi, C., Weinberg, R., Languet, B., Guillemin, F., Desmettre, P., Paoletti, E. (1991):**

Efficacy studies on a canarypox-rabies recombinant virus.  
Vaccine 9, 190-193.

**Taylor, J., Weinberg, R., Languet, B., Desmettre, P., Paoletti, E. (1988):**

Recombinant fowlpox virus inducing protective immunity in non-avian species.  
Vaccine 6, 497-503.

**Tewari, M., Dixit, V.M. (1995):**

Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus crmA gene product.  
J.Biol.Chem. 270, 3255-3260.

**Tewari, M., Telford, W.G., Miller, R.A., Dixit, V.M. (1995):**

**CrmA, a poxvirus-encoded serpin, inhibits cytotoxic T-lymphocyte-mediated apoptosis.**

J.Biol.Chem. 270, 22705-22708.

**Thomas, K., Tompkins, D.M., Sainsbury, A.W., Wood, A.R., Dalziel, R., Nettleton, P.F., McInnes, C.J. (2003):**

A novel poxvirus lethal to red squirrels (*sciurus vulgaris*).  
J.Gen.Virol. 84, 3337-3341.

**Tripathy, D.N. (1996):**

Fowlpox virus vectored vaccines for control of poultry diseases. Proc. World's Poult. Cong., 20th, New Delhi, India. Vol. II: 497-503.

- Tripathy, D.N.**, (1999):  
Swinepox virus as a vector for swine pathogens.  
*Adv.Vet.Med.* 41, 463-480.
- Tulman, E.R., Afonso, C.L., Lu, Z., Zsak, L., Sur, J.-H., Sandybaev, N.T., Kerembekova, U.Z., Zaitsev, V.L., Kutish, G.F., Rock, D.L.** (2002):  
The genomes of sheeppox and goatpox viruses.  
*J.Virol.* 76, 6054-6061.
- Turelli, P., Guiguen, F., Mornex, J.-F., Vigne, R., Querat, G.** (1997):  
dUTPase-minus caprine arthritis-encephalitis virus is attenuated for pathogenesis and accumulates G-to-A substitutions.  
*J.Virol.* 71, 4522-4530.
- Turner, P.C., Moyer, R.W.** (1990):  
The molecular pathogenesis of poxviruses.  
*Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 163, 125-151.
- Valder, W.-A., Straub, O.C., Thiel, W., Wachendörfer, G., Zettl, K.** (1979):  
Ecthyma contagiosum des Schafes – Wandel des klinischen Bildes.  
*Tierärztl. Umschau* 34, 828-836.
- Van der Leek, M.L., Feller, J.A., Sorensen, G., Isaacson, W., Adams, C.L., Borde, D.J., Pfeiffer, N., Tran, T., Moyer, R.W., Gibbs, E.P.J.** (1994):  
Evaluation of swinepox virus as a vaccine vector in pigs using an Aujeszky's disease (pseudorabies) virus gene insert coding for glycoproteins gp50 and gp63.  
*The Veterinary Record* 134, 13-18.
- Van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E., Estes, M.K., Lemon, S., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R., Wickner, R.** (2000):  
Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses.  
Academic Press, New York. P. 144-145.
- Vanderplasschen, A., Hollinshead, M., Smith, G.L.** (1998a):  
Intracellular and extracellular vaccinia virions enter cells by different mechanisms.  
*J.Gen.Virol.* 79, 877-887.
- Vanderplasschen, A., Mathew, E., Hollinshead, M., Sim, R.B., Smith, G.L.** (1998b):  
Extracellular enveloped vaccinia virus is resistant to complement because of incorporation of host complement control proteins into its envelope.  
*PNAS* 95, 7544-7549.
- VandeWoude, S., Richt, J.A., Zink, M.C., Rott, R., Narayan, O., Clements, J.E.** (1990):  
A borna virus cDNA encoding a protein recognized by antibodies in humans with behavioral diseases.  
*Science* 250, 1278-1281.
- Vijaysri, S., Talasela, L., Mercer A.A., McInnes, C.J., Jacobs, B.L., Langland, J.O.** (2003):  
The Orf virus E3L homologue is able to complement deletion of the vaccinia virus E3L gene in vitro but not in vivo.  
*Virology* 314, 305-314.
- Vos, J.C., Mercer, A.A., Fleming, S.B., Robinson, A.J.** (1992):  
In vitro recognition of an orf virus early promoter in a vaccinia virus extract.  
*Arch. Virol.* 123, 223-228.
- Walker, M.P., Jordan, I., Briese, T., Fischer, N., Lipkin, W.I.** (2000):  
Expression and characterization of the Borna disease virus polymerase.  
*J.Virol.* 74, 4425-4428.

