

Aus dem Institut für Molekularbiologie des Friedrich-Loeffler-Institutes,
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Insel Riems,
und dem
Institut für Geflügelkrankheiten
des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Aviäre Influenzavirus (AIV) Markervakzinen auf Basis des Newcastle Disease Virus (NDV) als Vektor:

**Herstellung, Charakterisierung und Prüfung einer AIV H9
Hämagglutinin (HA)-exprimierenden NDV-Rekombinante
gegen niedrigpathogenes AIV, sowie Prüfung H5 bzw. N1
Neuraminidase-exprimierender NDV-Rekombinanten gegen
hochpathogenes AIV**

INAUGURAL- DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Daniela Deckers
Tierärztin
aus Hamburg

Berlin 2009

Journal-Nr.: 3373

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.- Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Hafez Mohamed Hafez
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. Thomas C. Mettenleiter
Dritter Gutachter: PD Dr. Kerstin Borchers

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

poultry, poultry diseases, avian influenza a viruses, newcastle disease virus,
zoonoses, recombinant vaccines, gene expression, immunization

Tag der Promotion: 13.04.2010

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

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

ISBN: 978-3-86664-794-7

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2009

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Coverbild © malei - Fotolia.com

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© mensch und buch verlag 2010

choriner str. 85 - 10119 berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Für meine Eltern Elke und Winfried, meine Schwester Sylvia und Tim,
die wie ein Fels in der Brandung hinter mir stehen.

Inhaltsverzeichnis

1	<u>Einleitung</u>	1
2	<u>Literaturübersicht</u>	2
2.1	Newcastle Krankheit	2
2.1.1	Aviäre Paramyxoviren (APMV).....	2
2.1.2	Newcastle Disease Virus (NDV).....	7
2.1.3	Das revers-genetische System.....	10
2.2	Aviäre Influenza	12
2.2.1	Aviäre Orthomyxoviren	12
2.2.2	Aviäre Influenzaviren (AIV).....	18
2.3	AIV-Vakzinen	23
2.4	Ziele dieser Arbeit	28
3	<u>Material und Methoden</u>	29
3.1	Material	29
3.1.1	Versuchstiere und Eier	29
3.1.2	Virusstämme, rekombinante Viren.....	29
3.1.3	Zellen.....	30
3.1.4	Bakterien.....	30
3.1.5	Vektoren und rekombinante Plasmide.....	31
3.1.6	Antikörper, Antiseren	31
3.1.7	Medien und Lösungen für die Zellkultur.....	33
3.1.8	Medien und Lösungen für die Bakterienkultur	34
3.1.9	Sonstige Puffer und Lösungen	36
3.1.10	Reagenzien.....	42
3.1.10.1	Nukleinsäuren und Nukleotide.....	42
3.1.10.2	Aminosäuren und Proteine	44
3.1.10.3	Enzyme und deren Puffer	45
3.1.10.4	Kits.....	45
3.1.10.5	Chemikalien	46
3.1.11	Geräte, Laborhilfsmittel.....	49
3.1.12	Verbrauchsmaterial.....	50

3.2	Methoden	51
3.2.1	Zellkultur	51
3.2.1.1	Präparation von Primärzellen aus Hühnerembryonen.....	51
3.2.1.1.1	CEK-Zellen	51
3.2.1.1.2	CEF-Zellen.....	51
3.2.1.2	Vermehrung von permanenten Zelllinien.....	52
3.2.1.2.1	Vermehrung von LMH-Zellen.....	52
3.2.1.2.2	Vermehrung von QM9-Zellen	52
3.2.1.2.3	Vermehrung von BHK-21/BSR/T7/5-Zellen.....	52
3.2.1.3	Transfektion eukaryontischer Zellen.....	52
3.2.1.4	Transfektion zur Generierung rekombinanter ND-Viren	53
3.2.2	Virusvermehrung und -reinigung, -titerbestimmung.....	53
3.2.2.1	Virusvermehrung, Eikultur	53
3.2.2.2	Präparation von Virionen	54
3.2.2.3	Bestimmung des Virusgehaltes	54
3.2.2.3.1	Hämagglutinationstest	54
3.2.2.3.2	Zellkultur-infektiöse Dosis 50 (tissue culture infectious dose 50, TCID ₅₀)	55
3.2.2.3.3	Berechnung der Infektionsdosis für Zellen (MOI)	55
3.2.2.3.4	Ei-infektiöse Dosis 50 (egg infectious dose 50, EID ₅₀)	56
3.2.2.4	Bestimmung des Proteingehaltes	56
3.2.2.5	Wachstumskinetik.....	56
3.2.3	Isolierung von Nukleinsäuren	57
3.2.3.1	Präparation von Gesamtzell-RNA.....	57
3.2.3.2	Präparation von viraler RNA	57
3.2.3.3	Anzucht und Präparation von Plasmid-DNA.....	57
3.2.3.3.1	Anzucht Plasmid-DNA tragender Bakterien.....	57
3.2.3.3.2	Präparation von Plasmid-DNA.....	58
3.2.3.4	Aufreinigung von DNA aus wässrigen Lösungen	58
3.2.3.5	Phenol / Chloroform-Extraktion.....	58
3.2.3.6	Alkohol-Fällung	59
3.2.3.7	Präparative Agarosegelelektrophorese	59
3.2.3.8	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	60
3.2.4	Agarosegelelektrophorese und Membrantransfer von Nukleinsäuren.....	60
3.2.4.1	Neutrale Agarosegele (DNA-Gele)	60

3.2.4.2	Formaldehyd-Gele (RNA-Gele)	60
3.2.4.3	Northern Blot-Analyse.....	61
3.2.5	Northern Blot-Hybridisierung	62
3.2.5.1	<i>in vitro</i> -Synthese radioaktiver cRNA	62
3.2.5.2	Reinigung der Sonden	62
3.2.5.3	Hybridisierung.....	62
3.2.6	Polymerasekettenreaktion (PCR)	63
3.2.7	Sequenzierung.....	65
3.2.8	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	66
3.2.9	Plasmidklonierung	67
3.2.9.1	Klenow-Behandlung.....	67
3.2.9.2	Phosphorylierung von PCR-Produkten.....	67
3.2.9.3	Dephosphorylierung der Vektor-DNA	67
3.2.9.4	Ligation	68
3.2.9.5	Herstellung kompetenter Bakterien	68
3.2.9.6	Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA	68
3.2.10	Auftrennung von Proteinen	69
3.2.10.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	69
3.2.11	Immunologische Nachweismethoden	69
3.2.11.1	Western Blot-Analyse	69
3.2.11.2	Immunfluoreszenztest.....	70
3.2.11.2.1	Infektion und Fixieren der Zellen	70
3.2.11.2.2	Indirekter Immunfluoreszenztest.....	70
3.2.11.3	Radioimmunpräzipitationsanalyse (RIP).....	71
3.2.11.4	Immun-Elektronenmikroskopie	72
3.2.12	Fluorographie.....	72
3.2.13	<i>in vitro</i> -Translation	72
3.2.14	Durchführung der Tierversuche	73
3.2.14.1	Intracerebraler Pathogenitätsindex (ICPI)	73
3.2.14.2	Infektion der Versuchstiere	73
3.2.14.3	Klinische Bewertung der Versuchstiere	73
3.2.14.4	Serologische Untersuchung der Versuchstiere	76
3.2.14.4.1	Hämagglutinations-Hemmungstest.....	76
3.2.14.4.2	ELISA.....	77

3.2.14.5	Gewinnung von Tupferproben und Präparation viraler RNA	77
3.2.14.6	Nachweis viraler RNA mittels real-time RT-PCR.....	77
3.2.14.7	Tötung der Versuchstiere	80
3.2.15	Statistische Auswertung	80
4	<u>Ergebnisse</u>	<u>81</u>
4.1	Klonierung und Charakterisierung des H9 Hämagglutinin ORF des Stammes AIV A/turkey/Wisconsin/1/66 (H9N2)	81
4.2	Generierung und <i>in vitro</i>-Charakterisierung der NDV-H9 Rekombinante ...	86
4.3	<i>in vivo</i>-Charakterisierung der NDV-H9 Rekombinante.....	96
4.3.1	ICPI.....	96
4.3.2	Aufbau des Tierversuches im Huhn und in der Pute	96
4.3.3	Tierversuch im Huhn.....	97
4.3.4	Klinik nach Immunisierung.....	98
4.3.4.1	Untersuchung auf Antikörper gegen AIV	98
4.3.4.2	Untersuchung auf Antikörper gegen NDV	99
4.3.5	Klinik nach Belastungsinfektion mit AIV H9N2	100
4.3.5.1	Nachweis von Antikörpern gegen AIV	101
4.3.5.2	Nachweis der AIV-Virusausscheidung.....	102
4.3.5.3	Pathologische Befunde nach Belastungsinfektion mit AIV	104
4.3.6	Klinik nach Belastungsinfektion mit NDV.....	105
4.3.6.1	Nachweis von Antikörpern gegen NDV	105
4.3.6.2	Nachweis der NDV-Virusausscheidung.....	106
4.3.6.3	Pathologische Befunde nach Belastungsinfektion mit NDV	108
4.3.7	Ergebnisübersicht und Fazit	108
4.3.8	Tierversuch in der Pute.....	111
4.3.9	Klinik nach Immunisierung.....	111
4.3.9.1	Untersuchung auf Antikörper gegen AIV	112
4.3.9.2	Untersuchung auf Antikörper gegen NDV	113
4.3.10	Klinik nach Belastungsinfektion mit AIV H9N2	114
4.3.10.1	Untersuchung auf Antikörper gegen AIV	115
4.3.10.2	Nachweis der AIV-Virusausscheidung.....	116
4.3.10.3	Pathologische Befunde nach Belastungsinfektion mit AIV	118
4.3.11	Klinik nach Belastungsinfektion mit NDV	119
4.3.11.1	Nachweis von Antikörpern gegen NDV	120

4.3.11.2	Nachweis der NDV-Virusausscheidung	120
4.3.11.3	Pathologische Befunde nach Belastungsinfektion mit NDV	122
4.3.12	Ergebnisübersicht und Fazit	122
4.4	AIV-N1 exprimierende NDV-Rekombinante (NDV-N1)	124
4.5	Prüfung der Schutzwirkung der NDV-N1 Rekombinante gegen HPAIV.....	125
4.5.1	Aufbau des Tierversuches	126
4.5.2	Klinik nach Immunisierung.....	126
4.5.2.1	Nachweis von Antikörpern gegen AIV	127
4.5.2.2	Nachweis von Antikörpern gegen NDV	127
4.5.3	Klinik nach Belastungsinfektion mit AIV H5N1	128
4.5.3.1	Untersuchung auf Antikörper gegen AIV	128
4.5.3.2	Nachweis der AIV-Virusausscheidung.....	129
4.5.3.3	Pathologische Befunde.....	129
4.5.4	Ergebnisübersicht und Fazit	130
4.6	AIV H5, AIV H5LP oder AIV H5 und N1 exprimierende NDV-Rekombinanten (NDV-H5, NDV-H5LP und NDV-H5N1)	131
4.7	Prüfung der Schutzwirkung der NDV-H5LP-, der NDV-H5- und der NDV-H5N1 Rekombinante gegen HPAIV	133
4.7.1	Aufbau des Tierversuches im Huhn.....	133
4.7.2	Klinik nach Immunisierung.....	134
4.7.2.1	Nachweis von Antikörpern gegen AIV	135
4.7.2.2	Nachweis von Antikörpern gegen NDV	136
4.7.3	Belastungsinfektion mit HPAIV H5N1 (homolog).....	137
4.7.3.1	Klinik nach Belastungsinfektion	137
4.7.3.2	Nachweis von Antikörpern gegen AIV	138
4.7.3.3	Nachweis der AIV-Virusausscheidung.....	139
4.7.3.4	Pathologische Befunde.....	141
4.7.4	Belastungsinfektion mit HPAIV H5N1 (heterolog)	141
4.7.4.1	Klinik nach Belastungsinfektion	141
4.7.4.2	Nachweis von Antikörpern gegen AIV	142
4.7.4.3	Nachweis der AIV-Virusausscheidung.....	143
4.7.4.4	Pathologische Befunde.....	145
4.7.5	Belastungsinfektion mit HPAIV H5N2 (heterolog)	146
4.7.5.1	Klinik nach Belastungsinfektion	146
4.7.5.2	Nachweis von Antikörpern gegen AIV	147

4.7.5.3	Nachweis der AIV-Virusausscheidung.....	148
4.7.5.4	Pathologische Befunde.....	150
4.7.6	Auswertung (Fazit).....	150
5	<u>Diskussion</u>	<u>154</u>
6	<u>Zusammenfassung</u>	<u>164</u>
7	<u>Summary</u>	<u>166</u>
8	<u>Abbildungsverzeichnis</u>	<u>168</u>
9	<u>Tabellenverzeichnis</u>	<u>171</u>
10	<u>Abkürzungsverzeichnis</u>	<u>172</u>
11	<u>Literaturverzeichnis</u>	<u>175</u>

1 Einleitung

Aviäre Influenza (AI) verursacht, ebenso wie die Newcastle Krankheit (ND), weltweit enorme wirtschaftliche Schäden in Geflügelbeständen. Die Entwicklung von Impfstoffen gegen aviäres Influenzavirus (AIV) stellt eine große Herausforderung dar. Neben den hochpathogenen AIV-Isolaten (HPAIV), die als Auslöser für schwere Ausbrüche in Geflügelbeständen bisher nur unter den Subtypen H5 und H7 identifiziert wurden, existieren weitaus mehr niedrigpathogene AIV-Isolate (LPAIV). Diese sind ubiquitär verbreitet, verursachen im Allgemeinen milde, oft asymptomatische Krankheitsverläufe und breiten sich auf diese Weise nahezu unerkannt aus.

In letzter Zeit sind es Isolate des in Eurasien in Wirtschaftsgeflügel weitverbreiteten Subtypes H9, die erhöhte Aufmerksamkeit fordern: insbesondere H9N2-Isolate werden als Auslöser für zukünftige Influenzapandemien (Li et al. 2003) diskutiert, da die Übertragungsbarriere zwischen Vogel und Mensch durchbrochen wurde und dadurch das Gefahrenpotential für den Menschen massiv erhöht ist (Peiris et al. 1999; Guo et al. 1999; Butt et al. 2005).

Neben hygienischen Maßnahmen und Eradikationsmaßnahmen in infizierten Beständen ist insbesondere bei endemischem Vorkommen des Erregers eine Impfung des Geflügels das Mittel der Wahl, um die Ausbreitung effektiv zu mindern. Die klassischen inaktivierten Vollvirus-Vakzinen vermögen zwar die Tiere effektiv vor den Folgen einer Virusinfektion zu schützen, jedoch wird meist keine sterile Immunität erreicht. Daher wird in den letzten Jahren intensiv an der Entwicklung rekombinanter Impfstoffe gearbeitet, die eine Differenzierung von infizierten und vakzinierten (DIVA) Tieren erlauben. Ein vielversprechender Ansatz scheinen Vektorvakzinen auf Basis des Newcastle Disease Virus (NDV), die potentiell eine kostengünstige und zeitsparende Massenapplikation erlauben. Für H5 bzw. H7 Hämagglutinin-(HA)-exprimierende NDV-Rekombinanten konnte bereits eine effektive Schutzwirkung, nicht nur gegen HPAIV-Infektionen der entsprechenden Subtypen, sondern auch gegen virulentes NDV gezeigt werden (Schröer et al. 2009; Römer-Oberdörfer et al. 2008; Veits et al. 2006). Daher könnten diese Vakzinen zugleich als bivalente Impfstoffe gegen zwei der bedeutendsten Geflügelkrankheiten genutzt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine AIV H9 HA-exprimierende NDV-Rekombinante generiert und die Wirksamkeit eines solchen Impfkonzepes bei der Bekämpfung von LPAIV-Infektionen in den Geflügelspezies Huhn und Pute überprüft. Darüber hinaus wurde im Rahmen dieser Arbeit die Schutzwirkung verschiedener NDV-Rekombinanten, die H5 Hämagglutinin und / oder N1 Neuraminidase aktueller HPAIV-Isolate exprimieren, gegen homologe als auch gegen heterologe HPAIV-Infektionen vom Subtyp H5 untersucht.

2 Literaturübersicht

2.1 Newcastle Krankheit

2.1.1 Aviäre Paramyxoviren (APMV)

Taxonomie

Aviäre Paramyxoviren (APMV) werden der Ordnung *Mononegavirales* zugeordnet. In dieser Ordnung sind einzelsträngige (mono) RNA-Viren zusammengefasst, deren Genome negative (nega) Polarität aufweisen und in Form eines Nukleokapsids vorliegen. Den Viren dieser Ordnung ist weiterhin eine ähnliche Genomstruktur gemeinsam. Die Ordnung der *Mononegavirales* umfasst die Familien *Rhabdoviridae*, *Bornaviridae*, *Filoviridae* und *Paramyxoviridae*. APMV sind in der Familie der *Paramyxoviridae* [para (gr.) neben, bei; myxos (gr.) Schleim], der Subfamilie der *Paramyxovirinae* zugeordnet. Die *Paramyxovirinae* sind in fünf Genera (*Avulavirus*, *Henipavirus*, *Morbillivirus*, *Respirovirus*, *Rubulavirus*) unterteilt. Diese Einteilung basiert auf vier Merkmalen: (1) die Aminosäure-Sequenz-Verwandtschaft homologer Proteine, (2) die Anzahl an Genen (Transkriptionseinheiten), (3) die RNA Produkte des P-Gens und (4) die Hämagglutinin- und / oder Neuraminidase-Aktivitäten des Anheftungsproteins (Samal 2008). Seit April 2001 werden APMV daher in das Genus *Avulavirus* eingeordnet. Weiterhin werden APMV aufgrund von Agglutinationshemmung durch Antikörper in Serotypen eingeteilt (Tumova et al. 1979). Die Erreger der Newcastle Krankheit (Newcastle Disease, ND) werden dem Serotyp APMV-1 zugeordnet (ICTVdB Management 2006). Neben dem APMV-1 sind 8 weitere Serotypen aviärer Paramyxoviren bekannt, deren Vorkommen weitestgehend auf bestimmte Vogelspezies beschränkt sind. Wirtschaftliche Verluste nach Infektionen mit diesen Serotypen treten nur in geringem Umfang auf. Eine Infektion mit APMV-2 (Synonym.: Yucaipa-Virus-Infektion) oder APMV-3 (Syn.: Wisconsin-Virusinfektion) führt zu milder respiratorischer Erkrankung; bei Hühnern und Puten (APMV-2), bzw. bei Puten (APMV-3) (Siegmann und Neumann 2005).

Die Nomenklatur der APMV beinhaltet die Nennung von: Serotyp / Art der Wirtsspezies / geographische Lokalisation / Referenznummer des Isolates / Jahr der Isolierung (Hafez und Jodas 1997).

Genom

Das Genom besteht aus einer nicht-segmentierten einzelsträngigen RNA negativer Polarität. Auf dem modular organisierten Genom sind in 3' → 5' Richtung die Gene in folgender Reihenfolge angeordnet: N – P – M – F – HN – L. Dieser RNA-Strang dient als Matrize für mRNA und als Vorlage für die Synthese eines antigenomischen (+) RNA Stranges.

Assoziiert mit den Proteinen des Nukleokapsids zeigt es den Aufbau einer linksgängigen Helix von 14 bis 18 nm Durchmesser. Das RNA-Genom wird durch die Anlagerung von N-Proteinen vor der Zerstörung durch Nukleasen geschützt. Es besitzt weder eine 5' cap-Struktur, noch ist es am 3'-Ende polyadenyliert. Am 3'- und 5'-Ende des Genoms existieren kurze, extra-cistronische Sequenzen, die „*leader*“- und „*trailer*“-Regionen. Die Länge der *leader*-Region (3'-Ende) beträgt ca. 50 Nukleotide, während die Länge der *trailer*-Region (5'-Ende) zwischen 23 und 161 Nukleotiden variiert. Generell enthalten die ersten 12 Nukleotide des *leaders* und *trailers* komplementäre Sequenzen, die konservierten Promotorsequenzen am Ende von Genom und Antigenom (Mink et al. 1991), welche die Transkription initiieren. Die Gene werden von relativ konservierten Transkriptions-Kontrollsignalen, den virusspezifischen Gen-Start- und Gen-Endsequenzen flankiert, und durch in ihrer Länge und Sequenz variable intergene Regionen getrennt. An diesen intergenen Regionen kommt es mitunter zu Unterbrechungen der Transkription, wobei die Re-Initiation des Transkriptionsvorgangs 3'-terminal erfolgt und einen in Transkriptionsrichtung abfallenden mRNA-Gradienten zur Folge hat. Die Länge des Genoms der Mitglieder der Subfamilie der *Paramyxovirinae* beträgt ein Vielfaches von sechs Nukleotiden (Samal 2008). Das Nukleokapsid besteht aus Nukleoprotein-Untereinheiten, welche grundsätzlich mit 6 Nukleotiden assoziiert sind, wobei die Zuordnung mit dem ersten Nukleotid des 5'-Endes beginnt und am 3'-Ende nur dann exakt mit der Länge des Genoms übereinstimmt, wenn die Genomlänge ein Vielfaches von sechs beträgt (Kolakofsky et al. 1998). Daher wird bei von dieser Regel (engl.: rule of six) abweichender Genomlänge durch die Polymerase die am 3'-Ende beginnende Synthese nicht optimal eingeleitet, mit der Folge einer ineffizienten Replikation (Lamb und Parks 2006).

Eine spezielle, die RNA-Polymerase zum Pausieren bzw. Stottern anregende Nukleotidfolge im P-Gen, die „RNA editing site“, führt zu ko-transkriptionaler Integration von ein oder zwei zusätzlichen Guanosinresten (G) in die entstehenden mRNAs, so dass alternative offene Leseraster (ORF) entstehen, die das V-Protein (+1 G) und das W-Protein (+2 G) kodieren. Ein internes Start-Signal im P-Gen initiiert vermutlich die Transkription einer mRNA, die für das X-Protein kodiert (McGinnes et al. 1988; Steward et al. 1993).

Morphologie

APMV sind behüllte Viren, die sich elektronenmikroskopisch sphärisch, pleomorph oder filamentös darstellen und Durchmesser von 120 bis 350 nm aufweisen. Die virale Hüllmembran besteht aus einer Lipid-Doppelschicht, die sich von der Plasmamembran der Wirtszelle ableitet. Auf der Virusoberfläche erkennt man elektronenmikroskopisch als Spikes, die zwei in die Membran eingelagerten Oberflächenglykoproteine Fusions-Protein (F) und Hämagglutinin-Neuraminidase-Protein (HN). Sie ragen ca. 8 bis 12 nm aus der Oberfläche

heraus, auf der sie ungleichmäßig verteilt sind. Das Matrixprotein (M) kleidet von innen die Lipid-Doppelmembran aus und interagiert mit dem Nukleokapsid, dessen Hauptbestandteil das Nukleokapsidprotein (N) ist, das sich elektronenmikroskopisch als fischgrätenförmige Struktur darstellt.

Proteine

Das **Fusionsprotein (F)** ist ein Typ I-Membranprotein (Samson et al. 1980) und liegt als Homotrimer (Reitter et al. 1995; Russell et al. 1994) vor. Es ist glykosyliert und palmitoyliert (Chatis und Morrison 1982). Die am Carboxy-Terminus (C-Terminus) der F₂-Untereinheit gelegene Spaltstelle von F₀ stellt den zurzeit wichtigsten Parameter für Infektiosität und Virulenz des ND-Virus dar (Collins et al. 1993; Kommers et al. 2003; Römer-Oberdörfer et al. 2003) und befindet sich nach einem Abschnitt basischer Aminosäuren zwischen Position 116 und 117 (Rott und Klenk 1988). Die Aminosäure-Sequenz an der Spaltstelle kann einzelne oder mehrere basische Aminosäuren umfassen. Aus dem Vorläuferprotein F₀ gehen durch proteolytische Spaltung an dieser Stelle die heterodimeren Untereinheiten F₁ und F₂ hervor, die über eine Disulfidbrücke kovalent miteinander verbunden sind. In Anwesenheit des minimalen Furin-Motivs (R-X-K/R-R), findet bereits intrazellulär die aktivierende Spaltung statt. Das im *trans* Golgi Apparat lokalisierte Furin, eine Subtilisin-ähnliche Endoprotease, spaltet das F₀-Protein beim Transport zur Plasmamembran (Klenk und Garten 1994). Daraus resultiert, dass diese Nachkommenviren die Zelle bereits mit aktiviertem F-Protein verlassen, jede beliebige Zelle infizieren können und dadurch systemische Infektionen des befallenen Wirtes verursachen (Nagai und Klenk 1977). Viren, die nur eine basische Aminosäure an der Spaltstelle aufweisen, werden nicht intrazellulär aktiviert. Extrazelluläre Proteasen mit entsprechender Substratspezifität wurden in der Allantois-Flüssigkeit embryonierter Hühnereier (Gotoh et al. 1990; Gotoh et al. 1992), sowie in den Clara-Zellen des Bronchial-Epithels verschiedener Spezies gefunden. Daher verursachen diese Viren nur lokale Infektionen. Die amino-terminal (N-terminal) gelegenen 25 Aminosäuren der F₁-Untereinheit bilden einen sehr hydrophoben Bereich, der unter den *Paramyxovirinae* hoch konserviert ist (Chambers et al. 1986). Dieser fungiert nach einer Konformationsänderung als Fusionspeptid und vermittelt die Membranfusion bei neutralem pH-Wert (Richardson et al. 1980). Mit der Transmembrandomäne im C-terminalen Bereich ist die F₁-Untereinheit in der Membran verankert.

Das **Hämagglutinin-Neuraminidase-Protein (HN)** ist ein glykosyliertes Typ II-Membranprotein, das als Tetramer vorliegt, wobei die Monomere über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Pitt et al. 2000). Der strukturelle Aufbau aus einem Stiel und einem globulären, sechsfaltigen β -Propeller weist hohe Analogie zur Neuraminidase der Influenzaviren auf. Nahe dem N-Terminus befindet sich eine hydrophobe Domäne, die

sowohl als Signal- als auch als Transmembrandomäne dient. Das HN-Protein vermittelt die Virusanheftung über Sialinsäure-Rezeptoren an der Wirtszelloberfläche. Die Neuraminidase-Aktivität des HN-Proteins bewirkt die Abspaltung von Sialinsäure-Resten sowohl auf der Oberfläche der Wirtszelle, als auch von glykosylierten Oberflächenproteinen der Nachkommenvirionen, wodurch sie nach der Knospung vor Selbst-Aggregation geschützt sind. Zur Serotypisierung und in der Diagnostik werden die hämagglutinierenden Eigenschaften dieses Proteins genutzt.

Das **Matrixprotein (M)** ist ein phosphoryliertes, hydrophobes Strukturprotein. Es bindet an die Innenseite der Lipid-Doppelmembran und interagiert mit dem C-terminalen Ende des F-Proteins und dem N-terminalen Ende des HN-Proteins. Zudem wird dem M-Protein eine Bedeutung beim „budding“ zugesprochen. Die Assoziation zwischen Nukleoproteinkomplex und M-Protein wird als Ursache für die Knospung (engl.: budding) der Nachkommenvirionen angenommen (Peeples 1991).

Das **Nukleokapsidprotein (N)** übernimmt in der Virusreplikation mehrere Funktionen. Es verpackt die RNA in ein RNase-widerstandsfähiges Nukleokapsid und interagiert während der Transkription und Replikation mit dem P-Protein und der RNA-Polymerase (Peeples und Bratt 1982). Im Prozess des Viruszusammenbaus (engl.: assembly) interagiert es mit dem M-Protein. Als wichtiger Kontrollfaktor für die Transkription und Replikation des Genoms dient die intrazelluläre Konzentration an freiem N-Protein (Lamb und Parks 2006). Die Domänen für RNA-Bindung und die Nukleokapsid-Assoziation sind in den N-Proteinen verschiedener Paramyxoviren hoch konserviert und befinden sich im N-Terminus des Proteins (Mountcastle et al. 1970).

Das phosphorylierte **Phosphoprotein (P)** vermittelt die Bindung der RNA-Polymerase an den Nukleoproteinkomplex. Die Bindungsbereiche für die RNA-Polymerase und den Komplex aus RNA und N-Protein befinden sich am C-terminalen Ende des Proteins. Innerhalb der NDV-Stämme ist die Struktur der funktionalen C-terminalen Domänen des P-Proteins konserviert (Locke et al. 2000). Mutationen des P-Proteins können attenuierend wirken (Madansky und Bratt 1981). In NDV-infizierten Zellen sind weitere P-Gen Produkte, die durch mRNA-Editierung entstehen, nachweisbar (Chambers und Samson 1982). Durch Insertion eines Guanodin-Nukleotids entsteht ein alternativer ORF, der für das V-Protein kodiert. Das V-Protein wird als ein Virulenzfaktor (Interferon- α -(IFN- α)-Antagonist) angesehen (Huang et al. 2003b) und scheint eine wichtige Rolle in der Virusvermehrung zu spielen (Mebatsion et al. 2003). Bei Insertion zweier Guanodin-Nukleotide resultieren zwei Transkripte, die für das W-Protein kodieren; ein Nichtstrukturprotein über dessen Funktion bislang wenig bekannt ist.

Auf Grund des für Paramyxoviren beschriebenen Transkriptionsgradienten wird das **Large-Protein (L)**, dessen Gen am 5'-Ende des Genoms liegt, am geringsten transkribiert. Es ist

das größte Strukturprotein und verfügt über die enzymatische Aktivität einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase (Modrow und Falke 2003). Im L-Protein finden sich in den Bereichen mit Polymerasefunktion hohe Homologien zu Polymerasen anderer Virusfamilien (Yusoff et al. 1987; Poch et al. 1990). Aktive Zentren der Polymerasefunktion finden sich in den N-terminalen und mittleren Bereichen. Zu den weiteren enzymatischen Funktionen gehören die Guanyl- und Methyltransferase-Aktivität.

Infektion und Replikation

Für die spezifische Adsorption der Viruspartikel an die Zelloberfläche ist das Oberflächenprotein HN verantwortlich, das nach Bindung an die Wirtszelle eine Konformationsänderung des F-Proteins bewirkt. Das F-Protein induziert nach der Adsorption die Fusion der viralen mit der Plasmamembran. Hierbei interagiert das stark hydrophobe N-terminale Ende des F₁-Proteins mit der Wirtszellmembran. Es bleibt dabei über sein C-terminales Ende mit der Virusmembran assoziiert. Dadurch kommt es zu einer starken Annäherung der beiden Membranen. Sie verschmelzen und das Nukleokapsid gelangt in das Zellinnere (Flint et al. 2009). Im Zytoplasma, wo auch die Replikation stattfindet, löst sich das Nukleokapsid vom M-Protein. Zunächst wird mRNA transkribiert, wobei die Startsequenzen die Transkription initiieren und das Capping der mRNA durch die RNA-abhängige RNA-Polymerase erfolgt. Durch die Gen-Endsequenzen wird die mRNA durch wiederholtes Kopieren von bis zu sieben Uridin-Basen polyadenyliert, anschließend freigesetzt und die viralen Proteine translatiert. Sobald ein bestimmter Schwellenwert nicht-assemblierter N-Proteine vorhanden ist, ignoriert die mit dem Nukleokapsid assoziierte RNA-abhängige RNA-Polymerase sämtliche internen Stoppsignale und bildet den vollständigen, komplementären Antigenom-Strang. Dabei läuft die Synthese viraler RNA und die Verpackung des entstehenden Antigenoms parallel ab. Das naszierende Genom wird, wie auch das Antigenom, sofort an N-Proteine gebunden. Das HN-Protein besitzt eine hydrophobe Sequenzfolge von 25-30 Aminosäuren in Nachbarschaft des N-Terminus. Diese wirkt als Signal für den Transport des Translationskomplexes zur Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) und erlaubt das Durchschleusen der Proteinkette in das Lumen. Das Vorläuferprotein F₀ besitzt ebenfalls ein typisches Signalpeptid für den Transport des Translationskomplexes zur Membran des ER am N-terminalen Ende. Nach Reifung (Glykosylierung) und Faltung im ER werden die viralen Glykoproteine auf dem sekretorischen Weg an die Zelloberfläche transportiert (Doms et al. 1993; Helenius 1994). Die Knospung findet in den polarisierten Epithelzellen grundsätzlich an der apikalen Seite statt. Die M-Proteine lagern sich an der Innenseite der Plasmamembran an, wo sie mit den intra-zytoplasmatischen Anteilen der F- und HN-Proteine interagieren. Die Knospung der Virionen wird Actin-vermittelt durch Interaktion zwischen den vorliegenden RNP-Komplexen,

den Matrixproteinen und den Oberflächenproteinen ausgelöst (Giuffre et al. 1982). Die Neuraminidase-Aktivität des HN-Proteins ermöglicht die Freisetzung der Virionen von der Sialinsäure-haltigen Zelloberfläche.

2.1.2 Newcastle Disease Virus (NDV)

Geschichte

Das Virus der Newcastle Krankheit (Syn.: Newcastle Disease (ND), Atypische Geflügelpest, Asiatische Geflügelpest, Pseudo-Geflügelpest, Pseudo-Vogelpest, Doyle'sche Krankheit, Pneumoenzephalitis, Ranikhet-Disease) wurde bereits 1926 als filtrierbares Agens und somit als viraler Erreger identifiziert (Doyle 1927). Im Jahre 1946 wurde über die Isolierung des Newcastle Disease Virus (NDV) aus Puten mit respiratorischen Symptomen in den USA berichtet (Hafez und Jodas 1997). Auf Grund der großen Ähnlichkeit klinischer Symptome bei Infektionen mit virulentem NDV im Vergleich zu Infektionen mit hochpathogenen aviären Influenzaviren, gelang die Differenzierung beider Viren als separate Krankheitserreger erst im Jahre 1949 durch Schäfer, Schramm und Traub (Rolle und Mayr 2002). Auch heute noch ist die ND weltweit eine große Bedrohung für die Geflügelwirtschaft durch hohe Letalität, sowie Produktions- und Mastausfälle. Durch energische Bekämpfungsmaßnahmen (Impfpflicht, Eradikationsprogramme) sind in Deutschland seit 1996 keine bedeutenden Ausbrüche mehr aufgetreten.

Ätiologie

NDV infiziert ein breites Wirtsspektrum. 241 Vogelspezies aus 27 Ordnungen sind natürlich oder experimentell infizierbar (Seal et al. 2000); vermutlich sind alle Vogelspezies potentiell empfänglich (Alexander 1995). Das Virus wurde auch bei Säugern, Amphibien, Reptilien und einigen Insekten nachgewiesen (Siegmann und Neumann 2005). Auch der Mensch ist empfänglich. Humane Infektionen äußern sich meist in transienten Konjunktivitiden. Eine Übertragung von Mensch zu Mensch wurde bislang nicht beschrieben, jedoch ist eine Übertragung vom Menschen auf Tiere und umgekehrt nicht auszuschließen, daher zählt NDV zu den Zoonose-Erregern. Als Virusreservoir werden Wildvogelspezies und auch wilde Wasservögel angenommen (Lindh et al. 2008). Das Virus wird vor allem mit dem Kot ausgeschieden, die Sekrete von Nase, Rachen und Augen spielen bei der Verbreitung innerhalb der Herde eine Rolle. Die vertikale Übertragung ist möglich und mit velogenem Virus infizierte Bruteier sterben noch während der Bebrütung ab. In Abhängigkeit von äußeren Faktoren kann die Tenazität des Virus erheblich variieren. In feuchtem Milieu (z.B. Kot) und bei niedrigen Temperaturen ist die Tenazität hoch, so dass der aerogen-oralen

Übertragung mittels belebter und unbelebter Vektoren eine besondere Bedeutung bei der Verbreitung des Virus zukommt.

Pathotypen

APMV sind pathogene Erreger, unterscheiden sich jedoch in ihrer Virulenz. Die Virulenz von APMV-1 Isolaten wird mittels des intrazerebralen Pathogenitäts-Testes (ICPI) bestimmt (OIE 2009d). Die Beschreibung des Tests befindet sich in Kapitel 3.2.14.1. APMV-1 Isolate mit einem ICPI $< 0,7$ sind avirulent bis schwach virulent und werden als lentogen bezeichnet. Die mittelgradig virulenten Isolate (mesogen) erreichen einen ICPI Wert von $0,7$ bis $1,5$, während die hochvirulenten (velogenen) Stämme einen Wert von $> 1,5$ aufweisen (Hafez und Jodas 1997; Siegmann und Neumann 2005). Die velogenen Stämme können auf Grund ihres Organotropismus weiterhin in viszerotrope und neurotrope Stämme unterteilt werden. Die Ermittlung der Virulenz der Erreger erfolgt im Huhn und kann nicht ohne weiteres auf andere Vogelspezies übertragen werden.

Pathogenese, Klinik und Pathologie

Das Krankheitsbild variiert und ist unter anderem abhängig von der Erregervirulenz, sowie dem Immunstatus des Wirtsorganismus; entscheidend ist auch die Empfänglichkeit der Spezies (abnehmend von Huhn und Pute zu Taube und Wassergeflügel). Die Inkubationszeit für Infektionen mit velogenen und mesogenen Stämmen liegt zwischen 4 und 7 Tagen, bei Infektion mit lentogenen Stämmen kann sie bis zu 25 Tagen betragen. Je nach Virulenz des Erregers treten Verlaufsformen in Huhn und Pute von asymptomatisch bis perakut auf. Lentogene Stämme rufen überwiegend asymptomatische bis milde Erkrankungen hervor, die durch respiratorische Symptome, Störungen des Allgemeinbefindens und Diarrhöen gekennzeichnet sind und meist ohne weitere Folgeschäden abheilen. Der durch mesogene Stämme verursachte akute Verlauf geht auf Grund einer virämisch verlaufenden Allgemeinerkrankung aller Altersgruppen mit Legeleistungsabfall bzw. Retardierung der Wachstumsphase bei Masttieren, einer raschen Herdendurchseuchung, und z.T. hoher Mortalität einher. Protrahierte Verläufe mit mesogenen oder velogenen Stämmen sind für teilimmune Herden beschrieben, die einen langsamen Legeleistungsabfall und zentralnervöse Störungen bzw. nur einen Rückgang der Legetätigkeit zeigen (Siegmann und Neumann 2005). Bei einer Infektion mit velogenen Stämmen treten neben schweren akuten Krankheitsverläufen mit hoher Morbidität und Mortalität ($> 90\%$), auch perakute Formen auf, die zum plötzlichen schnellen Tod von Hühnern und Puten ohne sichtbare klinische Erkrankungen führen. Das klinische Bild velogener viscerotroper Stämme ist zumeist mit schweren intestinalen Störungen (grünlich-gelbliche Diarrhö) verbunden und geht mit deutlichen Störungen des Allgemeinbefindens (Mattigkeit, verminderte Futter- und

Wasseraufnahme) einher. Eine Infektion mit velogenen neurotrophen Virusstämmen hat hingegen in erster Linie akute respiratorische Symptome (Dyspnoe, Rhinitis, Atemgeräusche), sowie zentralnervöse Ausfälle zur Folge, die sich in Opisthotonus, Torticollis, Myoklonien, Tremor, Ataxie und Parese der Flügel oder Ständer äußern (Wakamatsu et al. 2006). Ursächlich für häufig auftretende Dyspnoe ist eine Lungenstauung in Folge einer Kreislaufstörung oder auch Schäden des Atemzentrums auf Grund einer Enzephalitis. Erkrankte Fasane zeigen vorwiegend zentralnervöse Erscheinungen, während Jungtauben, Enten und Gänse diese nur gelegentlich aufweisen (Aldous und Alexander 2008; Jorgensen et al. 1999).

Die Tiere nehmen den Erreger über die Schleimhäute des oberen Respirations- und Verdauungstraktes auf. Anschließend gelangt das Virus in die Blutbahn, ist dort bis zu 48 Stunden nach der Infektion nachweisbar und gelangt so in die Retikulumzellen der Milz und in das Gefäßendothel. Hier schließt sich eine weitere Vermehrung an, die von einer zweiten Virämie gefolgt ist. Dabei wird das an Erythrozyten gebundene Virus in alle Organe gestreut, wobei Darm, Lunge und das ZNS die bevorzugten Manifestationsorgane darstellen (Alexander und Gough 2003).

Der Sektionsbefund ist bei perakutem Verlauf oft unauffällig. Bei Infektion mit velogenen Virusstämmen kommt es zu großflächigen Nekrosen des lymphoiden Gewebes in der Milz und im Gastrointestinaltrakt (Brown et al. 1999b). Auf Grund der massiven Diarrhö ist eine allgemeine Dehydratation ein häufiger Befund, neben Leber-, Milz- und Nierenhyperplasie. Schwere hämorrhagische Veränderungen sind insbesondere in den Schleimhäuten von Proventriculus, Dünndarm und Zäkum, jedoch auch auf Serosen und Fettgewebe zu finden. Bei protrahierteren Krankheitsverläufen sind die häufigsten pathologischen Veränderungen hämorrhagische Veränderungen der Schleimhäute des Respirations- und Gastrointestinaltraktes. Weiterhin kommt es in einigen Fällen zu Nekrosen der lymphoiden Gewebe in Milz, Darm und der Zäkaltonsillen (Brown et al. 1999a; Brown et al. 1999c). Eine sichere Diagnose der ND in Wirtschaftsgeflügel kann nur durch Erregerisolierung und -typisierung gestellt werden. Dafür eignen sich Proben von Tracheal- und Kloakaltupfern, sowie Organmaterial (Darminhalt, Gehirn, Leber, Lunge, Milz) frisch verendeter Tiere.

Definition und rechtliche Grundlagen

Da es sich bei der ND um eine hoch kontagiöse Infektionserkrankung des Nutzgeflügels handelt, bestehen weltweit in nahezu allen Ländern staatlich angeordnete Maßnahmen zur Bekämpfung. Das Internationale Tierseuchenamt (OIE; World Organisation for Animal Health) weist die ND als anzeigepflichtige Seuche aus. Danach ist die ND definiert als „eine Infektion des Geflügels verursacht durch ein Virus des Aviären Paramyxovirus Serotyps I (APMV-1), welches eines der folgenden Virulenzkriterien erfüllt: das Virus weist einen

intrazerebralen Pathogenitätsindex (ICPI) in Eintagsküken von $\geq 0,7$ auf oder es werden multiple basische Aminosäuren im Virus (entweder direkt [aus Einsendungsmaterial] (Gohm et al. 2000) oder durch Sequenzanalyse) am C-Terminus des F₂-Proteins ermittelt und Phenylalanin an Position 117, die den N-Terminus des F₁-Proteins darstellt. Der Ausdruck multiple basische Aminosäuren bezieht sich auf mindestens 3 Arginin- oder Lysin-Reste zwischen den Positionen 113 und 116. Können die oben beschriebenen, charakteristischen Aminosäure-Sequenzen nicht nachgewiesen werden, besteht die Notwendigkeit der Charakterisierung des isolierten Virus im ICPI-Test. In dieser Definition sind die Aminosäure-Positionen ausgehend vom N-Terminus der Aminosäure-Sequenz abgeleitet von der Nukleotidsequenz des F₀-Gens, die Positionen 113 bis 116 korrespondieren mit den Positionen -4 bis -1 ausgehend von der Spaltstelle“ (OIE 2009c).

Basierend auf der Richtlinie 92/66 des Rates (ANON 1992) sind Vorschriften für die EU-weite Bekämpfung der ND festgelegt. In Deutschland regelt das Tierseuchengesetz (ANON 2007) in Kombination mit der Verordnung zum Schutz gegen die Geflügelpest und die Newcastle Krankheit (ANON 2005) die Bekämpfungs- und Vorsorgemaßnahmen bei der nationalen Umsetzung der EU Richtlinie 92/66, die Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen (ANON 2009c) regelt die nationale Anzeigepflicht. Als Vorsorgemaßnahme ist eine prophylaktische Schutzimpfung für Hühner und Puten, unabhängig von der Bestandsgröße, vorgeschrieben. In Deutschland finden die Impfstämme Hitchner B1, La Sota, Ulster und Clone 30 als Inaktivat- und Lebendimpfstoffe Anwendung, da diese bei geringer Virulenz hohe immunogene Eigenschaften aufweisen (Kaleta 1992). Während Inaktivat-Impfstoffe individuell appliziert werden müssen, sind Lebendimpfstoffe einfach zu applizieren (Spray, Trinkwasser, Augentropfen), werden ausgeschieden und sorgen somit für eine Durchseuchung des gesamten Bestandes. In Hühnern wird nach 2- bis 3-maliger Lebendvakzinierung die Verwendung inaktivierter Impfstoffe zur Induktion hoher und lang anhaltender Antikörper-Titer empfohlen. In Puten ist die Induktion einer humoralen Immunantwort nicht so ausgeprägt wie in Hühnern (Higgins 1996). Die Wahl der Applikationsart hängt von der Größe des Bestandes und der Seuchensituation ab. Impftechnik, Impfprogramme und Sicherheitsvorschriften sind im Bundesmaßnahmenkatalog-Tierseuchen ausführlich beschrieben (Hafez und Jodas 1997).

2.1.3 Das revers-genetische System

Reverse Genetik beschreibt die *de novo*-Synthese eines RNA-Genoms an klonierter cDNA. Diese Technik macht es möglich, auch Negativstrang RNA-Viren durch genetische Manipulation auf DNA Ebene mit etablierten Hilfsmitteln (Restriktionsenzyme, Polymerasen, Ligasen, Kinasen) zu verändern. Damit wird die detaillierte Analyse von z.B. Virusreplikation

oder der Rolle der Virusproteine bei Virus-Wirt-Interaktionen und der Pathogenität möglich. Auch der Austausch von Genen bzw. die Insertion von Fremdgenen wird möglich, so dass diese Viren für die potentielle Nutzung als Vektor zugänglich sind.

Seit 1994 die erste Generation von Negativstrang RNA-Viren vollständig aus cDNA generiert wurde (Conzelmann 2004), ist das revers-genetische System für viele Mitglieder der Familien *Rhabdo*-, *Paramyxo*- und *Filoviridae* etabliert worden. Die Entdeckung der Bedeutung des RNP-Komplexes als kleinster infektiöser Einheit (Lamb und Parks 2006; Conzelmann 2004; Hamaguchi et al. 1985; Hamaguchi et al. 1983; Szilagyi und Uryvayev 1973) der Ordnung der *Mononegavirales* brachte den entscheidenden Fortschritt.

Die revers-genetischen Systeme der nicht-segmentierten negativ strängigen RNA-Viren (nonsegmented negative-strand viruses; NNSV) entwickelten sich ausgehend von Replikon-Systemen, deren Grundlage ein Plasmid ist. In diesen Plasmiden ist die virale Erbinformation von Transkriptionssteuerungselementen (z.B. T7-Promotor und -Terminator) flankiert, was die Transkription von cRNA durch den Einsatz einer entsprechenden DNA-abhängigen RNA-Polymerase erlaubt (Conzelmann und Meyers 1996; Palese 1998). Die Replikon-Systeme enthielten ein synthetisches Genomäquivalent, das von viralen regulativen „*leader*“- und „*trailer*“- Sequenzen flankiert war (Mebatsion et al. 1996; Schnell et al. 1996). Die Insertion von drei Guanosin-Resten zwischen Promotor und erstem Nukleotid der viralen Sequenz soll die Transkriptionsrate erhöhen (Pattnaik und Wertz 1990; Pattnaik et al. 1992; Conzelmann 2004). Wurden die mit homologem Virus (als Helfer-Virus) infizierten Zellen transfiziert, komplementierte das Helfer-Virus die Komponenten des RNP-Komplexes und Virus-ähnliche Partikel (VLP, virus-like particles) konnten erzeugt werden. Das Zwei-Schritt-Verfahren von Transkription der cRNA im Reagenzglas und anschließender Transfektion in mit Helfervirus infizierten Zellen wurde weiterentwickelt. Bei Ko-Infektion von Zellen mit T7-Polymerase exprimierendem Vaccinia Virus (vTF7-3) und Helfervirus, sowie Transfektion dieser Zellen mit einem Plasmid, dessen Ziel-Gen entsprechend flankiert war, wurde die Expression des Zielproteins ermöglicht (Fürst et al. 1986). Anschließend wurden Helfervirus-freie Systeme etabliert, wobei Hilfsplasmide (Expressionsplasmide) für die Komponenten des RNP-Komplexes ko-transfiziert wurden. Deren Gene stehen unter der Kontrolle des T7-RNA-Polymerase-Promotors. Die Herstellung infektiöser Partikel ausschließlich aus Plasmiden gelang durch den Einsatz der Hepatitis-Delta-Virus-(HDV)-Ribozymsequenz (Perrotta und Been 1990), die durch autokatalytische Spaltung das korrekte Ende der transkribierten RNA generiert. Es handelt sich dabei um eine Ribozymsequenz des Antigenoms von HDV, die den Vorteil aufweist, dass nur hinter der Spaltstelle gelegene Sequenzen für die autokatalytische Spaltung benötigt werden (Shih und Been 2002). Mit einem klonierten viralen Gesamtgenom gelang es 1994 erstmalig, infektiöses Tollwut-Virus zu generieren (Schnell et al. 1994). Ein Nachteil der Infektion von Zellen mit T7-Polymerase

exprimierendem Virus und Transfektion (mit full-length Plasmid und Hilfsplasmiden) ist die Möglichkeit der homologen DNA-Rekombination zwischen dem full-length Plasmid und den Hilfsplasmiden, die für die Komponenten des RNP-Komplexes kodieren. Ein weiterer Fortschritt war daher die Entwicklung stabil T7-Polymerase-exprimierender Zellen (Buchholz et al. 1999).

Für NDV sind bisher fünf revers-genetische Systeme beschrieben, die auf den lentogenen Stämmen Clone 30 (Römer-Oberdörfer et al. 1999), La Sota (Peeters et al. 1999; Huang et al. 2003a), Hitchner B1 (Nakaya et al. 2001) und dem mesogenen Stamm Beaudette C (Krishnamurthy et al. 2000) basieren.

2.2 Aviäre Influenza

2.2.1 Aviäre Orthomyxoviren

Taxonomie

Die Inflenzaviren gehören zur Familie der *Orthomyxoviridae* [orthos (gr.) gerade, richtig und myxos (gr.) Schleim], die sich in die Genera *Influenza Virus A, B* und *C*, sowie *Thogoto-* und *Isavirus* (Lamb 2008) unterteilen.

Die Einteilung der Genera erfolgt auf Grund der Verwandtschaft der Gruppenantigene (Nukleokapsid und Matrixprotein) (Horimoto und Kawaoka 2005), wobei die aviären Orthomyxoviren ausschließlich den Influenza A Viren zuzuordnen sind (Alexander 1995). An Hand der serologischen Verwandtschaft der Oberflächenproteine Hämagglutinin und Neuraminidase werden Influenza A Viren in Subtypen unterteilt. Derzeit sind 16 Hämagglutinin Subtypen (H1 – H16) und 9 Neuraminidase Subtypen (N1 – N9) bekannt (Fouchier et al. 2005; Lamb 2008). Für die Bezeichnung eines Inflenzavirus-Stammes hat die WHO-Fachkommission definiert, dass folgende Angaben in der genannten Reihenfolge zu verwenden sind: Antigentyp (A, B oder C) / Wirtsspezies / geographische Lokalisation / Referenznummer des Stammes / Jahr der Isolierung (Hämagglutinin- und Neuraminidase-Subtyp) (WHO 1980).

Genom

Das Genom der Inflenzaviren besteht aus segmentierter, einzelsträngiger RNA negativer Polarität. Influenza A Viren besitzen 8 Segmente, die für 11 Proteine (Struktur- und Nichtstrukturproteine) kodieren. Ein helikal-symmetrisches Nukleokapsid umschließt jedes der 8 Segmente, die an ihrem 3'-Ende mit Polymeraseprotein-Komplexen assoziiert sind. Kurze, zueinander komplementäre Bereiche der 3'- und 5'-Enden der RNA jedes Segments bilden Doppelstränge aus, die den RNA-Molekülen eine quasi-zirkuläre, pfannenstielähnliche Form verleihen. Diese Bereiche stellen Signalsequenzen für die Initiation der Transkription

und RNA-Replikation dar (Modrow und Falke 2003). Das Genom ist weder 3'-polyadenyliert noch trägt es an seinem 5'-Ende eine cap-Struktur.

Die Nummerierung der Segmente entspricht ihrer Größe in absteigender Reihenfolge. In der folgenden Tabelle sind die Proteine den für sie kodierenden Segmenten zugeordnet.

Segment	Protein
1	basisches Polymeraseprotein 2 (PB2)
2	basisches Polymeraseprotein 1 (PB1)
3	saures Polymeraseprotein (PA)
4	Hämagglutinin (HA)
5	Nukleoprotein (NP)
6	Neuraminidase (NA)
7	Matrixprotein (M1; M2)
8	Nichtstrukturprotein 1 und Nichtstrukturprotein 2 (NS1; NS2)

Ein zusätzliches Protein mit proapoptotischer Aktivität (PB1- F₂) entsteht durch Translation eines alternativen ORFs des Segmentes 2. Durch alternatives „splicing“ der mRNA der Segmente 7 bzw. 8 kodiert das Segment 7 die Matrixproteine 1 (M1) und 2 (M2) und das Segment 8 die Nichtstrukturproteine 1 (NS1) und 2 (NS2 oder nuclear export protein, NEP).

Morphologie

Influenzaviren sind behüllte Viren mit einem Durchmesser von 80-120 nm. Das Viruspartikel stellt sich elektronenmikroskopisch sphärisch oder pleomorph dar, wobei an der Oberfläche ca. 1.000 spikeartige Gebilde zu erkennen sind (Potter 2004; Swayne und Halvorson 2003). Als sogenannte Spikes stellen sich die Oberflächenproteine Hämagglutinin (HA oder H) und Neuraminidase (NA oder N) dar, wobei sich das Hämagglutinin durch ein stabförmiges Aussehen von der pilzförmigen Gestalt der Neuraminidase unterscheidet (Wright et al. 2006). Beide Oberflächenproteine sind mit ihrem hydrophoben Ende in der Lipid-Doppelmembran verankert, welche von der Wirtszellmembran stammt. Das Mengenverhältnis von Hämagglutinin- zu Neuraminidase-Proteinen auf der Virusoberfläche beträgt ca. 4-5 zu 1. Weiterhin ist in der Virushülle das M2-Protein verankert und unter der Lipid-Doppelmembran befindet sich das Matrixprotein M1. Innerhalb des Viruspartikels ist jedes RNA-Segment von einem eigenen Nukleokapsid aus N- und Polymeraseprotein-Komplex umgeben und als dünne, das Virus unterteilende Strukturen elektronenmikroskopisch erkennbar (Lamb 2008). Der RNP-Komplex besteht aus dem Nukleoprotein (N), dem Polymeraseprotein-Komplex und der RNA (Modrow und Falke 2003).

Proteine

Das **Hämagglutinin (HA)** ist ein glykosyliertes und palmitoyliertes Typ-I-Membran-Protein, das aus drei identischen Untereinheiten gebildet wird. Auf jedem Viruspartikel sind ca. 1.000 dieser stabförmigen Moleküle vorhanden (Potter 2004).

Zur Erlangung der Infektiosität muss das Vorläuferprotein HA₀ proteolytisch in die Untereinheiten HA₁ und HA₂ gespalten werden. Am N-terminalen Ende des Vorläuferproteins HA₀ befindet sich ein Signalpeptid, das im ER abgespalten wird. An dieses schließt sich die HA₁-Untereinheit, die Spaltstelle und die HA₂-Untereinheit an; letztere beginnt mit dem Fusionspeptid. Nach Synthese am rauen ER lagern sich während des Transports durch den Golgi-Apparat jeweils 3 HA₀ Proteine zusammen, erhalten bis zu 7 Zuckergruppen (Glykosylierung) und 3 Palmitinsäure-Reste (Palmitoylierung) und gelangen über die Golgi-Vesikel zur Zelloberfläche. Nach der Spaltung bleiben die beiden Untereinheiten HA₁ und HA₂ über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden, wobei die HA₂-Untereinheit einen Stiel ausbildet, dessen C-terminales Ende, die Transmembranregion, in der Membran verankert ist. Die von der HA₁-Untereinheit gebildete globuläre Domäne besteht aus antiparallelen β -Faltblattstrukturen, die eine taschenartig geformte Struktur zur Interaktion mit Sialylsäure als zellulärem Rezeptor aufweisen und deren C-terminales Ende wiederum in Membrannähe liegt (Modrow und Falke 2003; Wright et al. 2006). Diese „Tasche“ ist für neutralisierende Antikörper nicht zugänglich, jedoch wird sie von Proteinbereichen umgeben, die B-Zell-Epitope darstellen.

Die Spaltstelle ist ein wichtiger Virulenzfaktor der AI Viren. Das Vorhandensein einer multibasischen Aminosäure-Sequenz (R-X-K/R-R) an der Spaltstelle entscheidet, ob die aktivierende Spaltung bereits im Trans-Golgi-Netzwerk durch die ubiquitär vorkommende Protease Furin (bzw. Furin- und Subtilisin-ähnliche Proteasen), als Bestandteil von Zellen vieler Gewebetypen, oder erst außerhalb der Wirtszelle stattfindet. Derartige multiple basische Aminosäuren an der Spaltstelle treten bei AIV der Subtypen H5 und H7 auf, die auf Grund der intrazellulären Aktivierung bereits bei Freisetzung infektiös sind, schwere generalisierte Erkrankungen hervorrufen und daher als hochpathogen eingestuft werden. Demgegenüber weisen niedrigpathogene AIV überwiegend nur eine basische Aminosäure an der Spaltstelle auf. Die aktivierende Spaltung erfolgt nach Freisetzung der LPAI-Viren durch gewebespezifische Trypsin-ähnliche Proteasen des Respirations- und Verdauungstrakts, weshalb diese Viren auf den Respirations- und Verdauungstrakt beschränkte Erkrankungen verursachen.

Bei der **Neuraminidase (NA)** handelt es sich um ein glykosyliertes, integriertes Typ-II-Membran-Protein, das aus vier identischen, über Disulfidbrücken miteinander verbundenen Untereinheiten aufgebaut ist (Potter 2004). Bei elektronenmikroskopischer Betrachtung eines Viruspartikels hat die Neuraminidase ein pilzförmiges Aussehen. Es sind ca. 100 bis 200

Neuraminidase-Moleküle ungleichmäßig auf der Virusoberfläche verteilt. Als Typ-II-Membranprotein befindet sich die Transmembrandomäne am N-Terminus des Proteins. An diese schließt sich der sogenannte Stielteil an, gefolgt von ca. 390 Aminosäuren, die eine globuläre Domäne bilden. Diese besteht aus 6 antiparallelen β -Faltblattregionen, die aus je 4 β -Faltblattstrukturen hervorgehen. Die vier miteinander interagierenden globulären Domänen bilden den „Pilzhut“ (Modrow und Falke 2003). Das aktive Zentrum befindet sich in einer taschenförmigen Struktur im Kopf des Pilzes, in der bei Influenza A Viren 9 saure und 6 basische Reste konserviert sind. Die Neuraminidase besitzt die enzymatische Aktivität einer Acyl-Neuraminy-Hydrolase und spaltet Sialylsäure-Reste der Kohlenhydratanteile auf der Oberfläche der Wirtszelle und der Virushülle ab. Dieser Vorgang verhindert zum einen die virale Aggregation während der Freisetzung der Nachkommenvirionen und zum anderen ein erneutes Anheften der Nachkommenvirionen an bereits infizierte Zellen. Neuraminidase-spezifische Antikörper können neutralisierende Aktivität besitzen. Diese verhindern die Bindung des Virus an Rezeptoren nicht, schränken jedoch die Virusausbreitung im Organismus ein (Müller 2006).

Das in der Virushülle verankerte **M2-Protein** ist ein Tetramer, übt die Funktion eines Ionenkanals aus und ist mit ca. 20 bis 60 Molekülen vertreten.

Allen nun folgenden Proteinen ist die Translation im Zytoplasma an Ribosomen, sowie die Anwesenheit von Kernlokalisationssequenzen gemeinsam.

Das **Matrixprotein (M1)** kleidet von innen die Virushülle aus und gibt dem Viruspartikel die Form. Dies geschieht durch Interaktion des M1-Proteins mit den zytoplasmatischen Domänen der Oberflächenglykoproteine und Assoziation an die Lipid-Doppelmembran. Weiterhin übernimmt das Matrixprotein eine wichtige Funktion bei der Verpackung der Nukleoprotein-Komplexe in entstehenden Viruspartikeln (Modrow und Falke 2003; Wright et al. 2006).

Das **Nukleoprotein (N)** ist das mengenmäßig dominierende Protein im RNP-Komplex und deckt an die RNA assoziiert einen Abschnitt von ca. 20 Nukleotiden ab (Modrow und Falke 2003). Es besitzt eine Domäne, die den Transport in den Zellkern vermittelt und ist in seiner freien, nicht-RNA-gebundenen Form wichtig für die Genom-Replikation (Swayne und Halvorson 2003). Durch Interaktion mit dem M1-Protein, gewährleistet es bei der Knospung die Verpackung des RNP-Komplexes in die Nachkommenvirionen.

Der für die Replikation essentielle Polymeraseprotein-Komplex mit Aktivität einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase besteht aus den **basischen Polymeraseproteinen 1 und 2 (PB1, PB2)** und dem **sauren Polymeraseprotein (PA)**, die alle eine Signalsequenz für den Transport in den Zellkern aufweisen. Das PB2 ist zudem für den Prozess des „cap-snatching“ (beschrieben unter Infektion und Replikation) verantwortlich.

Das **Nichtstrukturprotein 1 (NS1)** ist ein Kernprotein, wirkt hemmend auf die zelluläre mRNA-Synthese und wird als Interferon- α -Antagonist diskutiert (Garcia-Sastre 2001).

Das **Nichtstrukturprotein 2 (NS2)** vermittelt als regulatorisches Protein den Export von viralen Nukleokapsid-Segmenten aus dem Zellkern in das Zytoplasma.

Infektion und Replikation

Bei Influenzaviren wird die Bindung an die Zielzelle (engl.: attachment) durch das Hämagglutinin vermittelt, wobei als Rezeptoren terminale Sialinsäure-Reste an Membran-Glykoproteinen bzw. -Glykolipiden der Wirtszelloberfläche dienen.

Nach Bindung an den Rezeptor gelangt das Virus mittels Endozytose in die Zelle. Im Endosom fungiert das M2-Protein als Ionenkanal mit der Folge, dass der pH-Wert im Virusinneren absinkt (Pinto et al. 1992). Die Ansäuerung bewirkt eine Konformationsänderung im HA, die dazu führt, dass das Fusionspeptid am N-Terminus der HA₂-Untereinheiten in der endosomalen Membran verankert wird (Klenk und Garten 1994). Durch die räumliche Nähe verschmelzen Virushülle und endosomale Membran unter Ausbildung einer Pore (Skehel und Wiley 2000). Zum anderen unterstützt die Ansäuerung die Lösung der Interaktionen zwischen N- und M1-Proteinen, so dass die Nukleokapside in das Zytoplasma der Wirtszelle entlassen werden. Die Nukleokapside werden mit Hilfe von Kernlokalisationssequenzen, die in den Nukleoproteinen lokalisiert sind, durch Kernporen in den Zellkern transportiert, wo Transkription und Replikation der viralen RNA stattfinden (Neumann et al. 2000). Da Influenzaviren keine 5'-cap-Strukturen besitzen, werden in einem als „cap-snatching“ bezeichneten Prozess die 5'-cap-Strukturen zellulärer mRNA-Moleküle verwendet. Mit diesem Vorgang verbunden ist die Beeinträchtigung der Transkription und Translation zellspezifischer Gene. Das NS1-Protein vermittelt den Export der viralen mRNA aus dem Kern. Die Synthese der Membran-assoziierten Proteine findet am rauen ER statt, während die übrigen Proteine an Ribosomen im Zytoplasma translatiert und auf Grund von Signalsequenzen in den Zellkern transportiert werden. Reichern sich N-Proteine im Kern an, führt dies zur Veränderung der Polymerase-Aktivität und zur Synthese vollständiger antigenomischer RNA Stränge. Die mit N-Proteinen komplexierten Genomstränge dienen wiederum als Matrizen zur Synthese neuer negativ strängiger RNA-Genome. Diese assoziieren mit N-, PB1- PB2- und PA-Proteinen zu Nukleokapsiden (vRNPs). An diese vRNPs binden sich M1-Proteine. Der Export der vRNP-M1-Komplexe aus dem Zellkern in das Zytoplasma wird durch das NS2-Protein vermittelt (Chen und Krug 2000). Der Mechanismus, wie diese Komplexe Bereiche der Wirtszellmembran erreichen, in denen erhöhte Mengen an HA-, NA- und M2-Proteinen in die Zellmembran eingelagert sind, ist nicht geklärt (Nayak et al. 2004). Eine Theorie für die Ausbildung der initialen "budding"-Strukturen ist die Interaktion des M1-Proteins mit den zytoplasmatischen Anteilen der

Oberflächenproteine (HA, NA, M2), worauf sich die Zellmembran ausstülpt, die Nukleokapside umschließt und durch Knospung an der Oberfläche das neue Virion entlassen wird. Die Verteilung der Genom-Segmente auf die neu gebildeten Virionen scheint zufällig und nicht gerichtet stattzufinden, wobei es Hinweise gibt, dass bis zu 13 Nukleokapsid-Segmente je Virion eingelagert werden können (Modrow und Falke 2003). Endständige Neuraminsäure-Reste werden durch die Aktivität des NA-Proteins von zellulären und viralen Oberflächenproteinen entfernt. Dies verhindert Wechselwirkungen von freigesetzten Viruspartikeln untereinander oder mit Membranbestandteilen der infizierten Zelle.

Genetische Variabilität der Influenzaviren

Die Anpassungsfähigkeit der Influenzaviren ist außerordentlich hoch, da bei ihnen nicht nur Punktmutationen (Antigendrift) im Genom, sondern auch Reassortierung der Genom-Segmente (Antigenshift) vorkommen. Bei gleichzeitiger Infektion einer Zelle mit zwei verschiedenen Influenzaviren kann es zu einer Neuverteilung dieser Segmente in den Nachkommenviren kommen. Daraus ergeben sich theoretisch 254 (2^8 abzüglich der bereits existierenden Elternviren) mögliche Reassortanten. Austausche können zu neuen Subtypen führen. Kommt es beispielsweise zu einem Austausch des Hämagglutinin-Gens in einem an die Vermehrung im Menschen angepassten Virus, so kann ein Pandemie-auslösendes Virus entstehen, da die menschliche Population nicht über schützende Antikörper gegen den neuen HA-Subtyp verfügt (Scholtissek 2006).

Die Antigendrift wird durch Punktmutationen im Genom hervorgerufen. Da RNA-abhängige RNA-Polymerasen im Gegensatz zu DNA-Polymerasen keine Korrekturmechanismen für nicht vorlagengetreu transkribierte Bereiche („proofreading“-Aktivität) besitzen, kommt es bei der Genom-Replikation zu einer relativ hohen Mutationsrate. Bereits einzelne Punktmutationen können Aminosäure-Austausche bewirken, daneben treten aber auch „stille Mutationen“ ohne Auswirkungen auf die Aminosäure-Sequenz auf. Als wichtigste antigenetische Determinanten können das Hämagglutinin- und Neuraminidase-Protein die Bildung von Antikörpern induzieren und stehen daher unter hohem Selektionsdruck, was zu einer höheren Anzahl an Aminosäure-Austauschen in diesen Gen-Segmenten führt. In anderen Gen-Segmenten findet auch Antigendrift statt, da jedoch der Selektionsdruck geringer ist, in deutlich geringerem Umfang (Webster et al. 1992). Mutationen im Bereich der Spaltstelle des Hämagglutinins können die Pathogenität und damit die Virulenz verändern (Suarez et al. 2004), während Mutationen an der Rezeptor-Bindungsstelle des Hämagglutinins zur Änderung der Wirtsspezifität führen können.

Die Anordnung der Aminosäuren in der Sialinsäure-bindenden Tasche der HA₁-Untereinheiten bestimmt die Rezeptorspezifität und Wirtsspezifität, da das aviäre

respiratorische Epithel überwiegend Sialinsäuren mit α -2,3-Bindung aufweist, das humane jedoch überwiegend α -2,6-Bindungen (Flint et al. 2009). Für die Bindung an N-ständige Sialylsäuren spielen Aminosäuren an Position 226 und 228 offenbar eine entscheidende Rolle bei der Bevorzugung entweder α -2,3- oder α -2,6-gebundener Sialylsäuren als Rezeptordeterminante. Auf Grund der unterschiedlichen Verteilung in Mensch und Tier werden Wirts- und Gewebespezifität mitbestimmt (Matrosovich et al. 2004; Couceiro et al. 1993). In dieser Hinsicht nimmt das Schwein eine besondere Stellung ein, da sein respiratorisches Epithel sowohl Sialinsäuren mit α -2,3- und α -2,6-Bindungen aufweist und es dadurch als sogenanntes „mixing vessel“ bei Infektionen mit aviärem und humanem Influenzavirus fungieren kann (Webby et al. 2004). Durch Reassortierung können so für den Menschen gefährliche Varianten entstehen. Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Mutationen, die Sequenzen der Spaltstelle bzw. der Sialinsäure-bindenden Tasche betreffen, steigt mit der Anzahl der Viruspassagen, weshalb z.B. eine Infektion von Geflügelbeständen durch die hohen Tierzahlen und massenhafte Virusreplikation ein hohes Mutationspotential birgt.

2.2.2 Aviäre Influenzaviren (AIV)

Geschichte

Eine ansteckende, verlustreiche Erkrankung bei Hühnern wurde erstmals 1878 von Perroncito in Norditalien beschrieben. 1901 berichtete Greve über eine Hühnerseuche, die von einer Braunschweiger Geflügelausstellung nach Oldenburg verschleppt wurde und Künnemann beschrieb ein Jahr später Erkrankungen des Geflügels als Lombardische Geflügelseuche, Hühnerpest oder Vogelpest, die durch einen wandernden Geflügelhändler über Tirol nach Süddeutschland verschleppt wurden. Bereits zu diesem Zeitpunkt (1901) identifizierte Centanni den Verursacher der Geflügelpest als ein filtrierbares Agens (Centanni und Savonuzzi 1901). Die Verwandtschaft des AIV mit den Influenzaviren des Menschen erkannte Schäfer im Jahre 1955. 1959 wurde erstmals ein serologisch von bis dahin untersuchten Influenzaviren abweichendes Virus bei einem Seuchenausbruch in Schottland isoliert (Werner 2006). Bei weiteren Untersuchungen ab 1970 wurden auch „gesunde“ Wildvögel, insbesondere migrierende Wasservögel einbezogen, wobei weltweit zahlreiche Influenzaviren isoliert werden konnten (Rosenberger et al. 1974; Webster et al. 1976). Vergleichende, seroarchäologische Untersuchungen führten zu dem Schluss, dass migrierenden Wasservögeln eine entscheidende Rolle bei der Übertragung zukommt, da Gebiete mit hoher Geflügeldichte, die zudem an den Hauptflugrouten der Wildvögel liegen, besonders betroffen sind (Hafez und Jodas 1997; Wright et al. 2006). Wilde Wasservögel gelten als Reservoir aller Influenza A Viren (Webster et al. 1992; Wright et al. 2006).

Ätiologie

Die Krankheit Influenza ist sowohl bei Geflügel als auch bei Schweinen, Pferden, und dem Menschen beschrieben. Charakteristisch sind respiratorische Symptome, wobei milde bis schwere Krankheitsverläufe mit zum Teil hoher Mortalität auftreten, letztere besonders bei Geflügel. Natürliche Infektionen der Vögel sind bei Hühnern, Puten, Enten, Wachteln, Fasanen, Rebhühnern, Seeschwalben, Tauben, Gänsen und auch Straußen nachgewiesen worden. Als Reservoir gelten Wildvögel, da bei ihnen 103 von 144 möglichen HA / NA-Kombinationen nachgewiesen wurden (Kaleta et al. 2005) und Infektionen meist inapparent verlaufen. Weiterhin wurden auch Infektionen von Frettchen, Seelöwen, Walen, Katzen, Hunden und weiteren Säugetierspezies bekannt (Songserm et al. 2006b; Songserm et al. 2006a; Lamb 2008). In letzter Zeit wird häufiger über Fälle berichtet in denen aviäre Influenzaviren die Speziesbarriere durchbrochen haben und insbesondere der Subtyp H5N1 von Geflügel auf Menschen übertragen wurde. Daher stellt dieser Erreger eine ernstzunehmende Bedrohung für die menschliche Gesundheit dar (WHO 2009).

Die Ausscheidung des Virus erfolgt vor allem mit dem Kot, aber auch über die Sekrete des Respirations-, des Verdauungs- und des Reproduktionstraktes, sowie Tränenflüssigkeit (Rolle und Mayr 2002). Das Virus wird über mehrere Tage ausgeschieden und konnte nach experimenteller Infektion bis zu einer Dauer von 30 Tagen bei Enten (Webster et al. 1978) bzw. 72 Tagen bei Puten (Honne et al. 1970) nachgewiesen werden. Die horizontale Übertragung kann nasal, aerogen, oral oder durch kontaminierte Samenflüssigkeit stattfinden, so dass die Verschleppung des Erregers durch belebte und unbelebte Vektoren möglich ist. Eine vertikale Übertragung des Virus ist nicht bestätigt, jedoch besteht potentiell die Möglichkeit der Verbreitung des Virus durch kontaminierte Eierschalen, so dass eine Infektion bei / nach Schlupf möglich scheint (Hafez und Jodas 1997).

