

**Identifizierung von B- und T-Zell-Epitopen des klassischen  
Schweinepestvirus  
mittels synthetischer Peptide**

**DISSERTATION**

der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

2001

vorgelegt von

**Elisenda Armengol Bara**

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Oktober 2001

Dekan: Professor Dr. H. Probst

1. Berichterstatter: Professor Dr. G. Jung

2. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. K.-H. Wiesmüller

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von

Herrn Prof. Dr. G. Jung

in der Zeit von August 1997 bis September 2001 am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen und an der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere in Tübingen durchgeführt.

Herrn Professor Dr. Günther Jung danke ich sehr herzlich für seine Unterstützung und sein mir entgegengebrachtes Vertrauen.



## **Danksagungen**

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich bei allen, die zum Entstehen meiner Arbeit beigetragen haben. Mein besondere Dank gilt:

Herrn Priv. Doz. Dr. Armin Saalmüller für die Überlassung des Themas und des Arbeitsplatzes sowie für seine sehr gute Betreuung

Herrn Priv. Doz. Dr. K.-H. Wiesmüller für seine stete Diskussionsbereitschaft

Herrn Prof. Dr. E. Pfaff und Dr. N. Berger für die Unterstützung bei molekularbiologischen Arbeiten

D. Wienhold für die Durchsicht des Manuskripts und für die moralische Unterstützung

Dr. B. Höhlich, G. Kuebert und Dr. V. Fachinger danke ich für die Unterstützung bei neuen Arbeitsmethoden und ihre Diskussionsbereitschaft

Herrn Prof. Dr. M. Büttner für die Betreuung und Infektion der Versuchstiere

Frau Dr. E. Weiland für die Herstellung der monoklonalen Antikörper

Mein Dank gilt des weiteren der Europäischen Gemeinschaft für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Bei allen Kolleginnen und Kollegen möchte ich mich ganz herzlich für das angenehme Arbeitsklima im Arbeitskreis und ihre Hilfsbereitschaft bedanken.



## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1.EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Die Klassische Schweinepest.....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Das Schweinepestvirus.....	1
1.1.1.1. Taxonomie.....	1
1.1.1.2. Morphologie.....	2
1.1.1.3. Physikalisch-chemische Eigenschaften.....	2
1.1.1.4. Genomorganisation und virale Proteine.....	2
1.1.2. Infektionswege.....	4
1.1.3. Krankheitsbild.....	4
1.1.4. Epidemiologie.....	5
1.1.5. Diagnostik.....	6
1.1.5.1. Virus- und Antigennachweis.....	6
1.1.5.2. Antikörpernachweis.....	6
1.1.6. Die Impfstoffentwicklung.....	7
<b>1.2. Zielsetzung der Arbeit.....</b>	<b>9</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>10</b>
<b>2.1. Material.....</b>	<b>10</b>
2.1.1. Antikörper, Antiseren und Konjugate.....	10
2.1.1.1. Monoklonale Antikörper gegen porcine Leukozyten.....	10
2.1.1.2. Monoklonale Antikörper gegen CSFV.....	11
2.1.1.3. Monoklonale Antikörper und Antiseren gegen porcine Zytokine.....	11
2.1.1.4. Konjugate.....	11
2.1.2. Chemikalien und biologische Produkte.....	12
2.1.3. Geräte.....	14
2.1.4. Peptide.....	16
2.1.5. Puffer, Medien und Lösungen.....	16
2.1.5.1. Puffer.....	16
2.1.5.2. Medien.....	18
2.1.5.3.Lösungen.....	19
2.1.5.3.1. Substratlösungen.....	19

2.1.6. Radioaktive Substanzen.....	20
2.1.7. Kits.....	20
2.1.8. Verbrauchsmaterialien.....	20
2.1.9. Versuchstiere.....	20
2.1.10. Virusstämme.....	21
2.1.11. Zelllinien.....	21
<b>2.2. Methoden.....</b>	<b>22</b>
2.2.1. Infektionsversuche.....	22
2.2.2. Isolierung und Kultivierung von porciner Zellen.....	22
2.2.2.1. Isolierung mononukleärer Zellen.....	22
2.2.2.2. Bestimmung der Anzahl lebender Zellen.....	22
2.2.2.3. Bedingungen für die Zellkultur.....	23
2.2.2.4. Kultivierung von Zelllinien.....	23
2.2.2.5. Einfrieren von Zellen.....	23
2.2.2.6. Auftauen von Zellen.....	23
2.2.3. Charakterisierung von Leukozytenpopulationen mit Hilfe der Durchflußzyto- metrie.....	24
2.2.3.1. Immunfluoreszenzmarkierung von Zellen.....	24
2.2.3.2. Durchflußzytometrische Analysen.....	24
2.2.4. Funktionelle Tests mit Lymphozyten.....	25
2.2.4.1. Lymphoproliferationstest.....	25
2.2.4.2. Zytolytischer Aktivitätstest.....	26
2.2.4.3. IFN- $\gamma$ -ELISPOT-Test.....	27
2.2.5. Gewinnung von Serum bzw. Plasma.....	27
2.2.6. ELISA.....	28
2.2.6.1. Peptid-ELISA.....	28
2.2.6.2. Kompetitions-ELISA.....	28
2.2.7. Virusanzucht und Virustitration.....	29
2.2.7.1. Virusanzucht.....	29
2.2.7.2. Virustitration.....	29
2.2.8. Peptidsynthese.....	30
<b>3. ERGEBNISSE.....</b>	<b>31</b>
<b>3.1. Herstellung synthetischer CSFV-spezifischer Peptide.....</b>	<b>31</b>



<b>3.2. Untersuchung der spezifischen Immunantwort bei CSFV-infizierten</b>	
<b>Schweinen.....</b>	32
3.2.1. Untersuchung der CSFV spezifischen humoralen Immunantwort.....	33
3.2.1.1. Untersuchung von Plasma auf Antikörperreaktivität.....	33
3.2.1.2. Identifizierung von linearen B-Zell-Epitopen.....	34
3.2.1.2.1. Optimierung der ELISA Bedingungen.....	34
3.2.1.2.2. Detektion linearer B-Zell-Epitope im CSFV Polyprotein.....	36
3.2.2. Untersuchung der spezifischen zellvermittelten Immunantwort aus CSFV	
infizierten Schweinen.....	37
3.2.2.1. Stimulation von virusspezifischen T-Lymphozyten durch CSFV.....	38
3.2.2.1.1. Virusstamm-abhängige T-Zell-Stimulation.....	41
3.2.2.2. Stimulation von virusspezifischen T-Lymphozyten durch synthetische	
Peptide.....	42
3.2.2.2.1. Optimierung des peptidspezifischen Proliferationsassays.....	42
3.2.2.2.2. Identifizierung CSFV-spezifischer T-Zell-Epitope.....	44
3.2.2.2.3. Lokalisierung der T-Zell-Epitope des CSFV Stamms Glentorf.....	46
3.2.2.2.4. Charakterisierung der peptidspezifischen T-Zell-Antwort des CSFV-	
Stamms Alfort/187.....	47
3.2.2.2.5. Induktion antigenspezifischer Interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )-Freisetzung.....	50
3.2.2.2.5.1. Interferon- $\gamma$ Freisetzung nach CSFV-Stimulation.....	50
3.2.2.2.5.2. Interferon- $\gamma$ Freisetzung nach Peptidstimulation.....	53
3.2.2.2.6. MHC-Restriktion einer virus- oder peptidspezifischen T-Zell-Proliferation..	55
3.2.2.2.6.1. MHC-Restriktion einer virusspezifischen T-Zell-Proliferation.....	55
3.2.2.2.6.2. MHC-Restriktion einer peptidspezifischen T-Zell-Proliferation.....	56
3.2.2.2.7. Durchflußzytometrische Charakterisierung CSFV stimulierter PBMC.....	58
3.2.2.2.7.1. Nachweis einer Aktivierung von CSFV-restimulierten PBMC.....	58
3.2.2.2.7.2. Phänotypische Charakterisierung von PBMC nach in vitro Restimulation....	60
3.2.2.2.8. Zytolytische Aktivität CSFV-spezifischer T-Lymphozyten.....	64
3.2.2.2.8.1. Zytolytische Aktivität CSFV-spezifischer T-Lymphozyten nach	
Stimulation mit CSFV.....	65
3.2.2.2.8.2. Zytolytische Aktivität CSFV-spezifischer T-Lymphozyten nach	
Stimulation mit dem Peptid 290.....	66

<b>4. DISKUSSION.....</b>	<b>69</b>
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>77</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>78</b>
<b>7. ANHANG.....</b>	<b>97</b>
7.1. Liste der Pentadekapeptide, die das CSFV-Genom abdecken.....	97
7.2. Firmen.....	104

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	anti
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
AS	Aminosäure(n)
b	Basen
BDV	“Border Disease Virus“
BFAV	Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere
Boc	<i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl
Bq	Bequerel
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
BVDV	“Bovine Viral Diarrhea Virus“
°C	Grad Celsius
Cr	Chrom
Ci	Curie
cpm.	radioaktive Zerfälle pro Minute (counts per minute)
CSFV	Virus der Klassischen Schweinepest (Classical swine fever virus)
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
Cy5	Cyan5
DCM	Dichlormethan
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ELISPOT	Enzym Linked Immunospot Assay
ESI	Electrospray-Ionisation
Fa.	Firma
FACS	Durchflußzytometer (fluorescence activated cell sorter)
FCS	fötales Kälberserum (fetal calf serum)

FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht (forward scatter)
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
g	Gramm
h	Stunde
HC	Maximalwert (high control)
HEPES	4-(-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethanosulfonat
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
Ig	Immunglobulin
LC	Minimalwert (low control)
$\mu$	micro
m	milli
mAk	monoklonaler Antikörper
MEM	Minimalmedium (minimal essential medium)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
min	Minute
M	molar
MeOH	Methanol
MOI	Multiplizität der Infektion (multiplicity of infection)
MS	Massenspektrometrie
NIH	National Institute of Health
OD	Extinktion (optical density)
OPD	ortho-Phenylendiamin-dihydrochlorid
ORF	offenes Leseraster (open reading frame)
OtBu	<i>tert.</i> -Butylester ( <i>tert.</i> -Butoxy)
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells)
PBS	Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
p.i.	post infectionem

PNS	Pferdenormalserum
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
SPPS	Festphasenpeptidsynthese (Solid Phase Peptide Synthesis)
SSC	Seitwärtsstreulicht (side scatter)
TCID <sub>50</sub>	50 "tissue culture infectious dose"
TCR	T-Zell-Rezeptor (T cell receptor)
TPB	Tryptose Phosphate Broth
tBu	<i>tert.</i> -Butyl
TFA	Trifluoressigsäure
TFFH	Tetramethylfluorformamidiniumhexafluorphosphat
Trt	Trityl
U	unit



## **1. EINLEITUNG**

### **1.1. Die Klassische Schweinepest**

Die klassische Schweinepest (europäische Schweinepest), im englischen Sprachraum auch als “classical swine fever“ (CSF) oder “Hog Cholera“ bezeichnet, ist eine virale Erkrankung, die unter natürlichen Bedingungen nur beim Haus- und Wildschwein auftritt. Der Erreger der klassischen Schweinepest ist das “classical swine fever virus“ (CSFV), das eine der ökonomisch bedeutendsten Tierseuchen verursacht (Edwards *et al.*, 2000 a). Die Krankheit wurde erstmals 1833 im US-Bundesstaat Ohio beobachtet. Die Beschreibung der Virusätiologie erfolgte durch DeSchweinitz und Dorset (1904) zu Beginn dieses Jahrhunderts. Heute tritt die Krankheit in den Ländern Europas, Zentral- und Südamerikas, Asiens und Afrikas auf.

#### **1.1.1. Das Schweinepestvirus**

##### **1.1.1.1. Taxonomie**

Das CSF-Virus gehört zusammen mit dem Virus der Bovinen Virusdiarrhoe (BVDV) und dem Border-Disease-Virus (BDV) zum Genus der Pestiviren (Fenner, 1976). Die Pestiviren sind serologisch, physikalisch-chemisch und morphologisch miteinander verwandt (Horzinek, 1981). So wurden z.B. für das CSF- und das BVD-Virus serologische Kreuzreaktionen beobachtet (Darbyshire, 1960). Die Pestiviren wurden ursprünglich aufgrund der positiven Polarität und Morphologie ihres Genoms in die Familie der Togaviridae eingeordnet (Horzinek, 1971; Westaway *et al.*, 1985). Später wurden sie aufgrund neuerer Erkenntnisse über ihre Genomorganisation und Replikationsstrategie der Familie der Flaviviridae zugeordnet (Wengler, 1991). Die Familie der Flaviviridae umfaßt weiterhin das Hepatitis C Virus (HCV) und das Flavivirus (Francki *et al.*, 1991).

### **1.1.1.2. Morphologie**

Pestiviren sind kleine umhüllte RNS-Viren mit einer Größe von 40-60 nm (Ritchie & Fernelius, 1967 und 1968; Enzmann & Weiland, 1978). Die Virionen bestehen aus einem Nukleokapsid (30 nm), das von einer mit Glykoproteinen besetzten Lipidhülle umgeben ist (Horzinek *et al.*, 1967 und 1971).

### **1.1.1.3. Physikalisch-chemische Eigenschaften**

Das Virus ist relativ stabil in Exkrementen und frischen Fleischprodukten (Savi *et al.*, 1965). Aufgrund ihrer Lipidhülle sind die Viren empfindlich gegen organische Lösungsmittel und Detergenzien (Moennig, 1988). Eine Abnahme bzw. Zerstörung der Infektiosität kann durch Hitze und Proteasen erzielt werden (Edwards, 2000 b).

### **1.1.1.4. Genomorganisation und virale Proteine**

Das Genom der Pestiviren besteht aus einem einzelnen RNA-Strang mit positiver Polarität (Rümenapf *et al.*, 1989; Collett *et al.*, 1988 a; Moormann *et al.*, 1990).

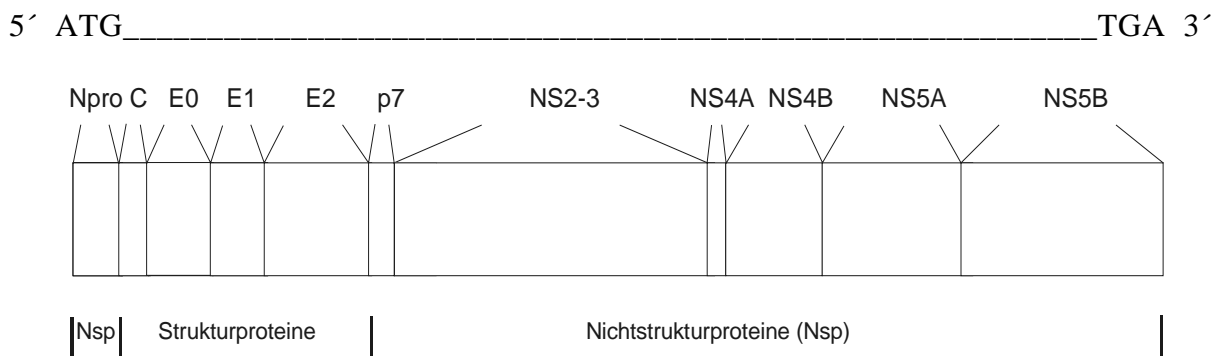
Das Genom von etwa 12,5 Kilobasen (kB) (Moormann & Hulst, 1988; Rümenapf *et al.*, 1989) enthält einen offenen Leserahmen ("open reading frame", ORF), der von nichttranslatierten Bereichen flankiert ist (Collett *et al.*, 1989). Dieser kodiert für ein Polyprotein von etwa 4000 Aminosäuren (Meyers *et al.*, 1989). Das 3'-Ende des Genoms der Pestiviren ist nicht polyadenyliert (Moormann & Hulst, 1988; Renard *et al.*, 1987; Collett *et al.*, 1988 a).

Die viralen Proteine, die vom Genom kodiert werden, entstehen durch co- und posttranslationale Prozessierung eines hypothetischen Polyproteins. Im 5' Bereich des offenen Leserahmens findet sich bei Pestiviren das Nichtstrukturprotein p23, das in der Lage ist, sich autoproteolytisch vom N-terminalen Bereich des Polyproteins abzuspalten (Thiel *et al.*, 1991; Stark *et al.*, 1993). Auf diese N-terminale Protease (N<sup>PRO</sup>) folgen in 3' Richtung des Leserasters das Nukleokapsidprotein p14, sowie die drei Glykoproteine E0 (gp44/48), E1 (gp33) und E2 (gp55) (Thiel *et al.*, 1991; Stark *et al.*, 1990). Einzelne Glykoproteine lassen sich sowohl als Monomere als auch als Dimere nachweisen. Die Proteine E0 und E2 bilden Homodimere. Heterodimer-Bildung konnte für die



Glykoproteine E1 und E2 nachgewiesen werden (Weiland *et al.*, 1990; Thiel *et al.*, 1991). Sowohl das E0 Glykoprotein, welches Ribonukleaseaktivität aufweist (Schneider *et al.*, 1993), als auch das E2 Glykoprotein wurden als Oberflächenproteine auf dem Virion nachgewiesen (Weiland *et al.*, 1992; Unger, 1993). Bei dem Glykoprotein E1 handelt es sich um ein Transmembranprotein (Weiland *et al.*, 1990).

In Richtung des 3'-Endes folgen auf die Sequenzen der Strukturproteine die kodierenden Bereiche der Nichtstrukturproteine p7 (Elbers *et al.*, 1996), NS2-3 (p125), NS4A (p10), NS4B (p30), NS5A und NS5B (p130) (Collett *et al.*, 1988 b; Meyers, 1990; Wiskerchen & Collett, 1991). Die Spaltung von Protein NS2-3 in NS2 und NS3 ist charakteristisch für cytopathogene Biotypen des BVD-Virus (Collett *et al.*, 1991; De Moerloze *et al.*, 1992). Für das CSF Virus konnte ein analoges NS3-Prozessierungsprodukt des NS2-3-Proteins nachgewiesen werden (Thiel *et al.*, 1991). BVDV NS2-3 und der entsprechende Polyproteinbereich von CSFV enthalten typische Sequenzmotive für Helikase, Protease und NTPase (Gorbalenya *et al.* 1989 a und 1989 b; Bazan & Fletterick, 1989). Das NS5B Nichtstrukturprotein weist Sequenzmotive für RNA-abhängige RNA-Polymerasen auf (Meyers *et al.*, 1989).



**Abb.1.: Genomorganisation des CSFV**

Die Abbildung zeigt schematisch die Lage der Struktur- und Nichtstrukturproteine (Nsp) auf dem Genom des CSFV.

### 1.1.2. Infektionswege

Die Infektion von Schweinen mit CSFV erfolgt unter natürlichen Bedingungen oronasal. Das Virus vermehrt sich primär in lymphatischen Organen (Dunne, 1959; Rolle & Mayr, 1984). Nach dem Eintritt in die Blutbahn werden weitere lymphatische Gewebe und das Knochenmark infiziert und eine sekundäre Virusvermehrung findet statt (Ressang, 1973).

Charakteristische Zielzellen für die Virusinfektion sind lymphoretikuläre Zellen, Endothelzellen und Makrophagen (Ressang, 1973)

Das Schweinepest-Virus kann diaplazental auch auf Föten übertragen werden (Frey *et al.*, 1980). Dies ist von der Tragezeit, dem Alter des Schweines und von der Virulenz des Erregers abhängig (van Oirschot & Terpstra, 1977). Die infizierten Ferkel überleben die Geburt häufig nur wenige Wochen (Meyer *et al.*, 1981).

### 1.1.3. Krankheitsbild

Das CSF-Virus tritt in diversen Stämmen auf, die nach Infektion ihres Wirts Krankheitsbilder unterschiedlichen Schweregrades auslösen. Diese beinhalten, neben klinisch inapparenten Formen auch perakute, akute, subakute und chronische Krankheitsbilder. Die verschiedenen Viren werden demnach in hochvirulente (z.B. Stamm Brescia), mäßig-virulente (z.B. Stamm Alfort Tübingen), schwachvirulente (z.B. Stamm Glentorf) und avirulente Stämme (z.B. C-Stamm) eingeordnet (van Oirschot & Terpstra, 1977).

Neben dem beteiligten Virusstamm sind für die Inkubationszeit und den Erkrankungsgrad auch die Virusdosis und verschiedene Wirtsfaktoren, wie Alter, Konstitution, Kondition und Immunkompetenz des Tieres verantwortlich (van Oirschot, 1988).

Tiere, die mit *hochvirulenten* Erregern infiziert wurden, können ein perakutes oder akutes Krankheitsbild ausbilden. Bei einer perakuten Infektion steigt die Körpertemperatur auf bis zu 41 °C an und das Tier stirbt ohne weitere Symptome 2-5 Tage nach Infektion (post infectionem) (Dunne, 1973). Ein akuter Krankheitsverlauf äußert sich durch verschiedene Symptome, wie z.B. Anstieg der Körpertemperatur auf Werte um 41 °C, Leukopenie, Nasenausfluß, Konjunktivitis, zentralnervöse Störungen, posteriore Paresis, Durchfall, Hämorrhagien und Zyanosen der Haut. Viele Tiere sterben

10-14 Tage nach Ausbruch der Krankheit (Trautwein, 1988). Die Mortalität liegt je nach Virusstamm zwischen 30% und 100% (van Oirschot, 1988).

Die *mäßig-virulenten* Virusstämme verursachen entweder subakute oder chronische Krankheitsverläufe. Beim chronischen Verlauf kann man drei Phasen beobachten. In der ersten Phase entspricht der Verlauf dem akuten Krankheitsbild in abgeschwächter Form. Charakteristische Symptome sind Schwäche, Anorexie und Durchfall (Mengeling & Cheville, 1968; Wensvoort & Terpstra, 1985). Nach einer kurzen Erholungsphase, kommt es dann allerdings wieder zu einer Verstärkung der Symptome, die zum Tod führen können (Mengeling & Packer, 1969; Trautwein, 1988).

Im Gegensatz dazu verläuft eine Infektion mit *schwachvirulenten* Stämmen häufig inapparent.

*Avirulente Virusstämme* treten nur unter Laborbedingungen auf und werden zur Impfstoffforschung genutzt.

#### **1.1.4. Epidemiologie**

Die Ausbreitung der Erregers der klassischen Schweinepest erfolgt auf verschiedenen Wegen (Terpstra, 1988; Blaha *et al.*, 1994):

- durch direkten Kontakt von nicht infizierten mit infizierten Schweinen
- durch Verfütterung von nicht oder nicht ausreichend pasteurisierten Schlachtabfällen, da Schweinefleisch und Schweinefleischprodukte über Jahre infektiös bleiben können (Edgar, 1952)
- durch kontaminierte Kleidung oder Instrumente bzw. mangelhafte Reinigung und ungenügende Desinfektion von Transportfahrzeugen
- aerogen (selten)
- durch Arthropoden z.B. Fliegen (Dorset *et al.*, 1919)
- durch den unkontrollierten Einsatz der "modified live"-Vakzine in den fünfziger und sechziger Jahren. In den Jahren 1967 und 1968 traten 21 % aller Schweinepestausbüche in den USA aufgrund dieser Impfung auf (Tillery, 1968)
- durch Wildschweinpopulationen (Harkness & Roeder, 1988). CSFV infizierte Wildschweine wurden in den letzten Jahren in Österreich, Frankreich, Deutschland, Italien und Schweiz beobachtet (Moennig, 2000)

Wie stark sich das Virus ausbreitet hängt insbesondere von seiner Virulenz ab. Je größer die Virulenz eines Erregers ist, um so schneller breitet er sich durch die Ausscheidung von Sekreten in einem Bestand aus und um so einfacher ist andererseits seine Diagnose (Fields, 1995).

### **1.1.5. Diagnostik**

#### **1.1.5.1. Virus- und Antigennachweis**

Die Standardtechnik für den Nachweis des CSF-Virus ist dessen Isolierung in Zellkultur. Die Testproben werden dabei zusammen mit porcinen Zellen inkubiert und der Virusnachweis erfolgt durch CSFV-spezifische Antikörper. Der Test ist aufwendig und dauert ca. 3 Tage. Virusantigennachweis in Gewebeschnitten unter Verwendung der Immunfluoreszenz ist schneller aber weniger sensitiv. Zum "Screening" einer großen Anzahl von CSFV Verdachtsfällen kann der Virus Antigen ELISA verwendet werden. Der Test ist aber nicht so sensitiv wie die Virusisolationmethode. Ein viraler RNA-Nachweis ist eine alternative Methode der Labordiagnose (Paton *et al.*, 2000). Außerdem wird zur Unterscheidung der verschiedenen CSFV-Stämmen die RT-PCR mit anschließender Sequenzierung herangezogen (Hofmann *et al.*, 1994; Lowings *et al.*, 1996; Greiser-Wilke *et al.*, 1998).

#### **1.1.5.2. Antikörpernachweis**

Der Virusneutralisationstest (VNT) ist die sensitivste und spezifischste Methode für den Nachweis CSFV-spezifischer Antikörper. Dabei werden porcine Serum mit einem CSF-Referenzvirus inkubiert. Sind in dem Serum spezifische Antikörper enthalten, so wird das Referenzvirus neutralisiert (Liess & Prager 1976; Holm-Jensen, 1981). Der Test dauert 2-3 Tage. Als weitere Methode werden auch ELISAs zum Antikörper-Nachweis eingesetzt.

### 1.1.6. Die Impfstoffentwicklung

Die bislang verwendeten CSFV-Vakzinen können in Vakzinen aus inaktivierten Viren und Vakzinen aus attenuiertem Viren unterteilt werden.

Ein Problem bei der Herstellung von Vakzinen aus inaktivierten Viren sind die großen Mengen, die einem Tier verabreicht werden müssen. Außerdem muß die erste Impfung über einen Zeitraum von 2 bis 3 Wochen aufgebaut werden. Hinzu kommen die hohen Herstellungskosten und die nur kurz anhaltende Schutzwirkung. Aufgrund dieser Fakten werden solche Impfstoffe für die Bekämpfung der klassischen Schweinepest heute nicht mehr verwendet (Biront & Leunen, 1988).

Ein besserer Impfschutz wurde mit attenuierten Viren erreicht, die entweder zahlreiche Kaninchenpassagen (z.B. C-Stämme) oder Zellkulturpassagen (z.B. Thiverval-Stamm) durchliefen (Launais *et al.*, 1972; Shimizu, 1980). Allerdings kann bei der Immunisierung trächtiger Sauen eine Infektion der Föten nicht immer verhindert werden (Johnson *et al.*, 1974). Auch hat man nach einigen Passagen im Schwein eine Reversion von attenuierten Viren zu virulenten Stämmen beobachtet. Als Gegenmaßnahme wurde in verschiedenen Ländern die Zahl der Passagen in Kaninchen (Aynaud, 1988) oder in Zellkulturen erhöht. Mit den attenuierten Stämmen konnte ein großer Erfolg bei der Bekämpfung der Seuche erzielt werden.

Alle bisher beschriebenen Impfstoffe bieten keine Möglichkeit zwischen Feld- und Impfvirus serologisch zu unterscheiden. Aus diesem Grund wurde die Vakzination von der Europäischen Union (EU) verboten. Das seit 1980 eingeführte EU Bekämpfungsprogramm gegen die Klassischen Schweinepest beruht auf Ausmerzungen infizierter Bestände. Zur Zeit ist eine Impfung mit attenuiertem Virus nur im Ausnahmefall zulässig (EU-Richtlinie 80/217/EEC).

Dennoch wird weiterhin intensiv an der Entwicklung eines zuverlässigen diagnostisch detektierbaren Impfschutzes gearbeitet.

Für die Herstellung eines Impfstoffes gegen das CSF-Virus wurden von der EU folgende Kriterien vorgeschlagen (Biront & Leunen, 1988):

- geringe Herstellungskosten
- genetische Stabilität: keine Reversion zu hochvirulenten Stämmen
- Nachweisbarkeit und Unterscheidbarkeit der geimpften und infizierten Tiere (eindeutige Diagnose)

- langanhaltende Schutzwirkung
- keine pathogenen Effekte der Vakzine (z.B. für Föten von trächtigen Sauen)

Im Gegensatz zu den konventionellen Vakzinen erlauben rekombinante Lebendimpfstoffe und Subunit-Vakzinen die Differenzierung von immunisierten und infizierten Tieren. Eine in der EU zugelassene Marker-Vakzine gegen die Klassische Schweinepest beruht auf im Baculovirussystem exprimierten E2 Glykoprotein von CSFV (van Rijn *et al.*, 1996). Diese Vakzine beruht auf der Tatsache, daß bei Immunisierung von Schweinen mit rekombinantem E2 ein Schutz gegen eine CSFV-Infektion aufgebaut werden konnte (van Zijl *et al.*, 1991; Hulst *et al.*, 1993; Van Rijn *et al.*, 1996). Nach der Immunisierung können vakzinierte und infizierte Tiere durch einen, auf viralen Proteinen (z.B. den Oberflächenglykoprotein E0) basierenden ELISA unterschieden werden. Die Merkmale dieser CSF-Marker-Vakzine wurden von Moenning und Fritzmeier (zitiert nach Ahrens *et al.*, 2000) wie folgt beschrieben: hohe Sicherheit, Induktion von Schutzimmunität, serologische Unterscheidung zwischen geimpften und infizierten Tieren, schnell und langanhaltende Schutzwirkung sowie Schutz gegen eine horizontale und eine vertikale Infektion (Moormann *et al.*, 2000). Eine relativ späte Induktion von neutralisierenden Antikörpern und eine zeitlich begrenzte Immunität sind die Nachteile dieser Art von Vakzine im Vergleich zu der attenuierten C-Stamm Vakzine.

Ein anderer Weg beruht darauf gezielt immunogene Bereiche des Virus zu identifizieren und dadurch Vakzine zu entwickeln, die die jeweiligen spezifischen B- und T-Zell-Epitope des Pathogens enthalten. Im Idealfall reicht eine begrenzte Aminosäurezahl, für eine solche Immunisierung aus, so dass von einer Peptidvakzine gesprochen werden kann. Hunde konnten z.B. mit zwei Pentadecapeptiden, die lineare B-Zell-Epitope des caninen Parvovirus enthielten und an den Immunmodulator KLH (keyhole limpet haemocyanin) gekoppelt waren, immunisiert und vor einer Infektion mit dem Parvovirus geschützt werden (Langeveld *et al.*, 1994).

Eine Verbesserung der Immunisierung wurde durch eine Überlappung von T-Helfer-Zell- und B-Zell-Epitopen erzielt. Solche Impfstoffe sind mittlerweile für verschiedene Viren beschrieben, z.B. Bovinen Herpesvirus-1 (Gao *et al.*, 1999), Influenza Virus (Fitzmaurice *et al.*, 1996). Weitere Versuche zeigten, daß eine Kopplung von B- mit T-

Zell-Epitopen (Cox *et al.*, 1988) oder eine kolineare Synthese der verschiedenen Epitope (Borrás-Cuesta *et al.*, 1987 und 1988) die Immunogenität der Peptidantigene erhöht. Häufig wurden zur Steigerung der Immunogenität der Peptide Adjuvantien wie KLH (Francis *et al.*, 1985), N-Palmitoyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl]-(R)-cysteinyl (Pam<sub>3</sub>Cys) oder inkomplettes Freund'sches Adjuvants (Francis *et al.*, 1987) verwendet. Pam<sub>3</sub>Cys ist ein effektiver Aktivator von neutrophilen Granulozyten (Seifert *et al.*, 1990), Makrophagen (Hauschildt *et al.*, 1990) und NK-Zellen (Obert *et al.*, 1998). Dieses Adjuvans kann außerdem B-Zellen polyklonal stimulieren (Lex *et al.*, 1986) und die Bildung von peptidspezifischen CTL unterstützen (Schild *et al.*, 1991). Nach Immunisierung von Meerschweinchen mit einem Pam<sub>3</sub>Cys gekoppelten Peptid des MKSV waren die Tiere nach einer Belastungsinfektion geschützt (Wiesmüller *et al.*, 1989). Neuere Untersuchungen zeigen den Toll-like Rezeptor 2 als Target für synthetische bakterielle Lipopeptide (Akira *et al.*, 2001; Müller *et al.*, 2001).