**Ward, B.M., Weisberg, A.S., Moss, B. (2003):**

Mapping and functional analysis of interaction sites within the cytoplasmic domains of the vaccinia virus A33R and A36R envelope proteins.

J.Virol. 77, 4114-4126.

**Watanabe, M., Kobayashi, T., Tomonaga, K., Ikuta, K. (2000):**

Antibodies to Borna disease virus in infected adult rats: an early appearance of anti-p10 antibodies and recognition of novel virus-specific proteins in infected animal brain cells.

J.Vet.Med.Sci. 62, 775-778.

**Weber, O., Siegling, A., Fricbe, A., Limmer, A., Schlapp, T., Knolle, P., Mercer, A., Schaller, H., Volk, H.-D. (2003):**

Inactivated parapoxvirus ovis (Orf virus) has antiviral activity against hepatitis B virus and herpes simplex virus.

J.Gen.Virol. 84, 11843-1852.

**Wehner, T., Ruppert, A., Herden, C., Frese, K., Becht, H., Richt, J.A. (1997):**

Detection of a novel Borna disease virus encoded 10 kDa protein in infected cells and tissues.

J.Gen.Virol. 78, 2459-2466.

**Weir, J.P., Moss, B. (1987):**

Determination of the promoter region of an early vaccinia virus gene encoding thymidine kinase.

Virology 158, 206-210.

**Weir, J.P., Moss, B. (1984):**

Regulation of expression and nucleotide sequence of a late vaccinia virus gene.

J.Virol. 51, 662-669.

**Wertz, G.W., Stott, E.J., Young, K.K., Anderson, K., Ball, L.A. (1987):**

Expression of the fusion protein of human respiratory syncytial virus from recombinant vaccinia virus vectors and protection of vaccinated mice.

J.Virol. 61, 293-301.

**Westermann, J., Geismar, U., Sponholz, A., Bode, U., Sparshott, S.M., Bell, E.B. (1997):**

CD4+ T cells of both the naive and the memory phenotype rat lymph nodes and Peyer's patches via high endothelial venules: within the tissue their migratory behavior differs.

Eur.J.Immunol. 27, 3174-3181.

**Wiktor, T.J., Kieny, M.P., Lathe, R. (1988):**

New vaccines and chemotherapy. *In Applied Virology research* 1. Kurstak, E., Marusyk, R.G., Murphy, F.A., Van Regenmortel, M.H.V. (Eds), Plenum, New York. p. 69-90.

**Wise, L.M., Ueda, N., Dryden, N.H., Fleming, S.B., Caesar, C., Roufail, S., Achen, M.G., Stacker, S.A., Mercer, A.A. (2003):**

Viral vascular endothelial growth factors vary extensively in amino acid sequence, receptor-binding specificities, and the ability to induce vascular permeability yet are uniformly active mitogens.

J.Biol.Chem. 278, 38004-38014.

**Wise, L.M., Veikkola, T., Mercer, A.A., Savory, L.J., Fleming, S.B., Caesar, C., Vitali, A., Makinen, T., Alitalo, K., Stacker, S.A. (1999):**

Vascular endothelial growth factor (VEGF)-like protein from orf virus NZ2 binds to VEGFR2 and neuropilin-1.

PNAS 96, 3071-3076.

**Wittek, R., Herlyn, M., Schümperli, D., Bachmann, P.A., Mayr, A., Wyler, R. (1980):**

Genetic and antigenic heterogeneity of different parapoxvirus strains.

Intervirology 13, 33-41.

**Wittek, R., Kuenzle, C.C., Wyler, R. (1979):**

High C + G content in parapoxvirus DNA.

J.Gen.Virol. 43, 231-234.

