

Aus dem Institut für Virologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

und

dem Friedrich-Loeffler Institut
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Institut für Immunologie
Tübingen / Greifswald – Insel Riems

**Gezielte Attenuierung und Markierung von Viren der klassischen
Schweinepest durch Mutation**

-

**Ansätze zur Entwicklung einer neuartigen Vakzine gegen das Virus
der klassischen Schweinepest zur Differenzierung infizierter von
vakzinierten Tieren**

Inaugural Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Sabine Wirtz
Tierärztin aus Aachen

Berlin 2013

Journal-Nr.: 3689

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Klaus Osterrieder
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Gregor Meyers
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Susanne Hartmann

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Pigs, classical swine fever virus, live vaccines, recombination, markers

Tag der Promotion: 03.06.2014

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: 978-3-86387-494-0

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2013

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.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2014

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Für meine Eltern



*His beauty shall in these black lines be seen,
And they shall live, and he in them still green.*

Sonnet 63 - Sir William Shakespeare

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	5
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	9
ZUSAMMENFASSUNG	14
SUMMARY	16
1.0 Einleitung	19
1.1 Pestiviren.....	19
1.1.1 Morphologie und Genomaufbau.....	20
1.1.2 Das Nichtstrukturprotein N ^{pro}	22
1.1.3 Das Glykoprotein E ^{gns}	23
1.1.4 Das Glykoprotein E2.....	24
1.2 Die klassische Schweinepest.....	25
1.3 „Persistenz“ durch Immunevasion.....	26
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	27
2.0 Material und Methoden	28
2.1 Material.....	28
2.1.1 Geräte.....	28
2.1.2 Chemikalien.....	30
2.1.3 Medien, Lösungen und Puffer.....	32
2.1.4 Biologische Materialien.....	35
2.1.4.1 Enzyme.....	35
2.1.4.2 Bakterien.....	35
2.1.4.3 Antikörper.....	35
2.1.5 Oligonukleotide.....	36
2.1.6 Plasmide.....	38
2.1.6.1 bereits im Labor vorhandene oder kommerziell erworbene Plasmide.....	38
2.1.6.2 selbst generierte Plasmide.....	39
2.1.7 vorgefertigte Komplettsysteme.....	40
2.1.8 Zelllinien.....	41
2.1.9 Viren der Klassischen Schweinepest (CSFV).....	41
2.1.9.1 CSF Wildtyp-Viren.....	41
2.1.9.2 rekombinante CSFV-Mutanten.....	41
2.1.9.3 Versuchstiere.....	42
2.1.9.3.1 FLI Tübingen.....	42
2.1.9.3.2 FLI Insel Riems.....	42
2.1.10 Medikamente.....	42
2.1.11 Verbrauchsmaterial.....	42
2.1.12 Verwendete Software.....	43
2.2 Methoden.....	44
2.2.1 Methoden für die Herstellung neuer Virusmutanten.....	44
2.2.1.1 Polymerase Kettenreaktion.....	44
2.2.1.1.1 Standard-PCR.....	44
2.2.1.1.2 Quik Change [®] -PCR.....	45
2.2.1.2 Agarosegelelektrophorese.....	46
2.2.1.3 Aufreinigung von DNA-Fragmenten mittels Agarosegelelektrophorese.....	46
2.2.1.4 Restriktionsenzymspaltung.....	46
2.2.1.5 Dephosphorylierung von DNA.....	48
2.2.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten.....	48

2.2.1.7	Fertigung von Agarplatten.....	48
2.2.1.8	Produktion von kompetenten Bakterien.....	49
2.2.1.9	Hitzeschocktransformation.....	49
2.2.1.10	Präparation von Plasmid-DNA.....	49
2.2.1.10.1	Mini-Präparation.....	49
2.2.1.10.2	Midi-Präparation.....	50
2.2.1.11	Aufreinigung von Mini-Präparationen für die Sequenzierung.....	50
2.2.1.12	Sequenzierung.....	51
2.2.1.13	<i>In vitro</i> -Transkription.....	52
2.2.1.14	Phenol-Chloroform-Extraktion.....	53
2.2.1.15	Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese.....	54
2.2.1.16	Elektroporation.....	54
2.2.2	Methoden für die Charakterisierung von Viren.....	55
2.2.2.1	Kultivierung von Zellen.....	55
2.2.2.2	Infektion von Zellen.....	55
2.2.2.3	Titration von Viren und Titerberechnung.....	56
2.2.2.4	Wachstumskurven.....	57
2.2.2.5	Extraktion viraler RNA aus infizierten Zellen.....	57
2.2.2.6	Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR).....	57
2.2.3	Methoden für die Durchführung von Tierversuchen.....	59
2.2.3.1	Vakzination und Infektion.....	59
2.2.3.2	Rücktitration von Vakzineviren.....	59
2.2.3.3	Determination der Klinischen Punktzahl.....	60
2.2.3.4	Körpertemperaturmessung.....	61
2.2.3.5	Blutentnahme.....	62
2.2.3.6	Euthanasie.....	63
2.2.3.7	Entnahme von Organproben.....	63
2.2.4	Methoden für die Analyse von Proben aus Tierversuchen.....	63
2.2.4.1	Leukozytenzählung.....	63
2.2.4.2	Präparation von Leukozytenkonzentrat.....	65
2.2.4.3	Aufarbeitung von Organproben.....	65
2.2.4.4	Virusanzucht aus Probenmaterial in Zellkultur.....	65
2.2.4.5	Serumneutralisationstest.....	66
2.2.4.6	Konventionelle indirekte Immunfluoreszenz.....	67
2.2.4.7	Indirekte Immunfluoreszenz mittels Zeiss Axiovert 200M mit ApoTome®.....	68
3.0	Ergebnisse.....	69
3.1	CSFV Doppelmutante.....	69
3.1.1	Grundlagen.....	69
3.1.2	Sicherheitsstudie mit tragenden Sauen (TV#30).....	70
3.1.2.1	Charakterisierung der in TV#30 eingesetzten Viren.....	71
3.1.2.2	Auswahl und Bezeichnung der Tiere.....	71
3.1.2.3	Zeitplan.....	72
3.1.2.4	Infektion und Titration der Viren für Vakzination und Belastungsinfektion.....	73
3.1.2.5	Körpertemperatur und klinisches Bild der Muttertiere.....	74
3.1.2.6	Serologische Untersuchung (SNT).....	75
3.1.2.7	Postmortale Untersuchung der Feten.....	76
3.1.2.8	Virusanzucht aus fetalen Organen.....	78
3.1.2.9	Zusammenfassung Sicherheitsstudie (TV#30).....	80
3.2	CSFV DIVA-Vakzine-Mutanten.....	81
3.2.1	TAV-Epitop-Basismutanten.....	81
3.2.1.1	Markierungskonzept.....	81
3.2.1.2	Konstruktion der benötigten Plasmide.....	82
3.2.1.3	Herstellung der TAV-Epitop Basismutanten.....	84
3.2.1.4	Prüfung des Markierungskonzeptes.....	84
3.2.1.4.1	Sequenzierung.....	84
3.2.1.4.2	Indirekte Immunfluoreszenz.....	85
3.2.1.5	Wachstumseigenschaften der TAV-Epitop Basismutanten.....	87
3.2.2	TAV-Epitop DIVA-Vakzine Kandidaten.....	87
3.2.2.1	TAV-Epitop-Kombinationsmutanten.....	88

3.2.2.1.1	Konstruktion der benötigten Plasmide – Ansatz 1	88
3.2.2.1.2	Herstellung der Virusmutanten aus cDNA-Konstrukten des Ansatz 1	90
3.2.2.1.3	Konstruktion der benötigten Plasmide – Ansatz 2	92
3.2.2.1.4	Herstellung der Virusmutanten aus cDNA-Konstrukten des Ansatz 2	94
3.2.3	Tierexperimentelle Studien mit CSFV DIVA-Vakzine-Mutanten	95
3.2.3.1	Vergleichsstudie TV#31	95
3.2.3.1.1	Charakterisierung der in TV#31 eingesetzten Viren	96
3.2.3.1.2	Verifizierung des Markierungskonzeptes mittels indirekter Immunfluoreszenz	97
3.2.3.1.3	Wachstumseigenschaften Viren TV#31	97
3.2.3.1.4	Auswahl und Bezeichnung der Tiere	98
3.2.3.1.5	Zeitplan	99
3.2.3.1.6	Infektion und Titration der Vakzineviren	101
3.2.3.1.7	Klinische Punktzahl	102
3.2.3.1.8	Körpertemperatur	104
3.2.3.1.9	Leukozytenzählung	106
3.2.3.1.10	Serologische Untersuchung (SNT)	107
3.2.3.1.11	Analyse der aus Leukozytenkonzentrat reisolierten Viren	108
3.2.3.1.11.1	Ergebnis der Sequenzierung	109
3.2.3.1.11.2	Ergebnis der indirekten Immunfluoreszenz	110
3.2.3.1.12	Zusammenfassung TV#31	111
3.2.3.2	Effizienzstudie TV#52/12	112
3.2.3.2.1	Charakterisierung der in TV#52/12 eingesetzten Viren	112
3.2.3.2.2	Verifizierung des Markierungskonzeptes mittels indirekter Immunfluoreszenz	113
3.2.3.2.3	Wachstumseigenschaften	114
3.2.3.2.4	Auswahl und Bezeichnung der Tiere	115
3.2.3.2.5	Zeitplan	116
3.2.3.2.6	Infektion und Titration der Viren für Vakzination und Belastungsinfektion	118
3.2.3.2.7	Klinische Punktzahl	119
3.2.3.2.8	Körpertemperatur	120
3.2.3.2.9	Leukozytenzählung	122
3.2.3.2.10	Serologische Untersuchung (SNT)	124
3.2.3.2.11	Analyse der aus Leukozytenkonzentrat reisolierten Viren	125
3.2.3.2.11.1	Ergebnis der Sequenzierung	126
3.2.3.2.11.2	Ergebnis der Indirekten Immunfluoreszenz	127
3.2.3.2.11.3	Zusammenfassung TV#52_12	129
3.3	Dimerisierung des E ^{rns} -Proteins	131
3.3.1	Dimerisierungsnegative Mutanten und Pseudoreversion	131
3.3.1.1	Pathogenitätsstudie TV#29	132
3.3.1.1.1	Generierung der benötigten Viren	132
3.3.1.1.2	Charakterisierung der eingesetzten Viren	135
3.3.1.1.3	Auswahl und Bezeichnung der Tiere	136
3.3.1.1.4	Zeitplan	136
3.3.1.1.5	Infektion und Titration der Vakzineviren	138
3.3.1.1.6	Klinische Punktzahl	140
3.3.1.1.7	Temperatur	141
3.3.1.1.8	Leukozytenzählung	142
3.3.1.1.9	Serologische Untersuchungen	145
3.3.1.1.10	Analyse der aus Leukozytenkonzentrat reisolierten Viren	146
3.3.1.1.11	Zusammenfassung TV#29	147
4.0	Diskussion	149
4.1	Anforderungen an einen neuartigen CSFV Impfstoff	149
4.2	Der Sonderfall der persistenten Infektion	150
4.3	Die Inhibierung des angeborenen Immunsystems durch N ^{pro} und E ^{rns}	151
4.4	BVDV und CSFV Doppeldeletionsmutanten als Vakzine-Kandidaten	154
4.5	Die Dimerisierung des E ^{rns} -Proteins als Virulenzfaktor von CSFV	156
4.6	Konventionelle CSFV Lebendvakzine	160
4.7	CSFV DIVA-Vakzine	161
4.7.1	Eigenschaften der kommerziell verfügbaren CSFV DIVA-Vakzine	161
4.7.2	Aktuelle Ansätze zur Entwicklung neuartiger CSFV DIVA-Vakzinen	163
4.7.3	Die TAV-Epitop markierte CSFV Doppelmutante als DIVA-Vakzine	167

ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	172
TABELLENVERZEICHNIS	173
LITERATURVERZEICHNIS	174
PUBLIKATIONSVERZEICHNIS.....	183
DANKSAGUNG	184
SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....	185

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Adenin
A	Alanin (Ala)
A	Ampere
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
bidest.	bidestilliertes Wasser
BDV	"border disease virus"
BVD	Bovine virale Diarrhoe
BVDV	"bovine viral diarrhoea virus"
bzw.	beziehungsweise
c	centi
C	Cystein (Cys)
C	Cytosin
ca.	circa
CIAP	calf intestine alkaline phosphatase
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
cp	zytopathogen
CSFV	"classical swine fever virus"
C-terminal	carboxyterminal
D	Aspartat (Asp)
d.h.	das heißt
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dd	didesoxy
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DIVA	"differentiation between infected and vaccinated animals"
DMEM	Dulbecco's Minimal Essential Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dpi	"days post infection"
dpv	"days post vaccination"