Pathotypen

Aviäre Influenzaviren sind für Geflügel grundsätzlich pathogen, variieren jedoch stark in ihrer Virulenz (Siegmann und Neumann 2005). Daher findet eine Unterscheidung der Erkrankung des Geflügels in Klassische Geflügelpest (HPAIV) und in Geflügelinfluenza-Erkrankungen durch gering (niedrig, engl.: low) pathogene AIV (LPAIV) statt, die auch tierseuchenrechtliche Konsequenzen mit sich bringt (Siegmann und Neumann 2005). Hochpathogene Isolate können bei Hühnern und Puten eine Mortalität von bis zu 100 % verursachen und sind bislang ausschließlich unter den Subtypen H5 und H7 aufgetreten. Viren aller Subtypen, die nicht die Kriterien als HPAIV erfüllen, werden als niedrigpathogene Isolate eingestuft.

Pathogenese, Klinik und Pathologie

Infektionen des Geflügels mit AI-Viren sind im Hinblick auf klinische Symptome und Verlauf sehr variabel. Die Wirtsspezies, das Alter, der individuelle physische Zustand (eines Einzeltieres / der Population) sowie Begleitinfektionen bestimmen das klinische Bild und die Dauer der Erkrankung maßgeblich. Die Virulenz des Isolates, die Infektionsdosis und der Infektionsweg nehmen zusätzlich Einfluss auf die Art und Ausprägung der Erkrankung. Auf Grund der Vielzahl an Faktoren variiert die Inkubationszeit zwischen 3 und 10 Tagen (Hafez und Jodas 1997). Die Bandbreite der Verläufe reicht von klinisch inapparent bis hin zu akuten schweren Erkrankungen ohne erkennbare klinische Symptome und hoher Letalität (bis 100 %). Treten Symptome auf, so lassen sich diese in fünf Komplexe einteilen: Störungen des Allgemeinbefindens, der Reproduktion, sowie respiratorische, gastrointestinale und zentralnervöse Störungen.

Tab. 1: Die Symptomenkomplexe der Aviären Influenza und zugeordnete Symptome

Symptomenkomplex	Symptome
gestörtes Allgemeinbefinden	Futter- / Wasseraufnahme vermindert Mattigkeit bis Apathie struppiges Gefieder Retardierung in der Wachstumsphase
Reproduktionsstörungen	Rückgang der Legetätigkeit verringerte Befruchtungs- und Schlupfrate Veränderungen der Eischalen (unregelmäßige Form, Kalkauflagerungen, fehlende Pigmentierung)
respiratorische Störungen	Dyspnoe (Atemgeräusche) Husten, Niesen Sinusitis (Schwellung des Infraorbitalsinus, Nasenausfluß)
gastrointestinale Störungen	Diarrhöen (grün-gelber, wässrig-schleimiger Kot)
zentralnervöse Störungen	Koordinationsstörungen abnorme Haltungen (z.B. Torticollis) Lähmungen (Paralysen) Tremor

Weitere Symptome sind Fieber, Konjunktivitis, Lidödeme, Kopfödem, sowie Zyanosen, Hämorrhagien und Nekrosen der unbefiederten Haut (Kopfanhänge, Ständer).

Eine schwere, generalisierte Verlaufsform tritt bei Infektionen mit HPAIV auf, die bei Hühnern und Puten zu einer 100 %igen Mortalität in 3 bis 4 Tagen führen kann. Meist zeigt sich in der Herde ein plötzlicher Rückgang der Futteraufnahme und Depression, bei Legetieren ein drastischer Einbruch in der Legeleistung, sowie zahlreiche, schlagartige Todesfälle. Die Inkubationszeit ist mit Stunden bis wenigen Tagen sehr kurz, der Tod kann nach experimenteller Infektion bereits nach 18 Stunden eintreten. Daher zeigen betroffene Tiere oft nur hochgradige Apathie, die von starker, grünlicher Diarrhö begleitet sein kann. Bei perakutem Verlauf ist der makroskopisch-pathologische Befund meist unauffällig. Bei akut verlaufenden HPAIV-Infektionen stehen schwere respiratorische Symptome im Vordergrund, häufig begleitet von Diarrhö, Kopfödemen, sowie Zyanosen bzw. Hämorrhagien von Kamm, Kehllappen und Ständern. In diesem Zusammenhang können makroskopisch-pathologisch Pankreatitiden mit nekrotischen oder hämorrhagischen Herden, Petechien auf Epikard, serösen Häuten und Abdominalfett und ein Lungenödem auftreten, ebenso wie Milzhyperplasie, Nephritis, hämorrhagische Blinddarmtonsillitis und katarrhalische bis hämorrhagische Enteritis. Zentralnervöse Störungen werden im Zusammenhang mit protrahiert akuten Verläufen beschrieben.

Im Gegensatz dazu sind LPAIV-Infektionen auf den Respirations- bzw. Verdauungstrakt beschränkt und rufen asymptomatische bis milde respiratorische Erkrankungen hervor. Im Gegensatz zu HPAIV-Infektionen ist die Inkubationszeit verlängert und beträgt wenige Tage bis 2 Wochen. In der Regel werden auch bei hohen Morbiditäts- nur geringe Mortalitätsraten erreicht. Bei Legehennen verursacht die Infektion mit LPAIV neben dem Rückgang der Legetätigkeit eine Verminderung der Eischalenqualität. Im Rahmen dieses Symptomkomplexes kann es zur Eidotterperitonitis kommen, auch Oviduktitis und Oophoritis kommen vor. Entsprechend dem klinischen Erscheinungsbild einer überwiegend respiratorischen, lokal begrenzten Infektion dominieren katarrhalische Sinusitis und Tracheitis das pathologische Bild. Des Weiteren können alle für HPAIV-Infektionen genannten respiratorischen und gastrointestinalen Befunde nach LPAIV-Infektionen ebenfalls auftreten, jedoch in geringerer Ausprägung.

Durch Begleitinfektionen können auch LPAIV-Infektionen schwere Verläufe aufweisen. So führte z.B. die Ko-Infektion von SPF-Hühnern mit LPAIV H9N2 und bakteriellen Erregern (*Staphylococcus aureus* bzw. *Haemophilus paragallinarum*) zum Auftreten klinischer Symptome, die bei alleiniger LPAIV H9N2-Infektion ausblieben (Kishida et al. 2004).

AIV vom Subtyp H9

Aviäre Influenzaviren vom Subtyp H9 sind den LPAIV zuzuordnen. Sie sind unter diesen jedoch von besonderer Bedeutung, da sie zu den am häufigsten in Hausgeflügelbeständen vorkommenden Subtypen gehören (Alexander 2003) und ein besonders breites Spektrum an Spezies infizieren können: neben Hühnern, Wachteln, Puten, Enten, Straußen und Gänsen, auch Schweine und Menschen (Cameron et al. 2000; Peiris et al. 2001; Abolnik et al. 2007). Humane Infektionen mit Viren dieses Subtyps wurden bereits beschrieben, weshalb AI H9 Viren als mögliche Pandemie-Viren diskutiert werden (Peiris et al. 1999; Guo et al. 1999; Matrosovich et al. 2001; Li et al. 2003; Butt et al. 2005). Das erste H9N2-Virus, das ausgiebig charakterisiert wurde (Homme und Easterday 1970c; Homme und Easterday 1970b; Homme et al. 1970; Homme und Easterday 1970a), ist der Stamm A/turkey/Wisconsin/1/66, der heute als Referenzstamm für Influenza A Viren des Subtyps H9 gilt (WHO 1980). Seit 1990 wurden vielfach AI H9-Virusinfektionen bei Geflügel, sowohl in Eurasien, als auch in Nord-Amerika beschrieben (Abolnik et al. 2007; Alexander 2000; Brown et al. 2006; Naeem et al. 1999).

Eine weitere Besonderheit von einigen Influenzaviren des Subtyps H9 ist, dass die humorale Immunantwort nach Infektion unterdrückt wird. So zeigen nach experimenteller Infektion von Hühnern erhaltene Ergebnisse eine deutlich reduzierte Antikörperantwort, wohingegen die zelluläre Immunantwort deutlich ausgeprägt war (Xing et al. 2008).

Rechtliche Grundlagen

Die Aviäre Influenza unterliegt strenger Gesetzgebung (OIE 2009a) und wird weltweit in nahezu allen Ländern durch staatlich angeordnete Maßnahmen bekämpft. Nach den Empfehlungen des Internationalen Tierseuchenamtes werden die Viren in hochpathogen (highly pathogenic, HP), meldepflichtig (notifiable, N) und niedrigpathogen (low pathogenic, LP) unterschieden (OIE 2009b). Die EU-weite Bekämpfung von AIV basiert auf der Richtlinie 2005/94 des Rates. Da bei LPAI Viren der Subtypen H5 oder H7 (LPNAI) die Gefahr besteht, zu HPAIV zu mutieren, enthält die RL 2005/94 neben Definitionen und Vorschriften zur Bekämpfung des Seuchenausbruchs auch Maßnahmen zur Überwachung (ANON 2006b). Aviäre Influenza ist definiert als „eine Infektion von Geflügel oder in Gefangenschaft gehaltenen Vögeln anderer Spezies, verursacht durch Influenzaviren des Typs A der Subtypen H5 oder H7 oder mit einem intravenösen Pathogenitätsindex (IVPI) von über 1,2 bei sechs Wochen alten Hühnern. Hochpathogene Aviäre Influenza [HPAI] bezeichnet eine Infektion von Geflügel oder in Gefangenschaft gehaltenen Vögeln anderer Spezies, verursacht durch Viren der Aviären Influenza der Subtypen H5 oder H7 mit einer Genomsequenz, wie sie auch bei anderen hochpathogenen Geflügelpestviren festgestellt wird, die für multiple basische Aminosäuren im Spaltbereich des Hämagglutininmoleküls

kodiert, d.h. das Hämagglutininmolekül kann von einer ubiquitär vorkommenden Wirtszell-Protease gespalten werden, oder Viren der Aviären Influenza mit einem intravenösen Pathogenitätsindex von über 1,2 bei sechs Wochen alten Hühnern. Niedrigpathogene Aviäre Influenza [LPNAI] bezeichnet eine Infektion von Geflügel oder in Gefangenschaft gehaltenen Vögeln anderer Spezies, verursacht durch Viren der Aviären Influenza der Subtypen H5 oder H7, die nicht unter die Definition nach Nummer 2 [HPAI] fallen.“

In Deutschland regelt das Tierseuchengesetz (ANON 2007) in Kombination mit der Verordnung zum Schutz gegen die Geflügelpest (ANON 2009a), der nationalen Umsetzung der EU Richtlinie 2005/94, die Bekämpfungsmaßnahmen. Die nationale Anzeigepflicht für Geflügelpest ist durch die Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen (ANON 2009c) geregelt. Um in allen EU-Mitgliedsstaaten einheitliche diagnostische Methoden zu gewährleisten, erfolgt die Probennahme, Laboranalyse und Diagnosestellung zum Nachweis der AIV nach Maßgabe des Diagnosehandbuchs (ANON 2006a). Die Diagnose muss entweder durch direkten Erregernachweis, Erregerisolierung oder serologisch erfolgen, da weder die klinischen Symptome noch das pathologisch-anatomische Bild pathognomisch sind. Für den direkten Erregernachweis sind AIV N- oder M-Protein basierte Sandwich-ELISA oder auch der Nachweis eines oder mehrerer Influenza A spezifischer Gensegmente mittels real-time RT-PCR nutzbar (Spackman et al. 2002). Für die Isolierung des Erregers eignet sich Material aus Rachen- oder Kloakentupfern, wie auch Kot oder Organmaterial frisch verendeter Vögel. Die Virusanzucht ist unter Kapitel 3.2.2.1 beschrieben. Zur Überwachung von Herden ist der Antikörpernachweis mittels Agar-Gel-Immendiffusions-Test (AGID), Hämagglutinations-Hemmungstest (HAH) oder Neuraminidase-Inhibitionstest angeraten; letztere werden auch in der Subtypisierung der Viren eingesetzt.

In der EU ist die Impfung gegen AIV verboten (ANON 2006b), allerdings werden Notimpfungen und präventive Impfungen in Kombination mit Überwachungsmaßnahmen ermöglicht. Entsprechend dürfen Schutzimpfungen gegen HPAI- und NAI-Viren nur unter Beachtung des Tierseuchengesetzes (ANON 2007) und der Geflügelpest-Verordnung (ANON 2009a) auf Anordnung, bzw. nach Genehmigung der zuständigen Behörde durchgeführt werden. Bestandsvakzinen gegen LPAI-, die nicht NAI-Viren sind, dürfen durch eine nach dem Tierseuchengesetz § 17c Abs.1 (ANON 2007), bzw. nach der Tierimpfstoff-Verordnung (ANON 2009b) befugte Person hergestellt und verabreicht werden.

2.3 AIV-Vakzinen

Neben der Einhaltung von Hygienemaßnahmen, ist die prophylaktische Impfung die einzige vorbeugende Maßnahme gegen eine Infektion mit AIV, die durch die Induktion einer Immunantwort Schutz vor Erkrankungen und Tod bieten und zur Reduktion der

Virusausscheidung beitragen soll, um Kontaktinfektionen zu vermeiden. Durch Vakzinierung kann neben der Produktion von Antikörpern (humorale Immunität) auch die Aktivierung sensibilisierter T-Lymphozyten (zelluläre Immunität) oder einer Kombination beider Komponenten resultieren. Darüber hinaus haben Schleimhäute als wichtigste Eintrittspforte in der Abwehr vieler viraler Erreger eine besondere Bedeutung, da die Schleimhaut-assoziierten lymphoiden Gewebe mit einer zellulären oder humoralen Immunantwort (IgA) reagieren können. Wenngleich die zelluläre Immunantwort eine initiale Infektion nicht verhindern kann, kann sie die Infektion mildern und Erkrankung sowie Sterblichkeit reduzieren (Belshe et al. 2000; Flynn et al. 1998). Gerade die CD8 T-Lymphozyten könnten zu einer schnellen Eliminierung des Virus nach Infektion beitragen (van den Berg et al. 2008), wobei aktuelle Untersuchungen nahelegen, dass die Verabreichung der Vakzine über die Schleimhäute nicht nur eine humorale (IgA), sondern auch eine zelluläre Antwort durch Aktivierung von Lymphozyten induziert (Gallichan und Rosenthal 1996).

Die Induktion einer humoralen Immunantwort, d.h. von Antikörpern gegen Virusproteine, ist das Hauptziel der Immunisierung. Gegen das Hämagglutinin gerichtete Antikörper können sowohl gegen Erkrankung als auch gegen Infektion mit homologem Virus schützen, da diese die Anheftung und Infektion der Zelle blockieren. Dagegen vermindern gegen die Neuraminidase gerichtete Antikörper die effiziente Freisetzung des Virus von infizierten Zellen (Johansson et al. 1989), weshalb sie weniger schützend sind als gegen das HA gerichtete Antikörper. Dies zeigten Untersuchungen von Hühnern, die entweder mit Baculovirus-exprimiertem NA (Sylte et al. 2007), oder mit NA-exprimierendem Geflügelpockenvirus (van den Berg et al. 2008) immunisiert wurden und nach Belastungsinfektion mit HPAIV nur eine partielle Schutzwirkung gegen Erkrankung zeigten. Um dem Druck des Immunsystems zu entkommen, entstehen häufig Virusvarianten mit veränderten Oberflächenproteinen, was eine Antikörper-vermittelte Immunantwort gegen solche Varianten der Virusstämme oft unzulänglich macht, so dass entsprechende Vakzinen neu formuliert werden müssen (Stamboulian et al. 2000). Auf der Suche nach einer universell einsetzbaren Influenza-Vakzine, die gegen alle HA und NA Subtypen wirksam ist, wurden sämtliche Influenza-Proteine auf ihre Immunogenität hin untersucht (Livingston et al. 2006) und das M-Protein als möglicher Kandidat vermutet (Neiryck et al. 1999). Die extrazelluläre Domäne des M2-Proteins (M2e) ist in allen Influenza A Viren hoch konserviert (Suarez und Schultz-Cherry 2000a), so dass dieses Protein unter keinem schweren Selektionsdruck zu stehen scheint. Bislang wurde keine Studie veröffentlicht, die die Schutzwirkung von M2e-spezifischen Antikörpern in Geflügel untersucht hat, Mäuse jedoch schienen nach Immunisierung mit einem Fusionsprotein aus M2e und Hepatitis B Core-Antigen (M2e-HBc) sowohl gegen homologe als auch heterologe Infektion mit humanem Influenzavirus geschützt (De Filette et al. 2005). Auch das Nukleoprotein wurde als

möglicher Kandidat für eine universale AIV-Vakzine untersucht, jedoch waren Hühner weder durch Immunisierung mit einer NP-exprimierenden Geflügelpocken-Rekombinante (Webster et al. 1991), noch mit einer NP-exprimierenden Retrovirus-Rekombinante (Brown et al. 1992), vor Infektion mit einer letalen Dosis HPAIV geschützt, obwohl die Immunisierung NP-spezifische Antikörper induzierte.

Obgleich attenuierte AIV-Lebendvakzinen den Vorteil der Induktion einer starken Immunantwort nach einmaliger Applikation durch die Replikation der Impfviren bieten würden, ist die Gefahr der Rekombination mit zirkulierenden AIV und damit der Entstehung von HPAIV in Geflügelbeständen sehr hoch, was die Verwendung in Geflügel verbietet (van den Berg et al. 2008; Fuchs et al. 2009). Daher kommen für Bestandsvakzinen in der Regel inaktivierte Vollvirus-Vakzinen zum Einsatz, die meist mehrere Subtypen des aktuellen Seuchengeschehens beinhalten (Hafez und Jodas 1997). Seit ca. 30 Jahren wird diese mit geringen Herstellungskosten verbundene Technik unter Verwendung von LPAIV mit zum Feldvirus homologen Hämagglutinin- und Neuraminidase-Subtypen angewendet. Durch Induktion einer Immunantwort gegen alle viralen Proteine können inaktivierte Vollvirus-Vakzinen eine breite Kreuzimmunität gegen verschiedene Feldisolate erreichen (Swayne et al. 2000c; Fuchs et al. 2009). Vom Einsatz homologer inaktiverter HPAIV Vollvirus-Vakzinen wird auf Grund von Biosicherheits-Bedenken bei Produktion und Einsatz jedoch abgeraten. Zusätzlich zu der großen Menge an Virus ist ein kostenintensiver Bestandteil inaktiverter Vakzinen das Adjuvans, durch das die Antikörper-Produktion verstärkt wird. In Geflügelvakzinen kommen Wasser-in-Öl-Emulsionen zum Einsatz, denen eine Depot-Funktion zugeschrieben wird, die bisher nicht vollständig verstanden ist. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass nicht-metabolisierbare Mineralöle eine höhere Antikörper-Antwort hervorrufen als metabolisierbare Öle (Jansen et al. 2006; Jansen et al. 2005). Nachteil der inaktivierten Vakzinen ist die zeitaufwendige und damit teure Einzeltier-Applikation, durch die weiterhin bei unzureichenden Hygienemaßnahmen das Risiko einer Feldvirus-Verschleppung besteht.

Vakzinen basierend auf Immunisierung mit einem oder mehreren Virusproteinen lassen sich unterteilen in Subunit-Vakzinen, bei denen das gereinigte Protein verwendet wird, und Vektorvakzinen, die das gewünschte Protein exprimieren und mitsamt des Vektors appliziert werden. Unter den Subunit-Vakzinen wurde in Hühnern bisher nur für Baculovirus-exprimiertes HA eine Schutzwirkung gegen Infektion mit HPAIV gezeigt (Crawford et al. 1999; Swayne et al. 2000c; Swayne et al. 2001).

Unter Verwendung von Plasmid-DNA als DNA-Vakzine wurden auch in Hühnern (Robinson et al. 1993; Fynan et al. 1993; Kodihalli et al. 1997; Suarez und Schultz-Cherry 2000b; Cherbonnel et al. 2003; Le Gall-Recule et al. 2007; Jiang et al. 2007) viele Studien durchgeführt, wobei sehr unterschiedliche Schutzwirkungen gezeigt wurden, die abhängig

waren vom verwendeten Promotor, dem inserierten Gen, der Verwendung eines Adjuvans und der Applikationsroute. Ein Nachteil der DNA-Vakzinen ist, dass sie individuell verabreicht werden müssen, was durch den Einsatz von Bakterien (z.B. *Shigella flexneri* (Vecino et al. 2004) oder *Salmonella typhimurium*, (Pan et al. 2009)) als Trägern oder durch Verwendung synthetischer Mikropartikel (Chen et al. 1998; Darji et al. 2000) überwunden werden könnte. Auch wenn bisher keine Untersuchungen zu bakteriellen Vektorvakzinen in Hühnern vorliegen, deuten Ergebnisse in Mäusen auf eine mögliche Nutzung auch im Huhn hin (Ben-Yedidia und Arnon 2005).

Zu den viralen Vektoren gehören die „virus-like particles“ (VLP), in deren Plasmid-kloniertes Genom Fremdgene eingefügt und eigene Strukturprotein-Gene entfernt werden können, so dass die Bildung infektiöser Nachkommenviren ausbleibt. Diese fehlende Replikation macht VLPs gegenüber Lebendvirus-Vektoren sicherer, da eine Verbreitung dieser Viren im Impfling unterbleibt. VLPs infizieren Zellen und exprimieren die Transgene. Unter VLPs wurden unter anderem replikationsdefekte humane Adenoviren 5 (Gao et al. 2006; Tang et al. 2009; Toro und Tang 2009; Toro et al. 2008; Toro et al. 2007) intranasal, intramuskulär und *in ovo* zur Vakzinierung verwendet, so dass die Applikation mittels Spray oder auch automatisiert *in ovo* möglich scheint. Eine weitere replikationsdefekte, HA-exprimierende Rekombinante wurde auf Basis des Vesikulären Stomatitis Virus (VSV) entwickelt und induzierte Schutz gegen HPAIV-Infektion (Kalhor et al. 2009), muss jedoch individuell verabreicht werden. Auch VLPs des Venezuelanischen Equinen Enzephalitis-Virus (VEEV; Genus Alphavirus der *Togaviridae*) (Schultz-Cherry et al. 2000) sind in Hühnern getestet worden, wobei eine Korrelation zwischen Alter des Impflings und dem Schutz gegen eine letale Dosis des Virus festgestellt wurde und im Alter von 2 Wochen geimpfte Hühner besser geschützt waren als *in ovo* oder als Eintagsküken geimpfte.

Auch replikationskompetente Vektorvirus-Vakzinen wurden in Hühnern untersucht, von denen eine auf dem Geflügelpocken Virus (FPV) basierende, H5-exprimierende Rekombinante seit 1998 in den USA als Notfallimpfung und in Mexiko ausschließlich für Hühner zugelassen ist (Bublöt et al. 2006), und auch in Ost-Asien als Vakzine genutzt wird. Unter experimentellen Bedingungen waren SPF-Hühner nach Immunisierung mit rFPV-H5 auch gegen heterologe HPAIV H5-Isolate geschützt und schieden deutlich weniger Virus aus als ungeimpfte Kontrolltiere (Swayne et al. 1997; Swayne et al. 2000c; Swayne et al. 2000b; Swayne et al. 2001). Durch FPV-Infektion oder Immunisierung immune Tiere zeigten eine Reduktion der Effektivität der rFPV-H5-Vakzinierung gegen AIV des Subtyps H5 (Swayne et al. 2000a), wohingegen maternale Antikörper gegen FP oder AI kaum Auswirkungen auf den Immunisierungseffekt im Vergleich zu SPF-Tieren hatten (Bublöt et al. 2006). Auch für ein attenuiertes, modifiziertes (replikationsdefektes) Vaccinia Virus Ankara (MVA) als AIV-H5-Vektor konnte Schutz gegen HPAIV-Erkrankung gezeigt werden (Veits et al. 2008). Das

Virus der infektiösen Laryngotracheitis führt als Vektor für eine HPAIV-Vakzine gegen die Subtypen H5 (Lüschow et al. 2001; Fuchs et al. 2007; Pavlova et al. 2009a; Pavlova et al. 2009b) und H7 (Veits et al. 2003) bei Hühnern ebenfalls zum Schutz vor einer letalen Infektion. Darüber hinaus könnten ILTV-basierte Vakzinen auch als Spray oder in Trinkwasser appliziert werden (Fuchs et al. 2006). Bisher nicht für AIV beschrieben, aber für die Anwendung in Hühnern und Puten durchaus denkbar ist das apathogene Putenherpesvirus (PHV, Serotyp 3), dessen Eignung als Vektor für die Expression immunogener Proteine von NDV bzw. Infektiöser Bursitis gezeigt wurde (Morgan et al. 1992; Tsukamoto et al. 2002).

Auf Basis zugelassener Impfstämme (La Sota, Hitchner B1) zeigte NDV als Vektor für eine bivalente NDV-AIV-Vakzine bereits nach einmaliger Immunisierung eine hohe Schutzwirkung gegen AIV- und NDV-Infektion (Nakaya et al. 2001; Veits et al. 2006; Park et al. 2006; Ge et al. 2007; Nayak et al. 2009), was zum Einsatz zweier NDV-HA-Rekombinanten als bivalente Vakzine in China und Mexiko führte. Auch NDV-basierte Vakzinen gegen AIV können potentiell mittels Massenapplikation (Spray, Trinkwasser) verabreicht werden, was einen kostengünstigen Einsatz ermöglichen würde. Ein weiterer Vorteil von NDV ist die Induktion einer mukosalen Immunantwort nach okulonasaler Applikation (Jayawardane und Spradbrow 1995). Zusätzlich würde das sehr breite Wirtsspektrum von NDV auch die Anwendung von NDV-Rekombinanten in anderen Spezies erlauben (Ge et al. 2007). Rekombinationsereignisse sind offenbar sehr selten, wodurch die Gefahr einer Rekombination zwischen Vakzine-Vektor und zirkulierenden Wildtyp-Viren sehr gering ist (Spann et al. 2003).

Zu den entscheidenden Vorteilen von Vektorvakzinen gehören die Induktion einer humoralen und zellulären -im Fall von NDV auch mukosalen- Immunität, sowie der bivalente Schutz gegen AI und das Vektor-Virus, wobei gegen NDV in sehr vielen Ländern Impfpflicht besteht, so dass der Einsatz einer bivalenten Vakzine Zeit und Geld sparen würde.

Alle Vakzinen, die Antikörper gegen nur ein Protein (bzw. nicht alle Proteine) von AIV induzieren erlauben eine DIVA-Diagnostik, d.h. die Unterscheidung von vakzinierten und AIV-infizierten Tieren. Eine solche Diagnostik ist entscheidend, da Vakzinen oft nur die Symptome einer Erkrankung verhindern, das Virus jedoch weiterhin repliziert und ausgeschieden wird und so unerkannt zirkulieren kann. Daher ist die schnelle Detektion von Infektionen zur Überwachung zirkulierender Viren von besonderer Bedeutung, um die Virusverbreitung durch gezielte Eradikationsmaßnahmen einzudämmen.

2.4 Ziele dieser Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Prüfung von AIV-Markervakzinen auf Basis des Newcastle Disease Virus.

Darunter fiel die Herstellung einer NDV-LPAIV Rekombinante gegen den Stamm A/turkey/Wisconsin/1/66 (H9N2), sowie deren *in vitro*-Charakterisierung. Des Weiteren sollte die Virulenz der Rekombinante NDV-H9 und die Schutzwirkung gegen LPAIV H9N2-Infektion, sowie gegen velogenes NDV in den Spezies Huhn und Pute geprüft werden. Auch sollte die Eignung von NDV-H9 als Markervakzine gegen AIV untersucht werden.

Darüberhinaus waren NDV-HPAIV Rekombinanten, die entweder H5 und / oder N1 exprimieren auf ihre Schutzwirkung gegen HPAIV Infektionen vom Subtyp H5, sowie auf ihre Eignung als AIV-Markervakzinen zu testen. In diesem Zusammenhang sollte die Auswirkung der Deletion polybasischer Aminosäuren an der Hämagglutinin-Spaltstelle von NDV-H5 (NDV-H5LP) und der Ko-Expression von H5 und N1 in NDV (NDV-H5N1) auf die Schutzwirkung gegen homologes und heterologes HPAIV H5 überprüft werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Versuchstiere und Eier

Tierart	Rasse	SPF*- Status	Bezugsfirma
Bankivahuhn <i>Gallus gallus</i>	White Leghorn	Ja	Lohmann Tierzucht
Truthuhn <i>Meleagris gallopavo</i>	BUT-Big 6	Nein	Gebr. Böcker Putenbrüterei GmbH
Valo SPF Hühnereier		Ja	Lohmann Tierzucht

* spezifisch pathogen frei (SPF)

3.1.2 Virusstämme, rekombinante Viren

Virus	Isolat	erhalten von
AIV	A/turkey/Wisconsin/1/66 (H9N2)	Dr. T. Harder, FLI, Insel Riems
AIV	A/duck/Vietnam/TG24-01/05 (H5N1)	P. Song Lien, NCVD, Donga, Vietnam
AIV	A/whooper swan/Germany/R65/06 (H5N1)	Dr. T. Harder, FLI, Insel Riems
AIV	A/chicken/Italy/8/98 (H5N2)	I. Capua IZSV, Legnaro, I
NDV	Clone 30	Intervet, Boxmeer, NL
NDV	Herts 33/56	Intervet, Boxmeer, NL
rNDV	Auf Basis des NDV Clone 30 mittels reverser Genetik hergestelltes Virus. (Römer-Oberdörfer et al., 1999)	Dr. A. Römer-Oberdörfer, FLI, Insel Riems
NDV-N1	Das Neuraminidase-Protein des Isolates AIV A/duck/Vietnam/TG24-01/05 (H5N1) exprimierende NDV-Rekombinante.	Dr. A. Römer-Oberdörfer, FLI, Insel Riems
NDV-H5	Das Hämagglutinin-Protein des Isolates AIV A/whooper swan/Germany/R65/06 (H5N1) exprimierende NDV-Rekombinante.	Dr. A. Römer-Oberdörfer, FLI, Insel Riems

NDV-H5LP	NDV-H5 mit Deletion basischer Aminosäuren im Bereich der Spaltstelle des AIV-H5-Gens.	Dr. A. Römer-Oberdörfer, FLI, Insel Riems
NDV-H5N1	Das Hämagglutinin- und Neuraminidase-Protein des Isolates AIV A/whooper swan/Germany/R65/06 (H5N1) exprimierende NDV-Rekombinante.	Dr. A. Römer-Oberdörfer, FLI, Insel Riems

3.1.3 Zellen

(CCLV = Collection of Cell Lines in Veterinary Medicine)

Katalog-Nummer	Name der Zelllinie	Beschreibung
CCLV-RIE 583	BHK-21/BSR/T7/5	T7 Polymerase exprimierende Sublinie der Babyhamsternieren-Zelllinie BHK-21 (ATCC: CCL-10) (Buchholz et al. 1999)
	CEF	primäre Hühner-Fibroblasten (aus 10 Tage bebrüteten SPF-Hühnereiern)
	CEK	primäre Nierenzellen von Hühnerembryonen (aus 19 Tage bebrüteten SPF-Hühnereiern)
CCLV-RIE 464 ATCC: CRL-2117	LMH	Permanente Zelllinie aus einem durch Diethylnitrosamin induzierten hepatozellulärem Karzinom eines Leghorn-Hahnes der Rasse LM (Kawaguchi et al. 1987).
CCLV-RIE 999	QM9 R	Sublinie der QM7-Zelllinie (ATCC: CRL-1062), gewonnen aus einem 3-Methylcholanthren-induzierten Fibrosarkom einer japanischen Wachtel <i>coturnix coturnix japonica</i> , die in Serumhaltigem Medium als Myoblasten replizieren.

3.1.4 Bakterien

Bakterien	Hersteller
<i>E. coli</i> XL1 Blue	Stratagene
<i>E. coli</i> XL10-Gold® Ultracompetent Cells	Stratagene
<i>E. coli</i> JM 109	Promega
<i>E. coli</i> DH 10 B	Invitrogen™

3.1.5 Vektoren und rekombinante Plasmide

Plasmid	Hersteller / erhalten von
pcDNA3	Invitrogen™
pcDNA3-NDV F ♦	Dr. J. Veits, FLI, Insel Riems
pcDNA3-NDV HN ♦	Dr. J. Veits, FLI, Insel Riems
pCR®2.1-TOPO®	Invitrogen™
pGem®-T Easy	Promega
pCite-NDV NP*	Dr. A. Römer-Oberdörfer, FLI, Insel Riems
pCite-NDV P*	Dr. A. Römer-Oberdörfer, FLI, Insel Riems
pCite-NDV L*	Dr. A. Römer-Oberdörfer, FLI, Insel Riems
pCR 2.1-TOPO-H9-5'	Dr. S. Weber, FLI, Insel Riems
pCR 2.1-TOPO-H9-3'	Dr. S. Weber, FLI, Insel Riems
pNDVH5Vm3 ‡	Dr. A. Römer-Oberdörfer, FLI, Insel Riems

♦ (Veits et al. 2006)

* (Römer-Oberdörfer et al. 1999)

‡ (Schröer et al. 2009)

3.1.6 Antikörper, Antiseren

Spezifität des Serums		von Tierart	erhalten von
NDV Clone 30	polyklonal	Kaninchen	Dr. J. Veits, FLI, Insel Riems
NDV	polyklonal	Huhn	Dr. J. Veits FLI, Insel Riems
NDV-F Vaccinia-Virus exprimiertes F-Protein von NDV Clone 30	monospezifisch	Kaninchen	Dr. J. Veits, FLI, Insel Riems
NDV-HN Vaccinia-Virus exprimiertes HN-Protein von NDV Clone 30	monospezifisch	Kaninchen	Dr. J. Veits, FLI, Insel Riems
AIV A/turkey/Wisconsin/1/66 (H9N2)	polyklonal	Huhn	Dr. T. Harder, FLI, Insel Riems

AIV-H9 Vaccinia-Virus exprimiertes H9-Protein des Isolates AIV A/turkey/Wisconsin/1/66 (H9N2)	monospezifisch	Kaninchen	Dr. J. Veits, FLI, Insel Riems
AIV-N1 Vaccinia-Virus exprimiertes N1-Protein des Isolates AIV A/chicken/Vietnam/P41/2005 (H5N1)	monospezifisch	Kaninchen	Dr. W. Fuchs, FLI, Insel Riems*
AIV-N1 (bakt.-AIV-N1) <i>E. coli</i> exprimiertes N1-Protein des Isolates AIV A/chicken/Vietnam/P41/2005 (H5N1)	monospezifisch	Kaninchen	Dr. W. Fuchs, FLI, Insel Riems*
AIV-H5 Vaccinia-Virus exprimiertes H5-Protein des Isolates AIV A/chicken/Vietnam/P41/2005 (H5N1)	monospezifisch	Kaninchen	Dr. W. Fuchs, FLI, Insel Riems*

* (Pavlova et al. 2009a)

Spezies-spezifische Zweitantikörper	Konjugat	Globulinfraktion	Hersteller
Ziege α-Pute	Meerrettichperoxidase	IgG (H+L)	KPL, Medac GmbH
Kaninchen α-Huhn	Meerrettichperoxidase	IgG (H+L)	Jackson Immuno Research
Ziege α-Kaninchen	Meerrettichperoxidase	IgG (H+L)	Jackson Immuno Research
Ziege α-Pute	FITC	IgG (H+L)	KPL, Medac GmbH
Ziege α-Kaninchen	Alexa Fluor® 488	IgG (H+L)	Invitrogen
Ziege α-Kaninchen	Alexa Fluor® 594	IgG (H+L)	Invitrogen
Ziege α-Huhn	Alexa Fluor® 488	IgG (H+L)	Invitrogen
Ziege α-Huhn	Alexa Fluor® 594	IgG (H+L)	Invitrogen

3.1.7 Medien und Lösungen für die Zellkultur

Gelatine-Lösung (0,5 % (w/v) in PBS)

Hanks Waschlösung	
137 mM	Natriumchlorid
5,6 mM	D-(+)-Glucose
5,4 mM	Kaliumchlorid
3,8 mM	Calciumchlorid
0,4 mM	Magnesiumsulfat
0,4 mM	Dikaliumhydrogenphosphat
0,3 mM	Dinatriumhydrogenphosphat
0,0002 % (v/v)	Phenolrot
eingestellt auf pH-Wert: 7,1 bis 7,2; sterilfiltriert	

ATV (Alsever's Trypsin-Versen-Lösung)	
137 mM	Natriumchlorid
6,9 mM	Natriumhydrogencarbonat
5,6 mM	D-(+)-Glucose
5,3 mM	Kaliumchlorid
0,7 mM	EDTA
0,05 % (w/v)	Trypsin
eingestellt auf pH-Wert: 7,1 bis 7,3; gelagert bei -20°C	

ZB 5	
18 mM	Natriumhydrogencarbonat
1 mM	Natriumpyruvat
0,53 % (w/v)	MEM Hanks
0,48 % (w/v)	MEM Earle
10,0 % (v/v)	fetales Kälberserum (FKS)
1,0 % (v/v)	nicht-essentielle Aminosäuren (NEAS; 100x)
eingestellt auf pH-Wert: 7,2; begast mit 2,5 % CO ₂ ; gelagert bei 2-8°C	

ZB 5b unterscheidet sich in der Zusammensetzung von **ZB 5** darin, dass statt 10 % FKS nur 5 % FKS eingesetzt werden.

ZB 9d	
1,0 % (v/v)	DMEM Earle
44 mM	Natriumhydrogencarbonat
eingestellt auf pH-Wert: 7,4; begast mit 2,5 % CO ₂ ; gelagert bei 2-8°C	

ZB 22	
26 mM	Natriumhydrogencarbonat
0,95 % (w/v)	MEM Earle
10,0 % (v/v)	FKS
eingestellt auf pH-Wert: 7,1; begast mit 2,5 % CO ₂	

ZB 22a unterscheidet sich in der Zusammensetzung von **ZB 22** darin, dass statt 10 % FKS nur 2 % FKS enthalten sind.

ZB 23a	
33 mM	Natriumhydrogencarbonat
1,25 % (w/v)	MEM Glasgow
0,1 % (w/v)	Kaseinpepton
0,05 % (w/v)	Tryptosephosphat
0,05 % (w/v)	Hefeextrakt
0,05 % (w/v)	Fleischpepton
10,0 % (v/v)	FKS
0,2 % (v/v)	essentielle Aminosäuren
eingestellt auf pH-Wert: 7,1; begast mit 2,5 % CO ₂	

3.1.8 Medien und Lösungen für die Bakterienkultur

Luria-Bertani-(LB)-Medium [flüssig]	Luria-Bertani-(LB) [Agar-Platte]
1,0 % (w/v) Natriumchlorid	1,0 % (w/v) Natriumchlorid
1,0 % (w/v) Caseinhydrolysat	1,0 % (w/v) Caseinhydrolysat
0,5 % (w/v) Hefeextrakt	0,5 % (w/v) Hefeextrakt
	2,0 % (w/v) Agar
Bestandteile in Aqua dest. gelöst; autoklaviert	
vor Gebrauch Antibiotika (0,01 % (w/v) Ampicillin, sterilfiltriert) zugegeben	nach Abkühlung auf ca. 50°C Antibiotika (0,01 % (w/v) Ampicillin, sterilfiltriert) zugegeben

SOB-Medium	
10 mM	Natriumchlorid
2,5 mM	Kaliumchlorid
1,0 % (w/v)	Caseinhydrolysat
0,5 % (w/v)	Hefeextrakt
Komponenten in Aqua dest. gelöst; autoklaviert	
10 mM	Magnesiumchlorid*
10 mM	Magnesiumsulfat*

* aus separat autoklavierter Stammlösung

SOC-Medium	
10 mM	Natriumchlorid
2,5 mM	Kaliumchlorid
1,0 % (w/v)	Caseinhydrolysat
0,5 % (w/v)	Hefeextrakt
Bestandteile in Aqua dest. gelöst; autoklaviert	
10 mM	Magnesiumchlorid*
10 mM	Magnesiumsulfat*
20 mM	Glucose **

* aus separat autoklavierter Stammlösung

** aus sterilfiltrierter Stammlösung

TFB-Medium	
100 mM	Kaliumchlorid
45 mM	Mangan(II)-chlorid
10 mM	Calciumchlorid
10 mM	Kaliummorpholinoethansulfonsäure
3 mM	Hexaminkobalt(III)chlorid
eingestellt auf pH-Wert: 6,2; sterilfiltriert	

3.1.9 Sonstige Puffer und Lösungen

0,8 % Agarose-Formaldehydgel	
0,8 % (w/v)	Agarose
in DEPC-H ₂ O aufgekocht, auf ca. 50°C abgekühlt	
3,0 %	Formalin (37 %)
10,0 %	MAE-Puffer (10x)

Deionisiertes Formamid

Formamid mit 40 g/l Serdolit MB1 über zwei Stunden gerührt, filtriert, portioniert und bei -20°C gelagert

DNA-Mini-Präparation Lösung I	
0,1 M	TRIS
10 mM	EDTA
0,04 % (w/v)	RNase
eingestellt auf pH-Wert: 7,5; gelagert bei 4°C	

DNA-Mini-Präparation Lösung II	
0,2 M	Natriumhydroxid
1,0 % (w/v)	SDS
vor Verwendung frisch angesetzt	

DNA-Mini-Präparation Lösung III	
3 M	Kaliumacetat
2 M	Eisessig
gelagert bei RT	

Fixierlösung für SDS-Polyacrylamidgele	
40,0 % (v/v)	Methanol
10,0 % (v/v)	Eisessig

Guanidin-Isothiocyanat-Lösung	
0,5 % (w/v)	Sarkosyl
4 M	Guanidin-Isothiocyanat
100 mM	2-Mercaptoethanol
25 mM	Natriumcitrat

Formamid dye	
97,5 %	deionisiertes Formamid
0,3 % (w/v)	Bromphenolblau
0,3 % (w/v)	Xylencyanol
10 mM	EDTA
gelagert bei -20°C	

Hybridisierungspuffer 1	
60,0 % (v/v)	deionisiertes Formamid
10,0 % (v/v)	SSPE-Puffer (20x)
0,5 % (w/v)	Magermilchpulver
5,0 % (v/v)	denaturierte Heringssperma-DNA-Lösung (10 mg/ml)
1,0 % (w/v)	SDS
0,1 % (w/v)	DEPC

Hybridisierungspuffer 2	
60,0 % (v/v)	deionisiertes Formamid
10,0 % (v/v)	SSPE-Puffer (20x)
0,5 % (w/v)	Magermilchpulver
1,0 % (w/v)	SDS
0,1 % (w/v)	DEPC

Isoamylalkohol-Chloroform-Lösung (IAC)	
96,0 % (v/v)	Chloroform
4,0 % (v/v)	Isoamylalkohol

Iod-Desinfektionslösung für Eier	
50 % (v/v)	Ethanol
3,5 % (w/v)	Iod
1,5 % (w/v)	Kaliumiodid

Lösung A für Proteinbestimmung	
25,8 mM	Bicinchoninsäure
2 % (w/v)	Natriumcarbonat
0,16 % (w/v)	Natriumtartrat
0,95 % (w/v)	Natriumhydrogencarbonat
eingestellt auf pH-Wert: 11,25	

Lösung B für Proteinbestimmung	
4 % (w/v)	Kupfersulfat

Loading Dye	Fermentas
--------------------	-----------

MAE-Puffer (10x)	
0,2 M	MOPS
50 mM	Natriumacetat
10 mM	EDTA
in DEPC-behandeltem Wasser autoklaviert	

Magermilchlösung für Northern-Blot	
10,0 % (w/v)	Magermilchpulver
0,02 % (v/v)	Natriumazid
gelagert bei 4°C	

Natriumchlorid-Lösung	
0,9 % (w/v)	Natriumchlorid

PBS (10x)	
140 mM	Natriumchlorid
6,5 mM	Dinatriumhydrogencarbonat
2,7 mM	Kaliumchlorid
1,5 mM	Kaliumdihydrogenphosphat
eingestellt auf pH-Wert: 7,4; autoklaviert	

Paraformaldehydlösung für Zellfixierung 3 %ig	
3,0 % (w/v)	Paraformaldehyd
1 l	PBS
bei 65°C unter Rühren gelöst (Natriumhydroxid zum Klären)	

RITA	
150 mM	Natriumchlorid
10 mM	TRIS-HCl (pH-Wert: 7,5)
2 mM	Methionin
1 mM	Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
1,0 % (v/v)	IGEPAL® CA-630
0,1 % (w/v)	Ovalbumin
0,1 % (w/v)	SDS
0,02 % (w/v)	Natriumazid

RNA-Probenpuffer	
60,3 % (v/v)	Formamid (deionisiert)
21,3 % (v/v)	Formaldehyd
12,1 % (v/v)	MAE-Puffer (10x)
6,0 % (v/v)	Formamid dye
0,3 % (v/v)	Ethidiumbromid (10 mg/ml)

SDS-Elektrophoresepuffer (10x)	
2,5 M	Glycin
250 mM	TRIS
1,0 % (w/v)	SDS

SDS-Probenpuffer	
125 mM	TRIS-HCl (pH-Wert: 6,8)
20,0 % (v/v)	Glycerol
10,0 % (v/v)	2-Mercaptoethanol
4,0 % (w/v)	SDS
0,01 % (w/v)	Bromphenolblau

SDS-Polyacrylamidgelpuffer für das Sammelgel	
0,5 M	TRIS
0,4 % (w/v)	SDS
eingestellt auf pH-Wert: 6,8	

SDS-Polyacrylamidgelpuffer für das Trenngel	
1,5 M	TRIS
0,4 % (w/v)	SDS
eingestellt auf pH-Wert: 8,8	

SDS-Polyacrylamid-Trenngel 10 %	
25,0 % (v/v)	SDS-Polyacrylamidgelpuffer für Trenngele
10,0 % (v/v)	Acrylamid
0,05 % (v/v)	APS
0,1 % (v/v)	TEMED

SDS-Polyacrylamid-Sammelgel 4 %	
25,0 % (v/v)	SDS-Polyacrylamidgelpuffer für Sammelgele
4,0 % (v/v)	Acrylamid
0,05 % (v/v)	APS
0,1 % (v/v)	TEMED

SSC-Puffer (20x)	
3 M	Natriumchlorid
0,3 M	Natriumcitrat
mit HCl eingestellt auf pH-Wert: 7,0; autoklaviert	

SSPE-Puffer (20x)	
3,6 M	Natriumchlorid
0,2 M	Dinatriumhydrogenphosphat
20 mM	EDTA
autoklaviert	

TAE-Puffer (50x)	
2 M	TRIS
250 mM	Natriumacetat
50 mM	EDTA
eingestellt auf pH-Wert: 7,8	

TBS-T (10x)	
150 mM	Natriumchlorid
10 mM	TRIS-HCl (pH-Wert: 8,0)
2,5 % (v/v)	Tween 20

TE-Puffer	
10 mM	TRIS-HCl (pH-Wert: 7,4 bis 8,0)
1 mM	EDTA
sterilfiltriert	

TEN-Puffer (10x)	
1,5 M	Natriumchlorid
0,2 M	TRIS-HCl (pH-Wert: 7,4)
10 mM	EDTA

Transferpuffer	
20 mM	Glycin
2,5 mM	TRIS
20 % (v/v)	Methanol
0,01 % (w/v)	SDS

Tupferproben-Medium	
0,1 %	Enrofloxacin
0,1 %	Lincomycin
0,005 %	Gentamicin
in ZB 5b Medium aufgenommen	

3.1.10 Reagenzien

3.1.10.1 Nukleinsäuren und Nukleotide

Nukleinsäuren und Nukleotide

dATP, dCTP, dGTP, dTTP

denaturierte Heringssperma-DNA

DNA Ladder GeneRuler™ 1 kbp

IC2 (interne Kontroll-RNA)

Lambda Mix Marker 19

RNA Ladder 0,5-10 kb

[$\alpha^{32}\text{P}$] –UTP

Hersteller

Roche

Promega

Fermentas

Labor Dr. B. Hoffmann, FLI, Insel Riems

Fermentas

Invitrogen

Hartmann Analytic GmbH

Tab. 2: Primer

Bezeichnung	Sequenz 5´ - 3´	Nukleotide	erhalten von / veröffentlicht durch
Bm-HAs	TAT TCG TCT CAG GGA GCA AAA GCA GGG G	28	Dr. S. Weber, FLI, Insel Riems
Bm-HAAs	ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GGT GTT TT	35	Dr. S. Weber, FLI, Insel Riems
H9N2-5HAs2	GGG GCA ATT AGA TTT CC	17	Dr. S. Weber, FLI, Insel Riems
H9N2-3HAAs2	GTG GGG CAT ACA CCA TCC ACC TAC CGA CAC	30	Dr. S. Weber, FLI, Insel Riems
AIVH9MUT_C816T_F	CAT GTT CTT ACG GGA GAG AGT CAT GGA AGA ATC CTA AAG AC	41	eigenes Design
AIVH9MUT_C816T_R	GTC TTT AGG ATT CTT CCA TGA CTC TCT CCC GTA AGA ACA TG	41	eigenes Design

AIVH9_F_430-448	TAC AGC GGA ACA AGC AGA G	19	eigenes Design
AIVH9_F_886-905	GGA CTC AAT ACA ACC TTG CC	20	eigenes Design
AIVH9_F_1240-60	AGG CTG AAC ATG ATC AAC AAC	21	eigenes Design
AIVH9_R_572-553	TGT ATG CCC CAC ATG AAA AG	20	eigenes Design
AIVH9_R_1002-983	AGC AGG CAC ATT CCT TAA AC	20	eigenes Design
AIVH9_R_1429-10	CAA AGC ATC CGT TTC CAT CC	20	eigenes Design
AIV_H9_F_BamHI_NcoI	TAA GGA TCC ACC ATG GAA ACA AAA GCA ATA ATT GC	35	eigenes Design
AIV_H9_R_AflIII_NotI	AAG CGG CCG CCT TAA GTA TAA TTG ACT CAA TTA TAT ACA AAT GTT GCA TCT G	52	eigenes Design
PN6115-35F	CCT AAT GTA CAA GCA AAA GGC	21	Dr. J. Veits, FLI, Insel Riems
PN6424-42R	CTA ACG CAA CTT GGC TAA C	19	Dr. J. Veits, FLI, Insel Riems
UM12F	AGC AAA AGC AGG	12	Dr. S. Weber, FLI, Insel Riems
M13-40for	TAA CGC CAG GGT TTT CCC AGT	21	Dr. J. Veits, FLI, Insel Riems
M13-48rev	GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG G	22	Dr. J. Veits, FLI, Insel Riems
SP6	CAT TTA GGT GAC ACT ATA G	19	Dr. J. Veits, FLI, Insel Riems
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	20	Dr. J. Veits, FLI, Insel Riems
EGFP12-F	TCG AGG GCG ACA CCC TG	17	(Hoffmann et al. 2005)

EGFP10-R	CTT GTA CAG CTC GTC CAT GC	20	(Hoffmann et al. 2005)
IVA-M_1for	AGA TGA GTC TTC TAA CCG AGG TCG	24	(Spackman et al. 2002)
IVA-M1.1rev*	TGC AAA AAC ATC TTC AAG T(Y)*T CTG	24	(Spackman et al. 2002)
Wise_M_4100_F	AGT GAT GTG CTC GGA CCT TC	20	(Wise et al. 2004)
Wise-M-4220-R	CCT GAG GAG AAG CAT TTG CTA	21	(Wise et al. 2004)

* modifiziert nach Hoffmann (unpubliziert); Y beschreibt eine Wobble-Sequenz (C / T)

Diese Primer wurden von der Firma MWG Biotech hergestellt.

Tab. 3: modifizierte DNA-Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz 5' - 3'	Nukleotide	veröffentlicht durch
EGFP-1-HEX	HEX-AGC ACC CAG TCC GCC CTG AGC A-BHQ1	22	(Hoffmann et al. 2005)
IVA-M_1-FAM-BHQ	FAM-TCA GGC CCC CTC AAA GCC GA-BHQ1	20	(Spackman et al. 2002)
Wise-M-4169-FAM	FAM-TTC TCT AGC AGT GGG ACA GCC TGC- BHQ1	27	(Wise et al. 2004)

Diese modifizierten DNA-Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech hergestellt.

3.1.10.2 Aminosäuren und Proteine

Aminosäuren und Proteine

Bovines Serum Albumin (BSA)

[¹⁴C]-Proteinmarker (14 bis 220 kDa)

Page Ruler Prestained Protein Ladder

Pansorbin[®] cells standardized

Protein A-Suspension (*Staph. aureus*)

[³⁵S]-markiertes Methionin

Hersteller

Promega

Amersham-Pharmacia

Fermentas

Calbiochem[®]

Hartmann Analytic GmbH

3.1.10.3 Enzyme und deren Puffer

Restriktionsendonuklease

<i>AflI</i>	New England Biolabs
<i>BamHI</i>	Promega
<i>BsmI</i>	Roche, bzw. New England Biolabs
<i>EcoRI</i>	Promega
<i>NcoI</i>	New England Biolabs
<i>NotI</i>	New England Biolabs
<i>SacI</i>	New England Biolabs

Enzyme

alkalische Phosphatase (CIP)	Roche
DNase I	Promega
Klenow-Fragment	New England Biolabs
Platinum [®] Pfx DNA Polymerase	Invitrogen
RNase A	Sigma-Aldrich [®] , bzw. Serva
RNasin	Promega
SP6 RNA-Polymerase	New England Biolabs
T4 DNA-Ligase	Roche
T7 RNA-Polymerase	Promega

Hersteller

3.1.10.4 Kits

Kit	Hersteller
BigDye [®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
ECL Western blotting detection reagents and analysis system	Amersham-Pharmacia
ID Screen [®] Influenza A Antibody Competition ELISA Kit	ID.Vet
ID Screen [®] Influenza N1 Antibody Competition ELISA Kit	ID.Vet
NucleoSpin [®] 96 Virus Core Kit	Macherey-Nagel
QIAamp [®] Viral RNA Mini Kit	Qiagen
QIAEX [®] II Kit	Qiagen
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Qiagen [®] Plasmid Purification Mini Kit	Qiagen

QIAGEN® OneStep RT-PCR Kit	Qiagen
QIAquick® Gel Extraktion Kit	Qiagen
QIAquick® Nucleotide Removal Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
RNA Transcription Kit	Stratagene
SigmaSpin™ Post-Reaction Clean-up Columns	Sigma-Aldrich
SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase	Invitrogen
TNT® Coupled Reticulocyte Lysate Systems	Promega

3.1.10.5 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Aceton	Roth
Acrylamid	BioRad
Agar (bacteriological grade)	MP Biomedicals Inc.
Agarose (electrophoresis grade)	Invitrogen™
Ampicillin	Roth
Amplify™ Fluorographic Reagent Code NAMP100	Amersham Biosciences Ltd.
APS	Sigma-Aldrich
Bicinchoninsäure	Sigma-Aldrich
Brennspiritus	Chemica GmbH
Bromphenolblau	Ferak
Cäsiumchlorid	Roth
Casein-Hydrolysat	Oxoid
Chloroform	Roth
DEPC	Roth
Dextrose (D-(+)-Glucose)	Sigma-Aldrich
Diethylether	Roth
Dikaliumhydrogenphosphat	Fluka
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth
DMEM Earle	Sigma-Aldrich
DMSO	Roth

EDTA	Roth
EGTA	Roth
Enrofloxacin (10 %) Baytril®	Bayer Health Care
Essigsäure	Roth
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
Evans blue	Sigma-Aldrich
fetales Kälberserum (FKS)	Sigma-Aldrich
Formaldehyd (37 %)	Roth
Formamid	Roth
Geneticin G418	Gibco (Invitrogen)
Gentamycin 50	Medistar
Glucose	Roth
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
Guanidin-Isothiocyanat	Roth
Hefeextrakt	Difco
Hexaminkobalt(III)chlorid	Roth
IGEPAL® CA-630	Sigma-Aldrich
Iod	Roth
Isoamylalkohol Rotipuran	Roth
Isopropanol	Roth
Kaliumacetat	Scharlau
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
Kaliumiodid	Roth
Kaliummorpholinoethansulfonsäure	Roth
Ketamin 10 %	Medistar
Kupfersulfat	Roth
LB-Agar (Lennox-L Agar)	Invitrogen
Lincomycin 200	Ceva Tiergesundheit
Lipofectamine™ 2000 Reagent	Invitrogen
Magermilchpulver	Hobbybäcker Versand
Mangan(II)-chlorid	Roth
MEM Earle	Gibco
MEM Glasgow BHK21	Sigma-Aldrich

MEM Hanks	Sigma-Aldrich
2-Mercaptoethanol	MP Biomedicals
Methanol	Roth
MOPS	Roth
Natriumacetat	Roth
Natriumazid	Roth
Natriumcarbonat	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Roth
Natriumhydrogencarbonat	Roth
Natriumhydroxid	Roth
Natriumpyruvat	Fluka
Natriumtartrat	Roth
nicht-essentielle Aminosäuren (NEAS)	Biochrom
Nuklease-freies Wasser (DEPC-behandelt)	Roth
Opti-Mem + GlutaMAX™	Gibco (Invitrogen)
Paraformaldehyd (PFA)	Roth
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich
PMSF	Roth
Roti®-Phenol	Roth
Rotiphorese® Gel 30	Roth
D(+)-Saccharose	Roth
Salzsäure	Roth
Sarkosyl (N-Lauroylsarcosin)	Sigma-Aldrich
SDS (ultra pure)	Roth
Sephadex G75	Pharmacia Fine Chemicals AB
Serdolit MB	Serva
TEMED	Fluka (Biochemika), bzw. Sigma-Aldrich
TRIS (ultra pure)	Invitrogen
Triton X	Sigma-Aldrich
Trypsin	Invitrogen
Tween® 20	Sigma-Aldrich
Wofasteril®	Kesla Pharma Wolfen GmbH
Xylazin 2 %	Bernburg Serumwerke
Xylencyanol	Roth

3.1.11 Geräte, Laborhilfsmittel

Gerät	Hersteller
Brutgeräte	J. Hemel Brutgeräte, Grumbach
Brutschränke für Bakterien und Zellen	Bachhofer, Heraeus
Bakterienschüttler (mehrere Modelle)	New Brunswick Scientific
Elektroblotapparatur Trans-Blot Semi-Dry	BioRad
Feinwaage, Analysenwaage BP310S	Sartorius
Fluoreszenzmikroskop Optiphot 2	Nikon
Fluoreszenzmikroskop IX 50	Olympus
Fluoreszenzmikroskop Axioskop 2	Zeiss
Gelelektrophoresekammern, horizontal	BioRad
Gel-Trockner Model 583	BioRad
Genetic Analyser 3130	Applied Biosystems
Gerät für Ultraschallbehandlung Branson Sonifer 450	Heinemann
Magnetrührer EM2, M30E	Framo
Mikrowelle 8018E	Privileg
pH-Meter	WTW
Phosphoimager FLA 3000	Fuji
Pipetten	Eppendorf
Radioaktivitäts-Handmessgerät LB 122	Berthold
Röntgenfilmkassetten	AGFA
Schüttler KL 2	Edmund Bühler
Schüttelheizblock Thermomixer 5436	Eppendorf
Sicherheitswerkbank Uniflow UVUB 1200	Uniequip
Spannungsgeräte	BioRad
Tischzentrifugen (5415 C; 5417 C)	Eppendorf
Transilluminator	Sera, Herolab
Optima TL Ultrazentrifuge	Beckmann
UV Crosslinker Stratalinker 1800	Stratagene
Vakuumtrockenofen LMM	Labor Müszeriparig Müvek
Verstärkerfolien Curix MR 800	AGFA
Vortex REAX 2000	Heidolph
Vortex Genie	Bachhofer
Waage	Sartorius
Wasserbad	GFL
Zentrifugen (Megafuge 1.0R; Multifuge 1S-R)	Heraeus sepatech

3.1.12 Verbrauchsmaterial

Material

Adhesive PCR Foil seals
Amersham Hybond™-N⁺ positiv geladene
Nylon Transfer Membran
BD Mikrotainer® SST™ Tubes
Blutagarplatten
Einmalpipetten
Kryokonservierungsgefäße
Micro-Platte, 96-well, F-Form
Micro-Platte, 96-well, U-Form
Parafilm
PCR-Tubes 0,2 ml
Pipettenspitzen
(DNase / RNase frei; mit / ohne Filter)
Röntgenfilme: Hyperfilm™ MP
Skalpellklingen
Spritzen und Kanülen
Stericup® Sterilfiltration
Thermo-Fast® 96, Non-Skirted
(96-well-PCR-Platte)
Thermowell™ Tubes 0,5 ml
Ultra Clear Cap Stripes
Whatman® Gel Blotting Papier
Whatman® Protran® Nitrocellulose Transfer
Membran
Zellkulturflaschen T25, T75
Zellkulturplatten (96, 48, 24, 12 & 6 well)
Zellschaber
Zentrifugengefäße

Hersteller

Thermo scientific, Abgene House
Amersham Bioscience Ltd.

Becton and Dickinson
Becton and Dickinson
Sarstedt
Greiner Bio-one
Greiner Bio-one
Greiner Bio-one
Pechiny Plastic Packaging
Biozym® Biotech Trading GmbH
Nerbe

Amersham Bioscience Ltd.
Aesculap
Terumo
Millipore
Thermo scientific, Abgene House

Corning Inc.
Thermo scientific, Abgene House
Schleicher & Schüll
Schleicher & Schüll

Becton & Dickinson; Falcon™; Corning Inc.
Corning Inc.
Sarstedt
Corning Inc.

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Eukaryontische Zellen wurden in H₂O gesättigter Atmosphäre bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

3.2.1.1 Präparation von Primärzellen aus Hühnerembryonen

Das künstliche Bebrüten von befruchteten, spezifisch pathogen freien (SPF)-Hühnereiern fand unter regelmäßigem Wenden 19 Tage bei 37,5° C und 50 % Luftfeuchtigkeit statt.

3.2.1.1.1 CEK-Zellen

Der Eröffnung der Eierschale folgte die sterile Entnahme der Embryonen, welche sofort dekapitiert wurden. Zur Gewinnung von primären Hühnernierenzellen (chicken embryo kidney cells, CEK), schloss sich die Präparation der Hühnernieren, die Zerkleinerung der Organe mit sterilem Besteck, sowie das Waschen mit Hanks Waschlösung an. Die zerkleinerten Organe wurden zweimal für 30 min. mit auf 37°C vorgewärmter Alsever's Trypsin-Versen-Lösung (ATV) unter Rühren inkubiert. Nach Filtration durch Gaze wurden die Suspensionen bei 1.200 rpm für 5 min. sedimentiert, der Überstand verworfen und das Zell-Sediment in ZB 22 Medium resuspendiert. Um eine bessere Haftung der Zellen zu erreichen, erfolgte die Aussaat auf mit steriler Gelatine-Lösung über Nacht vorinkubierten Kulturgefäßen. Die Zellen wurden nach Bildung eines konfluenten Zellrasens (ca. 24 Stunden) unter Verwendung des Mediums ZB 22 a infiziert.

3.2.1.1.2 CEF-Zellen

Auf die Eröffnung der Eierschale folgten die sterile Entnahme und die sofortige Dekapitation der Embryonen. Nach Entfernen der Augen wurden die Embryonen in einem Erlenmeyer-Kolben zweimal mit ZB 9d gewaschen und mit einer Schere zerkleinert. Dann wurde dreimal mit ZB 9d gewaschen, worauf sich zweimalige Inkubation mit ATV unter Rühren bei 37°C für jeweils 20 min. anschloss. Danach wurde die Zell-Suspension (chicken embryo fibroblast cells, CEF) mit ZB 5 auf ca. 50 ml pro Embryo aufgefüllt, und durch Gaze filtriert, um grobe Gewebstücke zu entfernen. Die Zellzahl wurde unter Nutzung einer Thoma-Kammer ermittelt und auf eine Konzentration von 10⁶ Zellen/ml eingestellt. Nach Bildung eines konfluenten Zellrasens (1 bis 2 Tage) wurden die Zellen unter Einsatz des Mediums ZB 5b infiziert.

3.2.1.2 Vermehrung von permanenten Zelllinien

3.2.1.2.1 Vermehrung von LMH-Zellen

Das Umsetzen der LMH-Zellen fand alle 3 bis 4 Tage durch Ablösen der Zellen mit ATV statt. Die Zellen wurden in ZB 5 Medium resuspendiert und im Verhältnis 1:2 bis 1:6 in neue Zellkulturflaschen oder im Verhältnis 1:2 auf Zellkulturgefäße umgesetzt und am Folgetag verwendet. Für Infektionen bzw. Transfektionen (3.2.1.3) der Zellen wurde das Medium ZB 5b verwendet.

3.2.1.2.2 Vermehrung von QM9-Zellen

Das Umsetzen der QM9-Zellen erfolgte alle 3 bis 4 Tage durch Ablösen der Zellen mit ATV. Die Zellen wurden in ZB 5 Medium resuspendiert und im Verhältnis 1:3 bis 1:6 in neue Zellkulturflaschen umgesetzt. Um die Zellen am Folgetag zu verwenden, wurden sie im Verhältnis 1:2 auf die benötigten Zellkulturgefäße umgesetzt. Bei Verwendung der Zellen erhielten diese das Medium ZB 5b.

3.2.1.2.3 Vermehrung von BHK-21/BSR/T7/5-Zellen

BHK-21/BSR/T7/5-Zellen wurden alle 3 bis 4 Tage umgesetzt. Durch etwa 10-minütige Inkubation mit ATV bei 37°C, erfolgte die Vereinzelnung der Zellen. Im Anschluss wurden die Zellen in ZB 23a Medium aufgenommen und in Zellkulturflaschen im Verhältnis 1:4 bis 1:6 ausgesät. Zur Aufrechterhaltung der T7-RNA-Polymerase exprimierenden Zellpopulation wurde dem Medium wöchentlich 20 µg /ml Geneticin zugesetzt. Zur Verwendung am Folgetag wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 in 6-well-Zellkulturgefäßen ausgesät. Die Inkubation transfizierter Zellen (3.2.1.4) erfolgte unter Verwendung des Mediums ZB 23a.

3.2.1.3 Transfektion eukaryontischer Zellen

Für die Transfektion eukaryontischer Zellen wurden am Vortag LMH-Zellen (3.2.1.2.1) 1:2 auf 6-well-Zellkulturschalen ausgesät. Dazu wurden 3 µg Plasmid-DNA mit Opti-MEM auf ein Volumen von 50 µl (Ansatz I) gebracht und leicht gemischt. Daneben wurde ein zweiter Ansatz mit 6 µl Lipofectamine 2000 und 44 µl Opti-MEM (DNA:Lipofectamine 2000 1:2) hergestellt und ebenfalls leicht gemischt. Die Ansätze wurden 5 min. bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen zwei Mal mit Opti-MEM (500 µl) gewaschen. Anschließend wurde Ansatz I mit Ansatz II gemischt und 20 min. bei RT inkubiert. Das Opti-MEM wurde von den Zellen entfernt und durch das Medium ZB 5b (2 ml) ersetzt. Die 100 µl DNA-Lipofectamine-Komplexe (Ansatz I und II) wurden langsam und gleichmäßig auf die Zellen getropft und vorsichtig durch Hin-und-Her-Schieben der Platte

verteilt. Nach 4 - 6 Stunden wurde das Medium abgesaugt, durch frisches ZB 5b ersetzt und die Inkubation für 24 bis 48 Stunden fortgeführt.

3.2.1.4 Transfektion zur Generierung rekombinanter ND-Viren

Mittels des reversen genetischen Systems wurde infektiöses NDV aus klonierter cDNA erzeugt (Römer-Oberdörfer et al. 1999). Dazu wurden am Vortag BHK-21/BSR/T7/5-Zellen (3.2.1.2.3) 1:2 auf 6-well-Zellkulturschalen ausgesät. Waren die Zellen zu ca. 80 % konfluent, wurde ein DNA-Mix (Ansatz I) aus pNDV-H9 (5 µg), pCiteNP (2 µg), pCiteP (2 µg), pCiteL (1 µg) in 250 µl Opti-MEM und ein 250 µl Ansatz II (mit 40 µl Lipofectamine 2000 und 210 µl Opti-MEM) hergestellt, jeweils leicht gemischt und 5 min. bei RT inkubiert. Die Ansätze wurden vereinigt und erneut für 20 min. bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen zwei Mal mit Opti-MEM (1000 µl) gewaschen. Vor dem langsamen Auftropfen der 500 µl DNA-Lipofectamine-Komplexe (Ansatz I und II) wurde das Opti-MEM von den Zellen entfernt und durch Medium ZB 23a (2.000 µl) ersetzt. Die Zellen wurden für 48 Stunden bei 37°C inkubiert, wobei nach 6 Stunden ein erneuter Mediumwechsel erfolgte. Zur Vermehrung potentiell entstandener infektiöser Viren wurde der Überstand, sowie die durch einen Frier-Tau-Zyklus aufgeschlossenen Zellen à 200 µl in die Allantois-Höhle 10 Tage alter, embryonierter SPF-Hühnereier inokuliert (3.2.2.1). Die Allantois-Flüssigkeit wurde geerntet (3.2.2.1) und die Anwesenheit infektiösen NDV mittels Hämagglutinationstest (3.2.2.3.1) bzw. nach Infektion von Zellkulturen mittels indirekten Immunfluoreszenz-Tests (3.2.11.2) geprüft.

3.2.2 Virusvermehrung und -reinigung, -titerbestimmung

3.2.2.1 Virusvermehrung, Eikultur

Bebrüten der SPF-Eier

Die Eier wurden vor Einlage in das Brutgerät einer Oberflächendesinfektion im Tauchbad mit 0,3 %iger Wofasteril®-Lösung unterzogen. Die Inkubation der Eier erfolgte bei 37,5°C und 50 % Luftfeuchtigkeit unter regelmäßigem Wenden. Vor Verwendung der Eier wurde die Vitalität der Embryonen mittels einer Schierlampe geprüft.

Virusvermehrung im Ei

Sowohl für APMV-1 als auch für AIV ist die Vermehrung im embryonierten Hühnerei die Methode der Wahl, da vergleichbare Vermehrungsbedingungen in der Zellkultur bislang nicht erreicht werden konnten. Die Vermehrung genannter Viren erfolgte in der Allantois-Höhle 10 Tage alter, embryonierter Hühnereier. Dazu wurden die Eier mit Jod-Lösung am stumpfen Pol desinfiziert und zentral ein kleines Loch in die Schale gebohrt. Durch dieses Loch wurde das Virus in einem Volumen von 200 µl mittels Spritze und Kanüle in die Allantois-Höhle

inokuliert. Die Öffnung wurde mit Kerzenwachs verschlossen und anschließend unter den oben genannten Bedingungen 5 Tage weiter inkubiert. Zur Prüfung der Vitalität der Embryonen wurden die Eier ab der 24. Stunde nach Beimpfung, sowie zweimal täglich geschickt. Eier deren Embryonen abgestorben waren, sowie bei der abschließenden Durchleuchtung 120 Stunden nach Beimpfung auch Eier mit überlebenden Embryonen, wurden vor der Ernte der Allantois-Flüssigkeit zunächst über Nacht im Kühlschrank (4°C) gelagert.

Ernte der Allantois-Flüssigkeit

Unter sterilen Bedingungen wurden die Eier am stumpfen Pol mit einer Schere eröffnet und die Eierschale und Eihaut abgehoben. Mit einer sterilen Pipette wurde die Allantois-Flüssigkeit abgesaugt und in einem 15 ml Zentrifugengefäß überführt. Zur Überprüfung der Keimfreiheit wurde ein Tropfen der Allantois-Flüssigkeit auf einer Blutagarplatte ausgestrichen und bei 37°C für 3 Tage inkubiert. Die Allantois-Flüssigkeit wurde für 5 min. bei 3.000 rpm zentrifugiert, die geklärte Allantois-Flüssigkeit in ein frisches Gefäß überführt und bei -70°C gelagert.

3.2.2.2 Präparation von Virionen

Um Virionen zu präparieren, wurde frisch geerntete und geklärte Allantois-Flüssigkeit (3.2.2.1) NDV- bzw. AIV-infizierter Eier verwendet. Dazu wurden die Viren aus der Allantois-Flüssigkeit mittels Ultrazentrifugation (Rotor TLA 55) bei 45.000 rpm, für 2 min. sedimentiert. Das Sediment wurde in TEN-Puffer gelöst und die Virionen in einem kontinuierlichen CsCl-Gradienten (20-45 % in TEN; 1,75 ml je Verdünnung) für eine Stunde bei 27.000 rpm und 4°C separiert. Die Virionen-haltige Bande wurde im Streulicht vorsichtig abgesaugt, in einen Dialyseschlauch überführt und zweimalig 24 Stunden gegen PBS-Puffer dialysiert. Schließlich wurde der Proteingehalt (3.2.2.4) der Virionenpräparation bestimmt. Die gereinigten Virionen wurden im Anschluss in der Western Blot-Analyse (3.2.11.1) und in der Immun-Elektronenmikroskopie (3.2.11.4) untersucht.

3.2.2.3 Bestimmung des Virusgehaltes

3.2.2.3.1 Hämagglutinationstest

Im Hämagglutinationstest wird die Fähigkeit einiger Viren (z.B. Orthomyxoviren, Paramyxoviren) durch ihre Oberflächenantigene Erythrozyten bestimmter Art zu vernetzen (Hämagglutination) genutzt (Rolle und Mayr 2002).

