

**Parapockenvirus (PPV) als neuartige Vektorvakzine:  
Entwicklung Pseudorabiesvirus (PRV)-spezifischer PPV-Rekombinanten  
und Untersuchung deren Immunogenität im Mausmodell**

**Dissertation**

der Fakultät für Biologie  
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

vorgelegt von

**Timo Fischer**  
aus Mühringen

**2002**

Tag der mündlichen Prüfung:

07. Oktober 2002

Dekan:

Professor Dr. H.-U. Schnitzler

1. Berichterstatter:

Professor Dr. E. Pfaff

2. Berichterstatter:

Professor Dr. F. Götz

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

Dem Präsidenten der Bundesforschungsanstalt Herrn Prof. Dr. T.C. Mettenleiter danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit an der BFAV anfertigen zu können.

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

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

Herrn Prof. Dr. L. Stitz und Herrn Dr. O. Planz möchte ich für die praktische Unterstützung, die anregenden Diskussionen und die kritische Beurteilung der Arbeit danken.

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

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Frau B. Bauer für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft und das freundschaftliche Verhältnis, das wir über die Jahre gewonnen haben.

Bei meinen Arbeitskollegen Marco Henkel, Tanja Twardawa, Bärbel Hoegen, Katja Oesterle, Mandy Lauckner, Rosita Cottone, Marco Mangold, Annette Wagner, Christian Marquardt, Daniel Wienhold, Roger Bernhard, Karina Mildner, und Christine Hepper bedanke ich mich für die Mithilfe bei verschiedenen Arbeiten und die tolle Arbeitsatmosphäre, die auch viel Spaß in den Laboralltag brachte.

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

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



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Klassifizierung der Parapockenviren	1
1.2	Klinische Symptomatik nach Parapockenvirusinfektion	2
1.3	Morphologie und Genomorganisation der Parapockenviren	3
1.4	Replikationszyklus und Genregulation bei Parapockenviren	6
1.5	Immunantwort gegen die ORFV Infektion und deren Modulation durch virale Faktoren	7
1.6	Genexpression und Replikation der PPV in nicht-permissiven Zellen und Immunantwort im nicht-permissiven Wirt	10
1.7	PPV als virale Vektoren	11
1.8	Klassifizierung, Struktur und Genomorganisation des Pseudorabiesvirus	12
1.9	Pathogenese und Vakzinierung	15
1.10	Ziel der Arbeit	19
<b>2</b>	<b>Material</b>	<b>20</b>
2.1	Tiere	20
2.2	Viren	20
2.3	Zelllinien und Zellkulturmedien	21
2.4	Bakterienstämme und Kulturmedien für Bakterien	22
2.5	Plasmide und Vektoren	23
2.6	Puffer und Lösungen für DNA	25
2.7	Puffer und Lösungen für RNA	28
2.8	Lösungen für Hybridisierungen	29
2.9	Lösungen, Puffer und Reagenzien für die PCR	30
2.10	Lösungen für proteinanalytische Arbeiten	31
2.11	Lösungen für immunologische Methoden	32
2.12	Reagenzien	32
2.13	Nukleinsäure-Längenstandards und Protein-Molekulargewichts-Marker	34
2.14	Enzyme	34
2.15	Radioaktive Substanzen	35
2.16	Oligonukleotide	35
2.17	Antisera, Monoklonale Antikörper und Konjugate	36
2.18	Kits	36
2.19	Geräte und Laborhilfsmittel	37
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>40</b>
3.1	DNA-Analysen	40
3.1.1	Methoden zur Präzipitation von Nukleinsäuren	40
3.1.2	Phenol-Extraktion	40
3.1.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	41
3.1.4	DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	41
3.1.5	DNA-Agarosegelelektrophorese	41
3.1.6	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	42
3.1.7	Southern Transfer (Southern, 1975)	43
3.1.8	Klonierung von DNA-Fragmenten	43
3.1.9	Identifizierung rekombinanter Klone	46
3.1.10	Aufarbeitung synthetischer Oligonukleotidprimer	47
3.1.11	DNA-Doppelstrang-Sequenzierung	48
3.1.12	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	50
3.1.13	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	51

3.1.14	Isolierung von PPV-DNA	53
3.2	RNA-Analysen	54
3.2.1	Isolierung von Gesamtzell-RNA	54
3.2.2	RNA-Agarosegelelektrophorese	54
3.2.3	Northern-Transfer (Kroczek und Siebert, 1990)	54
3.2.4	RNA Dot-Blot	55
3.3	Hybridisierungsmethoden	55
3.3.1	Hybridisierung radioaktiv markierter DNA	55
3.3.2	Rehybridisierung von Nylonmembranen	56
3.3.3	Autoradiographie	57
3.3.4	Densitometrische Analyse von Blothybridisierungen	57
3.4	Proteinanalytische Methoden	57
3.4.1	Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese	57
3.4.2	Coomassie-Färbung von Proteinen	58
3.5	DNA- und Protein-Sequenzanalysen	58
3.6	Immunologische Methoden	59
3.6.1	Western-Blotanalyse	59
3.6.2	Durchflußzytometrie	59
3.6.3	ELISA	60
3.6.4	Serumneutralisationstest	61
3.7	Zellkultur	61
3.7.1	Kultivierung und Lagerung von Zellen	61
3.7.2	Bestimmung der Zellzahl	62
3.8	Virusanzucht und Titerbestimmung	63
3.8.1	Virusanzucht	63
3.8.2	Virustitration	63
3.9	Virusinaktivierung	64
3.10	Herstellung rekombinanter PPV	64
3.10.1	Kotransfektion	64
3.10.2	Negative Selektion auf $\beta$ -Galaktosidase-Expression	65
3.10.3	Positive Selektion auf Fremdgenexpression	66
3.11	Ein-Schritt-Wachstumskurve	67
3.12	Elektronenmikroskopische Analyse D1701-infizierter Zellen	67
3.13	Tierversuche	68
3.13.1	Immunisierung	68
3.13.2	Blutentnahme	68
3.13.3	Passive Immunisierung	69
3.13.4	Belastungsinfektion	69
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>70</b>
4.1	Konstruktion der Transfervektoren zur Entwicklung von D1701-Vektorvakzinen	70
4.2	Selektion der rekombinanten ORFV-Vektorvakzinestämme	73
4.3	Restriktions- und Southern-Blotanalyse der ORFV-Vektorvakzinen	75
4.4	Genexpression der ORFV-Rekombinanten in permissiven Vero-Zellen	80
4.4.1	Transkription der Fremdgen-spezifischen mRNA	80
4.4.2	Western-Blotanalyse der Fremdgenexpression	83
4.4.3	Durchflußzytometrische Analyse der Fremdgenexpression	88
4.5	Genexpression und Replikation der ORFV-Rekombinanten in Maus-Zelllinien	91
4.5.1	Northern-Blotanalysen	91
4.5.2	Western-Blotanalysen	94
4.5.3	Durchflußzytometrische Analyse der Fremdgenexpression	95
4.5.4	Replikation der viralen DNA	96

4.5.5	Ein-Schritt-Wachstumskurve	98
4.5.6	Virusmorphogenese	101
4.6	Immunogenität und Protektivität der ORFV-Vektorvakzinen in der Maus	103
4.6.1	Bestimmung der letalen Dosis des PRV-Stammes NIA-3	103
4.6.2	Simultanimmunisierung	104
4.6.3	Separate Immunisierung mit den einzelnen Vektorvakzinen	107
4.6.3.1	Untersuchung der Rekombinanten D-gC3 und D-gD	107
4.6.3.2	Untersuchung der Rekombinanten D-gC1 und D-gC2	109
4.7	Charakterisierung der Vektorvakzine-induzierten protektiven Immunität	113
4.7.1	Passive Immunisierung von Mäusen durch Serumtransfer	113
4.7.2	Bedeutung von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen und IFN- $\gamma$ beim Vektorvakzine-vermittelten Schutz gegen PRV: Untersuchung von Knockout-Mäusestämmen	115
4.8	Immunogenität und Protektivität inaktivierter ORFV-Vektorvakzinen	120
4.9	Einfluß ORFV-spezifischer Immunität auf die Immunogenität und Protektivität der Vektorvakzinen	121
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>122</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>149</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>152</b>
<b>8</b>	<b>Verzeichnis der Abkürzungen</b>	<b>180</b>





## 1 Einleitung

### 1.1 Klassifizierung der Parapockenviren

Die Familie der Poxviridae untergliedert sich in die beiden Subfamilien Chordopoxvirinae (Pockenviren der Wirbeltiere) und Entomopoxvirinae (Pockenviren der Insekten). Erstere umfaßt acht verschiedene Genera, die man als Ortho-, Para-, Avi-, Capri-, Lepori-, Sui-, Mollusci- und Yatapoxvirus bezeichnet (Moss, 1996a). Das Genus Parapoxvirus (PPV) wird in die Spezies Parapoxvirus ovis (Orf Virus, ORFV), Parapoxvirus bovis 1 (Stomatitis papulosa Virus, BPSV), Parapoxvirus bovis 2 (Melkerknoten, Paravaccinia, Pseudokuhpocken, PCPV) und Parapoxvirus des Rotwildes in Neuseeland (PVNZ; Robinson & Mercer, 1995) als neues Mitglied der Gattung untergliedert (Van Regenmortel et al., 2000). Parapockenviren sind auf den Menschen übertragbar, d.h es handelt sich hierbei um Zoonosen (Robinson & Lyttle, 1992; Mercer et al., 1997). Eine Ausnahme stellt das Parapoxvirus des Rotwildes dar, bei dem bislang keine Übertragung auf den Menschen beschrieben wurde. PPV-Infektionen wurden auch bei anderen Wiederkäuern, wie Kamelen, Gämsen, Rentieren, Moschusochsen und asiatischen Antilopen sowie bei Nicht-Ungulaten wie Robben oder Eichhörnchen nachgewiesen (Übersicht Büttner & Rziha, 2002). Einerseits konnten diese Isolate zwar bislang nicht als eigenständige Spezies klassifiziert werden, andererseits ist ihre Zuordnung zu bekannten PPV-Spezies nicht in allen Fällen geklärt (Nettleton et al., 1995; Haig & Mercer, 1998; Inoshima et al., 2001).

Die Zuordnung von Parapockenviren zu einer Spezies basierte ursprünglich auf dem natürlichen Wirtsspektrum, klinischen Symptomen und serologischen Analysen. Es zeigte sich jedoch, dass das Wirtsspektrum und die klinische Symptomatik nicht immer ausreichend für die korrekte Klassifizierung von PPV-Isolaten sind (Robinson & Lyttle, 1992; Sentsui et al., 1999; Inoshima et al., 2001). Auch die zuverlässige Klassifizierung anhand serologischer Analysen ist aufgrund der serologischen Kreuzreaktivität innerhalb der PPV bislang nicht etabliert (Wittek et al., 1980; Rosenbusch & Reed, 1983; Lard et al., 1991; Czerny et al., 1997; Housawi et al., 1998). Deshalb erfolgt die Zuordnung verstärkt durch Restriktionsendonuklease-, DNA/DNA-Hybridisierungs- und PCR-Analysen der viralen DNA (Wittek et al., 1980; Gassmann et al., 1985; Robinson & Lyttle, 1992; Robinson & Mercer, 1995; Mercer et al., 1997; Inoshima et al., 2001).

### **1.2 Klinische Symptomatik nach Parapockenvirusinfektion**

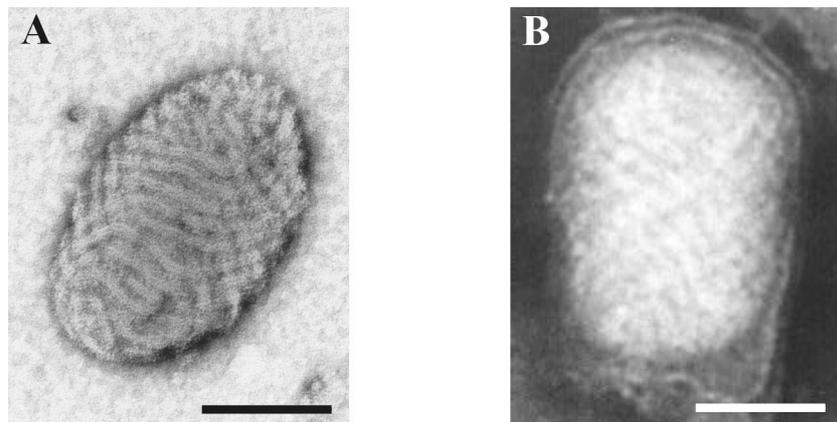
Parapockenviren verursachen eine kontagiöse Dermatitis, die sich auf die Haut bzw. Mundschleimhaut beschränkt (*Ecthyma contagiosum*). Die Infektion erfolgt über verletzte Haut, wobei sich das Virus vorwiegend in regenerierenden Epithelzellen der Epidermis vermehrt (McKeever et al., 1988; Jenkinson et al., 1990). Die Erkrankung heilt innerhalb von vier bis sechs Wochen vollständig ab. Das Krankheitsspektrum reicht dabei von mild verlaufenden Erythemen, wie sie bei BPS des Rindes vorkommen, bis zu schweren ulzerativen Wucherungen der Epidermis, die häufig bei Orf beim Schaf und bei der Ziege auftreten. Die Hautläsion äußert sich zunächst in einer Rötung und Schwellungen am Infektionsort. Degenerierte Epithelzellen bilden in der Folge Vesikel, die nach Einwanderung polymorphnukleärer Leukozyten eine pustuläre Erscheinung annehmen. Bei fortschreitender Erkrankung koagulieren benachbarte Pusteln zu einer virushaltigen Kruste, die nach einiger Zeit abfällt (Robinson & Balassu, 1981). Bislang gibt es keine gesicherten Hinweise auf eine systemische Verbreitung der PPV im Wirtstier. Dies gilt selbst für schwere Fälle von ORFV-Infektionen, die teilweise mit pathologischen Veränderungen der inneren Organe der betroffenen Tiere einhergingen. Letzteres ist vermutlich vielmehr auf Komplikationen durch Sekundärinfektionen mit Bakterien, Pilzen oder Insektenlarven zurückzuführen (Darbyshire, 1961; Robinson & Balassu, 1981; Snider et al., 1982; Gumbrell & McGregor, 1997). Gegen eine systemische Ausbreitung des Virus spricht auch die erfolglose Induktion von Orf-Läsionen nach intravenöser Applikation von ORFV im Schaf (Hussain & Burger, 1989). Da jedoch PPV auch erstmals aus Leukozyten des peripheren Bluts eines Rindes isoliert werden konnte (Sentsui et al., 1999), kann die Persistenz des Virus im Wirtstier nicht endgültig ausgeschlossen werden.

Die Orf-bedingte Morbidität kann in Schafherden bis zu 100% erreichen (Gardiner et al., 1967), die Mortalität liegt dagegen in der Regel bei nur etwa 1%. Hiervon sind besonders Jungtiere bzw. immunsupprimierte Tiere aufgrund von Problemen beim Säugen oder aufgrund der genannten Sekundärinfektionen betroffen (Valder et al., 1979; Haig & Mercer, 1998). Die humane ORFV-Infektion durch Kontakt mit infizierten Tieren führt in der Regel lediglich zu komplikationslosen Läsionen an den Händen, die innerhalb weniger Wochen vollständig abheilen. Schwerere Verlaufsformen wurden selten berichtet (Robinson & Balassu, 1981) und treten vor allem bei immunsupprimierten Personen oder nach Verbrennungen auf (Robinson & Lyttle, 1992).

### 1.3 Morphologie und Genomorganisation der Parapockenviren

Parapockenviren weisen bezüglich Genomorganisation, Genregulation und Virusreifung große Ähnlichkeiten zu anderen Vertretern der Familie der Poxviridae auf. Dagegen deuten vor allem die unterschiedliche Morphologie, sowie der hohe G+C Gehalt des Genoms der Parapockenviren auf eine signifikante genetische Divergenz zu anderen Gattungen der Familie hin.

Die Virionen sind von ovaler Gestalt und circa 260 x 160 nm groß (Abdussalam & Cosslett, 1957). Wie bei allen Pockenviren befindet sich das Virusgenom in einem Proteinnukleoid, dem sogenannten Core. Das Core wird von einer Lipoprotein-Doppelmembran umschlossen. In die äußere Membran sind tubuläre Proteinfilamente eingelagert, die bei den PPV in charakteristischer, spiraliger Anordnung verlaufen und das typische Bild einer Wollknäuel-Struktur ergeben (Abb.1.1). Dies ermöglicht mittels Elektronenmikroskopie einen zuverlässigen Nachweis der PPV (Robinson & Lyttle, 1992).



**Abb. 1.1:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen des ORFV-Stammes D1701. In Abbildung A ist die wollknäuelartige, spiralige Anordnung der tubulären Proteinfilamente zu erkennen. Die Abbildung B zeigt ein Partikel nach Umhüllung mit einer weiteren Membran, welche durch Fusion mit der Plasmamembran die Freisetzung des Partikels aus der infizierten Zelle ermöglicht. Die jeweils rechts unten abgebildete Maßstrecke entspricht 100 nm. Mit freundlicher Genehmigung von Dr. F. Weiland, BFAV Tübingen.

Parapockenviren besitzen ein lineares, doppelsträngiges DNA-Genom mit einer Größenvariabilität von ca. 130 bis 160 kbp zwischen verschiedenen PPV Spezies (Gassmann et al., 1985; Cottone et al., 1998). Der G+C Gehalt bei ORFV als Prototyp-Spezies der Gattung ist mit 63% deutlich höher als bei den übrigen Gattungen der Poxviridae, mit

Ausnahme der Gattung *Molluscipox* (Wittek et al., 1979; Moss, 1996a). Abgesehen davon weist das PPV Genom eine vergleichbare Organisation zum Genom anderer Pockenviren auf. Das Genom des ORFV Stammes D1701 ist schematisch in Abbildung 1.2 dargestellt. Haarnadelstrukturen an beiden Enden des Genoms der Pockenviren bedingen die kovalente Verknüpfung der beiden DNA-Stränge (Menna et al., 1979; Baroudy et al., 1982; Mercer et al., 1987). Die terminalen ITR-Regionen ("Inverted Terminal Repeats"), die betreffend ihrer Sequenz identisch aber umgekehrt orientiert sind (Mercer et al., 1987; Fraser et al., 1990), grenzen den zentralen Bereich des Genoms ein. Generell befinden sich im zentralen Bereich des Genoms hochkonservierte Gene, die für die Replikation der Pockenviren essentiell sind. Dagegen kodieren die variablen terminalen Abschnitte des Genoms für Faktoren, die für die Pathogenität, Virulenz und Wirtsspezifität der Pockenviren, jedoch nicht für deren Vermehrung in der Zellkultur von Bedeutung sind (Turner & Moyer 1990; Buller & Palumbo, 1991). Dementsprechend läßt sich beim Vergleich der Genkarten von Orf Virus und dem Orthopockenvirus *Vaccinia Virus* (VACV) vor allem im zentralen Bereich des Genoms eine hohe Übereinstimmung in der Verteilung, Orientierung und im Abstand homologer Gene feststellen. Dagegen befinden sich in den terminalen Abschnitten ORFV-spezifische Gene, die möglicherweise für die besonderen biologischen Eigenschaften der Orf Viren von Bedeutung sind (Mercer et al., 1995).

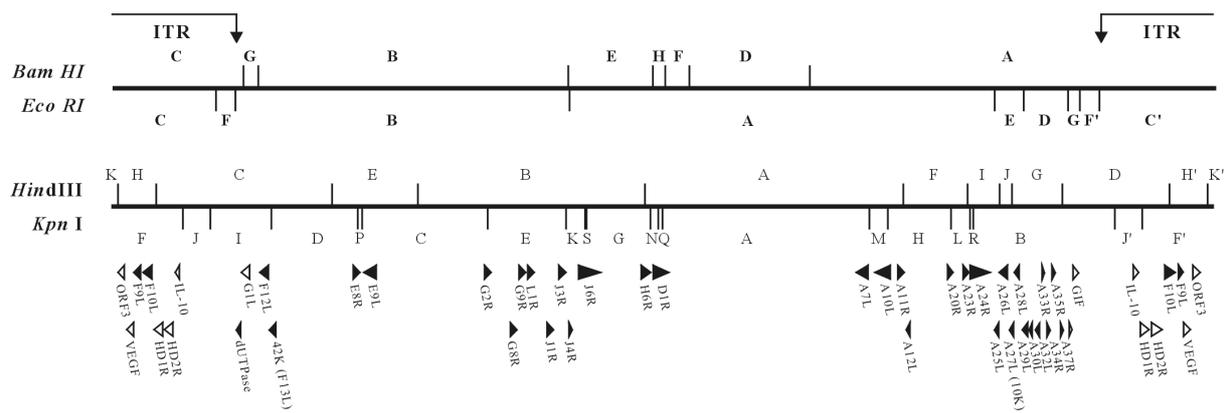
Trotz der vergleichbaren genomischen Organisation weisen die PPV eine größere genetische Heterogenität als andere Pockenviren auf (Wittek et al., 1980; Gassmann et al., 1985; Robinson & Mercer, 1995). Dabei ist die Heterogenität der Restriktionsmuster innerhalb einer Spezies bei ORFV-Isolaten am größten (Wittek et al., 1980; Robinson et al., 1982; Rafii & Burger, 1985; Mazur et al., 2000). Diese Heterogenität ist vor allem auf eine variable Verteilung der Restriktionsschnittstellen in den terminalen Bereichen des Genoms zurückzuführen (Robinson et al., 1987; Robinson & Mercer, 1995). Möglicherweise ist die Variabilität der Genomenden eine Ursache für deren Umstrukturierungen, die für verschiedene ORFV Stämme nach mehrfacher Zellkulturvermehrung beschrieben wurden (Fleming et al., 1995; Cottone et al., 1998; McInnes et al., 2001). In allen Fällen wurde dabei ein Bereich des rechten Genomendes dupliziert und zum linken Ende des Genoms transloziert, wo dies zum Verlust nicht-essentieller Gene führte. Unter anderem wurde hierbei das ORFV E3L deletiert. Dieses Gen, welches nicht homolog zum VACV E3L ist, kodiert für eine funktionelle dUTPase (Cottone et al., 2002). Die Funktion des benachbarten, VACV 5K-

homologen E2L (Mercer et al., 1996), welches in allen bislang bekannten ORFV-Zellkulturvarianten deletiert ist, ist nicht bekannt. Das ebenfalls E3L-benachbarte G1L-Gen besitzt Ankyrin-ähnliche Sequenz-Wiederholungsmotive und ist aufgrund dessen vermutlich an Protein/Protein- oder Protein/Nukleinsäure-Interaktionen beteiligt (Sullivan et al., 1995a). Im Anschluß an G1L befindet sich das G2L-Gen, welches für ein Protein von bislang unbekannter Funktion kodiert (Sullivan et al., 1995b) und in einer der beschriebenen Zellkulturvarianten ebenfalls deletiert ist (McInnes et al., 2001). Der attenuierte Phänotyp dieser ORFV Zellkulturvarianten *in vivo* deutet auf eine Funktion der deletierten Gene bezüglich Virulenz, Pathogenität und Wirtsspezifität des Virus hin. Für dUTPase-Homologe anderer viraler Erreger konnte bereits mehrfach eine Funktion hinsichtlich Virulenz oder Zelltropismus gezeigt werden (Lichtenstein et al., 1995; Jöns et al., 1997; Liang et al., 1997; Turelli et al., 1997). Für ORFV wurde diskutiert, dass die virale dUTPase möglicherweise die Replikation des Virus in infizierten epidermalen Zellen mit geringer intrinsischer dUTPase-Aktivität begünstigt, obwohl dies noch nicht experimentell gezeigt werden konnte (Cottone et al., 2002).

Eine weitere Folge der Duplikations-Translokationsereignisse ist die Vergrößerung der jeweiligen ITR-Regionen. Für den ORFV-Stamm D1701 wurde dabei eine Verdopplung der Gene beschrieben, die für Homologe zum ovinen IL-10 (Fleming et al., 1997) bzw. VEGF der Säugetiere (Lyttle et al., 1994) kodieren (Cottone et al., 1998).

Ähnliche Umstrukturierungen der genomischen Termini wurden bereits für verschiedene attenuierte Orthopockenviren beschrieben (Dumbell & Archard, 1980; Moyer et al., 1980; Esposito et al., 1981; Archard et al., 1984; Pickup et al., 1984; Kotwal & Moss, 1988) und stellen eventuell einen Mechanismus der schnellen Adaptation der Pockenviren an veränderte Bedingungen dar.

## Einleitung



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

### 1.4 Replikationszyklus und Genregulation bei Parapockenviren

Parapockenviren weisen im Vergleich zu anderen Pockenviren neben Ähnlichkeiten in der Genomorganisation und Genausstattung auch Parallelen im Replikationszyklus und in der Genregulation auf. Der Replikationszyklus der Pockenviren (ausführlich dargestellt in Moss, 1996a) vollzieht sich vollständig im Cytoplasma der infizierten Zelle. Nach der Fusion des umhüllten Virus mit der Zellmembran wird das Core in das Cytoplasma freigesetzt. Das Core enthält neben dem viralen Genom alle Proteine, die für die Transkription früher Gene benötigt werden. Frühe Genprodukte umfassen Wachstumsfaktoren, immunmodulatorische Proteine, sowie Enzyme und Faktoren, die für die Transkription intermediärer Gene und für die DNA-Replikation notwendig sind. Nach der Freisetzung der viralen DNA wird diese in Konkatemeren repliziert. Anschließend induzieren intermediäre Genprodukte die Transkription später Gene, die für virale Strukturproteine, Enzyme und frühe Transkriptionsaktivatoren kodieren. Genomische Einheiten des DNA-Konkatemers werden in zunächst unreifen Virionen (IV) verpackt, welche im weiteren Verlauf zu infektiösen intrazellulären Partikeln (IMV; Intracellular Mature Virion) reifen (Sodeik & Krijnse-Locker, 2002). Teilweise werden die reifen Viruspartikel zusätzlich mit einer vom Trans-Golgi-Netzwerk stammenden Membran umhüllt und an die Peripherie der Zelle transportiert, wo sie die Zelle durch Knospung verlassen. Als sogenannte EEV (Extracellular Enveloped Virus; s.

Abb. 1B) sind diese Partikel für die Verbreitung des Virus von Zelle zu Zelle verantwortlich. Die Regulation der Genexpression während unterschiedlicher Phasen des Replikationszyklus der Pockenviren wird durch unterschiedliche Transkriptions-Kontrollelemente gewährleistet (Moss, 1996a). Promotoren später pockenviraler Gene besitzen eine 20 bp lange, A/T-reiche Region stromaufwärts vom hochkonservierten TAAAT-Transkriptionsstartmotiv (Rosel et al., 1986; Bertholet et al., 1986; Davison & Moss, 1989a). Auch für späte Gene der Parapockenviren wurden entsprechende Promotormotive beschrieben (Fleming et al., 1993; Klemperer et al., 1995; Naase et al., 1991). Am 5'-Ende tragen späte Transkripte häufig Poly(A)-Leitsequenzen (Schwer et al., 1987; Ahn & Moss., 1989). Diese Eigenschaft, welche auch für späte ORFV-spezifische Transkripte postuliert wird (Sullivan et al., 1994), bedingt den Längenpolymorphismus später mRNAs (Bertholet et al., 1987).

Die Promotoren früher Gene der Pockenviren umfassen eine A/T-reiche Sequenz, stromaufwärts vom Transkriptionsstart (Davison & Moss; 1989b). Als typisches Transkriptionsterminationssignal besitzen frühe Gene das Motiv TTTTTNT (Yuen & Moss, 1987), wobei N ein beliebiges Nukleotid sein kann. Vergleichbare Kontrollelemente wurden auch bei frühen Genen der Orf Viren nachgewiesen (Mercer et al., 1989; Fraser et al., 1990; Fleming et al., 1991; Lyttle et al., 1994; Sullivan et al., 1995b; Cottone et al., 1998; Fleming et al., 2000). Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* werden die Transkriptionskontrollelemente früher ORFV-Gene vom Transkriptionsapparat von VACV erkannt und *vice versa* (Vos et al., 1992; Fleming et al., 1992; Rziha et al., 2000).

### **1.5 Immunantwort gegen die ORFV Infektion und deren Modulation durch virale Faktoren**

Als Folge der ORFV Infektion der Haut kommt es zur Aktivierung des unspezifischen Abwehrsystems im Wirtsorganismus. Dabei kann man die frühe Einwanderung von neutrophilen Leukozyten, sowie die Induktion von Cytokinen und Chemokinen beobachten (Haig et al. 1992, Haig et al., 1996a; Haig & Mercer 1998). Hierbei spielen IL-1 und IL-8 vermutlich eine Rolle bei der Rekrutierung von Neutrophilen und Lymphozyten als Bestandteil der inflammatorischen Immunantwort des Wirts gegen die Infektion (Haig et al., 1994). Desweiteren ist die infektionsbedingte Freisetzung von Typ 1-Interferonen als mögliche antivirale Mediatoren sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beschrieben (Yirrell et al.,

1991a, b; Haig et al., 1992; Büttner et al., 1995). Der Epitheliotropismus des ORFV und die Induktion einer kutanen inflammatorischen Immunantwort führt zur Akkumulation von MHC II-positiven dendritischen Zellen an Orf Läsionen (Lear et al., 1996), deren Rekrutierung möglicherweise durch die Induktion des Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierenden Factors (GM-CSF) am Entzündungsort vermittelt wird (Haig & Mercer, 1998). Diese dendritischen Zellen könnten als professionelle antigenpräsentierende Zellen eine wichtige Funktion bezüglich der Induktion der spezifischen Immunantwort einnehmen.

Die stark ausgeprägte Immunantwort ist weiterhin charakterisiert durch die Akkumulation von B-Zellen und  $CD4^+$  bzw.  $CD8^+$   $\alpha\beta$  sowie  $\gamma\delta$  T-Zellen am Infektionsort mit einem Maximum ca. 72 Stunden p.i. (Jenkinson et al., 1992). Die Depletion von T Zell-Subpopulationen *in vivo* deuten dabei auf eine wichtige Funktion von  $CD4^+$  T Zellen für die Entwicklung ORFV-spezifischer Antikörper und die Eliminierung des Virus nach einer Primärinfektion hin, wogegen eine protektive Funktion von  $CD8^+$  oder  $\gamma\delta$  T Zellen bislang nicht nachzuweisen war (Lloyd et al., 2000).

Die starke unspezifische sowie die adaptive Immunantwort des Wirtstieres nach einer Primärinfektion schützt das Schaf nicht gegen die ORFV-Reinfektion, was die Effizienz der Vakzinierung von Schafen gegen Orf limitiert (Buddle et al., 1984). So schützt das Vorhandensein ORFV-spezifischer Antikörper das adulte Tier nicht gegen eine Reinfektion (McKeever et al., 1987). Auch die passive Immunisierung des Neugeborenen durch maternale Antikörper verhindert die Infektion nicht (Buddle & Pulford, 1984). Allerdings sind die Läsionen nach Reinfektion weniger stark ausgeprägt und heilen schneller ab. (Haig & Mercer, 1998) Dabei steht die verminderte Pathogenität nach Reinfektion von Schafen in Korrelation zu hohen ORFV-spezifischen Antikörpertitern (Lloyd et al., 2000), dem vermehrten Auftreten von cytolytischen  $CD8^+$  T-Zellen (Haig et al., 1996b) und der Expression von  $IFN-\gamma$  am Infektionsort (Anderson et al., 2001).

Innerhalb der Familie der Pockenviren sind zahlreiche virale Faktoren mit immunmodulatorischen Eigenschaften beschrieben (Alcami & Smith, 1995; Spriggs, 1996; Alcamí & Koszinowski, 2000). Bei vielen der für diese Faktoren kodierenden Gene handelt es sich um Homologe zu Genen der Wirtszelle, die während der Evolution in das virale Genom integriert und verändert wurden. So wurde für verschiedene Orthopockenviren die Expression löslicher Rezeptoren beschrieben, welche die Funktion inflammatorischer Cytokine, Chemokine und Komplementfaktoren sowie antiviraler Interferone unterbinden (Smith, 1996;

Smith, 1999; Lalani & McFadden, 1997). Darüberhinaus wurde für VACV ein E3L-kodiertes Interferonresistenzprotein beschrieben, welches Interferon-induzierte Signalwege hemmt und damit die antivirale Wirkung von Interferonen in der infizierten Zelle unterbindet (Sharp et al., 1998). Zusätzlich sind virale Serin-Proteinase-Inhibitoren in der Lage, apoptotische Kaspasen in Pockenvirus-infizierten Zellen zu inhibieren. Sie verhindern damit die Apoptose als weiteren antiviralen Mechanismus der Wirtszelle (Gillet & Brun, 1996).

Mehrere immunmodulatorische Faktoren wurden auch für ORFV als Prototyp-Spezies der Parapockenviren beschrieben. Das ORFV-Interferonresistenzgen (OVIFNR) stellt ein funktionelles Homolog des VACV E3L dar (Haig et al., 1998). Der GM-CSF-inhibitorische Faktor (GIF) bindet und inhibiert die ovinen Cytokine GM-CSF und Interleukin-2 (Deane et al., 2000). Ein virales Homolog des ovinen IL-10 (Fleming et al., 1997; Rziha et al., 2002, eingereicht) inhibiert *in vitro* die Synthese von proinflammatorischen Cytokinen und IFN- $\gamma$  (Fleming et al., 2000; Imlach et al., 2002). Außerdem führt die Infektion mit einer IL-10 Deletionsmutante zur erhöhten IFN- $\gamma$  Produktion *in vivo* (Fleming et al., 2000). Mit dem ORFV VEGF-E wurde darüberhinaus ein für virale Erreger bislang neuartiger Virulenzfaktor beschrieben (Lyttle et al., 1994). Aufgrund der VEGF-E vermittelten Angiogenese sowohl *in vitro* (Ogawa et al., 1998; Meyer et al., 1999; Wise et al., 1999) als auch *in vivo* (Savory et al., 2000) wird diesem Protein eine wichtige Bedeutung bei der Ausprägung prolieferender, blutiger Läsionen beigemessen. Unklar ist bislang, ob die Verdopplung der IL-10- bzw. VEGF-E-spezifischen Gene bei zellkulturadaptiertem ORFV D1701 (siehe 1.3) von Bedeutung für dessen Virulenz bzw. Pathogenität *in vivo* ist.

Die genauere Kenntnis der Funktion dieser Immunmodulatoren bzw. Virulenzfaktoren der Orf Viren *in vivo* könnte Aufschluß darüber geben, weshalb die ausgeprägte Immunantwort des Wirtstieres die Bildung von Läsionen bei einer Primärinfektion sowie die Reinfektion nicht verhindern kann. Darüberhinaus stellen nicht-essentielle Gene, deren Verlust mit reduzierter Pathogenität des Virus einhergeht, mögliche Genomorte für die Insertion von Fremdgenen bei der Entwicklung rekombinanter Parapockenviren dar (Rziha et al., 1999, 2000; Cottone et al., 2002).

## **1.6 Genexpression und Replikation der PPV in nicht-permissiven Zellen und Immunantwort im nicht-permissiven Wirt**

Das natürliche Wirtsspektrum der PPV ist im Vergleich zu den Orthopockenviren sehr begrenzt. Selbst die hochdosierte experimentelle Infektion des Schweins als nicht-permissivem Wirt führt nicht zur Bildung von ORFV-spezifischen Läsionen (Büttner & Rziha 2002). Dagegen konnte mittels eines rekombinanten, *E. coli*  $\beta$ -Galaktosidase exprimierenden Orf Virus gezeigt werden, daß *in vitro* eine frühe Genexpression auch in nicht ORFV-permissiven Zellen stattfindet (Rziha et al., 2000). Darüberhinaus entwickelt die Maus, bei der eine produktive experimentelle ORFV-Infektion bislang nicht beschrieben wurde, eine  $\beta$ -Galaktosidase-spezifische humorale Immunantwort, die abhängig von *de novo* Proteinsynthese ist (Rziha et al., 2000). Dies deutet auf eine abortive Replikation von Orf Viren in nicht-permissiven Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* hin. Ähnliche Beobachtungen wurden auch für nichtreplizierende Vaccinia Viren (Sutter & Moss, 1992; Tartaglia et al., 1992; Holzer et al., 1999; Ober et al., 2002) bzw. andere Pockenviren mit restringiertem Wirtsspektrum gemacht (Taylor et al., 1988, 1991, 1995; Somogyi et al., 1993; Stannard et al., 1998). Dabei wurde eine Unterbrechung des Replikationszyklus entweder bereits vor der DNA Replikation (Holzer et al., 1999; Taylor et al., 1995; Ober et al., 2002) oder bei der späten Reifung der Viruspartikel festgestellt (Sutter & Moss, 1992; Somogyi et al., 1993; Stannard et al., 1998). Für ORFV sind keine Untersuchungen hinsichtlich des Mechanismus einer möglichen abortiven Replikation in nicht-permissiven Zellen bekannt.

Bereits mehrfach wurde die ORFV-induzierte Stimulierung einer unspezifischen Immunantwort auch in nicht-permissiven Wirtstieren beschrieben. Es konnte gezeigt werden, daß die Applikation inaktivierter Orf Viren des Stammes D1701 präventiv gegen infektiöse Erkrankungen bei verschiedenen Spezies wirkt (Strube et al., 1989; Hammert et al., 1995; Ziebell et al., 1997; Castrucci et al., 1998; Kyriakis et al., 1998) und einen therapeutischen Effekt bei der Behandlung von Katzen nach Infektion mit dem Felinen Leukämievirus aufweist (Hartmann et al., 1999). Diese Beobachtungen resultierten in der Zulassung des aus inaktivierten Orf Viren bestehenden Baypamun (Bayer AG, Leverkusen) als sogenanntem Paramunitäts-induzierenden Wirkstoff. Der Mechanismus dieser Paramunität, die auch von anderen attenuierten Pockenviren vermittelt werden kann (Mayr, 2001a), ist nur unvollständig bekannt. Eine mögliche Erklärung bietet die Superantigen-ähnliche Stimulierung der Proliferation von porcinen T-Helferzellen *in vitro* (Fachinger et al., 2000) und die damit

verbundene erhöhte Sekretion von Cytokinen, die auch für mononukleäre Zellen des peripheren Bluts anderer Spezies gezeigt wurde (Büttner et al., 1995).

### 1.7 PPV als virale Vektoren

Unter den viralen Vektoren zur Bekämpfung von infektiösen Erkrankungen oder Tumoren gilt den Pockenviren große Beachtung (Perkus et al., 1995; Paoletti, 1996; Moss, 1996b; Bonnet et al., 2000; Hu et al., 2001). Die erfolgreiche Anwendung von Vaccinia Virus als Impfstoff gegen die Pockeninfektion beim Menschen führte dazu, daß insbesondere die Wirksamkeit von VACV als Vakzinevektor in verschiedenen Modellsystemen erprobt wurde (Moss, 1991; Cox et al., 1992; Flexner & Moss, 1996). Aufgrund des breiten Wirtsspektrums von VACV und des vereinzelt Auftretens von schweren Nebenwirkungen der Pockenimpfung beim Menschen (Lane et al., 1969; Gurvich, 1992) wird dessen Nutzung als Vektor zur Impfstoffentwicklung oder Gentherapie allerdings kritisch gesehen (Wiktor et al. 1988). Als Folge davon konzentrierten sich weitere Arbeiten auf die Entwicklung von Vektoren, die auf hochattenuierten, replikationsdefizienten VACV-Stämmen basieren (Tartaglia et al., 1992, 1994; Sutter et al., 1994; Paoletti, 1996; Ramirez et al., 2000a; Ohishi et al., 2000). Eine Alternative hinsichtlich der Impfstoffsicherheit stellt die Nutzung von Pockenviren mit eingeschränktem Wirtsspektrum als Vektoren im natürlichen oder im nicht-permissiven Wirt dar (Esposito et al., 1988; Taylor et al., 1988, 1991; Letellier et al., 1991; Tripathy, 1996; 1999; Romero et al., 1994; van der Leek et al., 1994; Kerr & Jackson, 1995; Hahn et al., 2001; Paoletti et al., 1995; Limbach & Paoletti, 1996; Fries et al., 1996; Hu et al., 1996; Fischer et al., 1997; Pardo et al., 1997). Ziel dieser Entwicklungen ist in allen Fällen eine Minimierung des Risikos der Virusverbreitung im immunisierten Tier und/oder der Übertragung des Virus auf nicht-immunisierte Tiere bzw. andere potentielle Wirtsspezies.

Seit einiger Zeit gelten auch die Parapockenviren, insbesondere Orf Virus, als vielversprechende Kandidaten für die Entwicklung neuartiger Vektorvakzinen. (Robinson & Lyttle, 1992; Haig & Mercer, 1998; Rziha et al., 1999). Wichtig in diesem Zusammenhang sind das enge Wirtsspektrum der Orf Viren, das Ausbleiben einer systemischen Virusausbreitung sowie die schnelle Induktion unspezifischer bzw. paramunischer Immunmechanismen im infizierten Tier. Da die virusspezifische Immunantwort nach einer Primärinfektion die Reinfektion nicht verhindern kann, besteht außerdem die Möglichkeit der

Mehrfachimmunisierung gegen verschiedene Pathogene. Darüberhinaus ist unter dem Gesichtspunkt der Impfstoffsicherheit die potentielle Entwicklung einer spezifischen Immunantwort gegen vektorkodiertes Fremdanigen auch im nicht-permissiven Wirt von Bedeutung. Außerdem eröffnet die Identifizierung von Virulenzgenen und Genen für immunmodulatorische Faktoren die Möglichkeit der weiteren, gezielten Attenuierung der Orf-Vektoren.

Der hochattenuierte, zugelassene ORFV-Impfstamm D1701 (Mayr et al., 1981) wurde erstmals zur Entwicklung eines rekombinanten Orf Virus verwendet (Rziha et al., 1999, 2000). Da bislang im Genom des ORFV D1701 kein Thymidinkinase (Tk) -Gen identifiziert werden konnte (Rziha et al., 1999), war die Selektion rekombinanter Viren mittels Austausch des Tk-Gens durch Fremdgene, wie sie häufig zur Konstruktion anderer Pockenvirus-Rekombinanten durchgeführt wird (Mackett et al., 1984), bei ORFV D1701 nicht möglich. Dagegen führte die Identifizierung des frühen ORFV vegf-e-Gens, sowie dessen Charakterisierung als nicht-essentielles potentielles Virulenzgen, zum Ziel der Entwicklung eines Vektors mittels gezielter vegf-e-Deletion. Die erfolgreiche Insertion des *E. coli lacZ*-Gens im vegf-e Lokus, dessen Expression unter Kontrolle des frühen vegf-e Promotors *in vitro*, sowie die Induktion einer  $\beta$ -Galaktosidase-spezifischen Immunantwort in der Maus als vermutlich nicht-permissiver Wirtsspezies konnte nachgewiesen werden (Rziha et al., 2000). Bislang sind jedoch keine Untersuchungen zur Immunogenität einer ORFV Vektorvakzine gegen ein klinisch relevantes Pathogen im nicht-permissiven Wirt bekannt.

### **1.8 Klassifizierung, Struktur und Genomorganisation des Pseudorabiesvirus**

Das Pseudorabiesvirus (PRV, Suid Herpesvirus 1), ein Mitglied der Familie der Herpesviridae, ist der Erreger der Aujeszkyschen Krankheit (Aujeszký, 1902; Wittmann & Rziha, 1989).

Die Herpesviridae (Roizman 1996) sind 120-300 nm große DNA-Viren, die aufgrund ihrer biologischen Eigenschaften in die drei Subfamilien der  $\alpha$ -,  $\beta$ -, und  $\gamma$ -Herpesvirinae untergliedert werden. Zu den  $\gamma$ -Herpesvirinae, die sich ausschließlich in Lymphozyten vermehren, gehören das Epstein-Barr Virus (EBV) des Menschen, das Herpesvirus saimiri (HVS) bei Affen und das bovine Herpesvirus 4 (BHV-4). Kürzlich wurden mit den porcinen lymphotropen Herpesviren 1-3 neue Mitglieder der  $\gamma$ -Herpesvirinae identifiziert (Ehlers et al.,

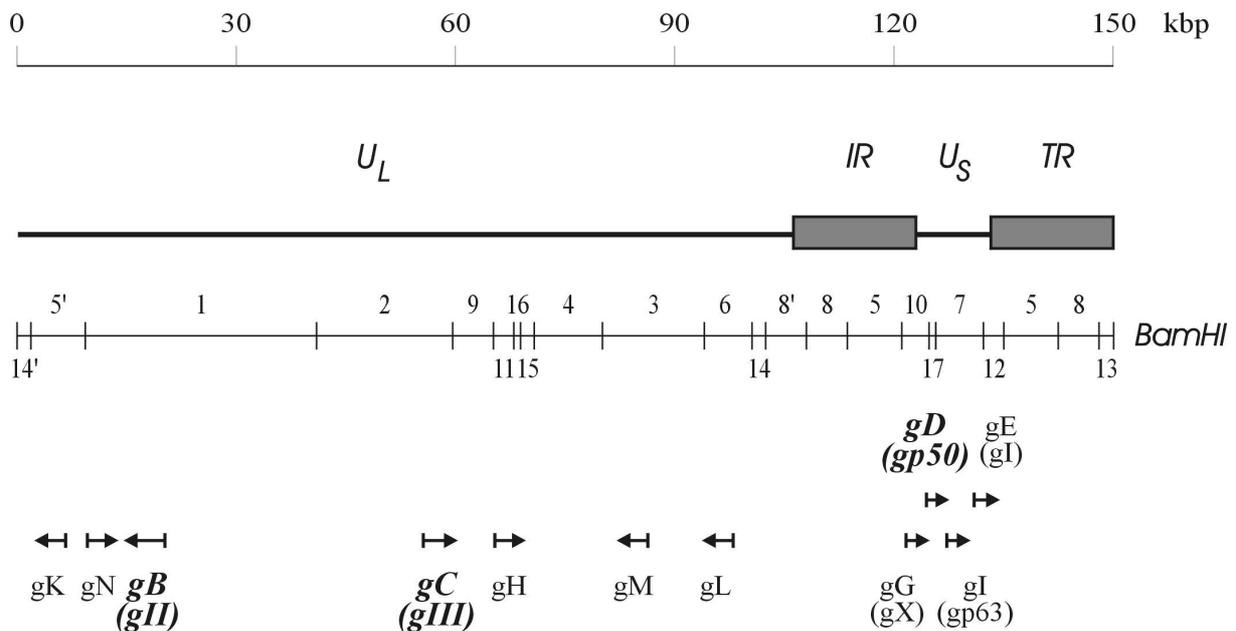
1999, Ulrich et al., 1999, Chmielewicz et al., 2001). Die  $\beta$ -Herpesvirinae, zu denen die humanen und murinen Cytomegalieviren (HCMV, MCMV) gehören, sind durch eine relativ langsame Vermehrung und durch abnorme Vergrößerung der infizierten Zellen gekennzeichnet. Sowohl die  $\beta$ -, als auch die  $\gamma$ -Herpesvirinae besitzen ein relativ enges Wirtsspektrum, wogegen die  $\alpha$ -Herpesvirinae sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* über ein breites Wirtsspektrum verfügen. Die  $\alpha$ -Herpesvirinae sind weiterhin gekennzeichnet durch einen relativ kurzen Vermehrungszyklus und effiziente Lyse der infizierten Zellen. Humanpathogene Vertreter dieser Gruppe sind die Herpes simplex Viren 1 und 2 (HSV-1, HSV-2) und das Varicella-Zoster Virus (VZV). Zu den tierpathogenen Vertretern gehören neben dem Pseudorabiesvirus die bovinen Herpesviren 1 und 2 (BHV-1, BHV-2) sowie das equine Herpesvirus 1 (EHV-1) und das Marek's Disease Virus.

Morphologisch sind sich alle Herpesviren sehr ähnlich. Das Protein-assoziierte Genom bildet eine Core-Struktur, die von einem ca. 100 nm großen, ikosaedrischen Kapsid aus 162 Kapsomeren umschlossen wird. Dieses Nukleokapsid ist von einer Tegumentschicht aus amorphem Proteinmaterial umgeben. Die äußere Virushülle (envelope) wird von einer Lipid-Doppelmembran zellulären Ursprungs gebildet, in die virale Komponenten, vor allem Glykoproteine, eingelagert sind.

Die doppelsträngigen DNA-Genome der Herpesviren sind zwischen 120 und 230 kbp groß und liegen in den Virionen in linearer Form vor. Nach ihrer Genomorganisation können die Herpesviren in 6 Gruppen (A-F) eingeteilt werden, die sich durch Anzahl und Orientierung repetitiver Elemente unterscheiden. In dieser Klassifikation wird PRV wie auch z.B. VZV, BHV-1 und -5, EHV-1, -3 und -4 der Gruppe D zugeordnet. Das Genom der Mitglieder dieser Gruppe besteht aus zwei singulären Sequenzen unterschiedlicher Länge (Unique Long ( $U_L$ ) und Unique Short ( $U_S$ )), wobei die Unique Short-Region von den inversen Repetitionen IR (Internal Repeat) bzw. TR (Terminal Repeat) flankiert wird (Abb. 1.3). Durch Rekombination innerhalb der inversen Repetitionen entstehen bezüglich der Orientierung der  $U_S$  zwei phänotypisch äquivalente isomere Formen des Genoms, die in Viruspopulationen in gleichen Mengen vorliegen (Ben-Porat & Kaplan, 1985). Die Genome der Herpesviren umfassen jeweils 70-80 Gene, die für regulatorische Proteine, Enzyme des Nukleotidstoffwechsels, der DNA-Replikation und der Protein-Prozessierung, sowie für virale Strukturproteine kodieren (Roizman & Sears, 1996).

Von den Strukturkomponenten der PRV-Virionen wurden neben den Kapsidproteinen

(Yamada et al., 1991; Klupp et al., 1992; de Wind et al., 1992; Lenk et al., 1997) bislang 10 Glykoproteine kartiert, welche Bestandteile der viralen Hüllmembran sind (gB, gC, gD, gE, gH, gI, gK, gL, gM, gN). Für die Virusvermehrung *in vitro* sind nur gB, gH, gK und gL essentiell (Mettenleiter, 1994a; Baumeister et al., 1995; Dijkstra et al., 1996; Schmidt et al., 1997).



**Abb. 1.3:** Organisation des ca. 150 kbp großen Genoms des Pseudorabiesvirus (PRV). Schematisch dargestellt ist die Anordnung der singulären Sequenzen Unique Long ( $U_L$ ) und Unique Short ( $U_S$ ) sowie der inversen Repetitionen Internal Repeat (IR) und Terminal Repeat (TR), welche die  $U_S$ -Region flankieren. Desweiteren ist die *Bam*HI-Restriktionskarte des Genoms gezeigt, wobei die Pfeile die Lokalisation der PRV-Glykoproteingene markieren. Die ursprüngliche Bezeichnung einzelner Glykoproteingene ist jeweils in Klammern vermerkt.

Der 155 kDa schwere Glykoprotein gB-Komplex (Mettenleiter et al., 1986; Robbins et al. 1987) stellt ein Hauptglykoprotein der PRV-Virushülle dar (Hampl et al., 1984). Zwei gB-Monomere assoziieren im endoplasmatischen Retikulum zu einem homodimeren Molekül. Beide Monomere werden anschließend durch eine zelluläre Protease im Golgi-Apparat gespalten, wobei die beiden Monomerfragmente über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden bleiben. (Lukács et al., 1985; Whealy et al., 1990; Wölfer et al., 1990). Das Glykoprotein gB ist notwendig für die Viruspenetration und die direkte Ausbreitung des PRV

von Zelle zu Zelle (Rauh & Mettenleiter, 1991; Peeters et al., 1992).

Das 50 kDa schwere Glykoprotein gD, welches O-gekoppelte, jedoch keine N-gekoppelte Glykosylierung aufweist (Wathen & Wathen, 1984; Petrovskis et al., 1986a), scheint in einem zweistufigen Prozeß in Zusammenwirken mit dem Glykoprotein gC an der primären Interaktion zwischen Virus und Zelloberfläche beteiligt zu sein (Mettenleiter, 1994a,b; Spear, 1993; Karger & Mettenleiter 1993). Diese Funktion von gD ist für die virale Infektiösität nicht notwendig. Für die anschließende Viruspenetration durch Fusion der Virushülle mit der cytoplasmatischen Membran der Zielzelle wurde gD zusammen mit dem gH-gL Komplex und gB als essentiell betrachtet. Die Herstellung von gD-unabhängiger Infektiösität für PRV *in vitro* (Schmidt et al., 1997) führte jedoch zur Erkenntnis daß die Funktion von gD bei der Viruspenetration *in vitro* von anderen Viruskomponenten kompensiert werden kann (Karger et al., 1998). *In vivo* erwies sich das gD-negative Virus jedoch als apathogen für das Schwein (Schmidt et al., 2001).

Unter den nicht essentiellen Glykoproteinen spielt das 92 kDa schwere Glykoprotein gC (Robbins et al., 1986a) eine Rolle bei der Virusadsorption (Schreurs et al., 1988; Whealy et al., 1988; Zuckermann et al., 1989), indem es eine primäre, Heparansulfat-abhängige Bindung an die Wirtszelloberfläche vermittelt (Mettenleiter et al., 1990; Ober et al., 2000). Darüberhinaus ist gC, wie auch die Glykoproteine gI und gE an der Virusfreisetzung aus infizierten Zellen beteiligt (Mettenleiter et al., 1987; Schreurs et al., 1988; Zsak et al., 1989).

### **1.9 Pathogenese und Vakzinierung**

Die Symptomatik der Aujeszky'schen Krankheit ist gekennzeichnet von einer Gehirn/Rückenmarksentzündung, die oft von einer Entzündung der oberen Atemwege und der Lunge begleitet wird. Unter natürlichen Bedingungen sind die meisten Säugetierarten durch PRV infizierbar. Lediglich Einhufer und Primaten (einschließlich des Menschen) zeigen weitgehende oder vollständige Resistenz. Die Krankheit verläuft bei den meisten Säugetierarten tödlich, lediglich beim Schwein nimmt die Mortalität mit zunehmendem Alter der infizierten Tiere deutlich ab. Die Infektion mit PRV erfolgt überwiegend durch virushaltige Aerosole. Die primäre Virusvermehrung erfolgt in den Epithelien des oberen Atmungstrakts. Daraufhin werden die Mandeln und die Lunge infiziert. Außerdem befällt das Virus das Zentralnervensystem (ZNS) über Nervenendigungen des trigeminalen und

olfaktorischen Systems, gefolgt von neuronalem Transport in Richtung ZNS. Das Virus breitet sich entweder in freier Form oder ausgehend vom ZNS über das Nervensystem oder durch infizierte Zellen des peripheren Bluts in andere Körperregionen aus (Pensaert & Kluge, 1989; Wittmann & Rziha, 1989; Enquist, 1994; Enquist et al., 1998).

Nach überstandener Primärinfektion schließt sich meist eine latente Phase ohne Krankheitssymptome und Virusausscheidung an. Obwohl in dieser Phase kein infektiöses Virus nachweisbar ist, kann das Genom in Ganglienzellen und Zellen des hämatopoetischen Systems nachgewiesen werden (Sabo & Rajcani, 1976; Gutekunst, 1979, Gutekunst et al., 1980; Beran, 1980; McFarlane, 1986; Rziha et al., 1986; Belak et al., 1989; Wittmann & Rziha, 1989). Durch Stress, Fieber oder Immunsuppression kann latentes Virus reaktiviert werden und teilweise zum erneuten Ausbruch der Krankheit und Virusausscheidung führen (Davies & Beran, 1980; Rziha et al., 1986; Wittmann et al., 1983; Thawley et al., 1984). Aufgrund der verringerten Mortalitätsrate des adulten Schweins und der Fähigkeit des PRV zur Ausbildung einer latenten, reaktivierbaren Infektion, gilt das Schwein als Hauptwirt und -überträger von PRV.

Um die wirtschaftlichen Verluste und die weitere Ausbreitung des PRV möglichst gering zu halten, werden in vielen Ländern Impfprogramme durchgeführt. Seit langem werden hierfür inaktivierte Viren sowie attenuierte Virusstämme (Bartha, 1961; Tatarov, 1968) verwendet. Die reduzierte Virulenz dieser attenuierten Virusstämme ist vor allem auf Mutationen und Deletionen zurückzuführen, die eines oder mehrere der viralen Hüllglykoproteine, sowie die viruskodierte Thymidinkinase betreffen (Mettenleiter et al., 1985; Petrovskis et al., 1986b; Robbins et al., 1989; Lomniczi et al., 1987). In der Folge wurde mit Hilfe gentechnologischer Methoden eine Reihe von Virusmutanten zur Verwendung als Vakzinestämme hergestellt. Ihnen allen gemeinsam ist ein inaktiviertes Thymidinkinase-Gen. Zusätzlich besitzen sie, wie die Mehrzahl der herkömmlichen, attenuierten Virusstämme, Deletionen in einem oder mehreren nicht-essentiellen Hüllglykoproteingenen (Kit et al., 1985, 1987; Marchioli et al., 1987a; Quint et al., 1987; Molitor & Hill, 1988; Moormann et al., 1990; Visser & Lütticken, 1989). Der Verlust einzelner viraler Hüllglykoproteine ermöglicht den Einsatz der meisten Lebendvakzinen als sogenannte Marker-Vakzinen, was eine Unterscheidung zwischen vakzinierten und Wildtypvirus-infizierten Tieren anhand Glykoprotein-spezifischer, serologischer Tests ermöglicht (Van Oirschot et al., 1986; 1990; Kit et al., 1987; Thomsen et al., 1987). Vakzinierung mit attenuierten Lebendvirusstämmen führt größtenteils zum

Ausbleiben klinischer Symptome nach Infektion mit Wildtypvirus. Sie verhindert jedoch nicht die Virusausscheidung, sowie die Etablierung einer latenten, reaktivierbaren Infektion (Van Oirschot et al., 1990). Da die herkömmlichen Lebendvakzinen selbst zur latenten Infektion befähigt sind, stellte sich das Problem möglicher Rekombination zwischen Impfviren untereinander und zwischen Impfvirus und Wildtypvirus, die zur Entstehung neuer, virulenter Virusstämme führen könnte (Henderson et al., 1991; Mengeling et al., 1992; Christensen et al., 1992; Christensen & Lomniczi, 1993; Dangler et al., 1993). Die Entstehung virulenter Virusnachkommen bei Simultanimpfung mit sich komplementierenden, avirulenten Deletionsmutanten (Henderson et al., 1991; Dangler et al., 1993) ist jedoch vermutlich auf phänotypische Komplementation und nicht auf Rekombination zurückzuführen (Kimman et al., 1995a; Visser, 1995; Visser & Rziha, 1995). Da bei Verwendung von Lebendvakzinen das Impfvirus sowohl bei primärer als auch bei reaktivierter, latenter Infektion vom geimpften Tier ausgeschieden werden kann, besteht ein weiteres Problem dieser Impfstoffe in der möglichen, unkontrollierten Ausbreitung des Impfvirus (Christensen et al., 1992). Zwar besteht die Möglichkeit, diesem Problem durch nicht-transmissible Glycoprotein gD-Deletionsmutanten als Markervakzinen zu begegnen (Heffner et al., 1993; Mettenleiter et al., 1994; Peeters et al., 1994). Jedoch eröffnet die *in vitro*-Isolierung einer infektiösen gD-Mutante (Schmidt et al., 1997) die Möglichkeit der Reversion solcher Mutanten auch *in vivo*. Neben inaktivierten oder natürlich bzw. gentechnologisch attenuierten Vakzineviren wird an der Entwicklung sogenannter Subunit-Vakzinen gearbeitet, die nur aus einzelnen Komponenten des Virus, sowie eventuell immunstimulatorischen und -regulatorischen Adjuvantien bestehen. Die Vorteile bestehen zum einen in einer konzentrierten Verabreichung ausschließlich immunrelevanter Determinanten des Erregers. Zum anderen wird das Risiko der Reversion des Vakzinestamms zu einem virulenten Stamm, sowie der unkontrollierten Ausbreitung des Impfvirus, welches bei Verwendung von Lebendvirusvakzinen besteht, ausgeschlossen.

Die Entwicklung von Subunit-Vakzinen setzt die Kenntnis der immundominanten Komponenten des Pseudorabiesvirus voraus. Es ist bekannt, daß monoklonale Antikörper gegen die Glykoproteine gB, gC, gD und gE virusneutralisierende Aktivität *in vitro* zeigen (Hampl et al., 1984; Wathen & Wathen, 1984; Eloit et al., 1988; Marchioli et al., 1988; Coe & Mengeling, 1990; Fuchs et al., 1990). Außerdem wird durch passive Immunisierung von Schweinen mit murinen monoklonalen Antikörpern gegen gB, gC und gD eine Schutzwirkung

gegen die PRV-Belastungsinfektion erreicht (Marchioli et al., 1988; Wathen et al., 1985). Darüberhinaus konnte nachgewiesen werden, daß ein großer Anteil der neutralisierenden Aktivität in Seren von Schweinen und Mäusen nach einer PRV-Infektion gegen gC bzw. gD gerichtet ist (Ben-Porat et al., 1986; Eloit et al., 1988), wobei die gC-spezifischen, neutralisierenden Antikörper spezifisch die Heparin-bindende Domäne des Glykoproteins erkennen (Ober et al., 2000). Desweiteren wurde die PRV-induzierte Entwicklung gB- und gC-spezifischer cytolytischer T-Zellen bzw. Lymphokin-aktivierter cytolytischer Zellen (Zuckermann et al., 1990; Kimman et al., 1996) und Gedächtnis-T-Helferzellen (Kimman et al., 1995b; Vanderpooten et al., unveröffentlicht; Ober et al., 1998) beschrieben. Demzufolge stellen die Glykoproteine gB, gC und gD die hauptimmunogenen Determinanten des PRV sowohl für die humorale als auch für die zelluläre Immunantwort dar.

Übereinstimmend damit gelang in der Maus und im Schwein die protektive Immunisierung mit den rekombinanten, gereinigten Glykoproteinen gB (Nakamura et al., 1993; Xuan et al., 1995), gC (Katayama et al., 1997) bzw. gD (Ishii et al., 1988; Mukamoto et al., 1991; Matsuda-Tsuchida et al. 1992) sowie mit anti-Idiotyp-anti-gD Antikörpern (Tsuda et al., 1992). Vielfach erfolgt die Subunit-Vakzinierung mit immunogenen PRV-Proteinen jedoch durch Integration der dafür kodierenden Gene in das Genom eines Vektors, der in der Lage ist, das inserierte Fremdgen zu exprimieren. In dieser Hinsicht wurden bereits *in vitro* kultivierte, immortalisierte Säugerzellen (Marchioli et al., 1987b), nicht-pathogene *E. coli* (Shiau et al., 2001), Baculovirus (Xuan et al., 1995; Aoki et al., 1999), Adenovirus (Adam et al., 1994; Eloit et al., 1995; Monteil et al., 1997; Hammond et al., 2001), Herpesvirus (Otsuka et al., 1996; Ikeda et al., 2000) und Vacciniavirus (Marchioli et al., 1987b; Riviere et al., 1992; Brockmeier et al., 1993, 1997a,b; Mengeling et al., 1994) als PRV-spezifische Vektorvakzinen auf ihre protektive Kapazität gegen PRV untersucht. Darüberhinaus fand in den vergangenen Jahren auch die Plasmid-DNA-Immunisierung bei der Entwicklung neuer PRV-spezifischer Impfstoffe Anwendung (Gerds et al., 1997, 1999; Chang et al., 1998; Ho et al., 1998; van Rooij et al., 1998, 2000; Somasundaram et al., 1999; Haagmans et al., 1999; Dufour et al., 2000). Auch in den genannten Vektorvakzine-Systemen erwiesen sich die PRV-Glykoproteine gB, gC und gD als Induzenten einer protektiven Immunität sowohl in der Maus als auch im Schwein, wenn auch mit unterschiedlicher Wirksamkeit.

### **1.10 Ziel der Arbeit**

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Herstellung rekombinanter ORFV D1701 Viren, welche die hauptimmunogenen PRV-Glykoproteine gB, gC und gD unter der Kontrolle des ORFV-vegf-e-Promotors exprimieren.

Die ORFV Rekombinanten sollten hinsichtlich Insertion des Fremdgens in das virale Genom und Expression des Fremdgens in permissiven Zellen untersucht werden. Die Prozessierung ORFV-Vektor-kodierter, herpesviraler Glykoproteine sollte anhand weiterer, Glykoprotein gC-spezifischer Rekombinanten mit Deletionen im Bereich der Signalsequenz bzw. der Transmembrandomäne genauer untersucht werden. Von Interesse war darüber hinaus die Untersuchung der Genexpression und Replikation der D1701-Vektoren in Zelllinien der Maus als potentiell nicht-permissiver Wirtsspezies für ORFV.