Abkürzungsverzeichnis

ds	doppelsträngig
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E1	„envelope protein 1“
E2	„envelope protein 2“
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N,N-tetraessigsäure
EP	Elektroporation
E ^{rns}	„envelope protein ribonuclease secreted“
et al.	"et aliter" (und andere)
EtOH	Ethanol
FCS	"fetal calf serum"
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut
g	Gramm
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung
ggf.	gegebenenfalls
H	Histidin (His)
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HAX-I	"HS-1-associated protein X-1"
HCl	Salzsäure
HCV	Hepatitis C Virus
i.m.	intramuskulär
i.n.	intranasal
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IRAK	"Interleukin-1 receptor-associated kinase"
IRES	"internal ribosomal entry side"
IκBα	"nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha"
INF	Interferon
IRF	Interferon regulierender Faktor
JIV	"J domain protein interacting with viral protein"
k	Kilo
K	Lysin (Lys)
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton

Abkürzungsverzeichnis

KID	Kulturinfektiöse Dosis
KLH	"Keyhole Limpet Hemocyanin"
L	Leucin (Leu)
l	Liter
LB	Luria Bertrani
log	Logstufe
LUA	Landesuntersuchungsamt
m	Meter
m	milli
M	molar (mol/l)
mAk	monoklonaler Antikörper
Mda-5	"melanoma differentiation-associated protein 5"
MD	"mucosal disease"
min	Minute
mM	millimolar
MOI	"multiplicity of infection"
Mol	molar
MyD88	"Myeloid differentiation primary response gene (88)"
N	Asparagin (Asp)
n	nano
n.d.	nicht durchgeführt
ncp	nicht zytopathogen
N ^{pro}	Nicht-Strukturprotein N ^{pro}
NF-κB	"nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells"
NSP	Nicht-Strukturprotein
N-terminal	aminoterminal
NTP	Ribonukleosidtriphosphat
NTR	"non translated region"
OD600	optische Dichte bei 600 nm
ORF	"open reading frame"
p	pico
P	Prolin (Pro)
p.a.	pro analysi
PBS	"phosphate buffered saline"
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PI	persistent infiziert
Q	Glutamin (Gln)

Abkürzungsverzeichnis

QC-PCR	Quik Change®-PCR
R	Arginin (Arg)
RIG-I	“retinoic acid inducible gene I”
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRT-PCR	realtime Reverse Transkriptase PCR
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
s	Sekunde
S	Serin (Ser)
s.	siehe
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SD	"standard deviation"
sec	Sekunden
SNT	Serumneutralisationstest
ss	einzelsträngig
ssDNA	einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure
T	Threonin (Thr)
T	Thimidin
t	Zeit
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAV-Epitop	TAVSPTTLRT Epitop auf dem E2-Protein von CSFV (AS 140-149 E2)
TE	Tris-EDTA Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenamin
Temp.	Temperatur
TF	Transfektion
TLR	"toll like receptor"
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
TV	Tierversuch
U	Aktivitätseinheit (Enzyme)
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Valin (Val)
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
vergl.	vergleiche

Abkürzungsverzeichnis

Vol.	Volumen
vs.	versus
w/v	Gewicht pro Volumen %
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
μ	Mikro

Zusammenfassung

Gezielte Attenuierung und Markierung von Viren der klassischen Schweinepest durch Mutation - Ansätze zur Entwicklung einer neuartigen Vakzine gegen das Virus der klassischen Schweinepest zur Differenzierung infizierter von vakzinierten Tieren

Die klassische Schweinepest ist eine in Deutschland anzeigepflichtige, hoch kontagiöse Erkrankung der Haus- und Wildschweine, die mit hohen Tierverlusten einhergehen kann und eine große wirtschaftliche Bedeutung besitzt. Die Bekämpfung der Krankheit ist in Deutschland durch die Schweinepest-Verordnung geregelt, deren zentraler Punkt ein generelles Impfverbot ist. Eine Ausnahme hiervon stellen lediglich behördlich angeordnete Notimpfungen im Falle eines festgestellten Seuchenausbruchs dar. Diese Politik ist auch darin begründet, dass es gegenwärtig keine kommerziell verfügbaren DIVA ("Differentiation between Infected and Vaccinated Animals") Vakzinen gegen das Virus der klassischen Schweinepest (classical swine fever virus, CSFV) gibt, die die optimale Schutzwirkung einer rekombinanten Lebendvakzine mit einem zuverlässigen Markierungsprinzip im Sinne des DIVA-Kriteriums in sich vereinen.

Das zentrale Thema dieser Arbeit war daher die Identifizierung und Charakterisierung einer CSFV (Classical Swine Fever Virus) Mutante, die die hohen Anforderungen an eine neuartige CSFV DIVA-Vakzine erfüllen kann. Als Grundlage für eine solche Mutante wurde eine CSFV-Doppeldeletionsmutante getestet, die die attenuierenden Mutationen einer Deletion des für das Nichtstrukturprotein „N^{pro}“ (N-terminale Protease) kodierenden Genombereichs und einer Ausschaltung der RNase-Aktivität des Strukturproteins „E^{ms}“ ("envelope protein ribonuclease secreted") in sich vereint. In einem Tierexperiment mit tragenden Sauen konnte gezeigt werden, dass diese Mutante im adulten Tier völlig apathogen ist, die Bildung von CSFV-spezifischen neutralisierenden Antikörpern induziert und keine Etablierung von diaplazentaren persistenten Infektionen in den Feten stattfindet. In einem nächsten Schritt gelang es, diese CSFV-Doppeldeletionsmutante mit einer Negativmarkierung im Sinne des DIVA-Kriteriums zu kombinieren. Als Angriffspunkt hierfür wurde das hoch konservierte, CSFV spezifische Epitop TAVSPTTLRT (TAV-Epitop) im Strukturprotein „E2“ („envelope protein 2“) von CSFV gewählt. Es war möglich, verschiedene TAV-Epitop markierte CSF-Virusmutanten zu generieren, die sich im Sinne des DIVA-Kriteriums funktional und in der Tierpassage stabil erwiesen. Die TAV-Epitop Markierung führte allein nicht zu einer Attenuierung der Viren, ließ sich jedoch stabil mit attenuierenden Mutationen (N^{pro}-Deletion und Ausschaltung der E^{ms}-RNase) kombinieren. Eine TAV-Epitop markierte Doppelmutante konnte als vielversprechender Kandidat für eine neuartige CSFV DIVA-Vakzine identifiziert werden.

Für die Impfstoffentwicklung ist die Aufklärung von molekularen Mechanismen essentiell, die für die Virulenz der Erreger von Bedeutung sind. Die Dimerisierung des Strukturproteins „E^{ms}“ ist als Virulenzfaktor von Pestiviren in diesem Zusammenhang ein spannendes Thema. Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden daher aufbauend auf die Ergebnisse vorangegangener Arbeiten Experimente mit dimerisierungsnegativen CSFV-Mutanten durchgeführt. In diesen Mutanten war zum einen die Dimerisierung des E^{ms}-Proteins an Position Cystein 171 durch Deletion oder Mutation des Cysteins verhindert, und zum anderen wurde den Viren an der alternativen Position 209 im E^{ms}-Protein die Möglichkeit zur Restaurierung der Dimerisierung durch eine Cystein-Substitution gegeben. Diese Versuche ergaben neue Hinweise darauf, dass die Fähigkeit zur E^{ms}-Dimerisierung einen Virulenzfaktor von Pestiviren darstellt. Abgesehen von individuellen Schwankungen bei einzelnen Tieren ergab sich jedoch im Tierversuch ein heterogenes Bild, sodass die Experimente als Grundlage für weitere Untersuchungen zu diesem interessanten Thema zu sehen sind.

Summary

Directed attenuation and labelling of classical swine fever virus via mutation - Approaches towards novel vaccines that enable the differentiation between infected and vaccinated animals

Classical swine fever is a highly contagious viral disease of swine and wild boar that leads to important economic losses. In Germany the abatement of the disease is regulated via a national decree, the so called "Schweinepest-Verordnung". This decree constitutes a general ban of vaccination against classical swine fever. In case of an outbreak of classical swine fever emergency vaccination can be performed but only upon official approval of the authority. This control policy is at least partially based on the fact that there are currently no commercial vaccines available that combine the optimized protective qualities of an attenuated live vaccine with a functional labelling concept to differentiate infected from vaccinated animals.

Therefore, the essential topic of this work was the identification and characterization of a promising classical swine fever virus (CSFV) mutant that could possibly serve as candidate for a novel classical swine fever virus DIVA (**D**ifferentiation between **I**nfected and **V**accinated **A**nimals) vaccine. As backbone for such a candidate we tested a CSFV double deletion mutant that combines two attenuating mutations: the deletion of the non-structural protein "N^{pro}" coding region of the genome and the abrogation of the structural protein "E^{ms}" ("envelope protein RNase secreted") RNase activity. In an animal trial employing pregnant sows we were able to show that the classical swine fever virus double deletion mutant proved completely apathogenic for adult animals, that it was able to induce significant titres of classical swine fever virus specific neutralizing antibodies and that it was unable to establish persistent infection in the fetuses.

In a next step, we established a negative labelling strategy using the highly conserved B-cell epitope TAVSPTTLRT ("TAV-epitope") contained in the structural protein "E2" ("envelope protein 2") of classical swine fever virus. We found out that the TAV-epitope mutations alone didn't lead to an attenuated phenotype of the virus in the natural host, but remained stable and functional via animal passage. Furthermore, it proved possible to combine the TAV-epitope labelling with known attenuating mutations such as the above described double deletion. In conclusion, the TAV-epitope labelled CSFV double deletion mutant constitutes a promising candidate for a future DIVA live vaccine against classical swine fever.

For the development of novel vaccines, knowledge of the molecular mechanisms underlying pathogen virulence is of great importance. In this context, structural protein "E^{ms}" dimer formation as virulence factor of pestiviruses is a fascinating topic. In an animal experiment two different mutants in which the ability to generate "E^{ms}" dimers was abrogated via mutation

or deletion of cysteine 171 were tested. In addition, these variants were able to form “E^{ms}” dimers via a newly introduced cystein codon at position 209. The finding of this experiment indicated that the location of “E^{ms}” dimers is indeed linked to CSFV virulence. Since however variations were observed in this experiment for individual animals, the findings of this experiment were heterologous and have to be regarded as basis for future research in the matter of “E^{ms}” dimerization.

1.0 Einleitung

1.1 Pestiviren

Pestiviren gehören gemeinsam mit den Flaviviren, den Hepaciviren und den Pegiviren in die Familie der *Flaviviridae* [1]. Beispiele für Vertreter des Genus *Flavivirus* sind human- und tierpathogene Viren wie das Gelbfieber-, Dengue- und Looping-III-Virus und das Virus der Frühsommermeningoenzephalitis (FSME), welches in Deutschland von zunehmender Bedeutung ist. Gemeinsam ist diesen Viren ihre Übertragung durch Arthropoden. Einziger Vertreter des Genus *Hepacivirus* ist das humanpathogene Hepatitis C Virus (HCV). Persistente Infektionen mit diesem Virus haben oft eine infauste Prognose und sind daher von hoher humanpathogener Relevanz. Zu den *Pegiviren* zählt die Gruppe der GB-Viren. Ein Vertreter dieser Gruppe ist das bei immunsupprimierten Menschen gefundene GB-C Virus. Während die übrigen Genera der Familie *Flaviviridae* auch humanpathogene Viren beinhalten, umfasst das Genus *Pestivirus* ausschließlich tierpathogene Viren, die Erreger von wirtschaftlich sehr bedeutenden Krankheiten bei landwirtschaftlichen Nutztieren sind. Zu diesen Viren gehören das Virus der Bovinen viralen Diarrhoe (BVDV), das Virus der klassischen Schweinepest (CSFV) und das „Border Disease“ Virus der Schafe (BDV). Eine besondere Eigenschaft der Pestiviren ist, dass jede Virusspezies in zwei verschiedenen Biotypen vorkommt. Diese beiden Biotypen werden gemäß ihrer Eigenschaften in der Zellkultur unterschieden. Während nicht zytopathogene (ncp) Viren in der Zellkultur replizieren ohne die Zellen zu schädigen, geht die Vermehrung zytopathogener (cp) Viren in der Zellkultur mit der Apoptose und Lyse der Zellen einher [1, 2].