Der Test wurde entsprechend dem OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines (OIE 2009b) durchgeführt. In eine 96-well-U-Boden-Platte wurden in jede Vertiefung 25 µl PBS vorgelegt. In die erste Reihe wurden je 25 µl der zu testenden

Flüssigkeiten (z.B. Allantois-Flüssigkeit) bzw. PBS als Negativkontrolle pipettiert. Beginnend mit den 1:2 verdünnt vorliegenden Proben wurden je 25 µl über die Platte titriert und somit eine Verdünnungsreihe in 2er-Stufen hergestellt. Im Anschluss erhielt jede Vertiefung weitere 25 µl PBS sowie 25 µl einer 1 %igen Hühnererythrozyten-Suspension. Der Test war nach 30-40 min. bei RT oder 60 min. bei 2 - 8°C durch schräges Halten der Platte auszuwerten, wenn bei der Erythrozytenkontrolle eine tropfenförmige Strömung der Erythrozyten zu erkennen war. Eine positive Reaktion lag vor, wenn sich die Erythrozyten durch die Vernetzung nicht absetzten und somit nicht abliefen. Die höchste Verdünnung, die eine Agglutination verursachte, gab den Titer an und enthielt definitionsgemäß eine hämagglutinierende Einheit.

3.2.2.3.2 Zellkultur-infektiöse Dosis 50 (tissue culture infectious dose 50, TCID₅₀)

Die TCID₅₀ dient der Infektiositäts-Bestimmung eines Virus in Zellkultur, und gibt den Virustiter wider, bei dem 50 % der Zellen infiziert werden. Es handelt sich um eine Endpunktbestimmung mittels Verdünnungsverfahren (Allan und Hebert 1968).

Zur Bestimmung der TCID₅₀ wurden ein Tag zuvor Zellkulturen angelegt, so dass sie zum Zeitpunkt der Infektion konfluent waren. Das Virus-haltige Ausgangsmaterial wurde in geeignetem Medium logarithmisch verdünnt, je 100 µl der Verdünnungen auf 4 Wells einer 96-well-Zellkulturplatte verbracht und für 18 bis 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Fixierung der Zellen mit Methanol-Aceton wurden die infizierten Zellen mittels indirekten Immunfluoreszenztests (3.2.11.2) nachgewiesen. Die in der Ausgangssuspension vorhandene Virusmenge wurde nach der Formel von Spearman-Kärber (Spearman 1908; Kaerber 1931) berechnet und als TCID₅₀ angegeben.

$$\log \text{TCID}_{50} = -L_1 - L_{\text{int}} (S - 0,5)$$

L₁ Logarithmus der höchsten Verdünnungsstufe mit der Reaktionsrate R (Positive / Gesamtzahl einer Verdünnungsstufe) = 1,0

L_{int} Logarithmus des Verdünnungsintervalls (bei Zehnerverdünnung = 1)

S Summe der Reaktionsraten aller Verdünnungsstufen ≥ L₁

0,5 Konstante

3.2.2.3.3 Berechnung der Infektionsdosis für Zellen (MOI)

Die Abkürzung MOI steht für „multiplicity of infection“ (Vielfachheit der Infektion) und beschreibt das zahlenmäßige Verhältnis von infektiösen Viruspartikeln zu Zielzellen. Die Berechnung der MOI erfolgte auf Basis des ermittelten TCID₅₀-Wertes (3.2.2.3.2) des Virus.

Folgende Formel kam zur Anwendung:

$$\text{MOI} = [(\text{Anzahl Zellen}) / (\text{TCID}_{50}\text{-Wert des Virus})] \times 2$$

Da der TCID₅₀-Wert sich nur auf 50 % der infizierten Zellen bezieht, wurde mit dem Faktor 2 multipliziert.

3.2.2.3.4 Ei-infektiöse Dosis 50 (egg infectious dose 50, EID₅₀)

Die EID₅₀ bezeichnet die Infektiosität eines Virus im Ei und wird entsprechend der TCID₅₀ (3.2.2.3.2) ermittelt. Dafür wurden Verdünnungen des Virus in sterilem PBS von 10⁻¹ bis 10⁻¹¹ hergestellt und jeweils auf eine definierte Anzahl an SPF-Eiern wie unter (3.2.2.1) verimpft und geerntet. Die Allantois-Flüssigkeiten wurden im Hämagglutinationstest (3.2.2.3.1), bzw. nach Infektion von Zellen mittels indirekten Immunfluoreszenztests (3.2.11.2) auf die Präsenz von Virus überprüft. Die Berechnung der EID₅₀ erfolgte analog zur TCID₅₀ (3.2.2.3.2).

3.2.2.4 Bestimmung des Proteingehaltes

Zur Bestimmung des Proteingehaltes einer Lösung nach Smith-Adams wurde eine Eichreihe mit definiertem Proteingehalt (von 0 bis 16 µg) unter Verwendung von bovinem Serum Albumin (BSA) erstellt, an Hand derer die Proteinkonzentration ermittelt werden konnte. Dazu wurden je 20 µl Lösung der Probe bzw. der Eichlösung zu je 1 ml der Gebrauchslösung (20 µl Lösung B je ml Lösung A) hinzugefügt, für 30 min. bei 60°C inkubiert und nach Abkühlung auf RT die Extinktion bei 562 nm photometrisch bestimmt (Smith et al. 1985).

3.2.2.5 Wachstumskinetik

Für die Bestimmung der Wachstumskinetik wurden 60 SPF-Eier mit lebenden Embryonen mit 10² EID₅₀ des Virus pro 200 µl nach dem unter Virusvermehrung (3.2.2.1) beschriebenen Schema beimpft. Zu den Zeitpunkten 0, 12, 24, 36, 48, 60, bzw. 72 Stunden nach der Beimpfung wurden je 4 Eier mit lebenden Embryonen in 4°C verbracht und am Folgetag die Allantois-Flüssigkeiten (3.2.2.1) der vier zu einer Zeiteinheit gehörenden Eier geerntet, zusammengeführt (poolen) und in zwei Portionen bei -70°C gelagert. Der Gehalt an Nachkommenviren wurde durch die Bestimmung der TCID₅₀ (3.2.2.3.2) der gepoolten Allantois-Flüssigkeiten ermittelt und der Durchschnittswert aus zwei unabhängigen Versuchen berechnet.

3.2.3 Isolierung von Nukleinsäuren

3.2.3.1 Präparation von Gesamtzell-RNA

Infizierte und nicht infizierte Zellen wurden für die Präparation von Gesamtzell-RNA einmal mit PBS gewaschen und durch Überschichten mit $1 \text{ ml} / 10^7$ Zellen Guanidin-Isothiocyanat-Lösung (Chomczynski und Sacchi 1987) lysiert. Die Zell-Lysate wurden in ein 15 ml Zentrifugen-Röhrchen überführt, mit einem Zehntel Volumen Natriumacetat (2 M, pH 4,0), einem Volumen Phenol und einem Fünftel Volumen IAC (Isoamylalkohol-Chloroform-Lösung) versetzt und durch Invertieren gemischt. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Ansätze bei 4.000 rpm und 4°C für 30 min. zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen, mit einem Volumen Isopropanol versetzt und die RNA bei -20°C über Nacht präzipitiert. Durch Zentrifugieren über 30 min. bei 6.000 rpm und 4°C sedimentierte die RNA. Nach Waschen des Sedimentes mit 70 %igem Ethanol und erneutem Zentrifugieren bei 6.000 rpm und 4°C für 5 min. wurde die RNA bei 37°C getrocknet, in DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen und bei -70°C gelagert.

3.2.3.2 Präparation von viraler RNA

Die Präparation viraler RNA aus geklärter Allantois-Flüssigkeit infizierter Eier erfolgte unter Verwendung des QIAamp Viral RNA Mini Kit nach Anweisung des Herstellers (QIAamp® Viral RNA Mini Handbook, 3rd Ed, 2007). Es wurde das Zentrifugen-Protokoll verwendet. Das Prinzip der RNA-Präparation umfasst dabei die Lyse der Probe unter stark denaturierenden Bedingungen und die Bindung der RNA an eine Silikamembran. Nach Waschschrinen, zur Entfernung von Proteinen, Nukleasen und andere Kontaminanten oder Inhibitoren wird die RNA wieder eluiert. Diese wurde in einem adäquaten Volumen RNase-freiem Wasser aufgenommen, nach Konzentrationsbestimmung (3.2.3.8) portioniert und bei -70 °C gelagert.

3.2.3.3 Anzucht und Präparation von Plasmid-DNA

3.2.3.3.1 Anzucht Plasmid-DNA tragender Bakterien

Die Anzucht Plasmid-DNA tragender Bakterienklone aus Einzelkolonien erfolgte unter Zusatz selektiver Antibiotika in ca. 2,2 ml LB-Medium über Nacht bei 37°C für eine Minipräparation (3.2.3.3.2). Zur Gewinnung reinerer Plasmid-DNA in größeren Mengen wurde eine Maxipräparation (3.2.3.3.2) durchgeführt. Dazu wurden die gewünschten Bakterienklone auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen und eine einzelne Kolonie in 2 ml LB-Medium über Tag bei 37°C angezogen. Eine größere Kultur von 200 bis 500 ml Medium wurde mit 1/1000 dieser Vorkultur beimpft und über Nacht bei 37°C vermehrt. Die Anzucht erfolgte in allen Schritten unter Zusatz selektiver Antibiotika.

3.2.3.3.2 Präparation von Plasmid-DNA

Die Plasmid-Isolation aus Bakterien erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly 1979).

Minipräparation

Nach Anzucht Plasmid-DNA-tragender Bakterien wurden 1,8 ml der Bakteriensuspension für 5 min. bei 5.000 rpm zentrifugiert und das Sediment in 200 µl DNA-Mini-Präparation Lösung I resuspendiert. Die Zugabe von 200 µl DNA-Mini-Präparation Lösung II hatte die Lyse der Bakterien, sowie die Denaturierung der Plasmid-DNA zur Folge. Zur Renaturierung der Plasmid-DNA wurden 200 µl DNA-Mini-Präparation Lösung III hinzugefügt und invertiert. Anschließend wurde der Ansatz bei 14.000 rpm für 5 min. sedimentiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Durch Zugabe von ca. 400 µl Isopropanol (3.2.3.6) wurde die DNA gefällt und in 20 – 50 µl Wasser aufgenommen. Zur Charakterisierung der Plasmide wurden die Restriktionsanalyse (3.2.8) und gegebenenfalls eine Sequenzierung (3.2.7) durchgeführt.

Maxipräparation

Die Maxipräparation wurde mit Hilfe des QIAfilter Plasmid Maxi Kit (Qiagen®) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.2.3.4 Aufreinigung von DNA aus wässrigen Lösungen

Um die DNA nach der, in der PCR (3.2.6) erfolgten Amplifikation von Primern, Proteinen und Salzen zu reinigen, wurde das QIAquick PCR Purification Kit der Firma Qiagen® eingesetzt und nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Das Prinzip dieser Reinigung macht sich die unterschiedlich starke Bindung von DNA, RNA und Proteinen an die Silikamembran der Anionentauschersäule zu Nutze. Durch den pH-Wert und die Ionenstärke des Waschpuffers werden Proteine und RNA gelöst. Danach kann die DNA eluiert werden. Anschließend wurde die DNA mit Isopropanol (3.2.3.6) gefällt.

3.2.3.5 Phenol / Chloroform-Extraktion

Diese Methode wurde für die Reinigung von DNA nach der enzymatischen Restriktion verwendet und nutzt das von Kirby (Kirby 1956) beschriebene Prinzip. Der Restriktionsansatz wurde in seinem Volumen mit Wasser auf mindestens 300 µl erhöht und nacheinander mit einem Volumen Phenol (dieser Ansatz wurde 5 min. auf Eis gekühlt), einem Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1, v/v) und einem Volumen IAC ausgeschüttelt. Dazwischen wurde jeweils bei 14.000 rpm zentrifugiert, um eine schnelle und deutliche Phasentrennung zu erreichen. Die Nukleinsäure-haltige wässrige Phase wurde nach jedem Zentrifugieren in ein neues Gefäß überführt. Anschließend wurde

die DNA mit Ethanol gefällt und in einem geeigneten Volumen TE-Puffer (pH-Wert: 8,0) aufgenommen.

3.2.3.6 Alkohol-Fällung

Das Prinzip der Alkohol-Fällung von DNA beruht auf dem Effekt des Lösungsmittelentzuges und erfolgt bei hohen Salzkonzentrationen (Aussalz-Effekt) in Alkohol (Eickbush und Moudrianakis 1978).

Ethanol-Fällung (auch Ethanol-Präzipitation) (Geiduschek und Gray 1956)

Zur DNA-Lösung wurden 1 / 10 Volumen Natriumacetat (3M, pH 4,8 – 5,2) und drei Volumen Ethanol hinzugefügt und gemischt. Die DNA wurde für 30 min. bei -20°C gefällt, durch Zentrifugieren bei 14.000 rpm für 20 min. sedimentiert und anschließend mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren für 5 min. bei 14.000 rpm wurde die DNA getrocknet und anschließend in TE-Puffer oder Wasser aufgenommen.

Isopropanol-Fällung

Wurde Isopropanol zur DNA-Fällung verwendet, wurde der DNA-Lösung 0,7 Volumen zugesetzt und für 15 min. bei RT inkubiert. Die DNA wurde, wie oben beschrieben zentrifugiert, mit 70 %igem Ethanol gewaschen und in einem geeignetem Volumen TE-Puffer oder Wasser aufgenommen.

3.2.3.7 Präparative Agarosegelelektrophorese

Die Isolierung von DNA aus Agarosegelen diente der Gewinnung einzelner Fragmente nach Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen (3.2.8). Nach gelelektrophoretischer Auftrennung (3.2.4.1) wurden diese unter langwelligem UV-Licht ausgeschnitten. Es wurden zwei verschiedene Verfahren eingesetzt, um die im Agarosegel enthaltenen DNA-Fragmente aus dem Gel zu extrahieren.

Zum einen wurde nach dem Prinzip der Phenol / Chloroform-Extraktion (3.2.3.5) verfahren. Hierbei wurde das Agarosegel mit der darin enthaltenen DNA in einem Gefäß mit einem Glasstab zerdrückt und mit einem Volumen Phenol gründlich gemischt (Vortex-Gerät). Das Gemisch wurde für 30 sec in flüssigem Stickstoff gefroren und direkt im Anschluss bei 14.000 rpm über 25 min. zentrifugiert, wonach eine deutliche Phasentrennung zu erkennen war. Mit der wässrigen Phase wurde, wie unter Phenol / Chloroform-Extraktion (3.2.3.5) beschrieben, weiter verfahren, eine Alkohol-Fällung (3.2.3.6) angeschlossen und die DNA in einem geeigneten Volumen TE-Puffer (pH-Wert: 7,4) aufgenommen.

Zum anderen wurde das QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen) verwendet. Das Prinzip dieses Kits beruht auf der Bindung von DNA an Silikakügelchen in Anwesenheit hoher Konzentrationen chaotroper Salze (Vogelstein und Gillespie 1979). Es folgten Waschschr

mit einem Salz-Ethanol-Puffer und anschließend wurde mit TE-Puffer oder DEPC-behandeltem Wasser eluiert.

3.2.3.8 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

In einem Photometer wurden zur Bestimmung von Konzentration und Reinheit der Nukleinsäuren UV-Absorptionsspektren von 220 bis 320 nm aufgenommen.

Die Berechnung der Nukleinsäurekonzentration nach Lambert-Beer erfolgte aus der Extinktion bei 260 nm,

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

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

Über den Quotienten OD_{260} / OD_{280} wurde die Reinheit der Nukleinsäurelösungen bestimmt. Dieser Wert beträgt bei reinen DNA- bzw. RNA-Lösungen $\geq 1,7$.

3.2.4 Agarosegelelektrophorese und Membrantransfer von Nukleinsäuren

3.2.4.1 Neutrale Agarosegele (DNA-Gele)

Die Auftrennung linearisierter DNA nach ihrer Größe erfolgte elektrophoretisch in horizontalen Agarosegelen (Thorne 1966; Helling et al. 1974). Die Porengröße der Agarosegelmatrix wurde mittels Variation der Agarosekonzentration (0,8 % bis 2 % (w/v)) an die Größe der zu trennenden Fragmente angepasst.

Durch Aufkochen in TAE-Puffer wurde die gewünschte Menge an Agarose gelöst. Nach Abkühlung auf weniger als 60°C wurde Ethidiumbromid (0,3 $\mu\text{g/ml}$ Konzentration im Gel) hinzugefügt, das Gel in die Apparatur gegossen und nach Polymerisation in der Elektrophoresekammer mit TAE-Puffer überschichtet. Die zu untersuchende DNA wurde vor dem Auftragen mit DNA-Probenpuffer (Loading Dye) versetzt. Daneben wurde ein Standard (DNA-Marker) mitgeführt, an Hand dessen die Größen der Fragmente bestimmt werden konnten. Das im Gel enthaltene Ethidiumbromid interkaliert mit der DNA, so dass die Fragmente unter UV-Licht (316 nm) als fluoreszierende Banden (Sharp et al. 1973) sichtbar wurden und zur Dokumentation fotografiert oder einzelne Fragmente zur DNA-Isolierung (3.2.3.7) ausgeschnitten werden konnten (Waring 1965; Le Pecq und Paoletti 1966).

3.2.4.2 Formaldehyd-Gele (RNA-Gele)

Formaldehyd-Gele sind denaturierende Gele, die zur Trennung von RNA verwendet wurden. Die gewünschte Menge an Agarose (0,8 %) wurde durch Aufkochen in 180 ml DEPC-behandeltem Wasser gelöst. Formalin (3 %) und 10-fach konzentrierter MAE-Puffer (10 %) wurden nach Abkühlen auf weniger als 50°C hinzugefügt und das Gel zur Polymerisation in

die Apparatur gegossen. Vor dem Auftragen der RNA-Proben wurde das Gel einem 30-minütigen Vorlauf bei 50 V in MAE-Puffer unterzogen. Es wurden 5 µg Gesamtzell-RNA bzw. ein RNA-Marker (nach Angaben des Herstellers) mit fünf Volumen RNA-Probenpuffer versetzt und für 15 min. bei 65°C denaturiert. Die Proben wurden auf Eis abgekühlt, kurz anzentrifugiert und auf das Gel geladen. Die Trennung erfolgte über 16 Stunden bei 35 V. Durch das im Probenpuffer enthaltene Ethidiumbromid wurde die RNA auf einem UV-Transilluminator sichtbar. Der RNA-Marker erlaubte die Größenbestimmung der Fragmente. Zur Dokumentation der Laufstrecke für anschließende Northern Blot-Analysen (3.2.4.3) wurde das Gel mit angelegtem Lineal fotografiert.

3.2.4.3 Northern Blot-Analyse

Infektion der Zellen

Zur Gewinnung von viraler RNA wurden CEK-Zellen mit den entsprechenden Viren mit einer MOI von 10 infiziert und für 2 Stunden bei 37°C inkubiert, im Anschluss das Virus-haltige Medium abgesaugt und durch frisches Medium (ZB 22) ersetzt. Nach weiteren 6 Stunden bei 37°C wurden die Zellen geerntet und die Gesamtzell-RNA präpariert (3.2.3.1).

Northern Blot-Analyse

Für die Übertragung von gelelektrophoretisch (3.2.4.2) getrennter RNA auf eine Nylon-Membran wurde die Nylon-Membran und drei Filterpapiere auf Gelgröße, sowie ein Filterpapier auf Gelbreite und doppelte Länge zugeschnitten.

Über eine mit SSC-Puffer (20x)-gefüllte Wanne wurde eine Glasplatte platziert und das SSC-getränkte, lange Filterpapier so darüber gelegt, das beide Enden in den Puffer eintauchten. Anschließend wurden nacheinander das Gel, die in Wasser angefeuchtete Nylon-Membran, sowie zwei feuchte und ein trockenes Filterpapier blasenfrei aufgelegt. Abschließend wurden ein ca. 10 cm hoher Zellstoff-Stapel, sowie eine weitere Glasplatte und ein Gewicht aufgeschichtet und über Nacht stehen gelassen. Durch die Kapillarkräfte wurde der Puffer nach oben gesogen, wobei die RNA aus dem Gel zur Membran wanderte. Um die RNA kovalent an die Nylon-Membran zu binden, wurde eine Bestrahlung unter UV-Licht angeschlossen („crosslinking“). Die Markerbanden waren im UV-Licht durch das im Probenpuffer enthaltene Ethidiumbromid erkennbar und wurden angezeichnet. Die Blot-Membranen wurden entweder sofort zur Hybridisierung (3.2.5.3) verwendet oder für 2 Stunden bei 80°C unter Vakuum getrocknet.

3.2.5 Northern Blot-Hybridisierung

3.2.5.1 *in vitro*-Synthese radioaktiver cRNA

Zur Synthese von cRNA wurden die gewünschten DNA-Fragmente in Plasmid-Vektoren kloniert, deren „multiple cloning site“ von T7-, SP6- oder T3-Promotorsequenzen flankiert waren. Durch den Einsatz der entsprechenden RNA-Polymerasen konnten *in vitro* strangspezifische cRNAs synthetisiert werden. Die cRNA-Synthese erfolgte mit Hilfe des RNA Transcription Kit unter Verwendung von 2 µg des entsprechenden Plasmids. An Stelle von UTP wurden zur radioaktiven Markierung 5 µl [α -³²P] UTP verwendet und der Ansatz eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend folgte der Verdau der Plasmid-DNA durch Zugabe von 10 U DNase I (RNase frei) über 15 min. bei 37°C.

3.2.5.2 Reinigung der Sonden

Um nicht eingebaute Radionukleotide abzutrennen, wurde das Prinzip der Gelfiltration angewendet. Dazu wurde eine 1 ml Spritze mit Glasfaserfilter abgedichtet, wiederholt mit einer Sephadex G75-Suspension (10 mM TE-Puffer, 0,02 % (w/v) Natriumazid) gefüllt und für 2 min. bei 2.000 rpm, in einem Zentrifugen-Röhrchen hängend zentrifugiert, bis die verdichtete Gelmatrix die Spritze auf 1 ml ausfüllte. Der unter (3.2.5.1) hergestellte *in vitro*-Transkriptionsansatz wurde mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 100 µl erhöht, auf die Gelmatrix (Säule) gegeben und 2 min. bei 2.000 rpm zentrifugiert. Nicht eingebaute Radionukleotide verblieben in der Matrix der Säule, während die höhermolekularen markierten Nukleinsäuren die Matrix passierten und sich im Eluat befanden. Die Radioaktivität des Eluates wurde mit einem Handmessgerät ermittelt.

3.2.5.3 Hybridisierung

Vor der Hybridisierung wurde die geblottete Membran (3.2.4.3) in 2x SSC-Puffer eingeweicht und im Rollerrohr über Nacht bei 54°C mit Hybridisierungspuffer 1, der zuvor kurz aufgeköcht wurde, inkubiert. Die radioaktiv markierte Sonde wurde in Hybridisierungspuffer 2 für 5 min. bei 100°C denaturiert und zur Membran gegeben, welche unter gleichen Bedingungen erneut über Nacht inkubiert wurde. Es folgten zwei Waschschrte über je 30 min. bei 54°C mit vorgewärmtem SSC-Puffer (2x / 0,5 % SDS), um unspezifisch gebundene Sonden von der Membran zu entfernen. Die Membran wurde anschließend mit SSC-Puffer (2x) gespült und zum Verdau einzelsträngiger RNA mit SSC-Puffer (2x), der 1 µg/ml RNase A enthielt, bei RT für 20 min. inkubiert. Die folgenden Waschschrte mit SSC-Puffer (0,1x / 0,5 % SDS) bei 65°C über 20 min. wurden so oft durchgeführt, bis in der Waschlösung keine Radioaktivität mehr nachweisbar war. Die auf Filterpapier getrocknete Membran wurde in

Haushaltsfolie eingewickelt und zur Exposition von Röntgenfilmen mit Verstärkerfolien über 1-14 Tage bei -70°C gelagert.

3.2.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Primerdesign

Für das Design von Primern wurden Sequenzen mit einer Mindestlänge von 17 bis 22 Nukleotiden ausgewählt. Diese Bereiche sollten weder die Tendenz zur Ausbildung von Sekundärstrukturen (Haarnadelstruktur) aufweisen, noch zu Dimer-Bildung neigen. Die Berechnung der Schmelztemperatur (T_m) erfolgte nach der Wallace-Regel:

$$T_m = 4x (G + C) + 2x (A + T)$$

Die Hybridisierungstemperatur wurde durch den Abzug von 0 bis 10 °C von der Schmelztemperatur bestimmt und bei Bedarf in einer Gradienten-PCR optimiert.

PCR

Die Ansätze, in der Regel 50 µl, enthielten:

10,0 % (v/v)	10x Pfx Amplifikations-Puffer
1 mmol	MgSO ₄
300 µmol	dATP
300 µmol	dCTP
300 µmol	dGTP
300 µmol	dTTP
10-100 ng	Template-DNA
300 pmol	Primer 1
300 pmol	Primer 2
1 U	Platinum [®] Pfx Polymerase

und wurden mit Wasser (dest.) aufgefüllt.

Temperaturprofil			
Aktivierung Polymerase, Denaturierung	94°C	2 min.	30-40 Zyklen
Denaturierung	94°C	15 sec	
Primer-Hybridisierung	55-60°C	30 sec	
Elongation	68°C	1 min./kb	
terminale Elongation	68°C	5-10 min.	

Die Amplifikationsprodukte wurden anschließend in der Agarosegelelektrophorese (3.2.4.1) analysiert und gegebenenfalls zur Weiterverwendung aus dem Gel isoliert (3.2.3.7), Phenol-extrahiert (3.2.3.5) und Ethanol-präzipitiert (3.2.3.6) oder sequenziert (3.2.7).

RT-PCR

Für die RT-PCR wurde das QIAGEN® OneStep RT-PCR Kit verwendet. Der Ansatz enthielt:

20,0 % (v/v)	OneStep 5x RT-PCR Puffer
4,0 % (v/v)	OneStep RT-PCR Enzyme Mix
400 µmol	dATP
400 µmol	dCTP
400 µmol	dGTP
400 µmol	dTTP
1 – 50 ng	Template-RNA
600 pmol	Primer 1
600 pmol	Primer 2
5 – 10 U/Reaktion	RNase-Inhibitor

und wurde auf 50 µl mit Wasser (RNase frei) aufgefüllt.

Temperaturprofil			
reverse Transkription	50°C	30 min.	
Aktivierung der Taq Polymerase; Inaktivierung der reversen Transkriptasen	95°C	15 min.	
Denaturierung	94°C	30 sec	30-40 Zyklen
Primer-Hybridisierung	55-60°C	30 sec	
Elongation	72°C	1 min./kb	
terminale Elongation	72°C	10 min.	

Mit den Amplifikationsprodukten wurde wie unter PCR beschrieben weiter verfahren.

Mutagenese-PCR

Um eine Punktmutation, Deletion oder Insertion in einem Plasmid zu generieren, wurde das QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) verwendet. Das Primerdesign richtete sich nach den Empfehlungen des Herstellers. Der Ansatz enthielt:

10 % (v/v)	10x Reaktionspuffer*
10 ng	Plasmid-DNA
125 ng	Oligonukleotid-Mutagenese-Primer 1
125 ng	Oligonukleotid-Mutagenese-Primer 2
2 % (v/v)	dNTP-Mix*
6 % (v/v)	QuikSolutionReagent*
2,5 U	<i>PfuUltra</i> HF DNA Polymerase*

und wurden mit Wasser (dest.) auf 50 µl aufgefüllt. *(Bestandteile des Kits)

Temperaturprofil			
Aktivierung Polymerase, Denaturierung	95°C	1 min.	
Denaturierung	95°C	50 sec	18 Zyklen
Primer-Hybridisierung	60°C	50 sec	
Elongation	68°C	1 min./kb	
terminale Elongation	68°C	7 min.	

An die Mutagenese-PCR schloss der Verdau der parentalen DNA und die Transformation der mutierten Plasmid-DNA in XL 10-Gold[®] ultrakompetente Zellen nach Angaben des Herstellers an.

3.2.7 Sequenzierung

Das Prinzip der hier verwendeten Sequenzierung beruht auf der Kettenabbruch-Methode nach Sanger (Sanger et al. 1977).

Neben den „regulären“ Bestandteilen der DNA (Desoxyribonukleotide, dNTP) ist auch ein kleiner Anteil (1 %) Didesoxyribonukleotide (ddNTP) im Reaktionsansatz enthalten. Wird ein solches Molekül eingebaut, bricht die Synthese ab. Die ddNTPs sind an ihrer Base mit verschiedenen, individuell zugeordneten Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgt als Parallelanalyse der vier markierten Nukleotide in einem Gesamtansatz. Als Template wurden Plasmid-DNA oder gereinigte PCR-Produkte eingesetzt. Der Reaktionsansatz enthielt:

Big Dye Ready Reaction Mix*	2 µl
5x Sequencing buffer*	1 µl
Primer	5 pmol
Template-dsDNA	150-300 ng
oder PCR-Produkt (1.000 – 2.000 bp)	20-50 ng

* Bestandteile des Kits BigDye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing und wurde mit Wasser (dest.) auf 10 µl aufgefüllt.

Temperaturprofil			
Aktivierung Polymerase	96°C	1 min.	25-30 Zyklen
Denaturierung	96°C	15 sec	
Annealing	55°C	5 sec	
Elongation	60°C	4 min.	

Um nicht eingebaute fluoreszierende ddNTPs zu entfernen, wurde das Ansatzvolumen verdoppelt und über SigmaSpin[™] Post-Reaction Clean-up Columns nach Anweisung des Herstellers gereinigt. 10 µl des gereinigten Ansatzes wurden mit dem gleichen Volumen Formamid versetzt, die DNA für 5 min. bei 99°C denaturiert und sequenziert (Genetic Analyser 3130 (Applied Biosystems)). Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte über die SeqLab-Oberfläche des GCG Software Package, Version 11.1.3-Unix (Accelrys Inc., San Diego, CA).

3.2.8 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

(Smith und Wilcox 1970)

Um doppelsträngige DNA zu charakterisieren, bedient man sich der enzymatischen Aktivität von Restriktionsendonukleasen, die an spezifischen Sequenzfolgen spalten. Nach der Spaltung entstehen so glatte („blunt ends“) und überhängende („sticky ends“) Enden. Restriktionsanalysen wurden in 20 bis 50 µl-Ansätzen durchgeführt. Für die Spaltung von 1 µg DNA wurden 5 - 10 U Enzym in dem vom Hersteller gelieferten Puffer eingesetzt. Dabei wurde das Volumen der Enzymlösung $\leq 10\%$ des Gesamtansatzes gehalten. Für eine vollständige Spaltung wurde der Ansatz in der Regel für 1 Stunde bei der für das Enzym angegebenen Temperatur inkubiert. Bei Doppelspaltungen wurde die DNA zuerst mit dem bei niedrigerer Salzkonzentration aktiven Enzym behandelt; anschließend wurden durch Erhöhung des Ansatzvolumens und der Salzkonzentration geeignete Reaktionsbedingungen für das zweite Enzym geschaffen.

Die Analyse der Restriktionsprodukte erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese (3.2.4.1), die gegebenenfalls anschließend ausgeschnitten (3.2.3.7), mittels Phenol-Extraktion (3.2.3.5) Ethanol-Präzipitation (3.2.3.6) gereinigt und in der Plasmidklonierung (3.2.9) eingesetzt wurden.

3.2.9 Plasmidklonierung

Plasmid-Vektoren und die zu klonierende DNA wurden mit Restriktionsendonukleasen verdaut, um möglichst kompatible 5'- oder 3'-Einzelstrangüberhänge zu erzeugen. Waren nicht kompatible Einzelstrangüberhänge erzeugt worden, schloss sich eine Klenow-Behandlung (3.2.9.1) an. Zur Vermeidung einer Religation der linearisierten Vektor-DNA wurde diese dephosphoryliert (3.2.9.3). Die Insert-DNA (PCR-Produkte oder Restriktionsfragmente) wurde durch präparative Agarosegelelektrophorese (3.2.3.7) gereinigt. Nach der Ligation von Vektor und Insert-DNA wurde ein Teil des Ansatzes in kompetente *Escherichia coli* Bakterien transformiert (3.2.9.6).

3.2.9.1 Klenow-Behandlung

Nicht-kompatible Einzelstrangüberhänge zwischen Vektor- und Insert-DNA wurden mit Klenow-Fragmenten behandelt, wobei durch die Polymerase-Funktion des Klenow-Enzyms 5'-überstehende DNA-Sequenzen aufgefüllt und durch die Exonuklease-Aktivität 3'-überstehende DNA-Sequenzen abgebaut wurden. Dadurch entstanden kompatible glatte Ende. Hierzu wurden die Ansätze mit 1 U Klenow-Polymerase und 2 µl Nukleotidmix (je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP) für 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Enzym für 20 min. bei 75°C inaktiviert.

3.2.9.2 Phosphorylierung von PCR-Produkten

PCR-Produkte, die an ihren 5'-Enden keine Phosphatgruppe aufwiesen, wurden vor der Klonierung zunächst phosphoryliert. Dazu wurden ca. 5 pmol des durch Phenol-Extraktion (3.2.3.5) und Ethanol-Präzipitation (3.2.3.6) gereinigten PCR-Produktes (3.2.6) in einem Ansatz mit 2 µl 10 mM ATP und 10 U T4-Polynukleotidkinase im mitgelieferten Puffer für 30 min. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym für 10 min. bei 70°C inaktiviert und der Ansatz mit dem Klenow-Fragment (3.2.9.1) behandelt.

3.2.9.3 Dephosphorylierung der Vektor-DNA

Um eine Religation des linearisierten Vektors ohne Insert-Fragment zu vermeiden, wurden die 5'-Enden der Vektor-DNA dephosphoryliert. Dazu wurde das Volumen des Restriktions-

Ansatzes mit TRIS-HCl (50 mM; pH 8,0) und EDTA (0,1 mM) auf 270 µl erhöht. Nach Zugabe von 1 U alkalischer Phosphatase (CIP, calf intestinal alkaline phosphatase) wurde für 30 min. bei 37°C und nach nochmaliger Zugabe von 1 U CIP bei 56°C über die gleiche Zeit inkubiert (Seeburg et al. 1977; Ullrich et al. 1977). Durch Zusatz von 30 µl EGTA (0,1 M) und 10-minütiges Erhitzen auf 65°C erfolgte die Inaktivierung des Enzyms. Anschließend wurde die DNA Phenol-extrahiert (3.2.3.5) und Ethanol-präzipitiert (3.2.3.6).

3.2.9.4 Ligation

(Dugaiczky et al. 1975)

Die Ligationsansätze (20 bis 50 µl) enthielten 100 bis 200 ng linearisierte, dephosphorylierte Vektor-DNA, eine äquimolare Menge bis zu einem 3-fach molaren Überschuss an Insert-DNA, 0,5 bis 1 U Ligase, sowie ein entsprechendes Volumen Ligase-Puffer nach Herstellerangaben. Die Ansätze wurden entweder für 10 min. bei 37°C, und anschließend über Nacht bei 16°C, oder bei Vorliegen von glatten Enden über Nacht bei 4°C inkubiert.

3.2.9.5 Herstellung kompetenter Bakterien

Um *Escherichia coli* Bakterien für die Aufnahme von DNA kompetent zu machen (Hanahan 1983), wurde von einer bestehenden Glycerinkultur des gewünschten Bakterienstammes eine 2 ml-Kultur in LB-Medium angeimpft. Diese wurde am nächsten Tag in 100 ml SOB-Medium überführt und bei 37°C bis zu einer optische Dichte von 0,4 (gemessen bei 660 nm) unter Schütteln kultiviert. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Bakterien 10 min. bei 2.500 rpm und 4°C sedimentiert, in 32 ml TFB-Medium resuspendiert und erneut, wie oben beschrieben, inkubiert und zentrifugiert. Nach Aufnahme der Bakterien in 8,6 ml TFB-Medium mit Glycerin (15 %) und zweimaliger Zugabe von jeweils 280 µl DMSO, sowie Inkubation für 5 min. auf Eis, wurden die Bakterien in gebrauchsblichen Portionen aliquotiert und bei -70°C gelagert.

3.2.9.6 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

Zu den auf Eis getauten, kompetenten Bakterien wurden ca. 50 - 100 ng ligierter Plasmid-DNA gegeben und für 30 min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 2 min. bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt, um die Aufnahme der Fremd-DNA zu erleichtern und unmittelbar danach für 2 min. auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 800 µl SOC-Medium wurden die Bakterien 1 Stunde bei 37°C und 450 rpm geschüttelt, 5 min. bei 2.500 rpm zentrifugiert, in ca. 200 µl SOC-Medium resuspendiert, auf LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die verwendeten Plasmide enthielten Resistenzgene gegen Antibiotika (z.B. Ampicillin), die den LB-Agarplatten zur Selektion zugesetzt worden waren. Nach Anzucht der erhaltenen Klone (3.2.3.3.1) und Präparation der Plasmid-DNA (3.2.3.3.2) erfolgte die Charakterisierung mittels Restriktionsanalyse (3.2.8) und gegebenenfalls Sequenzierung (3.2.7).

3.2.10 Auftrennung von Proteinen

3.2.10.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur vertikalen elektrophoretischen Trennung von Proteinen wurden diskontinuierliche denaturierende Polyacrylamidgele verwendet (Weber und Osborn 1969). Zwischen zwei in eine spezielle Apparatur gespannte Glasplatten mit Abstandshaltern wurde die Trenngel-Mischung (8 bis 15 % Acrylamid) und nach der Polymerisation die Sammelgel-Mischung (4 % Acrylamid) gegossen. In das Sammelgel wurde ein „Kamm“ eingesetzt, um Taschen für die Probelösung zu formen. Die zu untersuchenden Zell-Lysate, bzw. Virionen wurden vor dem Auftragen mit SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min. bei 95°C denaturiert und anschließend 5 min. bei 14.000 rpm zentrifugiert. Zur Molekulargewichtsbestimmung wurden Markerproteine mitgeführt. Die Trennung erfolgte bei 200 V für ca. 45 min. in SDS-Elektrophoresepuffer (Laemmli 1970).

3.2.11 Immunologische Nachweismethoden

3.2.11.1 Western Blot-Analyse

Infektion der Zellen und Ernte

Primäre CEK- oder CEF- Zellen wurden mit NDV oder AIV mit einer MOI von 2 infiziert und bei 37°C inkubiert. Nach 2 Stunden wurde das Inokulum durch frisches Medium ersetzt und die Zellen weiter inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mittels eines Zellschabers vom Boden des Zellkulturgefäßes gelöst, das Medium mit den darin enthaltenen Zellen in Zentrifugegefäße überführt und 10 min. bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in PBS resuspendiert und erneut, wie oben angegeben, zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in SDS-Probenpuffer aufgenommen und die Proben bis zur Auftrennung in SDS-Polyacrylamidgelen (3.2.10.1) bei -20°C gelagert.

Western Blot Analyse

Die Methode des Western Blottings beschreibt die Übertragung von Proteinen auf eine Membran (Burnette 1981; Towbin et al. 1979).

Zum Proteintransfer wurde eine „semi-dry“ Elektroblotkammer verwendet. Zwischen die Elektrodenplatten wurden nacheinander fünf Lagen mit Transferpuffer getränktem Blottingpapier, eine befeuchtete Nitrocellulosemembran, das Trenngel und weitere fünf

Lagen getränktes Blottingpapier gestapelt. Der Transfer erfolgte bei 25 V für 120 min., wonach die Banden der gefärbten Markerproteine auf der Nitrocellulosemembran sichtbar waren und gekennzeichnet werden konnten. Zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen wurde die Nitrocellulosemembran zunächst für 1 Stunde in TBS-T (mit 5 % Magermilchpulver) bewegt. Die Membran wurde anschließend mit den gewünschten Seren (in TBS-T mit 0,5 % Magermilchpulver) für eine Stunde bei RT inkubiert. Die Seren wurden in einer Verdünnung von 1:1.000 bis 1:50.000 eingesetzt. Nach Waschschritten mit TBS-T für einmal 15 min. und zweimal 5 min., folgte eine 30-minütige Inkubation mit Spezies-spezifischen, Peroxidase-konjugierten Zweitantikörpern (1:20.000). Die Membranen wurden erneut, wie oben beschrieben, gewaschen und die Bindung der Antikörper durch eine Peroxidase-induzierte Chemolumineszenzreaktion (ECL-System) auf Röntgenfilmen nachgewiesen.

3.2.11.2 Immunfluoreszenztest

3.2.11.2.1 Infektion und Fixieren der Zellen

Infizieren der Zellen

Für Immunfluoreszenz-Analysen wurden nahezu konfluente Zellen, die einen Tag zuvor auf die entsprechenden Zellkulturplatten ausgesät worden waren, infiziert (MOI 0,01) und für 18 bis 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

Fixieren der Zellen mit Paraformaldehyd und ggf. Behandlung mit Triton X

Die Zellen wurden mit Paraformaldehyd (PFA, 3 %) für 20- 30 min. bei RT fixiert, welches durch dreimaliges Waschen mit PBS wieder entfernt wurde. Sollten die Zellen perforiert werden, wurden diese erneut mit 3 % PFA unter Zusatz von 0,3 % Triton X für 10 min. bei RT bedeckt und anschließend mit PBS gewaschen.

Fixieren der Zellen mit Methanol/Aceton

Infizierte oder transfizierte (3.2.1.3 und 3.2.1.4) Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen zur Fixierung mit Methanol/Aceton (1:1) bedeckt und für 15-20 min. bei RT inkubiert. Die Zellen wurden bei RT getrocknet und bei -20°C aufbewahrt oder direkt für Immunfluoreszenz-Analysen eingesetzt.

3.2.11.2.2 Indirekter Immunfluoreszenztest

Die fixierten Zellen wurden zunächst dreimal mit PBS gewaschen, bevor sie 1 Stunde bei RT mit den in PBS verdünnten Antiseren inkubiert wurden. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit den 1:1000 bis 1:3000 verdünnten Alexa Fluor[®] 488 (bzw. Alexa Fluor[®] 594) konjugierten, Spezies-spezifischen Zweitantikörpern für 30 min. bei RT zum Nachweis gebundener Antikörper inkubiert. Der Zweitantikörperlösung wurde

gegebenenfalls Evans Blue (1:4.000) als Gegenfärbung der Zellen zur Minderung der Hintergrundfluoreszenz (Fry und Wilkinson 1963) zugesetzt und die Zellkulturplatte zum Erhalt der Fluoreszenzfarbstoffe im Dunkeln aufbewahrt. Nach erneutem Waschen wie oben beschrieben wurden die Zellen mit PBS beschichtet und am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

3.2.11.3 Radioimmunpräzitationsanalyse (RIP)

Infizieren der Zellen und metabolische Markierung

Für die metabolische Markierung wurden CEF-Zellen in einem T25-Zellkulturgefäß mit NDV oder AIV mit einer MOI von 2 infiziert und für 5 Stunden bei 37°C inkubiert.

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, für eine Stunde unter 5 ml MEM ohne Methionin und Cystein gehalten, bevor 10 µl [³⁵S]-markiertes Methionin (3,7 MBq) hinzugefügt wurde. Insgesamt 26 Stunden nach Infektion wurden die Zellen geerntet und 10 min. bei 14.000 rpm zentrifugiert. Das Sediment wurde in 1 ml RITA resuspendiert und nach Zugabe von 10 µl PMSF (100 mM) 3 x 20 sec einer Ultraschallbehandlung (Branson Sonifer 450; Fa. Heinemann; Stufe 7) unterzogen. Nach einer 30-minütiger Inkubation bei RT folgte die Wiederholung der Ultraschallbehandlung. Anschließend wurde das Zell-Lysat für 30 min. auf Eis inkubiert und 30 min. bei 40.000 rpm und 4°C (Rotor TLA 45) ultrazentrifugiert. Der Überstand wurde bei -70°C gelagert.

Radioimmunpräzitation

Bei der Radioimmunpräzitation (RIP) nutzt man die Bindungsfähigkeit der F_c-Region (kristallisierbares Fragment) von Immunglobulinen an Protein A zur Affinitätsreinigung. Protein A ist Bestandteil der Zellwand von *Staphylococcus aureus*, so dass in dieser Analysemethode inaktivierte Bakterien-Suspensionen zur Reinigung von Antigen-Antikörper-Komplexen durch Präzitation verwendet werden konnten (Kessler 1975).

Vor Verwendung wurde die *Staphylococcus aureus*-Suspension 5 min. bei 5.000 rpm zentrifugiert, zwei Mal mit RITA gewaschen, erneut zentrifugiert und im Ausgangsvolumen mit RITA resuspendiert. Von den [³⁵S]-markierten Zell-Lysaten wurden 50 µl mit je 25 µl *Staphylococcus aureus*-Suspension über 30 min. auf Eis vorinkubiert. Im folgenden 10-minütigen Zentrifugieren bei 14.000 rpm sedimentierten unspezifisch an Bakterien gebundene Proteine. Der Überstand wurde mit 50 µl des in RITA verdünnten Antikörpers versetzt, für eine Stunde bei RT und 100 rpm geschüttelt und eine weitere Stunde auf Eis inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation (10 min. bei 14.000 rpm) wurde dem Überstand 25 µl *Staphylococcus aureus*-Suspension hinzugefügt, 30 min. bei RT geschüttelt und anschließend 30 min. auf Eis inkubiert. Zur Sedimentation der Antigen-

Antikörper-Protein-A-Komplexe wurde für 1 min. bei 7.000 rpm zentrifugiert und das Sediment fünf Mal mit 500 µl RITA gewaschen.

Zuletzt wurde die Suspension für 2 min. bei 14.000 rpm durch ein 500µl Sucrose-Kissen (30 % in TE, pH 7,4) zentrifugiert. Das Präzipitat wurde in 30 µl SDS-Probenpuffer resuspendiert, für 5 min. bei 95°C denaturiert und bei 14.000 rpm über 5 min. zentrifugiert. In der SDS-PAGE (3.2.10.1) wurden die im Überstand gelösten Proteine getrennt. Zur Größenbestimmung wurden [¹⁴C]-methylierte Markerproteine mit aufgetrennt. Durch Fluorographie (3.2.12) wurden die Röntgenbanden sichtbar gemacht.

3.2.11.4 Immun-Elektronenmikroskopie

(durchgeführt von Herrn Dr. H. Granzow)

Gereinigte NDV- und AIV-Virionen wurden für 7 min. an Formvarfilme auf 400 mesh Objektträgernetzen absorbiert. Nach 12-minütigem Blocken unspezifischer Bindungen der Oberfläche in PBS (1 % Kaltwasserfisch-Gelatine, 20 mM Glycin und 1 % BSA (Fraktion V)) erfolgte die Inkubation mit Serum für eine Stunde bei RT. Nach wiederholtem Waschen der Präparate wurden mit 10 nm-Goldkolloiden markierte Zweitantikörper zum Nachweis der gebundenen Antikörper verwendet. Nach einstündiger Inkubation und erneutem Waschen wurden die Präparate mit 2 % Phosphorwolframsäure (pH-Wert: 7,4) kontrastiert und im Elektronenmikroskop ausgewertet.

3.2.12 Fluorographie

Im Anschluss an die Elektrophorese (3.2.10.1) wurden die Trenngele zwei Mal jeweils 20 min. in Fixierlösung für SDS-Polyacrylamidgele bewegt und mit Enhancer-Lösung (Amplify™ Fluorographic Reagent Code NAMP100) über eine Stunde imprägniert, da die schwache β-Strahlung der verwendeten Isotope keine Autoradiographie erlaubte. Durch 10-minütiges Wässern wurde die Lösung entfernt und die Gele auf Blottingpapier unter Vakuum bei 80°C getrocknet. Die Röntgenfilme wurden für 1-2 Tage (max. 14 Tage) bei -70°C exponiert.

3.2.13 *in vitro*-Translation

Das zu untersuchende offene Leseraster wurde hinter den T7 Promotor des Expressionsvektors pcDNA3 kloniert und im zellfreien „TNT coupled Reticulocyte Lysate System“ die Expression des klonierten Gens in einem Ansatz untersucht. Der Ansatz enthielt 1 µg Plasmid-DNA in 8 µl DEPC-behandeltem Wasser, 1 µl Reaktionspuffer, 0,5 µl Aminosäure-Mischung ohne Methionin, 2 µl [³⁵S]-Methionin, 0,5 µl RNase-Inhibitor (Rasin), 0,5 µl T7-RNA-Polymerase (10 U /µl) und 12,5 µl Kaninchen-Retikulozytenlysat und

wurde für 90 min. bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden 5 µl des Ansatzes durch SDS-PAGE (3.2.10.1) getrennt. Nach Fluorographie (3.2.12) wurde die Größe des erhaltenen *in vitro*-Translationsproduktes an Hand [¹⁴C]-markierter Standardproteine bestimmt.

3.2.14 Durchführung der Tierversuche

3.2.14.1 Intracerebraler Pathogenitätsindex (ICPI)

Der ICPI wurde zur Virulenzbestimmung von NDV nach den Anweisungen der OIE im „Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals“ (OIE 2009d) durchgeführt. Allantois-Flüssigkeit mit einem HA-Titer >2⁴ wurde 1:10 mit 0,9 %iger Kochsalzlösung verdünnt und zur intracerebralen Inokulation von zehn SPF-Eintagsküken zu je 50 µl verwendet, wobei hier Eintagsküken als Tiere eines Alters von 24 bis 40 Stunden definiert sind. Die Küken wurden über die folgenden 8 Tage alle 24 Stunden klinisch beurteilt und bewertet: gesund = 0, krank = 1, verstorben = 2. Erkrankte Tiere, die unfähig waren Futter oder Wasser aufzunehmen, wurden getötet und ab dem nächsten Tag als verstorben dokumentiert. Die Bewertungspunkte aller Tiere über den Beobachtungszeitraum wurden addiert und durch das Produkt aus der Tieranzahl und dem Beobachtungszeitraum dividiert.

$$\text{ICPI} = \frac{\sum(\text{Bewertungspunkte aller Tiere über den Beobachtungszeitraum})}{\text{Beobachtungszeitraum} * \text{Anzahl Tiere}}$$

Der ICPI-Wert repräsentiert die durchschnittliche Erkrankung der Tiere in diesem Zeitraum.

3.2.14.2 Infektion der Versuchstiere

Für Immunisierungen und Belastungsinfektionen wurde die gewünschte Virusdosis (in der Regel 10⁶ EID₅₀ / 200 µl pro Tier) mit PBS eingestellt und okulonasal verabreicht. Das Volumen wurde tropfenweise gleichmäßig auf das linke und rechte Auge bzw. die Nasenlöcher verteilt.

3.2.14.3 Klinische Bewertung der Versuchstiere

Infektion mit hochpathogenem AIV bzw. velogenem NDV

Nach der Infektion mit hochpathogenem AIV bzw. NDV wurden alle Hühner täglich klinisch überwacht und in Anlehnung an die Beurteilung der Tiere bei der Bestimmung des intravenösen Pathogenitätsindex (IVPI) für Aviäre Influenza (OIE 2009b) nach folgendem Punktesystem bewertet:

Punkte	Beurteilung	Symptome
0	gesund	keine klinischen Symptome
1	krank	eines der folgend aufgeführten Symptome: - Depression (Apathie) - respiratorische Symptome (Dyspnoe, Niesen) - Diarrhö - Zyanosen der unbefiederten Haut oder Kopfanhänge - Ödeme - zentralnervöse Störungen (z.B. klonische Spasmen, Muskelzittern, Tortocollis, Opisthotonus, Paralysen)
2	schwer krank	mehr als eines der oben aufgeführten Symptome
3	tot	Tier tot aufgefunden, bzw. am Tag zuvor moribund getötet

$$\text{klinischer Index} = \frac{\sum(\text{Punkte aller Tiere innerhalb einer Gruppe im Bewertungszeitraum})}{\text{Bewertungszeitraum} * \text{Anzahl der Tiere einer Gruppe}}$$

Aus den Bewertungspunkten wurde ein klinischer Index errechnet, der die durchschnittliche Erkrankung der Tiere innerhalb einer Gruppe über den Bewertungszeitraum von 10 Tagen widerspiegelt. Daneben wurden tägliche klinische Indices ermittelt, die die durchschnittliche Erkrankung aller Tiere einer Gruppe an dem jeweiligen Tag repräsentieren.

Infektion mit niedrigpathogenem AIV

Im Gegensatz zu Infektionen mit hochpathogenem AIV werden bei Infektionen mit niedrigpathogenem AIV oft keine oder nur leichte klinische Symptome beobachtet. Aus diesem Grund wurden auch geringfügige Abweichungen des Verhaltens der Tiere bzw. sehr milde Symptome nach der Belastungsinfektion in die Bewertung mit einbezogen. Die Einführung zusätzlicher Bewertungspunkte zwischen 0 und 1 soll dabei der geringen Intensität der Symptomatik bei LPAIV gegenüber HPAIV-Infektionen gerecht werden.

Punkte	Beurteilung	Symptome
0	gesund	keine klinischen Symptome
0,25	Beeinträchtigung des Wohl- befindens	- Mattigkeit (verzögerte Reaktion auf Ansprache, Bewegungsunlust) - leichte respiratorische Symptome (einmaliges Niesen im Beobachtungszeitraum) - geringgradige Schwellung des Sinus und der Augenlidbindehaut -leichte Diarrhö (Abweichungen in der Konsistenz)
0,50		zwei der oben aufgeführten Merkmale
0,75		drei der oben aufgeführten Merkmale
1	krank	eines der folgend aufgeführten Symptome: - Depression (Apathie) - respiratorische Symptome (Dyspnoe, wiederholtes Niesen) - Diarrhö - Zyanosen der unbefiederten Haut oder Kopfanhänge - Ödeme - zentralnervöse Störungen (z.B. klonische Spasmen, Muskelzittern, Tortocollis, Opisthotonus, Paralysen)
2	schwer krank	mehr als eines der oben aufgeführten Symptome
3	tot	Tier tot aufgefunden, bzw. am Tag zuvor moribund getötet

Während als gesund beurteilte Tiere bei Betreten der Stallungen durch neugieriges Verhalten sowie Verlassen ihres Ruheplatzes reagierten, wurden Tiere mit 0,25 Punkten bewertet, die eine verzögerte Reaktion auf Ansprache (z.B. schwerfälliges Verlassen des Ruheplatzes) aufwiesen bzw. schnell an den Ruheplatz zurückkehrten (Bewegungsunlust, Mattigkeit). Ebenfalls mit 0,25 Punkten bewertet wurde das Auftreten leichter respiratorischer Symptome (einmaliges Niesen während des Beobachtungszeitraumes), eine ausschließlich bei frontaler Ansicht des Kopfes unter Vergleich der beiden Kopfhälften erkennbare Schwellung des Sinus und / oder der Augenlidbindehäute, sowie Abweichungen in der Kotkonsistenz (breiig).

Die Berechnung der klinischen Indices über 10 Tage, sowie der täglichen klinischen Indices erfolgte nach der für HPAIV bzw. NDV beschriebenen Formel.

3.2.14.4 Serologische Untersuchung der Versuchstiere

Zur Gewinnung von Blutproben für serologische Untersuchungen wurde die Vena basilica (auch Vena ulnaris genannt) punktiert und das Blut direkt in BD Mikrotainer® SST™ Tubes (Serumseparatorröhrchen) aufgenommen. Diese wurden nach den Angaben des Herstellers zentrifugiert, das Serum abgenommen und bis zur Untersuchung bei -20°C gelagert.

3.2.14.4.1 Hämagglutinations-Hemmungstest

Mittels Hämagglutinations-Hemmungstest (HAH) wurde der Antikörpergehalt gegen die Oberflächenproteine mit hämagglutinierenden Eigenschaften der ND oder AI Viren untersucht. Sind Antikörper vorhanden, inhibieren sie die Hämagglutination und das Testergebnis ist als positiv zu werten. Es handelt sich um eine Endpunktbestimmung mittels Verdünnungsverfahren, wobei unter Verwendung einer definierten Menge an Antigen die höchste Verdünnung, bei der die Agglutination gehemmt wird, den Gehalt an Antikörpern widerspiegelt (Antikörper-Titer).

Für den HAH wurden jeweils die homologen Viren als Antigen eingesetzt. Der Antigengehalt wurde im Hämagglutinationstest (3.2.2.3.1; HA) neben einer 1:2-Verdünnung, zur genaueren Ermittlung der hämagglutinierenden Einheiten (HAE), auch mit einer 1:3-Verdünnung beginnend in 2er Schritten titriert, bestimmt und folgend auf 4 HAE eingestellt. Nach Bestätigung des Antigengehaltes in einem erneuten HA wurde die Virussuspension als Antigen im HAH verwendet (OIE 2009b).

Die zu untersuchenden Seren wurden zu je 25 µl in die obere Reihe einer 96-well-U-Bodenplatte pipettiert, in die zuvor je 25 µl PBS vorgelegt worden waren. Anschließend wurden die Seren in 2er-Schritten über die Platte titriert, zu jeder Serumverdünnung 25 µl des eingestellten Antigens hinzugefügt und durch seitliches Antippen gemischt. Nach 45 min. bei RT bzw. 60 min. bei 2 – 8°C wurden 25 µl einer 1 %igen Erythrozytensuspension in jede Vertiefung ergänzt und erneut gemischt. Die Auswertung des Tests erfolgte nach 30 – 40 min. bei RT bzw. 60 min. bei 2°- 8°C, wenn sich die Erythrozyten abgesetzt hatten.

An Hand eines mitgeführten positiven bzw. negativen Kontrollserums und einer Antigenkontrolle wurde die Validität des Tests geprüft. Zur Prüfung unspezifischer Serumreaktionen wurde jedes Serum in einem entsprechenden Ansatz ohne Antigen-Zugabe beurteilt. Bei schrägem Halten der Platte wies die Erythrozytenkontrolle eine tropfenförmige Strömung der Erythrozyten auf, die als Vergleichsvorlage für positiv zu bewertende Reaktionen der Serumverdünnungen herangezogen wurde. Die höchste Verdünnung, die die Agglutination inhibierte, ergab den HAH-Titer.

Vorbehandlung der Seren für den HAH

Zeigten die zu untersuchenden Seren im HAH unspezifische Reaktionen (Hämagglutination), wurden 100 µl der entsprechenden Seren mit je 10 µl einer 10 %igen Erythrozytenlösung für 30 min. bei ca. 200 rpm vorinkubiert und nach Sedimentation der Erythrozyten 800 g über 10 min., erneut im HAH untersucht (Pedersen 2008).

3.2.14.4.2 ELISA

Zum Nachweis von NP- bzw. N1-spezifischen AIV-Antikörpern wurden kommerziell erhältliche kompetitive ELISA-Kits entsprechend den Anweisungen des Herstellers eingesetzt.

3.2.14.5 Gewinnung von Tupferproben und Präparation viraler RNA

Gewinnung der Tupferproben

Zur Prüfung der Virusausscheidung nach NDV bzw. AIV-Infektionen wurden den Tieren an festgelegten Tagen Tupferproben aus dem Rachen und der Kloake entnommen. Die Tupfer wurden sofort nach Probennahme in 1 ml Antibiotika- und Serum-haltiges Tupfermedium überführt, stark durchmischt, 30 min. bei 200 rpm geschüttelt und bis zur Verwendung bei -70°C gelagert.

Präparation viraler RNA

Zur Bestimmung der Virusausscheidung mittels real time RT-PCR (rtRT-PCR) wurde zunächst RNA aus dem Tupferprobenmaterial isoliert. Dazu wurden 150 µl des Tupferprobenmaterials in 600 µl RAV-1 Puffer (Kit) aufgenommen und 5 µl einer heterologen internen Kontroll-RNA (IC2, 2×10^5 Kopien/µl) nach Hoffmann (Hoffmann et al. 2005) zugesetzt. Die RNA wurde unter Verwendung des NucleoSpin® 8/96 Virus Core Kit vollautomatisch präpariert und war danach in 50 µl H₂O enthalten. Um Kontaminationen während der Präparation kontrollieren zu können, wurde nach jeder 8. Probe reines Medium als RNA-Isolierungskontrolle (RIC) mitgeführt.

3.2.14.6 Nachweis viraler RNA mittels real-time RT-PCR

Der Nachweis AIV- bzw. NDV-spezifischer RNA in Tupferproben erfolgte nach der RNA-Extraktion mittels rtRT-PCR.

real-time RT-PCR zum Nachweis von AIV-spezifischer RNA

Die Anwesenheit AIV-spezifischer RNA wurde durch Detektion M1-Gen-spezifischer Sequenzen unter Nutzung der Primer-Sonden-Kombination nach Spackmann et al., modifiziert nach Hoffmann (unpubliziert) untersucht (Spackman et al. 2002).

AIV-M1-Mix (IVA-M1.1-Mix-FAM) (Spackman et al. 2002)		
Primer 1	IVA-M_1for	20 pmol
Primer 2	IVA-M1.1rev*	30 pmol
Sonde	IVA-M_1-FAM-BHQ	2,5 pmol
in 2 µl TE Puffer (pH 8,0)		

* modifiziert nach Hoffmann

Eine zweite Primer-Sonden-Kombination diente dem Nachweis der internen Kontroll-RNA. Die Zugabe einer internen Kontroll-RNA zu jeder Tupferprobe, ermöglichte die Überprüfung der RNA-Extraktion, sowie die Abwesenheit von PCR-Inhibitoren (Hoffmann et al. 2005).

IC2-Detektions-Mix (EGFP-Mix 6 (limit 5)) (Hoffmann et al. 2005)		
Primer 1	EGFP12-F	5 pmol
Primer 2	EGFP10-R	5 pmol
Sonde	EGFP-1-HEX	2,5 pmol
in 2 µl TE Puffer (pH 8,0)		

Je Probe wurden 5 µl RNA als Template unter Verwendung des SuperScript™ III OneStep RT-PCR (mit Platinum® Taq DNA Polymerase) Systems entsprechend folgendem Ansatz untersucht:

Komponenten	Volumen für eine Probe
Template-RNA	5 µl
RNase freies Wasser	2,5 µl
2x Reaction Mix*	12,5 µl
Enzym-Mix*	1,0 µl
Primer-Sonden-Mix 1: IVA-M1.1-Mix-FAM	2,0 µl
Primer-Sonden-Mix 2: EGFP-Mix 6 (limit 5)	2,0 µl
Gesamtvolumen:	25 µl

* Bestandteile des Systems SuperScript™ III OneStep RT-PCR (mit Platinum® Taq DNA Polymerase)

Die rtRT-PCR erfolgte unter Verwendung des angegebenen Temperaturprofils in dem MX-3000p real time RT-PCR System (Stratagene) und wurde mit der dazugehörigen Software analysiert.

Temperaturprofil			
Reverse Transkription	50°C	30 min.	
Inaktivierung Reverse Transkriptase, Aktivierung Taq Polymerase	94°C	2 min.	
Denaturierung	94°C	30 sec	42 Zyklen
Annealing	58°C	30 sec	
Elongation	68°C	30 sec	

Für die real-time Analysen wurden TaqMan-Sonden verwendet, die an ihrem 5'-Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff und am 3'-Ende mit einem Quencher markiert waren. Ein Fluoreszenzsignal ergab sich nach Hybridisierung der Sonden an die Gen-spezifischen Sequenzen, nachdem die Taq-Polymerase während der Synthese des Gegenstranges aufgrund ihrer 5'-3'-Exonucleaseaktivität das 5'-Ende der Sonde abgebaut hatte, wodurch der Quencher die räumliche Nähe zum Fluorophor verlor. Eine Zunahme der Fluoreszenzsignale korreliert daher mit der Zunahme der Menge an PCR-Produkten. Die Fluoreszenzdaten wurden am Ende der Annealing-Phase eines jeden Zyklus gemessen. Die Bewertung einer Probe war positiv, wenn der Fluoreszenzschwellenwert (threshold) vor Ablauf der 42 Zyklen überschritten wurde. Je größer die Ausgangsmenge an RNA in einer Probe, umso kleiner ist der Zyklus an dem die Probe den Schwellenwert überschreitet (threshold cycle). Als rtRT-PCR-Positiv-Kontrolle diente ein *in-vitro* transkribiertes RNA-Fragment des M1-Gens in einer standardisierten Konzentration von ca. 5×10^4 Kopien, welches zudem einen Abgleich zwischen den verschiedenen auf 96-well-Plattenformat durchgeführten PCR-Untersuchungen erlaubte. War in einer Probe die interne Kontrolle nicht amplifiziert worden oder die Aufarbeitungskontrolle (RIC) kontaminiert, wurde erneut RNA aus den Tupferproben isoliert und untersucht.

real time RT-PCR zum Nachweis von NDV-spezifischer RNA

Die Anwesenheit NDV-spezifischer RNA wurde durch Detektion Matrix-Gen-spezifischer Sequenzen unter Nutzung der Primer-Sonden-Kombination nach Wise et al. untersucht (Wise et al. 2004). Die Durchführung der Analyse erfolgte, inklusive der Nutzung der internen Kontroll-RNA, analog zum oben für den Nachweis AIV-spezifischer RNA beschriebenen Ablauf.

APMV-1 Matrix (ND-M-20,0/3,75-Mix-FAM) Primer und Sonde nach (Wise et al. 2004)		
Primer 1	Wise-M-4100-F	20 pmol*
Primer 2	Wise-M-4220-R	20 pmol*
Sonde	Wise-M-4169-FAM	3,75 pmol*
in 2 µl TE Puffer (pH 8,0)		

*modifiziert nach Veits (unpubliziert); (Wise et al. 2004)

3.2.14.7 Tötung der Versuchstiere

Moribund erkrankte bzw. am Versuchsende überlebende Tiere wurden durch Kopfschlag betäubt und durch Blutentzug getötet. Im Anschluss wurden die Tiere sezirt und pathologisch-anatomisch untersucht.

3.2.15 Statistische Auswertung

Die Daten wurden mittels des Wilcoxon-Tests auf Signifikanz ($p < 0,05$) unter Zuhilfenahme des Auswertungsprogrammes www.fon.hum.uva.nl/Service/Statistics/Wilcoxon_Test.html untersucht. Die Ergebnisse wurden in Form von Boxplots in Microsoft Excel unter Verwendung des Add-Ins „Diagrammtyp Boxplot“ www.learn-line.nrw.de/angebote/eda/medio/tips/excel_boxplots.htm erstellt und abgebildet.

4 Ergebnisse

4.1 Klonierung und Charakterisierung des H9 Hämagglutinin ORF des Stammes AIV A/turkey/Wisconsin/1/66 (H9N2)

Zur Gewinnung viraler RNA wurde der Stamm AIV A/turkey/Wisconsin/1/66 (H9N2) im embryonierten Hühnerei vermehrt, die Allantois-Flüssigkeit geerntet und die RNA extrahiert. Die virale RNA wurde unter Verwendung eines zu den konservierten, nicht-kodierenden Regionen der 3'-Enden der viralen Segmente komplementären Primers (UM12F) revers transkribiert. Der ORF H9 wurde zunächst in zwei Teilen als 5'- und 3'-Fragment mit den Primern Bm-HAs und H9N2-5HAas2, bzw. H9N2-3HAas2 und Bm-HAas von ca. 0,8 kb bzw. 1,2 kb amplifiziert und die PCR-Amplifikate in das Vektorplasmid pCR2.1-TOPO ligiert. Anschließend wurde ein 1.152 nt großes *BsmI* / *SacI*-Fragment, welches das 3'-Fragment des ORF H9 enthielt, aus dem Plasmid pTOPO-H9-3' gespalten, in der präparativen Gelelektrophorese isoliert und nach Phenol-Reinigung, sowie Ethanol-Präzipitation in das ebenfalls *BsmI* / *SacI* restringierte Plasmid pTOPO-H9-5' inseriert. Das resultierende Plasmid pTOPO-H9 wurde verwendet, um die Nukleotidsequenz des ORF H9 zu bestimmen, welcher eine Länge von 1.683 nt aufwies.

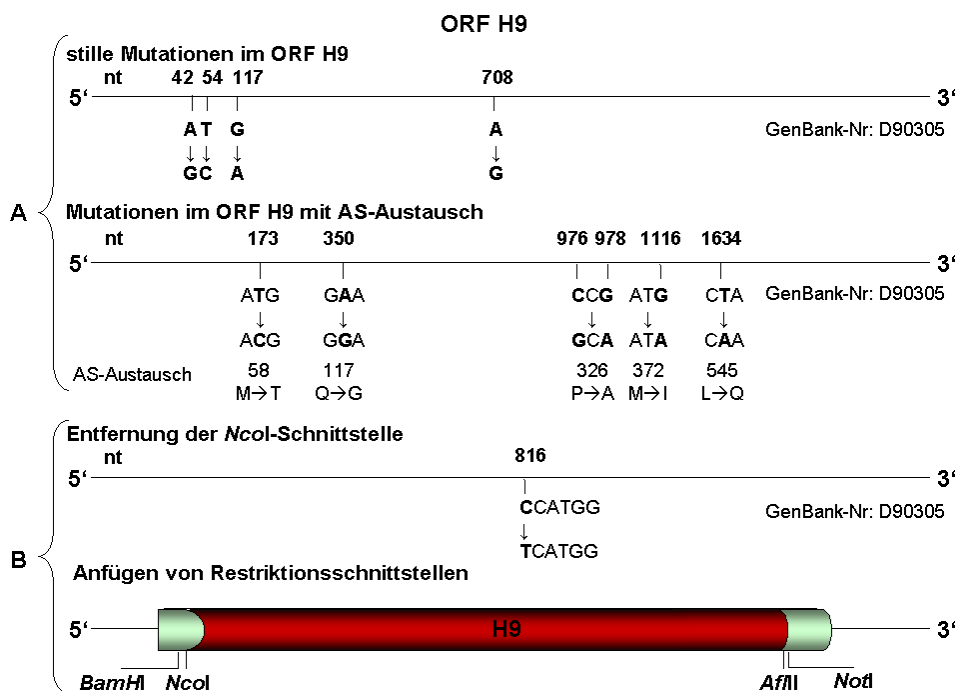


Abb. 1: schematische Darstellung der Nukleotidsequenz des ORF H9

Schematische, nicht maßstabsgerechte Darstellung der Nukleotid- bzw. Aminosäureaustausche (A) des ORF H9 gegenüber der Sequenz von H9 des Isolates AIV A/turkey/Wisconsin/1/66 (H9N2) in der Genbank (Nr. D90305) und Darstellung durchgeführter Modifikationen (B).

Die ermittelte Nukleotidsequenz des ORF H9 zeigte zu 99,35 % Übereinstimmung mit der in der Genbank publizierten H9 HA-Sequenz dieses Stammes (GenBank-Nr.: D90305) (Nobusawa et al. 1991). Die Abweichungen in der Nukleotidsequenz umfassten 4 stille Mutationen (nt 42 A→G; nt 54 T→C; nt 117 G→A; nt 708 A→G), sowie 5 nicht stille Mutationen, die in Aminosäureaustauschen an den Positionen: nt 173 T→C, AS 58 M→T; nt 350 A→G, AS 117 Q→G; nt 976 C→G und 978 G→A, AS 326 P→A; nt 1.116 G→A, AS 372 M→I; nt 1.634 T→A, AS 545 L→Q, resultierten (Abb. 1 A).

Für weitere Klonierungsschritte wurden dem ORF H9 flankierende Restriktionsenzymchnittstellen (*Bam*HI, *Nco*I, *Afl*II und *Not*I-Site) mittels PCR unter Verwendung der Primer AIV_H9_F_BamHI_NcoI und AIV_H9_R_AflII_NotI artifiziell angefügt (Abb. 1 B). Dazu musste zunächst eine im ORF H9 an Position nt 816 vorhandene *Nco*I-Schnittstelle entfernt werden. Mittels der Primer AIVH9MUT_C816T_F und AIVH9MUT_C816T_R wurde die *Nco*I-Schnittstelle derart mutiert, dass keine Aminosäureaustausche resultierten (Abb. 1 B).

Nach Anfügen der flankierenden Restriktionsenzymchnittstellen wurde das PCR-Produkt nach *Bam*HI / *Not*I Behandlung (ca. 1.700 nt) in den entsprechend gespaltenen Expressionsvektor pcDNA3 hinter die T7-Promotorsequenz inseriert. Das erhaltene Plasmid pcDNA3-H9 wurde erneut mittels Sequenzierung geprüft, wobei keine Abweichung zu der vorher bestimmten Sequenz des ORF H9 festzustellen war.

Tab. 4: Primer zur Analyse des ORF H9

H9 interne Vorwärtsprimer (VP)	H9 interne Rückwärtsprimer (RP)
AIV_H9_430-448_F	AIV_H9_572-553_R
AIV_H9_886-905_F	AIV_H9_1002-983_R
AIV_H9_1240-60_F	AIV_H9_1429-10_R
VP zur Analyse von H9 in NDV (im F-Gen beginnend)	RP zur Analyse von H9 in NDV (im HN-Gen beginnend)
PN6115-35F	PN6424-42R

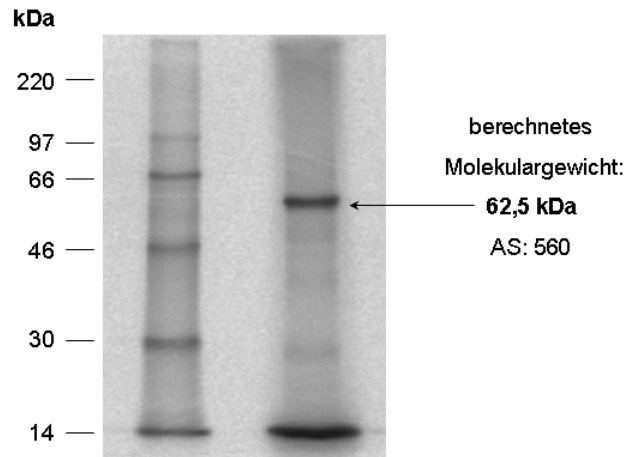


Abb. 2: *in vitro*-Translation pcDNA3-H9

Der im Expressionsplasmid enthaltene ORF H9 wurde mit Hilfe der T7 RNA-Polymerase im zellfreien System transkribiert und unter Einbau von [³⁵S]-Methionin translatiert. Das radioaktiv markierte Protein wurde in der SDS-PAGE getrennt und durch Fluorographie abgebildet. Die molekularen Massen (kDa) der Markerproteine sind angegeben.