Für die Untersuchung der protektiven Kapazität der Vektorvakzinen, sowie der induzierten PRV-spezifischen Immunmechanismen wurde dementsprechend die Maus als Wirtsspezies gewählt. Mehrere Studien zur Effizienz herkömmlicher PRV-Impfstoffe bzw. PRV-spezifischer Subunit-Vakzinen in der Maus ermöglichen dabei einen Vergleich zur protektiven Kapazität der ORFV-Vektorvakzine-induzierten Immunantwort.

## 2 Material

### 2.1 Tiere

Als Versuchstiere standen die Inzuchtmäusestämme Balb/c, 129/Sv/Ev und C57Bl6 zur Verfügung. Außerdem wurden Knockout-Mutanten des Stammes 129/Sv/Ev verwendet, die nicht zur Expression eines funktionellen Interferon-gamma-Rezeptors (IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup>) bzw. des Oberflächenmarkers CD4 (CD4<sup>-/-</sup>) befähigt sind. Die IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup>-Maus wurde von Huang et al., (1993) beschrieben. Die Disruption des CD4-Gens erfolgte zuerst im genetischen Hintergrund der C57Bl/6-Maus (Rahemtulla et al., 1991) und wurde später in den Stamm 129/Sv/Ev eingekreuzt (unveröffentlicht). Alle 129/Sv/Ev-Stämme wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Zinkernagel vom Institut für experimentelle Immunologie der Universität Zürich zur Verfügung gestellt und an der BFAV Tübingen weiter gezüchtet. Es wurden Tiere beiden Geschlechts verwendet, wobei das Alter der Tiere zum jeweiligen Versuchsbeginn bei 4 bis 10 Wochen lag. Während der gesamten Versuchsdauer war Futter und Wasser frei verfügbar.

### 2.2 Viren

Zur Herstellung der rekombinanten Vektorvakzinen wurde der Orf Virus (ORFV)-Stamm D1701 verwendet. Das an die Rindernierenzelllinie BK-KL3A adaptierte Virus D1701-B wurde über 39 Passagen an Vero-Zellen adaptiert und anschließend plaquegereinigt (D1701-V; Rziha et al., 2000). D1701-V diente zur Herstellung der vegf-e-negativen Virusmutante D1701-VrV (Rziha et al., 2000).

Die protektive Immunisierung von Mäusen gegen das Pseudorabiesvirus wurde mit dem PRV-Impfstamm Begonia (Nobiporvac Aujeszky®) durchgeführt. Es handelt sich um eine Thymidinkinase-negative, Glykoprotein gE-Deletionsmutante, die auf der Basis des virulenten Wildtypvirusstamms NIA-3 (Baskerville et al., 1973) hergestellt wurde (Visser & Lütticken, 1989).

Der virulente PRV-Stamm NIA-3 wurde für die Belastungs-Infektion immunisierter Mäuse verwendet.

## 2.3 Zelllinien und Zellkulturmedien

### Zelllinien

Zur Kultivierung von ORFV D1701, sowie für die Herstellung und *in vitro*-Charakterisierung der davon abgeleiteten Rekombinanten diente die ORFV-permissive Affennierenzelllinie Vero (ATCC, CCL-81). Die Fibroblasten-Zelllinien NIH/3T3 (ATCC, CRL-1658) bzw. L-929 (ATCC, CCL-1) wurden zur Analyse der Genexpression und Replikation von D1701 in murinen Zellen verwendet.

Zur Produktion eines PRV-gC-spezifischen monoklonalen Antikörpers stand die Hybridomazelllinie A18b (Schreurs, 1988) zur Verfügung.

### Zellkulturmedien und -zusätze

#### BFA-37:

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

2 g NaHCO<sub>3</sub>

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

#### BFA-40:

0,125% Trypsin

0,025% EDTA

0,4% NaCl

0,01% KCl

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

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

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

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

#### FCS:

Steril-filtriertes, Endotoxin-getestetes Fötales Rinderserum (FCS) wurde zur Komplementinaktivierung vor Gebrauch 30 Minuten bei 56°C inaktiviert.

### PBS:

137 mM NaCl  
2,7 mM KCl  
8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
pH 7,2 - 7,4, steril filtrieren

### Penicillin/Streptomycin-Stammlösung:

1 Mio I.E. Penicillin und 1g Streptomycin in 10 ml PBS lösen, steril filtrieren und bei -20°C lagern.  
Kulturmedien wurden mit einer 1:1000-Verdünnung der Antibiotika-Stammlösung versetzt.

### RPMI-Medium:

RPMI 1640-Medium mit L-Glutamin und NaHCO<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich)

## **2.4 Bakterienstämme und Kulturmedien für Bakterien**

### **Bakterienstämme**

Für die Plasmidklonierungen wurde der Bakterienstamm *Escherichia coli* K12 DH5αF' (Invitrogen Life Technologies) verwendet. Die Klonierung eines PCR-Produktes erfolgte mit Hilfe des Stammes *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen).

### **Bakterienmedien**

#### LB-Medium:

10 g Bacto-Trypton  
5 g Bacto-Hefeextrakt  
5 g NaCl  
2 ml 2 N NaOH (pH 7,0-7,2)  
ad 1 l mit H<sub>2</sub>O bidest und autoklavieren.

#### LB/Amp-Medium:

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

## Material

---

### LB/Amp-Platten:

20 g LB Broth Base

10 g Agarose

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

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

### SOB-Medium:

20 g Bacto-Trypton

5 g Bacto-Hefeextrakt

580 mg NaCl

190 mg KCl

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

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

### SOC-Medium:

20 mM Glucose in SOB

### Hogness modified freezing medium (HMFM):

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

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

2 mM Natriumcitrat

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

4,4% Glycerol

nach Herstellung autoklavieren

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

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

## **2.5 Plasmide und Vektoren**

Das Plasmid pdV550 enthält das 3,2 kbp große *HindIII-PstI*-Subfragment des ORFV D1701 *HindIII*-H Fragments mit partiell deletiertem vegf-e Gen. Der vegf-e-spezifische Promotor, sowie das (T)<sub>5</sub>NT-Motiv als Transkriptionsstoppsignal für die frühe vegf-e-mRNA blieben dabei erhalten (Henkel, 1997; Rziha et al., 2000). Multiple Klonierungsstellen (multiple cloning site; mcs) wurden durch Insertion doppelsträngiger Oligonukleotidlinker (s. 2.16) an

den glatten Enden des *EcoRV*-linearisierten pDV550 erhalten und resultierten in den rekombinanten Transferplasmiden pdV-Rec1 bzw. pdV-ATG (Rziha et al., unveröffentlicht). Die Plasmide pdV-Rec1 bzw. pdV-ATG dienten der Herstellung der Transfervektoren zur Entwicklung PRV-spezifischer ORFV Vektorvakzinen.

Das Plasmid gBpcDNA3 wurde mir freundlicherweise von Dr. A. Jestin (AFFSA, Ploufragan, Frankreich) zur Verfügung gestellt. Es enthält die vollständige für das PRV Glykoprotein gB kodierende Sequenz.

Das Plasmid pSPT19 trägt die *mes* des pUC19 Plasmids (Roche Molecular Biochemicals), flankiert von den SP6- und T7-Promotoren. Das Plasmid pBB-30 (Ober, 1993) ist ein Abkömmling von pSPT19 und enthält ein *PstI/BamHI*-Subfragment des PRV *BamHI*-2 Fragments. Das in diesem Subfragment enthaltene *NcoI/BamHI*-Subfragment umfasst das gC Gen mit Ausnahme der für die 19 C-terminalen Aminosäuren kodierenden Sequenz.

Das Plasmid pALM-20, welches mir freundlicherweise von Prof. Dr. L.W. Enquist (Department of Molecular Biology, Princeton University, Princeton, NJ 08544, USA) zur Verfügung gestellt wurde, enthält die vollständige kodierende Sequenz des PRV-Glykoproteingens gC als 1,47 kbp großes *NcoI-Hinfi* Fragment.

Das Plasmid pgDBSII ist ein Abkömmling des Plasmids pBluescript II KS (+/-) (Stratagene) Es enthält das komplette Gen für das PRV-Glykoprotein gD, sowie den N-terminalen Bereich des auf dem Genom stromabwärts von gD lokalisierten gI-Gens als 1,6 kbp großes *HindIII/BamHI*-Fragment. Das Plasmid wurde von Dr. A. Jestin, (AFFSA, Ploufragan, Frankreich) erhalten.

Das Plasmid pORF-50 ist ein Abkömmling des Vektors pTZ18R (Amersham Pharmacia Biotech; nicht mehr erhältlich) und enthält ein 1081 bp großes *SacI*-Subfragment des D1701-*HindIII*-H-Fragments (Cottone, 1996).

Das Plasmid pVU380 enthält das ORFV-F1L-Gen des Stammes NZ-2 als 1,8 kbp großes *BamHI/HpaI* Fragment und wurde mir von Prof. Dr. A.A. Mercer (Virus Research Unit and Centre for Gene Research, Department of Microbiology, University of Otago, Dunedin, New Zealand) zur Verfügung gestellt.

## 2.6 Puffer und Lösungen für DNA

### Acrylamidstammlösung für Sequenzgele (40%):

38% Acrylamid

2% N,N'-Methylen-Bisacrylamid

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

### BSE (Probenauftragspuffer für Nukleinsäuregele):

50% Sucrose

50 mM EDTA (pH 8,0)

0,5% SDS

0,06% Bromphenolblau

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

50 mM Tris-HCl (pH 8,0)

0,1 mM EDTA (pH 8,0)

### Elektrophoresepuffer für DNA-Agarosegele:

(50-fach konzentrierte Stammlösung)

2,0 M Tris

250 mM Natriumacetat

50 mM EDTA

pH 7,8 mit Essigsäure einstellen.

### Ethidiumbromid (Stammlösung):

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

### Glucose-EDTA-Lysozymlösung:

50 mM Glucose

10 mM EDTA (pH 8,0)

25 mM Tris-HCl (pH 8,0)

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

### Isoamylalkohol-Chloroform (IAC):

24 Teile Chloroform

1 Teil Isoamylalkohol

## Material

---

### Ligasepuffer (5X; Invitrogen Life Technologies):

250 mM Tris-HCl (pH 7,6)  
50 mM MgCl<sub>2</sub>  
5 mM DTT  
5 mM ATP  
25 % (w/v) Polyethylenglykol 8000

### NaOH/SDS:

0,2 N NaOH  
1% SDS

### PEG/NaCl:

20% PEG (6000-8000)  
2,5 M NaCl

### PMQN:

500 g Phenol  
0,5 g 8-Hydroxychinolin  
70 ml m-Cresol  
55 ml TEN

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

### Rnase A (10 mg/ml):

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

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

21 g Harnstoff  
7,5 ml Acrylamidstammlösung (40%)  
5 ml 10X TBE  
21,5 ml H<sub>2</sub>O

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

## Material

---

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

10 mM Tris-HCl

1 mM EDTA

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

### TEN:

20 mM Tris-HCl (pH 7,4)

1 mM EDTA

150 mM NaCl

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

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

0,1 N NaOH

0,5% SDS

### TFB:

10 mM K-MES (pH 6,2)

100 mM RbCl<sub>2</sub>

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

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

3 mM Hexamin-Kobalt(III)-Chlorid

### TFB-1:

30 mM Kaliumacetat

50 mM MnCl<sub>2</sub>

100 mM RbCl<sub>2</sub>

10 mM CaCl<sub>2</sub>

15% Glycerol

pH 5,8 einstellen

### TFB-2:

10 mM MOPS (pH 7,0)

75 mM CaCl<sub>2</sub>

10 mM RbCl<sub>2</sub>

15% Glycerol

## Material

---

### Tris-EDTA/Rnase A:

50 mM Tris-HCl (pH 7,5)

10 mM EDTA

100 µg/ml Rnase A

### Tris/SDS:

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

3% SDS

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

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

(10-fach konzentriert):

89 mM Tris

89 mM Borat

2,5 mM EDTA

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

### TEAB (1 M):

mit H<sub>2</sub>O eine 2 M Triethanolaminlösung herstellen.

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

## **2.7 Puffer und Lösungen für RNA**

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

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

### Elektrophoresepuffer für RNA-Formaldehydgel:

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

### Formamid-Dye:

0,1% Bromphenolblau

0,1% XylenCyanol

10 mM EDTA

Die Lösung wird in deionisiertem Formamid gelagert.

## Material

---

### MOPS/EDTA:

(10-fach konzentriert):

0,2 M MOPS

50 mM Natriumacetat

10 mM EDTA

pH 7,0 mit Eisessig einstellen und autoklavieren.

### Probenpuffer für Formaldehydgele (RNA):

200 µl 10X MOPS/EDTA

1 ml Formamid deionisiert (Invitrogen Life Technologies)

354 µl Formaldehyd (37%)

5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml)

100 µl Formamid-Dye

### SSC (20X):

3,0 M NaCl

0,3 M Natriumcitrat

## **2.8 Lösungen für Hybridisierungen**

### Blot-Abkochlösung:

0,1X SSC

0,5% SDS

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

### DNA-Vorhybridisierungs- und Hybridisierungs-Lösung:

0,5% Magermilchpulver

1,5X SSPE

1% SDS

0,5 mg/ml denaturierte Kalbsthymus-DNA

vor dem Gebrauch 50% Formamid (Invitrogen Life Technologies) zugeben.

## Material

---

### RNA-Vorhybridisierungs-Lösung:

0,5 g Trockenmilch

7,5 ml 20X SSPE

0,25 ml DEPC

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

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

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

### RNA-Hybridisierungs-Lösung:

1% Milch

3X SSPE

1% SDS

0,5% DEPC

7% Dextransulfat

vor dem Gebrauch 50-60% deionisiertes Formamid zugeben.

### SSPE (1X):

0,18 M NaCl

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

1 mM EDTA

pH mit 1N NaOH auf 7,4 einstellen.

## **2.9 Lösungen, Puffer und Reagenzien für die PCR**

### dNTP-Mischung:

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

### MgCl<sub>2</sub>:

Die 50 mM Stammlösung wurde bei 65°C für 10 Minuten gelöst und anschließend bei 4°C aufbewahrt.

### PCR-Puffer (10X):

500 mM KCl

100 mM Tris-HCl (pH 8,3)

## 2.10 Lösungen für proteinanalytische Arbeiten

### Coomassie-Blau Färbelösung:

50% Methanol  
10% Essigsäure  
0,25% Coomassie Brilliant Blue R-250  
Unter Rühren lösen, filtrieren.

### PAGE-FIX (Entfärber):

10% Methanol  
10% Essigsäure  
in H<sub>2</sub>O bidest

### Probenpuffer (denaturierend):

10% Sucrose  
125 mM Tris-HCl (pH 6,8)  
2,5% SDS  
0,01% Bromphenolblau  
5% β-Mercaptoethanol  
in H<sub>2</sub>O bidest; bei 4°C aufbewahren.

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

0,13 M Tris-HCl (pH 6,8)  
0,1% SDS

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

0,375 M Tris-HCl (pH 8,8)  
0,1% SDS

### Tris/Tricine/SDS-Laufpuffer (für SDS-PAGE, denaturierend):

(10-fach konzentriert) :  
121 g Tris  
179 g Tricine  
1% SDS  
ad 1000 ml mit H<sub>2</sub>O bidest

## 2.11 Lösungen für immunologische Methoden

### CND-Substratlösung:

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

10 mg Diaminobenzidin (DAB) in 5 ml Methanol lösen

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

### FACS-Puffer:

2% FCS in PBS

### Immunoblot-Transfer-Puffer:

22 mM Tris

193 mM Glycin

20% Methanol

### TBS-T:

50 mM Tris

150 mM NaCl

0,05% Tween 20

## 2.12 Reagenzien

### Chemikalien

### Firma

Acetonitril

Sigma-Aldrich

Acrylamid

Serva

Agarose

Invitrogen Life Technologies

Agarose (niedrig schmelzend, LMT)

Invitrogen Life Technologies

Agarose (SeaPlaque)

FMC Bioproducts

Ampicillin

Invitrogen Life Technologies

Bacto-Tryptone

Difco Laboratories

Bacto-Yeast-Extrakt

Difco Laboratories

Beta-Propiolacton

Serva

Binde-Silane

Amersham Pharmacia Biotech

Bluo-Gal

Invitrogen Life Technologies

Bromphenolblau

Sigma-Aldrich

## Material

---

Bovines Serum Albumin (BSA; nukleasefrei)	Amersham Pharmacia Biotech
4-Chloro-1-Naphtol	Sigma-Aldrich
Coomassie Brilliant Blue G250 und R250	Serva
Diaminobenzidin (DAB)	Sigma-Aldrich
Desoxynukleotidtriphosphate (dNTP)	Roche Molecular Biochemicals
Dextransulfat	Sigma-Aldrich
Diethyläther	Roth
Dithiothreitol (DTT)	Serva
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraessigsäure Dikaliumsalz (EDTA)	Serva
Ethidiumbromid	Serva
FACS™-Lysing Solution (10X)	Becton-Dickinson
Foetales Rinderserum (FCS)	PAN Biotech
Formamid (deionisiert)	Invitrogen Life Technologies
Harnstoff	Roth
Hefe tRNA	Invitrogen Life Technologies
Kalbsthymus-DNA	Sigma-Aldrich
Kationenaustauscher Amberlite MB-1 (20-50)	Serva
Ketamin	Bayer
LB broth base	Invitrogen Life Technologies
Magermilchpulver	Frema Reform
3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck
Paraformaldehyd (PFA)	Fluka
Penicillin	Grünthal
ProSieve® 50 Gel Solution	FMC Bioproducts
Repel-Silane	Amersham Pharmacia Biotech
Roentogen (Entwickler)	Tetenal
Rompun	Bayer
Streptomycin	Heyl
Sucrose	Serva

## Material

---

Superfect Transfection Reagent	Quiagen
Superfix (Schnellfixierer)	Tetenal
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Serva
Tricine	Roth
Tris	Invitrogen Life Technologies
TriZOL-Reagenz (RNA-Isolierung)	Invitrogen Life Technologies
Trypanblau	Sigma-Aldrich
Trypton	Invitrogen Life Technologies
Tween 20	Serva

### 2.13 Nukleinsäure-Längenstandards und Protein-Molekulargewichts-Marker

1 kb DNA Ladder	Invitrogen Life Technologies
RNA Molecular Weight Marker I (0,3-6,9 kb)	Roche Molecular Biochemicals
Kaleidoscope Prestained SDS-PAGE Marker	Bio-Rad Lab.
Prestained Protein Molecular Weight Marker	MBI Fermentas

### 2.14 Enzyme

Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen New England Biolabs, Invitrogen Life Technologies und Roche Molecular Biochemicals bezogen.

Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIP)	Roche Molecular Biochemicals
Lysozym aus Hühnereiweiß	Roche Molecular Biochemicals
Klenow-Polymerase	Stratagene
RNase A	Roche Molecular Biochemicals
RNasin (20-40 U/ul)	Promega
T4 DNA-Ligase (400 U/μl)	New England Biolabs
Taq DNA-Polymerase	Invitrogen Life Technologies

## 2.15 Radioaktive Substanzen

$\alpha$ -<sup>32</sup>P dCTP (3000 Ci/mmol)

ICN Biomedicals

$\alpha$ -<sup>35</sup>S dATP (650 Ci/mmol)

ICN Biomedicals

## 2.16 Oligonukleotide

Bezeichnung	Nukleotidsequenz 5' → 3'	Verwendungszweck
ORF31	GATGTTGCATCCCGTTACCA	Sequenzierung der rekombinanten Transferplasmide aus pDV-Rec1 bzw. pDV-ATG
ORF32	GGTGCGCTACCAATTCGCGC	Sequenzierung der rekombinanten Transferplasmide aus pDV-Rec1 bzw. pDV-ATG
PGC-1	CGCCGCGGATCCGTCGACCA CGACGGCGCTCG	PCR spezifisch für ein internes Fragment des PRV-Glykoprotein gC zur Entwicklung des Transferplasmids pDV-gC2 (Hervorgehoben: <i>Bam</i> HI-Schnittstelle)
PGC-2	CGGGCCCGTCGAATTCCGAC AGCGGGCGGGCGC	PCR spezifisch für ein internes Fragment des PRV-Glykoprotein gC zur Entwicklung des Transferplasmids pDV-gC2 (Hervorgehoben: <i>Eco</i> RI-Schnittstelle)
Rec1-Linker	AAGCTTGATATCTGCAGGATC CAGGTACCGAATT	Doppelsträngiger Oligonukleotidlinker zur Herstellung des Transferplasmids pdV-Rec1 aus pdV550 (Rziha et al., unveröffentlicht)
ATG-Linker	AAGCTTGGATGATATCGGATC CGGTACCTGCAGAATTCTGAT TGACTGA	Doppelsträngiger Oligonukleotidlinker zur Herstellung des Transferplasmids pdV-ATG aus pdV550 (Rziha et al., unveröffentlicht)

### 2.17 Antiseren, Monoklonale Antikörper und Konjugate

Anti-PRV gC, A18b (monoklonal, Maus, Zellkulturüberstand)	BFAV Tübingen
Polyklonales anti-PRV Ziegenserum	BFAV Tübingen
Kaninchen-anti-PRV-gD Serum 016/00 (monospezifisch)	BFAV Insel Riems
Anti ORFV-39 kDa, 4D9 (monoklonal, Maus, Zellkulturüberstand)	BFAV Tübingen
Kaninchen-anti-Ziege IgG (H+L), PO-konjugiert	Dianova
Kaninchen-anti-Maus IgG (H+L), PO-konjugiert	Dianova
Ziege-anti-Kaninchen IgG (H+L), PO-konjugiert	Dianova
F(ab') <sub>2</sub> -Fragment Kaninchen-anti-Maus IgG (H+L), FITC-konjugiert	Dianova
F(ab') <sub>2</sub> -Fragment Kaninchen-anti-Ziege IgG (H+L), FITC-konjugiert	Dianova
Ziege-anti-Maus-IgG1, Biotin-konjugiert	Southern Biotechnol
Ziege-anti-Maus-IgG2a, Biotin-konjugiert	Southern Biotechnol
Avidin, PO-konjugiert (250X-Konzentrat)	BD-Pharmingen
Ratte-anti-Maus-CD4 (L3T4, Klon GK1.5), FITC-konjugiert	BD-Pharmingen
Ratte-anti-Maus-CD8a (Ly-2, Klon 53-6.7), PE-konjugiert	BD-Pharmingen

### 2.18 Kits

ABI Prism™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit	Perkin Elmer Corp.
ABI Prism™ 377 DNA Sequenziersystem	Perkin Elmer Corp.
T7 Sequencing Kit	Amersham Pharmacia Biotech
deaza-T7-Sequencing Kit	Amersham Pharmacia Biotech
JETstar Plasmid Purification Kit	Genomed
Plasmid Isolation Kit (Midi und Maxi)	Qiagen
PCRx Enhancer System	Invitrogen Life Technologies
Topo TA-Cloning Kit	Invitrogen
Qiaex Gel Extraction Kit II	Qiagen
Rediprime DNA Labelling System	Amersham Life Science
CheKit Aujeszky-Test ELISA	Hoechst Roussel Vet
Cytofix/Cytoperm™ Kit	PharMingen
VectorVIP Peroxidase-Substrat Kit	Vector Laboratories

## 2.19 Geräte und Laborhilfsmittel

Bakterienschüttler Model G25	New Brunswick Scientific
Brutschränke für Bakterienkulturen	Heraeus
Brutschränke für die Zellkultur	Forma Scientific
Corex-Glaszentrifugenröhrchen (15 ml und 30 ml)	DuPont-Instruments
Dot-Blotapparatur SRC 96 D	Schleicher & Schuell
Digitalkamera DC120 Zoom	Kodak
Durchflußzytometer FACSCalibur	Becton Dickinson
Einmalspritzen und Kanülen	Braun
Eismaschine AF 20	Scotsman
ELISA-Reader DigiScan	Asys Hitech
Eppendorf-Reaktionsgefäße (0,5; 1,5 ml und 2,0 ml)	Eppendorf
Feinwaagen M160 / M80 und SM1000	Sauter
Folienschweißgerät C400	Joisten und Kettenbaum
Gewebekulturflaschen	Greiner
Gießapparatur für Macromould Sequenzgele 2010-100	Amersham Pharmacia Biotech
Horizontale Gelelektrophoresesysteme	Invitrogen Life Technologies
Hybond-N <sup>+</sup> Nylonmembran	Amersham Pharmacia Biotech
Hybridisierbrutschränke	Bachofer
Kühlwasserbad Frigomix 1495 mit Thermomix 1441	Braun
Land Camera MP-4	Polaroid
Magnetrührer	IKA Combimag
Makro- und Mikrotiterplatten	Greiner
Mikropipetten, verstellbar	Gilson; Abimed; Eppendorf
Mikrowellenherd Micromat	AEG
Neubauer Zählkammer	Brandt
Nitrocellulosemembran BA-S 85 (reinforced)	Schleicher & Schuell
Nylonmembran Hybond-N <sup>+</sup>	Amersham Life Science
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Costar
pH-Meßgerät pH 521	WTW
Pipettierhilfe Acuboy	Tecnomara

## Material

---

Polaroidfilme 665, 667	Polaroid
Polypropylenprobenröhrchen (steril, 15 ml und 50 ml)	Greiner
PVDF (Polyvinyliden-Difluorid)-Membran	Roche
Röntgenfilme Hyperfilm $\beta$ -Max	Amersham Life Science
Röntgenfilme X-OMAT AR; BIOMAX MR	Kodak
Röntgenfilmkassetten mit Verstärkerfolie Curix MR 600	AGFA
Schüttler SM 25	Bachofer
SDS-PAGE Apparatur "Minigel-Twin"	Biometra
Sephadex G50-Säule (Nick <sup>TM</sup> Column)	Amersham Pharmacia Biotech
SepPak C18-Kartuschen	Waters, Millipore-Corporation
Sequenzapparatur Macrochor 2010	Amersham Pharmacia Biotech
Sequenzapparatur ABI-PRISM Modell 377	Perkin Elmer Corporation
Spannungsgerät Modell 200/2.0	Bio-Rad Lab.
Spannungsgerät MACDRIVE 5 (für Sequenzgele)	Amersham Pharmacia Biotech
Spannungsgerät Power Pack P25	Biometra
Spannungsgeräte PTN 23, PTN 2011	Invitrogen Life Technologies
Spektrophotometer DU-64	Beckman
Spektrophotometer Gene Quant	Amersham Pharmacia Biotech
SRC 96 D (Dot-Blotter)	Schleicher & Schuell
Sterilfilter 0.2 $\mu$ m und 0,45 $\mu$ m	Schleicher & Schuell
Szintillationszähler BF betaszint 8000	Berthold
Thermomixer 5437	Eppendorf
Trans-Blot <sup>TM</sup> -Cell (Elektroblotkammer)	Bio-Rad Lab.
Transilluminator 254 nm	Biometra
Transilluminator 366 nm	Bachofer
TRIO-Thermoblock <sup>TM</sup>	Biometra
Ultraschallgerät Cell Disruptor B 15	Branson
Umkehrmikroskop Diavert	Leitz
UV-Crosslinker Stratalinker <sup>TM</sup> 1800	Stratagene
Vakuumofen	Heraeus
Vakuumzentrifuge	Savant

## Material

---

Vortex	Scientific Industries
Wasserbäder / Schüttelwasserbäder	Köttermann
Whatman-Blottingpapier	Schleicher & Schuell
Zentrifuge J2-21 (Rotoren JA-10, -14 und -17)	Beckman
Zentrifuge 5415C, 5417R	Eppendorf
Z-Gel 1,1 ml Probengefäße	Sarstedt AG

### **3 Methoden**

#### **3.1 DNA-Analysen**

##### **3.1.1 Methoden zur Präzipitation von Nukleinsäuren**

###### **Ethanol-fällung mit Ammoniumacetat**

Zur Nukleinsäurelösung wurde ½ Volumen 7,5 M Ammoniumacetat und 3 Volumina 100% Ethanol gegeben, mindestens 30 Minuten oder über Nacht bei -20°C inkubiert und anschließend mindestens 20 Minuten bei 20.000 g und 4°C zentrifugiert. Das Präzipitat wurde ein- bis zweimal mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend bei 37°C getrocknet. DNA wurde im gewünschten Volumen H<sub>2</sub>O bidest oder 0,01 M TE (pH 8,0) resuspendiert, wogegen für RNA DEPC/H<sub>2</sub>O verwendet wurde.

###### **Ethanol-fällung mit Natriumacetat**

Durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 4,8) und 2-3 Volumina 100% Ethanol zur Nukleinsäurelösung und mindestens 30 Minuten Inkubation bei -20°C (besser über Nacht) konnte die Nukleinsäure gefällt, und anschließend durch 30 minütiges Zentrifugieren bei 20.000 g und 4°C sedimentiert werden. Nach ein- bis zweimal Waschen in 70% Ethanol wurde das Präzipitat getrocknet. Die Natriumacetat-Methode wurde bevorzugt bei der Fällung von RNA eingesetzt. Entsprechend wurde das Präzipitat in DEPC/H<sub>2</sub>O aufgenommen.

###### **Isopropanolfällung**

Alternativ wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 4,8) und 1 Volumen Isopropanol, 30 minütiger Inkubation auf Eis und anschließender Zentrifugation Plasmid-DNA gefällt.

##### **3.1.2 Phenol-Extraktion**

Zur Entfernung von Proteinen aus Nukleinsäurelösungen wurde je ein halbes Volumen PMQN und IAC mit der Nukleinsäurelösung geschüttelt, 5 Minuten auf Eis inkubiert und 5 Minuten bei 20.000 g zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde mit einem Volumen IAC extrahiert, 5 Minuten auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde

einer zweiten IAC-Extraktion unterzogen. Zuletzt wurde die Nukleinsäure aus der wässrigen Phase mit Ethanol gefällt.

### **3.1.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Nukleinsäurelösung wurde 1:100 bis 1:500 in 0,1 ml H<sub>2</sub>O bidest verdünnt. Gegen H<sub>2</sub>O bidest als Referenzwert wurde von diesen Proben die UV-Absorption bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge aufgenommen. Nach folgenden Gleichungen konnte aus der Extinktion bei  $\lambda = 260$  nm ( $OD_{260}$ ) die Konzentration der Nukleinsäurelösung bestimmt werden:

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

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

$$OD_{260} \times 20 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \mu\text{g einzelsträngiger Oligonukleotid-DNA/ml}$$

### **3.1.4 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen**

Die Spaltung von DNA-Doppelsträngen mit bakteriellen Restriktionsendonukleasen an jeweils enzymespezifischen, palindromischen Nukleotidsequenzen erfolgte zur physikalischen Kartierung oder zur Klonierung viraler DNA-Fragmente in Plasmiden. Restriktionsspaltungen wurden in einem Volumen von 10-100  $\mu$ l durchgeführt. Entsprechend den Herstellerangaben wurden für die einzelnen Enzyme Reaktionspuffer mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen verwendet. Die Enzyme wurden in der Regel mit etwa 10-20 Units (U) pro  $\mu$ g DNA eingesetzt. Die Enzymmengen wurden so gewählt, daß das in der Enzymlösung enthaltene Glycerin eine Endkonzentration im Reaktionsansatz von 10% nicht überstieg. Die Inkubationszeit bei enzymespezifischer Reaktionstemperatur betrug 1,5 (Plasmid-DNA) bis 4,5 (pockenvirale genomische DNA) Stunden. Die Reaktion wurde mit 1/10 Volumen 10X BSE gestoppt. Hitzeinaktivierbare Restriktionsenzyme wurden außerdem 10 Minuten bei 65°C inaktiviert.

### **3.1.5 DNA-Agarosegelelektrophorese**

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe wurden horizontale Elektrophoreseapparaturen unterschiedlicher Größe verwendet. Die Agarose-

konzentration der Gele betrug zwischen 0,8% und 2,0%. Eine entsprechende Menge Agarose wurde in Elektrophoresepuffer mit 0,3 µg/ml Ethidiumbromid aufgekocht und nach Abkühlung auf etwa 60°C zu ca 5 mm dicken Gelen gegossen. Nach Polymerisation wurde das Gel mit Elektrophoresepuffer mit identischer Ethidiumbromidkonzentration überschichtet, der Kamm gezogen und die mit 1/10 Volumen 10X BSE-versetzten DNA-Proben aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte während 0,5-24 Stunden bei 20-100 Volt. Bei mehrstündigen Läufen wurde der Puffer umgewälzt. Anschließend wurden die Gele unter kurzwelligem UV-Licht ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) mit einer Polaroidkamera mit Orange-Filter photographiert. Anhand eines Größenmarkers konnten die Größen unbekannter DNA-Fragmente über eine halblogarithmische Eichgerade bestimmt werden. Sofern die DNA-Fragmente zur Klonierung aus dem Gel ausgeschnitten werden sollten, wurden die Gele nur langwelligem UV-Licht ( $\lambda = 366 \text{ nm}$ ) ausgesetzt, um DNA-Strangbrüche zu vermeiden.

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

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

Die DNA-Fragmente wurden in einprozentigen low melting temperature (LMT) Agarosegelen wie oben beschrieben aufgetrennt. Das gewünschte Fragment wurde unter langwelligem UV-Licht ( $\lambda = 366 \text{ nm}$ ) ausgeschnitten und mit 3 µl H<sub>2</sub>O bidest pro Milligramm Gel bei 65°C innerhalb 10-15 Minuten verflüssigt. Die DNA wurde bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### **"Qiaex"-Isolierung von DNA-Fragmenten aus Nicht-LMT-Agarosegelen**

Bei Isolierung von DNA-Fragmenten aus Nicht-LMT-Agarosegelen unter Verwendung des "Qiaex Gel Extraction Kit" wurden entsprechend der Vorschrift des Herstellers (Qiagen) pro 100 mg isolierten Gels 300 µl Puffer QX1 und 10 µl QIAEX-Suspension zugegeben. Die Agarose wurde durch 10-minütiges Erwärmen auf 50°C gelöst und dabei gleichzeitig die DNA an die Silicagelpartikel der QIAEX-Suspension gebunden. Dabei wird die Löslichkeit der Agarose und die selektive Adsorption von DNA an Silicagelpartikel in der Gegenwart von chaotropen Salzen ausgenutzt. Nach einminütiger Zentrifugation bei 15.000 g erfolgte einmaliges Waschen des Präzipitats mit 500 µl Puffer QX1 zur Entfernung restlicher Gelstücke. Nach erneuter Zentrifugation wurde zweimal mit Waschpuffer PE gewaschen. Das

Präzipitat wurde an der Luft getrocknet und die DNA durch Zugabe von 20 µl H<sub>2</sub>O bei Raumtemperatur von den Silicagelpartikeln eluiert. Nach einminütiger Zentrifugation wurde der DNA-enhaltende Überstand abgenommen und bei -20°C aufbewahrt

### **3.1.7 Southern Transfer (Southern, 1975)**

Die gelelektrophoretisch getrennte DNA wurde vor dem Transfer für 10 Minuten in 0,25 M HCl depurinisiert und anschließend für 20 Minuten in 0,5 N NaOH/1,5 M NaCl denaturiert. Als Transfer-Puffer diente 0,25 N NaOH/1,5 M NaCl. Durch Diffusion des Puffers durch untergelegtes Whatman-Blottingpapier wurde die DNA aus dem Agarosegel auf die aufliegende Nylonmembran übertragen. Auf der Membran aufgelegte Whatman-Blottingpapiere, mehrere Lagen von Zellstoff-Papier und ein Gewicht verstärkten den Diffusionseffekt. Nach 8-12 Stunden wurde die Nylonmembran für 5 Minuten in 2X SSC neutralisiert und die DNA im UV-Stratalinker mit UV-Licht (0,12 Joule) kovalent an die Membran gebunden. Anschließend wurde die Membran für 2 Stunden bei 80°C im Vakuumofen gebacken und trocken aufbewahrt.

### **3.1.8 Klonierung von DNA-Fragmenten**

#### **Phosphatasebehandlung der Vektor-DNA (CIP-Behandlung)**

Bei der Klonierung viraler DNA-Fragmente in Plasmidvektoren war darauf zu achten, daß die entstehenden Enden der zu fusionierenden Partner kompatibel waren. Um eine Rezirkularisierung des Vektors zu vermeiden, wurde gegebenenfalls eine CIP (calf intestinal phosphatase)-Behandlung zur Entfernung der 5'-Phosphatreste der Vektor-DNA durchgeführt. Der Restriktionsansatz wurde mit 5X NEB3 Reaktionspuffer (New England Biolabs) und H<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 50 µl gebracht und mit 1 µl CIP (10U/µl) für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung der Phosphatase erfolgte durch Zugabe von 3 µl 0,1 M EDTA und Erhitzen auf 75°C für 10 Minuten. Anschließend wurde mit PMQN und zweimal mit IAC extrahiert, die DNA mit 7,5 M Ammoniumacetat und 100% Ethanol gefällt und das getrocknete Präzipitat in einem geeigneten Volumen 0,01 M TE-Puffer (pH 8,0) resuspendiert.

### **Klenow-Behandlung**

Um nicht-kompatible DNA-Fragmente zu ligieren, wurden zunächst die 5'-Überhänge der DNA aufgefüllt bzw. die 3'-Überhänge abgedaut. Die Auffüllreaktion erfolgte durch die 5'-3'-Polymeraseaktivität, der Abbau durch die 3'-5'-Exonukleaseaktivität des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase I aus *Escherichia coli*. Hierzu wurde die DNA in einem 10 µl Ansatz, welcher 1 µl 10X Klenow-Puffer (Stratagene) und 1 µl Nukleotid-Mix (alle 4 dNTPS, je 2 mM) enthielt, mit 5 U Klenow-Polymerase für 5 Minuten bei 37°C und anschließend für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte während 10 Minuten bei 75°C.

### **Ligation**

Die linearisierte und gegebenenfalls CIP-behandelte Vektor-DNA wurde mit dem isolierten DNA-Fragment in einem molaren Verhältnis von ungefähr 1:5 (Vektor : Insert) ligiert. Zur Kontrolle wurde die Vektor-DNA ohne Insert ligiert. Die DNA-Endkonzentration sollte etwa 5-10 µg/ml betragen. Die Ligation erfolgte in einem Volumen von 20 µl unter Zugabe von 1,5 µl T4-DNA-Ligase (400 U/µl) und 20% 5X Ligasepuffer. Der Ansatz wurde 5 Minuten bei 37°C und anschließend bei 14°C über Nacht inkubiert. Nach Inaktivierung während 10 Minuten bei 65°C wurde der Ligationsansatz direkt zur Transformation eingesetzt oder bei -20°C aufbewahrt.

### **Herstellung kompetenter Bakterien (Hanahan, 1983)**

Als Wirtsbakterien für rekombinante Plasmide wurde der *Escherichia coli*-Stamm K12 DH5αF' verwendet. In 2-3 ml LB-Medium wurde bei 37°C eine Übernachtskultur angezogen. Diese wurde 1:25 in SOB-Medium verdünnt und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4-0,5 bei 37°C inkubiert (ca. 80 Minuten). Die Bakterien wurden 15 Minuten auf Eis gekühlt, 5 Minuten bei 4°C und 3500 g sedimentiert, der Überstand verworfen und das Bakteriensediment in 8 ml TFB-Medium auf Eis resuspendiert. Nach weiteren 15 Minuten auf Eis wurde erneut zentrifugiert, das Bakteriensediment in 2 ml TFB-Medium aufgenommen, 70 µl DMSO zugegeben und 5 Minuten auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 70 µl DTT-Kaliumacetat wurde weitere 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden erneut 70 µl DMSO zugegeben und die auf Eis gekühlten Bakterien sofort zur Transformation eingesetzt. Pro Ansatz wurden 200 µl kompetenter Bakterien verwendet.

### **Herstellung tiefgefrorener kompetenter Bakterien**

Eine frische Übernachtskultur des *Escherichia coli*-Stamm K12 DH5 $\alpha$ F' wurde 1:100 in LB-Medium verdünnt und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4-0,5 inkubiert. Danach wurden die Bakterien 10 Minuten auf Eis gekühlt und anschließend 10 Minuten mit 3.500 g bei 4°C abzentrifugiert. Die weiteren Schritte erfolgten alle auf Eis mit vorgekühlten Lösungen. Das Bakteriensediment wurde in 1/10 des Ausgangsvolumens der Kultur TFB-I resuspendiert, 10 Minuten auf Eis gestellt und erneut zentrifugiert. Nachdem das Bakteriensediment in 4 ml TFB-II aufgenommen worden war, wurden 60  $\mu$ l Portionen sofort bei -70°C eingefroren.

### **Transformation der kompetenten Bakterien**

Vom Ligationsansatz wurden verschiedene Mengen an Gesamt-DNA für die Transformation verwendet (zwischen 5 und 100 ng). Jeweils 200  $\mu$ l kompetenter DH5 $\alpha$ F'-Bakterien wurden mit einem der gewünschten DNA-Menge entsprechenden Volumen des Ligationsansatzes gemischt, wobei 5% des Gesamtvolumens im Transformationsansatz nicht überschritten wurden. Der Ansatz wurde 30 Minuten auf Eis belassen. Es folgte ein Hitzeschock bei 42°C für exakt 2 Minuten. Anschließend wurden auf Eis 800  $\mu$ l SOC-Medium zugegeben und die Bakterien 1 Stunde bei 37°C im Schüttler inkubiert. Unterschiedliche Volumina des Transformationsansatzes wurden auf LB-Platten unter dem Selektionsdruck der Plasmid-abhängigen Antibiotikaresistenz ausgestrichen und bei 37°C für 12 Stunden inkubiert. Als Negativkontrollen wurden nicht-transformierte Bakterien ausgestrichen.

Die Transformation von TOP10-Bakterien zur Vermehrung von Plasmiden mit inserierten PCR-Produkten ist unter 3.1.13 beschrieben.

### **Lagerung von Bakterien**

Bakterienklone sind bei 4°C in Flüssigkultur nur wenige Wochen, auf Agarplatten einige Monate lebensfähig. Zur längerfristigen Aufbewahrung wurden aus frischen Übernachtskulturen 1:20 Verdünnungen in 2 ml LB-Medium unter dem Selektionsdruck der jeweils Plasmid-abhängigen Antibiotikaresistenz für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden bei 3500 g sedimentiert, in 1 ml HMF-Medium resuspendiert und bei -70°C aufbewahrt.

### **3.1.9 Identifizierung rekombinanter Klone**

#### **PEG-Plasmid-Präparation (Hattori und Sakaki, 1986)**

1,5 ml einer Übernachtskultur, welche unter dem Selektionsdruck der jeweils Plasmid-abhängigen Antibiotikaresistenz gewachsen war, wurden 5 Minuten bei 14.000 g abzentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde in 100 µl Glucose-EDTA-Lysozym-Lösung resuspendiert und 5 Minuten bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl von NAOH/SDS wurde der Ansatz 5 Minuten auf Eis gekühlt, mit 150 µl 3 M Kaliumacetat/2 M Essigsäure versetzt und weitere 5 Minuten auf Eis stengelassen. Bei allen Schritten wurde immer wieder vorsichtig gemischt. Durch diese Behandlung wurden die Bakterien lysiert und anschließend Proteine und Membranbestandteile präzipitiert. Nach Zentrifugation bei 14.000 g wurde der Überstand mit einem gleichen Volumen PMQN geschüttelt, 5 Minuten auf Eis gekühlt und erneut zentrifugiert. Die DNA in der wässrigen Phase wurde durch Zugabe von 2 Volumina 100% Ethanol während 10 Minuten bei RT gefällt und anschließend 30 Minuten bei 14.000 g zentrifugiert. Das Präzipitat wurde zweimal mit 70% Ethanol gewaschen. Nach Trocknen bei 37°C wurde das Präzipitat in 50 µl 0,01 M TE (pH 8,0) resuspendiert und anschließend mit 10 µg/ml RNaseA für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 30 µl PEG/NaCl wurde die DNA für eine Stunde auf Eis präzipitiert. Nach 5 Minuten Zentrifugation wurde das Präzipitat zweimal mit 300 µl 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 15 µl 0,01 M TE (pH 8,0) aufgenommen. Aufgrund der guten Qualität der PEG-isolierten Plasmid-DNA, konnte diese zur Sequenzierung und Klonierung eingesetzt werden.

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

1,5 ml einer Bakterienübernachtskultur, welche unter dem Selektionsdruck der jeweils Plasmid-abhängigen Antibiotikaresistenz gewachsen war, wurden etwa 10 Sekunden bei 14.000 g zentrifugiert und der Überstand bis auf 50-100 µl dekantiert. Das Bakteriensediment wurde im verbleibenden Medium durch Mischen am Vortex resuspendiert und mit 300 µl TENS-Lösung zur Denaturierung genomischer DNA und zellulärer Proteine gemischt. Nach 2-5 Sekunden Mischen am Vortex erfolgte die Zugabe von 150 µl eiskaltem, 3 M Natriumacetat (pH 5,2) zur Ausfällung der Proteine. Die Lösung wurde nochmals geschüttelt und nach kurzer Inkubation auf Eis erneut bei 14.000 g zentrifugiert. Zur Fällung der Plasmid-DNA wurde der Überstand mit dem doppelten Volumen -20°C kaltem 100% Ethanol

versetzt und 5 Minuten bei 4°C und 14.000 g zentrifugiert. Das Präzipitat wurde mit 70% Ethanol gewaschen, bei 37°C getrocknet und in 15 µl H<sub>2</sub>O bidest resuspendiert.

### **Plasmid-Maxipräparation**

Zur Gewinnung größerer Mengen reiner Plasmid-DNA wurde eine PEG-Plasmid-Maxipräparation durchgeführt. Die Methode entspricht der oben beschriebenen Durchführung, jedoch wurden 10 ml Bakterienübernachtskultur eingesetzt. Die Ausbeute an Plasmid-DNA betrug zwischen 20 und 50 µg Plasmid-DNA.

Plasmid-Maxipräparation wurde außerdem mit Hilfe der Plasmid-Präparations-Kits der Firmen Qiagen und Genomed durchgeführt.

### **3.1.10 Aufarbeitung synthetischer Oligonukleotidprimer**

Synthetische Oligonukleotidprimer wurden zur Sequenzierung von Doppelstrang-DNA, sowie zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten über PCR verwendet. Synthetische Oligonukleotide der gewünschten Sequenz wurden von der Firma Invitrogen Life Technologies gebrauchsfertig bezogen und auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Alternativ dazu wurden die Oligonukleotide auch am Oligonukleotidsynthesizer mit freundlicher Unterstützung von Prof. Dr. E. Pfaff (BFAV, Tübingen) hergestellt. In diesem Fall erfolgte die Abspaltung der Oligonukleotide vom Trägerharz in 1 ml 25% Ammoniaklösung während einer Minute bei Raumtemperatur. Anschließend wurde 5 Minuten bei 14.000 g abzentrifugiert und der Überstand zur Abspaltung der Schutzgruppe über Nacht bei 56°C inkubiert. Die Lösung wurde sodann in flüssigem Stickstoff eingefroren und in der Vakuumzentrifuge eingetrocknet. Das Sediment wurde in 100 µl H<sub>2</sub>O bidest resuspendiert, 10 Minuten bei 14.000 g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Die Abtrennung unvollständig synthetisierter Oligonukleotide erfolgte durch Reinigung in einem denaturierenden Polyacrylamidgel (20% PAA/7 M Harnstoff), in einer Sequenzgel-elektrophorese-Apparatur in 1X TBE bei 500 V und 56°C. Nach 30 Minuten Vorlauf des Gels wurde die Oligonukleotid-enthaltende Lösung 1:1 mit deionisiertem Formamid und 1 µl Stopp-Lösung des T7-Sequenzier-Kits (Amersham Pharmacia Biotech) versetzt, für 3 Minuten bei 95°C denaturiert und aufgetragen. Die Trenndauer betrug ca. 90 Minuten. Zur Orientierung diente die Wanderung von Bromphenolblau (entspricht ca. 10

Basen) und Xylencyanol (entspricht ca. 28 Basen), die in der Stopp-Lösung enthalten sind. Nach der Elektrophorese wurde das Gel auf eine mit UV-Fluoreszenzindikator beschichtete Kieselgelplatte gelegt, um die bei  $\lambda = 254$  nm sichtbare Oligonukleotidbande zu isolieren. Die Elution aus dem Gel erfolgte in 1,0 ml 1 M TEAB über Nacht bei 56°C.

Anschließend erfolgte die Reinigung der Oligonukleotide durch "Reversed-Phase-Chromatographie". Hierfür wurden SepPak C18-Kartuschen auf Einwegspritzen mit je 1 ml Acetonitril, 10 mM TEAB und 1 M TEAB vorbehandelt. Dann wurde die DNA-Lösung auf die Kartusche gegeben und mit 20 ml 10 mM TEAB gespült. Die Oligonukleotide wurden mit 3 ml 30% Acetonitril/10mM TEAB eluiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und erneut in der Vakuumzentrifuge eingetrocknet. Das Sediment wurde in 100  $\mu$ l H<sub>2</sub>O bidest resuspendiert und nach photometrischer DNA-Konzentrationsbestimmung bei -20°C gelagert. Unter Berücksichtigung der Verdünnung gilt für ein 20mer Oligonukleotid, daß eine OD<sub>260</sub> von 1,0 einer Konzentration von 5  $\mu$ M entspricht. Primer zur Sequenzierung wurden mit H<sub>2</sub>O bidest auf 5 ng/ $\mu$ l, Primer für die PCR auf 30 ng/ $\mu$ l verdünnt.

### 3.1.11 DNA-Doppelstrang-Sequenzierung

#### Sequenzreaktion

Für die DNA-Doppelstrang-Sequenzierung wurde der T7-Sequenzier-Kit verwendet. Nach der Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977) wird ausgehend von einem Oligonukleotid-Primer einzelsträngige DNA mit Hilfe der T7-Polymerase zum Doppelstrang ergänzt. Dabei wird außer dTTP, dGTP und dCTP  $\alpha$ -<sup>35</sup>S dATP zur Synthese angeboten, was zur radioaktiven Markierung des neusynthetisierten Stranges führt. In vier verschiedenen Teilreaktionen kommt es zum Kettenabbruch durch die Anwesenheit je eines Didesoxynukleotids. In jedem Reaktionsansatz entsteht somit eine Mischung aus unterschiedlich langen Fragmenten, die alle mit dem jeweiligen in der Reaktion vorhandenen Didesoxynukleotid enden. Die Fragmentenden stellen somit das entsprechende Desoxynukleotid der Sequenz dar. Eine Auftrennung der Fragmente erfolgte im Sequenzgel. Um Kompressionen, die durch den hohen G+C-Gehalt des PRV-Genoms bedingt sind, besser auftrennen zu können, wurde zusätzlich der deaza-T7-Sequenzier-Kit verwendet.

Doppelsträngige DNA muß vor der Durchführung einer Sequenzreaktion in einzelsträngige DNA denaturiert werden. Hierzu wurden 2-4  $\mu$ g der zu sequenzierenden DNA mit H<sub>2</sub>O bidest

auf 14 µl aufgefüllt, 2 µl 2 N NaOH und 2 µl 2 mM EDTA (pH 7,4) zur Denaturierung zugegeben und der Ansatz 5 Minuten auf 85°C erhitzt. Dann wurden 2 µl eiskaltes 2 mM Ammoniumacetat (pH 4,6) und 60 µl 100% Ethanol zugegeben und die DNA 15 Minuten auf Eis gefällt. Nach 20 Minuten Zentrifugation bei 4°C und 20.000 g wurde das Sediment einmal mit 70% Ethanol gewaschen, das Präzipitat im Vakuum getrocknet und in 10 µl H<sub>2</sub>O bidest aufgenommen. Zu 10 µl denaturierter DNA wurden 2 µl Primer (5 ng/µl) und 2 µl Primerhybridisierungs-Puffer gegeben und der Ansatz 1 Stunde bei 37°C und 10 bis 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dem Ansatz wurden 3 µl Markierungs-Mix, 2 µl α-<sup>35</sup>S dATP und 2 µl T7-Polymerase (2 U/µl) zugegeben und es folgten 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur. Nach der Kettenverlängerungsreaktion wurden je 4,5 µl des Ansatzes zu je 2,5 µl auf Raumtemperatur vorgewärmter Terminationsmische pipettiert, die neben den 4 dNTPs jeweils ein 2'3'-Dideoxynukleotid enthielten. Nach 5 Minuten Inkubation bei 37°C wurden die Reaktionen mit 5 µl Stop-Lösung beendet und bis zur Elektrophorese bei -20°C aufbewahrt.

### **Sequenzgele**

Zur Auftrennung der Sequenzreaktionen wurden 6% Polyacrylamid/7 M Harnstoff-Gele verwendet. Die Gele wurden in Schräglage zwischen eine Thermostatisierplatte und eine Ohrenplatte gegossen. Die Ohrenplatte, die als Gelträgerplatte fungierte, wurde vor jeder Benutzung zweimal mit 5 ml einer Lösung aus 10 ml 100% Ethanol, 260 µl 10% Essigsäure und 30 µl Binde-Silane beschichtet und danach mit 100% Ethanol poliert. Zwischen der Beschichtung der Gelträgerplatte und dem Polyacrylamidgel bilden sich kovalente Bindungen aus. Bei der Thermostatisierplatte war eine Beschichtung nur nach jedem fünften Gebrauch notwendig. Da an ihr Gel nicht haften bleiben durfte, wurde sie zweimal mit 5 ml Repel-Silane behandelt und dann zweimal mit 100% Ethanol poliert. Die Elektrophorese erfolgte in 1X TBE bei 2500 V und 56°C. Die Geltaschen wurden mit einer Einmalspritze sorgfältig gespült, um Luftblasen und Gelreste zu entfernen. Nach 30 Minuten Vorlauf des Gels wurden die Proben aufgetragen, nachdem sie zuvor während 5 Minuten bei 95°C denaturiert worden waren. Die Auftrenndauer richtete sich nach der Länge der zu untersuchenden Sequenz und lag zwischen 90 Minuten und 4 Stunden. Nach dem Lauf wurde das an der Ohrenplatte haftende Gel für 20 Minuten in 10% Essigsäure fixiert, wobei gleichzeitig der Harnstoff

hydrolysiert wurde. Anschließend wurde es für 10 Minuten gewässert und 1 Stunde im Umluftofen bei 80°C getrocknet. Das Gel wurde dann einem Röntgenfilm für 1-3 Tage zur Exposition ausgesetzt. Durch die Autoradiographie konnte die DNA-Sequenz anhand der Signalabfolge in den 4 Spuren gelesen werden.

### **Automatische Sequenzierung**

Analog zur aufgeführten Sequenziermethode wurden Sequenzanalysen unter Verwendung des ABI Prism BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction-Kits und des ABI Prism™ 377 DNA Sequenziersystems mit freundlicher Unterstützung von Berthilde Bauer und Karl-Heinz Adam (BFAV, Tübingen) durchgeführt. Das hier zu Grunde liegende Prinzip ist ebenfalls die Kettenabbruchmethode. Dabei dient eine spezifische Markierung der Didesoxynukleotide mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen zur Zuordnung der Basenabfolge aufgrund deren charakteristischer Emissionsspektren. Es wurden 0,5 µg Plasmid-DNA und je 1 pmol Primer für die Sequenzreaktion eingesetzt. Die Reaktionsbedingungen entsprachen denen des Herstellers.

### **3.1.12 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten**

#### **DNA-Markierung**

Die radioaktive Markierung von DNA, die aus Agarose-Gelen isoliert wurde, erfolgte mit Hilfe des "Rediprime DNA Labelling System". Das Prinzip dieser Methode besteht darin, daß ein Gemisch verschiedener Nonamer-Oligonukleotide an die DNA hybridisiert wird und die dadurch entstehenden DNA-Doppelstrangbereiche in Anwesenheit der Klenow-Polymerase und eines radioaktiv markierten Nukleotids ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P dCTP) verlängert werden (Feinberg & Vogelstein, 1983). Etwa 10-30 ng der zu markierenden DNA, wurden mit H<sub>2</sub>O bidest auf ein Gesamtvolumen von 45 µl gebracht und 10 Minuten im Wasserbad gekocht. Die DNA-Lösung wurde mit dem im Kit portionierten Markierungsmix (enthält dNTPs und Klenow-Polymerase) gemischt und mit 5 µl  $\alpha$ -<sup>32</sup>P dCTP (ca. 50 µCi) versetzt. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 37°C inkubiert und die Reaktion mit 5 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) gestoppt.

### **Abtrennung nicht eingebauter Radionukleotide**

Nicht eingebaute Radionukleotide wurden mit einer Sephadex G50-Säule abgetrennt. Bei dieser Ausschlußchromatographie können kleinere Moleküle in die Poren des Säulenmaterials eindringen und werden bei der Elution zurückgehalten, während größere Moleküle nicht ins Säulenmaterial eindringen können. Die Säule wurde mit 3 ml 0,01 M TE (pH 7,4) äquilibriert und sodann die radioaktive Probe aufgetragen. Mit 400 µl 0,01 M TE (pH 7,4) wurde Eluat 1 hergestellt und verworfen. Mit weiteren 400 µl wurde Eluat 2 gewonnen, das den Großteil der radioaktiven Probe enthält. 2 µl von Eluat 2 wurden im Szintillationszähler zur Bestimmung der spezifischen Aktivität der Probe (cpm/µg DNA) eingesetzt.

### **3.1.13 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die PCR-Amplifikation eines DNA-Fragments erfolgt mit Hilfe zweier Oligonukleotid-Primer, die an Strang bzw. Gegenstrang der DNA hybridisieren, und dem Enzym Taq-Polymerase (aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*). Der in einem Thermocycler durchgeführte Reaktionszyklus unterteilt sich in Denaturierung der Matrizen-DNA, Anlagerung der Primer ("Annealing") und Kettenverlängerung. Die Denaturierung doppelsträngiger DNA erfolgte für 80 Sekunden bei 96°C. Die Annealing-Temperatur ist von der Schmelztemperatur der verwendeten Primer abhängig. Sie errechnet sich für Oligonukleotide bis zu 100 Basen Länge nach folgender Gleichung:

$$T_m = 16,6 \times (\log c[\text{monovalentes Salz}]) + 0,41 (\%G+C) + 81,5 - (675/n)$$

Hierbei entspricht n der Anzahl an Nukleotiden des Primers, das monovalente Salz im Puffer ist das KCl mit einer Konzentration von 50 mM. Die Anlagerung der Primer erfolgte während 90 Sekunden bei optimierter Hybridisierungstemperatur, die Kettenverlängerung wurde in der Regel für 90 Sekunden bei 72°C durchgeführt, wobei die Reaktionsdauer von der Länge des Amplifikationsproduktes abhängt. Die Anzahl der Reaktionszyklen lag bei 25 bis 35. Bei Verwendung von Plasmiden als DNA-Matrize wurde eine Konzentration zwischen 2 und 200 pg/µl gewählt. Die Primerkonzentration (zwischen 0,3 und 1,2 ng/µl beider Primer) und die Primer-Annealingtemperatur wurden in Vorversuchen optimiert. Die Amplifikation erfolgte in einem Volumen von 50 µl unter Anwesenheit von 0,02 mM dNTP-Mix (jedes dNTP 0,02

mM), 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl und 1,5 - 3,0 mM MgCl<sub>2</sub>.

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten mit hohem G+C-Gehalt wurde bei Bedarf durch Zusatz einer optimierten Menge PCRx Enhancer-Lösung (PCRx Enhancer System, Invitrogen Life Technologies) ermöglicht. In diesem Fall wurde das Amplifikationsprotokoll zusätzlich folgendermaßen geändert: Nach 10 Amplifikationszyklen bei einer Primer-Annealingtemperatur von 65°C folgten 15 Zyklen bei 54°C und weitere 10 Zyklen bei 60°C Annealingtemperatur.

Nach dem letzten Amplifikationszyklus wurde die Kettenverlängerung um 10 Minuten bei 72°C ausgedehnt. Sollte das PCR-Produkt zur Klonierung verwendet werden, wurde die Inkubation bei 72°C nach dem letzten Zyklus auf 60 Minuten ausgedehnt. Die Reaktionsansätze wurden bei 4°C bis zur gelelektrophoretischen Analyse oder anderer Verwendung aufbewahrt.

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

Die Klonierung von PCR-Produkten erfolgte mit dem "Topo TA-Cloning Kit". Der im Kit enthaltene Klonierungsvektor besitzt an seinen offenen Enden je einen singulären 3'-Desoxythymidin-Überhang. Dies ermöglicht die Insertion von PCR-Produkten, die aufgrund einer vom amplifizierten DNA-Fragment unabhängigen Aktivität der Taq-Polymerase an ihren 3'-Enden einen Desoxyadenosin-Überhang besitzen.

Zunächst wurde eine PCR unter optimierten Bedingungen für das zu klonierende DNA-Fragment durchgeführt. In einem Agarosegel wurde das amplifizierte DNA-Fragment auf seine Reinheit überprüft. Der Ligationsansatz aus 4 µl H<sub>2</sub>O (steril), 1 µl 10X Ligationspuffer, 3 µl des PCR-Ansatzes, 1 µl pCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO Vektor-DNA und 1 µl T4-Ligase wurde über Nacht bei 14°C inkubiert. Die Transformation wurde nach Anleitung des Herstellers mit kompetenten TOP10-Bakterien durchgeführt. Es handelt sich bei dem Bakterienstamm um eine lacZΔM15-Deletionsmutante, die trotz nicht-exprimierten lac-Repressors (lacI<sup>-</sup>) nicht zur Synthese einer funktionellen β-Galaktosidase befähigt ist. Transformandenklone, die den Vektor pCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO erhalten haben, sind über α-Komplementation mit dem Vektor-kodierten N-terminalen Fragment der β-Galaktosidase in der Lage, das funktionelle Enzym herzustellen. Wird die Gensequenz für das N-terminale Fragment im Vektor durch Insertion eines PCR-Produktes unterbrochen, so ist α-Komplementation nicht mehr möglich. Dies

erlaubt die Selektion rekombinanter Klone auf Bluo-Gal behandelten LB-Amp-Platten. Auf LB-Amp-Platten, die mit 40 µl einer Lösung von 40 mg Bluo-Gal pro ml DMSO behandelt worden waren, wurden 100 µl bzw. 350 µl des Transformationsansatzes aufgetragen. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden mehrere weiße Kolonien sowie eine blaue Kontroll-Kolonie gepickt und in 3 ml LB-Amp-Medium über Nacht bei 37°C angezogen. Anschließend wurde TENS-Plasmidpräparation durchgeführt, die Plasmid-DNA mit *EcoRI* verdaut und in einem Agarosegel aufgetrennt, um die Insertion eines DNA-Fragments der richtigen Größe zu überprüfen. Von einem positiven Klon wurde eine HMF-M-Kultur hergestellt und bei -70°C gelagert.

### **3.1.14 Isolierung von PPV-DNA**

Die Isolierung viraler DNA aus ORFV D1701 erfolgte in Anlehnung an Inoshima et al. (2000). Die Methode wurde ursprünglich für die Isolierung großer Plasmide beschrieben (Kado & Liu, 1981).

Vero-Zellen, die in 150 cm<sup>2</sup> Gewebekulturflaschen zu einer Dichte von ca. 80% herangewachsen waren, wurden mit einer *moi* von 1 infiziert, wobei die Virusadsorption im kleinen Volumen für eine Stunde bei Raumtemperatur in Kulturmedium mit 2% FCS durchgeführt wurde. Nach Zugabe von ausreichend Medium mit 3% FCS wurden die Zellen bis zum Erreichen eines *cpe* von ca. 80% bei 37°C inkubiert (3-4 Tage p.i.), anschließend trypsinisiert und mit Kulturüberstand bei 500 g und 4°C zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 400 µl einer Lösung aus 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM EDTA und 100 µg/ml Rnase A resuspendiert. Die Zellen wurden durch Zugabe von 800 µl einer Lösung aus 50 mM Tris (NaOH ad pH 12,6) und 3% SDS lysiert. Die virale DNA wurde durch mindestens viermalige Extraktion mit 2,4 ml Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) und anschließende Ethanol-fällung der wässrigen Phase isoliert.

## **3.2 RNA-Analysen**

### **3.2.1 Isolierung von Gesamtzell-RNA**

Vero-Zellen wurden nach Erreichen von ca. 80% Konfluenz des Zellrasens im kleinen Volumen mit einer  $MOI$  von 10 infiziert. Die Virusadsorption erfolgte während 60 Minuten bei Raumtemperatur in Medium mit 2% FCS. Anschließend wurden die Zellen mit frischem Medium mit 3% FCS bei 37°C inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit TriZOL-Reagenz lysiert und die Gesamtzell-RNA nach Herstellerangaben isoliert.