Alle Mitglieder der Familie *Flaviviridae* teilen bestimmte Eigenschaften. Ihnen allen gemein sind ihre umhüllten Viruspartikel, ihr einzelsträngiges RNA-Genom positiver Polarität und ihre Genexpressionstrategie mittels Translation eines einzigen langen Polyproteins. Die Infektion erfolgt über rezeptorvermittelte Endozytose [3, 4]. Der niedrige pH-Wert im Endosom induziert dann wahrscheinlich die Fusion der Virusmembran mit der Endosomenmembran. Hierbei wird die verpackte RNA ins Zytosol freigesetzt. Aufgrund der Tatsache, dass das virale Genom eine positive Polarität aufweist, kann es im Anschluss direkt als mRNA dienen. Bei der Translation wird ein Polyprotein hergestellt, das durch zelluläre und virale Proteasen co- und posttranslational in die einzelnen viralen Proteine gespalten wird. Im Anschluss dient die Plusstrang-RNA als Matrize für die Replikation. Neu gebildete Plusstrang-RNA wird wiederum in neue Viruspartikel verpackt, bevor diese aus der Zelle ausgeschleust werden [1].

1.1.1 Morphologie und Genomaufbau

Pestiviren bilden membranumhüllte Viruspartikel, die einen Durchmesser von ca. 40-60 nm aufweisen [5]. Auf der Oberfläche der Membran können drei Strukturproteine detektiert werden: die Glykoproteine E^{ms} (ribonuclease secreted), E1 und E2. Das Kapsidprotein ist im Inneren des Partikels lokalisiert. Eine Besonderheit des Kapsidproteins ist, dass es vermutlich kein starres Kapsid ausbildet, welches das Genom umschließt, sondern die RNA nur mit dem Kapsidprotein assoziiert ist. Diese Verbindung stabilisiert und schützt die RNA offenbar vor der Erkennung durch zelluläre Faktoren [6].

Das virale Genom besteht aus einer einzelsträngigen RNA positiver Polarität und umfasst ca. 12300 Nukleotide, welche einen einzigen offenen Leserahmen beinhalten [7, 8]. Dieser offene Leserahmen codiert für ein Polyprotein von ca. 4000 AS und wird von 5' und 3' nicht translatierten Regionen flankiert [7, 9]. Die Initiation der Translation wird durch eine IRES vermittelt, die sich in der 5' nicht translatierten Region befindet [10, 11]. In der infizierten Zelle wird das entstehende Polyprotein durch zelluläre und virale Proteasen co- und posttranslational in die viralen Strukturproteine (C, E^{ms}, E1 und E2) und die Nichtstrukturproteine (N^{pro}, p7, NS2/3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) gespalten (Abbildung 1).

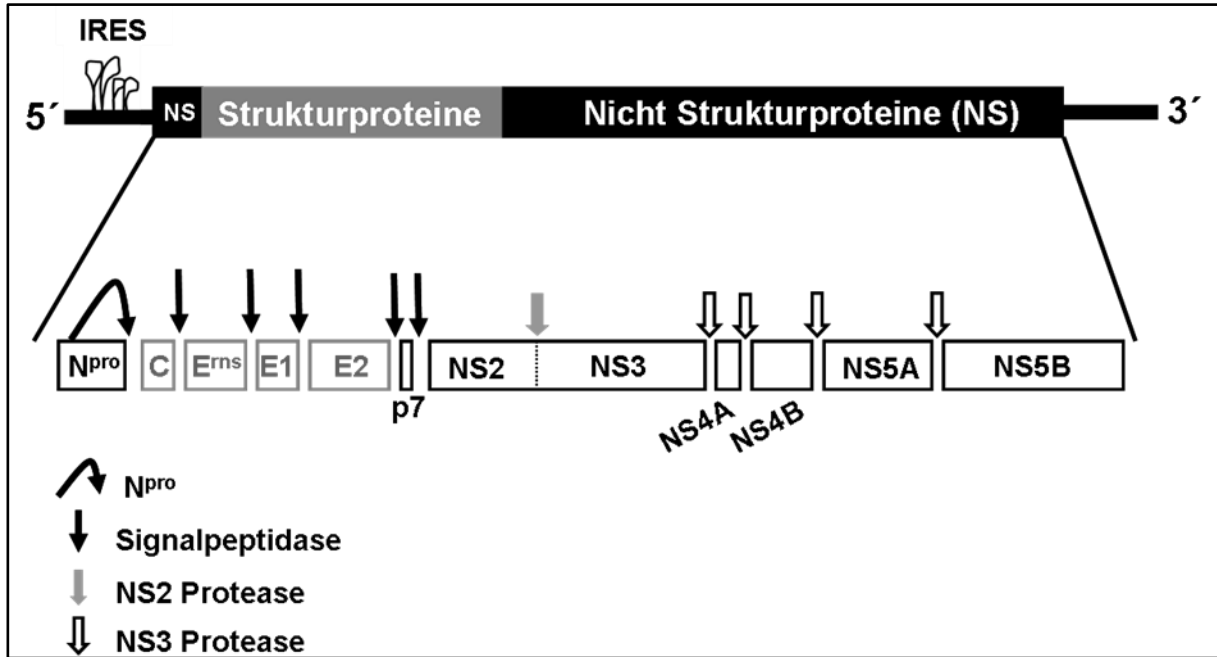


Abbildung 1: Genomorganisation von Pestiviren

Schematische Darstellung der Genomorganisation von Pestiviren. Im 5' Bereich ist die IRES dargestellt, die Ribosomen rekrutiert und den Startpunkt der Translation determiniert. Darunter sind die einzelnen Proteine des Polyproteins proportional zu ihrer Größe abgebildet. Die autokatalytische Spaltung von N^{pro} ist durch einen gekrümmten schwarzen Pfeil dargestellt. Die Signalpeptidasespaltung zwischen den vier Strukturproteinen und p7 ist durch schwarze Pfeile symbolisiert, die autokatalytische Spaltung von NS2-3 durch einen grauen Pfeil und die Spaltung der übrigen Nichtstrukturproteine durch die NS3/4A-Protease durch einen weißen Pfeil [12].

Das erste Protein im Polyprotein ist die Autoprotease N^{pro}, die sich selbständig vom Kapsid abspaltet. Da dieses Protein gemeinsam mit den Glykoproteinen E^{ms} und E2 in dieser Arbeit von besonderer Bedeutung ist, wird auf diese Proteine in den Abschnitten 1.1.2, 1.1.3 und 1.1.4 gesondert eingegangen. Im Polyprotein schließen sich die viralen Strukturproteine C, E^{ms}, E1 und E2 an N^{pro} an [13]. E1 und E2 sind integrale Membranproteine [14]. Alle drei Glykoproteine bilden dimere Strukturen aus. Es finden sich sowohl Homodimere von E^{ms} und E2, als auch Heterodimere aus E1 und E2 bzw. E^{ms} und E2. Diese Dimere sind über Disulfidbrücken kovalent verbunden [15, 16]. Auf die Strukturproteine folgt das p7-Protein im Polyprotein. Ähnlich dem HCV p7-Protein wird vermutet, dass das pestivirale p7 Ionenkanäle ausbilden kann. Diese Eigenschaft erlaubt die Spekulation, dass p7 bei der Freisetzung der Viruspartikel aus der Zelle beteiligt sein könnte [14]. Das sich anschließende Protein NS2 spaltet in seiner Eigenschaft als Autoprotease an seinem eigenen C-Terminus das Vorläuferprotein NS2-3 in die einzelnen Proteine NS2 und NS3, wobei dieser Vorgang über den zellulären Faktor JIV (J domain protein interacting with viral protein) reguliert wird [17]. Diese Spaltung zwischen NS2 und NS3 spielt eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung der beiden Biotypen von Pestiven. Im Fall von ncp Pestiviren ist diese Spaltung streng

reguliert. NS2-3 wird bei ncp Pestiviren nur in der Anfangsphase der Infektion gespalten. Bei cp Pestiviren hingegen findet die Spaltung zwischen NS2 und NS3 anhaltend statt und führt so zu einer dauerhaften Expression von NS3 [2]. Da freies NS3 wiederum essentiell für die RNA-Replikation ist, korreliert die Menge an freiem NS3 direkt mit der Menge an gebildeter viraler RNA. NS3 ist eine Protease, die im Komplex mit dem Kofaktor NS4A die im Polyprotein auf NS3 folgenden Nichtstrukturproteine prozessiert [18]. Über die Funktionen von NS4B und NS5A der Pestiviren ist bislang wenig bekannt. NS5B ist die pestivirale RNA-abhängige RNA-Polymerase und damit essentiell für die Replikation des viralen Genoms [19, 20].

1.1.2 Das Nichtstrukturprotein N^{pro}

Die Autoprotease N^{pro} ist das einzige pestivirale Protein, das für die Viren nicht essentiell ist, so dass die N^{pro} codierende Region aus dem viralen Genom deletiert werden kann [21]. Jedoch bilden Viren ohne N^{pro} einen attenuierten Phänotyp aus [22]. N^{pro} spielt gemeinsam mit dem Glykoprotein E^{ms} eine entscheidende Rolle bei der Blockierung des angeborenen Immunsystems durch Pestiviren. Für N^{pro} ist eine Interaktion mit verschiedenen Faktoren des angeborenen Immunsystems beschrieben. Es ist bekannt, dass N^{pro} den Abbau des zellulären Faktors IRF-3 durch das Proteasom induziert [23-25] und es konnte ein Zink-bindendes Motif in N^{pro} identifiziert werden, das für den Abbau von IRF-3 [26] und für die Interaktion von N^{pro} mit IRF-7 [27] verantwortlich ist. Der zelluläre Faktor IRF-3 spielt in der Zelle unter anderem eine entscheidende Rolle bei der Erkennung von intrazellulär vorkommender viraler RNA. Durch Komponenten des angeborenen Immunsystems kann virale RNA in der Zelle detektiert werden, was zur Aktivierung verschiedener Signalwege führt. Bei Aktivierung mehrerer Signalkaskaden wird IRF-3 phosphoryliert. Diese Phosphorylierung wiederum leitet eine Homodimerisierung ein, die die Translokation von IRF-3 in den Zellkern zur Folge hat. Dort wirkt das dimerisierte IRF-3 als Transkriptionsfaktor und sorgt für die transkriptionale Aktivierung des INF- β -Gens. In Folge dessen wird Interferon gebildet und die Zelle in einen antiviralen Status versetzt. Durch den N^{pro} vermittelten Abbau von IRF-3 wird also die Reaktion auf die Detektion viraler RNA in der Zelle unterbunden. So erhält das Virus einen Wachstumsvorteil. Des Weiteren wurde eine Interaktion von N^{pro} mit den Faktoren I- κ B α [28] und HAX-1 [29] beschrieben. Beide Faktoren sind involviert in die Aktivierung von NF- κ B und in die Inhibierung der Apoptose.

Es gibt Hinweise darauf, dass CSF Viren virulent bleiben können, in denen spezifisch die Fähigkeit des N^{pro}-Proteins IRF-3 zu degradieren ausgeschaltet ist. Somit ist die beobachtete Attenuierung von Viren, in denen das N^{pro}-Protein deletiert wurde, trotz der verschiedenen

Funktionen von N^{pro} vermutlich in erster Linie in einer niedrigeren Translationsaktivität der mutierten genomischen RNA begründet und nicht in einer fehlenden Interaktion mit IRF-3 [30].

1.1.3 Das Glykoprotein E^{ms}

Das Glykoprotein E^{ms} folgt als erstes virales Glykoprotein im Polyprotein auf N^{pro} und ist unentbehrlich für die Bildung infektiöser Viruspartikel. E^{ms} ist auffällig stark glykosyliert und diese Glykosylierungen haben einen großen Einfluss auf die immunogenen Eigenschaften des Proteins. Neben E2 stellt E^{ms} das wichtigste Antigen von Pestiviren dar und induziert die Bildung von neutralisierenden Antikörpern in infizierten Tieren. Darüber hinaus hat das Protein einige interessante Eigenschaften. Eine Besonderheit von E^{ms} stellt seine Fähigkeit zur Dimerisierung dar. Das Protein enthält 8 – 9 Cysteine je nach Virusstamm. Die ersten 8 Cysteine bilden intramolekulare Disulfidbrückenbindungen aus, die die 3D-Struktur des Proteins stabilisieren. Über das neunte Cystein, das als einziges nicht in allen Pestiviren konserviert ist, können sich Homodimere bilden. Wird dieses Cystein an Position 171 des E^{ms}-Proteins deletiert, so entsteht eine Virusmutante, die im natürlichen Wirt attenuiert ist [31].

E^{ms} ist zwar ein essenzieller Bestandteil der Virushülle, besitzt jedoch keine Transmembranregion oder einen klassischen Membrananker. Die Membranverankerung wird vielmehr durch den C-Terminus des Proteins vermittelt, der eine amphipathische Helix ausbildet und leicht schräg in die Membran eingelagert ist, diese aber nicht durchspannt [12, 32]. Diese ungewöhnliche Membranverankerung steht in direktem Zusammenhang mit einer weiteren ungewöhnlichen Eigenschaft des Proteins. Die Bezeichnung E^{ms} steht für „envelope protein ribonuclease secreted“. E^{ms} besitzt eine intrinsische RNase-Aktivität [33, 34], was für ein Glykoprotein eines Plusstrang RNA-Virus sehr ungewöhnlich ist, und wird zusätzlich zu einem gewissen Anteil von infizierten Zellen in den Extrazellularraum sekretiert [35].