## **1.2. Zielsetzung der Arbeit**

Eine wesentliche Voraussetzung für die Entwicklung einer effektiven Peptidvakzine ist die Identifizierung von Epitopen. Das Forschungsvorhaben im Rahmen dieser Doktorarbeit beruht auf der Identifizierung von B- und T-Zell-Epitopen des CSFV mit Hilfe von überlappenden Pentadekapetiden, die 82% des offenen Leserahmens des CSFV abdecken. Dabei war es nötig mit Hilfe verschiedener Testsysteme die humorale und die zelluläre Immunantwort gegen das Virus der klassischen Schweinepest im natürlichen Wirt zu charakterisieren.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Antikörper, Antiseren und Konjugate

##### 2.1.1.1. Monoklonale Antikörper gegen porcine Leukozyten

$\alpha$ CD4	mAk 74-12-4 (Maus IgG <sub>2b</sub> ; $\kappa$ ) American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, USA (Pescovitz <i>et al.</i> , 1984)
$\alpha$ CD8	mAk 11/295/33 (Maus IgG <sub>2a</sub> ; $\kappa$ ) BFAV Tübingen (Jonjic & Koszinowski, 1984)
$\alpha$ CD25	mAk K231-3B2 (Maus IgG <sub>1</sub> ; $\kappa$ ) freundlicherweise erhalten von Dr. C. Stokes, University of Bristol, UK (Bailey <i>et al.</i> , 1992)
$\alpha$ CD45	mAk 3a56 (Maus IgG <sub>1</sub> ; $\kappa$ ) BFAV Tübingen (Zuckermann <i>et al.</i> , 1994)
$\alpha$ MHC-I	mAk 74-11-10 (Maus IgG <sub>2b</sub> ; $\kappa$ ) freundlicherweise erhalten von Dr. J. K. Lunney, USDA Beltsville, MD, USA (Pescovitz <i>et al.</i> , 1984)



$\alpha$ MHC-II      mAk MSA3 (Maus IgG<sub>2a</sub>;  $\kappa$ )  
freundlicherweise erhalten von Dr. Hammerberg, Virginia  
Polytechnic Institute, Blacksburg, USA  
(Hammerberg & Schurig, 1986)

#### **2.1.1.2. Monoklonale Antikörper gegen CSFV**

$\alpha$ E2              mAk a18 (Maus IgG<sub>2a</sub>;  $\kappa$ )  
BFAV Tübingen  
(Weiland et al., 1990)

#### **2.1.1.3. Monoklonale Antikörper und Antiseren gegen porcine Zytokine**

Maus-anti-Schwein-Interferon- $\gamma$  (mAk)                      Fa. Endogen

Kaninchen-anti-Schwein-Interferon- $\gamma$  (polyclonal Ak)      Fa. Endogen

#### **2.1.1.4. Konjugate**

##### **Biotinylierte Antikörper**

Ziege-anti-Maus-IgG<sub>2a</sub>-biotin                                      Fa. Biozol

##### **Fluorochrom-markierte Antikörper**

Ziege-anti-Maus-IgG<sub>2b</sub>, FITC-konjugiert                      Fa. Biozol

Ziege-anti-Maus-IgG<sub>1</sub>, PE-konjugiert                         Fa. Biozol

Cy5 konjugiertes Streptavidin (Strept-Cy5)                Fa. Dianova

## Peroxidasekonjugate

Peroxidase konjugiertes Ziege-anti-Maus IgG (H+L)	Fa. Bio-Rad
Peroxidase konjugiertes Ziege-anti-Schwein IgG (H+L)	Fa. Biozol

### 2.1.2. Chemikalien und biologische Produkte

Aminoethylcarbazole (AEC)	Fa. Sigma
β-Mercaptoethanol	Fa. Merck
Bovines Serum Albumin (BSA), Fraktion V, pH 7	Fa. Serva
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Fa. Merck
3,3'-Diaminobenzidine (DAB)	Fa. Sigma
Dichlormethan (DCM)	Fa. Fluka
Diethylether	Fa. SDS
Diisopropylcarbodiimid (DIC)	Fa. Fluka
Dimethylformamid (DMF)	Fa. Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fa. Merck
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Fa. Merck
Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM)	Fa. GibcoBRL
E2 Glykoprotein	Fa. Bayer
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Fa. Serva
Ethanol	Fa. Roth
Ethandithiol	Fa. Fluka
Ficoll-Paque	Fa. Pharmacia
Fmoc-Aminosäuren	Fa. Novabiochem
Fötales Kälberserum (FCS)	Fa. PAA
Harnstoff	Fa. Sigma
Heparin-Natrium	Fa. Serva
Hepes	Fa. Serva
Hydroxybenzotriazol (HOBt)	Fa. Fluka
Kaliumchlorid (KCl)	Fa. Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Fa. Merck
L-15	Fa. Life Technologies

L-Glutamin	Fa. Merck
Magnesiumchloridhexahydrat ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	Fa. Merck
MEM $\alpha$	Fa. GibcoBRL
MEM-NEAA	Fa. GibcoBRL
Methanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ )	Fa. SDS
Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ )	Fa. Merck
Natriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Fa. Merck
Ortho-Phenylendiamin-Dihydrochlorid (OPD)	Fa. Sigma
Penicillin	Fa. Grünenthal
Pferdenormalserum (PNS)	Fa. Biochrom KG
Phenol	Fa. Fluka
Piperidin	Fa. Merck
Schwefelsäure ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )	Fa. Merck
Streptomycinsulfat	Fa. Serva
<i>tert.</i> -Butylalkohol	Fa. Merck
Thioanisol	Fa. Fluka
Trifluoressigsäure (TFA)	Fa. SDS
Trypanblau	Fa. Serva
Trypsin	Fa. Difco
Tryptose-Phosphate-Broth (TPB)	Fa. Difco
Tween 20	Fa. Serva
Wang-Harz	Fa. Novabiochem
Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )	Fa. Merck
Zitronensäure-Monohydrat	Fa. Merck

### 2.1.3. Geräte

#### Durchflußzytometer:

FACStar plus	Fa. Becton Dickinson
Argon Laser, Spinnaker 1361	Fa. Spectra Physics
Helium-Neon-Laser, Modell 127	Fa. Spectra Physics

#### Elektrospray-Massenspektrometrie:

Triple-Quadropol-Massenspektrometer (VG Quattro II)	Fa. Micromass
Elektrospray-Ionenquelle	

#### ELISA-Meßgerät:

Multiskan MC	Fa. Titertek
--------------	--------------

#### Feinwaagen:

M160/M80	Fa. Sauter
MC1 Analytic 210S	Fa. Sartorius

#### Gammastrahlenmeßgerät:

Cobra Autogamma	Fa. Packard
-----------------	-------------

#### HPLC

Hochdruck-Pumpensystem, Modell 480	Fa. Gynkotek
Automatischer Probengeber, Modell Gina 160	
Photodiodenarraydetektor UVD-320	
Nucleosil C18-Säule	Fa. Grom

#### Mikrowellenherd:

Mikromat	Fa. AEG
----------	---------

#### Mikroskop:

Diavert Invertmikroskop	Fa. Leitz
-------------------------	-----------

Mixer:

Vortex Fa. Bender & Hobein

Peptidsynthesizer:

Syro-Pipettierroboter Fa. MultiSynTech

Szintillationszähler:

Microbeta 1450 Fa. Wallac

Ultrafiltrationsanlage zur Herstellung von bidestilliertem Wasser:

Milli Q-Ultrafiltrationsanlage Fa. Millipore

Ultraschallgerät:

Bransonic 1200 Ultrasonic cleaner Fa. Branson

Wasserbad:

Wasserbad GFL Fa. GfL

Zählkammer:

Neubauer-Zählkammer Fa. Fisher Scientific

Zellerntegerät:

Cell Harvester Fa. Inotech

Zellkultur:

Brutschrank Fa. Heraeus

Sterilbank Laminair Fa. Heraeus

Zentrifugen:

Zentrifuge	Fa. Eppendorf
Megafuge 1,0R	Fa. Heraeus
Biofuge 13	Fa. Heraeus
Zentrifuge für Mikrotiterplatten	Fa. Hermle

### 2.1.4. Peptide

Es wurden 573 Pentadekapeptide synthetisiert (Armengol, 1997), die eine Überlappung von 10 Aminosäuren enthalten. Die Peptide wurden in 1% DMSO in einer Konzentration von je 1 mg/ml gelöst. Alle weiteren Verdünnungen wurden entweder in H<sub>2</sub>O oder in Medium durchgeführt.

### 2.1.5. Puffer, Medien und Lösungen

#### 2.1.5.1 Puffer

PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung), pH 7,2

0,5 mM	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O
0,7 mM	CaCl <sub>2</sub>
1,5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
140 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
6,5 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
in Aqua bidest.	

PBS-A, pH 7,2

1,5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
140 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
6,5 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
in Aqua bidest.	

PBS-Tween: wie PBS-A, jedoch mit 0,05 (v/v) % Tween 20

FACS-Puffer

3 (v/v) % FCS in PBS-A

ELISA-Waschpuffer

0,1 (v/v) % Tween 20 in PBS

Na-Acetatpuffer, pH 5,0

0,05 M  $\text{H}_3\text{CCOO}^- \text{Na}^+ \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

0,0009 (v/v) %  $\text{CH}_3\text{COOH}$

TPB-Puffer

29,5 g Tryptose-Phosphate-Broth

in 1 l Aqua bidest.

Versen-Trypsin-Puffer, pH 7,2

14 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

2 mM EDTA

6,5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

0,125 mg/ml Trypsin

135 mM NaCl

in Aqua bidest.

### 2.1.5.2. Medien

#### Lymphozytenkulturmedium

500 ml	MEM $\alpha$
10 (v/v) %	FCS
100 IU/ml	Penicillin G
0,1 mg/ml	Streptomycinsulfat
2 mM	L-Glutamin
0,05 mM	$\beta$ -Mercaptoethanol
10 mM	HEPES (pH 7,2)

#### Medium für STE-Zellen

40 (v/v) %	MEM-NEAA
40 (v/v) %	L-15
10 (v/v) %	TPB
10 (v/v) %	Pferdeserum
100 IU/ml	Penicillin G
0,1 mg/ml	Streptomycinsulfat

#### Medium für MAX-Zellen

500 ml	DMEM
10 (v/v) %	FCS
100 IU/ml	Penicillin G
0,1 mg/ml	Streptomycinsulfat
2 mM	L-Glutamin
0,05 mM	$\beta$ -Mercaptoethanol
10 mM	HEPES (pH 7,2)



### Einfriermedium

50 (v/v) %	Lymphozytenkulturmedium
40 (v/v) %	FCS
10 (v/v) %	DMSO

### 2.1.5.3. Lösungen

#### Trypanblaulösung

0,25 (v/v) %	Trypanblau in 0,15 M NaCl
--------------	---------------------------

#### Abspaltlösung

6,27 (v/v) %	Phenol
4,14 (v/v) %	Thioanisol
2,13 (v/v) %	1,2-Ethandithiol
5 (v/v) %	Aqua bidest
82,46 (v/v) %	TFA

### 2.1.5.3.1. Substratlösungen

#### OPD-ELISA-Substratlösung

4,67 g	Zitronensäure
9,15 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
0,5 g	OPD
in 1 l Aqua bidest.	

#### AEC-Substratlösung

3 mg	AEC
0,75 ml	DMF
14,25 ml	Na-Acetatpuffer

### 2.1.6. Radioaktive Substanzen

(Methyl- <sup>3</sup> H)-Thymidin	Fa. Amersham Buchler
Na <sub>2</sub> <sup>51</sup> CrO <sub>4</sub>	Fa. Amersham Buchler

### 2.1.7. Kits

CHEKIT <sup>®</sup> CSF-SERO	Fa. Hoechst
DAB-Substratlösung	Fa. Sigma

### 2.1.8. Verbrauchsmaterialien

Abdeckplatten für Mikrotiterplatten	Fa. Greiner
Einfrierröhrchen; 1,8 ml	Fa. Greiner
Einschweißfolien für radioaktive Filter	Fa. Wallac
Eppendorfröhrchen; 1,5 ml, 2 ml	Fa. Eppendorf
FACS-Röhrchen, Falcon	Fa. Becton Dickinson
Feststoffsintillator Meltilex A	Fa. Wallac
Gewebekulturflaschen: 50 ml, 250 ml, 500 ml	Fa. Greiner
Mikrotiterplatten, Rundboden	Fa. Greiner
Mikrotiterplatten, Flachboden	Fa. Greiner
Nitrozelluloseplatten	Fa. Millipore
Nunc-Immuno Plate Maxisorb	Fa. Nunc
Petrischalen	Fa. Greiner
Probenröhrchen für Gammastrahlenmeßgerät	Fa. Sarstedt
Röhrchen, 15ml, 50ml	Fa. Greiner
Szintillationsfilter (Printed Filtermat A)	Fa. Wallac

### 2.1.9. Versuchstiere

An der BFAV gezüchtete Inzuchtschweine vom d/d-Haplotyp (NIH-Minipigs) (Sachs *et al.*, 1976; Thistlethwaite *et al.*, 1984).

### **2.1.10. Virusstämme**

“Classical swine fever virus“ (CSFV), Stamm Alfort/187 (Aynaud, 1976; Ruggli *et al.*, 1996) and Stamm Glentorf (Pittler *et al.*, 1968), erhalten von Dr. R. Ahl, BFAV Tübingen.

### **2.1.11. Zelllinien**

MAX-Zelllinie: Transformierte Nierenzellen eines d/d-Inzuchtschweines.  
Erhalten von Dr. T. Pauly, BFAV, Tübingen (Pauly *et al.*, 1995).

STE-Zelllinie: Swine testis epitheloid Zellen (STE) (McClurkin *et al.*, 1966).  
Erhalten von Dr. R. Ahl, BFAV, Tübingen.

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Infektionsversuche**

Zwei Inzuchtschweine (NIH-Minipigs, d/d-Haplotyp; Schwein 1 und 18) und ein outbred Schwein (Schwein 39) wurden intramuskulär (i.m.) mit CSFV infiziert. Schwein 1 wurde mit  $10^4$  TCID<sub>50</sub> CSFV-Alfort/187 und Schwein 18 und 39 mit  $10^6$  TCID<sub>50</sub> CSFV-Glentorf infiziert. Die Tiere 1 und 18 wurden zweimal, Tier 39 einmal im monatlichen Abstand einer Challengeinfektion unterworfen. Schwein 1 wurde dabei mit 500 TCID<sub>50</sub> CSFV-Alfort/187 und die Schweine 18 und 39 mit  $10^6$  TCID<sub>50</sub> CSFV-Glentorf inokuliert. Plasma bzw. Serum und Blutproben wurden vor der Infektion und zu bestimmten Zeitpunkten nach dem jeweiligen Infektionen entnommen.

### **2.2.2. Isolierung und Kultivierung von porciner Zellen**

#### **2.2.2.1. Isolierung mononukleärer Zellen**

Zur Gewinnung mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) wurde heparinisiertes Blut im Verhältnis 1:1 mit PBS verdünnt. Davon wurden je 30 ml auf 15 ml Ficoll-Paque (Dichte 1,077 g/ml) geschichtet (Boyum, 1964). Nach Zentrifugation (30 min, 800 x g, RT) konnten die PBMC aus der Interphase zwischen Serum und Ficoll entnommen werden. Die PBMC wurden zweimal mit PBS und einmal mit Lymphozytenkulturmedium gewaschen (10 min, 500 x g, 4 °C).

#### **2.2.2.2. Bestimmung der Anzahl lebender Zellen**

Zur Bestimmung der Vitalität der isolierten PBMC wurde der “Trypanblau-Exklusionstest“ durchgeführt. Aliquots der Zellsuspensionen wurden mit einer Trypanblaulösung versetzt. Tote Zellen wurden durch den Farbstoff blau gefärbt. Die Zahl der ungefärbten, lebenden Zellen konnte in einer Neubauer-Zählkammer im Mikroskop bestimmt werden.

### **2.2.2.3. Bedingungen für die Zellkultur**

Die Inkubationsschritte bei Zellkulturarbeiten wurden in einem feuchten Brutschrank mit 5 % CO<sub>2</sub> bei 37 °C durchgeführt.

### **2.2.2.4. Kultivierung von Zelllinien**

Die Kultivierung der STE-Zellen erfolgte in 50 ml oder 250 ml Plastikgewebekulturflaschen mit 5 oder 12 ml STE Medium. Die MAX-Zellen wurden in 500 ml Gewebekulturflaschen mit 25 ml DMEM Medium kultiviert. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Sobald sich ein dichter einschichtiger Zellrasen gebildet hatte, wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen mit Trypsinlösung (ca. 10 min) abgelöst. Die abgelösten Zellen konnten in frischem Kulturmedium auf neue Gewebekulturflaschen im Verhältnis 1:3 bis 1:4 verteilt werden.

### **2.2.2.5. Einfrieren von Zellen**

Die Zellen wurden in kaltem Einfriermedium in einer Konzentration von 1-3x10<sup>7</sup> Zellen/ml in Einfrierröhrchen aufgenommen. Vor Lagerung der Proben in flüssigem Stickstoff wurden die Zellen für 48 Stunden auf -70 °C heruntergekühlt.

### **2.2.2.6. Auftauen von Zellen**

Eingefrorene Zellen wurden im Wasserbad bei 37 °C bis zum Gefrierpunkt aufgetaut, in 20 ml kaltem Lymphozytenkulturmedium aufgenommen und zweimal gewaschen (10 min, 500 x g).

### **2.2.3. Charakterisierung von Leukozytenpopulationen mit Hilfe der Durchflußzytometrie**

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

#### **2.2.3.1. Immunfluoreszenzmarkierung von Zellen**

Um den Phänotyp von PBMC zu charakterisieren wurde eine Dreifarbenimmunfluoreszenz durchgeführt.  $1 \times 10^6$  Zellen wurden nach folgendem Protokoll markiert:

1. Inkubation mit jeweils 0,1 ml von folgenden murinen monoklonalen Antikörpern (mAk) mit unterschiedlichen Isotypen: anti-CD4 (IgG<sub>2b</sub>), anti-CD8 (IgG<sub>2a</sub>) und entweder anti-CD25 (IgG<sub>1</sub>) oder anti-CD45 (IgG<sub>1</sub>).
2. Inkubation mit jeweils 0,1 ml von folgenden isotypspezifischen anti-Maus-Antikörpern:  $\alpha$ IgG<sub>2b</sub>-FITC,  $\alpha$ IgG<sub>1</sub>-PE,  $\alpha$ IgG<sub>2a</sub>-biotin.
3. Inkubation mit 0,1 ml Streptavidin-Cy5.

Alle Inkubationsschritte wurden für 20 min bei 4 °C durchgeführt. Nach jedem Inkubationsschritt wurden die Zellen zweimal mit je 1 ml FACS-Puffer gewaschen und zentrifugiert (5 min, 500 x g). Die markierten Zellen wurden in FACS-Puffer resuspendiert und  $2,5 \times 10^4$  Zellen pro Probe im Durchflußzytometer analysiert. PBMC, die mit den bei Schritt 2 und 3 eingesetzten Fluorochromkonjugaten markiert worden waren, dienten als Kontrolle. Alle Antikörper und Konjugate wurden vor ihrer Verwendung in der Durchflußzytometrie austitriert und in FACS-Puffer entsprechend verdünnt.

#### **2.2.3.2. Durchflußzytometrische Analysen**

Die fluoreszenzmarkierten Zellen wurden mit einem Durchflußzytometer, das mit einem Argon- und Helium-Neon-Laser ausgerüstet war, analysiert. Streulicht- und Fluoreszenzsignale einzelner Zellen wurden mit Hilfe spezifischer Detektoren gemessen. Die Streulichtparameter enthalten das Vorwärtsstreulicht und das

Seitwärtsstreulicht. Das Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) definiert Zellpopulationen aufgrund ihrer Größe. Das Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC) stellt ein relatives Maß für die intrazelluläre Granulation der Zellen dar. Durch weitere fluoreszenzabhängige Parameter können Oberflächenantigene sichtbar gemacht werden. Dabei wird die Fluoreszenzintensität von Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE) und Cy5 durch die unterschiedlichen Wellenlängen des emittierten Lichtes unterschieden. Die Quantifizierung der Fluoreszenz- und Streulichtemissionen jeder einzelnen Zelle wurde gespeichert. Die Daten wurden anschließend mit Hilfe von Computerprogrammen (PC-Lysis und Cell Quest) ausgewertet.

## **2.2.4. Funktionelle Tests mit Lymphozyten**

### **2.2.4.1. Lymphoproliferationstest**

PBMC wurden in einer Konzentration von  $10^6$  Zellen/ml in Lymphozytenkulturmedium resuspendiert und in einer Rundbodenmikrotiterplatte ausplattiert. Die Zellen wurden entweder mit Virus ( $2 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub> CSFV Alfort/187 oder  $5 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub> CSFV Glentorf pro Vertiefung) oder mit Peptiden (12,5 µg/ml und 25 µg/ml) stimuliert. Nach 5tägiger Inkubation der Zellen bei 37°C in 5 % CO<sub>2</sub> wurde 37 kBq (1 µCi) [<sup>3</sup>H]Thymidin pro Vertiefung zugegeben und die Kultur für weitere 18 Stunden inkubiert. Danach wurde die Mikrotiterplatte eingefroren um den [<sup>3</sup>H]Thymidineinbau zu stoppen und die Zellen zu lysieren. Mit Hilfe eines Zellerntegerätes (Cell Harvester) wurde der Inhalt der Mikrotiterplatte auf Filtermatten gesaugt. Nach Trocknen der Filter in einem Mikrowellengerät (160 W, ca. 5 min) wurde die Feststoffszintillatorplatte auf diese Filter aufgeschmolzen. Schließlich konnten die abgekühlten Filter in einen Folienbeutel eingeschweißt und die Menge des eingebauten [<sup>3</sup>H]Thymidins im Szintillationszähler gemessen werden. Alle Messungen wurden als Vierfachbestimmung durchgeführt. Der Stimulationsindex (SI) berechnete sich als: cpm stimulierte Mikrokulturen/cpm Mikrokulturkontrolle. Ein Stimulationsindex  $\geq 2$  wurde als positiv angesehen.

#### 2.2.4.2. Zytolytischer Aktivitätstest

Zur Untersuchung der CSFV-spezifischen zytolytischen Aktivität von T-Lymphozyten wurden  $^{51}\text{Cr}$  Freisetzungstests durchgeführt. CSFV-spezifische zytolytische T-Lymphozyten (Effektorzellen, cytolytic T lymphocytes, CTL) stammten aus PBMC eines CSFV-Glentorf infizierten Schweines. Die PBMC wurden in einer Konzentration von  $10^6$  Zellen/ml in Lymphozytenkulturmedium aufgenommen und *in vitro* mit CSFV (Stamm Glentorf; MOI 0,5) für 6 Tage in Rundbodenmikrotiterplatten restimuliert.

Als Zielzellen im Chromfreisetzungstest dienten MAX-Zellen, die mit CSFV (Stamm Glentorf, MOI 1) für 48 Stunden inkubiert wurden.  $1 \times 10^6$  dieser MAX-Zellen wurden mit  $100 \mu\text{Ci Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  für 60 min ( $37^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ ) markiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die Zellen in Lymphozytenkulturmedium aufgenommen. Für die Peptidansätze wurden  $4 \times 10^4$  nicht-infizierte, Chrom-markierte Zielzellen mit  $20 \mu\text{g}$  Peptid für eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Die Effektorzellen wurden in einer Konzentration von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt und in log-2 Stufen in drei Parallelansätzen in Rundbodenmikrotiterplatten titriert.  $100 \mu\text{l}$  Virus-infizierte oder mit Peptid-inkubierte Zielzellen wurden in einer Konzentration von  $1 \times 10^4$  Zellen/ml zu den titrierten Effektorzellen gegeben. Der Ansatz wurde zentrifugiert (5 min,  $100 \times g$ ) und 4 Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach Zentrifugation der Zellen (10 min,  $600 \times g$ ) wurde die Menge von freigesetztem  $^{51}\text{Cr}$  durch Lyse der Zielzellen in  $100 \mu\text{l}$  Überstand pro Mikrokultur gemessen.

Die Berechnung der spezifischen Lyse erfolgte nach folgender Formel:

$$\% \text{ spezifische Lyse} = ((\text{cpmX} - \text{cpm LC}) / (\text{cpm HC} - \text{cpm LC})) \times 100$$

X	die Probe
LC (low control)	Spontanlyse der Zielzellen im Kulturmedium
HC (high control)	Gesamteinbau von radioaktivem $^{51}\text{Cr}$ in die Zielzellen
cpm	radioaktive Zerfälle pro Minute



Als Kontrolle diente die Chromfreisetzung mit Überstand aus mock-infizierten Zielzellen oder mit negativem Peptid behandelten Zielzellen, die mit Effektorzellen inkubiert wurden.

#### **2.2.4.3. IFN- $\gamma$ -ELISPOT-Test**

Zu einer Quantifizierung von IFN- $\gamma$  freisetzenden Zellen wurde der IFN- $\gamma$  ELISPOT-Test eingesetzt. Eine Nitrozelluloseplatte wurde mit einem monoklonalen Antikörper gegen porcines IFN- $\gamma$  (5  $\mu\text{g/ml}$  in PBS-A; 100  $\mu\text{l}$ /Vertiefung) über Nacht bei 4 °C beschichtet. Die Vertiefungen wurden mit PBS-A gewaschen und mit 200  $\mu\text{l}$  Lymphozytenkulturmedium für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. PBMC aus CSFV infizierten Schweinen wurden in verschiedenen Konzentrationen (1,25x10<sup>5</sup> bis 1x10<sup>6</sup> Zellen/Mikrokultur) mit 100  $\mu\text{l}$  Virussuspension (2x10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub> CSFV-Alfort/187 oder 5x10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub> CSFV-Glentorf /Vertiefung) in Parallelansätzen in der Antikörper beschichteten Platte inkubiert. Für die Peptidansätze wurden die PBMC (1x10<sup>6</sup> Zellen/Vertiefung) mit Peptid 290 (5  $\mu\text{g/ml}$  bis 100  $\mu\text{g/ml}$  pro Vertiefung) stimuliert. Als Kontrolle dienten PBMC, die mit Überstand aus mock-infizierten Zellen oder mit negativem Peptid inkubiert wurden. Die Platte wurde dann für 44-48 Stunden bei 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach Waschen der Platten mit PBS-A erfolgte die Zugabe eines in PBS-A verdünnten anti-IFN- $\gamma$ -Kaninchenserums (2,5  $\mu\text{g/ml}$ ). Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Platte mit PBS-A gewaschen und ein Peroxidase-gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (1:200 in PBS-A verdünnt) zugegeben. Nach Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur wurden die Vertiefungen mit PBS-A gewaschen. Die Färbung der IFN- $\gamma$  spezifischen Spots erfolgte durch Zugabe von 3,3'-Diaminobenzidine (DAB). Nach 4-7 min wurde die Reaktion durch Waschen mit PBS-A und H<sub>2</sub>O gestoppt. Die Platten wurden anschließend über Nacht getrocknet und die Spots mit einem Stereomikroskop ausgezählt.

#### **2.2.5. Gewinnung von Serum bzw. Plasma**

Zur Gewinnung von Serum wurde das Blut bei Raumtemperatur inkubiert bis es geronnen war. Das Fibrin und die Blutzellen wurden durch Zentrifugation bei 2300 x g für 20 min abgetrennt.

Zur Gewinnung von Plasma wurde heparinisiertes Blut (0,1 mg Heparin/ml Blut) zentrifugiert und die Überstände bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

## **2.2.6. ELISA**

### **2.2.6.1. Peptid-ELISA**

Um lineare B-Zell-Epitope zu bestimmen wurde der Peptid-ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) durchgeführt.

Die ELISA-Platten (Nunc-Immuno Plate Maxisorb) wurden, soweit nicht anders angegeben, mit einer Peptidlösung (40  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{l}$  pro Vertiefung) beschichtet und über Nacht bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingetrocknet. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern, wurden danach die Platten in PBS mit 3 % BSA für 2 Stunden bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach dem Blockierungsschritt wurden die Platten dreimal mit PBS-Tween gewaschen und anschließend mit Plasma (Verdünnung 1:100 PBS/3 % BSA, wenn nicht anders angegeben) für 1 Stunde bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde ein Peroxidase-konjugierter Ziege-anti-Schwein-Antikörper (1:3000 in PBS/3 % BSA) zugegeben und für 1 Stunde bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach fünf weiteren Waschschritten wurden zur Färbung eine OPD-Substratlösung (50  $\mu\text{l/Vertiefung}$ ) mit 0,04  $\mu\text{l/ml}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  zugegeben. Das Abstoppen der Farbreaktion erfolgte nach ca. 10 min im Dunkeln mit 2 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (100  $\mu\text{l/Vertiefung}$ ). Die Messung der Farbintensität wurde mit Hilfe eines ELISA-Meßgeräts bei 492 nm vorgenommen. Als Positivkontrolle wurde das rekombinante E2 Glykoprotein von CSFV Stamm Brescia verwendet. Als Negativkontrolle wurde das Peptid Nr. 5 eingesetzt. Für jeden ermittelten Wert wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

### **2.2.6.2 Kompetitions-ELISA**

Zum Nachweis von CSFV-spezifischen Antikörpern im Blutserum und -plasma von Schweinen wurde ein Enzymimmuntest (CHEKIT-CSF-SERO) verwendet. Der Test wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

## **2.2.7. Virusanzucht und Virustitration**

### **2.2.7.1. Virusanzucht**

Zur Vermehrung von CSFV wurden STE-Zellen in Suspension mit CSFV und einer MOI von 0,02 bis 0,2 in Kulturgefäßen infiziert. Nach 3 Tagen Inkubation bei 37 °C wurden die infizierten Zellkulturen bei -70 °C eingefroren, um durch Lyse der Zellen intrazelluläres CSFV freizusetzen. Zur Abtrennung der Zelltrümmer von virushaltigem Überstand wurde das Lysat bei 2000 x g und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Die Virusernte wurde aliquotiert und bei -70 °C gelagert.

### **2.2.7.2. Virustitration**

Zur Bestimmung der Viruskonzentrationen wurden CSFV-haltige Suspensionen in Kulturmedium über mehrere Stufen auf Flachbodenmikrotiterplatten titriert.

STE-Zellen wurden so auf Flachbodenmikrotiterplatten ausgesät, daß nach 3-tägiger Inkubation (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) 90 % Konfluenz erreicht war. Nach der Inkubation wurde der Zellrasen gewaschen, getrocknet und für 20 min bei 4 °C mit 100 µl Ethanol pro Vertiefung fixiert. Anschließend wurde die Platte getrocknet und ein anti-E2 monoklonaler Antikörper (mAk a18; 1:40 in PBS) dazugegeben. Nach einer Stunde Inkubation bei 37 °C wurde die Platte dreimal gewaschen und ein Peroxidase-konjugierter Ziege-anti-Maus-Antikörper (1:1000 in PBS) zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 37 °C wurde die Platte fünfmal gewaschen und eine AEC Substratlösung mit 0,1 µl/ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 µl/Vertiefung) zugegeben. Nach ca. 15-20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde der Zellrasen nochmals gewaschen und 100 µl Waschpuffer pro Vertiefung einpipettiert. Anschließend wurde der Virustiter durch Auszählen der gefärbten Plaques im Mikroskop bestimmt.

### 2.2.8. Peptidsynthese

In der vorliegenden Arbeit wurde die Synthese der Peptide nach der Festphasen-peptidsynthese (Merrifield, 1963; Merrifield, 1985) durchgeführt. Die Peptide wurden nach der Fmoc-Strategie (Fields & Noble, 1990) in einem multiplen Peptidsynthesizer hergestellt. Wang-Harz wurde als Festphase verwendet. Das Harz wurde vor der Synthese mit DMF vorgequollen.

Zur Kupplung wurden die Fmoc-geschützten Aminosäuren in HOBt/DMF (0,6 M) gelöst und in zehnfachem Überschuß bezogen auf die Harzbelegung eingesetzt. Schwerlösliche Aminosäuren wurden für 10 min mit Ultraschall behandelt. Als Kupplungsreagenz wurden DIC (1,5 M in DMF/DCM (2:1)) und HOBt verwendet. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgte mit Piperidin/DMF (1:1). Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten wurden die Harze mit DMF gewaschen.

Nach der Synthese wurden die Harze je dreimal mit Methanol (1ml) und Diethylether (1ml) gewaschen um verbliebene Reagenzien und DMF zu entfernen. Danach wurden diese über Nacht getrocknet.

Die Abspaltung des Peptides vom Harz erfolgte durch Zugabe von 500 µl Abspalllösung je Reaktionsgefäß. Nach drei Stunden wurde die Abspalllösung über eine Fritte in ein Zentrifugen-Röhrchen filtriert und tiefgekühlter Diethylether (5 ml) zugegeben. Zur vollständigen Fällung wurden die Lösungen 14 Stunden bei -20°C aufbewahrt, abzentrifugiert (3000 x g; 5 min) und der Überstand dekantiert und verworfen. Das verbleibende Peptid wurde zweimal mit Diethylether (2 ml) gewaschen. Schließlich wurden die Peptide in *tert.*-Butylalkohol/Wasser (1:4, 5 ml) gelöst und lyophilisiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Peptide mit der Electrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) charakterisiert und die Reinheit mittels HPLC überprüft.

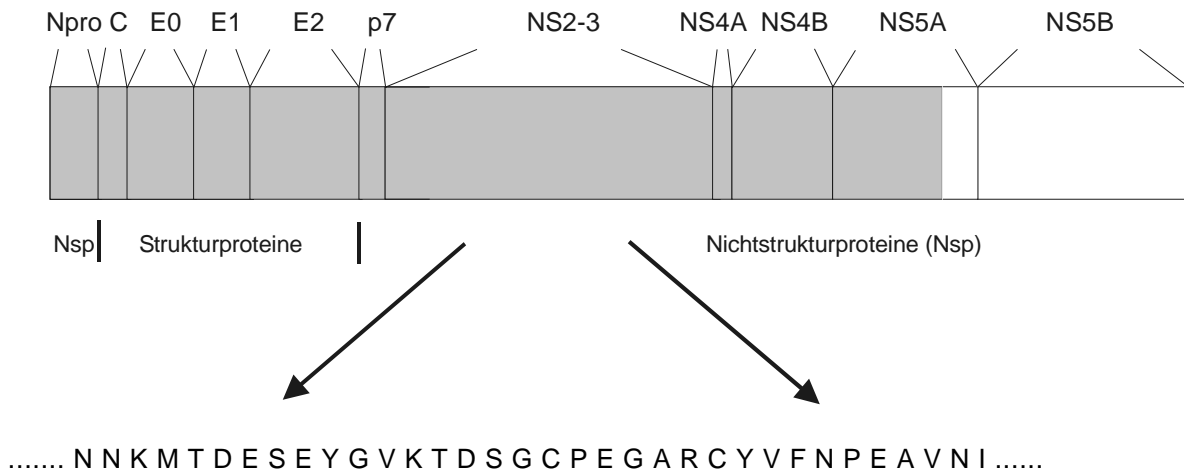
### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1. Herstellung synthetischer CSFV-spezifischer Peptide

Für die Entwicklung einer synthetischen Peptidvakzine ist die Identifizierung immunrelevanter Epitope eine Voraussetzung. Heutzutage können zwar antigene Bereiche durch Computerprogramme vorhergesagt werden, aber sowohl B- als auch T-Zell-Epitope werden mit diesen theoretischen Methoden nur ungefähr bestimmt. Überlappende Peptide, die virale Proteine abdecken, stellen eine der Strategien zur Eingrenzung und Identifizierung von antigenen Determinanten von Krankheitserregern dar.

Im Rahmen dieser Arbeit zur Untersuchung der porcinen Immunantwort gegen das Virus der klassischen Schweinepest (CSFV) wurden 573 Peptide synthetisiert. Diese Pentadekapeptide mit einer Überlappung von je 10 Aminosäuren decken 82 % der Aminosäuresequenz des hypothetischen Polyproteins des CSFV-Stamms Glentorf ab. Dieser Bereich entspricht dem Struktur- sowie einem Teil der Nichtstrukturproteine des CSFV (Abb. 2). Die Peptide wurden durch multiple Festphasenpeptidsynthese mittels eines Pipettierroboters hergestellt. Die Peptide wurden sowohl zur Identifizierung von B-Zell-Epitopen als auch zur Aufklärung von T-Zell-Epitopen eingesetzt.

Alle synthetisierten Peptide wurden nachfolgend mit Elektrospray-Massenspektrometrie (ESI-MS) identifiziert. Um die Reinheit der Peptide zu untersuchen wurde anschließend eine HPLC-Analyse durchgeführt. Der Großteil der Peptide zeigte eine Reinheit von 70 % (Armengol, 1997).



synthetische Peptide:

```

337     NNKMTDESEYGVKTD
338           DESEYGVKTD SGCPE
339                 GVKTD SGCPEGARCY
340                     SGCPEGARCYVFNPE
    
```

**Abb. 2.: Herstellung CSFV-spezifischer synthetischer Peptide**

Die Abbildung zeigt schematisch das CSFV-Genom. Vom translatierten Gesamtgenom des CSF-Virus Stamm Glentorf wurden 573, jeweils um zehn Aminosäuren überlappende, Pentadekapeptide synthetisiert. Der durch Pentadekapeptide erfasste Genombereich ist grau gekennzeichnet. Als Beispiel für die überlappende Peptidsynthese sind die Peptide 337-340 aus dem NS2-3 Bereich schematisch dargestellt.

**3.2. Untersuchung der spezifischen Immunantwort bei CSFV-infizierten Schweinen**

Zur Untersuchung der spezifischen Immunantwort nach einer CSFV Infektion mussten zuerst Schweine mit CSFV infiziert werden und PBMC und Plasma aus diesen geprimten Tieren gewonnen werden. Zu diesem Zweck wurden zwei Inzuchtschweine (d/d Haplotyp; Schwein Nr.1 und Nr. 18) und ein outbred Schwein (Schwein Nr. 39) wie folgt infiziert: Das Schwein Nr. 1 wurde zuerst mit  $10^4$  KID<sub>50</sub> (halbmaximale Kultur-infektiöse Dosis) CSFV-Alfort/187 intramuskulär (i.m.) infiziert. Die erste und zweite Challengeinfektion des Schweins erfolgte i.m. mit 500 KID<sub>50</sub> CSFV-Alfort/187. Die Schweine Nr. 18 und 39 wurden zuerst mit  $10^6$  KID<sub>50</sub> CSFV-Glentorf i.m. infiziert. Die erste Challengeinfektion beider Schweine erfolgte i.m. mit  $10^6$  KID<sub>50</sub> CSFV-Glentorf. Die zweite Challengeinfektion beim Schwein Nr. 18 wurde i.m. mit  $10^6$  KID<sub>50</sub> CSFV-Glentorf durchgeführt.