Um die Synthese früher ORFV-spezifischer Transkripte in infizierten Zellen zu steigern, wurden die Zellen vor der Infektion für eine Stunde mit Cycloheximid-haltigem Medium (100 µg/ml) behandelt. Nach Virusadsorption in Abwesenheit von Cycloheximid wurden die infizierten Zellen für weitere 8 Stunden in Cycloheximid-haltigem Medium inkubiert und anschließend zur Isolierung der Gesamtzell-RNA mit TriZOL-Reagenz lysiert.

Die Konzentration der RNA wurde anschließend im Photometer bestimmt und auf die gewünschte Endkonzentration in DEPC/H<sub>2</sub>O eingestellt.

### **3.2.2 RNA-Agarosegelelektrophorese**

Einzelsträngige RNA-Moleküle bilden im nativen Zustand Sekundärstrukturen aus, die das Laufverhalten der RNA während der Elektrophorese verändern. Daher muß die RNA vor ihrer Größenauftrennung denaturiert werden. Dies erfolgte durch Zugabe eines fünffachen Volumens formaldehydhaltigen Probenpuffers und 15-minütiges Erhitzen auf 65°C. Die elektrophoretische Auftrennung der RNA erfolgte in 0,8-1,0-prozentigen Agarosegelen. Dazu wurden pro 100 ml Gesamtvolumen 1,0 g Agarose in 87 ml DEPC/H<sub>2</sub>O aufgekocht, auf etwa 60°C abgekühlt und 10 ml 10X MOPS/EDTA sowie 3 ml 37% Formaldehyd zugefügt. Nach 30 minütigem Vorlauf des Gels bei 50 Volt wurden die Proben aufgetragen und bei 80 Volt aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 1X MOPS/EDTA, als Größenmarker der RNA Molecular Weight Marker I (0,3-6,9 kb).

### **3.2.3 Northern-Transfer (Kroczek und Siebert, 1990)**

Der Transfer von RNA aus dem Gel auf eine Nylonmembran erfolgte mit Hilfe von 10X SSC als Transferpuffer, Whatman-Filtern und Zellstofftüchern als Saugmaterial. Durch Auflegen eines Gewichtes konnte so über Nacht die Nukleinsäure auf die Membran transferiert und

anschließend durch UV-Crosslinking auf der Membran fixiert werden. Die Membran wurde für 10 Minuten in 2X SSC bewegt und für 2 Stunden im Vakuumofen bei 80°C gebacken. Bis zur Hybridisierung wurde sie luftdicht aufbewahrt.

### 3.2.4 RNA Dot-Blot

Zur semiquantitativen Bestimmung der Konzentration einer spezifischen mRNA in isolierter Gesamtzell-RNA wurde eine RNA Dot-Blotanalyse durchgeführt. Hierfür wurde die RNA zunächst in der gewünschten Konzentration in einer 10X SSC-Lösung mit 15% Formaldehyd während 15 Minuten bei 65°C denaturiert. Anschließend wurde die RNA stufenweise in 10X SSC mit 15% Formaldehyd auf Eis verdünnt. Die Verdünnungsreihe wurde mittels einer Dot-Blotapparatur im Vakuum auf eine Hybond-N<sup>+</sup> Nylonmembran gesaugt. Nach Fixieren der RNA und Backen der Membran wie in Abschnitt 3.2.3 beschrieben, wurde die Membran bis zur Hybridisierung mit der jeweiligen mRNA-spezifischen Sonde luftdicht aufbewahrt.

## 3.3 Hybridisierungsmethoden

### 3.3.1 Hybridisierung radioaktiv markierter DNA

Sämtliche Hybridisierungen wurden in einem Glasrohr im temperierten Rollerschrank durchgeführt. Vor der Hybridisierung wurde die Nylonmembran 1 Stunde bei 65°C in 0,1X SSC/0,5% SDS vorinkubiert. Danach wurde sie in ein Glasrohr überführt. Bei Southern-Blothybridisierung lag die Hybridisierungstemperatur ca. 25°C unter der mittleren Schmelztemperatur des DNA/DNA-Hybrids, die nach folgender Formel berechnet wurde:

$$T_m = 81,5^{\circ}\text{C} + 16,6 (\log c[\text{Na}^+]) + 0,41 (\% \text{ G+C}) - 0,63 (\% \text{ Formamid})$$

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

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

Für Oligonukleotid-Sonden wird auch die Länge der Sonde berücksichtigt. Man subtrahiert deshalb noch  $600/n$  vom Term, wobei  $n$  der Anzahl der Nukleotide des Oligonukleotids entspricht.

Vorhybridisierungs- und Hybridisierungslösung enthielten bei Southern-Blot hybridisierung in der Regel 50%, bei Northern-Blot hybridisierung 60% deionisiertes Formamid. Mit 5 ml der Vorhybridisierungslösung wurde für mindestens 2 Stunden bei der errechneten Hybridisierungstemperatur vorinkubiert. Bei Northern-Blot hybridisierung wurde für die Hybridisierung die Vorhybridisierungslösung durch 5 ml Hybridisierungslösung ersetzt, die zusätzlich Dextransulfat enthielt. Dextransulfat dient der Erhöhung der Hybridisierungseffizienz. Bei Southern-Blot hybridisierung wurde die Vorhybridisierungslösung auch zur Hybridisierung verwendet. Mindestens  $10^5$  cpm radioaktiv markierter Probe pro ml Hybridisierungslösung wurden für 10 Minuten im kochenden Wasserbad denaturiert. Nach schnellem Abkühlen auf Eis wurde die Hybridisierungslösung mit der radioaktiv markierten Sonde zur Nylonmembran gegeben und über Nacht bei der errechneten Hybridisierungstemperatur inkubiert. Die sowohl in der Vorhybridisierungs- als auch in der Hybridisierungslösung enthaltene denaturierte Kalbsthymus-DNA und Milch dienten zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran. Nach der Hybridisierung wurde nicht oder unspezifisch gebundene Radioaktivität entfernt, indem die Membran zunächst zweimal 20 Minuten im Schüttelwasserbad in 2X SSC/0,1% SDS und anschließend zwei- bis fünfmal 20 Minuten in 0,1X SSC/1% SDS gewaschen wurde, bis keine Radioaktivität mehr in der Waschlösung gemessen werden konnte. Soweit nicht anders erwähnt, wurde eine Temperatur der Waschlösungen von 72°C bei DNA/DNA-Hybriden und 45°C bei DNA/RNA-Hybriden eingehalten. Zuletzt wurde die Membran bei Raumtemperatur in 0,1X SSC gespült.

### **3.3.2 Rehybridisierung von Nylonmembranen**

Durch Behandlung der hybridisierten Southern-Blotmembranen mit 0,4 N NaOH in einem 45°C warmen Wasserbad für 30 Minuten und anschließendem kurzem Aufkochen in Blotabkochlösung konnte die spezifisch gebundene radioaktive Sonde von der Membran abgewaschen werden. Dabei war wichtig, daß die Membran während der vorangegangenen Autoradiographie nicht eingetrocknet war. Durch die milde alkalische Behandlung und nur

kurzzeitiges Erhitzen der Abkochlösung kommt es nicht zum Abwaschen der kovalent an den Nylonfilter gebundenen DNA, so daß die Membran nach Vorbehandlung mit 0,1X SSC/0,5% SDS mit einer neuen Sonde hybridisiert werden konnte. Northern-Blotmembranen wurde dagegen nur einmalig für die Hybridisierung verwendet, da sie nicht effizient abgekocht werden konnten.

### **3.3.3 Autoradiographie**

Nach den Waschschritten wurde die Membran auf einem Whatman-Papier kurz angetrocknet, auf ein trockenes Filterpapier gelegt und in Haushaltsfolie eingewickelt. Unter Rotlicht wurde der Röntgenfilm in einer Filmkassette mit Verstärkerfolie aufgelegt und bei -70°C für 15 Minuten bis 7 Tage, je nach Strahlungsintensität der Membran, exponiert. Vor der Entwicklung wurde die Filmkassette zunächst in der Wärme getrocknet um Schlierenbildung auf dem Film zu vermeiden. Der Film wurde wiederum bei Rotlicht für 50 Sekunden in Roentogen entwickelt. Anschließend wurde kurz gewässert und 2 Minuten in Superfix fixiert. Fixierreste wurden durch Wässern entfernt und der Film an der Luft getrocknet.

### **3.3.4 Densitometrische Analyse von Blothybridisierungen**

Zur quantitativen Beurteilung der Signalintensitäten nach Blothybridisierungen wurde das Autoradiogramm mit der DC120 Zoom-Kamera digitalisiert und anschließend mit Hilfe der 1D-Software (Kodak digital science) densitometrisch ausgewertet.

## **3.4 Proteinanalytische Methoden**

### **3.4.1 Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese**

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte durch eine diskontinuierliche SDS-PAGE. Soweit nicht anders vermerkt, wurden Trenngele mit einer Konzentration von 8% Acrylamid und Sammelgele mit 5% Acrylamid verwendet. Die Proben, bestehend aus Zellysaten in denaturierendem SDS-PAGE Probenpuffer, wurden für 5 Minuten bei 95°C aufgekocht und die Proteine anschließend elektrophoretisch in Tris/Tricine/SDS-Puffer bei 150 V getrennt.

## Methoden

Reagenzien	8% Trenngel	10% Trenngel	12% Trenngel	5% Sammelgel
deionisiertes H <sub>2</sub> O	5,7 ml	5,3 ml	4,9 ml	7,5 ml
ProSieve® 50 Lösung	1,6 ml	2,0 ml	2,4 ml	1,0 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	-
1 M Tris-HCl, pH 6,8	-	-	-	1,3 ml
10% SDS	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
10% APS	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
TEMED	4,0 µl	4,0 µl	4,0 µl	10,0 µl

### 3.4.2 Coomassie-Färbung von Proteinen

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden durch Färben mit Coomassie-Färbelösung sichtbar. Hierfür wurde das Gel 10-20 Minuten in der Färbelösung geschwenkt und dann 2 Stunden in PAGE-FIX entfärbt, wobei die Entfärbelösung mehrmals gewechselt wurde.

### 3.5 DNA- und Protein-Sequenzanalysen

Die Analyse von DNA-Sequenzen und ihr Vergleich mit bekannten Sequenzen aus der Datenbank erfolgte unter Verwendung des Wisconsin Package (Version 9.1) der Genetics Computer Group (GCG), Madison (Wisconsin) vom September 1997.

Für die Vorhersage von Polypeptid-Molekulargewichten wurde die Expert Protein Analysis Software (ExPASy; ([http://www.expasy.ch/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html)) des Schweizer Instituts für Bioinformatik (<http://www.isb-sib.ch/>) verwendet.

Die Vorhersage der Hydrophobizität einer Polypeptidsequenz erfolgte mit Hilfe der Kyte-Doolittle Hydrophathy Plot-Software des FASTA-Package der Universität Virginia ([http://fasta.bioch.virginia.edu/o\\_fasta/grease.htm](http://fasta.bioch.virginia.edu/o_fasta/grease.htm)). Als Fenstergröße zur Ermittlung der mittleren Hydrophobizität einer Peptidsequenz wurde eine Anzahl von 9 Aminosäureresten gewählt.

### **3.6 Immunologische Methoden**

#### **3.6.1 Western-Blotanalyse**

Der Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf PVDF-Membranen erfolgte mittels Elektro-Blot während 1 Stunde bei 100 V (Trans-Blot™-Cell) in Immunoblot-Transfer-Puffer. Anschließend wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen über Nacht in TBS-T/5% Magermilchpulver bei 4°C belassen. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte für 1-2 Stunden in TBS-T/1% Magermilchpulver bei Raumtemperatur. Die Zellkulturüberstände der Hybridome A18b (Schreurs, 1988) bzw. 4D9 (Czerny et al., 1997; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Büttner) wurden dabei 1:5 bzw. 1:50 verdünnt, wogegen das Kaninchenserum 016/00 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Mettenleiter) und das polyklonale PRV-spezifische Ziegenserum in einer Verdünnung von 1:3000 eingesetzt wurden. Nach fünfmaligem Waschen der Membran in TBS-T wurde der jeweils speziesspezifische, Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:2000 in TBS-T/1% Milch zugegeben und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem fünfmaligem Waschen der Membran erfolgte die Färbereaktion mit CND-Substratlösung.

#### **3.6.2 Durchflußzytometrie**

Vero-Zellen in 24-Lochplatten wurden nach Erreichen von ca. 80% Konfluenz des Zellrasens im kleinen Volumen mit einer  $moi$  von 10 infiziert. Die Virusadsorption erfolgte während 60 Minuten bei Raumtemperatur in Medium mit 2% FCS. Anschließend wurden die Zellen mit frischem Medium mit 3% FCS bei 37°C inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit BFA-40 abtrypsiniert, in FACS-Puffer gewaschen und zum Nachweis von Zelloberflächenproteinen in einem Volumen von 100 µl auf Eis für 30 Minuten mit dem jeweiligen Primärantikörper inkubiert. Der monoklonale Antikörper A18b wurde in einer Verdünnung von 1:1 eingesetzt, wogegen das gD-monospezifische Serum 016/00 bzw. das polyklonale, PRV-spezifische Ziegenserum 1:100 verdünnt wurde. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit FACS-Puffer gewaschen und in 100 µl für 30 Minuten auf Eis mit dem FITC-markierten Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:100 inkubiert. Nach erneut dreimaligem Waschen wurden die Zellen durchflußzytometrisch analysiert.

Zum Nachweis intrazellulärer Lokalisation der rekombinant exprimierten Proteine, wurden die infizierten Zellen vor der Inkubation mit dem Primärantikörper zunächst fixiert und permeabilisiert. Hierfür wurde der Cytofix/Cytoperm™-Kit nach Herstellerangaben verwendet. Die weitere Färbung und Analyse erfolgte wie bei nicht-permeabilisierten Zellen. In allen Fällen dienten nicht-markierte Zellen als Negativkontrolle zur Justierung des Zytometers.

Zur durchflußzytometrischen Analyse von Lymphozyten der Maus, wurde das aus dem retroorbitalen Plexus gewonnene Blut (s. 3.13.2) bei 500 g für 5 Minuten zentrifugiert und anschließend in 100 µl FACS-Puffer mit 10mM EDTA resuspendiert. Die Oberflächenantigen-spezifischen, Fluoreszenzfarbstoff-markierten Primärantikörper wurden in einer 1:100-Verdünnung eingesetzt und die Zellen während 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die Zellen zur Lyse der Erythrozyten in 500 µl 1X-FACS™-Lysing Solution resuspendiert und anschließend im Durchflußzytometer analysiert. Wiederum dienten nicht-markierte Zellen zur Justierung des Zytometers.

### **3.6.3 ELISA**

Zur Untersuchung von Mäuseseren auf PRV-spezifische IgG1 und IgG2a Antikörper wurde der CheKit Aujeszký-Test ELISA in modifizierter Form angewandt. In separaten 96-Lochplatten wurden die Mäuseseren beginnend bei einer 1:80 Verdünnung in PBS titriert (log 2). Die mit inaktiviertem PRV beschichteten Testplatten wurden nach Herstellerangaben vorbehandelt und anschließend 100 µl der vorverdünnten Mäuseseren auf die Testplatten übertragen. Nach über Nacht-Inkubation bei 4°C oder 90 Minuten bei 37°C wurden die Platten dreimal mit 1X Waschlösung gewaschen. Die folgenden Antikörper- und Konjugatverdünnungen wurden alle in 1X Waschpuffer angesetzt. Die Platten wurden mit einer 1:5000 Verdünnung biotinylierter anti-Maus-IgG1 bzw. anti-Maus IgG2a Antikörper für 90 Minuten bei 37°C inkubiert (100 µl pro Vertiefung). Nach erneutem Waschen wurde eine 1:2000 Verdünnung des Peroxidase konjugierten Avidin (100 µl pro Vertiefung) zugegeben und für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Zuletzt wurde wiederum dreimal gewaschen und die Färbe- und Stoppreaktion mit den im Testkit mitgelieferten Reagenzien durchgeführt. Der Test wurde im ELISA-Reader mit Hilfe der MikroWin 2000 Software (Mikrotek Laborsysteme) bei einer Wellenlänge von 405 nm und einer Referenzwellenlänge von 492 nm

ausgewertet. Als Referenzwert für die Bestimmung der spezifischen Antikörpertiter diente die durchschnittliche OD der Seren der D1701-VrV-immunisierten Kontrolltiere bei der Ausgangsverdünnung von 1:80. Die Titerangaben repräsentieren die höchste Verdünnung der Testseren, die mindestens doppelt so hohe OD-Werte lieferten wie der Referenzwert.

### **3.6.4 Serumneutralisationstest**

Im Neutralisationstest wird das Virus durch die Bindung spezifischer Antikörper gehindert, in die Wirtszelle einzudringen. Im Komplement-unabhängigen Neutralisationstest wird das verwendete Serum zur Inaktivierung des Komplements zunächst für 30 Minuten bei 56°C inkubiert und somit eine Komplement-vermittelte Inaktivierung des Virus verhindert.

Je 50 µl einer Verdünnungsreihe (log 2) in PBS der hitzeinaktivierten Mäuseseren wurden mit je 50 pfu des PRV Stammes NIA-3 für 90 Minuten bei 37°C inkubiert (Endvolumen = 100 µl). Hierfür wurden 96-Lochplatten mit Flachboden verwendet. Die Verdünnungsreihen aller getesteten Seren wurden in Triplikaten angesetzt, wobei mit einer Verdünnung von 1:20 begonnen wurde. Anschließend wurden ca.  $3,5 \times 10^4$  Vero-Zellen in einem Volumen von 100 µl Kulturmedium mit 10% FCS zugegeben. Nach 3 Tagen wurde der Titer PRV-spezifischer neutralisierender Serumantikörper als die höchste Serumverdünnung festgelegt, bei der in allen drei Replikaten kein cytopathogener Effekt erkennbar war.

## **3.7 Zellkultur**

### **3.7.1 Kultivierung und Lagerung von Zellen**

Vero-Zellen wurden nach Erreichen eines konfluenten Zellrasens mit BFA-40 trypsinisiert, im Verhältnis 1:4 bis 1:8 geteilt und in BFA-37-Kulturmedium, das mit Penicillin, Streptomycin und 5% FCS versetzt war, bei 37°C herangezogen.

Die murinen Fibroblasten-Zelllinien NIH/3T3 bzw. L-929 wurden ebenfalls in BFA-37 mit 5% FCS und Antibiotika kultiviert. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:3 bis 1:5 (NIH/3T3) bzw. 1:4 bis 1:8 (L-929) geteilt. Dabei wurde darauf geachtet, daß die NIH/3T3-Zellen nie bis zum vollständig konfluenten Zellrasen herangewachsen waren.

Zur Lagerung wurden  $10^7$  trypsinisierte Zellen mit 10 ml BFA-37 10 Minuten bei 500 g und 4°C zentrifugiert und das Sediment in 1 ml kaltem BFA-37 mit 10% DMSO und 20% FCS resuspendiert. Die Zellen wurden in diesem Einfriermedium in Gefrier Röhrchen über Nacht

bei  $-70^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt und anschließend in flüssigem Stickstoff bei  $-185^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur Anzucht wurden die tiefgefrorenen Zellen schnell im  $37^{\circ}\text{C}$  warmen Wasserbad aufgetaut und sofort in 25 ml BFA-37 mit 5% FCS aufgenommen und ausgesät.

Die zur Produktion des PRV-gC-spezifischen monoklonalen Antikörpers verwendete Hybridomazelllinie A18b wurde in RPMI 1640-Medium mit 10% FCS bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  kultiviert. Bei einer Konzentration von über  $10^6$  Zellen pro ml wurden die Zellen im Verhältnis 1:10 geteilt und mit frischem Medium versorgt. Der verbleibende Kulturüberstand wurde zur weiteren Verwendung für Western-Blot- oder durchflußzytometrische Analysen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

Zur längerfristigen Lagerung wurden die Hybridomzellen einen Tag vor dem Einfrieren im Verhältnis 1:10 geteilt. Die Zellen wurden dann bei 400 g für 5 Minuten bei  $4^{\circ}\text{C}$  sedimentiert, anschließend in FCS mit 8% DMSO resuspendiert und sofort bei einer Konzentration von  $1-5 \times 10^7$  Zellen pro ml in Gefriereröhrchen in einer Styroporbox auf  $-70^{\circ}\text{C}$  über Nacht abgekühlt. Anschließend wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Bei Bedarf wurden die Zellen schnell im  $37^{\circ}\text{C}$  warmen Wasserbad aufgetaut und in 10 ml Medium mit 10% FCS langsam verdünnt. Durch Sedimentation bei 200 g für 5 Minuten wurde restliches DMSO entfernt. Die Zellen wurden zu  $1-5 \times 10^6$  Zellen pro ml in frischem Medium mit 10% FCS resuspendiert und im  $\text{CO}_2$ -Inkubator kultiviert.

### **3.7.2 Bestimmung der Zellzahl**

10  $\mu\text{l}$  einer Zellsuspension wurden mit 90  $\mu\text{l}$  Trypanblau-Lösung gemischt und die Zellzahl in einer Fuchs-Rosenthal Zählkammer bestimmt. Dazu wurde die Anzahl n an lebenden Zellen pro Diagonale des Großquadrats ausgezählt. Blau gefärbte tote Zellen wurden nicht gezählt. Die Anzahl lebender Zellen pro ml Suspension wurde nach folgender Formel berechnet:

$$n \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 5 \times 10^3 = \text{Zellen/ml.}$$

### 3.8 Virusanzucht und Titerbestimmung

#### 3.8.1 Virusanzucht

Die Anzucht von ORFV D1701 erfolgte auf Vero-Zellen. Der zu 80% konfluente Zellrasen wurde mit einer  $moi$  von 0,1 bis 1,0 im kleinen Volumen infiziert und nach 1 Stunde Virusadsorption wurde BFA-37/5% FCS ergänzt. Bei einem  $cpe$  von 80-90% wurden sowohl Kulturüberstand als auch adhärenente Zellen geerntet und vereinigt. Die Suspension wurde bei 30.000 g und 4°C für 2 Stunden ultrazentrifugiert und das so erhaltene Sediment anschließend durch Ultraschall aufgeschlossen (Sonifier cell disruptor mit 3 Schallstößen von 50% Leistung). Verbliebene Zelltrümmer wurden mittels Zentrifugation für 10 Minuten bei 800 g abgetrennt. Der virushaltige Überstand wurde titriert, portioniert und bei -20°C gelagert.

#### 3.8.2 Virustitration

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

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

$x_0$ : Der positive Exponent der höchsten Verdünnung, bei welcher alle Vertiefungen positiv bezüglich der Ausprägung eines  $cpe$  sind;  $d$ : Dosisabstand der Verdünnungsstufen in Logarithmen (hier: 10);  $n$ : Anzahl der Replikate pro Verdünnungsstufe;  $\sum x_i$ : Summe aller positiven Vertiefungen, ab und einschließlich der Stufe  $x_0$ .

Für die Ein-Schritt-Wachstumskurve (siehe 3.11) wurde in Verdünnungen einer Virussuspension die Anzahl der Plaque-bildenden Einheiten bestimmt, woraus sich die Titerangabe als pfu (plaque forming units) pro ml ergibt.

### 3.9 Virusinaktivierung

Die Inaktivierung von ORFV D1701 erfolgte mittels  $\beta$ -Propiolacton-Behandlung. Bei  $\beta$ -Propiolacton handelt es sich um ein alkylierendes Agens, das nach Reaktion vor allem mit Purinresten die Struktur von Nukleinsäuren verändert. Es kommt zu DNA-Strangbrüchen, Kreuzverbindungen zwischen DNA und Proteinen und zwischen den einzelnen DNA-Strängen einer Doppelhelix. Die Virusstammlösung mit einem Titer von  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml wurde mit 0,08% (v/v)  $\beta$ -Propiolacton versetzt. Während der folgenden Schritte wurde darauf geachtet, daß ein neutraler pH-Wert von ca. 7,5 erhalten wurde. Bei Bedarf wurde mit 10 M NaOH nachtitriert. Zunächst wurde die Virussuspension für 30 Minuten auf Eis gehalten und während dieser Zeit immer wieder kurz geschüttelt. Anschließend wurde für 4 Stunden bei 37°C im Schüttler inkubiert. Zuletzt wurde die Suspension bei 4°C für 48 Stunden stehen gelassen. Dabei bildet sich ein weißes Präzipitat, das durch Zentrifugation bei 1000 g für 15 Minuten sedimentiert wurde. Der Überstand wurde in Portionen bei -70°C aufbewahrt. Um die Inaktivierung zu überprüfen, wurden Vero-Zellen mit 10  $\mu$ l unverdünnter, inaktivierter Virussuspension inokuliert und das Ausbleiben eines cytopathogenen Effekts bis 4 Tage nach der Inokulation überprüft.

### 3.10 Herstellung rekombinanter PPV

#### 3.10.1 Kotransfektion

Zur Herstellung rekombinanter PPV wurden Vero-Zellen mit D1701-VrV infiziert und anschließend mit Plasmid-DNA transfiziert. Das Vorhandensein mindestens 1,5 kbp großer PPV-spezifischer DNA-Fragmente der Plasmid-DNA, welche die zu transferierende DNA-Sequenz flankieren, ermöglicht die homologe Rekombination mit dem Virusgenom. Dies führt zur gerichteten Insertion der Fremd-DNA in das virale Genom.

Zur Transfektion wurde das SuperFect Transfektionsreagenz (Quiagen) verwendet. Hierbei handelt es sich um aktivierte Dendrimere, deren positiv geladene Aminogruppen mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA interagieren. Die resultierenden Komplexe sind positiv geladen, was die Bindung an negativ geladene Oberflächenmoleküle der Zelle ermöglicht. Die Transfektionskomplexe werden durch unspezifische Endozytose aufgenommen. Nach Fusion der Endosomen mit Lysosomen stabilisieren die aktivierten

Dendromere den pH-Wert und verhindern somit den Verdau der DNA durch lysosomale Nukleasen.

Die Zellen wurden in 6-Lochplatten ausgesät und über Nacht zu einer Dichte des Zellrasens von ca. 80% angezogen. Die Infektion der Zellen mit D1701-VrV erfolgte bei einer  $moi$  von 0,1 für 1 Stunde bei 37°C in 500 µl Kulturmedium. Währenddessen wurden zwischen 2 und 4 µg Plasmid-DNA der Konzentration 1 µg/µl mit BFA-37 ohne Antibiotika und ohne Serum auf 100 µl Endvolumen gebracht. Anschließend wurde im Verhältnis zum DNA-Ausgangsvolumen das zwei- bis fünffache Volumen SuperFect Transfektionsreagenz (Quiagen) zugefügt. Die Komplexbildung zwischen Transfektionsreagenz und Plasmid-DNA erfolgte während 10 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Virussuspension vom Zellrasen abgesaugt und durch die mit SuperFect komplexierte DNA ersetzt. Um die Transfektionseffizienz zu begünstigen und ein Austrocknen des Zellrasens zu vermeiden wurden zuletzt 500 µl Kulturmedium mit Antibiotika und 5% FCS zugegeben. Nach 3 Stunden Inkubation bei 37°C wurde die Transfektionslösung entfernt und durch frisches, serumhaltiges Medium ersetzt. Sobald mindestens 80% des Zellrasens einen cpe aufwiesen, wurde der Kulturüberstand sowie verbleibende adhärenente Zellen abgeerntet und durch dreimaliges Frieren bei -70°C aufgeschlossen. Das so erhaltene Lysat wurde bei 4°C aufbewahrt und mittels unten beschriebener Selektionsmethoden auf das Vorhandensein der gewünschten rekombinanten D1701-Stämme untersucht.

### **3.10.2 Negative Selektion auf $\beta$ -Galaktosidase-Expression**

Das Ausgangsvirus D1701-VrV, welches der Herstellung PRV-Glykoproteingen-exprimierender, rekombinanter PPV diente, exprimiert das  $\beta$ -Galaktosidasegen (*lacZ*) von *E. coli* unter Kontrolle des synthetischen Promotors e1P1 (Pfleiderer et al., 1995). Infektion von Vero-Zellen mit D1701-VrV und anschließende Übersichtung des Zellrasens mit Bluo-Gal-haltigem Agarosemedium führt zur Bildung blau gefärbter Plaques. Dagegen erscheinen Plaques, die auf die Vermehrung rekombinanter, *lacZ*-negativer Viren zurückzuführen sind, unter Bluo-Gal-haltigem Agarosemedium weiß.

Je 100 µl einer Verdünnungsreihe (log 10) des Kotransfektionslysats wurden in 6-Lochplatten zusammen mit ca.  $5 \times 10^5$  Vero-Zellen in BFA-37 mit 5% FCS ausgesät. Sobald ein erkennbarer cpe erreicht war (ca. 3 Tage p.i.), wurde zweiprozentige SeaPlaque Agarose

aufgekocht, anschließend auf 37°C im Wasserbad abgekühlt und mit einem identischen Volumen doppelt konzentriertem Minimum Essential Medium ohne Phenolrot-Indikator gemischt. Zuletzt wurde in DMSO gelöstes Bluo-Gal in einer Endkonzentration von 0,3 mg/ml zugefügt und der Zellrasen vorsichtig mit 2 ml des erhaltenen einprozentigen Agarosemediums überschichtet. Die Umsetzung des farblosen Substrats Bluo-Gal in einen blauen Indigofarbstoff durch die Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase erfolgte über Nacht bei 37°C. Die eindeutige Identifizierung rekombinanter, *lacZ*-negativer Nachkommenviren erfolgte mittels Southern-Blothybridisierung. Nicht oder nur schwach gefärbt erscheinende Plaques wurden gepickt und die isolierten Viruspartikel wurden durch Infektion von Vero-Zellen in 24-Lochplatten vermehrt. Je 100  $\mu$ l der erhaltenen Lysate wurden mit Hilfe einer Dot-Blotapparatur im Vakuum auf eine Hybond-N<sup>+</sup> Nylonmembran gesaugt. Nach Denaturierung der Proben mit 0,5 N NaOH und Neutralisierung mit 1 M NH<sub>4</sub>-Acetat wurde die Membran mit 2X SSC gewaschen. Anschließend wurde die DNA wie beschrieben (s. 3.1.7) kovalent an die Membran gebunden und mittels einer Fremdgen-spezifischen, radioaktiv markierten Sonde im Southern-Blot auf das Vorhandensein rekombinanter Virus-DNA untersucht. Die Lysate, die rekombinante Viruspartikel enthielten, wurden erneut einer Blau/Weiß-Selektion mit anschließender Southern-Blothybridisierung unterzogen. Sobald alle Nachkommenviren eines Einzelplaques nachweislich das Fremdgen inseriert hatten wurde diese homogene Virussuspension zu hohen Titern in Vero-Zellen vermehrt, portioniert und zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

### **3.10.3 Positive Selektion auf Fremdgenexpression**

Die positive Selektion rekombinanter PPV erfolgte immunhistochemisch mittels Nachweis der Oberflächenexpression der inserierten PRV-Glycoproteingene in infizierten Zellen.

Die Titration des Kotransfektionslysats erfolgte wie beschrieben (s. 3.10.2). Nach Erreichen eines deutlichen cpe wurde das Kulturmedium durch PBS mit einer 1:500 Verdünnung des polyklonalen Ziegen-anti-PRV Serums ersetzt. Nach 2 Stunden Inkubation bei 37°C wurde der Zellrasen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit einer 1:1000 Verdünnung in PBS des Kaninchen-anti-Ziegen-IgG (H+L)-Peroxidase-Konjugats überschichtet. Nach einer weiteren Stunde Inkubation bei 37°C wurde erneut zweimal gewaschen und das Peroxidase-Substrat des Vector-VIP Kits nach Herstellervorschrift zugegeben. Sobald gefärbte Plaques

mikroskopisch erkennbar waren wurde der Zellrasen mit 1-prozentigem Agarosemedium (s. 3.10.2) vorsichtig überschichtet. Die gefärbten Plaques wurden isoliert, das Virus in Vero-Zellen vermehrt und die resultierenden Lysate erneut immunhistochemisch analysiert. Diese Selektion wurde solange wiederholt bis 100% der Nachkommenviren eines Einzelplaques in der immunhistochemischen Färbung positiv waren. Das rekombinante Virus wurde wie beschrieben vermehrt und gelagert (s. 3.10.2).

### **3.11 Ein-Schritt-Wachstumskurve**

Um die Vermehrung von ORFV D1701 in unterschiedlichen Zelllinien über die Zeit zu quantifizieren wurde eine Ein-Schritt-Wachstumskurve durchgeführt. Nahezu konfluente Zellen in 24-Loch-Platten wurden mit ORFV D1701 bei unterschiedlicher  $moi$  im kleinen Volumen auf Eis infiziert. Nach 1 Stunde (Zeitpunkt  $t_0$ ) wurde das Virusinokulat durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt und anschließend wurde 1 ml vorgewärmtes BFA-37 mit 3% FCS zugegeben. Zu den Zeitpunkten  $t_0$ ,  $t_{24}$ ,  $t_{36}$  und  $t_{48}$  wurden die Kulturüberstände der infizierten Zellen abgenommen, die Zellen durch Trypsin-Behandlung abgelöst und ebenfalls auf ein Volumen von 1 ml mit BFA-37 gebracht. Zellen und Überstände wurden jeweils separat bei  $-70^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Die Überstände wurden anschließend direkt zur Bestimmung des Virustiters verwendet, wogegen die infizierten Zellen zunächst durch dreimaliges Frieren und Tauen aufgeschlossen wurden und anschließend die verbleibenden Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 800 g entfernt wurden. Die Virustiter-Bestimmung erfolgte in diesem Fall als Plaque-bildende Einheiten (pfu) pro ml. Hierfür wurde die Anzahl an Plaques in konfluenten Vero-Zellrasen nach Infektion mit einzelnen Verdünnungsstufen einer Verdünnungsreihe (log 10) der Kulturüberstände bzw. Zellysate gezählt. Zu jedem Zeitwert wurden Kulturüberstände und Zellysate in Triplikaten gewonnen und die Virustiter der einzelnen Proben wurden wiederum in Triplikaten ermittelt.

### **3.12 Elektronenmikroskopische Analyse D1701-infizierter Zellen**

Zur Untersuchung der Morphogenese des ORFV-Stammes D1701 wurden annähernd konfluente Zellrasen mit einer  $moi$  von 10 infiziert. Nach 16 Stunden wurden die Zellen in Glutaraldehyd in einer Endkonzentration von 2,5 % (v/v) fixiert. Anschließend wurden die Zellen abgeschabt und in  $37^{\circ}\text{C}$  warmer, flüssiger Agarose aufgenommen Nach Abkühlen

wurde die Agarose in kleine Blöcke geschnitten, welche anschließend in 1% OsO<sub>4</sub> nachfixiert wurden. Nach Entwässerung in Aceton und Infiltration von Epoxyharz wurden im Ultramikrotom Dünnschnitte mit einer Dicke von nicht mehr als 60 nm angefertigt. Nach Kontrastierung mittels Uranylacetat und Bleicitrat wurden die Schnitte im Elektronenmikroskop analysiert. Diese Arbeiten wurden von Karina Mildner (BFAV Tübingen) durchgeführt.

### **3.13 Tierversuche**

#### **3.13.1 Immunisierung**

Die Versuchstiere wurden kurzzeitig in Diethyläther betäubt und anschließend wurde intramuskulär immunisiert, wobei die Gesamtdosis zu gleichen Teilen auf beide Oberschenkelmuskel verteilt wurde. Es wurden Kanülen mit einem Durchmesser von 0,45 mm (26 G x ½") verwendet. Soweit nicht anders erwähnt, erfolgten die Immunisierungen im Abstand von 14 Tagen.

#### **3.13.2 Blutentnahme**

Die Mäuse wurden mit Hilfe einer Pasteurpipette aus dem Retroorbital-Plexus geblutet. Hierfür wurden die Tiere zunächst kurzzeitig in Diethyläther narkotisiert. Zur Serumgewinnung wurde das Blut direkt in Z-Gel Probengefäße überführt, die einen Gerinnungsaktivator enthalten. Das geronnene Blut wurde durch Zentrifugation der Gefäße bei 6000 g für 2 Minuten abgetrennt. Zur Präparation von Leukozyten für die Durchflußzytometrie wurden mindestens 3 Tropfen Blut in 3 ml FACS-Puffer mit 0,2% NaN<sub>3</sub> und 10 mM EDTA überführt.

Zur Gewinnung größerer Blutmengen wurde den Tieren 300 µl einer Mischung aus 2% Ketamin und 2% Rompun intraperitoneal injiziert. Sobald kein Fußreflex mehr festzustellen war wurde mit einer 1 ml-Spritze und Kanülen mit einem Durchmesser von 0,9 mm (20G x 1 ½") Herzblut entnommen. Anschließend wurde den Tieren außerdem das Genick gebrochen.

### **3.13.3 Passive Immunisierung**

Naiven Empfängertieren wurden unterschiedliche Volumina des Serums von immunisierten Tieren intravenös übertragen. Nach 24 Stunden wurden die Tiere aus dem retroorbitalen Plexus geblutet und das gewonnene Serum auf die erreichte Konzentration PRV-spezifischer Antikörper untersucht.

### **3.13.4 Belastungsinfektion**

Für die letale Belastungsinfektion aktiv bzw. passiv immunisierter Mäuse wurden  $10^3$  pfu des hochvirulenten PRV-Stammes NIA-3 intraperitoneal appliziert. Die Belastungsinfektion aktiv immunisierter Mäuse erfolgte 14 Tage nach der jeweils letzten Immunisierung, wogegen passiv immunisierte Mäuse bereits 24 Stunden nach Serumübertragung infiziert wurden.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Konstruktion der Transfervektoren zur Entwicklung von D1701-Vektorvakzinen

#### Konstruktion des Transfervektors pdVgB

Die vollständige für das PRV Glykoprotein gB kodierende Sequenz wurde als 2874 bp großes *HindIII/EcoRV*-Fragment aus gBpcDNA3 isoliert (Abb. 4.1). Das Transferplasmid pdV-ATG wurde ebenfalls mit *HindIII* und *EcoRV* linearisiert. Die Insertion des gB-Fragments resultierte im rekombinanten Transfervektor pdVgB. Die Translation der gB-spezifischen mRNA kann nur vom gB-spezifischen Translationsinitiationscodon ATG initiiert werden, da die *HindIII/EcoRV*-Spaltung des pdV-ATG zum Verlust des plasmideigenen Startcodons führte.

#### Konstruktion der Transfervektoren pdVgC1 und pdVgC2

Zur Herstellung der rekombinanten Transfervektoren pdVgC1 und pdVgC2 wurde das Plasmid pBB-30 verwendet (Abb. 4.1).

Für pdVgC1 wurde pBB-30 zunächst mit *NcoI* gespalten und die überhängenden Enden anschließend durch die Klenow-Polymerase aufgefüllt. Durch nachfolgende Spaltung des linearisierten Vektors mit *BamHI* konnte ein 1382 bp großes Fragment isoliert und in das mit *EcoRV* und *BamHI* linearisierte Plasmid pdV-Rec1 inseriert werden, womit der Transfervektor pdVgC1 erhalten wurde. Diesem Transfervektor fehlt die kodierende Sequenz für die Aminosäuren 461 bis 479. Dies bedingt eine Deletion der letzten 6 Aminosäuren der Transmembrandomäne, die von den Aminosäuren 443 bis 466 gebildet wird (Solomon et al., 1991). Die Deletion der kodierenden Sequenz für die Aminosäuren 470-479 führt außerdem zum vollständigen Verlust der cytoplasmatischen Domäne des Proteins (Solomon et al., 1990).

Zur Konstruktion von pdVgC2 diente das *NcoI-BamHI*-Fragment des Plasmids pBB-30 als Matrize für eine PRV gC-spezifische PCR mit "mismatch"-Primern. Der Primer PGC1 hybridisiert dabei an die Gegenstrangsequenz des gC Gens von Position 57 bis 88, der Primer PGC2 ist homolog zur Gegenstrangsequenz von Position 1160 bis 1128. Das resultierende gC-spezifische PCR Produkt besitzt aufgrund der Sequenz der "mismatch"-Primer zusätzliche Restriktionsschnittstellen für die Enzyme *BamHI* bzw. *EcoRI* (s. 2.16). Die PCR wurde in

Anwesenheit von je 60 ng beider Primer, 10 ng Matrizen-DNA und 0,5X Enhancer Solution in einem Gesamtvolumen von 50 µl wie beschrieben durchgeführt (s. 3.1.13). Mehrere identische Reaktionen wurden vereint, Phenol-extrahiert und die DNA anschließend Ethanolgefällt. Sowohl das PCR-Produkt als auch das Transferplasmid pdV-ATG wurden mit *Bam*HI und *Eco*RI gespalten. Die Insertion des PCR-Produkts in pdV-ATG resultierte im Transfervektor pdVgC2. Dieser enthält die kodierende Sequenz für ein gC-spezifisches Polypeptid, welches die Aminosäuren 23 bis 408 umfasst. Die Verwendung der "mismatch"-Primer hat Sequenzveränderungen zur Folge, die zu einem Austausch der Aminosäuren 22 (A→D) sowie der Aminosäuren 409 (D→L) und 410 (L→K) im rekombinant exprimierten Protein führen. Dem Transfervektor pdVgC2 fehlen die vollständigen Sequenzabschnitte, die für das Signalpeptid von Position 1 bis 21 (Enquist et al., 1988), für die Transmembrandomäne und für die cytoplasmatische Domäne kodieren.

### **Konstruktion des Transfervektors pdVgC3**

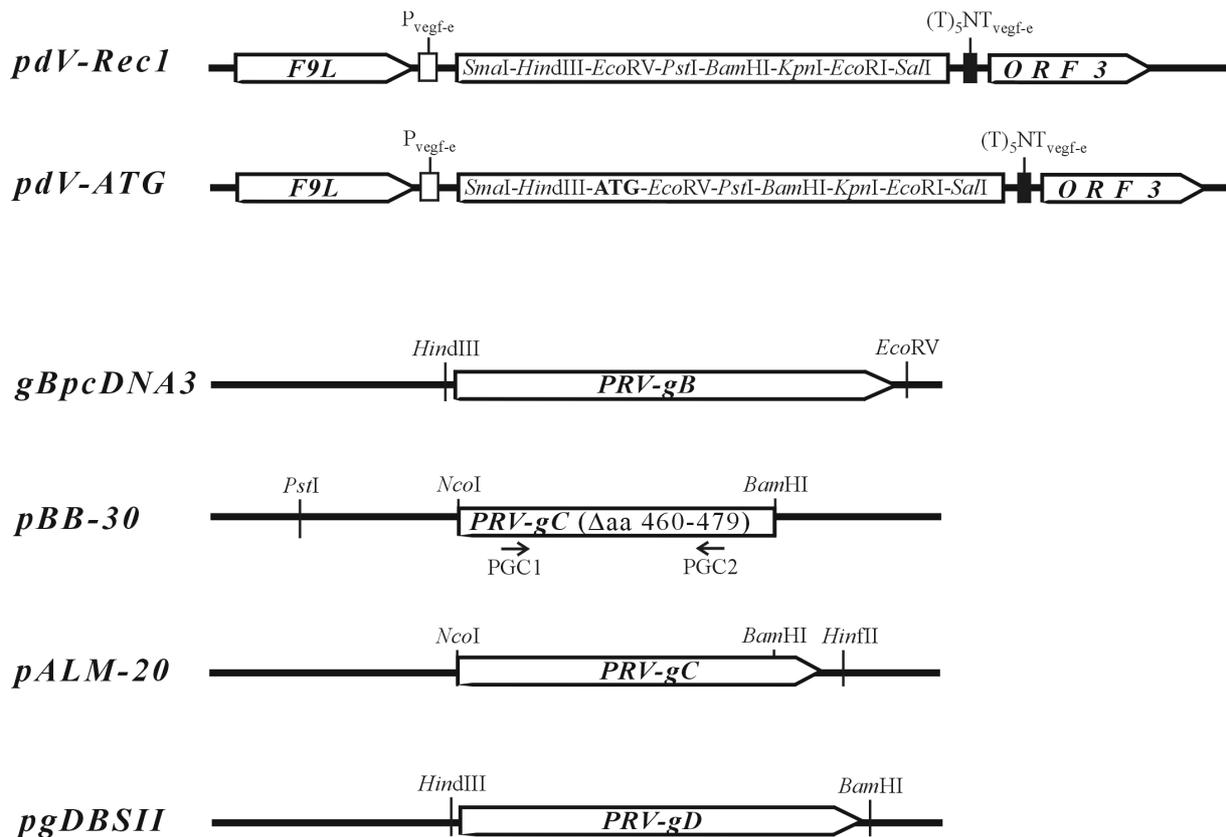
Das 1,47 kbp große *Nco*I-*Hin*fI Fragment des Plasmids pALM-20 enthält die vollständige kodierende Sequenz des PRV-Glykoproteingens gC (Abb. 4.1). Das Fragment wurde isoliert und die überhängenden Enden wurden mit Hilfe der Klenow-Polymerase aufgefüllt. Durch Insertion dieses 1,47 kbp großen Fragments an den glatten Enden des zuvor mit *Eco*RV-linearisierten und anschließend CIP-behandelten Plasmids pdV-Rec1 wurde der rekombinante Transfervektor pdVgC3 erhalten.

### **Konstruktion des Transfervektors pdVgD**

Das für das PRV Glykoprotein gD kodierende Gen wurde als 1613 bp großes *Hind*III-*Bam*HI-Fragment aus dem Plasmid pgDBSII isoliert (Abb. 4.1). Die Insertion dieses Fragments in das zuvor mit *Hind*III und *Bam*HI linearisierte Plasmid pdV-Rec1 führte zum rekombinanten Transfervektor pdVgD.

Die korrekte Insertion der PRV Glykoproteingene bzw. -genfragmente in den beschriebenen Transfervektoren konnte in allen Fällen mittels DNA-Sequenzanalyse bestätigt werden (nicht gezeigt).

## Ergebnisse



**Abb. 4.1:** Schematische Darstellung des relevanten Bereichs der Plasmide pdV-Rec1 und pdV-ATG, welche für die Konstruktion der Transfervektoren zur Entwicklung der ORFV-Rekombinanten verwendet wurden. Die Plasmide enthalten das 3,2 kbp große *HindIII-PstI*-Subfragment des ORFV D1701 *HindIII*-H Fragments mit partiell deletiertem *vegfe*-Gen. Der *vegfe*-spezifische Promotor, sowie das (T)<sub>5</sub>NT-Motiv als Transkriptionsstoppsignal für die frühe *vegfe*-mRNA blieben dabei erhalten (Henkel, 1997; Rziha et al., 2000). Desweiteren sind die Plasmide schematisch dargestellt, deren PRV-Glykoproteingen-spezifische Sequenzen unter Verwendung der eingezeichneten Schnittstellen in die mcs von pdV-Rec1 bzw. pdV-ATG inseriert wurden. Die Plasmide gBpcDNA3, pALM-20 bzw. pgDBSII dienen der Konstruktion der Transfervektoren pdVgB, pdVgC3 bzw. pdVgD, welche die vollständige Sequenz der jeweiligen Glykoproteingene tragen. Die Verwendung der *BamHI*-Schnittstelle von pBB-30 resultierte im Transfervektor pdVgC1, der für ein C-terminal verkürztes Glykoprotein gC kodiert. Die Primer PGC1 und PGC2 dienen der PCR-Amplifikation eines gC-spezifischen Fragments. Die Insertion dieses Fragments in pdV-ATG resultierte im Transfervektor pdVgC2, welcher für ein N- und C-terminal verkürztes Glykoprotein gC kodiert. Genauere Erläuterungen sind dem Text zu entnehmen.

## 4.2 Selektion der rekombinanten ORFV-Vektorvakzinestämme

### Selektion von D1701-VrVgC3 und D1701-VrVgD

Die rekombinanten Transfervektoren pdVgC3 bzw. pdVgD enthalten die vollständige für die Glykoproteine gC bzw. gD kodierende Sequenz. Da beide Glykoproteine über die Transmembrandomäne in PRV-infizierten Zellen in der Zellmembran verankert werden und auch integrale Bestandteile der Hüllmembran des PRV darstellen bestand die Möglichkeit, daß auch die Expression unter Kontrolle des vegf-e-Promotors durch die entsprechenden D1701-Rekombinanten zur membranständigen Lokalisation in infizierten Zellen führt. Deshalb wurde in beiden Fällen die immunhistochemische Analyse als positive Selektion auf Fremdgen-Expression gewählt (s. 3.10.3).

Vero-Zellen wurden mit D1701-VrV infiziert und anschließend mit den rekombinanten Transfervektoren pdVgC3 bzw. pdVgD transfiziert. Die Komplexierung von je 4 µg Plasmid-DNA erfolgte dabei mit jeweils 8 µl SuperFect Transfektionsreagenz. Eine Verdünnungsreihe des Transfektionslysats wurde zur Infektion von Vero-Zellen in 6-Lochplatten verwendet. Die immunhistochemische Färbung ermöglichte in beiden Fällen die Identifizierung von Plaques, die auf eine Infektion von Zellen mit Glykoproteingen-exprimierenden Virusrekombinanten schließen ließen. Durch Isolieren dieser Plaques, Zwischenvermehrung des enthaltenen Virus und erneute immunhistochemische Analyse infizierter Zellen konnten die rekombinanten Viren weiter angereichert werden. Nach dreimaliger Isolierung immunhistochemisch gefärbter Einzelplaques konnte für alle daraus stammenden Nachkommenviren die Fremdgenexpression in infizierten Zellen und damit die Homogenität der Viruspopulation der Plaqueisolate nachgewiesen werden. Zur Kontrolle wurden die Nachkommenviren erneut auf Vero-Zellen vermehrt, und die einzelnen Lysate auf das Vorhandensein Fremdgen-spezifischer DNA durch Southern-Blothybridisierung mittels PRV-gC- bzw. gD-spezifischer Sonden überprüft (s. 3.10.2). Auf diese Weise gelang die Isolierung jeweils einer homogenen Viruspopulation mit nachweislicher Insertion des gC- bzw. gD-Gens im viralen Genom und nachweislicher Expression dieser Gene in infizierten Zellen. Ausgehend von diesen Populationen der rekombinanten ORFV Vektorvakzine-Stämme D1701-VrVgC3 bzw. D1701-VrVgD (im Folgenden bezeichnet als D-gC3 bzw. D-gD) wurden für weitere Experimente hochtitrige Virussuspensionen hergestellt.

### **Selektion von D1701-VrVgC1 und D1701-VrVgC2**

Die rekombinanten Transfervektoren pdVgC1 bzw. pdVgC2 enthalten die für das Glykoprotein gC kodierende Sequenz mit partieller (pdVgC1) bzw. vollständiger (pdVgC2) Deletion des für die Transmembrandomäne kodierenden Bereichs. Da es bei Infektion von Zellen mit PRV-Mutanten, die vergleichbare Deletionen im gC-Gen aufweisen, zum Verlust bzw. zur Beeinträchtigung der membranständigen Lokalisation des abgeleiteten Proteins kommt (Ryan et al., 1989; Solomon et al., 1991), wurde in diesen Fällen die positive Selektion rekombinanter ORFV mittels Immunhistochemie nicht angewandt. Stattdessen wurde mittels negativer Selektion auf Deletion des *lacZ*-Gens im Genom des parentalen D1701-VrV und Substitution durch die jeweiligen gC-spezifischen Fragmente von pdVgC1 bzw. pdVgC2 getestet (s. 3.10.2).

Für die Transfektion D1701-VrV-infizierter Zellen wurden 2 µg Plasmid-DNA der jeweiligen Transfervektoren mit 4 µl SuperFect Transfektionsreagenz komplexiert. Wiederum wurde eine Verdünnungsreihe des Transfektionslysats zur Infektion von Vero-Zellen in 6-Lochplatten verwendet. Im Gegensatz zur immunhistochemischen Analyse wurde bei eindeutiger Plauebildung der Zellrasen sofort mit Bluo-Gal-haltigem Agarosemedium überschichtet und nach Inkubation über Nacht wurden zahlreiche Plaques isoliert, bei denen keine oder vergleichbar schwache Blaufärbung zu erkennen war. Nach Vermehrung des Virus dieser Einzelplaques wurde als Gegenkontrolle mittels Southern-Blothybridisierung auf das Vorhandensein gC-spezifischer DNA im viralen Genom getestet. Da bei positiven Signalen eine Mischung aus parentalem D1701-VrV und rekombinanten, gC-positiven Viren in der Viruspopulation nicht auszuschließen war, wurde die Reinigung des rekombinanten Virus über zwei weitere Blau/Weiß-Selektionsschritte mit anschließender Southern-Blothybridisierung fortgeführt. Auf diese Weise gelang nach jeweils drei aufeinanderfolgenden Plaueinigungen die Isolierung homogener Populationen rekombinanter Viren. Wiederum wurden ausgehend von diesen homogenen Populationen der rekombinanten ORFV-Vektorvakzinen D1701-VrVgC1 bzw. D1701-VrVgC2 (im Folgenden bezeichnet als D-gC1 bzw. D-gC2) hochtitrige Virussuspensionen für weitere Experimente hergestellt.

### **Selektion von D1701-VrVgB**

Das rekombinante Transferplasmid pdVgB enthält die vollständige kodierende Sequenz für das PRV Glykoprotein gB, welches an der Oberfläche PRV-infizierter Zellen lokalisiert ist. Zur Selektion von gB-rekombinanten ORFV D1701-Viren wurden Vero-Zellen nach Infektion mit dem Lysat D1701-VrV-infizierter und pdVgB-kotransfizierter Zellen deshalb zunächst immunhistochemisch hinsichtlich Oberflächen-Expression des Glykoproteins untersucht. Es wurden unterschiedliche Mengen an Plasmid-DNA und unterschiedliche Mengenverhältnisse zwischen Plasmid-DNA und Transfektionsreagenz für die Transfektion getestet. In keinem Fall gelang jedoch die Isolierung einer gB-exprimierenden ORFV-Rekombinante. Auch bei Untersuchung der Transfektionslysate mittels negativer Selektion auf Substitution des *lacZ*-Gens im Genom des parentalen D1701-VrV durch das pdVgB-kodierte gB-Gen konnte im Rahmen dieser Arbeit bislang keine gB-positive Rekombinante identifiziert werden.

### **4.3 Restriktions- und Southern-Blotanalyse der ORFV-Vektorvakzinen**

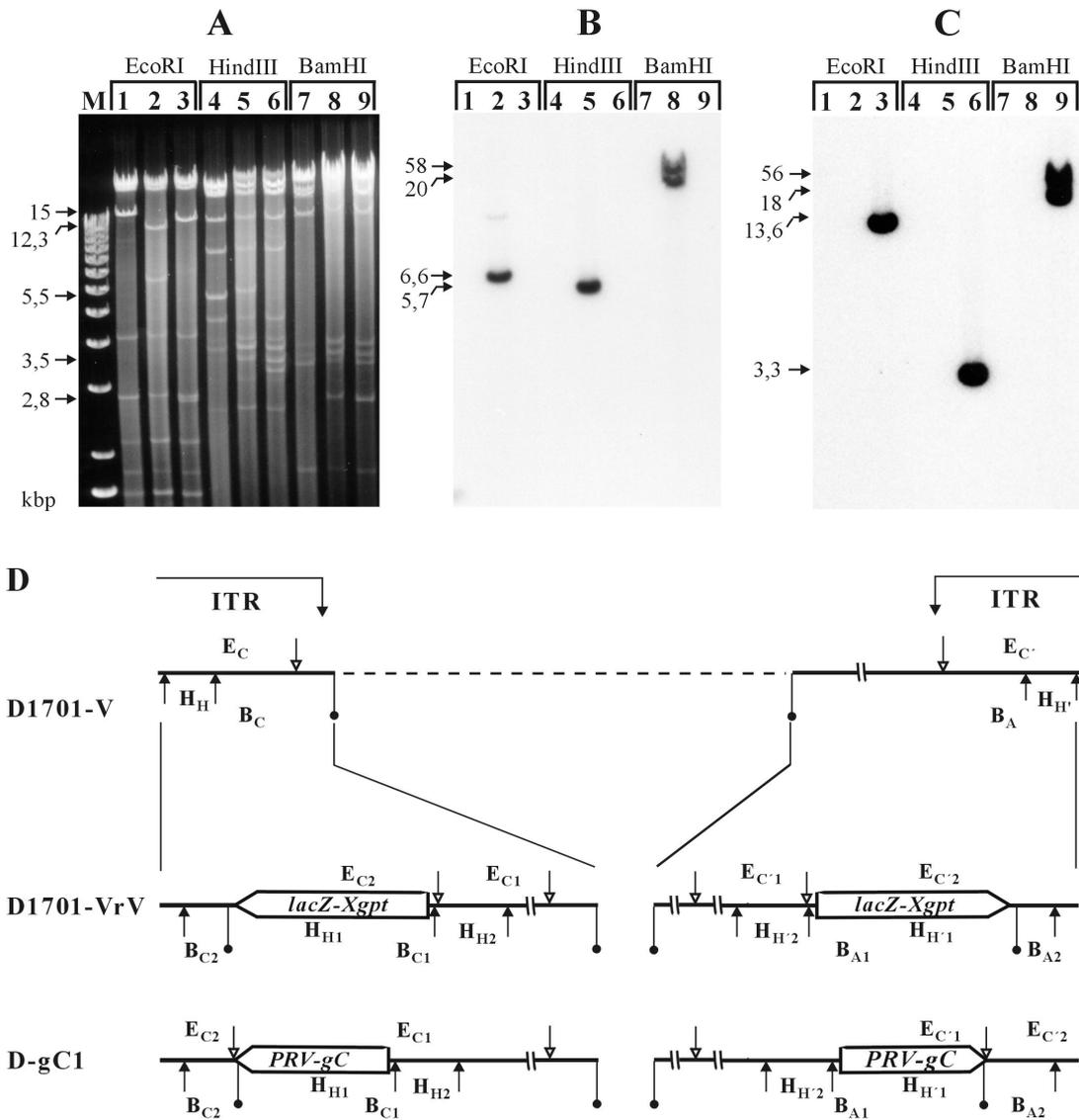
Zur Überprüfung der korrekten Insertion der Fremdgen-spezifischen DNA-Sequenzen in den rekombinanten Vektorvakzinestämmen wurde die virale DNA zunächst mittels Erstellung von Restriktionsendonuklease-Schnittmustern analysiert. Hierfür wurden jeweils 2 bis 4 µg der viralen DNA in einem Volumen von 40 µl mit 100 U der Enzyme *EcoRI*, *HindIII* oder *BamHI* während 4 bis 6 Stunden bei der enzyspezifischen Reaktionstemperatur inkubiert. Anschließend wurden die erhaltenen DNA-Fragmente im Agarosegel aufgetrennt. In Abbildung 4.2 ist dies exemplarisch für das genomische Restriktionsendonuklease-Schnittmuster der Rekombinante D-gC1 im Vergleich zu den Spaltnustern des parentalen Stammes D1701-VrV bzw. des Wildtypstammes D1701-V gezeigt (A). Die im Agarosegel aufgetrennten DNA-Fragmente wurden anschließend auf eine Nylonmembran transferiert und durch Hybridisierung mit einer <sup>32</sup>P-markierten, *E.coli lacZ*-spezifischen (B) bzw. PRV gC-spezifischen (C) Sonde analysiert. Abbildung 4.2 D zeigt schematisch die ITR-Region des Genoms von D1701-V, sowie die Veränderungen des Musters der Restriktionsschnittstellen nach Substitution des *vegF-e*-Gens durch die *lacZ-xgpt*-Kassette bei D1701-VrV bzw. durch das gC-spezifische Genfragment bei D-gC1.

Das 15 kbp große Fragment *EcoRI*-C bzw. -C' von D1701-V (A, Spur 1) wurde durch

Insertion der *lacZ-Xgpt*-Kassette in D1701-VrV durch das 12,3 kbp große Fragment *EcoRI*-C1 bzw. -C'1 und das 6,6 kbp große Fragment *EcoRI*-C2 bzw. -C'2 ersetzt (A, Spur 2). Letzteres trägt das *lacZ*-Gen der *lacZ-xgpt*-Kassette (B, Spur 2). Aufgrund des Vorhandenseins einer *EcoRI*-Schnittstelle stromabwärts vom 3'-Ende des gC-Fragments im Transfervektor pdVgC1, führte die Substitution der *lacZ-xgpt*-Kassette durch dieses Fragment zu einer Vergrößerung des 12,3 kbp großen *EcoRI*-Fragments C1 bzw. C'1 von D1701-VrV auf 13,6 kbp im Genom von D-gC1 (A, Spur 3). Dieses Fragment wurde erwartungsgemäß von der gC-spezifischen Sonde erkannt (C, Spur 3). Desweiteren kam es zum Austausch des 6,6 kbp großen *EcoRI*-Fragments C2 bzw. C'2 von D1701-VrV gegen ein 2,8 kbp großes Fragmente im Genom von D-gC1 (A, Spur 3), das wie erwartet kein gC-spezifisches Signal zeigte (C, Spur 3).

Das 5,5 kbp große *HindIII*-H bzw. -H'-Fragment von D1701-V (A, Spur 4) wird im Genom von D1701-VrV durch das 5,7 kbp große, *lacZ*-positive Fragment *HindIII*-H1 bzw. H'1 und das 3,5 kbp große, *lacZ*-negative Fragment *HindIII*-H2 bzw. -H'2 ersetzt (A und B, Spuren 5). Die *HindIII*-Schnittstelle stromaufwärts vom 5'-Ende des gC-Fragments in pdVgC1 führt zum Erhalt des 3,5 kbp großen *HindIII*-H2 bzw. -H'2-Fragments im Genom von D-gC1, wogegen das 5,7 kbp große *HindIII*-H1 bzw. H'1 Fragment von D1701-VrV durch ein *lacZ*-negatives, gC-positives Fragment von 3,3 kbp ersetzt wird (A und C, Spuren 6).

Durch die *BamHI*-Schnittstelle am 3'-Ende der *lacZ-xgpt*-Kassette werden die 57 bzw. 19 kbp großen *BamHI*-Fragmente A bzw. C des Genoms von D1701-V durch die zwei *lacZ*-positiven Fragmente *BamHI*-A1 bzw. -C1 von 58 bzw. 20 kbp Größe im Genom von D1701-VrV ersetzt (B, Spur 8). Zusätzlich entsteht mit *BamHI*-A2 bzw. -C2 ein diploides, *lacZ*-negatives Fragment von 2,8 kbp (A, Spur 8). Da sich die *BamHI*-Schnittstelle von pdVgC1 ebenfalls stromabwärts vom inserierten gC-Fragment befindet, bleibt das 2,8 kbp große, gC-negative Fragment erhalten (A, Spur 9). Die 58 bzw. 20 kbp großen *BamHI*-Fragmente A1 bzw. C1 von D1701-VrV werden dagegen durch *lacZ*-negative, gC-positive Fragmente von ca. 56 bzw. 18 kbp ersetzt (C, Spur 9).



**Abb. 4.1:** Restriktionsfragment-Analyse der *EcoRI*, *HindIII* oder *BamHI* gespaltenen Virus-DNA des an Vero-Zellen adaptierten Wildtypstammes D1701-V (Spuren 1,4,7), der vegf-e-negativen Mutante D1701-VrV (Spuren 2,5,8) sowie der Rekombinante D-gC1 (Spuren 3,6,9). Dargestellt sind das Ethidiumbromid-gefärbte Agarosegel (A) sowie die Hybridisierung der auf eine Nylon-Membran transferierten DNA-Fragmente mit *E. coli lacZ*- (B) bzw. PRV-gC (C) -spezifischen, radioaktiv markierten Sonden. (M = 1 kb DNA Ladder). Abbildung D zeigt eine schematische Darstellung des Bereichs innerhalb der ITR-Region des Genoms von D1701-V (vgl. Abb. 1.2), in welchem die Substitution des vegf-e-Gens durch die *lacZ-xgpt*-Kassette bei D1701-VrV bzw. durch die PRV-gC-spezifische Gensequenz in D-gC1 erfolgte. Die Größe der inserierten Fremdgene ist in der Grafik nicht maßstabsgetreu dargestellt. Es wurden nur die Schnittstellen für *EcoRI* (↓), *HindIII* (↑) und *BamHI* (↓), eingezeichnet, die für das Verständnis der Restriktionsfragment-Analyse von Bedeutung sind. Die Schnittstellen wurden mit ihrem jeweiligen Anfangsbuchstaben abgekürzt, die tiefstehenden Zeichen geben die exakte Bezeichnung der jeweiligen Restriktionsfragmente bzw. -subfragmente wieder. Genauere Erläuterungen sind dem Text zu entnehmen.