Im Blut von CSFV-infizierten Schweinen und BVDV-infizierten Rindern kann sowohl freies, als auch an Viruspartikel gebundenes E^{ms} in signifikanten Mengen nachgewiesen werden, so dass die Annahme berechtigt erscheint, dass die sekretierte und die nicht-sekretierte Form von E^{ms} unterschiedliche Funktionen innehaben können.

Obwohl die RNase- Aktivität des E^{ms}-Proteins für das Virus nicht essentiell ist, führt ihre Ausschaltung durch gezielte Mutagenese zur Attenuierung des Virus [36, 37]. Die RNase stellt also einen wichtigen Virulenzfaktor von Pestiviren dar. In einem Zellkultursystem konnte gezeigt werden, dass bei Anwesenheit von aufgereinigtem E^{ms} im Zellkulturüberstand die Zugabe von extrazellulärer RNA nicht mehr zu einer Interferonantwort der Zelle führt,

während intrazelluläre dsRNA die Interferonantwort nach wie vor auslösen kann [38, 39]. Diese Beobachtung begründete die Hypothese, dass sekretiertes E^{ms} eventuell außerhalb der Zelle die Aktivierung des angeborenen Immunsystems verhindern kann, indem die RNase dafür sorgt, dass freie RNA außerhalb der Zelle schnell abgebaut wird und so nicht mehr von Komponenten des angeborenen Immunsystems detektiert werden kann. Es bleibt in diesem Zusammenhang allerdings die Frage offen, woher diese extrazelluläre RNA stammen sollte und ob das sezernierte E^{ms} noch zusätzliche Aufgaben erfüllt.

1.1.4 Das Glykoprotein E2

Das Glykoprotein E2 ist das rezeptorbindende Protein von Pestiviren. Als integrales Membranprotein kann es über Disulfidbrückenbindungen gebunden als Homodimer oder als Heterodimer mit E1 vorkommen [14]. Rekombinantes CSFV E2 ist in der Lage, an Zellen zu binden und deren Infektion durch CSFV oder BVDV zu blockieren. Dies lässt vermuten, dass es einen gemeinsamen Rezeptor oder Co-Rezeptor für den Eintritt dieser beiden Pestiviren in die Zelle gibt [40]. E2 ist das Hauptantigen, welches neutralisierende Antikörper in CSFV infizierten Tieren induziert [16, 41, 42]. Verschiedene wichtige antigene Regionen sind in der Literatur für das E2-Protein beschrieben. Dazu gehören konformative [43-46] und lineare Epitope [47-51]. Das für diese Arbeit relevante lineare TAV-Epitop befindet sich an den Positionen 140-148 des E2-Proteins, hat die Aminosäuresequenz TAVSPTTLRT und wird von dem monoklonalen Antikörper A18 erkannt. Das TAV-Epitop ist spezifisch für CSFV, evolutionär fast zu 100% konserviert und ein Ziel neutralisierender Antikörper [48, 52].

1.2 Die klassische Schweinepest

Die klassische Schweinepest ist eine fieberhafte Allgemeinerkrankung, die mit Symptomen in verschiedenen Organsystemen einhergehen kann. Die klassische Schweinepest wird hervorgerufen durch das „Classical Swine Fever Virus“ (CSFV). Dieses Virus ist streng wirtsspezifisch, nur Haus- und Wildschweine können von CSFV infiziert werden. Bei der klassischen Schweinepest ist die Virulenz des verursachenden Virusstammes entscheidend für die Schwere und die Form der auftretenden Erkrankung. Hoch virulente Stämme können perakute bis akute Verlaufsformen mit hoher Letalität in Ferkeln verursachen, während niedrig virulente Stämme eher einen chronischen Verlauf der Krankheit bewirken können. Bei der perakuten Verlaufsform sterben die Tiere innerhalb kürzester Zeit und als einziges klinisches Symptom wird häufig nur das hohe Fieber bemerkt. Typische klinische Symptome eines akuten Verlaufs von klassischer Schweinepest sind Fieber, Mattigkeit, Anorexie, Durchfall, zentralnervöse Störungen und Hämorrhagien der Haut, der inneren Organe und der Schleimhäute. Im Blutbild zeigen sich eine ausgeprägte Leukopenie und B-Zell Depletion [14, 53]. Eine akute Form von klassischer Schweinepest kann in adulten Tieren (z.B. Zuchtsauen) jedoch auch ohne klinische Symptome verlaufen. Dieser als subakut bezeichnete Verlauf der Krankheit fällt oft erst durch Fruchtbarkeitsstörungen der betroffenen Tiere auf. Chronische Verlaufsformen von klassischer Schweinepest können lange Zeit unbemerkt in Herden bestehen, da die Symptome alternierend auftreten können und oftmals unspezifisch sind. Chronisch infizierte Tiere erscheinen oft in ihrer Entwicklung verzögert („Kümmerer“), zeigen intermittierende Durchfälle, einen wechselnden Appetit und Fruchtbarkeitsstörungen. Oft tritt in unregelmäßigen Abständen Fieber auf, auch spontane Todesfälle sind möglich. Sowohl die chronische, als auch die perakute, akute und subakute Form von klassischer Schweinepest sind das Ergebnis einer horizontal, oro-nasal übertragenen Infektion von Tier zu Tier. Im Gegensatz dazu ist die persistente Infektion das Resultat einer vertikalen diaplazentaren Übertragung des Virus von der Mutter auf den Fetus während der Trächtigkeit. Ferkel, die persistent infiziert geboren werden, können zunächst völlig normal erscheinen und über mehrere Monate leben. Sie können jedoch auch „kümmerern“ oder bereits lebensschwach geboren werden. Man bezeichnet diese Form der Krankheit auch als „late onset“, da sie häufig erst nach einigen Wochen oder Monaten sichtbar wird [54].

Während in der Vergangenheit vorwiegend perakute und akute Ausbrüche von klassischer Schweinepest gemeldet wurden, sind die heutigen Ausbrüche eher durch chronische Verläufe gekennzeichnet. Durch diese Tatsache wird jedoch die schnelle Diagnosestellung erschwert [55, 56].

Die klassische Schweinepest ist in Deutschland anzeigepflichtig und ihre Bekämpfung wird im Detail in der Schweinepest-Verordnung geregelt. Ein zentraler Punkt in dieser Verordnung

ist das generelle Impfverbot des § 2. Ausnahmen sind unter bestimmten Voraussetzungen möglich. Dazu zählen Notimpfungsprogramme bei Hausschweinen zur Einschränkung der Ausbreitung der Krankheit im Seuchenfall und Impfprogramme für Wildschweine, die das Hauptreservoir des Erregers in Europa darstellen.

Für Notimpfungen stehen als DIVA („differentiation between infected and vaccinated animals“)-Vakzine zwei kommerziell erhältliche E2-Subunit-Marker-Vakzine zur Verfügung. Da durch die Immunisierung mit diesen Vakzinen ausschließlich Antikörper gegen das E2-Protein gebildet werden, ist eine Differenzierung geimpfter und nicht-geimpfter Tiere mittels eines E^{ms}-ELISAs möglich. Diese Vakzine haben jedoch leider im Vergleich zu den nicht-markierten rekombinanten Lebendvakzinen (*C-Stamm*-Vakzine) den Nachteil, dass ihre Schutzwirkung später einsetzt und selbst bei mehrmaliger Applikation weniger belastbar ist (vergl. 4.7.1). Damit besteht weiterhin die Gefahr einer unbemerkten Weiterverbreitung des Virus in einer geimpften, aber nicht ausreichend immunen Tierpopulation. Zudem schützen alle momentan verfügbaren kommerziellen CSFV-Impfstoffe nicht zuverlässig vor der Gefahr der persistenten Infektion.

1.3 „Persistenz“ durch Immunevasion

Allen Pestiviren ist gemein, dass sie in der Lage sind, in trächtigen Tieren die Feten diaplazentar zu infizieren. Eine solche Infektion kann verschiedene Folgen haben. Je nach Virulenz des Erregers und dem Trächtigkeitsstadium des Muttertieres kann es infolge der Infektion zum Tod des Fetus kommen (Resorption der Frucht, Abort, Mummifizierung oder Totgeburt sind die Folge), der Fetus kann serokonvertieren und die Infektion überleben oder aber der Fetus kann ohne Serokonversion persistent mit dem Virus infiziert werden [14]. Eine persistente Infektion kann im Fetus nur dann erfolgreich etabliert werden, wenn das Virus den Fetus zu einem Zeitpunkt infiziert, zu dem das Immunsystem des Fetus noch nicht vollständig entwickelt ist. So erreicht das Virus, dass es vom Immunsystem des Wirtes nicht als „fremd“, sondern vielmehr als „eigen“ erkannt wird. Auf diese Weise schalten Pestiviren die adaptive Immunantwort ihrer Wirte gegen ihre eigenen Proteine selektiv komplett aus. Es kommt also weder zur Bildung von pestivirus-spezifischen Antikörpern, noch zur spezifischen T-Zell-Antwort. Diese Immunevasionsstrategie ist in dieser radikalen Form für Pestiviren einzigartig. Ein persistent infiziertes Tier ist also aus Sicht des Virus die optimale Strategie, um in einer Population dauerhaft unbeschadet fortbestehen zu können. Denn diese Tiere scheiden große Mengen an Virus aus und können so zur Durchseuchung ihrer Kontakttiere beitragen ohne in der Regel selbst klinisch krank zu sein. Diese Form von pestiviralen Infektionen ist daher von besonders großer wirtschaftlicher Bedeutung und macht die nachhaltige Bekämpfung von klassischer Schweinepest besonders schwierig.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die Bekämpfung der klassischen Schweinepest in Deutschland und in Europa beruht auf einer Politik des „Nicht-Impfens“ und geht im Seuchenfall einher mit der Keulung ganzer Bestände und sehr großer Tierzahlen. Die wirtschaftlichen und sozialen Folgen dieser Politik können sehr einschneidend für die betroffenen Betriebe sein und ihre wirtschaftliche Existenz bedrohen. Die Akzeptanz radikaler Keulungsprogramme ist des Weiteren in der Bevölkerung sehr umstritten. Stünde ein geeigneter neuartiger DIVA-Impfstoff gegen die klassische Schweinepest zur Verfügung, so könnte die Politik zur Bekämpfung der Seuche eine Änderung erfahren. An die Stelle der Strategie des „Impfverbotes“ könnten nationale „Impfprogramme“ zumindest in den Ländern der EU treten.

Ziel dieser Arbeit war es daher - unter Berücksichtigung der bereits in der Arbeitsgruppe durchgeführten Untersuchungen zu verschiedenen rekombinanten CSFV- und BVDV-Virusmutanten - eine vielversprechende CSFV-Mutante zu etablieren und zu charakterisieren, die sich als Kandidat für eine neuartige CSFV-DIVA Vakzine eignet.