Zur Kontrolle der CSFV-spezifischen humoralen und zellvermittelten Immunantwort wurden Blutproben aus der *vena jugularis externa* vor Infektion (Kontrollwerte) und zu bestimmten Zeitpunkten nach Infektion abgenommen. Aus den Blutproben wurden sowohl Plasma als auch PBMC gewonnen. Die PBMC wurden in funktionellen Tests wie Proliferationsassays, CTL-assays oder IFN- $\gamma$  ELISPOT-assays auf ihre CSFV spezifische zellvermittelte Immunantwort geprüft. Das gewonnene Plasma wurde zur Untersuchung der CSFV-spezifischen humoralen Immunantwort in verschiedenen ELISA analysiert.

### **3.2.1. Untersuchung der CSFV spezifischen humoralen Immunantwort**

#### **3.2.1.1. Untersuchung von Plasma auf Antikörperreaktivität**

Die Reaktion des spezifischen Immunsystems in Form von Antikörpern gegen einen Krankheitserreger braucht eine bestimmte Zeitspanne. Diese Zeitspanne ist unter anderem abhängig vom Wirtstier sowie auch dem Krankheitserreger. Zur Kontrolle der humoralen Immunantwort wurden die Plasmen aller infizierten Schweine zu verschiedenen Zeitpunkten (vor und nach Infektion) auf CSFV-spezifische Antikörper mittels eines kommerziellen ELISA-Kit untersucht.

In Tabelle 1 ist die Reaktivität der Plasmen der verschiedenen Schweine dargestellt. Das Plasma von Schwein 1 zeigte bereits zwei Wochen nach der ersten Infektion CSFV-spezifische Antikörper. Für Schwein 18 und 39 wurden erst nach drei Wochen CSFV-spezifische Antikörper nachgewiesen.

	Tage nach der ersten Infektion											
Schwein 1	<b>0</b>	3	7	14	<b>21</b>	29	36	38	42	<b>49</b>	56	63
Schwein 18	<b>0</b>	9	<b>22</b>	28	42	51	<b>58</b>	76				
Schwein 39	<b>0</b>	9	<b>22</b>	28	42	51	58					

**Tabelle 1.: Infektionsplan und spezifischer Antikörpernachweis eines mit CSFV-Stamm Alfort/187 (Schwein 1) und zweier mit CSFV-Stamm Glentorf (Schwein 18 und 39) infizierten Schweine**

Die Tabelle zeigt das Auftreten CSFV-spezifischer Antikörper (grau) in Seren CSFV-infizierter Tiere. Die Zahlen repräsentieren die Tage der Blutentnahme nach Infektion. Die Infektionszeitpunkte sind **fett** dargestellt.

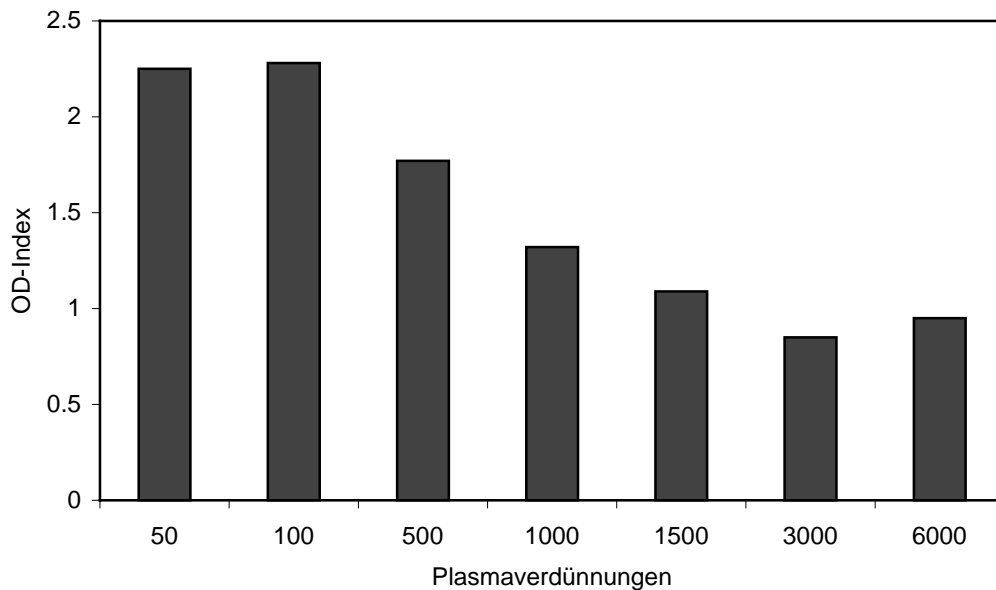
### 3.2.1.2. Identifizierung von linearen B-Zell-Epitopen

Eine der erfolgreichsten Strategien zur Identifizierung von linearen B-Zell-Epitopen basiert auf der Verwendung von synthetischen Peptiden (Wiesmüller *et al.*, 1992; Beck-Sickinger & Jung, 1993). Zur Untersuchung der linearen B-Zell-Epitope für CSFV wurden daher 565 überlappenden Pentadekapeptide (Kap. 3.1.) zusammen mit Plasma von CSFV-infizierten Schweinen im ELISA getestet. Plasmen die vor der Infektion gewonnen wurden dienten als Negativkontrolle.

#### 3.2.1.2.1. Optimierung der ELISA Bedingungen

Um verlässliche Aussagen über mögliche CSFV-spezifische lineare B-Zell-Epitope zu bekommen mussten die Bedingungen des Peptid-ELISA optimiert werden. Beim Standard-Peptid-ELISA werden Plasma und Antigen in der Platte coinkubiert. Um bei positiven Peptiden ein maximales Signal zu erhalten, muss daher eine optimale Plasma- und Antigenkonzentration ermittelt werden. Zuerst wurde die Plasmakonzentration bestimmt, bei der der Anteil der CSFV-spezifischen Antikörper ein im ELISA optimal detektierbares Signal ergab. Für diese Versuche wurde ein rekombinantes Baculovirus-exprimiertes Glykoprotein E2 zusammen mit verschiedenen Plasmaverdünnungsreihen im ELISA ausgetestet. In Abbildung 3 sind die Ergebnisse der Plasmatitration dargestellt. Bei einer Antigenkonzentration von 100 ng/well steigt die optische Dichte, d.h. der Gehalt an E2-spezifischen Antikörpern mit zunehmender Plasmakonzentration bis zu einem Plateauwert an.

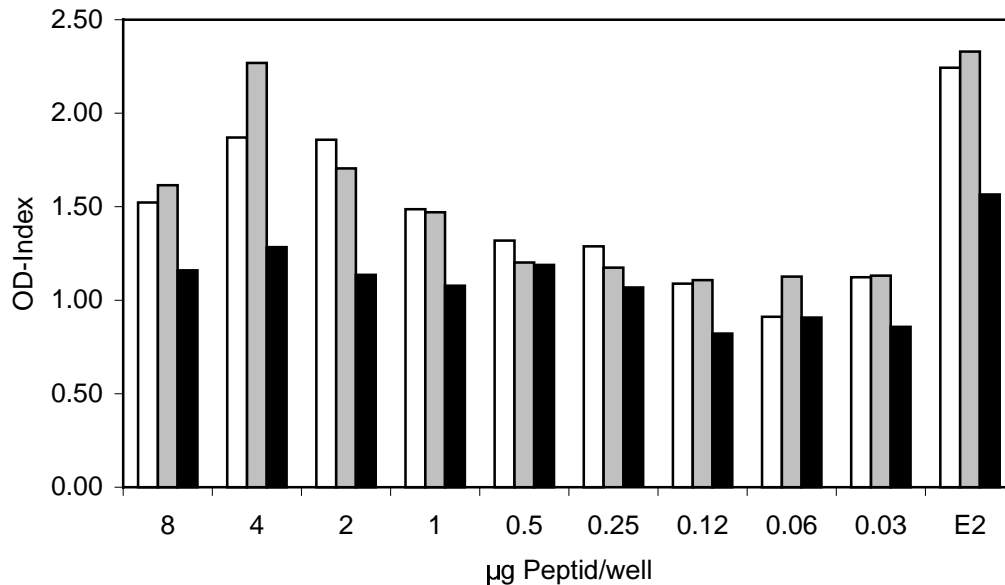




**Abb. 3.: Optimierung der Plasmakonzentration im ELISA**

Die Abbildung zeigt die Reaktivität von verschiedenen Plasmaverdünnungen (1:50 bis 1:6000) eines CSFV-Stamm Glentorf infizierten Schweines mit rekombinantem E2 Glykoprotein (100 ng/well). Als Kontrollplasma wurde Plasma verwendet, das vor Infektion gewonnen wurde. Der OD-Index wurde als Quotient der optische Dichte (OD) des CSFV-Plasmas und der OD des Kontrollplasmas bestimmt.

Ausgehend von diesen Daten wurde in einem Vorversuch eine Plasmakonzentration von 1:100 für die Optimierung der Antigenkonzentration im Peptid-ELISA verwendet. In den folgenden Experimenten wurden ca. 70 Peptide in einer Standardkonzentration von 2 µg/well im Peptid-ELISA ausgetestet. Das Glykoprotein E2 diente sowohl bei der Optimierung als auch bei den folgenden Tests zur Detektion von linearen B-Zell-Epitopen im ELISA als Positivkontrolle. Um optimale ELISA Bedingungen für die Peptide zu ermitteln wurde das Peptid 2, das in diesem Vorversuch als positiv identifiziert wurde, weiter charakterisiert. In Abbildung 4 sind die Ergebnisse der Titration von Peptid 2 mit verschiedenen Plasmakonzentrationen dargestellt. Mit Erhöhung der Konzentration des Peptidantigens bei konstanter Plasmaverdünnung steigt der im ELISA gemessene OD-Index auf einen Maximalwert an und sinkt dann wieder ab. In diesen Versuchen konnten als optimale Bedingungen zur Detektion linearer B-Zell-Epitope eine Antigenkonzentration von 4 µg/well bei einer Plasmakonzentration von 1:100 ermittelt werden. Die 565 verschiedenen Peptide wurden analog den optimalen Bedingungen in den folgenden Tests eingesetzt.

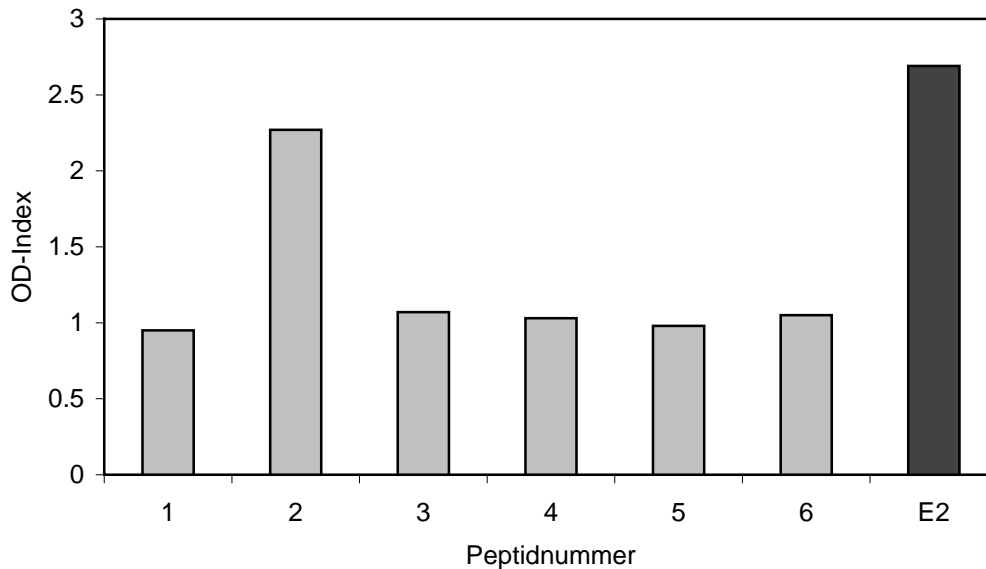


**Abb. 4.: Optimierung der Antigen- und Plasmakonzentrationen im Peptid-ELISA zur Detektion CSFV-spezifischer linearer B-Zell-Epitope**

Die Abbildung zeigt die Reaktivität von Peptid 2 mit verschiedenen Plasmaverdünnungen (1:50, weiße Balken; 1:100, graue Balken; 1:500, schwarze Balken) eines CSFV-Stamm Glentorf infizierten Schweins. Das Peptid 2 wurde zur Bestimmung der optimalen Peptidkonzentration titriert. Als Kontrollplasma wurde das Plasma des selben Schweines verwendet, das vor der Infektion gewonnen wurde. Als Positivkontrolle wurde rekombinantes E2-Glykoprotein mitgeführt. Der OD-Index wurde analog zu Abb. 3 bestimmt.

### 3.2.1.2.2. Detektion linearer B-Zell-Epitope im CSFV Polyprotein

Alle 565 zur Verfügung stehenden Peptide aus dem offenen Leseraster des CSFV-Genoms (Kap. 3.1.) wurden unter den optimierten Bedingungen (4 µg/well; Plasmakonzentration: 1:100) auf potentielle B-Zell-Epitope untersucht. Für die Schweine 1, 18 und 39 wurden dazu Plasma 63, 76 bzw. 58 Tage nach der Infektion im ELISA getestet. Für Schwein 39 konnte in der Autoprotease Region des CSFV ein lineares B-Zell-Epitop (Peptid 2) mit Peptidsequenz FELLYKTNKRKPMGV, identifiziert werden. Diese Ergebnisse sind in Abb. 5 dargestellt. Für die Tiere 1 und 18 konnte mit allen getesteten Plasmafraktionen trotz nachweisbarer CSFV-spezifischer Antikörper kein positives Peptid ermittelt, das heißt kein lineares B-Zell-Epitop detektiert werden.



**Abb. 5.: Identifizierung eines linearen B-Zell-Epitops des CSFV**

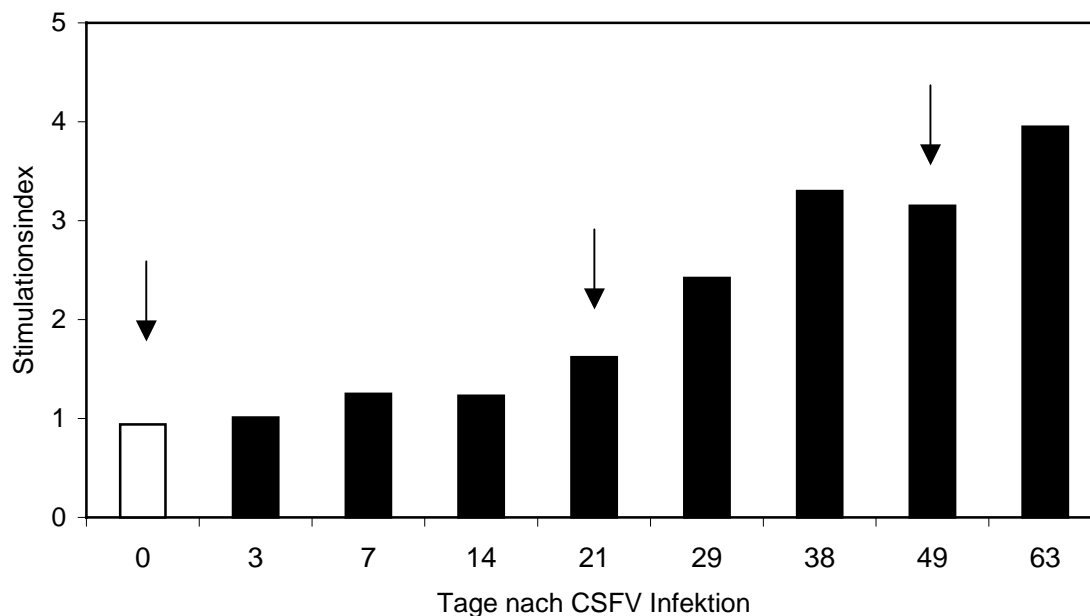
Die Abbildung zeigt exemplarisch die Reaktivität verschiedener Pentadekapeptide aus dem N-terminalen Bereich des CSFV (4µg/well, graue Balken) mit dem Plasma eines CSFV-Stamm Glentorf infizierten Schweines (Schwein 39). Ein Peptid wurde als positiv bewertet, wenn der OD-Index (siehe Abb. 3)  $\geq 2$  war. Das Peptid 2 konnte eindeutig als positiv identifiziert werden. Im Test wurde das rekombinante E2-Glykoprotein (E2) als Positivkontrolle (schwarzer Balken) mitgeführt.

### 3.2.2. Untersuchung der spezifischen zellvermittelten Immunantwort aus CSFV infizierten Schweinen

Neben der humoralen Immunantwort spielt bei einer erfolgreichen Immunisierung die durch T-Lymphozyten vermittelte zelluläre Immunantwort eine entscheidende Rolle. Daher wurde in dieser Arbeit neben der Identifizierung von B-Zell-Epitopen ein weiterer Schwerpunkt auf die Detektion von T-Zell-Epitopen gelegt. Dazu wurde untersucht, wie Lymphozyten des peripheren Blutes von infizierten Schweinen auf das Virus sowie auf die überlappenden synthetischen Peptide des CSFV reagieren. Die Analyse der zellvermittelten Immunantwort erfolgte mittels Proliferationsassays, IFN- $\gamma$ -ELISPOTS-assays sowie durch den Nachweis der virusspezifischen zytolytischen T-Lymphozyten. Eine Analyse des Phänotyps der CSFV-aktivierten T-Zellen wurde mit Hilfe der Durchflußzytometrie erstellt.

### 3.2.2.1. Stimulation von virusspezifischen T-Lymphozyten durch CSFV

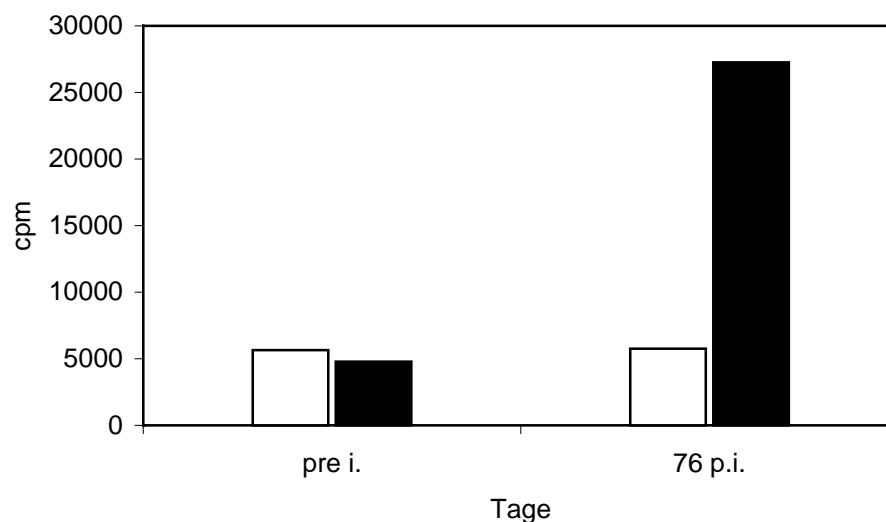
Eine antigen-spezifische Immunantwort wird ausgelöst, wenn naive T-Zellen Antigenfragmente über MHC-Moleküle auf der Oberfläche einer antigenpräsentierenden Zelle erkennen. Die aktivierten T-Zellen produzieren verschiedene Zytokine (z.B. IL-2, IL-4, IFN- $\gamma$ ), die ihre Proliferation und weitere Differenzierung steuern. T-Lymphozyten, die schon einmal mit einem Antigen *in vivo* in Kontakt waren, können *in vitro* in Anwesenheit desselben Antigens zur Proliferation, d. h. zur Zellteilung angeregt werden. Diese Proliferation kann dann über den Einbau von radioaktivem [ $^3$ H]Thymidin in die neusynthetisierte DNA quantifiziert werden.



**Abb. 6.: Induktion einer CSFV-spezifischen zellulären Immunantwort**

Die Abbildung zeigt die Proliferation von PBMC eines mit dem CSFV-Stamm Alfort/187 infizierten Schweines (Tier Nr. 1), die zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion gewonnen wurden (schwarze Balken). Die *in vitro* Stimulation der PBMC erfolgte mit einer MOI von 0,1. Das Schwein wurde am Tag 21 und am Tag 49 nach der ersten Infektion nochmals infiziert (Pfeile). Bei einem Stimulationsindex (SI = cpm stimulierte Kulturen / cpm Kontrollkulturen)  $\geq 2$  wurde eine Proliferation als CSFV spezifisch gewertet. Als Kontrolle diente die Proliferation von PBMC derselben Tieres die vor der Infektion gewonnen wurden (weißer Balken).

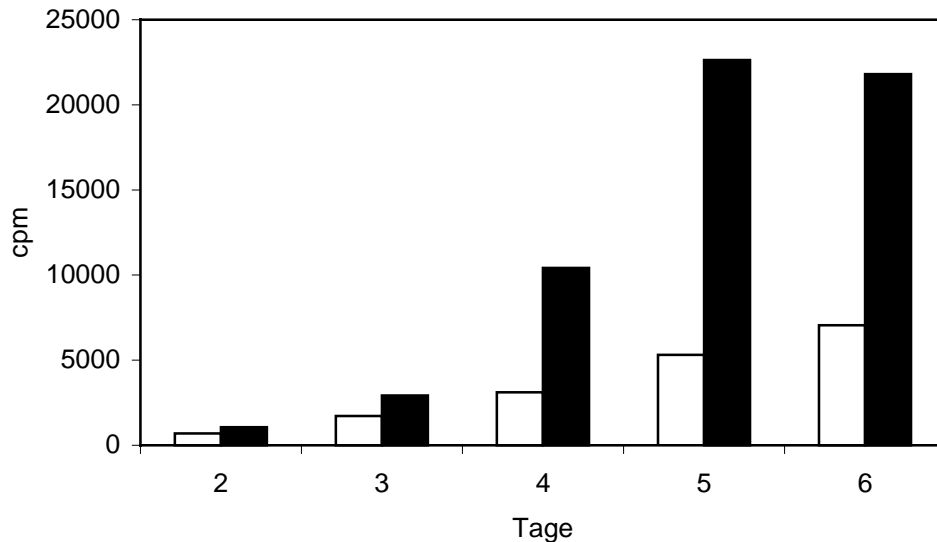
Zur Untersuchung der CSFV spezifischen zellvermittelten Immunantwort wurden Inzuchtschweine (NIH-Minipigs, d/d-Haplotyp) mit verschiedenen CSFV Stämmen infiziert. Für die Kontrolle der Immunantwort der entsprechenden Tiere wurden Blutproben vor Infektion (Kontrollgruppe) und zu bestimmten Zeitpunkten nach Infektion abgenommen, aus denen PBMC isoliert wurden. Zunächst wurde untersucht, ob PBMC von Schwein 1 (Abb. 6) oder Schwein 18 (Abb. 7) eine Proliferation nach einer Restimulation mit CSFV zeigen. Zu diesem Zweck wurden PBMC mit CSFV für fünf Tage *in vitro* inkubiert und anschließend die Proliferation der stimulierten Zellen durch Zugabe von [<sup>3</sup>H]Thymidin bestimmt.



**Abb. 7.: Zelluläre CSFV-spezifische Immunantwort**

Die Abbildung zeigt die Proliferation von PBMC eines mit CSFV-Stamm Glentorf infizierten Schweines (Tier Nr. 18), die vor (pre i.) und 76 Tage nach der ersten Infektion (p. i.) gewonnen wurden. Die *in vitro* Stimulation der PBMC erfolgte mit dem CSFV Stamm Glentorf (schwarze Balken, MOI 0,5). Als Negativkontrolle diente die Proliferation von PBMC, die mit Überstand von mock-infizierten Zellen (weiße Balken) kultiviert wurden.

Für das Schwein Nr. 1 (Abb. 6) wurde 29 Tage nach der ersten Infektion eine CSFV-spezifische Proliferation nachgewiesen. Der Stimulationsindex steigerte sich im zeitlichen Verlauf bis auf Maximalwerte zwischen 3 und 4. Für das Schwein 18 (Abb. 7) wurde die virusspezifische Proliferation der PBMC vor und 76 Tage nach der Infektion bestimmt. Die Proliferation virusrestimulierter Kulturen ist durch die schwarzen Balken, die Kontrollgruppe, die mit Medium aus mock-infizierten Zellen kultiviert wurde, durch weiße Balken dargestellt. Es zeigte sich, dass sowohl bei Schwein 1 als auch bei Schwein 18 eine CSFV-spezifische Proliferation nachzuweisen war.



**Abb. 8.: Kinetik der CSFV-spezifischen Proliferation von PBMC**

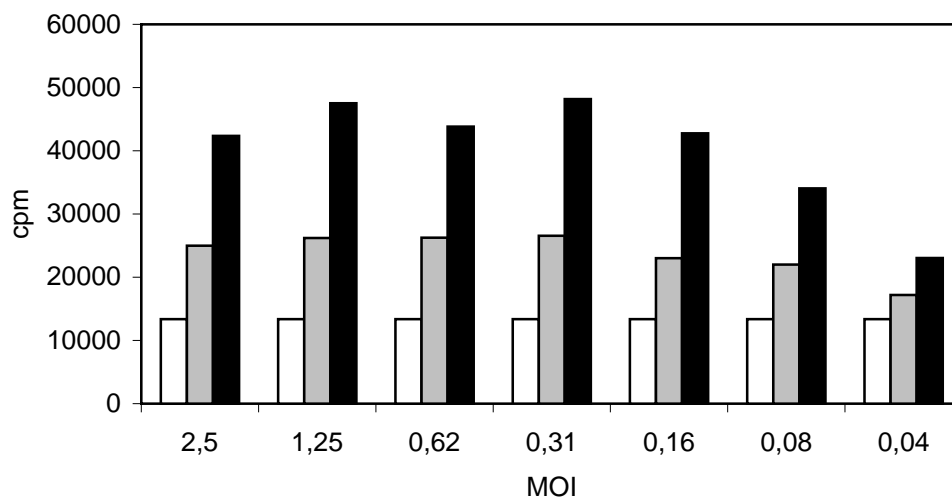
PBMC des Schweines 18 wurden mit dem CSF-Stamm Glentorf (schwarze Balken, MOI 0,5) restimuliert. Die Proliferation der PBMC wurde an verschiedenen Tagen (Tag 2 bis Tag 6) über einen 18stündigen  $^3\text{H}$ Thymidineinbau bestimmt. PBMC inkubiert mit Medium aus mock-infizierten Zellen (weiße Balken) dienten als Kontrolle.

Nachdem eine CSFV-spezifische Proliferation von PBMC aus infizierten Schweinen nachgewiesen werden konnte, sollte untersucht werden, zu welchem Zeitpunkt nach Restimulation eine optimale Proliferation der PBMC zu beobachten war.

Aus diesem Grund wurden PBMC von Schwein 18 mit Virus restimuliert und die virus-spezifische Proliferation zwischen den Tagen 2 und 6 über den  $^3\text{H}$ Thymidineinbau gemessen (Abb. 8). Für die Tage 2 und 3 konnte keine CSFV-spezifische Proliferation nachgewiesen werden, da die Proliferationswerte (cpm) der CSFV-stimulierten PBMC (Abb. 8, schwarze Balken) nur wenig über den Werten der nicht stimulierten PBMC (Abb. 8, weiße Balken) lagen. Ab Tag 4 wurde ein stärkerer Anstieg der spezifische Proliferation CSFV-stimulierter Zellen im Vergleich zu der geringeren Proliferation der mit Medium aus mock-infizierten Zellen inkubierten PBMC beobachtet. Zwischen Tag 5 und Tag 6 zeigte die Proliferation der CSFV-stimulierten Zellen ein Plateau. Basierend auf den vorliegenden Daten (Abb. 8) wurde Tag 5 als optimaler Zeitpunkt für eine CSFV-spezifische Proliferation ermittelt, da der Abstand zwischen spezifischen und unspezifischen Proliferation am grössten war. An Tag 6 war ein leichtes Ansteigen der Spontanproliferation zu beobachten. Die nachfolgenden Untersuchungen wurden mit einer Restimulationszeit von je 5 Tagen durchgeführt.

### 3.2.2.1.1. Virusstamm-abhängige T-Zell-Stimulation

Zur Analyse einer CSFV-stammabhängigen T-Zellproliferation wurden PBMC von Schwein Nr. 1 (infiziert mit CSFV-Stamm Alfort/187) mit verschiedenen CSFV-Stämmen (Alfort Tübingen, Alfort/187) *in vitro* restimuliert (Abb. 9). Außerdem wurde die Antigen-Dosisabhängigkeit der CSFV-spezifischen Proliferation analysiert. Zu diesem Zweck wurden die PBMC des Schweines 1 mit verschiedener MOI (0,04 – 2,5) des CSFV-Stammes Alfort/187 und des Stammes Alfort Tübingen restimuliert (Abb. 9). Mit zunehmender MOI war auch hier eine Zunahme der Proliferation bis zu einem Plateauwert zu beobachten. Wie in Abbildung 9 gezeigt, konnte eine CSFV-spezifische Proliferation sowohl für Stamm Alfort Tübingen als auch für Stamm Alfort/187 nachgewiesen werden. Die Ergebnisse zeigten allerdings eine deutlich höhere Proliferation der PBMC bei der *in vitro* Restimulation mit dem homologen Virus dem CSFV-Stamm Alfort/187.



**Abb. 9.: CSFV-Stamm- und dosisabhängige T-Zellproliferation**

Die Abbildung zeigt die virusspezifische Proliferation von PBMC eines mit CSFV-Stamm Alfort/187 infizierten Schweines (Schwein 1), nach *in vitro* Restimulation mit verschiedenen CSFV-Stämmen (graue Balken: Alfort Tübingen; schwarze Balken: Alfort/187). Alle Viren wurden mit einer MOI von 2,5-0,04 eingesetzt. Als Kontrolle wurde die Spontanproliferation der PBMC dargestellt (weiße Balken).

Obwohl beide Stämme eine Aminosäurehomologie von 86.3 % aufweisen (GenBank Alfort Tübingen: J04358; GenBank Alfort/187: X87939) zeigte sich hier, dass ein Teil der T-Zell-Epitope stammspezifisch ist. Zusammenfassend konnte also gezeigt werden, dass die CSFV-spezifische Proliferation sowohl stammspezifisch (Abb. 9) als auch zeit- (Abb. 6) und dosisabhängig (Abb. 9) ist.

### **3.2.2.2. Stimulation von virusspezifischen T-Lymphozyten durch synthetische Peptide**

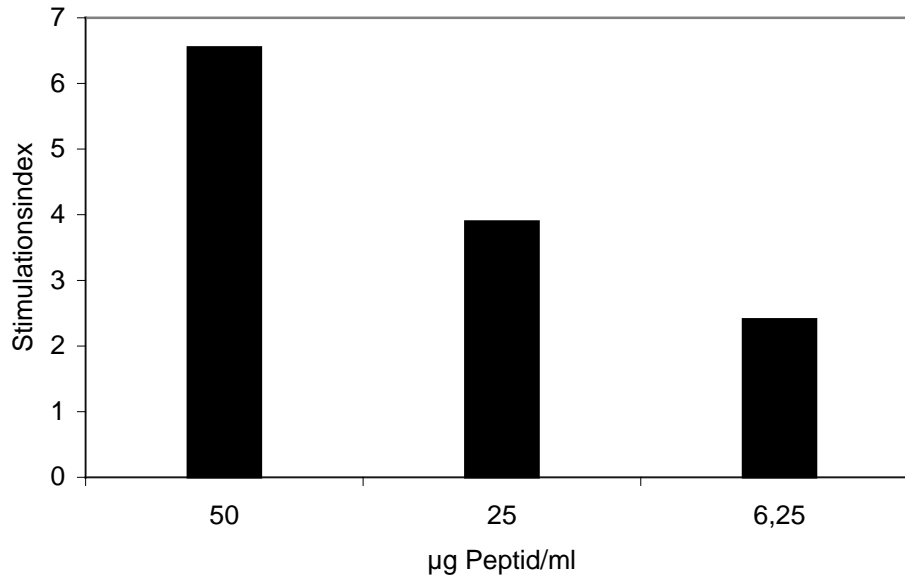
Nachdem der Nachweis einer CSFV-spezifischen Stimulation von porcinen PBMC gelungen war (Abb. 6, Abb. 7), sollten nun einzelne Fragmente der viralen Antigene, die für diese Reaktivität verantwortlich sind, identifiziert werden. Zur Identifizierung dieser porcinen T-Zell-Epitope wurden PBMC eines CSFV-Stamm Glentorf infizierten Schweines (Schwein 18), die 76 Tage nach der ersten Infektion gewonnen wurden, mit den CSFV-überlappenden Pentadekapeptiden (Kap. 3.1.) *in vitro* restimuliert. Falls ein bestimmtes Peptid ein T-Zell-Epitop enthalten sollte, sollte es durch eine erhöhte Proliferation der PBMC detektierbar sein.

#### **3.2.2.2.1. Optimierung des peptidspezifischen Proliferationsassays**

Um eine optimale peptidspezifische Proliferation von PBMC zu erhalten, mussten bestimmte Parameter wie Zell- und Peptidkonzentration als auch Inkubationszeit der *in vitro* Restimulation bestimmt werden. Ausgehend von den beschriebenen Daten der Stimulation von PBMC mit Virus (Abb. 8), wurde in einem Vorversuch die gleiche Zellkonzentration und Inkubationszeit verwendet. In diesem Experiment wurden ca. 300 Peptide mit einer Konzentration von 25 µg/ml im Proliferationstest ausgetestet. Die Peptidkonzentration wurde entsprechend der Literatur für T-Zell-Epitopmapping des FMDV gewählt (Blanco *et al.*, 2000). Auffällig war Peptid 290, das den höchsten Stimulationsindex zeigte. Zur Bestimmung der optimalen Peptidkonzentration im Proliferationsassay wurden PBMC von Schwein 18 mit unterschiedlichen Konzentrationen von Peptid 290 (6,25-50 µg/ml) inkubiert und die spezifische Proliferation über [<sup>3</sup>H]Thymidineinbau gemessen (Abb. 10). Die Proliferation der PBMC in Anwesenheit des Peptides erwies sich als konzentrationsabhängig (Abb. 10). Aus Kostengründen wurde für weitere Untersuchungen eine Peptidkonzentration von 12,5 und



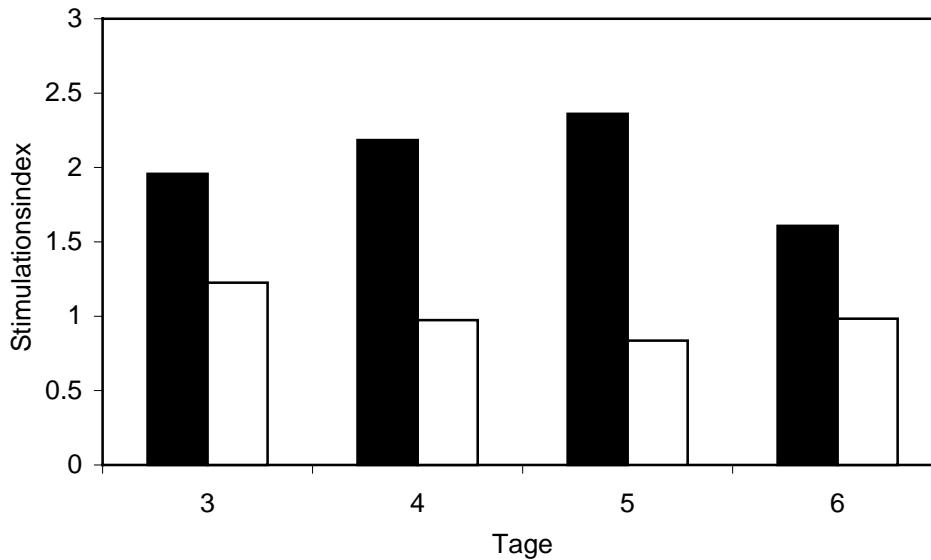
25 µg/ml ausgewählt, da ab ca. 6 µg/ml eine peptidspezifische Proliferation nachzuweisen war.