Von dem pcDNA3-H9 Expressionsplasmid wurde das H9 mit Hilfe der T7 RNA-Polymerase transkribiert und im zellfreien System unter Einbau von [³⁵S]-Methionin translatiert. Durch elektrophoretische Auftrennung des Reaktionsansatzes und anschließender Fluorographie des Gels wurde das synthetisierte Protein dargestellt (Abb. 2). Die prominenteste Proteinbande entsprach dem durch Ableitung von der Aminosäuresequenz (AS: 560) des ORF H9 errechneten Molekulargewicht von 62,5 kDa.

Durch Transfektion des pcDNA3-H9 Plasmids in LMH-Zellen wurde die Expression des Hämagglutinins H9 in eukaryontischen Zellen geprüft. Während in der indirekten Immunfluoreszenz (IFT) in Vektorplasmid-transfizierten bzw. nicht-transfizierten Zellen keine Reaktionen detektiert wurden, konnte in pcDNA-H9-transfizierten Zellen, wie auch in AIV H9N2-infizierten Zellen, die als Kontrolle mitgeführt wurden, die Expression des AIV-H9 Proteins mittels eines polyklonalen AIV H9-spezifischen Antiserums nachgewiesen werden (Abb. 3).

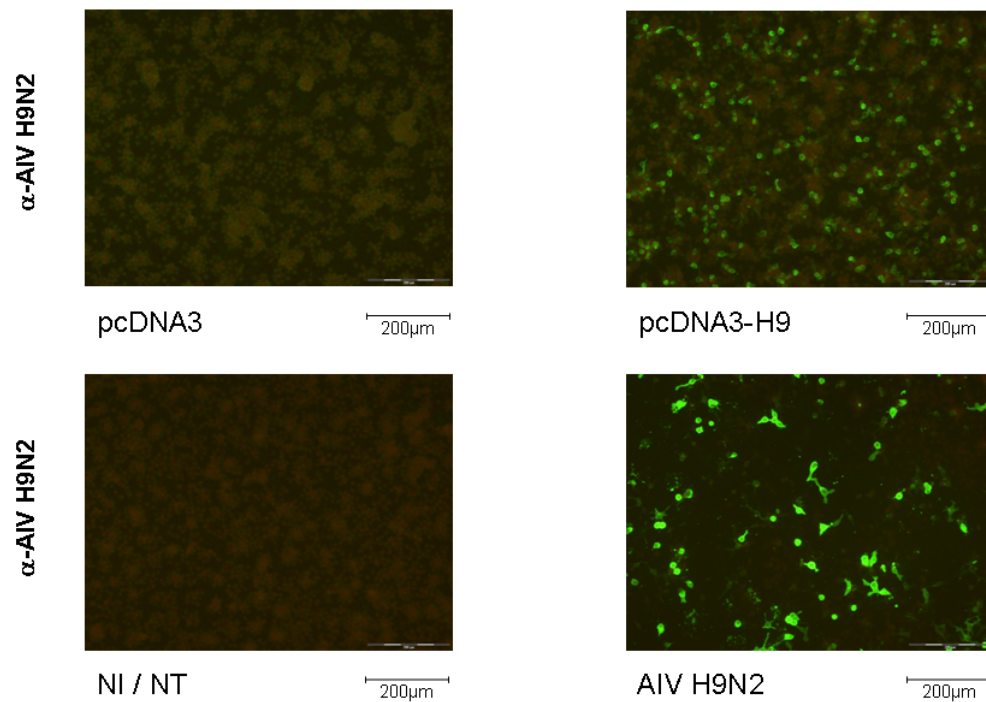


Abb. 3: Nachweis der H9 Protein-Expression in transfizierten Zellen im IFT

LMH-Zellen wurden mit Vektor-DNA (pcDNA3) mit bzw. ohne inseriertem H9 (3 µg) transfiziert, mit AIV H9N2 (MOI 0,01) infiziert oder blieben unbehandelt. (nicht infiziert / nicht transfiziert (NI / NT)). Die Zellen wurden mit einem polyklonalen AIV H9N2-Antiserum (1:600) inkubiert und die Reaktion mit Spezies-spezifischem Alexa-Fluor 488-konjugierten Zweitantikörper nachgewiesen.

Entsprechend konnte das AIV-H9-Protein in Lysaten pcDNA-H9 transfizierter Zellen in der Western Blot-(WB)-Analyse mit einer apparenten Größe von ca. 65 kDa nachgewiesen werden (Abb. 4) und war damit gegenüber der Größe des *in vitro*-Translationsproduktes des H9 (Abb. 2) bzw. dem berechneten Molekulargewicht von 62,5 kDa vergrößert. Da das Hämagglutinin des AIV glykosyliert wird, ist die Größenzunahme vermutlich auf eine Glykosylierung, möglicherweise aber auch auf weitere zellspezifische Modifikationen zurückzuführen.

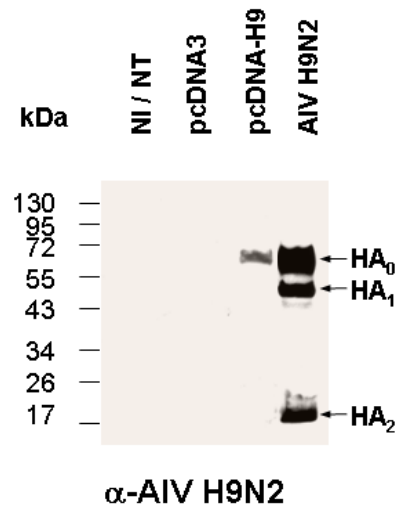


Abb. 4: Nachweis der H9 Protein-Expression in transfizierten Zellen durch WB-Analyse

LMH-Zellen wurden entweder mit Plasmid-DNA (pcDNA3), mit bzw. ohne inseriertem H9-Gen (3 μ g) transfiziert, sowie mit AIV H9N2 infiziert oder blieben unbehandelt (NI / NT). Die Lysate dieser Zellen wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose-Membranen transferiert und mit einem polyklonalem AIV H9N2-Antiserum (1:15.000) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Chemolumineszenz mit Peroxidase-konjugierten Zweitantikörpern nachgewiesen. Die molekularen Massen der Markerproteine (kDa) sind angegeben. In AIV H9N2 infizierten Zellen konnte das unprozessierte Hämagglutinin (HA₀) und auch das prozessierte HA als HA₁ und HA₂ dargestellt werden.

Als Basis zur Herstellung der Rekombinante NDV-H9 mittels des reversen genetischen Systems (Römer-Oberdörfer et al. 1999) diente ein das gesamte Genom des NDV Clone 30 tragendes full-length Plasmid mit zusätzlicher Transkriptionseinheit in der intergenen Region zwischen dem NDV F- und HN-Gen, welche ein Hämagglutinin H5 codiert (Abb. 5; pNDVH5Vm3) (Schröer et al. 2009). In diesem Plasmid wurde der ORF H5 von singulären *NcoI* und *AflII*-Sites flankiert; dies ermöglichte einen einfachen Austausch von Fremdgenen. Das pcDNA3-H9 Plasmid wurde *NcoI* / *AflII*-gespalten und ein 1.699 nt großes, den ORF H9 enthaltendes Fragment gelisoliert und in das gleichermaßen gesplante und dephosphorylierte full-length Plasmid inseriert. In dem resultierenden Plasmid pNDV-H9 wird der ORF H9 von virusspezifischen Gen-Start- und Gen-Endsequenzen, sowie von nicht-kodierenden Regionen, die vom NDV-HN-Gen abgeleitet wurden, begrenzt (Abb. 5). Bei der Generierung des full-length Plasmids pNDV-H9 war insbesondere die Einhaltung der „rule of six“ zu beachten, die durch Anpassung der Länge der am 3'-Ende des ORF H9 gelegenen, nicht-kodierenden Region erfolgte. Dies wurde bereits im Design des Primers AIV_H9_R_AflII_NotI berücksichtigt, wodurch das NDV-H9-Gesamtgenom eine Länge von 17.178 nt erhielt.

Die ORF H9 enthaltende Genkassette (2.034 nt) wurde mittels Sequenzierung des pNDV-H9-Plasmids mit AIV H9-spezifischen, sowie flankierenden NDV F- und HN-Gen-

spezifischen Primern (Tab. 4) geprüft und 100 % Übereinstimmung mit der erwarteten Sequenz bestätigt.

pNDVH5Vm3



pNDV-H9

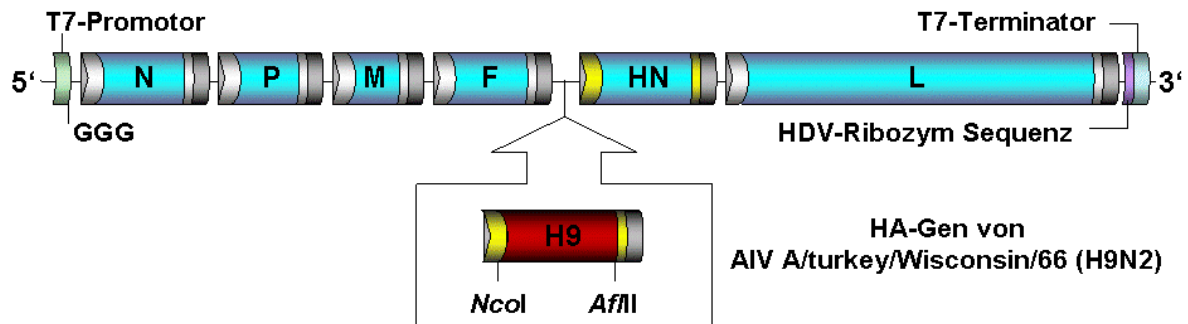


Abb. 5: Plasmidaufbau NDV-H9

Schematische, nicht maßstabsgerechte Darstellung des Aufbaus der Plasmide pNDVH5Vm3 und pNDV-H9 und der Lokalisation der singulären *NcoI* und *AflII* Restriktionsenzymstimmstellen; Farbkodierung: grün: T7-Promotor, dunkelgrau: Gen-Start- (Pfeil) und Gen-Endsequenzen (Block); hellgrau: nicht-kodierende Region; hellblau: NDV-Gene, gelb: nicht-kodierende Region des HN-Gens; lila: HDV-Ribozym Sequenz; türkis: T7-Terminator; rot bzw. dunkelblau: inseriertes AIV Hämagglutinin-Gen

4.2 Generierung und *in vitro*-Charakterisierung der NDV-H9 Rekombinante

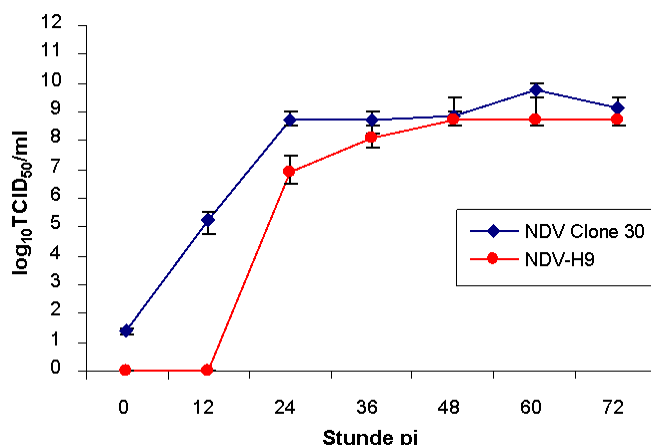


Abb. 6: *in ovo*-Wachstumskinetik der NDV-H9 Rekombinante

Je vier embryonierte SPF-Eier wurden mit einer Dosis von 10^2 EID₅₀ /Ei beimpft, die Allantois-Flüssigkeiten zu festgelegten Zeitpunkten geerntet, gepoolt und die Titer der Nachkommen-Viren auf Zellkultur bestimmt (TCID₅₀ / ml). Dargestellt sind die durchschnittlichen Titer aus zwei unabhängigen Versuchen, sowie die Standardabweichungen.

Zur Generierung von infektiösen Viren wurde das pNDV-H9 Plasmid zusammen mit den Hilfsplasmiden pCite-NDV NP, pCite-NDV P und pCite-NDV L in eine T7 RNA-Polymerase exprimierende Zelllinie (BHK-21, Clone BSR T7/5) (Buchholz et al. 1999) transfiziert, wodurch die Transkription viralen Antigenoms, sowie die Expression der für den Transkriptionskomplex notwendigen Proteine N, P und L ermöglicht wurde.

Zur Anzucht der entstandenen Viren wurden die nach 48 Stunden geernteten Transfektions-Überstände in die Allantoishöhle 10 Tage alter, embryonierter SPF-Eier verimpft und nach 5 Tagen geerntet. Die Allantoisflüssigkeit wurde mittels Hämagglutinationstest und nach Infektion von Zellen mittels indirekten Immunfluoreszenztests auf die Anwesenheit von infektiösem Virus untersucht. Konnte infektiöses Virus nachgewiesen werden, wurde dieses in einer zweiten Eipassage vermehrt und auf seine NDV-H9 Identität geprüft. Dazu wurde RNA aus Allantoisflüssigkeit präpariert, mittels RT-PCR mit NDV F- und HN-spezifischen Primern ein die Fremdgeninsertion umfassendes Fragment (ca. 2.300 bp) amplifiziert und mit NDV-, sowie AIV H9-spezifischen Primern sequenziert (Tab. 4). In diesem Bereich waren im generierten Virus keine Abweichungen zur Nukleotidsequenz des pNDV-H9 Plasmids festzustellen.

Zur Prüfung, ob die Insertion des H9-Gens als zusätzliche Transkriptionseinheit Auswirkungen auf die Replikationseigenschaften des rekombinanten NDV-H9 zeigt, wurden im Vergleich zum parentalen NDV Clone 30 Wachstumskinetiken im Ei durchgeführt. Die Rekombinante NDV-H9 repliziert in den ersten 24 Stunden verzögert, erreicht zu späteren Zeitpunkten aber einen zum parentalen Virus vergleichbaren Endtiter von 10^9 TCID₅₀ / ml (Abb. 6).

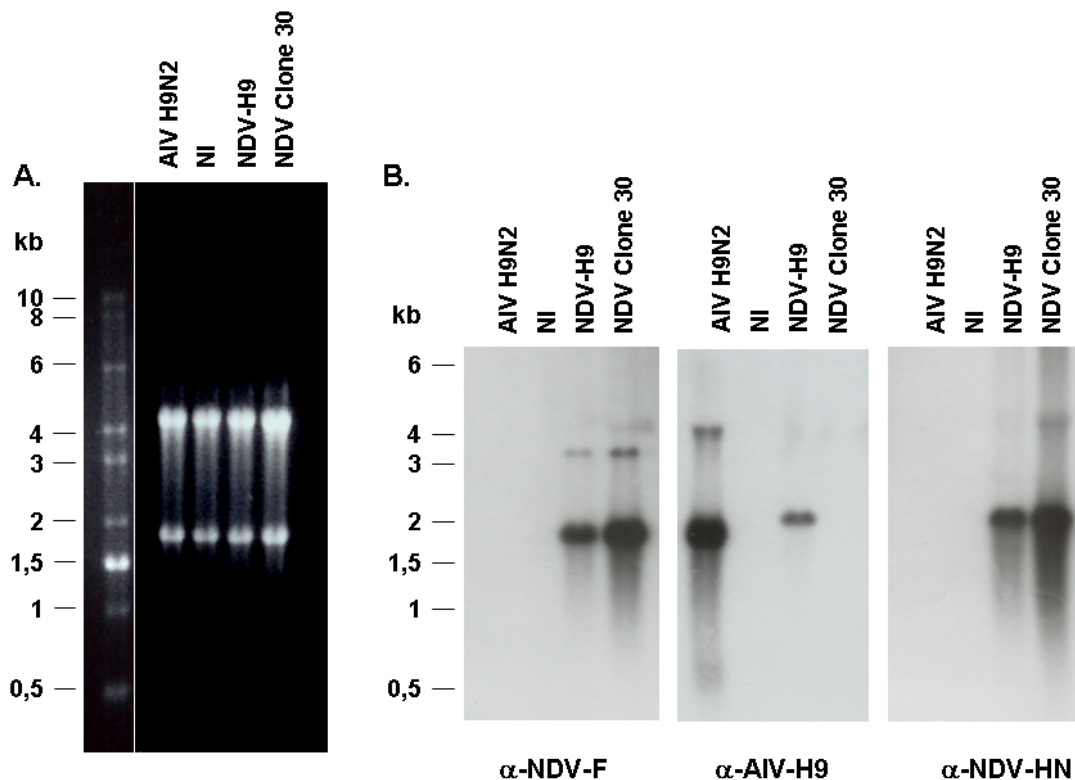


Abb. 7: Nachweis H9-spezifischer mRNA im Northern Blot

CEK-Zellen wurden mit einer MOI von 5 infiziert und 8 Stunden pi geerntet. Gesamtzell-RNA (6 µg) aus mit den entsprechenden Viren infizierten und nicht infizierten (NI) Zellen wurden in Formaldehyd-haltigen Agarosegelen (3.2.4.2; Abb. 7 A.) getrennt, auf Nylonmembranen transferiert und mit [³²P]-markierten, Gen-spezifischen Antisense-cRNA-Sonden hybridisiert (Abb. 7 B.). Die Größen des mitgeführten Markers sind angegeben.

Zum Nachweis von mRNA der AIV H9- bzw. NDV F- und HN-Gene in infizierten Zellen wurden die Expressionsplasmide pcDNA3-H9, pcDNA3-NDV F sowie pcDNA3-NDV HN genutzt, um mit Hilfe der SP6 RNA-Polymerase Gen-spezifische Antisense-cRNA-Sonden zu synthetisieren. Mittels der radioaktiv-markierten cRNA-Sonden konnten nach Hybridisierung der auf Nylonmembran transferierten Gesamtzell-RNA aus infizierten (NDV Clone 30, NDV-H9, AIV H9N2) und nicht infizierten Zellen die entsprechenden mRNAs nachgewiesen werden (Abb. 7 B.).

In NDV-H9-infizierten Zellen konnte H9-spezifische mRNA nachgewiesen werden, welche mit ca. 2 kb gegenüber der mRNA aus AIV H9N2-infizierten Zellen (ca. 1,7 kb) vergrößert war. Die Größendifferenz ist dabei auf flankierende, nicht-kodierende Regionen von ca. 0,27 kb um den ORF H9 in der NDV-H9 Rekombinante zurückzuführen und entspricht damit der erwarteten Größe. In NDV Clone 30- oder in NDV-H9-infizierten Zellen waren die Transkripte der das H9-Gen umgebenden Gene F und HN mit den erwarteten Größen von ca. 1,8 kb bzw. ca. 2 kb nachzuweisen. Die Signale der NDV F- und HN-mRNAs waren in NDV-H9-infizierten Zellen schwächer als in NDV Clone 30-infizierten Zellen. Das Mengenverhältnis der nachgewiesenen mRNAs zueinander blieb aber konstant, so dass die

Transkription des nachfolgenden HN-Gens durch die Insertion des Fremdgens nicht sichtbar beeinträchtigt war. Mit der NDV F-spezifischen Sonde wurde in NDV Clone 30- und in NDV-H9-infizierten Zellen eine zusätzliche ca. 3 kb große Bande detektiert, die vermutlich Durchlesetranskripte der NDV Gene M und F darstellt.

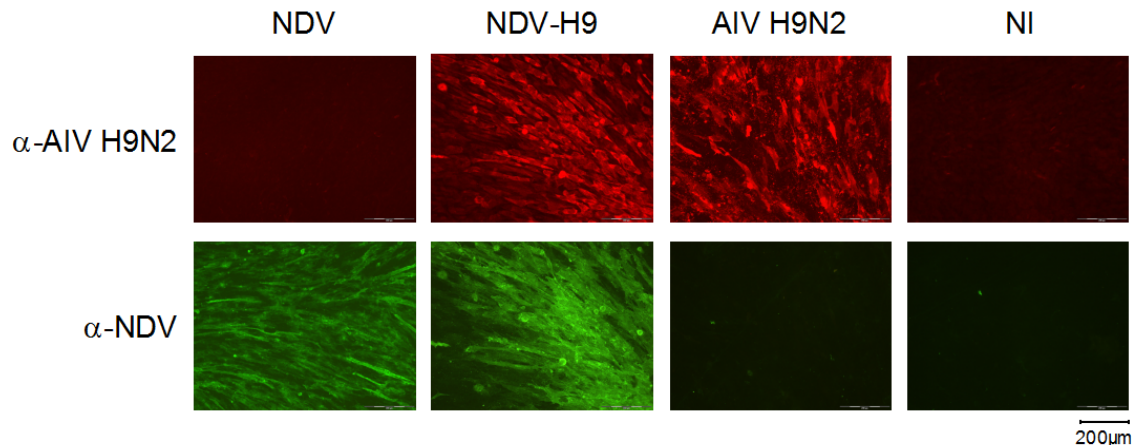


Abb. 8: Nachweis des H9-Proteins von NDV-H9 im IFT

CEF-Zellen wurden mit den entsprechenden Viren mit einer MOI von 0,01 infiziert und nach 18 Stunden fixiert. Infizierte, sowie nicht infizierte Zellen wurden mit polyklonalem AIV H9N2 Antiserum (1:600, Huhn), sowie mit NDV-Antiserum (1:3.000, Kaninchen) simultan inkubiert und die Reaktionen mit entsprechenden, Spezies-spezifischen Alexa-Fluor 488- bzw. 594-markierten Zweitantikörpern (1:1.000) nachgewiesen.

Der simultane Einsatz eines NDV-spezifischen, sowie eines H9-spezifischen Antiserums in der indirekten Immunfluoreszenz (Abb. 8) zeigte, dass in NDV-H9 infizierten Zellen, die NDV-spezifische Fluoreszenz aufwiesen, auch das H9-Protein exprimiert wurde, während in NDV-infizierten Zellen nur NDV-spezifische Proteine detektiert wurden. Mit dem homologen AIV H9N2-infizierte Zellen dienten zur Kontrolle der AIV H9-spezifischen Reaktion und nicht-infizierte Zellen zeigten keine Reaktion.

Wie in der Immunfluoreszenzanalyse wurde auch in der Western Blot Analyse (Abb. 9) und mittels Radioimmunpräzipitation (RIP; Abb. 10) mit dem H9-spezifischen Serum nur in NDV-H9 oder AIV H9N2 infizierten Zell-Lysaten eine Reaktion erhalten, die in nicht-infizierten oder NDV-infizierten Zell-Lysaten fehlte. Ein entsprechend durchgeführter Blot bzw. RIP, in dem NDV-spezifische Proteine nachgewiesen wurden, zeigte, dass einander entsprechende Mengen aufgetragen worden waren. Das durch NDV-H9 exprimierte H9 Protein wies in beiden Analysen ein Molekulargewicht von ca. 65 kDa auf und entsprach damit der Größe des H9 Proteins in AIV H9 infizierten Zell-Lysaten. Die Übereinstimmung der Größe des H9 Proteins in NDV-H9-, sowie AIV H9N2-infizierten Zellen spricht daher für eine ähnliche posttranslationale Modifikation (Glykosilierung) des H9 Proteins.

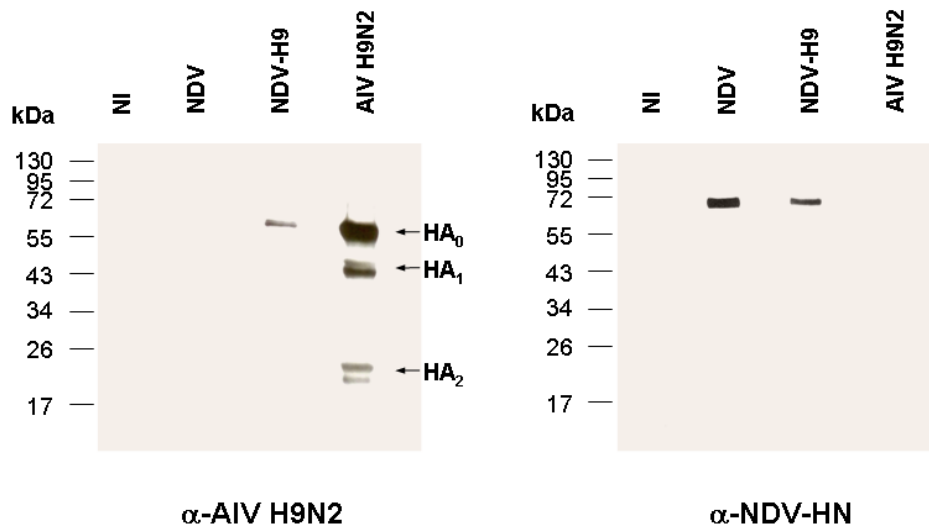


Abb. 9: Nachweis des H9-Proteins von NDV-H9 in der WB-Analyse

CEF-Zellen wurden mit den entsprechenden Viren mit einer MOI von 2 infiziert und nach 24 Stunden geerntet. Die Lysate der Zellen wurden in der SDS-PAGE getrennt, auf Nitrocellulose-Membranen transferiert und mit polyklonalem AIV H9N2 Antiserum (1:15.000) bzw. einem NDV-HN-spezifischen Antiserum (1:20.000) inkubiert. Die Antikörperbindung wurde durch Chemolumineszenzreaktion der Peroxidase-konjugierten, Spezies-spezifischen Zweitantikörper (1:20.000) nachgewiesen. Die molekularen Massen der Markerproteine sind angegeben.

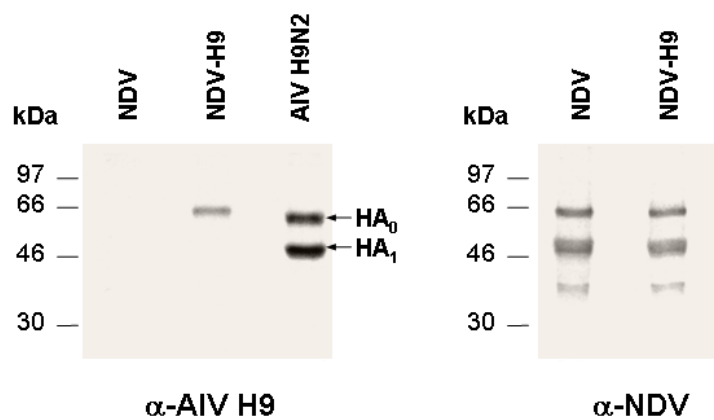


Abb. 10: Nachweis des H9-Proteins von NDV-H9 in der Radioimmunpräzipitation (RIP)

Mit den entsprechenden Viren infizierte CEK-Zellen wurden mit [³⁵S]-Methionin metabolisch markiert. Nach Inkubation der Zell-Lysate mit monospezifischem Vaccinia-AIV H9-Antiserum (1:10) bzw. polyklonalem NDV-Antiserum (1:10, Kaninchen) wurden die Antigen-Antikörper-Komplexe mit inaktivierten *Staphylococcus aureus* (Protein A) immunpräzipitiert und durch SDS-PAGE getrennt. Mittels Fluorographie konnten die präzipitierten viralen Proteine nachgewiesen und ihre molekularen Massen (kDa) an Hand radioaktiver Markerproteine bestimmt werden.

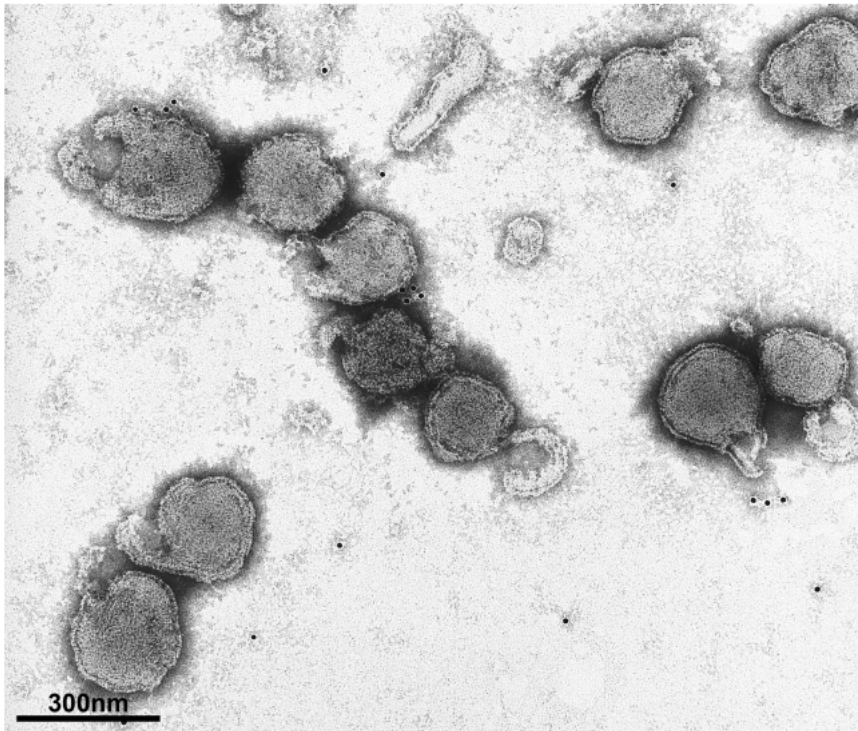
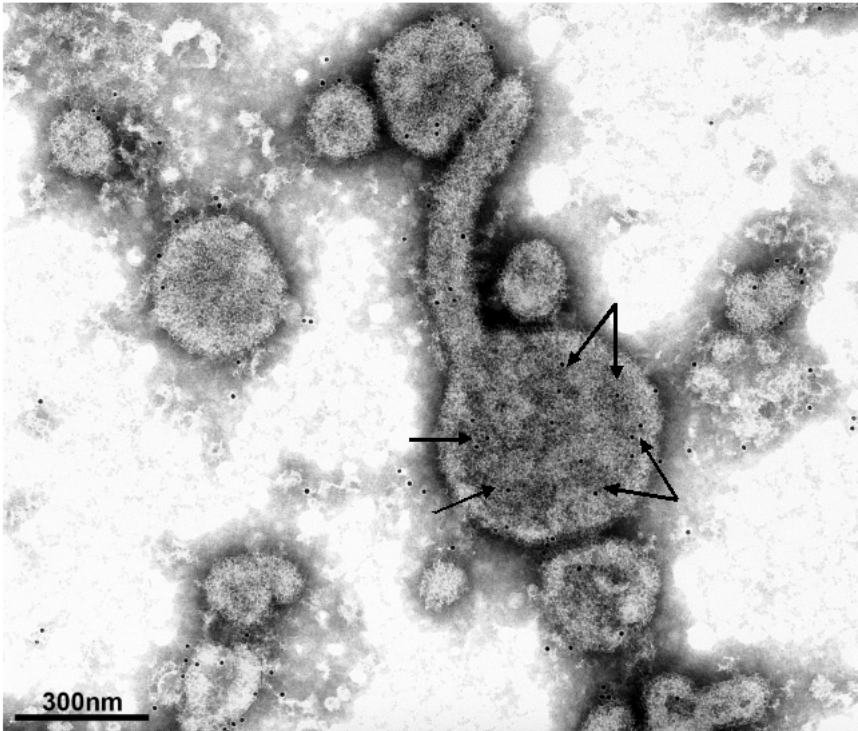


Abb. 11: Immunelektronenmikroskopische Untersuchung zur Inkorporation des H9 Proteins in NDV-H9 Virionen

Gereinigte AIV H9N2 (oben) bzw. NDV-H9 (unten) Virionen wurden mit polyklonalem H9N2-Antiserum inkubiert. Die Antikörperbindung wurde mit Gold-markierten Zweitantikörpern nachgewiesen und nach Negativkontrastierung elektronenmikroskopisch dargestellt (Die Präparate und Aufnahmen wurden von Herrn Dr. H. Granzow, FLI, Insel Riems angefertigt).

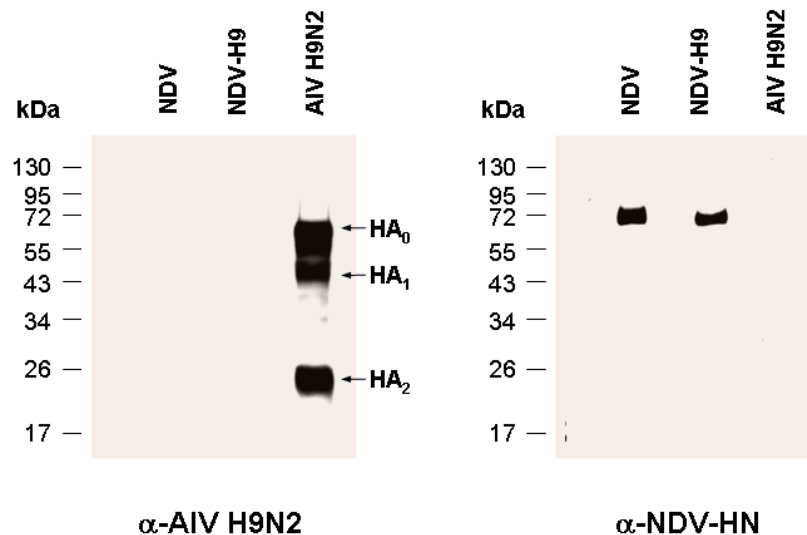


Abb. 12: Untersuchung zur Inkorporation des H9-Proteins in gereinigten NDV-H9 Virionen in der WB-Analyse

Nach Bestimmung des Proteingehaltes wurden gereinigte Virionen (1 μ g) der entsprechenden Viren in der SDS-PAGE getrennt, auf Nitrocellulose-Membranen transferiert und mit polyklonalem AIV H9N2 Antiserum (1:15.000) bzw. einem NDV-HN-spezifischen Antiserum (1:20.000) inkubiert. Die Antikörperbindung wurde durch Chemolumineszenzreaktion der Peroxidase-konjugierten, Spezies-spezifischen Zweitantikörper (1:20.000) nachgewiesen. Die molekularen Massen der Markerproteine sind angegeben.

Weiterhin wurde untersucht, ob das H9 Protein in NDV-H9-Virionen inkorporiert wird. Dazu wurden gereinigte Virionen immunelektronenmikroskopisch im Labor Dr. Granzow untersucht. Während AIV H9-Virionen mit einem polyklonalen AIV H9N2-spezifischen Serum markiert wurden, waren in Virionen der NDV-H9 Rekombinante keine spezifische Reaktion nachzuweisen (Abb. 11). Western Blot-Analysen gereinigter Virionen bestätigten dieses Ergebnis, auch in dieser Analyse ergab sich kein Hinweis auf eine mögliche Inkorporation des H9 Proteins in NDV-H9 Virionen (Abb. 12). Da in entsprechenden H5 bzw. H7-exprimierenden NDV-Rekombinanten das HA Protein in der Virushüllmembran nachgewiesen werden kann (Veits et al. 2006; Schröder et al. 2009), wurde weiterhin geprüft, ob das H9 Protein möglicherweise nicht oder nicht ausreichend auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Dazu wurden NDV-H9-infizierte Zellen, perforierend bzw. nicht-perforierend fixiert und in der indirekten Immunfluoreszenz die Lokalisation des AIV-H9 Proteins auf der Zelloberfläche bzw. im Zytoplasma untersucht. Während der Nachweis des zur Kontrolle untersuchten NDV-F Proteins im Zytoplasma und auf der Zelloberfläche NDV-H9 infizierter Zellen zu erbringen war, konnte das AIV-H9 Protein nur im Zytoplasma detektiert werden (Abb. 13). Nicht infizierte Kontrollzellen zeigten keine Reaktion. Daraus lässt sich folgern, dass das H9-Protein in NDV-H9 infizierten Zellen nicht oder unterhalb der in dieser Untersuchung detektierbaren Menge auf der Zelloberfläche exprimiert wird.

Die Stabilität der Fremdgen-Insertion von NDV-H9 wurde durch 10-malige Passage der Rekombinante im Ei geprüft. Nach Präparation der viralen RNA aus der Allantoisflüssigkeit der 10. Eipassage wurde mittels RT-PCR der gesamte Bereich des Fremdgens mit im NDV F- und NDV HN-Gen lokalisierten Primern amplifiziert. Das ca. 2.300 bp große Fragment wurde in den Vektor pGem-T Easy ligiert und mit NDV F-, NDV HN- sowie AIV H9-spezifischen Primern (Tab. 4) sequenziert. Die Analysen zeigten, dass das H9-Gen, sowie die Übergänge zu den benachbarten NDV-Genen im Vergleich zu der Nukleotidsequenz des pNDV-H9-Plasmids unverändert waren. Darüber hinaus wurden Zellen mit der 10-malig passagierten NDV-H9 Rekombinante mit einer MOI von 0,01 bzw. 2 infiziert und in der indirekten Immunfluoreszenz (Abb. 14) und Western Blot-Analyse (Abb. 15), wie oben beschrieben, untersucht. In beiden Untersuchungen konnte die Expression des H9-Proteins von NDV-H9 verifiziert und somit die Stabilität des Fremdgens über 10 Eipassagen belegt werden.

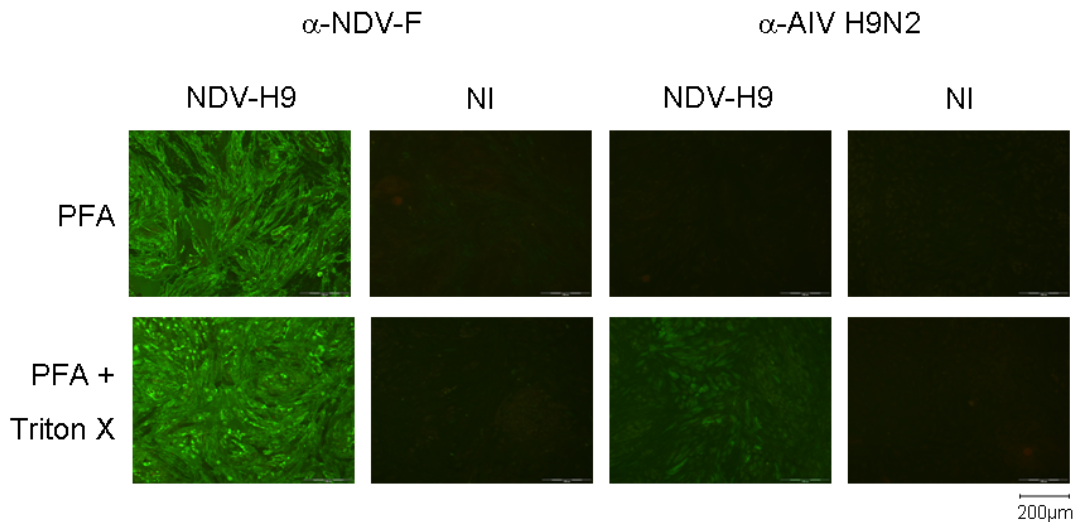


Abb. 13: Nachweis des NDV F- bzw. AIV H9-Proteins von NDV-H9 in perforierten bzw. nicht-perforierten Zellen im IFT

CEF-Zellen wurden mit NDV-H9 mit einer MOI von 0,01 infiziert bzw. nicht infiziert und nach 18 Stunden mit PFA bzw. PFA-Triton X fixiert. Die Zellen wurden mit polyklonalem AIV H9N2 (1:600), bzw. mit NDV F-spezifischem Antiserum (1:1.000) inkubiert und die Reaktionen mit den entsprechenden, Spezies-spezifischen Alexa-Fluor 488-Zweitantikörpern (1:1.000) nachgewiesen.

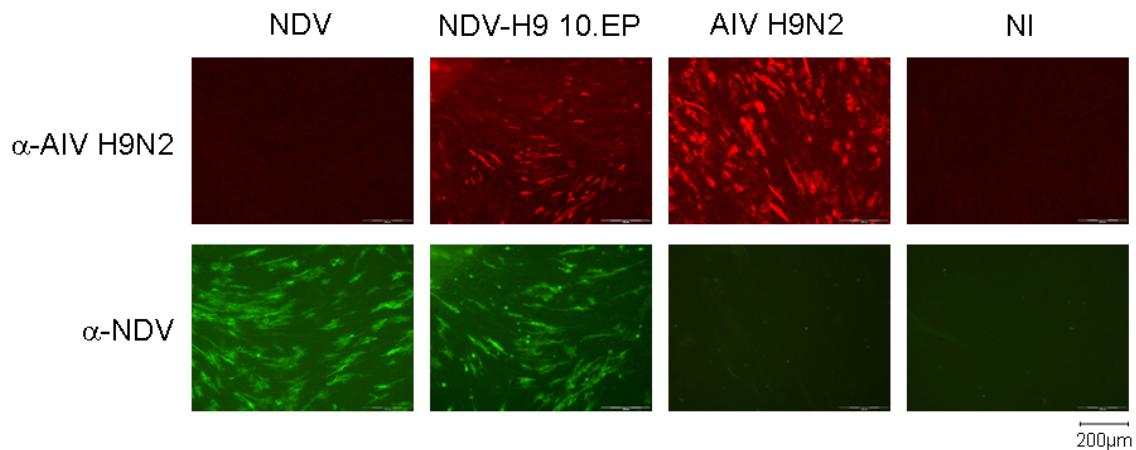


Abb. 14: Nachweis des H9-Proteins der 10. Eipassage von NDV-H9 im IFT

CEF-Zellen wurden mit den entsprechenden Viren mit einer MOI von 0,01 infiziert und nach 18 Stunden fixiert. Infizierte, sowie nicht infizierte Zellen wurden mit polyklonalem AIV H9N2 Antiserum (1:600, Huhn) und mit NDV-Antiserum (1:3.000; Kaninchen) simultan inkubiert und die Reaktionen mit entsprechenden, Spezies-spezifischen Alexa-Fluor 488- bzw. 594-markierten Zweitantikörpern (1:1.000) nachgewiesen.

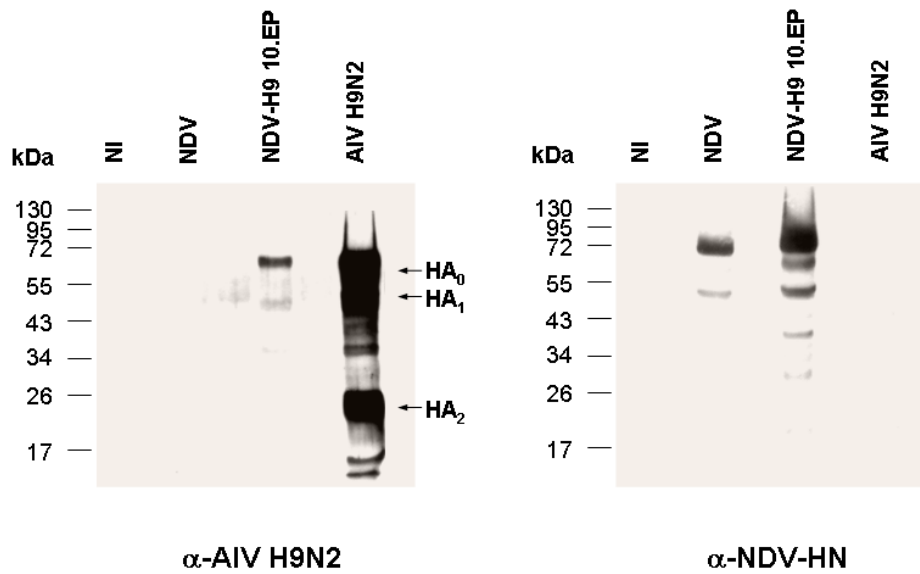


Abb. 15: Nachweis des H9-Proteins der 10. Eipassage von NDV-H9 in der WB-Analyse

CEF-Zellen wurden mit den entsprechenden Viren mit einer MOI von 2 infiziert und nach 24 Stunden geerntet. Die Lysate der Zellen wurden in der SDS-PAGE getrennt, auf Nitrocellulose-Membranen transferiert und mit polyklonalem AIV H9N2 Antiserum (1:15.000) bzw. einem NDV-HN-spezifischen Antiserum (1:20.000) inkubiert. Die Antikörperbindung wurde durch Chemolumineszenzreaktion der Peroxidase-konjugierten, Spezies-spezifischen Zweitantikörper (1:20.000) nachgewiesen. Die molekularen Massen der Markerproteine sind angegeben.

4.3 *in vivo*-Charakterisierung der NDV-H9 Rekombinante

Die *in vivo*-Charakterisierung umfasste die Prüfung der Virulenz der NDV-H9 Rekombinante, sowie der Schutzwirkung gegen LPAIV vom Subtyp H9N2 und gegen velogenes NDV in den Spezies Huhn und Pute. Bei gegebener Wirksamkeit sollte weiterhin die Eignung der Rekombinante als Markervakzine gegen AIV geprüft werden.

4.3.1 ICPI

Zur Prüfung der Virulenz der NDV-H9 Rekombinante wurde der ICPI-Test nach den Richtlinien des OIE durchgeführt. Die H9-exprimierende NDV-Rekombinante erwies sich, wie auch das parentale, rekombinante NDV ohne Fremdgeninsertion, im ICPI Test als avirulent (ICPI-Werte = 0). Damit konnte gezeigt werden, dass die Insertion des AIV H9-Hämagglutinins in das NDV-Genom zu keiner erkennbaren Steigerung der Virulenz im Huhn führt.

4.3.2 Aufbau des Tierversuches im Huhn und in der Pute

Immunisierung	NDV-H9	rNDV	
Anzahl der Tiere	10	10	
	10	10	

Challenge	AIV H9N2	NDV Herts 33/56	
Anzahl der Tiere	10	10	10 naiv
	10	10	

Abb. 16: Gruppeneinteilung zur Prüfung der Schutzwirkung von NDV-H9 im Huhn und in der Pute

4.3.3 Tierversuch im Huhn

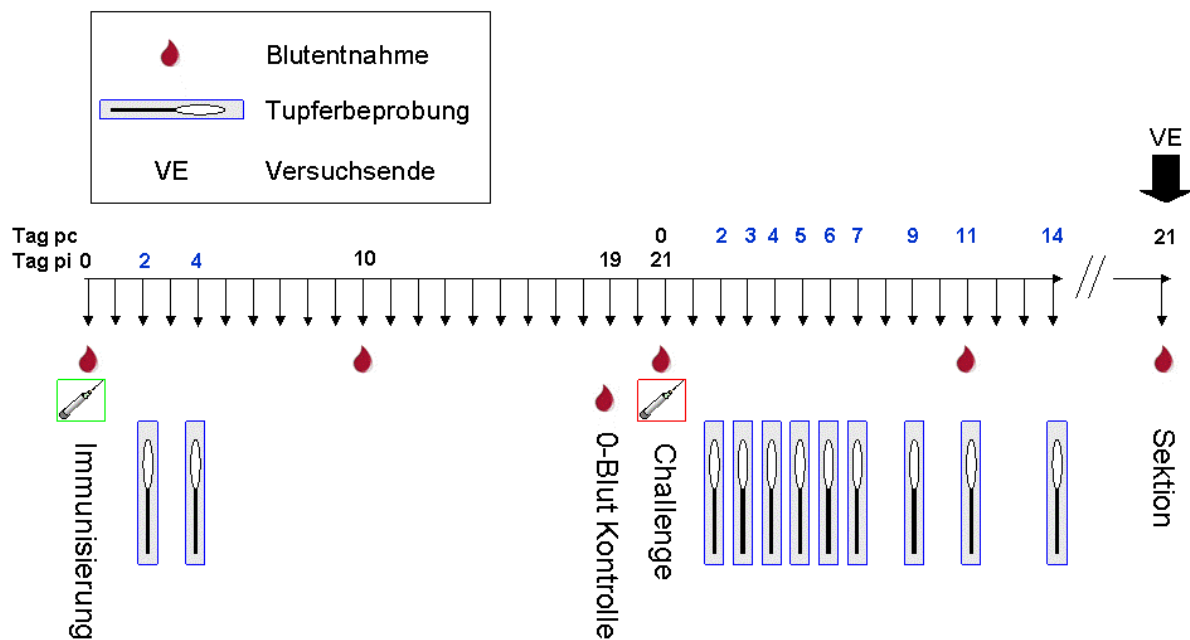


Abb. 17: Zeitablaufplan der Prüfung der Schutzwirkung der NDV-H9 Rekombinante im Huhn

Zur Prüfung der NDV-H9 Rekombinante im Huhn wurden 50 SPF-Tiere eingesetzt. Im Alter von 3 Wochen wurden je 20 Tiere mit NDV-H9 bzw. mit dem entsprechend rekombinant erzeugten NDV (rNDV) okulonasal mit einer Dosis von 10^6 EID₅₀ / 200 µl pro Tier immunisiert, während 10 Tiere naiv blieben und als Kontrollgruppe für die Belastungsinfektion (Challenge) mit NDV dienten (Abb. 16). Vor (Tag 0; d0), sowie an Tag 10 und 21 nach Immunisierung (pi) wurde den immunisierten Tieren Blut abgenommen und die daraus gewonnenen Seren auf NDV-, sowie H9-spezifische Antikörper untersucht. Durch oropharyngeale und kloakale Tupfernahmen an Tag 2 und 4 pi wurde die Ausscheidung von NDV-H9 im Vergleich zu rNDV durch den Nachweis viraler RNA (vRNA) mittels real time RT-PCR (rtRT-PCR) untersucht (Abb. 17).

Drei Wochen nach Immunisierung erfolgten die Belastungsinfektionen. Dazu wurden 10 NDV-H9 immunisierte und 10 rNDV immunisierte Tiere, welche als Kontrollen dienten, mit dem homologen AIV A/turkey/Wisconsin/1/66 (H9N2) in einer Dosis von $10^{8,2}$ EID₅₀ / Tier in 200 µl okulonasal infiziert. Weitere 10 NDV-H9 immunisierte und 10 rNDV immunisierte Tiere wurden zusammen mit 10 naiven Kontrolltieren mit NDV Herts 33/56 in einer tödlichen Dosis von $10^{5,5}$ EID₅₀ / Tier in 200 µl okulonasal infiziert (Abb. 16). Den Kontrolltieren wurde ein Tag zuvor zur Bestimmung des Antikörperstatus Blut abgenommen (Abb. 17).

Zur Prüfung der Virusausscheidung nach den Belastungsinfektionen (pc) wurden an den Tagen 2 bis 7, sowie an Tag 9, 11 und 14 oropharyngeale und kloakale Tupferproben genommen. Der Versuch wurde drei Wochen nach der Belastungsinfektion beendet (VE;

Abb. 17). Erkrankte oder am Versuchsende getötete Tiere wurden pathologisch-anatomisch untersucht.

4.3.4 Klinik nach Immunisierung

Nach der Immunisierung mit der Rekombinante NDV-H9 oder rNDV zeigten die Tiere keine klinischen Symptome und wurden als gesund beurteilt (Tab. 5).

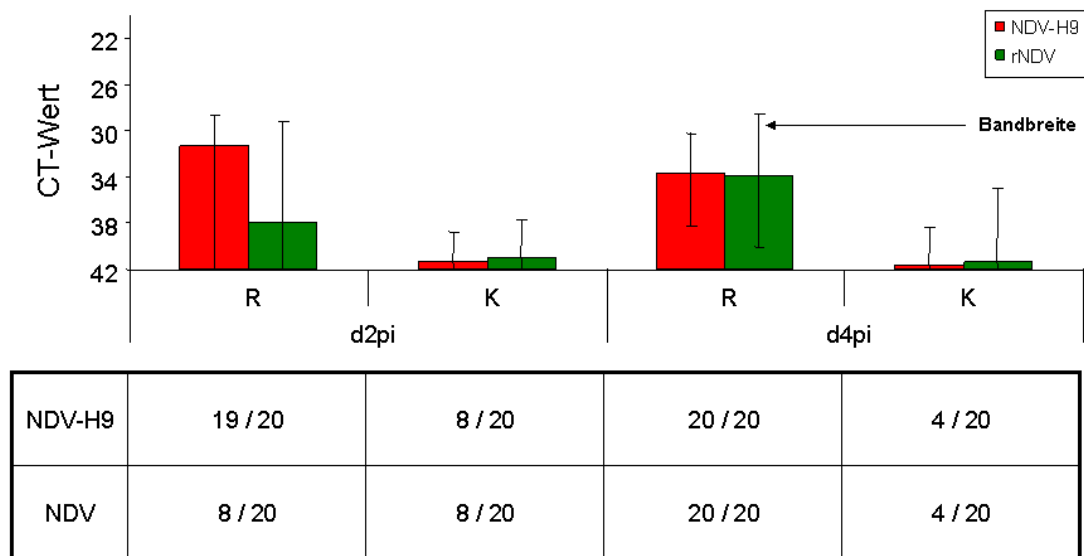


Abb. 18: vRNA-Nachweis in Tupferproben nach Immunisierung mit NDV-H9 und rNDV im Huhn

Zur Ermittlung der Virusausscheidung wurden Tupferproben in der rtRT-PCR auf vRNA untersucht und die Mittelwerte der erhaltenen CT-Werte aller Rachen-(R) und Kloakentupfer (K) pro Gruppe und Tag dargestellt. Die vertikalen Linien geben die Bandbreite der CT-Werte wieder. Angegeben sind außerdem die positiven Reagenten (CT < 42) an der Gesamtzahl der Tiere für die untersuchten Tage.

Die Ausscheidung der Viren über Rachen und Kloake wurde mittels Detektion vRNA in der rtRT-PCR untersucht. Aus den dargestellten Daten folgt, dass beide Viren ausgeschieden wurden, wobei in den Rachentupfern eine deutlich höhere Virusgenomlast als in kloakalen Tupfern nachgewiesen wurde (Abb. 18). Dies ist nicht ungewöhnlich, da die Viren lokal vorrangig im Rachenraum replizieren. Die NDV-H9 Rekombinante repliziert im Huhn dem rNDV entsprechend.

4.3.4.1 Untersuchung auf Antikörper gegen AIV

Die vor bzw. nach Immunisierung gewonnenen Serumproben wurden im Hämagglutinations-Hemmungstest untersucht. Entsprechend den Empfehlungen des OIE (OIE 2009b) wurden bei Antigeneinstellung auf 4 HAE Einzeltierseren mit einem Titer von 2^4 oder höher als positiv bewertet, der Gruppenmittelwert wurde aus allen erhaltenen Einzeltielergebnissen ungeachtet dessen, ob sie positiv zu bewerten waren, berechnet. Als Antigen wurde das homologe AIV A/turkey/Wisconsin/1/66 (H9N2) eingesetzt. Bei der Untersuchung der vor

Immunisierung gewonnenen Seren konnten keine H9-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. In den Seren rNDV-immunisierter Tiere waren erwartungsgemäß keine H9-spezifischen Antikörper induziert worden, jedoch konnten auch in den mit NDV-H9 immunisierten Hühnern keine H9-spezifischen Antikörper detektiert werden.

Daraufhin wurden die Seren der NDV-H9 Immunisierten mit sensitiveren Methoden wie der indirekten Immunfluoreszenz auf AIV H9N2 infizierten Zellen und in Western Blot-Analysen mit Zell-Lysaten AIV H9N2 infizierter bzw. nicht infizierter Zellen untersucht. In beiden Analysen konnten auch bei niedrigen Serumverdünnungen (1:10) keine H9-spezifischen Reaktionen mit den an Tag 21pi gewonnenen Seren nachgewiesen werden, weshalb davon auszugehen war, dass keine oder lediglich unter der Nachweisgrenze dieser Methoden liegende Mengen H9-spezifischer Antikörper induziert worden waren.

Für den Nachweis, dass diese Tiere auch mit der Rekombinante NDV-H9 immunisiert worden waren, d.h. um Durchführungsfehler auszuschließen, wurden aus mehreren Rachentupfern (d2pi) von Tieren dieser Gruppe RNA isoliert und in der RT-PCR mit H9-spezifischen internen Primern untersucht. Es konnten Fragmente in der erwarteten Größe (ca. 500 bis 540 bp) amplifiziert werden, die mittels präparativer Agarosegelelektrophorese unter Verwendung des QIAquick® Gel Extraction Kits (Qiagen) gereinigt und sequenziert wurden. Die ermittelten Sequenzen zeigten 100 %ige Übereinstimmung mit der im NDV-H9-Plasmid ermittelten H9 Hämagglutininsequenz und bestätigten somit die Immunisierung der Tiere mit der NDV-H9 Rekombinante.

4.3.4.2 Untersuchung auf Antikörper gegen NDV

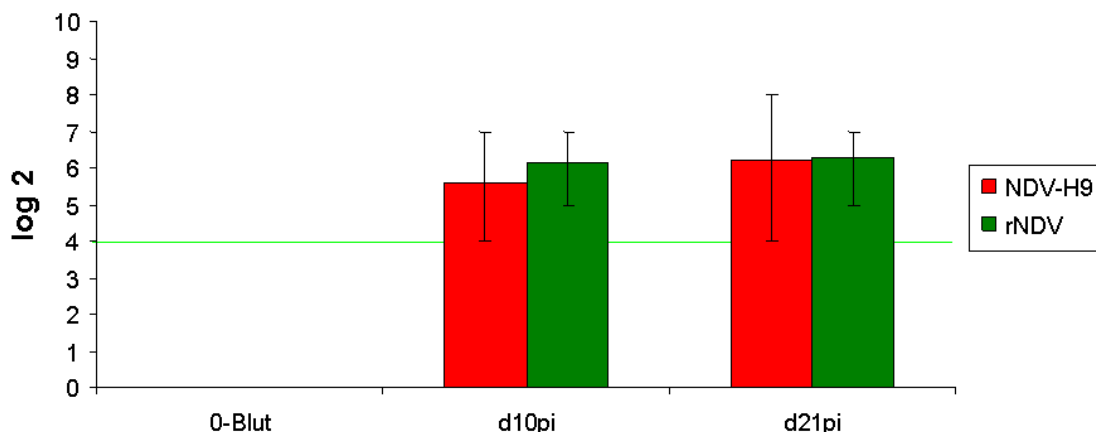


Abb. 19: HN-spezifische AK nach Immunisierung mit NDV-H9 und rNDV im Huhn

Dargestellt sind die HAH-Titer Mittelwerte (Balken) der jeweiligen Gruppe an den entsprechenden Beprobungstagen als log₂, sowie die Bandbreiten (vertikale Linien). Die grüne Linie gibt den Titer an, der nach OIE als positiv zu bewerten ist.

Die vor bzw. nach Immunisierung gewonnenen Seren wurden im Hämagglutinations-Hemmungstest unter Verwendung von rNDV als Antigen untersucht (Abb. 19). Die Ergebnisse wurden analog des AIV-H9 Nachweises (4.3.4.1) bewertet. Vor der Immunisierung verfügte keines der Tiere über HN-spezifische Antikörper. Bereits nach 10 Tagen wiesen beide Gruppen (je 10 / 10) spezifische Antikörper-Titer gegen NDV auf, die nahe dem drei Wochen nach Immunisierung erreichten Titer (ca. 2^6) lagen. Dies zeigt, dass Immunisierung mit NDV-H9 dem rNDV entsprechende Titer in SPF-Hühnern induziert.

4.3.5 Klinik nach Belastungsinfektion mit AIV H9N2

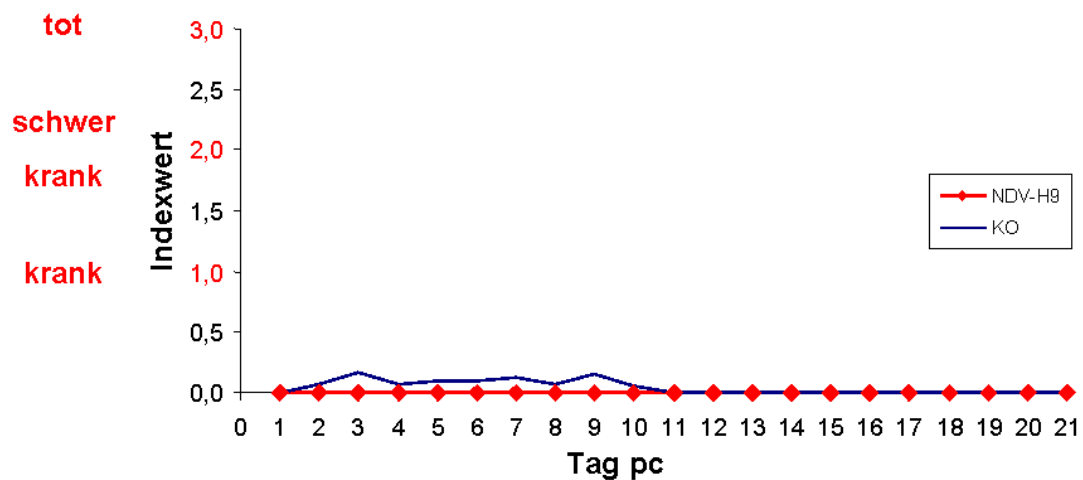


Abb. 20: täglicher klinischer Index nach Infektion von Hühnern mit AIV H9N2

Da LPAIV keine oder kaum klinische Symptome insbesondere in SPF-Hühnern hervorruft, wurde für die Belastungsinfektion mit AIV A/turkey/Wisconsin/1/66 (H9N2) die durch den Virustiter limitierte maximale Dosis ($10^{8,2}$ EID₅₀ / Tier) verwendet. Die Kontrolltiere zeigten von Tag 2 bis Tag 10 nach Infektion eine Beeinträchtigung des Wohlbefindens (Abb. 20). Dies resultiert in einem über 10 Tage berechneten klinischen Index von 0,1 (Kap. 3.2.14.3 und Tab. 5). In der frühen Phase nach Infektion (Tag 2 und 3) war bei 4 von 10 Tieren eine leichte Rötung und Schwellung der Augenlidbindehaut zu verzeichnen. Ab Tag 4 zeigten die anderen 6 Tiere leichten Durchfall. Das Allgemeinbefinden, die Futter- oder Wasseraufnahme der Hühner war nicht gestört. Jedes der 10 Kontrolltiere zeigte über den 10-tägigen Berechnungszeitraum mindestens ein Bewertungsmerkmal, was den Rückschluss auf eine infektionsbedingte Beeinträchtigung zuließ. Ab dem 11. Tag waren die Tiere wieder unauffällig (Abb. 20). Insgesamt waren die Symptome sehr mild, jedoch zeigt der -wenn auch geringe- ermittelte Indexwert der Kontrolltiere, dass es zu einer Beeinträchtigung des Wohlbefindens der Tiere gekommen war. Hingegen blieben die NDV-H9 immunisierten Tiere völlig gesund (klinischer Index = 0; Tab. 5).

4.3.5.1 Nachweis von Antikörpern gegen AIV

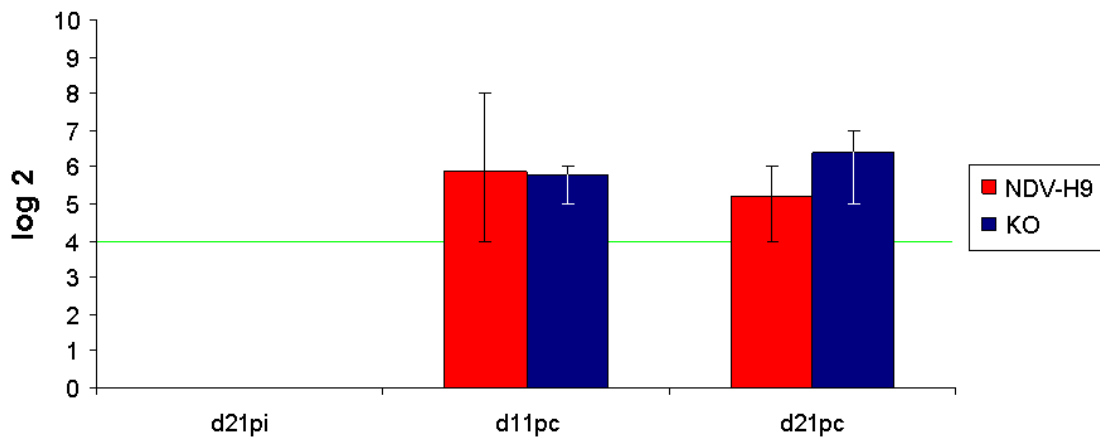


Abb. 21: AIV H9-spezifische AK nach Infektion mit AIV H9N2 im Huhn

Dargestellt sind die HAH-Titer Mittelwerte (Balken) der jeweiligen Gruppe an den entsprechenden Beprobungstagen als \log_2 , sowie die Bandbreiten (vertikale Linien). Die grüne Linie gibt den Titer an, der nach OIE als positiv zu bewerten ist.

An den Tagen 11 bzw. 21pc gewonnene Seren, wurden im Vergleich zu den vor Belastungsinfektion gewonnenen Seren (d21pi) im Hämagglutinations-Hemmungstest untersucht. Als Antigen wurde das homologe AIV A/turkey/Wisconsin/1/66 (H9N2) verwendet, die Bewertung erfolgte wie unter 4.3.4.1 beschrieben. Während in vor Belastungsinfektion gewonnen Seren keine AIV H9-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden konnten, serokonvertierten alle NDV-H9 immunisierten Tiere nach AIV-Infektion entsprechend den nicht-immunisierten Kontrolltieren (Abb. 21). Bereits nach 11 Tagen wurden in beiden Gruppen Durchschnitts-Titer von ca. 2^6 erreicht (Abb. 21; Tab. 5). Dies indiziert eine starke Virusreplikation in den Tieren beider Gruppen.

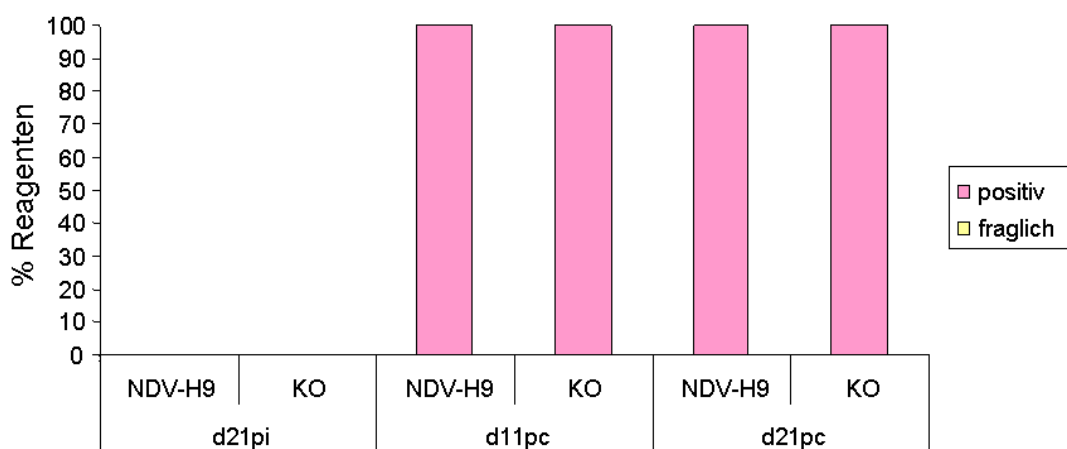


Abb. 22: AIV NP-spezifische AK nach Infektion mit AIV H9N2 im Huhn

Die Immunisierung mit der NDV-H9-Rekombinante induzierte keine H9-spezifischen Antikörper, womit sich eine Differenzierung von immunisierten und infizierten Tieren an Hand des Nachweises von Antikörpern gegen andere, nicht HA-spezifische AIV Proteine nach Belastungsinfektion erübrigt. Dennoch wurden die Seren in einem AIV NP-spezifischen ELISA untersucht, um Erfahrungen zum Nachweis und zum zeitlichen Auftreten solcher Antikörper zu sammeln. Vor der Infektion waren in den Seren NDV-H9 immunisierter und AIV-naiver Hühner, wie erwartet, keine AIV NP-spezifischen Antikörper detektierbar. Bereits 11 Tage nach der AIV-Belastungsinfektion konnten in allen Tieren beider Gruppen NP-spezifische Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 22; Tab. 5), was ebenfalls die Virusreplikation in Tieren beider Gruppen indiziert.

4.3.5.2 Nachweis der AIV-Virusausscheidung

Zur Ermittlung der Virusausscheidung nach Infektion mit dem homologen AIV H9N2, wurden Tupfer von Rachen und Kloake auf vRNA in der rtRT-PCR untersucht.

An den Tagen 2 und 3 konnte in den Rachentupfern eine höhere Virusgenomlast ermittelt werden, als in Kloakentupfern beider Gruppen. Ab Tag 4 war die mittels rtRT-PCR analysierte Ausscheidung in Rachentupfern deutlich rückläufig (Abb. 23). Für die Kontrollgruppe wurde von Beginn an eine hohe Virusgenomlast aus den kloakalen Tupfern ermittelt, die bis Tag 5 anstieg, gefolgt von einer Plateau-Phase auf ebenfalls hohem Niveau und anschließender Reduktion. Die NDV-H9 Gruppe zeigte einen deutlich verlangsamten Anstieg der detektierten kloakalen Ausscheidung von vRNA, die einen der Kontrollgruppe äquivalenten, jedoch um mindestens 3 CT-Werte reduzierten weiteren Verlauf aufwies. Auch war die Anzahl positiver Einzelproben in der NDV-H9 Gruppe an fast allen Tagen geringer.

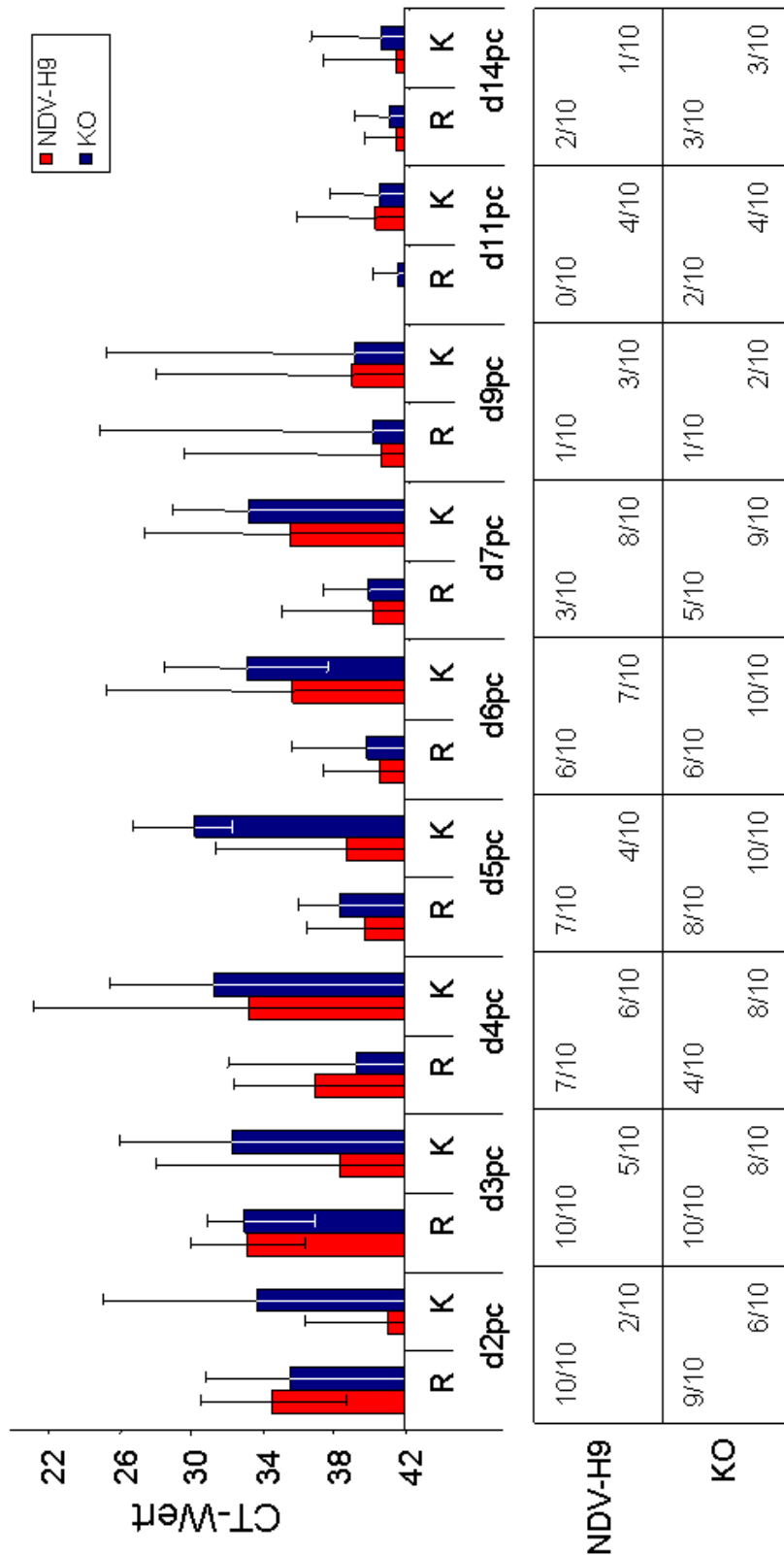


Abb. 23: vRNA-Nachweis in Tupferproben nach Infektion von Hühnern mit AIV H9N2 (rtRT-PCR)

Die CT-Mittelwerte der Gruppen (Balken), sowie die Bandbreiten (vertikale Linie) sind pro Beprobungstag für Rachen (R) und Kloake (K) getrennt dargestellt. Die Anzahl positiver Tupfer an der Gesamtzahl je Gruppe und Tag ist in der Tabelle darunter für Rachen und Kloake getrennt aufgeführt.