2.0 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

AB Hitachi 3130 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Weiterstadt
Analysenwaage Satorius Analytic	Satorius, Göttingen
Blutmischpipette (Leukozyten)	Hecht, Sondheim
CO ₂ Inkubator Steri-cult 200	Forma Scientific, USA
Eismaschine AF 10	Scotsman Ice Systems, USA
Elektroporationsküvetten	Bio-Rad, München
Elektroporator PG200 Progenetor II	Hoefer, USA
Fieberthermometer	Hartmann, Heidenheim
Flüssigkeits-Absaugsystem BVC	Vacuubrand, Wertheim
Fluoreszenzmikroskop Nikon ECLIPSE Ti	Nikon, Düsseldorf
Fluoreszenzmikroskop Zeiss mit ApoTome® Modul	Zeiss, Oberkochen
Gassicherheitsbrenner flammy S	Schütt, Göttingen
Geldokumentationssystem E.A.S.Y	Herolab, Wiesloch
Geldokumentationssystem Quantum	peqlab, Erlangen
Gelelektrophoresekammer horizontal	Feinmechanik, FLI Tübingen
Glasgefäße	Schott, Mainz
Hämatologie-Automat Sysmex xt 2000i	Sysmex, Norderstedt
Heizlüfter astron 2001	Sprenger, St. Andreasberg
Heiz-Magnetrührer IKAMAG RCT	IKA Labortechnik, Staufen
Inkubator B5050	Heraeus, Hanau
Invertmikroskop Diavert	Leitz, Wetzlar
Kühlfalle	Bachhofer, Reutlingen
Kühlschrank Liebherr	Liebherr, Ochsenhausen
Kühltischzentrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg
Mikropipettierhelfer	Brand, Wertheim
Mikrowellengerät HMG 760/62.B	Bosch, Gerlingen
Minifuge 2	Heraeus, Hanau
PCR-Gerät Gene Amp 9600	Perkin Elmer, USA
PCR-Gerät Trio Thermoblock	Biometra, Göttingen

pH-Meter Calcimetric	Knick, Berlin
Pipetten (Einkanal / 12-Kanal)	Eppendorf, Hamburg / Gilson, Frankreich / Abimed, Langenfeld
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Vitaris AG, Baar
Pistill	Roth, Karlsruhe
Power-Supply PS500XT	Hoefer, USA
Reibschale	Roth, Karlsruhe
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific, UK
Schüttelinkubator G25	New Brunswick Scientific, UK
Schütteltisch The Belly Dancer	Fröbel Labortechnik, Lindau
Schwenktisch/Wippschüttler Rockomat	Tecnomara, Fernwald
Schüttler IKA-VIBRAX-VXR	IKA Labortechnik, Staufen im Breisgau
Speed Vac Concentrator (Savant)	Bachhofer, Reutlingen
Spektralphotometer Ultrospec 3000	Pharmacia Biotech, England
Sterilbank	Prettl, Pfullingen
Sterilbank FlowSafe® B-[MaxPro] ² – 130	Berner International, Elmshorn
Sterilbank Safe2020	Thermo Scientific, Langenselbold
Sterilbank LaminAir HB2472	Heraeus, Hanau
Thermodrucker P93D	Mitsubishi, Japan
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Thermostatic Circulator 2219 Multitemp II	Bromma, Schweden
Tiefkühlschrank Liebherr (-20°C)	Liebherr, Ochsenhausen
Tiefkühltruhe Heraeus (-70°C)	Heraeus, Hanau
Transilluminator (254 nm)	Bachofer, Reutlingen
Transilluminator (302 nm)	Vetter, Ammerbuch
Triple Timer	Conrad, Hirschau
Vakuumpumpe	Edwards, UK
Varifuge RF	Heraeus, Hanau
Vibrator 338, Rüttler für Blutmischpipetten	Hecht, Sondheim
Vortex Vibrofix VF1	Bachofer, Reutlingen
Waage Mettler PM2000	Mettler, Gießen
Wasserbad HAAKE D8	Bachofer, Reutlingen
Wasserbad Julabo U3	Bachofer, Reutlingen
Wasserbad W350T	Memmert, Schwabach
Zählkammer, Fuchs-Rosenthal	Hecht, Sondheim
Zählkammer, Neubauer	Hecht, Sondheim
Zentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg

2.1.2 Chemikalien

0,5-10 kb RNA Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
0.24-9.5 kb RNA Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
1 kb Plus DNA Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
Aceton	Roth, Karlsruhe
Acridinorange	Serva, Heidelberg
Acrylamid (40%) (29:1)	AppliChem, Darmstadt
Agarose Broad Range	Roth, Karlsruhe
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Sigma, München
Ammoniumpersulphat (APS)	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Serva, Heidelberg
Bacto-Agar	Becton Dickinson, USA
Bacto-Trypton	Becton Dickinson, USA
Bacto-Yeast-Extrakt	Becton Dickinson, USA
Biotin	Merck, Darmstadt
Blasticidin	InvivoGen, Toulouse (Frankreich)
Bovine Serum Albumin Fraktion V (BSA)	New England Biolabs, Schwalbach
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Calciumchlorid-2-hydrat (CaCl ₂ ·H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Chloroform	Roth, Karlsruhe
DABCO (1,4-diazabicyclo-[2,2,2]-octane)	Sigma, München
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Serva, Heidelberg
DCS (Donor Calf Serum)	Harmon Technological (USA)
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Desoxycholat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Desoxy-Nukleotidtriphosphat (dNTP)	Amersham Biosciences, Freiburg
D-Glukose	Merck, Darmstadt
Dikaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DDT)	Roche Applied Science, Mannheim
DMEM (1x)	gibco® by life technologies™, USA
Erythrosin B	Sigma-Aldrich, Steinheim
Essigsäure	Hoechst, Dortmund
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamidtetraessigsäure (EDTA)	Serva, Heidelberg
Fetal calve serum (FCS)	Biochrom, Berlin

Formaldehyd	Merck, Darmstadt
GelRed™	Biotrend, Köln
Gentamycin	Biochrom, Berlin
Glukose	Merck, Darmstadt
Glycerin (87 %)	Merck, Darmstadt
Glycin	Fluka, Steinheim
Glyoxal (40 %)	Fluka, Steinheim
Harnstoff	Merck, Darmstadt
Heparin	Serva, Heidelberg
HiDi™	Applied Biosystems, Darmstadt
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat (KAc)	Riedel-de-Haën, Seelze
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	Merck, Darmstadt
L-Alanin	Fluka, Steinheim
L-Asparaginsäure	Fluka, Steinheim
L-Glutaminsäure	Fluka, Steinheim
L-Prolin	Fluka, Steinheim
Magnesiumchlorid (MgCl ₂ ·6H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat (NaAc)	Serva, Heidelberg
Natriumbicarbonat (NaHCO ₃)	Fluka, Steinheim
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
NEBuffer 1	New England Biolabs, Schwalbach
NEBuffer 2	New England Biolabs, Schwalbach
NEBuffer 3	New England Biolabs, Schwalbach
NEBuffer 4	New England Biolabs, Schwalbach
Nukleosidtriphosphat (Ultrapure dNTP Set)	Pharmacia Biotech, USA
Orange G	Fluka, Steinheim
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
Penicillin G	Grünenthal, Aachen
Perchlorsäure	Merck, Darmstadt
Phenol	Qbiogene, Frankreich

Phenolrot	Merck, Darmstadt
Phosphorsäure (H ₃ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Polyuridylic Acid	Pharmacia Biotech, USA
Salzsäure (HCl)	Riedel-de-Haën, Seelze
Saponin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Sephadex G-50	Amersham Bioscience, Freiburg
Streptomycin	Sanavita, Werne
TEMED	Sigma, München
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Invitrogen, Karlsruhe
Triton X-100	Merck, Darmstadt
25% Trypsin-EDTA	gibco®, Invitrogen, Karlsruhe
Türk Lösung	Merck, Darmstadt
Xylencyanol	Fluka, Steinheim

2.1.3 Medien, Lösungen und Puffer

Sofern nicht anders benannt, wurden alle Lösungen mit demineralisiertem Wasser aus einer Millipore Anlage hergestellt.

Acteon-Methanol	50 % (w/v)	Aceton
	50 % (w/v)	Methanol
Acridinorangelösung	0,2 % (w/v)	Acridinorange-Stammlösung in 1xPhosphatpuffer
Acridinorange-Stammlösung	10 mg/ml	Acridinorange
Antibiotikastammlösung	1 Mio I.U.	Penicillin
	1000 mg	Streptomycin
		auf 15 ml PBS Endkonzentration/ml:
		66667 IU Penicillin
		66,6 mg Streptomycin
APS-Lösung	10 %	APS
BSA-Lösung	2 %	BSA in PBS
CaCl ₂ -Lösung	60 mM	CaCl ₂
	15 % (v/v)	Glycerin
	10 mM	Pipes (pH 7,1)
DMEM +FCS	50 ml	FCS
	1 ml	Antibiotikastammlösung plus 500 ml DMEM (1x)
DMEM	1ml	Antibiotikastammlösung plus 500 ml DMEM (1x)

Material und Methoden

dNTP-Mix (50x)	10 mM	dATP
	10 mM	dCTP
	10 mM	dGTP
	10 mM	dTTP
Erythrosin B-Lösung	10 mg	Erythrosin B auf 10 ml PBS
FR-Puffer	0,125% (w/v)	Orange G
	15 % (w/v)	Ficoll400
	5 %	TAE
Glyoxallösung	8,8 M	Glyoxal entionisiert
GelRed-Lösung	0,03 % (w/v)	GelRed
	0,1 M	NaCl
Heparin-Lösung	0,2 % (w/v)	Heparin in PBS-A
LB-Agar	15 g/l	Bacto™ Agar in LB-Medium
LB-+Amp-Medium	100 µg/ml	Ampicillin in LB-Medium
LB-Medium	10 g	Bacto-Trypton
	5 g	Bacto-Yeast-Extrakt
	5 g	NaCl
		auf 1l Wasser
LB++-Medium	10 mM	KCl
	20 mM	MgSO ₄
		in LB-Medium
Lysispuffer	154 mM	NH ₄ Cl
	7,3 mM	KHCO ₃
	1,3 mM	EDTA
Minipräp Solution 1	50 mM	Tris pH 8
	10 mM	EDTA
	50 mM	Glucose
Minipräp Solution 2	0,2 M	NaOH
	1 % (v/v)	Triton X-100
Minipräp Solution 3	3 M	NaAcetat pH 4,8
Mowiol-Eindeckelmedium	2,4 g	Mowiol
	6,0 g	Glycerol
	6 ml	bideest. H ₂ O
	12 ml	Tris-Puffer 0,2 M pH 8
	0,1 %	DABCO
	2 %	DAPI (100µg/µl in PBS)
PBS	0,4 mM	MgCl ₂ •6H ₂ O
	0,9 mM	CaCl ₂

Material und Methoden

	137 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	7,4 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄
PBS-A	137 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	7,4 mM	Na ₂ HPO ₂
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄
PFA-Lösung	4 % (w/v)	Paraformaldehyd in PBS
Phosphatpuffer (50x) für RNA-Gel	250 mM	Na ₂ HPO ₄ •2H ₂ O
	250 mM	NaH ₂ PO ₄ •2H ₂ O
		pH 6,8-7
Poly(U)	2 mg/ml	Polyuridylic Acid in DEPC-Wasser
RIP-Grundpuffer (pH 7,6)	100 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	2 mg/ml	BSA
	20 mM	Tris
RNase-Puffer	40 mM	Tris Acetat pH 6,5
	5 mM	DTT
	0,5 mM	EDTA in DEPC-Wasser
RNA-Probenpuffer	0,25 % (w/v)	Bromphenolblau
	0,25 % (w/v)	Xylencyanol
	0,1 % (w/v)	Orange G
	30 % (w/v)	Glycerin in Aqua bidest
Saponin-Stammlösung	5% (w/v)	Saponin in PBS-A
Sephadex G50	10 g	Sephadex G50
		in 250 ml TE-Puffer (DEPC-Wasser)
TAE-Puffer (50x)	40 mM	Tris pH 7,8
	5 mM	Natriumacetat
	1 mM	EDTA
TE-Puffer (10x)	100 mM	Tris-HCl pH 7,5
	10 mM	EDTA
Triton (alt) 1%	0,1 % (w/v)	Desoxycholol
	0,1 % (w/v)	SDS
	1 % (w/v)	Triton X-100
		in RIP-Grundpuffer
Triton PBS-A	0,05 % (w/v)	Triton X 100 in PBS-A

2.1.4 Biologische Materialien

2.1.4.1 Enzyme

Alkalische Phosphatase (CIAP)	Roche, Mannheim
DNase I	New England Biolabs, Schwalbach
Pfu-Polymerase	Promega, Mannheim
Pfx-Polymerase (Accuprime)	Invitrogen, Karlsruhe
RNAguard	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Schwalbach Fermentas, St. Leon-Rot Stratagen, Heidelberg
RNase A	Serva, Heidelberg
SP6-RNA-Polymerase	New England Biolabs, Schwalbach
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Schwalbach

2.1.4.2 Bakterien

Für die Amplifikation der Plasmide wurden die Bakterienstämme E. coli K12 HB101 und Top 10 F' verwendet.

HB101- Genotyp:	supE44, Δ (mcrC-mrr), recA13, ara-14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20, xyl-5, mtl-1, leuB6, thi-1
Top 10 F'- Genotyp:	mcrA, Δ (mcrBC-hsdRMS-mrr), end A1, recA1, relA1, gyrA96, F80lacZDM15, deoR, nupG, araD139, F(lacIq, Tn10(Tetr)), galU, DlacX74, galK, D(ara-leu)7697

2.1.4.3 Antikörper

Die folgenden Antikörper wurden für *Indirekte Immunfluoreszenz* Experimente (2.2.4.6; 2.2.4.7) in der angegebenen Verdünnung eingesetzt.

Material und Methoden

Antikörper	Antigen	Wirtsorganismus	Verdünnung	Herkunft
Monoklonale Antikörper				
a18	E2	Maus	1:10	Dr. Weiland
24/16	E ^{ms}	Maus	1:10	Dr. Weiland
f48	E2	Maus	1:10	Dr. Weiland
Code 4	NS3	Maus	1:10	Dr. Dubovi
Sekundärantikörper				
α-Maus-FITC	Maus-IgG	Kaninchen	1:100	Jackson Immuno Research Laboratories
Alexa Fluor®488	Maus-IgG	Esel	1:250	molecular probes®, Thermo Scientific

2.1.5 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide für PCR und Sequenzierung wurden von Metabion (München) bezogen und vom Hersteller frei von Schutzgruppen, voll entsalzt und lyophilisiert geliefert.