**Abb. 10.: Einfluß der Peptidkonzentration auf die Stimulation CSFV-spezifischer T-Lymphozyten im Proliferationstest.**

Die Abbildung zeigt den Stimulationsindex für Peptid 290 in einer Konzentration von 50, 25 und 6,25 µg/ml. Der SI wurde analog zu Abbildung 6 ermittelt.

Nachdem eine Konzentrationsabhängigkeit der peptidspezifischen Proliferation nachgewiesen wurde, sollte untersucht werden, zu welchem Zeitpunkt nach Restimulation mit einem Peptid eine optimale Proliferation der PBMC zu beobachten war. Aus diesem Grund wurden PBMC mit einer Peptidkonzentration von 25 µg/ml stimuliert und die spezifische Proliferation zwischen Tag 3 und 6 über den [<sup>3</sup>H]Thymidineinbau gemessen (Abb. 11). Auf Messwerte des Tages 2 wurde aufgrund der Daten der CSFV-spezifischen Kinetik (Abb. 8) verzichtet. Ab Tag 3 konnte ein starker Anstieg der Proliferationswerte der peptidstimulierten Zellen im Vergleich zu der Proliferation der mit Medium inkubierten PBMC beobachtet werden. Basierend auf den vorliegenden Daten (Abb. 11) wurde der Tag 5 als der optimale Zeitpunkt für die Messung einer peptidspezifischen Proliferation definiert und die nachfolgenden Untersuchungen mit einer *in vitro* Restimulationszeit von 5 Tagen durchgeführt.



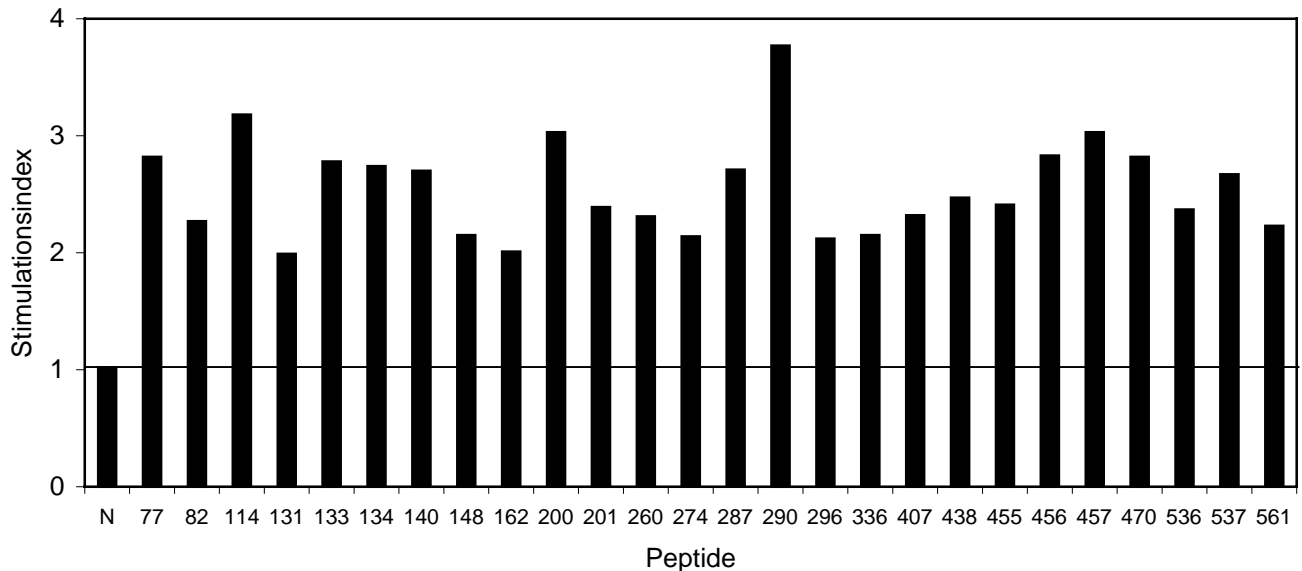
**Abb. 11.: Kinetik der peptidspezifischen Proliferation von PBMC**

PBMC eines CSFV-Stamm Glentorf infizierten Schweines wurden mit Peptid 290 (25µg/ml, schwarze Balken) inkubiert. Die peptidspezifische Proliferation der PBMC wurde an verschiedenen Tagen (Tag 3 bis Tag 6) über einen 18stündigen [<sup>3</sup>H]Thymidineinbau bestimmt. PBMC, die mit einem negativen Peptid (weiße Balken) inkubiert wurden, dienten als Kontrolle. Der Stimulationsindex wurde analog zu Abbildung 6 ermittelt.

### 3.2.2.2.2. Identifizierung CSFV-spezifischer T-Zell-Epitope

Zur Identifizierung CSFV-spezifischer T-Zell-Epitope wurden 573 CSFV-spezifische Peptide in Proliferationsassays mit PBMC des Schweines 18 getestet. Bei den Peptidantigenen handelt es sich um die 10 AS überlappende Pentadekapeptide, die sowohl die Strukturproteinregion als auch einen Teil des Nichtstrukturproteinbereiches des CSFV umspannen (Kap. 3.1.).

Ein Peptid wurde ab einem Stimulationsindex ( $SI_{\text{peptid}} = \text{cpm Peptidproliferation} / \text{cpm Kontrollproliferation}$ ) von 2 als positiv bewertet. Als Negativkontrolle diente ein irrelevantes Peptid (Peptid 5), dessen peptidspezifische Proliferationswerte ( $SI \text{ ca. } 1$ ) unter denen der CSFV spezifischen Peptide lag ( $SI \geq 2$ ).



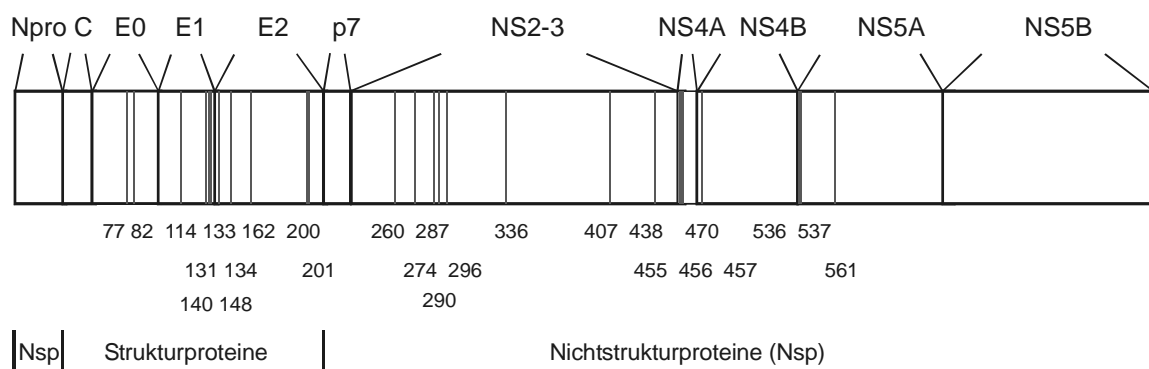
**Abb. 12.: T-Zell-Epitope des CSFV Stamm Glentorf**

Die Abbildung zeigt den Stimulationsindex (SI Peptid = cpm Peptidproliferation / cpm Kontrollproliferation) von verschiedenen Peptiden, die als T-Zell-Epitope im Proliferationstest identifiziert wurden. PBMC vom Schwein 18 wurden für 5 Tage mit den jeweiligen Peptiden (12,5 und 25 µg/ml) stimuliert. Die Proliferation der peptidspezifischen T-Lymphozyten wurde über einen 18stündigen [<sup>3</sup>H]Thymidineinbau gemessen. Ein Peptid wurde bei einem Stimulationsindex  $\geq 2$  als positiv gewertet. Im Test wurde das Peptid 5 als Negativkontrolle (N) mitgeführt. Für jedes Peptid ist der SI für die Peptidkonzentration gezeigt, mit der die optimale Stimulation erreicht wurde.

Von den 573 getesteten Peptiden waren 26 Peptide in der Lage eine spezifische Proliferation von PBMC eines CSFV-infizierten Tieres zu induzieren (Abb. 12). 11 stimulierende Peptide stammten aus dem Strukturprotein- und 15 aus dem Nichtstrukturproteinbereich des CSFV. Überlappende Peptide, aus den Proteinbereichen N<sup>pro</sup>, C und p7, waren nicht in der Lage eine spezifische Proliferation anzuregen. Innerhalb der 26 positiven Peptide wurden unterschiedlich stimulierende Effekte beobachtet. Den höchsten stimulatorischen Effekt zeigte Peptid 290, das deshalb für weitergehende Untersuchungen verwendet wurde. Zur Kontrolle der CSFV spezifischen Reaktivität der 26 Peptide, wurden diese mit vor Infektion gewonnenen PBMC inkubiert und die Proliferation über einen 18stündigen [<sup>3</sup>H]Thymidineinbau gemessen. Die geringen Stimulationsindices (SI ca. 1) zeigten zusätzlich die CSFV-Spezifität der stimulierenden Peptidsequenzen.

### 3.2.2.3. Lokalisierung der T-Zell-Epitope des CSFV Stamms Glentorf

Abb. 13 zeigt die Lokalisation der in Proliferationsassays als positiv identifizierten Peptide auf den hypothetischen Polyprotein des CSFV (Abb. 13). 11 Peptide lassen sich den Strukturproteinen E0, E1 und E2 zuordnen, 15 Peptide den Nichtstrukturproteinen NS2-3, NS4A, NS4B und NS5A. Auf den viralen Proteinen N<sup>pro</sup>, C und p7 konnte kein T-Zell-Epitop nachgewiesen werden. Einige Bereiche zeigten eine starke Ansammlung positiver Sequenzen so z.B. die Grenzregion zwischen E1 und E2 sowie die Region zwischen NS2-3 und NS4A. Oft wurden benachbarte Peptide als positiv identifiziert, da aufgrund der überlappenden Sequenzen Epitope auf beiden Sequenzen lokalisiert sind, so z.B. Peptide 133-134; 200-201; 455-456-457; 536-537. Im Gegensatz dazu konnten auch einzelne Peptide als positiv identifiziert werden, in deren Nähe keine weiteren stimulierenden Sequenzen identifiziert wurden; so z.B. Peptid 114, 336, 407.

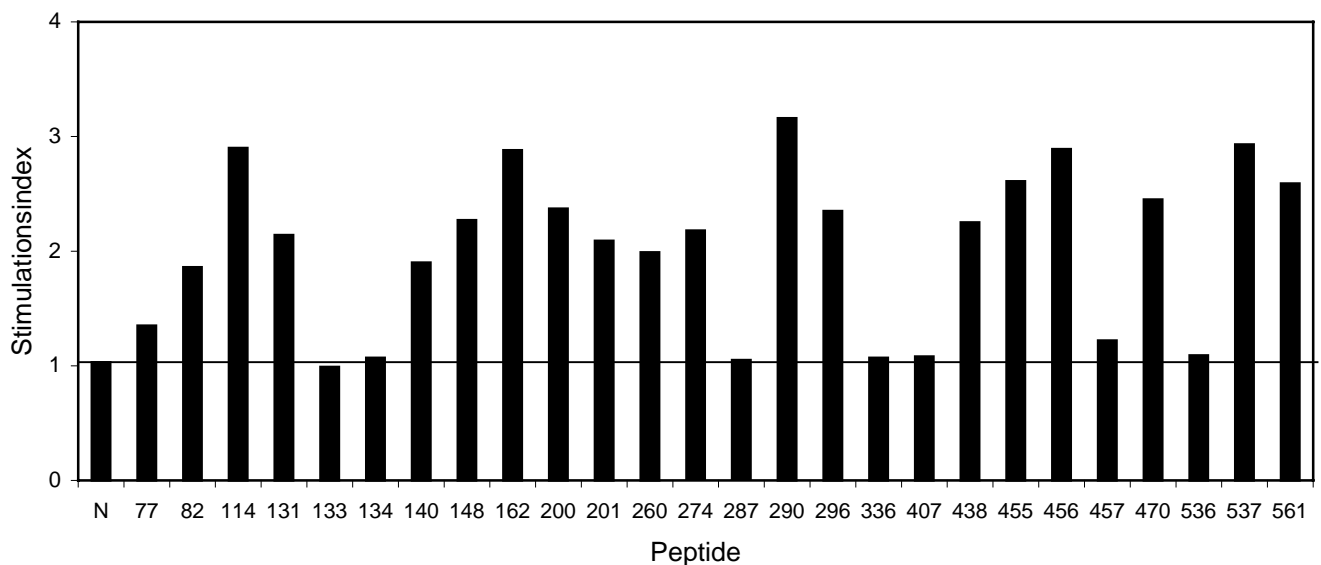


**Abb. 13.: Lokalisation der T-Zell-Epitope des CSFV**

Die Abbildung zeigt die Genomorganisation des offenen Leserahmens des CSFV (Meyers & Thiel, 1996). Die einzelnen Genomabschnitte, die für die verschiedenen Proteine kodieren, sind gekennzeichnet. Die stimulierenden Peptide sind als Linie dargestellt. Unterhalb der Grafik sind die internen Nummern der Peptide angegeben.

### 3.2.2.4. Charakterisierung der peptidspezifischen T-Zell-Antwort des CSFV-Stamms Alfort/187

Für die Entwicklung einer Vakzine, die auf synthetischen Peptiden basiert, müssen bestimmte Grundvoraussetzungen erfüllt werden. Eine solche Vakzine sollte ein großes Spektrum von verschiedenen MHC-Allelen abdecken, zudem sollte eine möglichst stammübergreifende zellvermittelte Immunantwort induziert werden. Deshalb wurden die für den CSFV-Stamm Glentorf (Schwein 18) als positiv identifizierten Peptide, in Proliferationsassays mit PBMC vom Schwein 1, das mit dem CSFV Stamm Alfort/187 infiziert worden war, ausgetestet. Ziel war es immunodominante Epitope zu charakterisieren, die für beide Stämme (Alfort/187 und Glentorf) eine starke Immunantwort induzieren können.



**Abb. 14.: T-Zell-Epitope des CSFV Stamm Alfort/187**

Die Abbildung zeigt den Stimulationsindex von verschiedenen Peptiden, die als T-Zell-Epitope für Stamm Glentorf identifiziert wurden. Die PBMC von Schwein 1 wurden für 5 Tage mit den jeweiligen Peptiden (12,5 und 25 µg/ml) inkubiert. Die Proliferation der peptidspezifischen T-Lymphozyten wurde über  $[^3\text{H}]$ Thymidineinbau gemessen. Ein Peptid wurde bei einem Stimulationsindex  $\geq 2$  als positiv gewertet. Im Test wurde das Peptid 5 als Negativkontrolle (N) mitgeführt. Für jedes Peptid ist der SI für die Peptidkonzentration gezeigt, mit der die optimale Stimulation erreicht wurde. Der SI wurde wie in Abbildung 6 ermittelt.

Die Abbildung 14 zeigt die stimulatorische Kapazität der 26 Peptide, die in vorhergehenden Versuchen (Abb. 12) als positiv bewertet wurden, mit PBMC eines CSFV-Stammes Alfort/187 infizierten Schweines. Von den 26 für den CSFV-Stamm Glentorf positiv identifizierten Peptide konnten 18 in Proliferationsassays als stimulierende Sequenzen für beide Stämme bestätigt werden. Die als positiv identifizierten Peptide zeigten in beiden Schweinen (Schwein 1 und 18) jedoch unterschiedliche Proliferationsmuster. Ähnlich wie bei der Restimulation mit Virus zeigten die PBMC von Schwein 18 (Stamm Glentorf) auch bei der Restimulation mit Peptiden höhere Proliferationswerte. Trotz einer Aminosäurehomologie konnte auch durch synthetische Peptide eine Stammspezifität nachgewiesen werden. Zur Kontrolle der CSFV spezifischen Reaktivität der 18 positiven Peptide, wurden diese mit PBMC gewonnen, vor Infektion inkubiert und die Proliferation über einen 18stündigen  $^3\text{[H]}$ Thymidineinbau gemessen. Die geringeren Proliferationswerte (SI ca. 1) zeigen zusätzlich die CSFV-Spezifität der stimulierenden Peptidsequenzen. Das Peptid 290 zeigte sowohl für den CSFV-Stamm Alfort/187 als auch für den Stamm Glentorf den höchsten Stimulationsindex. In Tabelle 2 sind die stimulierenden Peptidsequenzen für beide Stämme zusammengefasst. Auffällig war, dass ein einziger Aminosäureaustausch in der Sequenz zum Verlust der stimulierenden Wirkung des Peptids führen konnte (Peptid 77). Im Gegensatz dazu zeigte ein Austausch von mehreren nicht essentiellen Aminosäuren keine Wirkung auf die Stimulationsfähigkeit des Peptids (z.B. Peptid 114). Interessanterweise waren einige Peptide (z.B. 133, 134) zu finden, die keinerlei AS-Austausche zwischen den beiden Stämmen zeigten, aber trotz einheitlichem MHC, unterschiedliche stimulatorische Eigenschaften aufwiesen.

**Tabelle 2.: Sequenzunterschiede der Peptide zwischen den Stämmen Glentorf und Alfort 187**

Die Tabelle zeigt die 26 Aminosäuresequenzen der Peptide, die als T-Zell-Epitope für den CSFV-Stamm Glentorf nachgewiesen wurden. Die unterstrichenen Peptide konnten ebenfalls für den Stamm Alfort/187 als positive Peptide bestätigt werden. Aminosäureaustausche sind fett dargestellt. <sup>a</sup>Aminosäureposition im CSFV Polyprotein. <sup>b</sup>Position innerhalb der viralen Proteine. <sup>c</sup>Die unterstrichene Aminosäuresequenz zeigt das in der Literatur beschriebene CTL-Epitop (Pauly *et al.*, 1995). <sup>d</sup> Aminosäureaustausch zwischen den beiden Stämmen.

Peptid Nr.	Aminosäure <sup>a</sup>	Lokalisation <sup>b</sup>	Peptidsequenz nach Stamm Glentorf <sup>c</sup>	Alfort/187 <sup>d</sup>
77	(381-395)	E0	C R Y D K D A D <b>I</b> N V V T Q A	<b>I</b> →V
<u>82</u>	(406-420)	E0	K K G K N F S F A G T <b>I</b> I E G	<b>I</b> →V
<u>114</u>	(566-580)	E1	T A S A L Y L I <b>S Y</b> Y V I P Q	<b>SY</b> →LH
<u>131</u>	(651-665)	E1	T R V W N S A S T T A F L I C	
133	(661-675)	E1	A F L I C L I K V L R G Q I V	
134	(666-680)	E1	L I K V L R G Q I V Q G V I W	
<u>140</u>	(696-710)	E2	D Y R Y A I S S T N E I G L L	
<u>148</u>	(736-750)	E2	I C <b>A</b> A G S F K V T A L N V V	<b>A</b> →V
<u>162</u>	(806-820)	E2	T T L L N G S A F Y L V C P I	
<u>200</u>	(996-1010)	E2	Y E P R D S Y F Q Q Y M L K G	
<u>201</u>	(1001-1015)	E2	S Y F Q Q Y M L K G E Y Q Y W	
<u>260</u>	(1296-1310)	NS2-3	T L I L I L P T Y E L T K L Y	
<u>274</u>	(1366-1380)	NS2-3	K A I L I S C I S N K W Q F I	
287	(1431-1445)	NS2-3	K K F F L L S S R V K E L I I	
<u>290</u>	(1446-1460)	NS2-3	K H K V R N E V M V H W F <b>D</b> D	<b>D</b> →G
<u>296</u>	(1476-1490)	NS2-3	A T L S K N K <b>N</b> C I L C T V C	<b>N</b> →H
336	(1676-1690)	NS2-3	V V C Q S N N K M T D E S E Y	
407	(2031-2045)	NS2-3	S Q S P Y V V V A T N A I E S	
<u>438</u>	(2186-2200)	NS2-3	E P I Q L A Y N S Y E T Q V P	
<u>455</u>	(2271-2285)	NS2-3-NS4A	G L S T A <u>E N A L L V A L F</u> G	
<u>456</u>	(2276-2290)	NS4A	<u>E N A L L V A L F</u> G Y V G Y Q	
457	(2281-2295)	NS4A	<u>V A L F</u> G Y V G Y Q A L S K R	
<u>470</u>	(2346-2360)	NS4B	E A M T N Y A <b>K</b> E G I Q F M K	<b>K</b> →R
536	(2676-2690)	NS4B-NS5A	S E G K I R Q L S S N Y I L E	
<u>537</u>	(2681-2695)	NS4B-NS5A	R Q L S S N Y I L E L L Y K F	
<u>561</u>	(2801-2815)	NS5A	V E L Y Y K G <b>T</b> T I K L D F N	<b>T</b> →A

### **3.2.2.5. Induktion antigenspezifischer Interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )-Freisetzung**

Interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) ist ein Zytokin, das nach Aktivierung von T-Helfer-Zellen ( $T_H1$ -Zellen) (Mosmann & Coffman, 1989), zytolytischen T-Zellen (Fong & Mosmann, 1990) und NK-Zellen (Bach *et al.*, 1997) freigesetzt wird. Dieses Zytokin induziert die Phagozytose und steigert die MHC-Klasse-I Expression. Die IFN- $\gamma$  Freisetzung stellt ein Parameter für die Aktivierung der zellvermittelten Immunantwort. Zum Nachweis der IFN- $\gamma$  Freisetzung nach *in vitro* CSFV- bzw. Peptid Stimulation wurden ELISPOT-assays (enzyme-linked-immunospot assay) eingesetzt.

Mit Hilfe dieses Test kann die IFN- $\gamma$  Freisetzung auf Einzelzellebene ermittelt und damit die Frequenzen der antigenspezifischen, aktivierten T-Lymphozyten bestimmt werden.

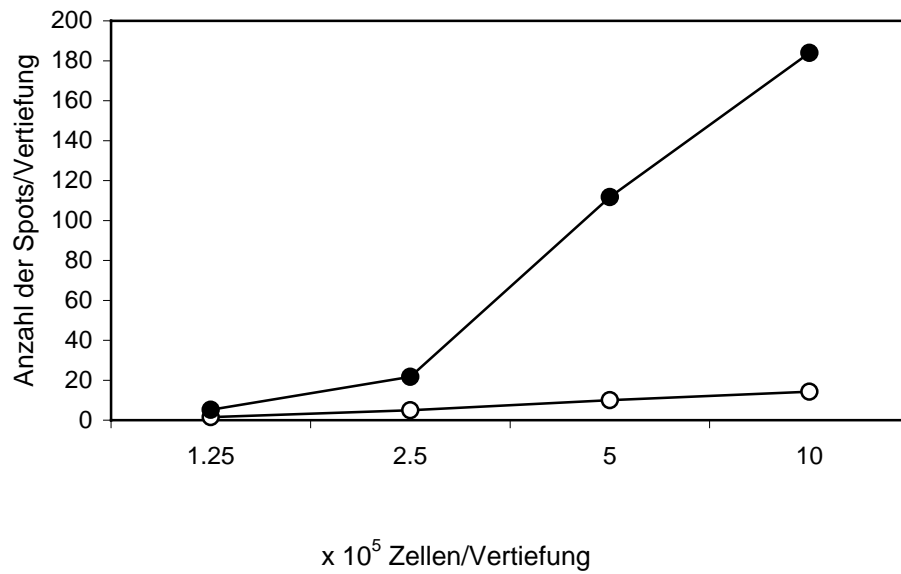
#### **3.2.2.5.1. Interferon- $\gamma$ Freisetzung nach CSFV-Stimulation**

Mit Hilfe von ELISPOT kann untersucht werden, ob eine Stimulation von PBMC mit CSFV eine gesteigerte IFN- $\gamma$  Freisetzung induziert. Durch dieses Experiment wäre eine quantitative Bestimmung der Zellen, die IFN- $\gamma$  produzieren, möglich.

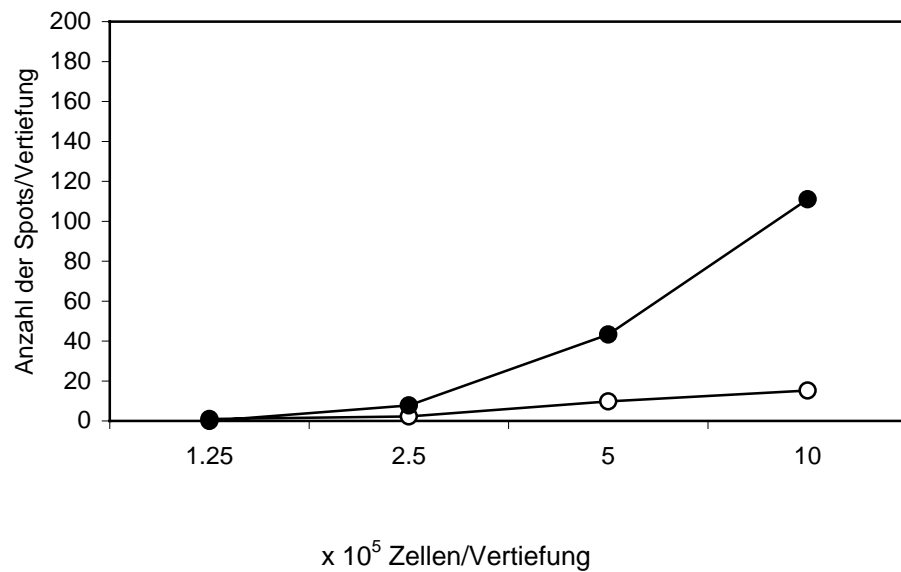
Zu diesem Zweck wurden verschiedene Konzentrationen von PBMC von CSFV Stamm Glentorf und Alfort/187 infizierten Schweinen in Anwesenheit von Virus für zwei Tage kultiviert und anschließend die Zahl der IFN- $\gamma$  produzierenden Zellen durch den Test quantifiziert (Abb. 15).



a)



b)



**Abb. 15.: IFN- $\gamma$  Sekretion durch Virusstimulation**

Zahl der im ELISPOT detektierten IFN- $\gamma$  sekretierenden Zellen einem CSFV-Stamm Glentorf (a) oder Alfort/187 (b) infizierten Schweinen. Die PBMC wurden ab einer Konzentration von  $10^7$  Zellen/ml titriert und mit CSFV Stamm Glentorf ( $5 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/Vertiefung; ●) oder CSFV Stamm Alfort/187 ( $2 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/Vertiefung; ●) inkubiert. Als Kontrolle wurden PBMC mitgeführt, die in Medium von mock-infizierten Zellen kultiviert wurden (○).

Von  $1,25 \times 10^5$  bis  $2,5 \times 10^5$  Zellen/Vertiefung ließen sich im ELISPOT für CSFV-stimulierte PBMC entweder keine oder nur eine sehr geringe Zahl von IFN- $\gamma$  sekretierenden Zellen nachweisen (Abb. 15 a, ●; 15 b, ●). Die Zellzahl der IFN- $\gamma$  sekretierenden Zellen der jeweiligen Negativkontrolle (Abb. 15 a, ○; 15 b, ○) lagen bei diesen Zellkonzentrationen im gleichen Bereich wie für CSFV-stimulierte PBMC. Ab  $2,5 \times 10^5$  Zellen/Vertiefung konnte ein Anstieg in der Zahl der IFN- $\gamma$  sekretierenden Zellen sowohl für PBMC aus dem mit CSFV-Stamm Glentorf (Abb. 15 a) als auch mit CSFV Stamm Alfort/187 infizierten Schweines (Abb. 15 b) verzeichnet werden. Die Anzahl der Spots stieg dabei mit zunehmender Zellzahl. Im Gegensatz dazu bewegten sich die Werte der Negativkontrolle weiterhin in einem Bereich von maximal 15 Spots. Eine CSFV Stimulation von PBMC ( $10^6$  Zellen/Vertiefung) des mit CSFV Stamm Glentorf infizierten Schweines führte zu einer 13fach höheren Anzahl von IFN- $\gamma$  freisetzenden Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle. Bei der CSFV-Stimulation von PBMC aus einem mit CSFV Stamm Alfort/187 infizierten Schweines konnte eine 7fache Erhöhung der Zahl der IFN- $\gamma$  freisetzenden Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle nachgewiesen werden.

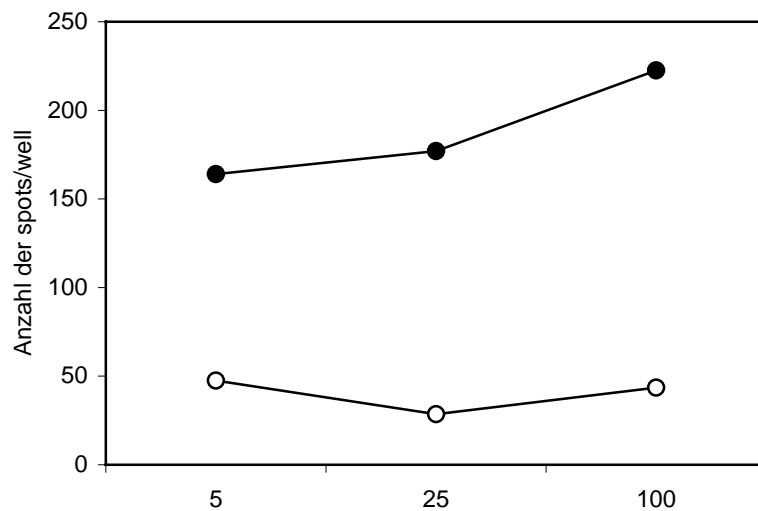
Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass porcine PBMC nach Stimulation mit CSFV in der Lage sind, IFN- $\gamma$  zu produzieren. Das heißt, dass CSFV eine T-Zellantwort auslösen kann. Diese IFN- $\gamma$  Sekretion war CSFV spezifisch aufgrund der geringe Anzahl der Spots, die mit Überstand aus mock infizierten Zellen gezählt wurden.

Vergleicht man Abb.15 a mit 15 b so fällt auf, dass für PBMC eines mit CSFV Stamm Glentorf infizierten Schweines eine höhere Zahl an Spots nachgewiesen werden konnte als für PBMC eines mit CSFV Stamm Alfort/187 infizierten Schweines. Dies lässt auf eine unterschiedliche Immunantwort der beiden Schweine schließen, geht man davon aus, dass bei diesen Experimenten verwendeten Viruskonzentrationen für die Stimulation optimal sind, was in vorangegangenen Proliferationstests bewiesen werden konnte.

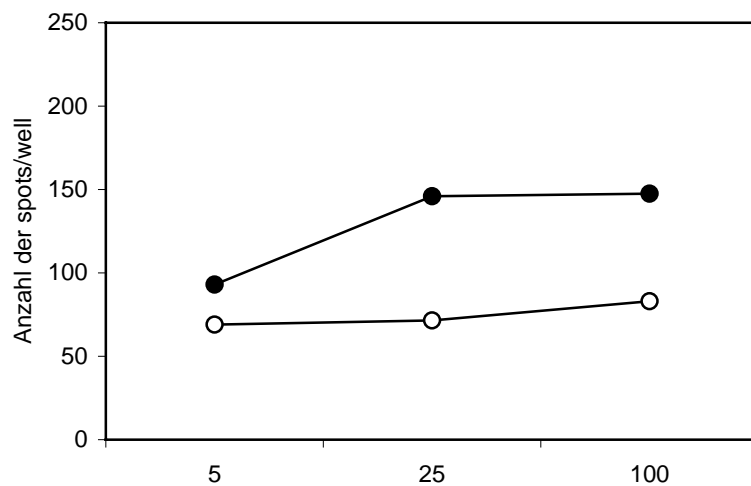
### 3.2.2.5.2. Interferon- $\gamma$ Freisetzung nach Peptidstimulation

Nachdem gezeigt werden konnte, dass CSFV IFN- $\gamma$  induzieren kann, stellte sich die Frage in wie weit eine *in vitro* Restimulation mit Peptid 290 einen Einfluß auf die IFN- $\gamma$  Sekretion hat.

a)



b)



**Abb. 16.: IFN- $\gamma$  Sekretion durch Peptidstimulation**

IFN- $\gamma$  sekretierende Zellen aus einem CSFV-Stamm Glentorf (a) oder Alfort/187 (b) infizierten Schweines wurden im ELISPOT nachgewiesen. Die PBMC ( $10^7$  Zellen/ml) wurden mit verschiedenen Konzentrationen (5  $\mu\text{g/ml}$ , 25  $\mu\text{g/ml}$  und 100  $\mu\text{g/ml}$ ) von Peptid 290 (●) stimuliert. Als Kontrolle wurden mit Peptid 5 (○) kultivierte PBMC mitgeführt.

Zu diesem Zweck wurden PBMC der beiden Schweine (1, 18; Abb. 16) mit verschiedenen Konzentrationen (5 µg/ml, 25 µg/ml und 100 µg/ml) des Peptids 290 im ELISPOT-Test eingesetzt.

Aufgrund der ELISPOT-Tests, die mit CSFV durchgeführt wurden, wurde eine Zellzahl von  $10^6$  Zellen/Vertiefung als Optimalkonzentration für diese Versuche ausgewählt.

Bei den PBMC des mit CSFV Stamm Glentorf infizierten Schweines (Tier 18) stieg die Anzahl der Spots mit der Zunahme der Konzentration des stimulierenden Peptids (Abb. 16 a, ●). Im Gegensatz dazu blieb die Anzahl der IFN- $\gamma$  sekretierenden Zellen bei der Negativkontrolle (irrelevantes Peptid 5, ○) konstant. Schon bei einer Peptidkonzentration von 5 µg/ml des Peptids 290 konnten peptidspezifische IFN- $\gamma$  sekretierende Zellen nachgewiesen werden. Eine Stimulation von PBMC von Tier 18 mit Peptid 290 (5 µg/ml) führte dabei zu einer 3,5fach erhöhten Anzahl IFN- $\gamma$  sekretierender Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle. Bei einer Peptidkonzentration von 100 µg/ml stieg die Anzahl der IFN- $\gamma$  sekretierenden Zellen bis auf das 5fache in Vergleich zur Negativkontrolle an.

Für die PBMC, des mit dem CSFV Stamm Alfort/187 infizierten Schweines (1), stieg die Anzahl der Spots mit Zunahme der Konzentration von Peptid 290 an, bis ein Plateau erreicht wurde. Ab einer Peptidkonzentration von 25 µg/ml konnten peptidspezifische IFN- $\gamma$  sekretierende Zellen nachgewiesen werden. Bei dieser Konzentration verdoppelte sich die Anzahl der IFN- $\gamma$  sekretierenden Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle. Wie bei der Reaktion gegen Gesamtvirus zeigen auch die PBMC des Schweines 18 nach Restimulation mit Peptidantigen eine deutlich höhere Aktivität. Zusammenfassend konnte in diesen Versuchen gezeigt werden, dass die Anzahl der IFN- $\gamma$  sekretierenden Zellen in porcinen PBMC durch Stimulation mit Peptid 290 und Virus erhöht werden konnte. Die CSFV-Spezifität der IFN- $\gamma$  Sekretion zeigt sich durch den Vergleich der Anzahl der IFN- $\gamma$  sekretierenden Zellen bei Inkubation von porcinen PBMC mit Peptid 5 bzw. mock-Kontrolle. Außerdem konnten tierspezifische Unterschiede an der Anzahl IFN- $\gamma$  sekretierenden Zellen nachgewiesen werden.