Die Restriktionsendonuklease-Schnittmuster und Southern-Blothybridisierungen wurden vergleichbar für die Genome der Rekombinanten D-gC2, D-gC3 und D-gD untersucht. In Abbildung 4.3 sind jeweils die Ethidiumbromid-gefärbten Restriktionsfragmente und die zugehörige Southern-Blothybridisierung mit der gC-spezifischen Sonde dargestellt. Auf eine grafische Darstellung der durch die Rekombination verursachten genomischen Veränderungen im ITR-Bereich und der daraus resultierenden Subfragmente (vgl. Abb. 4.2) wurde hier verzichtet.

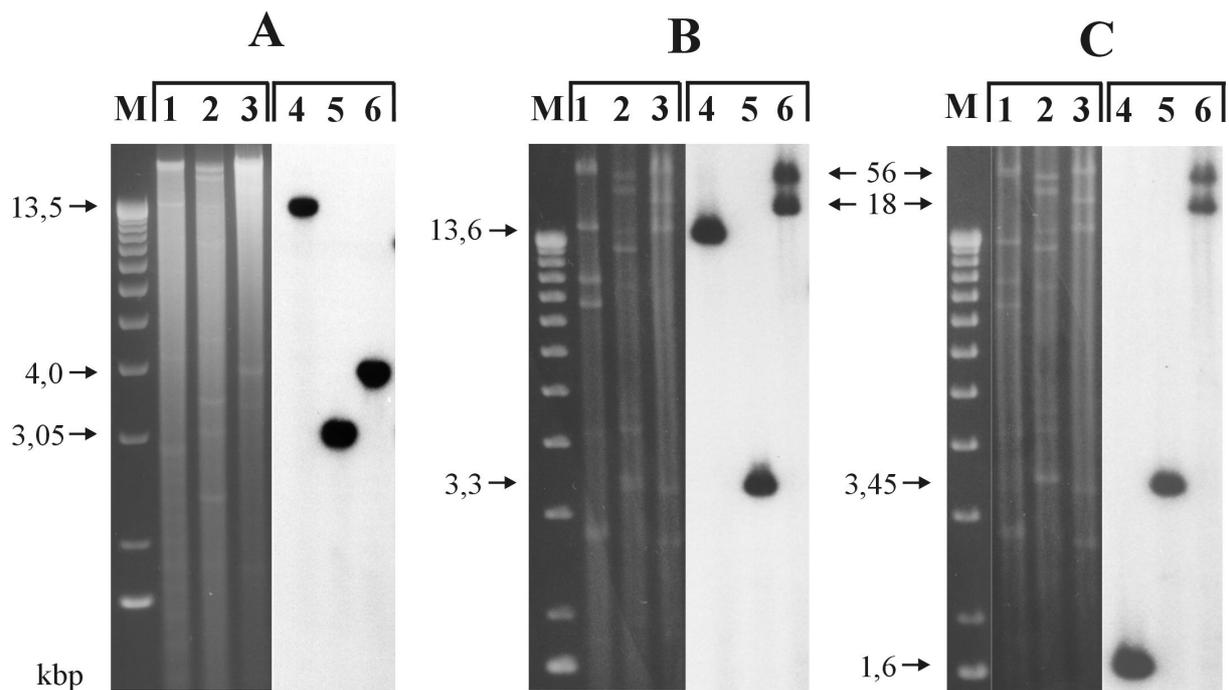
Die viralen DNA-Fragmente von D-gC2 sind aufgrund von Verunreinigung mit zellulärer DNA nur undeutlich zu erkennen. Allerdings gelang über Southern-Blothybridisierung der Nachweis gC-spezifischer Fragmente der erwarteten Größe. Da das gC-spezifische PCR-Produkt zur Konstruktion von pdVgC2 in das Plasmid pdV-ATG inseriert wurde, befindet sich eine *EcoRI*-Schnittstelle stromabwärts vom inserierten Fragment. Dies resultiert im Genom der Rekombinante D-gC2 in einem 13,5 kbp großen *EcoRI*-Fragment (A, Spur 4). Das gC-spezifische *HindIII*-Fragment von D-gC2 ist aufgrund des Fehlens der für die Signalsequenz und der für die vollständige Transmembrandomäne kodierenden Sequenz gegenüber D-gC1 auf 3,05 kbp verkleinert (A, Spur 5). Im Gegensatz zu den singulären, gC-spezifischen *BamHI*-Fragmenten von D-gC1, liegt bei D-gC2 ein diploides, 4,0 kbp großes gC-spezifisches Fragment vor (A, Spur 6). Die Ursache hierfür ist das Vorhandensein der *BamHI*-Schnittstelle am 5'-Ende des gC-spezifischen Fragments im Transfervektor pdVgC2.

Die Konstruktion des Transfervektors pdVgC3 erfolgte durch Insertion der vollständigen gC-spezifischen Sequenz in die *EcoRV*-Schnittstelle von pdV-Rec1, wobei alle weiteren Schnittstellen der *mes* erhalten wurden. Damit ergibt sich für das virale Genom der Rekombinante D-gC3 ein vergleichbares Restriktionsendonuklease-Schnittmuster wie für die Rekombinante D-gC1. Im Vergleich zu D-gC1 mit partiell deletierter Sequenz für die Transmembrandomäne führt das Vorhandensein der vollständigen für die Transmembrandomäne kodierenden Sequenz lediglich zu einer geringen Vergrößerung der gC-spezifischen Fragmente (B, Spuren 4-6).

Das *HindIII/BamHI*-Fragment des pgDBSII, welches zur Konstruktion des Transfervektors pdVgD diente, besitzt eine *EcoRI*-Schnittstelle stromaufwärts vom gD-Gen. Zusammen mit der *EcoRI*-Schnittstelle des Empfängerplasmids pdV-Rec1 entsteht damit ein 1,6 kbp großes, gD-positives *EcoRI*-Fragment im Genom von D-gD (C, Spur 4). Die Lokalisation der *HindIII*- bzw. *BamHI*-Schnittstellen stromaufwärts vom 5'-Ende bzw. stromabwärts vom 3'-

Ende des gD-Gens in pdVgD erklärt das 3,45 kbp große, gD-spezifische *HindIII*-Fragment (C, Spuren 2 und 5) und die ca. 56 bzw. 18 kbp großen gD-spezifischen *BamHI*-Fragmente (C, Spuren 3 und 6) des Genoms von D-gD.

Zusammengefaßt weist die genomische Analyse der rekombinanten Vektorvakzinestämme nach, daß die Fremdgen-spezifischen DNA-Sequenzen durch homologe Rekombination jeweils korrekt in das Genom von D1701-VrV inseriert wurden. Aufgrund der Abwesenheit eines *lacZ*-spezifischen Fragments im Genom der untersuchten Rekombinanten (nicht gezeigt für die Rekombinanten D-gC2, D-gC3 und D-gD) konnte außerdem nachgewiesen werden, daß in allen Fällen die Fremdgen-spezifische Sequenz die *lacZ-xgpt*-Kassette an beiden Enden des Genoms ersetzt hat und damit in diploider Form vorliegt. Gleichzeitig wurde damit die Reinheit der rekombinanten Viruspopulationen bestätigt.



**Abb. 4.3:** Analyse der Restriktionsfragmente genomischer DNA der ORFV-Rekombinanten D-gC2 (A), D-gC3 (B) und D-gD (C). Dargestellt sind die gelelektrophoretisch getrennten, Ethidiumbromid-gefärbten DNA-Fragmente nach Spaltung der Virus-DNA mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* (Spuren 1), *HindIII* (Spuren 2) und *BamHI* (Spuren 3). Die anschließende Southern-Blot-Hybridisierung mittels einer gC-spezifischen (A und B) bzw. einer gD-spezifischen (C) Sonde zeigt außerdem den Nachweis der jeweiligen Glykoproteinengenspezifischen Fragmente (*EcoRI*: Spuren 4; *HindIII*: Spuren 5; *BamHI*: Spuren 6). (M=1 kb DNA Ladder)

#### 4.4 Genexpression der ORFV-Rekombinanten in permissiven Vero-Zellen

##### 4.4.1 Transkription der Fremdgen-spezifischen mRNA

Nachdem die korrekte Insertion der Fremdgene bzw. Fremdgenfragmente in den jeweiligen rekombinanten ORFV-Stämmen wie beschrieben überprüft worden war, wurde deren Expression in infizierten Vero-Zellen untersucht.

Nach Infektion mit den jeweiligen ORFV Rekombinanten wurde zunächst mittels Northern-Blotanalyse untersucht, ob die jeweilige Fremdgen-spezifische mRNA der erwarteten Größe synthetisiert wird. Zum Nachweis der frühen Fremdgen-spezifischen Transkription unter Kontrolle des vegf-e-Promotors wurden die Zellen mit Cycloheximid behandelt. Cycloheximid hemmt die Proteinsynthese und blockiert damit den Übergang in die späte

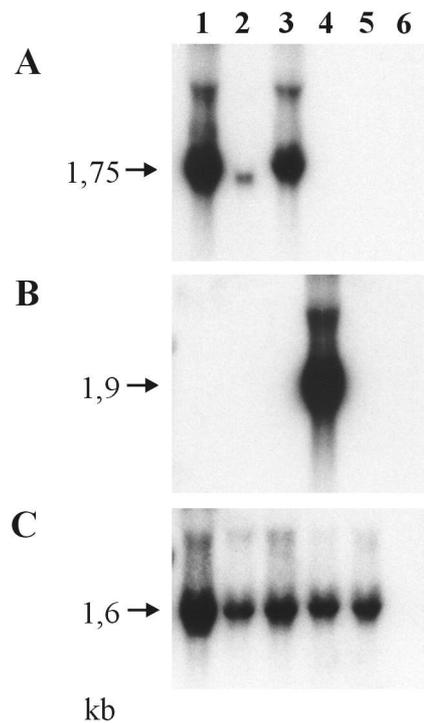
Phase der Infektion, da dieser Übergang abhängig vom Vorhandensein früher viraler Genprodukte ist. Die Zellen wurden mit jeweils identischer  $moi$  von  $10 \text{ TCID}_{50}$  pro Zelle entweder des parentalen D1701-VrV oder der davon abgeleiteten Virusrekombinanten infiziert, und identische Mengen Gesamt-RNA der infizierten Zellen wurden für die Northern-Blotanalyse verwendet. Somit konnten eventuelle Unterschiede der Fremdgen-spezifischen Transkription für die einzelnen Rekombinanten ermittelt werden. Zusätzlich wurde dies über die Syntheserate der D1701 HD1R-spezifischen mRNA kontrolliert. Das HD1R Gen ist in der ITR-Region stromaufwärts vom D1701 vegf-e Gen lokalisiert und wird ebenfalls früh nach der Infektion exprimiert. Es kodiert für ein Ankyrin-ähnliches Protein von bislang unbekannter Funktion (Cottone, 2000; Rziha, eingereicht).

Es konnte nachgewiesen werden, daß die Rekombinanten D-gC1-3 bzw. D-gD jeweils die Synthese eines gC-bzw. gD-spezifischen, frühen Transkripts der erwarteten Größe von ca. 1,75 kb (gC) bzw. 1,9 kb (gD) in infizierten Zellen induzieren (Abb. 4.4 A bzw. B). In geringerem Ausmaß waren außerdem spezifische Transkripte von ca. 4 kb nachweisbar. Die Hybridisierung war jeweils spezifisch, da die gC-spezifische Sonde nicht mit Gesamtzell-RNA D-gD- bzw. mock-infizierter Zellen hybridisierte und *vice versa*. Die Größe der spezifischen Transkripte deutete darauf hin, daß die mRNA-Synthese unter Kontrolle des vegf-e-Promotors induziert und unter Nutzung des vegf-e-spezifischen  $(T)_5NT$ -Motiv als Transkriptionsterminationsignal des frühen Gens beendet wird. Desweiteren war in kürzeren Autoradiographie-Exponaten noch deutlicher zu erkennen, daß die D-gC1 bzw. D-gC2 kodierte, gC-spezifische mRNA entsprechend der Größe der jeweils im viralen Genom inserierten gC-spezifischen Fragmente eine entsprechend geringere Größe aufwies, als das vollständige, D-gC3 kodierte gC-spezifische Transkript (nicht gezeigt).

Wie in Abb. 4.4 C dargestellt, konnte in Cycloheximid-behandelten Zellen nach Infektion mit D1701-VrV (Spur 5) bzw. mit den rekombinanten Vektorvakzine-Stämmen (Spuren 1-4) auch das frühe 1,6 kb große HD1R-spezifische Transkript in Gesamtzell-RNA nachgewiesen werden. Auch hier war eine schwache spezifische Hybridisierung mit RNA von ca. 4 kb zu erkennen. Die densitometrische Auswertung der Intensität des HD1R-spezifischen Signals ermöglichte die Quantifizierung der gC- bzw. gD-spezifischen Transkription nach Infektion von Vero-Zellen mit den jeweiligen Virusrekombinanten. Die Normierung anhand der HD1R-spezifischen Signalintensität ergab eine annähernd identische Transkriptionsrate für das D-gC3-kodierte vollständige gC-Gen verglichen zum D-gC1-kodierten gC-Fragment. Die

Syntheserate des D-gC2-kodierten gC-Fragments war gegenüber der vollständigen gC-mRNA in D-gC3-infizierten Zellen dagegen um das Sechsfache geringer. Außerdem konnte im Vergleich zur Transkriptionsrate des vollständigen gC-Gens eine fast vierfach höhere gD-spezifische Transkriptionsrate in D-gD-infizierten Zellen festgestellt werden. Dabei ist jedoch zu beachten, daß zwar gleiche Aktivitäten der gD- bzw. gC-spezifischen Sonden für die Hybridisierung eingesetzt wurden, Unterschiede in der Hybridisierungseffizienz der verschiedenen Sonden bei den gewählten Bedingungen jedoch nicht auszuschließen sind. Quantitativ vergleichbare Unterschiede der Glykoproteingen-spezifischen Transkription nach Infektion von Zellen mit den einzelnen ORFV-Rekombinanten wurden in zwei unabhängigen Experimenten festgestellt.

Der mit typischen Strukturelementen für frühe Gene ausgestattete ORFV-veg-f-e Promotor ist auch während der späten Phase der Replikation aktiv (Henkel, 1997). Dementsprechend konnten Glykoproteingen-spezifische Transkripte auch 24 Stunden nach der Infektion ohne Zusatz von Cycloheximid nachgewiesen werden (nicht gezeigt).



**Abb. 4.4:** Analyse der PRV-Glykoproteingen-spezifischen Transkription in Vero-Zellen nach Infektion mit D-gC1 (Spur 1), D-gC2 (Spur 2), D-gC3 (Spur 3) bzw. D-gD (Spur 4). Als Negativkontrolle diente die Gesamtzell-RNA D1701-VrV-infizierter bzw. nicht-infizierter Zellen (Spur 5 bzw. 6). Die Zellen wurden zur Anreicherung früher mRNA während 8 Stunden nach der Infektion mit Cycloheximid behandelt. Die Northern-Blothybridisierung isolierter und gelelektrophoretisch getrennter Gesamtzell-RNA erfolgte mittels des *NcoI/HinfI*-Fragments des Plasmids pALM-20 als gC-spezifischer Sonde (A) bzw. des *HindIII/BamHI*-Fragments des Plasmids pgDBSII als gD-spezifischer Sonde (B). Zur internen Kontrolle auf vergleichbare Infektionsrate mit den verschiedenen ORFV-Rekombinanten wurde außerdem eine Hybridisierung mit dem *SacI*-Fragment des Plasmids pORF-50 als D1701-HD1R-spezifischer Sonde durchgeführt (C).

#### 4.4.2 Western-Blotanalyse der Fremdgenexpression

Die Translation der jeweiligen Fremdgen-spezifischen mRNA wurde mittels Western-Blot analysiert. Vero-Zellen wurden mit einer *moi* von 10 mit den jeweiligen ORFV-Rekombinanten infiziert und anschließend für 24 Stunden kultiviert. Als Negativkontrollen dienten nicht-infizierte bzw. D1701-VrV-infizierte Zellen, wogegen PRV-Begonia-infizierte Zellen als Positivkontrolle verwendet wurden. Auch bei den Kontrollen wurde eine *moi* von 10 gewählt. Zum Nachweis der Expression PRV-gC-spezifischer Polypeptide wurde der monoklonale Antikörper A18b verwendet, wogegen das monospezifische Kaninchenserum 016/00 zur Detektion des PRV-Glykoproteins gD diente. Die vergleichbare Infektionsrate mit

den einzelnen Rekombinanten wurde mittels Western-Blotanalyse mit dem ORFV-spezifischen monoklonalen Antikörper 4D9 überprüft. Dieser Antikörper erkennt das 39 kDa schwere, immundominante Haupthüllprotein des Orf Virus, welches vom F1L-Gen (VACV H3L-Homolog) kodiert und in der späten Phase der Virusreplikation exprimiert wird (Fleming et al., 1993; Housawi et al., 1998).

In Abbildung 4.5 ist der Nachweis gC-spezifischer Polypeptide in den verschiedenen Zellysaten dargestellt. Die diffuse aber prominente Bande entsprechend eines Molekulargewichts von 70 bis 75 kDa bei D-gC3- und PRV-Begonia-infizierten Zellen (A, Spuren 3 und 7) stellt hierbei vermutlich das Prä-Golgi-lokalisierte gC-Vorläuferprotein dar. Darüberhinaus ist mit der Doppelbande bei ca. 85 kDa sowie weiteren gC-spezifischen Polypeptiden von ca. 90 bis 95 kDa eine diffuse Molekulargewichtsverteilung zu erkennen, wie sie für das reife, membranständige Glykoprotein in PRV-infizierten Zellen beschrieben wurde (Ryan et al., 1987). Außerdem konnte ein Polypeptid von ca. 58 kDa nachgewiesen werden, bei dem es sich vermutlich nicht um ein Abbauprodukt, sondern um das primäre Translationsprodukt mit einem berechneten Molekulargewicht von 51 kDa handelt (Robbins et al., 1986a; Ryan et al., 1987; 1989; 1993; Enquist et al., 1988). Die nahezu völlige Übereinstimmung der nachgewiesenen gC-spezifischen Polypeptide im Vergleich zu PRV-Begonia infizierten Zellen deutet auf eine authentische Translation der gC-spezifischen mRNA und authentische posttranslationale Modifikationen des Glykoproteins in D-gC3-infizierten Zellen hin.

Nach Infektion mit D-gC1 ist ein gC-spezifisches Polypeptid von ca. 70 kDa schwach nachweisbar (A, Spur 1). Hierbei handelt es sich vermutlich um das Prä-Golgi-lokalisierte gC-Vorläuferprotein mit partiell deletierter Transmembrandomäne und vollständig deletierter cytoplasmatischer Domäne, welches nach Berechnung (s. 3.5) ein um 1,96 kDa geringeres Molekulargewicht als das vollständige Genprodukt aufweisen sollte. Außerdem ist wiederum die gC-spezifische Doppelbande von ca. 85 kDa deutlich, die diffuse Bande bei 90 bis 95 kDa jedoch nur sehr schwach zu erkennen.

Im Lysat D-gC2-infizierter Vero-Zellen konnte kein gC-spezifisches Polypeptid nachgewiesen werden (A, Spur 2).

Die Western-Blotanalyse mit Hilfe des PRV-gD-spezifischen Kaninchenserums 016/00 ermöglichte den Nachweis des Glykoproteins gD in D-gD-infizierten Zellen als Doppelbande bei einem Molekulargewicht von ca. 60 kDa (B, Spur 4). Außerdem wurde ein schwaches

gD-spezifisches Polypeptid von ca. 45 kDa erkannt. Hierbei handelt es sich vermutlich um das primäre Translationsprodukt ohne O-gekoppelte Glykosylierung (Petrovskis et al., 1986a). Wiederum deutet das identische Bandenmuster bei PRV-infizierten (B, Spur 7) und D-gD-infizierten Zellen auf eine authentische Translation und posttranslationale Modifikation des vektorkodierten Glykoproteins gD hin. Die Expressionsrate scheint gegenüber Glykoprotein gC in D-gC3-infizierten Zellen geringer. Dabei ist zu berücksichtigen, daß auch in PRV-infizierten Zellen die nachweisbare Menge des Glykoproteins gD gegenüber dem Glykoprotein gC geringer ist.

Die Infektion mit allen PRV-Glykoproteingen-Rekombinanten sowie mit der parentalen Rekombinante D1701-VrV führte zur Expression vergleichbarer Mengen des 39 kDa schweren ORFV Hauptoberflächenantigens (C). Der monoklonale Antikörper 4D9 weist außerdem ein 31 kDa schweres, 39K-spezifische Spaltprodukt (Housawi et al., 1998) in vergleichbarer Menge in allen Zellen nach Infektion mit den unterschiedlichen ORFV-Rekombinanten nach. Somit konnte ausgeschlossen werden, daß die geringere Menge nachweisbaren Fremdartigens in D-gC1-infizierten gegenüber D-gC3-infizierten Zellen sowie das Ausbleiben einer spezifischen Reaktion mit dem Lysat der D-gC2-infizierten Zellen auf unterschiedliche Infektionsraten mit den einzelnen ORFV-Rekombinanten zurückzuführen ist.

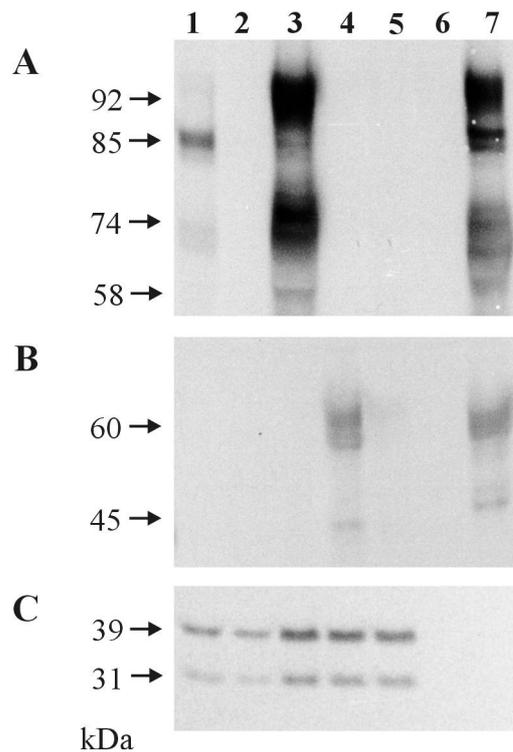
Die Kinetik der Fremdgenexpression in Vero-Zellen wurde ebenfalls mittels Western-Blotanalyse überprüft. Die Zellen wurden als konfluenter Zellrasen infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen 2 Stunden und 48 Stunden nach der Infektion geerntet. Bei einer *moi* von 0,1 war eine gC-spezifische Expression in D-gC3-infizierten Zellen 8 Stunden nach der Infektion nachweisbar (Abb. 4.6 A, Spur 3). Neben dem reifen Glykoprotein ist auch das gC-spezifische prä-Golgi Vorläuferprotein sehr schwach zu erkennen. Im weiteren zeitlichen Verlauf bleibt die Gesamtmenge des rekombinant exprimierten Proteins weitgehend unverändert. Die starke Zunahme der Gesamtmenge des Glykoproteins im Lysat von Zellen 48 Stunden nach der Infektion (A, Spur 8) ist wahrscheinlich auf die Vollendung des Replikationszykluses in primär infizierten Zellen und die anschließende frühe Genexpression in benachbart infizierten Zellen zurückzuführen. Auch das 58 kDa Polypeptid ist zu diesem Zeitpunkt nachweisbar. Bei einer *moi* von 10 ist die Expression des Fremdgens bereits 2 Stunden nach der Infektion schwach nachweisbar (B,

Spur 1). 8 Stunden p.i. ist das charakteristische Muster gC-spezifischer Polypeptide vollständig vorhanden und das Maximum der Genexpressionsrate erreicht. Für die Rekombinante D-gD wurden vergleichbare Resultate erzielt (nicht gezeigt). Auch hier war bei der geringen moi von 0,1 das Glykoprotein gD erst 8 Stunden p.i. nachweisbar und die maximale Konzentration war ebenfalls erst zum späten Zeitpunkt von 24 Stunden p.i., vermutlich aufgrund der Genexpression in sekundär infizierten Zellen, erreicht. Dagegen war bei moi 10 die Fremdgenexpression spätestens 4 Stunden p.i. nachweisbar und erreichte wiederum bereits 8 Stunden nach der Infektion ein Maximum.

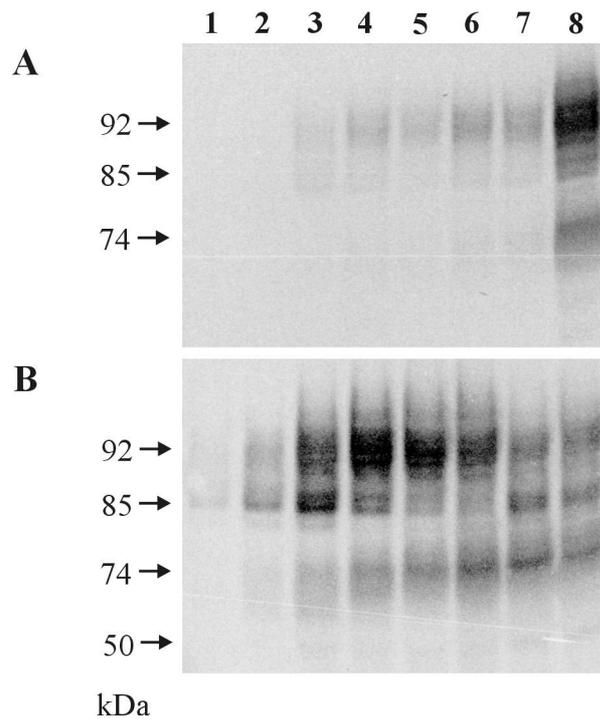
Anhand der kinetischen Analyse konnte somit die frühe Expression der D-gC3 bzw. D-gD-kodierten PRV-Glykoproteingene auch auf Proteinebene gezeigt werden.

Die Lysate infizierter Zellen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten wurden außerdem auf das Vorhandensein des ORFV-Hüllproteins 39K untersucht. Da es sich bei ORFV-F1L um ein spätes Gen handelt, konnte das entsprechende Genprodukt bei moi 10 bzw. moi 1 wie erwartet erst zu den späten Zeitpunkten von 24 bzw. 36 Stunden nach der Infektion nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

## Ergebnisse



**Abb. 4.5:** Analyse der PRV-Glykoproteinsynthese in Vero-Zellen 24 Stunden nach Infektion mit D-gC1 (Spur 1), D-gC2 (Spur 2), D-gC3 (Spur 3) bzw. D-gD (Spur 4). Die Western-Blotanalyse des Gesamtproteins infizierter Zellen nach Trennung in einem 8-prozentigen, denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel erfolgte mittels des gC-spezifischen, monoklonalen Antikörpers A18b (A), bzw. des gD-monospezifischen Serums 016/00 (B). Als Negativkontrolle dienten die Lysate D1701-VrV-infizierter bzw. nicht-infizierter Zellen (Spur 5 bzw. 6), wogegen das Lysat PRV-Begonia infizierter Zellen die Positivkontrolle darstellt (Spur 7). Zur Kontrolle auf vergleichbare Infektionsrate mit den unterschiedlichen ORFV-Rekombinanten wurde außerdem eine Western-Blotanalyse mit dem ORFV 39K-spezifischen monoklonalen Antikörper 4D9 durchgeführt (C).



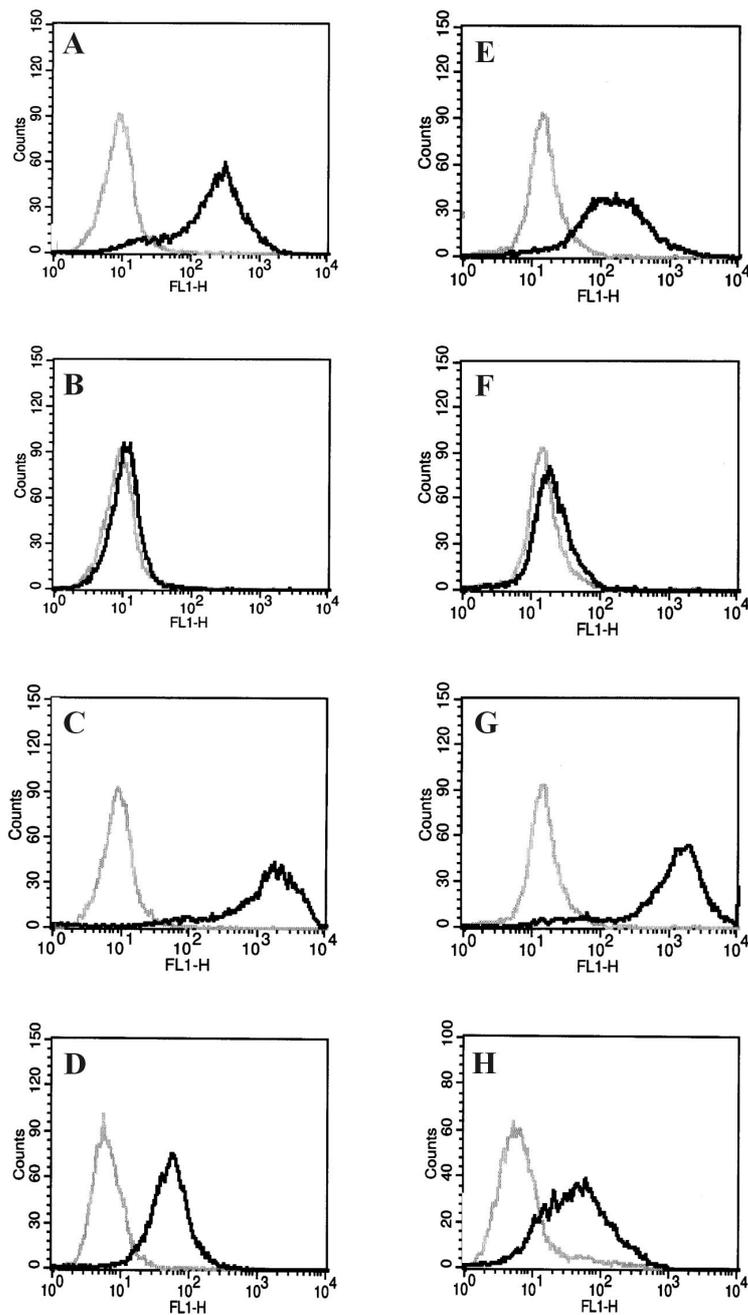
**Abb. 4.6:** Kinetik der PRV-Glykoproteinsynthese in Vero-Zellen nach Infektion mit der ORFV-Rekombinante D-gC3. Die Western-Blotanalyse des gelelektrophoretisch getrennten Gesamtproteins von Zellen nach Infektion mit moi 0,1 (A) oder moi 10 (B) erfolgte mit dem gC-spezifischen, monoklonalen Antikörper A18b. Es wurden Lysate zu den Zeitpunkten 2 h (Spur 1), 4 h (Spur 2), 8 h (Spur 3), 12 h (Spur 4), 16 h (Spur 5), 24 h (Spur 6), 36 h (Spur 7) und 48 h (Spur 8) nach der Infektion auf das Vorhandensein gC-spezifischer Polypeptide untersucht.

#### 4.4.3 Durchflußzytometrische Analyse der Fremdgenexpression

Mittels durchflußzytometrischer Analyse von Vero-Zellen nach Infektion mit den einzelnen ORFV-Rekombinanten sollten die Ergebnisse der Western-Blotanalysen überprüft und weitere Aufschlüsse hinsichtlich der Lokalisation der rekombinant exprimierten PRV Glykoproteine bzw. Proteinfragmente in infizierten Zellen gewonnen werden. Die Zellen wurden mit einer moi von 10 mit dem parentalen Stamm D1701-VrV bzw. mit den davon abgeleiteten Rekombinanten infiziert und nach 24 Stunden geerntet. Zu diesem Zeitpunkt ist entsprechend der Western-Blotanalyse ein maximaler Anteil der Glykoproteine vollständig glykosyliert. Die Expression und Lokalisation des Glykoproteins gC bzw. der gC-spezifischen Fragmente durch die jeweiligen Rekombinanten D-gC1-3 wurde mit Hilfe des gC-spezifischen monoklonalen Antikörpers A18b untersucht. Die eindimensionale Darstellung der Fluoreszenzintensität erfolgte jeweils vergleichend zwischen infizierten und nicht-

infizierten Zellen. Als Negativkontrolle dienten D1701-VrV-infizierte Zellen, bei denen in keinem Fall eine spezifische Reaktion mit den verwendeten Primärantikörpern festgestellt werden konnte (nicht gezeigt). In Abbildung 4.7 ist zu erkennen, daß bei nativen Zellen sowohl das vollständige Glykoprotein gC in D-gC3-infizierten Zellen als auch das gC-spezifische Fragment mit partiell deletierter Transmembrandomäne in D-gC1-infizierten Zellen an die Zelloberfläche transportiert wird (A bzw. C). Das Maximum der Fluoreszenzintensität bei D-gC3-infizierten Zellen deutet dabei auf eine ca. 10-fach höhere Antigendichte an der Zelloberfläche im Vergleich zu D-gC1-infizierten Zellen hin. In D-gC2-infizierten Zellen war dagegen kein gC-spezifisches Produkt an der Zelloberfläche nachweisbar (B). Auch für fixierte und permeabilisierte Zellen wurde die höchste Fluoreszenzintensität nach Infektion mit D-gC3 gemessen, wogegen die Antigenkonzentration in D-gC1-infizierten Zellen deutlich geringer war (E bzw. G). In D-gC2-infizierten Zellen war wiederum kein gC-spezifisches Produkt nachweisbar (F). Diese Befunde stimmen sowohl qualitativ als auch quantitativ mit den Ergebnissen der Western-Blotanalyse überein.

Die durchflußzytometrische Analyse D-gD-infizierter Vero-Zellen nach Inkubation mit dem gD-monospezifischen Serum 016/00 zeigte, daß auch das Glykoprotein gD in Vektor-infizierten Zellen an die Zelloberfläche gelangt. Die nachweisbare Antigendichte sowohl an der Oberfläche nativer Zellen (D) als auch in permeabilisierten Zellen (H) ist im Vergleich zum Glykoprotein gC bei D-gC3-infizierten Zellen jedoch deutlich geringer, was wiederum den Beobachtungen der Western-Blotanalyse entspricht.



**Abb. 4.7:** Durchflußzytometrische Analyse von Vero-Zellen 24 Stunden nach Infektion mit einer *moi* von 10 mit den ORFV-Rekombinanten D-gC1 (A und E), D-gC2 (B und F), D-gC3 (C und G) sowie D-gD (D und H). Zum Nachweis der Lokalisation der Glykoproteine an der Zelloberfläche wurden die infizierten Zellen in nativem Zustand markiert (A-D), wogegen der Nachweis intrazellulären Antigens an fixierten und permeabilisierten Zellen erfolgte (E-H). Das Glykoprotein gC bei D-gC-infizierten Zellen wurde mittels des monoklonalen Antikörpers A18b nachgewiesen, wogegen das monospezifische Serum 016/00 zum Nachweis des Glykoproteins gD in D-gD-infizierten Zellen diente. Dargestellt ist die Zellzahl (Counts) in Abhängigkeit von der Fluoreszenzintensität (FL1-H) von infizierten (schwarz) im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen (grau).

#### **4.5 Genexpression und Replikation der ORFV-Rekombinanten in Maus-Zelllinien**

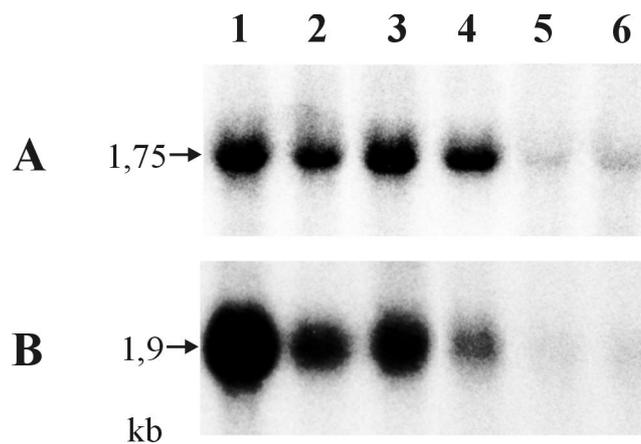
Die Maus gilt als nicht-permissiver Wirt für die Vermehrung des Orf-Virus. Jedoch sind bislang keine gesicherten Daten hinsichtlich des ORFV-Replikationszyklus in murinen Zellen *in vitro* bzw. *in vivo* bekannt. Im Folgenden sollte deshalb die virale Genexpression und Virusvermehrung *in vitro* in den murinen Fibroblasten-Zelllinien NIH/3T3 bzw. L-929 erstmals genauer untersucht werden. Da hierbei von besonderem Interesse war, ob ORFV-Vektoren auch in murinen Zellen die Expression der inserierten Fremdgene unter Kontrolle des viralen vegf-e-Promotors induzieren, wurden die NIH/3T3- und L-929-Zellen nach Infektion mit den Rekombinanten D-gC3 bzw. D-gD analysiert.

##### **4.5.1 Northern-Blotanalysen**

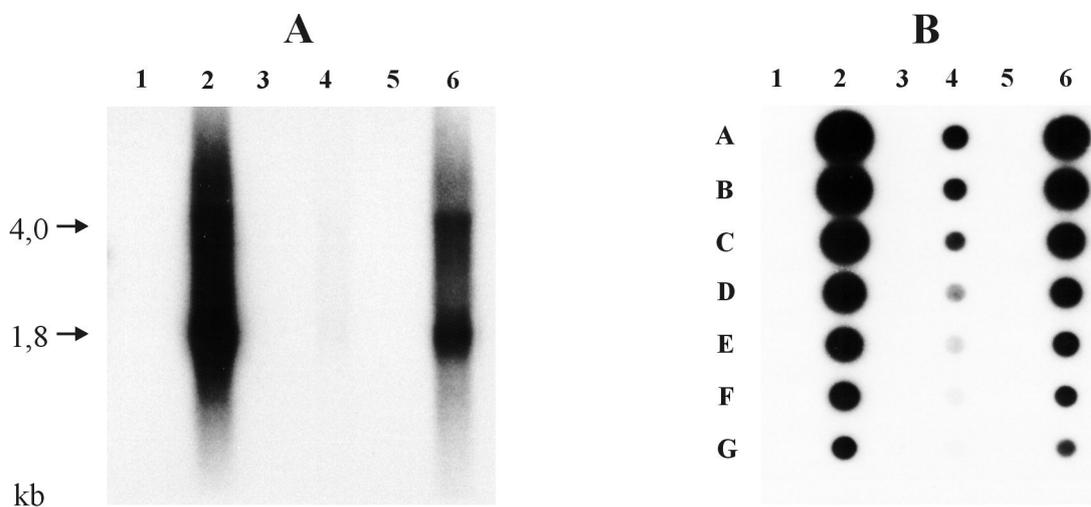
Zur vergleichenden Untersuchung der Glykoproteingen-spezifischen Transkription wurden Vero-Zellen und die murinen Zellen mit einer *moi* von 10 mit den Rekombinanten D-gC3 und D-gD infiziert. Zur Anreicherung früher mRNA wurden die Zellen mit Cycloheximid behandelt und 8 Stunden p.i. geerntet, wogegen zur Untersuchung der späten Transkription die infizierten Zellen für 24 Stunden ohne Cycloheximid-Behandlung kultiviert wurden. Anschließend wurde die Gesamtzell-RNA isoliert und nach gelelektrophoretischer Trennung zur Northern-Blotthybridisierung verwendet. Abbildung 4.8 zeigt bei beiden murinen Zelllinien gC- bzw. gD-spezifische Transkripte der gleichen Größe wie in infizierten Vero-Zellen als Positivkontrolle. In nicht-infizierten Zellen waren die Transkripte nicht nachweisbar (nicht gezeigt). Die densitometrische Analyse der Signalintensitäten zeigte, daß im Vergleich zu Vero-Zellen die Menge an gC-spezifischer mRNA während der frühen Phase der Infektion in NIH/3T3-Zellen nur um das 1,5-fache geringer war. Zwischen Vero- und L-929-Zellen war keinerlei quantitativer Unterschied hinsichtlich gC-spezifischer Transkripte vorhanden. Zum Zeitpunkt 24 Stunden p.i. war jedoch die Menge an gC-spezifischer mRNA bei NIH/3T3-Zellen um das 4,5-fache, bei L-929-Zellen um das 3,5-fache geringer als in Vero-Zellen. Nach Infektion mit der Rekombinante D-gD war die Menge an früher gD-spezifischer mRNA gegenüber Vero-Zellen wiederum nur 1,5-fach bei NIH/3T3-Zellen und 1,3-fach bei L929-Zellen geringer. In der späten Phase der Virusreplikation waren gD-spezifische Transkripte in 3,0-fach (NIH/3T3) bzw. 2,7-fach (L-929) geringerer Menge als in Vero-Zellen vorhanden. Um die Frage zu klären, ob in den murinen Zelllinien auch ORFV-spezifische Expression von

Genen stattfindet, die ausschließlich in der späten Phase des Replikationszykluses transkribiert werden, wurde die Gesamtzell-RNA D-gC3-infizierter Zellen auf das Vorhandensein der ORFV B2L-spezifischen mRNA untersucht. Das B2L-Gen kodiert für ein 42 kDa schweres Protein und wird in der späten Phase der Virusreplikation transkribiert wird (Sullivan et al., 1994). Das Gen ist homolog zum Vaccinia Virus F13L, welches für das 37 kDa schwere Hauptstrukturprotein der äußeren Membran der extrazellulären Vaccinia Virus-Partikel kodiert (Blasco & Moss, 1991). In Abbildung 4.9 A ist zu sehen, daß 24 Stunden p.i. in Vero-Zellen eine B2L-spezifische mRNA mit einer Größe von ca. 1,8 kb nachgewiesen werden konnte. Außerdem war ein schwächeres Signal für ein spezifisches Transkript von ca. 4 kb zu erkennen. Auch in den murinen Zelllinien NIH/3T3 und L-929 wurden spezifische Transkripte entsprechender Größe nachgewiesen. Für NIH/3T3-Zellen ist dies nur undeutlich zu erkennen. Nach längerer Exposition des Röntgenfilms waren jedoch beide spezifischen Transkripte auch in NIH/3T3-Zellen deutlich nachweisbar (nicht gezeigt). Aufgrund der großen Unterschiede in den Signalintensitäten war eine direkte densitometrische Auswertung ungenau. Deshalb wurde die B2L-spezifische Transkriptionsrate in den einzelnen Zelllinien mittels einer RNA Dot-Blotanalyse genauer quantifiziert (Abb. 4.9 B). Auf diese Weise konnte gezeigt werden, daß die Menge spezifischer Transkripte des späten B2L-Gens in NIH/3T3-Zellen 64-fach, in L-929-Zellen dagegen nur 4-fach geringer war als in Vero-Zellen. Um weitere Daten hinsichtlich der Transkription später Gene in den ORFV-infizierten murinen Zellen zu gewinnen, sollte auch die Synthese einer F1L-spezifischen mRNA untersucht werden. Mit Hilfe des 39K-spezifischen monoklonalen Antikörpers 4D9 wäre es in diesem Fall außerdem möglich, die Korrelation zwischen F1L-spezifischer Transkription und der Synthese des 39K-Proteins zu untersuchen (s. Abb. 4.10). Zur Herstellung einer F1L-spezifischen, radioaktiv markierten Sonde wurde das Plasmid pVU380 verwendet. In den bisherigen Experimenten gelang der Nachweis von F1L-spezifischer mRNA jedoch weder in Vero-Zellen noch in den murinen Zellen zum Zeitpunkt von 24 Stunden nach Infektion mit den ORFV-Vektorvakzinen. Für weitere Versuche diesbezüglich ist zunächst eine Überprüfung der F1L-Spezifität der aus pVU380 isolierten Sequenz notwendig.

## Ergebnisse



**Abb. 4.8:** Northern-Blotanalyse zum Nachweis der gC-spezifischen (A) bzw. gD-spezifischen (B) Transkription nach Infektion mit den ORFV-Rekombinanten D-gC3 bzw. D-gD. Die Glykoproteingen-spezifische Transkription wurde vergleichend für infizierte Vero-Zellen (Spuren 1 und 4), NIH/3T3-Zellen (Spuren 2 und 5) und L-929-Zellen (Spuren 3 und 6) untersucht. Dargestellt ist der Nachweis der spezifischen mRNA sowohl nach Cycloheximid-Behandlung der Zellen und daraus resultierender Anreicherung der Transkripte in der frühen Phase der Replikation (Spuren 1-3) als auch in der späten Phase der Replikation zum Zeitpunkt 24 Stunden p.i. (Spuren 4-6). Die spezifischen, radioaktiv markierten Sonden wurden wie in Abschnitt 4.4.1 gewählt.



**Abb. 4.9:** Nachweis ORFV-B2L-spezifischer Transkripte in nicht-infizierten bzw. D-gC3-infizierten Vero-Zellen (Spuren 1 bzw. 2), NIH/3T3-Zellen (Spuren 3 bzw. 4) und L-929-Zellen (Spuren 5 bzw. 6). Abbildung A zeigt die Northern-Blotthybridisierung gelelektrophoretisch getrennter Gesamtzell-RNA mit einem B2L-spezifischen PCR-Produkt als radioaktiv markierter Sonde. Abbildung B zeigt die RNA Dot-Blotthybridisierung der jeweiligen Gesamtzell-RNA mit der B2L-spezifischen Sonde. Ausgehend von 10 µg (Reihe A) wurde hierbei eine Verdünnungsreihe (log 2) der RNA bis Reihe G aufgetragen.

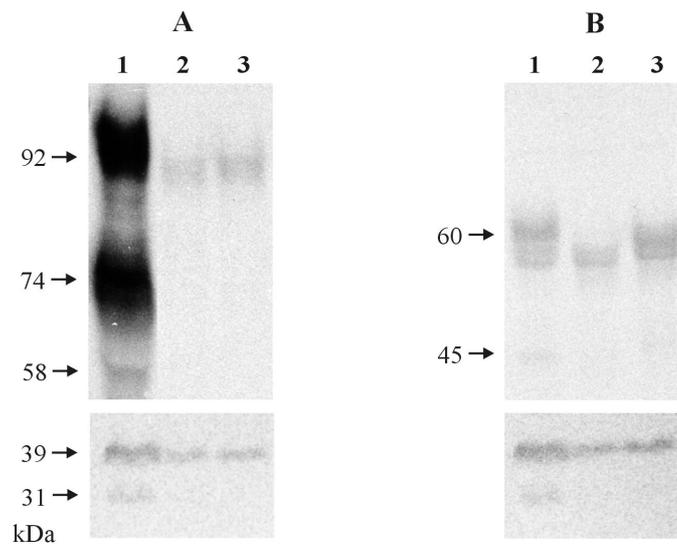
#### 4.5.2 Western-Blotanalysen

Im Folgenden wurde mittels Western-Blotanalyse die Translation der gC- bzw. gD-spezifischen mRNA in den Vektor-infizierten murinen Zellen überprüft. Die Zellen wurden mit einer *moi* von 10 mit den Rekombinanten D-gC3 bzw. D-gD infiziert und anschließend für 24 Stunden kultiviert, wobei als Positivkontrolle entsprechend infizierte Vero-Zellen dienten.

In Abbildung 4.10 A ist zu sehen, daß sowohl in NIH/3T3- als auch in L929-Zellen das reife Glykoprotein gC von ca. 92 kDa synthetisiert wird. Dies zeigt, daß auch in den murinen Zellen die posttranslationalen Modifikationen des rekombinant exprimierten Glykoproteins durchgeführt werden. Die Gesamtmenge an nachweisbarem Protein war allerdings deutlich geringer als in D-gC3-infizierten Vero-Zellen. Darauf ist es vermutlich zurückzuführen, daß in den Lysaten der murinen Zellen das 74 kDa schwere prä-Golgi-Vorläuferprotein sowie das primäre Translationsprodukt mit einem Molekulargewicht von 58 kDa nicht erkennbar sind.

Nach Infektion mit der Rekombinante D-gD wird auch das Glykoprotein gD in beiden Maus-Zelllinien synthetisiert, wobei in diesem Fall kein deutlicher Unterschied in der nachweisbaren Menge des Glykoproteins gegenüber dem Lysat infizierter Vero-Zellen vorhanden war (Abb. 4.10 B). Auffällig war jedoch, daß von den beiden gD-spezifischen Produkten mit einem Molekulargewicht von ca. 60 kDa, wie sie bei infizierten Vero-Zellen zu erkennen sind, in NIH/3T3-Zellen offensichtlich nur das Produkt mit dem geringeren Molekulargewicht synthetisiert wird. Außerdem waren im Lysat der D-gD-infizierten L-929-Zellen zwar zwei spezifische Produkte von ca. 60 kDa nachweisbar, jedoch scheint das Molekulargewicht nicht exakt dem der jeweiligen Produkte in infizierten Vero-Zellen zu entsprechen.

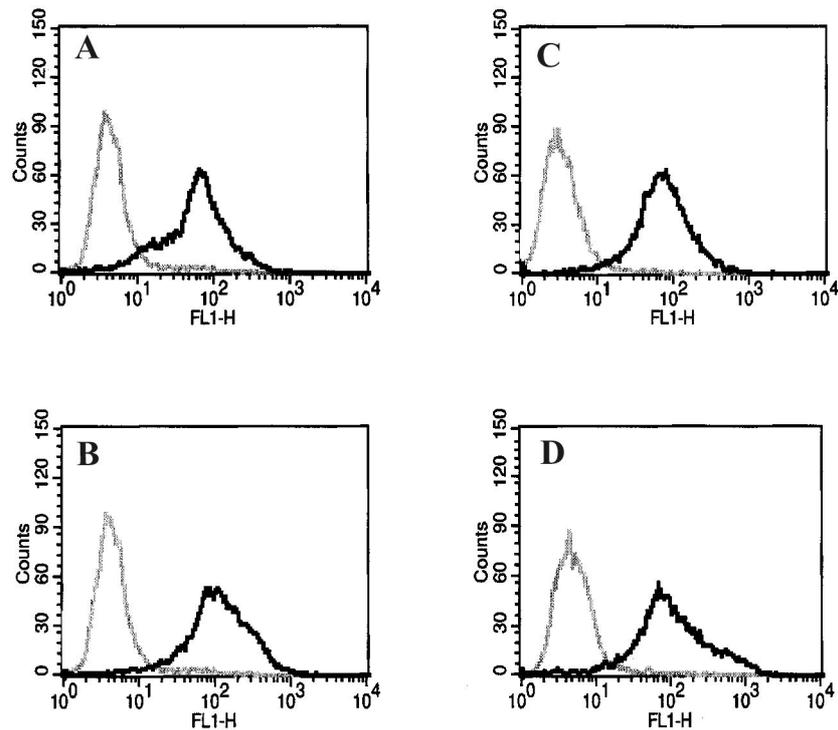
Das F1L-kodierte 39K-Hüllprotein, welches in der späten Phase der Virusreplikation exprimiert wird, wurde mit dem monoklonalen Antikörper 4D9 nachgewiesen. Abbildung 4.10 zeigt, daß das Protein in NIH/3T3- und L-929-Zellen in vergleichbarer Menge wie in Vero-Zellen synthetisiert wird. Das in Vero-Zellen ebenfalls erkannte 31 kDa schwere 39K-spezifische Spaltprodukt (s. auch Abb. 4.5) war in den murinen Zellen jedoch nicht nachweisbar.



**Abb. 4.10:** Western-Blotanalyse der Expression ORFV-Vektor-kodierter Gene 24 Stunden nach Infektion von Vero- (Spuren 1), NIH/3T3- (Spuren 2) bzw. L-929-Zellen (Spuren 3) mit den Rekombinanten D-gC3 (A) bzw. D-gD (B). Das Gesamtprotein der infizierten Zellen wurde in einem 8-prozentigen, denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel getrennt. Der Nachweis der frühen Vektor-kodierten Glykoproteine gC bzw. gD im Western-Blot erfolgte mittels des gC-spezifischen, monoklonalen Antikörpers A18b (A; oben), bzw. des gD-monospezifischen Serums 016/00 (B; oben). Die Synthese des ORFV-39K als spätem Genprodukt wurde für beide Rekombinanten mittels des monoklonalen Antikörpers 4D9 nachgewiesen (A und B; jeweils unten).

### 4.5.3 Durchflußzytometrische Analyse der Fremdgenexpression

Mittels durchflußzytometrischer Analyse der NIH/3T3 und L-929-Zellen nach Infektion mit den ORFV-Rekombinanten D-gC3 bzw. D-gD sollten wiederum die Ergebnisse der Western-Blotanalyse überprüft und Aufschlüsse hinsichtlich der Lokalisation der exprimierten Glykoproteine gewonnen werden. Die Zellen wurden mit einer  $moi$  von 10 mit den einzelnen Rekombinanten infiziert und 24 Stunden p.i. im nativen Zustand geerntet. Abbildung 4.11 zeigt, daß sowohl das Glykoprotein gC in D-gC3-infizierten (A und C), als auch das Glykoprotein gD in D-gD-infizierten Zellen (B und D) an der Zelloberfläche nachweisbar war. Dabei zeigte sich, daß die Antigendichte des Glykoproteins gC bei den murinen Zellen gegenüber entsprechend infizierten Vero-Zellen deutlich geringer war (s. Abb. 4.7 C). Im Gegensatz dazu war die Antigendichte des Glykoproteins gD an der Oberfläche der D-gD-infizierten Maus-Zelllinien vergleichbar zu entsprechend infizierten Vero-Zellen (s. Abb. 4.7 D). Die quantitative Bewertung der durchflußzytometrischen Analyse stimmt damit gut mit den Ergebnissen der Western-Blotanalyse überein.



**Abb. 4.11:** Durchflußzytometrische Analyse von NIH/3T3-Zellen (A und B) bzw. L-929-Zellen (C und D) 24 Stunden nach Infektion mit den ORFV-Rekombinanten D-gC3 (A und C) oder D-gD (B und D) bei einer *moi* von 10. Der Nachweis der Lokalisation der Glykoproteine gC bzw. gD an der Oberfläche nativer Zellen erfolgte mittels des monoklonalen Antikörpers A18b bzw. des monospezifische Serums 016/00. Dargestellt ist die Zellzahl (Counts) in Abhängigkeit von der Fluoreszenzintensität (FL1-H) von infizierten (schwarz) im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen (grau).

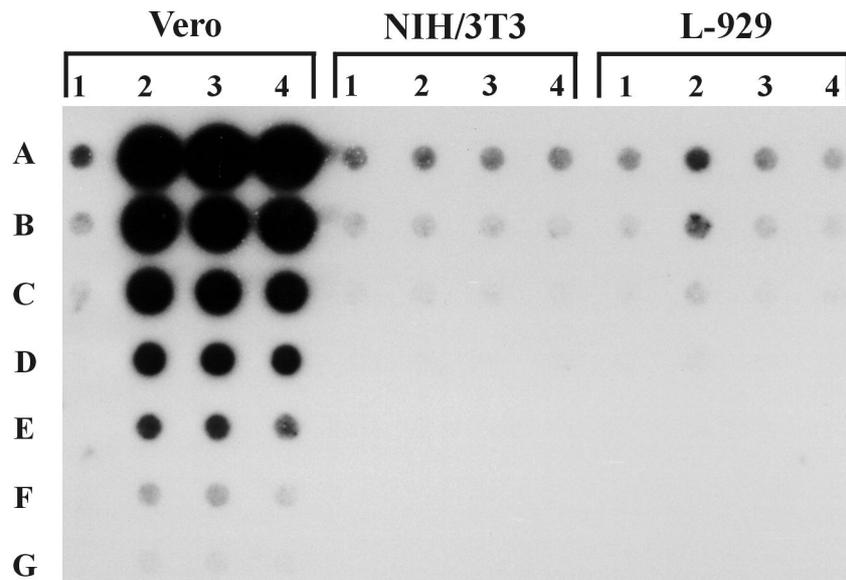
#### 4.5.4 Replikation der viralen DNA

Die Replikation des ORFV-Genoms in infizierten Zellen beginnt vor der Expression später viraler Gene. Der Nachweis der Expression später Gene in den infizierten Maus-Zelllinien deutete demzufolge darauf hin, daß auch eine Replikation der viralen DNA stattfindet. Dies wurde im folgenden Experiment vergleichend zu permissiven Vero-Zellen untersucht. Die Zellen wurden mit der Rekombinante D-gC3 mit einer *moi* von 10 infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten p.i. geerntet. Nach Aufschluß der Zellen durch dreimaliges Frieren/Tauen wurden je 100 µl der Suspension in einer Verdünnungsreihe (log 3) mit Hilfe einer Dot-Blotapparatur auf eine Nylonmembran aufgetragen (siehe 3.10.2). Zur Blothybridisierung wurde die ORFV-B2L-spezifische Sonde verwendet (Abb. 4.12). Anschließend wurde die Signalintensität für jede Verdünnungsstufe densitometrisch

bestimmt. Zum Zeitpunkt 1 Stunde nach der Infektion ( $t_0$ ) war die nachweisbare Menge an viraler DNA in den Lysaten aller Zelllinien annähernd identisch, was auf eine vergleichbare Infektionsrate in allen Fällen schließen läßt. Es konnte gezeigt werden, daß 24 Stunden nach der Infektion in Vero-Zellen eine Zunahme der Gesamtmenge viraler DNA um mehr als das 81-fache gegenüber dem Zeitpunkt  $t_0$  stattfand. Eine weitere Zunahme 36 bzw. 48 Stunden p.i. war nicht festzustellen. Demzufolge war 24 Stunden p.i. die virale DNA-Replikation vollständig abgeschlossen. Bei NIH/3T3 Zellen war im Gegensatz dazu über den Zeitraum von 48 Stunden p.i. keinerlei Replikation der viralen DNA meßbar. Bei L-929-Zellen war lediglich 24 Stunden p.i. eine ca. 3-fache Zunahme der Menge an viraler DNA gegenüber der Ausgangskonzentration zum Zeitpunkt  $t_0$  zu erkennen.

Die Replikation der viralen DNA wurde in identischer Weise nach Infektion der verschiedenen Zelllinien mit einer  $moi$  von 1 untersucht (nicht gezeigt). Die nachweisbare Menge an viraler DNA 1 Stunde nach der Infektion ( $t_0$ ) war auch hier in allen Zelllinien vergleichbar, jedoch, wie erwartet, deutlich geringer als bei einer  $moi$  von 10. Bei Vero-Zellen war 24 Stunden nach der Infektion bereits eine Zunahme der Menge an Virus-DNA um das 240-fache nachweisbar und 36 Stunden p.i. war die maximale Konzentration erreicht, die ca. das 700-fache des Ausgangswerts zum Zeitpunkt  $t_0$  betrug. Bei identischer Dauer der Autoradiographie war dabei die Intensität der Signale identisch zur jeweiligen Signalintensität bei einer  $moi$  von 10. Damit konnte ein Infektionsdosis-unabhängiges Maximum der Konzentration an ORFV-DNA in permissiven Vero-Zellen gezeigt werden. Die höheren Induktionskoeffizienten der Zunahme an viraler DNA über die Zeit bei  $moi$  1 gegenüber  $moi$  10 sind demzufolge ausschließlich auf die unterschiedliche Ausgangskonzentration an Virus-DNA zurückzuführen.

Auch bei  $moi$  1 war in infizierten NIH/3T3-Zellen keine Replikation der Virus-DNA festzustellen. Außerdem war auch bei L-929-Zellen keine eindeutige Zunahme an viraler DNA über den Zeitraum von 48 Stunden p.i. meßbar.



**Abb. 4.12:** Untersuchung der DNA-Replikation der ORFV-Rekombinante D-gC3 in den murinen Fibroblasten-Zelllinien NIH/3T3 und L-929 im Vergleich zu ORFV-permissiven Vero-Zellen. Die Zellen wurden mit einer  $moi$  von 10 infiziert und zu den Zeitpunkten 1 h (Spuren 1), 24 h (Spuren 2), 36 h (Spuren 3) sowie 48 h (Spuren 4) nach der Infektion geerntet. Die Lysate der infizierten Zellen wurden ausgehend von der unverdünnten Suspension (Reihe A) in einer Verdünnungsreihe ( $\log 3$ ) bis Reihe G auf eine Nylonmembran aufgetragen. Die Southern-Blothybridisierung zum Nachweis der viralen DNA erfolgte mittels des ORFV-B2L-spezifischen PCR-Produkts als radioaktiv markierter Sonde.

#### 4.5.5 Ein-Schritt-Wachstumskurve

Die geringe bzw. nicht-nachweisbare virale DNA-Replikation in den untersuchten murinen Zellen ließ die Produktion infektiöser Virusnachkommen unwahrscheinlich erscheinen. Um dies zu überprüfen wurden Ein-Schritt-Wachstumskurven für D-gC3-infizierte NIH/3T3- und L-929-Zellen im Vergleich zu infizierten Vero-Zellen erstellt. Die Zellen wurden mit einer  $moi$  von 1 bzw. 10 infiziert. Die erreichten Virustiter wurden für Kulturüberstände und Zelllysate zu unterschiedlichen Zeitpunkten p.i. separat bestimmt (Abb. 4.13). Ausgehend von der Anzahl infektiöser Partikel nach einstündiger Adsorption der Viren ( $t_0$ ) war bei einer  $moi$  von 10 bei Vero-Zellen eine 59-fache Zunahme intrazellulärer bzw. zellassoziierter infektiöser Partikel 24 Stunden p.i. nachweisbar. Bis zum Zeitpunkt 48 Stunden p.i. war das 94-fache des Virustiters zum Zeitpunkt  $t_0$  erreicht. Die Zunahme intrazellulärer Viruspartikel stimmt damit sehr gut mit der Replikationsrate der viralen DNA überein (s. 4.5.4). Im Überstand war erst 36 Stunden p.i. eine signifikante Erhöhung der Anzahl infektiöser Partikel

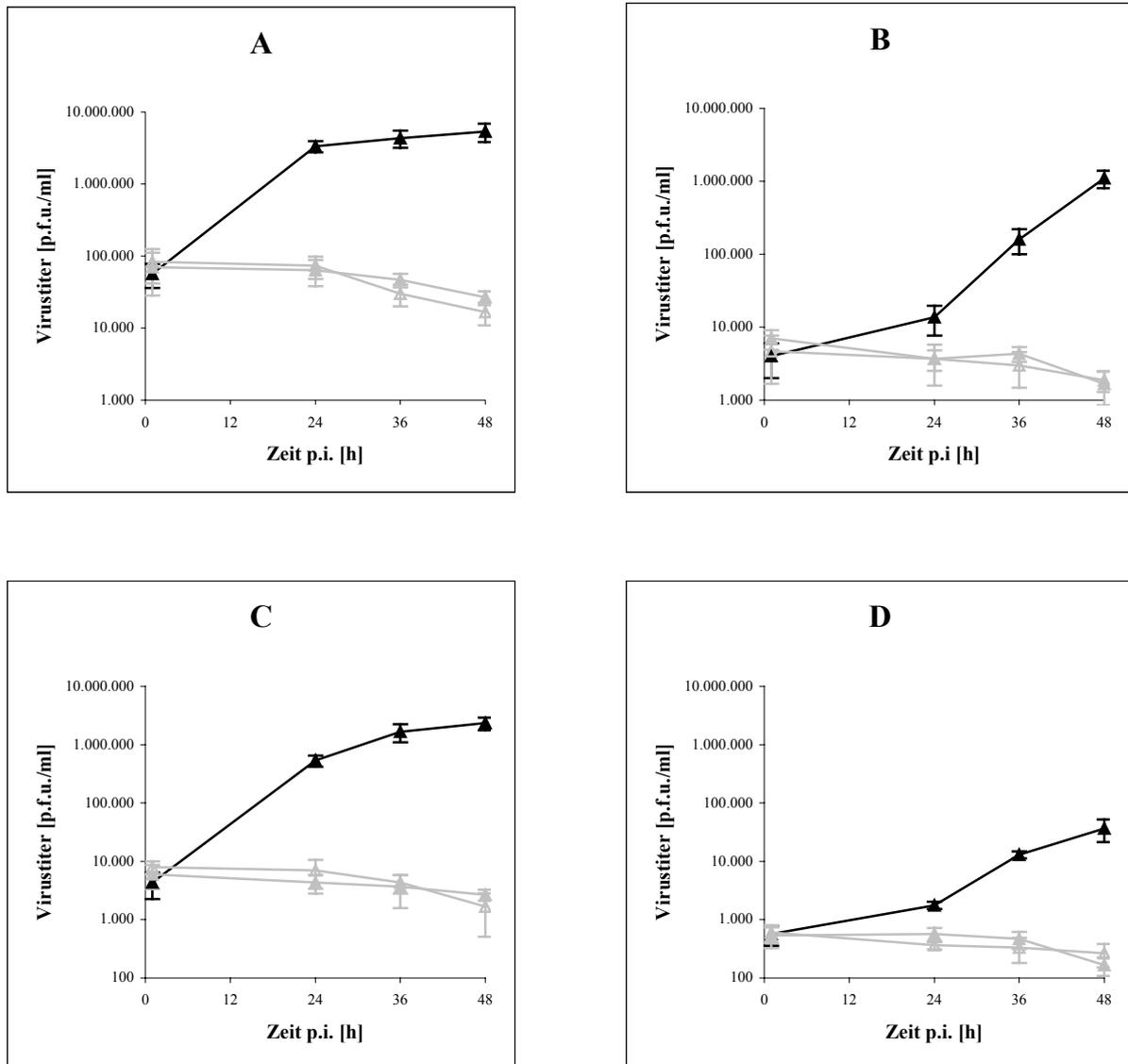
um das 40-fache gegenüber dem Titer zum Zeitpunkt  $t_0$  nachweisbar. Bis 48 Stunden p.i. war die Menge an Virusnachkommen um das 350-fache erhöht. Wie zu erwarten, ist demnach die Freisetzung der extrazellulären umhüllten Virusnachkommen (EEV) gegenüber der Zunahme intrazellulärer reifer Partikel (IMV) zeitlich verzögert. Die Gesamtmenge nachweisbarer Virionen im Kulturüberstand ist im Vergleich zur Gesamtmenge der IMV nach 48 Stunden um 75% geringer. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß zu späteren Zeitpunkten der Anteil der EEV weiter ansteigt.