Die Oligonukleotide wurden in sterilem demineralisiertem Wasser aus einer Millipore Anlage gelöst, so dass die Stammlösung eine Konzentration von 1 nmol/μl aufwies. Daraus wurden anschließend die Gebrauchsverdünnungen für PCRs / RT-PCRs (Quiagen-Kit) (20pmol/μl), für Quik Change®-PCRs / RT-PCRs (Superscript-Kit) (10pmol/μl) und für die Sequenzierung (2,5 pmol/μl) gebildet.

Bezeichnung	Sequenz von 5' nach 3'	Verwendungszweck
C-BsiWI-E2	CCCCACAACCTTGCCTACGGAAGTGGTGAAAAC	Quik Change® Mutagenese Primer sense BsiWI
C-BsiWI-E2r	GTTTTCACCACTTCCGTACGCAAGGTTGTGGGG	Quik Change® Mutagenese Primer sense BsiWI
NS1-S209C	GGGAGGCAGCTCTGTACAGCA	Quik Change® Mutagenese Primer sense S209C

Material und Methoden

NS2-S209Cr	CTTCTTCCCTGCTGTACAGAG	Quik Change® Mutagenese Primer antisense S209C
CP7-E2-EPITr	TCCGTACGCAAGGTATCTTTGTTCACTGCTGTGCACTCTAC	TAV-Epitop Mutagenese Primer antisense
NY-E2-EPITr	TCCGTACGCAAGGTATCTTTGTTCACTGCTGTGCACTCTAC	TAV-Epitop Mutagenese Primer antisense
AATV-E2-EPITr	TCCGTACGCACGGTTGCGGCGCTCACTGCTGTGCACTCTAC	TAV-Epitop Mutagenese Primer antisense
ASSV-E2-EPITr	TCCGTACGCACGGATGAGGCGCTCACTGCTGTGCACTCTAC	TAV-Epitop Mutagenese Primer antisense
ol pCITE	CGGGGACGTGGTTTTTCCTTT	PCITE® Basisprimer sense
SW42r	CGCCATCTCTGTTGCAGTCTGTGG	TAV-Epitop RT-PCR / Sequenzierprimer antisense
SW43	CGACGGAACCGTTAAGGCCG	TAV-Epitop RT-PCR / Sequenzierprimer sense
SW86	GGGCGGCTAGCCTGTAAGG	Ersatz für SW43
SW87r	CGCCCTTGAGCATATATTGC	Ersatz für SW42r
SWXhol	GTCGTCAGTAGTTCGACGTGAGCA	N ^{pro} -Deletion RT-PCR / Sequenzierprimer sense
SWEo3sIIr	CTAGTCACATTGCAGTAAGGTGACAGG	RNase-Deletion RT-PCR / Sequenzierprimer sense
SW88r	GCCAGTCAGAGTAGTTGGCC	Ersatz für SWE03sIIr
E053SIII	CATGCCATGGGGGCCCTGTTGGCTTGGGCGGTG	Dimerisierungsnegative Mutanten RT-PCR Primer sense
E03S_XbaI	GCTCTAGACTAGGCATAGGCACCAAACCAGTTTTGC	Dimerisierungsnegative Mutanten RT-PCR Primer antisense
348M+	AACAAACATGGAGCGTGTAAGTGGTAC	Dimerisierungsnegative Mutanten

2.1.6 Plasmide

Sofern nicht anders beschrieben, ist mit CSFV grundsätzlich der CSFV-Stamm Alfort/Tübingen gemeint.

2.1.6.1 bereits im Labor vorhandene oder kommerziell erworbene Plasmide

pCITE [®] - 2a-c(+)	kommerziell erhältliche DNA-Expressionsvektoren; 3,8 kb groß; Novagen, Darmstadt
p√1677	CSFV-Subklon aus der 5'-Region (ca. 1,8 kb groß); basiert auf einem bluescript [®] Vektor, in den ein XhoI / BglII CSFV cDNA Fragment eingefügt wurde, das die viralen Proteine N ^{pro} , C, E ^{ms} (mit Deletion von Cystein 171 E ^{ms}) und Teile von E1 enthält
p578	CSFV Subklon; basiert auf einem pCITE [®] -2c Vektor; 7,5 kb groß; beinhaltet die codierenden Sequenzen für die viralen Proteine N ^{pro} , C, Erns, E1, E2, p7 sowie Teile der 5' nicht translatierten Region von NS2
p1989c	CSFV Subklon; basiert auf p578; beinhaltet Mutationen im E ^{ms} Protein: C171S / S209C
p1347	CSFV-Wildtyp Gesamtklon; 14 kb groß
Q15/33	CSFV Gesamtklon mit N ^{pro} -Deletion
Q14/25	CSFV Gesamtklon mit Ausschaltung der intrinsischen E ^{ms} RNase-Aktivität durch Deletion des Histidins an Position 346 E ^{ms}
Q13/18	CSFV Gesamtklon mit Doppeldeletion (Kombination von N ^{pro} -Deletion und Deletion von Codon 346 E ^{ms})

2.1.6.2 selbst generierte Plasmide

- pSW1 basiert auf Plasmid p $\sqrt{1677}$; enthält zusätzlich die Mutation S209C E^{rns}
- pSW2 basiert auf Plasmid p 578, in das ein 1,65 kb großes XhoI/NdeI cDNA Fragment aus pSW1 eingefügt wurde; enthält die Mutationen C171 Δ / S209C E^{rns}
- pSW3 CSFV Gesamtklon; basiert auf Klon p1347, in das ein SdaI / BglIII Fragment aus pSW2 inseriert wurde; enthält die Mutationen C171 Δ / S209C
- pSW4 basiert auf dem Vektor pCITE[®]2a, in den ein ca. 2,1 kb großes NdeI/BglIII CSFV cDNA Fragment eingefügt wurde; dieses Fragment beinhaltet die Sequenzen, die für den Großteil des viralen Proteins E1, die Proteine E2 und p7 sowie Teile der 5' nicht translatierten Region des Proteins NS2 codieren.
- pSW5 basiert auf pSW4; enthält zusätzlich eine BsiWI-Schnittstelle
- pSW6 basiert auf pSW5; enthält Mutationen im TAV-Epitop des E2-Proteins: TAV**NKDTV**RT
- pSW8 basiert auf pSW5; enthält Mutationen im TAV-Epitop des E2-Proteins: TAV**SAATV**RT
- pSW9 basiert auf pSW5; enthält Mutationen im TAV-Epitop des E2-Proteins: TAV**SASSV**RT
- pSW10 basiert auf Plasmid p578; in das ein NdeI/BglIII cDNA Fragment aus pSW8 eingefügt wurde, welches die entsprechenden Mutationen im TAV-Epitop enthält: TAV**NKDTV**RT
- pSW12 basiert auf Plasmid p578; in das ein NdeI/BglIII cDNA Fragment aus pSW8 eingefügt wurde: welches die entsprechenden Mutationen im TAV-Epitop enthält: TAV**SAATV**RT
- pSW13 basiert auf Plasmid 578; in das ein NdeI/BglIII Fragment aus pSW8 eingefügt wurde, welches die entsprechenden Mutationen im TAV-Epitop enthält: TAV**SASSV**RT
- pSW14 CSFV Gesamtklon; basiert auf Klon p1347, in das ein XhoI/BglIII/Scal Fragment aus pSW12 inseriert wurde, das die Mutationen im TAV-Epitop beinhaltet: TAV**NKDTL**RT
- pSW16 CSFV Gesamtklon; basiert auf Klon p1347, in das ein XhoI/BglIII/Scal Fragment aus pSW12 inseriert wurde, das die Mutationen im TAV-Epitop beinhaltet: TAV**SAATV**RT

pSW17	CSFV Gesamtklon; basiert auf Klon p1347, in den ein XhoI/BglIII/Scal Fragment aus pSW12 inseriert wurde, das die Mutationen im TAV-Epitop beinhaltet: TAVS ASSV RT
pSW69	CSFV Gesamtklon; basiert auf pSW17, in das ein XhoI/SdaI Fragment aus Q15/33 eingefügt wurde; kombiniert die TAV-Epitop Mutationen TAVS ASSV RT mit der N ^{pro} -Deletion
pSW73	CSFV Gesamtklon; basiert auf Q13/18, in das ein SdaI/EcoRI Fragment aus pSW14 inseriert wurde; kombiniert die TAV-Epitop Mutationen TAV NK DTLRT mit der Doppeldeletion
pSW74	CSFV Gesamtklon; basiert auf Q14/25, in das ein SdaI/EcoRI Fragment aus pSW14 inseriert wurde; kombiniert die TAV-Epitop Mutationen TAV NK DTLRT mit der Ausschaltung der E ^{ms} RNase-Aktivität durch Deletion von Histidin 346 E ^{ms}
p1990CIII	CSFV Gesamtklon; beinhaltet Mutationen im E ^{ms} Protein: C171S / S209C

2.1.7 vorgefertigte Komplettsysteme

BigDye [®] Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt
Nucleo-Spin [®] -Extract II Kit	Macherey-Nagel, Düren
Nucleobond [®] Xtra Midi Kit	Macherey-Nagel, Düren
OneStep RT-PCR Kit	Quiagen, Hilden
RiboMAX [™] Large Scale RNA Production System – SP6	Promega, USA
Super Script III One Step RT-PCR	Invitrogen, USA
peqGold Trifast [™]	peqLab, Erlangen

2.1.8 Zelllinien

SK-6 „swine kidney“, adhärenzte Schweinenierenzelle (*Sus scrofa*) – Linie 6
Zellen erhalten von R. Riebe (Zellbank Insel Riems)

2.1.9 Viren der Klassischen Schweinepest (CSFV)

2.1.9.1 CSF Wildtyp-Viren

SP50 Alfort/Tübingen; Passage 50

1347 RTF III Alfort/Tübingen; Passage 4 vom 15.10.09

Eystrup hochpathogener CSFV-Stamm für Belastungsinfektionen; Passage vom 2.10.12

2.1.9.2 rekombinante CSFV-Mutanten

Sofern nicht anders benannt, handelt es sich um Mutanten, die auf dem CSFV-Stamm Alfort/Tübingen beruhen.

EP#6/12 Doppeldeletionsmutante: Kombination von Deletion der N^{pro}-kodierenden Region (mit Ausnahme von zwei verbleibenden Resten: M, G) und Ausschaltung der E^{ms}-RNase-Aktivität durch Deletion des Histidins an Position 346 E^{ms}

Auf der Sequenz des CSFV-Stammes ATCC basieren die kodierenden Sequenzen der 5'-NTR und des C-Proteins, die übrigen Sequenzbereiche basieren auf Alfort/Tübingen.

TF#283/1 Mutante mit Ausschaltung der E^{ms}-RNase Funktion durch Austausch des Histidin Codons an Position 297 gegen ein Lysin Codon

EP#69/2 TAV-Epitop-Kombinationsmutante: N^{pro} Deletion und TAV-Epitop-Mutationen: TAVS**ASS**LRT

pSW16 TAV-Epitop-Mutante: TAVS**AA**TLRT

EP#73/2 TAV-Epitop-Kombinationsmutante: Doppeldeletion (N^{pro}-Deletion und Ausschaltung der E^{ms}-RNase-Aktivität durch Deletion von Histidin 346 E^{ms}) und TAV-Epitop-Mutationen: TAV**NKD**TLRT

EP#74/1 TAV-Epitop-Kombinationsmutante: Ausschaltung der E^{ms}-RNase-Aktivität durch Deletion von Histidin
346 E^{ms} und TAV-Epitop-Mutationen: TAV**NK**DTLRT

1990 CIII E^{ms} Pseudorevertante: C171S / S209C

849 E^{ms} Pseudorevertante: C171Δ / S209C

2.1.9.3 Versuchstiere

2.1.9.3.1 FLI Tübingen

Für die Sicherheitsstudie der CSFV Doppelmutante (TV#30) wurden tragende Sauen, für die Infektionsversuche TV#29 und TV#31 Ferkel der Rasse Deutsches Hybridschwein vom Reberhof in Filderstadt-Hardthausen (Familie Alber) bezogen. Die Ferkel hatten bei Einstellung in die Versuchseinrichtung des Friedrich-Loeffler-Institutes Tübingen ein Körpergewicht von ca. 20 kg.

2.1.9.3.2 FLI Insel Riems

Für die Effizienzstudie der DIVA-Mutanten (TV#52_12) wurden Ferkel der Rasse Deutsches Hybridschwein vom Landwirtschaftsbetrieb Schwasdorf eG mit einem Einstellungsgewicht von ca. 20 kg bezogen.