### 3.2.2.6. MHC-Restriktion einer virus- oder peptidspezifischen T-Zell-Proliferation

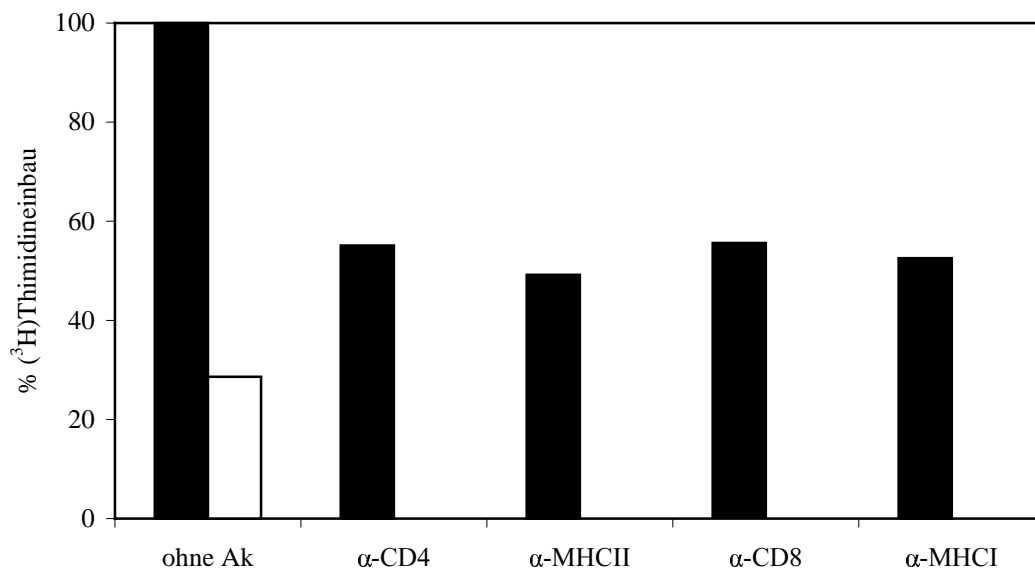
Virusspezifische CTL erkennen mit ihrem T-Zell-Rezeptor virale Peptide nur, wenn diese in Assoziation mit MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Oberfläche infizierter Zellen präsentiert werden (Zinkernagel & Doherty, 1979; Vitiello & Sherman, 1983). Das CD8 Molekül stabilisiert dabei die Bindung zwischen T-Zell-Rezeptor und Antigen-MHC-Klasse-I-Komplex und spielt damit eine wichtige Rolle bei der CTL-Aktivierung. Bei der Aktivierung von T-Helfer-Zellen kommt es zur Bindung zwischen dem T-Zell-Rezeptor und einem Antigen-MHC-Klasse-II-Molekül Komplex, der auf antigenpräsentierenden Zellen präsentiert wird. Die T-Helfer-Zellen tragen auf ihrer Zelloberfläche unter anderem auch das Glykoprotein CD4, das die Bindung zwischen T-Zell-Rezeptor und MHC-Klasse-II-Molekül stabilisiert. Durch die Blockierung der Oberflächenmoleküle CD4, CD8, MHC-I und MHC-II mit Hilfe von spezifischen monoklonalen Antikörpern kann die MHC-Restriktion einer antigenspezifischen Proliferation nachgewiesen werden.

#### 3.2.2.6.1. MHC-Restriktion einer virusspezifischen T-Zell-Proliferation

Um die MHC-Restriktion für die virusspezifische T-Zell-Proliferation zu charakterisieren, wurden PBMC unter Zugabe der entsprechenden monoklonalen Antikörper (mAk) für 5 Tage mit CSFV inkubiert und anschließend die Proliferation über den Einbau von radioaktivem [<sup>3</sup>H]Thymidin bestimmt (Abb. 17). Als Positivkontrolle diente die Proliferation von PBMC, die mit Virus und ohne den Zusatz von mAk restimuliert wurden. Als Negativkontrolle wurden die PBMC mit Überstand aus mock-infizierten Zellen und ohne mAk inkubiert.

Es konnte gezeigt werden, dass die Werte der CSFV-spezifischen Proliferation (Positivkontrolle: Abb. 17, ohne Ak, schwarzer Balken) dreifach höher lagen als die Werte der Negativkontrolle (Abb. 17, ohne Ak; weißer Balken). Die CSFV-spezifische Stimulation von PBMC konnte sowohl durch den Zusatz von Antikörpern gegen CD4 und MHC-Klasse-II-Moleküle als auch durch mAk gegen CD8 und MHC-Klasse-I-Moleküle deutlich inhibiert werden. Sowohl für die T-Helfer-Zell-Aktivierung als auch für die CTL-Aktivierung konnte durch den mAk eine Inhibition der Proliferation von ca. 50 % beobachtet werden. Die Ergebnisse zeigten, dass die virusspezifische Proliferation

sowohl auf einer MHC-Klasse-I als auch auf einer MHC-Klasse-II Antigenpräsentation beruht.



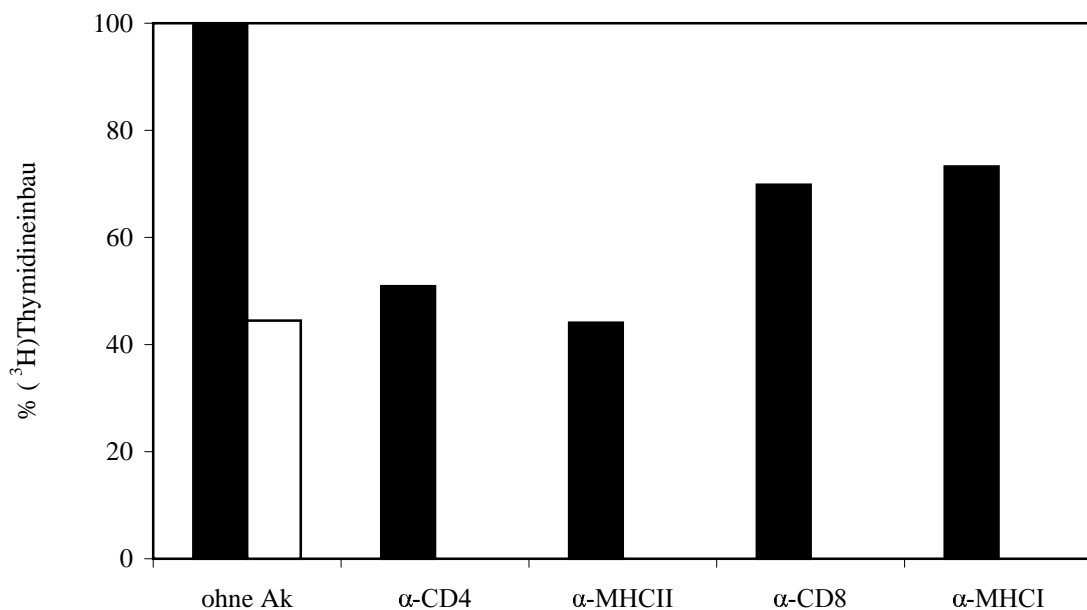
**Abb. 17.: MHC-Restriktion einer virusspezifischen T-Zell-Proliferation.**

PBMC ( $10^5$ /Mikrokultur) eines mit dem CSFV-Stamm Glentorf infizierten Schweines (Schwein 18) wurden mit CSFV ( $2 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/Mikrokultur, schwarze Balken) unter Zugabe von mAk gegen CD4, MHC-Klasse-II, CD8 und MHC-Klasse-I stimuliert. Die Proliferation der Zellen wurde durch den Einbau von [<sup>3</sup>H]Thymidin quantifiziert. PBMC, die mit Überständen aus mock-infizierten Zellen inkubiert wurden, dienten als Negativkontrolle (weißer Balken). Im Gegensatz dazu dienten PBMC, die nur mit CSFV (schwarzer Balken, ohne Ak) inkubiert wurden, als Positivkontrolle. Der [<sup>3</sup>H]Thymidineinbau der Positivkontrolle wurde als 100 % angesetzt.

### 3.2.2.6.2. MHC-Restriktion einer peptidspezifischen T-Zell-Proliferation

Die Untersuchungen zur MHC-Restriktion einer peptidspezifischen T-Zell-Proliferation wurden exemplarisch mit dem Peptid 290, aufgrund seiner hohen stimulatorischen Kapazität, durchgeführt. Zum Nachweis der MHC-Restriktion der peptidspezifischen T-Zell-Proliferation wurden PBMC aus einem mit dem CSFV Stamm Glentorf infizierten Inzuchtschwein (76 Tage p.i.) unter Zugabe der entsprechenden monoklonalen Antikörper für 5 Tage mit dem Peptid 290 (25 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurde die Proliferation durch den [<sup>3</sup>H]Thymidineinbau gemessen (Abb. 18). Als Positivkontrolle (Abb. 18, ohne Ak, schwarzer Balken) diente die Proliferation von PBMC, die mit Peptid 290 ohne Zusatz von mAk stimuliert wurden. PBMC, die mit einem irrelevanten Peptid (Peptid 5) ohne Zusatz von mAk kultiviert wurden, dienten als Negativkontrolle (Abb. 18, ohne Ak, weißer Balken).

Ohne den Zusatz von Antikörpern ließ sich für die Positivkontrolle, (mit Peptid 290 stimulierten PBMC) eine im Vergleich zur Negativkontrolle (mit Peptid 5 stimulierten PBMC) um mehr als das Doppelte gesteigerte Proliferation, nachweisen (Abb. 18, ohne Ak). Durch Zugabe von mAk gegen CD4 und MHC-Klasse-II zum Inkubationsansatz konnte die peptidspezifische Proliferation deutlich inhibiert werden. Die Proliferationswerte lagen nach Zugabe des Antikörpers gegen CD4 und MHC-Klasse-II im Bereich der Negativkontrolle. Eine Inhibition der peptidspezifischen Proliferation konnte ebenfalls für die Zellen gezeigt werden, die mit mAk gegen CD8 und MHC-Klasse-I inkubiert wurden. Die peptidspezifische Proliferation wurde nach Zugabe der mAk gegen CD8 und MHC-Klasse-I um ca. 30 % und nach Zugabe von mAk gegen CD4 und MHC-II um ca. 50 % inhibiert. Die Ergebnisse der Blockierungsexperimente zeigten, dass das Peptid 290 sowohl eine MHC-II restringierte T-Helfer-Zell-Aktivierung als auch eine MHC-I restringierte CTL-Aktivierung induziert.



**Abb. 18.: MHC-Restriktion einer peptidspezifischen T-Zell-Proliferation.**

PBMC ( $10^5$  Zellen/Mikrokultur) eines mit dem CSFV-Stamm Glentorf infizierten Schweines (Schwein 18) wurden unter Zugabe von mAk gegen CD4, MHC-Klasse-II, CD8, MHC-Klasse-I mit Peptid 290 (25  $\mu$ g/ml, schwarze Balken) stimuliert. Die Quantifizierung der Proliferation der PBMC erfolgte über den [<sup>3</sup>H]Thymidineinbau. PBMC, die mit einem irrelevanten Peptid (Peptid 5) inkubiert wurden, wurden als Negativkontrolle eingesetzt (weißer Balken). Im Gegensatz dazu dienten PBMC, die mit Peptid 290 (schwarzer Balken, ohne Ak) inkubiert wurden, als Positivkontrolle. Der [<sup>3</sup>H]Thymidineinbau der Positivkontrolle wurde als 100 % angesetzt.

### 3.2.2.7. Durchflusszytometrische Charakterisierung CSFV stimulierter PBMC

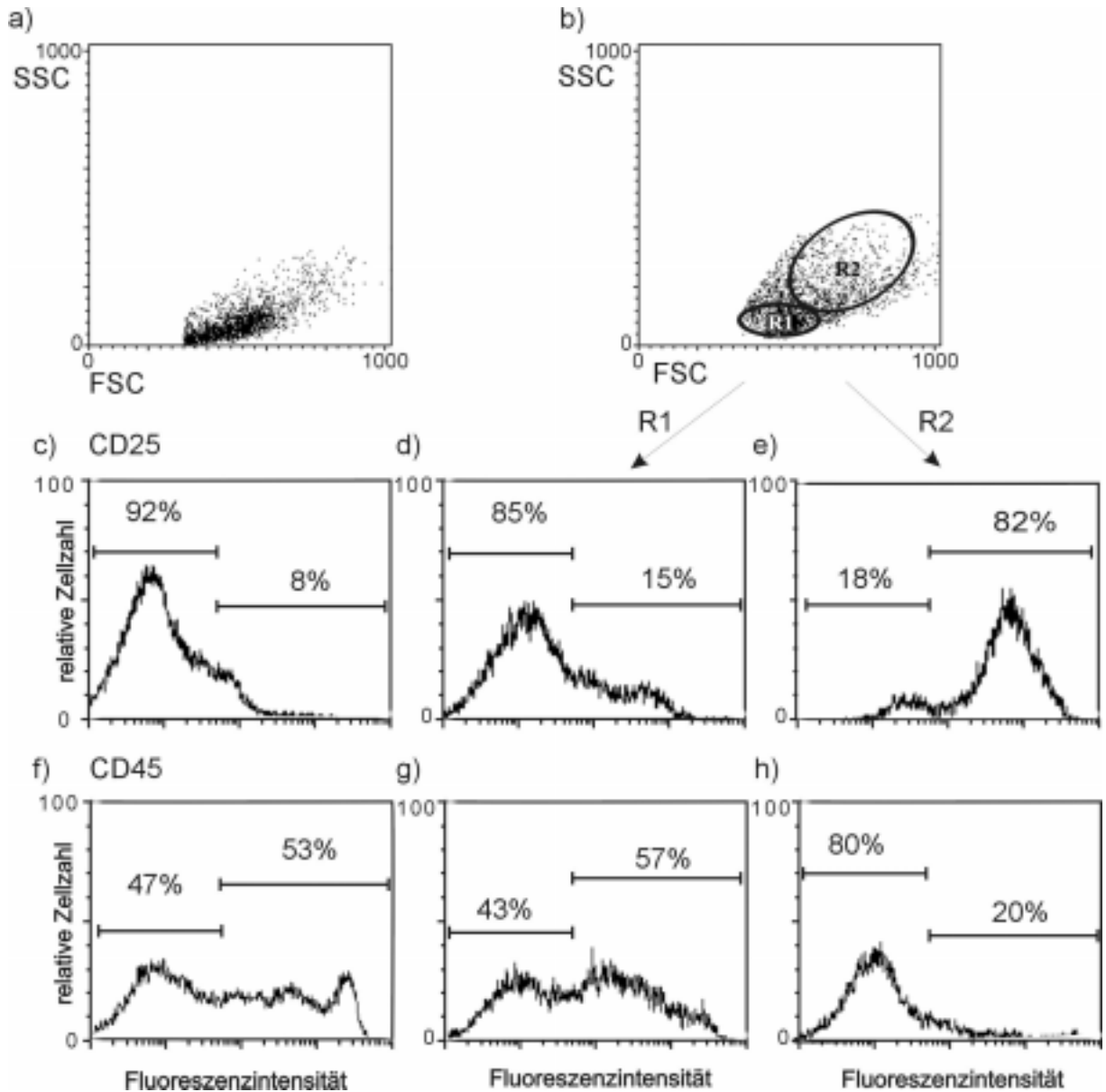
Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde eine phänotypische Charakterisierung der CSFV-spezifischen T-Zellen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden spezifische fluorochrom markierte mAk gegen verschiedene Leukozytendifferenzierungsantigene des Schweines verwendet.

#### 3.2.2.7.1. Nachweis einer Aktivierung von CSFV-restimulierten PBMC

Um die CSFV-spezifischen T-Lymphozyten näher zu charakterisieren, wurden PBMC eines mit CSFV-Stamm Alfort/187 infizierten Schweins vor und sechs Tage nach in vitro Restimulation mit CSFV, mit monoklonalen Antikörpern gegen die T-Zelldifferenzierungsantigene CD4, CD8 und zusammen mit CD25 und CD45 für die durchflusszytometrische Analysen markiert. Das CD25 Antigen diente als Marker für aktivierte Zellen. Ruhende und naive T- und B-Lymphozyten exprimieren einen Teil des IL-2-Rezeptors ( $\beta$ - und  $\gamma$ -Kette). Nach Aktivierung dieser Zellen wird die Synthese der  $\alpha$ -Kette induziert. Der mAk gegen CD25 erkennt ein Epitop auf der  $\alpha$ -Kette des IL2-Rezeptors, das ausschließlich auf aktivierten B- und T-Zellen exprimiert wird. Bei dem Oberflächenmolekül CD45 handelt es sich um ein auf allen hämatopoetischen Zellen exprimiertes Antigen, dessen Dichte auf Lymphozyten besonders hoch ist. Charakteristisch ist die Expression verschiedener Isoformen auf unterschiedlich differenzierten T-Zellen. Die Isoform CD45RC wird auf naiven T-Zellen, die Isoform CD45R0 auf aktivierten Zellen und Gedächtniszellen exprimiert. Nach Markierung der Zellen mit dem Antikörper gegen CD45RC enthält die negative Fraktion aktivierte T-Zellen und T-Gedächtnis-Zellen.

Die Abbildung 19 (a und b) zeigt die Streulichtparameter (forward scatter, FSC vs. side scatter, SSC) von PBMC vor (a) und sechs Tage nach in vitro Restimulation mit CSFV (b). Der Anteil aktivierter T-Zellen, in der Regel große Zellen mit hoher Granularität (hoher FSC und SSC, Abb. 19 a, b), war bei den virusrestimulierten Zellen deutlich höher im Vergleich zu den nicht stimulierten Zellen.





**Abb. 19: Expression von CD25 und CD45RC auf PBMC vor und nach *in vitro* Restimulation mit CSFV**

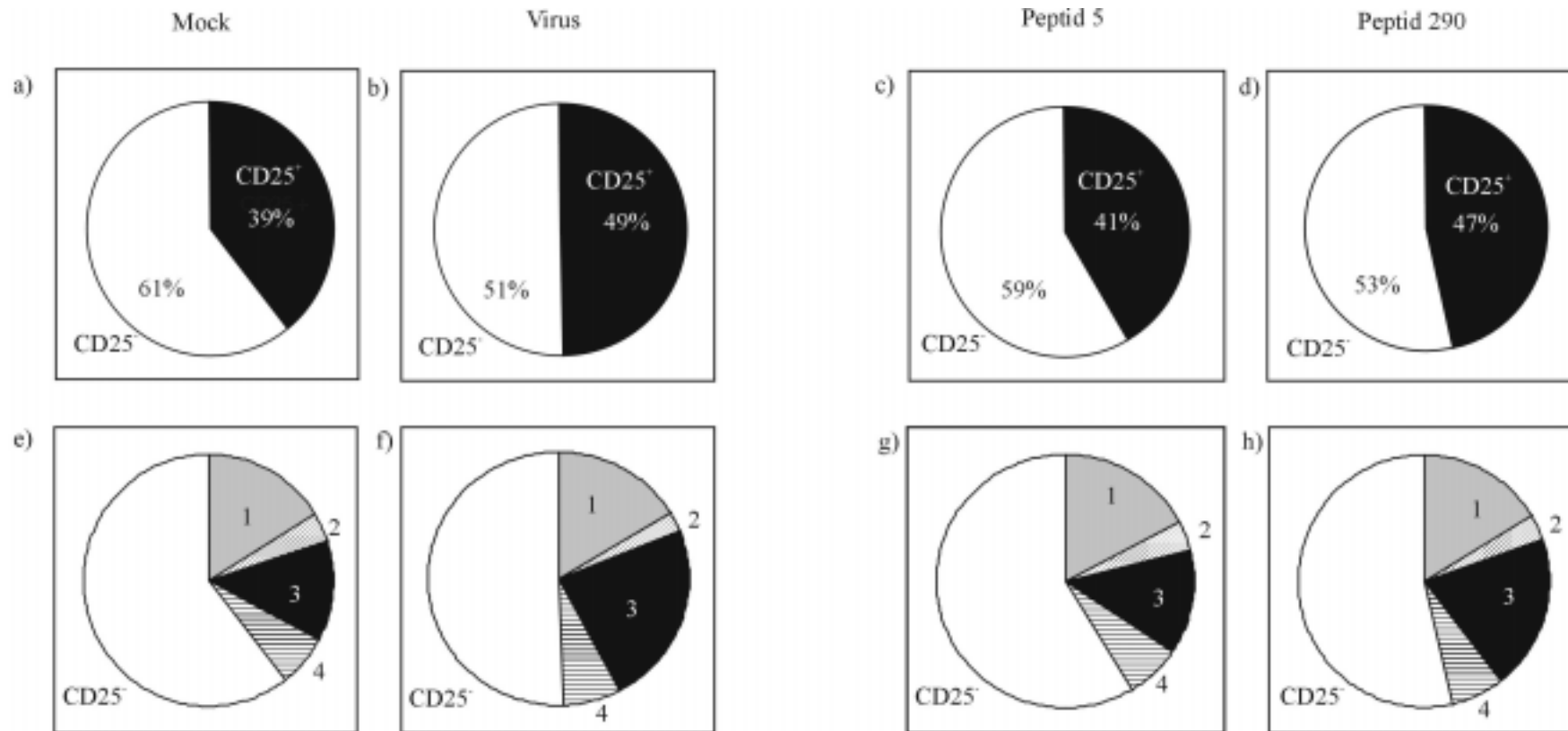
PBMC ( $2 \times 10^5$ /Mikrokultur) eines mit dem CSFV-Stamm Alfort/187 infizierten Schweines wurden für 6 Tage mit Virus ( $2 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub> CSFV Stamm Alfort/187/Mikrokultur) restimuliert. Jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen vor und nach der Restimulation wurden mit mAk gegen CD25 oder CD45 markiert und durchflußzytometrisch analysiert. Die fluoreszenzunabhängigen Streulichtparameter FSC (forward scatter, Vorwärtsstreulicht) und SSC (side scatter, Seitwärtsstreulicht) für ruhende (a) und für CSFV stimulierte PBMC (b) sind als Dotplotdarstellungen gezeigt. Aufgrund der unterschiedlichen Größe und Granularität lassen sich in Darstellung b ruhende Zellen (R1) von aktivierten Zellen (R2) unterscheiden. Die Histogramme (c-h) zeigen die Fluoreszenzintensität für CD25 (c-e) und CD45 (f-h) bei nicht stimulierten PBMC (c, f) sowie bei *in vitro* kultivierten ruhenden (d, g) und aktivierten (e, h) CSFV stimulierten PBMC.

Die *in vitro* CSFV-restimulierten PBMC konnten aufgrund der Streulichtparameter in kleinere ruhende Zellen mit geringer Granularität (Abb. 19 b, R1) und große blastenartige Zellen mit hoher Granularität (Abb. 19 b, R2) untergliedert werden. Beide Zellfraktionen wurden auf ihre CD25 und CD45RC Expression analysiert. Der Anteil an CD25-positiven Zellen innerhalb der *in vitro* kultivierten ruhenden Population (Abb. 19 d, 15 %) entsprach ungefähr dem Anteil der CD25-positiven Zellen innerhalb der nicht stimulierten Zellen (Abb. 19 c, 8%). Allerdings war die Expression von CD25 etwas erhöht. Im Gegensatz dazu lag der Anteil der CD25-positiven Zellen in der Population der blastenartigen Zellen (Abb. 19 e) bei 82 % und zeigte eine deutliche hohe CD25 Expression.

Ähnliche Ergebnisse konnten bei der CD45 Expression gezeigt werden. Auch hier ähnelten sich die CD45RC-Expression auf ruhenden virusrestimulierten (Abb. 19 g, 57 %) Zellen und auf nicht stimulierten Zellen (Abb. 19 f, 53 %). In der Blasten Population der *in vitro* aktivierten CSFV-spezifischen T-Zellen war die CD45RC Expression deutlich niedriger (Abb. 19 h, 20 %).

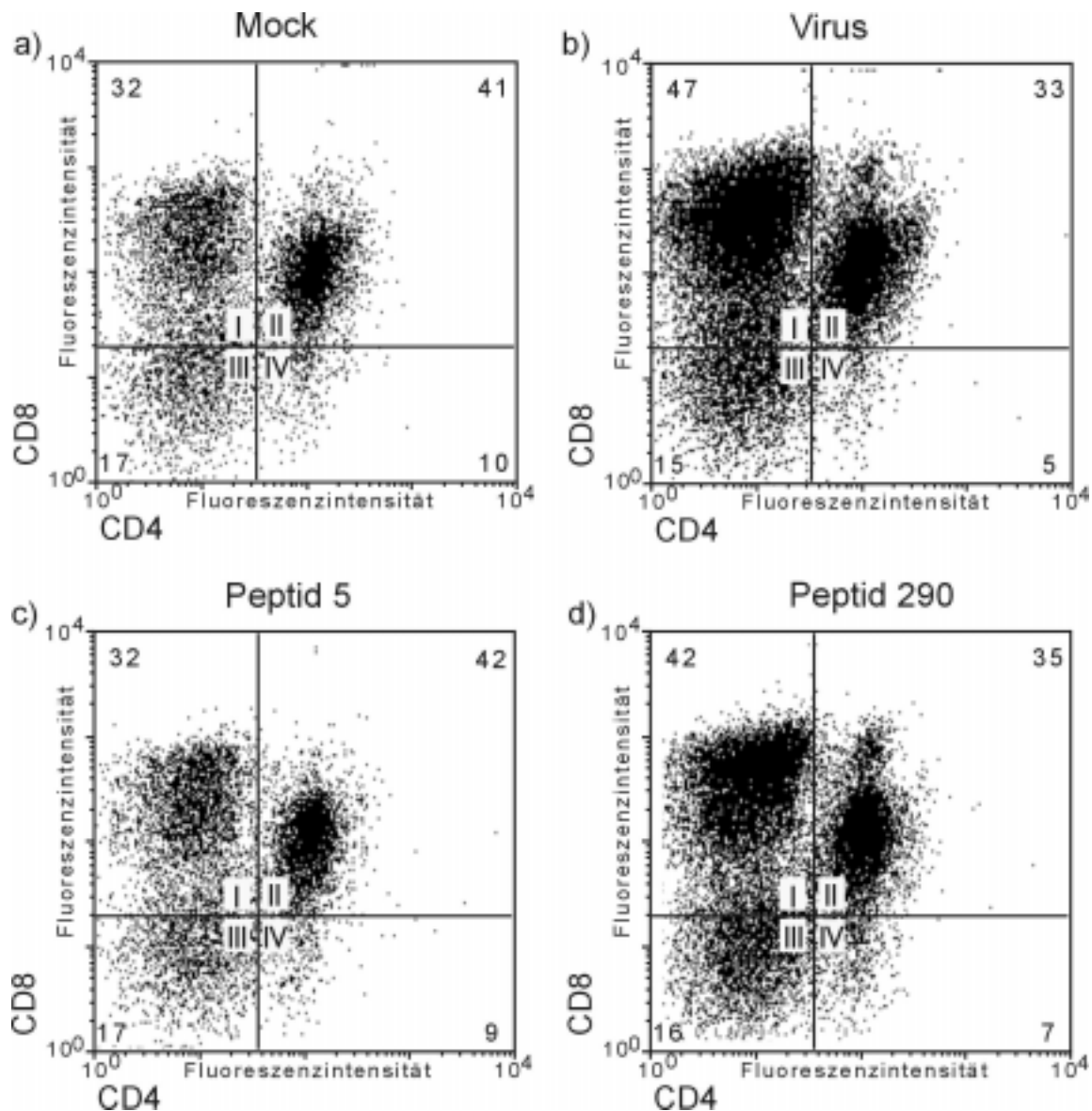
### 3.2.2.7.2. Phänotypische Charakterisierung von PBMC nach *in vitro* Restimulation

Das vorherige Kapitel beschrieb den Phänotyp von CSFV restimulierten PBMC in Bezug auf die Expression von CD25 und CD45. Im Folgenden sollte nun über eine zusätzliche Markierung mit mAk gegen CD4 und CD8 geklärt werden, welche der T-Zellsubpopulationen durch das CSFV-Antigen aktiviert wurden. PBMC eines CSFV-Stamm Alfort/187 infizierten Schweins wurden für 6 Tage mit CSFV bzw. mit dem Peptid 290 stimuliert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit monoklonalen Antikörpern gegen CD4, CD8 und CD25 markiert und durchflusszytometrisch untersucht. Abbildung 20 zeigt den Anteil der CD25-positiven T-Zellen nach Virus- und Peptidstimulation. Es zeigte sich, daß der Anteil der CD25-exprimierenden Zellen bei der CSFV Stimulation (Abb. 20 b) höher lag als bei der entsprechenden Negativkontrolle (Abb. 20 a, mock). Ähnliche Ergebnisse fanden sich für peptidstimulierte Zellen. Der Anteil der CD25-exprimierenden Zellen hatte nach Stimulation der PBMC mit Peptid 290 (Abb. 20 d) im Vergleich zur Negativkontrolle (Abb. 20 c, Peptid 5) zugenommen. Mit Hilfe einer Dreifarbenimmunfluoreszenzanalyse mit monoklonalen Antikörpern gegen CD4, CD8 und CD25 wurden dann die T-Zellsubpopulationen, die die CD25-positiven Zellen enthielten, bestimmt (Abb. 20 e-h, Abb. 21).



**Abb. 20: Anteil und Phänotyp CD25-positiver T-Zellen nach Virus- und Peptidstimulation**

PBMC ( $2 \times 10^5$ /Mikrokultur) eines mit dem CSFV Stamm Alfort/187 infizierten Schweines wurden mit Virus (CSFV strain Alfort/187,  $2 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/Mikrokultur; b, f) bzw. Peptid 290 ( $5 \mu\text{g}$ /Mikrokultur; d, h) stimuliert. Nach einer Inkubationszeit von 6 Tagen wurden die PBMC ( $1 \times 10^6$  Zellen) mit monoklonalen Antikörpern gegen CD4, CD8 und CD25 durchflußzytometrisch analysiert. PBMC, die mit dem Peptid Nr. 5 (c, g) oder mit dem Überstand von mock-infizierten Zellen (a, e) inkubiert wurden, dienen als Negativkontrolle. Die Abbildung zeigt graphisch den prozentualen Anteil der CD25<sup>+</sup> Zellen (a-d) und den Anteil durch CD4 und CD8 definierten T-Zellsubpopulationen an den CD25<sup>+</sup> Zellfraktionen (e-h). Dabei wird der Anteil der 1: CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>; 2: CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>; 3: CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>; 4: CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> T-Lymphozyten beschrieben.



**Abb. 21.: Phänotypische Charakterisierung CD25<sup>+</sup> stimulierter PBMC**

PBMC ( $2 \times 10^5$ /Mikrokultur) eines mit CSFV Stamm Alfort/187 infizierten Schweines wurden mit Virus (CSFV Stamm Alfort/187,  $2 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/Mikrokultur) sowie dem Peptid 290 (5 µg/Mikrokultur) stimuliert. Nach 6 Tagen wurden die PBMC ( $1 \times 10^6$ ) mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern gegen CD4, CD8 und CD25 durchflußzytometrisch analysiert.

Die Darstellung zeigt die CD4- versus CD8- Antigenexpression der CD25<sup>+</sup> PBMC-Fraktionen (siehe Abb.20), die mit Virus (b) oder Peptid 290 (d) *in vitro* stimuliert wurden. Phänotyp der CD25<sup>+</sup> PBMC, die mit dem Überstand von mock-infizierten Zellen (a) oder dem Peptid 5 (c) inkubiert wurden, dienten als Negativkontrolle. Die in den Darstellungen auftretenden Quadranten wurden durch unmarkierte Zellen festgelegt und definieren doppel-negativ, einfach positive und doppel-positive Zellpopulationen. Die prozentualen Anteile der verschiedenen T-Zellsubpopulationen (I: CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>, II: CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, III: CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>, IV: CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>) sind in den Ecken der einzelnen Quadranten angegeben.

Durch die Expression der Differenzierungsantigene CD4 und CD8 können innerhalb der CD25<sup>+</sup> aktivierten T-Lymphozyten einzelne T-Zellsubpopulationen identifiziert werden. Bei der Markierung von Zellen mit monoklonalen Antikörpern gegen CD4 und CD8 lassen sich beim Schwein vier T-Lymphozytensubpopulationen definieren (Abb. 21): CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (Quadrant II) und CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> (Quadrant IV) stellen die T-Helfer-Zellen dar. Zellen mit dem Phänotyp CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> enthalten dabei die aktivierten T-Helfer- und T-Helfer-Gedächtnis-Zellen (Saalmüller *et al.*, 1989; Summerfield *et al.*, 1996). Die CD4-einfachpositive T-Zellsubpopulation enthält dagegen hauptsächlich naive T-Helfer-Zellen. Zytolytische T-Zellen (CTL) und NK-Zellen finden sich in der CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> Fraktion (Quadrant I) (Jonjic & Koszinowski, 1984; Saalmüller & Bryant, 1994; Pauly *et al.*, 1996). Die Subpopulation mit dem Phänotyp CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> enthält die B-Lymphozyten, Monozyten und T-Lymphozyten mit  $\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptor (Quadrant III) (Hirt *et al.*, 1990).

Abbildung 21 zeigt die Expression von CD4 und CD8 auf CD25<sup>+</sup> Zellen, die mit Virus (Abb. 21 b) bzw. mit dem Peptid 290 (Abb. 21 d) stimuliert worden waren. Der prozentuale Anteil der verschiedenen T-Lymphozytenpopulationen ist in dem entsprechenden Quadranten gezeigt. Als Negativkontrolle wurden die PBMC mit Überstand von mock-infizierten Zellen (Abb. 21 a) oder mit dem irrelevanten Peptid Nr. 5 (Abb. 21 c) inkubiert.

Wie schon oben erwähnt, können porcine CD4 positive T-Helfer-Zellen anhand ihrer CD8 Expression in CD8<sup>-</sup> naive T-Helfer-Zellen und CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> aktivierte T-Helfer-Zellen und T-Helfer-Gedächtnis-Zellen untergliedert werden. Eine Bestimmung des Verhältnisses der beiden T-Helfer-Zellsubpopulationen sollte einen Rückschluß auf eine mögliche T-Helfer-Zell-Aktivierung erlauben.

Dieses Verhältnis beträgt bei der Inkubation der PBMC mit der mock-Kontrolle (Abb. 21 a; % Quadrant II durch % Quadrant IV) 4,1. Dieser Quotient stieg durch die Restimulation mit Virus auf 6,6 an. Bei der Restimulation der PBMC mit dem irrelevanten Peptid 5 bzw. mit Peptid 290 stieg der Quotient von 4,6 auf 5 an. Dies deutet zusätzlich auf eine Aktivierung der T-Helfer-Zellen sowohl durch eine Restimulation mit Virus als auch mit Peptid 290 hin.

Weiter wurde ein deutlicher Anstieg der CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> Fraktion von 32% auf 47% bei der Restimulation der PBMC mit Virus (Abb. 21 b, Quadrant I) im Vergleich zu der Negativkontrolle (Abb. 21 a, Quadrant I) beobachtet. Im Fall der Stimulation mit dem

irrelevanten Peptid 5 (Abb. 21 c, Quadrant I) bzw. mit dem Peptid 290 (Abb. 21 d, Quadrant I) zeigte sich ein vergleichbares Anstieg von 32% auf 42%. Diese Zellpopulation der  $CD4^+CD8^+$  enthält sowohl MHC-I restringierte CTL als auch NK-Zellen. In der Abbildung 21 (b, d) wird deutlich, dass vor allem eine Zunahme der CD8-hochpositiven Zellen zu verzeichnen war. Die Zellen konnten als MHC-I restringierte T-Zellen definiert werden. Eine Zunahme von CD8-schwach positiven NK-Zellen war weniger stark. Der Anteil der  $CD4^+CD8^-$  Subpopulation blieb in allen Gruppen nahezu konstant (Abb. 21 a-d, Quadrant III). Dies zeigt, dass weder B-Zellen, TcR $\gamma\delta$  Zellen, noch Monozyten durch die entsprechenden CSFV-Antigene restimuliert wurden.