- Wolff, T., Pflieger, R., Wehner, T., Reinhardt, J., Richt, J.A.** (2000):  
A short leucine-rich sequence in the Borna disease virus p10 protein mediates association with the viral phospho- and nucleoproteins.  
*J.Gen.Virol.* 81, 939-947.
- Wolffe, E.J., Weisberg, A.S. Moss, B.** (2001):  
The vaccinia virus A33R protein provides a chaperone function for viral membrane localization and tyrosine phosphorylation of the A36R protein.  
*J.Virol.* 75, 303-310.
- Woollett, G.R., Barclay, A.N., Puklavec, M., Williams, A.F.** (1985):  
Molecular and antigenic heterogeneity of the rat leukocyte-common antigen from thymocytes and T and B lymphocytes.  
*Eur.J.Immunol.* 15, 168-173.
- Yirrell, D.L., Reid, H.W. Norval, M., Miller, H.R.P.** (1991a):  
Qualitative and quantitative changes in ovine afferent lymph draining the site of epidermal orf virus infection.  
*Vet. Dermatol.* 2, 133-138.
- Yirrell, D.L., Reid, H.W., Norval, M., Entrican, G., Miller, H.R.P.** (1991b):  
Response of efferent lymph and popliteal lymph node to epidermal infection of sheep with orf virus.  
*Vet. Immunol. Immunopathol.* 28, 219-235.
- Yirrell, D.L., Reid, H.W., Norval, M., Howie, S.E.** (1989):  
Immune response of lambs to experimental infection with Orf virus.  
*Vet. Immunol. Immunopathol.* 22, 321-332.
- Yoshida, T., Imai, T., Kakizaki, M., Nishimura, M., Takagi, S., Yoshie, O.** (1998):  
Identification of single C motif-1/lymphotactin receptor XCR1.  
*J.Biol.Chem.* 273, 16551-16554.
- Yuen, L., Moss, B.** (1987):  
Oligonucleotide sequence signaling transcriptional termination of vaccinia virus early genes.  
*Proc.Natl.Acad.Sci.* 84, 6417-6421.
- Zachary, I.** (2003):  
VEGF signalling: integration and multi-tasking in endothelial cell biology.  
*Biochem.Soc.Trans.* 31, 1171-1177.
- Ziebell, K.L., Steinmann, H., Kretzdorn, D., Schlapp, T., Failing, K., Schmeer, N.** (1997):  
The use of Baypamun N in crowding associated infectious respiratory disease: efficacy of Baypamun N (freeze dried product) in 4-10 month old horses.  
*Zentbl. Veterinärmed.* 44, 529-536.
- Zimmermann, W., Breter, H., Rudolph, M., Ludwig, H.** (1994):  
Borna disease virus: immunoelectron microscopic characterization of cell-free virus and further information about the genome.  
*J.Virol.* 68, 6755-6758.
- Zwick, W.** (1939):  
Bornasche Krankheit und Encephalomyelitis der Tiere.  
In: *Handbuch der Viruskrankheiten* (Herausgeber: F. Gildemeister, E. Haagen und O. Waldmann) G. Fischer Verlag Jena 2, 254f.

## 10 Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
AdTx	thymektomiert
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
as	antisense
BFAV	Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere
BD	Borna Disease, Borna'sche Krankheit
BDV	Borna Disease Virus
Bluo-Gal	halogeniertes Indolyl- $\beta$ -D-Galactosid
bp	Basenpaare
BPS(V)	Bovine Pustuläre Stomatitis (Virus)
BSE	Probenauftragpuffer
bzw.	beziehungsweise
c	komplementär
°C	Grad Celsius
CD	Cluster of Differentiation
CH	Cycloheximid
Ci	Curie
CIP	alkalische Phosphatase aus Kalbsthymus
cpe	cytopathogener Effekt
cpm	counts per minute
CTL	cytotoxische T-Lymphozyten
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidin
DC	Dendritische Zelle
dCTP	2'-Desoxy-Cytidin-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli

---

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIP	early/late Promotor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	fötale Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Gramm bzw. relative Zentrifugalbeschleunigung
GIF	GM-CSF-inhibitorischer Faktor
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating-Factor
h	Stunde
HMFM	Hogness modified freezing medium
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
IAC	Isoamylalkohol-Chloroform
I.E.	Internationale Einheiten
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
IR	Internal Repeat
ITR	Inverted Terminal Repeats
kb(p)	Kilobasen(paare)
kDa	Kilodalton
l	Liter
lacZ	β-Galaktosidase
LB	Luria-Bertoni
LD	letale Dosis
LHZ	Langerhans'sche Zelle
LMT	low melting temperature
m	milli
M	Molaritätseinheit
mcs	multiple cloning site
MEM	Minimal Essential Medium
μg	Mikrogramm
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute
moi	multiplicity of infection (Infektionsdosis)



---

MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MRI	Mordun Research Institute (ORFV WT Virus)
mRNA	messenger RNA
MVA	modified vaccinia virus Ankara
N	Nukleoprotein
ng	Nanogramm
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
ORF	Offenes Leseraster
ORFV	Orf Virus
OVIFNR	Orf Virus-Interferonresistenzgen
p	Plasmid
P	Promotor
p24	Phosphoprotein mit 24 kDa
p40	Phosphoprotein mit 40 kDa
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglykol
Pen	Penicillin
pfu	plaque forming units
p.i.	post infectionem
PO	Peroxidase
PRV	Pseudorabiesvirus
PPV	Parapoxvirus
PVNZ	Parapockenvirus Neuseeland
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s	sense
s.	siehe

---

SSC	Standard Saline Citrat
SSPE	Standard Saline-Phosphat-EDTA
Strep	Streptomycin
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCID	Tissue culture infectious dose
TE	Tris-EDTA
TEAB	Triethanolamin-Puffer
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
Th-Zelle	T-Helferzelle
TK	Thymidinkinase
Tm	Schmelztemperatur
TR	Terminal Repeat
Tris	Trishydroxymethylaminoethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
VACV	Vaccinia Virus
VEGF	vascular endothelial growth factor
WT	Wildtyp
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
w/v	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit
XGPT	Xanthin-Guanosin Phosphoribosyltransferase
ZNS	Zentralnervensystem
%	Prozent

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

---

## L E B E N S L A U F

### Persönliche Daten

Name: Marco Henkel  
Geburtstag: 2. Oktober 1968  
Geburtsort: Sindelfingen  
Familienstand: getrennt lebend (ein Kind)  
Nationalität: Deutsch

### Ausbildung

1975 – 1979 Peter-Rosegger-Grundschule, Gärtringen  
1979 – 1989 Otto-Hahn Gymnasium, Böblingen, Abitur  
  
1989 – 1990 Luftwaffensicherungsstaffel, Klosterlechfeld  
  
1990 – 1991 Chemiestudium, Universität Fridericiana zu Karlsruhe, Karlsruhe  
1991 – 1997 Biologiestudium, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen.  
1996 – 1997 Diplomarbeit an der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Institut für Immunologie, Tübingen unter Anleitung von Herrn Dr. H.-J. Rziha und Herrn Prof. Dr. E. Pfaff zum Thema: Parapockenvirus Orf D1701: Versuche zur Herstellung einer VEGF-negativen Mutante.  
Mai 1997 Diplom in Biologie  
  
06/97 – 12/01 Dissertation an der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Institut für Immunologie, Tübingen unter Anleitung von Herrn Dr. H.-J. Rziha und Herrn Prof. Dr. E. Pfaff zum Thema: Parapockenvirus ORF-Virus D1701: Attenuierung und Herstellung einer Vektorvakzine gegen die Borna'sche Krankheit  
  
01/02 – 06/02 Orientierung auf dem Arbeitsmarkt

### Berufserfahrung

07/02 – 06/05 wiss. Angestellter am Universitätsklinikum Tübingen, Klinik für Radio-onkologie, Exp. Strahlentherapie, AG Herr Prof. Dr. C. Belka und Frau Prof. Dr. V. Jendrossek  
08/05 – 02/07 wiss. Angestellter am Universitätsklinikum Tübingen, Abt. Innere Medizin I, Medizinische Klinik, Molekulare Gastroenterologie, AG Herr Prof. Dr. S. Wesselborg  
Seit 02/07 Angestellter beim Institut Prof. Dr. Jäger in Tübingen