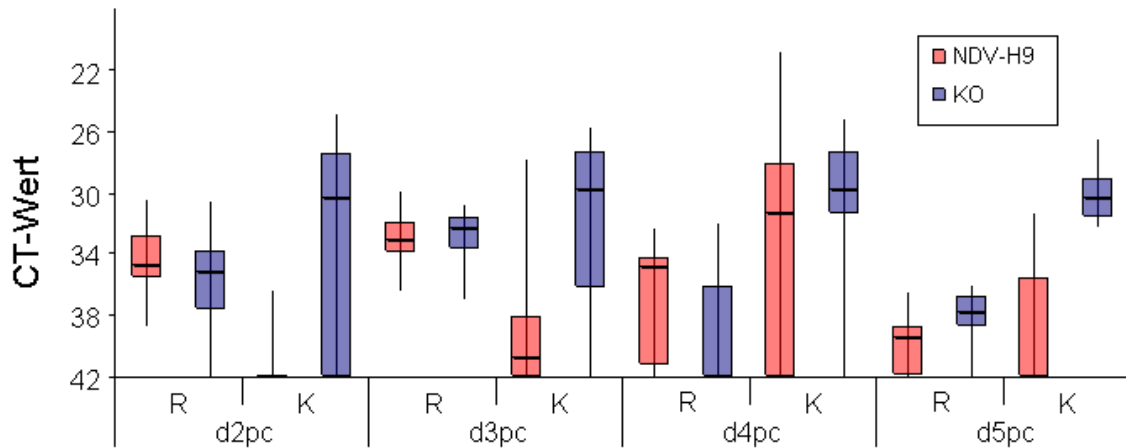


Abb. 24: Box-Plots der ermittelten CT-Werte in Tupferproben nach AIV H9N2-Infektion von Hühnern

Dargestellt sind die Bandbreite (vertikale Linie; Minimum und Maximum), der Median (horizontale schwarze Linie), sowie das untere (0,25) und obere (0,75) Quartil (untere bzw. obere Begrenzung der Box). Decken die Boxen beider Gruppen für Rachen- oder Kloakentupfer an einem Tag nicht-überschneidende CT-Wertbereiche ab, sind die Unterschiede signifikant.

Signifikante Unterschiede der erhaltenen CT-Werte aus Tupfern der Kontroll- und NDV-H9 immunisierten Gruppe waren lediglich in Kloakentupfern an den Tagen 3 ($p=0,04515$; $W=78$) und 5 ($p=0,0004397$; $W=58$) festzustellen, wurden mittels Wilcoxon Test ermittelt und als Box-Plot in Abb. 24 dargestellt. Alle weiteren aus Abb. 23 ersichtlichen Differenzen in der Virusgenomlast zwischen den Gruppen waren nicht signifikant. Der Vergleich der CT-Gruppenmittelwerte im zeitlichen Verlauf legt die Vermutung nahe, dass die Immunisierung mit NDV-H9 eine Minderung von Virusgenomlast und Reagenten über den Hauptausscheidungszeitraum (d2 bis d7pc), bewirkt.

4.3.5.3 Pathologische Befunde nach Belastungsinfektion mit AIV

Drei Wochen nach Infektion mit LPAIV H9N2 wurden alle Tiere sezirt und pathologisch-anatomisch auf makroskopische Veränderungen untersucht. Die Kontrolltiere, aber auch die NDV-H9-immunisierten Tiere wiesen überwiegend leichte (bis mittelgradige) Hämorrhagien im Duodenum und Jejunum auf. Während bei NDV-H9 immunisierten Tieren das Pankreas makroskopisch keine Veränderungen aufwies, konnten bei 2 Kontrollen multifokale, helle, punktförmige Veränderungen diagnostiziert werden, die auf das Vorliegen einer Pankreasnekrose hindeuteten.

4.3.6 Klinik nach Belastungsinfektion mit NDV

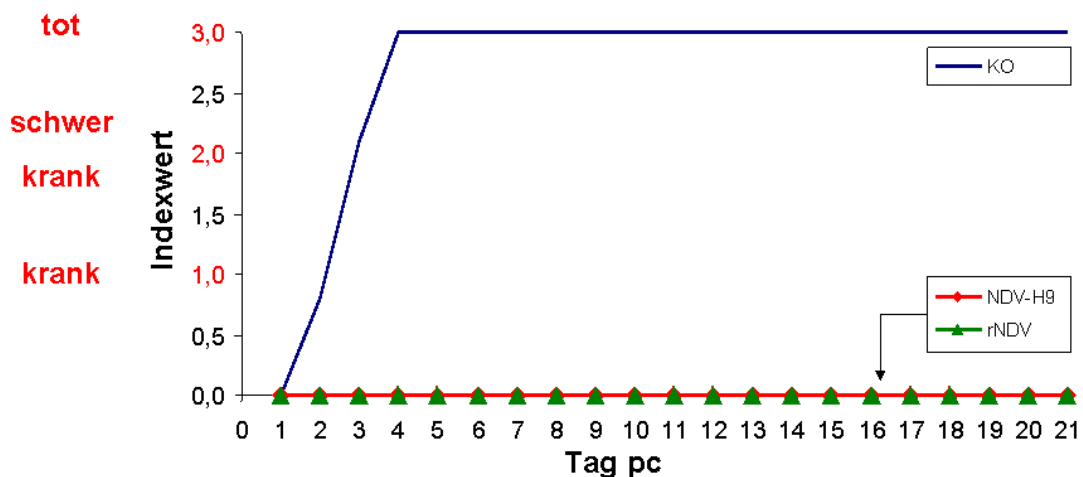


Abb. 25: Täglicher klinischer Index nach Infektion von Hühnern mit velogenem NDV

Nach Infektion mit velogenem NDV Herts 33/56 in tödlicher Dosis ($10^{5.5}$ EID₅₀/Tier), waren alle Tiere der Kontrollgruppe an Tag 4 verstorben. Die immunisierten Tiere blieben gesund und zeigten im Verlauf keine klinischen Symptome (Abb. 25). Während für die Kontrollgruppe ein über 10 Tage berechneter klinischer Index von 2,39 ermittelt wurde, war dieser für beide immunisierten Gruppen 0 (Tab. 5). Wie auch das parentale rNDV zeigte die NDV-H9 Rekombinante nach einmaliger Immunisierung einen vollständigen Schutz gegen klinische Symptome nach einer letalen NDV-Infektion.

4.3.6.1 Nachweis von Antikörpern gegen NDV

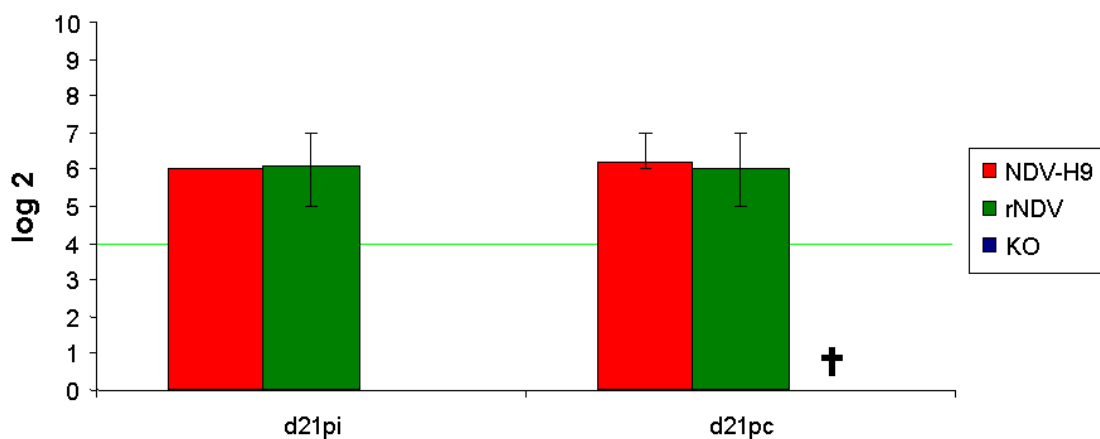


Abb. 26: HN-spezifische AK nach Infektion mit velogenem NDV in Hühnern

Dargestellt sind die HAH-Titer Mittelwerte (Balken) der jeweiligen Gruppe an den entsprechenden Beprobungstagen als log₂, sowie die Bandbreiten (vertikale Linien). Die grüne Linie gibt den Titer an, der nach OIE als positiv zu bewerten ist.

Die vor und nach der Infektion gewonnenen Seren wurden im Hämagglutinations-Hemmungstest auf HN-spezifische Antikörper untersucht. Die Ergebnisse wurden analog des AIV-Nachweises (4.3.4.1) bewertet. Vor der Infektion waren in den Seren der Kontrolltiere keine HN-spezifischen Antikörper gegen NDV nachweisbar. Nach der Infektion standen auf Grund des Versterbens der Kontrollen keine Seren dieser Tiere zur Untersuchung zur Verfügung. Beide immunisierten Gruppen wiesen vor der Infektion HN-spezifische Antikörper-Titer (ca. 2^6 ; Tab. 5) auf, die nach Belastungsinfektion nicht weiter anstiegen (Abb. 26), was auf fehlende oder lediglich geringe Virusreplikation in diesen Gruppen hindeutet.

4.3.6.2 Nachweis der NDV-Virusausscheidung

Zur Ermittlung der Virusausscheidung nach Infektion mit velogenem NDV Herts 33/56 wurden Tupfer von Rachen und Kloake auf vRNA in der rtRT-PCR untersucht.

Die Kontrolltiere wiesen gegenüber beiden immunisierten Gruppen an Tag 3 sowohl in Rachentupfern, wie auch in Kloakentupfern eine signifikant (Abb. 28) höhere Virusgenomlast auf ($p=0,0001028$; $W=28$) und waren an Tag 4 verstorben. Die detektierte Virusgenomlast beider immunisierter Gruppen war, sowohl oropharyngeal, als auch kloakal, von Beginn an auf einem niedrigen Niveau, verminderte sich von Tag 2 an stetig und bewegte sich ab Tag 6 am Detektionslimit (Abb. 27).

An Tag 3 und 4 schied die NDV-H9 immunisierte Gruppe in Kloaken- bzw. Rachentupfern eine signifikant geringere Virusgenomlast ($p_{3K}=0,01726$; $W_{3K}=73$; $p_{4R}=0,00025$; $W_{4R}=56$) als die rNDV immunisierte Gruppe aus (Abb. 28). Abgesehen davon waren in den Tupferproben über den gesamten Beprobungszeitraum zwischen NDV-H9- und rNDV-immunisierten Tieren keine relevanten Unterschiede in der Menge ausgeschiedener vRNA festzustellen. Insgesamt war damit die Ausscheidung nach Belastungsinfektion in beiden immunisierten Gruppen gegenüber nicht-immunisierten Kontrolltieren deutlich reduziert, wobei die Schutzwirkung NDV-H9-immunisierter Tiere mit der rNDV-immunisierter Tiere vergleichbar war.

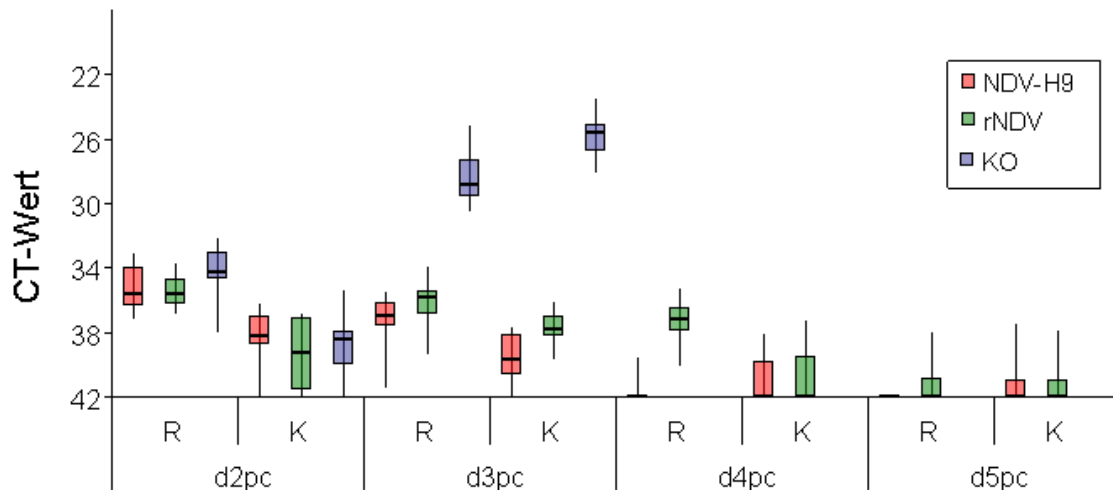


Abb. 28: Box-Plots der ermittelten CT-Werte nach NDV-Infektion von Hühnern

Dargestellt sind die Bandbreite (vertikale Linie; Minimum und Maximum), der Median (horizontale schwarze Linie), sowie das untere (0,25) und obere (0,75) Quartil (untere bzw. obere Begrenzung der Box). Decken die Boxen beider Gruppen für Rachen- oder Kloakentupfer an einem Tag nicht-überschneidende CT-Wertbereiche ab, sind die Unterschiede signifikant.

4.3.6.3 Pathologische Befunde nach Belastungsinfektion mit NDV

Die verstorbenen, moribund getöteten, bzw. die nach Infektion mit velogenem NDV bei Versuchsende getöteten Tiere wurden seziiert und pathologisch-anatomisch auf makroskopische Veränderungen untersucht. Bei den Kontrolltieren standen als pathologische Befunde petechiale Blutungen und Hämorrhagien im Vordergrund, die überwiegend im Epikard, in der Drüsenmagen- bzw. Muskelmagenschleimhaut, sowie insbesondere im Darm-assoziierten lymphoiden Gewebe der Schleimhaut des Duodenums, Jejunums und Ileums lokalisiert waren. Die NDV-H9- bzw. rNDV-immunisierten Tiere wiesen demgegenüber nur leichte Hämorrhagien in Duodenum und Jejunum auf.

4.3.7 Ergebnisübersicht und Fazit

Die protektive Wirkung der NDV-H9 Rekombinante wurde zum einen gegen AIV H9N2 und zum anderen im Vergleich zum parentalen rNDV gegen velogenes NDV im Huhn geprüft. Die NDV-H9 Rekombinante induzierte nach einmaliger Immunisierung vergleichbare NDV-spezifische Antikörper-Titer wie das parentale rNDV (Abb. 19). Zudem wurden beide Immunisierungsviren auf einem vergleichbaren Level ausgeschieden (Abb. 18), woraus geschlossen werden kann, dass NDV-H9 im Huhn entsprechend dem parentalen NDV ohne Fremdgeninsertion repliziert. Die Immunisierung mit NDV-H9 induzierte jedoch keine nachweisbaren AIV H9-spezifischen Antikörper (Kap. 4.3.4.1).

Einmalige Immunisierung mit NDV-H9 bzw. rNDV induzierte einen vollständigen Schutz gegen klinische Symptome nach einer letalen NDV-Infektion (Abb. 25). Ein fehlender Anstieg NDV-spezifischer Antikörper-Titer (Abb. 26) war ein Hinweis auf reduzierte Virusreplikation. Bestätigt wurde dies durch deutlich geringere Virusgenomlasten im Vergleich zur Kontrolle in der RT-PCR (Abb. 27; 28).

Nach Infektion mit LPAIV H9N2 zeigten die Kontrolltiere infektionsbedingte Beeinträchtigungen des Wohlbefindens, während NDV-H9-immunisierte Tiere völlig unauffällig blieben (Abb. 20). Die Entwicklung AIV HA-, sowie NP-spezifischer Antikörper (Abb. 21; 22) in allen Tieren indiziert die Replikation des Virus in beiden Gruppen. Dies wurde durch den Nachweis viraler RNA in der überwiegenden Anzahl der Tupferproben in der RT-PCR (Abb. 23) bestätigt. Die nachgewiesene Menge an viraler AIV-RNA war in beiden Gruppen in etwa vergleichbar. Lediglich an Tag 3 und 5 war die Virusgenomlast in kloakalen Tupfern der NDV-H9-immunisierten Gruppe signifikant geringer (Abb. 24), womit über eine protektive Wirkung der NDV-H9 Rekombinante spekuliert werden kann. Die protektive Wirkung konnte jedoch nicht klar gezeigt werden.

Tab. 5: Ergebnisübersicht:
Schutzwirkung der NDV-H9-Rekombinante im Huhn

Immunisierung	Zeit	NDV-H9		rNDV		KO	
Dosis pro Tier Inokulationsweg	d0	10 ⁶ EID ₅₀ okulonasal		10 ⁶ EID ₅₀ okulonasal		-	
Morbidität		0 / 20		0 / 20			
Mortalität		0 / 20		0 / 20			
klinischer Index		0,00		0,00			
Ausscheidung NDV ⊖-CT-Wert P / n	d2pi	R 31,28 19 / 20	K 41,32 8 / 20	R 38,01 8 / 20	K 41,00 8 / 20		
Ausscheidung NDV ⊖-CT-Wert P / n	d4pi	R 33,70 20 / 20	K 41,70 4 / 20	R 33,70 20 / 20	K 41,32 4 / 20		
H9-spez. Antikörper ⊖-HAH-Titer; P / n	d10pi	0 0 / 20		0 0 / 20			
H9-spez. Antikörper ⊖-HAH-Titer; P / n	d21pi	0 0 / 20		0 0 / 20			
HN-spez. Antikörper ⊖-HAH-Titer; P / n	d10pi	2 ^{5,6} 20 / 20		2 ^{6,15} 20 / 20			
HN-spez. Antikörper ⊖-HAH-Titer; P / n	d21pi	2 ^{6,2} 20 / 20		2 ^{6,3} 20 / 20			
Belastungsinfektion	d21pi	A/turkey/Wisconsin/1/66 (H9N2)					
Dosis pro Tier Inokulationsweg	d0pc	10 ^{8,2} EID ₅₀ okulonasal					
Morbidität		0 / 10		10 / 10			
Mortalität		0 / 10		0 / 10			
klinischer Index		0,00		0,10			
H9-spez. Antikörper ⊖-HAH-Titer; P / n	d11pc	2 ^{5,9} 10 / 10		2 ^{5,8} 10 / 10			
H9-spez. Antikörper ⊖-HAH-Titer; P / n	d21pc	2 ^{5,2} 10 / 10		2 ^{6,4} 10 / 10			
NP-spez. Antikörper P / n	d11pc	10 / 10		10 / 10			
NP-spez. Antikörper P / n	d21pc	10 / 10		10 / 10			
Ausscheidung AIV max. ⊖-CT (Tag) P / n	d2 – d14pc	R 33,24 (3) 10 / 10	K 33,38 (4) 10 / 10	R 33,07 (3) 10 / 10	K 30,26 (5) 10 / 10		
Belastungsinfektion	d21pi	NDV Herts 33/56					
Dosis pro Tier Inokulationsweg	d0pc	10 ^{5,5} EID ₅₀ okulonasal					
Morbidität		0 / 10		0 / 10		10 / 10	
Mortalität		0 / 10		0 / 10		10 / 10	
klinischer Index		0,00		0,00		2,39	
HN-spez. Antikörper ⊖-HAH-Titer; P / n	d21pc	2 ^{6,2} 10 / 10		2 ^{6,0} 10 / 10		†	
Ausscheidung NDV max. ⊖-CT (Tag) P / n	d2 – d14pc	R 35,29 (2) 10 / 10	K 38,32 (2) 10 / 10	R 35,50 (2) 10 / 10	K 37,69 (3) 10 / 10	R 28,29 (3) 10 / 10	K 25,83 (3) 10 / 10

P / n = Anzahl positiver Tupfer bzw. Seren (P) / Anzahl Tiere (n)

4.3.8 Tierversuch in der Pute

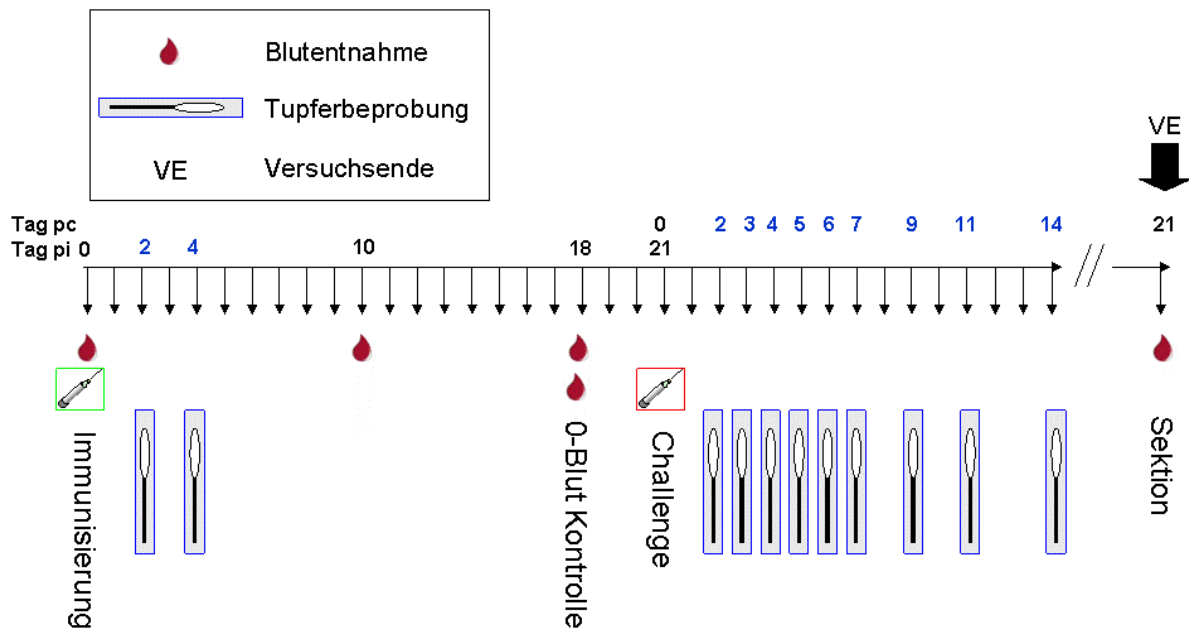


Abb. 29: Zeitablaufplan der Prüfung der NDV-H9 Rekombinante in Puten

Für die Untersuchung der NDV-H9 Rekombinante in Puten wurden insgesamt 50 Tiere verwendet, die aus einem kommerziellen Bestand bezogen wurden, in dem Elterntiere NDV-geimpft waren. Die Puten erhielten als Eintagsküken eine TRT-Impfung (Turkey rhinotracheitis) und waren zum Zeitpunkt der NDV-H9 bzw. rNDV-Immunisierung drei Wochen alt. Gruppeneinteilung und Versuchsdurchführung waren analog zu dem für Hühner (Kap. 4.3.2.; Abb. 16 und 29) beschriebenen. Die Immunisierungsdosis wurde auf 10^7 EID₅₀ / Tier erhöht, um die Immunisierungswirkung in dieser Spezies zu erhöhen. Abweichend vom Versuchsaufbau in Hühnern wurde am Ende der Immunisierungsphase die Serumgewinnung auf Tag 18 vorverlegt, um der höheren Stressanfälligkeit der Puten gerecht zu werden (Abb. 29). Die Belastungsinfektion (Challenge) wurde mit dem homologen AIV H9N2 ($10^{8,2}$ EID₅₀ / Tier) okulonasal, bzw. mit NDV Herts 33/56 ($10^{5,5}$ EID₅₀ / Tier) intramuskulär in den Brustmuskel durchgeführt.

4.3.9 Klinik nach Immunisierung

Die Tiere zeigten nach der Immunisierung mit der Rekombinante NDV-H9 und rNDV keine klinischen Symptome und wurden als gesund beurteilt. Allerdings trat in allen Gruppen infektionsunabhängig Kannibalismus auf. Sowohl in der NDV-H9, als auch in der rNDV Gruppe erlag jeweils ein Tier an Tag 4 den dadurch entstandenen Verletzungen und wurde deshalb ab diesem Zeitpunkt von der Gruppenbewertung ausgeschlossen (Tab. 6).

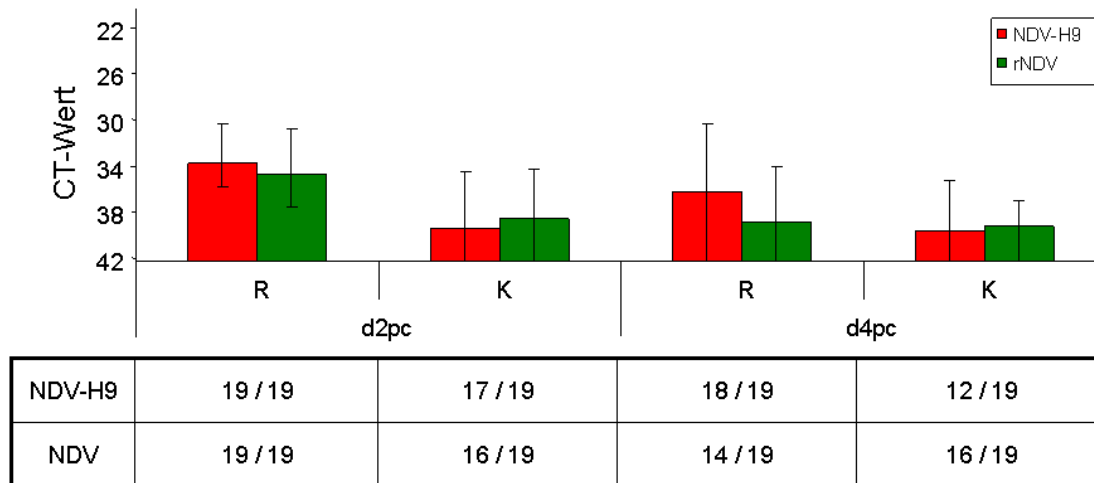


Abb. 30: vRNA-Nachweis in Tupferproben nach Immunisierung mit NDV-H9 und rNDV in Puten

Die CT-Mittelwerte der Gruppen (Balken), sowie die Bandbreiten (vertikale Linie) sind pro Beprobungstag für Rachen (R) und Kloake (K) getrennt dargestellt. Die Anzahl positiver Tupfer an der Gesamtzahl je Gruppe und Tag ist in der Tabelle darunter für Rachen und Kloake getrennt aufgeführt.

Auch in den immunisierten Puten wurde die Virusausscheidung über Rachen und Kloake mittels Detektion der vRNA in der rtRT-PCR untersucht. In beiden Gruppen konnte an beiden Tagen vRNA in Rachen- und Kloakentupfern nachgewiesen werden, wobei die durchschnittlichen täglichen CT-Werte beider Gruppen an den Beprobungstagen kaum differierten (Abb. 30). Wie auch in den Hühnern konnte in Rachentupfern eine höhere Virusgenomlast, als in Kloakentupfern ermittelt werden. Die NDV-H9 Rekombinante repliziert in der Pute entsprechend dem parentalen rNDV ohne Fremdgeninsertion.

4.3.9.1 Untersuchung auf Antikörper gegen AIV

Im Hämagglutinations-Hemmungstest wurden die vor und nach Immunisierung gewonnenen Serumproben auf AIV H9-spezifische Antikörper untersucht. Als Antigen wurde das homologe AIV A/turkey/Wisconsin/1/66 (H9N2) eingesetzt; die Bewertung erfolgte wie unter 4.3.4.1 beschrieben. Bei der Untersuchung der vor Immunisierung gewonnenen Seren konnten keine H9-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. In den Seren rNDV-immunisierter Tiere waren erwartungsgemäß keine H9-spezifischen Antikörper induziert worden, jedoch konnten auch in den mit NDV-H9 immunisierten Puten keine H9-spezifischen Antikörper detektiert werden. Wie auch für Hühner beschrieben, wurde dieses Ergebnis in der sensitiveren indirekten Immunfluoreszenz auf AIV H9N2 infizierten Zellen überprüft. Desgleichen konnte für Puten selbst bei niedrigen Serumverdünnungen (1:10) keine H9-spezifische Fluoreszenz mit den d18pi gewonnenen Seren nachgewiesen werden, weshalb auch bei Puten davon auszugehen war, dass durch die Immunisierung mit

NDV-H9 keine oder lediglich unterhalb der Nachweisgrenze dieser Methode liegende Mengen an H9-spezifischen Antikörpern induziert worden waren.

4.3.9.2 Untersuchung auf Antikörper gegen NDV

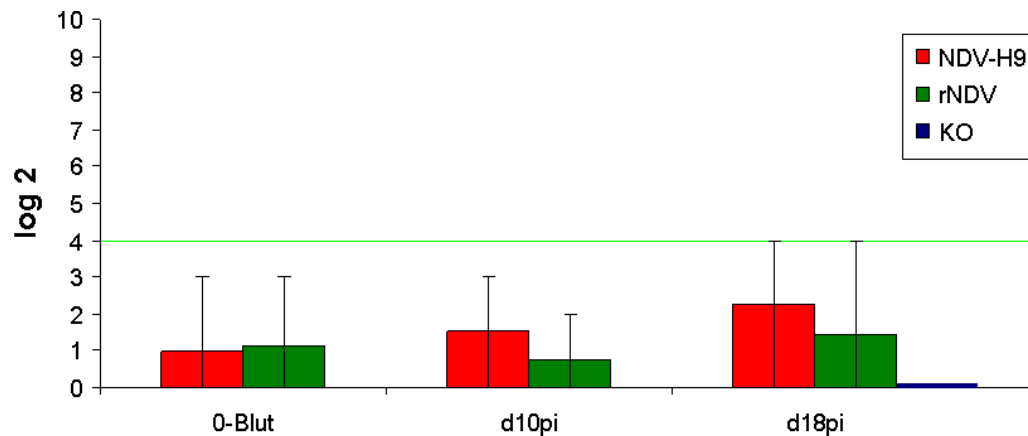


Abb. 31: HN-spezifische AK nach Immunisierung mit NDV-H9 und rNDV in Puten

Dargestellt sind die HAH-Titer Mittelwerte (Balken) der jeweiligen Gruppe an den entsprechenden Beprobungstagen als log₂, sowie die Bandbreiten (vertikale Linien). Die grüne Linie gibt den Titer an, der nach OIE als positiv zu bewerten ist.

Im Hämagglutinations-Hemmungstest wurden vor und nach der Immunisierung gewonnene Serumproben auf HN-spezifische Antikörper untersucht. Als Antigen wurde rNDV eingesetzt und die Ergebnisse analog des AIV-Nachweises (4.3.4.1) bewertet. Bereits vor der Immunisierung wurden in Seren aller zu immunisierender Tiere Antikörper gegen NDV auf unspezifischem Niveau detektiert (Abb. 31). An Tag 18 nach Immunisierung konnten sowohl in NDV-H9- als auch in rNDV-immunisierten Tieren höhere Antikörper-Titer als an Tag 0 und 10 ermittelt werden, während in nicht-immunisierten Tieren (d18pi) keine Antikörper-Titer nachgewiesen wurden (Abb. 31), somit ist davon auszugehen, dass die Immunisierung Antikörper induziert hatte, obwohl die Antikörper-Titer insgesamt sehr niedrig waren.

4.3.10 Klinik nach Belastungsinfektion mit AIV H9N2

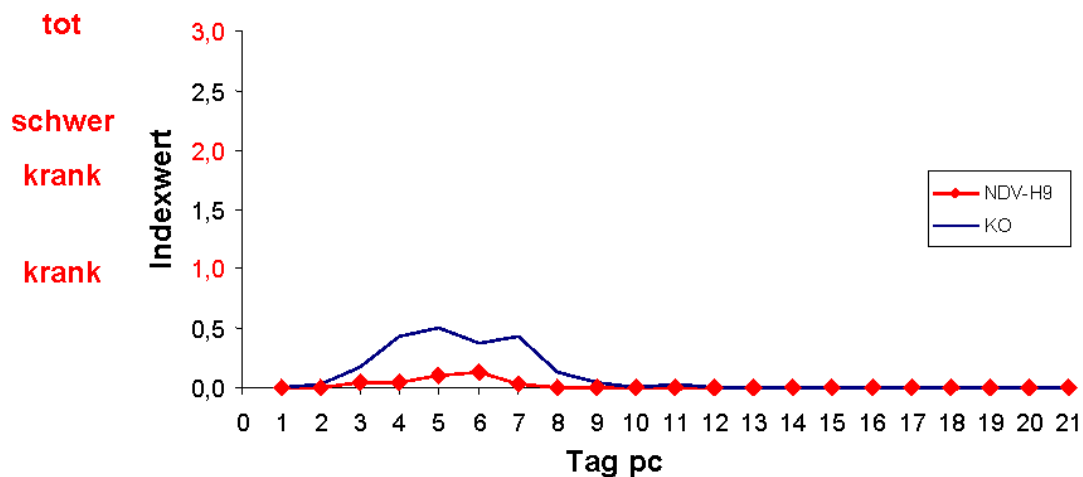


Abb. 32: täglicher klinischer Index nach Infektion von Puten mit AIV H9N2

Nach Infektion mit einer hohen AIV H9N2 Dosis ($10^{8,2}$ EID₅₀ / Tier) zeigten alle Kontrolltiere (100 %; 10/10) eine deutliche Beeinträchtigung des Wohlbefindens von Tag 2 bis 10 (Abb. 32). Die häufigsten Merkmale waren Mattigkeit, leichter Durchfall und eine leichte Entzündung der Lidbindehaut und des Sinus, in Verbindung mit einer geringgradigen Schwellung. Demgegenüber zeigten NDV-H9 immunisierte Tiere insgesamt nur eine leichte Beeinträchtigung des Wohlbefindens (Mattigkeit, minimale Schwellung des Sinus) über einen verkürzten Zeitraum (d3 – d7pc), wobei nur 78 % (7/9) dieser Tiere betroffen waren. Insgesamt waren die Symptome sehr mild, jedoch zeigt der -wenn auch geringe- ermittelte Indexwert der Kontrolltiere (klinischer Index = 0,21; Tab. 5), dass es zu einer Beeinträchtigung des Wohlbefindens der Tiere gekommen war. Hingegen waren die NDV-H9 immunisierten Tiere deutlich weniger beeinträchtigt (klinischer Index = 0,04; Tab. 5).

Ein Tier der NDV-H9 Gruppe wurde moribund getötet und in der Sektion eine dilatative Kardiomyopathie diagnostiziert. Dieses Tier schied aus der Bewertung nach Belastungsinfektion aus, so dass diese Gruppe aus 9 Tieren bestand.

4.3.10.1 Untersuchung auf Antikörper gegen AIV

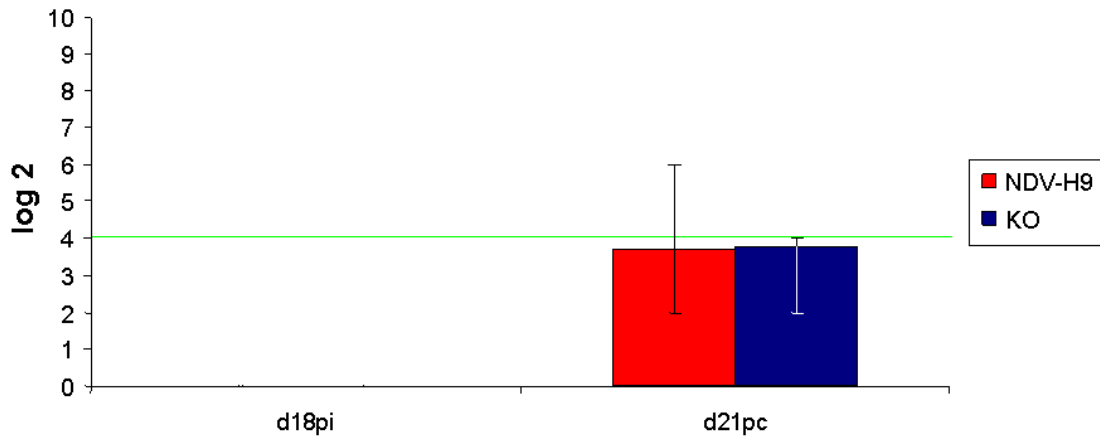


Abb. 33: AIV H9-spezifische Antikörper nach Infektion mit AIV H9N2 in Puten

Dargestellt sind die HAH-Titer Mittelwerte (Balken) der jeweiligen Gruppe an den entsprechenden Beprobungstagen als log₂, sowie die Bandbreiten (vertikale Linien). Die grüne Linie gibt den Titer an, der nach OIE als positiv zu bewerten ist.

Vor und nach der Infektion gewonnene Serumproben wurden im Hämagglutinations-Hemmungstest auf H9-spezifische Antikörper untersucht. Als Antigen wurde das homologe AIV A/turkey/Wisconsin/1/66 (H9N2) verwendet, die Bewertung erfolgte wie unter 4.5.3.1 beschrieben. Während in vor Belastungsinfektion gewonnenen Seren keine AIV H9-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden konnten, serokonvertierten (ca. 2⁴; Tab. 6) alle NDV-H9-immunisierten Tiere nach AIV-Infektion entsprechend den nicht-immunisierten Kontrolltieren (Abb. 33). Dies indiziert eine starke Virusreplikation in den Tieren beider Gruppen.

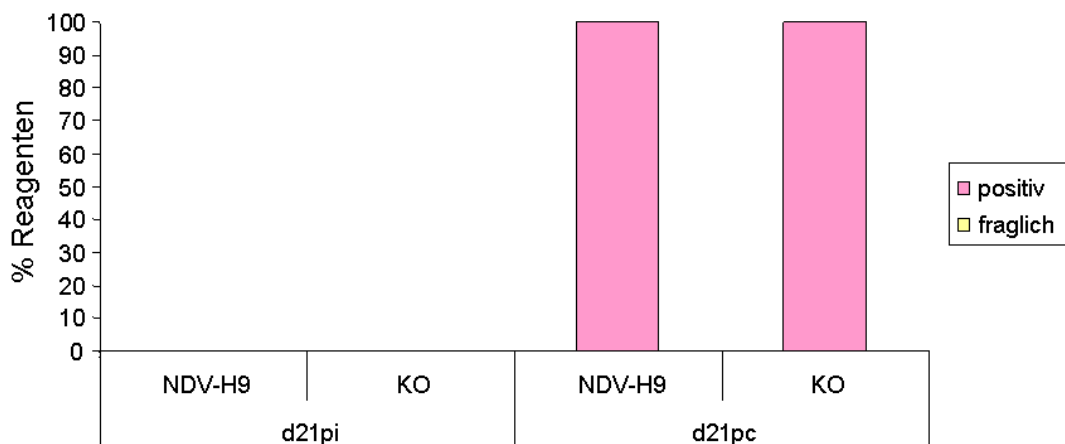


Abb. 34: AIV NP-spezifische Antikörper nach Infektion mit AIV H9N2 in Puten

Auch in Puten induzierte die Immunisierung mit der NDV-H9-Rekombinante keine H9-spezifischen Antikörper, womit sich eine Differenzierung von immunisierten und infizierten Tieren anhand des Nachweises von Antikörpern gegen andere, nicht HA-spezifische AIV Proteine nach Belastungsinfektion, erübrigt. Dennoch wurden die Seren in einem AIV NP-spezifischen ELISA untersucht. Vor der Infektion waren in den Seren NDV-H9 immunisierter und AIV-naiver Hühner, wie erwartet, keine AIV NP-spezifischen Antikörper detektierbar. Nach der AIV-Belastungsinfektion (d21pc) konnten in allen Tieren beider Gruppen NP-spezifische Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 34), was weiterhin die Virusreplikation in Tieren beider Gruppen indiziert.

4.3.10.2 Nachweis der AIV-Virusausscheidung

Die Virusausscheidung nach Infektion mit AIV H9N2 wurde mittels Untersuchung von Rachen- und Kloakentupfern in der rtRT-PCR auf vRNA geprüft. An den Tagen 2 bis 4 konnte in den Rachentupfern eine höhere Virusgenomlast ermittelt werden, als in Kloakentupfern beider Gruppen. Ab Tag 5 war die mittels rtRT-PCR analysierte Ausscheidung in Rachentupfern deutlich rückläufig (Abb. 35).

Für die Kontrollgruppe wurde von Tag 3 an eine hohe Virusgenomlast aus den kloakalen Tupfern ermittelt, die von einer Plateau-Phase auf ebenfalls hohem Niveau und anschließender Reduktion gefolgt war. Die NDV-H9 Gruppe zeigte einen deutlich verzögerten Anstieg der kloakalen Virusgenomlast, die einen der Kontrollgruppe äquivalenten weiteren Verlauf aufwies. Auch war die Anzahl positiver Einzelproben der NDV-H9 Gruppe in der frühen Phase nach Infektion pro Tag geringer (Abb. 35).

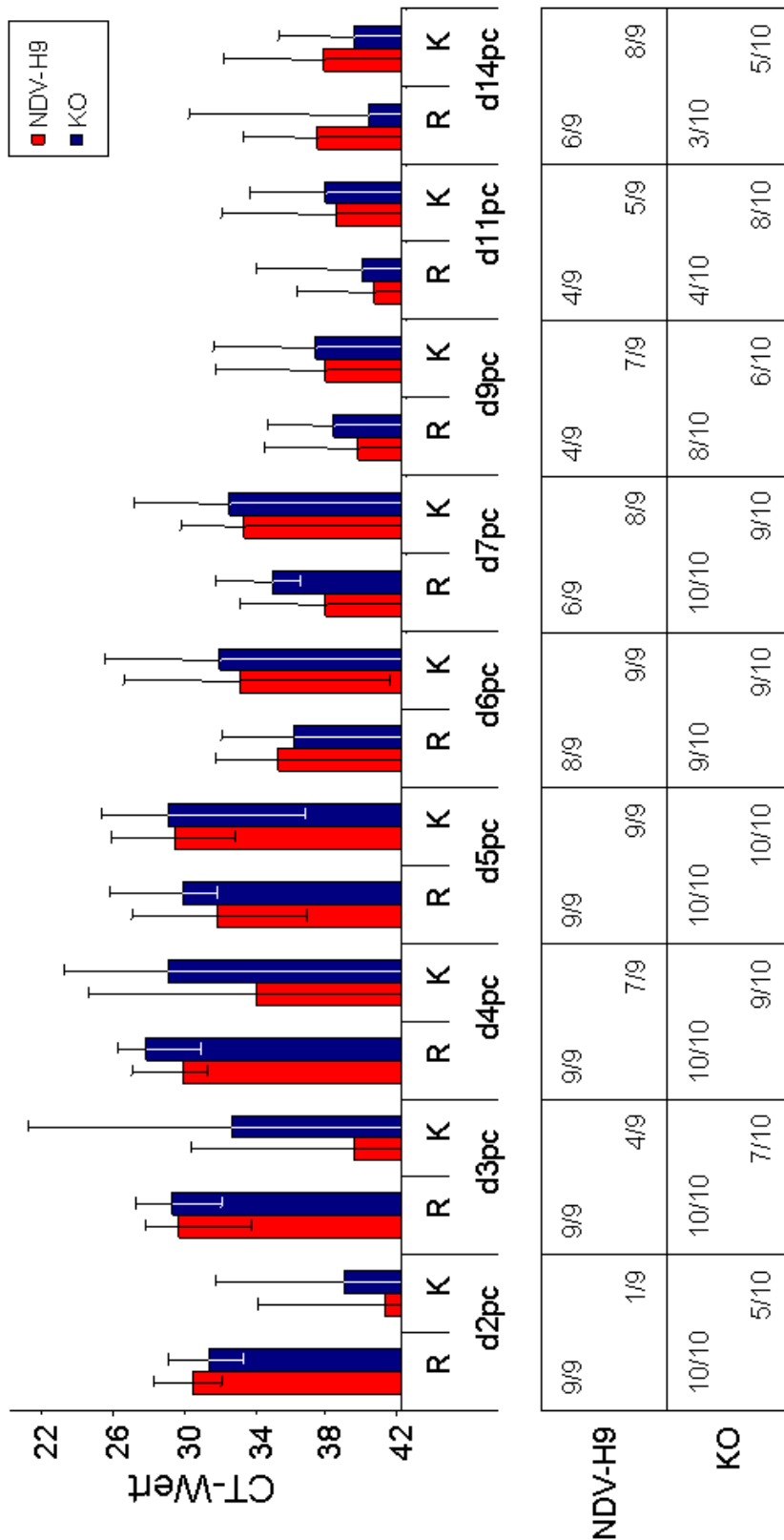


Abb. 35: vRNA-Nachweis in Tupferproben nach Infektion von Puten mit AIV H9N2 (rtRT-PCR)

Die CT-Mittelwerte der Gruppen (Balken), sowie die Bandbreiten (vertikale Linie) sind pro Beprobungstag für Rachen (R) und Kloake (K) getrennt dargestellt. Die Anzahl positiver Tupfer an der Gesamtzahl je Gruppe und Tag ist in der Tabelle darunter für Rachen und Kloake getrennt aufgeführt.

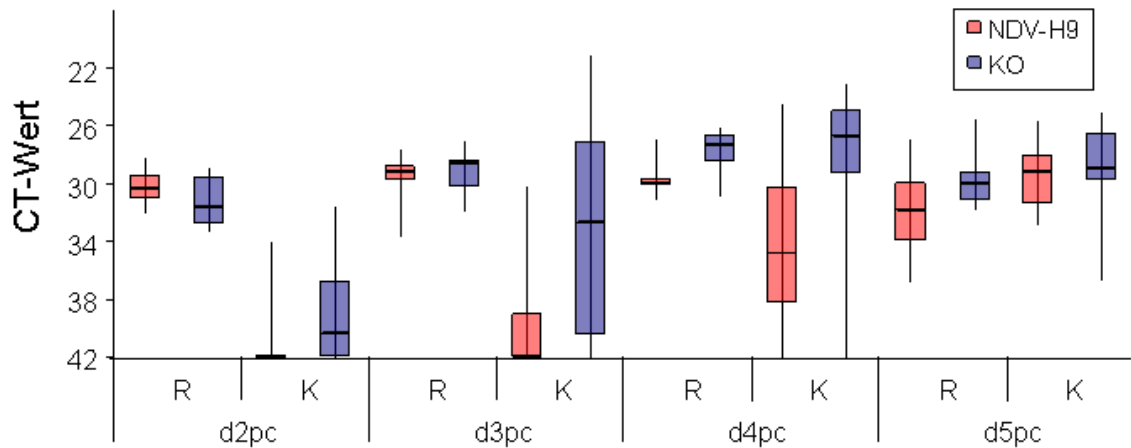


Abb. 36: Box-Plots der ermittelten CT-Werte in Tupferproben nach AIV H9N2-Infektion von Puten

Dargestellt sind die Bandbreite (vertikale Linie; Minimum und Maximum), der Median (horizontale schwarze Linie), sowie das untere (0,25) und obere (0,75) Quartil (untere bzw. obere Begrenzung der Box). Decken die Boxen beider Gruppen für Rachen- oder Kloakentupfer an einem Tag nicht-überschneidende CT-Wertbereiche ab, sind die Unterschiede signifikant.

Aus den erhaltenen CT-Werten aus Tupfern der Kontroll- und NDV-H9 immunisierten Gruppe waren lediglich in oropharyngealen Tupfern von NDV-H9 an Tag 4 signifikant geringere Virusgenomlasten ($p=0,01011$; $W=68$) mittels Wilcoxon Test ermittelt worden und als Box-Plot in Abb. 36 dargestellt. Alle weiteren aus Abb. 35 ersichtlichen Differenzen in der Virusgenomlast zwischen den Gruppen waren nicht signifikant. Der Vergleich der CT-Gruppenmittelwerte im zeitlichen Verlauf legt die Vermutung nahe, dass die Immunisierung mit NDV-H9 eine Minderung von Virusgenomlast und Reagenten über den Hauptausscheidungszeitraum (d2 bis d4pc), bewirkt.

4.3.10.3 Pathologische Befunde nach Belastungsinfektion mit AIV

Drei Wochen nach Infektion mit LPAIV H9N2 wurden alle Tiere sezziert und pathologisch-anatomisch auf makroskopische Veränderungen untersucht. Bei 80 % der Kontrolltiere, aber auch bei 50 % der NDV-H9-immunisierten Tiere zeigten sich überwiegend leichte bis mittelgradige Hämorrhagien in Duodenum und Jejunum, sowie subserosale, petechiale Blutungen in Bursa und Nieren. Die anderen 50 % der NDV-H9-immunisierten Tiere wiesen keine sichtbaren Veränderungen auf.

4.3.11 Klinik nach Belastungsinfektion mit NDV

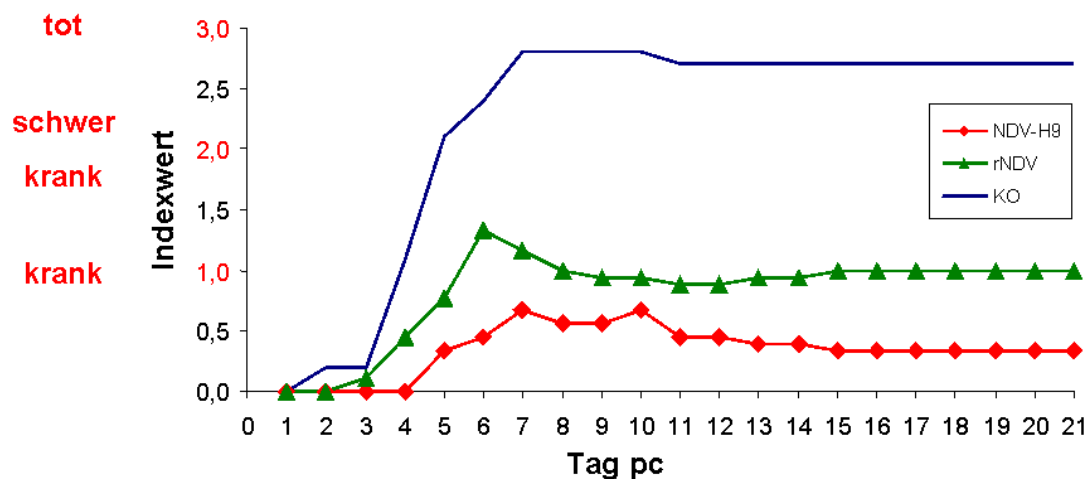


Abb. 37: täglicher klinischer Index nach Infektion von Puten mit velogenem NDV

Nach Infektion mit einer letalen Dosis NDV Herts 33/56 ($10^{5,5}$ EID₅₀ / Tier) war die Kontrollgruppe an Tag 5 schwer erkrankt bzw. 50 % der Tiere verstarben (Abb. 37). Insgesamt verstarben 90 % und 1 krankes Tier überlebte. Daraus resultierte ein klinischer Index von 1,72 für die Kontrollgruppe (Tab. 6).

In der mit rNDV immunisierten Gruppe zeichnete sich ein ähnlicher Kurvenverlauf ab, der im Vergleich zur Kontrollgruppe auf einem deutlich niedrigeren Niveau lag. Die erkrankten Tiere (7/9) zeigten vorherrschend Depression und Diarrhö, jedoch verstarben 3 von 9 Tieren (33 %), woraus ein klinischer Index von 0,67 resultierte (Tab. 6).

Die NDV-H9 immunisierten Tiere zeigten gegenüber der rNDV Gruppe und den Kontrollen ein verzögertes Auftreten klinischer Symptome. In dieser Gruppe erkrankten 5 von 9 Tieren überwiegend an zentralnervösen Störungen (Paralyse des Flügels, Ataxie). Diese Gruppe wies mit 11 % (1/9) die niedrigste Mortalität und auch den geringsten klinischen Index (0,34) auf (Tab. 6).

Wie auch das parentale rNDV zeigte die NDV-H9 Rekombinante nach einmaliger Immunisierung eine deutliche Reduktion klinischer Symptome und der Mortalität nach einer letalen NDV-Infektion.

4.3.11.1 Nachweis von Antikörpern gegen NDV

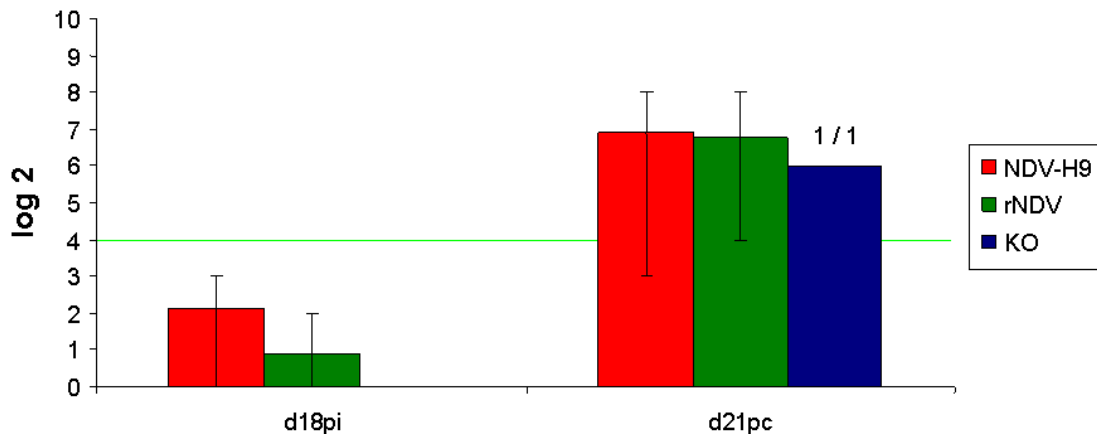


Abb. 38: HN-spezifische AK nach Infektion mit velogenem NDV in Puten

Dargestellt sind die HAH-Titer Mittelwerte (Balken) der jeweiligen Gruppe an den entsprechenden Beprobungstagen als \log_2 , sowie die Bandbreiten (vertikale Linien). Die grüne Linie gibt den Titer an, der nach OIE als positiv zu bewerten ist.

Die vor und nach der Infektion gewonnenen Seren wurden im Hämagglutinations-Hemmungstest auf NDV HN-spezifische Antikörper untersucht. Die Kontrolltiere wiesen vor der Infektion keine HN-spezifischen Antikörper auf. Es verstarben 9 von 10 Kontrolltieren, wobei das überlebende Tier nach der Infektion einen HN-spezifischen Titer von 10^6 aufwies (Tab. 6). Beide immunisierten Gruppen hatten nach Infektion, bei einem Titer HN-spezifischer Antikörper von ca. 2^7 , serokonvertiert (Abb. 38), was als ein Anzeichen für Virusreplikation in rNDV immunisierten Tieren, aber auch in NDV-H9 immunisierten Tieren gewertet werden kann.

4.3.11.2 Nachweis der NDV-Virusausscheidung

Zur Ermittlung der Virusausscheidung nach Infektion mit velogenem NDV Herts 33/56, wurden Tupfer von Rachen und Kloake auf vRNA in der rtRT-PCR untersucht. Über den gesamten Beprobungszeitraum schieden alle Tiere vRNA aus. Deutlich höhere Virusgenomlasten waren an Tag 4 und 5, sowohl in Rachen-, als auch in Kloakentupfern der Kontrolltiere gegenüber den beiden immunisierten Gruppen nachzuweisen (Abb. 39). An den beiden Folgetagen waren nur noch die Virusgenomlasten aus Kloakentupfern der Kontrollen höher als die von immunisierten Tieren ermittelten; die aus Rachentupfern nachgewiesenen Virusgenomlasten waren in etwa vergleichbar (Abb. 39). Insgesamt war damit die Ausscheidung nach Belastungsinfektion in beiden immunisierten Gruppen gegenüber nicht-immunisierten Kontrolltieren (d4 bis d7pc) reduziert, wobei die Schutzwirkung NDV-H9-immunisierter Tiere mit der rNDV-immunisierter Tiere vergleichbar war.

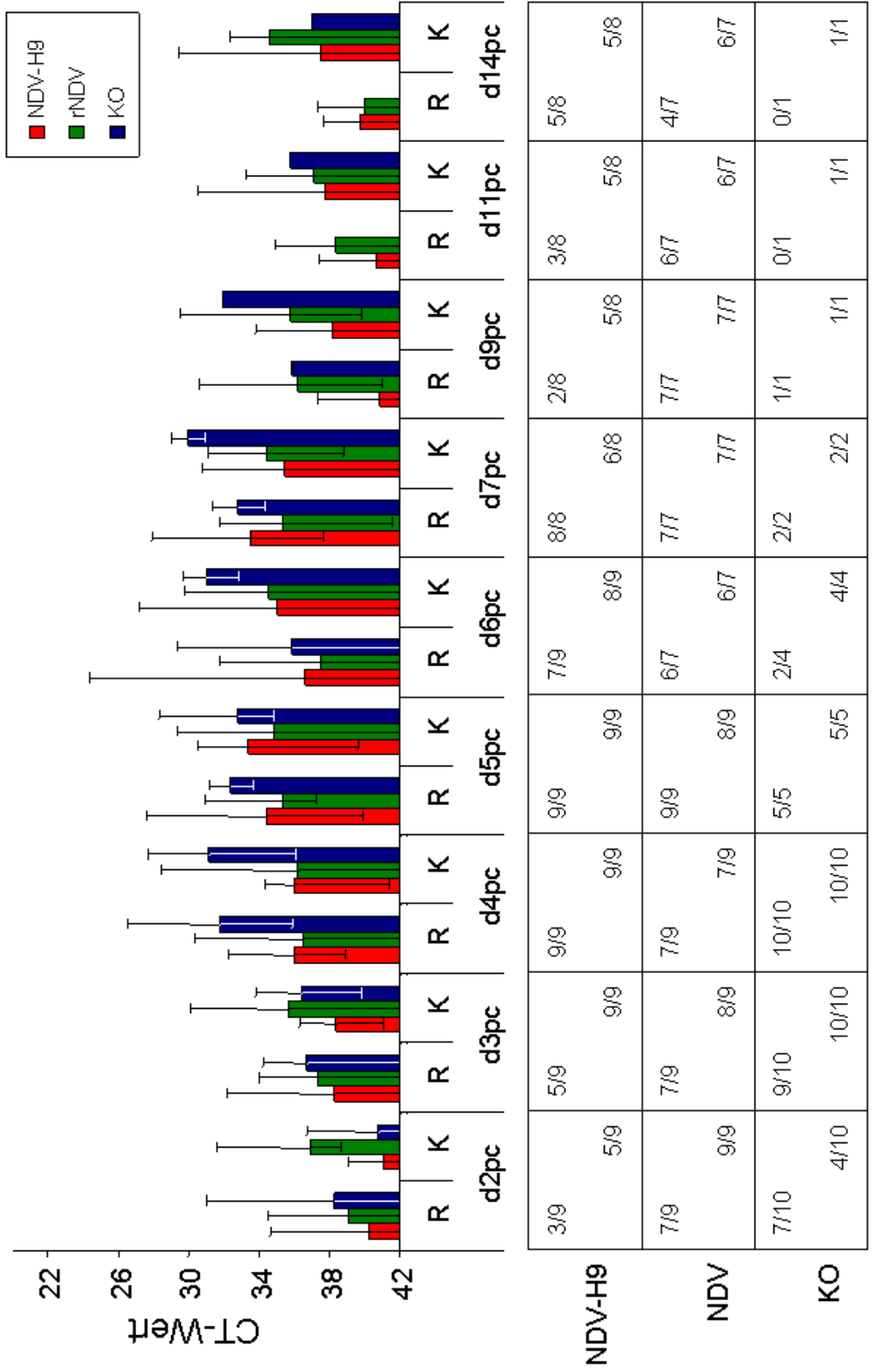


Abb. 39: vRNA-Nachweis in Tupferproben nach Infektion von Puten mit NDV (rtRT-PCR)

Die CT-Mittelwerte der Gruppen (Balken), sowie die Bandbreiten (vertikale Linie) sind pro Beprobungstag für Rachen (R) und Kloake (K) getrennt dargestellt. Die Anzahl positiver Tupfer an der Gesamtzahl je Gruppe und Tag ist in der Tabelle darunter für Rachen und Kloake getrennt aufgeführt.

4.3.11.3 Pathologische Befunde nach Belastungsinfektion mit NDV

Die verstorbenen, moribund getöteten bzw. die am Versuchsende getöteten Tiere wurden sezziert und pathologisch-anatomisch auf makroskopische Veränderungen untersucht. Die Kontrolltiere wiesen zahlreiche Veränderungen auf, wie Hämorrhagien in Duodenum und Jejunum und multiple, umschriebene Pankreasnekrosen. Diese Veränderungen wurden auch in NDV-H9- bzw. NDV-immunisierten Tieren gefunden.

4.3.12 Ergebnisübersicht und Fazit

Die NDV-H9 Rekombinante wurde auf ihre protektive Wirkung in der Pute analog zur Testung im Huhn gegen AIV H9N2 und zum anderen im Vergleich zum parentalen rNDV gegen velogenes NDV geprüft. Die NDV-H9 Rekombinante induzierte nach einmaliger Immunisierung vergleichbare NDV-spezifische Antikörper-Titer wie das parentale rNDV (Abb. 31), wobei die Titer sehr niedrig waren. Zudem wurden beide Viren auf einem vergleichbaren Niveau ausgeschieden (Abb. 30), was zeigt, dass NDV-H9 auch in der Pute entsprechend dem parentalen NDV ohne Fremdgeninsertion repliziert. Die Immunisierung mit NDV-H9 induzierte jedoch keine nachweisbaren AIV H9-spezifischen Antikörper (Kap. 4.3.9.1).

Einmalige Immunisierung mit NDV-H9 bzw. rNDV induzierte einen partiellen Schutz gegen klinische Symptome nach einer letalen NDV-Infektion (Abb. 37) und führte zu reduzierter Mortalität im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ein deutlicher Anstieg NDV-spezifischer Antikörper-Titer (Abb. 38) war jedoch ein Hinweis auf starke Virusreplikation. Bestätigt wurde dies durch hohe Virusgenomlasten in der RT-PCR, die in den immunisierten Tieren geringfügig geringer waren als in den Kontrollen (Abb. 39).

Nach Infektion mit LPAIV H9N2 zeigten die Kontrolltiere infektionsbedingte Beeinträchtigungen des Wohlbefindens, während NDV-H9-immunisierte Tiere völlig unauffällig blieben (Abb. 32). Die Entwicklung AIV HA-, sowie NP-spezifischer Antikörper (Abb. 33; 34) in allen Tieren indiziert die Replikation des Virus in beiden Gruppen. Dies wurde durch den Nachweis viraler RNA in der überwiegenden Anzahl der Tupferproben in der RT-PCR (Abb. 35) bestätigt. Die nachgewiesene Menge an viraler AIV-RNA war in beiden Gruppen in etwa vergleichbar. Lediglich an Tag 4 war die Virusgenomlast in oropharyngealen Tupfern der NDV-H9-immunisierten Gruppe signifikant geringer (Abb. 36). Eine protektive Wirkung konnte nicht gezeigt werden.

Tab. 6: Ergebnisübersicht:
Schutzwirkung der NDV-H9 Rekombinante in der Pute

Immunisierung	Zeit	NDV-H9		rNDV		KO	
Dosis pro Tier Inokulationsweg	d0	10 ⁷ EID ₅₀ okulonasal		10 ⁷ EID ₅₀ okulonasal		-	
Morbidität		0 / 19		0 / 19			
Mortalität		0 / 19		0 / 19			
klinischer Index		0,00		0,00			
Ausscheidung NDV ⊖-CT-Wert P / n	d2pi	R 33,49 19/19	K 39,03 17/19	R 34,40 19/19	K 38,26 16/19		
Ausscheidung NDV ⊖-CT-Wert P / n	d4pi	R 35,95 18/19	K 39,39 12/19	R 38,49 14/19	K 38,99 16/19		
H9-spez. Antikörper ⊖-HAH-Titer; P / n	d10pi	0 0 / 19		0 0 / 19			
H9-spez. Antikörper ⊖-HAH-Titer; P / n	d18pi	0 0 / 19		0 0 / 19			
HN-spez. Antikörper ⊖-HAH-Titer; P / n	d10pi	2 ^{1,5} 4 / 19		2 ^{0,7} 0 / 19			
HN-spez. Antikörper ⊖-HAH-Titer; P / n	d18pi	2 ^{2,3} 8 / 19		2 ^{1,4} 2 / 19			
Belastungsinfektion	d21pi	A/turkey/Wisconsin/1/66 (H9N2)					
Dosis pro Tier Inokulationsweg	d0pc	10 ^{8,2} EID ₅₀ okulonasal					
Morbidität		7 / 9		10 / 10			
Mortalität		0 / 9		0 / 10			
klinischer Index		0,04		0,21			
H9-spez. Antikörper ⊖-HAH-Titer; P / n	d21pc	2 ^{3,7} 5 / 9		2 ^{3,8} 9 / 10			
NP-spez. Antikörper P / n	d21pc	9 / 9		10 / 10			
Ausscheidung AIV max. ⊖-CT (Tag) P / n	d2 – d14pc	R 29,54 (3) 9 / 9	K 29,28 (5) 9/9	R 27,72 (4) 10 / 10	K 28,98 (5) 10 / 10		
Belastungsinfektion	d21pi	NDV Herts 33/56					
Dosis pro Tier Inokulationsweg	d0pc	10 ^{5,5} EID ₅₀ intramuskulär					
Morbidität		5 / 9		7 / 9		10 / 10	
Mortalität		1 / 9		3 / 9		9 / 10	
klinischer Index		0,34		0,67		1,72	
HN-spez. Antikörper ⊖-HAH-Titer; P / n	d21pc	2 ^{6,9} 8 / 8		2 ^{6,8} 6 / 6		2 ^{6,0} 1 / 1	
Ausscheidung NDV max. ⊖-CT (Tag) P / n	d2 – d14pc	R 33,46 (7) 9 / 9	K 33,44 (5) 9 / 9	R 35,37 (5) 9 / 9	K 34,40 (7) 9 / 9	R 31,78 (4) 10 / 10	K 29,97 (7) 10 / 10

P / n = Anzahl positiver Tupfer bzw. Seren (P) / Anzahl Tiere (n)

4.4 AIV-N1 exprimierende NDV-Rekombinante (NDV-N1)

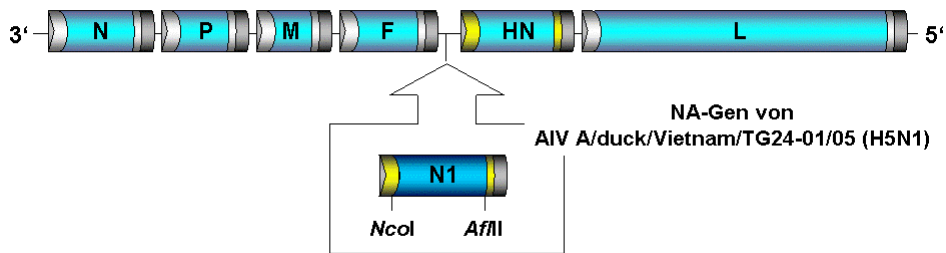


Abb. 40: Genomaufbau der NDV-N1 Rekombinante

Schematische, nicht maßstabsgerechte Darstellung des Genomaufbaus von NDV-N1; Farbkodierung: dunkelgrau: Gen-Start- (Pfeil) und Gen-Endsequenzen (Block); hellgrau: nicht-kodierende Region; hellblau: NDV-Gene, gelb: nicht-kodierende Region des HN-Gens, dunkelblau: inserierter ORF des AIV Neuraminidase N1-Gens

Die NDV-N1-Rekombinante entspricht in ihrem Aufbau der unter 4.1 beschriebenen Rekombinante NDV-H9. Ausgehend vom full-length Plasmid pNDVH5Vm3 wurde das H5-Gen in dieser Rekombinante gegen das Neuraminidase-Gen des Isolates A/duck/Vietnam/TG24-01/05 (H5N1) substituiert (Abb. 40). Die Rekombinante wurde im Labor Dr. A. Römer-Oberdörfer, FLI, Insel Riems, generiert und *in vitro*-charakterisiert (Ramp et al. in preparation). Vor dem Einsatz dieser Rekombinante zur Immunisierung und Prüfung der Schutzwirkung gegen HPAIV im Tier wurde die Fremdgenexpression verifiziert.

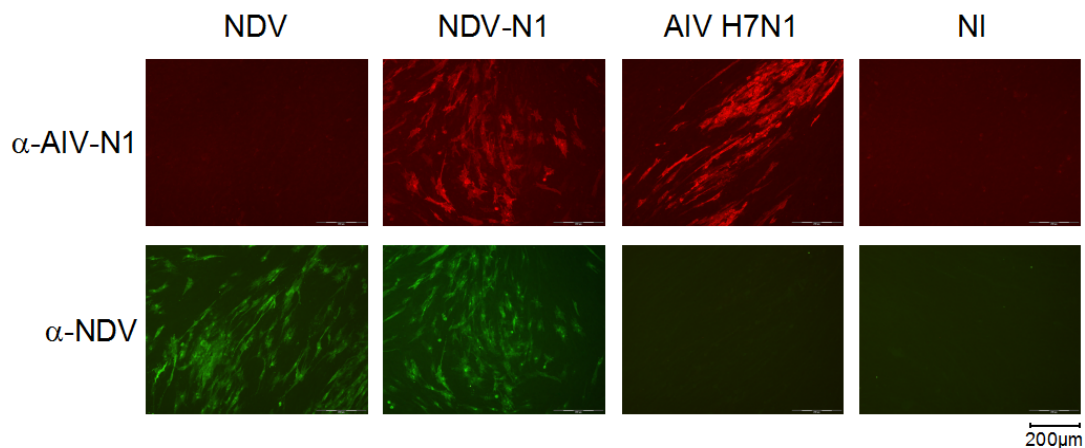


Abb. 41: Nachweis des N1-Proteins von NDV-N1 im IFT

CEF-Zellen wurden mit den entsprechenden Viren (MOI: 0,01) infiziert und nach 18 Stunden fixiert. Alle Zellen wurden mit einem monospezifischen Vaccinia-AIV-N1- (1:1.000, Kaninchen), sowie mit polyklonalem NDV-Antiserum (1:1.000; Huhn) simultan inkubiert und die Reaktionen mit entsprechenden Spezies-spezifischen Alexa-Fluor 488- bzw. 594-markierten Zweitantikörpern nachgewiesen.

Durch den simultanen Einsatz eines NDV-spezifischen, sowie N1-spezifischen Antiserums in der indirekten Immunfluoreszenz konnte gezeigt werden, dass in NDV-N1 infizierten Zellen,

die NDV-spezifische Fluoreszenz aufwiesen, auch das N1-Protein exprimiert wurde, während in NDV-infizierten Zellen nur NDV-spezifische Proteine detektiert wurden (Abb. 41). Mit AIV H7N1-infizierte Zellen dienten zur Kontrolle der AIV N1-spezifischen Reaktion und nicht-infizierte Zellen, als Negativkontrolle zeigten keine Reaktion (Abb. 41).

Übereinstimmend konnte das N1-Protein in NDV-N1-infizierten Zell-Lysaten mittels Western Blot-Analyse mit einem Molekulargewicht von ca. 50 kDa nachgewiesen werden und entsprach damit in etwa dem berechneten Molekulargewicht (49 kDa). Als Kontrolle der N1-spezifischen Reaktion diente ein Lysat AIV H7N1-infizierter Zellen, in dem das N1 Protein in entsprechender Größe nachgewiesen werden konnte, während Reaktionen in nicht infizierten und NDV-infizierten Zell-Lysaten fehlten (Abb. 42). Der Nachweis des NDV HN-Proteins auf einem gleichartigen Kontroll-Blot belegt, dass in etwa gleiche Mengen NDV- bzw. NDV-N1-infizierter Lysate aufgetragen wurden (Abb. 42).

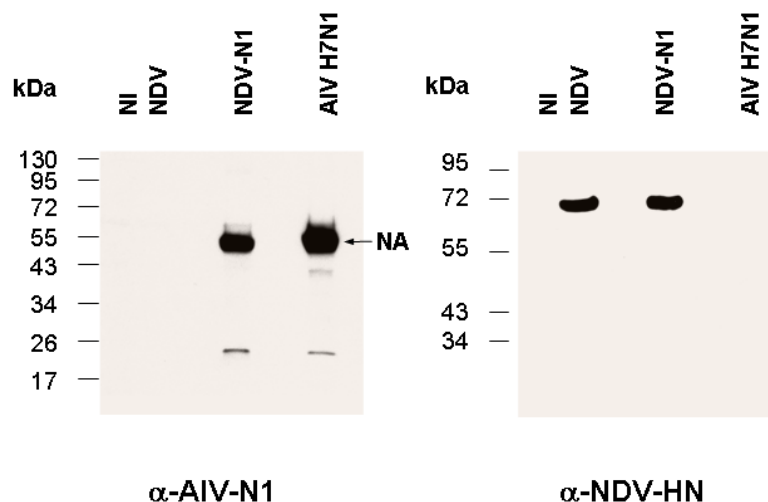


Abb. 42: Nachweis des N1 Proteins von NDV-N1 in der WB-Analyse

CEF-Zellen wurden mit entsprechenden Viren (MOI: 2) infiziert und nach 24 Stunden geerntet. Die Lysate dieser Zellen wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose-Membranen transferiert und mit monospezifischem bakt.-AIV-N1-Antiserum (1:50.000) bzw. monospezifischem NDV-HN-Antiserum (1:20.000) inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Chemolumineszenz mit Peroxidase-konjugierten Zweitantikörpern auf Röntgenfilmen nachgewiesen. Die molekularen Massen der Markerproteine (kDa) sind angegeben.

4.5 Prüfung der Schutzwirkung der NDV-N1 Rekombinante gegen HPAIV

Es galt die Schutzwirkung der NDV-N1 Rekombinante gegen eine HPAIV-Infektion vom Subtyp H5N1 im Huhn zu testen. Bei gegebener Wirksamkeit sollte weiterhin die Eignung der Rekombinante als Markervakzine gegen AIV geprüft werden.

Zuvor wurde die Virulenz der NDV-N1 Rekombinante durch das Nationale Referenzlabor für Newcastle Disease, FLI, Insel Riems im ICPI bestimmt. Der ermittelte Indexwert war, wie auch für das parentale rNDV ohne Fremdgeninsertion, 0. Dies zeigt, dass die Insertion des

AIV N1-Gens zu keiner erkennbaren Steigerung der Virulenz im Huhn führte und die Rekombinante somit als avirulent (lentogen) einzustufen war.