2.1.10 Medikamente

Stresnil[®] (Wirkstoff: Azaperon)

Janssen-Cilag GmbH, Neuss

Release[®] (Wirkstoff: Pentobarbital-Natrium)

Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte eG, Garbsen

2.1.11 Verbrauchsmaterial

BD Biocoat™ Poly-D-Lysine Cellware

BD Biosciences, USA

Bluecaps CELLSTAR[®] (15, 50 ml)

Greiner Bio-One, Frickenhausen

Einmalkanülen:

1,1 x 30mm	Henke Sass Wolf, Tuttlingen
1,2 x 40mm	Becton, Dickinson & Co., USA
1,2 x 50mm	Terumo, Belgien
1,2 x 75mm; 2,0 x 100mm; 2,0 x 120mm	Ehrhardt Medizinprodukte GmbH
Einmalspritzen (1ml, 2ml, 10ml, 20ml, 50ml)	Braun, Melsungen
Messpipetten (Glas/Plastik)	Becton Dickinson, USA
Mikrofilter (0,45 / 0,2 µm)	Whatman, Dassel
Objektträger Glas (76 x 26 mm)	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim
Parafilm „M“	American National Can, Greenwich
PCR-Gefäße (0,2ml)	Biozym, Hess. Oldendorf
Pipettenspitzen	Greiner, Frickenhausen
Plastibrand 1,5ml Halbmikroküvetten	Brand, Wertheim
Reaktionsgefäße (0,5ml; 1,5ml und 2ml)	Eppendorf, Hamburg
Seesand, steril	Roth, Karlsruhe
S-Monovetten EDTA	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
S-Monovetten mit Gerinnungsaktivator	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Tuberkulinspritzen (1 ml)	Henke Sass Wolf, Tuttlingen
Vacuum Filter Systems	Corning Incorporated, USA
VasoVet Venenverweilkanüle 1,1 x 25 mm	Braun, Melsungen
Zellkulturflaschen / -schalen	Greiner, Frickenhausen
Zellkultur-Platte (6- / 24- /96- well)	Greiner, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen (5, 15, 30 ml)	Greiner, Frickenhausen

2.1.12 Verwendete Software

Online verfügbar:

MultiAlign <http://multialin.toulouse.inra.fr>

kommerzielle Software:

Axiovision 4.5 Zeiss, Göttingen

CodonCode Aligner CodonCode Corporation

pDraw32 (Version 1.1.113) AcaClone Software

2.2 Methoden

2.2.1 Methoden für die Herstellung neuer Virusmutanten

2.2.1.1 Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) wurde zur Mutagenese und zur Amplifikation von DNA-Fragmenten eingesetzt. Die für die PCR verwendeten Oligonukleotide (2.1.5) wurden für die Standard-PCR in einer 20pmol/ μ l-Verdünnung und für die Quik Change®-PCR in einer 10pmol/ μ l-Verdünnung angewendet.

Reaktionsansatz für PCRs:

Komponenten	Volumen [μ l]
bidest. H ₂ O	40,5
dNTPs 10mM	1,0
Template-DNA 100ng/ μ l	1,0
Primer sense	1,0
Primer antisense	1,0
10x PCR-Puffer	5,0
Pfu-Polymerase oder AccuPrime-Polymerase	0,5

Tabelle 1: Beispielhafter Reaktionsansatz für eine PCR

2.2.1.1.1 Standard-PCR

Die Standard-PCR wurde für die Amplifikation von Plasmiden eingesetzt und es wurde ein Reaktionsansatz verwendet, wie er in Tabelle 1 beschrieben ist.

Sofern sich die gewünschten Aminosäureaustausche in der Sequenz der verwendeten Oligonukleotide befanden, konnte die Standard-PCR im Sonderfall auch für die Mutagenese verwendet werden. Tabelle 2 veranschaulicht den Programmablauf für eine Standard-PCR.

Schritt	Prozess	Temperatur [°C]	Dauer [sec.]
initiale Denaturierung	Denaturierung	95	120
Synthesezyklen (x35)	Denaturierung	95	30
	Primerhybridisierung	54	30
	Primerextension	72	60/kb
finale Synthese	Primerextension	72	120

Tabelle 2: Programm für eine Standard-PCR

2.2.1.1.2 Quik Change®-PCR

Die Quik Change®-PCR hat im Gegensatz zur Standard-PCR den Vorteil, dass mit ihrer Hilfe gezielt Mutationen direkt in ein Plasmid eingefügt werden können und dass die Quik Change®-PCR Produkte direkt im Anschluss für die Transformation kompetenter Bakterien (2.2.1.9) verwendet werden können.

Jeweils zwei Oligonukleotide mit den gewünschten Mutationen – eines in Plus-Strang und eines in Minus-Strang Orientierung – wurden für die Quik Change®-PCR verwendet. Hierbei ist zu beachten, dass die Oligonukleotide für eine Quik Change®-PCR länger sein müssen, als die für eine Standard-PCR (2.1.5). Der Reaktionsansatz wurde analog zur Standard-PCR gewählt (Tabelle 1).

Folgender Programmablauf wurde für die Quik Change®-PCR gewählt:

Schritt	Prozess	Temperatur [°C]	Dauer [sec.]
initiale Denaturierung	Denaturierung	95	30
Synthesezyklen (16x)	Denaturierung	95	30
	Primerhybridisierung	55	120
	Primerextension	68	120/kb
finale Synthese	Primerextension	68	120

Tabelle 3: Programm für eine Quik Change®-PCR

Nach Ablauf der Quik Change®-PCR wurde zu jedem Reaktionsansatz 1,0 µl des Restriktionsenzym DpnI gegeben. Dieses Enzym spaltet spezifisch methylierte DNA an der Sequenz GATC. Nur die eingesetzte parentale Plasmid-DNA ist jedoch methyliert, nicht die durch die Quik Change®-PCR neu synthetisierte DNA. Daher bleibt nach der Behandlung mit DpnI nur die gewünschte neu synthetisierte unmethylierte DNA übrig.

2.2.1.2 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe.

Das Trennungsprinzip beruht dabei auf der größenabhängig unterschiedlich starken Retention von DNA-Fragmenten während ihrer Wanderung durch die Agarosematrix im elektrischen Feld. Die DNA ist im Laufpuffer negativ geladen und wandert daher in Richtung der Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt nun zum einen von der Größe der DNA-Fragmente ab – je kleiner sie sind, desto schneller wandern sie – und zum anderen von der Vernetzung der Agarosematrix, die durch die Konzentration der Agarose gesteuert werden kann. Standardmäßig wurden 1%ige (in 1x TAE-Puffer) Agarosegele verwendet.

Die Agarosegelelektrophorese wurde sowohl für die analytische als auch für die präparative Trennung von DNA-Fragmenten eingesetzt.

Für die analytische Auftrennung wurden pro Probe jeweils 1µl der zu untersuchenden DNA mit 9µl bidest. H₂O und 2µl FR-Puffer gemischt und bei 100 V/cm für 30 min in TAE-Puffer getrennt. Zusätzlich wurden pro Agarosegel 10µl des 1kb Plus DNA Ladders für die Größenmarkierung aufgetragen. Im Anschluss wurden die DNA-Banden in einem Bad mit einer Lösung des Farbstoffs GelRed® (1:3300) für fünfzehn Minuten gefärbt und danach bei 366 nm in der Geldokumentationseinheit betrachtet und fotografiert.

2.2.1.3 Aufreinigung von DNA-Fragmenten mittels Agarosegelelektrophorese

PCR-Produkte oder mittels Restriktionsenzymen geschnittene Plasmid-DNA-Fragmente wurden mittels präparativer Agarosegelelektrophorese vor ihrer weiteren Verwendung gereinigt.

Hierzu wurde jede Probe (50µl Ansatz) mit 10µl FR-Puffer gemischt, analog zu 2.2.1.2 elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend gefärbt. Danach wurden die DNA-Banden im Agarosegel bei 302 nm betrachtet und mit einem Skalpell ausgeschnitten.

Die Aufreinigung und Elution (in 15-30µl bidest. H₂O) der exzidierten Banden erfolgte unter Verwendung des Nucleo-Spin®-Extract II Kits nach Herstellerprotokoll.

2.2.1.4 Restriktionsenzymspaltung

Restriktionsendonukleasen sind in der Lage, dsDNA an spezifischen Nukleotidsequenzen zu schneiden. Die Erkennungssequenzen bestehen in der Regel aus Palindromen (gegenläufig

identische Sequenzen) und es entstehen durch die Spaltung definierte dsDNA-Fragmente mit spezifischen 5'- und 3'-Enden.

Die Restriktionsenzymspaltung wurde erstens eingesetzt, um durch gezielte Spaltung und anschließende analytische Gelelektrophorese (2.2.1.2) die korrekte Größe spezifischer DNA-Konstrukte zu überprüfen.

Hierzu wurde eine geringe Menge einer Plasmid-DNA oder eines PCR-Produktes (ca. 100 ng) mit zwei oder drei Restriktionsendonukleasen und dem korrespondierenden Puffer versetzt und für 30 bis 60 min bei der für die gewählten Enzyme optimalen Temperatur inkubiert. Danach konnten die zu überprüfenden DNA-Fragmente wie unter 2.2.1.2 beschrieben elektrophoretisch aufgetrennt und in der Geldokumentationseinheit betrachtet werden. Hierbei wurden dann die tatsächlichen Bandenmuster mit den theoretisch zu erwartenden Größen verglichen.

Zweitens wurde die Restriktionsenzymspaltung verwendet, um vor der Ligation (2.2.1.6) spezifische Enden von DNA-Fragmenten zu generieren, über die ein DNA-Fragment in einen Vektor inseriert werden konnte.

Die Plasmid-DNA oder das PCR-Produkt wurden zu diesem Zweck ebenfalls mit mind. zwei Restriktionsenzymen und dem dazugehörigen Puffer gemischt und für 60 – 120 min bei der für die Enzyme passenden Temperatur inkubiert. Nach 1 h wurde eine Probe entnommen und mittels analytischer Gelelektrophorese (2.2.1.2) untersucht, ob die Spaltung bereits vollständig erfolgt war. War dies nicht der Fall, wurde die Inkubationszeit verlängert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Reaktionsansatz mit FR Puffer versetzt und die gewünschten DNA-Fragmente wurden mittels präparativer Agarosegelelektrophorese aufgereinigt (2.2.1.3).

Weiterhin wurde diese Methode genutzt, um eine zirkuläre Plasmid-DNA vor einer *In-vitro* Transkription (2.2.1.13) zu linearisieren. Dazu wurde ein Restriktionsenzym gewählt, welches die Plasmid-DNA am 3'-Ende der zu transkribierenden Sequenz spaltet. Dieses Enzym wurde dann mit 5 µg Plasmid-DNA und dem passenden Puffer gemischt und für 1 h bei der für das Enzym optimalen Temperatur inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Probe zunächst mittels analytischer Agarosegelelektrophorese (2.2.1.2) überprüft und dann mittels präparativer Agarosegelelektrophorese (2.2.1.3) aufgereinigt. Bei Proben, die für die RNA-Synthese bestimmt waren, ist jedoch die Besonderheit zu beachten, dass diese im letzten Schritt der Aufreinigung mit DEPC-Wasser eluiert wurden, um danach direkt in der *In vitro*-Transkription (2.2.1.13) verwendet werden zu können. DEPC inaktiviert Ribonukleasen und schützt so die RNA vor dem Abbau durch diese Enzyme.

2.2.1.5 Dephosphorylierung von DNA

Durch die Behandlung mit alkalischer Phosphatase (CIAP) kann vor einer Ligation (2.2.1.6) das 5'-Phosphat der Vektor-DNA abgespalten werden. Dies ist nützlich, um die Religation von komplementären Vektorenden zu verhindern. Zu diesem Zweck wurde die linearisierte Vektor-DNA für 30 min bei 37°C mit 1 U alkalischer Phosphatase inkubiert. Im Anschluss daran wurde der gesamte Reaktionsansatz für 5 min bei 65° C inkubiert, um die alkalische Phosphatase zu deaktivieren. Danach wurde die DNA mit dem Nucleo-Spin®-Extract II Kit nach Herstellerprotokoll gereinigt und eluiert.

2.2.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten

In Zuge der Ligation wurden die geschnittenen, aufgereinigten DNA-Fragmente mit komplementären Enden mit Hilfe der T4-DNA Ligase kovalent zu einer zirkulären DNA gebunden. In dieser Reaktion wurde die Insert-DNA in achtfachem molaren Überschuss gegenüber der Vektor-DNA eingesetzt, um eine hohe Ligationseffizienz zu erreichen. Der in Tabelle 4 beschriebene Reaktionsansatz wurde entweder bei 14°C über Nacht, bei RT für 4 h oder bei 37°C für 1,5 h inkubiert.