Die Anzahl nachweisbarer infektiöser Partikel war bei den beiden murinen Zelllinien zum Zeitpunkt  $t_0$  vergleichbar zu infizierten Vero-Zellen. Im Gegensatz zu letzteren war jedoch weder bei NIH/3T3- noch bei L-929-Zellen eine Produktion intrazellulärer bzw. zellassoziierter infektiöser Virusnachkommen über den Zeitraum von 48 Stunden p.i. zu erkennen. Dementsprechend war auch eine Freisetzung infektiöser Virusnachkommen in den Kulturüberstand über diesen Zeitraum nicht nachweisbar. Spätere Zeitpunkte nach der Infektion wurden bislang nicht untersucht, da insbesondere die NIH/3T3 und in geringerem Ausmaß auch die L-929-Zellen zu diesem Zeitpunkt bereits einen deutlichen cytopathogenen Effekt aufwiesen. Eine Produktion infektiöser Virusnachkommen zu späteren Zeitpunkten erscheint deshalb unwahrscheinlich.

Ein vergleichbares Ergebnis wurde auch bei  $moi$  1 erhalten. Die Ausgangsmenge an nachweisbaren Viruspartikeln war gegenüber der  $moi$  10 wie erwartet ca. 10-fach reduziert. Bei Vero-Zellen war wiederum eine kontinuierliche Zunahme an zellassozierten bzw. intrazellulären Viruspartikeln über den gesamten Zeitraum nachweisbar. Nach 48 Stunden war der Virustiter um das 540-fache gegenüber dem Titer 1 Stunde p.i. erhöht und erreichte einen vergleichbaren Wert wie das Maximum bei  $moi$  10. Dies entspricht den Ergebnissen der Replikation viraler DNA und kann durch einen  $moi$ -unabhängigen Plateaueffekt der Virusreplikation erklärt werden. Im Überstand der Vero-Zellen kam es nach Infektion mit  $moi$  1 ebenfalls zur kontinuierlichen Zunahme an Virusnachkommen, wobei 48 Stunden p.i. das 65-fache des Ausgangstiters erreicht war. Die Gesamtmenge der EEV entsprach zu diesem Zeitpunkt jedoch lediglich 1,5 % der nachweisbaren Menge an IMV, wobei auch hier eine mögliche Zunahme der EEV zu späteren Zeitpunkten nicht untersucht wurde. Auch bei  $moi$  1 war weder bei NIH/3T3 noch bei L-929-Zellen eine Bildung intrazellulärer, infektiöser Virusnachkommen oder die Freisetzung infektiöser Virusnachkommen in den Kulturüberstand nachweisbar.

## Ergebnisse

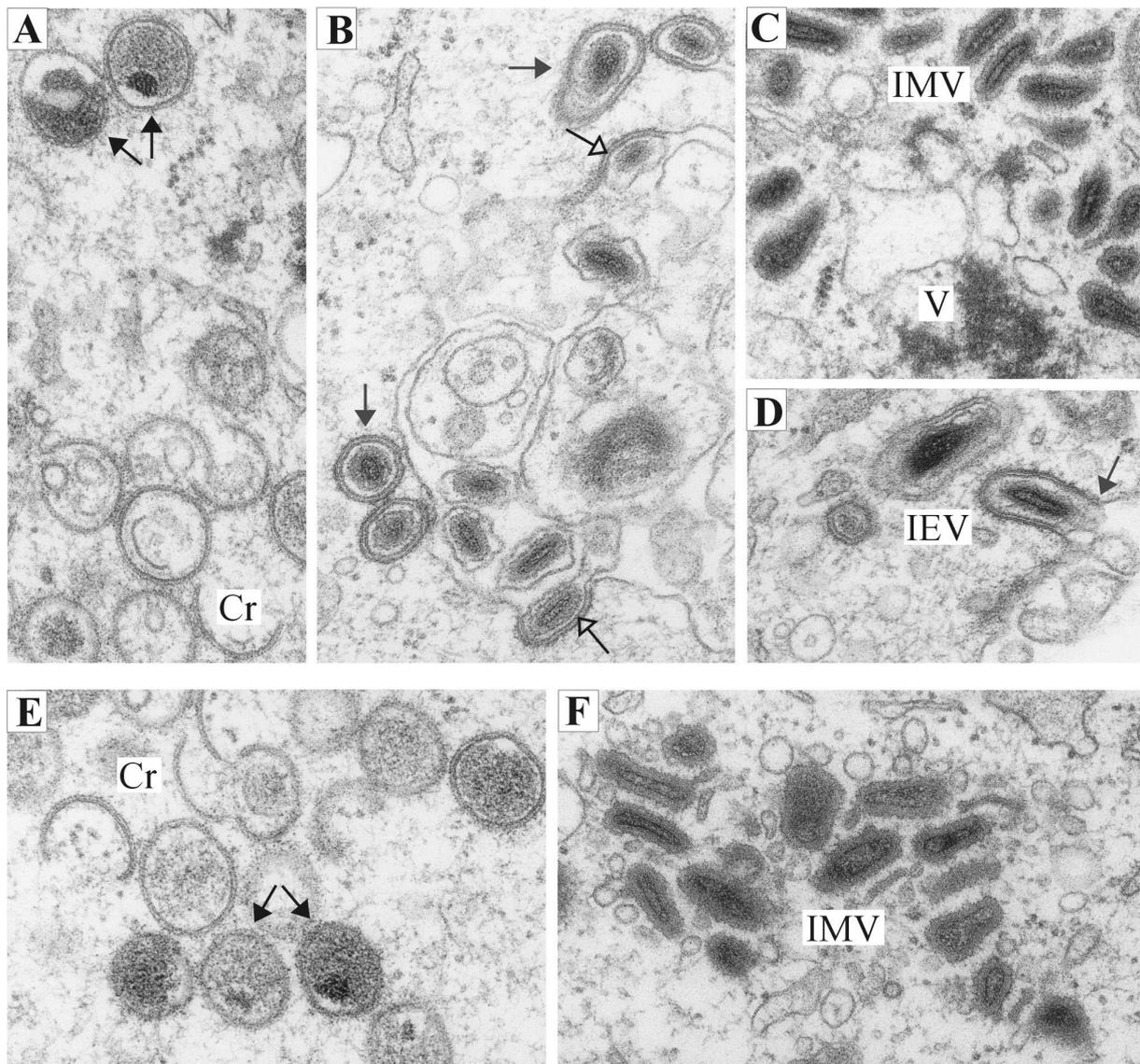
Die in Abbildung 4.13 dargestellten Daten stellen die Mittelwerte aus Titrationsen der einzelnen Zellysate und Kulturüberstände in Triplikaten dar. Diese Ergebnisse ließen sich darüber hinaus in zwei weiteren, identisch durchgeführten Experimenten bestätigen.



**Abb. 4.13:** Ein-Schritt-Wachstumskurven zur Untersuchung der Virusvermehrung der ORFV-Rekombinante D-gC3 in den murinen Zelllinien NIH/3T3 ( $\Delta$ ) und L-929 ( $\blacktriangle$ ) im Vergleich zu permissiven Vero-Zellen ( $\blacktriangle$ ). Die Zellen wurden mit einer moi von 10 (A und B) oder 1 (C und D) infiziert. Zu den Zeitpunkten 1 h, 24 h, 36 h und 48 h nach der Infektion wurde der erreichte Virustiter jeweils separat für die Zellysate (A und C) sowie für die Kulturüberstände (B und D) bestimmt. Die Standardabweichung beruht auf der Titration der einzelnen Lysate und Überstände in Triplikaten.

#### 4.5.6 Virusmorphogenese

Aufgrund der Ergebnisse hinsichtlich der Replikation der viralen DNA und der Produktion infektiöser Virusnachkommen war zu vermuten, daß die Morphogenese des ORFV in den untersuchten murinen Zellen bereits in einem frühen Stadium unterbrochen wird. Um dies zu überprüfen wurden L-929-Zellen mit einer *moi* von 10 mit der Rekombinante D-gC3 infiziert. Die Zellen wurden 16 Stunden p.i. fixiert und elektronenmikroskopisch analysiert, wobei zum Vergleich D-gC3-infizierte Vero-Zellen zum selben Zeitpunkt dienten. In Abbildung 4.14 ist zu sehen, daß in Vero-Zellen vergleichbare Stadien der Virusmorphogenese auftreten, wie sie bereits für andere Pockenviren beschrieben wurden (Moss, 1996a; Stannard et al., 1998). Es sind sichelförmige Doppelmembranstrukturen (Crescents) zu erkennen, die nach der Reifung zu einer geschlossenen Kugelform dichtes granuläres Material beinhalten (A). Dieses elektronendichte Material stammt von sogenannten Virosomen und ist reich an viralen Proteinen und viraler DNA. Nach der weiteren Reifung der IV weisen die intrazellulären reifen Partikel (IMV) eine eher rechteckige Form auf (C). Bei zahlreichen IMV war eine weitere Umhüllung mit der Membran eines subzellulären Kompartiments und damit die Entstehung von intrazellulären umhüllten Virionen (IEV) zu erkennen (B). Teilweise konnten auch IEV an der Zellperipherie identifiziert werden, wobei deren äußere Doppelmembran vermutlich die Fusion mit der Plasmamembran und die Freisetzung der Virionen aus der infizierten Zelle ermöglicht (D). Auch in L-929-Zellen waren die sichelförmigen Membranstrukturen, sowie die Kondensation des Virosomenmaterials in unreifen Virionen deutlich nachweisbar (E). Überraschenderweise konnten IMV-ähnliche Partikel in vergleichbarer Menge wie in Vero-Zellen identifiziert werden, wobei auch keine offensichtlichen strukturellen Unterschiede zu IMV-ähnlichen Partikeln in Vero-Zellen festzustellen waren (F). Eine zusätzliche Umhüllung der IMV an subzellulären Kompartimenten war dagegen nicht zu erkennen. Demzufolge waren an der Peripherie der infizierten L-929-Zellen auch keine reifen Partikel mit einer IEV-ähnlichen Struktur nachweisbar.



**Abb. 4.14:** Dargestellt ist die elektronenmikroskopische Analyse von Ultradünnschnitten D-gC3-infizierter Vero- (A-D) bzw. L-929-Zellen (E und F) zum Zeitpunkt 16 Stunden p.i. In Abbildung A und E sind sichelförmige Membranstrukturen (Crescents, Cr) zu sehen. Diese entwickeln sich zu kugelförmigen Strukturen mit eingelagertem elektronendichtem Material, welches von sogenannten Virosomen stammt (V; siehe C). Die Pfeile markieren Partikel, bei denen die Kondensation des Virosomenmaterials unterschiedlich weit fortgeschritten ist. In Abbildung C sind intrazelluläre reife Virionen (IMV) dargestellt. Ein Teil der IMV erhält an einem subzellulären Kompartiment eine zusätzliche Membranhülle (B; weiße Pfeile), was zur Bildung intrazellulärer umhüllter Virionen (IEV) führt (B; schwarze Pfeile). Die IEV können durch Fusion mit der Plasmamembran von der infizierten Zelle freigesetzt werden (D; schwarzer Pfeil). In L-929-Zellen waren zwar ebenfalls Crescents (E) und IMV-ähnliche Strukturen (F) jedoch keine IEV nachweisbar. Die rechts unten abgebildete Maßstrecke entspricht 300 nm.

## 4.6 Immunogenität und Protektivität der ORFV-Vektorvakzinen in der Maus

### 4.6.1 Bestimmung der letalen Dosis des PRV-Stammes NIA-3

Die Maus gilt als höchst empfänglich für die PRV-Infektion. Es wurde beschrieben, daß bereits eine geringe Dosis des virulenten PRV-Stammes NIA-3 zum Tod der infizierten Mäuse innerhalb von drei Tagen führt (Bianchi et al., 1998). Für die Bestimmung der protektiven Kapazität der ORFV-Vektorvakzinen war die Kenntnis der letalen PRV-Dosis in den hier untersuchten Mäusestämmen notwendig. Jeweils 4 Mäuse der Inzuchtstämme Balb/c, C57Bl/6 und 129/Sv/Ev wurden hierfür mit 3, 10, 30, 100, 300 oder 1000 pfu des virulenten PRV Wildtypstammes NIA-3 intraperitoneal infiziert. In Abhängigkeit von der Infektionsdosis wurde für die einzelnen Versuchstiergruppen der prozentuale Anteil der überlebenden Tiere ermittelt. Dies ermöglichte die Erstellung einer "Best-Fit"-Standard-Regression und die Ermittlung der Dosis, die in 50% Mortalität der Tiere resultiert ( $LD_{50}$ ).

Bei Balb/c-Mäusen war die Infektion ab einer Dosis von 30 pfu für alle Tiere letal, woraus sich eine  $LD_{100}$  von  $\leq 30$  pfu ergibt. Außerdem konnte bei einem Bestimmtheitsmaß der Regression von  $r = 0,98$  eine  $LD_{50}$  von 3 pfu errechnet werden. Es wurde eine Zeitabhängigkeit der Mortalität von der Infektionsdosis festgestellt, wonach bei einer Infektionsdosis von 30 bis 100 pfu die Tiere durchschnittlich ca. 15 Stunden länger überlebten als bei einer Dosis von mindestens 300 pfu, die im Durchschnitt nach 77 Stunden zum Tod der Tiere führte.

Für C57Bl/6-Mäuse konnte eine  $LD_{100}$  von  $\leq 300$  pfu festgelegt werden, die  $LD_{50}$  beträgt 40 pfu ( $r = 0,96$ ). Damit liegen beide Werte um ca. das Zehnfache höher als bei Balb/c-Mäusen.

Die 129/Sv/Ev-Wildtypmäuse wiesen mit einer  $LD_{100}$  von  $\leq 300$  pfu und einer  $LD_{50}$  von 55 pfu ( $r = 0,91$ ) annähernd identische Werte auf, wie C57Bl/6-Mäuse und waren demzufolge gegenüber Balb/c-Mäusen ebenfalls deutlich weniger empfänglich für die PRV-Infektion.

Im Folgenden wurde für alle Experimente die Belastungsinfektion mit  $10^3$  pfu des Stammes NIA-3 durchgeführt. Dies entspricht nach obiger Darstellung für Balb/c-Mäuse einer Dosis von mindestens 30  $LD_{100}$  bzw. mehr als 300  $LD_{50}$ . Bei C57Bl/6- und 129/Sv/Ev-Mäusen entspricht diese Dosis ca. 3  $LD_{100}$  bzw. ca. 20  $LD_{50}$ .

#### 4.6.2 Simultanimmunisierung

Das folgende Experiment beschreibt die simultane Vakzinierung von Mäusen mit den PRV-spezifischen Rekombinanten D-gC3 und D-gD, die *in vitro* die vollständigen PRV Glykoproteine gC bzw. gD exprimieren.

Im Abstand von zwei Wochen wurden Tiere der verschiedenen Stämme gleichzeitig mit je  $10^7$  TCID<sub>50</sub> der beiden Rekombinanten intramuskulär immunisiert. Als Negativkontrolle dienten nicht-immunisierte Tiere bzw. Tiere die mit  $10^7$  TCID<sub>50</sub> des parentalen Virus D1701-VrV immunisiert wurden. Als Positivkontrolle wurden Tiere mit  $10^7$  pfu des kommerziellen PRV Impfstammes Begonia ebenfalls intramuskulär immunisiert. Wiederum 2 Wochen nach der letzten Immunisierung wurden die Tiere zur Serumgewinnung geblutet und anschließend PRV-infiziert.

#### Serologische Analysen

Direkt vor der Belastungsinfektion wurde Serum von allen Mäusen gewonnen und mittels ELISA auf das Vorhandensein PRV-spezifischer Antikörper untersucht. Es wurde dabei zwischen Antikörpern der Subklassen IgG1 und IgG2a differenziert. Die mittlere OD der Seren der dreifach D1701-VrV-immunisierten Tiere diente als Referenz für die spezifische Titerbestimmung. Die folgenden Titerangaben stellen die Mittelwerte der Testergebnisse mehrerer Tiere dar, wobei die jeweilige Anzahl getesteter Tiere Tab. 4.1 zu entnehmen ist.

In Abbildung 4.15 A sind die durchschnittlichen Antikörpertiter für Balb/c-Mäuse nach Immunisierung mit PRV-Begonia bzw. nach Simultanimmunisierung mit D-gC3 und D-gD dargestellt. Die einmalige Immunisierung mit PRV-Begonia führte zu einem ca. 20-fach höheren PRV-spezifischen IgG2a- (1:8500) gegenüber IgG1- (1:480) Antikörpertiter. Nach einmaliger Immunisierung mit den ORFV-Vektorvakzinen wurden durchschnittliche Antikörpertiter von 1:4300 (IgG2a) und 1:530 (IgG1) erhalten. Unter Berücksichtigung der Standardabweichung sind diese Werte vergleichbar denen der Begonia-immunisierten Tiere, d.h. auch hier war eine Dominanz der PRV-spezifischen IgG2a Antikörper feststellbar. Die zweifache Immunisierung mit den ORFV-Vektorvakzinen führte gegenüber einmaliger Immunisierung zu einer Erhöhung der Konzentration der PRV-spezifischen IgG1-Antikörper um das 16-fache. Dagegen waren die spezifischen IgG2a-Antikörpertiter nur um den Faktor 4 erhöht womit eine Angleichung der Titer der beiden IgG-Subklassen festzustellen war. Die

dreimalige Immunisierung mit den ORFV-Vektorvakzinen hatte gegenüber zweimaliger Immunisierung keinen weiteren nennenswerten Einfluß auf die Konzentration der PRV-spezifischen Serumantikörper.

Bei 129/Sv/Ev-Mäusen (Abb. 4.15 B) war nach Immunisierung mit PRV Begonia der Titer PRV-spezifischer IgG2a-Antikörper mit 1:2600 im Vergleich zu Balb/c-Mäusen zwar geringer, jedoch war auch hier eine ca. 8-fach höhere Konzentration gegenüber IgG1-Antikörpern mit einem Titer von 1:320 feststellbar. Nach einmaliger Simultanimmunisierung von 129/Sv/Ev-Mäusen mit D-gC3 und D-gD wurden Antikörpertiter von 1:430 (IgG1) bzw. 1:2100 (IgG2a) und damit wiederum vergleichbare Konzentrationen wie bei Balb/c-Mäusen gemessen. Auch hier war demnach eine Dominanz PRV-spezifischer IgG2a über IgG1 Antikörper vorhanden. Nach der zweiten Immunisierung erhöhten sich die PRV-spezifischen Antikörpertiter auf jeweils 1:17000. Vergleichbar zu Balb/c-Mäusen wurde damit auch bei 129Sv/Ev-Mäusen eine Angleichung der Titer PRV-spezifischer IgG1- bzw. IgG2a-Antikörper festgestellt. Auch bei den 129/Sv/Ev-Mäusen führte eine dritte Immunisierung mit den beiden ORFV-Vektorvakzinen zu keiner weiteren Erhöhung der PRV-spezifischen IgG-Antikörpertiter.

Abbildung 4.15 C zeigt, daß die Immunisierung von C57Bl/6-Mäusen mit PRV-Begonia PRV-spezifische IgG1-Antikörper zu einem durchschnittlichen Titer von 1:370 induzierte, was den Beobachtungen bei den beiden vorherigen Mäusestämmen entspricht. Der mittlere PRV-spezifische IgG2a-Antikörpertiter lag mit 1:80 dagegen an der Nachweisgrenze und war im Vergleich zu Balb/c- und 129/Sv/Ev-Mäusen signifikant geringer. Nach einmaliger Simultanimmunisierung mit den ORFV-Rekombinanten wurden bei C57Bl/6-Mäusen höhere PRV-spezifische IgG1-Antikörpertiter (1:2600), jedoch ebenfalls signifikant geringere IgG2a-Antikörpertiter (1:200) als bei Balb/c- oder 129/Sv/Ev-Mäusen gemessen. Die zweimalige Simultanimmunisierung führte zwar zu einem Anstieg der Konzentration beider PRV-spezifischen IgG-Subklassen, wobei jedoch der mittlere Titer der IgG2a-Antikörper mit 1:1280 wiederum deutlich unter den vergleichbaren Werten für Balb/c- bzw. 129/Sv/Ev-Mäuse blieb. Nach der dritten Immunisierung wurden PRV-spezifische IgG1-Antikörper in vergleichbarer Konzentration wie bei den beiden anderen Mäusestämmen gemessen, wogegen die IgG2a-Antikörpertiter mit durchschnittlich 1:2100 nachwievor signifikant geringer blieben.

Die Seren wurden darüberhinaus bezüglich der Neutralisation des PRV Stammes NIA-3 *in vitro* im komplementunabhängigen Serumneutralisationstest getestet (Abb. 4.16). Wie erwartet konnten keine PRV-spezifischen, neutralisierenden Antikörper in Seren von Mäusen nach zweimaliger Immunisierung mit D1701-VrV nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Auch bei Untersuchung des Serums der Mäuse nach einmaliger Immunisierung mit PRV-Begonia oder Simultanimmunisierung mit D-gC3 und D-gD war keine Virusneutralisation feststellbar. Erst nach der zweiten Immunisierung mit den ORFV-Rekombinanten wurde das Virus bis zu einer Serumverdünnung von ca. 1:30 (Balb/c und 129/Sv/Ev) bzw. 1:80 (C57Bl/6) neutralisiert. Nach dreimaliger Immunisierung stieg der Titer neutralisierender Antikörper auf durchschnittlich 1:100 (Balb/c), 1:160 (129/Sv/Ev) bzw. 1:130 (C57Bl/6) an.

### **Mortalität nach Belastungsinfektion**

In Tabelle 4.1 ist die Mortalität der Tiere nach Immunisierung mit den PRV-spezifischen Vektorvakzinen im Vergleich zu Kontrolltieren dargestellt. Die einmalige Immunisierung der Mäuse mit PRV-Begonia als Positivkontrolle führte, wie erwartet, zu vollständigem Schutz gegen die letale intraperitoneale NIA-3-Infektion. Dagegen starben die nicht-immunisierten Tiere aller untersuchten Mäusestämme innerhalb eines Zeitraums von 3-4 Tagen nach der Infektion. Lediglich eine nicht-immunisierte 129/Sv/Ev überlebte die Infektion, was aufgrund des schweren Krankheitsverlaufs bei den übrigen Kontrolltieren dieses Stammes jedoch vermutlich auf einen Fehler bei der Belastungsinfektion zurückzuführen ist. Darüberhinaus war auch keines der Tiere, die ein- oder mehrfach mit dem parentalen D1701-VrV immunisiert worden waren, gegen die Belastungsinfektion geschützt.

Von den Balb/c-Mäusen, die einmal mit D-gC3 und D-gD immunisiert worden waren, starben 2 von 10 Tieren, wobei der Zeitpunkt des Todes am 5. bzw. 6. Tag nach der Infektion gegenüber den Kontrolltieren deutlich verzögert war. Die übrigen Tiere dieser Gruppe überlebten die Belastungsinfektion ohne auffällige klinische Symptome über den gesamten Beobachtungszeitraum von 8 Wochen. Spätestens nach der zweiten Simultanimmunisierung mit beiden Rekombinanten wurde ein vollständiger Schutz gegen die NIA-3-Infektion erhalten. Im Gegensatz zu Balb/c-Mäusen überlebten 100% der 129/Sv/Ev- und C57Bl/6-Mäuse bereits nach einmaliger Simultanimmunisierung mit D-gC3 und D-gD die nachfolgende PRV-Infektion und dementsprechend waren auch nach Mehrfachimmunisierung alle Tiere dieser Stämme gegen die Infektion geschützt.

### **4.6.3 Separate Immunisierung mit den einzelnen Vektorvakzinen**

#### **4.6.3.1 Untersuchung der Rekombinanten D-gC3 und D-gD**

Die Untersuchung von Mäusen nach Einzelimmunisierung mit den Rekombinanten D-gC3 bzw. D-gD sollte Aufschluß darüber geben, welchen Anteil die einzelnen Rekombinanten an der humoralen und vor allem an der protektiven Immunantwort gegen PRV leisten. Wildtypmäuse der verschiedenen Mäusestämme wurden in zweiwöchigen Abständen jeweils separat mit  $10^7$  TCID<sub>50</sub> der Rekombinanten D-gC3 oder D-gD intramuskulär immunisiert. Auf dreimalige Immunisierung wurde verzichtet, da bei Simultanimmunisierung mit den beiden Rekombinanten bereits nach zweimaliger Immunisierung die Tiere zu 100% gegen die PRV Infektion geschützt waren und, mit Ausnahme der C57Bl/6-Mäuse, das Maximum der PRV-spezifischen IgG-Antikörpertiter erreicht war.

#### **Serologische Analysen**

Die Tiere wurden wiederum direkt vor der Belastungsinfektion serologisch untersucht (Abb. 4.15). Nach einmaliger Immunisierung mit D-gC3 wurden bei allen untersuchten Mäusestämmen PRV-spezifische IgG1- bzw. IgG2a-Antikörpertiter in ähnlicher Höhe wie im Serum von Mäusen nach einmaliger Simultanimmunisierung mit D-gC3 und D-gD gemessen. Außerdem führte die zweimalige Immunisierung mit D-gC3 in allen Fällen zu einem Anstieg der PRV-spezifischen IgG-Antikörpertiter auf nahezu identische Werte, wie sie bei zweifach simultan immunisierten Tieren der jeweiligen Mäusestämme erreicht wurden. Auch hier waren demnach maximale Antikörperkonzentrationen beider IgG-Subklassen bei Balb/c- und 129Sv/Ev-Mäusen, sowie insgesamt niedrigere Konzentrationen mit einer Dominanz IgG1-spezifischer Antikörper bei C57Bl/6-Mäusen zu messen.

Im Gegensatz dazu waren nach einmaliger Immunisierung der verschiedenen Mäusestämme mit D-gD keine PRV-spezifischen Antikörpertiter messbar und lagen demnach unter der Testgrenze einer Serumverdünnung von 1:80. Auch nach zweimaliger Immunisierung mit dieser Rekombinante waren bei Balb/c-Mäusen nur sehr geringe durchschnittliche Antikörpertiter von 1:320 (IgG1), bzw. 1:210 (IgG2a) messbar. Die 129/Sv/Ev-Mäuse wiesen durchschnittliche Antikörpertiter von 1:200 (IgG1) bzw. 1:380 (IgG2a) auf. Bei C57Bl/6-Mäusen waren entsprechend geringe PRV-spezifische IgG1-Antikörpertiter von durchschnittlich 1:130 nachweisbar. Die spezifische IgG2a-Antikörperkonzentration lag unter

der Nachweisgrenze. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß auch die Simultanimmunisierung mit beiden ORFV-Vektorvakzinen PRV-spezifische Serumantikörper induzierte, die zum größten Teil spezifisch gegen das Glykoprotein gC gerichtet sind.

Analog zu den simultanimmunisierten Mäusen der verschiedenen Stämme wurde auch die Konzentration PRV-spezifischer neutralisierender Serumantikörper nach separater Immunisierung mit den Rekombinanten D-gC3 bzw. D-gD quantifiziert (Abb. 4.16). Nach einmaliger Immunisierung mit den einzelnen ORFV-Rekombinanten konnten wie bei den simultanimmunisierten Mäusen keine neutralisierenden Antikörper nachgewiesen werden. Ein geringer durchschnittlicher Titer neutralisierender Antikörper von 1:20 (Balb/c), 1:30 (129/Sv/Ev) bzw. 1:50 (C57Bl/6) war im Serum zweifach D-gC3-immunisierter Tiere nachweisbar. Die zweifache Immunisierung mit D-gD führte bei Balb/c-Mäusen nicht zur Produktion neutralisierender Antikörper in nachweisbaren Mengen, wogegen bei 129/Sv/Ev- bzw. C57Bl/6-Mäusen wiederum geringe Titer neutralisierender Antikörper von durchschnittlich 1:30 bzw. 1:50 erreicht wurden.

Trotz der hohen Diskrepanz der induzierten Mengen an PRV-spezifischen IgG-Serumantikörpern, waren demzufolge beide Rekombinanten in der Lage, vergleichbare, wenn auch geringe Konzentrationen an neutralisierenden Serumantikörpern zu induzieren.

### **Mortalität immunisierter Tiere nach Belastungsinfektion**

In Tabelle 4.1 ist der jeweilige Anteil der Tiere dargestellt, die nach separater Immunisierung mit den einzelnen ORFV-Vektorvakzinen die anschließende PRV-Infektion überlebten. Nach einmaliger Immunisierung von Balb/c-Mäusen mit D-gC3 überlebten 6 von 8 Tieren die NIA-3-Infektion ohne klinische Symptome. Die beiden anderen Tiere dieser Gruppe starben um 20 bzw. 44 Stunden später als die nicht-immunisierten bzw. D1701-VrV-immunisierten Kontrolltiere, bei denen der Tod durchschnittlich nach 90 Stunden eintrat. Alle Tiere, die zweimal mit D-gC3 immunisiert worden waren, überlebten die Belastungsinfektion ohne Symptome bis zum Ende des Beobachtungszeitraums von sechs Wochen. Dieses Resultat steht im Einklang mit den Beobachtungen bei Balb/c-Mäusen nach Simultanimmunisierung mit D-gC3 und D-gD.

Trotz nicht bzw. nur in geringen Konzentrationen nachweisbarer PRV-spezifischer IgG-Antikörper überlebten 2 von 8 Balb/c-Mäusen nach einmaliger, bzw. 4 von 8 Mäusen nach zweimaliger Immunisierung mit D-gD die PRV-Infektion. Bei den Tieren, die die Infektion

nicht überlebten, war wiederum ein verzögerter Eintritt des Todes im Vergleich zu den Kontrolltieren zu beobachten.

Die 129/Sv/Ev-Mäuse und C57Bl/6 überlebten die Infektion nach einmaliger oder zweimaliger Immunisierung mit D-gC3 ohne Ausnahme. Im Gegensatz zu den Balb/c-Mäusen waren die Mäuse dieser Stämme auch nach einmaliger Immunisierung mit D-gD bereits fast vollständig geschützt und die zweite D-gD-Immunisierung resultierte im vollständigen Schutz aller getesteten Tiere dieser beiden Stämme.

### **4.6.3.2 Untersuchung der Rekombinanten D-gC1 und D-gC2**

Wie oben beschrieben (s. 4.4) resultiert die C-terminale Deletion des D-gC1-kodierten gC-Fragments *in vitro* in einer verringerten Genexpressionsrate und in Veränderungen hinsichtlich der posttranslationalen Modifikationen. Im Folgenden wurde untersucht, wie sich dies auf die Immunogenität des gC-Fragments *in vivo* auswirkt. Auch die Immunogenität der Rekombinante D-gC2 wurde überprüft, da nicht ausgeschlossen werden kann, daß aufgrund der N- und C-terminalen Deletionen des D-gC2-kodierten Proteinfragments eventuell eine frühe posttranslationale Degradation der gC-spezifischen Polypeptide in infizierten Zellen stattfindet. In diesem Fall wäre zwar ein Nachweis des Genprodukts mittels Immunfärbung nicht möglich, jedoch könnte die Präsentation gC-spezifischer Peptide über MHC-Moleküle der infizierten Zellen möglicherweise trotzdem zur Induktion einer gC-spezifischen Immunantwort führen.

Es wurden Balb/c-Mäuse entweder einmal oder zweimal mit  $10^7$  TCID<sub>50</sub> der Rekombinanten D-gC1 oder D-gC2 intramuskulär immunisiert und anschließend mit  $10^3$  pfu PRV NIA-3 infiziert.

### **Serologische Analysen**

Zwei Wochen nach der letzten Immunisierung wurden die Tiere geblutet und die Seren der Tiere der einzelnen Gruppen wurden in diesem Fall vereinigt. Die Bestimmung der Antikörpertiter mittels ELISA (nicht dargestellt) ergab nach einmaliger Immunisierung mit D-gC1 einen durchschnittlichen PRV-spezifischen Antikörpertiter von 1:640 für die beiden Subklassen IgG1 und IgG2a. Der Titer spezifischer IgG2a-Antikörper war damit geringer als bei entsprechender Immunisierung von Balb/c-Mäusen mit der Rekombinante D-gC3, die das

vollständige Glykoprotein exprimiert. Demzufolge war in diesem Fall keine Dominanz von IgG2a- über IgG1-Antikörper nach der einmaligen Immunisierung festzustellen. Auch nach zweimaliger Immunisierung mit D-gC1 blieben die PRV-spezifischen IgG1- und IgG2a-Antikörper mit einem durchschnittlichen Titer von 1:7700 unter den Werten, die bei D-gC3-immunisierten Tieren erreicht wurden. PRV-spezifische IgG1- oder IgG2a-Antikörper waren weder nach einmaliger noch nach zweimaliger Immunisierung der Balb/c-Mäuse mit der Rekombinante D-gC2 nachweisbar.

### **Mortalität immunisierter Tiere nach Belastungsinfektion**

Es waren 3 von 8 Tieren nach einmaliger und 7 von 8 Tieren nach zweimaliger Immunisierung mit der Rekombinante D-gC1 gegen die PRV-Infektion geschützt (Tab. 4.1). Die Mortalität war demnach höher als bei Balb/c-Mäusen nach entsprechender Immunisierung mit der Rekombinante D-gC3, wenn auch wiederum eine Verzögerung des Todes um bis zu 48 Stunden gegenüber den Kontrolltieren festzustellen war. Von den D-gC2-immunisierten Mäusen war keines der Tiere gegen die Infektion geschützt.

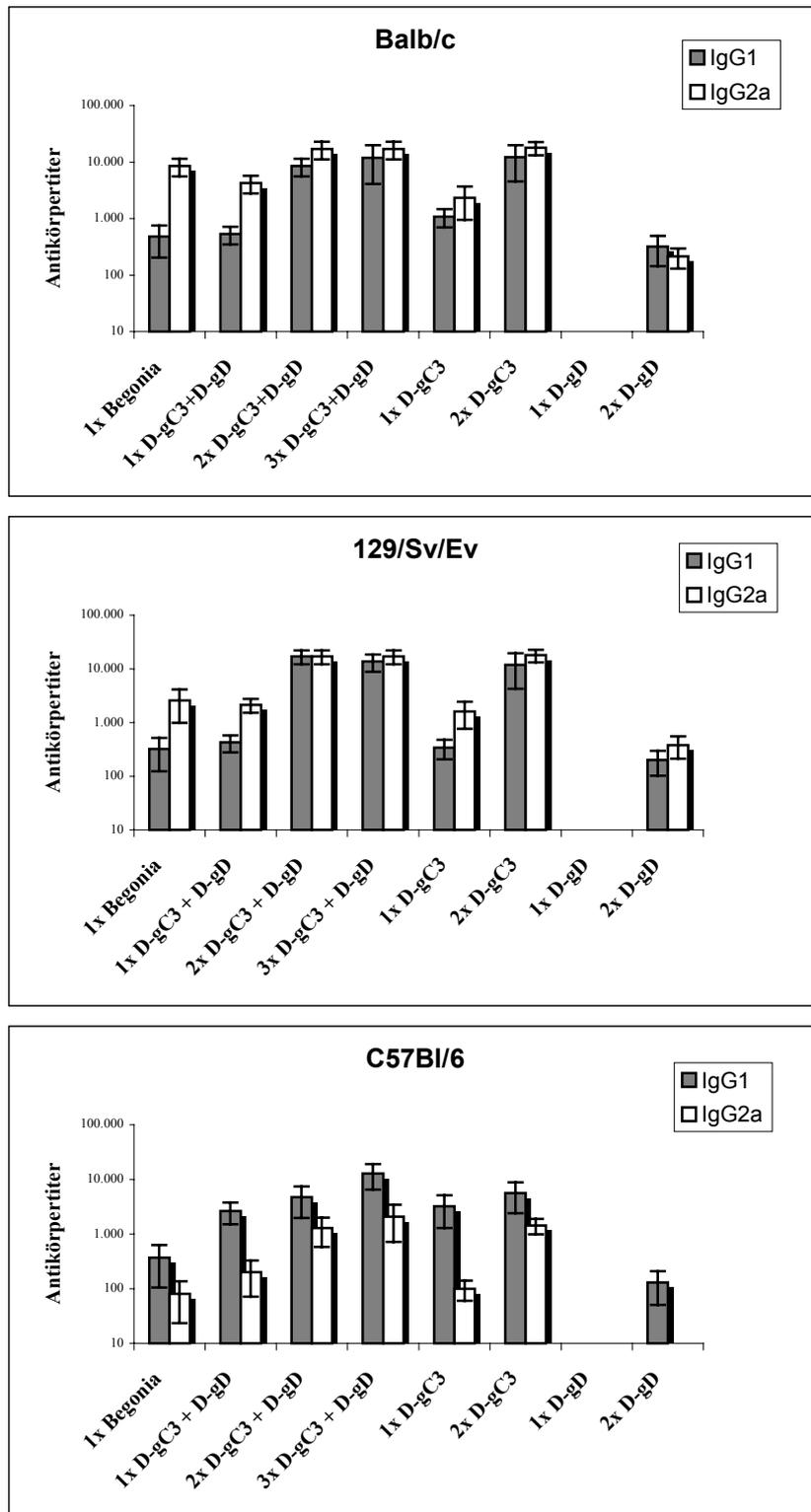
Insgesamt deuten die Daten auf eine geringere Immunogenität des gC-Fragments in D-gC1-immunisierten im Vergleich zum vollständigen Glykoprotein in D-gC3-immunisierten Mäusen hin. Außerdem ist die Rekombinante D-gC2 offenbar nicht zur Synthese immunogener, gC-spezifischer Polypeptide in der Lage.

## Ergebnisse

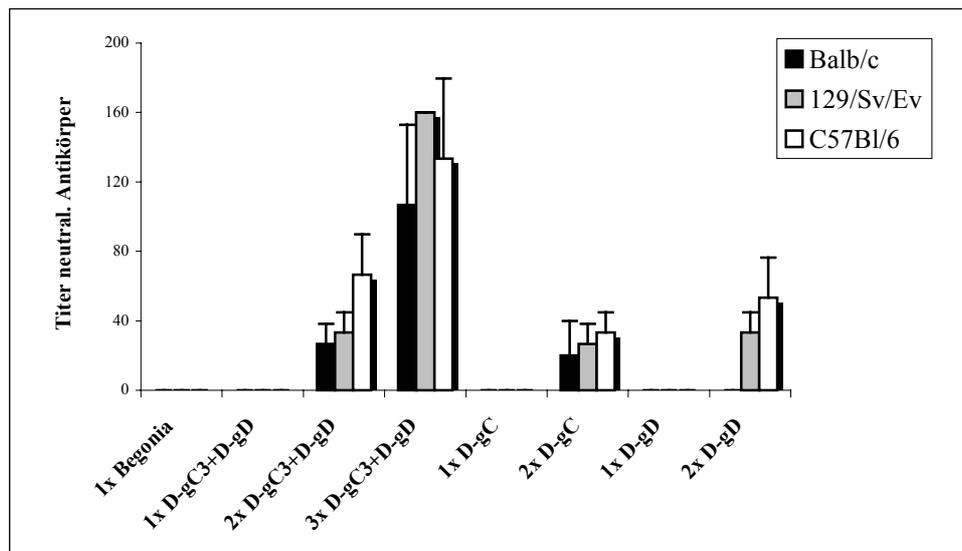
		Balb/c	129Sv/Ev	C57Bl/6
nicht-immunisiert		0/19	0/5	0/10
D1701-VrV	(1x)	0/13	n.u.	n.u.
	(2x)	0/8	0/5	0/5
PRV-Begonia	(1x)	5/5	5/5	5/5
D-gC3 + D-gD	(1x)	8/10	5/5	8/8
	(2x)	10/10	5/5	8/8
	(3x)	5/5	5/5	8/8
D-gC3	(1x)	6/8	8/8	8/8
	(2x)	8/8	8/8	8/8
D-gD	(1x)	2/8	7/8	7/8
	(2x)	4/8	8/8	8/8
D-gC1	(1x)	3/8	n.u.	n.u.
	(2x)	7/8	n.u.	n.u.
D-gC2	(1x)	0/8	n.u.	n.u.
	(2x)	0/8	n.u.	n.u.

**Tab. 4.1:** Mortalität von Wildtypmäusen der verschiedenen Stämme nach ein- oder mehrfacher Immunisierung mit  $10^7$  pfu des PRV-Impfstamms Begonia bzw.  $10^7$  TCID<sub>50</sub> der ORFV-Vektorvakzinen und anschließender Belastungsinfektion mit  $10^3$  pfu des virulenten PRV-Stamms NIA-3. Dargestellt ist der Anteil überlebender Tiere an der Gesamtzahl getesteter Tiere pro Gruppe. Die Tiere wurden über einen Zeitraum von mindestens 8 Wochen beobachtet. (n.u. = nicht untersucht).

## Ergebnisse



**Abb. 4.15:** PRV-spezifische Serumantikörpertiter der Subklassen IgG1 und IgG2a bei den verschiedenen Mäusestämmen nach Immunisierung mit dem PRV-Impfstamm Begonia oder den ORFV-Vektorvakzinen D-gC3 bzw. D-gD. Die Titer sind in logarithmischer Skala dargestellt und repräsentieren den Mittelwert der in Tab. 4.1 aufgeführten Anzahl an getesteten Tieren pro Gruppe.



**Abb. 4.16:** Titer PRV-spezifischer, Komplement-unabhängig neutralisierender Antikörper nach Immunisierung von Mäusen der unterschiedlichen Stämme mit dem PRV-Impfstamm Begonia oder den ORFV-Vektorvakzinen D-gC3 bzw. D-gD. Die Titerangaben stellen die höchste als positiv gewertete Serumverdünnung dar und repräsentieren den Mittelwert der in Tab. 4.1 aufgeführten Anzahl an getesteten Tieren pro Gruppe.

#### 4.7 Charakterisierung der Vektorvakzine-induzierten protektiven Immunität

Zusammengefaßt lassen die bislang dargestellten Experimente erkennen, daß die Rekombinante D-gC3 eine höhere protektive Kapazität in den unterschiedlichen Mäusestämmen aufweist als die Rekombinante D-gD. Dies geht einher mit deutlich höheren PRV-spezifischen IgG1- und IgG2a-Antikörpertitern im Serum der D-gC3-immunisierten gegenüber D-gD-immunisierten Tieren. Mit den folgenden Experimenten sollte deshalb genauer untersucht werden, ob die Vektorvakzine-induzierten Serumantikörper ausreichend für einen soliden Schutz gegen die PRV-Infektion sind bzw. welche weiteren Komponenten der adaptiven Immunantwort hierfür notwendig sind.

##### 4.7.1 Passive Immunisierung von Mäusen durch Serumtransfer

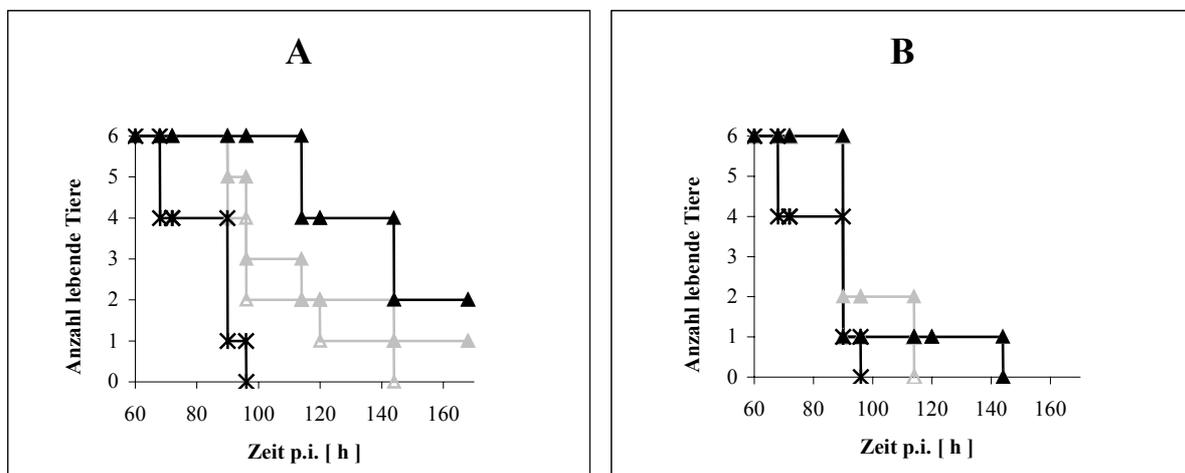
Serum von Balb/c-Mäusen nach zweimaliger Immunisierung mit den PRV-spezifischen ORFV-Vektorvakzinen wurde zur passiven Immunisierung von naiven Mäusen verwendet. Die Seren von Mäusen nach Immunisierung mit jeweils einer der beiden Rekombinanten wurden dabei separat getestet. Jeweils 6 naive Balb/c-Mäuse wurden durch intravenöse Applikation von 100, 300 oder 500 µl Serum passiv immunisiert. Zur Kontrolle erhielten

weitere 5 Tiere je 500 µl Serum von zweimal D1701-VrV-immunisierten Mäusen. Nach 24 Stunden wurden die Empfängertiere aus dem retroorbitalen Plexus geblutet und die gewonnenen Seren wurden auf den erreichten Titer PRV-spezifischer IgG-Antikörper untersucht. Als ELISA-Negativkontrolle diente hierbei das Serum von Mäusen nach Transfer von 500 µl Serum der zweifach D1701-VrV-immunisierten Tiere. Direkt nach der Blutentnahme wurden die Tiere mit  $10^3$  pfu PRV-NIA-3 infiziert.

Kontrolltiere, die nicht, bzw. mit Serum D1701-VrV-immunisierter Mäuse passiv immunisiert worden waren, überlebten die Infektion nicht länger als 96 Stunden (nicht gezeigt). In Abbildung 4.17 A ist dargestellt, daß nach Transfer von 100 µl Serum der D-gC3-immunisierten Tiere ebenfalls keines der Empfängertiere gegen die Infektion geschützt war. Die durchschnittlichen PRV-spezifischen Serumantikörpertiter (nicht gezeigt) von 1:530 (IgG1) bzw. 1:1200 (IgG2a) waren dabei im Vergleich zu Balb/c-Mäusen nach einmaliger aktiver Immunisierung mit D-gC3, bei denen 75% der Tiere die NIA-3-Infektion überlebten, um 16% bzw. 37% geringer. Unter Berücksichtigung der Standardabweichung sind diese Unterschiede in den PRV-spezifischen Serumantikörpertitern nicht signifikant. Nach Transfer von 300 µl dieses Serums wurden bei den Empfängertieren PRV-spezifische Serumantikörpertiter von durchschnittlich 1:1920 (IgG1) bzw. 1:2970 (IgG2a) und damit etwas höhere Werte als nach einmaliger aktiver Immunisierung mit D-gC3 erreicht. Im Gegensatz zu den aktiv immunisierten Tieren überlebte jedoch nur eines von sechs Tieren die PRV-Belastungsinfektion. Zwar wurden nach Transfer von 500 µl Serum nahezu dreifache höhere PRV-spezifische IgG-Antikörpertiter von durchschnittlich 1:3840 (IgG1) bzw. 1:6830 (IgG2a) verglichen zu einfach aktiv immunisierten Tieren erreicht. Jedoch war der Anteil überlebender Tiere nach NIA-3-Infektion mit 2 von 6 wiederum geringer als bei letzteren. Auffällig war jedoch, daß die passiv immunisierten Tiere gegenüber den Kontrolltieren deutlich verzögert starben. Nach passiver Immunisierung mit 500 µl Serum betrug diese Verzögerung bis zu 48 Stunden.

Bei passiver Immunisierung von Balb/c-Mäusen mit dem Serum der zweifach D-gD-immunisierten Tiere, lagen selbst nach Transfer von 500 µl die PRV-spezifischen Serumantikörpertiter unter der Nachweisgrenze von 1:80. In diesem Fall war eine verzögerte Mortalität nur bei einem Empfängertier nach Transfer von 500 µl Serum zu erkennen. Alle übrigen Tiere überlebten unabhängig vom Volumen des transferierten Serums die Infektion nicht signifikant länger als die Kontrolltiere (Abb. 4.17 B).

Diese Daten deuten daraufhin, daß in Balb/c-Mäusen die D-gC3-induzierten spezifischen Antikörper zumindest in der frühen Phase einer PRV-Infektion von Bedeutung sind. Für einen soliden Langzeitschutz sind die gC-spezifischen Antikörper zusammen mit Mechanismen der angeborenen Immunität alleine jedoch nicht ausreichend. Dies deutet auf die Notwendigkeit weiterer Mechanismen der adaptiven Immunität hin, die durch die gC-spezifische Vektorvakzine induziert und durch die anschließende PRV-Infektion reaktiviert werden. Darin könnte auch der partielle bis vollständige Schutz trotz vergleichsweise geringer PRV-spezifischer Antikörpertiter nach aktiver Immunisierung mit der Vektorvakzine D-gD bzw. begründet liegen.



**Abb. 4.17:** Dargestellt ist die zeitabhängige Überlebensrate von Balb/c-Mäusen nach passiver Immunisierung mit 500 µl (▲), 300 µl (△) oder 100 µl (△) Serum, welches von Balb/c-Mäusen nach zweifacher aktiver Immunisierung mit D-gC3 (A) oder D-gD (B) gewonnen worden war. Es wurden jeweils 6 Tiere pro Gruppe verwendet und über einen Zeitraum von acht Wochen beobachtet. Als Kontrolle wurden weitere 6 Tiere mit 500 µl Serum passiv immunisiert, welches von Mäusen nach zweimaliger Immunisierung mit D1701-VrV stammte (X).

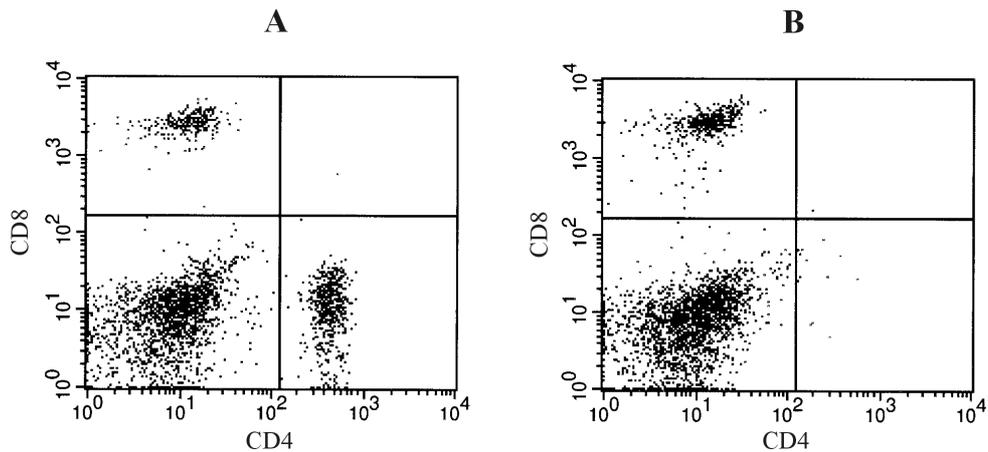
#### 4.7.2 Bedeutung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen und IFN-γ beim Vektorvakzine-vermittelten

##### Schutz gegen PRV: Untersuchung von Knockout-Mäusestämmen

Die bisherigen Beobachtungen führten zur Notwendigkeit der Untersuchung Vektorvakzine-induzierter zellulärer Immunmechanismen gegen die PRV-Infektion der Maus.

Schijns et al. (1995) stellten die Hypothese auf, daß nach Immunisierung mit inaktiviertem Pseudorabiesvirus der Schutz von Mäusen gegen eine ansonsten letale PRV

Belastungsinfektion von der IFN- $\gamma$  Produktion durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen abhängig ist. Bei Wildtypmäusen des Stammes 129/Sv/Ev wurde nach Immunisierung eine Dominanz der PRV-spezifischen IgG2a-Antikörper gegenüber IgG1-Antikörpern nachgewiesen. Diese Mäuse waren solide gegen eine nachfolgende PRV-Infektion geschützt. Im Gegensatz dazu konnten nach Immunisierung von IFN- $\gamma$ -Rezeptor-negativen (IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup>) 129/Sv/Ev-Mäusen hohe Konzentrationen an PRV-spezifischen IgG1 und IgG2b Antikörpern bei geringeren IgG2a Antikörpertitern die zentralnervöse Erkrankung und Mortalität nach PRV Infektion nicht verhindern. Dementsprechend wurde IFN- $\gamma$ -abhängigen, PRV-spezifischen IgG2a-Antikörpern eine entscheidende Rolle beim Schutz gegen die PRV-Infektion zugeschrieben. Es stellte sich die Frage, ob im hier beschriebenen Modell der Immunisierung von Mäusen mit PRV-spezifischen ORFV-Vektorvakzinen vergleichbare Immuneffektormechanismen für den Schutz gegen die PRV Infektion verantwortlich sind. Vergleichend zu 129/Sv/Ev Wildtypmäusen wurde deshalb die PRV-spezifische Immunantwort von Knockout-Mutanten des Stammes 129/Sv/Ev nach Vakzinierung mit den rekombinanten Vakzinen D-gC3 und D-gD untersucht. Es standen Stämme zur Verfügung, die nicht zur Expression des CD4-Oberflächenantigens (CD4<sup>-/-</sup>) oder des intakten IFN- $\gamma$ -Rezeptors (IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup>) in der Lage sind. Die durchflußzytometrische Analyse von Leukozyten des peripheren Bluts der CD4<sup>-/-</sup>-Mutante bestätigte das Fehlen CD4-positiver T-Zellen, wogegen die Population CD8-positiver T-Zellen gegenüber Wildtypmäusen nicht verringert war (Abb. 4.18). Vergleichbare Ergebnisse wurden für jeweils 5 Wildtyp- bzw. CD4<sup>-/-</sup>-Mäuse der für diesen Versuch verwendeten Zucht erhalten. Die Überprüfung des Genotyps der IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup>-Mäuse wird momentan durchgeführt. Die Tiere wurden wiederum im Abstand von zwei Wochen intramuskulär mit 10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub> der Rekombinanten D-gC3 oder D-gD immunisiert und anschließend mit 10<sup>3</sup> pfu PRV NIA-3 infiziert. Auch hier wurden PRV-Begonia-immunisierte Tiere als Positivkontrolle und D1701-VrV-immunisierte bzw. nicht-immunisierte Tiere als Negativkontrolle untersucht.



**Abb. 4.18:** Überprüfung der CD4-Knockout-Mäuse mittels durchflußzytometrischer Analyse von Leukozyten des peripheren Bluts von 129/Sv/Ev-Wildtypmäusen (A) und CD4-Knockout-Mäusen des selben Stammes (B). Die Zweifarbenfluoreszenzanalyse von jeweils 10.000 Zellen wurde mit CD4- und CD8-spezifischen monoklonalen Antikörpern durchgeführt, wobei die Fluoreszenzintensität in logarithmischer Skala dargestellt ist.

### Serologische Analysen

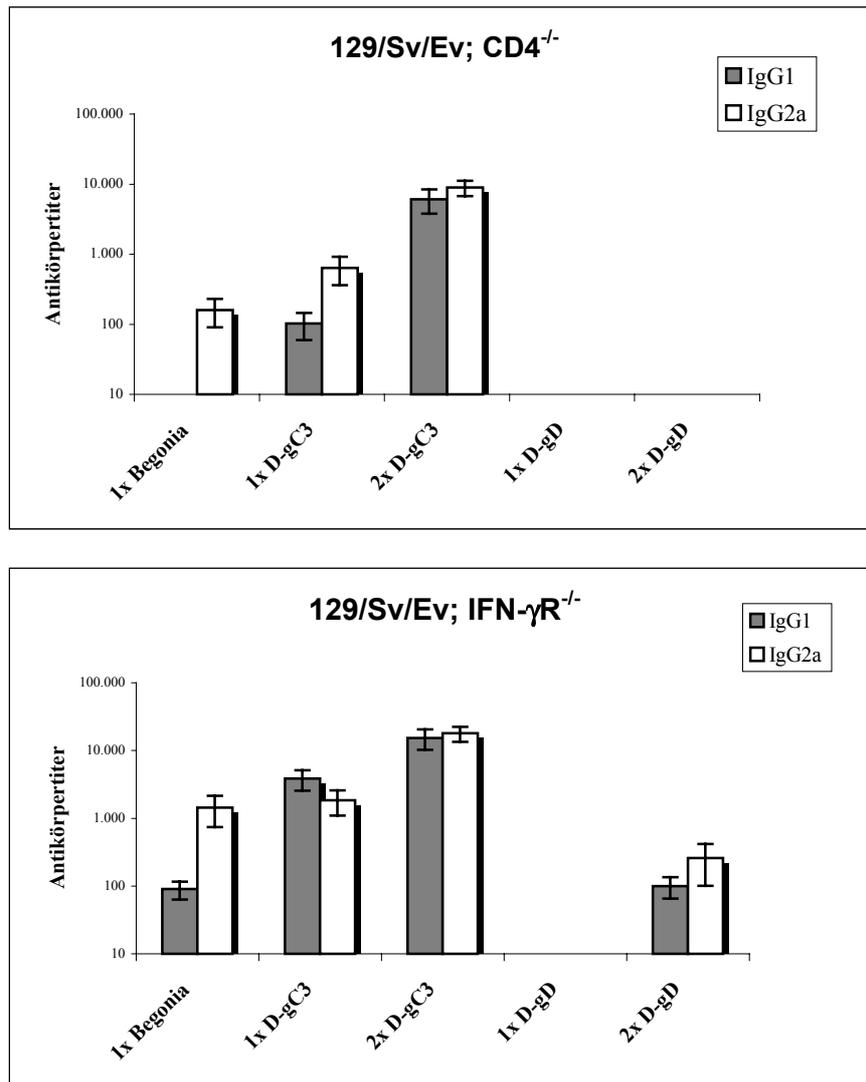
Das Serum der immunisierten Knockout-Mäuse wurde auf die Konzentration PRV-spezifischer IgG-Antikörper im Vergleich zu Wildtypmäusen des gleichen Stammes (s. 4.6.3) untersucht. Die Titerangaben repräsentieren wiederum den Mittelwert der Seren von jeweils acht getesteten Tieren

Abbildung 4.19 zeigt, daß nach Immunisierung von  $CD4^{-/-}$ -Mäusen mit PRV-Begonia keine PRV-spezifischen IgG1-Antikörper messbar waren. Außerdem war der mittlere Titer spezifischer IgG2a-Antikörper von 1:160 gegenüber Begonia-immunisierten Wildtypmäusen um mehr als 90% geringer. Nach einmaliger Immunisierung mit der Rekombinante D-gC3 waren die mittleren PRV-spezifischen IgG1- bzw. IgG2a-Antikörpertiter bei  $CD4^{-/-}$ -Mäusen um 70% bzw. um 60% geringer als bei entsprechend immunisierten Wildtypmäusen. Nach zweimaliger D-gC3-Immunisierung wiesen die spezifischen Antikörpertiter ca. 50% der Werte von Wildtypmäusen auf. Die Rekombinante D-gD war weder nach einmaliger noch nach zweimaliger Applikation in der Lage, PRV-spezifische Antikörper in nachweisbarer Menge in  $CD4^{-/-}$ -Mäusen zu induzieren.

Bei  $IFN-\gamma R^{-/-}$ -Mäusen lag nach Immunisierung mit PRV-Begonia der mittlere Titer PRV-spezifischer IgG1-Antikörper mit 1:90 an der Nachweisgrenze. Im Gegensatz zu  $CD4^{-/-}$ -Mäusen waren jedoch spezifische IgG2a-Antikörpertiter in ähnlicher Höhe wie bei Begonia-immunisierten 129/Sv/Ev-Wildtypmäusen vorhanden. Außerdem war nach Immunisierung

## Ergebnisse

mit den ORFV-Rekombinanten D-gC3 bzw. D-gD die Entwicklung PRV-spezifischer IgG-Antikörper gegenüber Wildtypmäusen nicht beeinträchtigt. Vielmehr führte die einmalige Immunisierung mit D-gC3 sogar zu deutlich höheren PRV-spezifischen IgG1-Antikörpertitern als bei entsprechend immunisierten Wildtypmäusen.



**Abb. 4.19:** PRV-spezifische Serumantikörpertiter der Subklassen IgG1 und IgG2a nach Immunisierung von CD4<sup>-/-</sup> bzw. IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup>-Mäusen mit dem PRV-Impfstamm Begonia oder den ORFV-Vektorvakzinen D-gC3 bzw. D-gD. Die Titerangaben in logarithmischer Darstellung repräsentieren den Mittelwert von jeweils 8 Testseren.

Wie aufgrund der Beobachtungen bei 129/Sv/Ev-Wildtypmäusen erwartet, waren im Serum beider Knockout-Mäusestämme nach einmaliger Immunisierung mit PRV-Begonia bzw. den ORFV-Rekombinanten D-gC3 oder D-gD keine PRV-spezifischen neutralisierenden Antikörper in nachweisbarer Konzentration vorhanden. Bei  $CD4^{-/-}$ -Mäusen waren auch nach zweimaliger Immunisierung mit den einzelnen Rekombinanten keine neutralisierenden Antikörper nachweisbar. Bei  $IFN-\gamma R^{-/-}$ -Mäusen konnten nach zweimaliger Immunisierung mit D-gC3 bzw. D-gD geringe Titer neutralisierender Antikörper von durchschnittlich 1:20 bzw. 1:60 gemessen werden, was den Werten entsprechend immunisierter Wildtypmäuses dieses Stammes vergleichbar ist (nicht dargestellt).

### **Mortalität immunisierter Tiere nach Belastungsinfektion**

Die Belastungsinfektion der Knockout-Mäuse erfolgte wiederum mit  $10^3$  pfu des PRV-Stammes NIA-3. Der Anteil überlebender Tiere in jeder Versuchsgruppe ist in Tabelle 4.2 dargestellt. Von den Begonia-immunisierten  $CD4^{-/-}$ -Mäusen überlebte die Hälfte der Tiere die NIA-3 Infektion nicht. Außerdem waren nur fünf von acht Tieren nach einmaliger Immunisierung mit D-gC3 gegen die Infektion geschützt, wogegen alle 129/Sv/Ev-Wildtypmäuse die Infektion überlebt hatten (s. Tab. 4.1). Erst die zweimalige Applikation dieser Rekombinante resultierte in vollständigem Schutz aller immunisierten Tiere. Auch nach ein- bzw. zweimaliger Immunisierung mit D-gD überlebten nur 25% bzw. 50% der  $CD4^{-/-}$ -Mäuse die Infektion, wogegen die Wildtypmäuse zu 90% bzw. 100% geschützt waren (s. Tab. 4.1). Verglichen zu den 129/Sv/Ev-Wildtypmäusen weisen die  $CD4^{-/-}$ -Mäuse demzufolge sowohl geringere Vakzine-induzierte PRV-spezifische Antikörpertiter als auch einen verminderten Schutz gegen die PRV-Infektion auf.

Im Gegensatz dazu ergab sich bei  $IFN-\gamma R^{-/-}$ -Mäusen hinsichtlich der protektiven Immunität gegen die PRV-Infektion ein identisches Bild wie bei den jeweils entsprechend immunisierten Wildtypmäusen. Mit Ausnahme eines Tieres, welches einmal mit der Rekombinante D-gD immunisiert worden war, überlebten alle immunisierten Tiere die Infektion ohne Krankheitssymptome über den Beobachtungszeitraum von acht Wochen.