4.5.1 Aufbau des Tierversuches

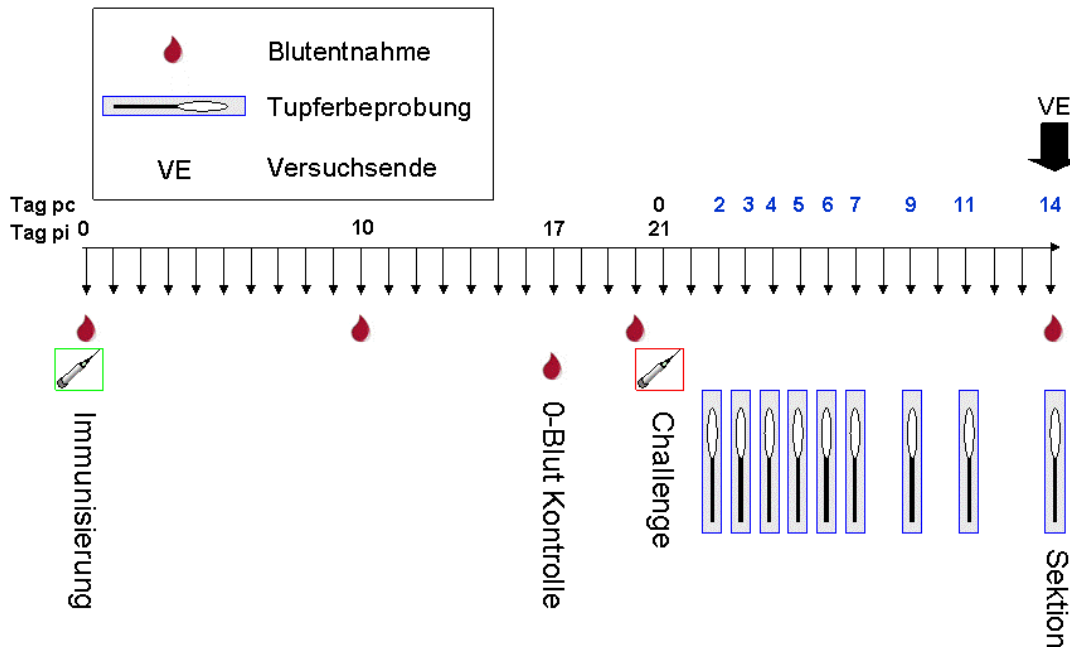


Abb. 43: Zeitablaufplan der Prüfung der NDV-N1 Rekombinante im Huhn

Für die Untersuchung der Schutzwirkung der NDV-N1 Rekombinante gegen HPAIV H5N1 wurden insgesamt 22 SPF-Hühner im Alter von vier Wochen eingesetzt. Die Hälfte der Tiere (11) wurde mit NDV-N1 okulonasal in einer Dosis von 10^6 EID₅₀/ 200 µl pro Tier immunisiert, während die anderen 11 Tiere als Kontrolle bis zum Zeitpunkt der Belastungsinfektion naiv blieben. Vor (d0pi) und nach der Immunisierung (d10pi, d20pi) gewonnene Blutproben wurden auf AIV N1-spezifische und NDV-spezifische Antikörper untersucht (Abb. 43).

Drei Wochen nach Immunisierung erfolgte die Belastungsinfektion. Dazu wurde der HPAIV Stamm A/duck/Vietnam/TG24-01/05 (H5N1) in einer Dosis von 10^6 EID₅₀/ 200 µl pro Tier okulonasal verabreicht. An festgelegten Tagen (s. Abb. 43) wurden Tupferproben aus Rachen und Kloake entnommen und auf vRNA mittels rtRT-PCR untersucht. Der Versuch wurde zwei Wochen nach der Belastungsinfektion beendet (VE; Abb. 43). Erkrankte oder am Versuchsende getötete Tiere wurden pathologisch-anatomisch untersucht.

4.5.2 Klinik nach Immunisierung

Nach Immunisierung mit NDV-N1 konnten keine klinischen Symptome diagnostiziert werden, die Tiere wurden durchgehend als gesund beurteilt (Tab. 7).

4.5.2.1 Nachweis von Antikörpern gegen AIV

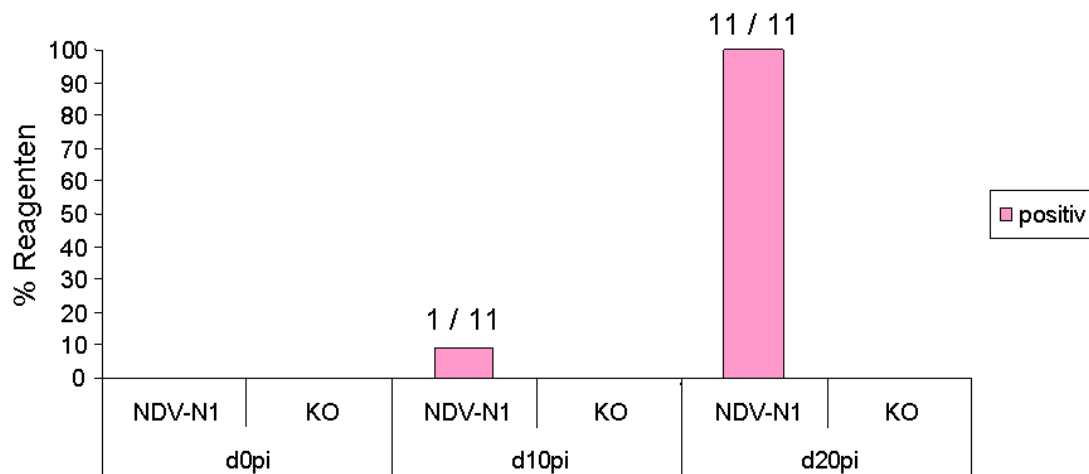


Abb. 44: AIV N1-spezifische AK nach Immunisierung mit NDV-N1

Die Entwicklung AIV N1-spezifischer Antikörper nach einmaliger Immunisierung mit NDV-N1 wurde mittels kommerziell erhältlichem ELISA untersucht. In vor der Immunisierung gewonnenen Seren konnten, wie erwartet, keine N1-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden, während nach 10 Tagen bereits eins der 11 Tiere spezifische Antikörper aufwies (Abb. 44). An Tag 20 nach Immunisierung waren in allen NDV-N1-immunisierten Tieren AIV N1-spezifische Antikörper nachweisbar (Tab. 7).

4.5.2.2 Nachweis von Antikörpern gegen NDV

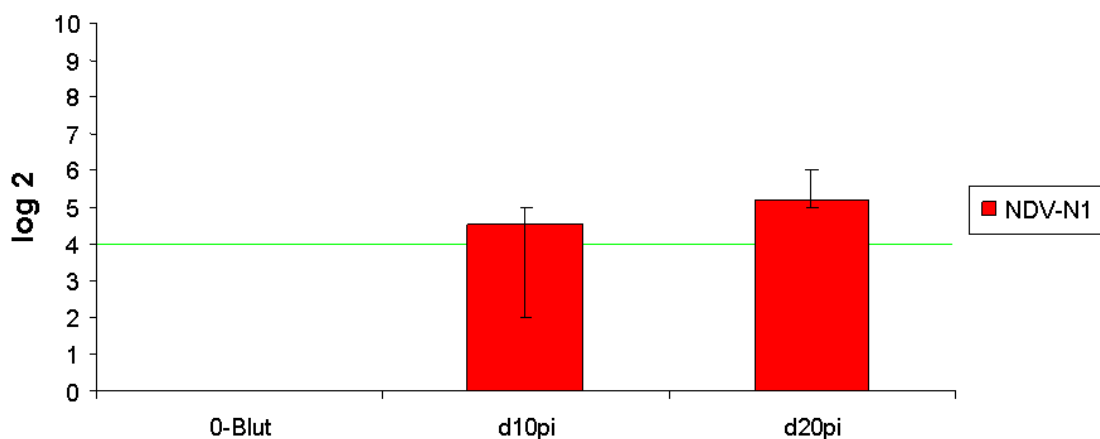


Abb. 45: HN-spezifische AK nach Immunisierung mit NDV-N1

Dargestellt sind die HAH-Titer Mittelwerte (Balken) der jeweiligen Gruppe an den entsprechenden Beprobungstagen als log₂, sowie die Bandbreiten (vertikale Linien). Die grüne Linie gibt den Titer an, der nach OIE als positiv zu bewerten ist.

Im Hämagglutinations-Hemmungstest wurden vor und nach der Immunisierung gewonnene Serumproben auf NDV HN-spezifische Antikörper untersucht. Das rNDV wurde als Antigen verwendet und die Ergebnisse analog des AIV Nachweises (4.3.4.1) bewertet. Bereits nach 10 Tagen wies die Gruppe spezifische Antikörper-Titer gegen NDV HN auf und nach 20 Tagen hatten alle Tiere individuelle Titer $\geq 2^5$ erreicht (Abb. 45; Tab. 7).

4.5.3 Klinik nach Belastungsinfektion mit AIV H5N1

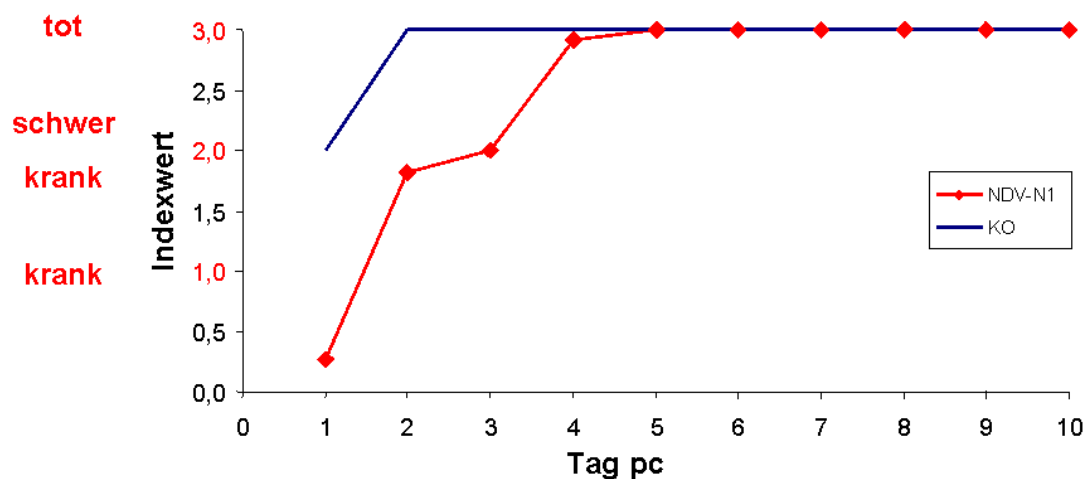


Abb. 46: täglicher klinischer Index nach Infektion mit AIV H5N1

Nach Infektion mit einer letalen Dosis AIV A/duck/Vietnam/TG24-01/05 (H5N1) lag die Morbidität und Mortalität beider Gruppen bei 100 %. An Tag 2 pc (Abb. 46) waren alle Kontrolltiere verstorben. Die immunisierten Tiere zeigten im Verlauf eine deutlich verzögerte Symptomatik. Der klinische Index wurde über 10 Tage berechnet (Tab. 7) und für die Kontrollgruppe ein Wert von 2,9 ermittelt. Die mit NDV-N1 immunisierten Tiere wiesen einen geringeren Index (2,5) auf: ein Hinweis auf die Beteiligung des N1-Proteins an einer schützenden Immunität.

4.5.3.1 Untersuchung auf Antikörper gegen AIV

Die zu frühen Zeitpunkten nach der Infektion (d3 und d4pc) gewonnenen Seren (3 /11 Tiere) wurden mittels eines AIV NP-spezifischen ELISA bzw. Hämagglutinations-Hemmungstests untersucht, um Erfahrungen zum Nachweis und zum zeitlichen Auftreten solcher Antikörper zu sammeln. In beiden Nachweismethoden konnten keine messbaren Antikörper detektiert werden.

4.5.3.2 Nachweis der AIV-Virusausscheidung

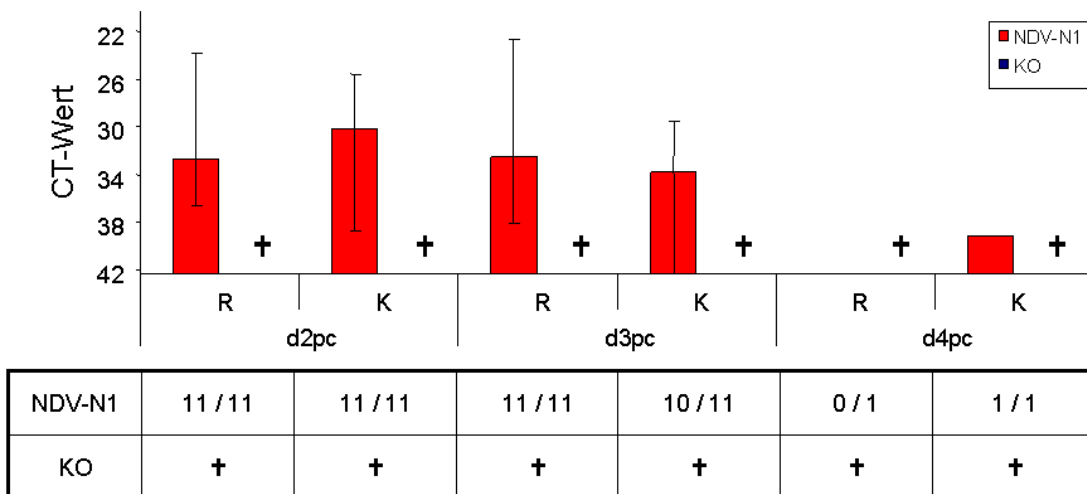


Abb. 47: vRNA-Nachweis in Tupferproben nach Infektion von Hühnern mit HPAIV H5N1 (rtRT-PCR)

Die CT-Mittelwerte der Gruppen (Balken), sowie die Bandbreiten (vertikale Linie) sind pro Beprobungstag für Rachen und Kloake getrennt dargestellt. Die Anzahl positiver Tupfer an der Gesamtzahl je Gruppe und Tag ist in der Tabelle darunter für Rachen und Kloake getrennt aufgeführt.

Die Ermittlung der Virusausscheidung wurde aus Tupfern von Rachen und Kloake durch Untersuchung auf vRNA in der rtRT-PCR durchgeführt. Die Kontrolltiere waren alle bereits bis Tag 2 verstorben. In NDV-N1 immunisierten Tiere wurden sowohl oropharyngeal, als auch kloakal Virusgenomlasten auf nahezu übereinstimmendem, hohem Niveau gefunden (Abb. 47; Tab. 7), was auf eine starke Virusreplikation in den Tieren schließen lässt.

4.5.3.3 Pathologische Befunde

Alle verstorbenen bzw. moribund getöteten Tiere wurden seziiert und pathologisch-anatomisch auf makroskopische Veränderungen untersucht. Sowohl die Kontrolltiere, als auch die NDV-N1-immunisierten Tiere wiesen zahlreiche Veränderungen auf, wie Ödeme des Kopfes und Zyanosen bzw. Nekrosen der Kopfanhänge, Unterhautblutungen, subepikardiale, petechiale Blutungen, Hämorrhagien auf den Serosen, in Thymus und Drüsenmagenschleimhaut, sowie Pankreatitis mit multifokalen bzw. konfluierenden, hellen Veränderungen, die auf das Vorliegen einer Pankreasnekrose hindeuteten.

4.5.4 Ergebnisübersicht und Fazit

Tab. 7: Ergebnisübersicht:
Schutzwirkung der NDV-N1 Rekombinante gegen HPAIV H5N1 im Huhn

Immunisierung	Zeit	NDV-N1		KO	
Dosis pro Tier Inokulationsweg	d0	10 ⁶ EID ₅₀ okulonasal			
Morbidität		0 / 11			
Mortalität		0 / 11			
klinischer Index		0,00			
N1-spez. Antikörper P / n	d10pi	1 / 11			
N1-spez. Antikörper P / n	d20pi	11 / 11			
HN-spez. Antikörper ⊖-HAH-Titer; P / n	d10pi	2 ^{4,6} 9 / 11			
HN-spez. Antikörper ⊖-HAH-Titer; P / n	d20pi	2 ^{5,2} 11 / 11			
Belastungsinfektion	d21pi	A/duck/Vietnam/TG24-01/05 (H5N1)			
Dosis pro Tier Inokulationsweg	d0pc	10 ⁶ EID ₅₀ okulonasal			
Morbidität		11 / 11		11 / 11	
Mortalität		11 / 11		11 / 11	
klinischer Index		2,50		2,90	
Ausscheidung AIV max. ⊖-CT (Tag) P / n	d2 – d4pc	R 32,20 (3) 11 / 11	K 29,83 (2) 11 / 11	+	+

P / n = Anzahl positiver Tupfer bzw. Seren (P) / Anzahl Tiere (n);

Die NDV-N1 Rekombinante wurde auf ihre Schutzwirkung gegen HPAIV H5N1 in Hühnern überprüft. Nach einmaliger Immunisierung mit NDV-N1 konnten in immunisierten Tieren, sowohl AIV N1-spezifische (Abb. 44), als auch NDV HN-spezifische Antikörper (Abb. 45) nachgewiesen werden. Nach Infektion mit HPAIV H5N1 in tödlicher Dosis zeigten die mit NDV-N1 immunisierten Tiere eine verlängerte Überlebenszeit gegenüber den naiven Kontrolltieren (Abb. 46). Das zeigt die Beteiligung des AIV N1-Proteins an einer schützenden Immunität.

4.6 AIV H5, AIV H5LP oder AIV H5 und N1 exprimierende NDV-Rekombinanten (NDV-H5, NDV-H5LP und NDV-H5N1)

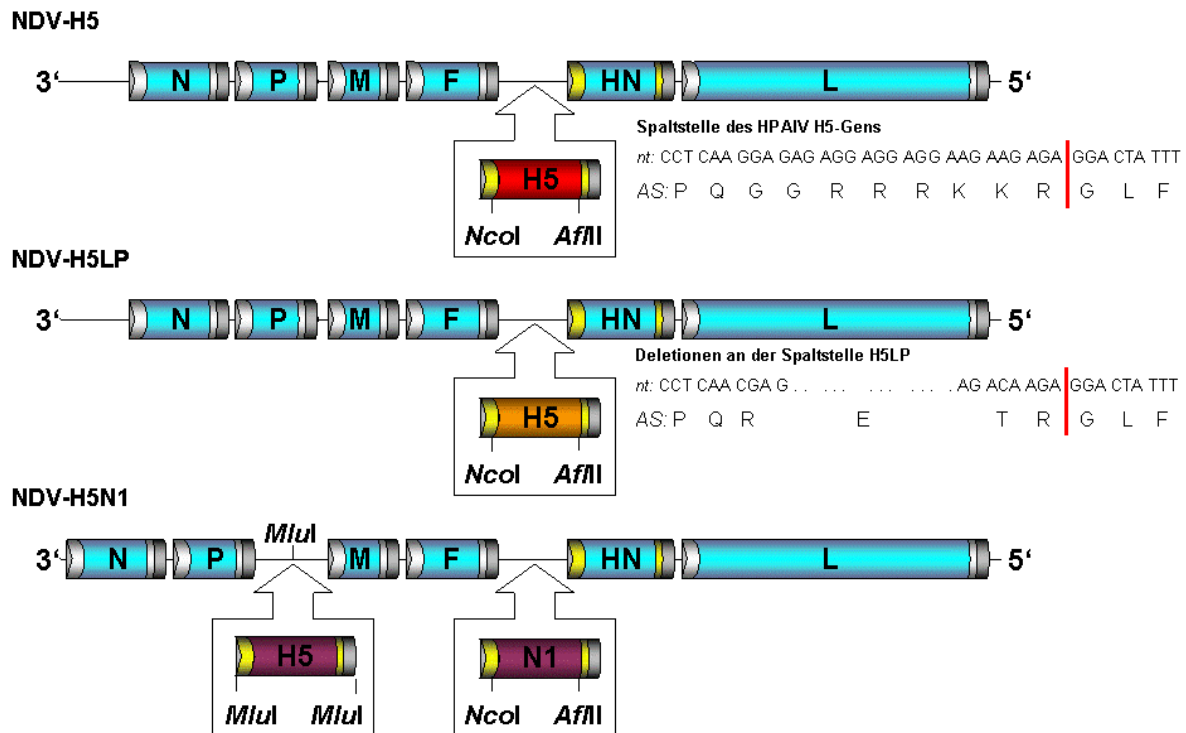


Abb. 48: Genomaufbau von NDV-H5LP, NDV-H5 und NDV-H5N1

Schematische, nicht maßstabsgerechte Darstellung der Gesamtgenome von NDV-H5LP, NDV-H5 bzw. von NDV-H5N1. Farbkodierung: dunkelgrau: Gen-Start- (Pfeil) und Gen-Endsequenzen (Block); hellgrau: nicht-kodierende Regionen; hellblau: NDV-Gene, gelb: nicht-kodierende Regionen des HN-Gens; rot: H5-ORF, orange: H5LP-ORF, lila: H5 und N1-ORFs in der ko-exprimierenden Rekombinante.

Die Rekombinanten NDV-H5LP, NDV-H5 entsprechen in ihrem Aufbau der unter Kapitel 4.1 beschriebenen Rekombinante NDV-H9. Ausgehend vom full-length Plasmid pNDV-H5Vm3 wurde das H5-Gen in diesen Rekombinanten gegen das Hämagglutinin-Gen des Stammes A/whooper swan/Germany/R65/06 (H5N1) (Genbank Nr. AM403460) substituiert, bzw. für die Rekombinante NDV-H5N1 entsprechend das Neuraminidase-Gen dieses Stammes (Abb. 48). Im Falle der Rekombinante NDV-H5LP wurde die Hämagglutinin-Spaltstelle vor Insertion in das NDV Genom durch Deletion basischer AS (Abb. 48; neben der orangefarbenen Genkassette H5) modifiziert, so dass die Spaltstelle monobasisch war. Für die Ko-Expression von H5 und N1 in NDV-H5N1 wurde zur Insertion der H5-Genkassette zwischen P- und M-Gen in den nicht-kodierenden Bereich durch Punktmutation eine neue *MluI*-Site generiert und die das H5-Gen flankierenden *MluI*-Sites durch spezifische Primer in der PCR-Amplifikation artifiziell angefügt. Die Rekombinanten NDV-H5LP, NDV-H5 und NDV-H5N1 wurden von Eylin Topfstedt im Rahmen ihrer Dissertation am FLI, Insel Riems,

generiert und charakterisiert (Topfstedt et al. in preparation). Vor dem Einsatz dieser Rekombinanten zur Immunisierung und Prüfung der Schutzwirkung gegen verschiedene HPAIV vom Subtyp H5 im Huhn wurde die Fremdgen-Expression in der Western-Blot Analyse verifiziert.

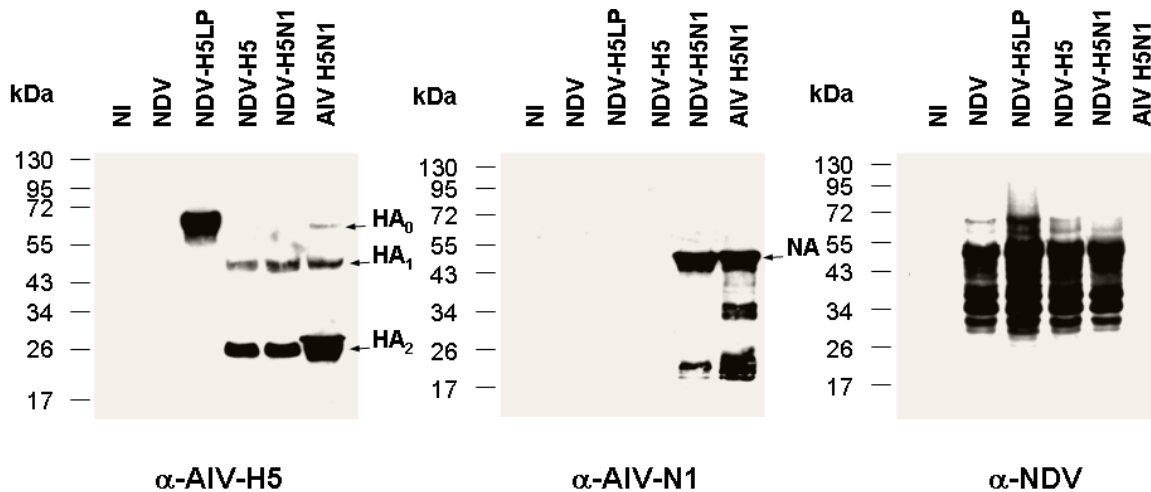


Abb. 49: Nachweis des H5- bzw. N1-Proteins von NDV-H5LP, NDV-H5 bzw. NDV-H5N1 in der WB-Analyse

CEF-Zellen wurden mit entsprechenden Viren (MOI: 2) infiziert und nach 24 Stunden geerntet. Die Lysate der Zellen wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose-Membranen transferiert und mit monospezifischem AIV-H5- (1:20.000), bzw. monospezifischem bakt.-AIV-N1-Antiserum (1:50.000) oder polyklonalem NDV-Antiserum (1:20.000; Kaninchen) inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Chemolumineszenz mit Peroxidase-konjugierten Zweitantikörpern auf Röntgenfilmen nachgewiesen. Die molekularen Massen der Markerproteine (kDa) sind angegeben.

Das AIV H5 Vorläuferprotein HA₀ konnte in Lysaten NDV-H5LP-infizierter Zellen mit einem Molekulargewicht von ca. 70 kDa nachgewiesen werden, wohingegen in Lysaten NDV-H5- und NDV-H5N1-infizierter Zellen das H5 Protein als HA₁ und HA₂ (45 kDa und 25 kDa) detektiert werden konnte (Abb. 49). Auf Grund multipler basischer Aminosäuren vor der Spaltstelle liegt das Hämagglutinin in NDV-H5 und NDV-H5N1 in seiner gespaltenen Form vor, während in NDV-H5LP durch die Deletion der basischen Aminosäuren keine Spaltung des Hämagglutinins erfolgte. Das N1-Protein konnte erwartungsgemäß nur in Lysaten NDV-H5N1-infizierter Zellen mit einem Molekulargewicht von ca. 50 kDa nachgewiesen werden (Abb. 49). Als Kontrolle der H5- bzw. N1-spezifischen Reaktionen dienten Lysate AIV H5N1-infizierter Zellen, entsprechende Reaktionen fehlten in nicht-infizierten und NDV-infizierten Zell-Lysaten. Der Nachweis NDV-spezifischer Proteine auf einem gleichartigen Kontroll-Blot belegt, dass in etwa gleiche Mengen NDV-H5LP-, NDV-H5-, NDV-H5N1- bzw. NDV-infizierter Zell-Lysate aufgetragen wurden (Abb. 49).

4.7 Prüfung der Schutzwirkung der NDV-H5LP-, der NDV-H5- und der NDV-H5N1 Rekombinante gegen HPAIV

Es galt die Schutzwirkung dieser Rekombinanten gegen homologe, sowie heterologe HPAIV-Infektionen vom Subtyp H5 im Huhn zu testen. Bei gegebener Wirksamkeit sollte weiterhin die Eignung der Rekombinante als Markervakzine gegen AIV geprüft werden.

Zuvor wurde die Virulenz der Rekombinanten durch das Nationale Referenzlabor für Newcastle Disease, FLI, Insel Riems im ICPI bestimmt. Der ermittelte Indexwert war für NDV-H5 und NDV-H5LP wie auch für das parentale rNDV ohne Fremdgeninsertion, 0. Dies zeigt, dass die Insertion des AIV H5- bzw. des durch Deletion basischer Aminosäuren modifizierten H5-Gens zu keiner erkennbaren Steigerung der Virulenz im Huhn führte und die Rekombinanten somit als avirulent (lentogen) einzustufen sind. Die Rekombinante NDV-H5N1 wies einen Indexwert von 0,3 auf und ist ebenfalls als avirulent (lentogen) einzustufen.

4.7.1 Aufbau des Tierversuches im Huhn

Immuni- sierung	NDV-H5LP	NDV-H5	NDV-H5N1
Anzahl der Tiere	10	10	10
	10	10	10
	10	10	10

Challenge	HPAIV H5N1 homolog	HPAIV H5N1 heterolog	HPAIV H5N2 heterolog
Anzahl der Tiere	10	10	10
	10	10	10
	10	10	10
	10 naiv	10 naiv	10 naiv

Abb. 50: Aufbau der Prüfung von NDV-H5LP, NDV-H5 und NDV-H5N1

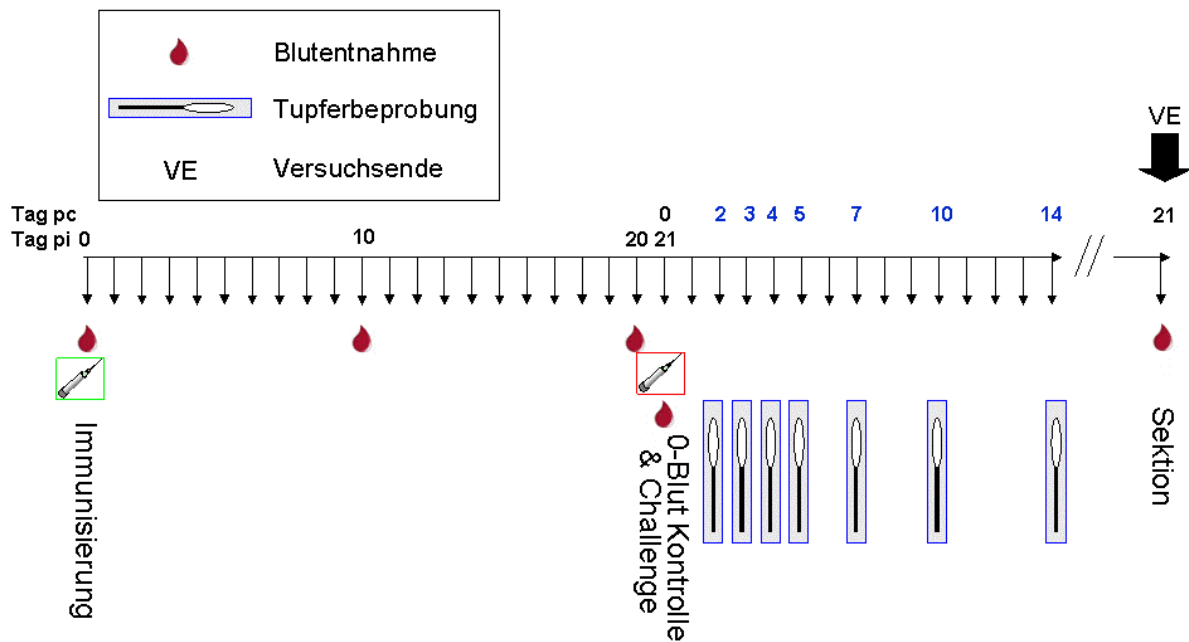


Abb. 51: Zeitablaufplan der Prüfung von NDV-H5LP, NDV-H5 und NDV-H5N1

Zur Analyse der Schutzwirkung der NDV-H5LP, NDV-H5 und NDV-H5N1 Rekombinanten gegen verschiedene HPAIV wurden insgesamt 120 SPF-Hühner eingesetzt, die zum Zeitpunkt der Immunisierung drei Wochen alt waren. Versuchsaufbau (Abb. 50) und Versuchsdurchführung (Abb. 51) waren weitestgehend analog zu den vorher beschriebenen Prüfungen. Auch in diesem Versuch wurden die Tupferbeprobungen oropharyngeal und kloakal durchgeführt. Als Kontrollgruppe blieben 30 Tiere bis zur Belastungsinfektion naiv, während je 30 Tiere mit den entsprechenden Rekombinanten okulonasal in einer einheitlichen Dosis von 10^6 EID₅₀ / Tier in 200 µl immunisiert wurden. Vor und nach Immunisierung entnommene Blutproben wurden auf Antikörper gegen NDV, sowie gegen AIV H5 und AIV N1 untersucht (Abb. 51).

Drei Wochen nach Immunisierung wurden die Tiere nach dem in Abb. 50 gezeigten Schema in drei Gruppen aufgeteilt und mit den verschiedenen HPAIV-Isolaten in letaler Dosis okulonasal infiziert (Abb. 51). Diese war für AIV A/whooper swan/Germany/R65/06 (H5N1) und AIV A/duck/Vietnam/TG24-01/05 (H5N1) 10^6 EID₅₀ / Tier in 200 µl und für AIV A/chicken/Italy/8/98 (H5N2) $10^{7.5}$ EID₅₀ / Tier in 200 µl.

4.7.2 Klinik nach Immunisierung

Die Tiere zeigten weder nach Immunisierung mit NDV-H5LP oder NDV-H5, noch mit NDV-H5N1 klinische Symptome und wurden durchgehend als gesund beurteilt (Tab. 8).

4.7.2.1 Nachweis von Antikörpern gegen AIV

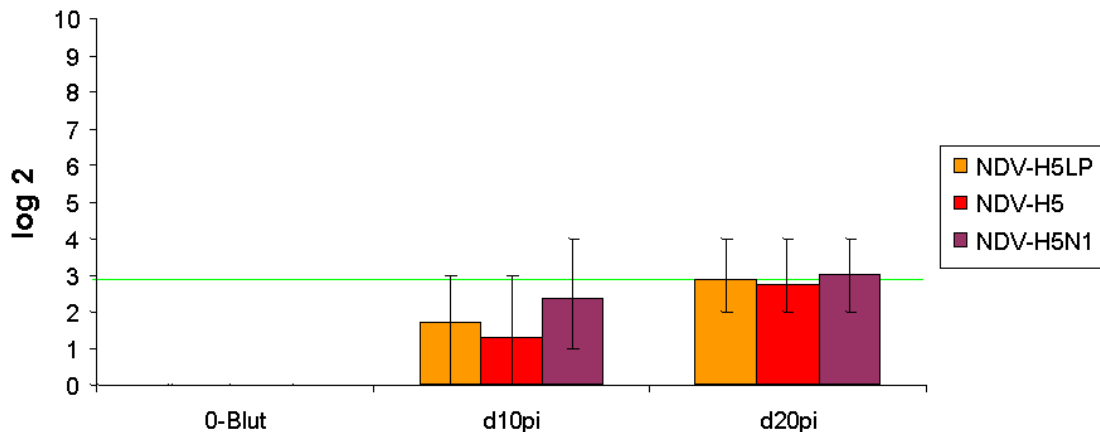


Abb. 52: AIV H5-spez. AK nach Immunisierung mit NDV-H5LP, NDV-H5 und NDV-H5N1

Dargestellt sind die HAH-Titer Mittelwerte (Balken) der jeweiligen Gruppe an den entsprechenden Beprobungstagen als \log_2 , sowie die Bandbreiten (vertikale Linien). Die grüne Linie gibt den Titer an, der nach OIE als positiv zu bewerten ist.

Im Hämagglutinations-Hemmungstest wurden vor und nach der Immunisierung gewonnene Seren aller immunisierten Tiere auf AIV H5-spezifische Antikörper untersucht. Das homologe AIV (A/whooper swan/Germany/R65/06 (H5N1)) wurde als Antigen verwendet. Entsprechend den Empfehlungen des OIE (OIE 2009b) wurden bei Antigeneinstellung auf 8 HAE Einzeltierseren mit einem Titer von 2^3 oder höher als positiv bewertet, der Gruppenmittelwert wurde aus allen Einzeltierergebnissen, auch wenn sie $< 2^3$ waren, berechnet.

Vor der Immunisierung konnten in Seren aller Tiere keine H5-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 52). Drei Wochen nach Immunisierung wurde für NDV-H5 immunisierte Tiere ein durchschnittlicher Titer aller Tiere der Gruppe von $2^{2.8}$ ermittelt. Nach Immunisierung mit NDV-H5LP ($2^{2.9}$) und NDV-H5N1 (2^3) wurden Titer in ähnlicher Höhe detektiert (Abb. 52). Von 30 Tieren je Gruppe wurde bei 21 mit NDV-H5 immunisierten, 26 mit NDV-H5LP und 29 mit NDV-H5N1 immunisierten Tieren als positiv zu bewertende individuelle Titer $\geq 2^3$ ermittelt (Tab. 8). Immunisierung mit NDV-H5, NDV-H5LP oder NDV-H5N1 resultierte in einander entsprechenden Antikörper-Titern in Hühnern.

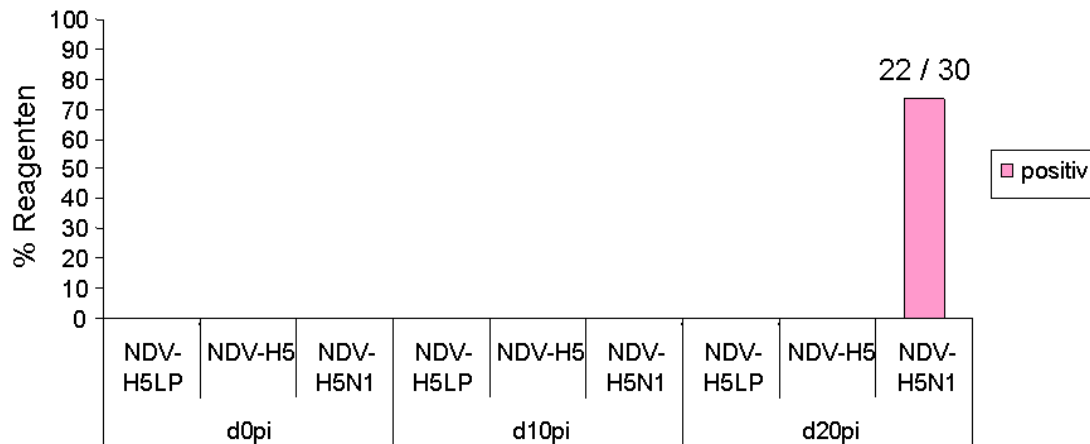


Abb. 53: AIV N1-spez. AK nach Immunisierung mit NDV-H5N1

Die Entwicklung AIV N1-spezifischer Antikörper nach einmaliger Immunisierung mit NDV-H5N1 wurde mittels kommerziell erhältlichem ELISA untersucht (Abb. 53). In vor der Immunisierung gewonnenen Seren aller immunisierten Tiere konnten keine N1-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Hingegen waren in Seren, die 3 Wochen nach Immunisierung gewonnen wurden, in NDV-H5N1 immunisierten Tieren (bei 22 von 30) N1-spezifische Antikörper diagnostizierbar (Abb. 53; Tab. 8).

4.7.2.2 Nachweis von Antikörpern gegen NDV

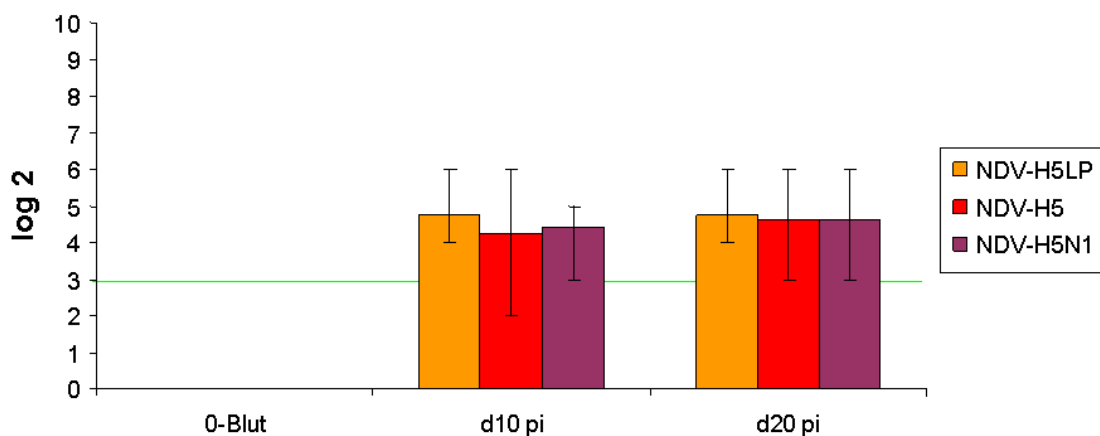


Abb. 54: HN-spez. AK nach Immunisierung mit NDV-H5LP, NDV-H5 und NDV-H5N1

Dargestellt sind die HAH-Titer Mittelwerte (Balken) der jeweiligen Gruppe an den entsprechenden Beprobungstagen als \log_2 , sowie die Bandbreiten (vertikale Linien). Die grüne Linie gibt den Titer an, der nach OIE als positiv zu bewerten ist.

Im Hämagglutinations-Hemmungstest wurden vor und nach der Immunisierung gewonnene Serumproben auf NDV HN-spezifische Antikörper untersucht. Das rNDV wurde als Antigen verwendet und die Ergebnisse analog des AIV Nachweises (4.7.2.1) bewertet. Die vor der

Immunisierung gewonnenen Seren enthielten keine HN-spezifischen Antikörper. Bereits nach 10 Tagen wiesen alle Gruppen spezifische Antikörper gegen NDV auf, die dem nach 3 Wochen erreichten Titer (2^5) entsprachen (Abb. 54; Tab. 8). Immunisierung mit NDV-H5, NDV-H5LP oder NDV-H5N1 resultierte in einander entsprechenden Antikörper-Titern in Hühnern.

4.7.3 Belastungsinfektion mit HPAIV H5N1 (homolog)

Zur Überprüfung der Schutzwirkung gegen das homologe AIV A/whooper swan/Germany/R65/06 (H5N1) wurden je 10 mit NDV-H5LP, NDV-H5 bzw. NDV-H5N1 immunisierte Tiere, sowie 10 naive Kontrollen mit diesem Isolat in einer letalen Dosis von 10^6 EID₅₀ / Tier okulonasal infiziert.

4.7.3.1 Klinik nach Belastungsinfektion

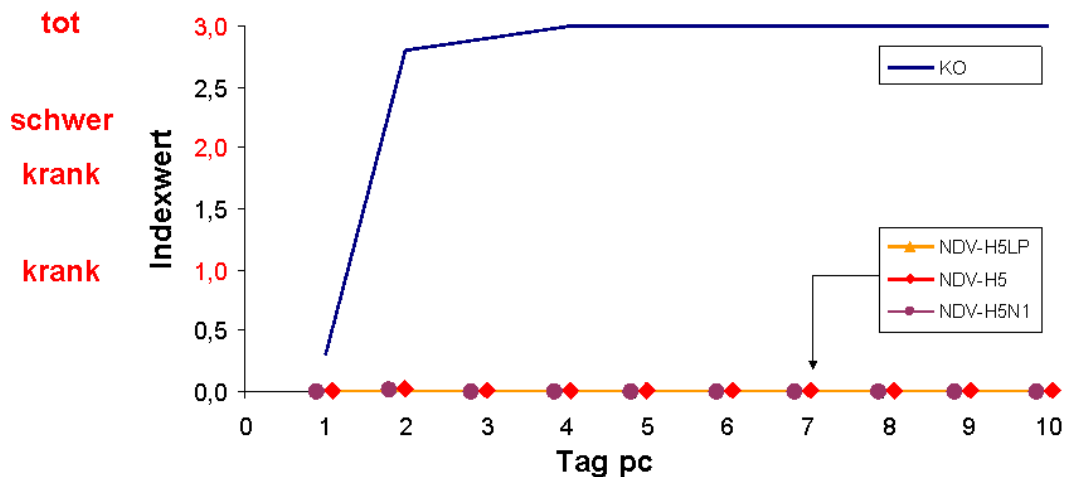


Abb. 55: tägl. klin. Index nach HPAIV A/whooper swan/Germany/R65/06 (H5N1)-Infektion

Nach Belastungsinfektion mit einer letalen Dosis des homologen AIV A/whooper swan/Germany/R65/06 (H5N1) verstarben alle Kontrolltiere bis Tag 4, während alle immunisierten Tiere gesund blieben (Abb. 55). Der über 10 Tage berechnete klinische Index von 2,7 für die Kontrollgruppe, lag deutlich über dem von allen immunisierten Gruppen erreichten Wert 0 (Abb. 69). Einmalige Immunisierung mit NDV-H5 bzw. NDV-H5LP oder NDV-H5N1 bietet vollständigen Schutz gegen klinische Symptome nach letaler homologer HPAIV-Infektion.

4.7.3.2 Nachweis von Antikörpern gegen AIV

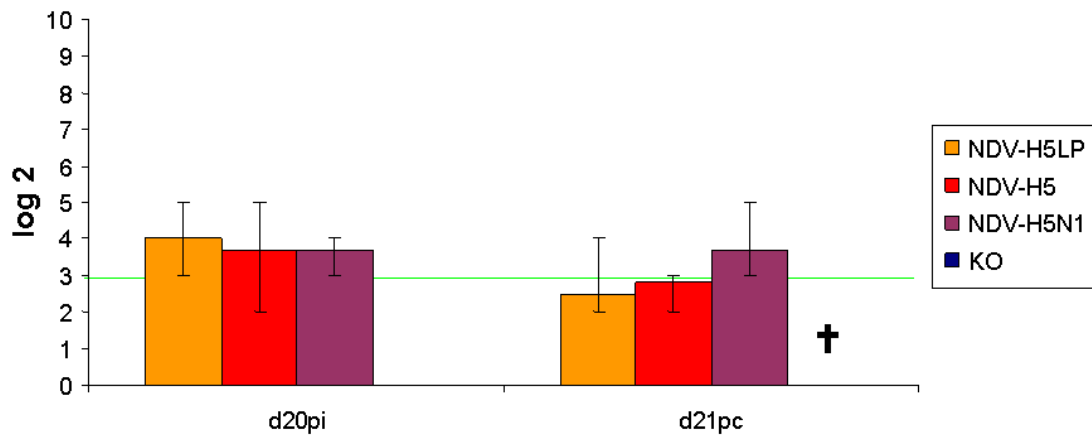


Abb. 56: AIV H5-spez. AK nach Infektion mit HPAIV A/whooper swan/Germany/R65/06 (H5N1)

Dargestellt sind die HAH-Titer Mittelwerte (Balken) der jeweiligen Gruppe an den entsprechenden Beprobungstagen als \log_2 , sowie die Bandbreiten (vertikale Linien). Die grüne Linie gibt den Titer an, der nach OIE als positiv zu bewerten ist.

Nach Immunisierung und nach Infektion gewonnene Seren wurden im Hämagglutinations-Hemmungstest auf H5-spezifische Antikörper untersucht, wobei das Infektionsvirus als Antigen diente und die Bewertung analog zu Kapitel 4.7.2.1 erfolgte. Für die Kontrolltiere konnten vor der Belastungsinfektion keine AIV-spezifischen Antikörper ermittelt werden, nach Infektion verstarb diese Gruppe, so dass keine Seren zur Verfügung standen. Drei Wochen nach Belastung mit homologen HPAIV A/whooper swan/Germany/R65/06 (H5N1) konnte weder in NDV-H5-, noch in NDV-H5LP- bzw. NDV-H5N1-immunisierten Tieren ein Anstieg H5-spezifischer Antikörper ermittelt werden (Abb. 56): ein Hinweis auf geringe Virusreplikation in allen Immunisierten (Abb. 69).

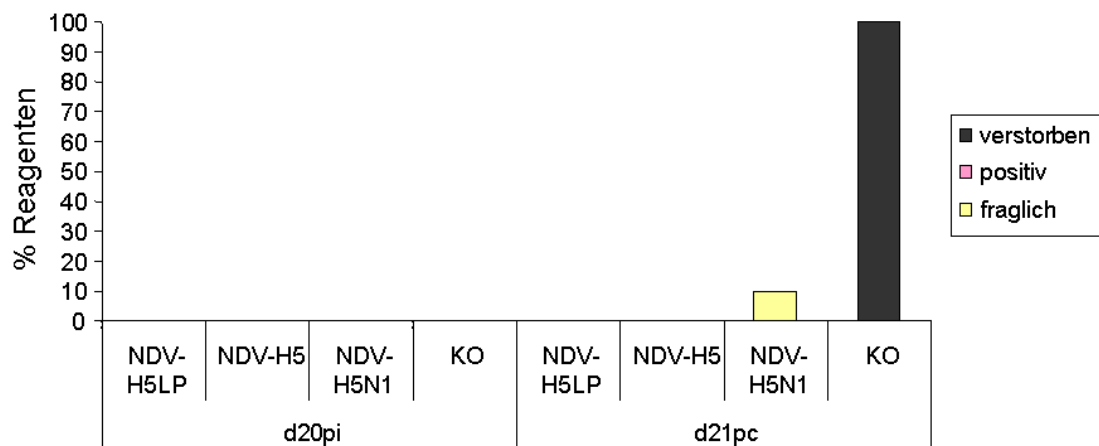


Abb. 57: AIV NP-spez. AK nach Infektion mit HPAIV A/whooper swan/Germany/R65/06 (H5N1)

Es wurde geprüft, ob eine Differenzierung von immunisierten und infizierten Tieren an Hand des Nachweises von Antikörpern gegen andere, nicht-HA- bzw. nicht-NA-spezifische AIV-Proteine nach Belastungsinfektion wurde mittels Detektion AIV-NP-spezifischer Antikörper unter Verwendung eines ELISA möglich ist. Vor der Infektion waren in den Seren aller getesteten Tiere, den Erwartungen entsprechend, keine Antikörper zu detektieren. Dies traf auch nach der Infektion auf die NDV-H5 und NDV-H5LP Gruppe zu (Abb. 57). Ein Tier der NDV-H5N1 Gruppe reagierte wiederholt mit fraglichem Ergebnis. Da alle immunisierten Tiere keine (bzw. eine fragliche) Serokonversion aufwiesen, ist von keiner bzw. minimaler Virusreplikation in den Tieren auszugehen, wobei keine DIVA-Diagnostik möglich war.

4.7.3.3 Nachweis der AIV-Virusausscheidung

Die Bestimmung der Virusausscheidung wurde durch Untersuchung von Rachen- und Kloakentupfern auf vRNA in der rtRT-PCR durchgeführt. Während für die überlebenden Kontrolltiere erhebliche Virusgenomlasten ermittelt wurden, konnte für keines der immunisierten Tiere aller drei Gruppen vRNA detektiert werden (Abb. 58 und 69). Immunisierung mit NDV-H5LP, NDV-H5 oder NDV-H5N1 verhinderte die Ausscheidung des Virus im Gegensatz zu nicht-immunisierten Kontrolltieren.

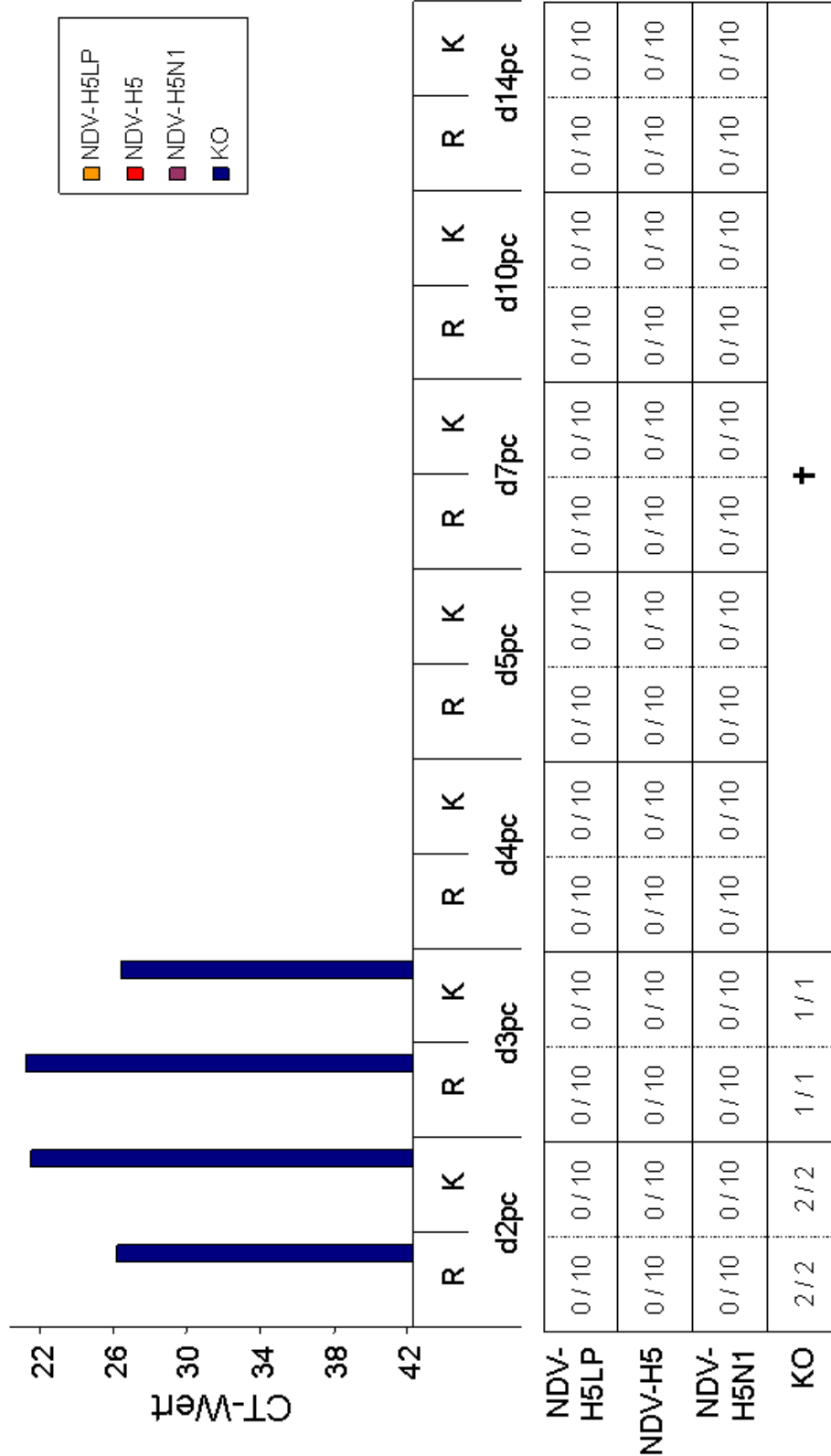


Abb. 58: vRNA-Nachweis in Tupfern nach homologer HPAIV H5N1-Infektion (rtRT-PCR)

Die CT-Mittelwerte der Gruppen (Balken), sowie die Bandbreiten (vertikale Linie) sind pro Beprobungstag für Rachen und Kloake getrennt dargestellt. Die Anzahl positiver Tupfer an der Gesamtzahl je Gruppe und Tag ist in der Tabelle darunter für Rachen und Kloake getrennt aufgeführt.

4.7.3.4 Pathologische Befunde

Alle verstorbenen bzw. moribund getöteten Kontrolltiere, sowie am Versuchsende getötete Tiere wurden pathologisch-anatomisch auf makroskopische Veränderungen untersucht. Die Kontrolltiere wiesen zahlreiche Veränderungen, wie Ödeme des Kopfes oder Zyanosen bzw. Nekrosen der Kopfanhänge, Unterhautblutungen, subepikardiale, petechiale Blutungen, Hämorrhagien auf den Serosen, in der Drüsenmagenschleimhaut, sowie Pankreatitis mit multifokalen bzw. konfluierenden, hellen Veränderungen auf, die auf das Vorliegen einer Pankreasnekrose hindeuteten. Dagegen waren in allen immunisierten Tieren keine maßgeblichen pathologischen Veränderungen sichtbar.

4.7.4 Belastungsinfektion mit HPAIV H5N1 (heterolog)

Zur Überprüfung der Schutzwirkung gegen das heterologe HPAIV A/duck/Vietnam/TG24-01/05 (H5N1) wurden je 10 mit NDV-H5LP, NDV-H5 bzw. NDV-H5N1 immunisierte Tiere, sowie 10 naive Kontrollen mit diesem Stamm in einer letalen Dosis von 10^6 EID₅₀ / Tier okulonasal infiziert. Die Aminosäure-Homologie zwischen dem Hämagglutinin dieses Stammes und dem homologen Stamm HPAIV A/whooper swan/Germany/R65/06 (H5N1) beträgt 96,3 %.

4.7.4.1 Klinik nach Belastungsinfektion

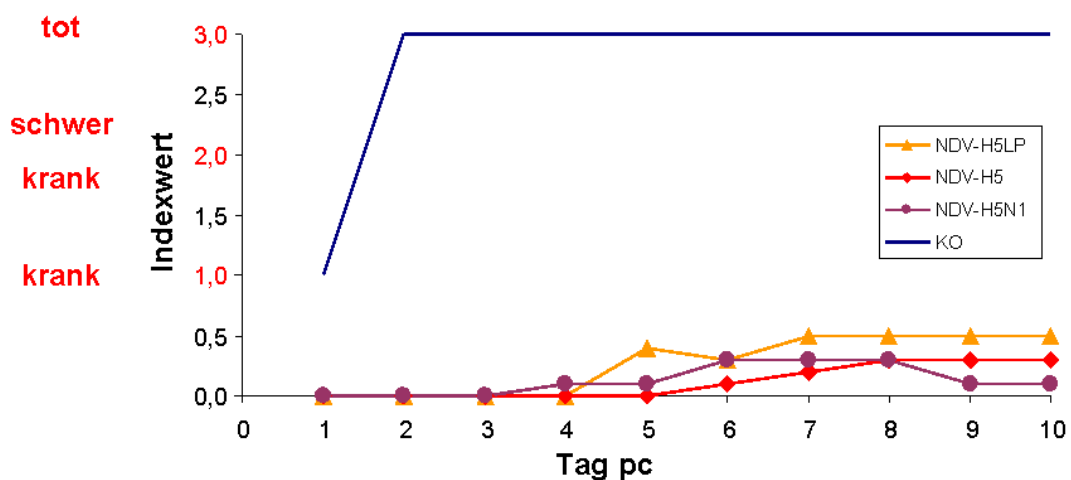


Abb. 59: tägl. klin. Index nach HPAIV A/duck/Vietnam/TG24-01/05 (H5N1)-Infektion

Nach Infektion mit einer letalen Dosis des heterologen AIV A/duck/Vietnam/TG24-01/05 (H5N1) verstarben alle Kontrolltiere bis Tag 2 (Abb. 59). Demgegenüber zeigten alle immunisierten Gruppen eine deutlich reduzierte Morbidität und Mortalität.

In der NDV-H5LP Gruppe waren 6 von 10 Tieren vollständig gegen klinische Symptome geschützt; jedoch verstarben 2 der 4 Erkrankten. Bei den mit NDV-H5 Immunisierten waren 9 von 10 Tieren über den gesamten Beobachtungszeitraum gesund, während ein erkranktes

Tier verstarb. Die Immunisierung mit NDV-H5N1 induzierte in 7 von 10 Tieren einen vollständigen Schutz gegen klinische Symptome, wohingegen 3 Tiere erkrankten, von denen eines bis zum Versuchsende an rechtseitiger Paralyse des Ständers litt.

Für die Kontrollgruppe wurde ein Index von 2,8 ermittelt, während die für NDV-H5LP (0,27), NDV-H5 (0,12) und NDV-H5N1 (0,13) analysierten Indices (Abb. 69) beträchtlich geringer waren. Die einmalige Immunisierung mit NDV-H5 bzw. NDV-H5LP oder NDV-H5N1 führte zu einer deutlich reduzierten klinischen Symptomatik und Mortalität gegenüber den naiven Kontrollen nach letaler Infektion mit heterologem HPAIV H5N1.

4.7.4.2 Nachweis von Antikörpern gegen AIV

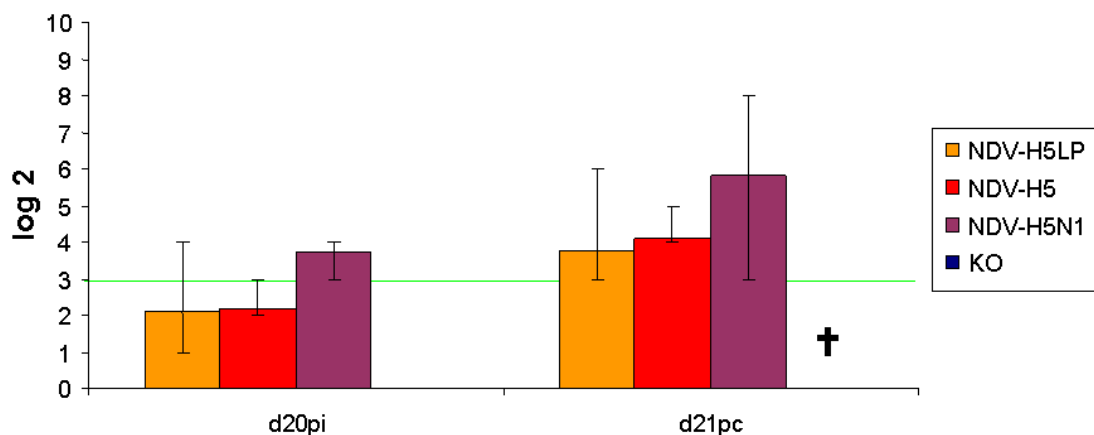


Abb. 60: AIV H5-spez. AK nach Infektion mit HPAIV A/duck/Vietnam/TG24-01/05 (H5N1)

Dargestellt sind die HAH-Titer Mittelwerte (Balken) der jeweiligen Gruppe an den entsprechenden Beprobungstagen als log₂, sowie die Bandbreiten (vertikale Linien). Die grüne Linie gibt den Titer an, der nach OIE als positiv zu bewerten ist.

Nach Immunisierung und nach Infektion gewonnene Seren wurden im Hämagglutinations-Hemmungstest auf H5-spezifische Antikörper untersucht, wobei das Infektionsvirus als Antigen diente und die Bewertung analog zu Kapitel 4.7.2.1 erfolgte. Für die Kontrolltiere konnten vor der Belastungsinfektion keine AIV-spezifischen Antikörper ermittelt werden, nach Infektion verstarb diese Gruppe, so dass keine Seren zur Verfügung standen. Drei Wochen nach Belastung mit heterologem AIV A/duck/Vietnam/TG24-01/05 (H5N1) wurde in NDV-H5LP bzw. NDV-H5N1 immunisierten, wie auch in der NDV-H5 Gruppe, ein Anstieg H5-spezifischer Antikörper diagnostiziert (Abb. 60 und 69): ein Hinweis auf Virusreplikation in allen immunisierten Tieren.

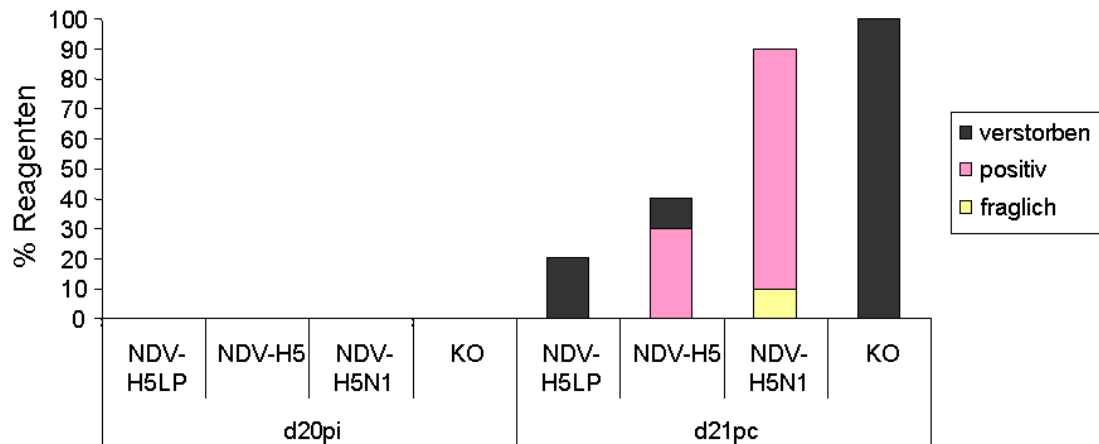


Abb. 61: AIV NP-spez. AK nach Infektion mit HPAIV A/duck/Vietnam/TG24-01/05 (H5N1)

Es wurde geprüft, ob eine Differenzierung von immunisierten und infizierten Tieren an Hand des Nachweises von Antikörpern gegen andere, nicht-HA- bzw. nicht-NA-spezifische AIV-Proteine nach Belastungsinfektion mittels Detektion AIV-NP-spezifischer Antikörper unter Verwendung eines ELISA möglich ist. Vor der Infektion waren in keinem Serum diese Antikörper zu detektieren. Die überlebenden Tiere der NDV-H5LP-Gruppe zeigten keine Serokonversion, während in der NDV-H5-Gruppe 3 von 10 und in der NDV-H5N1 Gruppe 8 von 10 Tieren serokonvertierten (Abb. 61 und 69). Auf Grund der geringen Rate an Serokonversion in der NDV-H5LP und NDV-H5-Gruppe, ist von einer lediglich geringen Virusreplikation in diesen Tieren auszugehen, allerdings ist die DIVA-Diagnostik nicht bei allen Tieren möglich.

4.7.4.3 Nachweis der AIV-Virusausscheidung

Zur Ermittlung der Virusausscheidung nach Infektion mit AIV A/duck/Vietnam/TG24-01/05 (H5N1) wurden Tupfer von Rachen und Kloake auf vRNA in der rtRT-PCR untersucht. Die Kontrolltiere waren bereits an Tag 2 verstorben. Die detektierte Virusgenomlast in allen immunisierten Tieren bewegte sich über den gesamten Untersuchungszeitraum auf gleichbleibend niedrigem Niveau (Abb. 62). Statistisch signifikante Unterschiede der Virusgenomlast aus Rachentupfern sind in Abb. 63 als Box-Plot dargestellt. An Tag 2 ist bei der NDV-H5N1 Gruppe eine signifikant höhere Virusgenomlast als in der NDV-H5LP bzw. der NDV-H5 Gruppe ermittelt worden; genau entgegengesetzt war das Ergebnis an Tag 3, so dass sich in der Gesamtbeurteilung keine Aussage ableiten ließ. An Tag 7 fiel die NDV-H5N1 immunisierte Gruppe durch einen Peak der kloakalen Virusgenomlast auf, der jedoch bei statistischer Auswertung keine Signifikanz aufwies (Abb. 63).

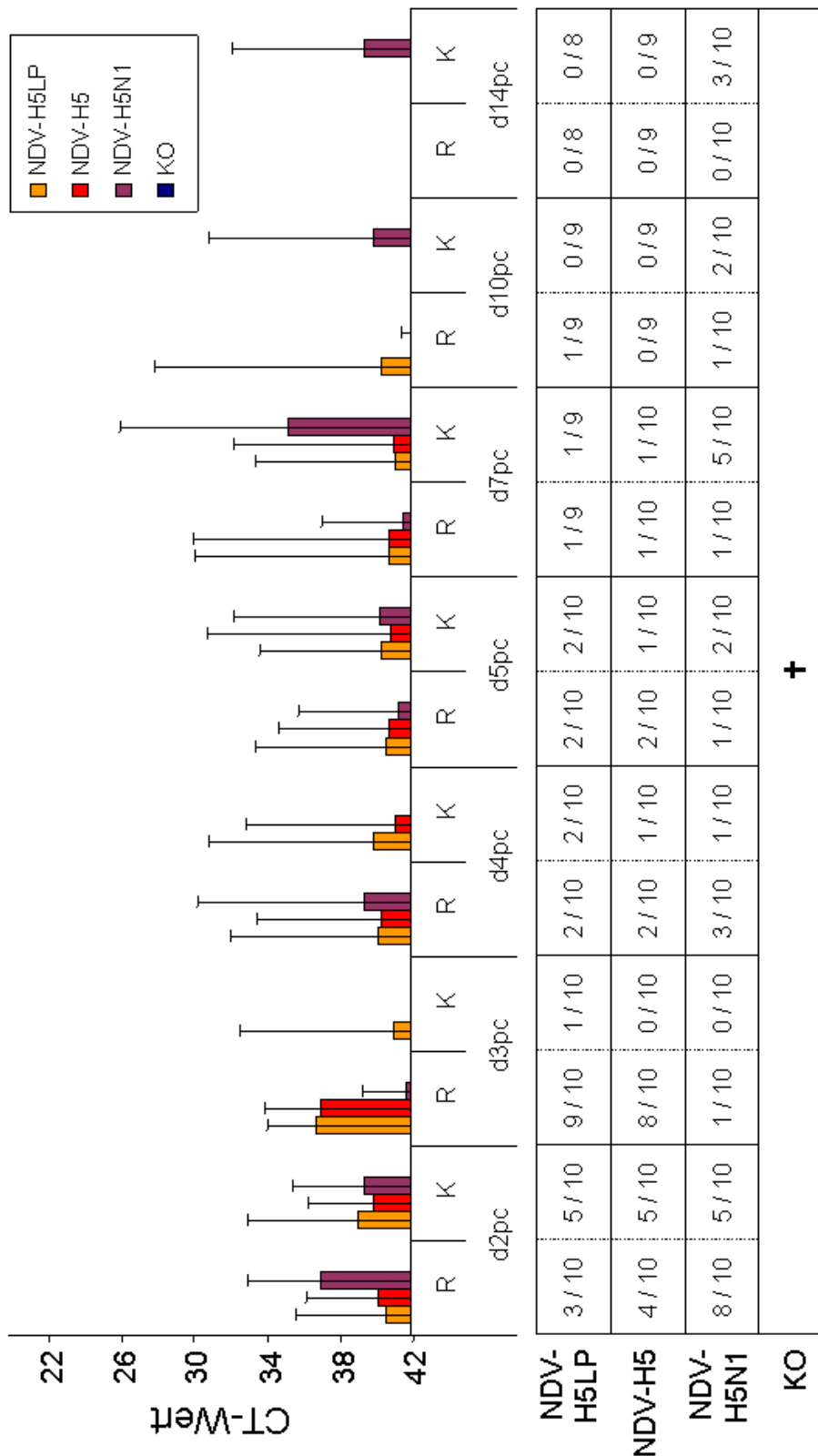


Abb. 62: vRNA-Nachweis in Tupfern nach heterologer HPAIV H5N1-Infektion (rtRT-PCR)

Die CT-Mittelwerte der Gruppen (Balken), sowie die Bandbreiten (vertikale Linie) sind pro Beprobungstag für Rachen und Kloake getrennt dargestellt. Die Anzahl positiver Tupfer an der Gesamtzahl je Gruppe und Tag ist in der Tabelle darunter für Rachen und Kloake getrennt aufgeführt.

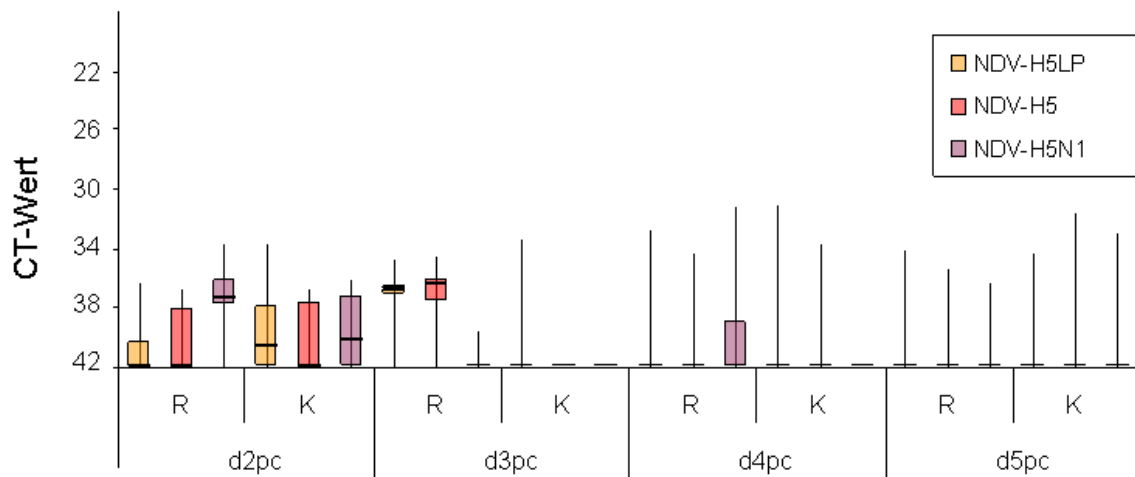


Abb. 63: Box-Plots der ermittelten CT-Werte nach HPAIV A/duck/Vietnam/TG24-01/05 (H5N1)-Infektion

Dargestellt sind die Bandbreite (vertikale Linie; Minimum und Maximum), der Median (horizontale schwarze Linie), sowie das untere (0,25) und obere (0,75) Quartil (untere bzw. obere Begrenzung der Box). Decken die Boxen beider Gruppen für Rachen- oder Kloakentupfer an einem Tag nicht-überschneidende CT-Wertbereiche ab, sind die Unterschiede signifikant.

Über den gesamten Beprobungszeitraum waren an Hand der Ausscheidung von vRNA keine weiteren signifikanten Unterschiede zwischen den Tieren der drei Immunisierungsgruppen festzustellen (Abb. 63). Die Ausscheidungsraten viraler RNA sind nach einmaliger Immunisierung mit NDV-H5 bzw. NDV-H5LP oder NDV-H5N1 relativ gering; die höchsten Gruppendurchschnitts-CT-Werte (ca. CT 37) der drei Immunisierungsgruppen stimmten überein (Abb. 69).

4.7.4.4 Pathologische Befunde

Alle verstorbenen, moribund getöteten, sowie am Versuchsende getötete Tiere wurden pathologisch-anatomisch auf makroskopische Veränderungen untersucht. Die Kontrolltiere wiesen zahlreiche Veränderungen auf, wie Ödeme des Kopfes oder Zyanosen bzw. Nekrosen der Kopfanhänge, Unterhautblutungen, subepikardiale, petechiale Blutungen, Hämorrhagien auf den Serosen, in den Organen (Bursa, Milz) und der Drüsenmagenschleimhaut, sowie Pankreatitis mit multifokalen bzw. konfluierenden, hellen Veränderungen, die auf das Vorliegen einer Pankreasnekrose hindeuteten. Dagegen waren in immunisierten Tieren aller Gruppen kaum maßgebliche pathologische Veränderungen sichtbar, lediglich $\leq 20\%$ der NDV-H5 bzw. NDV-H5N1, bzw. 30% der NDV-H5LP Gruppe wiesen eine der für die Kontrolle genannten Veränderungen auf.