### 3.2.2.8. Zytolytische Aktivität CSFV-spezifischer T-Lymphozyten

Antigenspezifische zytolytische T-Lymphozyten (CTL) spielen eine zentrale Rolle im spezifischen Immunsystem bei der Abwehr von viralen Infektionen (Pasternack, 1988).

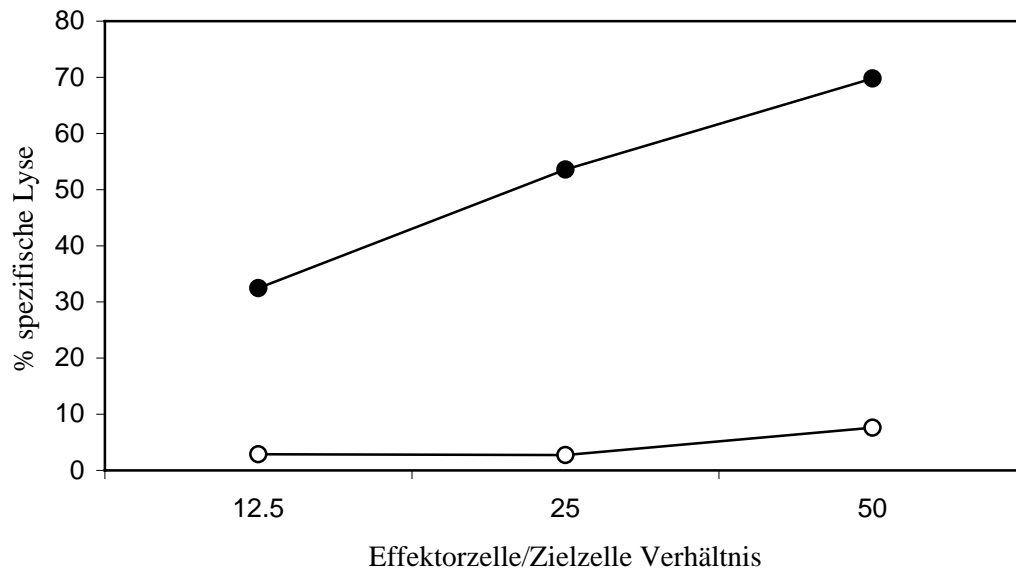
Die bisherigen durchflusszytometrischen Daten haben gezeigt, dass die  $CD4^+CD8^+$  CTL Population nach Stimulation mit CSFV oder mit dem Peptid 290 deutlich zunimmt (Abb. 21). Darüber hinaus konnten auch die Experimente zur Charakterisierung der MHC-Restriktion (Abb. 17, 18) eine deutliche Beteiligung CD8 positiver, MHC-I restringierter T-Lymphozyten (CTL) zeigen. Die Rolle dieser zytolytischen T-Lymphozyten sollte näher untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden CTL-Test (Chromfreisetzungstest) durchgeführt. Bei diesem Test wurde die Lyse der chrommarkierten Zielzellen durch die CSFV-spezifisch-aktivierten Effektorzellen (CTL) mittels Messung der Chromfreisetzung bestimmt. Die Stärke der Lyse ist dabei ein Maß für die Aktivierung der CTL. PBMC, eines mit dem CSFV Stamm Glentorf infizierten Inzuchtschweines, wurden als Effektorzellen eingesetzt. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass nur PBMC, die mit dem Virus *in vitro* restimuliert wurden, eine deutliche zytolytische Aktivität zeigten also eine hohe Rate virusspezifischer CTL enthielten. Als Zielzellen wurden MAX-Zellen eingesetzt. MAX-Zellen wurden nach Transformation von Nierenzellen eines d/d-Inzuchtschweines mit dem SV-40 „large“ T Antigen gewonnen. Diese Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche MHC-Klasse-I Moleküle und können mit CSFV infiziert werden. Beides sind Voraussetzungen für eine erfolgreiche Präsentation von viralen Antigenen und für die Erkennung durch CSFV-spezifische CTL.

### 3.2.2.8.1. Zytolytische Aktivität CSFV-spezifischer T-Lymphozyten nach Stimulation mit CSFV

Zum Nachweis CSFV-spezifischer CTL wurden PBMC eines infizierten Schweines (CSFV-Stamm Glentorf) *in vitro* für 6 Tage mit CSFV restimuliert. Nach der Kultivierung wurden die PBMC auf ihre zytolytische Aktivität im Chromfreisetzungstest untersucht. Dazu wurden Zielzellen mit CSFV-Stamm Glentorf (Abb. 22, MOI 1) für 2 Tage infiziert und mit  $^{51}\text{Cr}$  markiert. Die zytolytische Aktivität der CSFV-spezifischen CTL wurde gegenüber den chrommarkierten Zielzellen in einem 4stündigen Chromfreisetzungstest analysiert. Als Negativkontrolle dienten die mit mock inkubierten Zielzellen (MAX-Zellen).

Die Abbildung 22 zeigt die Lyse der CSFV-infizierten MAX-Zellen durch die CSFV-spezifischen CTL (Abb. 22, ●) im Vergleich zur Negativkontrolle (Abb. 22, ○). Die CSFV-spezifische Lyse war deutlich abhängig von der Zahl der Effektorzellen (virusrestimulierte PBMC). Bei einem Verhältnis von Effektorzellen zu Zielzellen von 50:1 lag die zytolytische Aktivität ca. 60 % über der der Negativkontrolle. Auffallend war, dass eine hohe spezifische Lyse bereits ab einem Effektor:Zielzell-Verhältnis von 12.5:1 nachgewiesen werden konnte. Diese hohe spezifische Lyse scheint mit einer hohen Rate  $\text{CD8}^+$  Zellen nach *in vitro* Restimulation zu korrelieren.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die PBMC eines CSFV-infizierten Schweins eine deutliche CSFV-spezifische CTL-Aktivität zeigten. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit denen der MHC-Restriktionsexperimente (Abb. 17, Nachweis eine MHC-Klasse-I-Restriktion) und der durch durchflusszytometrische Analysen (Abb. 21, Zunahme der  $\text{CD4}^-\text{CD8}^+$  T-Zellsubpopulation durch Virusrestimulation) gewonnenen Daten. Nachdem eine CSFV-spezifische-zytolytische-Aktivität bei CSFV infizierten Zellen gezeigt werden konnte, stellt sich die Frage, ob im Peptid 290 ein CTL-Epitop zu finden wäre.



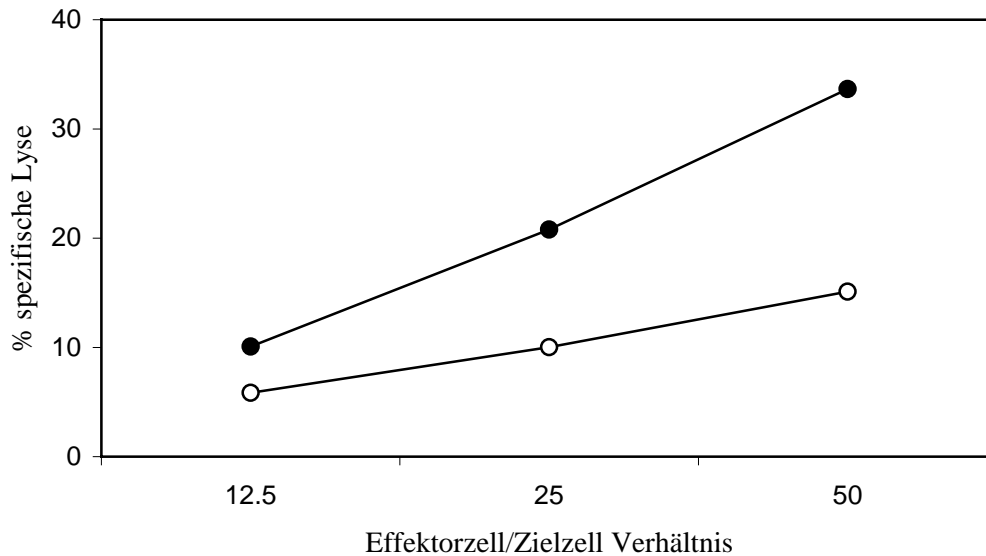
**Abb. 22.: Zytolytische Aktivität CSFV-spezifischer T-Lymphozyten**

Die zytolytische Aktivität von CTL eines d/d-Inzuchtschweines wurde gegen CSFV-infizierte (MOI 1; ●) bzw. mit mock-infizierten (○) Zielzellen im Chromfreisetzungstest untersucht. Als Effektorzellen dienten *in vitro* mit CSFV (MOI 0.5) restimulierte PBMC aus einem CSFV-Stamm Glentorf-infizierten Schwein. Als Zielzellen wurden die MAX-Zellen eingesetzt.

### 3.2.2.8.2. Zytolytische Aktivität CSFV-spezifischer T-Lymphozyten nach Stimulation mit dem Peptid 290

Durch die durchflusszytometrischen Untersuchungen konnte eine Aktivierung der CD4<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> Zellpopulation nach Stimulation von PBMC mit dem Peptid 290 nachgewiesen werden. In den folgenden Versuchen sollte nun geklärt werden, ob das Peptid 290 von CSFV-spezifischen CTL im Chromfreisetzungstest erkannt wird und somit ein MHC-I restringiertes T-Zell-Epitop darstellt.





**Abb. 23.: Zytolytische Aktivität CSFV-spezifischer T-Lymphozyten nach Stimulation mit Peptid 290**

Die zytolytische Aktivität von CTL eines d/d-Inzuchtschweines wurde gegen Peptid 290 (●, 20 µg Peptid/4x10<sup>4</sup> Zielzellen) bzw. mit dem irrelevanten Peptid 5 (○) inkubierten Zielzellen im Chromfreisetzungstest untersucht. Als Effektorzellen dienten in vitro mit Virus (MOI 0,5) restimulierte PBMC aus einem CSFV Stamm Glentorf-infizierten Schwein. Als Zielzellen wurden die MAX-Zellen eingesetzt.

Zu diesem Zweck wurden PBMC eines mit Stamm Glentorf infizierten Schweins in vitro für 6 Tage mit CSFV restimuliert um eine hohe Rate CSFV spezifische CTL zu gewinnen. Die mit dem Virus restimulierten PBMC wurden als Effektorzellen in den CTL-Test eingesetzt. Als Zielzellen wurden chrommarkierte MAX-Zellen mit dem Peptid 290 für 1 h inkubiert. Danach wurde die zytolytische Aktivität der in log<sub>2</sub>-Stufen titrierten Effektorzellen gegenüber den beladenen Zielzellen in einem 4stündigen Chromfreisetzungstest untersucht. Als Negativkontrolle dienten MAX-Zellen die mit dem irrelevantem Peptid (Peptid 5) inkubiert worden waren.

Es konnte eine deutliche Lyse der mit dem Peptid 290 inkubierten Zielzellen (Abb. 23, ●) nachgewiesen werden. Die Kontrolle, Zielzellen inkubiert mit dem Peptid 5 (Abb. 23, ○), zeigte nur eine geringe Lyse. Die spezifische Lyse war abhängig von der Zahl der Effektorzellen. Bei einem Effektorzell zu Zielzell Verhältnis von 25:1 und 50:1 lag die zytolytische Aktivität deutlich über die Negativkontrolle. Eine Steigerung der Effektorzellzahl führte zu einer Erhöhung der spezifischen Lyse der Zielzellen. Ein toxischer Effekt der Peptide konnte in den Versuchen ausgeschlossen werden, da die

Werte für die spontane Lyse der inkubierten Zielzellen mit und ohne irrelevantem Peptid nur geringfügig voneinander abwichen. Die Ergebnisse zeigten, dass mit dem Peptid 290 inkubierte Zielzellen von CSFV-spezifischen CTL erkannt wurden, was darauf hindeutet, dass im Peptid 290 ein CSFV-spezifisches CTL-Epitop enthalten ist.

Im Vergleich mit den vorhergehenden Versuchen zur MHC-Restriktion (Abb. 18) und den Durchflusszytometrieanalysen (Abb. 21) muss davon ausgegangen werden, dass das Peptid 290 sowohl eine MHC-I als auch eine MHC-II restringierte Immunantwort induzieren kann und sowohl ein CTL als auch ein T-Helfer-Zell-Epitop enthält.

#### 4. DISKUSSION

Die Klassische Schweinepest ist eine weltweit verbreitete Infektionskrankheit, die bedeutende wirtschaftliche Schäden verursacht (Edwards *et al.*, 2000 a; Stegeman *et al.*, 2000). Der letzte große Seuchenzug wurde in Europa 1997 dokumentiert (Greiser-Wilke, 2000). Vermutlich breitete sich damals die Seuche ausgehend von Deutschland über Holland und von dort über Italien, Spanien und Belgien aus.

Die heutzutage eingesetzten Bekämpfungsmaßnahmen beruhen auf einem strikten Vakzinationsverbot und der Vernichtung infizierter Tiere bzw. verdächtiger Herden. Außerdem setzt man verstärkt auf hygienische Maßnahmen und eine intensive epidemiologische Diagnostik.

Diese Bekämpfungsmaßnahmen wurden erlassen, da die entweder aus attenuierten oder inaktivierten Viren bestehenden klassischen Vakzine keine serologische Unterscheidung zwischen vakzinierten und infizierten Tieren erlauben. Das auf dieser Tatsache basierende Vakzinationsverbot der EU-Kommission kann nur mit Sondergenehmigung für Notimpfungen aufgehoben werden. Diese Notimpfungen sollten im Ernstfall einen Ring immunisierter "Landwirtschaftsbetriebe" erzeugen, der die weitere Ausbreitung der Krankheit verhindert.

Um diese aufwendige und nur bedingt wirkungsvolle Strategie zu verbessern wurde eine neue Generation von CSFV-Vakzinen und ein damit verbundener serologischer Diagnostik-Test entwickelt, der die Unterscheidung zwischen vakzinierten und infizierten Tieren ermöglicht (Van Rijn *et al.*, 1999). Die derzeit zugelassenen Vakzine-Subeinheiten beruhen auf rekombinantem E2 Glykoprotein von CSFV, das im Baculovirussystem exprimiert wird (Hulst *et al.*, 1993). Die Unterscheidung beruht darauf, dass im Serum von geimpften Tiere keine Antikörper gegen das E0 Glykoprotein nachweisbar sind.

Schweine, die nur ein Mal mit der E2-Marker-Vakzine geimpft wurden, sind ca. 13 Monate gegen eine lethale Infektion mit CSFV geschützt. Im Gegensatz dazu sind Tiere, die mit der klassischen C-Stamm Vakzine geimpft wurden, bis zu 6 Jahre gegen eine lethale Infektion geschützt (de Smit, 2001).

Ein weiterer Nachteil der E2-Marker-Vakzine besteht möglicherweise darin, dass aufgrund der großen Anzahl von Epitopen, die ein rekombinantes Protein enthält, eine

Kreuzreaktivität mit Antikörpern gegen andere Pestiviren auftreten kann. Dieser Fall wurde für Picornaviren beschrieben (Neitzert *et al.*, 1991).

Eine andere Alternative zu den bislang beschriebenen Vakzinen wäre eine synthetische Peptidvakzine, die aus definierten B- und/oder T-Zell-Epitopen eines Virus besteht (Menne *et al.*, 1997; Wiesmüller *et al.*, 1989). Durch diese Vakzine könnte zudem aufgrund der spezifischen B- oder T-Zell-Epitope eine Kreuzreaktivität zwischen eng verwandten Viren und falsch-positive Diagnosen verhindert werden (Shen *et al.*, 1999). Die Verwendbarkeit einer solchen Vakzine wird seit längerem bei verschiedenen Virusinfektionen untersucht (DiMarchi *et al.*, 1986; Morgan & Moore, 1990).

Die Analyse der Bindungsmotive von MHC-Molekülen durch Poolsequenzierung (Falk *et al.*, 1991 und 1994; Stevanovic & Jung, 1993) oder Peptidbibliotheken (Fleckenstein *et al.*, 1996; Jung *et al.*, 1998) spielen bei der Aufklärung von T-Zell-Epitopen eine wichtige Rolle. Der Einsatz von überlappenden synthetischen Peptiden ist eine weitere erfolgreiche Strategie zur Identifizierung von B- und T-Zell-Epitopen (Muller *et al.*, 1996; Ober *et al.*, 1998; Wiesmüller *et al.*, 1992, Beck-Sickinger & Jung, 1993).

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand die Identifizierung linearer B- und T-Zell-Epitope des klassischen Schweinepestvirus. 573 Pentadekapeptide mit einer Überlappung von 10 Aminosäuren wurden für die Epitopkartierung hergestellt. Diese Sequenzen umfassten die gesamte Strukturproteine (Nukleokapsid, E0, E1 und E2) und einen Teil der Nichtstrukturproteine (N<sup>pro</sup>, p7, NS2-3, NS4A, NS4B und NS5A) des CSFV-Stamm Glentorf.

Lineare B-Zell-Epitope sind in der Regel maximal 8 Aminosäuren lang und werden über 3-4 Aminosäure-Bindungsstellen vom Antikörper erkannt (Geysen, 1985). Eine Überlappung von 10 Aminosäuren wurde gewählt um ein potentielles Epitop im ELISA optimal erfassen zu können.

Die Identifizierung der linearen B-Zell-Epitope wurde mit Hilfe der CSFV Stamm Glentorf spezifischen synthetischen Peptide und Plasma von einem CSFV Stamm Glentorf infizierten Schwein im Peptid-ELISA durchgeführt. Ein einziges lineares B-Zell-Epitop konnte auf einem Peptid aus dem Autoprotease (N<sup>pro</sup>) Protein (FELLYKTNKRKPMGV) lokalisiert werden. Allerdings enthielten nicht alle Plasmen von Glentorf infizierten Tieren Antikörper gegen dieses Peptid.

Auffallend war, dass kein Pentadekapeptid aus dem Bereich des E2-Glykoproteins als B-Zell-Epitop identifiziert werden konnte, obwohl das rekombinante E2 Protein, im gleichen Test als positiv erkannt wurde. Es ist bekannt, dass dieses Protein B-Zell-Epitope enthält (Yu *et al.*, 1996), doch mit Hilfe der in dieser Arbeit durchgeführten Peptid-ELISA können nur lineare-B-Zell-Epitope und keine Konformationsepitope identifiziert werden. Es ist anzunehmen, dass die Plasmen der verschiedenen Schweine Antikörper enthalten, die E2-Konformationsepitope erkennen können, aber nicht Teile der Epitope auf einem kurzen Pentadecapeptid.

Das gefundene B-Zell-Epitop könnte als Teil eine Peptidvakzine verwendet werden, wodurch im optimalsten Fall eine Unterscheidung zwischen vakzinierten und infizierten Tiere möglich wäre. Da das Plasma von infizierten Tieren Antikörper gegen alle viralen Proteine aufweist (Shen *et al.*, 1999) ist eine Unterscheidung von vakzinierten Tieren, deren Plasma ausschließlich Antikörpern gegen das synthetische Peptid enthält, durch einen Peptid-ELISA möglich. Diese Peptid-ELISA könnte dann ganz auf infektiöses CSFV verzichten.

Peptidvakzinen, die aus B- und zusätzlich T-Zell-Epitopen bestehen, induzieren eine effektivere Immunantwort (Borrás-Cuesta *et al.*, 1987; Collen *et al.*, 1991; Piatti *et al.*, 1991). Eine synthetische Peptidvakzine, die aus einem B- und T-Zell-Epitop des Maul- und Klauenseuche Virus bestand und kovalent an Tripalmitoyl-S-glycerylcysteinylerylserine (Pam<sub>3</sub>Cys) gebunden war, konnte Meerschweinchen gegen eine Belastungsinfektion schützen (Wiesmüller *et al.*, 1989).

Deshalb wurde in weiteren Versuchen die Identifizierung von T-Zell-Epitopen auf unterschiedlichen viralen Proteinen des CSFV durchgeführt. Um eine optimale Aussage treffen zu können wurde zunächst die CSFV-spezifische Proliferation von PBMC nach Stimulation mit dem Virus untersucht. Dabei wurde das Testsystem in Bezug auf die Inkubationszeit, die Zellkonzentration und die Virusdosis optimiert.

Zur Analyse der T-Zell-Epitope, wurden die überlappenden synthetischen Peptide in Proliferationassays getestet. Da MHC-Klasse-II-Moleküle Peptide einer Länge von 10 bis 30 Aminosäuren präsentieren (Chicz *et al.*, 1993) wurden für die Epitopkartierung Pentadekapeptide ausgewählt. Bei Epitopkartierung von 82 % des gesamten kodierenden Bereiches des CSFV konnten 26 positive Peptide durch PBMC eines mit CSFV Stamm

Glentorf infizierten Schweines identifiziert werden. 11 dieser Peptide stammten aus dem Strukturproteinbereich (E0, E1, E2) und 15 aus dem Nichtstrukturproteinbereich (NS2-3, NS4A, NS4B und NS5A).

In dieser Arbeit wurden 5 positive Peptide (Peptide 140, 148, 162, 200 und 201) aus dem E2 Glykoprotein als T-Zell-Epitop identifiziert. Das E2 Glykoprotein scheint ein hoch-immunogenes Protein zu sein und wie in verschiedenen Arbeiten beschrieben ist, eine Immunantwort gegen E2 allein ausreichend einen effektiven Schutz gegen eine CSFV Infektion zu erzeugen (Van Zijl *et al.*, 1991 ; Hulst *et al.*, 1993 ; König *et al.*, 1995). An dieser protektiven Immunität ist die humorale Immunantwort durch neutralisierende Antikörper beteiligt (Weiland *et al.*, 1990 und 1992). Diese Ergebnisse zeigen, dass dieses virale Protein außer einer humoralen auch eine zelluläre Immunantwort induzieren kann. Dabei ist eine Überlappung von B- und T-Zell-Epitopen in dem gleichen Proteinbereich möglich. Dies wurde auch für andere Viren beschrieben wie z.B. für das Maul und Klauenseuche Virus (Rodriguez *et al.*, 1994).

Interessant sind die Peptide 200 und 201 aus dem E2 Glykoprotein, die eine deutliche Stimulation in Proliferationsassays zeigten. Diese Peptide bilden einen Teil eines bereits beschriebenen B-Zell-Epitopes (Yu *et al.*, 1996). Es scheint hier eine Überlappung von B- und T-Zell-Epitopen vorzuliegen. Diese Tatsache macht diese Peptidsequenzen besonders interessant, da Peptidvakzine, die aus B-Zell- und T-Zell-Epitopen bestehen, eine bessere Antikörper Immunantwort induzieren (Borrás-Cuesta *et al.*, 1987; Collen *et al.*, 1991).

Auffallend war auch dass die Peptide 455 und 456 aus dem NS4A Protein, im Proliferationsassays als positiv identifiziert wurden. Sie enthalten ein bereits beschriebenes CTL-Epitop (Pauly *et al.*, 1995). Eine gesteigerte CTL Immunantwort kann u.a. auch durch die kovalente Bindung zwischen einem CTL- und T-Zell-Epitop erreicht werden (Partidos *et al.*, 1996; Shirai *et al.*, 1994; Stuhler & Walden, 1993).

Oft wurden in den durchgeführten Versuchen zwei überlappende Peptide aufgrund der Lokalisation des Epitops als positiv identifiziert (Peptide Nr. 133-134; 200-201; 455-456-457; 536-537). Eine genaue Definition von minimalen T-Zell-Epitopen ist anhand der überlappenden Peptide und der unterschiedlichen Länge der Epitope, die von T-

Helfer-Zellen erkannt werden, schwierig (Rudensky *et al.*, 1991). Es könnte sein dass in einer solchem Sequenz mehrere überlappende Epitope enthalten sind. Das kann allerdings nur entweder auf molekularer Ebene oder durch den Einsatz spezifischen T-Zellklone geklärt werden.

Auffallend war, dass 18 von 26 stimulierenden Peptiden auch eine proliferative Reaktion bei PBMC aus einem mit dem CSFV Stamm Alfort/187 infizierten Schwein im Proliferationsassays auslösen. Dies wird verständlich wenn man die Aminosäuresequenzhomologie zwischen beiden Stämmen von 98.2% (GenBank Nr. in Tab. 3) betrachtet. Aufgrund geringer Aminosäureunterschiede (Austausch einer einzigen Aminosäure) konnte ein stammspezifisches Peptid (Peptid 77) aus dem Glykoprotein E0 identifiziert werden.

In allen untersuchten Tieren konnten in Proliferationsassays keine T-Zell-Epitope auf den Proteinen N<sup>pro</sup>, C und p7 für beide CSFV-Stämme nachgewiesen werden. Andererseits, lagen oftmals mehrere Epitope auf den Proteinen E0, E1, E2, NS2-3, NS4A, NS4B und NS5A. Dies beweist die Bedeutung dieser Proteine in der zellvermittelten Immunantwort. Das Pentadekapeptid 290 aus dem NS2-3 Proteinbereich, das den höchsten Stimulationindex im Proliferationsassays zeigte, wurde weiter charakterisiert.

In beiden Inzuchtschweinen (MHC-dd-Haplotyp) wurden die meisten Peptide als gemeinsame T-Zell-Epitope identifiziert. Andererseits wurden Peptide, die die gleiche Aminosäuresequenz in beiden CSFV Stämmen (Glentorf und Alfort/187) enthalten, nur von PBMC aus einem Schwein als T-Zell-Epitop erkannt. Da davon auszugehen ist, dass beide Inzuchtschweine identische MHC-Allele besitzen, muss diese unterschiedliche Reaktivität durch andere Wirtsfaktoren oder Virusfaktoren wie die unterschiedlichen Stämmen und ihr Verhalten *in vivo* erklärt werden.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse sollte darauf hingewiesen werden, dass die Identifizierung der T-Zell-Epitope mit PBMC zweier Schweine mit definiertem MHC erfolgte. Tiere mit anderen MHC-Molekülen werden möglicherweise ein abweichendes Epitopreaktionsmuster zeigen.

Zur Analyse der IFN- $\gamma$  Zytokinfreisetzung auf Zellebene aus CSFV und peptidstimulierten T-Zellen wurden ELISPOT durchgeführt. In einem komparativen Versuch wurde gezeigt, dass der Zytokinnachweis mittels ELISPOT im Vergleich zum ELISA

sensitiver war (Tanguay & Killion, 1994). Andererseits, sind T-Zell-Antworten, die mit diesem Test nachgewiesen werden könnten, auf IFN- $\gamma$  sekretierende T-Zellen begrenzt. Die Untersuchung der IFN- $\gamma$  sekretierenden Zellen wurde in Anwesenheit verschiedener CSFV Stämme durchgeführt. Es konnte nachgewiesen werden, dass porcine PBMC, aus CSFV-infizierten Schweinen, in der Lage waren nach Stimulation mit Peptid 290 bzw. Virus IFN- $\gamma$  zu produzieren. Auffallend war dass Peptid 290 einen ähnlich starken stimulatorischen Effekt wie das Virus zeigte. Zusammen mit den in Proliferationsassays erhaltenen Daten deutet dies auf eine immunodominante Rolle des in Peptid 290 enthaltenen T-Zell-Epitopes hin.

Zur Untersuchung der T-Lymphozyten, die nach Stimulation von PBMC mit Peptid 290 an der Proliferation beteiligt waren, wurde die MHC-Restriktion der Proliferation untersucht. Bei einer Restimulation mit CSFV *in vitro* beruhte die virusspezifische Proliferation sowohl auf einer MHC-Klasse-I als auch auf einer MHC-Klasse-II Antigenpräsentation.

Es wurde erwartet, dass das Virus sowohl eine MHC-Klasse-I als auch eine MHC-Klasse-II Restriktion zeigte. Wird das Antigen durch Endozytose in die Antigenpräsentierenden Zellen (APC) aufgenommen, werden die prozessierten Peptide durch MHC-II-Moleküle präsentiert (exogener Pfad). Da für die Restimulation der PBMC infektiöses Virus verwendet worden war, wird davon ausgegangen, dass während der Infektion neusynthetisiertes virales Antigen ebenfalls über den endogenen Pfad der Antigenpräsentation (MHC-I-Moleküle) präsentiert wurde (Janeway *et al.*, 1997). Vermutlich waren in den zur *in vitro* Restimulation eingesetzten CSFV neben infektiösen Viren (MHC-Klasse-I-Präsentation), auch inaktivierte Viren oder Teile der Viren vorhanden, die dann von APC aufgenommen wurden (MHC-Klasse-II-Präsentation).

Bei der *in vitro* Restimulation der CSFV-spezifischen PBMC mit Peptid 290 konnte gezeigt werden, dass hauptsächlich T-Helfer-Zellen stimuliert wurden. Eine geringere Inhibition der Proliferation wurde allerdings auch nach Zugabe von Antikörper gegen CD8 und MHC-Klasse-I beobachtet. Dies lässt auf eine MHC-I restringierte Stimulation der CTL-Population schließen. Dies konnte durch einen mit Hilfe der Durchflußzytometrie deutlichen Anstieg des prozentualen Anteils der CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Fraktion (CTL und NK-Zellen) sowohl nach Restimulation mit Virus als auch mit dem



Peptid 290 im Vergleich zu den entsprechenden Negativkontrollen belegt werden. Es ist davon auszugehen dass CTL bei der CSFV-Infektion eine sehr wichtige Rolle spielen.

CTL sind in der Lage virusinfizierte Zellen, zu erkennen und zu lysieren. Um zu überprüfen ob das Peptid 290 von virusspezifischen CTL erkannt wird, wurden Chromfreisetzungstests durchgeführt. In dieser Arbeit wurde die zytolytische Aktivität von CSFV-spezifischen CTL, auf die Zielzellen (MAX-Zellen), die mit dem Peptid 290 inkubiert wurden, untersucht. Dadurch dass gezeigt werden konnte, dass das Peptid 290 von CSFV-spezifischen CTL erkannt wurde, kann man davon ausgehen, dass die Sequenz des Peptids 290 ein CTL-Epitop enthält.

Eine höhere zytolytische Aktivität der CTL gegen CSFV infizierte Zielzellen im Vergleich zu Zielzellen, die mit dem Peptid 290 beladen wurden, konnte beobachtet werden. Dies kann vermutlich durch die Anwesenheit von zusätzlichen CTL Epitopen z.B. auf dem NS4A Protein des CSFV (ENALLVALF) (Pauly *et al.*, 1995) erklärt werden.

CTL erkennen durch ihre T-Zell-Rezeptoren in der Regel Peptidfragmente von 8 bis 11 Aminosäuren Länge, die an die entsprechenden MHC-Klasse-I-Moleküle binden (Falk *et al.*, 1991). Andererseits können, wie auch in dieser Arbeit gezeigt, durchaus auch längere Peptide in CTL-Tests als Epitope erkannt werden (Bertoletti *et al.*, 1993; Pauly *et al.*, 1995).

Zusammenfassend scheint das Peptid 290 sowohl ein T-Helfer-Zell-Epitop als auch ein CTL-Epitop zu enthalten. In Verbindung mit einem B-Zell-Epitop könnte dieses Peptid die ideale Basis für eine effiziente Peptidvakzine bieten (An & Whitton, 1997). Hierzu kommt, dass dieser Proteinbereich, der die Aminosäuren 1446-1460 des NS2-3 Proteins umfasst zwischen den unterschiedlichen CSFV Stämmen hoch konserviert ist (Tabelle 3).

Tabelle 3. Sequenzen des Peptids 290 in verschiedenen CSFV Stämmen

Stamm	Virusproteinsequenz 1446-1460	GenBank Nr.
Glentorf	K H K V R N E V M V H W F D D	U45478
Alfort Tübingen	K H K V R N E V <b>V</b> V <b>R</b> W F <b>G</b> D	J04358
Alfort/187	K H K V R N E V M V H W F <b>G</b> D	X87939
Riems	K H K V R N E V M V <b>R</b> W F <b>G</b> D	U45477
Brescia	K H K V R N E V M V H W F <b>G</b> D	AF091661

Ein Vergleich der Virusproteinsequenzen dieses Bereiches zwischen Stamm Glentorf, Alfort/187 und Brescia zeigen einen Aminosäureaustausch an Position 1459, zwischen Glentorf und Riems zwei Aminosäureaustausche an Positionen 1456 und 1459 und zwischen Stamm Glentorf und Alfort Tübingen drei Aminosäureaustausche an den Positionen 1454, 1456 und 1459. Der Aminosäureaustausch an Position 1459 scheint für die Erkennung des Peptids nicht relevant zu sein, da Peptid 290 mit PBMC aus beiden mit unterschiedlichen Stämmen infizierten Schweinen im Proliferationsassays als positiv identifiziert werden konnte. Über die anderen AS-Austausche können zur Zeit noch keine Aussagen gemacht werden.

Neben einer stammübergreifenden Sequenzhomologie eines synthetischen Peptides spielt natürlich auch die Varianz der MHC-Moleküle innerhalb einer Spezies bei der Entwicklung von Vakzinen, die auf wenigen Epitopen basieren, eine entscheidende Rolle.

Da diese Versuche bislang nur mit MHC-II definierten Inzuchtschweinen (dd-Haplotyp) durchgeführt wurden, ist nicht anzunehmen dass diese Ergebnisse in vivo auf die gesamte Schweinepopulation übertragen werden können. In weiteren Versuchen werden aus diesen 26 Epitopen einzelne MHC-haplotyp unabhängige Epitope identifiziert werden können (Kubo *et al.*, 1994; Oldstone *et al.*, 1992), die dann in Vakzinationsversuchen eingesetzt werden sollten.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Arbeit wurden B- und T-Zell-Epitope des Klassischen Schweinepestvirus (CSFV) mit Hilfe von synthetischen Peptiden im natürlichen Wirtstier identifiziert.

Ein Schwerpunkt war die Etablierung eines Peptid-ELISA mit dem lineare B-Zell-Epitope nachgewiesen werden konnten. Um diese B-Zell-Epitopkartierung durchzuführen zu können, wurden 565 Pentadekapeptide mit einer Überlappung von 10 Aminosäuren aus dem Leseraster des CSFV-Stammes Glentorf synthetisiert und im ELISA eingesetzt. Diese Peptide decken ca. 80% des kodierenden Genombereiches von CSFV ab. Ein einziges lineares B-Zell-Epitop wurde auf dem Autoprotease Protein des CSFV identifiziert.

Im zweiten Teil der Arbeit gelang der Nachweis von T-Zell-Epitopen mit Hilfe der überlappenden Pentadekapeptide. 26 Peptide konnten mit peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) eines mit dem CSFV-Stamm Glentorf infizierten Schweines als positiv identifiziert werden. 18 von diesen 26 Peptiden wurden von PBMC eines mit dem CSFV-Stamm Alfort/187 infizierten Schweines in Proliferationsassays ebenfalls erkannt.

Das Peptid 290 aus dem NS2-3 Bereich des CSFV, das in den Proliferationsassays den höchsten Stimulationsindex zeigte, wurde weiter untersucht. Wie mit Hilfe von Elispot-Assays gezeigt werden konnte, war das Peptid 290 in der Lage CSFV-sensibilisierte T-Zellen zur IFN- $\gamma$ -Produktion anzuregen. Blockierungsexperimente mit monoklonalen Antikörpern gegen an der Antigenpräsentation beteiligte Moleküle (CD4, CD8, MHC-I, MHC-II) zeigten eine Aktivierung sowohl der T-Helfer-Zellen als auch der CTL nach Stimulation mit Peptid 290. Diese Ergebnisse konnten durch Tests zur zellvermittelten Lyse bestätigt werden.