## Ergebnisse

	129/Sv/Ev CD4 <sup>-/-</sup>	129/Sv/Ev IFN- $\gamma$ R <sup>-/-</sup>
Nicht-immunisiert	0/4	0/4
D1701-VrV (2x)	0/4	0/4
Begonia (1x)	2/4	4/4
D-gC3 (1x)	5/8	8/8
D-gC3 (2x)	8/8	8/8
D-gD (1x)	2/8	7/8
D-gD (2x)	4/8	8/8

**Tab. 4.2:** Mortalität der CD4<sup>-/-</sup> bzw. IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup>-Mäuse nach Immunisierung mit 10<sup>7</sup> pfu des PRV-Impfstamms Begonia bzw. 10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub> der ORFV-Vektorvakzinen D-gC3 oder D-gD und anschließender Belastungsinfektion mit 10<sup>3</sup> pfu des virulenten PRV-Stamms NIA-3. Dargestellt ist der Anteil überlebender Tiere an der Gesamtzahl getesteter Tiere pro Gruppe.

### 4.8 Immunogenität und Protektivität inaktivierter ORFV-Vektorvakzinen

Anhand der Immunisierung von Mäusen mit inaktivierten ORFV-Rekombinanten wurde überprüft, ob die Immunogenität der Vektorvakzinen darauf zurückzuführen ist, daß das Fremdanigen eine Strukturkomponente des Vektorvirus darstellt, oder ob hierfür eine *de novo* Proteinsynthese *in vivo* notwendig ist. Da sich die Rekombinante D-gC3 in den bisherigen Experimenten als besonders effektiv bei der Induktion einer protektiven Immunantwort in der Maus erwiesen hatte, wurde diese Frage beispielhaft anhand der Immunisierung von Balb/c-Mäusen mit  $\beta$ -Propiolacton-inaktiviertem D-gC3 untersucht. Analog zur protektiven Immunisierung mit Lebendvirus wurden die Mäuse zweimal im Abstand von 14 Tagen intramuskulär immunisiert, wobei jeweils eine Dosis entsprechend 10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub> vor Inaktivierung des Virus gewählt wurde.

Die Analyse der Seren vor Belastungsinfektion ergab durchschnittliche PRV-spezifische Antikörpertiter von 1:80 (IgG1) bzw. 1:640 (IgG2a) und demnach eine Dominanz spezifischer IgG2a- über IgG1-Antikörper (nicht dargestellt). Allerdings waren die Antikörperkonzentrationen verglichen zu Balb/c-Mäusen nach zweimaliger Immunisierung mit Lebendvirus um 99% (IgG1) bzw. 96% (IgG2a) reduziert. Außerdem konnte keine Induktion neutralisierender Antikörper nachgewiesen werden. Dennoch überlebten auch hier 6 von 8 Tieren die anschließende NIA-3-Infektion ohne auffällige Krankheitssymptome (nicht dargestellt). Auch diese Beobachtung unterstützt die Vermutung, daß für eine protektive Immunität neben Vektor-induzierten, PRV-spezifischen Serumantikörpern weitere

Mechanismen der adaptiven Immunantwort eine wichtige Rolle spielen.

Das hier beschriebene Experiment kann nicht als schlüssiger Hinweis auf die Inkorporation des Glykoproteins gC in Viruspartikel der Rekombinante D-gC3 betrachtet werden. Die inaktivierte Virussuspension wurde zwar in der Zellkultur überprüft, allerdings kann ein möglicherweise sehr geringer verbleibender Anteil an vermehrungsfähigem Virus nicht völlig ausgeschlossen werden. Die Verifizierung der Ergebnisse nach eindeutiger Kontrolle der Virusinaktivierung mittels Northern-Blotanalyse der Fremdgenexpression *in vitro* steht noch aus.

#### **4.9 Einfluß ORFV-spezifischer Immunität auf die Immunogenität und Protektivität der Vektorvakzinen**

Ein möglicher Vorteil von ORFV als Vakzinevektor besteht in der kurzanhaltenden ORFV-spezifischen Immunität, wie dies im Schaf als natürlichen Wirt beobachtet wird. Dies eröffnet eventuell die Möglichkeit der sequentiellen Immunisierung gegen verschiedene Pathogene. In den vorangegangenen Experimenten wurde bereits deutlich, daß die Mehrfachimmunisierung mit einer ORFV-Rekombinante zu einer verbesserten humoralen und protektiven Immunantwort führt. Demzufolge verhindert eine gegen den Vektor gerichtete Immunantwort die Reaktivierung der Fremdanigen-spezifischen Immunantwort nach einer sekundären Immunisierung nicht. Im folgenden Experiment wurde getestet, wie sich eine vorhandene ORFV-spezifische immunologische Prägung auf die Induktion einer primären Immunantwort gegen Vektor-kodiertes Fremdanigen auswirkt. Hierfür wurden Balb/c-Mäuse zunächst mit  $10^7$  TCID<sub>50</sub> des parentalen ORFV-Stammes D1701-VrV intramuskulär immunisiert. Zwei Wochen später erfolgte die Immunisierung mit  $10^7$  TCID<sub>50</sub> der Vektorvakzine D-gC3. Wiederum zwei Wochen später wurden die erreichten Titer PRV-spezifischer IgG-Serumantikörper und die Empfänglichkeit für die PRV-Infektion ermittelt.

Es zeigte sich, daß die Titer PRV-spezifischer Serumantikörper bei acht getesteten Tieren mit durchschnittlichen Werten von 1:2240 (IgG1) bzw. 1:4160 (IgG2a) gegenüber Mäusen nach alleiniger Immunisierung mit der Rekombinante D-gC3 sogar etwas höher waren. Außerdem waren auch hier 75% der Tiere vollständig gegen die PRV-Infektion geschützt und bei einem Tier trat der Tod erst 10 Tage nach der Infektion ein. Demzufolge ist die Induktion einer primären protektiven Immunantwort gegen ORFV-Vektor-kodiertes Antigen bei vorhandener Vektor-spezifischer Immunität nicht beeinträchtigt.

## 5 Diskussion

Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit war die Entwicklung von Rekombinanten des Parapockenvirus ORFV, die die Glykoproteine gB, gC bzw. gD des Pseudorabiesvirus exprimieren. Wie in der Einleitung ausführlich beschrieben, stellen diese Glykoproteine hauptimmunogene Strukturbestandteile dieses Mitglieds der  $\alpha$ -Herpesviren dar (siehe 1.9). Die Konstruktion von weiteren Rekombinanten mit Deletionen in einzelnen strukturellen Komponenten des Glykoproteins gC diente der Untersuchung der Auswirkung solcher Deletionen auf die Expressionsrate des rekombinanten Proteins *in vitro* und die Immunogenität der jeweiligen Vektorvakzine *in vivo*.

Aufgrund der potentiellen Anwendung von Parapockenviren als rekombinante Vektoren (Robinson & Lyttle, 1992; Rziha et al., 1999, 2000) unterliegt das ORFV seit einigen Jahren intensiver Erforschung. Für die Entwicklung der hier beschriebenen Vektorvakzinen diente der hochattenuierte Stamm D1701 (Mayr et al., 1981). Da D1701, wie wohl alle ORFV-Stämme, kein Thymidin-Kinase-Gen besitzt war die Selektion rekombinanter Viren mittels Austausch des Tk-Gens durch Fremdgene, wie sie häufig zur Konstruktion anderer Pockenvirus-Rekombinanten durchgeführt wird (Mackett et al., 1984), bei ORFV D1701 nicht möglich. Stattdessen wurde das nicht-essentielle vegf-e-Gen (Lyttle et al., 1994) als Zielort für die Insertion von Fremd-DNA gewählt (Henkel, 1997; Rziha et al., 1999, 2000). Die Substitution des D1701 vegf-e-Gens durch die bakteriellen Marker-Gene *xgpt* und *lacZ* (Chakrabarti et al., 1985; Falkner & Moss, 1988; 1990) resultierte im vegf-e-negativen Stamm D1701-VrV (Henkel, 1997; Rziha et al., 1999). Der Verlust des vegf-e-Gens bedingt eine verringerte Virulenz des Virus *in vivo* (Savory et al., 2000; Rziha et al., unveröffentlicht), was die Funktion des vegf-e-Gens als Virulenzfaktor demonstriert und im Hinblick auf die Sicherheit einer Vektorvakzine von Vorteil ist. Aus diesem Grund diente die Rekombinante D1701-VrV als parentales Virus für die Entwicklung der in dieser Arbeit vorgestellten PRV-spezifischen ORFV-Vektorvakzinen.

Bei der Adaption von D1701 an die Zellkultur kam es aufgrund eines Duplikations- und Translokationsereignisses an den genomischen Enden zu einer Vergrößerung der ITR-Region und damit auch zur Verdopplung des vegf-e-Gens (Cottone et al., 1998). Außerdem konnte für D1701-VrV die Substitution des vegf-e-Gens durch die *lacZ/xgpt*-Kassette an beiden Enden des Genoms nachgewiesen werden. Dies war für die Entwicklung stabiler, *lacZ*-

negativer Rekombinanten von Bedeutung, da nur bei Insertion der PRV-Glykoproteingene an beiden Enden des Genoms der Verlust der Gene durch intragenomische Rekombination ausgeschlossen werden konnte. Für alle hier beschriebenen D1701-PRV-Rekombinanten konnte mittels Southern-Blothybridisierungen nachgewiesen werden, daß die Glykoproteingen-spezifischen Sequenzen in diploider Form im vegf-e-Lokus inseriert waren. Die Stabilität der Rekombinanten hinsichtlich der Fremdgenexpression über eine hohe Anzahl an Viruspassagen wurde im Rahmen dieser Arbeit noch nicht überprüft.

Die Charakterisierung der Fremdgenexpression der ORFV-PRV-Rekombinanten erfolgte zunächst in Vero-Zellen als permissiver Zelllinie für die ORFV-Infektion. Es konnte gezeigt werden, daß nach Infektion der Zellen mit den einzelnen ORFV-Rekombinanten PRV-Glykoprotein-spezifische mRNAs während der frühen Phase der Replikation synthetisiert werden. Die Transkription während der frühen Phase der Virusreplikation und die Größe der jeweiligen Transkripte lassen darauf schließen, daß die Transkription unter Kontrolle des frühen ORFV-vegf-e-Promotors initiiert und unter Nutzung des (T)<sub>5</sub>NT-Motiv des vegf-e-Gens terminiert wird. Im D1701-Genom befinden sich 0,72 kbp sowie 1,65 kbp stromabwärts vom vegf-e-spezifischen Transkriptions-Stoppsignal zwei weitere (T)<sub>5</sub>NT-Motive. Möglicherweise sind die ebenfalls nachweisbaren, ca. 4 kb großen gC- bzw. gD-spezifischen Transkripte auf das Überlesen des vegf-e-spezifischen Stoppsignals und Termination der Transkription nach den stromabwärts lokalisierten Stoppsignalen zurückzuführen. Auch für das HD1R-Gen wurde bereits das Vorhandensein 3,6 - 4,8 kb großer spezifischer Transkripte beschrieben, die vermutlich durch das Überlesen des 40 Nukleotide stromabwärts vom letzten HD1R-Codon lokalisierten (T)<sub>5</sub>NT-Motivs verursacht werden (Cottone, 2000).

Die Quantifizierung der gC-spezifischen Transkription nach Infektion von Zellen mit den verschiedenen D-gC-Rekombinanten ließ erkennen, daß sich die Deletion der für die Signalsequenz bzw. für die Transmembrandomäne und die cytoplasmatische Domäne kodierenden Genbereiche negativ auf die Effizienz der mRNA-Synthese auswirkt. Ausschlaggebend hierfür ist vermutlich das Fehlen des für die Signalsequenz kodierenden Bereichs, da vergleichbare Beobachtungen mit einer PRV-Mutante gemacht wurden, bei der die Signalsequenz deletiert wurde, die kodierenden Sequenzen für die Transmembrandomäne und die cytoplasmatische Domäne jedoch unverändert blieben (Enquist et al., 1988; Ryan et al., 1989). Es wurde beschrieben, daß nach Infektion von Zellen mit der PRV-Signalsequenz-Deletionsmutante eine stabile gC-spezifische mRNA synthetisiert wird, die jedoch im

Vergleich zu Zellen nach Infektion mit PRV Wildtypvirus nur in zwölfmal geringerer Menge nachweisbar war. Die Ursache hierfür ist nicht bekannt. Übereinstimmend damit wurde eine ca. sechsfach geringere Transkriptionsrate in D-gC2- gegenüber D-gC3-infizierten Zellen festgestellt. Ein weiterer Hinweis darauf, daß die reduzierte gC-spezifische Transkriptionsrate bei D-gC2-infizierten Zellen ausschließlich auf das Fehlen des für die Signalsequenz kodierenden Bereichs zurückzuführen ist, ist die annähernd identische Effizienz der Synthese gC-spezifischer mRNA nach Infektion von Zellen mit D-gC1 und D-gC3. Demzufolge hat der partielle bzw. vollständige Verlust der für die Transmembrandomäne bzw. für die cytoplasmatische Domäne kodierenden Gensequenzen keinen Einfluß auf die Transkription des gC-Gens. Wiederum übereinstimmend hierzu wurden PRV-Mutanten beschrieben, bei denen die vollständige Deletion dieser Domänen zwar die zelluläre Lokalisation des Proteins, jedoch nicht die Syntheserate des Proteins beeinflusst (Solomon et al., 1990; 1991). Zusammengefaßt lassen diese Experimente erkennen, daß der Genabschnitt, der für die Signalsequenz des Glykoproteins gC kodiert, für die effiziente Synthese der gC-mRNA erforderlich ist. Dies ist offensichtlich unabhängig davon, ob die Transkription vom gC-spezifischen Promotor in PRV-infizierten Zellen oder vom vegf-e-spezifischen Promotor in ORFV-infizierten Zellen initiiert wird.

Das Glykoprotein gC erfährt während des Reifungsprozesses und der Translokation vom endoplasmatischen Retikulum an die Oberfläche infizierter Zellen bzw. in die Hüllmembran des Viruspartikels umfangreiche Modifikationen. Das primäre, nicht glykosylierte Translationsprodukt besitzt ein Molekulargewicht von ca. 58 kDa (Ryan et al., 1989). Nach der Translokation durch die Membran des rauhen endoplasmatischen Retikulums weist die prä-Golgi-Form des Proteins eine N-gekoppelte, Mannose-reiche Glykosylierung und ein Molekulargewicht von 74 kDa auf. Als Golgi- oder post-Golgi-lokalisiertes Protein von ca. 92 kDa weist das Protein die komplexe Form der N-gekoppelten Glykosylierung auf und ist vermutlich zusätzlich O-glykosyliert (Ryan et al., 1987). Die Western-Blotanalyse des Lysats von Vero-Zellen nach Infektion mit der Rekombinante D-gC3, welche das vollständige gC-Gen kodiert, zeigte eine quantitativ vergleichbare Menge des Glykoproteins wie in PRV-infizierten Zellen. Außerdem deutet das in beiden Fällen sehr ähnliche Muster spezifisch erkannter Polypeptide auf authentische posttranslationale Modifikationen des Proteins in D-gC3 infizierten Zellen hin.

Nach Infektion von Vero-Zellen mit der Rekombinante D-gC1 war die Gesamtmenge nachweisbarer gC-spezifischer Polypeptide deutlich geringer als bei Expression des vollständigen Glykoproteins. Außerdem scheint die Glykosylierung zum reifen, 92 kDa schweren Protein beeinträchtigt zu sein. Es ist bekannt, daß der Verlust der cytoplasmatischen Domäne weder die Reifung noch die korrekte Lokalisation des Glykoproteins gC beeinträchtigt (Solomon et al., 1990). Dagegen demonstrieren Experimente mit PRV-Stämmen, die Mutationen im Bereich der Transmembrandomäne aufweisen, daß die Aminosäure-Zusammensetzung des hydrophoben C-terminalen Bereichs die posttranslationale Modifikation und die Direktion des Glykoproteins beeinflussen. Es konnte gezeigt werden, daß zwar nicht die spezifische Aminosäuresequenz, jedoch die Polarität der Transmembrandomäne für die Membranverankerung entscheidend ist. Dabei ist eine ausreichende Anzahl an hydrophoben Resten für die effiziente Translokation des primären Translationsprodukts und die anschließende Durchführung der posttranslationalen Modifikationen notwendig. Der Sequenzbereich, der für die Membranverankerung des Glykoproteins gC notwendig ist, konnte auf die Aminosäuren 443 bis 466 eingegrenzt werden (Solomon et al., 1991). Bei Ermittlung der durchschnittlichen Polarität sequentiell über jeweils einen Bereich von 17 Aminosäuren weist die Polarität dieses Sequenzbereichs durchgängig einen Wert von  $\geq 1,6$  im Kyte-Doolittle-Plot auf (s. 3.5; nicht gezeigt). Die Polarität sowie die ausreichende Länge dieses Sequenzbereichs stimmen mit den Voraussetzungen für die Vorhersage einer Polypeptidsequenz als mögliche Transmembrandomäne überein (Kyte & Doolittle, 1982). Bei D-gC1 wurden die hydrophoben Aminosäuren von Position 461 bis 470 des Glykoproteins gC deletiert. Damit fehlen dem Proteinfsegment zwar nur sechs Aminosäuren des für die Membranverankerung des vollständigen Glykoproteins essentiellen Bereichs von Position 443-466. Allerdings ist der durchgängige Bereich, dessen Polarität nach Kyte & Doolittle einen Wert von  $\geq 1,6$  beträgt, von 22 auf 10 Aminosäurereste reduziert (nicht gezeigt). Möglicherweise verursacht dies eine schwache Verankerung des Proteins in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER), was in der Folge zu Beeinträchtigungen des weiteren Reifungsprozesses führt. Dies könnte auch die deutlich geringere Dichte nachweisbaren gC-spezifischen Antigens an der Oberfläche von Zellen nach Infektion mit der Rekombinante D-gC1 im Vergleich zu D-gC3-infizierten Zellen erklären.

Bei PRV-Mutanten mit deletierter Signalsequenz ist zwar das primäre Translationsprodukt als intrazelluläres Protein von ca 58 kDa nachweisbar, dieses wird jedoch nicht ins Lumen des ER transloziert und es finden keine posttranslationalen Modifikationen statt. Demzufolge sind an der Oberfläche infizierter Zellen keine reifen Glykoproteine lokalisierbar. (Enquist et al., 1988; Ryan et al., 1989; 1993). Im Gegensatz dazu zeigte sowohl die Western-Blot- als auch die durchflußzytometrische Analyse D-gC2-infizierter Zellen, daß keine Synthese eines gC-spezifischen Polypeptids stattfindet. Die Translation von viraler mRNA in eukaryontischen Zellen unterliegt Kontrollmechanismen des eukaryontischen Proteinsyntheseapparats. Einer dieser Kontrollmechanismen ist die partielle Abhängigkeit der Translationsinitiation von der mRNA-Sequenz in direkter Nachbarschaft des Startcodons AUG. Die kanonische Sequenz ACCAUGG, die auch als Kozak-Sequenz bekannt ist, liefert dabei die höchste Wahrscheinlichkeit der Translationsinitiation (Kozak, 1986; Jackson 1996; Gale et al., 2000). Abweichungen von dieser Sequenz können dazu führen, daß der ribosomale Präinitiationskomplex das Startcodon überliest und die mRNA auf ein weiter stromabwärts gelegenes geeignetes Startcodon überprüft. Die PRV gC-spezifische mRNA weist im Bereich des AUG-Startcodons mit der Sequenz GCCAUGG eine im Vergleich zur Kozak-Sequenz nahezu identische Basenabfolge auf (Robbins et al., 1986a; GeneBank Acc.-No.: M12778). Auch bei den ORFV-Rekombinanten D-gC1 und D-gC3 ist die Umgebung des gC-Startcodons mit der Sequenz ATCAUGG mit Ausnahme eines Nukleotids identisch mit der Kozak-Sequenz. Aufgrund der Konstruktion des Transfervektors pDVgC2 weicht dagegen die gC-spezifische Translationsinitiationsequenz TGGGAUGA der Rekombinante D-gC2 an jeder Position von der Konsensussequenz ab, was möglicherweise dazu führt, daß die Ribosomen das Startcodon nicht zur Initiation der Translation nutzen können. Zwar befindet sich 19 Nukleotide weiter stromabwärts im gC-Gen ein weiteres Startcodon, dessen Umgebung allerdings ebenfalls stark von der Konsensussequenz abweicht und vermutlich die Bildung des ribosomalen Initiationskomplexes nicht erlaubt. Aufgrund dessen ist die Rekombinante D-gC2 möglicherweise nicht in der Lage, die Synthese eines gC-spezifischen Polypeptids in infizierten Zellen zu induzieren. Neben der Kozak-Sequenz können auch andere Eigenschaften der mRNA-Sequenz die virale Genexpression beeinflussen (Gale et al., 2000). So können z.B. Sekundärstrukturen des 5'-nicht translatierten Bereichs (5'-UTR) einer mRNA die Ribosomen an der Rastersuche eines Translationsstartcodons hindern. Die Sequenz der 5'-UTR des gC-Gens der Rekombinante D-gC3 unterscheidet sich von der 5'-

UTR des PRV-gC-Gens, was jedoch die Translation offensichtlich nicht behindert. Da sich außerdem die Sequenz der 5'-UTR zwischen den Rekombinanten D-gC2 und D-gC3 lediglich an den letzten 3 Nukleotiden unterscheidet ist demzufolge eine Sekundärstruktur der D-gC2-kodierten, gC-spezifischen mRNA in diesem Bereich als Ursache für das Ausbleiben der Synthese eines gC-Polypeptids unwahrscheinlich.

Auch die Western-Blotanalyse der Expression des vollständigen Glykoproteins gD in D-gD-infizierten permissiven Vero-Zellen deutet auf eine korrekte Synthese des primären Translationsprodukts von 45 kDa hin, welches im Verlauf der weiteren Reifung ein Molekulargewicht von ca. 60 kDa annimmt. Das Muster nachweisbarer gD-spezifischer Polypeptide entspricht damit demjenigen von PRV-infizierten Zellen, woraus geschlossen werden kann, daß auch bei Expression des Glykoproteins gD als rekombinantes ORFV-Protein eine ko- bzw. posttranslationale O-gekoppelte Glykosylierung stattfindet (Petrovskis et al., 1986a). In dieser Hinsicht unterscheidet sich gD von den übrigen bekannten PRV-Glykoproteinen und auch vom homologen Glykoprotein gD von HSV, welche alle zusätzlich N-gekoppelte Glykosylierung aufweisen. Eine wichtige Funktion der N-gekoppelten Glykosylierung ist die Stabilisierung von Glykoproteinen gegen proteolytische Degradation, wobei die Struktur der Seitenketten, sowie deren Bedeutung für die Stabilisierung des Glykoproteins in unterschiedlichen Zelltypen verschieden ist (Paulson, 1989). So konnte beispielsweise in HeLa-Zellen nach Infektion mit einer VACV-Rekombinante, die das PRV-Glykoprotein gD exprimiert, eine höhere Konzentration des Glykoproteins als in PRV-infizierten Vero-Zellen nachgewiesen werden (Marchioli et al., 1987b). Demnach erklärt das Fehlen von N-gekoppelter Glykosylierung eventuell die geringere Antigendichte des Glykoproteins gD verglichen zum Glykoprotein gC nach Infektion von Vero-Zellen mit den jeweiligen ORFV-Rekombinanten.

Die Genexpression und Replikation der Pockenviren vollzieht sich vollständig im Cytoplasma der infizierten Zelle (Moss, 1996a). Im Gegensatz dazu findet die Transkription herpesviraler Gene im Zellkern der infizierten Zelle statt (Roizman & Sears, 1996). Zusammengefaßt demonstriert die Charakterisierung der ORFV-Rekombinanten *in vitro* jedoch, daß bei Insertion der vollständigen für die Glykoproteingene gC bzw. gD kodierenden Sequenz die cytoplasmatisch synthetisierte mRNA korrekt translatiert und posttranslational modifiziert wird, was auch zur Verankerung der reifen Glykoproteine in der Zellmembran führt. Auch für andere Pockenvirus-Rekombinanten, vor allem der Spezies VACV, konnte die authentische

Expression inserierter herpesviraler Glykoproteingene *in vitro* nachgewiesen werden (Cremer et al., 1985; Cantin et al., 1987; Marchioli et al., 1987b; Weir et al., 1989; Riviere et al., 1992; Tripathy et al., 1999).

Für die Untersuchung der protektiven Kapazität der ORFV-PRV-Vektorvakzinen war es notwendig, die letale Dosis des hier verwendeten virulenten PRV-Stammes NIA-3 in der Maus zu kennen. Die Bestimmung der letalen Dosis wurde vergleichend für alle untersuchten Mäusestämme durchgeführt, wobei sich herausstellte, daß sie bei Balb/c-Mäusen ca. zehnfach geringer war, als bei C57Bl/6- oder 129/Sv/Ev-Mäusen. In der Literatur sind bei Verwendung des selben PRV-Stammes dagegen unterschiedliche und untereinander widersprüchliche Angaben zu finden sind (Schijns et al., 1994, 1995; Bianchi et al., 1998). Aus diesem Grund wurde eine Belastungsinfektion der immunisierten Tiere mit  $10^3$  pfu durchgeführt, da diese Dosis unter Berücksichtigung aller bekannten Daten einer mindestens 20-fachen LD<sub>50</sub> für alle hier verwendeten Mäusestämme entspricht.

Die Immunisierung von Mäusen mit der ORFV-Vektorvakzine D-gC3, die das vollständige Glykoprotein gC exprimiert, zeigte, daß nach nur einer Immunisierung die Mäuse unterschiedlicher Inzuchtstämme nahezu vollständig gegen die PRV-Infektion geschützt waren. Lediglich bei Balb/c-Mäusen überlebten 25% der Tiere die Infektion nicht. Allerdings ist dabei die höhere Empfänglichkeit der Balb/c- gegenüber C57Bl/6- oder 129/Sv/Ev-Mäusen zu berücksichtigen. Eine zweite Immunisierung mit dieser Rekombinante resultierte im vollständigen Schutz der Mäuse aller Stämme. In früheren Studien wurde gezeigt, daß die protektive Immunität gegen die PRV-Infektion in Mäusen nach Immunisierung mit inaktiviertem oder attenuiertem PRV entscheidend von der Entwicklung virusspezifischer Antikörper abhängt. Eine besondere Bedeutung wurde hierbei spezifischen Antikörpern des Subtyps IgG2a beigemessen (Schijns et al., 1994; 1995). Obwohl dem Immunsystem der D-gC3-immunisierten Maus mit dem Glykoprotein gC nur eine immunogene PRV-Komponente präsentiert werden kann, erreichten die Titer PRV-spezifischer IgG-Serumantikörper vergleichbare Werte wie nach Immunisierung von Mäusen mit dem attenuierten PRV-Impfstamm Begonia. Außerdem induzierte auch die ORFV-Rekombinante bei Balb/c- und 129/Sv/Ev-Mäusen eine Dominanz der PRV-spezifischen IgG2a gegenüber IgG1-Antikörpern. Bei C57Bl/6-Mäusen war das Verhältnis der Konzentrationen D-gC3-induzierter spezifischer IgG1- bzw. IgG2a-Antikörper umgekehrt. Dies wurde vergleichbar aber auch

nach Immunisierung von Mäusen dieses Stammes mit inaktiviertem PRV beobachtet und wurde auf Unterschiede im genetischen Hintergrund der einzelnen Stämme zurückgeführt. Dennoch waren auch bei PRV-immunisierten C57Bl/6-Mäusen die spezifischen IgG2a-Antikörper für den Schutz gegen PRV entscheidend (Schijns et al., 1995). Dies stimmt mit der Hypothese überein, daß die Entwicklung spezifischer IgG2a-Antikörper ein genereller Mechanismus der Wirtsimmunantwort zur Bekämpfung speziell von viralen Erregern ist (Coutelier et al., 1987, 1988).

Es wurde bereits mehrfach beschrieben, daß die Entwicklung spezifischer CD4-positiver T-Zellen die protektive Immunität der Maus gegen herpesvirale Infektionen begünstigt (Manickan et al., 1995; Manickan & Rouse, 1995; Bianchi et al., 1998; Sin et al., 1999; 2001; Harandi et al., 2001; Schon et al., 2001). Grundsätzlich werden CD4-positive T-Zellen als essentiell für die Entwicklung hoch-affiner Antikörper und einen effizienten Isotypwechsel von der Produktion von IgM- zu IgG-Antikörpern betrachtet (Parker, 1993; Oxenius et al., 1998). Die Interaktion zwischen Antigen-spezifischen B-Zellen und CD4<sup>+</sup> T-Zellen führt zur Sekretion von Cytokinen, die den Prozeß des Isotypwechsels von IgM zu IgG initiieren (Finkelmann et al., 1990). Mittels einer CD4-Knockout-Mutante des Stammes 129/Sv/Ev sollte deshalb die Bedeutung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen für die Entwicklung gC-spezifischer IgG-Antikörper und den Schutz gegen eine PRV-Infektion nach Immunisierung mit der ORFV-Vektorvakzine D-gC3 untersucht werden. Es zeigte sich, daß die CD4<sup>-/-</sup>-Mäuse nach Immunisierung mit der Rekombinante D-gC3 dennoch PRV-spezifische IgG1 und IgG2a-Antikörper produzieren. Die Titer der spezifischen IgG-Antikörper waren in den CD4<sup>-/-</sup>-Mäusen nach einer Immunisierung allerdings dreifach geringer als in entsprechend immunisierten Wildtypmäusen dieses Stammes. Außerdem war ein Drittel der CD4<sup>-/-</sup>-Mäuse nicht mehr ausreichend gegen die PRV-Infektion geschützt. Auch nach Immunisierung mit dem attenuierten PRV-Stamm Begonia waren die IgG-Antikörpertiter bei CD4<sup>-/-</sup>-Mäusen deutlich geringer als bei Wildtypmäusen und 50% der Tiere überlebten die PRV-Infektion nicht. Eine zweite Immunisierung mit der Rekombinante D-gC3 führte jedoch zu einem deutlichen Anstieg der Titer PRV-spezifischer IgG-Antikörper. In diesem Fall überlebten die Tiere die PRV-Infektion ohne Ausnahme, was wiederum die Vermutung unterstützt, daß die Konzentration PRV-spezifischer IgG-Antikörper zumindest für den von der ORFV-Vektorvakzine D-gC3 vermittelten Schutz von wichtiger Bedeutung ist.

Der Mechanismus, der es den CD4<sup>-/-</sup>-Mäusen nach Infektion mit ORFV ermöglicht, einen Ig-

Isotypwechsel zu vollziehen, ist unklar. Allerdings wurde auch in HSV-2-immunisierten CD4<sup>-/-</sup>-Mäusen beobachtet, daß spezifische IgG-Antikörper produziert werden, wenn auch wiederum in geringerer Menge als in Wildtypmäusen (Harandi et al., 2001). In anderen Studien wurden Hinweise gefunden, daß CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup> doppelt negative T-Zellen als Helferzellen die Entwicklung antiviraler IgG-Antikörper ermöglichen können (Rahemtulla et al., 1994; Sha & Compans, 2000). Darüberhinaus wurde beschrieben, daß der Isotypwechsel selbst in  $\alpha\beta$  T-Zellrezeptor-Knockout-Mäusen möglich ist, allerdings unter der Voraussetzung einer Infektion mit replikationsfähigem Virus (Maloy et al., 1998; Szomolanyi-Tsuda et al., 1998).

Es stellte sich die Frage, welche Effektorfunktion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen die Entwicklung spezifischer IgG-Antikörper unterstützt und die Protektivität der ORFV-Vektorvakzine D-gC3 erhöht. CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen (Th) werden aufgrund unterschiedlicher Cytokinsekretionsmuster in zwei Subpopulationen eingeteilt. Th1-Zellen zeichnen sich durch die Sekretion von Interleukin-2 (IL-2), Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) und Tumornekrose-Faktoren (TNF) aus, wogegen Th2-Zellen vorwiegend IL-4, IL-5, IL-6 und IL-13 produzieren (Mosmann & Coffman, 1989; Abbas et al., 1996; Oxenius et al., 1998). Generell scheint nach viralen Infektionen vorzugsweise eine Differenzierung zu Typ 1 T-Helferzellen stattzufinden (Oxenius et al., 1998). In früheren Studien wurde anhand von IFN- $\gamma$ -Rezeptor Knockout-Mäusen (IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup>) gezeigt, daß ein funktionelles IFN- $\gamma$ -System die Entwicklung einer PRV-spezifischen Immunität begünstigt (Schijns et al., 1994, 1995). Auch für die Herpes simplex Viren vom Typ 1 und 2 (HSV-1, -2) als weiteren Vertretern der  $\alpha$ -Herpesviren wurde gezeigt, daß die Sekretion von IFN- $\gamma$  durch virusspezifische CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen die Morbidität und Mortalität HSV-infizierter Mäuse reduziert. (Manickan et al., 1995; Sin et al., 1999; Harandi et al., 2001). Auch hierbei konnte die Notwendigkeit der Expression eines funktionellen IFN- $\gamma$ -Rezeptors nachgewiesen werden (Cantin et al., 1999). Demzufolge scheint für eine protektive Immunität der Maus gegen herpesvirale Erreger die Entwicklung von Th1-Zellen von Vorteil zu sein. Zur Überprüfung, ob auch für den D-gC3-vermittelten Schutz ein funktionelles IFN- $\gamma$ -System notwendig ist, wurde die Immunogenität der Rekombinante ebenfalls in IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup>-Mäusen untersucht. Im Gegensatz zu den oben genannten Befunden bei PRV-immunisierten Tieren war jedoch bei D-gC3-immunisierten Tieren weder eine Beeinträchtigung der Entwicklung PRV-spezifischer IgG2a-Antikörper noch eine höhere Mortalität als bei Wildtypmäusen dieses Stammes feststellbar. Als IFN- $\gamma$ -unabhängiger

Mechanismus der Induktion höherer Konzentrationen PRV-spezifischer IgG-Antikörper in Wildtypmäusen verglichen zu CD4<sup>-/-</sup>-Mäusen kommt eventuell auch eine Superantigen-ähnliche Eigenschaft des ORFV in Betracht. ORFV verursacht zumindest *in vitro* eine polyklonale Stimulierung porciner CD4<sup>+</sup> T-Zellen zur Sekretion von IL-2 (Fachinger et al., 2000). Möglicherweise führt dieser Mechanismus auch in der Maus zu einem veränderten lokalen Cytokinmilieu und einer daraus resultierenden verstärkten Aktivierung von B-Zellen. Allerdings spricht die geringere Konzentration spezifischer Antikörper und die höhere Mortalität auch bei PRV-Begonia-immunisierten CD4<sup>-/-</sup>-Mäusen vielmehr dafür, daß für die Entwicklung einer soliden Immunität antigenspezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen notwendig sind, da für PRV keine Superantigen-ähnlichen Eigenschaften bekannt sind. Die Experimente mit den Knockout-Mäusen deuten insgesamt darauf hin, daß die ORFV-Vektorvakzine D-gC3 die immunisierten Mäuse bei Entwicklung ausreichend hoher PRV-spezifischer IgG-Serumantikörpertiter gegen die PRV-Infektion schützt. Hierfür sind offenbar Effektorfunktionen von CD4<sup>+</sup> T-Zellen notwendig, die unabhängig von IFN- $\gamma$ R-vermittelter Signaltransduktion sind.

Der mögliche Mechanismus, über den die Vakzine-induzierten IgG-Antikörper die PRV-Infektion in der Maus kontrollieren, ist bislang nicht bekannt. Da IgG2a-Antikörper den vorrangigen Ig-Isotyp bezüglich der Bindung von Komplement- bzw. Fc-Rezeptoren darstellen, wurde von Schijns et al. (1995) die Möglichkeit der IgG2a-abhängigen Komplement- bzw. zellvermittelten Cytotoxizität gegen PRV-infizierte Zellen diskutiert. Die Interaktion von Komplement mit Virus-infizierten Zellen wurde für verschiedene Viren untersucht, scheint jedoch vor allem für die Bekämpfung nicht-cytopathogener Viren von Bedeutung zu sein (Zinkernagel et al., 2001). Außerdem konnte sowohl für HSV als auch für PRV nachgewiesen werden, daß das Glykoprotein gC die Funktion der Komplement-Komponente C3 effizient inhibiert und damit die Komplement-vermittelte Lyse verhindert (Lachmann & Davies, 1997; Lubinski et al., 1999; Maeda et al., 2002). Anhand von Experimenten mit Fc-Rezeptor-Knockout-Mäusen konnte gezeigt werden, daß Fc-Rezeptoren bei anaphylaktischen Reaktionen, Antikörper-vermittelten Autoimmunkrankheiten und eventuell bei der Antikörper-vermittelten Zerstörung von Tumorzellen von Bedeutung sein können. Dagegen gibt es bei der Maus bislang keine Hinweise auf eine wichtige Funktion von Fc-Rezeptoren bei der Bekämpfung einer Reihe bakterieller, parasitärer oder auch viraler Pathogene (Zinkernagel et al., 2001; Ravetch & Clynes 1998). Aufgrund dieser

Betrachtungen scheint es unwahrscheinlich, daß die D-gC3-induzierten PRV-spezifischen Antikörper ihre protektive Funktion in der Maus mittels Komplement- oder Fc-Rezeptor-abhängiger Mechanismen ausüben. In künftigen Experimenten kann dies unter Verwendung von Knockout-Mäusen mit Defekten in der Expression einzelner Komplement-Komponenten (Takai et al., 1994) oder Fc-Rezeptor-Knockout-Mäusen (Wessels et al., 1995) genauer geklärt werden.

Das Glykoprotein gC ist zwar *in vitro* nicht essentiell für die Virusinfektion und -replikation (Robbins et al., 1986b). Dennoch können gC-spezifische Antikörper durch Inhibition der primären Virusadsorption neutralisierende Funktion einnehmen. Hierbei wird die Interaktion von Heparan-bindenden Domänen des Glykoproteins gC und Heparansulfat-Glykosaminoglykanen der Zelloberfläche unterbunden (Ober et al., 2000). Für cytotolytische Viren gilt im Allgemeinen, daß die Kontrolle einer Reinfektion entscheidend von der Konzentration vorhandener neutralisierender Antikörper abhängt (Zinkernagel, 1996). Komplement-unabhängige, PRV-neutralisierende Antikörper waren allerdings im Serum aller untersuchten Mäusestämme erst nach zweifacher Immunisierung mit der ORFV-Vektorvakzine D-gC3 in geringer Menge nachweisbar. Dies stimmt überein mit den geringen Titern Komplement-unabhängig neutralisierender Antikörper nach Immunisierung von Mäusen mit gereinigtem Glykoprotein gC (Matsuda-Tsuchida et al., 1992) oder einer gC-spezifischen DNA-Vakzine (Hong et al., 2002). Es kann dennoch nicht ausgeschlossen werden, daß bereits nicht-nachweisbare Konzentrationen neutralisierender Antikörper bei der Kontrolle der PRV-Infektion zumindest während der frühen Phase wichtig sind. Dies könnte auch die höhere Mortalität der D-gC3-immunisierten CD4<sup>-/-</sup>-Mäuse erklären, da hier selbst nach einer zweiten Immunisierung die Konzentration neutralisierender Antikörper unterhalb der Nachweisgrenze lag.

Zur Überprüfung der protektiven Kapazität der Vektorvakzine-induzierten Antikörper wurde naiven Balb/c-Mäusen Serum von zweimal D-gC3-immunisierten Tiere transferiert. Trotz der in Abhängigkeit vom Volumen des transferierten Serums teilweise höheren PRV-spezifischen IgG-Antikörpertiter waren die naiven Rezipienten deutlich schlechter gegen die PRV-Infektion geschützt als die aktiv immunisierten Tiere. Es war lediglich eine zeitlich verzögerte Mortalität zu beobachten. Dagegen wurde von Schijns et al. (1994) berichtet, daß bei passiver Immunisierung mit Serum von Mäusen, die mit inaktiviertem PRV immunisiert worden waren, ein vollständiger Schutz der Empfängertiere gegen PRV erhalten wurde. In diesem

Experiment war die Konzentration der PRV-spezifischen IgG1- und IgG2a-Antikörper im transferierten Serum sogar geringer als im Serum der D-gC3-immunisierten Tiere. Eine Erklärung für diese unterschiedlichen Resultate könnte in der für die Belastungsinfektion der Empfängertiere verwendeten PRV-Dosis liegen, die bei Schijns et al. vierfach geringer war als im hier beschriebenen Experiment. Außerdem wurden dort C57Bl/6-Mäuse als Empfängertiere gewählt, die im Vergleich zu Balb/c-Mäusen, wie bereits beschrieben, deutlich weniger empfänglich für die PRV-Infektion sind. Andererseits ermöglicht die Immunisierung mit inaktiviertem PRV eine spezifische humorale Immunantwort gegen unterschiedliche immunogene Komponenten des Virus. Eine daraus resultierende höhere Konzentration PRV-neutralisierender Antikörper könnte die effizientere Kontrolle der Reinfektion von Mäusen nach passiver Immunisierung mit diesem Serum erklären. Allerdings war, wie hier gezeigt, die Konzentration PRV-neutralisierender Antikörper auch nach Immunisierung der Balb/c-Mäuse mit dem attenuierten PRV-Stamm Begonia unterhalb der Nachweisgrenze. Außerdem war das Serum dieser Tiere nicht in der Lage, passiv immunisierte Tiere (n=3) gegen die PRV-Infektion zu schützen (nicht gezeigt). Aufgrund dieser widersprüchlichen Befunde hinsichtlich der essentiellen Bedeutung der Vektorvakzine-induzierten Antikörper für eine protektive Immunität, wurden Untersuchungen hinsichtlich der protektiven Kapazität der Rekombinante D-gC3 in Mäusen mit einer defekten B-Zell-Reifung ( $\mu$ MT) begonnen. Bei diesen Mäusen ist die Produktion von Antikörpern sämtlicher Isotypen ausgeschlossen (Kitamura et al., 1991).

Die bisherigen Überlegungen geben Hinweise, daß die Vektorvakzine-induzierten gC-spezifischen Antikörper wichtig sind, um die Viruslast nach einer PRV-Infektion zu reduzieren, für einen effektiven Langzeitschutz jedoch neben der B-Zell-Hilfe weitere Effektormechanismen von  $CD4^+$  T-Zellen notwendig sind. Übereinstimmend damit haben Untersuchungen hinsichtlich protektiver Immunmechanismen der Maus gegen die Infektion mit HSV-2 gezeigt, daß sowohl virusspezifische Antikörper als auch HSV-2-geprägte T-Zellen gleichzeitig für die Kontrolle der lokalen Virusvermehrung notwendig sind (Morrison et al., 2001). Es wurde dabei die Möglichkeit diskutiert, daß HSV-spezifische Th1-Zellen durch die Sekretion von  $IFN-\gamma$  und  $TNF-\alpha$  in Makrophagen das Enzym iNOS aktivieren, welches die Produktion von Stickstoffoxid (NO) katalysiert. NO besitzt antimikrobielle Aktivität gegen ein breites Spektrum intra- und extrazellulärer Mikroben, einschließlich von Viren (MacMicking et al., 1997). Eine antivirale Funktion von NO wurde *in vitro* für HSV-1-

infizierte Makrophagen und *in vivo* anhand von HSV-1-infizierten iNOS-Knockout-Mäusen gezeigt (Karupiah et al., 1993; MacLean et al., 1998). In diesem Zusammenhang ist eventuell auch die Expression von CD40-Ligand (CD40L) durch aktivierte T-Helferzellen von Bedeutung. Die Interaktion von CD40L auf aktivierten T-Zellen und CD40 auf antigenspezifischen B-Zellen ist einerseits essentiell für den Ig-Isotypwechsel zur Produktion von IgG-Antikörpern gegen Thymus-abhängige Antigene (Oxenius et al., 1996). Zum anderen unterstützt die CD40/CD40L-Interaktion eine verstärkte NO-Produktion durch Makrophagen (Stout et al., 1996; Bingaman et al., 2000; Netea et al., 2002). Es konnte desweiteren gezeigt werden, daß für die effiziente Bekämpfung zahlreicher mikrobieller Erreger, einschließlich des Herpes simplex Virus, die T-Zell-vermittelte Aktivierung von Makrophagen über die CD40/CD40L-Interaktion notwendig ist. (Netea et al., 2002; Edelmann & Wilson, 2001; Ramshaw et al., 1997). Möglicherweise führt demnach auch bei D-gC3-induzierten, PRV-spezifischen T-Helferzellen die Sekretion von Th1-Cytokinen sowie die CD40/CD40L-Interaktion zu einer verstärkten antiviralen NO-Produktion in Peritoneal- oder Gewebemakrophagen. Die Phagozytose von Antikörper-opsonisierten Viruspartikeln durch aktivierte Makrophagen und deren anschließende NO-vermittelte Zerstörung bietet somit eine mögliche Erklärung für die höhere Protektivität der D-gC3-induzierten Antikörper bei gleichzeitigem Vorhandensein PRV-geprägter T-Zellen. Die Bedeutung von TNF- $\alpha$  und CD40/CD40L für die Induktion von NO und dessen Funktion beim D-gC3-vermittelten Schutz gegen PRV kann in weiteren Experimenten unter Verwendung entsprechender Knockout-Mäuse untersucht werden (Renshaw et al., 1994; Kawabe et al., 1994; Wei et al., 1995; Körner et al., 1997).

CD8-positiven cytotoxischen T-Zellen (CTL) wird vor allem eine Funktion bei der Eliminierung nicht-cytolytischer Viren vor deren Freisetzung durch die infizierte Zelle beigemessen (Zinkernagel, 1996). Es wurde jedoch auch schon mehrfach eine wichtige Funktion für CTLs bei der Bekämpfung herpesviraler Infektionen der Maus beschrieben (Schmid & Rouse 1992; Zuckermann et al., 1990). Dabei konnte gezeigt werden, daß CD8<sup>+</sup> T-Zellen vor allem die Neurovirulenz einer primären HSV-1-Infektion reduzieren (Simmons & Tschärke, 1992; Kumaraguru et al., 2001). Lange Zeit wurde zwar die Hypothese vertreten, daß in Neuronen keine MHC-Klasse I-Expression stattfindet, um zu gewährleisten, daß diese Zellen gegen die CD8<sup>+</sup> T-Zell-vermittelte Lyse geschützt sind (Joly et al., 1991). Allerdings konnte gezeigt werden, daß die HSV-Infektion sensorischer Neuronen eine transiente MHC-

Klasse I-Expression und eine Interaktion der infizierten Neuronen mit T-Zellen *in vivo* induziert (Pereira & Simmons, 1999). Übereinstimmend mit der vitalen Bedeutung von Neuronen wird jedoch die CD8<sup>+</sup> T-Zell-vermittelte Inhibition der produktiven Virusvermehrung nicht durch Lyse der infizierten Zellen erreicht. Vielmehr wurde diskutiert, daß die Sekretion von Cytokinen durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen den Übergang von einer produktiven Virusvermehrung in eine latente Phase induzieren und benachbarte Neuronen in einen antiviralen Zustand versetzen können (Simmons & Tschärke, 1992). Da das Glykoprotein gC sowohl bei PRV als auch bei HSV als guter Induzent spezifischer CTLs gilt (Glorioso et al., 1985; Rosenthal et al., 1987; Zuckermann et al., 1990), besteht demnach die Möglichkeit, daß auch die ORFV-Vektorvakzine D-gC3 gC-spezifische CD8-positive T-Zellen induziert, die für die Kontrolle der Neurovirulenz und damit für einen stabilen Vektorvakzine-vermittelten Langzeitschutz gegen PRV von Bedeutung sind. Zur Klärung dieser Möglichkeit sind Versuche hinsichtlich der Protektivität der Vektorvakzine in CD8-Knockout-Mäusen des Stammes 129/Sv/Ev in Vorbereitung.

Die ORFV-Rekombinante D-gD, die das vollständige PRV-Glykoprotein gD exprimiert, erwies sich hinsichtlich der Induktion einer PRV-spezifischen Immunität in der Maus als wesentlich weniger effizient als die Rekombinante D-gC3. Besonders auffällig war dies bei Balb/c-Mäusen, die selbst nach einer zweiten Immunisierung mit dieser Rekombinante nur partiell gegen die PRV-Infektion geschützt waren. Bei 129/Sv/Ev- und C57Bl/6-Mäusen war die Anzahl geschützter Tiere nach D-gD-Immunisierung deutlich höher, allerdings muß auch hier wieder die verglichen zu Balb/c-Mäusen geringere Empfänglichkeit dieser beiden Stämme gegen die PRV-Infektion berücksichtigt werden. Es stellte sich heraus, daß die Rekombinante D-gD nach einer singulären Immunisierung nicht in der Lage war PRV-spezifische IgG-Antikörper in nachweisbarer Menge zu induzieren. Auch nach einer zweiten Immunisierung waren die PRV-spezifischen Titer beider IgG-Subklassen ca. 50-fach geringer als in D-gC3-immunisierten Mäusen, wogegen die Titer neutralisierender Antikörper vergleichbar hoch waren. Nach Transfer des Serums der zweimal D-gD-immunisierten Tiere war keines der passiv immunisierten Empfängertiere gegen die PRV-Infektion geschützt und auch eine zeitlich verzögerte Mortalität, wie sie durch die D-gC3-induzierten gC-spezifischen Antikörper vermittelt wurde, war nicht zu beobachten. Diese Beobachtungen sind ein weiterer Hinweis darauf, daß PRV-neutralisierende Antikörper nur eine untergeordnete Bedeutung

beim ORFV-Vektorvakzine-vermittelten Schutz gegen PRV einnehmen. Stattdessen scheint die geringere Protektivität der Rekombinante D-gD gegenüber D-gC3 auf die deutlich geringere Konzentration nicht-neutralisierender IgG-Antikörper zurückzuführen zu sein. Da auch bei den D-gD-immunisierten CD4<sup>-/-</sup>-Mäusen und IFN- $\gamma$ R<sup>-/-</sup>-Mäusen eine Korrelation zwischen der Konzentration PRV-spezifischer IgG-Serumantikörper und dem Schutz gegen PRV festzustellen war, spricht vieles dafür, daß auch hier spezifische Antikörper das Bindeglied zwischen aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen und unspezifischen Immunmechanismen, wie sie oben diskutiert wurden, darstellen. Eine eindeutige Beurteilung der protektiven Funktion D-gD-induzierter Antikörper ist allerdings auch hier nur anhand von Untersuchungen mit  $\mu$ MT-Mäusen möglich. Auch eine mögliche Funktion Vektorvakzine-induzierter gD-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen muß in weiteren Experimenten noch geklärt werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, daß die alleinige Expression der Glykoproteine gC oder gD durch die ORFV-Vektorvakzinen D-gC3 bzw. D-gD Mäuse gegen eine PRV-Infektion schützt. Es konnte eine Korrelation zwischen der Konzentration induzierter PRV-spezifischer Antikörper und der Mortalität der Tiere nach einer Belastungsinfektion festgestellt werden. Die Resultate deuten jedoch darauf hin, daß für den Vektorvakzine-vermittelten Schutz unterschiedliche Mechanismen der adaptiven Immunantwort eine Rolle spielen, wobei ein Zusammenwirken mit Mechanismen der angeborenen Immunität möglich ist. Die Induktion virusspezifischer Antikörper, deren Funktionalität in weiteren Experimenten zu klären bleibt, scheint vor allem in der frühen Phase der Infektion von wichtiger Bedeutung zu sein. Ohne das Vorhandensein immunologisch geprägter T-Zellen sind die Antikörper jedoch nicht ausreichend für einen effektiven Langzeitschutz. Die Effektorfunktion von T-Helferzellen besteht dabei eventuell in der Cytokin-vermittelten Koordination zwischen humoraler Immunität und Mechanismen der angeborenen Immunität. Vermutlich sind hierfür T-Helferzellen vom Typ 1 verantwortlich. Deshalb ist es neben den Experimenten mit verschiedenen Knockout-Mäusestämmen von Interesse, das Cytokinexpressionsmuster D-gC3-induzierter PRV-spezifischer T-Helferzellen *in vitro* zu charakterisieren. Es besteht außerdem die Möglichkeit, daß der Anteil der humoralen bzw. zellvermittelten Immunität in Abhängigkeit vom rekombinant exprimierten Glykoprotein variiert. Interessant in diesem Zusammenhang ist auch die Beobachtung, daß nach Immunisierung mit inaktiviertem D-gC3 75% der Mäuse gegen die PRV-Infektion geschützt

waren, obwohl die induzierten Antikörpertiter drastisch geringer waren als nach Immunisierung mit Lebendvirus. Auch dies deutet darauf hin, daß das Wirtsimmunsystem über redundante Mechanismen zur Bekämpfung des Virus verfügt, wobei die ORFV-Vektorvakzinen offensichtlich die immunologische Prägung mehrerer Komponenten der adaptiven Immunantwort ermöglichen.

Beim Vergleich der ORFV-Rekombinanten D-gC1, D-gC2 und D-gC3 konnte gezeigt werden, daß ein direkter Zusammenhang zwischen der Effizienz der Fremdgenexpression *in vitro* und der Immunogenität des rekombinanten Glykoproteins bzw. der Proteinfragmente *in vivo* vorhanden ist. Wie bereits diskutiert, hängt die Effizienz der Fremdgenexpression dabei offensichtlich von der strukturellen Beschaffenheit des rekombinanten Proteins (D-gC1) sowie von Vektor-spezifischen Kontrollelementen der mRNA-Translation (D-gC2) ab. Dies ist vor allem im Hinblick auf die Entwicklung von ORFV-Rekombinanten von Interesse, welche die kodierende Sequenz für multiple T- bzw. lineare B-Zellepitope eines Pathogens tragen. Möglicherweise ist hierfür die Fusionierung der immunogenen Epitope an Strukturbestandteile notwendig, welche für eine effiziente Translationsinitiation und Membranverankerung des rekombinanten Polypeptids sorgen.

Die zumindest partielle Abhängigkeit der Antikörperproduktion und Protektion der Mäuse von CD4<sup>+</sup> T-Zellen setzt deren Aktivierung über die Interaktion zwischen T-Zell-Rezeptor und Peptid-beladenen MHC Klasse II-Molekülen auf der Oberfläche Antigen-präsentierender Zellen (APC) voraus (Germain & Margulies, 1993). Es stellte sich deshalb die Frage, auf welchem Weg das Vektor-kodierte Antigen dem Immunsystem präsentiert wird. APCs, die als einzige eine MHC Klasse II-Expression aufweisen, sind über unterschiedliche Mechanismen in der Lage, lösliches Antigen, Antigenkomplexe oder partikuläres Antigen aufzunehmen. Das Antigen wird in sauren endosomalen Kompartimenten zu Peptidfragmenten degradiert, welche anschließend von MHC Klasse II-Molekülen gebunden und an die Zelloberfläche transportiert werden (Neefjes & Momburg, 1993). Für eine Aktivierung PRV-spezifischer T Zellen auf diesem Weg wäre allerdings die Inkorporation des Glykoproteins gC im ORFV-Partikel vorauszusetzen. Für rekombinante Vaccinia-Viren konnte der Einbau des Fremdanogens in verschiedene Bestandteile des umhüllten, reifen Viruspartikels gezeigt werden (Gomez & Esteban, 2001). Die Induktion geringer PRV-spezifischer Antikörpertiter auch mit inaktiviertem Virus steht damit zwar in Einklang, bietet

jedoch keine Erklärung für die signifikant höheren Titer nach Immunisierung mit Lebendvirus. Offensichtlich ist für die Induktion hoher spezifischer Antikörperkonzentrationen eine Glykoproteingegen-Expression *in vivo* notwendig. Dies steht zunächst im Widerspruch zum klassischen Weg der Proteinprozessierung für die Beladung von MHC Klasse II-Molekülen. Es wurde jedoch beschrieben, daß auch endogen synthetisierte virale Proteine in der Lage sind, MHC Klasse II-Moleküle zu beladen (Oxenius et al., 1995). Dies gilt vor allem für Proteine, die während ihrer Biosynthese das Endoplasmatische Retikulum (ER) passieren (Oxenius et al., 1998). In Studien mit rekombinanten Vaccinia-Viren wurde gezeigt, daß auch bei intrazellulär synthetisierten viralen Proteinen eine endosomale Prozessierung für die Präsentation von Proteinfragmenten über MHC Klasse II-Moleküle notwendig ist (Jin et al., 1988; Jaraquemada et al., 1990; Malnati et al., 1992). Möglich wäre dies durch den vesikulären Transport membranständiger rekombinanter Proteine zu sauren endosomalen Kompartimenten und anschließender Degradation und Beladung von MHC Klasse II-Molekülen (Polydefkis et al., 1990). Ein solcher Mechanismus ist für die Präsentation gC-bzw. gD-spezifischer Peptide denkbar, da bei Expression der Glykoproteine als rekombinante ORFV-Proteine zumindest *in vitro* eine Membranverankerung gezeigt werden konnte. Interessant in diesem Zusammenhang ist auch die Beobachtung, daß für das D-gC1-kodierte gC-Fragment eine verringerte Effizienz der Membranverankerung verglichen zum D-gC3-kodierten vollständigen Glykoprotein festgestellt wurde, was möglicherweise im Zusammenhang mit der geringeren Immunogenität des gC-Fragments steht. Dieser Mechanismus der Antigenpräsentation setzt allerdings voraus, daß die Antigen-präsentierende Zelle direkt von den ORFV-Vektoren infiziert wird. Da es sich bei ORFV prinzipiell um ein cytolytisches Virus handelt, besteht andererseits auch die Möglichkeit, daß eine cytopathogene Infektion anderer somatischer Zelltypen im Muskelgewebe zur Freisetzung *de novo*-synthetisierter PRV-Glykoproteine führt, die dann von Antigen-präsentierenden Zellen verarbeitet und über MHC Klasse II-Moleküle präsentiert werden. Zumindest *in vitro* wurde beobachtet, daß die Infektion der murinen Fibroblastenzelllinien NIH/3T3 und L-929 mit den ORFV-Rekombinanten einen massiven cytopathogenen Effekt innerhalb von 24 Stunden p.i. verursacht (nicht gezeigt), obwohl es nicht zur Produktion infektiöser Virusnachkommen kommt. Demzufolge schließt auch eine nicht-produktive Replikation des ORFV die Lyse der Wirtszelle nicht aus. Ähnliches wurde bereits für nicht-replizierende Vaccinia-Viren *in vitro* beschrieben und ist vermutlich darauf

zurückzuführen, daß auch nicht-replizierende Pockenviren in der infizierten Wirtszelle eine starke Expression viraler Proteine induzieren, was letztlich zum Zelltod führt (Somogyi et al., 1993; Ober et al., 2002).

Im Hinblick auf die Sicherheit eines viralen Vektors ist es von entscheidender Bedeutung, daß das Virus sich im Wirtstier nicht produktiv vermehrt. In den meisten Studien über nicht-replizierende Pockenviren wurde festgestellt, daß in nicht-permissiven Zellen sowohl frühe und späte Genexpression als auch die Replikation der Virus-DNA stattfindet (Sutter & Moss, 1992; Drexler et al., 1998; Ramirez et al., 2000., Somogyi et al., 1993; Stannard et al., 1998). Eine aberrante Morphogenese erlaubt in diesen Fällen jedoch keine Produktion infektiöser Virusnachkommen. In anderen Fällen konnte die abortive Infektion bereits auf das Ausbleiben der Replikation viraler DNA und der Expression später viraler Gene zurückgeführt werden (Taylor et al., 1995; Holzer et al., 1999; Ober et al., 2002). Da für ORFV diesbezüglich weder *in vitro* noch *in vivo* gesicherte Daten bekannt sind, wurde begonnen, diesen Aspekt in den murinen Zelllinien NIH/3T3 und L-929 genauer zu untersuchen. Die Immunogenität der PRV-spezifischen Vektorvakzinen *in vivo* war bereits ein eindeutiger Hinweis darauf, daß in der Maus zumindest die Expression früher viraler Gene gewährleistet ist. Dementsprechend konnte auch *in vitro* gezeigt werden, daß in den Vektorvakzine-infizierten murinen Zellen die frühe Transkription der PRV Glykoproteingene stattfindet und die mRNA zur Synthese von membranständigen Glykoproteinen genutzt wird. Das Molekulargewicht des Glykoproteins gC deutet dabei darauf hin, daß das Protein auch in den murinen Zellen sowohl N- als auch O-gekoppelte Glykosylierung erfährt. Die geringfügig unterschiedliche Molekulargewichtsverteilung gD-spezifischer Polypeptide in den murinen Zellen gegenüber Vero-Zellen könnte eventuell auf Unterschieden in der O-gekoppelten Glykosylierung beruhen. Wie bereits erwähnt ist die Struktur der Kohlenhydratseitenketten von Glykoproteinen abhängig vom Zelltyp, in dem das Protein exprimiert wird (Paulson, 1989). Variationen hinsichtlich der O-gekoppelten Glykosylierung in Abhängigkeit von der verwendeten Zelllinie wurden beispielsweise auch für das Glykoprotein gC von HSV-1 beschrieben (Lundstrom et al., 1987). Unklar ist, warum die Syntheserate des Glykoproteins gC, jedoch nicht die des Glykoproteins gD in den murinen Zellen im Vergleich zu Vero-Zellen deutlich geringer ist (Abb. 4.10). Die Western-Blot- und die durchflußzytometrische Analyse von Lysaten PRV-infizierter NIH/3T3- oder L-929-Zellen hinsichtlich der Expression der Glykoproteine gC und gD steht jedoch noch aus. Damit könnte geklärt

werden, ob in den murinen Zellen das Glykoprotein gC unabhängig vom Expressionssystem in geringerer Menge synthetisiert wird als in Vero-Zellen und ob mögliche Unterschiede in der Glykosylierung des Glykoproteins gD tatsächlich von der jeweiligen Wirtszelle abhängig sind.

Die Expression der PRV-Glykoproteine unter Kontrolle des frühen ORFV vegf-e-Promotors ließ darauf schließen, daß der Abbruch der ORFV-Replikation in den murinen Zellen, wenn überhaupt, erst in der späten Phase der Virusreplikation stattfindet. Aus diesem Grund wurde auch die Expression später Gene, sowie die Replikation des viralen Genoms und die Virusmorphogenese in diesen Zellen genauer untersucht. Es zeigte sich, daß auch das späte B2L-Gen in beiden murinen Zellen transkribiert wird. Allerdings war die Transkriptionsrate in NIH/3T3-Zellen deutlich geringer als in L-929-Zellen, die diesbezüglich nur einen geringen Unterschied zu den ORFV-permissiven Vero-Zellen aufwiesen. Generell ist die Expression später pockenviraler Gene von der Replikation der viralen DNA abhängig (Moss, 1990). Dementsprechend wurde beschrieben, daß die Expression des B2L-Gens, wie auch des homologen VACV-F13L-Gens erst nach Beginn der DNA-Replikation nachweisbar ist (Hiller & Weber, 1985; Sullivan et al., 1994). Es ist deshalb bislang unklar, weshalb die Transkription des B2L-Gens in den murinen Zellen stattfindet, obwohl eine Replikation der viralen DNA in L-929-Zellen nur in sehr geringem Ausmaß und in NIH/3T3-Zellen überhaupt nicht nachweisbar war. Als mögliche Ursache für die Abhängigkeit der Expression später Gene von der Replikation der Virus-DNA wurde eine Maskierung der DNA des Virusinokulats durch virale Proteine diskutiert. Als Folge wäre die effiziente Bindung von Transkriptionsfaktoren für die Expression später Gene ausschließlich an *de novo* synthetisierter viraler DNA möglich (Keck et al., 1990). Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß bereits die sehr geringe Rate der ORFV-DNA-Replikation in L-929-Zellen eine ausreichende Menge freier Virus-DNA für eine starke B2L-spezifische Transkription bereitstellt. Dies würde auch die signifikant geringere Menge nachweisbarer B2L-spezifischer Transkripte in NIH/3T3-Zellen gegenüber L-929-Zellen erklären.

Das 39K-Hüllprotein, welches vom späten F1L-Gen kodiert wird, war in der Western-Blotanalyse zwar in beiden murinen Zelllinien in vergleichbarer Menge nachweisbar. Es kann jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden, daß es sich hierbei nicht um *de novo* synthetisiertes Protein, sondern eventuell um residuales Antigen des Virusinokulats handelte. In diesem Zusammenhang ist eventuell die Beobachtung von Bedeutung, daß auch ein 31 kDa

schweres Protein vom 39K-spezifischen monoklonalen Antikörper 4D9 in Vektor-infizierten Vero-Zellen, jedoch nicht in NIH/3T3- oder L-929-Zellen nachweisbar war. In einer früheren Studie wurde gezeigt, daß dieses Produkt ausschließlich in gereinigten Virionen nachweisbar ist (Czerny et al., 1997). Dies deutet eventuell darauf hin, daß in Vero-Zellen eine Neusynthese des 39K-Hüllproteins und eine Produktion reifer, umhüllter Virusnachkommen stattfindet, in den murinen Zelllinien dagegen nicht. Allerdings muß zur Überprüfung dieser Hypothese zunächst auch die Transkription des F1L-Gens in den verschiedenen Zelllinien vergleichend untersucht werden.