4.7.5 Belastungsinfektion mit HPAIV H5N2 (heterolog)

Zur Überprüfung der Schutzwirkung gegen das heterologe AIV A/chicken/Italy/8/98 (H5N2) wurden je 10 mit NDV-H5LP, NDV-H5 bzw. NDV-H5N1 immunisierte Tiere, sowie 10 naive Kontrollen mit dem Isolat in einer Dosis von $10^{7,5}$ EID₅₀ / Tier okulonasal infiziert. Die Aminosäure-Homologie zwischen dem Hämagglutinin dieses Stammes und dem homologen Stamm HPAIV A/whooper swan/Germany/R65/06 (H5N1) beträgt 93,8 %.

4.7.5.1 Klinik nach Belastungsinfektion

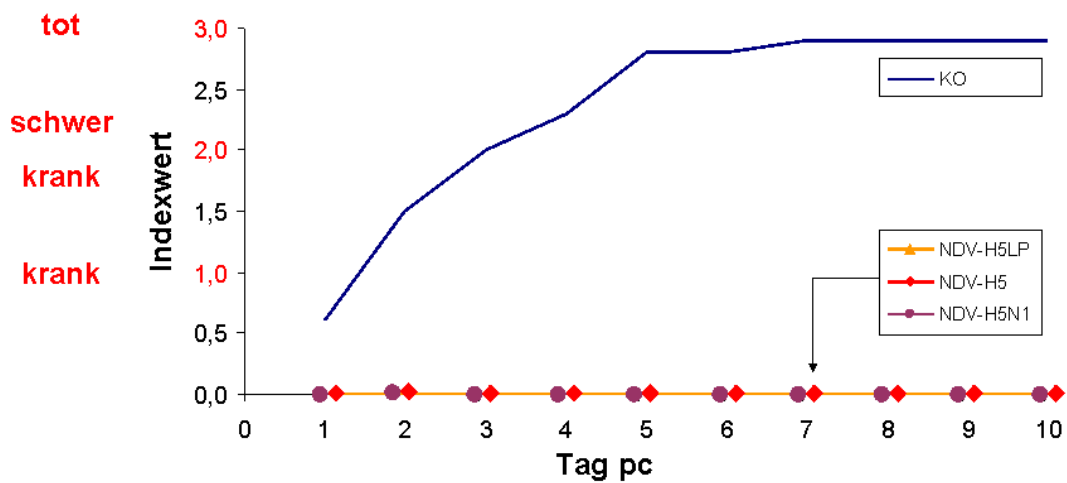


Abb. 64: tägl. klin. Index nach HPAIV A/chicken/Italy/8/98 (H5N2)-Infektion

Nach Belastung mit einer letalen Dosis des heterologen AIV A/chicken/Italy/8/98 (H5N2) verstarben 90 % der Kontrolltiere, während alle immunisierten Tiere keine klinischen Symptome zeigten und als gesund beurteilt wurden. Der Index der Kontrollgruppe lag mit 2,36 deutlich über dem für alle Immunisierungsgruppen (0) ermittelten (Abb. 64 und 69). Eine einmalige Immunisierung mit NDV-H5 bzw. NDV-H5LP oder NDV-H5N1 bewirkte vollständigen Schutz gegen klinische Symptome nach letaler heterologer HPAIV H5N2-Infektion.

4.7.5.2 Nachweis von Antikörpern gegen AIV

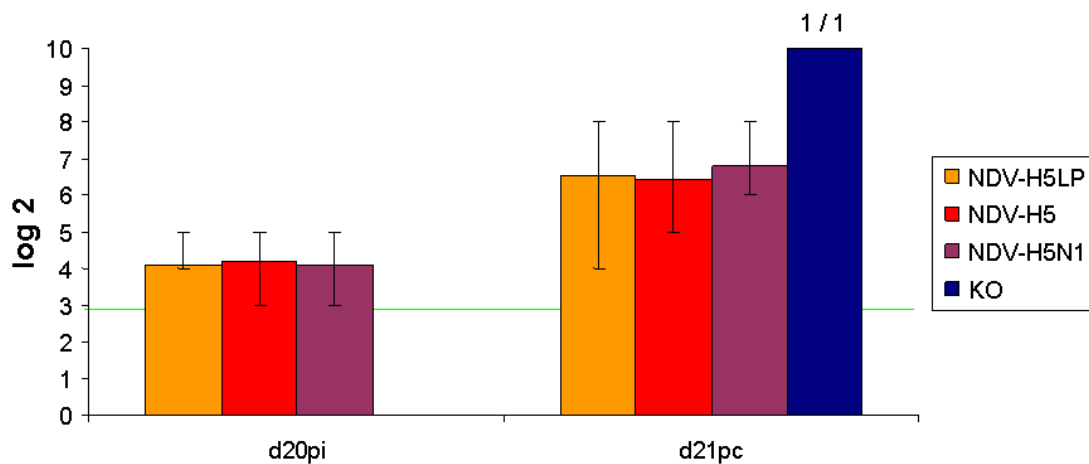


Abb. 65: AIV H5-spez. AK nach Infektion mit HPAIV A/chicken/Italy/8/98 (H5N2)

Dargestellt sind die HAH-Titer Mittelwerte (Balken) der jeweiligen Gruppe an den entsprechenden Beprobungstagen als \log_2 , sowie die Bandbreiten (vertikale Linien). Die grüne Linie gibt den Titer an, der nach OIE als positiv zu bewerten ist.

Nach Immunisierung und nach Infektion gewonnene Seren wurden im Hämagglutinations-Hemmungstest auf H5-spezifische Antikörper untersucht, wobei das Infektionsvirus als Antigen diente und die Bewertung analog zu Kapitel 4.7.2.1 erfolgte. Von den Kontrolltieren verstarben 9 von 10, das überlebende Tier wies nach drei Wochen einen sehr hohen Titer von 2^{10} auf (Abb. 65 und 69). Drei Wochen nach Belastung mit heterologem AIV A/chicken/Italy/8/98 (H5N2) wurde in NDV-H5LP bzw. NDV-H5N1 immunisierten, wie auch in der NDV-H5 Gruppe, ein Anstieg H5-spezifischer Antikörper diagnostiziert, was auf Virusreplikation in allen immunisierten Tieren hinweist.

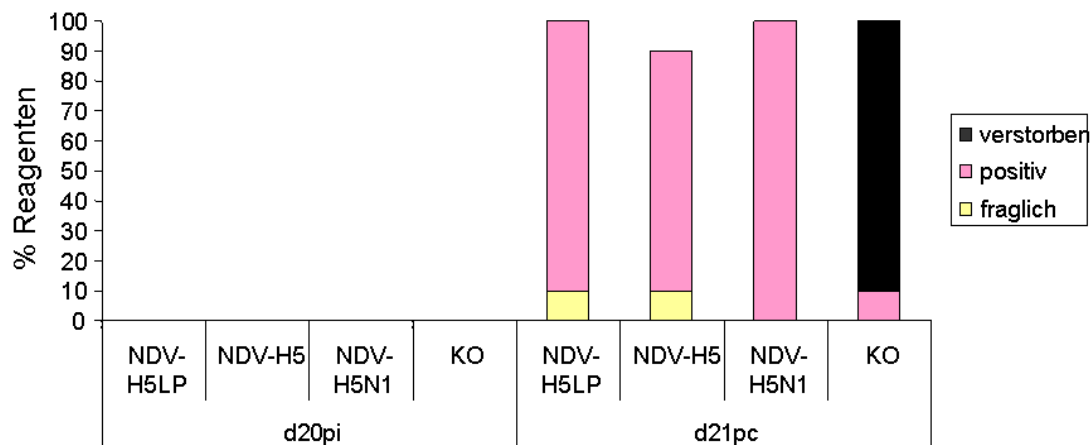


Abb. 66: AIV NP-spez. AK nach Infektion mit HPAIV A/chicken/Italy/8/98 (H5N2)

Es wurde geprüft, ob eine Differenzierung von immunisierten und infizierten Tieren an Hand des Nachweises von Antikörpern gegen andere, nicht-HA- bzw. nicht-NA-spezifische AIV-Proteine nach Belastungsinfektion wurde mittels Detektion AIV-NP-spezifischer Antikörper

unter Verwendung eines ELISA möglich ist. Vor der Infektion waren in den Seren aller getesteten Tiere keine Antikörper zu detektieren. Für das überlebende Tier der Kontrollgruppe konnten NP-spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Bei 90 % der NDV-H5LP, sowie bei 80 % der NDV-H5 bzw. 100 % der NDV-H5N1 immunisierten Tiere, wurden 3 Wochen nach Infektion ebenfalls Antikörper detektiert (Abb. 66 und 69). Bei je einem Tier der NDV-H5LP bzw. NDV-H5 Gruppe konnte die Serokonversion nicht sicher nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse weisen auf Virusreplikation in immunisierten Tieren hin, wobei fast alle immunisierten und infizierten Tiere durch Nachweis NP-spezifischer Antikörper zu identifizieren waren.

4.7.5.3 Nachweis der AIV-Virusausscheidung

Zur Ermittlung der Virusausscheidung nach Infektion mit AIV A/chicken/Italy/8/98 (H5N2), wurden Tupfer von Rachen und Kloake auf vRNA in der rtRT-PCR untersucht. Für die Kontrolltiere wurde von Beginn an, sowohl oropharyngeal als auch kloakal eine hohe Virusgenomlast ermittelt (Abb. 67). Die detektierte Virusgenomlast in allen immunisierten Tieren bewegte sich über den gesamten Untersuchungszeitraum auf gleichbleibend niedrigem Niveau mit durchschnittlichen CT-Werten nahe dem Detektionslimit. Statistisch signifikante Unterschiede der Virusgenomlast zwischen Kontrollgruppe und den drei immunisierten Gruppen sind in Abb. 68 als Box-Plot dargestellt.

Über den gesamten Beprobungszeitraum waren an Hand der Ausscheidung viraler RNA keine weiteren signifikanten Unterschiede zwischen den Tieren der drei Immunisierungsgruppen festzustellen. Die Ausscheidungsraten vRNA waren nach einmaliger Immunisierung mit NDV-H5 bzw. NDV-H5LP oder NDV-H5N1 gegenüber der Kontrollgruppe signifikant reduziert.

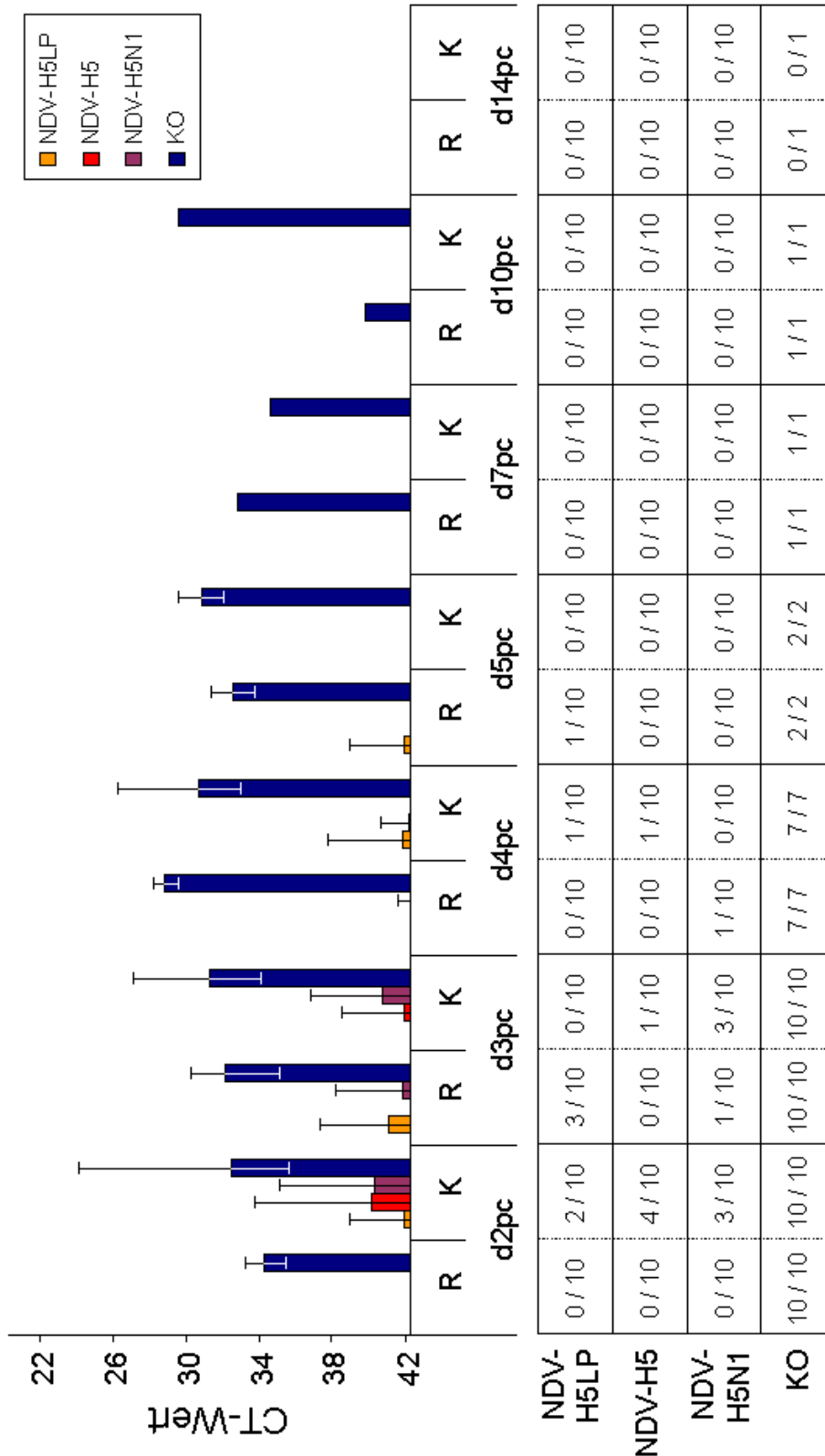


Abb. 67: vRNA-Nachweis in Tupfern nach heterologer HPAIV H5N2-Infektion (rtRT-PCR)

Die CT-Mittelwerte der Gruppen (Balken), sowie die Bandbreiten (vertikale Linie) sind pro Beprobungstag für Rachen und Kloake getrennt dargestellt. Die Anzahl positiver Tupfer an der Gesamtzahl je Gruppe und Tag ist in der Tabelle darunter für Rachen und Kloake getrennt aufgeführt.

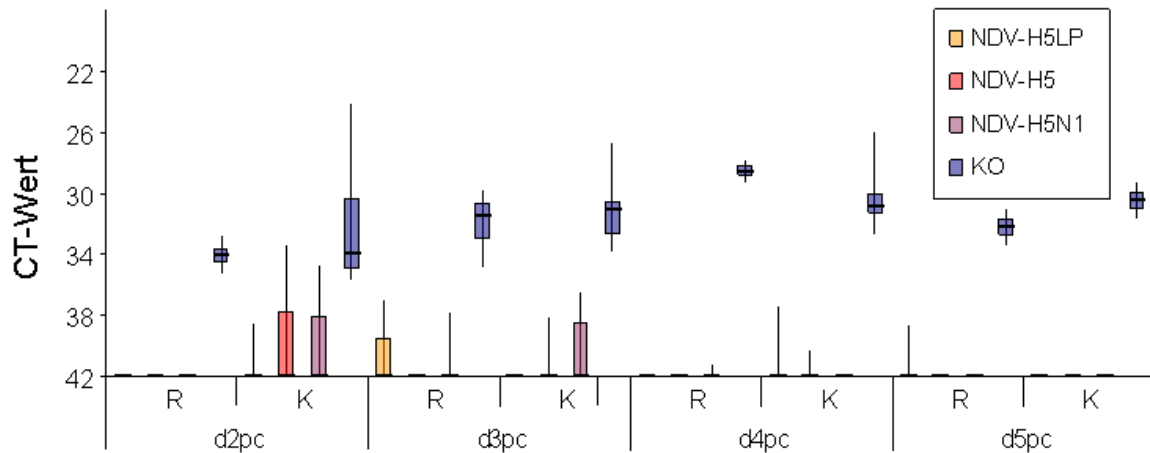


Abb. 68: Box-Plots der ermittelten CT-Werte nach HPAIV A/chicken/Italy/8/98 (H5N2)-Infektion

Dargestellt sind die Bandbreite (vertikale Linie; Minimum und Maximum), der Median (horizontale schwarze Linie), sowie das untere (0,25) und obere (0,75) Quartil (untere bzw. obere Begrenzung der Box). Decken die Boxen beider Gruppen für Rachen- oder Kloakentupfer an einem Tag nicht-überschneidende CT-Wertbereiche ab, sind die Unterschiede signifikant.

4.7.5.4 Pathologische Befunde

Alle verstorbenen, moribund getöteten, sowie am Versuchsende getötete Tiere wurden pathologisch-anatomisch auf makroskopische Veränderungen untersucht. Die Kontrolltiere wiesen zahlreiche Veränderungen auf, wie Ödeme des Kopfes oder Zyanosen bzw. Nekrosen der Kopfanhänge, Unterhautblutungen, subepikardiale, petechiale Blutungen, Hämorrhagien auf den Serosen, in den Organen (Darm, Bursa, Milz) und der Drüsenmagenschleimhaut, sowie Pankreatitis mit multifokalen bzw. konfluierenden, hellen Veränderungen, die auf das Vorliegen einer Pankreasnekrose hindeuteten. Dagegen waren in immunisierten Tieren aller Gruppen kaum maßgebliche pathologische Veränderungen sichtbar, lediglich $\leq 20\%$ der NDV-H5LP bzw. 10% der NDV-H5N1 und keines der NDV-H5 Gruppe wiesen eine, der für die Kontrolle genannten Veränderungen auf.

4.7.6 Auswertung (Fazit)

Die protektive Wirkung der NDV-H5LP, NDV-H5 und NDV-H5N1 Rekombinanten im Huhn wurde in drei parallel durchgeführten Experimenten überprüft: zum einen gegen homologes HPAIV H5N1, zum anderen im Vergleich zu zwei heterologen HPAIV H5-Isolaten.

Die NDV-H5LP, NDV-H5 und NDV-H5N1 Rekombinante induzieren im Huhn einander entsprechende Antikörper-Titer, sowohl gegen AIV H5 (Abb. 52), als auch gegen NDV HN (Abb. 54). In mehr als 70% der NDV-H5N1 immunisierten Tiere konnten N1-spezifische Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 53).

Tab. 8: Ergebnisübersicht nach Immunisierung mit NDV-H5LP, NDV-H5 und NDV-H5N1

Immunisierung	Zeit	NDV-H5LP	NDV-H5	NDV-H5N1
Dosis pro Tier Inokulationsweg	d0	10 ⁶ EID ₅₀ okulonasal		
Morbidität		0 / 30	0 / 30	0 / 30
Mortalität		0 / 30	0 / 30	0 / 30
klinischer Index		0,00	0,00	0,00
H5-spez. Antikörper ⊖-HAH-Titer; P / n	d10pi	2 ^{1,7} 2 / 30	2 ^{1,3} 1 / 30	2 ^{2,4} 12 / 30
H5-spez. Antikörper ⊖-HAH-Titer; P / n	d20pi	2 ^{2,9} 26 / 30	2 ^{2,8} 21 / 30	2 ^{3,0} 29 / 30
N1-spez. Antikörper P / n	d10pi	0 / 30	0 / 30	0 / 30
N1-spez. Antikörper P / n	d20pi	0 / 30	0 / 30	22 / 30
HN-spez. Antikörper ⊖-HAH-Titer, P / n	d10pi	2 ^{4,7} 30 / 30	2 ^{4,2} 29 / 30	2 ^{4,4} 30 / 30
HN-spez. Antikörper ⊖-HAH-Titer; P / n	d20pi	2 ^{4,8} 30 / 30	2 ^{4,6} 30 / 30	2 ^{4,6} 30 / 30

P / n = Anzahl positiver Tupfer bzw. Seren (P) / Anzahl Tiere (n);
(positive Titer $\geq 2^3$ für AIV; $\geq 2^4$ für NDV)

Nach letaler Infektion mit HPAIV A/whooper swan/Germany/R65/06 (H5N1) verstarben die Kontrolltiere bis Tag 4, während die mit den Rekombinanten NDV-H5LP, NDV-H5 oder NDV-H5N1 immunisierte Tiere gesund blieben (Abb. 55) und weder gegen das AIV Nukleoprotein serokonvertierten (Abb. 57) noch Virusausscheidung an Hand der Detektion von vRNA (Abb. 58) aus Tupferproben aufwiesen. Diese Ergebnisse deuten auf sterile Immunität hin, so dass eine Differenzierung zwischen vakzinierten und infizierten (DIVA) Tieren nicht möglich war. Auf Grund der fehlenden Ausscheidung des Virus besteht jedoch auch keine Notwendigkeit dafür.

Nach letaler Infektion mit HPAIV A/duck/Vietnam/TG24-01/05 (H5N1), einem heterologen Isolat mit 98,3 %iger Aminosäure-Homologie im Hämagglutinin zu dem homologen Virus, zeigte, dass Immunisierung mit den Rekombinanten eine deutliche Milderung der klinischen Symptome (Abb. 59) gegenüber der Kontrollgruppe bewirkte, jedoch keinen vollständigen Schutz vor Mortalität bot. NDV-H5LP immunisierte Tiere serokonvertierten nicht gegen das AIV-Nukleoprotein (Abb. 61) und wiesen über den Beobachtungszeitraum Virusgenomlasten nahe der Nachweisgrenze auf (Abb. 62). In der NDV-H5 Gruppe war eine AIV NP-spezifische Serokonversion von 30 % (Abb. 61), bei ebenfalls geringen Virusgenomlasten nahe des Detektionslimits zu verzeichnen (Abb. 62). Tiere der NDV-H5N1 Gruppe serokonvertierten AIV NP-spezifisch zu 80 % (Abb. 61), bei Ausscheidung geringer Virusgenomlasten (Abb. 62; 63). Insgesamt weisen diese Ergebnisse auf eine hohe partielle Schutzwirkung gegen das Virus hin: geringe Serokonversion in Verbindung mit geringen ausgeschiedenen Virusgenomlasten indizieren deutlich verminderte Virusreplikation, jedoch

verstarben auch immunisierte Tiere (3/30). Mit Ausnahme der Gruppe, die mit der NDV-H5LP Rekombinante immunisiert worden waren, konnten in den Gruppen, in denen Virusausscheidung zu detektieren war, Serokonversion (Abb. 61) gegen AIV NP nachgewiesen werden.

Nach Belastungsinfektion mit HPAIV A/chicken/Italy/8/98 (H5N2) in einer maximalen Dosis von $10^{7.5}$ EID₅₀ / Tier des verstarben 90 % der Kontrolltiere, wohingegen die Immunisierung mit NDV-H5LP, NDV-H5 oder NDV-H5N1 vollständigen Schutz gegen klinische Symptome bot (Abb. 64). Alle Tiere für die Virusgenomlasten ermittelt wurden (Abb. 67) konnten mittels Nachweis NP-spezifischer Antikörper (Abb. 66) im ELISA als infiziert identifiziert werden, so dass an Hand NP-spezifischer Antikörper eine DIVA-Diagnostik möglich war. Dies zeigt die sehr hohe protektive Wirkung aller drei Rekombinanten gegen dieses heterologe Isolat, wobei kein maßgeblicher Unterschied zwischen den Rekombinanten festzustellen war.

Immuni- sierung	Zeit	NDV- H5LP	NDV- H5	NDV- H5N1	KO	NDV- H5LP	NDV- H5	NDV- H5N1	KO	NDV- H5LP	NDV- H5	NDV- H5N1	KO
H5-spez. AK [a]	d21pi	2 ^{4,0} 10 / 10	2 ^{3,7} 9 / 10	2 ^{3,7} 10 / 10	- 0 / 10	2 ^{2,1} 3 / 10	2 ^{2,2} 2 / 10	2 ^{3,7} 10 / 10	- 0 / 10	2 ^{4,1} 10 / 10	2 ^{4,2} 10 / 10	2 ^{4,1} 10 / 10	- 0 / 10
Belastungs- infektion	d21pi	A/whoooper swan/Germany/R65/06 (H5N1)											
Dosis / Tier Inokulation	d21pi	10 ⁶ EID ₅₀ okulonasal											
Morbidität		0 / 10	0 / 10	0 / 10	10 / 10	4 / 10	1 / 10	3 / 10	10 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	10 / 10
Mortalität		0 / 10	0 / 10	0 / 10	10 / 10	2 / 10	1 / 10	0 / 10	10 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10	9 / 10
klinischer Index		0,00	0,00	0,00	2,70	0,27	0,12	0,13	2,80	0,00	0,00	0,00	2,36
H5-spez. AK [a]	d21pc	2 ^{2,5} 4 / 10	2 ^{2,8} 7 / 10	2 ^{3,7} 10 / 10	+	2 ^{3,8} 8 / 8	2 ^{4,1} 9 / 9	2 ^{5,8} 10 / 10	+	2 ^{6,5} 10 / 10	2 ^{6,4} 10 / 10	2 ^{6,8} 10 / 10	2 ¹⁰ 1 / 1
NP-spez. AK [b]	d21pc	0 / 10	0 / 10	0 / 10	+	0 / 8	3 / 9	8 / 10	+	9 / 10	8 / 10	10 / 10	1 / 1
Rachen [c] Reagenten	d2- d14pc	0 / 10	0 / 10	0 / 10	2 / 2	9 / 10	8 / 10	8 / 10	+	3 / 10	0 / 10	2 / 10	10 / 10
Kloake [c] Reagenten	d2- d14pc	0 / 10	0 / 10	0 / 10	2 / 2	5 / 10	5 / 10	7 / 10	+	3 / 10	5 / 10	5 / 10	10 / 10

[a] Ø-HAH Titer; Anzahl positiver Titer (P) / Anzahl Tiere (n); (positive Titer $\geq 2^3$ für AIV)

[b] Anzahl positiver Seren (P) / Anzahl Tiere (n)

[c] Ausscheidung viraler RNA mittels rRT-PCR: Anzahl positiver Tupfer (P) / Anzahl Tiere (n) über den Beprobungszeitraum

Abb. 69: Ergebnisübersicht: Schutzwirkung von NDV-H5LP, NDV-H5 und NDV-H5N1 gegen HPAIV H5N1 (homolog und heterolog) und HPAIV H5N2

5 Diskussion

Niedrig pathogenes AIV des Subtyps H9 wird als möglicher Auslöser für zukünftige Influenzapandemien diskutiert, da in Asien bereits die Speziesbarriere zwischen Vogel und Mensch durchbrochen wurde (Peiris et al. 1999; Guo et al. 1999; Li et al. 2003; Butt et al. 2005) und es in Geflügelpopulationen auf Grund seiner milden Krankheitsverläufe oft unerkannt zirkuliert (Naeem et al. 2003; Roussan et al. 2009). Auch verursacht der Subtyp H9 in Kombination mit bakteriellen Ko- oder Sekundär-Infektionen zum Teil schwere Krankheitsverläufe mit hohen wirtschaftlichen Verlusten in Nutzgeflügelpopulationen (Kishida et al. 2004; Banet-Noach et al. 2007). Dieser Aspekt und die potentielle Gefährdung des Menschen durch diese Viren zeigen die Notwendigkeit der Entwicklung einer Vakzine gegen AIV des Subtyps H9. Am weitesten verbreitet ist der Einsatz inaktivierter Vollvirus-Vakzinen, die zwar gegen klinische Symptome schützen, jedoch eine zeitaufwendige Einzeltierapplikation erfordern. Unter Verwendung gentechnologischer Methoden wurden Vektorvakzinen entwickelt, die neben dem Schutz vor klinischen Erkrankungen auch eine kostengünstige Massenapplikation (Spray, Trinkwasser) ermöglichen sollen (van den Berg et al. 2008; Fuchs et al. 2009; Swayne 2009). Dazu wurden Impfviren, die als Lebendimpfstoff gegen andere Geflügelkrankheiten (z.B. Geflügelpocken, Infektiöse Laryngotracheitis oder Newcastle Krankheit) verwendet werden, gentechnisch so verändert, dass sie z.B. das immunogene Hämagglutinin exprimieren. Hämagglutinin-Protein exprimierende NDV-Rekombinanten schützen gegen Erkrankung durch den entsprechenden AIV-Stamm (Nakaya et al. 2001; Huang et al. 2003a; Veits et al. 2006; Park et al. 2006; Ge et al. 2007; Schröer et al. 2009; Nayak et al. 2009). In China wird seit 2006 mit einer HA-exprimierenden NDV-Rekombinante geimpft.

Für NDV-Rekombinanten, die das Hämagglutinin H5 bzw. H7 exprimieren, wurde nach einmaliger Immunisierung von SPF-Hühnern eine hohe Schutzwirkung gegen klinische Symptome nach homologer HPAIV-Infektion und eine reduzierte Ausscheidung des Virus gegenüber nicht-immunisierten Kontrolltieren vorgefunden (Veits et al. 2006; Schröer et al. 2009). Um eine Vakzine gegen LPAIV des Subtyps H9 herzustellen, wurde unter Nutzung des von Römer-Oberdörfer et al. etablierten revers-genetischen Systems für NDV Clone 30 ein entsprechendes NDV full-length Plasmid konstruiert (Römer-Oberdörfer et al. 1999), wobei das H9-Gen des Stammes AIV A/turkey/Wisconsin/1/66 (H9N2) in die intergene Region zwischen NDV F- und HN-Gen inseriert wurde, so dass der Aufbau identisch zu NDV-H5 und NDV-H7 war.

Durch Transfektion T7-Polymerase-exprimierender Zellen (Buchholz et al. 1999) mit dem full-length Plasmid NDV-H9 unter Ko-Transfektion mit Hilfsplasmiden (für NDV NP, P und L) wurde infektiöses Virus generiert. Die generierte NDV-H9-Rekombinante erreichte *in ovo*

dem parentalen Virus NDV Clone 30 vergleichbare Endtiter, wobei die Replikationseigenschaften der NDV-H9 Rekombinante lediglich in der frühen Phase nachteilig beeinflusst scheinen. Die anfangs verzögerte Virusreplikation ist nach Insertion von Fremdgenen für mehrere NNSV beschrieben (Bukreyev et al. 2006) und kann mit dem für NNSV typischen, durch das Abfallen der Polymerase bedingten Transkriptionsgradienten erklärt werden, der eine Verringerung der Transkription von 5' zur Genkassette lokalisierten Genprodukten bewirkt. Durch die Insertion des Fremdgens zwischen F- und HN-Gen könnte die Transkriptionsrate des L-Gens (nicht untersucht) vermindert sein, was das Verhältnis von NP:P:L, also der Komponenten des RNP-Komplexes, verschieben und zu einer anfangs verzögerten Replikation führen könnte. Für die Verwendung als Vakzine ist jedoch das Erreichen eines dem parentalen Virus entsprechenden Endtiters *in ovo* entscheidend. Die H9-Expression in NDV-H9 wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz infizierter Zellen im Vergleich zu AIV H9N2- und rNDV-infizierten Zellen gezeigt, sowie in Lysaten NDV-H9 infizierter Zellen in Western Blot- und Radioimmunpräzipitationsanalyse. Durch die zusätzliche Expression des H9 Proteins in NDV konnte vergleichend zu rNDV im ICPI keine Steigerung der Virulenz festgestellt werden; somit war NDV-H9 als lentogen einzustufen, was eine Voraussetzung für eine potentielle Vakzine darstellt. Die Rekombinante wurde in SPF-Hühnern und in Puten auf ihre Schutzwirkung gegen Infektion mit velogenem NDV oder LPAIV A/turkey/Wisconsin/1/66 (H9N2) überprüft.

Eine einmalige Immunisierung von SPF-Hühnern mit NDV-H9 induzierte im Vergleich zum parentalen rNDV entsprechende Antikörper-Titer (2^6) gegen NDV und resultierte in vollständiger Schutzwirkung bezüglich Mortalität und klinischer Symptome, bei deutlich reduzierter Ausscheidung viraler RNA gegenüber nicht-immunisierten Kontrolltieren. In Puten hingegen wurde drei Wochen nach einmaliger Immunisierung mit NDV-H9 oder rNDV zwar ein Antikörper-Titeranstieg gezeigt, jedoch waren nachgewiesene Titer insgesamt mit ca. 2^2 niedrig. Eine mögliche Erklärung für die niedrigen Impftiter in Puten könnten maternale NDV-Antikörper sein, die offenbar mit den Impfviren interagierten und so die Induktion einer humoralen Antwort verminderten. Um eine bessere Immunisierung zu erzielen, wurde eine 10-fach höhere Immunisierungs-dosis als in Hühnern eingesetzt, da in der Literatur (Higgins 1996) für Puten eine generell geringere Antikörper-Antwort sowohl nach Immunisierung als auch nach Infektionen im Vergleich zu Hühnern beschrieben ist. Obwohl nach Immunisierung mit NDV-H9 oder rNDV nur niedrige Antikörper-Titer nachgewiesen wurden, waren immunisierte Tiere gegenüber nicht-immunisierten Kontrollen partiell geschützt; so war die Mortalität um mehr als 50 % reduziert und klinische Symptome deutlich milder. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass Immunisierung mit NDV-H9 in zu rNDV gleichwertigen Ergebnissen bezüglich Antikörper-Titern, Schutzwirkung gegen NDV-Infektion

und Reduktion der Virusausscheidung resultierte; somit konnten keine Nachteile durch Insertion des Fremdgens H9 in NDV ermittelt werden.

Nach Immunisierung mit NDV-H9 konnten weder in SPF-Hühnern, noch in Puten AIV H9-spezifische Antikörper mittels Hämagglutinations-Hemmungstest detektiert werden. Daher wurden die Seren in der sensitiveren indirekten Immunfluoreszenz untersucht, wobei trotz einer geringen Verdünnung von 1:10 ebenfalls keine H9-spezifischen Reaktionen gezeigt werden konnten. Um nachzuweisen, dass die Tiere mit NDV-H9 immunisiert worden waren, wurde aus mehreren nach Immunisierung mit NDV-H9 gewonnenen Tupferproben RNA extrahiert, das H9 Gen mittels RT-PCR amplifiziert und durch Sequenzierung der Beweis erbracht. Das klinische Bild wie auch die Ausscheidung des Virus differierte zwar nach Belastungsinfektion mit A/turkey/Wisconsin/1/66 (H9N2) zwischen NDV-H9-immunisierten und AIV-naiven SPF-Hühnern und Puten, jedoch waren nur wenige Unterschiede auch signifikant, so dass die Immunisierung kaum eine Schutzwirkung induzierte. Wurden Hühner intranasal, mittels Augentropfen oder in den Kropf mit NDV immunisiert, konnten in Tränenflüssigkeit und Trachea-Spülflüssigkeit NDV-spezifische IgA nachgewiesen werden (Jayawardane und Spradbrow 1995), so dass eine durch okulonasale NDV-H9-Immunisierung induzierte lokale Immunantwort durch IgA oder auch die Induktion einer zellulären Immunantwort wahrscheinlich scheint. Dies wurde hier jedoch nicht untersucht und bleibt daher abzuklären.

Da das H9-Protein in NDV-H9-infizierten Zellen mittels indirekten Immunfluoreszenz-Tests mit polyklonalem α -H9N2-Hühnerserum zu detektieren war, kann eine geringe Antigenität des H9-Proteins ausgeschlossen werden und ist keine mögliche Erklärung für die fehlende Antikörper-Induktion im Tier. Auch entwickelten die nicht-immunisierten Hühner und Puten nach Infektion mit A/turkey/Wisconsin/1/66 (H9N2) hohe H9-spezifische Antikörper-Titer (2^6 bzw. 2^4), was zeigt, dass das H9-Hämagglutinin antigen-wirksam ist.

Möglicherweise reicht also die Menge an exprimiertem H9 in NDV-H9 nicht aus, um eine ausreichende Antikörper-Antwort zu induzieren. Die auf Röntgenfilm erhaltene Signalstärke für das HA-Protein in NDV-H9-infizierten Zell-Lysaten weist auf eine geringe Expression des Proteins hin. Dies steht im Gegensatz zur hohen Expression von z.B. H5 bzw. H7 in infizierten Zell-Lysaten entsprechender NDV-Rekombinanten (Veits et al. 2008; Schröder et al. 2009; Nayak et al. 2009), wobei diese Proteine auch in das NDV-HA-Virion inkorporiert wurden. Daher wurde die Inkorporation des AIV H9-Proteins in gereinigten NDV-H9 und AIV H9N2 Virionen in Western Blot-Analyse und Immunelektronenmikroskopie untersucht, wobei keine Inkorporation in NDV-H9-Virionen gefunden wurde. Die Inkorporation in das Virion scheint jedoch nicht zwingend erforderlich, da für eine H5-exprimierende ILTV-Rekombinante nach einmaliger Immunisierung eine hohe Antikörper-Antwort und auch ein guter Schutz gegen HPAIV-Infektion beschrieben wurde (Pavlova et al. 2009a).

Von den vom HN-Gen abgeleiteten Gen-Start- oder Gen-Endsequenzen und nicht-kodierenden Regionen, die den ORF H9 flankieren, wurde eine hohe Expression des H9 erwartet, da für eine NDV-H7-Rekombinante mit identischer Genkassette eine hohe Expression des inserierten Fremdgens gezeigt wurde. Da außerdem bei Nicht-Einhaltung der „rule of six“ die virale Replikation bis zum vollständigen Ausfall verringert sein kann, was Untersuchungen an SeV und MV zeigten (Kolakofsky et al. 1998), wurde bei Kreation der Genkassette unter Berücksichtigung der Gesamtlänge des NDV-H9-Genoms (17.178 nt) die Einhaltung der „rule of six“ beachtet.

Auch wenn die Untersuchung der Rekombinante NDV-H9 gezeigt hat, dass durch die Insertion des Fremdgens die Transkription der distal des Inserts liegenden Transkriptionseinheit (HN) nicht sichtbar beeinträchtigt scheint, weist die auf Röntgenfilm erhaltenen Signalstärke auf eine geringere Transkription des H9-Gens hin. Betrachtet man die durch Veits et al. gezeigte Northern Blot-Analyse für zwei NDV-H5 Rekombinanten, so weisen diese jeweils stärkere Signale für die entsprechend detektierte mRNA der H5-Gene auf (Veits et al. 2006). Eine vermutlich geringere Transkription des H9-Gens könnte eine verminderte Translation zur Folge haben. Eine effiziente Translationsinitiation soll nach der von Kozak postulierten Hypothese erfolgen, wenn sich an Position -3 eine Purinbase (oft Adenosin; A) und an Position +4 ein Guanosin (G) befinden. In der auf die Gen-Startsequenz folgenden nicht-kodierenden Region proximal des ORF H9 wurde zusätzlich die als „Kozak-Sequenz“ (**GCCA/GCCATGG**) (Kozak 1987) bekannte Basenabfolge so modifiziert, dass die „entscheidenden Basen“ dieser Sequenz für effiziente Translationsinitiation erhalten sind (NDV-H9: TCA**ACCATGG**). Auch wenn kein Vergleich der Translationsrate möglich war, so wurde gezeigt, dass der ORF H9 in der *in vitro*-Translation abgelesen und das Produkt der erwarteten Größe von ca. 62,5 kDa entspricht.

Die Expression des AIV H9-Proteins konnte in Lysaten NDV-H9- und AIV H9N2-infizierter Zellen in Western Blot und Radioimmunpräzipitationsanalyse, ebenso wie in transfizierten Zellen übereinstimmend mit einem Molekulargewicht von ca. 65 kDa gezeigt werden, was für eine ähnliche posttranslationale Modifikation (Glykosylierung, Palmitoylierung) im endoplasmatischen Retikulum (ER) spricht. Die Überprüfung der Expression von H9 auf der Oberfläche NDV-H9-infizierter Zellen mittels indirekten Immunfluoreszenz-Tests ergab, dass das H9-Protein im Zytoplasma, nicht jedoch auf der Zelloberfläche nachgewiesen wurde. Warum das Protein nicht in die Zelloberfläche gelangt, obwohl es im ER modifiziert wird, könnte an den Aminosäure-Austauschen liegen, die möglicherweise zu einer fehlerhaften Faltung führen, was den Abbau des Proteins zur Folge haben oder den Transport zur Oberfläche stören könnte. Der Aminosäure-Austausch an Position 362 tritt in mehr als 15 weiteren H9N2-Isolaten auf und stellt damit eine natürliche Variante dar, was keine Beeinträchtigung bedeuten sollte. Die Aminosäure-Austausche an den Positionen 58 und

117 befinden sich im HA₁-Bereich des Hämagglutinins, während die Position 372 im HA₂-Anteil lokalisiert ist und könnten daher kaum Einfluss auf den Transport zur Wirtszellmembran haben. Daher verbleibt als potentielle Ursache für fehlende Inkorporation in die Virushülle ein Aminosäure-Austausch an Position 545, der sich im Bereich der Transmembrandomäne befindet. Das könnte eine Störung im intrazellulären Transport zur Plasmamembran hervorrufen. Der Austausch einer aliphatisch-neutralen Aminosäure durch eine strukturell und in ihren elektrischen Eigenschaften ähnliche, aliphatisch-neutrale Aminosäure sollte keinen so bedeutsamen Unterschied in der Struktur des Proteins bewirken, dass eine Störung des intrazellulären Transportes zu erwarten gewesen wäre. Die Korrektur dieses Aminosäure-Austauschs sollte zeigen, ob damit die Inkorporation in die Virionen zu erreichen ist.

Eine weitere Hypothese ist eine Inkompatibilität der zytoplasmatischen Domäne des H9-Proteins mit NDV. In diesem Fall könnte der Austausch dieser Domänen durch die eines anderen Hämagglutinins, bei dem eine erfolgreiche Inkorporation in NDV gezeigt wurde, die Inkorporation des H9-Proteins in das NDV-H9 Virion ermöglichen. Alternativ könnte die AIV H9-Ektodomäne mit der Transmembran- und zytoplasmatischen Domäne des NDV F-Proteins fusioniert werden (Nayak et al. 2009; Park et al. 2006), was zu einer erhöhten Expression und Inkorporation in das Viruspartikel führen könnte. Damit könnte das chimäre NDV-F / AIV H9-Protein eine noch höhere Kompatibilität zu seinem Vektor NDV aufweisen, da der zytoplasmatische Anteil mit dem M-Protein interagiert und die Transmembrandomäne NDV-spezifisch wäre.

Möglicherweise sind mehrere dieser Faktoren für die fehlende Antikörper-Antwort und die resultierende fehlende Schutzwirkung gegen LPAIV H9N2-Infektion nach einmaliger Immunisierung mit NDV-H9 verantwortlich.

Mit dem weltweit steigenden Auftreten hochpathogener AIV-Isolate des Subtyps H5N1 und der derzeit hohen Prävalenz dieses Subtyps in vielen Regionen Asiens sind die Entwicklungen von Vakzinen gegen HPAIV verstärkt worden. HPAI-Viren des Subtyps H5N1 bedingten über die letzten 12 Jahre nicht nur verheerende Verluste in der Geflügelindustrie, sondern waren durch das zoonotische Potential auch als mögliche Pandemieauslöser gefürchtet. Infektionen verursachten mehrere hundert, meist schwere Erkrankungen beim Menschen, davon ca. 260 Todesfälle. (WHO 2009)

Bislang werden vorwiegend inaktivierte Vollvirus-Vakzinen zur Bekämpfung von HPAIV H5-Infektionen eingesetzt, wodurch zwar die Virusausscheidung in Hühnern deutlich reduziert, nicht aber zwischen Feldvirus- und Impfvirus-Antikörpern unterschieden werden kann. Eine schnelle Detektion zur Überwachung von zirkulierenden Viren, die keine Symptome verursachen, ist von besonderer Bedeutung, um die Virusverbreitung durch gezielte

Eradikationsmaßnahmen einzudämmen. Durch Verwendung eines Impfvirus mit zum kursierenden Feldisolat übereinstimmendem Hämagglutinin- und abweichendem Neuraminidase-Subtyp wurde eine Unterscheidung zwischen geimpften und infizierten Tieren an Hand NA-spezifischer Antikörper möglich (Capua et al. 2003), jedoch ist die Unterscheidung im IFT für den Einsatz in der Praxis zu aufwändig. Obwohl eine Vollvirus-Vakzinierung eine breitere Schutzwirkung auf Grund der Immunantwort gegen viele virale Proteine hervorruft, bieten Markervakzinen durch Induktion einer Immunantwort auf ausgewählte AIV-Oberflächenproteine bei Fehlen weiterer immunogener AIV-Proteine, den Vorteil einer schnelleren und sichereren Diagnostik auf Feldvirus-Infektionen, da auch geimpfte und anschließend Feldvirus-infizierte Tiere durch Testung auf Antikörper gegen nicht in der Vakzine enthaltene Proteine erkannt werden können. Die Neuraminidase weist gegenüber dem Hämagglutinin eine deutlich geringere Mutationsrate auf und induziert, wie auch das HA, die Bildung von Antikörpern. Für Hämagglutinin-exprimierende NDV-Rekombinanten wurde eine hohe Schutzwirkung gegen HPAIV-Infektionen gezeigt und es sollte geprüft werden, ob durch weitere immunogene Proteine die Schutzwirkung weiter verbessert werden kann. Eine N1-exprimierende Rekombinante wurde generiert, die im Aufbau analog zur NDV-H9-Rekombinante war.

Die Expression des N1-Proteins konnte in mit NDV-N1 infizierten Zellen in der indirekten Immunfluoreszenz und in der Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden. Die Insertion des AIV N1-Gens führte zu keiner erkennbaren Steigerung der Virulenz im ICPI gegenüber dem parentalen rNDV; somit war auch NDV-N1 als lentogen einzustufen, was die Nutzung einer solchen Rekombinante als potentielle Vakzine ermöglicht.

Drei Wochen nach einer einmaligen Immunisierung mit NDV-N1 konnten in allen SPF-Hühnern sowohl AIV N1-spezifische Antikörper mittels N1-ELISA, als auch hohe NDV-spezifische Antikörper (2^5) mittels Hämagglutinations-Hemmungstest nachgewiesen werden. Nach Belastungsinfektion mit HPAIV H5N1 in tödlicher Dosis zeigten die NDV-N1 immunisierten Tiere gegenüber den naiven Kontrolltieren eine verlängerte Überlebenszeit, was die Beteiligung N1-spezifischer Antikörper an einer schützenden Immunität zeigt. Vergleichbare Resultate konnten nach einmaliger Immunisierung von SPF-Hühnern mit einer N1-exprimierenden ILTV-Rekombinante (Pavlova et al. 2009a) oder nach Mehrfach-Immunisierung mit NA-kodierendem DNA-Plasmid- bzw. NA-exprimierenden Alphavirus-basierten VLPs oder Baculovirus-exprimiertem rekombinanten NA gezeigt werden (Sylte et al. 2007).

Wie auch diese Ergebnisse deuten Untersuchungen unter Nutzung verschiedener Vektorsysteme darauf hin, dass HA- und NA-Ko-Expression einen verbesserten und breiteren Schutz gegen HPAIV-Infektionen induzieren könnte (Johansson et al. 2002; Qiao et al. 2003; Pavlova et al. 2009a). Daher wurde eine HA- und NA-ko-exprimierende NDV-

Rekombinante (NDV-H5N1), die die entsprechenden Gene des Stammes A/whooper swan/Germany/R65/06 (H5N1) im Vergleich zu einer H5-exprimierenden NDV Rekombinante (NDV-H5) getestet. Das H5-Gen wurde zwischen NDV-P- und M-Gen und das N1-Gen zwischen NDV-F- und HN-Gen inseriert, so dass möglicherweise durch seine Lage das H5-Gen noch stärker exprimiert wird, als bei Insertion zwischen F und HN. Zusätzlich wurde eine H5-exprimierende NDV-Rekombinante (NDV-H5LP) ohne polybasische Spaltstelle getestet. Zur Evaluierung der Schutzwirkung dieser drei Rekombinanten wurde neben dem homologen, deutschen AIV H5N1 (Clade 2.2), auch heterologes, asiatisches AIV A/duck/Vietnam/TG24-01/05 (H5N1) (Clade 1; AS-Homologie HA: 96,3 %) bzw. AIV A/chicken/Italy/8/98 (H5N2) (AS-Homologie HA: 93,8 %) eingesetzt.

Die zusätzliche Expression des H5-Proteins konnte in mit NDV-H5 und NDV-H5LP infizierten Zell-Lysaten in der Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden. In mit NDV-H5N1 infizierten Zellen wurde außerdem die gleichzeitige Expression des H5- und des N1-Proteins detektiert. Für NDV-H5- und NDV-H5N1-infizierte Zell-Lysate, in denen das H5 mit multiplen basischen Aminosäuren an der Spaltstelle inseriert ist, konnten zwei Signale in der Größe von ca. 25 und ca. 45 kDa detektiert werden, die darauf hinweisen, dass das H5-Protein in seiner gespaltenen Form vorliegt. Demgegenüber konnte für das durch Deletion dieser basischen Aminosäuren modifizierte H5-Protein in NDV-H5LP-infizierten Zell-Lysaten in seiner ungespaltenen Form ein ca. 70 kDa großes Signal identifiziert werden.

Im ICPI wurde für NDV-H5 und NDV-H5LP gleichermaßen keine Steigerung der Virulenz durch die Fremdgen-Insertion gegenüber dem parentalen rNDV festgestellt. Obwohl für NDV-H5N1 bei einem ICPI Wert von 0,3 eine geringe Steigerung der Virulenz gezeigt wurde, war auch diese als lentogen einzustufen.

Da das NDV-H5N1-Virion durch die Expression von zwei Oberflächenproteinen möglicherweise maßgeblich verändert wurde, könnte die Expression der Neuraminidase bei der Freisetzung der Nachkommenvirionen eine Verklumpung an der Zelloberfläche verhindern, eine erhöhte Freisetzungsrates der Rekombinante ermöglichen und in Kombination mit dem durch ubiquitäre Proteasen spaltbaren Hämagglutinin zu einer gesteigerten Ausbreitung im Tier führen.

Nach einer dreiwöchigen Immunisierungsphase zeigten Serum-Untersuchungen immunisierter SPF-Hühner, dass die einmalige Immunisierung mit NDV-H5, NDV-H5LP oder NDV-H5N1 in allen Tieren detektierbare Antikörper-Titer gegen AIV H5 induziert hatte. In mit NDV-H5N1 immunisierten Tieren konnten zu diesem Zeitpunkt lediglich bei 22 von 30 Tieren N1-spezifische Antikörper im ELISA nachgewiesen werden. Zum gleichen Zeitpunkt hatten in der vorherigen Studie alle (11/11) mit NDV-N1 immunisierten Tiere detektierbare N1-spezifische Antikörper entwickelt. Die Expression des N1-Proteins in diesen beiden Rekombinanten ist nicht vergleichbar. Bedingt durch den Transkriptionsgradienten und die

durch Ko-Expression von HA und NA bedingte Lage von N1 weiter 5' im NDV-H5N1-Genom, ist die N1-Expression in NDV-H5N1 vermutlich geringer. In allen mit den drei Rekombinanten immunisierten Tieren konnten NDV-spezifische Antikörper-Titer ($\bar{\varnothing}$ ca. 2^5) mittels Hämagglutinations-Hemmungstest nachgewiesen werden.

Die stärkste Schutzwirkung konnte in allen Gruppen nach Belastungsinfektion mit dem homologen HPAIV ermittelt werden, wobei eine Ausscheidung des Virus nicht nachweisbar war und auch keines der Tiere gegen das AIV Nukleoprotein serokonvertierte. Diese Ergebnisse sprechen für eine sterile Immunität gegen das homologe HPAIV.

Nach Immunisierung waren die meisten Tiere auch gegen klinische Symptome nach Belastung mit dem heterologen asiatischen HPAIV H5N1 geschützt, allerdings erkrankten einzelne Tiere jeder Gruppe (NDV-H5LP: 4; NDV-H5: 1, NDV-H5N1: 3) und insgesamt 3 Tiere (NDV-H5LP: 2; NDV-H5: 1) verstarben an der Infektion. In den NDV-H5LP- und NDV-H5-immunisierten Tieren konnte das Virus entweder vom Immunsystem abgewehrt werden, so dass kaum bzw. keine NP-spezifischen Antikörper gebildet wurden oder die Tiere verstarben auf Grund der hohen Virulenz des Erregers. Dennoch bewegte sich die Ausscheidung des Virus in allen immunisierten Gruppen auf einem durchgehend niedrigen Niveau, besonders in den Tieren der NDV-H5LP bzw. NDV-H5 Gruppe, die nicht gegen NP serokonvertierten. Da in der rtRT-PCR die virale RNA mit sehr geringen Genomlasten nachgewiesen wurde, schieden die Tiere vermutlich kein infektiöses Virus aus.

Im Gegensatz dazu zeigte keines der Tiere der immunisierten Gruppen nach einer Belastungsinfektion mit dem heterologen HPAIV A/Huhn/Italien/8/98 (H5N2) Symptome. Von den Kontrolltieren verstarben trotz der Verabreichung einer maximalen Dosis von $10^{7,5}$ EID₅₀ nur 90 % der Tiere, woraus sich eine geringere Virulenz des Stammes A/chicken/Italy/8/98 (H5N2) gegenüber den HPAIV H5N1 Infektionsviren ableitet, was auch in anderen Studien gezeigt wurde (Pavlova et al. 2009a; Pavlova et al. 2009b). In allen immunisierten Gruppen wurde eine Serokonversion gegen NP ermittelt, was auf Virusreplikation hindeutete, obwohl in der rtRT-PCR nur äußerst geringe Genomlasten nahe der Nachweisgrenze detektiert wurden.

Somit wurde gezeigt, dass Vakzinierung mit einer NDV-Rekombinante, die unverändertes, bzw. durch Deletion basischer AS an der Spaltstelle modifiziertes AIV H5 exprimiert, oder H5 und N1 ko-exprimiert, in SPF-Tieren nicht nur gegen homologes, sondern auch gegen heterologes asiatisches HPAIV A/duck/Vietnam/TG24-01/05 (H5N1) oder HPAIV A/chicken/Italy/8/98 (H5N2) eine hohe Schutzwirkung induziert.

Insgesamt resultierte die Immunisierung mit NDV-H5, NDV-H5LP oder NDV-H5N1 in einer hohen protektiven Wirkung gegen klinische Symptome, wobei entweder auch die Virusreplikation nach Belastungsinfektion (homolog) gegenüber den Kontrolltieren so stark eingeschränkt war, dass die Ausscheidung unterbunden und dadurch keine

Markerdiagnostik durch Nachweis AIV NP-spezifischer Antikörper möglich und nötig war, oder die Virusausscheidung war gegenüber Kontrolltieren stark reduziert (heterolog) und in diesen Gruppen auch NP-spezifische Serokonversion vorhanden.

Diese Ergebnisse stimmen mit Resultaten von Römer-Oberdörfer et al. überein, denen zufolge eine hohe Übereinstimmung zwischen Impfantigen und Infektionsvirus eine bessere Schutzwirkung induziert als heterologe Impfantigene (Römer-Oberdörfer et al. 2008). Bei Vergleich der Resultate der einzelnen Rekombinanten in ihrer Schutzwirkung bezüglich Klinik, Serokonversion und Virusausscheidung gegen die drei Infektionsviren konnten zwischen NDV-H5, NDV-H5LP und NDV-H5N1 keine deutlichen Unterschiede festgestellt werden. Zusätzlich lassen diese Resultate den Rückschluss zu, dass die Deletion multibasischer Aminosäuren im Bereich der Spaltstelle in NDV-H5LP die Immunantwort und folglich die Schutzwirkung gegen HPAIV-Infektion nicht nachteilig beeinflusst, so dass durch Einsatz derart modifizierter HA-Gene eine hohe Homologie zum Feldisolat bei hoher Sicherheit im Hinblick auf gefürchtete Rekombinationsereignisse mit AIV-Feldisolaten gewährleistet scheint.

Für die Entwicklung moderner Impfstoffe gegen AIV, die zum einen nach Massenapplikation als Spray oder im Trinkwasser einen zuverlässigen Schutz vermitteln und zum anderen die Unterscheidung zwischen geimpften und infizierten Tieren (DIVA-Prinzip) ermöglichen, bietet NDV als Vektor für bivalente Markervakzinen zur Anwendung in Geflügelbeständen gegenüber ILTV- oder FPV-basierten Vakzinen Vorteile. Obwohl bei NDV, ILTV und mit reduzierter Wirksamkeit bei FPV die Massenapplikation möglich ist, besitzt NDV ein breiteres Wirtsspektrum (Alexander und Gough 2003), was die Anwendung einer HA-exprimierenden NDV-Vakzine nicht nur auf Hühner beschränkt. Nachteile von ILTV sind das enge Wirtsspektrum (Hühner und Fasane), sowie die geringe Empfänglichkeit sehr junger Hühner. Auch wenn für FPV in Hühnern eine Massenapplikation möglich ist, wird eine hohe Schutzwirkung erst durch Einzeltierapplikation erreicht (Tripathy und Reed 2003). Außerdem werden NDV- und FPV-basierte Vektorvakzinen in der Praxis bereits verwendet (van den Berg et al. 2008; Fuchs et al. 2009; Swayne 2009), während ILTV-basierte bisher nur unter experimentellen Bedingungen getestet worden sind (Lüschow et al. 2001; Veits et al. 2003; Pavlova et al. 2009a; Pavlova et al. 2009b). Allerdings haben Untersuchungen mit immunen Tieren für NDV und FPV (Swayne et al. 2000a) gezeigt, dass die Wirksamkeit gegenüber naiven Tieren reduziert ist, so dass entsprechende Rekombinanten eher für den prophylaktischen Einsatz in naiven Tieren geeignet scheinen oder mehrfach immunisiert werden muss, was in der Praxis üblich ist.

Zusätzlich wurde nach NDV-Immunisierung neben der Induktion einer humoralen IgG-Immunantwort, auch die Induktion mukosaler IgA gezeigt (Jayawardane und Spradbrow 1995), was für die Abwehr von Erregern respiratorischer Erkrankungen einen großen Vorteil

bedeuten könnte. Prinzipiell sind HA-exprimierende NDV-Rekombinanten nicht nur für die Verwendung als Vakzine gegen HPAIV, sondern auch gegen LPAIV nutzbar. Da gegen NDV Impfpflicht besteht und die Verabreichung dieser Rekombinanten keine Beeinträchtigung der Schutzwirkung gegen NDV-Infektionen zeigte, könnten NDV-Rekombinanten als bivalente Vakzine eingesetzt und somit simultan gegen zwei bedeutsame Viruserkrankungen immunisiert werden.

6 Zusammenfassung

Aviäre Influenzavirus (AIV) Markervakzinen auf Basis des Newcastle Disease Virus (NDV) als Vektor: Herstellung, Charakterisierung und Prüfung einer AIV H9 Hämagglutinin (HA)-exprimierenden NDV-Rekombinante gegen niedrigpathogenes AIV, sowie Prüfung H5 bzw. N1 Neuraminidase-exprimierender NDV-Rekombinanten gegen hochpathogenes AIV

Die Entwicklung bzw. Testung von NDV-AIV Rekombinanten war Gegenstand dieser Arbeit. Mittels reverser Genetik wurde der H9-ORF des LPAIV Stammes A/turkey/Wisconsin/1/66 (H9N2) in die intergene Region zwischen F- und HN-Gen des NDV Clone 30-Genoms inseriert und infektiöses Virus generiert. Die Insertion der zusätzlichen Transkriptionseinheit führte zu einer verzögerten Replikation, wobei aber zum parentalen Virus vergleichbare Endtiter erreicht wurden. Die Fremdgenexpression wurde mittels indirekten Immunfluoreszenz-Tests (IFT), Western Blot-Analyse (WB) und Radioimmunpräzipitationsanalyse (RIP) nachgewiesen. Die Fremdgeninsertion blieb nach 10-maliger Passage im Ei erhalten.

Eine Steigerung der Virulenz durch die zusätzliche Expression des H9 Proteins in NDV konnte weder im ICPI noch nach Immunisierung von SPF-Hühnern und Puten festgestellt werden. Eine einmalige Immunisierung mit der H9-exprimierenden NDV-Rekombinante induzierte in SPF-Hühnern Schutz gegen eine letale Infektion mit velogenem NDV und reduzierte die Ausscheidung des Virus gegenüber nicht-immunisierten Kontrolltieren. In Puten induzierte eine einmalige Immunisierung mit NDV-H9 einen partiellen Schutz gegen klinische Erkrankungen, reduzierte die Ausscheidung des Virus gegenüber Kontrolltieren jedoch nicht signifikant.

Nach einmaliger Immunisierung mit NDV-H9 konnten weder in SPF-Hühnern, noch in Puten H9-spezifische Antikörper detektiert werden, so dass kein Schutz gegen klinische Erkrankungen nach einer Infektion mit einer maximalen Dosis AIV A/turkey/Wisconsin/1/66 (H9N2) induziert wurde. Das klinische Bild wie auch die Ausscheidung des Virus differierten zwar nach Belastungsinfektion von immunisierten und AIV-naiven SPF-Hühnern und Puten, jedoch waren nur wenige Unterschiede auch signifikant.

Ferner wurden in dieser Arbeit AIV Hämagglutinin- oder Neuraminidase-exprimierende NDV-Rekombinanten nach einmaliger Immunisierung auf ihre Schutzwirkung gegen HPAIV-Infektionen vom Subtyp H5 untersucht. Die mit einer N1-exprimierenden NDV-Rekombinante immunisierten Tiere zeigten gegenüber den Kontrollen eine verlängerte Überlebenszeit nach Infektion mit HPAIV H5N1, was auf eine Beteiligung des Neuraminidase-Proteins an einer schützenden Immunität hindeutet.

NDV-Rekombinanten, die entweder HPAIV H5 (NDV-H5) oder durch Deletion basischer Aminosäuren modifiziertes H5 (NDV-H5LP) exprimieren bzw. H5 und N1 ko-exprimieren, (NDV-H5N1) wurden auf ihre Schutzwirkung gegen Infektion mit dem homologen (AIV A/whooper swan/Germany/R65/06 (H5N1)), oder heterologen AIV-H5 Stämmen (A/duck/Vietnam/TG24-01/05 (H5N1); A/chicken/Italy/8/98 (H5N2)) überprüft. Eine einmalige Immunisierung mit einer der drei Rekombinanten induzierte in SPF-Hühnern Schutz gegen klinische Erkrankungen nach einer letalen Infektion mit homologen HPAIV H5N1 und verhinderte die Ausscheidung des Virus. Nach Infektion mit heterologem HPAIV H5N1 trat bei allen immunisierten Tieren eine gegenüber den naiven Kontrollen deutlich reduzierte klinische Symptomatik und Mortalität auf und die Ausscheidung des Virus bewegte sich im Durchschnitt auf einem niedrigen Niveau. Nach Infektion mit heterologem HPAIV H5N2 blieben alle immunisierten Tiere gesund und wiesen im Gruppendurchschnitt eine deutlich reduzierte Ausscheidung des Virus nahe des Detektionslimits auf, während die Kontrolltiere eine hohe Virusgenomlast ausschieden und 90 % verstarben.

Die Rekombinanten NDV-H5, NDV-H5LP, sowie NDV-H5N1 zeigten damit eine gute Schutzwirkung sowohl gegen homologe, als auch gegen heterologe Belastungsinfektion mit HPAIV H5. Dabei unterschieden sich die drei Rekombinanten in ihrer Schutzwirkung nicht. Darüber hinaus konnten Tiere, die mit H5- bzw. N1-exprimierenden NDV-Rekombinanten immunisiert worden waren, durch die An- oder Abwesenheit AIV NP-spezifischer Antikörper von infizierten Tieren unterschieden werden.

7 Summary

Avian influenza virus (AIV) marker vaccines based on Newcastle disease virus (NDV) as a vector: development, characterisation and testing of a AIV H9 hemagglutinin (HA) expressing NDV-recombinant against low pathogenic AIV as well as testing of H5 or N1 neuraminidase-expressing NDV-recombinants against highly pathogenic AIV

The purpose of this thesis was the development and testing of NDV-AIV recombinants respectively. Using reverse genetics the H9-ORF of the LPAIV strain A/turkey/Wisconsin/1/66 (H9N2) was inserted into the intergenic region between the F and HN genes of NDV Clone 30 and an infectious virus was generated. Inserting an additional transcription unit led to a delay of replication but the final titers were comparable to the parent virus. Expression of the foreign gene was demonstrated using indirect immunofluorescence (IFT), Western blot analysis (WB) and radioimmunoprecipitation assay (RIP). The insert remained stable after ten passages in eggs.

No increase in virulence resulting from the additional expression of the H9 protein in NDV was registered, neither in the ICPI nor post immunisation of turkeys and SPF chickens. A single immunisation of SPF chickens with NDV expressing H9 induced protection against clinical symptoms after a lethal infection with velogenic NDV and reduced the excretion of the virus. A single immunisation with NDV-H9 resulted in partial protection of turkeys against clinical symptoms but virus excretion was not significantly reduced in comparison to naive animals.

However, neither in SPF chickens nor in turkeys were H9 specific antibodies detectable after immunisation. Therefore no protection against clinical symptoms after challenge infection with A/turkey/Wisconsin/1/66 (H9N2) was induced. Immunised and AIV-naive SPF chickens and turkeys displayed differences in clinical symptoms and virus excretion, but most differences were not significant.

Protective efficacy against the HPAIV H5 infection after a single immunisation with NDV expressing AIV hemagglutinin and neuraminidase was also investigated. Animals immunised with NDV expressing N1 revealed prolonged survival in comparison to the control group after challenge infection with HPAIV H5N1 indicating a contribution of N1 to protective immunity. Furthermore NDV expressing HPAIV H5 (NDV-H5) or HPAIV H5 modified by deletion of the polybasic cleavage site (NDV-H5LP), or coexpressing H5 and N1 were evaluated for their protective efficacy after challenge infection with homologous (A/whooper swan/Germany/R65/06 (H5N1)) or heterologous (A/duck/Vietnam/TG24-01/05 (H5N1); A/chicken/Italy/8/98 (H5N2)) HPAI viruses. A single immunisation of SPF chickens with either one of these recombinants induced protection against clinical signs after homologous HPAIV

challenge infection and inhibited virus excretion. After challenge infection with heterologous HPAIV H5N1 all immunised animals displayed few clinical symptoms, low mortality, and a low level of virus excretion. After challenge infection with heterologous HPAIV H5N2 all immunised animals remained healthy and the low level of virus excretion was close to the detection limit, whereas naive animals excreted high levels of viral RNA and 90 % died. The recombinants (NDV-H5, NDV-H5LP, and NDV-H5N1) thus demonstrated a high level of protection against homologous and heterologous HPAIV H5 challenges without any differences between one another. Additionally chickens immunised with NDV expressing H5 or N1 could be distinguished from infected animals by the absence of AIV NP specific antibodies.

8 **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1: schematische Darstellung der Nukleotidsequenz des ORF H9	81
Abb. 2: <i>in vitro</i> -Translation pcDNA3-H9	83
Abb. 3: Nachweis der H9 Protein-Expression in transfizierten Zellen im IFT	84
Abb. 4: Nachweis der H9 Protein-Expression in transfizierten Zellen durch WB-Analyse	85
Abb. 5: Plasmidaufbau NDV-H9.....	86
Abb. 6: <i>in ovo</i> -Wachstumskinetik der NDV-H9 Rekombinante	86
Abb. 7: Nachweis H9-spezifischer mRNA im Northern Blot	88
Abb. 8: Nachweis des H9-Proteins von NDV-H9 im IFT	89
Abb. 9: Nachweis des H9-Proteins von NDV-H9 in der WB-Analyse.....	90
Abb. 10: Nachweis des H9-Proteins von NDV-H9 in der Radioimmunpräzipitation (RIP)	90
Abb. 11: Immunelektronenmikroskopische Untersuchung zur Inkorporation des H9 Proteins in NDV-H9 Virionen	91
Abb. 12: Untersuchung zur Inkorporation des H9-Proteins in gereinigten NDV-H9 Virionen in der WB-Analyse	92
Abb. 13: Nachweis des NDV F- bzw. AIV H9-Proteins von NDV-H9 in perforierten bzw. nicht-perforierten Zellen im IFT	94
Abb. 14: Nachweis des H9-Proteins der 10. Eipassage von NDV-H9 im IFT	94
Abb. 15: Nachweis des H9-Proteins der 10. Eipassage von NDV-H9 in der WB-Analyse.....	95
Abb. 16: Gruppeneinteilung zur Prüfung der Schutzwirkung von NDV-H9 im Huhn und in der Pute	96
Abb. 17: Zeitablaufplan der Prüfung der Schutzwirkung der NDV-H9 Rekombinante im Huhn	97
Abb. 18: vRNA-Nachweis in Tupferproben nach Immunisierung mit NDV-H9 und rNDV im Huhn	98
Abb. 19: HN-spezifische AK nach Immunisierung mit NDV-H9 und rNDV im Huhn	99
Abb. 20: täglicher klinischer Index nach Infektion von Hühnern mit AIV H9N2	100
Abb. 21: AIV H9-spezifische AK nach Infektion mit AIV H9N2 im Huhn	101
Abb. 22: AIV NP-spezifische AK nach Infektion mit AIV H9N2 im Huhn	101
Abb. 23: vRNA-Nachweis in Tupferproben nach Infektion von Hühnern mit AIV H9N2 (rtRT-PCR)	103
Abb. 24: Box-Plots der ermittelten CT-Werte in Tupferproben nach AIV H9N2-Infektion von Hühnern.....	104
Abb. 25: Täglicher klinischer Index nach Infektion von Hühnern mit velogenem NDV	105
Abb. 26: HN-spezifische AK nach Infektion mit velogenem NDV in Hühnern.....	105

Abb. 27: vRNA-Nachweis in Tupferproben nach Infektion von Hühnern mit NDV (rtRT-PCR)	107
Abb. 28: Box-Plots der ermittelten CT-Werte nach NDV-Infektion von Hühnern	108
Abb. 29: Zeitablaufplan der Prüfung der NDV-H9 Rekombinante in Puten.....	111
Abb. 30: vRNA-Nachweis in Tupferproben nach Immunisierung mit NDV-H9 und rNDV in Puten	112
Abb. 31: HN-spezifische AK nach Immunisierung mit NDV-H9 und rNDV in Puten	113
Abb. 32: täglicher klinischer Index nach Infektion von Puten mit AIV H9N2	114
Abb. 33: AIV H9-spezifische Antikörper nach Infektion mit AIV H9N2 in Puten.....	115
Abb. 34: AIV NP-spezifische Antikörper nach Infektion mit AIV H9N2 in Puten	115
Abb. 35: vRNA-Nachweis in Tupferproben nach Infektion von Puten mit AIV H9N2 (rtRT-PCR)	117
Abb. 36: Box-Plots der ermittelten CT-Werte in Tupferproben nach AIV H9N2-Infektion von Puten	118
Abb. 37: täglicher klinischer Index nach Infektion von Puten mit velogenem NDV	119
Abb. 38: HN-spezifische AK nach Infektion mit velogenem NDV in Puten	120
Abb. 39: vRNA-Nachweis in Tupferproben nach Infektion von Puten mit NDV (rtRT-PCR)	121
Abb. 40: Genomaufbau der NDV-N1 Rekombinante	124
Abb. 41: Nachweis des N1-Proteins von NDV-N1 im IFT	124
Abb. 42: Nachweis des N1 Proteins von NDV-N1 in der WB-Analyse.....	125
Abb. 43: Zeitablaufplan der Prüfung der NDV-N1 Rekombinante im Huhn	126
Abb. 44: AIV N1-spezifische AK nach Immunisierung mit NDV-N1	127
Abb. 45: HN-spezifische AK nach Immunisierung mit NDV-N1	127
Abb. 46: täglicher klinischer Index nach Infektion mit AIV H5N1	128
Abb. 47: vRNA-Nachweis in Tupferproben nach Infektion von Hühnern mit HPAIV H5N1 (rtRT-PCR)	129
Abb. 48: Genomaufbau von NDV-H5LP, NDV-H5 und NDV-H5N1	131
Abb. 49: Nachweis des H5- bzw. N1-Proteins von NDV-H5LP, NDV-H5 bzw. NDV-H5N1 in der WB-Analyse.....	132
Abb. 50: Aufbau der Prüfung von NDV-H5LP, NDV-H5 und NDV-H5N1	133
Abb. 51: Zeitablaufplan der Prüfung von NDV-H5LP, NDV-H5 und NDV-H5N1.....	134
Abb. 52: AIV H5-spez. AK nach Immunisierung mit NDV-H5LP, NDV-H5 und NDV-H5N1.	135
Abb. 53: AIV N1-spez. AK nach Immunisierung mit NDV-H5N1.....	136
Abb. 54: HN-spez. AK nach Immunisierung mit NDV-H5LP, NDV-H5 und NDV-H5N1.....	136
Abb. 55: tägl. klin. Index nach HPAIV A/whooper swan/Germany/R65/06 (H5N1)-Infektion	137

Abb. 56: AIV H5-spez. AK nach Infektion mit HPAIV A/whooper swan/Germany/R65/06 (H5N1)	138
Abb. 57: AIV NP-spez. AK nach Infektion mit HPAIV A/whooper swan/Germany/R65/06 (H5N1)	138
Abb. 58: vRNA-Nachweis in Tupfern nach homologer HPAIV H5N1-Infektion (rtRT-PCR) .	140
Abb. 59: tägl. klin. Index nach HPAIV A/duck/Vietnam/TG24-01/05 (H5N1)-Infektion.....	141
Abb. 60: AIV H5-spez. AK nach Infektion mit HPAIV A/duck/Vietnam/TG24-01/05 (H5N1)	142
Abb. 61: AIV NP-spez. AK nach Infektion mit HPAIV A/duck/Vietnam/TG24-01/05 (H5N1)	143
Abb. 62: vRNA-Nachweis in Tupfern nach heterologer HPAIV H5N1-Infektion (rtRT-PCR)	144
Abb. 63: Box-Plots der ermittelten CT-Werte nach HPAIV A/duck/Vietnam/TG24-01/05 (H5N1)-Infektion	145
Abb. 64: tägl. klin. Index nach HPAIV A/chicken/Italy/8/98 (H5N2)-Infektion.....	146
Abb. 65: AIV H5-spez. AK nach Infektion mit HPAIV A/chicken/Italy/8/98 (H5N2)	147
Abb. 66: AIV NP-spez. AK nach Infektion mit HPAIV A/chicken/Italy/8/98 (H5N2).....	147
Abb. 67: vRNA-Nachweis in Tupfern nach heterologer HPAIV H5N2-Infektion (rtRT-PCR)	149
Abb. 68: Box-Plots der ermittelten CT-Werte nach HPAIV A/chicken/Italy/8/98 (H5N2)-Infektion	150
Abb. 69: Ergebnisübersicht: Schutzwirkung von NDV-H5LP, NDV-H5 und NDV-H5N1 gegen HPAIV H5N1 (homolog und heterolog) und HPAIV H5N2	153

9 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Die Symptomenkomplexe der Aviären Influenza und zugeordnete Symptome	20
Tab. 2: Primer.....	42
Tab. 3: modifizierte DNA-Oligonukleotide	44
Tab. 4: Primer zur Analyse des ORF H9.....	82
Tab. 5: Ergebnisübersicht: Schutzwirkung der NDV-H9-Rekombinante im Huhn.....	110
Tab. 6: Ergebnisübersicht: Schutzwirkung der NDV-H9 Rekombinante in der Pute.....	123
Tab. 7: Ergebnisübersicht: Schutzwirkung der NDV-N1 Rekombinante gegen HPAIV H5N1 im Huhn.....	130
Tab. 8: Ergebnisübersicht nach Immunisierung mit NDV-H5LP, NDV-H5 und NDV-H5N1 .	151

10 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIV	Aviäres Influenzavirus
AK	Antikörper
Amp.	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
ATV	Alsever's Trypsin Versen Lösung
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C-terminal	carboxy-terminal
CEK	chicken embryo kidney
CEF	chicken embryo fibroblast
(d)ATP	(desoxy-) Adenosintriphosphat
(d)CTP	(desoxy-) Cytosintriphosphat
(d)GTP	(desoxy-) Guanosintriphosphat
(d)TTP	(desoxy-) Thymidintriphosphat
d	Tag(e)
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat, Diethylendicarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	Doppelstrang
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-[β -aminoethylether]-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
FPV	Geflügelpockenvirus; fowl pox virus
h	Stunde
HA	Hämagglutinin, Hämagglutinationstest
HAE	hämagglutinierende Einheit

HAH	Hämagglutinations-Hemmungstest
HPAI	hochpathogene Aviäre Influenza; highly pathogenic avian influenza
IAC	Isoamylalkohol / Chloroform
IFT	Immunfluoreszenz Test
kDa	Kilodalton
klin.	Klinisch
LB	Luria-Bertani
LMH	Hühnerhepatom-Zelllinie
LPAI	niedrigpathogene Aviäre Influenza; low pathogenic avian influenza
LPNAI	meldepflichtige Aviäre Influenza; low pathogenic notifiable avian influenza
MCS	multiple cloning site
MEM	minium essential medium
min.	Minute
MOI	multiplicity of infection
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
N-terminal	amino-terminal
NB	Northern Blot
NDV	Newcastle Disease Virus
NNSV	nicht-segmentierten negativ strängigen RNA-Viren; nonsegmented negative-strand Viruses
nt.	Nukleotide
OD	optische Dichte
OIE	World Organisation for Animal Health (ehemals: Office International des Epizooties)
ORF	open reading frame; offener Leserahmen
pc	post challenge
pi	post infectionem, post immunisationem
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RIP	Radioimmunpräzipitation
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease

RNP	Ribonukleoprotein
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
rtRT-PCR	real time Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat, (Sodium Dodecyl Sulfate)
spez.	spezifisch
SPF	spezifisch pathogenfrei
Syn	Synonym
Tab.	Tabelle
tägl.	täglich
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
vRNA	virale Ribonukleinsäure
v/v	Volumen / Volumen (volume per volume)
UV	ultraviolett
w/v	Gewicht / Volumen (weight per volume)
WB	Western Blot
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

11 Literaturverzeichnis

Abolnik, C.; Bisschop, S. P.; Gerdes, G. H.; Olivier, A. J. und Horner, R. F. (2007): Phylogenetic analysis of low-pathogenicity avian influenza H6N2 viruses from chicken outbreaks (2001-2005) suggest that they are reassortants of historic ostrich low-pathogenicity avian influenza H9N2 and H6N8 viruses, *Avian Dis.* (Band 51), Nr. 1 Suppl, Seite 279-284. URL: PM:17494567

Aldous, E. W. und Alexander, D. J. (2008): Newcastle disease in pheasants (*Phasianus colchicus*): a review, *Vet.J.* (Band 175), Nr. 2, Seite 181-185. URL: PM:17383205

Alexander, D. J. (1995): The epidemiology and control of avian influenza and Newcastle disease, *J.Comp Pathol.* (Band 112), Nr. 2, Seite 105-126. URL: PM:7769142

Alexander, D. J. (2000): A review of avian influenza in different bird species, *Vet.Microbiol.* (Band 74), Nr. 1-2, Seite 3-13. URL: PM:10799774

Alexander, D. J. (2003): Report on avian influenza in the Eastern Hemisphere during 1997-2002, *Avian Dis.* (Band 47), Nr. 3 Suppl, Seite 792-797. URL: PM:14575066

Alexander, D. J. und Gough, R. E. (2003): Newcastle disease, other avian paramyxoviruses, and pneumovirus infections, Saif, Y. M, in: *Diseases of Poultry* , 11. Auflage, Seite 63-99, Iowa State Press, Ames.