Die in den verschiedensten CSFV-Stämmen konservierte Sequenz von Peptid 290 scheint somit sowohl ein T-Helfer-Zell-Epitop als auch ein CTL-Epitop für den MHC dd-Haplotyp des Schweines zu erhalten. Wenn die Interaktion des Peptids 290 mit anderen MHC Molekülen des Schweines geklärt ist und sich als positiv erweist, wäre das Peptid 290 ein idealer Kandidat für eine stammübergreifende Peptidvakzine.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

**Ahrens, U., Kaden, V., Drexler, Ch. & Visser, N. (2000).** Efficacy of the classical swine fever (CSF) marker vaccine Porcilis® Pesti in pregnant sows. *Vet. Microbiol.* **77**, 83-97

**Akira, S., Takeda, K. & Kaisho, T. (2001).** Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Immunol.* **2**, 675-680

**An, L. L. & Whitton, J. L. (1997).** A multivalent minigene vaccine, containing B-cell, cytotoxic T-lymphocyte and Th epitopes from several microbes, induces appropriate responses in vivo and confers protection against more than one pathogen. *J. Virol.* **71**, 2292-2302

**Armengol, E. (1997).** Optimierung der Festphasenpeptidsynthese und Identifizierung von B-Zell-Epitopen des Klassischen Schweinepestvirus mittels synthetischer Peptide der Glykoproteine E0 und E2. Diplomarbeit, Fakultät für Chemie der Universität Barcelona.

**Aynaud, J. M. (1976).** Characteristics of a new live virus vaccine against swine fever prepared in tissue culture at low temperature. The Thiverval strain. *Comm. Eur. Commun. Publ. No. EUR 5486*, 93-96

**Aynaud, J. M. (1988).** Principles of vaccination. In: Liess, B. (ed.): Classical swine fever and related viral infections. Martinus Nijhoff Publishing, Boston, Dordrecht, Lancaster. pp 165-180

**Bach, E. A., Aguet, M. & Schreiber, R. D. (1997).** The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 563-591

**Bailey, M., Stevens, K., Bland, P. W. & Stokes, C. R. (1992).** A monoclonal antibody recognizing an epitope associated with pig interleukin-2 receptors. *J. Immunol. Methods* **153**, 85-91

- Bazan, J. F. & Fletterick, R. J. (1989).** Detection of a trypsin-like serine protease domain in flaviviruses and pestiviruses. *Virology* **171**, 637-639
- Beck-Sickinger, A. G. & Jung, G. (1993).** Epitope mapping: synthetic approaches to the understanding of molecular recognition in the immune system. *Pharm. Acta Helv.* **68**, 3-20
- Bertoletti, A., Chisari, F. V., Penna, A., Guilhot, S., Galati, L., Missale, G., Fowler, P., Schlicht, H. J., Vitiello, A., Chesnut, R. C., Fiaccadori, F. & Ferrari, C. (1993).** Definition of a Minimal Optimal Cytotoxic T-Cell Epitope within the Hepatitis B Virus Nucleocapsid Protein. *J. Virol.* **67**, 2376-2380
- Biront, P. & Leunen, J. (1988).** Vaccines. In : Liess, B. (ed.): Classical swine fever and related viral infections. Martinus Nijhoff Publishing, Boston, Dordrecht, Lancaster. pp 181-200
- Blaha, T., Böhler, L. & Straub, O.C. (1994).** Zwischenbilanz zum 1993/94er Seuchenzug der Europäischen Schweinepest (ESP) und Vorschläge zu ihrer Bekämpfung. *Tierärztl. Umschau.* **49**, 315-318
- Blanco, E., McCullough, K., Summerfield, A., Fiorini, J., Andreu, D., Chiva, C., Borrás, E., Barnett, P. & Sobrino, F. (2000).** Interspecies Major Histocompatibility Complex-Restricted Th Cell Epitope on Foot-and-Mouth Disease Virus Capsid Protein VP4. *J. Virol.* **74**, 4902-4907
- Borrás-Cuesta, F., Petit-Camurdan, A. & Fedon, Y. (1987).** Engineering of immunogenic peptides by co-linear synthesis of determinants recognized by B and T cells. *Eur. J. Immunol.* **17**, 1213-1215
- Borrás-Cuesta, F., Fedon, Y. & Petit-Camurdan, A. (1988).** Enhancement of peptide immunogenicity by linear polymerisation. *Eur. J. Immunol.* **18**, 199-202

- Boyum, A. (1964).** Separation of white blood cells. *Nature* **204**, 793-794
- 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 allogenic target cells in vitro, inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology* **14**, 181-196
- Chicz, R. M., Urban, R. G., Gorga, J. C., Vignali, D. A. A., Lane, W. S. & Strominger, J. L. (1993).** Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles. *J. Exp. Med.* **178**, 27-47
- Collen, T., DiMarchi, R. & Doel, T. R. (1991).** A T cell epitope in VP1 of foot-and-mouth disease virus is immunodominant for vaccinated cattle. *J. Immunol.* **146**, 749-755
- Collett, M. S., Larson, R., Gold, C., Strick, D., Anderson, D. K. & Purchio, A. F. (1988 a).** Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhea virus. *Virology* **165**, 191-199
- Collett, M. S., Larson, R., Belzer, S. K & Retzel, E. (1988 b).** Proteins encoded by bovine viral diarrhea virus: the genomic organization of a pestivirus. *Virology* **165**, 200-208
- Collett, M. S., Wiskerchen, M. A., Welniak, E. & Belzer, S. K. (1991).** Bovine viral diarrhea virus genomic organization. *Arch. Virol.* **3**, 19-27
- Cox, J. H., Ivanyi, J., Young, D. B., Lamb J. R., Syred, A. D. & Francis, M. J. (1988).** Orientation of epitopes influences the immunogenicity of synthetic peptide dimers. *Eur. J. Immunol.* **18**, 2015-2019
- Darbyshire, J. H. (1960).** A serological relationship between swine fever and mucosal disease of cattle. *Vet. Rec.* **72**, 331

**De Moerlooze, L., Lecomte, C., Renard, A., Vandenberg, D., Vandenhijden, N. & Martial, J. A. (1992).** The cytopathic bovine viral diarrhoea virus Osloss strain: molecular characterization and expression of the proteins potentially involved in its cytopathogenicity. *Proceedings of the Second Symposium on Pestiviruses*, 23-24

**DeSchweinitz, E. A. & Dorset, M. (1904).** New facts concerning the etiology of hog cholera. USDA 20th Ann. Rep. Bai, pp 157-162

**De Smit, A. J., Bouma, A., de Kluijver, E. P., Terpstra, C. & Moormann, R. J. M. (2001).** Duration of the protection of an E2 subunit marker vaccine against classical swine fever after a single vaccination. *Vet. Microbiol.* **78**, 307-317

**DiMarchi, R., Brooke, G., Gale, C., Cracknell, V., Doel, T. & Mowat, N. (1986).** Protection of cattle against foot-and-mouth disease by a synthetic peptide. *Science* **232**, 639-641

**Dorset, M., Mc Bryde, C. N., Nile, W.B. & Rietz, J. H. (1919).** Observations concerning the dissemination of hog cholera by insects. *J. Am Vet. Med. Assoc.* **14**, 55-60

**Dunne, H. W., Hokanson, J. F. & Luedke, A. J. (1959).** The pathogenesis of hog cholera. I. Route of entrance of the virus into the animal body. *Am. J. Vet. Res.* **20**, 615-618

**Dunne, H. W. (1973).** Hog cholera (European swine fever). *Adv. Vet. Med.* **17**, 315-359

**Elbers, K., Tautz, N., Becher, P., Stoll, D., Rüménapf, T. & Thiel, H. J. (1996).** Processing in the Pestivirus E2-NS2 Region: Identification of Proteins p7 and E2p7. *J. Virol.* **70**, 4131-4135

**Edgar, G., Hart, L. & Hayston, J. T. (1952).** Studies on the viability of the virus of swine fever. *Proc 14th Intern Vet Congr.* **2**, 387-391

**Edwards, S., Fukusho, A., Lefevre, P., Lipowiski, A., Pejsak, Z., Roehe, P. & Westergaard, J. (2000 a).** Classical swine fever the global situation. *Vet. Microbiol.* **73**, 103-119

**Edwards, S. (2000 b).** Survival and inactivation of classical swine fever virus. *Vet Microbiol.* **73**, 175-181

**Enzmann, P. J. & Weiland, F. (1978).** Structural similarities of hog cholera virus with togaviruses. *Arch. Virol.* **57**, 339-348

**Falk, K., Rötzschke O., Stevanovic, S., Jung, G. & Rammensee, H. G. (1991).** Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* **351**, 290-296

**Falk, K., Rötzschke O., Stevanovic, S., Jung, G. & Rammensee, H. G. (1994).** Pool sequencing of natural HLA-DR, DQ, and DP ligands reveals detailed peptide motifs, constraints of processing, and general rules. *Immunogenetics* **39**, 230-242

**Fenner, F. (1976).** Classification and nomenclature of viruses. *Intervirology* **7**, 44-47

**Fields, G. B. & Noble, R. L. (1990).** Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int. J. Pept. Prot. Res.* **35**, 161-214

**Fitzmaurice, C. J., Brown, L. E., McInerney, T. L. & Jackson, D. C. (1996).** The assembly and immunological properties of non-linear synthetic immunogens containing T-cell and B-cell determinants. *Vaccine* **14**, 553-560

**Fleckenstein, B., Kalbacher, H., Muller, C. P., Stoll, D., Halder, T., Jung, G. & Wiesmüller, K.-H. (1996).** New ligands binding to the human leukocyte antigen class II molecule DRB1\*0101 based on the activity pattern of an undecapeptide library. *Eur. J. Biochem.* **240**, 71-77



**Fong, T. A. & Mosmann, T. R. (1990).** Alloreactive murine CD8+ T cell clones secrete the Th1 pattern of cytokines. *J. Immunol.* **144**, 1744-1752

**Francis, M. J., Fry, C. M., Rowlands, D. J., Brown, F., Bittle, J. L., Houghten, R. A. & Lerner, R. A. (1985).** Immunological priming with synthetic peptides of foot-and-mouth disease virus. *J. Gen. Virol.* **66**, 2347-2354

**Francis, M. J., Fry, C. M., Rowlands, D. J., Bittle, J. L., Houghten, R. A., Lerner, R. A. & Brown, F. (1987).** Immune response to uncoupled peptides of foot-and-mouth disease virus. *Immunology* **61**, 1-6

**Francki, R. I. B., Fauquet, C. M., Knudson, D. L. & Brown, F. (1991).** Classification and Nomenclature of viruses. *Arch. Virol.* **2**, 223-233

**Frey, H. R., Liess, B., Richter-Reichhelm, H. B., von Benten, K. & Trautwein, G. (1980).** Experimental transplacental transmission of hog cholera virus in pigs. I. Virological and serological studies. *Zbl. Vet. Med. B* **27**, 154-164

**Gao, Y., Wang, C. & Splitter, G. A. (1999).** In Mapping T and B lymphocyte epitopes of bovine herpesvirus-1 glycoprotein B. *J. Gen. Virol.* **80**, 2699-2704

**Geysen, H. M. (1985).** Antigen-antibody interactions at the molecular level: adventures in peptide synthesis. *Immunol. Today* **6**, 364-369

**Gorbalenya, A. E., Donchenko, A. P., Koonin, E. V. & Blinov, V. M. (1989 a).** N-terminal domains of putative helicases of flavi- and pestiviruses may be serine proteases. *Nucl. Acids Res.* **17**, 3889-3897

**Gorbalenya, A. E., Koonin, E. V., Donchenko, A. P. & Blinov, V. M. (1989 b).** Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucl. Acids Res.* **17**, 4713-4730

**Greiser-Wilke, I., Depner, K., Fritzemeier, J., Haas, L. & Moennig, V. (1998).** Application of a computer program for genetic typing of classical swine fever virus isolates from Germany. *J. Virol. Methods* **75**, 141-150

**Greiser-Wilke, I., Fritzemeier, J., Koenen, F., Vanderhallen, H., Rutili, D., de Mia, G.-M., Romero, L., Rosell, R., Sanchez-Vizcaino, J. M. & San Gabriel, A. (2000).** Molecular epidemiology of a large classical swine fever epidemic in the European Union in 1997-1998. *Vet. Microbiol.* **77**, 17-27

**Hammerberg, C. & Schurig, G. G. (1986).** Characterization of monoclonal antibodies directed against swine leukocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **11**, 107-121

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

**Hauschildt, S., Hoffmann, P., Beuscher, H. U., Dufhues, G., Heinrich, P., Wiesmüller, K. H., Jung, G. & Bessler, W. G. (1990).** Activation of bone marrow-derived mouse macrophages by bacterial lipopeptide: cytokine production, phagocytosis and Ia expression. *Eur. J. Immunol.* **20**, 63-68

**Hirt, W., Saalmüller, A. & Reddehase, M. J. (1990).** Distinct  $\gamma/\delta$  T cell receptors define two subsets of circulation porcine CD2<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> T-lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **20**, 265-269

**Holm-Jensen, M. (1981).** Detection of antibodies against hog cholera virus and bovine viral diarrhoea virus in porcine serum. *Acta Vet. Scand.* **22**, 85-98

**Hofmann, M. A., Brechtbühl, K. & Stäuber, N. (1994).** Rapid characterization of new pestivirus strains by direct sequencing of PCR-amplified cDNA from the 5' noncoding region. *Arch. Virol.* **139**, 217-219

- Horzinek, M., Reczko, E. & Petzoldt, K. (1967).** On the morphology of hog cholera virus. *Arch. f. d. ges. Virusforsch.* **21**, 475-478
- Horzinek, M., Maess, J. & Laufs, R. (1971).** Studies on the substructure of Togaviruses. II. Analysis of equine arteritis, rubella, bovine viral diarrhoea, and hog cholera viruses. *Arch. f. d. ges. Virusforsch.* **33**, 306-318
- Horzinek, M. C. (1981).** None arthropod-borne togaviruses. Verlag Academic Press, London, NY, Toronto, Sydney, San Francisco
- Hulst, M. M., Westra, D. F., Wensvoort, G. & Moormann, R. J. M. (1993).** Glycoprotein E1 of hog cholera virus expressed in insect cells protects swine from hog cholera. *J. Virol.* **67**, 5435-5442
- Janeway, C. A. & Travers, P. (1997).** Antigenerkennung durch T-Lymphocyten. In: Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford. pp 123-171
- Johnson, K. P., Feguson, L. C., Byington, D. P. & Redman, D. R. (1974) zitiert nach Moennig, V. & Plagemann, P. G. W. (1992).** The Pestiviruses. *Advanc. Virus Res.* **41**, 53-98
- Jonjic, S. & Koszinowski, U. H. (1984).** Monoclonal antibodies reactive with swine lymphocytes. I. Antibodies to membrane structures that define the cytolytic T lymphocyte subset in the swine. *J. Immunol.* **133**, 647-652
- Jung C., Kalbus, M., Fleckenstein, B., Melms, A., Jung, G. & Wiesmüller, K.-H. (1998).** New ligands for HLADRB1\*0301 by random selection of favourable amino acids ranked by competition studies with undecapeptide amide sublibraries. *J. Immunol. Methods* **219**, 139-149
- König, M., Lengsfeld, T., Pauly, T., Stark, R. & Thiel, H. J. (1995).** Classical swine fever virus: independent induction of protective immunity by two structural glycoproteins. *J. Virol.* **69**, 6479-6486

**Kubo, R. T., Sette, A., Grey, H. M., Appella, E., Sakaguchi, K., Zhu, N. Z., Arnott, D., Sherman, N., Shabanowitz, J., Michel, H., Bodnar, W. M., Davis, T. A. & Hunt, D. F. (1994).** Definition of specific peptide motifs for four major HLA-A alleles. *J. Immunol.* **152**, 3913-3924

**Langeveld, J. P., Casal, J. I., Osterhaus, A. D., Cortes, E., de Swart, R., Vela, C., Dalsgaard, K., Puijk, W. C., Schaaper, W. M. & Melen, R. H. (1994).** First peptide vaccine providing protection against viral infection in the target animal: studies of canine parvovirus in dogs. *J. Virol.* **68**, 4506-4513

**Launais, M., Aynaud, J. M. & Corthier, G. (1972).** Peste Porcine Classique: Propriétés d'un clone (souche «Thiverval») isolé en culture cellulaire a basse température. Application dans la vaccination. *Rev. Méd. Vét.* **123**, 1537-1554

**Lex, A., Wiesmüller, K.-H., Jung, G. & Bessler, W. G. (1986).** A synthetic analogue of *Escherichia coli* lipoprotein, tripalmitoyl pentapeptide, constitutes a potent immune adjuvant. *J. Immunol.* **137**, 2676-2681

**Liess, B. & Prager, D. (1976).** Detection of neutralizing antibodies (NIF test): use of new technical equipment (CCSC system) for laboratory swine fever diagnosis. In: Liess, B. (ed.): Diagnosis and epizootiology of classical swine fever. CEE-Publ. EUR 5496, 200-211, Luxembourg.

**Lowings, P., Ibata, G., Needham, J. & Paton, D. (1996).** Classical swine fever diversity and evolution. *J. Gen. Virol.* **77**, 1311-1321

**McClurkin, A. W. & Norman, J. O. (1966).** Studies on transmissible gastroenteritis of swine. II. Selected characteristics of a cytopathogenic virus common to five isolates from transmissible gastroenteritis. *Can. J. comp. Med.* **30**, 190-198

**Mengeling, W. L. & Cheville, N. F. (1968).** Host response to persistent infection with hog cholera virus. *Proc. Ann. Meet. US Anim. Health Assoc.* **72**, 283-295

**Mengeling, W. L. & Packer, R. A. (1969).** Pathogenesis of chronic hog cholera: host response. *Am. J. Vet. Res.* **30**, 409-417

**Menne, S., Maschke, J., Tolle, T. K., Lu, M. & Roggendorf, M. (1997).** Characterization of T-Cell Response to Woodchuck Hepatitis Virus Core Protein and protection of Woodchucks from Infection by Immunization with Peptides Containing a T-cell Epitop. *J. Virol.* **71**, 65-74

**Meyer, H., Liess, B., Frey, H. R., Hermanns, W. & Trautwein, G. (1981).** Experimental transplacental transmission of hog cholera virus in pigs. IV. Virological and serological studies in newborn piglets. *Zbl. Vet. Med. B* **28**, 659-668

**Meyers, G., Rümenapf, T. & Thiel, H. J. (1989).** Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus. *Virology* **171**, 555-567

**Meyers, G. (1990).** Virus der klassischen Schweinepest-Genomanalyse und Vergleich mit dem Virus der Bovinen Viralen Diarrhöe. Dissertation, Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls-Universität. Tübingen

**Meyers, G. & Thiel, H. J. (1996).** Molecular characterization of pestiviruses. *Adv. Virus Res.* **47**, 53-118

**Merrifield, R. B. (1963).** Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2149-2154

**Merrifield, R. B. (1985).** Festphasen-Synthese (Nobel-Vortrag). *Angew. Chem.* **97**, 801-812

**Meyers, G., Rümenapf, T. & Thiel, H. J. (1989).** Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus. *Virology* **171**, 555-567

**Moennig, V. (1988).** Characteristics of the virus. In: Liess, B. (ed.) Classical swine fever and related viral infections. Martinus Nijhoff Publishing, Boston, Dordrecht, Lancaster. pp 55-80

**Moennig, V. (2000).** Introduction to classical swine fever: virus, disease and control policy. *Vet. Microbiol.* **73**, 93-102

**Morgan, D. O. & Moore, D. M. (1990).** Protection of cattle and swine against foot-and-mouth disease, using biosynthetic peptide vaccines. *Am. J. Vet. Res.* **51**, 40-45

**Mosmann, T. R. & Coffman, R. L. (1989).** TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* **7**, 145-173

**Moormann, R. J. M & Hulst, M. M. (1988).** Hog cholera virus: identification and characterization of the viral RNA and the virus-specific RNA synthesized in infected swine kidney cells. *Virus Res.* **11**, 281-291

**Moormann, R. J. M, Warmerdam, P. A. M., van der Meer, B., Schaaper, W. M. M., Wensvoort, G. & Hulst, M. M. (1990).** Molecular cloning and nucleotide sequence of hog cholera virus strain Brescia and mapping of the genomic region encoding envelope glykoprotein E1. *Virology* **177**, 184-198

**Moormann, R. J. M., Bouma, A., Kramps, J. A., Terpstra, C. & De Smit, H. J. (2000).** Development of a classical swine fever subunit marker vaccine and companion diagnostic test. *Vet. Microbiol.* **73**, 209-219

**Muller, C. P., Ammerlaan, W., Fleckenstein, B., Krauss, S., Kalbacher, H., Schneider, F., Jung, G. & Wiesmüller, K.-H. (1996).** Activation of T cells by the ragged tail of MHC class II-presented peptides of the measles virus fusion protein. *Int. Immunol.* **8**, 445-456

**Müller, M. R., Pfannes, S. D. C., Ayoub, M., Hoffmann, P., Bessler, W. G. & Mittenbühler, K. (2001).** Immunostimulation by the synthetic lipopeptide P<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>: TLR4-independent activation of the ERK1/2 signal transduction pathway in macophages. *Immunology* **103**, 49-60

**Neitzert E., Beck, E., de Mello, P. A., Gomes, I. & Bergmann, I. E. (1991).** Expression of the aphotavirus RNA polymerase gene in Escherichia coli and its use together with other bioengineered nonstructural antigens in detection of late persistent infections. *Virology* **184**, 799-804

**Ober B. T., Summerfield, A., Mattlinger, C., Wiesmüller, K.-H., Jung, G., Pfaff, E., Saalmüller, A. & Rziha, H. J. (1998).** Vaccine-induced, pseudorabies virus-specific, extrathymic CD4+CD8+ memory T-helper cells in swine. *J. Virol.* **72**, 4866-4873

**Obert, M., Pleuger, H., Hanagarth, H. G., Schulte-Monting, J., Wiesmüller, K.-H., Braun, D. G., Brandner, G. & Hess, R. D. (1998).** Protection of mice against SV40 tumours by Pam<sub>3</sub>Cys, MTP-PE and Pam<sub>3</sub>Cys conjugated with SV40 T antigen-derived peptide, K(698)-T(708). *Vaccine* **16**, 161-169

**Oldstone, M. B. A., Tishon, A., Geckeler, R., Lewicki, H. & Whitton, J. L. (1992).** A common antiviral cytotoxic T-lymphocyte epitope for diverse major histocompatibility complex haplotypes: Implications for vaccination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 2752-2755.

**Partidos, C. D., Vohra, P. & Steward, M. W. (1996).** Induction of measles virus-specific cytotoxic T-cell responses after intranasal immunization with synthetic peptides. *Immunology* **87**, 179-185

**Pasternack, M. (1988).** Cytotoxic T-Lymphocytes. *Adv. Intern. Med.* **33**, 17

**Paton, D. J., Mc Goldrick, A., Belak, S., Mittelholzer, C., Koenen, F., Vanderhallen, H., Biagetti, M., De Mia, G. M., Stadejek, T., Hofmann, M. & Thuer, B. (2000).** Classical swine fever virus: a ring test to evaluate RT-PCR detection methods. *Vet. Microbiol.* **73**, 159-174

**Pauly, T., Elbers, K., König, M., Lengsfeld, T., Saalmüller, A. & Thiel, H. J. (1995).** Classical swine fever virus-specific cytotoxic T lymphocytes and identification of a T cell epitope. *J. Gen. Virol.* **76**, 3039-3049

**Pauly, T., Weiland, E., Hirt, W., Dreyer-Bux, C., Maurer, S., Summerfield, A. & Saalmüller, A. (1996).** Differentiation between MHC-restricted and non-MHC-restricted porcine cytolytic T lymphocytes. *Immunology* **88**, 238-246

**Pescovitz, M. D., Lunney, J. K. & Sachs, D. H. (1984).** Preparation and characterization of monoclonal antibodies reactive with porcine PBL. *J. Immunol.* **133**, 368-375

**Piatti, P. G., Berinstein, A., Lopez, O. J., Fernandez, F., Borca, M. V., Schudel, A. A. & Sadir, A. M. (1991).** Comparison of the immune response elicited by infectious and inactivated foot-and-mouth disease virus in mice. *J. Gen. Virol.* **72**, 1691-1694

**Pittler, H., Brack, M., Schulz, L. C., Rohde, G., Witte, K. & Liess, B. (1968).** Untersuchungen über die Europäische Schweinepest. I. Mitteilung: Ermittlungen zur gegenwärtigen Seuchensituation in Norddeutschland. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* **75**, 537-542

**Renard, A., Dino, D. & Martial, J. (1987).** Vaccines and diagnostics derived from bovine diarrhoea virus. J. European Patent Application No. 86870095.6. Publication No. 02.08672.

**Ressang, A. A. (1973).** Studies on the pathogenesis of hog cholera. II. Virus distribution in tissue and morphology of the immune response. *Zbl. Vet. Med. B* **20**, 272-288



- Ritchie, A. E. & Fernelius, A. L. (1967).** Electron microscopy of hog cholera virus and its antigen-antibody complex. *Vet. Record* **81**, 417-418
- Ritchie, A. E. & Fernelius, A. L. (1968).** Direct immuno-electron microscopy and some morphological features of hog cholera virus. *Arch. f. d. ges. Virusforschung* **23**, 292-298
- Rodriguez, A., Saiz, J. C., Novella, I. S., Andreu, D. & Sobrino, F. (1994).** Antigenic specificity of porcine T cell response against foot-and-mouth disease virus structural proteins: identification of T helper epitopes in VP1. *Virology* **205**, 24-33
- Rolle, M. & Mayr, A. (1984).** Togaviridae. In: Mayr, A. (ed.): Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. F. Enke Verlag, Stuttgart
- Rudensky, A. Y., Preston, H. P., Hong, S. C., Barlow, A. & Janeway, C. A. J. (1991).** Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* **353**, 622-627
- Ruggli, N., Tratschin, J. D., Mittelholzer, C. & Hofmann, M. A. (1996).** Nucleotide sequence of classical swine fever virus strain Alfort/187 and transcription of infectious RNA from stably cloned full-length cDNA. *J. Virol.* **70**, 3478-3487
- Rümenapf, T., Meyers, G., Stark, R. & Thiel, H. J. (1989).** Hog cholera virus-characterization of specific antiserum and identification of cDNA clones. *Virology* **171**, 18-27
- Saalmüller, A. & Bryant, J. (1994).** Characteristics of porcine T lymphocytes and T-cell lines. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **43**, 45-52
- Sachs, D. H., Leight, G., Cone, J. L., Schwarz, S., Stuart, L. & Rosenberg, S. A. (1976).** Transplantation in miniature swine: I. Fixation of the major histocompatibility complex. *Transplantation* **22**, 559-567

**Savi, P., Torlone, V. & Titoli, F. (1965).** Recherches sur la survie du virus de la peste porcine classique dans certains produits de charcuterie. *Bull. OIE* **63**, 87-96

**Schild, H., Deres, K., Wiesmüller, K.-H., Jung, G. & Rammensee, H. G. (1991).** Efficiency of peptides and lipopeptides for in vivo priming of virus-specific cytotoxic T cells. *Eur. J. Immunol.* **21**, 2649-2654

**Schimizu, Y. (1980).** GP vaccine for control of hog cholera in Japan. *Jap. J. Trop. Agr. Res. Sci.* **13**, 167-170

**Schneider, R., Unger, G., Stark, R., Schneider-Scherzer, E. & Thiel, H. J. (1993).** Identification of a structural glycoprotein of an RNA virus as a ribonuclease. *Science* **261**, 1169-1171

**Seifert, R., Schultz, G., Richter-Freund, M., Metzger, J., Wiesmüller, K.-H., Jung, G., Bessler, W. G. & Hauschildt, S. (1990).** Activation of superoxide formation and lysozyme release in human neutrophils by the synthetic lipopeptide Pam<sub>3</sub>Cys-Ser-(Lys)<sub>4</sub>. Involvement of guanine-nucleotide-binding proteins and synergism with chemotactic peptides. *Biochem. J.* **267**, 795-802

**Shen, F., Chen, P. D., Walfield, A. M., Ye, J., House, J., Brown, F. & Wang, C. Y. (1999).** Differentiation of convalescent animals from those vaccinated against foot-and-mouth disease by a peptide ELISA. *Vaccine* **17**, 3039-3049

**Shirai, M., Pendleton, C. D., Ahlers, J., Takeshita, T., Newman, M. & Berzofsky, J. A. (1994).** Helper-cytotoxic T lymphocyte (CTL) determinant linkage required for priming of anti-HIV CD8<sup>+</sup> CTL in vivo with peptide vaccine constructs. *J. Immunol.* **152**, 549-556

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

- Stark, R., Meyers, G., Rümenapf, T. & Thiel, H. J. (1993).** Processing of pestiviral polyprotein: cleavage site between autoprotease and nucleocapsid protein of classical swine fever virus. *J. Virol.* **67**, 7088-7095
- Stegeman, A., Elbers, A., de Smit, H., Moser, H., Smak, J. & Plumiers, F. (2000).** The 1997-1998 epidemic of classical swine fever in the Netherlands. *Vet. Microbiol.* **73**, 183-196
- Stevanovic, S. & Jung, G. (1993).** Multiple sequence analysis: pool sequencing of synthetic and natural peptide libraries. *Anal. Biochem.* **212**, 212-220
- Stuhler, G. & Walden, P. (1993).** Collaboration of helper and cytotoxic T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **23**, 2279-2286
- Summerfield, A., Rziha, H. J. & Saalmüller, A. (1996).** Functional characterisation of porcine CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> extrathymic T lymphocytes. *Cellular Immunology* **168**, 291-296
- Tanguay, S. & Killion, J. J. (1994).** Direct comparison of ELISPOT and ELISA-based assays for detection of individual cytokine secreting cells. *Lymphokine Cytokine Res.* **13**, 259-263
- Terpstra, C. (1988).** Epizootiology of hog cholera. In: Liess, B. (ed.): Classical swine fever and related viral infections. Martinus Nijhoff Publishing, Boston, Dordrecht, Lancaster. pp 201-216
- Thiel, H. J., Stark, R., Weiland, E., Rümenapf, T. & Meyers, G. (1991).** Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus. *J. Virol.* **65**, 4705-4712
- Thiel, H. J., Plagemann, G. W. & Moennig, V. (1996).** Pestiviruses. In: Fields, B. N., Knipe, D., Howley, P. *et al.* (ed.): Fields Virology. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. pp 1059-1073

**Thistlethwaite J. R. Jr., Auchincloss H. Jr., Pescovitz M. D. & Sachs D. H. (1984).** Immunologic characterisation of MHC recombinant swine: role of class I and II antigens in in vitro immune response. *J. Immunogenetics* **11**, 9-19

**Tillery, M. J. (1968).** Status of State Federal hog cholera eradication programme. *Proc. Ann Meeting US Livestock San Assoc.* **72**, 306-318

**Trautwein, G. (1988).** Pathology and pathogenesis of the disease. In: Liess, B. (ed.): Classical swine fever and related viral infections. Martinus Nijhoff Publishing, Boston, Dordrecht, Lancaster. pp 27-53

**Unger, G. (1993).** Proteinbiochemische und strukturelle Analysen des Virus der klassischen Schweinepest. Dissertation, Universität Tübingen

**Van Oirschot, J. T. & Terpstra, C. (1977).** A congenital persistent swine fever infection. I. Clinical and virological observations. *Vet. Microbiol.* **2**, 121-132

**Van Oirschot, J. T. (1988).** Description of the virus infection. In: Liess, B. (ed.): Classical swine fever and related viral infections. Martinus Nijhoff Publishing, Boston, Dordrecht, Lancaster. pp 1-25

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

**Van Rijn, P. A., van Gennip, H. G. P. & Moormann, R. J. M. (1999).** An experimental marker vaccine and accompanying serological diagnostic test both based on envelope glycoprotein E2 of classical swine fever virus (CSFV). *Vaccine* **17**, 433-440

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

**Vitiello, A. & Sherman, L. A. (1983).** Recognition of influenza-infected cells by cytolytic T lymphocyte clones: determinant selection by class I restriction elements. *J. Immunol.* **131**, 1635-1640

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

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

**Wengler, G. (1991).** Family Flaviviridae. In: Franki, R. I. B., Fauquet, C. M. Knudson, D. L. & Brown (ed.): Classification and nomenclature of viruses: Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer Verlag, Berlin. pp. 223-233

**Wensvoort, G. & Terpstra, C. (1985).** Classical swine fever: a changing clinical picture. *Tijdschr. Diergeneesk* **110**, 263-269

**Westaway, E. G., Brinton, M. A., Gaidamovich, S. Ya, Horzinek, M. C., Igarashi, A., Kaariainen, L., Lvov, D. K., Porterfield, J. S., Russell, P. K. & Trent D. W. (1985).** Togaviridae. *Intervirology* **24**, 125-139

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

**Wiesmüller, K.-H., Jung, G. & Hess, G. (1989).** Novel low-molecular-weight synthetic vaccine against foot-and-mouth disease containing a potent B-cell and macrophage activator. *Vaccine* **7**, 29-33

**Wiesmüller K.-H., Spahn, G., Handtmann, D., Schneider, F., Jung G. & Muller C. P. (1992).** Heterogeneity of linear B cell epitopes of the measles virus fusion protein reacting with late convalescent sera. *J. Gen. Virol.* **73**, 2211-2216

**Yu, M., Wang, L., Shiell, B. J., Morrissy, C. J. & Westbury, H. A. (1996).** Fine mapping of a C-terminal linear epitope highly conserved among the major envelope glycoprotein E2 (gp51 to gp54) of different pestiviruses. *Virology* **222**, 289-292

**Zuckermann, F.A., Schabacker, D. & Binns, R.M. (1994).** Biochemical analysis of molecules reactive with monoclonal antibodies specific for porcine CD45. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **43**, 307-313