Übereinstimmend mit der Feststellung, daß in den murinen Zellen die Replikation der ORFV-DNA nur eingeschränkt (L-929) bzw. überhaupt nicht (NIH/3T3) stattfindet, konnte gezeigt werden, daß auch keine infektiösen Virusnachkommen produziert werden. Es war deshalb zu vermuten, daß die Virusmorphogenese bereits in einem frühen Stadium unterbrochen wird. Umso überraschender war es, daß bei elektronenmikroskopischer Untersuchung der ORFV-infizierten L-929-Zellen auch fortgeschrittene Reifungsstadien zu erkennen waren. Zwar wurden bislang keine Daten hinsichtlich des Reifungsprozesses der Parapockenviren veröffentlicht. Die einzelnen Stufen der Pockenvirusmorphogenese (Übersicht in Sodeik & Krijnse-Locker, 2002) sind jedoch generell für alle dahingehend untersuchten Genera vergleichbar (Moss, 1996a). Auch für ORFV waren in permissiven Vero-Zellen bereits in früheren Untersuchungen ähnliche Reifungsstadien differenzierbar (Rziha & Büttner, unveröffentlicht). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte die Entstehung unreifer Partikel aus einer halbmondförmigen Membranstruktur (Crescent) an dichten Aggregaten granulären Materials (sogenannte Virosomen), gezeigt werden. Die Crescents reifen zu kugelförmigen intrazellulären Virionen (IV), die mit dem granulären Material gefüllt sind. Während die elektronendichte Matrix der IV kondensiert, wird vermutlich die DNA aufgenommen. Bei der weiteren Reifung der IVs war häufig eine zusätzliche Umhüllung mit Membranen eines subzellulären Kompartiments zu beobachten. Ein Teil der IMV wird anschließend von einer weiteren Doppelmembran umhüllt, welche, in Analogie zu VACV, vermutlich vom Trans-Golgi-Netzwerk stammt (Schmelz et al., 1994). Diese intrazellulär umhüllten Virionen (IEV) können dann durch einen Cytoskelett-vermittelten aktiven Transport an die Zellperipherie transportiert werden, wo sie mit der Plasmamembran fusionieren und als extrazellulär umhüllte Virionen (EEV) freigesetzt werden. Eine besondere Eigenschaft des VACV ist die Tatsache, daß sowohl IMV als auch EEV infektiöse Partikel darstellen (Vanderplasschen et

al., 1998). Dies trifft aufgrund der hier dargestellten Ergebnisse auch für ORFV zu, da in permissiven Vero-Zellen eine Zunahme infektiöser intrazellulärer und extrazellulärer Partikel über die Zeit nachgewiesen werden konnte. Da auch in L-929-Zellen IMV-ähnliche Strukturen gefunden wurden, ist bislang unklar, weshalb diese intrazellulären Partikel offensichtlich nicht infektiös sind. Eine logische Erklärung hierfür wäre sicherlich, daß diese Partikel aufgrund der sehr geringen Replikationsrate des viralen Genoms in L-929-Zellen keine virale DNA enthalten. Allerdings bliebe dann zu klären, wie es zur Ausbildung IMV-ähnlicher Partikel kommt, da diese Stufe im pockenviralen Reifungsprozess nach allem bisher Bekannten von der Inkorporation viraler DNA abhängt. Die Behandlung ORFV-infizierter Zellen mit Cytosinarabinsid, welches die Replikation der viralen DNA verhindert, sollte Aufschluß darüber geben, ob die Bildung IMV-ähnlicher Partikel bei PPV auch ohne die Aufnahme viraler DNA möglich ist. Auffällig war, daß in L-929-Zellen eine Umhüllung unreifer Partikel an subzellulären Kompartimenten nicht erkennbar war, weshalb die Partikel eventuell unvollständig umhüllt und deshalb nicht infektiös sind. Ähnliches wurde bereits für Penguinoxvirus als einem Mitglied der Gattung Avipox in nicht-permissiven Säugierzellen diskutiert (Stannard et al., 1998). Möglicherweise ist auch die Ineffizienz mehrerer aufeinander folgender Reifungsprozesse in der Summe für die nicht nachweisbare Infektiösität von ORFV in L-929-Zellen verantwortlich. So wurde beispielsweise auch für Fowlpoxvirus als einem weiteren Vertreter der Gattung Avipox vermutet, daß die abortive Replikation in Säugierzellen auf die Kombination einer ineffizienten Expression später Gene und die ineffiziente Partikelreifung aus unreifen, kondensierten Nukleotiden zurückzuführen ist (Somogyi et al., 1993).

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimente erlauben bislang kein schlüssiges Modell hinsichtlich der abortiven Replikation des ORFV in den hier getesteten murinen Zelllinien NIH/3T3 und L-929. Hierfür sind weitere Untersuchungen bezüglich der Expression später viraler Gene und der Replikation des viralen Genoms notwendig. Außerdem werden momentan Experimente zur strukturellen und funktionellen Charakterisierung gereinigter Partikel aus permissiven Vero-Zellen und nicht-permissiven L-929-Zellen durchgeführt. In den oben genannten Studien mit nicht-replizierenden Orthopox- bzw. Avipoxviren wurde außerdem eine starke Abhängigkeit der Fähigkeit zur Replikation der viralen DNA und der Produktion infektiöser Virusnachkommen von der Wirtszellspezies und der Gewebespezifität der Wirtszelle festgestellt. Deshalb stehen vergleichbare Untersuchungen auch nach ORFV-

Infektion von Wirtszellen anderer Spezies und anderer Gewebespezifität an. Neben der *in vitro*-Charakterisierung der ORFV-Replikation in murinen Zellen sind darüberhinaus Studien zur Dissemination des Virus *in vivo* und zur Expression des Vektor-kodierten Fremdgens in unterschiedlichen Geweben notwendig.

Die Immunogenität nicht-replizierender rekombinanter Pockenviren wurde bereits in zahlreichen Modellsystemen belegt (Paoletti et al., 1995; Moss, 1996b; Paoletti, 1996; Ramirez et al., 2000a). Ein Problem bei nicht-replizierenden Vaccinia-Viren oder Avipoxviren stellt jedoch die Tatsache dar, daß die effiziente Vermehrung fast ausschließlich in primären Hühnerembryo-Fibroblasten (CEF) möglich ist, was sehr zeitaufwendig ist und die Produktion großer Mengen an rekombinanten Viren beeinträchtigt (Ober et al., 2002). Lediglich für den attenuierten VACV-Stamm MVA konnte die Adaptation an permanente Zelllinien gezeigt werden (Drexler et al., 1998; Mayr, 2001b). Da es sich bei MVA jedoch um einen Abkömmling des VACV mit breitem Wirtsspektrum handelt, kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Adaptation an Säugerzellen die Virulenz in Säugetieren erhöht und die Sicherheit daraus resultierender MVA-ähnlicher Stämme beeinträchtigt ist. Diesem Problem wurde durch die Konstruktion defekter Vakzinia-Viren begegnet, die zwar ein breites Wirtsspektrum in permanenten Säugerzellen *in vitro* aufweisen, aufgrund der Deletion des Uracil-DNA-Glykosylasegens jedoch nur in komplementierenden Zelllinien replikationsfähig sind (Holzer et al., 1999; Ober et al., 2002). Die Nutzung des ORFV als pockenviraler Vektor stellt unter diesen Gesichtspunkten eine interessante Alternative dar. ORFV verbindet den Vorteil eines natürlich begrenzten Wirtsspektrums, wie es auch für Vertreter der Gattung Avipox zutrifft, mit der Möglichkeit zur Vermehrung in einer permanenten Zelllinie, die keine komplementierenden Eigenschaften aufweisen muß. Somit wird zum einen Sicherheitsanforderungen an eine virale Vektorvakzine Rechnung getragen. Zum anderen ist die Bedingung der effizienten und kontrollierbaren Produktion von rekombinanten Viren erfüllt (World Health Organization, 1998).

Einen weiteren wichtigen Aspekt für die Nutzung von ORFV-Rekombinanten als virale Vektoren stellt die Beobachtung dar, daß ORFV-Vektorvakzinen die Induktion einer protektiven Fremdanigen-spezifischen Immunantwort auch dann ermöglichen, wenn das Tier bereits zuvor eine ORFV-spezifische immunologische Prägung erfahren hat. Sowohl die Entwicklung gC-spezifischer IgG-Serumantikörper als auch die protektive Kapazität der

Rekombinante D-gC3 war bei immunologisch gegen das ORFV-Virus geprägten Mäusen gegenüber naiven Mäusen nicht beeinträchtigt. Die Ursache hierfür ist vermutlich darin begründet, daß selbst im Schaf als natürlichem Wirt für das ORFV die adaptive Virus-spezifische Immunantwort kurzlebig ist und die Ausprägung klinischer Symptome nach einer Reinfektion nur unvollständig verhindert (Buddle et al., 1984; McKeever et al., 1987; Haig & Mercer, 1998). Da sich das ORFV in der Maus vermutlich nicht produktiv vermehren kann, ist die immunologische Prägung gegen das Virus offensichtlich unzureichend, um das Virus nach Reinfektion schnell und effizient eliminieren zu können. Dies eröffnet die Möglichkeit der multiplen Immunisierung gegen verschiedene ORFV-Vektor-kodierte Antigene in zeitlichen Abständen und bietet auch eine Erklärung für die deutlich verbesserte Immunität der Mäuse gegen PRV nach einer Boost-Immunisierung mit den PRV-spezifischen Vektorvakzinen. Im Gegensatz dazu konnte in zahlreichen Modellsystemen gezeigt werden, daß bei Maus und Mensch eine VACV-spezifische immunologische Prägung die Entwicklung einer primären Immunantwort gegen VACV-Vektorvaccine-kodiertes Antigen beeinträchtigt (Perkus et al., 1985; Rooney et al., 1988; Kündig et al., 1993; Belyakov et al., 1999; Kanesthasan et al., 2000; Ramirez et al., 2000b). Es wurde versucht, dies durch Verwendung des nicht-replizierenden VACV-Stammes MVA, gegen den eine schwächere Immunantwort induziert wird als gegen virulentes VACV, zu umgehen. Allerdings war auch bei MVA-geprägten Mäusen die Induktion einer primären Immunantwort gegen MVA-Vektorvaccine-kodiertes Antigen gegenüber naiven Mäusen verschlechtert (Ramirez et al., 2000b; Sharpe et al., 2001).

Neben viralen Vektorvakzinen galt in den letzten Jahren der Entwicklung von DNA-Vakzinen besondere Beachtung. In zahlreichen Modellsystemen konnte für DNA-Vakzinen die Entwicklung einer protektiven Immunantwort vor allem gegen virale Erreger gezeigt werden (Donnelly et al., 1997). Wie virale Lebendvakzinen induzieren auch DNA-Vakzinen sowohl zellvermittelte als auch humorale Immunmechanismen, wobei vor allem bei intramuskulärer Applikation eine bevorzugte Entwicklung von T-Helferzellen vom Typ 1 und cytotoxischen T-Lymphozyten zu beobachten ist (Donnelly et al., 1997; Lewis & Babiuk, 1999). Auch die Immunogenität PRV-Glykoprotein-spezifischer DNA-Vakzinen wurde bereits mehrfach untersucht (Ho et al., 1998; Chang et al., 1998; Gerds et al., 1999; Haagmans et al., 1999; van Rooij et al., 2000; Hong et al., 2002). Es stellte sich heraus, daß je nach Wirtsspezies, rekombinantem Glykoprotein, Immunisierungsstrategie sowie Stringenz der

Belastungsinfektion die protektive Kapazität der DNA-Immunisierung stark variierte. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden erstmals vergleichende Untersuchungen zur Immunogenität der PRV-spezifischen ORFV-Vektorvakzinen und DNA-Vakzinen unter einheitlichen Bedingungen durchgeführt. Da dies in Zusammenarbeit mit einer französischen Arbeitsgruppe erfolgte, wurden die Ergebnisse hier nicht dargestellt. Plasmide, die als Abkömmlinge des Vektors pcDNA (Invitrogen) die PRV-Glykoproteine gB, gC bzw. gD unter Kontrolle des Cytomegalovirus (CMV)-Promotors exprimieren, wurden freundlicherweise von Dr. A. Jestin (AFFSA, Ploufragan, Frankreich) zur Verfügung gestellt. Nach einmaliger intramuskulärer Immunisierung von Balb/c-Mäusen mit bis zu 50 µg einer Mischung der Glykoprotein-spezifischen Plasmide wiesen die Tiere keine PRV-spezifische Immunität auf und überlebten die Infektion nicht länger als nicht-immunisierte Kontrolltiere. Da sich auch in anderen Studien erwies, daß die DNA-Vakzinierung bei hochpathogenen Organismen nur einen unzureichenden Schutz vermittelt, wurden unterschiedliche Versuche zur Verbesserung der Immunogenität der DNA-Vakzinen unternommen (Robinson & Pertmer 2000). Eine Möglichkeit diesbezüglich stellt die Verwendung von Alphavirus-DNA-Vektoren dar. Alphavirus DNA-Vektoren nutzen einen RNA-Polymerase II-Promotor zur Synthese einer selbstreplizierenden Alphavirus-RNA. Die Strukturgene des Alphavirus-Replikons werden durch das gewünschte Fremdgen ersetzt (Xiong et al., 1989; Leitner et al., 1999). Für HSV konnte gezeigt werden, daß Alphavirus-Vektoren die Effizienz der DNA-Vakzinierung um ein Vielfaches erhöhen (Hariharan et al., 1998). Mögliche Ursachen hierfür sind zum einen eine höhere Expressionsrate des Fremdgens, zum anderen die Replikon-induzierte Cytokinexpression oder die Replikon-induzierte Apoptose transfizierter Zellen, was die Antigenaufnahme durch APC erhöht (Hariharan et al., 1998; Albert et al., 1998). Dementsprechend konnte auch bei Immunisierung von Balb/c-Mäusen mit DNA-Vektoren, die auf der Basis des Alphavirus Sindbis Virus konstruiert wurden und für die PRV-Glykoproteine gB, gC bzw. gD kodieren (ebenfalls zur Verfügung gestellt von Dr. A. Jestin), eine verbesserte Immunogenität gegenüber den pcDNA-Vektoren festgestellt werden. Allerdings war lediglich eine verzögerte Mortalität bei einzelnen Tieren, jedoch kein solider Langzeitschutz zu beobachten. Demzufolge war die Vakzinierung von Mäusen mit den ORFV-Vektorvakzinen gegenüber den pcDNA-Vektoren oder Sindbis-Vektoren hinsichtlich der Entwicklung einer protektiven Immunität gegen die PRV-Infektion deutlich effizienter. In den letzten Jahren wurde in einigen Studien gezeigt, daß nach einer primären DNA-

Immunisierung und darauffolgender Immunisierung mit pockenviralen Vektoren mit derselben Antigen-spezifität (prime-boost-Immunisierung) vor allem zellvermittelte Immunmechanismen gegen unterschiedliche Pathogene signifikant stärker induziert werden (Ramsay et al., 1997; Kent et al., 1998; Schneider et al., 1999; Robinson & Pertmer 2000; Ramshaw & Ramsay 2000; Gurunathan et al., 2000; Amara et al., 2002). Die Ursache hierfür ist bislang unklar. Möglicherweise führt die dauerhafte Expression des Immunogens in geringer Menge durch DNA-Vakzinen zu einer Affinitätsreifung von spezifischen T-Zellen, wie sie für B-Zellen seit langem bekannt ist (Rees et al., 1999). Die Restimulierung der immunologisch geprägten T-Zellen durch die pockenviralen Vektoren resultiert dann in einer Expansion von T-Zellen mit hochaffinen antigenspezifischen T-Zellrezeptoren (Ramshaw & Ramsay, 2000). Eine weitere Möglichkeit stellt die immunmodulatorische Eigenschaft von nicht-methylierten Dinukleotiden der Plasmid-DNA dar. Diese sogenannten CpG-Motive stimulieren die unspezifische Immunantwort, vor allem die Sekretion proinflammatorischer Th1-ähnlicher Cytokine und die verstärkte Expression kostimulatorischer Moleküle durch APCs, was vermutlich die Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen begünstigt (Krieg et al., 1998; Roman et al., 1997). Ob ein heterologes prime-boost Protokoll mit primärer PRV-spezifischer DNA-Vakzinierung die Immunogenität der ORFV-Vektorvakzinen verbessert, bleibt in künftigen Experimenten zu überprüfen. Besonders für die Rekombinante D-gD besteht die Möglichkeit, daß eine Verstärkung der zellulären Immunantwort durch DNA-Immunisierung den offensichtlich unzureichenden Antikörper-vermittelten Schutz kompensiert. Möglicherweise ist hierfür sogar die Koapplikation von Plasmid-DNA ausreichend, die für immunmodulatorische Cytokine, Chemokine oder kostimulatorische Moleküle kodiert. In zahlreichen Modellsystemen konnte bereits gezeigt werden, daß auf diese Weise die Immunogenität und Protektivität von Vakzinen beeinflußt werden kann (Übersicht in Gurunathan et al., 2000). Unter anderem wurde auch für HSV- bzw. PRV-spezifische Vakzinen eine immunstimulatorische Funktion koinjizierter IL-12-spezifischer Plasmid-DNA sowohl in der Maus als auch im Schwein beschrieben (Schijns et al., 1995; Sin et al., 1999; Zuckermann et al., 1999).

Die hier dargestellten Untersuchungen bezüglich der Immunogenität der PRV-spezifischen ORFV-Vektorvakzinen wurden in der Maus als Wirtstier durchgeführt. Dabei ist zu berücksichtigen, daß die PRV-Infektion in der Maus immer akut und letal verläuft. Im

Gegensatz dazu etabliert PRV im Schwein als natürlichem Wirt oft eine chronische, latente Infektion. Deshalb besteht die Möglichkeit, daß die immunogenen Komponenten des Virus sowie die Mechanismen, die eine protektive Immunität gewährleisten, in den beiden Spezies unterschiedlich sind. Zahlreiche Untersuchungen hinsichtlich der Immunogenität attenuierter oder inaktivierter PRV-Vakzinen sprechen dafür, daß auch beim Schwein die Vakzine-induzierte Aktivierung mehrerer Immunmechanismen für die Entwicklung einer soliden protektiven Immunität gegen PRV notwendig ist. Eine protektive Funktion wurde dabei für Virus-neutralisierende Antikörper (Ben-Porat et al., 1986; Marchioli et al., 1988), Komplement-vermittelte Cytotoxizität (Iglesias et al., 1990), Antikörper-abhängige zellvermittelte Cytotoxizität (El Awar & Hahn, 1987; Iglesias et al., 1990), NK-Zellen und Lymphokin-aktivierte Killerzellen (Martin & Wardley, 1984; Kimman et al., 1996), CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> doppelt-positive T-Helferzellen (Ober et al., 1998) sowie CD8<sup>+</sup> cytotoxische T-Zellen (Zuckermann et al., 1990) diskutiert. Es ist außerdem bekannt, daß die Konzentration Vakzine-induzierter neutralisierender Antikörper nicht zwingend mit der Protektivität einer Vakzine korreliert, was eine Erklärung für die unzureichende Protektivität inaktivierter PRV-Vakzinen darstellt und die wichtige Bedeutung zellulärer Immunität hervorhebt (Martin et al., 1986; Wittmann, 1991; Kimman et al., 1992; Mengeling et al., 1992; Zuckermann et al., 1999). Attenuierte PRV-Lebendvakzinen induzieren sowohl humorale als auch zelluläre Immunmechanismen und verleihen einen langanhaltenden Schutz gegen PRV. Allerdings besteht das Risiko einer unzureichenden Attenuierung oder möglicher Rekombination zwischen Impfviren untereinander und zwischen Impfvirus und Wildtypvirus, was zur Entstehung neuer, virulenter Virusstämme führen könnte (Christensen et al., 1992; Christensen & Lomniczi, 1993; Dangler et al., 1993; Henderson et al., 1991; Mengeling et al., 1992). Aufgrund dieser Argumente wird seit einigen Jahren auch die Nutzbarkeit pockenviraler Vektoren zur Vakzinierung des Schweins gegen PRV untersucht (Riviere et al., 1992; Brockmeier et al., 1993). Pockenvirale Vektoren bieten im Gegensatz zu inaktivierten PRV-Vakzinen die Möglichkeit der effizienten Induktion sowohl humoraler als auch zellulärer Immunmechanismen. Darüberhinaus wäre die Eliminierung attenuierter Lebendimpfstoffe und bei seropositiven Tieren eine Diskriminierung zwischen vakzinierten und infizierten Tieren möglich. Für VACV-PRV-Rekombinanten wurde außerdem die Möglichkeit zur aktiven Immunisierung von Ferkeln beschrieben, die eine kurzzeitige Immunität aufgrund der passiven Übertragung PRV-spezifischer maternaler Antikörper

aufweisen (Brockmeier et al., 1997a,b). Bei herkömmlichen PRV-Vakzinen verhindern die maternalen Antikörper die Induktion einer ausreichenden adaptiven Immunität während der ersten Lebensmonate, in denen die klinische Symptomatik einer PRV-Infektion besonders ausgeprägt ist und in der Regel zum Tod des Tieres führt (Vannier, 1986; Van Oirschot, 1987, 1991; Kit et al., 1993; Mc Caw & Xu, 1993; De Smet et al., 1994). Es wurde gezeigt, daß im Schwein PRV-spezifische VACV-Vektoren bei gleichzeitiger Immunisierung gegen die Glykoproteine gB, gC und gD eine signifikant bessere Immunität verleihen als bei Immunisierung gegen die einzelnen Glykoproteine. Eine besondere Bedeutung wurde hierbei den Rekombinanten beigemessen, die die Glykoproteine gB und gD exprimieren (Riviere et al., 1992; Brockmeier et al. 1993). Dasselbe wurde auch für die Induktion einer protektiven Immunität in maternal immunen Tieren beschrieben (Brockmeier et al., 1997a,b). Die protektive Kapazität der ORFV-Vektorvakzinen gegen PRV im Schwein soll in künftigen Experimenten vergleichend zu herkömmlichen attenuierten oder inaktivierten PRV-Vakzinen bzw. zu den entsprechenden VACV-Rekombinanten untersucht werden. Aufgrund der Beobachtungen mit den VACV-Rekombinanten ist hierfür auch die Entwicklung einer PRV-gB-spezifischen ORFV-Rekombinante erforderlich. Da mittels der hier beschriebenen Methoden die Identifizierung einer gB-spezifischen Rekombinante nicht erfolgreich war, wird momentan eine stringenter Selektionsstrategie entwickelt, die auf der Restauration einer phänotypischen Variante des ORFV-Stammes D1701-Stammes beruht (Rziha et al., unveröffentlicht).

## 6 Zusammenfassung

Das Orf Virus (ORFV), welches im natürlichen Wirt (Schaf, Ziege) zu ulcerativen Hautläsionen führt (Erythema contagiosum), ist der am besten charakterisierte Vertreter des Genus Parapockenvirus (PPV) der Familie Poxviridae. Im Hinblick auf die Verwendung des ORFV als neues, alternatives Vektorvirus ist die Kenntnis von nicht-essentiellen Regionen im ORFV-Genom von Bedeutung, da diese als Insertionsstellen für Fremd-DNA dienen können. Die Identifizierung des ORFV-vegf-e-Gens als nicht essentielles Gen war in diesem Zusammenhang von Vorteil, da es sich hierbei um ein Virulenzgen des Virus handelt, dessen Deletion die Pathogenität rekombinanter Orf-Viren gezielt vermindern kann.

In den hier vorgestellten Arbeiten wurden ORFV-Rekombinanten entwickelt, bei denen das vegf-e-Gen durch die Oberflächen-Glykoproteingene gC und gD des Alphaherpesvirus Pseudorabiesvirus (PRV) substituiert wurde. Bei den PRV-Glykoproteinen gC und gD handelt es sich um immunogene Komponenten des Virus, was erstmals die Untersuchung der Immunogenität und Protektivität von ORFV-Rekombinanten gegen ein klinisch relevantes Virus ermöglichte.

Es konnte gezeigt werden, daß die Rekombinanten in ORFV-permissiven Vero-Zellen die Transkription der Glykoproteingene unter Kontrolle des frühen vegf-e-Promotors induzieren. Desweiteren erfahren die primären Translationsprodukte authentische posttranslationale Modifikationen und sind an der Oberfläche der Vektor-infizierten Zellen lokalisierbar. Dasselbe gilt auch für Zelllinien der Maus, die als nicht-permissive Wirtsspezies für die ORFV-Infektion gilt. In den hier untersuchten murinen Zelllinien NIH/3T3 und L-929 findet eine abortive ORFV-Replikation statt, so daß es nicht zur Produktion infektiöser Virusnachkommen kommt. Die Ursache hierfür konnte bislang jedoch nicht schlüssig geklärt werden. Die abortive Replikation, die es auch *in vivo* noch zu bestätigen gilt, stellt einen relevanten Sicherheitsaspekt für die Nutzung von ORFV als Vakzinevektor dar.

Die Immunisierung von Mäusen unterschiedlicher Stämme mit den ORFV-Rekombinanten zeigte, daß bereits eine singuläre intramuskuläre Applikation eine protektive Immunität gegen PRV induzieren kann. Es stellte sich heraus, daß in diesem Vektorsystem das Glykoprotein gC eine deutlich höhere Immunogenität aufweist als das Glykoprotein gD. Die Untersuchung der induzierten Immunmechanismen deutet darauf hin, daß Glykoprotein-spezifischen Antikörpern eine wichtige protektive Funktion vor allem während der frühen Phase der PRV-Infektion zukommt. Der Mechanismus des Antikörper-vermittelten Schutzes ist noch nicht

geklärt. Allerdings zeigen die Experimente, daß für einen effektiven Schutz auch die Beteiligung antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen erforderlich ist. Möglicherweise stellen Effektorfunktionen von T-Helferzellen ein Bindeglied zwischen der humoralen adaptiven Immunität und unspezifischen Immunmechanismen dar.

Anhand unterschiedlicher PRV-gC-spezifischer ORFV-Rekombinanten konnte gezeigt werden, daß die Effizienz der Fremdgenexpression *in vitro* offensichtlich in direkter Korrelation zur Immunogenität der Vektorvakzine stand. Es wurde deutlich, daß bei der Entwicklung immunogener ORFV-Vektorvakzinen regulatorische Elemente der Genexpression in Eukaryontenzellen sowie strukturelle Eigenschaften des jeweiligen Fremdantigens zu berücksichtigen sind.

Mehrere Aspekte sind hinsichtlich der Nutzung von ORFV als Vakzinevektor von Bedeutung. Hierzu zählt das enge natürliche Wirtsspektrum des Virus sowie die nachweisliche Expression früher Gene auch in Zellen, die die Virusreplikation nicht unterstützen. Dies ermöglicht die Anwendbarkeit der ORFV-Vektoren in nicht-permissiven Systemen, was mittlerweile eine Grundvoraussetzung hinsichtlich der Sicherheit einer viralen Vektorvakzine darstellt. Desweiteren stellt die Möglichkeit zur effizienten Produktion rekombinanter Orf-Viren unter kontrollierbaren Bedingungen einen Vorteil gegenüber der Mehrzahl anderer nicht-replizierender pockenviraler Vektoren, vor allem unter Kosten- und Sicherheitsaspekten, dar. Im Gegensatz zu Vaccinia Virus (VACV) als Vektor konnte außerdem beispielhaft gezeigt werden, daß eine ORFV-spezifische Immunität die Induktion einer Immunantwort gegen ORFV-kodiertes Fremdantigen nicht beeinträchtigt. Dies schafft die Möglichkeit der Mehrfachimmunisierung oder der multiplen Immunisierung gegen verschiedene Pathogene. Dies ist zwar auch unter Verwendung von DNA-Vakzinen möglich, jedoch erwiesen sich die PRV-spezifischen ORFV-Rekombinanten als Induzenten einer protektiven Immunität der DNA-Immunisierung eindeutig überlegen.



## 7 Literaturverzeichnis

**Abbas, A.K., Murphy, K.M., Sher, A. (1996)**

Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383: 787-793.

**Abdussalam, M., Cosslett, V.E. (1957)**

Contagious pustular dermatitis. I. Studies on morphology. *J. Comp. Pathol.* 67: 145-156.

**Adam, M., Lepottier, M.F., Eloit, M. (1994)**

Vaccination of pigs with replication-defective adenovirus vectored vaccines: the example of pseudorabies. *Vet Microbiol.* 42: 205-215.

**Ahn, B.-Y., Moss, B. (1989)**

Capped poly(A) leader of variable lengths at the 5' ends of vaccinia virus late mRNAs. *J. Virol.* 63: 226-232.

**Albert, M.L., Sauter, B., Bhardwaj, N. (1998)**

Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392: 86-89.

**Alcami, A., Smith, G.L. (1995)**

Cytokine receptors encoded by poxviruses: a lesson in cytokine biology. *Immunol. Today* 16: 474-478.

**Alcami, A., Koszinowski, U.H. (2000)**

Viral mechanisms of immune evasion. *Immunol Today.* 21: 447-455.

**Amara, R.R., Villinger, F., Staprans, S.I., Altman, J.D., Montefiori, D.C., Kozyr, N.L., Xu, Y., Wyatt, L.S., Earl, P.L., Herndon, J.G., McClure, H.M., Moss, B., Robinson, H.L. (2002)**

Different patterns of immune responses but similar control of a simian-human immunodeficiency virus 89.6P mucosal challenge by Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA) and DNA/MVA vaccines. *J. Virol.* 76: 7625-7631.

**Anderson, I.E., Reid, H.W., Nettleton, P.F., McInnes, C.J., Haig, D.M. (2001).**

Detection of cellular cytokine mRNA expression during orf virus infection in sheep: differential interferon- $\gamma$  mRNA expression by cells in primary versus reinfection skin lesions. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 83: 161-176.

**Aoki, H., Sakoda, Y., Jukuroki, K., Takada, A., Kida, H., Fukusho, A. (1999)**

Induction of antibodies in mice by a recombinant baculovirus expressing pseudorabies virus glycoprotein B in mammalian cells. *Vet Microbiol.* 68:197-207.

**Archard, L.C., Mackett, M., Barnes, D.E., Dumbell, K.R. (1984)**

The genome structure of cowpox virus white pock variants. *J. Gen. Virol.* 65: 875-886.

**Aujeszky, A. (1902)**

Über eine neue Infektionskrankheit bei Haustieren. *Zentralbl. Bakteriol.* 32: 353-357.

**Baroudy, B.M., Venkatesan, S., Moss, B. (1982)**

Incompletely base-paired flip-flop terminal loops link the two DNA strands of the vaccinia virus genome into one uninterrupted polynucleotide chain. *Cell* 28: 315-324.

**Bartha, A. (1961)**

Versuche zur Reduzierung der Virulenz des Aujeszky-Virus. *Mag. Allat. Lapja.* 16: 42.

**Baskerville A. (1973)**

The histopathology of experimental pneumonia in pigs produced by Aujeszky's disease virus. *Res. Vet. Sci.* 14: 223-228.

**Baumeister, J., Klupp, B.G., Mettenleiter, T.C. (1995)**

Pseudorabiesvirus and equine herpesvirus 1 share a nonessential gene which is absent in other herpesviruses and located adjacent to a highly conserved gene cluster. *J. Virol.* 69: 5560-5567.

**Belak, S., Ballagi-Pordany, A., Flensburg, J., Virtanen, A. (1989)**

Detection of Pseudorabiesvirus DNA sequences by polymerase chain reaction. *Arch. Virol.* 108: 279-286.

**Belyakov, I.M., Moss, B., Strober, W., Berzofsky, J.A. (1999)**

Mucosal vaccination overcomes the barrier to recombinant vaccinia immunization caused by preexisting poxvirus immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 96: 4512-4517.

**Ben-Porat, T., Kaplan, A.S. (1985)**

Molecular Biology of Pseudorabies Virus. *In: The Herpesviruses.* Roizman, B. (Ed.), Plenum Press New York and London V III: p. 105-173.

**Ben-Porat, T., DeMarchi, J.M., Lomniczi, B., Kaplan, A.S. (1986)**

Role of glycoproteins of Pseudorabiesvirus in eliciting neutralizing antibodies. *Virology* 154: 325-334.

**Beran, G.W., Davies, E.B., Arambulo, P.V., Will, L.A., Hill, H.T., Rock, D.L. (1980)**

Persistence of Pseudorabiesvirus in infected swine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 176: 998-1000.

**Bertholet, C., Stocco, P., Van Meir, E., Wittek, R. (1986)**

Functional analysis of the 5' flanking sequence of a vaccinia virus late gene. *EMBO J.* 5: 1951-1957.

**Bertholet, C., Van Meir, E., Ten Heggeler-Bordier, B., Wittek, R. (1987)**

Vaccinia virus produces late mRNAs by discontinuous synthesis. *Cell* 50: 153-162.

**Bianchi, A.T., Moonen-Leusen, H.W., van Milligen, F.J., Savelkoul, H.F., Zwart, R.J., Kimman, T.G. (1998)**

A mouse model to study immunity against pseudorabies virus infection: significance of CD4+ and CD8+ cells in protective immunity. *Vaccine* 16: 1550-1558.

**Bingaman, A.W., Pearson, T.C., Larsen, C.P. (2000)**

The role of CD40L in T cell-dependent nitric oxide production by murine macrophages. *Transpl. Immunol.* 8: 195-202.

**Blasco, R., Moss, B. (1991)**

Extracellular vaccinia virus formation and cell-to-cell virus transmission are prevented by deletion of the gene encoding the 37,000-Dalton outer envelope protein. *J. Virol.* 65: 5910-5920.

**Bonnet, M.C., Tartaglia, J., Verdier, F., Kourilsky, P., Lindberg, A., Klein, M., Moingeon, P. (2000)**

Recombinant viruses as a tool for therapeutic vaccination against human cancers. *Immunol. Letters* 74: 11-25.

**Brockmeier, S.L., Lager, K.M., Tartaglia, J., Riviere, M., Paoletti, E., Mengeling, W.L. (1993)**

Vaccination of pigs against pseudorabies virus with highly attenuated vaccinia (NYVAC) recombinant viruses. *Vet. Microbiol.* 38: 41-58.

**Brockmeier, S.L., Lager, K.M., Mengeling, W.L. (1997a)**

Successful pseudorabies vaccination in maternally immune piglets using recombinant vaccinia virus vaccines. *Res. Vet. Sci.* 62: 281-285.

**Brockmeier, S.L., Lager, K.M., Mengeling, W.L. (1997b)**

Vaccination with recombinant vaccinia virus vaccines expressing glycoprotein genes of pseudorabies virus in the presence of maternal immunity. *Vet. Microbiol.* 58: 93-103.

**Buddle, B. M., Pulford, H. D. (1984)**

Effects of passively acquired antibodies and vaccination on the immune response to contagious ecthyma virus. *Vet. Microbiol.* 9: 515-522.

**Buddle, B.B., Dellers, R.W., Schurig, G.G. (1984)**

Contagious ecthyma virus-vaccination failures. *Am. J. Vet. Res.* 45: 263-266.

**Buller, R.M., Palumbo, G.J. (1991)**

Poxvirus pathogenesis. *Microbiol. Rev.* 55: 80-122.

**Büttner, M., Czerny, C.P., Lehner, K.H., Wertz, K. (1995)**

Interferon induction in peripheral blood mononuclear leukocytes of man and farm animals by poxvirus vector candidates and some poxvirus constructs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 46: 237-250.

**Büttner, M., Rziha, H.-J. (2002)**

Parapoxviruses: from the lesion to the viral genome. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health.* 49: 7-16.

**Cantin, E.M., Eberle, R., Baldick, J.L., Moss, B., Willey, D.E., Notkins, A.L., Openshaw, H. (1987)**

Expression of herpes simplex virus 1 glycoprotein B by a recombinant vaccinia virus and protection of mice against lethal herpes simplex virus 1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 5908-5912.

**Cantin, E., Tanamachi, B., Openshaw, H., Mann, J., Clarke, K. (1999)**

Gamma interferon (IFN- $\gamma$ ) receptor null-mutant mice are more susceptible to herpes simplex virus type 1 infection than IFN- $\gamma$  ligand null-mutant mice.

**Castrucci, G., Frigeri, F., Osburn, B.I., Ferrari, M., Barreca, F., Salvatori, D. (1998)**

Further investigations on the efficacy of a non-specific defense inducer evaluated in calves exposed to infectious bovine rhinotracheitis virus. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 21: 155-163.

**Chakrabarti, S., Brechling, K., Moss, B. (1985)**

Vaccinia virus expression vector: coexpression of  $\beta$ -galactosidase provides visual screening of recombinant virus plaques. *Mol. Cell Biol.* 5: 3403-3409.

**Chang, S.W., Bu, J., Rompato, G., Garmendia, A.E. (1998)**

A vector DNA vaccine encoding pseudorabies virus immediate early protein demonstrates partial protection in mice against lethal virus challenge. *Viral Immunol.* 11: 27-36.

**Chmielewicz, B., Goltz, M., Ehlers, B. (2001)**

Detection and multigenic characterization of a novel gammaherpesvirus in goats. *Virus Res.* 75: 87-94.

**Christensen, L.S., Medveczky, I., Strandbygaard, S.B., Pejsak, Z. (1992)**

Characterization of field isolates of suid herpesvirus 1 (Aujeszky's disease virus) as derivatives of attenuated vaccine strains. *Arch. Virol.* 124: 225-234.

**Christensen, L.S., Lomniczi, B. (1993)**

High frequency intergenomic recombination of suid herpesvirus 1 (SHV-1, Aujeszky's disease virus). *Arch. Virol.* 132: 37-50.

**Coe, N., Mengeling, W. (1990)**

Mapping and characterization of neutralizing epitopes of glycoproteins gIII and gp50 of the Indiana-Funkhauser strain of pseudorabies virus. *Arch. Virol.* 110: 137-42.

**Cottone, R. (1996)**

Parapockenvirus Orf D1701: Genomkartierung und transkriptionelle Organisation potentieller Gene. Diplomarbeit, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

- Cottone, R., Büttner, M., Bauer, B., Henkel, M., Hettich, E., Rziha, H.-J. (1998)**  
Analysis of genomic rearrangement and subsequent gene deletion of the attenuated Orf virus strain D1701. *Virus Res.* 56: 53-67.
- Cottone, R. (2000)**  
Identifizierung und Charakterisierung virulenz-spezifischer Mechanismen und Faktoren beim Parapockenvirus Orf. Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- Cottone, R., Büttner, M., McInnes, C.J., Wood, A.R., Rziha, H.J. (2002)**  
Orf virus encodes a functional dUTPase gene. *J. Gen. Virol.* 83: 1043-1048.
- Coutelier, J.P., van der Logt, J.T., Heessen, F.W., Warnier, G., Van Snick, J. (1987)**  
IgG2a restriction of murine antibodies elicited by viral infections. *J. Exp. Med.* 165: 64-69.
- Coutelier, J.P., van der Logt, J.T., Heessen, F.W., Vink, A., van Snick, J. (1988)**  
Virally induced modulation of murine IgG antibody subclasses. *J. Exp. Med.* 168: 2373-2378.
- Cox, W.I., Tartaglia, J., Paletti, E. (1992)**  
*In: Poxvirus Recombinants as live vaccines.* Binns, M.M., Smith, G.L. (Eds). CRC, Boca Raton, Fl. p. 123-162.
- Cremer, K.J., Mackett, M., Wohlenberg, C., Notkins, A.L., Moss, B. (1985)**  
Vaccinia virus recombinant expressing herpes simplex virus type 1 glycoprotein D prevents latent herpes in mice. *Science* 228: 737-740.
- Czerny, C.-P., Waldmann, R., Scheubeck, T. (1997)**  
Identification of three distinct antigenic sites in parapoxviruses. *Arch. Virol.* 142: 807-821.
- Dangler, C.A., Henderson, L.M., Bowman, L.A. Deaver, R.E. (1993)**  
Direct isolation and identification of recombinant Pseudorabiesvirus strains from tissues of experimentally co-infected swine. *Am. J. Vet. Res.*, 54: 540-545.
- Darbyshire, J.H. (1961)**  
A fatal ulcerative mucosal condition of sheep associated with the virus of contagious pustular dermatitis. *British Vet. J.* 117: 97-105.
- Davies, E.B., Beran, G.W. (1980)**  
Spontaneous shedding of Pseudorabiesvirus from a clinically recovered postparturient sow. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 176: 1345-1347.
- Davison, A.J., Moss, B. (1989a)**  
Structure of vaccinia virus late promoters. *J. Mol. Biol.* 210: 771-784.
- Davison, A.J., Moss, B. (1989b)**  
Structure of vaccinia virus early promoters. *J. Mol. Biol.* 210: 749-769.
- Deane, D., McInnes, C.J., Percival, A., Wood, A., Thomson, J., Lear, A., Gilray, J., Fleming, S., Mercer, A., Haig, D. (2000)**  
Orf virus encodes a novel secreted protein inhibitor of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-2. *J. Virol.* 74: 1313-1320.
- De Smet, K., De Waele, K., Pensaert, M. (1994)**  
Influence of vaccine medium and vaccination schedules on the induction of active immunity against Aujeszky's disease in maternally immune pigs. *Res. Vet. Sci.* 56 :89-94.
- De Wind, N., Wagenaar, F., Pol, J., Kimman, T., Berns, A. (1992)**  
The Pseudorabiesvirus homolog of the herpes simplex virus UL21 gene product is a capsid protein which is involved in capsid maturation. *J. Virol.* 66: 7096-7103.

- Dijkstra, J.M., Visser, N., Mettenleiter, T.C., Klupp, B. (1996)**  
Identification and characterization of Pseudorabiesvirus glycoprotein gM as a nonessential virion component. *J. Virol.* 70: 5684-5688.
- Donnelly, J.J., Ulmer, J.B., Shiver, J.W., Liu, M.A. (1997)**  
DNA vaccines. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 617-648.
- Drexler, I., Heller, K., Wahren, B., Erfle, V., Sutter, G. (1998)**  
Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara replicates in baby hamster kidney cells, a potential host for virus propagation, but not in various human transformed and primary cells. *J. Gen. Virol.* 79 : 347-352.
- Dufour, V., Chevallier, S., Cariolet, R., Somasundaram, S., Lefevre, F., Jestin, A., Albina, E. (2000)**  
Induction of porcine cytokine mRNA expression after DNA immunization and pseudorabies virus infection. *J. Interferon Cytokine Res.* 20: 889-895.
- Dumbell, K.R., Archard, L.C. (1980)**  
Comparison of white pock (h) mutants of monkeypoxvirus with parental monkeypox and variola-like viruses isolated from animals. *Nature* 286: 29-32.
- Edelmann, K.H., Wilson, C.B. (2001)**  
Role of CD28/CD80-96 and CD40/CD154 costimulatory interactions in host defense against primary herpes simplex virus infection. *J. Virol.* 75: 612-621.
- Ehlers, B., Ulrich, S., Goltz, M. (1999)**  
Detection of two novel porcine herpesviruses with high similarity to gammaherpesviruses. *J. Gen. Virol.* 80: 971-978.
- El Awar, F., Hahn, E. (1987)**  
Swine antibody-dependent cellular cytotoxicity against pseudorabies virus infected cells. *Am. J. Vet. Res.* 48: 481-485.
- Eloit, M., Fargeaud, D., Haridon, L. Toma, B. (1988)**  
Identification of pseudorabies virus glycoprotein gp50 as a major target of neutralizing antibodies. *Arch. Virol.* 99: 45-56.
- Eloit, M., Adam, M. (1995)**  
Isogenic adenoviruses type 5 expressing or not expressing the E1A gene: efficiency as virus vectors in the vaccination of permissive and non-permissive species. *J.Gen. Virol.* 76: 1583-1589.
- Enquist, L.W., Keeler, C.L. Jr., Robbins, A.K., Ryan, J.P., Whealy, M.E. (1988)**  
An amino-terminal deletion mutation of pseudorabies virus glycoprotein gIII affects protein localization and RNA accumulation. *J. Virol.* 62: 3565-3573.
- Enquist, L.W. (1994)**  
Infection of the mammalian nervous system by Pseudorabiesvirus (PRV). *Seminars in Virology* 5: 221-223.
- Enquist, L.W., Husak, P.J., Banfield, B.W., Smith, G.A. (1998)**  
Infection and spread of alphaherpesviruses in the nervous system. *Adv. Virus Res.* 51: 237-347.
- Esposito, J.J., Cabradilla, C.D., Nakano, J.H. (1981)**  
Intragenomic sequence transposition in monkeypox virus. *Virology* 109: 231-243.
- Esposito, J.J., Knight, J.C., Shaddock, J.H., Novembre, F.J., Bauer, G.M. (1988)**  
Successful oral rabies vaccination of raccoons with raccoon poxvirus recombinants expressing rabies virus glycoprotein. *Virology* 165: 313-316.

**Fachinger, V., Schlapp, T., Saalmüller, A. (2000)**

Evidence for a parapox ovis virus-associated superantigen. *Eur. J. Immunol.* 30: 2962-2971.

**Falkner, F.G., Moss, B. (1988)**

*Escherichia coli* gpt gene provides dominant selection for vaccinia virus open reading frame expression vectors. *J. Virol.* 62: 1849-1854.

**Falkner, F.G., Moss, B. (1990)**

Transient dominant selection of recombinant vaccinia viruses. *J. Virol.* 64: 3108-3111.

**Feinberg, A.P., Vogelstein, B. (1983)**

A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132: 6-13.

**Fischer, L., Le Gros, F.X., Mason, P.W., Paoletti, E. (1997)**

A recombinant canarypox virus protects rabbits against a lethal rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) challenge. *Vaccine* 15: 90-96.

**Finkelman, F.D., Holmes, J., Katona, I.M., Urban, J.F. Jr., Beckmann, M.P., Park, L.S., Schooley, K.A., Coffman, R.L., Mosmann, T.R., Paul, W.E. (1990)**

Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. *Annu. Rev. Immunol.* 8:303-333.

**Fleming, S.B., Fraser, K.M., Mercer, A.A., Robinson, A.J. (1991)**

Vaccinia virus-like transcriptional control sequences flank an early gene in orf virus. *Gene* 97: 207-212.

**Fleming, S.B., Mercer, A.A., Fraser, K.M., Lyttle, D.J., Robinson, A.J. (1992)**

In vivo recognition of orf-virus early transcriptional promoters in a vaccinia virus recombinant. *Virology* 187: 464-471.

**Fleming, S.B., Blok, J., Fraser, K.M., Mercer, A.A., Robinson, A.J. (1993)**

Conservation of gene structure and arrangement between vaccinia virus and orf virus. *Virology* 195: 175-84.

**Fleming, S.B., Lyttle, D.J., Sullivan, J.T., Mercer, A.A., Robinson, A.J. (1995)**

Genomic analysis of a transposition deletion mutant variant of orf-virus reveals a 3,3 kbp region of non-essential DNA. *J. Gen. Virol.* 76: 2969-2978.

**Fleming, S.B., Mc Caughan, C.A., Andrews, A.E., Nash, A.D., Mercer, A.A. (1997)**

A homolog of interleukin-10 is encoded by the poxvirus orf virus. *J. Virol.* 71: 4857-4861.

**Fleming, S.B., Haig, D.M., Nettleton, P., Reid, H.W., McCaughan, C.A., Wise, L.M., Mercer, A.A. (2000)**

Sequence and functional analysis of a homolog of interleukin-10 encoded by the parapoxvirus orf virus. *Virus Genes* 21: 85-95.

**Flexner, C., Moss, B. (1996)**

*In: Vaccinia Virus as a live vector for expression of immunogens.* Woodrow, G.C., Levine, M.M. (Eds.). Dekker, New York.

**Fraser, K.M., Hill, D.F., Mercer, A.A., Robinson, A.J. (1990)**

Sequence analysis of the inverted terminal repetition in the genome of parapoxvirus, Orf virus. *Virology* 176: 379-389.

**Fries, L.F., Tartaglia, J., Taylor, J., Kauffmann, E.K., Meignier, B., Paoletti, E., Plotkin, S. (1996)**

Human safety and immunogenicity of a canarypox-rabies glycoprotein recombinant vaccine: an alternative poxvirus vector system. *Vaccine* 14: 428-434.

**Fuchs, W., Rziha, H.J., Braunschweiger, I., Visser, N., Lütticken, D., Lukacs, N., Schreurs, C., Mettenleiter, T.C. (1990)**

Pseudorabies virus glycoprotein gI: in vitro and in vivo analysis of immunorelevant epitopes. *J. Gen. Virol.* 71: 1141-1151.

**Gale, M. Jr., Tai, S.-L., Katze, M.G. (2000)**

Translational control of viral gene expression in eukaryotes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 239-280.

**Gardiner, M.R., Craig, J., Nairn, M.E. (1967)**

An unusual outbreak of contagious ecthyma (scabby mouth) in sheep. *Aust. Vet. J.* 43: 163-165.

**Gassmann, U., Wyler, R., Wittek, R. (1985)**

Analysis of parapoxvirus genomes. *Arch. Virol.* 83: 17-31.

**Gerdtts, V., Jons, A., Makoschey, B., Visser, N., Mettenleiter, T.C. (1997)**

Protection of pigs against Aujeszky's disease by DNA vaccination. *J. Gen. Virol.* 78: 2139-2146.

**Gerdtts, V., Jons, A., Mettenleiter, T.C. (1999)**

Potency of an experimental DNA vaccine against Aujeszky's disease in pigs. *Vet Microbiol.* 66: 1-13.

**Germain, R.N., Margulies, D.H. (1993)**

The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Annu. Rev. Immunol.* 11: 403-450.

**Gillet, G., Brun, G. (1996)**

Viral inhibition of apoptosis. *Trends Microbiol.* 4: 312-317.

**Glorioso, J., Kees, U., Kumel, G., Kirchner, H., Kramer, P.H. (1985)**

Identification of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) glycoprotein gC as the immunodominant antigen for HSV-1 specific memory cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.* 135: 575-582.

**Gomez, C.E., Esteban, M. (2001)**

Recombinant proteins produced by vaccinia virus vectors can be incorporated within the virion (IMV form) into different compartments. *Arch Virol.* 146: 875-892.

**Gumbrell, R.C., McGregor, D.A. (1997)**

Outbreak of severe fatal orf in lambs. *Vet. Rec.* 141: 150-151.

**Gurunathan, S., Klinman, D.M., Seder, R.A. (2000)**

DNA vaccines: Immunology, applications and optimization. *Annu. Rev. Immunol.* 18: 927-974.

**Gurvich, E.B. (1992)**

The age-dependent risk of postvaccination complications in vaccines with smallpox vaccine. *Vaccine* 10: 96-97.

**Gutekunst, D.E. (1979)**

Latent Pseudorabiesvirus infection in swine detected by RNA-DNA Hybridization. *Am. J. Vet. Res.* 40: 1568-1572.

**Gutekunst, D.E., Pirtle, E.C., Miller, L.D., Stewart, W.C. (1980)**

Isolation of Pseudorabiesvirus from trigeminal ganglia of a latently infected sow. *Am. J. Vet. Res.* 41: 1315-1316.

**Haagmans, B.L., van Rooij, E.M., Dubelaar, M., Kimman, T.G., Horzinek, M.C., Schijns, V.E., Bianchi, A.T. (1999)**

Vaccination of pigs against pseudorabies virus with plasmid DNA encoding glycoprotein D. *Vaccine.* 17: 1264-1271.

**Hahn, J., Park, S., Song, J., An, S., Ahn, B. (2001)**

Construction of recombinant swinepox viruses and expression of the classical swine fever virus E2 protein. *J. Virol. Methods* 93: 49-56.

**Haig, D.M., Entican, G., Yirrell, D.L., Deane, D., Miller, H.R.P., Norval, M., Reid, H.W. (1992)**

Differential appearance of interferon- and colony stimulating activity in afferent versus efferent lymph following orf virus infection of sheep. *Vet. Dermatol.* 3: 221-229.

**Haig, D. M., McInnes, C.J., Wood, P.R. Seow, H.-F. (1994)**

The cytokines: origin, structure and function. *In: Gooddeeris, B.M., Morrison, W.I. (Eds). Cell mediated immunity in ruminants. CRC Press, Boca Raton, Florida. p. 75-92.*

**Haig, D., Deane, D., Percival, A., Myartt, N., Thomson, J., Inglis, L., Rothel, J., Seow, H.-F., Wood, P., Miller, H.R.P., Reid, H.W. (1996a)**

The cytokine response of afferent lymph following orf virus reinfection of sheep. *Vet. Dermatol.* 7: 11-20.

**Haig, D., Hutchison, G., Thomson, J., Yirrel, D., Reid, H.W. (1996b)**

Cytolytic activity and associated serine protease expression by skin and afferent lymph CD8<sup>+</sup> T cells during orf virus reinfection. *J. Gen. Virol.* 77: 953-961.

**Haig, D.M., McInnes, C.J., Thomson, J., Wood, A., Bunyan, K., Mercer, A.A. (1998)**

The orf virus OV20.0L gene product is involved in interferon resistance and inhibits an interferon-inducible, double-stranded RNA dependent kinase. *Immunology* 93: 335-340.

**Haig, D.M., Mercer, A.A., (1998)**

Ovine diseases. *Orf. Vet. Res.* 29: 311-326.

**Hammert, J., Wolf, G., Berner, H. (1995)**

Klinische Untersuchungen zur Wirkung des Paramunitätsinducers Baypamun® als Prophylaxe beim MMA-Komplex der Sau. *Tierärztliche Umschau* 50: 383-386.

**Hammond, J.M., Jansen, E.S., Morrissy, C.J., van der Heide, B., Goff, W.V., Williamson, M.M., Hooper, P.T., Babiuk, L.A., Tikoo, S.K., Johnson, M.A. (2001)**

Vaccination of pigs with a recombinant porcine adenovirus expressing the gD gene from pseudorabies virus. *Vaccine.* 19: 3752-3758.

**Hampl, H., Ben-Porat, T., Ehrlicher, L., Habermehl, K.O., Kaplan, A.S. (1984)**

Characterization of the envelope glycoproteins of Pseudorabiesvirus. *J. Virol.* 52: 583-590.

**Hanahan, D. (1983)**

Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.

**Harandi, A.M., Svennerholm, B., Holmgren, J., Eriksson, K. (2001)**

Differential roles of B cells and IFN-gamma-secreting CD4(+) T cells in innate and adaptive immune control of genital herpes simplex virus type 2 infection in mice. *J. Gen. Virol.* 82: 845-853.

**Hariharan, M.J., Driver, D.A., Townsend, K., Brumm, D., Polo, J.M., Belli, B.A., Catton, D.J., Hsu, D., Mittelstaedt, D., McCormack, J.E., Karavodin, L., Dubensky, T.W. Jr., Chang, S.M., Banks, T.A. (1998)**

DNA immunization against herpes simplex virus: enhanced efficacy using a Sindbis virus-based vector. *J. Virol.* 72: 950-958.

**Hartmann, K., Block, A., Ferck, G., Beer, B., Vollmar, A., Lutz, H. (1999)**

Treatment of feline leukemia virus (FeLV) infection. *Vet. Microbiol.* 69: 111-113.

**Hattori, M., Sakaki, Y. (1986)**

Dideoxy sequencing method using denatured plasmid templates. *Anal. Biochem.* 152: 232-238.

**Heffner, S., Kovacs, F., Klupp, B. Mettenleiter, T.C. (1993)**

Glycoprotein gp50-negative Pseudorabiesvirus: a novel approach towards a nonspreading live herpesvirus vaccine. *J. Virol.* 67: 1529-1537.

**Henderson, L.M., Levings, R.L., Davis, A.J., Sturtz, D.R. (1991)**

Recombination of Pseudorabiesvirus vaccine strains in swine. *Am. J. Vet. Res.* 52: 820-825.

**Henkel, M. (1997)**

Parapockenvirus Orf D1701: Versuche zur Herstellung einer VEGF-negativen Mutante. Diplomarbeit, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

**Hiller, G., Weber, K. (1985)**

Golgi-derived membranes that contain an acylated viral polypeptide are used for vaccinia virus envelopment. *J. Virol.* 55: 651-659.

**Ho, T.Y., Hsiang, C.Y., Hsiang, C.H., Chang, T.J. (1998)**

DNA vaccination induces long-term antibody response and protective immunity against pseudorabies virus in mice. *Arch. Virol.* 143: 115-125.

**Hong, W., Xiao, S., Zhou, R., Fang, L., He, Q., Wu, B., Zhou, F., Chen, H. (2002)**

Protection induced by intramuscular immunization with DNA vaccines of pseudorabies in mice, rabbits and piglets. *Vaccine* 20:1205-1214.

**Holzer, G.W., Remp, G., Antoine, G., Pfeleiderer, M., Enzersberger, O.M., Emsenhuber, W., Hammerle, T., Gruber, F., Urban, C., Falkner, F.G., Forner, F. (1999)**

Highly efficient induction of protective immunity by a vaccinia virus vector defective in late gene expression. *J. Virol.* 73: 4536-4542.

**Ho, T.Y., Hsiang, C.Y., Hsiang, C.H., Chang, T.J. (1998)**

DNA vaccination induces a long-term antibody response and protective immunity against pseudorabies virus in mice. *Arch. Virol.* 143: 115-125.

**Housawi, F.M.T., Roberts, G.M., Gilray, J.A., Pow, I., Reid, H.W., Nettleton, P.F., Sumption, K.J., Hibma, M.H., Mercer, A.A. (1998)**

The reactivity of monoclonal antibodies against orf virus with other parapoxviruses and the identification of a 39 kDa immunodominant protein. *Arch. Virol.* 143: 2289-2303.

**Huang, S., Hendriks, W., Althage, A., Hemmi, S., Bluethmann, H., Kamijo, R., Vilcek, J., Zinkernagel, R.M., Aguet, M. (1993)**

Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. *Science* 259: 1742-1745.

**Hu, L., Esposito, J.J., Scott, F.W. (1996)**

Raccoon poxvirus feline panleukopenia virus VP2 recombinant protects cats against FPV challenge. *Virology* 218: 248-252.

**Hu, Y., Lee, J., McCart, J.A., Xu, H., Moss, B., Alexander, H.R., Bartlett, D.L. (2001)**

Yaba-like disease virus: An alternative replicating poxvirus vector for cancer gene therapy. *J. Virol.* 75: 10300-10308.

**Hussain, K.A., Burger, D. (1989)**

In vivo and in vitro characteristics of contagious ecthyma virus isolates: host response mechanisms. *Vet. Microbiol.* 19: 23-26.

**Iglesias, G., Molitor, T., Reed, D., Litalien, J. (1990)**

Antibodies to Aujeszky's disease virus in pigs immunized with purified virus glycoproteins. *Vet. Microbiol.* 24: 1-10.

- Ikeda Y, Shibata I, Xuan X, Matsumoto Y, Otsuka H. (2000)**  
Immunogenic properties of a bovine herpesvirus-1 (BHV-1) recombinant expressing major pseudorabies virus (PrV) glycoproteins in combination. *J. Vet. Med. Sci.* 62: 849-859.
- Imlach, W., McCaughan, C.A., Mercer, A.A., Haig, D., Fleming, S.B. (2002)**  
Orf virus-encoded interleukin-10 stimulates the proliferation of murine mast cells and inhibits cytokine synthesis in murine peritoneal macrophages. *J. Gen. Virol.* 83: 1049-1058.
- Inoshima, Y., Morooka, A., Murakami, K., Sentsui, H. (2000)**  
Simple preparation of parapoxvirus genome DNA for endonuclease analysis. *Microbiol. Immunol.* 44: 69-72.
- Inoshima, Y., Murakami, K., Yokoyama, T., Sentsui, H. (2001)**  
Genetic heterogeneity among parapoxviruses isolated from sheep, cattle and Japanese serows (*Capricornis crispus*). *J. Gen. Virol.* 82: 1215-1220.
- Ishii, H., Kobayashi, Y., Kuroki, M., Kodama, Y. (1988)**  
Protection of mice from lethal infection with Aujeszky's disease virus by immunization with purified gVI. *J. Gen. Virol.* 69 : 1411-1414.
- Jackson, R.J. (1996)**  
A comparative view of initiation site selection mechanisms. *In: Hershey, J.W.B., Mathews, B., Sonenberg, N. (Eds.), Translational control.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y. p. 71-112.
- Jaraquemada, D., Marti, M., Long, E.O. (1990)**  
An endogenous processing pathway in vaccinia virus-infected cells for presentation of cytoplasmic antigens to class II-restricted T cells. *J. Exp. Med.* 172: 947-954.
- Jenkinson, D., McEwan, P.E., Moss, V.A., Elder, H.Y., Reid, H.W. (1990)**  
Location and spread of orf virus antigen in infected ovine skin. *Vet. Dermatol.* 1: 189-195.
- Jenkinson, D., Mc Ewan, P.E., Hutchison, G., Reid, H.W. (1992)**  
The B and T cell responses to orf virus infection. *Vet. Dermatol.* 2: 57-64.
- Jin, Y., Shih, W.K., Berkower, I. (1988)**  
Human T cell response to the surface antigen of hepatitis B virus (HbsAg): Endosomal and nonendosomal processing pathways are accessible to both endogenous and exogenous antigen. *J. Exp. Med.* 168: 293-306.
- Jöns, A., Gerdts, V., Lange, E., Kaden, V., Mettenleiter, T.C. (1997)**  
Attenuation of dUTPase- deficient pseudorabies virus for the natural host. *Vet. Microbiol.* 56: 47-54.
- Joly, E., Mucke, L., Oldstone, M.B.A. (1991)**  
Viral persistence in neurons explained by lack of major histocompatibility complex class I expression. *Science* 253: 1283-1285.
- Kado, C.I., Liu, S.-T. (1981)**  
Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 145: 1365-1373.
- Kanesa-athan, N., Smucny, J.J., Hoke, C.H., Marks, D.H., Konishi, E., Kurane, I., Tang, D.B., Vaughn, D.W., Mason, P.W., Shope, R.E. (2000)**  
Safety and immunogenicity of NYVAC-JEV and ALVAC-JEV attenuated recombinant Japanese encephalitis virus. Poxvirus vaccines in vaccinia-nonimmune and vaccinia-immune humans. *Vaccine* 15: 483-491.
- Karger, A., Mettenleiter, T.C. (1993)**  
Glycoproteins gIII and gp50 play dominant roles in the biphasic attachment of Pseudorabiesvirus. *Virology* 194: 654-64.

**Karger, A., Schmidt, J., Mettenleiter, T.C. (1998)**

Infectivity of a pseudorabies virus mutant lacking attachment glycoproteins C and D. *J. Virol.* 72: 7341-7348.

**Karupiah, G., Xie, Q., Buller, R.M., Nathan, C., Duarte, C., MacMicking, J.D. (1993)**

Inhibition of viral replication by interferon- $\gamma$ -induced nitric oxide synthase. *Science.* 261: 1445-1448.

**Katayama, S., Okada, N., Yoshiki, K., Okabe, T., Shimizu, Y. (1997)**

Protective effect of glycoprotein gC-rich antigen against pseudorabies virus. *J. Vet. Med. Sci.* 59: 657-63.

**Kawabe, T., Naka, T., Yoshida, K., Tanaka, T., Fujiwara, H., Suematsu, S., Yoshida, N., Kishimoto, T., Kikutani, H. (1994)**

The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity* 1: 167-178.

**Keck, J.G., Baldick, C.J. Jr., Moss, B. (1990)**

Role of DNA replication in vaccinia virus gene expression: a naked template is required for transcription of three late trans-activator genes. *Cell.* 61: 801-809.

**Kent, S.J., Zhao, A., Best, S.J., Chandler, J.D., Boyle, D.B., Ramshaw, I.A. (1998)**

Enhanced T-cell immunogenicity and protective efficacy of a human immunodeficiency virus type1 vaccine regimen consisting of consecutive priming with DNA and boosting with recombinant fowlpox virus. *J. Virol.* 72:10180-10188.

**Kerr, P.J., Jackson, R.J. (1995)**

Myxoma virus as a vaccine vector for rabbits: antibody levels to influenza virus haemagglutinin presented by a recombinant myxoma virus. *Vaccine* 13: 1722-1726.

**Kimman, T.G., Oei-Lie, N., Van Zaane, D. (1992)**

Role of memory B-cell responses in serum and mucosal fluids of swine for protective immunity against Pseudorabiesvirus. *Am. J. Vet. Res.* 53: 1992-1998.

**Kimman, T.G., Gielkens, A.L.J., Glazenburg, K., Jacobs, L., de Jong, M.C.M., Mulder, W.A.M., Peeters, B.P.H. (1995a)**

Characterization of Live Pseudorabiesvirus Vaccines. *Dev. Biol. Stand.* 84: 89-96.