Allan, W. H. und Hebert, C. N. (1968): The precision of virus end-point determinations, *Arch.Gesamte Virusforsch.* (Band 25), Nr. 3, Seite 330-336. URL: PM:5709351

ANON (1992): Richtlinie 92/66/EWG des Rates vom 14. Juli 1992 über Gemeinschaftsmaßnahmen zur Bekämpfung der Newcastle-Krankheit, *Amtblatt der Europäischen Union* Nr. L 066 vom 03.09.1992 , Seite 1-27.

ANON (2005): Verordnung zum Schutz gegen die Geflügelpest und die Newcastle Krankheit (Geflügelpest-Verordnung). Vom 03. November 2004, *BGBl.* 2004 Teil I Nr. 57, S. 2746 vom 09. November 2004 geändert am 20.12.2005, *BGBl.* 2005 Teil I Nr. 74, S. 3499 vom 23. Dezember 2005 – Bekanntmachung der Neufassung: *BGBl.* 2005 Teil I Nr. 74, S. 3538 vom 23. Dezember 2005.

ANON (2006a): Entscheidung 2006/437/EG der Kommission vom 4. August 2006 über die Genehmigung eines Handbuchs zur Diagnose der Aviären Influenza gemäß der Richtlinie 2005/94/EG des Rates, *ABl.* Nr. 237 vom 31.08.2006 S. 1.

ANON (2006b): Richtlinie 2005/94/EG des Rates vom 20. Dezember 2005 mit Gemeinschaftsmaßnahmen zur Bekämpfung der Aviären Influenza und zur Aufhebung der Richtlinie 92/40/EWG (RL/2005/94/EG), *Amtsblatt der Europäischen Union* Nr. L 010 vom 14/01/2006 , Seite 16-65.

ANON (2007): Tierseuchengesetz (TierSG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 22. Juni 2004 (*BGBl.* I S. 1260; 3588), das zuletzt durch Artikel 1 § 5 Absatz 3 des Gesetzes vom 13. Dezember 2007 (*BGBl.* I S. 2930) geändert worden ist.

ANON (2009a): Geflügelpest-Verordnung (GefIPestSchV) vom 18. Oktober 2007 (BGBl. I S. 2348), die zuletzt durch Artikel 6 der Verordnung vom 6. April 2009 (BGBl. I S. 749) geändert worden ist.

ANON (2009b): Tierimpfstoff-Verordnung (TierImpfStV) vom 24. Oktober 2006 (BGBl. I S. 2355), die zuletzt durch Artikel 14 des Gesetzes vom 17. Juli 2009 (BGBl. I S. 1990) geändert worden ist.

ANON (2009c): Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen (TierSeuchAnzV) in der Fassung der Bekanntmachung vom 3. November 2004 (BGBl. I S. 2764), die zuletzt durch Artikel 3 der Verordnung vom 6. April 2009 (BGBl. I S. 752) geändert worden ist.

Banet-Noach, C.; Perk, S.; Simanov, L.; Grebenyuk, N.; Rozenblut, E.; Pokamunski, S.; Pirak, M.; Tendler, Y. und Panshin, A. (2007): H9N2 influenza viruses from Israeli poultry: a five-year outbreak, *Avian Dis.* (Band 51), Nr. 1 Suppl, Seite 290-296. URL: PM:17494569

Belshe, R. B.; Gruber, W. C.; Mendelman, P. M.; Mehta, H. B.; Mahmood, K.; Reisinger, K.; Treanor, J.; Zangwill, K.; Hayden, F. G.; Bernstein, D. I.; Kotloff, K.; King, J.; Piedra, P. A.; Block, S. L.; Yan, L. und Wolff, M. (2000): Correlates of immune protection induced by live, attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenza virus vaccine, *J.Infect.Dis.* (Band 181), Nr. 3, Seite 1133-1137. URL: PM:10720541

Ben-Yedidia, T. und Arnon, R. (2005): Towards an epitope-based human vaccine for influenza, *Hum.Vaccin.* (Band 1), Nr. 3, Seite 95-101. URL: PM:17012851

Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic Acids Res.* (Band 7), Nr. 6, Seite 1513-1523. URL: PM:388356

Brown, C.; King, D. J. und Seal, B. (1999a): Detection of a macrophage-specific antigen and the production of interferon gamma in chickens infected with Newcastle disease virus, *Avian Dis.* (Band 43), Nr. 4, Seite 696-703. URL: PM:10611986

Brown, C.; King, D. J. und Seal, B. S. (1999b): Pathogenesis of Newcastle disease in chickens experimentally infected with viruses of different virulence, *Vet.Pathol* (Band 36), Nr. 2, Seite 125-132. URL: PM:10098640

Brown, C. C.; King, D. J. und Seal, B. S. (1999c): Comparison of pathology-based techniques for detection of viscerotropic velogenic Newcastle disease virus in chickens, *J.Comp Pathol* (Band 120), Nr. 4, Seite 383-389. URL: PM:10208734

Brown, D. W.; Kawaoka, Y.; Webster, R. G. und Robinson, H. L. (1992): Assessment of retrovirus-expressed nucleoprotein as a vaccine against lethal influenza virus infections of chickens, *Avian Dis.* (Band 36), Nr. 3, Seite 515-520. URL: PM:1329705

Brown, I. H.; Banks, J.; Manvell, R. J.; Essen, S. C.; Shell, W.; Slomka, M.; Londt, B. und Alexander, D. J. (2006): Recent epidemiology and ecology of influenza A viruses in avian species in Europe and the Middle East, *Dev.Biol.(Basel)* (Band 124), Seite 45-50. URL: PM:16447493

Bublott, M.; Pritchard, N.; Swayne, D. E.; Selleck, P.; Karaca, K.; Suarez, D. L.; Audonnet, J. C. und Mickle, T. R. (2006): Development and use of fowlpox vectored vaccines for avian influenza, *Ann.N.Y.Acad.Sci.* (Band 1081), Seite 193-201. URL: PM:17135511

Buchholz, U. J.; Finke, S. und Conzelmann, K. K. (1999): Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter, *J.Virol.* (Band 73), Nr. 1, Seite 251-259. URL: PM:9847328

Bukreyev, A.; Skiadopoulos, M. H.; Murphy, B. R. und Collins, P. L. (2006): Nonsegmented negative-strand viruses as vaccine vectors, *J.Virol.* (Band 80), Nr. 21, Seite 10293-10306. URL: PM:17041210

Burnette, W. N. (1981): "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A, *Anal.Biochem.* (Band 112), Nr. 2, Seite 195-203. URL: PM:6266278

Butt, K. M.; Smith, G. J.; Chen, H.; Zhang, L. J.; Leung, Y. H.; Xu, K. M.; Lim, W.; Webster, R. G.; Yuen, K. Y.; Peiris, J. S. und Guan, Y. (2005): Human infection with an avian H9N2 influenza A virus in Hong Kong in 2003, *J.Clin.Microbiol.* (Band 43), Nr. 11, Seite 5760-5767. URL: PM:16272514

Cameron, K. R.; Gregory, V.; Banks, J.; Brown, I. H.; Alexander, D. J.; Hay, A. J. und Lin, Y. P. (2000): H9N2 subtype influenza A viruses in poultry in pakistan are closely related to the H9N2 viruses responsible for human infection in Hong Kong, *Virology* (Band 278), Nr. 1, Seite 36-41. URL: PM:11112478

Capua, I.; Terregino, C.; Cattoli, G.; Mutinelli, F. und Rodriguez, J. F. (2003): Development of a DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) strategy using a vaccine containing a heterologous neuraminidase for the control of avian influenza, *Avian Pathol* (Band 32), Nr. 1, Seite 47-55. URL: PM:12745380

Centanni, E. und Savonuzzi, E. (1901): La peste aviara I & II, Comunicazione fatta all'accademia delle scienze mediche e naturali de Ferrara.

Chambers, P.; Millar, N. S. und Emmerson, P. T. (1986): Nucleotide sequence of the gene encoding the fusion glycoprotein of Newcastle disease virus, *J.Gen.Virol.* (Band 67 (Pt 12)), Seite 2685-2694. URL: PM:3025345

Chambers, P. und Samson, A. C. (1982): Non-structural proteins in Newcastle disease virus-infected cells, *J.Gen.Virol.* (Band 58 Pt 1), Seite 1-12. URL: PM:7142963

Chatis, P. A. und Morrison, T. G. (1982): Fatty acid modification of Newcastle disease virus glycoproteins, *J.Virol.* (Band 43), Nr. 1, Seite 342-347. URL: PM:7109029

Chen, S. C.; Jones, D. H.; Fynan, E. F.; Farrar, G. H.; Clegg, J. C.; Greenberg, H. B. und Herrmann, J. E. (1998): Protective immunity induced by oral immunization with a rotavirus DNA vaccine encapsulated in microparticles, *J.Virol.* (Band 72), Nr. 7, Seite 5757-5761. URL: PM:9621034

Chen, Z. und Krug, R. M. (2000): Selective nuclear export of viral mRNAs in influenza-virus-infected cells, *Trends Microbiol.* (Band 8), Nr. 8, Seite 376-383. URL: PM:10920397

Cherbonnel, M.; Rousset, J. und Jestin, V. (2003): Strategies to improve protection against low-pathogenicity H7 avian influenza virus infection using DNA vaccines, *Avian Dis.* (Band 47), Nr. 3 Suppl, Seite 1181-1186. URL: PM:14575138

Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal.Biochem.* (Band 162), Nr. 1, Seite 156-159. URL: PM:2440339

Collins, M. S.; Bashiruddin, J. B. und Alexander, D. J. (1993): Deduced amino acid sequences at the fusion protein cleavage site of Newcastle disease viruses showing variation in antigenicity and pathogenicity, *Arch.Virol.* (Band 128), Nr. 3-4, Seite 363-370. URL: PM:8435046

Conzelmann, K. K. (2004): Reverse Genetics of Mononegavirales, Kawaoka, Y., in: *Biology of negative strand RNA viruses: the power of reverse genetics*, Seite 1-41, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, ISBN: 3-540-40661-1.

Conzelmann, K. K. und Meyers, G. (1996): Genetic engineering of animal RNA viruses, *Trends Microbiol.* (Band 4), Nr. 10, Seite 386-393. URL: PM:8899964

Couceiro, J. N.; Paulson, J. C. und Baum, L. G. (1993): Influenza virus strains selectively recognize sialyloligosaccharides on human respiratory epithelium; the role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity, *Virus Res.* (Band 29), Nr. 2, Seite 155-165. URL: PM:8212857

Crawford, J.; Wilkinson, B.; Vosnesensky, A.; Smith, G.; Garcia, M.; Stone, H. und Perdue, M. L. (1999): Baculovirus-derived hemagglutinin vaccines protect against lethal influenza infections by avian H5 and H7 subtypes, *Vaccine* (Band 17), Nr. 18, Seite 2265-2274. URL: PM:10403594

Darji, A.; Zur Lage, S.; Garbe, A. I.; Chakraborty, T. und Weiss, S. (2000): Oral delivery of DNA vaccines using attenuated *Salmonella typhimurium* as carrier, *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* (Band 27), Nr. 4, Seite 341-349. URL: PM:10727890

De Filette, M.; Min, J. W.; Birkett, A.; Lyons, K.; Schultz, B.; Tonkyro, A.; Resch, S. und Fiers, W. (2005): Universal influenza A vaccine: optimization of M2-based constructs, *Virology* (Band 337), Nr. 1, Seite 149-161. URL: PM:15914228

Doms, R. W.; Lamb, R. A.; Rose, J. K. und Helenius, A. (1993): Folding and assembly of viral membrane proteins, *Virology* (Band 193), Nr. 2, Seite 545-562. URL: PM:8460475

Doyle, T. M. (1927): A hitherto unrecorded disease of fowls due to a filterpassing virus, *J.Comp.Pathol.*, Nr. 40, Seite 144-169.

Dugaiczyk, A.; Boyer, H. W. und Goodman, H. M. (1975): Ligation of EcoRI endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures, *J.Mol.Biol.* (Band 96), Nr. 1, Seite 171-184. URL: PM:169355

- Eickbush, T. H. und Moudrianakis, E. N. (1978): The compaction of DNA helices into either continuous supercoils or folded-fiber rods and toroids, *Cell* (Band 13), Nr. 2, Seite 295-306. URL: PM:203402
- Flint, S. J.; Enquist, L. W.; Racaniello, V. R. und Skalka, A. M. (2009): *Principles of Virology*, 3. Auflage, American Society for Microbiology Press, Washington, DC., ISBN: 978-1-55581-479-3.
- Flynn, K. J.; Belz, G. T.; Altman, J. D.; Ahmed, R.; Woodland, D. L. und Doherty, P. C. (1998): Virus-specific CD8+ T cells in primary and secondary influenza pneumonia, *Immunity*. (Band 8), Nr. 6, Seite 683-691. URL: PM:9655482
- Fouchier, R. A.; Munster, V.; Wallensten, A.; Bestebroer, T. M.; Herfst, S.; Smith, D.; Rimmelzwaan, G. F.; Olsen, B. und Osterhaus, A. D. (2005): Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls, *J.Virol.* (Band 79), Nr. 5, Seite 2814-2822. URL: PM:15709000
- Fry, C. S. und Wilkinson, A. E. (1963): A note on the use of Evans blue as a background stain in the fluorescent Treponemal Antibody test, *Br.J.Vener.Dis.* (Band 39), Seite 190-191. URL: PM:14066173
- Fuchs, W.; Römer-Oberdörfer, A.; Veits, J. und Mettenleiter, T. C. (2009): Novel avian influenza virus vaccines, *Rev.Sci.Tech.* (Band 28), Nr. 1, Seite 319-332. URL: PM:19618635
- Fuchs, W.; Veits, J.; Helferich, D.; Granzow, H.; Teifke, J. P. und Mettenleiter, T. C. (2007): Molecular biology of avian infectious laryngotracheitis virus, *Vet.Res.* (Band 38), Nr. 2, Seite 261-279. URL: PM:17296156
- Fuchs, W.; Veits, J. und Mettenleiter, T. C. (2006): Recombinant viruses of poultry as vector vaccines against fowl plague, *Berl Munch.Tierarztl.Wochenschr.* (Band 119), Nr. 3-4, Seite 160-166. URL: PM:16573206
- Fürst, T. R.; Niles, E. G.; Studier, F. W. und Moss, B. (1986): Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 83), Nr. 21, Seite 8122-8126. URL: PM:3095828
- Fynan, E. F.; Robinson, H. L. und Webster, R. G. (1993): Use of DNA encoding influenza hemagglutinin as an avian influenza vaccine, *DNA Cell Biol.* (Band 12), Nr. 9, Seite 785-789. URL: PM:8216849
- Gallichan, W. S. und Rosenthal, K. L. (1996): Long-lived cytotoxic T lymphocyte memory in mucosal tissues after mucosal but not systemic immunization, *J.Exp.Med.* (Band 184), Nr. 5, Seite 1879-1890. URL: PM:8920875
- Gao, W.; Soloff, A. C.; Lu, X.; Montecalvo, A.; Nguyen, D. C.; Matsuoka, Y.; Robbins, P. D.; Swayne, D. E.; Donis, R. O.; Katz, J. M.; Barratt-Boyes, S. M. und Gambotto, A. (2006): Protection of mice and poultry from lethal H5N1 avian influenza virus through adenovirus-based immunization, *J.Virol.* (Band 80), Nr. 4, Seite 1959-1964. URL: PM:16439551

Garcia-Sastre, A. (2001): Inhibition of interferon-mediated antiviral responses by influenza A viruses and other negative-strand RNA viruses, *Virology* (Band 279), Nr. 2, Seite 375-384. URL: PM:11162793

Ge, J.; Deng, G.; Wen, Z.; Tian, G.; Wang, Y.; Shi, J.; Wang, X.; Li, Y.; Hu, S.; Jiang, Y.; Yang, C.; Yu, K.; Bu, Z. und Chen, H. (2007): Newcastle disease virus-based live attenuated vaccine completely protects chickens and mice from lethal challenge of homologous and heterologous H5N1 avian influenza viruses, *J.Virol.* (Band 81), Nr. 1, Seite 150-158. URL: PM:17050610

Geiduschek, E. P. und Gray, I. (1956): Non-aqueous solutions of sodium deoxyribose-nucleate, *J.Am.Chem.Soc.* (Band 78), Seite 879-880.

Giuffre, R. M.; Tovell, D. R.; Kay, C. M. und Tyrrell, D. L. (1982): Evidence for an interaction between the membrane protein of a paramyxovirus and actin, *J.Virol.* (Band 42), Nr. 3, Seite 963-968. URL: PM:6285006

Gohm, D. S.; Thur, B. und Hofmann, M. A. (2000): Detection of Newcastle disease virus in organs and faeces of experimentally infected chickens using RT-PCR, *Avian Pathol* (Band 29), Nr. 2, Seite 143-152. URL: PM:19184800

Gotoh, B.; Ogasawara, T.; Toyoda, T.; Inocencio, N. M.; Hamaguchi, M. und Nagai, Y. (1990): An endoprotease homologous to the blood clotting factor X as a determinant of viral tropism in chick embryo, *EMBO J.* (Band 9), Nr. 12, Seite 4189-4195. URL: PM:2174359

Gotoh, B.; Yamauchi, F.; Ogasawara, T. und Nagai, Y. (1992): Isolation of factor Xa from chick embryo as the amniotic endoprotease responsible for paramyxovirus activation, *FEBS Lett.* (Band 296), Nr. 3, Seite 274-278. URL: PM:1537403

Guo, Y.; Li, J. und Cheng, X. (1999): Discovery of men infected by avian influenza A (H9N2) virus, *Zhonghua Shi Yan.He.Lin.Chuang.Bing.Du Xue.Za Zhi.* (Band 13), Nr. 2, Seite 105-108. URL: PM:12569771

Hafez, M. H. und Jodas, S. (1997): *Putenkrankheiten*, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, ISBN: 978-3432291611.

Hamaguchi, M.; Nishikawa, K.; Toyoda, T.; Yoshida, T.; Hanaichi, T. und Nagai, Y. (1985): Transcriptive complex of Newcastle disease virus. II. Structural and functional assembly associated with the cytoskeletal framework, *Virology* (Band 147), Nr. 2, Seite 295-308. URL: PM:3907120

Hamaguchi, M.; Yoshida, T.; Nishikawa, K.; Naruse, H. und Nagai, Y. (1983): Transcriptive complex of Newcastle disease virus. I. Both L and P proteins are required to constitute an active complex, *Virology* (Band 128), Nr. 1, Seite 105-117. URL: PM:6683907

Hanahan, D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *J.Mol.Biol.* (Band 166), Nr. 4, Seite 557-580. URL: PM:6345791

Helenius, A. (1994): How N-linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum, *Mol.Biol.Cell* (Band 5), Nr. 3, Seite 253-265. URL: PM:8049518

Helling, R. B.; Goodman, H. M. und Boyer, H. W. (1974): Analysis of endonuclease R-EcoRI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis, *J.Virol.* (Band 14), Nr. 5, Seite 1235-1244. URL: PM:4372397

Higgins, D. A. (1996): Comparative Immunology of Avian Species, Davison, T. F.; Morris, T. R. und Payne, L. N., in: *Poultry immunology* (Band 24), Seite 149-205, Carfax Publishing Company, Oxford, ISBN: 0902879707.

Hoffmann, B.; Beer, M.; Schelp, C.; Schirrmeyer, H. und Depner, K. (2005): Validation of a real-time RT-PCR assay for sensitive and specific detection of classical swine fever, *J.Virol.Methods* (Band 130), Nr. 1-2, Seite 36-44. URL: PM:16055202

Homme, P. J. und Easterday, B. C. (1970a): Avian influenza virus infections. I. Characteristics of influenza A-turkey-Wisconsin-1966 virus, *Avian Dis.* (Band 14), Nr. 1, Seite 66-74. URL: PM:4314007

Homme, P. J. und Easterday, B. C. (1970b): Avian influenza virus infections. III. Antibody response by turkeys to influenza A-turkey-Wisconsin-1966 virus, *Avian Dis.* (Band 14), Nr. 2, Seite 277-284. URL: PM:5427234

Homme, P. J. und Easterday, B. C. (1970c): Avian influenza virus infections. IV. Response of pheasants, ducks, and geese to influenza A-turkey-Wisconsin-1966 virus, *Avian Dis.* (Band 14), Nr. 2, Seite 285-290. URL: PM:5427235

Homme, P. J.; Easterday, B. C. und Anderson, D. P. (1970): Avian influenza virus infections. II. Experimental epizootiology of influenza A-turkey-Wisconsin-1966 virus in turkeys, *Avian Dis.* (Band 14), Nr. 2, Seite 240-247. URL: PM:5427232

Horimoto, T. und Kawaoka, Y. (2005): Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents, *Nat.Rev.Microbiol.* (Band 3), Nr. 8, Seite 591-600. URL: PM:16064053

Huang, Z.; Elankumaran, S.; Panda, A. und Samal, S. K. (2003a): Recombinant Newcastle disease virus as a vaccine vector, *Poult.Sci.* (Band 82), Nr. 6, Seite 899-906. URL: PM:12817444

Huang, Z.; Krishnamurthy, S.; Panda, A. und Samal, S. K. (2003b): Newcastle disease virus V protein is associated with viral pathogenesis and functions as an alpha interferon antagonist, *J.Virol.* (Band 77), Nr. 16, Seite 8676-8685. URL: PM:12885886

ICTVdB Management (2006): 01.048.1. Paramyxovirinae, Büchen-Osmond, C. Ed, In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, Version 4. Auflage, Columbia University, New York, USA.

Jansen, T.; Hofmans, M. P.; Theelen, M. J.; Manders, F. und Schijns, V. E. (2006): Structure- and oil type-based efficacy of emulsion adjuvants, *Vaccine* (Band 24), Nr. 26, Seite 5400-5405. URL: PM:16675072

Jansen, T.; Hofmans, M. P.; Theelen, M. J. und Schijns, V. E. (2005): Structure-activity relations of water-in-oil vaccine formulations and induced antigen-specific antibody responses, *Vaccine* (Band 23), Nr. 8, Seite 1053-1060. URL: PM:15620479

Jayawardane, G. W. und Spradbrow, P. B. (1995): Mucosal immunity in chickens vaccinated with the V4 strain of Newcastle disease virus, *Vet.Microbiol.* (Band 46), Nr. 1-3, Seite 69-77. URL: PM:8545981

Jiang, Y.; Yu, K.; Zhang, H.; Zhang, P.; Li, C.; Tian, G.; Li, Y.; Wang, X.; Ge, J.; Bu, Z. und Chen, H. (2007): Enhanced protective efficacy of H5 subtype avian influenza DNA vaccine with codon optimized HA gene in a pCAGGS plasmid vector, *Antiviral Res.* (Band 75), Nr. 3, Seite 234-241. URL: PM:17451817

Johansson, B. E.; Bucher, D. J. und Kilbourne, E. D. (1989): Purified influenza virus hemagglutinin and neuraminidase are equivalent in stimulation of antibody response but induce contrasting types of immunity to infection, *J.Virol.* (Band 63), Nr. 3, Seite 1239-1246. URL: PM:2915381

Johansson, B. E.; Pokorny, B. A. und Tiso, V. A. (2002): Supplementation of conventional trivalent influenza vaccine with purified viral N1 and N2 neuraminidases induces a balanced immune response without antigenic competition, *Vaccine* (Band 20), Nr. 11-12, Seite 1670-1674. URL: PM:11858877

Jorgensen, P. H.; Handberg, K. J.; Ahrens, P.; Hansen, H. C.; Manvell, R. J. und Alexander, D. J. (1999): An outbreak of Newcastle disease in free-living pheasants (*Phasianus colchicus*), *Zentralbl.Veterinarmed.B* (Band 46), Nr. 6, Seite 381-387. URL: PM:10481621

Kaerber, G. (1931): Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche, *Arch.exp.Pathol.Pharmakol.* Nr. 162, Seite 480.

Kaleta, E. F. (1992): Newcastle Krankheit, Heider, G.; Monreal, G. und Mészáros, J., in: *Krankheiten des Wirtschaftsgeflügels* (Band 1), Seite 590-624, Fischer Verlag, Jena, Stuttgart.

Kaleta, E. F.; Hergarten, G. und Yilmaz, A. (2005): Avian influenza A viruses in birds --an ecological, ornithological and virological view, *Dtsch.Tierarztl.Wochenschr.* (Band 112), Nr. 12, Seite 448-456. URL: PM:16425630

Kalhor, N. H.; Veits, J.; Rautenschlein, S. und Zimmer, G. (2009): A recombinant vesicular stomatitis virus replicon vaccine protects chickens from highly pathogenic avian influenza virus (H7N1), *Vaccine* (Band 27), Nr. 8, Seite 1174-1183. URL: PM:19135116

Kawaguchi, T.; Nomura, K.; Hirayama, Y. und Kitagawa, T. (1987): Establishment and characterization of a chicken hepatocellular carcinoma cell line, LMH, *Cancer Res.* (Band 47), Nr. 16, Seite 4460-4464. URL: PM:3607775

Kessler, S. W. (1975): Rapid isolation of antigens from cells with a staphylococcal protein A-antibody adsorbent: parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein A, *J.Immunol.* (Band 115), Nr. 6, Seite 1617-1624. URL: PM:1102604

- Kirby, K. S. (1956): A new method for the isolation of ribonucleic acids from mammalian tissues, *Biochem.J.* (Band 64), Nr. 3, Seite 405-408. URL: PM:13373784
- Kishida, N.; Sakoda, Y.; Eto, M.; Sunaga, Y. und Kida, H. (2004): Co-infection of *Staphylococcus aureus* or *Haemophilus paragallinarum* exacerbates H9N2 influenza A virus infection in chickens, *Arch.Virol.* (Band 149), Nr. 11, Seite 2095-2104. URL: PM:15503199
- Klenk, H. D. und Garten, W. (1994): Host cell proteases controlling virus pathogenicity, *Trends Microbiol.* (Band 2), Nr. 2, Seite 39-43. URL: PM:8162439
- Kodihalli, S.; Haynes, J. R.; Robinson, H. L. und Webster, R. G. (1997): Cross-protection among lethal H5N2 influenza viruses induced by DNA vaccine to the hemagglutinin, *J.Virol.* (Band 71), Nr. 5, Seite 3391-3396. URL: PM:9094608
- Kolakofsky, D.; Pelet, T.; Garcin, D.; Hausmann, S.; Curran, J. und Roux, L. (1998): Paramyxovirus RNA synthesis and the requirement for hexamer genome length: the rule of six revisited, *J.Virol.* (Band 72), Nr. 2, Seite 891-899. URL: PM:9444980
- Kommers, G. D.; King, D. J.; Seal, B. S. und Brown, C. C. (2003): Virulence of six heterogeneous-origin Newcastle disease virus isolates before and after sequential passages in domestic chickens, *Avian Pathol* (Band 32), Nr. 1, Seite 81-93. URL: PM:12745384
- Kozak, M. (1987): An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs, *Nucleic Acids Res.* (Band 15), Nr. 20, Seite 8125-8148. URL: PM:3313277
- Krishnamurthy, S.; Huang, Z. und Samal, S. K. (2000): Recovery of a virulent strain of newcastle disease virus from cloned cDNA: expression of a foreign gene results in growth retardation and attenuation, *Virology* (Band 278), Nr. 1, Seite 168-182. URL: PM:11112492
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* (Band 227), Nr. 5259, Seite 680-685. URL: PM:5432063
- Lamb, R. A. (2008): Influenza, Mahy, B. W. J. und van Regenmortel, M. H. V., in: *Encyclopedia of Virology*, 3. Auflage, Seite 95-104, Elsevier Ltd., Amsterdam, ISBN: 978-0-12-374410-4.
- Lamb, R. A. und Parks, G. D. (2006): Paramyxoviridae: The Viruses and Their Replication, Knipe, D. M. und Howley, P. M., in: *Fields Virology* (Band 2), 5. Auflage, Seite 1449-1496, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Philadelphia, ISBN: 978-0781760607.
- Le Gall-Recule, G.; Cherbonnel, M.; Pelotte, N.; Blanchard, P.; Morin, Y. und Jestin, V. (2007): Importance of a prime-boost DNA/protein vaccination to protect chickens against low-pathogenic H7 avian influenza infection, *Avian Dis.* (Band 51), Nr. 1 Suppl, Seite 490-494. URL: PM:17494616
- Le Pecq, J. B. und Paoletti, C. (1966): A new fluorometric method for RNA and DNA determination, *Anal.Biochem.* (Band 17), Nr. 1, Seite 100-107. URL: PM:6008008

- Li, K. S.; Xu, K. M.; Peiris, J. S.; Poon, L. L.; Yu, K. Z.; Yuen, K. Y.; Shortridge, K. F.; Webster, R. G. und Guan, Y. (2003): Characterization of H9 subtype influenza viruses from the ducks of southern China: a candidate for the next influenza pandemic in humans?, *J.Virol.* (Band 77), Nr. 12, Seite 6988-6994. URL: PM:12768017
- Lindh, E.; Huovilainen, A.; Ratti, O.; Ek-Kommonen, C.; Sironen, T.; Huhtamo, E.; Poysa, H.; Vaheri, A. und Vapalahti, O. (2008): Orthomyxo-, paramyxo- and flavivirus infections in wild waterfowl in Finland, *Virolog.J.* (Band 5), Seite 35. URL: PM:18307758
- Livingston, B. D.; Higgins, D. und Van, Nest G. (2006): Evolving strategies for the prevention of influenza infection: potential for multistrain targeting, *BioDrugs.* (Band 20), Nr. 6, Seite 335-340. URL: PM:17176120
- Locke, D. P.; Sellers, H. S.; Crawford, J. M.; Schultz-Cherry, S.; King, D. J.; Meinersmann, R. J. und Seal, B. S. (2000): Newcastle disease virus phosphoprotein gene analysis and transcriptional editing in avian cells, *Virus Res.* (Band 69), Nr. 1, Seite 55-68. URL: PM:10989186
- Lüschow, D.; Werner, O.; Mettenleiter, T. C. und Fuchs, W. (2001): Protection of chickens from lethal avian influenza A virus infection by live-virus vaccination with infectious laryngotracheitis virus recombinants expressing the hemagglutinin (H5) gene, *Vaccine* (Band 19), Nr. 30, Seite 4249-4259. URL: PM:11457552
- Madansky, C. H. und Bratt, M. A. (1981): Relationships among virus spread, cytopathogenicity, and virulence as revealed by the noncytopathic mutants of Newcastle disease virus, *J.Virol.* (Band 40), Nr. 3, Seite 691-702. URL: PM:7321100
- Matrosovich, M. N.; Krauss, S. und Webster, R. G. (2001): H9N2 influenza A viruses from poultry in Asia have human virus-like receptor specificity, *Virology* (Band 281), Nr. 2, Seite 156-162. URL: PM:11277689
- Matrosovich, M. N.; Matrosovich, T. Y.; Gray, T.; Roberts, N. A. und Klenk, H. D. (2004): Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 101), Nr. 13, Seite 4620-4624. URL: PM:15070767
- McGinnes, L.; McQuain, C. und Morrison, T. (1988): The P protein and the nonstructural 38K and 29K proteins of Newcastle disease virus are derived from the same open reading frame, *Virology* (Band 164), Nr. 1, Seite 256-264. URL: PM:3363866
- Mebatsion, T.; de Vaan, L. T.; de Haas N.; Römer-Oberdörfer, A. und Braber, M. (2003): Identification of a mutation in editing of defective Newcastle disease virus recombinants that modulates P-gene mRNA editing and restores virus replication and pathogenicity in chicken embryos, *J.Virol.* (Band 77), Nr. 17, Seite 9259-9265. URL: PM:12915541
- Mebatsion, T.; Schnell, M. J.; Cox, J. H.; Finke, S. und Conzelmann, K. K. (1996): Highly stable expression of a foreign gene from rabies virus vectors, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 93), Nr. 14, Seite 7310-7314. URL: PM:8692989

Mink, M. A.; Stec, D. S. und Collins, P. L. (1991): Nucleotide sequences of the 3' leader and 5' trailer regions of human respiratory syncytial virus genomic RNA, *Virology* (Band 185), Nr. 2, Seite 615-624. URL: PM:1840712

Modrow, S. und Falke, D. (2003): Orthomyxoviren, Modrow, S. und Falke, D., in: *Molekulare Virologie*, Seite 240-260, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

Morgan, R. W.; Gelb, J., Jr.; Schreurs, C. S.; Luttkick, D.; Rosenberger, J. K. und Sondermeijer, P. J. (1992): Protection of chickens from Newcastle and Marek's diseases with a recombinant herpesvirus of turkeys vaccine expressing the Newcastle disease virus fusion protein, *Avian Dis.* (Band 36), Nr. 4, Seite 858-870. URL: PM:1485872

Mountcastle, W. E.; Compans, R. W.; Caligiuri, L. A. und Choppin, P. W. (1970): Nucleocapsid protein subunits of simian virus 5, Newcastle disease virus, and Sendai virus, *J.Virol.* (Band 6), Nr. 5, Seite 677-684. URL: PM:4320701

Müller, H. (2006): Biology of influenza viruses, *Berl Munch.Tierarztl.Wochenschr.* (Band 119), Nr. 3-4, Seite 91-100. URL: PM:16573199

Naeem, K.; Naurin, M.; Rashid, S. und Bano, S. (2003): Seroprevalence of avian influenza virus and its relationship with increased mortality and decreased egg production, *Avian Pathol* (Band 32), Nr. 3, Seite 285-289. URL: PM:12850918

Naeem, K.; Ullah, A.; Manvell, R. J. und Alexander, D. J. (1999): Avian influenza A subtype H9N2 in poultry in Pakistan, *Vet.Rec.* (Band 145), Nr. 19, Seite 560. URL: PM:10609578

Nagai, Y. und Klenk, H. D. (1977): Activation of precursors to both glycoproteins of Newcastle disease virus by proteolytic cleavage, *Virology* (Band 77), Nr. 1, Seite 125-134. URL: PM:841855

Nakaya, T.; Cros, J.; Park, M. S.; Nakaya, Y.; Zheng, H.; Sagrera, A.; Villar, E.; Garcia-Sastre, A. und Palese, P. (2001): Recombinant Newcastle disease virus as a vaccine vector, *J.Virol.* (Band 75), Nr. 23, Seite 11868-11873. URL: PM:11689668

Nayak, B.; Rout, S. N.; Kumar, S.; Khalil, M. S.; Fouda, M. M.; Ahmed, L. E.; Earhart, K. C.; Perez, D. R.; Collins, P. L. und Samal, S. K. (2009): Immunization of chickens with Newcastle disease virus expressing H5 hemagglutinin protects against highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses, *PLoS ONE* (Band 4), Nr. 8, Seite e6509. URL: PM:19654873

Nayak, D. P.; Hui, E. K. und Barman, S. (2004): Assembly and budding of influenza virus, *Virus Res.* (Band 106), Nr. 2, Seite 147-165. URL: PM:15567494

Neiryneck, S.; Deroo, T.; Saelens, X.; Vanlandschoot, P.; Jou, W. M. und Fiers, W. (1999): A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein, *Nat.Med.* (Band 5), Nr. 10, Seite 1157-1163. URL: PM:10502819

Neumann, G.; Hughes, M. T. und Kawakami, Y. (2000): Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1, *EMBO J.* (Band 19), Nr. 24, Seite 6751-6758. URL: PM:11118210

Nobusawa, E.; Aoyama, T.; Kato, H.; Suzuki, Y.; Tateno, Y. und Nakajima, K. (1991): Comparison of complete amino acid sequences and receptor-binding properties among 13 serotypes of hemagglutinins of influenza A viruses, *Virology* (Band 182), Nr. 2, Seite 475-485. URL: PM:2024485

OIE (2009a): Avian Influenza (Kapitel 10.4), in: *Terrestrial Animal Health Code*, World Organisation for Animal Health (OIE). URL: http://www.oie.int/eng/normes/MCODE/en_chapitre_1.10.4.htm

OIE (2009b): Avian Influenza (Kapitel 2.3.4), in: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2009* (Band 1), Seite 465-481, World Organisation for Animal Health (OIE). URL: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_summry.htm

OIE (2009c): Newcastle Disease (Kapitel 10.13), in: *Terrestrial Animal Health Code*, World Organisation for Animal Health (OIE). URL: http://www.oie.int/eng/normes/MCODE/en_chapitre_1.10.13.htm

OIE (2009d): Newcastle disease (Kapitel 2.3.14), in: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2009* (Band 1), Seite 576-589, World Organisation for Animal Health (OIE). URL: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_summry.htm

Palese, P. (1998): RNA virus vectors: where are we and where do we need to go?, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 95), Nr. 22, Seite 12750-12752. URL: PM:9788984

Pan, Z.; Zhang, X.; Geng, S.; Cheng, N.; Sun, L.; Liu, B.; Huang, J. und Jiao, X. (2009): Priming with a DNA vaccine delivered by attenuated *Salmonella typhimurium* and boosting with a killed vaccine confers protection of chickens against infection with the H9 subtype of avian influenza virus, *Vaccine* (Band 27), Nr. 7, Seite 1018-1023. URL: PM:19103246

Park, M. S.; Steel, J.; Garcia-Sastre, A.; Swayne, D. und Palese, P. (2006): Engineered viral vaccine constructs with dual specificity: avian influenza and Newcastle disease, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 103), Nr. 21, Seite 8203-8208. URL: PM:16717196

Pattnaik, A. K.; Ball, L. A.; LeGrone, A. W. und Wertz, G. W. (1992): Infectious defective interfering particles of VSV from transcripts of a cDNA clone, *Cell* (Band 69), Nr. 6, Seite 1011-1020. URL: PM:1318785

Pattnaik, A. K. und Wertz, G. W. (1990): Replication and amplification of defective interfering particle RNAs of vesicular stomatitis virus in cells expressing viral proteins from vectors containing cloned cDNAs, *J.Virol.* (Band 64), Nr. 6, Seite 2948-2957. URL: PM:2159555

Pavlova, S. P.; Veits, J.; Keil, G. M.; Mettenleiter, T. C. und Fuchs, W. (2009a): Protection of chickens against H5N1 highly pathogenic avian influenza virus infection by live vaccination with infectious laryngotracheitis virus recombinants expressing H5 hemagglutinin and N1 neuraminidase, *Vaccine* (Band 27), Nr. 5, Seite 773-785. URL: PM:19041677

Pavlova, S. P.; Veits, J.; Mettenleiter, T. C. und Fuchs, W. (2009b): Live vaccination with an H5-hemagglutinin-expressing infectious laryngotracheitis virus recombinant protects chickens against different highly pathogenic avian influenza viruses of the H5 subtype, *Vaccine* (Band 27), Nr. 37, Seite 5085-5090. URL: PM:19573638

Pedersen, J. C. (2008): Hemagglutination-Inhibition Test for Avian Influenza Virus Subtype Identification and the Detection and Quantitation of Serum Antibodies to the Avian Influenza Virus, Spackman, E., in: *Methods in Molecular Biology* (Band 436), Seite 53-66, Humana Press, Totowa, NJ, USA.

Peeples, M. E. (1991): Paramyxovirus M proteins: pulling it all together and taking it on the road, Kingsbury, D. W., in: *The Paramyxoviruses*, Seite 427-456, Plenum Press, New York, ISBN: 0-306-43553-5.

Peeples, M. E. und Bratt, M. A. (1982): UV irradiation analysis of complementation between, and replication of, RNA-negative temperature-sensitive mutants of Newcastle disease virus, *J.Virol.* (Band 41), Nr. 3, Seite 965-973. URL: PM:7097855

Peeters, B. P.; de Leeuw, O. S.; Koch, G. und Gielkens, A. L. (1999): Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence, *J.Virol.* (Band 73), Nr. 6, Seite 5001-5009. URL: PM:10233962

Peiris, J. S.; Guan, Y.; Markwell, D.; Ghose, P.; Webster, R. G. und Shortridge, K. F. (2001): Cocirculation of avian H9N2 and contemporary "human" H3N2 influenza A viruses in pigs in southeastern China: potential for genetic reassortment?, *J.Virol.* (Band 75), Nr. 20, Seite 9679-9686. URL: PM:11559800

Peiris, M.; Yuen, K. Y.; Leung, C. W.; Chan, K. H.; Ip, P. L.; Lai, R. W.; Orr, W. K. und Shortridge, K. F. (1999): Human infection with influenza H9N2, *Lancet* (Band 354), Nr. 9182, Seite 916-917. URL: PM:10489954

Perrotta, A. T. und Been, M. D. (1990): The self-cleaving domain from the genomic RNA of hepatitis delta virus: sequence requirements and the effects of denaturant, *Nucleic Acids Res.* (Band 18), Nr. 23, Seite 6821-6827. URL: PM:2263447

Pinto, L. H.; Holsinger, L. J. und Lamb, R. A. (1992): Influenza virus M2 protein has ion channel activity, *Cell* (Band 69), Nr. 3, Seite 517-528. URL: PM:1374685

Pitt, J. J.; Da, Silva E. und Gorman, J. J. (2000): Determination of the disulfide bond arrangement of Newcastle disease virus hemagglutinin neuraminidase. Correlation with a beta-sheet propeller structural fold predicted for paramyxoviridae attachment proteins, *J.Biol.Chem.* (Band 275), Nr. 9, Seite 6469-6478. URL: PM:10692451

Poch, O.; Blumberg, B. M.; Bougueleret, L. und Tordo, N. (1990): Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: theoretical assignment of functional domains, *J.Gen.Virol.* (Band 71 (Pt 5)), Seite 1153-1162. URL: PM:2161049

Potter, C. W. (2004): Influenza, Zuckerman, A. J.; Banatvala, J. E.; Pattison, J. R.; Griffiths, P. D. und Schoub, B. D., in: *Principles and Practice of Clinical Virology*, 5. Auflage, Seite 271-297, John Wiley & Sons Ltd., Hoboken, NJ, ISBN: 0-470-84338-1.

Qiao, C. L.; Yu, K. Z.; Jiang, Y. P.; Jia, Y. Q.; Tian, G. B.; Liu, M.; Deng, G. H.; Wang, X. R.; Meng, Q. W. und Tang, X. Y. (2003): Protection of chickens against highly lethal H5N1 and H7N1 avian influenza viruses with a recombinant fowlpox virus co-expressing H5 haemagglutinin and N1 neuraminidase genes, *Avian Pathol* (Band 32), Nr. 1, Seite 25-32. URL: PM:12745375

Ramp, K.; Deckers, D.; Veits, J.; Grund, C.; Mettenleiter, T. C. und Römer-Oberdörfer, A. (in preparation): in preparation.

Reitter, J. N.; Sergel, T. und Morrison, T. G. (1995): Mutational analysis of the leucine zipper motif in the Newcastle disease virus fusion protein, *J.Virol.* (Band 69), Nr. 10, Seite 5995-6004. URL: PM:7666504

Richardson, C. D.; Scheid, A. und Choppin, P. W. (1980): Specific inhibition of paramyxovirus and myxovirus replication by oligopeptides with amino acid sequences similar to those at the N-termini of the F1 or HA2 viral polypeptides, *Virology* (Band 105), Nr. 1, Seite 205-222. URL: PM:7414950

Robinson, H. L.; Hunt, L. A. und Webster, R. G. (1993): Protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with a haemagglutinin-expressing plasmid DNA, *Vaccine* (Band 11), Nr. 9, Seite 957-960. URL: PM:8212843

Rolle, M. und Mayr, A. Hrsg. (2002): *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*, 7. Auflage, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, ISBN: 978-3432846866.

Römer-Oberdörfer, A.; Mundt, E.; Mebatsion, T.; Buchholz, U. J. und Mettenleiter, T. C. (1999): Generation of recombinant lentogenic Newcastle disease virus from cDNA, *J.Gen.Virol.* (Band 80), Seite 2987-2995. URL: PM:10580061

Römer-Oberdörfer, A.; Veits, J.; Helferich, D. und Mettenleiter, T. C. (2008): Level of protection of chickens against highly pathogenic H5 avian influenza virus with Newcastle disease virus based live attenuated vector vaccine depends on homology of H5 sequence between vaccine and challenge virus, *Vaccine* (Band 26), Nr. 19, Seite 2307-2313. URL: PM:18395947

Römer-Oberdörfer, A.; Werner, O.; Veits, J.; Mebatsion, T. und Mettenleiter, T. C. (2003): Contribution of the length of the HN protein and the sequence of the F protein cleavage site to Newcastle disease virus pathogenicity, *J.Gen.Virol.* (Band 84), Nr. Pt 11, Seite 3121-3129. URL: PM:14573818

Rosenberger, J. K.; Krauss, W. C. und Slemons, R. D. (1974): Isolation of Newcastle disease and type-A influenza viruses from migratory waterfowl in the Atlantic flyway, *Avian Dis.* (Band 18), Nr. 4, Seite 610-613. URL: PM:4433304

Rott, R. und Klenk, H. D. (1988): Molecular basis of infectivity and pathogenicity of Newcastle disease virus, Alexander, D. J., in: *Newcastle disease*, Seite 98-112, Kluwer Academic Publishers, Bouston.

Roussan, D. A.; Khawaldeh, G. Y.; Al Rifai, R. H.; Totanji, W. S. und Shaheen, I. A. (2009): Avian influenza virus H9 subtype in poultry flocks in Jordan, *Prev.Vet.Med.* (Band 88), Nr. 1, Seite 77-81. URL: PM:18692925

Russell, R.; Paterson, R. G. und Lamb, R. A. (1994): Studies with cross-linking reagents on the oligomeric form of the paramyxovirus fusion protein, *Virology* (Band 199), Nr. 1, Seite 160-168. URL: PM:8116239

Samal, S. K. (2008): Paramyxoviruses of Animals, Mahy, B. W. J. und van Regenmortel, M. H. V., in: *Encyclopedia of Virology*, 3. Ed. Auflage, Seite 40-47, Elsevier Ltd., Amsterdam, ISBN: 978-0-12-374410-4.

Samson, A. C.; Chambers, P. und Dickinson, J. H. (1980): Location of post-translational cleavage events within F and HN glycoproteins of Newcastle disease virus, *J.Gen.Virol.* (Band 47), Nr. 1, Seite 19-27. URL: PM:7365463

Sanger, F.; Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 74), Nr. 12, Seite 5463-5467. URL: PM:271968

Schnell, M. J.; Buonocore, L.; Whitt, M. A. und Rose, J. K. (1996): The minimal conserved transcription stop-start signal promotes stable expression of a foreign gene in vesicular stomatitis virus, *J.Virol.* (Band 70), Nr. 4, Seite 2318-2323. URL: PM:8642658

Schnell, M. J.; Mebatsion, T. und Conzelmann, K. K. (1994): Infectious rabies viruses from cloned cDNA, *EMBO J.* (Band 13), Nr. 18, Seite 4195-4203. URL: PM:7925265

Scholtissek, C. (2006): Influenza pandemic planning, *Berl Munch.Tierarztl.Wochenschr.* (Band 119), Nr. 3-4, Seite 179-185. URL: PM:16573208

Schröer, D.; Veits, J.; Grund, C.; Dauber, M.; Keil, G.; Granzow, H.; Mettenleiter, T. C. und Römer-Oberdörfer, A. (2009): Vaccination with Newcastle disease virus vectored vaccine protects chickens against highly pathogenic H7 avian influenza virus, *Avian Dis.* (Band 53), Nr. 2, Seite 190-197. URL: PM:19630223

Schultz-Cherry, S.; Dybing, J. K.; Davis, N. L.; Williamson, C.; Suarez, D. L.; Johnston, R. und Perdue, M. L. (2000): Influenza virus (A/HK/156/97) hemagglutinin expressed by an alphavirus replicon system protects chickens against lethal infection with Hong Kong-origin H5N1 viruses, *Virology* (Band 278), Nr. 1, Seite 55-59. URL: PM:11112481

Seal, B. S.; King, D. J. und Sellers, H. S. (2000): The avian response to Newcastle disease virus, *Dev.Comp Immunol.* (Band 24), Nr. 2-3, Seite 257-268. URL: PM:10717292

Seeburg, P. H.; Shine, J.; Martial, J. A.; Baxter, J. D. und Goodman, H. M. (1977): Nucleotide sequence and amplification in bacteria of structural gene for rat growth hormone, *Nature* (Band 270), Nr. 5637, Seite 486-494. URL: PM:339105

Sharp, P. A.; Sugden, B. und Sambrook, J. (1973): Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis, *Biochemistry* (Band 12), Nr. 16, Seite 3055-3063. URL: PM:4354250

Shih, I. H. und Been, M. D. (2002): Catalytic strategies of the hepatitis delta virus ribozymes, *Annu.Rev.Biochem.* (Band 71), Seite 887-917. URL: PM:12045114

Siegmann, O. und Neumann, U. (2005): Kompendium der Geflügelkrankheiten, 6. Auflage, Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG, Hannover, ISBN: 3-87706-744-1.

Skehel, J. J. und Wiley, D. C. (2000): Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin, *Annu.Rev.Biochem.* (Band 69), Seite 531-569. URL: PM:10966468

Smith, H. O. und Wilcox, K. W. (1970): A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*. I. Purification and general properties, *J.Mol.Biol.* (Band 51), Nr. 2, Seite 379-391. URL: PM:5312500

Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M.; Olson, B. J. und Klenk, D. C. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal.Biochem.* (Band 150), Nr. 1, Seite 76-85. URL: PM:3843705

Songserm, T.; Amonsin, A.; Jam-on, R.; Sae-Heng, N.; Meemak, N.; Pariyothorn, N.; Payungporn, S.; Theamboonlers, A. und Poovorawan, Y. (2006a): Avian influenza H5N1 in naturally infected domestic cat, *Emerg.Infect.Dis.* (Band 12), Nr. 4, Seite 681-683. URL: PM:16704821

Songserm, T.; Amonsin, A.; Jam-on, R.; Sae-Heng, N.; Pariyothorn, N.; Payungporn, S.; Theamboonlers, A.; Chutinimitkul, S.; Thanawongnuwech, R. und Poovorawan, Y. (2006b): Fatal avian influenza A H5N1 in a dog, *Emerg.Infect.Dis.* (Band 12), Nr. 11, Seite 1744-1747. URL: PM:17283627

Spackman, E.; Senne, D. A.; Myers, T. J.; Bulaga, L. L.; Garber, L. P.; Perdue, M. L.; Lohman, K.; Daum, L. T. und Suarez, D. L. (2002): Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes, *J.Clin.Microbiol.* (Band 40), Nr. 9, Seite 3256-3260. URL: PM:12202562

Spann, K. M.; Collins, P. L. und Teng, M. N. (2003): Genetic recombination during coinfection of two mutants of human respiratory syncytial virus, *J.Virol.* (Band 77), Nr. 20, Seite 11201-11211. URL: PM:14512568

Spearman, C. (1908): The method of "right and wrong cases" (constant stimuli) without Gauss's formulae, *British Journal of Psychology* (Band 2), Seite 227-242.

Stamboulian, D.; Bonvehi, P. E.; Nacinovich, F. M. und Cox, N. (2000): Influenza, *Infect.Dis.Clin.North Am* (Band 14), Nr. 1, Seite 141-166. URL: PM:10738677

Steward, M.; Vipond, I. B.; Millar, N. S. und Emmerson, P. T. (1993): RNA editing in Newcastle disease virus, *J.Gen.Virol.* (Band 74 (Pt 12)), Seite 2539-2547. URL: PM:8277263

Suarez, D. L. und Schultz-Cherry, S. (2000a): Immunology of avian influenza virus: a review, *Dev.Comp Immunol.* (Band 24), Nr. 2-3, Seite 269-283. URL: PM:10717293

Suarez, D. L. und Schultz-Cherry, S. (2000b): The effect of eukaryotic expression vectors and adjuvants on DNA vaccines in chickens using an avian influenza model, *Avian Dis.* (Band 44), Nr. 4, Seite 861-868. URL: PM:11195640

Suarez, D. L.; Senne, D. A.; Banks, J.; Brown, I. H.; Essen, S. C.; Lee, C. W.; Manvell, R. J.; Mathieu-Benson, C.; Moreno, V.; Pedersen, J. C.; Panigrahy, B.; Rojas, H.; Spackman, E. und Alexander, D. J. (2004): Recombination resulting in virulence shift in avian influenza outbreak, Chile, *Emerg.Infect.Dis.* (Band 10), Nr. 4, Seite 693-699. URL: PM:15200862

Swayne, D. E und Halvorson, D. A. (2003): Influenza, Saif, Y. M, in: *Diseases of Poultry* , 11. Auflage, Seite 135-160, Iowa State Press, Ames.

Swayne, D. E. (2009): Avian influenza vaccines and therapies for poultry, *Comp Immunol.Microbiol.Infect.Dis.* (Band 32), Nr. 4, Seite 351-363. URL: PM:18442853

Swayne, D. E.; Beck, J. R. und Kinney, N. (2000a): Failure of a recombinant fowl poxvirus vaccine containing an avian influenza hemagglutinin gene to provide consistent protection against influenza in chickens preimmunized with a fowl pox vaccine, *Avian Dis.* (Band 44), Nr. 1, Seite 132-137. URL: PM:10737653

Swayne, D. E.; Beck, J. R. und Mickle, T. R. (1997): Efficacy of recombinant fowl poxvirus vaccine in protecting chickens against a highly pathogenic Mexican-origin H5N2 avian influenza virus, *Avian Dis.* (Band 41), Nr. 4, Seite 910-922. URL: PM:9454926

Swayne, D. E.; Beck, J. R.; Perdue, M. L. und Beard, C. W. (2001): Efficacy of vaccines in chickens against highly pathogenic Hong Kong H5N1 avian influenza, *Avian Dis.* (Band 45), Nr. 2, Seite 355-365. URL: PM:11417815

Swayne, D. E.; Garcia, M.; Beck, J. R.; Kinney, N. und Suarez, D. L. (2000b): Protection against diverse highly pathogenic H5 avian influenza viruses in chickens immunized with a recombinant fowlpox vaccine containing an H5 avian influenza hemagglutinin gene insert, *Vaccine* (Band 18), Nr. 11-12, Seite 1088-1095. URL: PM:10590330

Swayne, D. E.; Perdue, M. L.; Beck, J. R.; Garcia, M. und Suarez, D. L. (2000c): Vaccines protect chickens against H5 highly pathogenic avian influenza in the face of genetic changes in field viruses over multiple years, *Vet.Microbiol.* (Band 74), Nr. 1-2, Seite 165-172. URL: PM:10799788

Sylte, M. J.; Hubby, B. und Suarez, D. L. (2007): Influenza neuraminidase antibodies provide partial protection for chickens against high pathogenic avian influenza infection, *Vaccine* (Band 25), Nr. 19, Seite 3763-3772. URL: PM:17350145

Szilagyi, J. F. und Uryvayev, L. (1973): Isolation of an infectious ribonucleoprotein from vesicular stomatitis virus containing an active RNA transcriptase, *J.Virol.* (Band 11), Nr. 2, Seite 279-286. URL: PM:4347429

Tang, D. C.; Zhang, J.; Toro, H.; Shi, Z. und Van Kampen, K. R. (2009): Adenovirus as a carrier for the development of influenza virus-free avian influenza vaccines, *Expert.Rev.Vaccines.* (Band 8), Nr. 4, Seite 469-481. URL: PM:19348562

- Thorne, H. V. (1966): Electrophoretic separation of polyoma virus DNA from host cell DNA, *Virology* (Band 29), Nr. 2, Seite 234-239. URL: PM:4287545
- Topfstedt, E.; Deckers, D.; Veits, J.; Grund, C.; Mettenleiter, T. C. und Römer-Oberdörfer, A. (in preparation): Recombinant Newcastle disease viruses as marker vaccines against highly pathogenic avian influenza virus of subtype H5, in preparation.
- Toro, H. und Tang, D. C. (2009): Protection of chickens against avian influenza with nonreplicating adenovirus-vectored vaccine, *Poult.Sci.* (Band 88), Nr. 4, Seite 867-871. URL: PM:19276437
- Toro, H.; Tang, D. C.; Suarez, D. L.; Sylte, M. J.; Pfeiffer, J. und Van Kampen, K. R. (2007): Protective avian influenza in ovo vaccination with non-replicating human adenovirus vector, *Vaccine* (Band 25), Nr. 15, Seite 2886-2891. URL: PM:17055126
- Toro, H.; Tang, D. C.; Suarez, D. L.; Zhang, J. und Shi, Z. (2008): Protection of chickens against avian influenza with non-replicating adenovirus-vectored vaccine, *Vaccine* (Band 26), Nr. 21, Seite 2640-2646. URL: PM:18384919
- Towbin, H.; Staehelin, T. und Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 76), Nr. 9, Seite 4350-4354. URL: PM:388439
- Tripathy, D. N. und Reed, W. M. (2003): Pox, Saif, Y. M, in: *Diseases of Poultry* , 11. Auflage, Seite 253-269, Iowa State Press, Ames.
- Tsukamoto, K.; Saito, S.; Saeki, S.; Sato, T.; Tanimura, N.; Isobe, T.; Mase, M.; Imada, T.; Yuasa, N. und Yamaguchi, S. (2002): Complete, long-lasting protection against lethal infectious bursal disease virus challenge by a single vaccination with an avian herpesvirus vector expressing VP2 antigens, *J.Virol.* (Band 76), Nr. 11, Seite 5637-5645. URL: PM:11991992
- Tumova, B.; Stumpa, A.; Janout, V.; Uvizl, M. und Chmela, J. (1979): A further member of the Yucaipa group isolated from the common wren (*Troglodytes troglodytes*), *Acta Virol.* (Band 23), Nr. 6, Seite 504-507. URL: PM:94770
- Ullrich, A.; Shine, J.; Chirgwin, J.; Pictet, R.; Tischler, E.; Rutter, W. J. und Goodman, H. M. (1977): Rat insulin genes: construction of plasmids containing the coding sequences, *Science* (Band 196), Nr. 4296, Seite 1313-1319. URL: PM:325648
- van den Berg, T.; Lambrecht, B.; Marche, S.; Steensels, M.; van Borm, S. und Bublot, M. (2008): Influenza vaccines and vaccination strategies in birds, *Comp Immunol.Microbiol.Infect.Dis.* (Band 31), Nr. 2-3, Seite 121-165. URL: PM:17889937
- Vecino, W. H.; Quanquin, N. M.; Martinez-Sobrido, L.; Fernandez-Sesma, A.; Garcia-Sastre, A.; Jacobs, W. R., Jr. und Fennelly, G. J. (2004): Mucosal immunization with attenuated *Shigella flexneri* harboring an influenza hemagglutinin DNA vaccine protects mice against a lethal influenza challenge, *Virology* (Band 325), Nr. 2, Seite 192-199. URL: PM:15246259

Veits, J.; Luschow, D.; Kindermann, K.; Werner, O.; Teifke, J. P.; Mettenleiter, T. C. und Fuchs, W. (2003): Deletion of the non-essential UL0 gene of infectious laryngotracheitis (ILT) virus leads to attenuation in chickens, and UL0 mutants expressing influenza virus haemagglutinin (H7) protect against ILT and fowl plague, *J.Gen.Virol.* (Band 84), Nr. Pt 12, Seite 3343-3352. URL: PM:14645915

Veits, J.; Römer-Oberdörfer, A.; Helferich, D.; Durban, M.; Suezer, Y.; Sutter, G. und Mettenleiter, T. C. (2008): Protective efficacy of several vaccines against highly pathogenic H5N1 avian influenza virus under experimental conditions, *Vaccine* (Band 26), Nr. 13, Seite 1688-1696. URL: PM:18291561

Veits, J.; Wiesner, D.; Fuchs, W.; Hoffmann, B.; Granzow, H.; Starick, E.; Mundt, E.; Schirrmeyer, H.; Mebatsion, T.; Mettenleiter, T. C. und Römer-Oberdörfer, A. (2006): Newcastle disease virus expressing H5 hemagglutinin gene protects chickens against Newcastle disease and avian influenza, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 103), Nr. 21, Seite 8197-8202. URL: PM:16717197

Vogelstein, B. und Gillespie, D. (1979): Preparative and analytical purification of DNA from agarose, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 76), Nr. 2, Seite 615-619. URL: PM:284385

Wakamatsu, N.; King, D. J.; Seal, B. S.; Samal, S. K. und Brown, C. C. (2006): The pathogenesis of Newcastle disease: a comparison of selected Newcastle disease virus wild-type strains and their infectious clones, *Virology* (Band 353), Nr. 2, Seite 333-343. URL: PM:16860365

Waring, M. J. (1965): Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids, *J.Mol.Biol.* (Band 13), Nr. 1, Seite 269-282. URL: PM:5859041

Webby, R.; Hoffmann, E. und Webster, R. (2004): Molecular constraints to interspecies transmission of viral pathogens, *Nat.Med.* (Band 10), Nr. 12 Suppl, Seite S77-S81. URL: PM:15577935

Weber, K. und Osborn, M. (1969): The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, *J.Biol.Chem.* (Band 244), Nr. 16, Seite 4406-4412. URL: PM:5806584

Webster, R. G.; Bean, W. J.; Gorman, O. T.; Chambers, T. M. und Kawaoka, Y. (1992): Evolution and ecology of influenza A viruses, *Microbiol.Rev.* (Band 56), Nr. 1, Seite 152-179. URL: PM:1579108

Webster, R. G.; Kawaoka, Y.; Taylor, J.; Weinberg, R. und Paoletti, E. (1991): Efficacy of nucleoprotein and haemagglutinin antigens expressed in fowlpox virus as vaccine for influenza in chickens, *Vaccine* (Band 9), Nr. 5, Seite 303-308. URL: PM:1651609

Webster, R. G.; Morita, M.; Pridgen, C. und Tumova, B. (1976): Ortho- and paramyxoviruses from migrating feral ducks: characterization of a new group of influenza A viruses, *J.Gen.Virol.* (Band 32), Nr. 2, Seite 217-225. URL: PM:1018173

Webster, R. G.; Yakhno, M.; Hinshaw, V. S.; Bean, W. J. und Murti, K. G. (1978): Intestinal influenza: replication and characterization of influenza viruses in ducks, *Virology* (Band 84), Nr. 2, Seite 268-278. URL: PM:23604

Werner, O. (2006): *Klassische Geflügelpest - Eine Übersicht*, Berl Munch.Tierarztl.Wochenschr. (Band 119), Nr. 3-4, Seite 140-150. URL: PM:16573204

WHO (1980): A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO Memorandum, *Bulletin of the World Health Organisation* (Band 58), Seite 585-591.

WHO (2009): Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1) Reported to WHO, WHO programmes and projects - Global Alert and Response. Zugriff am 02.11.2009. URL:
http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2009_09_24

Wise, M. G.; Suarez, D. L.; Seal, B. S.; Pedersen, J. C.; Senne, D. A.; King, D. J.; Kapczynski, D. R. und Spackman, E. (2004): Development of a real-time reverse-transcription PCR for detection of newcastle disease virus RNA in clinical samples, *J.Clin.Microbiol.* (Band 42), Nr. 1, Seite 329-338. URL: PM:14715773

Wright, P. F.; Neumann, G. und Kawaoka, Y. (2006): Orthomyxoviruses, Knipe, D. M. und Howley, P. M., in: *Fields Virology* (Band 2), 5. Auflage, Seite 1691-1740, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Philadelphia, ISBN: 978-0781760607.

Xing, Z.; Cardona, C. J.; Li, J.; Dao, N.; Tran, T. und Andrada, J. (2008): Modulation of the immune responses in chickens by low-pathogenicity avian influenza virus H9N2, *J.Gen.Virol.* (Band 89), Nr. Pt 5, Seite 1288-1299. URL: PM:18420808

Yusoff, K.; Millar, N. S.; Chambers, P. und Emmerson, P. T. (1987): Nucleotide sequence analysis of the L gene of Newcastle disease virus: homologies with Sendai and vesicular stomatitis viruses, *Nucleic Acids Res.* (Band 15), Nr. 10, Seite 3961-3976. URL: PM:3035486

Danksagung

Diese Arbeit wurde durch das Forschungs-Sofortprogramm Influenza des Bundes (FSI) ermöglicht.

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die durch Ihre Hilfsbereitschaft, angenehme Zusammenarbeit und moralische Unterstützung zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Thomas C. Mettenleiter danke ich recht herzlich für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Arbeit am Institut für Molekularbiologie, FLI sowie für die Begutachtung.

Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. Hafez Mohamed Hafez danke ich sehr für die motivierenden Worte, die Bereitschaft diese Arbeit zu begutachten und vor dem Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin zu vertreten.

Bei Frau PD Dr. Kerstin Borchers bedanke ich mich herzlich für die Begutachtung der Arbeit.

Frau Dr. Jutta Veits danke ich ganz herzlich für die hervorragende Betreuung und Unterstützung in allen theoretischen und praktischen Aspekten dieser Arbeit, die Diskussionsbereitschaft und die Bereitschaft, ihre langjährige Laborerfahrung zu teilen. Sie hat mir mit ihrem großen molekularbiologischen und virologischen Wissen sehr geholfen. Danke für die aufwendige und kritische Durchsicht und Korrektur dieser Arbeit.

Für die Vorarbeiten zur Herstellung der NDV-H9 Rekombinante danke ich Herrn Dr. S. Weber. Frau Dr. A. Römer-Oberdörfer danke ich für die Überlassung der NDV-AIV H5 und / oder N1 Rekombinanten zur Testung im Huhn.

Für die Hilfe bei der Pathologie danke ich Prof. Dr. J. P. Teifke, A. Breithaupt, C. Maresch und J. Meyer. Für die Unterstützung bei der automatisierten RNA-Extraktion danke ich Dr. M. Durban, G. Strebelow und C. Korthase. Herrn Dr. H. Granzow danke ich für die Erstellung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Für die Generierung der Vaccinia-H9 Rekombinante zur Herstellung monospezifischen Serums danke ich Herrn Dr. G. M. Keil. M. Lenk und dem Team der Zellbank danke ich für die Bereitstellung der Zellen. Für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten möchte ich Herrn Dr. M. Ziller danken.

Ein Dank für die gute Organisation und Führung der Infektionsstallungen und des Quarantänestalls gebührt Frau Dr. E. Lange, Frau Dr. A. Balkema-Buschmann, Herrn Dr. B. Haas und Herrn PD Dr. M. Beer sowie dem Tierpfleger-Team; besonders K. Gellert, T. Arnold, I. Laß und R. Brill. Den technischen Assistentinnen S. Feistkorn und D. Helke danke ich für ihre Hilfsbereitschaft, ihr Engagement und ihre gute Laune.

Mein Dank gilt außerdem und nicht minder allen bisher nicht namentlich erwähnten Mitarbeitern des FLI und meinen Freunden, ohne deren vielfältige und häufige, kleinere und größere Hilfestellungen die Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Veröffentlichungen

Deckers, D., Römer-Oberdörfer, A., Veits, J., Mettenleiter, T. C. (2008): Efficacy of vaccination with Newcastle disease virus recombinants expressing influenza virus neuraminidase N1 against highly pathogenic avian influenza. Gesellschaft für Virologie (GfV) Annual Meeting, Heidelberg, 05.-08. März 2008 (Poster)

Schroeer, D., **Deckers, D.**, Mettenleiter, T. C., Veits, J. (2009): Newcastle disease virus recombinants expressing hemagglutinin of low pathogenic avian influenza viruses. Gesellschaft für Virologie (GfV) Annual Meeting, Leipzig, 18.-21. März 2009 (Poster)

Topfstedt, E., **Deckers, D.**, Veits, J., Grund, C., Mettenleiter, T. C. und Römer-Oberdörfer, A.: Recombinant Newcastle disease viruses as marker vaccines against highly pathogenic avian influenza virus of subtype H5, in preparation.

Ramp, K.; **Deckers, D.**; Veits, J.; Grund, C.; Mettenleiter, T. C. und Römer-Oberdörfer, A.: in preparation.

Erklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Daniela Deckers