7. ANHANG

7.1. Liste der Pentadekapeptide, die das CSFV-Genom abdecken

N <sup>pro</sup>	1	MELDHFELLYKTNKR	C	40	HEKDSRTKPPDATIV
N <sup>pro</sup>	2	FELLYKTNKRKPMGV	C	41	RTKPPDATIVVEGVK
N <sup>pro</sup>	3	KTNKRKPMGVVEPVY	C	42	DATIVVEGVKYQVKK
N <sup>pro</sup>	4	KPMGVVEPVYDATGR	C	43	VEGVKYQVKKKGKVK
N <sup>pro</sup>	5	EEPVYDATGRPLFGD	C	44	YQVKKKGKVKGRNTQ
N <sup>pro</sup>	6	DATGRPLFGDPSEVH	C	45	KGKVKGRNTQDGLYH
N <sup>pro</sup>	7	PLFGDPSEVHPQSTL	C	46	GRNTQDGLYHNKNKP
N <sup>pro</sup>	8	PSEVHPQSTLKLPHD	C	47	DGLYHNKNKPPESRK
N <sup>pro</sup>	9	PQSTLKLPHDRGRGN	C	48	NKNKPPESRKKLEKA
N <sup>pro</sup>	10	KLPHDRGRGNIKTTL	C	49	PESRKKLEKALLAWA
N <sup>pro</sup>	11	RGRGNIKTTLKNLPR	C	50	KLEKALLAWAVIAIV
N <sup>pro</sup>	12	IKTTLKNLPRKGDRC	C	51	<b>LLAWAVIAIVLYQPV</b>
N <sup>pro</sup>	13	KNLPRKGDRCRSGNHL	C	52	VIAIVLYQPVAEANI
N <sup>pro</sup>	14	KGDCRSGNHLGPVSG	C	53	LYQPVAEANITQWNL
N <sup>pro</sup>	15	SGNHLGPVSGIYVKP	E0	54	EAENITQWNLSDNGT
N <sup>pro</sup>	16	GPVSGIYVKPGPVFY	E0	55	TQWNLSDNGTNGIQH
N <sup>pro</sup>	17	IYVKPGPVFYQDYM	E0	56	SDNGTNGIQHAMYL
N <sup>pro</sup>	18	GPVFYQDYMGPVYHR	E0	57	NGIQHAMYLGRVSR
N <sup>pro</sup>	19	QDYMGPVYHRAPLEF	E0	58	AMYLGRVSRSLHGIW
N <sup>pro</sup>	20	PVYHRAPLEFFNEAQ	E0	59	GVSRSRSLHGIWPEKIC
N <sup>pro</sup>	21	APLEFFNEAQFCEVT	E0	60	LHGIWPEKICKGVPT
N <sup>pro</sup>	22	FNEAQFCEVTKRIGR	E0	61	PEKICKGVPTHLATD
N <sup>pro</sup>	23	FCEVTKRIGRVTGND	E0	62	KGVPTHLATDTELKE
N <sup>pro</sup>	24	KRIGRVTGNDGKLYH	E0	63	HLATDTELKEIQGMM
N <sup>pro</sup>	25	VTGNDGKLYHIYVCI	E0	64	TELKEIQGMMDASEG
N <sup>pro</sup>	26	GKLYHIYVICIDGCIL	E0	65	IQGMMDASEGTNYTC
N <sup>pro</sup>	27	IYVICIDGCILLKLAK	E0	66	DASEGTNYTCCKLQR
N <sup>pro</sup>	28	DGCILLKLAKRGEPR	E0	67	TNYTCCKLQRHEWNK
N <sup>pro</sup>	29	LKLAKRGEPRTLKWI	E0	68	CKLQRHEWNBKHWGN
N <sup>pro</sup>	30	RGEPRTLKWIRNFTD	E0	69	HEWNBKHWGNWYNID
N <sup>pro</sup>	31	TLKWIRNFTDCPLWV	E0	70	HGNWYNIDPWIQL
N <sup>pro</sup>	32	RNFTDCPLWVTSCSD	E0	71	WYNIDPWIQLMNRTQ
N <sup>pro</sup>	33	CPLWVTSCSDDGASG	E0	72	PWIQLMNRTQANLAE
C	34	TSCSDDGASGSKEKK	E0	73	MNRTQANLAEGPPAK
C	35	DGASGSKEKKPDRIN	E0	74	ANLAEGPPAKECAVT
C	36	<b>SKEKKPDRINKGKLG</b>	E0	75	GPPAKECAVTCRYDK
C	37	PDRINKGKLGKIAPE	E0	76	ECAVTCRYDKDADIN
C	38	KGKLGKIAPEHEKDS	E0	77	CRYDKDADINVVTQA
C	39	IAPKEHEKDSRTKPP	E0	78	DADINVVTQARNRPT

ANHANG

E0	79	VVTQARNRPTTLTDC	E1	123	NVGKYVCVRPDWWPY
E0	80	RNRPTTLTDCKKGKN	E1	124	VCVRPDWWPYETKVA
E0	81	TLTDCKKGKNFSFAG	E1	125	DWWPYETKVALLFEE
E0	82	KKGKNFSFAGTIEG	E1	126	ETKVALLFEEAGQIV
E0	83	FSFAGTIEGPCNFN	E1	127	LLFEEAGQIVKLALR
E0	84	TIEGPCNFVSVED	E1	128	AGQIVKLALRALRDL
E0	85	PCNFVSVEDILYGD	E1	129	KLALRALRDLTRVWN
E0	86	VSVEDILYGDHECGS	E1	130	ALRDLTRVWNSASTT
E0	87	ILYGDHECGSLLQDT	E1	131	TRVWNSASTTAF LIC
E0	88	HECGSLLQDTALYLV	E1	132	SASTTAF LICLIKVL
E0	89	LLQDTALYLV DGMTN	E1	133	AF LICLIKVLRGQIV
E0	90	ALYLV DGMTNTIETA	E1	134	LIKVLRGQIVQGVIW
E0	91	DGMTNTIETARQGAA	E1	135	RGQIVQGVIVLLLVT
E0	92	TIETARQGAARVTSW	E1	136	QGVIVLLLVTGAQGR
E0	93	RQGAARVTSWLGRQL	E1	137	LLLVTGAQGR LACKE
E0	94	RVTSWLGRQLRIAGK	E2	138	GAQGR LACKEDYRYA
E0	95	LGRQLRIAGKRLEGR	E2	139	LACKEDYRYAISSTN
E0	96	RIAGKRLEGRSKTWF	E2	140	DYRYAISSTNEIGLL
E0	97	RLEGRSKTWFGAYAL	E2	141	ISSTNEIGLLGAGGL
E0	98	SKTWFGAYALSPYCN	E2	142	EIGLLGAGGLTTTWK
E1	99	GAYALSPYCNVTSKI	E2	143	GAGGLTTTWKEYRHD
E1	100	SPYCNVTSKIGYIWIY	E2	144	TTTWKEYRHDLQLND
E1	101	VTSKIGYIWIYTDNCT	E2	145	EYRHDLQLNDGTVKA
E1	102	GYIWIYTDNCTPACLP	E2	146	LQLNDGTVKAICAAG
E1	103	TDNCTPACLPKNTKI	E2	147	GTVKAICAAGSFKVT
E1	104	PACLPKNTKIIGPGK	E2	148	ICAAGSFKVTALNVV
E1	105	KNTKIIGPGKFDTNA	E2	149	SFKVTALNVVSRRYL
E1	106	IGPGKFDTNAEDGKI	E2	150	ALNVVSRRYLASLHK
E1	107	FDTNAEDGKILHEMG	E2	151	SRRYLASLHKEALPT
E1	108	EDGKILHEMGHGLSE	E2	152	ASLHKEALPTSVTFE
E1	109	LHEMGHGLSEFLLLS	E2	153	EALPTSVTFELLFDG
E1	110	GHLSEFLLLSLVVLS	E2	154	SVTFELLFDG TNPST
E1	111	FLLLSLVVLSDFAPE	E2	155	LLFDG TNPSTEEMGD
E1	112	LVVLSDFAPETASAL	E2	156	<b>TNPSTEEMGDDFGFG</b>
E1	113	DFAPETASALY LISY	E2	157	<b>EEMGDDFGGLCPFD</b>
E1	114	TASALY LISYYVIPQ	E2	158	DFGGLCPFD TSPVV
E1	115	Y LISYYVIPQSHEEP	E2	159	LCPFD TSPVVKGYN
E1	116	YVIPQSHEEPEGCDT	E2	160	TSPVVKGYNT TLLN
E1	117	SHEEPEGCDTNQLNL	E2	161	KGKYNT TLLNGSAFY
E1	118	EGCDTNQLNL TVELR	E2	162	T TLLNGSAFYLV CPI
E1	119	NQLNL TVELRTEDVI	E2	163	GSAFYLV CPIGWTV
E1	120	TVELRTEDVIPSSVW	E2	164	LV CPIGWTVIECTA
E1	121	TEDVIPSSVWNVGKY	E2	165	GWTVIECTAVSPTT
E1	122	PSSVWNVGKYVCVRP	E2	166	IECTAVSPT TLRTEV



ANHANG

E2	167	VSPTTLRTEVVVKTR	E2	211	TYIVLTEQLAAGLPL
E2	168	LRTEVVKTRFREKPF	E2	212	TEQLAAGLPLGQGEV
E2	169	VKTRFREKPFPHRMD	P7	213	<b>AGLPLGQGEVVLIGN</b>
E2	170	REKPFPHRMDCVTTT	P7	214	GQGEVVLIGNLITHT
E2	171	PHRMDCVTTTVENED	P7	215	VLIGNLITHTDIEVV
E2	172	CVTTTVENEDLFYCK	P7	216	LITHTDIEVVVYFLL
E2	173	VENEDLFYCKLGGNW	P7	217	<b>DIEVVVYFLLLYLVM</b>
E2	174	LFYCKLGGNWTVCVK	P7	218	VYFLLLYLVMRDEPI
E2	175	LGGNWTVCVKGEVVY	P7	219	LYLVMRDEPIKKWIL
E2	176	TCVKGEVVYTGGLV	P7	220	RDEPIKKWILLFHA
E2	177	EPVVYTGGLVKQCRW	P7	221	KKWILLLFHAMTNNP
E2	178	TGGLVKQCRWCGFDF	P7	222	LLFHAMTNNPVKTIT
E2	179	KQCRWCGFDFNEPDG	P7	223	MTNNPVKTITVALLM
E2	180	CGFDFNEPDGLPHYP	P7	224	<b>VKTITVALLMFSGVA</b>
E2	181	NEPDGLPHYPIGKCI	P7	225	VALLMFSGVARGGKI
E2	182	LPHYPIGKCILANET	P7	226	FSGVARGGKIDGGWQ
E2	183	IGKCILANETGYRIV	NS2-3	227	RGGKIDGGWQRLPET
E2	184	LANETGYRIVDSTDC	NS2-3	228	DGGWQRLPETSFDIQ
E2	185	GYRIVDSTDCNRDGV	NS2-3	229	RLPETSFDIQLALTV
E2	186	DSTDCNRDGVVISTD	NS2-3	230	SFDIQLALTVIVVSV
E2	187	NRDGVVISTDGSHEC	NS2-3	231	LALTVIVVSVMLLAK
E2	188	VISTDGSHECLIGNT	NS2-3	232	IVVSVMLLAKRDPTT
E2	189	GSHECLIGNTTVKVH	NS2-3	233	MLLAKRDPTTVPLVI
E2	190	LIGNTTVKVHASDER	NS2-3	234	RDPTTVPLVITVATL
E2	191	TVKVHASDERLGPMP	NS2-3	235	VPLVITVATLRTAKV
E2	192	ASDERLGPMPCRPKE	NS2-3	236	TVATLRTAKVTNGLG
E2	193	LGPMPCRPKEIVSSA	NS2-3	237	RTAKVTNGLGTDIAI
E2	194	CRPKEIVSSAGPVRK	NS2-3	238	TNGLGTDIAIATVLT
E2	195	IVSSAGPVRKTSCTF	NS2-3	239	TDIAIATVLTALLTW
E2	196	GPVRKTSCTFNYAKT	NS2-3	240	<b>ATVLTALLTWTYICD</b>
E2	197	TSCTFNYAKTLKNKY	NS2-3	241	ALLTWTYICDYRYK
E2	198	NYAKTLKNKYEPYPRD	NS2-3	242	TYICDYRYKTWLQY
E2	199	LKNKYEPYPRDSYFQQ	NS2-3	243	YYRYKTWLQYLISTV
E2	200	YEPRDSYFQQYMLKG	NS2-3	244	TWLQYLISTVGTGIFL
E2	201	SYFQQYMLKGQYQYW	NS2-3	245	LISTVGTGIFLIRVLK
E2	202	YMLKGQYQYWFDDLVD	NS2-3	246	TGIFLIRVLKIGIGEL
E2	203	EYQYWFDDLVDTRHS	NS2-3	247	IRVLKIGIGELDLHTP
E2	204	FDDLVDTRHSDYFAE	NS2-3	248	GIGELDLHTPTLPSY
E2	205	TDRHSDYFAEFVVLV	NS2-3	249	DLHTPTLPSYRPLFF
E2	206	<b>DYFAEFVVLVVVALL</b>	NS2-3	250	TLPSYRPLFFILVYL
E2	207	<b>FVVLVVVALLGGRYV</b>	NS2-3	251	RPLFFILVYLIVLSTAV
E2	208	<b>VVALLGGRYVWLIV</b>	NS2-3	252	ILVYLIVLSTAVVTRWN
E2	209	GGRYVWLIVTYIVL	NS2-3	253	IVLSTAVVTRWNLDIAG
E2	210	LWLIVTYIVLTEQLA	NS2-3	254	VTRWNLDIAGLLLQC

ANHANG

NS2-3	255	LDIAGLLLQCVPTLL	NS2-3	299	EDREWRGETCPKCGR
NS2-3	256	LLLQCVPTLLMVFTM	NS2-3	300	RGETCPKCGRFGPPV
NS2-3	257	VPTLLMVFTMWADIL	NS2-3	301	PKCGRFGPPVTCGMT
NS2-3	258	<b>MVFTMWADILTLILI</b>	NS2-3	302	FGPPVTCGMTLADFE
NS2-3	259	WADILTLILILPTYE	NS2-3	303	TCGMTLADFEKHYK
NS2-3	260	TLILILPTYELTKLY	NS2-3	304	LADFEKHYKRIFFR
NS2-3	261	LPTYELTKLYYLKEV	NS2-3	305	EKHYKRIFREDQSE
NS2-3	262	LTKLYYLKEVKIGAE	NS2-3	306	RIFREDQSEGPVRE
NS2-3	263	YLKEVKIGAERGWSL	NS2-3	307	EDQSEGPVREEYAGY
NS2-3	264	KIGAERGWSLKTNFK	NS2-3	308	<b>GPVREEYAGYLQYRA</b>
NS2-3	265	RGWSLKTNFKRVNDI	NS2-3	309	EYAGYLQYRARGQLF
NS2-3	266	<b>KTNFKRVNDIYEVDQ</b>	NS2-3	310	LQYRARGQLFLRNLP
NS2-3	267	RVNDIYEVDQAGEGV	NS2-3	311	<b>RGQLFLRNLPVLATK</b>
NS2-3	268	YEVDQAGEGVYLFPS	NS2-3	312	LRNLPVLATKVKMLL
NS2-3	269	AGEGVYLFPSKQKTS	NS2-3	313	VLATKVKMLLVGNLG
NS2-3	270	YLFPSKQKTSSITGT	NS2-3	314	VKMLLVGNLGTVEVD
NS2-3	271	KQKTSSITGTMLPLI	NS2-3	315	VGNLGTVEVDLEHLG
NS2-3	272	SITGTMLPLIKAILI	NS2-3	316	TEVDLEHLGWVLRG
NS2-3	273	MLPLIKAILISCISN	NS2-3	317	LEHLGWVLRGPAVCK
NS2-3	274	KAILISCISNKWQFI	NS2-3	318	WVLRGPAVCKKVTEH
NS2-3	275	SCISNKWQFIYLLYL	NS2-3	319	PAVCKKVTEHEKCTT
NS2-3	276	<b>KWQFIYLLYLIFEVS</b>	NS2-3	320	KVTEHEKCTTSIMDK
NS2-3	277	YLLYLIFEVSYLHK	NS2-3	321	EKCTTSIMDKLTAFF
NS2-3	278	IFEVSYLHKKIIDE	NS2-3	322	SIMDKLTAFFGVMPR
NS2-3	279	YYLHKKIIDEIAGGT	NS2-3	323	LTAFFGVMPRGTTPR
NS2-3	280	KIIDEIAGGTNFIISR	NS2-3	324	GVMPRGTTPRAPVRF
NS2-3	281	IAGGTNFIISRLVAAL	NS2-3	325	GTTPRAPVRFPTSL
NS2-3	282	NFIISRLVAALIEANW	NS2-3	326	APVRFPTSLLKIRRG
NS2-3	283	<b>LVAALIEANWAFDNE</b>	NS2-3	327	PTSLLKIRRGLETGW
NS2-3	284	IEANWAFDNEEVRGL	NS2-3	328	KIRRGLETGWAYTHQ
NS2-3	285	AFDNEEVRGLKKFFL	NS2-3	329	LETGWAYTHQGGISS
NS2-3	286	EVRGLKKFFLLSSRV	NS2-3	330	AYTHQGGISSVDHVT
NS2-3	287	KKFFLLSSRVKELII	NS2-3	331	GGISSVDHVTCGKDL
NS2-3	288	LSSRVKELIIKHKVR	NS2-3	332	VDHVTCGKDLLVCDT
NS2-3	289	KELIIKHKVRNEVMV	NS2-3	333	CGKDLLVCDTMGRTR
NS2-3	290	KHKVRNEVMVHWFDD	NS2-3	334	LVCDTMGRTRVVCQS
NS2-3	291	<b>NEVMVHWFDEEVYG</b>	NS2-3	335	MGRTRVVCQSNNKMT
NS2-3	292	HWFDEEVYGMPLKV	NS2-3	336	VVCQSNNKMTDESEY
NS2-3	293	EEVYGMPLKLVGLVKA	NS2-3	337	NNKMTDESEYGVKTD
NS2-3	294	MPKLVGLVKAATLSK	NS2-3	338	<b>DESEYGVKTDSGCPE</b>
NS2-3	295	GLVKAATLSKNKNCI	NS2-3	339	GVKTDSGCPEGARCY
NS2-3	296	ATLSKNKNCILCTVC	NS2-3	340	SGCPEGARCYVFNPE
NS2-3	297	NKNCILCTVCEDREW	NS2-3	341	<b>GARCYVFNPEAVNIS</b>
NS2-3	298	LCTVCEDREWRETG	NS2-3	342	VFNPEAVNISGTKGS

ANHANG

NS2-3	343	AVNISGTKGSMVHLQ	NS2-3	387	ENLRVAMTATPAGT
NS2-3	344	GTKGSMVHLQKTGGE	NS2-3	388	VAMTATPAGTVTTTG
NS2-3	345	MVHLQKTGGEFTCVT	NS2-3	389	TPAGTVTTTGQKHPI
NS2-3	346	KTGGEFTCVTASGTP	NS2-3	390	VTTTGQKHPIEEFIA
NS2-3	347	FTCVTASGTPAFFDL	NS2-3	391	QKHPIEEFIAPEVMK
NS2-3	348	ASGTPAFFDLKLNKLG	NS2-3	392	EEFIAPEVMKGEDLG
NS2-3	349	AFFDLKLNKLGWSGLP	NS2-3	393	PEVMKGEDLGSEYLD
NS2-3	350	KNLKGWSGLPIFEAS	NS2-3	394	GEDLGSEYLDIAGLK
NS2-3	351	WSGLPIFEASSGRVV	NS2-3	395	SEYLDIAGLKIPVEE
NS2-3	352	IFEASSGRVVGRVKV	NS2-3	396	IAGLKIPVEEMKSNM
NS2-3	353	<b>SGRVVGRVKGKNE</b>	NS2-3	397	IPVEEMKSNMLVFVP
NS2-3	354	GRVKVKGKNEDESKPTK	NS2-3	398	MKSNMLVFVPTRNMA
NS2-3	355	GKNEDESKPTKLMSGI	NS2-3	399	LVFVPTRNMAVETAK
NS2-3	356	SKPTKLMSGIQTVSK	NS2-3	400	TRNMAVETAKKLKAK
NS2-3	357	LMSGIQTVSKSTTDL	NS2-3	401	VETAKKLKAKGYNSG
NS2-3	358	QTVSKSTTDLTEMVK	NS2-3	402	KLKAKGYNSGYYSYG
NS2-3	359	STTDLTEMVKKITTM	NS2-3	403	GYNSGYYSYGEDPSN
NS2-3	360	TEMVKKITTMNRGEF	NS2-3	404	YYYSYGEDPSNLRVVT
NS2-3	361	KITTMNRGEFRQITL	NS2-3	405	EDPSNLRVVTSQSPY
NS2-3	362	NRGEFRQITLATGAG	NS2-3	406	LRVVTSQSPYVVVAT
NS2-3	363	RQITLATGAGKTEL	NS2-3	407	SQSPYVVVATNAIES
NS2-3	364	ATGAGKTELPRSVI	NS2-3	408	VVVATNAIESGVTL
NS2-3	365	KTELPRSVIEEIGR	NS2-3	409	NAIESGVTLPLD
NS2-3	366	PRSVIEEIGRHKRVL	NS2-3	410	GVTLPLD
NS2-3	367	EEIGRHKRVLVLIPL	NS2-3	411	DLDVVVD
NS2-3	368	HKRVLVLIPLRAAAE	NS2-3	412	VDTGLKCEKRI
NS2-3	369	VLIPLRAAAESVYQY	NS2-3	413	KCEKRI
NS2-3	370	RAAAESVYQYMRQKH	NS2-3	414	IRLSTKMPFIVTGLK
NS2-3	371	SVYQYMRQKHPSIAF	NS2-3	415	KMPFIVTGLK
NS2-3	372	MRQKHPSIAFNLRIG	NS2-3	416	VTGLK
NS2-3	373	PSIAFNLRIGEMKEG	NS2-3	417	RMAVTIGEQA
NS2-3	374	NLRIGEMKEGDMATG	NS2-3	418	IGEQARRGRVGRVK
NS2-3	375	EMKEGDMATGITYAS	NS2-3	419	<b>QRRGRVGRVKPGRYY</b>
NS2-3	376	DMATGITYASYGYFC	NS2-3	420	VGRVKPGRYYRQGET
NS2-3	377	ITYASYGYFCQMPQP	NS2-3	421	PGRYYRQGETPVGSK
NS2-3	378	YGYFCQMPQPKLRAA	NS2-3	422	<b>RGQETPVGSKDYHYD</b>
NS2-3	379	QMPQPKLRAAMVEYS	NS2-3	423	PVGSKDYHYDLLQAQ
NS2-3	380	<b>KLRAAMVEYSFIFLD</b>	NS2-3	424	DYHYDLLQAQRYGIE
NS2-3	381	<b>MVEYSFIFLDEYHCA</b>	NS2-3	425	LLQAQRYGIEDGINI
NS2-3	382	FIFLDEYHCATPEQL	NS2-3	426	RYGIEDGINITKSFR
NS2-3	383	EYHCATPEQLAIMGK	NS2-3	427	DGINITKSFREMN
NS2-3	384	TPEQLAIMGKIHRFS	NS2-3	428	TKSFREMN
NS2-3	385	AIMGKIHRFSENLRV	NS2-3	429	EMNYDWSLYEEDSLM
NS2-3	386	IHRFSENLRVVAMTA	NS2-3	430	WSLYEEDSLMITQLE

ANHANG

NS2-3	431	<b>EDSLMITQLEILNNL</b>	NS4B	475	TYKETMDTATDYVKK
NS2-3	432	<b>ITQLEILNNLLISEE</b>	NS4B	476	MDTATDYVKKFMEAL
NS2-3	433	ILNNLLISEELPMAV	NS4B	477	DYVKKFMEALTDSKE
NS2-3	434	LISEELPMAVKNIMA	NS4B	478	FMEALTDSKEDI IKY
NS2-3	435	LPMVAVKNIMARTDHP	NS4B	479	TDSKEDI IKYGLWGT
NS2-3	436	KNIMARTDHPEPIQL	NS4B	480	DI IKYGLWGHTALY
NS2-3	437	RTDHPEPIQLAYNSY	NS4B	481	GLWGHTALYKSICA
NS2-3	438	EPIQLAYNSYETQVP	NS4B	482	HTALYKSICARLGSE
NS2-3	439	AYNSYETQVPVLFPK	NS4B	483	KSICARLGSETAFAT
NS2-3	440	ETQVPVLFPKIKNGE	NS4B	484	RLGSETAFATLVVKKW
NS2-3	441	VLFPKIKNGEVTDSY	NS4B	485	TAFATLVVKKWLAFGG
NS2-3	442	IKNGEVTDSYDNYTF	NS4B	486	LVVKKWLAFGGESIED
NS2-3	443	VTDSYDNYTFLNARK	NS4B	487	LAFGGESIEDHVKQA
NS2-3	444	DNYTFLNARKLGDDV	NS4B	488	<b>ESIEDHVKQAATDLV</b>
NS2-3	445	LNARKLGDDVPPYVY	NS4B	489	HVKQAATDLVVYYII
NS2-3	446	LGDDVPPYVYATEDE	NS4B	490	ATDLVVYYIINRPQF
NS2-3	447	PPYVYATEDEDLAVE	NS4B	491	VYYIINRPQFPDTE
NS2-3	448	ATEDEDLAVELLGLD	NS4B	492	NRPQFPDTEQOEG
NS2-3	449	<b>DLAVELLGLDWPDPG</b>	NS4B	493	PGDTEQOEGRKFVA
NS2-3	450	<b>LLGLDWPDPGNQGTI</b>	NS4B	494	<b>TQOEGRKFVASLLVS</b>
NS2-3	451	<b>WPDPGNQGTIEVGRA</b>	NS4B	495	RKFVASLLVSALATY
NS2-3	452	NQGTIEVGRALKQVV	NS4B	496	SLLVSALATYTYKSW
NS2-3	453	EVGRALKQVVGLSTA	NS4B	497	ALATYTYKSWNYNNL
NS2-3	454	LKQVVGLSTAENALL	NS4B	498	TYKSWNYNNLSKIVE
NS4A	455	GLSTAENALLVALFG	NS4B	499	NYNNLSKIVEPALAT
NS4A	456	ENALLVALFGYVGYQ	NS4B	500	SKIVEPALATLPYAA
NS4A	457	VALFGYVGYQALSKR	NS4B	501	PALATLPYAATALKL
NS4A	458	YVGYQALSKRHIPVV	NS4B	502	LPYAATALKLFAPTR
NS4A	459	ALSKRHIPVVTDIYS	NS4B	503	TALKLFAPTRLESVV
NS4A	460	HIPVVTDIYSIEDHR	NS4B	504	FAPTRLESVVMLSTA
NS4A	461	TDIYSIEDHRLEDTT	NS4B	505	LESVVMLSTAIYKTY
NS4A	462	IEDHRLEDTTHLQYA	NS4B	506	MLSTAIYKTYLSIRR
NS4A	463	LEDTTHLQYAPNAIK	NS4B	507	IYKTYLSIRRGKSDG
NS4A	464	HLQYAPNAIKTEGKE	NS4B	508	LSIRRGKSDGLLGIG
NS4A	465	PNAIKTEGKETELKE	NS4B	509	GKSDGLLGIGVSAAM
NS4A	466	TEGKETELKELAQGD	NS4B	510	LLGIGVSAAMEIMSQ
NS4A	467	TELKELAQGDVQRCV	NS4B	511	VSAAMEIMSQNPASV
NS4B	468	LAQGDVQRCVEAMTN	NS4B	512	EIMSQNPASVGIAMV
NS4B	469	VQRCVEAMTNYAKEG	NS4B	513	NPASVGIAMV LGVGA
NS4B	470	EAMTNYAKEGIQFMK	NS4B	514	GIAMV LGVGA VAHN
NS4B	471	YAKEGIQFMKSQALK	NS4B	515	LGVGA VAHN AIEAS
NS4B	472	IQFMKSQALKVKETP	NS4B	516	VAAHNAIEASEQKRT
NS4B	473	SQALKVKETPTYKET	NS4B	517	AIEASEQKRTLLMKV
NS4B	474	VKETPTYKETMDTAT	NS4B	518	EQKRTLLMKV FVKNF

ANHANG

NS4B	519	LLMKVFVKNFLDQAA	NS5A	563	KLDFNNSKITILATDK
NS4B	520	FVKNFLDQAATDELV	NS5A	564	NSKITILATDKWEVDH
NS4B	521	LDQAATDELVKESPE	NS5A	565	LATDKWEVDHSTLVR
NS4B	522	TDELVKESPEKIIMA	NS5A	566	WEVDHSTLVRVLRKH
NS4B	523	KESPEKIIMALFEAV	NS5A	567	STLVRVLRKHTGAGY
NS4B	524	KIIMALFEAVQTVGN	NS5A	568	VLRKHTGAGYHGAYL
NS4B	525	LFEAVQTVGNPLRLV	NS5A	569	TGAGYHGAYLGEKPN
NS4B	526	QTVGNPLRLVYHIYG	NS5A	570	HGAYLGEKPNHKHLI
NS4B	527	PLRLVYHIYGVFYKG	NS5A	571	GEKPNHKHLIERDCA
NS4B	528	YHIYGVFYKGWEAKE	NS5A	572	HKHLIERDCATITKD
NS4B	529	<b>VFYKGWEAKELAQRT</b>	NS5A	573	ERDCATITKDKVCFL
NS4B	530	WEAKELAQRTAGRNL	NS5A	574	TITKDKVCFLKMKRG
NS4B	531	LAQRTAGRNLFTLIM	NS5A	575	KVCFLKMKRGCAFTY
NS4B	532	AGRNLFTLIMFEAVE	NS5A	576	KMKRGCAFTYDLSLH
NS4B	533	<b>FTLIMFEAVELLGVD</b>	NS5A	577	CAFTYDLSLHNLTRL
NS4B	534	FEAVELLGVDSEGKI	NS5A	578	DLSLHNLTRLIELVH
NS4B	535	LLGVDSEGKIRQLSS	NS5A	579	NLTRLIELVHKNNLE
NS4B	536	SEGKIRQLSSNYILE	NS5A	580	IELVHKNNLEDKEIP
NS5A	537	RQLSSNYILELLYKF	NS5A	581	KNNLEDKEIPAVTVT
NS5A	538	NYILELLYKFRDSIK	NS5A	582	DKEIPAVTVTTLWLAY
NS5A	539	<b>LLYKFRDSIKSSVRE</b>	NS5A	583	AVTVTTLWLAYTFVNK
NS5A	540	RDSIKSSVREMAISW	NS5A	584	TWLAYTFVNKDIGTI
NS5A	541	SSVREMAISWAPAPF	NS5A	585	TFVNKDIGTIKPAFG
NS5A	542	MAISWAPAPFSCDWT	NS5A	586	DIGTIKPAFGKVTPT
NS5A	543	APAPFSCDWTPTDDR	NS5A	587	KPAFGKVTPEMQED
NS5A	544	SCDWTPTDDRIGLPQ	NS5A	588	EKVTPEMQEDITLQP
NS5A	545	PTDDRIGLPQDNFLQ	NS5A	589	EMQEDITLQPAVVVD
NS5A	546	IGLPQDNFLQVETKC	NS5A	590	ITLQPAVVVDTTDVT
NS5A	547	<b>DNFLQVETKCPGKYK</b>	NS5A	591	<b>AVVVDDTDTVTVTVVG</b>
NS5A	548	VETKCPGKYKMKAVK	NS5A	592	TTDVTDTVTVVGEAPTM
NS5A	549	PCGYKMKAVKNCDGE	NS5A	593	TVVVGGEAPMTTGET
NS5A	550	MKAVKNCDGELRLLLE	NS5A	594	EAPMTTGETPTAFT
NS5A	551	NCDGELRLLLEEGSF	NS5A	595	TTGETPTAFTSSGSD
NS5A	552	<b>LRLLEEGSF LCRNK</b>	NS5A	596	PTAFTSSGSDPKGQQ
NS5A	553	EEGSFLCRNKFGRGS	NS5A	597	SSGSDPKGQQVLKLG
NS5A	554	LCRNKFGRGSRNYRV	NS5A	598	PKGQQVLKLGVEGEGQ
NS5A	555	FGRGSRNYRVTKYYD	NS5A	599	VLKLGVEGEGQYPGTN
NS5A	556	RNYRVTKYYDDNLSE	NS5A	600	VGEGQYPGTNPQRAS
NS5A	557	TKYYDDNLSEIKPVI	NS5A	601	YPGTNPQRASLHEAI
NS5A	558	DNLSEIKPVIRMEGH	NS5A	602	PQRASLHEAIQGADE
NS5A	559	IKPVIRMEGHVELYY	NS5A	603	LHEAIQGADERPSVL
NS5A	560	<b>RMEGHVELYYKGTTI</b>	NS5A	604	QGADERPSVLILGSD
NS5A	561	VELYYKGTTIKLDNF	NS5A	605	RPSVLILGSDKATSN
NS5A	562	KGTTIKLDNFNSKTI	NS5A	606	ILGSDKATSNRVKTA

NS5A	607	KATSNRVKTAKNVKV			
NS5A	608	RVKTAKNVKVYRGRD			
NS5A	609	KNVKVYRGRDPLEVR			
NS5A	610	YRGRDPLEVRDMMKR			
NS5A	611	PLEVRDMMKRGKILV			
NS5A	612	DMMKRGKILVIALSR			

Die massenspektrometrisch nicht charakterisierbaren Pentadekapeptide sind fett dargestellt.

## 7.2. Firmen

Fa. AEG	Nürnberg
Fa. Amersham Buchler	Braunschweig
Fa. Bayer	Leverkusen
Fa. Biochrom KG	Berlin
Fa. Bio-Rad	München
Fa. Becton Dickinson	Heidelberg
Fa. Biozol	Eching
Fa. Branson	Soest
Fa. Dianova	Hamburg
Fa. Difco Laboratories	Detroit, USA
Fa. Endogen	Woburn, Massachusetts
Fa. Eppendorf	Hamburg
Fa. Fisher Scientific	Schwerte
Fa. Fluka	Neu-Ulm
Fa. GfL	Hannover
Fa. GibcoBRL	Karlsruhe
Fa. Greiner	Nürtingen
Fa. Grom	Herrenberg
Fa. Grünenthal	Stolberg
Fa. Gynkotek	Germering
Fa. Heraeus Instruments GmbH	Hanau
Fa. Hermle	Tüttlingen
Fa. Hoechst	Frankfurt
Fa. Inotech	Dottikon, Schweiz
Fa. Leitz	Wetzlar

Fa. Life Technologies	Karlsruhe
Fa. Merck	Darmstadt
Fa. Micromass	Altrincham, England
Fa. Millipore	Bedford, MA, USA, Deutschland: Eschborn
Fa. MultiSyntech	Bochum
Fa. Novabiochem	Bad Soden
Fa. Nunc	Wiesbaden
Fa. Packard	Frankfurt/Main
Fa. Sartorius	Göttingen
Fa. Sarstedt	Nürnbrecht
Fa. Sauter	Ebingen
Fa. SDS	Peypin, Frankreich
Fa. Serva	Heidelberg
Fa. Sigma	Deisenhofen
Fa. Spectra-Physics	Darmstadt
Fa. Titertek	Helsinki, Finnland
Fa. Wallac ADL	Turku, Finnland





Meine akademischen Lehrer waren:

An der Universität Barcelona

E. Brillas., J. Costa, J. Deixeus, X. Fontcuberta, J. Garcia, E. Giralt, C. López, F. López,  
M. Mora, A. Moyano, C. Müller, G. Müller, Ll. Puignou, J. Ribó, M. Sarret, M. Vallès,  
J. Vilarrassa, X. Vinyes,

An der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

G. Jung, J. Strähle, W. Voelter



## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Elisenda Armengol Bara  
Geburtsdatum: 27.12.1971  
Geburtsort: Barcelona

### Schulausbildung:

1977-1985 Grundschule "Pau Casals" in Barcelona  
1985-1989 Gymnasium "La Sedeta" in Barcelona  
1989 Allgemeine Hochschulreife

### Hochschulausbildung:

1989-1994 Chemiestudium an der Universität Barcelona  
1994 Diplomprüfung  
1996-1997 Anfertigung der Diplomarbeit "Optimierung des Festphasenpeptid-synthese und Identifizierung von B-Zell-Epitopen des klassischen Schweinepestvirus mittels synthetischer Peptide der Glykoproteine E0 und E2" unter Anleitung von Prof. Dr. G. Jung an der Universität Tübingen.  
  
seit 1997 Anfertigung der Doktorarbeit "Identifizierung von B- und T-Zell-Epitopen des klassischen Schweinepestvirus mittels synthetischer Peptide" unter Anleitung von Prof. Dr. G. Jung an der Universität Tübingen  
  
1997-2000 EU-Forschungsstipendiatin: "TMR Marie Curie Research Training Grant"