**Kimman, T.G., De Bruin, T.M.G., Voermans, J.J.M., Peeters, B.P.H., Bianchi, A.T.J. (1995b)**

Development and antigen specificity of the lymphoproliferation response of pigs to pseudorabies virus: dichotomy between secondary B- and T-cell responses. *Immunology* 86: 372-378.

**Kimman, T.G., DeBruin, T.G., Voermans, J.J., Bianchi, A.T. (1996)**

Cell-mediated immunity to pseudorabies virus: cytolytic effector cells with characteristics of lymphokine-activated killer cells lyse virus-infected and glycoprotein gB- and gC-transfected L14 cells. *J. Gen. Virol.* 77: 987-990.

**Kitamura, D., Roes, J., Kuhn, R., Rajewski, K. (1991)**

A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin  $\mu$  chain gene. *Nature* 350: 423-426.

**Kit, S., Kit, M. and Pirtle, E. C. (1985)**

Attenuated properties of thymidine kinase-negative deletion mutant of Pseudorabiesvirus. *Am. J. Vet. Res.* 46: 1359-1367.

**Kit, S., Sheppard, M., Ichimura, H. and Kit, M. (1987)**

Second-generation Pseudorabiesvirus vaccine with deletions in thymidine kinase and glycoprotein genes. *Am. J. Vet. Res.* 48: 780-793.

**Kit, S., McConnell, S., Kit, M., Lawhorn, B. (1993)**

Circumvention of maternal antibody interference by immunization of newborn pigs by glycoprotein gIII-deleted marker vaccine. *Immunology and Cell Biology* 71: 421-430

**Klemperer, N., Lyttle, D.J., Tausin, D., Traktman, P., Robinson, A.J. (1995)**

Identification and characterization of the orf virus type I topoisomerase. *Virology* 206: 203-215.

**Klupp, B.G., Kern, H., Mettenleiter, T.C. (1992)**

The virulence-determining genomic BamHI fragment 4 of Pseudorabiesvirus contains genes corresponding to the UL15 (partial), UL18, UL19, UL20 and UL21 genes of herpes simplex virus and a putative origin of replication. *Virology* 191: 900-908.

**Körner, H., Cook, M., Riminton, D.S., Lemckert, F.A., Hoek, R.M., Ledermann, B., Köntgen, F., Fazekas de St Groth, B., Sedgwick, J. (1997)**

Distinct roles for lymphotoxin- $\alpha$  and tumor necrosis factor in organogenesis and spatial organization of lymphoid tissue. *Eur. J. Immunol.* 27: 2600-2609.

**Kotwal, G.J., Moss, B. (1988)**

Analysis of a large cluster of nonessential genes deleted from a vaccinia virus terminal transposition mutant. *Virology* 167: 524-537.

**Kozak, M. (1986)**

Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* 44: 283-293.

**Krieg, A.M., Yi, A.K., Scorr, J., Davis, H.L. (1998)**

The role of CpG dinucleotides in DNA vaccines. *Trends Microbiol.* 6: 23-27.

**Kroczek, R.A., Siebert, E. (1990)**

Optimizing of northern analysis by vacuum-blotting, RNA-transfer visualization, and ultraviolet fixation. *Anal. Biochem.* 184: 90-95.

**Kündig, T.M., Kalberer, C.P., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M. (1993)**

Vaccination with two different vaccinia viruses: long-term inhibition of secondary vaccination. *Vaccine* 11: 1154-1158.

**Kumaraguru, U., Davis, I.A., Deshpande, S., Tevethia, S.S., Rouse, B.T. (2001)**

Lymphotoxin alpha-/- mice develop functionally impaired CD8+ T cell responses and fail to contain virus infection of the central nervous system. *J Immunol.* 166: 1066-1074.

**Kyriakis, S.C., Tzika, E.D., Lyras, D.N., Tsinas, A.C., Saoulidis, K. Sarris, K. (1998)**

Effect of an inactivated parapoxvirus based immunomodulator (Baypamun) on post weaning diarrhoea syndrome and wasting pig syndrome of piglets. *Res. Vet. Sci.* 64: 187-190.

**Kyte, J., Doolittle, R.F. (1982)**

A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157: 105-132.

**Lachmann, P.J., Davies, A. (1997)**

Complement and immunity to viruses. *Immunol. Rev.* 159: 69-77.

**Lalani, A.S., McFadden, G. (1997)**

Secreted poxvirus chemokine binding proteins. *J. Leukoc. Biol.* 62: 570-576.

**Lane, J.M., Ruben, F.L., Neff, J.M., Millar, J.D. (1969)**

Complications of smallpox vaccination, 1968. *N. Engl. J. Med.* 281: 1201-1208.

**Lard, S.L., Roehrig, J.T., Pearson, L.D. (1991)**

Differentiation of parapoxviruses by application of orf virus-specific monoclonal antibodies against cell surface proteins. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 28: 247-258.

**Lear, A., Hutchison, G., Reid, H., Norval, M., Haig, D.M. (1996)**

Phenotypic characterisation of the dendritic cells accumulating in ovine dermis following primary and secondary orf virus infection. *Eur. J. Derm.* 6: 135-140.

**Leitner, W.W., Ying, H., Restifo, N.P. (1999)**

DNA and RNA-based vaccines: principles, progress and prospects. *Vaccine* 18: 765-77.

**Lenk, M., Visser, N., Mettenleiter, T.C. (1997)**

The Pseudorabiesvirus UL51 gene product is a 30-kilodalton virion component. *J. Virol.* 71: 5635-8.

**Letellier, C., Burny, A., Meulemans, G. (1991)**

Construction of a pigeonpox virus recombinant: expression of the Newcastle disease virus (NDV) fusion glycoprotein and protection of chickens against NDV challenge. *Arch. Virol.* 118: 43-56.

**Lewis, P.J., Babiuk, L.A. (1999)**

DNA vaccines: A review. *Advances in virus research* 54: 129-188.

**Liang, X., Chow, B., Babiuk, L.A. (1997)**

Study of immunogenicity and virulence of bovine herpesvirus 1 mutants deficient in the UL49 homolog, UL49.5 homolog and dUTPase genes in cattle. *Vaccine* 15: 1057-1064.

**Lichtensteins, D.L., Rushlow, K.E., Cook, R.F., Raabe, M.L., Swardson, C.J., Kociba, G.J., Issel, C.J., Montelaro, R.C. (1995)**

Replication in vitro and in vivo of an equine infectious anemia virus mutant deficient in dUTPase activity. *J. Virol.* 69: 2881-2888.

**Limbach, K.J., Paoletti, E. (1996)**

Non-replicating expression vectors: applications in vaccine development and gene therapy. *Epidemiol. Infect.* 116: 241-256.

**Lloyd, J. B., Gill, H.S., Haig, D. M., Husband, A. J. (2000)**

In vivo T-cell subset depletion suggests that CD4<sup>+</sup> T-cells and a humoral immune response are important for the elimination of orf virus from the skin of sheep. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 74: 249-262.

**Lomniczi, B., Watanabe, S., Ben-Porat, T., Kaplan, A.S. (1987)**

Genome location and identification of functions defective in the Bartha vaccine strain of Pseudorabiesvirus. *J. Virol.*, 61: 796-801.

**Lubinski, J., Wang, L., Mastellos, D., Sahu, A., Lambris, J.D., Friedman, H.M. (1999)**

In vivo role of complement-interacting domains of herpes simplex virus type 1 glycoprotein gC. *J. Exp. Med.* 190: 1637-1646.

**Lukàcs, N., Thiel, H.J., Mettenleiter, T.C., Rziha, H.J. (1985)**

Demonstration of three major species of Pseudorabiesvirus glycoproteins and identification of a disulfide-linked glycoprotein complex. *J. Virol.* 53: 166-173.

**Lundstrom, M., Jeansson, S., Olofsson, S. (1987)**

Host cell-induced differences in the O-glycosylation of herpes simplex virus gC-1. II. Demonstration of cell-specific galactosyltransferase essential for formation of O-linked oligosaccharides. *Virology* 161: 395-402.

**Lyttle, D.J., Fraser, K.M., Fleming, S.B., Mercer, A.A., Robinson, A.J. (1994)**

Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf-virus. *J. Virol.* 68: 84-92.

**Mackett, M., Smith, G.L., Moss, B. (1984)**

General Method for production and selection of infectious vaccinia virus recombinants expressing foreign genes. *J. Virol.* 49: 857-864.

**MacMicking, J., Xie, Q., Nathan, C. (1997)**

Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 323-350.

**Maeda, K., Hayashi, S., Tanioka, Y., Matsumoto, Y., Otsuka, H. (2002)**

Pseudorabies virus (PRV) is protected from complement attack by cellular factors and glycoprotein C (gC). *Virus Res.* 84: 79-87.

**Malnati, M.S., Marti, M., LaVaute, T., Jaraquemada, D., Biddison, W., DeMars, R., Long, E.O. (1992)**

Processing pathways for presentation of cytosolic antigen to MHC class II-restricted T cells. *Nature* 357: 702-704.

**Maloy, K.J., Odermatt, B., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M. (1998)**

Interferon gamma-producing gammadelta T cell-dependent antibody isotype switching in the absence of germinal center formation during virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 1160-1165.

**Manickan, E., Rouse, B.T. (1995).**

Roles of different T-cell subsets in control of herpes simplex virus infection determined by using T-cell-deficient mouse models. *J. Virol.* 69: 8178-8179.

**Manickan, E., Rouse, R.D.J., Yu, Z., Wire, W.S., Rouse, B.T. (1995)**

Genetic immunization against herpes simplex virus. Protection is mediated by CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. *J. Immunol.* 155:259-265.

**Marchioli, C. C., Yancey, R. J., Wardley, R. C., Thomsen, D. R. and Post, L. E. (1987a)**

A vaccine strain of Pseudorabiesvirus with deletions in the thymidine kinase and glycoprotein X genes. *Am. J. Vet. Res.* 48: 1577-1583.

**Marchioli, C. C., Yancey, R. J., Petrovskis, E. A., Timmins, J. G. and Post, L. E. (1987b)**

Evaluation of pseudorabies virus glycoprotein gp50 as a vaccine for Aujeszky's disease in mice and swine: expression by vaccinia virus and Chinese hamster ovary cells. *J. Virol.* 61: 3977-82.

**Marchioli, C.C., Yancey, R.J., Timmins, J.G., Post, L.E., Young, B.R. (1988)**

Protection of mice and swine from pseudorabies virus induced mortality by administration of pseudorabiesvirus specific mouse monoclonal antibodies. *Am. J. Vet. Res.* 49: 860-864.

**Martin, S., Wardley, R. (1984)**

Natural cytotoxicity detected in swine using Aujeszky's disease virus infected targets. *Res. Vet. Sci.* 37 : 211-218.

**Martin, S., Wardley, R.C., Donaldson, A.I. (1986)**

Functional antibody responses in pigs vaccinated with live and inactivated Aujeszky's disease virus. *Res. Vet. Sci.* 41: 331-35.

**Matsuda-Tsuchida, A., Katayama, S., Okada, N., Okabe, T., Sasaki, N. (1992)**

Protection from pseudorabies virus challenge in mice by a combination of purified gII, gIII and gVI antigens. *J. Vet. Med. Sci.* 54: 447-452.

**Mayr, A., Bachmann, P.A., Bibrack, B., Wittmann, G. (1974)**

Quantitative Bestimmung der Virusinfektiosität (Virustitration). *In: Virologische Arbeitsmethoden Band I.* Fischer Verlag, Stuttgart. p. 35-39.

**Mayr, A., Herlyn, M., Mahnel, H., Danco, A., Zach, A., Bostedt, H. (1981)**

Bekämpfung der ecthyma contagiosum (Pustular dermatitis) der Schafe mit einem neuen Parenteral-Zellkultur-Lebendimpfstoff. Zentralblatt Veterinärmedizin B. 28: 535-552.

**Mayr, A. (2001a)**

Development of non-immunising, paraspecific vaccine from attenuated pox viruses: a new type of vaccine. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 114: 184-187.

**Mayr, A., (2001b)**

Altered strain of the modified vaccinia virus Ankara (MVA). WO 01/68820 A1. World Intellectual Property Organization, Geneva, Switzerland.

**Mazur, C., Ferreira, I.L., Rangel Filho, F.B., Galler, R. (2000)**

Molecular characterization of Brazilian isolates of orf virus. Vet. Microbiol. 73: 253-259.

**McCaw, M.B., Xu, J. (1993)**

Protection against pseudorabies virus infection by intranasal vaccination of newborn pigs. Am. J. Vet. Res. 54: 527-533.

**McFarlane, R.G., Thawley, D.G., Solorzano, R.F. (1986)**

Detection of latent Pseudorabiesvirus in porcine tissue, using a DNA hybridization dot-blot assay. Am. J. Vet. Res. 47: 2329-2336.

**McInnes, C.J., Wood, A.R., Nettleton, P.F., Gilray, J.A. (2001)**

Genomic comparison of an avirulent strain of orf virus with that of a virulent wild type isolate reveals that the orf virus G2L gene is non-essential for replication. Virus Genes 22: 141-150.

**McKeever, D.J., Reid, H.W., Inglis, N.F., Herring, A.J. (1987)**

A qualitative and quantitative assessment of the humoral antibody response of the sheep to orf virus infection. Vet. Microbiol. 15: 229-241.

**McKeever, D.J., Jenkinson, D.M., Hutchison, G., Reid, H.W. (1988)**

Studies on the pathogenesis of orf virus infection in sheep. J. Comp. Pathol. 99: 317-328.

**McLean, A., Wie, X.-Q., Huang, F.-P., Al-Alem, U., Chan, W.L., Liew, F.Y. (1998)**

Mice lacking inducible nitric-oxide synthase are more susceptible to herpes simplex virus infection despite enhanced Th1 cell responses. J. Gen. Virol. 79 : 825-830.

**Mengeling, W.L., Lager, K.M., Volz, D.M., Brockmeier, S.L. (1992)**

Effect of different vaccination procedures on shedding latency and reactivation of virulent pseudorabies virus in pigs. Am. J. Vet. Res. 53: 2164-2173.

**Mengeling, W.L., Brockmeier, S.L., Lager, K.M. (1994)**

Evaluation of a recombinant vaccinia virus containing pseudorabies (PR) virus glycoprotein genes gp50, gII and gIII as a PR vaccine for pigs. Arch. Virol. 134: 259-269.

**Menna, A., Wittek, R., Bachmann, P.A., Mayr, A., Wyler, R. (1979)**

Physical characterization of a stomatitis papulosa virus genome: a cleavage map for the restriction endonuclease HindIII and EcoRI. Arch Virol. 59: 145-156.

**Mercer, A.A., Fraser, K.M., Barns, G., Robinson, A.J. (1987)**

The structure and cloning of orf virus DNA. Virology 157: 1-12.

**Mercer, A.A., Fraser, K.M., Stockwell, P.A., Robinson, A.J. (1989)**

A homologue of retroviral pseudoproteases in the parapoxvirus, orf virus. Virology 172: 665-668.

**Mercer, A.A., Lyttle, D.J., Whelan, E.M., Fleming, S.B., Sullivan, J.T. (1995)**

The establishment of a genetic map of orf virus reveals a pattern of genomic organization that is highly conserved among divergent poxviruses. *Virology* 212: 698-704.

**Mercer, A.A., Fraser, K.M., Esposito, J.J. (1996)**

Gene homology between orf virus and smallpox variola virus. *Virus Genes*. 13: 175-178.

**Mercer, A., Fleming, S., Robinson, A., Nettleton, P., Reid, H. (1997)**

Molecular genetic analyses of parapoxviruses pathogenic for humans. In: Kaaden, O.-R., Czerny, C.-P., Eichhorn, W. (Eds.), *Viral zoonoses and food of animal origin*. Springer, Wien, pp. 25-34.

**Mettenleiter, T.C., Lukács, N., Rziha, H.J. (1985)**

Pseudorabiesvirus avirulent strains fail to express a major glycoprotein. *J. Virol.* 56: 307-311.

**Mettenleiter, T.C., Lukács, N., Thiel, H.J., Schreurs, C.S., Rziha, H.J. (1986)**

Location of the structural gene of Pseudorabiesvirus glycoprotein complex gII. *Virology* 152: 66-75.

**Mettenleiter, T.C., Schreurs, C., Zuckermann, F., Ben-Porat, T. (1987)**

Role of Pseudorabiesvirus glycoprotein gI in virus release from infected cells. *J. Virol.* 61: 2764-2769.

**Mettenleiter, T.C., Zsak, L., Zuckermann, F., Sugg, N., Kern, H., Ben-Porat, T. (1990)**

Interaction of glycoprotein gIII with a cellular heparinlike substance mediates adsorption of Pseudorabiesvirus. *J. Virol.*, 64: 278-286.

**Mettenleiter, T.C. (1994a)**

Pseudorabies (Aujeszky's Disease) virus: state of the art. *Acta Veterinaria Hungaria* 42: 153-177.

**Mettenleiter, T.C. (1994b)**

Initiation and spread of  $\alpha$ -herpesvirus infections. *Trends in Microbiology* 2: 2-4.

**Mettenleiter, T.C., Klupp, B.G., Weiland, F., Visser, N. (1994)**

Characterization of a quadruple glycoprotein-deleted Pseudorabiesvirus mutant for use as a biologically safe live virus vaccine. *J. Gen. Virol.* 75: 1723-1733.

**Meyer, M., Lanz, C., Clauss, M., Lepple-Wienhues, A., Waltenberger, J., Augustin, H.G., Ziche, M., Lenz, C., Büttner, M., Rziha, H.-J., Dehio, C. (1999)**

A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling by VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinase. *EMBO J.* 18: 363-374.

**Molitor, T.W., Hill, H.A.T. (1988)**

Safety, efficacy and field studies with syntrovect pseudorabies vaccine, prv/marker. *Proc. Am. Assoc. Swine Pract.*, 6-8 March, St. Louis, p.75-78.

**Monteil, M., Le Potier, M.F., Cariolet, R., Houdayer, C., Eloit, M. (1997)**

Effective priming of neonates born to immune dams against the immunogenic pseudorabies virus glycoprotein gD by replication-incompetent adenovirus-mediated gene transfer at birth. *J. Gen. Virol.* 78: 3303-3310.

**Moormann, R.J.M., De Rover, T., Peeters, B.P.H., Gielkens, A.L. and Van Oirschot, J.T. (1990)**

Inactivation of the thymidine kinase gene of a gI deletion mutant of Pseudorabiesvirus generates a safe but still highly immunogenic vaccine strain. *J. Gen. Virol.* 71: 1591-1595.

**Morrison, L.A., Zhu, L., Thebeau, L.G. (2001)**

Vaccine-induced serum immunoglobulin contributes to protection from herpes simplex virus type 2 genital infection in the presence of immune T cells. *J. Virol.* 75: 1195-1204.

**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.

**Moss, B. (1990)**

Regulation of vaccinia virus transcription. *Annu. Rev. Biochem.* 59: 661-688.

**Moss, B. (1991)**

Vaccinia virus: a tool for research and vaccine development. *Science* 252: 1662-1667.

**Moss, B. (1996a)**

Poxviridae. The viruses and their replication. *In: Fields Virology*, Third Edition, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. p. 2637-2671.

**Moss, B. (1996b)**

Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 93: 11341-11348.

**Moyer, R.W., Graves, R.L., Rothe, C.T. (1980)**

The white pock ( $\mu$ ) mutants of rabbit poxvirus. III. Terminal DNA sequence duplication and transposition in rabbit poxvirus. *Cell* 22: 545-553.

**Mukamoto, M., Watanabe, I., Kobayashi, Y., Icatlo, F.C. Jr, Ishii, H., Kodama, Y. (1991)**

Immunogenicity in Aujeszky's disease virus structural glycoprotein gVI (gp50) in swine. *Vet. Microbiol.* 29: 109-121.

**Naase, M., Nicholson, B.H., Fraser, K.M., Mercer, A.A., Robinson, A.J. (1991)**

An orf virus sequence showing homology to the 14K 'fusion' protein of vaccinia virus. *J. Gen. Virol.* 72: 1177-1181.

**Nakamura, T., Ihara, T., Nunoya, T., Kuwahara, H., Ishihama, A., Ueda, S. (1993)**

Role of pseudorabies virus glycoprotein II in protection from lethal infection. *Vet. Microbiol.* 36 :83-90.

**Neeffjes, J.J., Momburg, F. (1993)**

Cell biology of antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.* 5: 27-34.

**Netea, M.G., Meer, J.W., Verschueren, I., Kullberg, B.J. (2002)**

CD40/CD40 ligand interactions in the host defense against disseminated *Candida albicans* infection: the role of macrophage-derived nitric oxide. *Eur. J. Immunol.* 32: 1455-1463.

**Nettleton, P.F., Munro, R., Pow, I., Gilray, J.A., Gray, E.W., Reid, H.W. (1995)**

Isolation of a parapoxvirus from a grey seal (*Halichoreus grypus*). *Vet. Rec.* 137: 562-564.

**Ober, B.T. (1993)**

Kartierung von B- und T-Zellepitopen mittels synthetischer Peptide und Fusionsproteine des Glykoproteins gIII des Pseudorabies- (Suid Herpes 1) virus. Diplomarbeit, Eberhard Karls Universität, Tübingen.

**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<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> memory T-helper cells in swine. *J. Virol.* 72: 4866-4873.

**Ober, B.T., Teufel, B., Wiesmüller, K.H., Jung, G., Pfaff, E., Saalmüller, A., Rziha, H.-J. (2000)**

The porcine humoral immune response against pseudorabies virus specifically targets attachment sites on glycoprotein gC. *J. Virol.* 74: 1752-1760.

**Ober, B.T., Brühl, P., Schmidt, M., Wieser, V., Gritschenberger, W., Coulibaly, S., Savidis-Dacho, H., Gerencer, M., Falkner, F.G. (2002)**

Immunogenicity and safety of defective vaccinia virus Lister: Comparison with Modified Vaccinia Virus Ankara. *J. Virol.* 76: 7713-7723.

**Ogawa, S., Oku, A., Sawano, A., Yamaguchi, S., Yazaki, Y., Shibuya, M. (1998)**

A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain. *J. Biol. Chem.* 273: 31273-31282.

**Ohishi, K., Inui, K., Barrett, T., Yamanouchi, K. (2000)**

Long-term protective immunity to rinderpest in cattle following a single vaccination with a recombinant vaccinia virus expressing the virus haemagglutinin protein. *J. Gen. Virol.* 81: 1439-1446.

**Otsuka, H., Xuan, X., Shibata, I., Mori, M. (1996)**

Protective immunity of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) recombinants which express pseudorabies virus (PRV) glycoproteins gB, gC, gD and gE. *J. Vet. Med. Sci.* 58: 819-824.

**Oxenius, A., Bachmann, M.F., Ashton-Rickardt, P.G., Tonegawa, S., Zinkernagel, R.M., Hengartner, H. (1995)**

Presentation of endogenous viral proteins in association with major histocompatibility complex class II: on the role of intracellular compartmentalization, invariant chain and the TAP transporter system. *Eur. J. Immunol.* 25: 3402-3411.

**Oxenius, A., Campbell, K.A., Maliszewski, C.R., Kishimoto, T., Kikutani, H., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M., Bachmann, M.F. (1996)**

CD40-CD40 ligand interactions are critical in T-B cooperation but not for other anti-viral CD4<sup>+</sup>T cell functions. *J. Exp. Med.* 183: 2209-2218.

**Oxenius, A., Zinkernagel, R.M., Hengartner, H. (1998)**

CD4<sup>+</sup> T-cell induction and effector functions: a comparison of immunity against soluble antigens and viral infections. *Adv. Immunol.* 70: 313-367.

**Paoletti, E., Taylor, J., Maignier, B., Meric, C., Tartaglia, J. (1995)**

Highly attenuated poxvirus vectors: NYVAC, ALVAC and TROVAC. *Dev. Biol. Stand.* 84: 159-163.

**Paoletti, E. (1996)**

Applications of pox virus vectors to vaccination: An update. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 93: 11349-11353.

**Pardo, M.C., Bauman, J.E., Mackowiak, M. (1997)**

Protection of dogs against canine distemper by vaccination with a canarypox virus recombinant expressing canine distemper virus fusion and hemagglutinin glycoproteins. *Am. J. Vet. Res.* 58: 833-836.

**Pereira, R.A., Simmons, A. (1999)**

Cell surface expression of H2 antigens on primary sensory neurons in response to acute but not latent herpes simplex virus infection in vivo. *J. Virol.* 73: 6484-6489.

**Parker, D.C. (1993)**

T-cell dependent B-cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* 11: 331-360.

**Paulson, J.C. (1989)**

Glycoproteins : what are the sugar chains for ? *Trends Biochem. Sci.* 14: 272-279.

**Peeters, B., de Wind, N., Wagenaar, F., Gielkens, A., Moormann, R. (1992)**

Pseudorabiesvirus envelope glycoproteins gp50 and gII are essential for virus penetration, but only gII is involved in membrane fusion. *J. Virol.* 66: 894-905.

**Peeters, B., Bouma, A., de Bruin, T., Moormann, R., Gielkens, A., Kimman, T. (1994)**

Non-transmissible Pseudorabiesvirus gp50 mutants: a new generation of save live vaccines. *Vaccine* 12: 375-380.

**Pensaert, M.B., Kluge, J.P. (1989)**

Pseudorabiesvirus (Aujeszky's disease). Pensaert, M.B. (Ed.): *Virus infections of porcines*. Elsevier Science publishers B.V. Amsterdam.

**Perkus, M.E., Piccini, A., Lipinskas, B.R., Paoletti, E. (1985)**

Recombinant vaccinia virus: Immunization against multiple pathogens. *Science* 229: 981-984.

**Perkus, M.E., Tartaglia, J., Paoletti, E. (1995)**

Poxvirus-based vaccine candidates for cancer, AIDS and other infectious diseases. *J. Leukoc. Biol.* 58: 1-13.

**Petrovskis, E.A., Timmins, J.G., Armentrout, M.A., Marchioli, C.C., Yancey, R.J., Post, L.E. (1986a)**

DNA sequence of the gene for Pseudorabiesvirus gp50, a glycoprotein without N-linked glycosylation. *J. Virol.* 59: 216-223.

**Petrovskis, E.A., Timmins, J.G., Gierman, T.M., Post, L.E. (1986b)**

Deletions in vaccine strains of Pseudorabiesvirus and their effect on synthesis of glycoprotein gp63. *J. Virol.* 60: 1166-1169.

**Pfleiderer, M., Falkner, F.G., Dorner, F. (1995)**

A novel vaccinia virus expression system allowing construction of recombinants without the need for selection markers, plasmids and bacterial hosts. *J. Gen. Virol.* 76: 2957-2962.

**Pickup, D.J., Ink, B.S., Parsons, B.L., Hu, W., Joklik, W.K. (1984)**

Spontaneous deletions and duplications of sequences in the genome of cowpox virus. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 81: 6817-6821.

**Polydefkis, M., Koenig, S., Flexner, C., Obah, E., Gebo, K., Chakrabarti, S., Earl, P.L. Moss, B., Siliciano, R.F. (1990)**

Anchor sequence-dependent endogenous processing of human immunodeficiency virus 1 envelope glycoprotein gp160 for CD4<sup>+</sup> T cell recognition. *J. Exp. Med.* 171: 875-887.

**Quint, W., Gielkens, A., van Oirschot, J., Berns, A., Cuypers, H.T. (1987)**

Construction and characterization of deletion mutants of Pseudorabiesvirus: a new generation of live vaccines. *J. Gen. Virol.* 68: 523-534.

**Rafii, F., Burger, D. (1985)**

Comparison of contagious ecthyma virus genomes by restriction endonucleases. *Arch. Virol.* 84: 283-289.

**Rahemtulla, A., Fung-Leung, W.P., Schilham, M.W., Kundig, T.M., Sambhara, S.R., Narendran, A., Arabian, A., Wakeham, A., Paige, C.J., Zinkernagel, R.M., et al. (1991)**

Normal development and function of CD8<sup>+</sup> cells but markedly decreased helper cell activity in mice lacking CD4. *Nature.* 353: 180-184.

**Rahemtulla, A., Kundig, T.M., Narendran, A., Bachmann, M.F., Julius, M., Paige, C.J., Ohashi, P.S., Zinkernagel, R.M., Mak, T.W. (1994)**

Class II major histocompatibility complex-restricted T cell function in CD4-deficient mice. *Eur. J. Immunol.* 24: 2213-2218.

**Ramirez, J.C., Gherardi, M.M., Esteban, M. (2000a)**

Biology of attenuated modified vaccinia virus Ankara recombinant vector in mice: virus fate and activation of B- and T-cell immune responses in comparison with the Western Reserve strain and advantages as a vaccine. *J. Virol.* 74: 923-933.

**Ramirez, J.C., Gherardi, M.M., Rodriguez, D., Esteban, M. (2000b)**

Attenuated modified vaccinia virus Ankara can be used as an immunizing agent under conditions of preexisting immunity to the vector. *J. Virol.* 74: 7651-7655.

**Ramsay, A.J., Leong, K.H., Ramshaw, I.A. (1997)**

DNA vaccination against virus infection and enhancement of antiviral immunity following consecutive immunization with DNA and viral vectors. *Immunol. Cell Biol.* 75: 382-388.

**Ramshaw, I.A., Ramsay, A.J., Karupiah, G., Rolph, M.S., Mahalingam, S., Ruby, J.C. (1997)**

Cytokines and immunity to viral infections. *Immunol. Rev.* 159: 119-135.

**Ramshaw, I.A., Ramsay, A.J. (2000)**

The prime-boost strategy: Exciting prospects for improved vaccination. *Immunol. Today* 21: 163-165.

**Rauh, I., Mettenleiter, T.C. (1991)**

Pseudorabies virus glycoproteins gII and gp50 are essential for virus penetration. *J. Virol.* 65: 5348-5356.

**Ravetch, J.V., Clynes, R.A. (1998)**

Divergent roles for Fc receptors and complement in vivo. *Annu. Rev. Immunol.* 16: 421-432.

**Rees, W., Bender, J., Kent Teague, T., Kedl, R.M., Crawford, F., Marrack, P., Kappler, J. (1999)**

An inverse relationship between T cell receptor affinity and antigen dose during T cell responses in vivo and in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 9781-9786.

**Renshaw, B.R., Fanslow, W.C. 3rd, Armitage, R.J., Campbell, K.A., Liggitt, D., Wright, B., Davison, B.L., Maliszewski, C.R. (1994)**

Humoral immune responses in CD40 ligand-deficient mice. *J. Exp. Med.* 180: 1889-1900.

**Riviere, M., Tartaglia, J., Perkus, M.E., Norton, E.K., Bongermimo, C.M., Lacoste, F., Duret, C., Desmettre, P., Paoletti, E. (1992)**

Protection of mice and swine from pseudorabies virus conferred by vaccinia virus-based recombinants. *J. Virol.* 66: 3424-3434.

**Robbins, A.K., Watson, R.J., Whealy, M.E., Hays, W.W., Enquist, L.W. (1986a)**

Characterization of Pseudorabiesvirus glycoprotein gene with homology to herpes simplex virus type 1 and type 2 glycoprotein C. *J. Virol.*, 58: 339-347.

**Robbins, A.K., Whealy, M.E., Watson, R.J., Enquist, L.W. (1986b)**

Pseudorabies virus gene encoding glycoprotein gIII is not essential for growth in tissue culture. *J. Virol.* 59: 635-645.

**Robbins, A.K., Dorney, D.J., Wathen, M.W., Whealy, M.E., Gold, C., Watson, R.J., Holland, L.E., Weed, S.D., Levine, M., Glorioso, J.C., Enquist, L.W. (1987)**

The Pseudorabiesvirus gII gene is closely related to the gB glycoprotein gene of herpes simplex virus. *J. Virol.* 61: 2691-2701.

**Robbins, A.K., Ryan, J.P., Whealy, M.E., Enquist, L.W. (1989)**

The gene encoding the gIII envelope protein of Pseudorabiesvirus vaccine strain Bartha contains a mutation affecting protein localization. *J. Virol.* 63: 250-258.

**Robinson, A.J., Balassu, T.C. (1981)**

Contagious pustular dermatitis (orf). *Vet. Bulletin* 170: 771-782.

**Robinson, A. J., Ellis, G., Balassu, T. (1982)**

The genome of orf virus: restriction endonuclease analysis of viral DNA isolated from lesions of orf in sheep. *Arch. Virol.* 71: 43-55.

**Robinson, A.J., Barns, G., Fraser, K.M., Carpenter, E., Mercer, A.A. (1987)**

Conservation and variation in orf-virus genomes. *Virology* 157: 13-23.

**Robinson, A.J., Lyttle, D.J. (1992)**

Parapoxviruses: Their biology and potential as recombinant vaccines. *In: Binns, M.M., Smith, G.L. (Eds.), Recombinant poxviruses.* CRC Press Inc., Boca Raton, FL, pp. 285-327.

**Robinson, A.J., Mercer, A.A. (1995)**

Parapoxvirus of red deer: evidence for its inclusion as a new member in the genus parapoxvirus. *Virology* 208: 812-815.

**Robinson, H.L., Pertmer, T.M. (2000)**

DNA vaccines for viral infections: basic studies and applications. *Adv. Virus. Res.* 55: 1-74.

**Roizman, B. (1996)**

Herpesviridae. *In: Fields Virology, Third Edition, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.* p. 2221-2230.

**Roizman, B., Sears, A. (1996)**

Herpes simplex viruses and their replication. *In: Fields Virology, Third Edition. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia,* p. 2291-2295.

**Roman, M., Martin-Orozco, E., Goodman, J.S., Nguyen, M.D., Sato, Y., Ronaghy, A., Kornbluth, R.S., Richman, D.D., Carson, D.A., Raz, E. (1997)**

Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants. *Nat. Med.* 3: 849-854.

**Romero, C.H., Barrett, T., Chamberlain, R.W., Kitching, R.P., Fleming, M., Black, D.N. (1994)**

Recombinant capripox virus expressing the hemagglutinin protein gene of rinderpest virus: protection of cattle against rinderpest and lumpy skin disease. *Virology* 204: 425-429.

**Rooney, J.F., Wohlenberg, C., Cremer, K.J., Moss, B., Notkins, A.L. (1988)**

Immunization with a vaccinia virus recombinant expressing herpes simplex virus type 1 glycoprotein D: long-term protection and effect of revaccination. *J. Virol.* 62:1530-1534.

**Rosel, J.L., Earl, P.L., Weir, J.P., Moss, B. (1986)**

Conserved TAAATG sequence at the transcriptional and translational initiation sites of vaccinia virus late genes deduced by structural and functional analysis of the HindIII H genome fragment. *J. Virol.* 60: 436-439.

**Rosenbusch, R.F., Reed, D.E. (1983)**

Reaction of convalescent bovine antisera with strain-specific antigens of parapoxviruses. *Am J. Vet. Res.* 44: 875-878.

**Rosenthal, K.L., Smiley, J.R., South, S., Johnson, D.C. (1987)**

Cells expressing herpes simplex virus glycoprotein gC but not gB, gD or gE are recognized by murine cytotoxic T lymphocytes. *J. Virol.* 61: 2438-2447.

**Ryan, J.P., Whealy, M.E., Robbins, A.K., Enquist, L.W. (1987)**

Analysis of pseudorabiesvirus glycoprotein gIII localization and modification by using novel infectious viral mutants carrying unique *EcoRI* sites. *J. Virol.* 61: 2962-2972.

**Ryan, J.P., Whealy, M.E., Robbins, A.K., Keeler, C.L., Enquist, L.W. (1989)**

Genetic analysis of a herpesvirus glycoprotein signal sequence. *In: Cell Biology of virus entry, replication, and pathogenesis.* Compans, R.W., Helenius, A., Oldstone, M.B.A (Eds.) Liss, A.R. Inc. New York. p. 299-308.

**Ryan, P., Robbins, A., Whealy, M., Enquist, L.W. (1993)**

Overall signal sequence hydrophobicity determines the *in vivo* translocation efficiency of a herpesvirus glycoprotein. *Virus Genes* 7: 5-21.

- Rziha, H.J., Mettenleiter, T.C., Ohlinger, V., Wittmann, G. (1986)**  
Herpesvirus (Pseudorabiesvirus) latency in swine: occurrence and physical state of viral DNA in neural tissues. *Virology* 155: 600-613.
- Rziha, H.-J., Henkel, M., Cottone, R., et al. (1999)**  
Parapoxviruses: Potential alternative vectors for directing the immune response in permissive and non-permissive hosts. *J. Biotechnol.* 73: 235-242.
- Rziha, H.-J., Henkel, M., Cottone, R., Bauer, B., Auge, U., Götz, F., Pfaff, E., Röttgen, M., Dehio, C., Büttner, M. (2000)**  
Generation of recombinant parapoxviruses: non-essential genes suitable for insertion and expression of foreign genes. *J. Biotechnol.* 83: 137-145.
- Sabo, A., Rajcani, J. (1976)**  
Latent Pseudorabiesvirus infection in pigs. *Acta Virologica* 20: 208-214.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977)**  
DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- Savory, L.J., Stacker, S.A., Fleming, S.B., Niven, B.E., Mercer, A.A. (2000)**  
Viral vascular endothelial growth factor plays a critical role in orf virus infection. *J. Virol.* 74:10699-10706.
- Schijns, V.E.C.J., Haagmans, B.L., Rijke, E.O., Huang, S., Aguet, M., Horzinek, M.C. (1994)**  
IFN- $\gamma$  receptor-deficient mice generate antiviral Th1-characteristic cytokine profiles but altered antibody responses. *J. Immunol.* 153: 2029-2037.
- Schijns, V.E.C.J., Haagmans, B.L., Horzinek, M.C. (1995)**  
IL-12 stimulates an antiviral type 1 cytokine response but lacks adjuvant activity in IFN- $\gamma$ -receptor-deficient mice. *J. Immunol.* 155: 2525-2532.
- Schmelz, M., Sodeik, B., Ericsson, M., Wolffe, E.J., Shida, H., Hiller, G., Griffiths, G. (1994)**  
Assembly of vaccinia virus: The second wrapping cisterna is derived from the Trans Golgi Network. *J. Virol.* 68: 130-147.
- Schmid, D.S., Rouse, B.T. (1992)**  
The role of T cell immunity in control of herpes simplex virus. *In*: Rouse, B.T. (Ed.). *Herpes simplex virus. Pathogenesis, immunobiology and control.* *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 179: 57-74.
- Schmidt, J., Klupp, B.G., Karger, A., Mettenleiter, T.C. (1997)**  
Adaptability in Herpesviruses: Glycoprotein D-independent infectivity of Pseudorabiesvirus. *J. Virol.* 71: 17-24.
- Schmidt, J., Gerds, V., Beyer, J., Klupp, B.G., Mettenleiter, T.C. (2001)**  
Glycoprotein D-independent infectivity of pseudorabies virus results in an alteration of in vivo host range and correlates with mutations in glycoproteins B and H. *J. Virol.* 75: 10054-10064.
- Schneider, J., Gilbert, S.C., Hannan, C.M., Degano, P., Sheu, E.G., Plebanski, M., Hill, A.V.S. (1999)**  
Induction of CD8<sup>+</sup> T cells using heterologous prime-boost immunization strategies. *Immunological Reviews* 170: 29-39.
- Schon, E., Harandi, A.M., Nordstrom, I., Holmgren, J., Eriksson K. (2001)**  
Dendritic cell vaccination protects mice against lethality caused by genital herpes simplex virus type 2 infection. *J. Reprod. Immunol.* 50: 87-104.
- Schreurs, C. (1988)**  
Isolierung und Charakterisierung von Glykoproteinmutanten des Pseudorabiesvirus (Suid Herpesvirus 1). Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

- Schreurs, C., Mettenleiter, T.C., Zuckermann, F., Sugg, N., Ben-Porat, T. (1988)**  
Glycoprotein gIII of Pseudorabiesvirus is multifunctional. *J. Virol.* 62: 2251-2257.
- Schwer, B., Visca, P., Vos, J.C., Stunnenberg, H.G. (1987)**  
Discontinuous transcription or RNA processing of vaccinia virus late messengers results in a 5' poly(A) leader. *Cell* 50: 163-169.
- Sentsui, H., Murakami K., Inoshima, Y., Shibahara, T., Yokomizo, Y. (1999)**  
Isolation of parapoxvirus from a cow treated with interferon- $\gamma$ . *Vet. Microbiol.* 70: 143-152.
- Sha, Z., Compans, R.W. (2000)**  
Induction of CD4<sup>+</sup> T-cell-independent immunoglobulin responses by inactivated influenza virus.
- Sharp, T.V., Moonan, F., Romashko, A., Joshi, B., Barber, G.N., Jagus, R. (1998)**  
The vaccinia virus E3L gene product interacts with both the regulatory and the substrate binding regions of PKR: Implications for PKR autoregulation. *Virology* 250: 302-315.
- Sharpe, S., Polyanskaya, N., Dennis, M., Sutter, G., Hanke, T., Erfle, V., Hirsch, V., Cranage, M. (2001)**  
Induction of simian immunodeficiency virus (SIV)-specific CTL in rhesus macaques by vaccination with modified vaccinia virus Ankara expressing SIV transgenes: influence of pre-existing anti-vector immunity. *J. Gen. Virol.* 82 : 2215-2223.
- Shiau, A.L., Chu, C.Y., Su, W.C., Wu, C.L. (2001)**  
Vaccination with the glycoprotein D gene of pseudorabies virus delivered by nonpathogenic *Escherichia coli* elicits protective immune responses. *Vaccine.* 19: 3277-3284.
- Simmons, A., Tschärke, D.C. (1992)**  
Anti-CD8 impairs clearance of herpes simplex virus from the nervous system: implications for the fate of virally infected neurons. *J. Exp. Med.* 175: 1337-1344.
- Sin, J.I., Kim, J.J., Arnold, R.L., Shroff, K.E., McCallus, D., Pachuk, C., McElhiney, S.P., Wolf, M.W., Pompa-de Bruin, S.J., Higgins, T.J., Ciccarelli, R.B., Weiner, D.B. (1999)**  
IL-12 gene as a DNA vaccine adjuvant in a herpes mouse model: IL-12 enhances Th1-type CD4<sup>+</sup> T cell-mediated protective immunity against herpes simplex virus-2 challenge. *J. Immunol.* 162: 2912-2921.
- Sin, J.I., Kim, J.J., Zhang, D., Weiner, D.B. (2001)**  
Modulation of cellular responses by plasmid CD40L: CD40L plasmid vectors enhance antigen-specific helper T cell type 1 CD4<sup>+</sup> T cell-mediated protective immunity against herpes simplex virus type 2 in vivo. *Hum. Gene Ther.* 12: 1091-1102.
- Smith, G.L. (1996)**  
Virus proteins that bind cytokines, chemokines or interferons. *Curr. Opin. Immunol.* 8: 467-471.
- Smith, G.L. (1999)**  
Vaccinia virus immune evasion. *Immunol. Lett.* 65: 55-62.
- Snider, T.G., McConnell, S., Pierce, K.R. (1982)**  
Increased incidence of bovine papular stomatitis in neonatal calves. *Arch. Virol.* 71: 251-258.
- Sodeik, B., Krijnse-Locker, J. (2002)**  
Assembly of vaccinia virus revisited: *de novo* membrane synthesis or acquisition from the host? *Trends Microbiol.* 10: 15-24.
- Solomon, K.A., Robbins, A.K., Whealy, M.E., Enquist, L.W. (1990)**  
The putative cytoplasmic domain of the pseudorabies virus envelope protein gIII, the herpes simplex virus type 1 glycoprotein C homolog, is not required for normal export and localization. *J. Virol.* 64: 3516-3521.

**Solomon, K.A., Robbins, A.K., Enquist, L.W. (1991)**

Mutations in the C-terminal hydrophobic domain of Pseudorabies Virus gIII affect both membrane anchoring and protein export. *J. Virol.* 65: 5952-5960.

**Somasundaram, C., Takamatsu, H., Andreoni, C., Audonnet, J.C., Fischer, L., Lefevre, F., Charley, B. (1999)**

Enhanced protective response and immuno-adjuvant effects of porcine GM-CSF on DNA vaccination of pigs against Aujeszky's disease virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 70: 277-287.

**Somogyi, P., Frazier, J., Skinner, M.A. (1993)**

Fowlpox virus host range restriction: gene expression, DNA replication and morphogenesis in nonpermissive mammalian cells. *Virology* 197: 439-444.

**Southern, E. (1975)**

Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.

**Spear, P.G. (1993)**

Entry of alphaherpesviruses into cells. *Semin. Virol.* 4: 167-80.

**Spriggs, M.K., (1996)**

One step ahead of the game: viral immunomodulatory molecules. *Ann. Rev. Immunol.* 14: 101-130.

**Stannard, L.M., Marais, D., Kow, D., Dumbell, K.R. (1998)**

Evidence for incomplete replication of a penguin poxvirus in cells of mammalian origin. *J. Gen. Virol.* 79: 1637-1646.

**Stout, R.D., Suttles, J., Xu, J., Grewal, I.S., Flavell, R.A. (1996)**

Impaired T cell mediated macrophage activation in CD40 ligand-deficient mice. *J. Immunol.* 156: 8-11.

**Strube, W., Kretzdorn, D., Grunmach, J., Bergle, R.D., Thein, P. (1989)**

The effectiveness of the paramunity inducer Baypamun (PIND-ORF) for the prevention and metaphylaxis of an experimental infection with the infectious bovine rhinotracheitis virus in cattle. *Tieraerztliche Praxis* 17: 267-272.

**Sullivan, J.T., Mercer, A.A., Fleming, S.B., Robinson, A.J. (1994)**

Identification and characterization of an orf virus homologue of the vaccinia virus gene encoding the major envelope antigen p37K. *Virology* 202: 968-973.

**Sullivan, J.T., Fraser, K.M., Fleming, S.B., Robinson, A.J., Mercer, A.A. (1995a)**

Sequence and transcriptional analysis of an orf virus gene encoding ankyrin-like repeat sequences. *Virus Genes.* 9: 277-282.

**Sullivan, J.T., Fleming, S.B., Robinson, A.J., Mercer, A.A. (1995b)**

Sequence and transcriptional analysis of a near-terminal region of the orf virus genome. *Virus genes* 11: 21-29.

**Sutter, G., Moss, B. (1992)**

Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 89: 10847-10851.

**Sutter, G., Wyatt, L.S., Foley, B.L., Bennink, J.R., Moss, B. (1994)**

A recombinant vector derived from the host range-restricted and highly attenuated MVA strain of vaccinia virus stimulates protective immunity in mice to influenza virus. *Vaccine* 12: 1032-1040.

**Szomolanyi-Tsuda E., Le, Q.P., Garcea, R.L., Welsh, R.M. (1998)**

T-cell independent immunoglobulin G responses in vivo are elicited by live virus infection but not by immunization with viral proteins or virus-like particles. *J. Virol.* 72: 6665-6670.

- Takai, T., Li, M., Sylvestre, D.L., Clynes, R., Ravetch, J.L. (1994)**  
FcR gamma chain deletion results in pleiotropic effector cell defects. *Cell* 76: 519-529.
- Tartaglia, J., Perkus, M.E., Taylor, J., Norton, E.K., Audonnet, J.C., Cox, W.I., Davis, S.W., Vanderhoeven, J., Meignier, B., Riviere, M., Languet, B., Paoletti, E. (1992)**  
NYVAC: a highly attenuated strain of vaccinia virus. *Virology* 188: 217-232.
- Tartaglia, J., Cox, W.I., Pincus, S., Paoletti, E. (1994)**  
Safety and immunogenicity of recombinants based on the genetically-engineered vaccinia strain, NYVAC. *Dev. Biol. Stand.* 82: 125-129.
- Tatarov, G. (1968)**  
Apathogener Mutant des Aujeszky-Virus, induziert von 5-Jodo-2-Deoxyuridin (JUDR). *Zentralbl. Veterinärmed.* 15 B: 847-853.
- Taylor, J., Weinberg, R., Languet, B., Desmettre, P., Paoletti, E. (1988)**  
Recombinant fowlpox virus inducing protective immunity in non-avian species. *Vaccine* 6: 497-503.
- Taylor, J., Trimarchi, C., Weinberg, R., Languet, B., Guillemin, F., Desmettre, P., Paoletti, E. (1991)**  
Efficacy studies on a canarypox-rabies recombinant virus. *Vaccine* 9: 190-193.
- Taylor, J., Meignier, B., Tartaglia, J., Languet, B., Vanderhoeven, J., Franchini, G., Trimarchi, C., Paoletti, E. (1995)**  
Biological and immunogenic properties of a canarypox-rabies recombinant, ALVAC-RG (vCP65) in non-avian species. *Vaccine* 13: 539-549.
- Thawley, D.G., Solorzano, R.F., Johnson, M.E. (1984)**  
Confirmation of Pseudorabiesvirus infection, using virus recrudescence by dexamethasone treatment and in vitro lymphocyte stimulation. *Am. J. Vet. Res.* 45: 981-983.
- Thomsen, D.R., Marchioli, C., Yancey, R. and Post, L. (1987)**  
Replication and virulence of Pseudorabiesvirus mutants lacking glycoprotein gX. *J. Virol.* 61: 229-232.
- Tripathy, D.N. (1996)**  
Fowlpox virus vectored vaccines for control of poultry diseases. *Proc. World's Poult. Cong., 20<sup>th</sup>, New Delhi, India.* Vol. II: 497-503.
- Tripathy, D.N. (1999)**  
Swinepox Virus as a vaccine vector for swine pathogens. *Adv. Vet. Med.* 41: 463-480.
- Tsuda, T., Onodera, T., Sugimura, T., Murakami, J. (1992)**  
Induction of protective immunity and neutralizing antibodies to pseudorabies virus by immunization of anti-idiotypic antibodies. *Arch. Virol.* 124: 291-300.
- Turelli, P., Guiguen, F., Mornex, J.-F., Vigne, R., Querat, G. (1997)**  
dUTPase-minus caprine arthritis-encephalitis virus is attenuated for pathogenesis and accumulates G-to-A substitutions. *J. Virol.* 71 : 4522-4530.
- Turner, P.C., Moyer, R.W. (1990)**  
The molecular pathogenesis of poxviruses. *Curr.Top. Microbiol. Immunol.* 163: 125-151.
- Ulrich, S., Goltz, M., Ehlers, B. (1999)**  
Characterization of the DNA polymerase loci of the novel porcine lymphotropic herpesviruses 1 and 2 in domestic and feral pigs. *J. Gen. Virol.* 80: 3199-3205.
- Valder, W.-A., Straub, O.C., Thiel, W., Wachendörfer, G., Zettl, K. (1979)**  
Ecthyma contagiosum des Schafes – Wandel des klinischen Bildes. *Tierärztl. Umschau* 34: 828-836.

**Van der Leek, M.L., Feller, J.A., Sorensen, G., Isaacson, W., Adams, C.L., Borde, D.J., Pfeiffer, N., Tran, T., Moyer, R.W., Gibbs, E.P.J. (1994)**

Evaluation of swinepox virus as a vaccine vector in pigs using an Aujeszky's disease (pseudorabies) virus gene insert coding for glycoproteins gp50 and gp63. *The Veterinary Record* 134: 13-18.

**Vannier, P. (1986)**

Vaccination against Aujeszky's disease by different routes using live attenuated and inactivated virus vaccines in pigs with or without passive immunity. *J. Vet. Med. B* 33: 704-712.

**Van Oirschot, J.T., Rziha, H.J., Moonen, P.J.L.M., Pol, J.M.A. and Van Zaane, D. (1986)**

Differentiation of serum antibodies from pigs vaccinated or infected with Aujeszky's disease virus by a competitive enzyme immunoassay. *J. Gen. Virol.* 67: 1179-1182.

**Van Oirschot, J.T. (1987)**

Intranasal vaccination of pigs against Aujeszky's disease: comparison with one or two doses of attenuated vaccines in pigs with high maternal antibody titres. *Res. Vet. Sci.* 42 : 12-16.

**Van Oirschot, J.T., Gielkens, A.L.J., Moormann, R.J.M., Berns, A.J.M. (1990)**

Marker vaccines, virus protein-specific antibody assays and the control of Aujeszky's disease. *Vet. Microbiol.* 23: 85-101.

**Van Oirschot, J.T. (1991)**

Intranasal vaccination of pigs against Aujeszky's disease: protective immunity at 2 weeks, 2 months and 4 months after vaccination in pigs with maternal antibodies. *Vet. Microbiol.* 27: 103-113.

**Van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E., Estes, M.K., Lemon, S., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R., Wickner, R. (2000)**

Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Academic Press, New York. P. 144-145.

**van Rooij, E.M., Haagmans, B.L., de Visser, Y.E., de Bruin, M.G., Boersma, W., Bianchi, A.T. (1998)**

Effect of vaccination route and composition of DNA vaccine on the induction of protective immunity against pseudorabies infection in pigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 66: 113-26.

**van Rooij, E.M., Haagmans, B.L., Glansbeek, H.L., de Visser, Y.E., de Bruin, M.G., Boersma, W., Bianchi, A.T. (2000)**

A DNA vaccine coding for glycoprotein B of pseudorabies virus induces cell-mediated immunity in pigs and reduces virus excretion early after infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 74: 121-36.

**Visser, N., Lütticken, D. (1989)**

Experiences with a gI-/TK-modified live Pseudorabiesvirus vaccine: strain Begonia. In: Van Oirschot, J.T. (Ed.) CEC Seminar on Vaccination and Control of Aujeszky's disease. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. p. 37-44.

**Visser, N. (1995)**

The influence of recombination on the genetic stability of Pseudorabies vaccine virus. *Dev. Biol. Stand.*, 84: 97-104.

**Visser, N., Rziha, H.J. (1995)**

Is recombination of PRV vaccine strains a real problem? *Acta Veterinaria Hungarica* 42: 183-193.

**Vos, J.C., Mercer, A.A., Fleming, S.B., Robinson, A.J. (1992)**

In vitro recognition of an orf virus early promoter in a vaccinia virus extract. *Arch. Virol.* 123: 223-228.

**Wathen, M.W., Wathen, L.M.N. (1984)**

Isolation, characterization and physical mapping of a Pseudorabiesvirus mutant containing antigenically altered gp50. *J. Virol.* 51: 57-62.

**Wathen, L.M.K., Platt, K.B., Wathen, M.W. (1985)**

Production and characterization of monoclonal antibodies directed against PrV. *Virus Res.* 4: 19-29.

**Wei, X.-Q., Charles, I.G., Smith, A., Ure, J., Feng, G.-J., Huang, F.-P., Xu, D.M., Muller, W., Moncada, S., Liew, F.Y. (1995)**

Altered immune response in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature.* 375: 408-411.

**Weir, J.P., Bennett, M., Allen, E.M., Elkins, K.L., Martin, S., Rouse, B.T. (1989)**

Recombinant vaccinia virus expressing the herpes simplex virus type 1 glycoprotein C protects mice against herpes simplex virus challenge. *J. Gen. Virol.* 70 : 2587-2594.

**Wessels, M.R., Butko, P., Ma, M., Warren, H.B., Lage, A.L., Carroll, M.C. (1995)**

Studies of group B streptococcal infection in mice deficient in complement component C3 or C4 demonstrate an essential role for complement in both innate and acquired immunity. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 92: 11490-11494.

**Whealy, M.E., Robbins, A.K., Enquist, L.W. (1988)**

Pseudorabiesvirus glycoprotein gIII is required for efficient virus growth in tissue culture. *J. Virol.* 62: 2512-2515.

**Whealy, M.E., Robbins, A.K., Enquist, L.W. (1990)**

The export pathway of the Pseudorabiesvirus gB homolog gII involves oligomer formation in the endoplasmic reticulum and protease processing in the golgi apparatus. *J. Virol.* 64: 1946-1955.

**Wiktor, T.J., Kieny, M.P., Lathe, R. (1988)**

New vaccines and chemotherapy. *In Applied Virology research* 1. Kurstak, E., Marusyk, R.G., Murphy, F.A., Van Regenmortal, M.H.V. (Eds), Plenum, New York. p. 69-90.

**Wise, L.M., Veikkola, T., Mercer, A.A., Savory, L.J., Fleming, S.B., Caesar, C., Vitali, A., Makinen, T., Alitalo, K., Stackner, S.A. (1999)**

Vascular endothelial growth factor (VEGF)-like protein from orf virus NZ2 binds to VEGFR2 and neuropilin-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 3071-3076.

**Wittek, R., Kuenzle, C.C., Wyler, R. (1979)**

High C+G content in parapoxvirus DNA. *J. Gen. Virol.* 43: 231-234.

**Wittek, R., Herlyn, M., Schumperli, D., Bachmann, P.A., Mayr, A., Wyler, R. (1980)**

Genetic and antigenic heterogeneity of different parapoxvirus strains. *Intervirology* 13: 33-41.

**Wittmann, G., Ohlinger, V.F., Rziha, H.J. (1983)**

Occurrence and reactivation of latent Aujeszky's disease virus following challenge in previously vaccinated pigs. *Arch Virol.* 75: 29-41.

**Wittmann, G., Rziha, H.-J. (1989)**

Aujeszky's disease (pseudorabies) in pigs. *In: G. Wittmann (Ed.), Herpesvirus diseases of cattle, horses and pigs.* Kluwer Academic Publishers, Norwell, Mass. p. 230-325.

**Wittmann, G. (1991)**

Spread and control of Aujeszky's disease (AD). *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 14: 165-173.

**Wölfer, U., Krufft, V., Sawitzky, D., Hampl, H., Wittmann-Liebold, B., Habermehl, K.O. (1990)**

Processing of Pseudorabiesvirus glycoprotein gII. *J. Virol.* 64: 3122-3125.

**World Health Organization. (1998)**

Requirements for the use of animal cells as in vitro substrates for the production of biologicals. Technical Report Series, no. 878. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

- Xiong, C., Levis, R., Shen, P., Schlesinger, S., Rice, C.M., Huang, H.V. (1989)**  
Sindbis virus: an efficient broad host range vector for gene expression in animal cells. *Science* 243: 1188-1191.
- Xuan, X., Nakamura, T., Ihara, T., Sato, I., Tuchiya, K., Nosetto, E., Ishihama, A., Ueda, S. (1995)**  
Characterization of pseudorabies virus glycoprotein gII expressed by recombinant baculovirus. *Virus Res.* 36: 151-161.
- Yamada, S., Imada, T., Watanabe, W., Honda, Y., Nakajima-Iijima, S., Shimizu, Y., Sekikawa, K. (1991)**  
Nucleotide sequence and transcriptional mapping of the major capsid protein gene of Pseudorabiesvirus. *Virology* 185: 56-66.
- Yirrell, D.L., Reid, H.W., Norval, M., Miller, H.R.P. (1991a)**  
Qualitative and quantitative changes in ovine afferent lymph draining the site of epidermal orf virus infection. *Vet. Dermatol.* 2: 133-138.
- Yirrell, D.L., Reid, H.W., Norval, M., Entrican, G., Miller, H.R.P. (1991b)**  
Response of efferent lymph and popliteal lymph node to epidermal infection of sheep with orf virus. *Vet Immunol. Immunopathol.* 28: 219-235.
- Yuen, L., Moss, B. (1987)**  
Oligonucleotide sequence signalling transcription termination of vaccinia virus early genes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 84: 6417-6421.
- Ziebell, K.L., Steinmann, H., Kretzdorn, D., Schlapp, T., Failing, K., Schmeer, N. (1997)**  
The use of Baypamun N in crowding associated infectious respiratory disease: efficacy of Baypamun N (freeze dried product) in 4-10 month old horses. *Zentbl. Veterinärmed.* 44: 529-536.
- Zinkernagel, R.M. (1996)**  
Immunology taught by viruses. *Science* 271. 173-178.
- Zinkernagel, R.M., LaMarre, A., Ciurea, A., Hunziker, L., Ochsenbein, A.F., McCoy, K.D., Fehr, T., Bachmann, M.F., Kalinke, U., Hengartner, H. (2001)**  
Neutralizing antiviral antibody responses. *Adv. Immunol.* 79: 1-53.
- Zsak, L., Mettenleiter, T.C., Sugg, N., Ben-Porat, T. (1989)**  
Release of Pseudorabiesvirus from infected cells is controlled by several viral functions and is modulated by cellular components. *J. Virol.* 63: 5457-547.
- Zuckermann, F.A., Zsak, L., Sugg, N., Ben-Porat, T. (1989)**  
Early interactions of Pseudorabiesvirus with host cells: functions of glycoprotein gIII. *J. Virol.* 63: 3323-3329.
- Zuckermann, F.A., Zsak, L., Mettenleiter, T.C., Ben-Porat, T. (1990)**  
Pseudorabies virus glycoprotein gIII is a major target antigen for murine and swine virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *J. Virol.* 64: 802-812.
- Zuckermann, F.A., Martin, S., Husmann, R.J., Brandt, J. (1999)**  
Use of interleukin 12 to enhance the cellular immune response of swine to an inactivated herpesvirus vaccine. *Adv. Vet. Med.* 41: 447-461.

## 8 Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
BFAV	Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere
Bluo-Gal	hologeniertes Indolyl- $\beta$ -D-Galactosid
bp	Basenpaare
BPS(V)	Bovine Pustuläre Stomatitis (Virus)
BSE	Probenauftragspuffer
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CD	Cluster of Differentiation
Ci	Curie
CIP	alkalische Phosphatase aus Kalbsthymus
cpe	cytopathogener Effekt
cpm	counts per minute
CTL	cytotoxische T-Lymphozyten
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidin
dCTP	2'-Desoxy-Cytidin-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Gramm bzw. relative Zentrifugalbeschleunigung
GIF	GM-CSF-inhibitorischer Faktor
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating-Factor
h	Stunde
HMFM	Hogness modified freezing medium
H <sub>2</sub> O bidest	doppelt destilliertes Wasser
IAC	Isoamylalkohol-Chloroform
I.E.	Internationale Einheiten
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IR	Internal Repeat
ITR	Inverted Terminal Repeats
kb(p)	Kilobasen(paare)
kDa	Kilodalton
l	Liter

## Verzeichnis der Abkürzungen

---

LB	Luria-Bertoni
LD	letale Dosis
LMT	low melting temperature
m	milli
M	Molaritätseinheit
mcs	multiple cloning site
MEM	Minimal Essential Medium
µg	Mikrogramm
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute
moi	multiplicity of infection (Infektionsdosis)
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
MVA	modified vaccinia virus Ankara
ng	Nanogramm
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
ORF	Offenes Leseraster
ORFV	Orf Virus
OVIFNR	Orf Virus-Interferonresistenzgen
p	Plasmid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglykol
Pen	Penicillin
pfu	plaque forming units
p.i.	post infectionem
PO	Peroxidase
PRV	Pseudorabiesvirus
PPV	Parapoxvirus
PVNZ	Parapockenvirus Neuseeland
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SSC	Standard Saline Citrat
SSPE	Standard Saline-Phosphat-EDTA
Strep	Streptomycin
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEAB	Triethanolamin-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

## Verzeichnis der Abkürzungen

---

Th-Zelle	T-Helferzelle
TK	Thymidinkinase
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
TR	Terminal Repeat
Tris	Trishydroxymethylaminoethan
U	Unit
U <sub>L</sub>	Unique Long
U <sub>S</sub>	Unique Short
UV	Ultraviolett
V	Volt
VACV	Vaccinia Virus
VEGF	vascular endothelial growth factor
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
w/v	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit
ZNS	Zentralnervensystem
%	Prozent

Für die Bezeichnung von Nukleotiden und Aminosäuren wurden die international gebräuchlichen IUB-Einbuchstaben-Codes verwendet.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Timo Fischer
Geburtsdatum	17. Mai 1972
Geburtsort	Mühringen
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig

### Ausbildung

1978-1982	Grundschule Nordstetten
1982-1991	Martin-Gerbert-Gymnasium, Horb a.N.
Juni 1991	Allgemeine Hochschulreife
1991-1992	Chemiestudium an der Universität Konstanz
1992-1998	Biologiestudium an der Universität Konstanz
1997-1998	Diplomarbeit an der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere in Tübingen unter Anleitung von Herrn Dr. H.-J. Rziha und Herrn Prof. Dr. E. Pfaff zum Thema: Untersuchung Pseudorabiesvirus-spezifischer porciner T-Zellen
Februar 1998	Diplom in Biologie
1998	Beschäftigung als wissenschaftliche Hilfskraft an der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere in Tübingen und an der Universität Konstanz.
Februar 1999-Oktober 2002	Dissertation am Institut für Immunologie der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere in Tübingen unter Anleitung von Herrn Dr. H.-J. Rziha und Herrn Prof. Dr. E. Pfaff zum Thema: Parapockenvirus (PPV) als neuartige Vektorvakzine: Entwicklung Pseudorabiesvirus (PRV)-spezifischer PPV-Rekombinanten und Untersuchung deren Immunogenität im Mausmodell.