Reaktionsansatz für eine Ligation:

Komponenten	Volumen [µl]
bideest. H ₂ O	26,5
Insert-DNA	8,0
Vektor	1,0
10x Ligationspuffer	4,0
T4-DNA-Ligase	0,5

Tabelle 4: Ligationsansatz

2.2.1.7 Fertigung von Agarplatten

Für die Produktion von Agarplatten wurden 7,5 g Agar in 500 ml *LB-Medium* gelöst und anschließend autoklaviert. Danach wurden der auf ca. 40° C abgekühlten Lösung 50mg / 500 ml Ampicillin zugesetzt und vorsichtig geschüttelt. Dann wurde die Agarlösung in Plastikpetrischalen gegossen.

2.2.1.8 Produktion von kompetenten Bakterien

In einem ersten Schritt wurde eine Übernachtskultur der Bakterien mit LB-Medium angeimpft. Von dieser Vorkultur ausgehend wurde dann in einem zweiten Schritt wiederum eine Hauptkultur mit LB-Medium so angesetzt, dass die OD600 zwischen 0,05 und 0,10 betrug. Die Bakterien wurden dann bei 37°C schüttelnd bis zu einer OD600 von 0,6 - 0,7 inkubiert und dann für 10 min bei 4000rpm zentrifugiert. Das Sediment wurde in 25 ml eiskalter CaCl₂-Lösung aufgenommen und für 40 min auf Eis gestellt. Im Anschluss daran wurden die Bakterien erneut für 10 min bei 4000 rpm und 4°C sedimentiert und das Bakterienpellet wurde in 5 ml CaCl₂-Lösung gelöst. Die Bakterien wurden dann in 150 µl Aliquots portioniert und nach weiteren 3 h auf Eis bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

2.2.1.9 Hitzeschocktransformation

Für die Vermehrung von Plasmid-DNA wurden Top 10 oder HB 101 Bakterien (2.1.4.2) benutzt und mit der Hitzeschockmethode transformiert. Dazu wurde pro Probe ein frisch auf Eis aufgetautes 50 µl Aliquot verwendet und mit dem gesamten Reaktionsansatz einer Ligation (2.2.1.6) oder mit 5 µl eines Quik Change®-PCR Produktes (2.2.1.1.2) versetzt. Nach einer 20 minütigen Inkubationszeit auf Eis, wurden die Bakterien für 2 min einem Hitzeschock im 42°C warmen Wasserbad unterzogen und direkt im Anschluss für 2 min auf Eis gekühlt. Dann wurden dem Reaktionsansatz 200 µl LB++ zugefügt und anschließend wurde alles noch einmal für 60 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert, bevor dann der gesamte Ansatz auf einer vorgewärmten Agarplatte (2.2.1.7) ausplattiert und über Nacht bei 37° C im Brutschrank inkubiert wurde.

2.2.1.10 Präparation von Plasmid-DNA

2.2.1.10.1 Mini-Präparation

Für die Isolierung kleinerer Mengen Plasmid-DNA wurde die Mini-Präparation durchgeführt. Pro Probe wurden 5 ml LB-Medium mit Antibiotikum in einem Glasröhrchen vorgelegt. Es wurde dann mithilfe einer Pipettenspitze eine einzelne Bakterienkolonie von einer Agarplatte (2.2.1.9) gepickt und die Pipettenspitze mit der Kolonie dann in das LB-Medium abgeworfen. Danach wurde das Ganze über Nacht schüttelnd bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 1,5 ml dieses Ansatzes in ein 1,5 ml Eppendorffgefäß pipettiert und dann wurden die Zellen für 10 min bei 5000 rpm sedimentiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das

Bakterienpellet für 3 min in 100 µl kalter *Minipräp-Solution I* schüttelnd gelöst. Dann wurden 200 µl *Minipräp-Solution II* zugefügt, kurz gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert.

Nach dem Hinzufügen von 150 µl *Minipräp-Solution III* wurde das Gefäß dreimal geschwenkt und dann für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Mischung für 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert, der Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorffgefäß transferiert und mit 400 µl Isopropanol versetzt. Um die Ausbeute der Fällung zu erhöhen, wurde die Lösung dann für 30 min bei -20°C inkubiert. Danach erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt bei 14000 rpm für 10 min. Im Anschluss daran wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet mit der gefällten Plasmid-DNA in 200 µl Isopropanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und Absaugen des Überstandes wurde das Pellet zunächst in der SpeedVac für 5 min getrocknet und danach in 50 µl bidest. H₂O aufgenommen.

Im Anschluss daran wurde die gewonnene Plasmid-DNA mit Hilfe der Restriktionsenzymspaltung (2.2.1.4) und nach entsprechender Aufreinigung (2.2.1.11) mit Hilfe der Sequenzierung (2.2.1.12) analysiert.

2.2.1.10.2 Midi-Präparation

Für die Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA wurde die Midi-Präparation durchgeführt. Hierzu wurden standardmäßig 100 µl aus der Übernachtskultur der Mini-Präparation (2.2.1.10.1) in 100 ml LB-Medium mit Antibiotikum angeimpft und wiederum über Nacht bei 37° C schüttelnd inkubiert. Für die Präparation von "low copy"-Plasmiden (Gesamtklone) wurde die eingesetzte Menge an LB-Medium auf 200 ml erhöht.

Am nächsten Tag wurde die Plasmid-DNA nach Hestellerprotokoll mit Hilfe des Nucleobond® Xtra Midi Kits extrahiert. Die DNA wurde in 50 µl demineralisiertem Wasser aufgenommen und danach ihre Konzentration durch Messung im Photometer bei 260 nm bestimmt.

Analog zu 2.2.1.10.1 wurde danach die Plasmid-DNA vor ihrer weiteren Verwendung mittels Restriktionsenzymspaltung (2.2.1.4) und Sequenzierung (2.2.1.12) überprüft.

2.2.1.11 Aufreinigung von Mini-Präparationen für die Sequenzierung

Um nach erfolgter Mini-Präparation (2.2.1.10.1) von Plasmid-DNA Reste von RNA zu entfernen, welche die Sequenzierung stören können, wurden die Proben vor der Sequenzierung mit RNase behandelt. Dazu wurde die gesamte Menge an Mini-Präparation (48 µl) mit 39 µl demineralisiertem Wasser, 10 µl NEB Puffer 4 und 3 µl RNase A (10 µg/µl) gemischt und für 15 min bei 37° C inkubiert.

Im Anschluss daran wurde die Plasmid-DNA dann mit Hilfe des Nucleo-Spin®-Extract II Kits aufgereinigt und in 15 µl demineralisiertem Wasser eluiert.

2.2.1.12 Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA-Proben beruht auf dem Prinzip der Didesoxymethode nach Sanger.

Die hier verwendete Variante dieser Methode stützt sich auf eine lineare PCR. Es wird dabei nur ein Oligonukleotid (im Gegensatz zu zweien bei einer konventionellen PCR) an die DNA-Probe hybridisiert und mit einer DNA-Polymerase elongiert. Der Reaktionsansatz enthält nun neben dNTPs auch ddNTPs (d.h. die entsprechenden Didesoxy-Varianten der dNTPs), an die vier verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe (jeweils ein anderer für ddATP, ddCTP, ddTTP und ddGTP) gekoppelt sind. Da die ddNTPs keine 3'OH-Gruppe besitzen, führt ihr Einbau zum Abbruch der Polymerisationsreaktion und das entstandene DNA-Fragment ist damit automatisch mit dem Fluoreszenzfarbstoff des eingebauten ddNTPs markiert. Auf diese Weise entstehen in der Reaktion unterschiedlich lange ssDNA-Fragmente mit spezifisch markierten 3'-Enden, die dann über eine Kapillarelektrophorese aufgetrennt werden können. Dann kann über Auslesen der spezifischen Fluoreszenzmarkierung der 3'-Enden die DNA-Sequenz ermittelt werden.

Der Reaktionsansatz für die lineare PCR ist in Tabelle 5 aufgeführt. Die Komponenten entstammen dem *BigDye® Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit* von ABI.

Reaktionsansatz für die Sequenzierung:

Komponenten	Volumen [µl]
bidest. H ₂ O	5,5
5x Sequenz-Puffer	1,5
Template-DNA (100ng/µl)	1,0
Oligonukleotid (2,5 pmol/µl)	1,0
Sequenz Mix	1,0

Tabelle 5: Reaktionsansatz für die PCR-gestützte Sequenzierung

Die PCR-Maschine wurde wie folgt programmiert:

Schritt	Prozess	Temperatur [°C]	Dauer [sec.]
initiale Denaturierung	Denaturierung	95	60
Synthesezyklen (x25)	Denaturierung	95	10
	Primerhybridisierung	50	5
	Primerextension	60	110

Tabelle 6: Programmablauf für die Sequenzierungs-PCR

Im Anschluss an die Sequenzierungsreaktion wurden die Syntheseprodukte zur Reinigung einer Ethanol-fällung unterzogen. In einem 1,5 ml Eppendorffgefäß wurden hierzu 25 µl EtOH p.a. und 1 µl 3 M NaAc pH 5 vorgelegt; dann wurde der Reaktionsansatz zugegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Danach wurde die Lösung bei 14000 rpm für 20 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet mit 150 µl 75%igem EtOH gewaschen. Die Zentrifugation wurde wiederholt, der Überstand abgesaugt und der folgende Waschschrift mit 75%igem EtOH noch einmal wiederholt. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand wieder abgesaugt und das Pellet für 5 min in der SpeedVac getrocknet. Anschließend wurde die Probe in 20 µl HiDi™ aufgenommen und dann komplett für die Analyse eingesetzt.

Die kapillarelektrophoretische Trennung, die Detektion der Fluoreszenzmarkierung und die bioinformatische Bearbeitung der Proben erfolgte mit Hilfe des 3130 Genetic Analyzer von Applied Biosystems (ABI) und den dazugehörigen Computerprogrammen.

Die Auswertung der Sequenzen erfolgte über das Programm CodonCode Aligner und über das im Internet frei verfügbare Programm MultiAlign Interface (2.1.12).

2.2.1.13 *In vitro*-Transkription

Die *In vitro*-Transkription ist eine Methode zur Synthese von RNA ausgehend von einer DNA Matritze.

Alle Arbeitsschritte wurden zum Schutz der RNA mit RNase-freien Arbeitsmaterialien durchgeführt. In einem ersten Schritt wurde die gewünschte zirkuläre Plasmid-DNA hierfür wie unter 2.2.1.4 beschrieben linearisiert, aufgereinigt und in DEPC-Wasser eluiert.

In der folgenden *In vitro*-Transkription-Reaktion wurden dann die vorbereitete Plasmid-DNA und die Komponenten aus dem RiboMAX™ Large Scale RNA Production System – SP-6 Kit von Promega wie in Tabelle 7 beschrieben verwendet.

Reaktionsansatz für die *In vitro*-Transkription:

Komponenten	Volumen [μ l]
Plasmid-DNA (linearisiert, gelgereinigt, eluiert in bidest. H ₂ O DEPC)	50,0
5x SP-6 Puffer	20,0
rATP	5,0
rCTP	5,0
rGTP	5,0
rUTP	5,0
SP-6 Enzym Mix	10,0

Tabelle 7: Reaktionsansatz für die *In vitro*-Transkription mit *RiboMAX*TM Kit

Nach einer Inkubationszeit von 4 h bei 37° C wurde dem Reaktionsansatz 1 μ l des Enzyms DNase aus dem Kit zugefügt und für weitere 15 min bei 37° C inkubiert, um die parentale DNA zu zerstören.

Im Anschluss an die DNase-Behandlung wurden die Proben über Sephadex G50 Zentrifugationssäulen aufgereinigt. Für die Vorbereitung der Säulen wurden mit Hilfe der Stempel 1ml Spritzen jeweils mit zwei passend ausgestanzten Glasfaserfiltern (Whatman GF/C) abgedichtet und mit zuvor in 1x TE equilibriertem und autoklaviertem *Sephadex G50* befüllt. Danach wurden die Säulen für 30 min bei RT inkubiert, damit das Gelmaterial sedimentieren konnte. Die so vorbereiteten Säulen wurden bei 2000 rpm für 2 min zentrifugiert, um sie von Restflüssigkeit zu befreien. Danach wurden die kompletten Reaktionsansätze aus der *In vitro*-Transkription auf die Säulen aufgetragen, ebenfalls für 2 min bei 2000 rpm zentrifugiert und die durchlaufenden Proben wurden in Reaktionsgefäßen aufgefangen. Die so gewonnene RNA wurde durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion (2.2.1.14) gereinigt, gefällt und in 20 μ l bidest. H₂O DEPC aufgenommen. Im Anschluss daran wurde die neu synthetisierte RNA mittels Elektrophorese im formaldehydhaltigen 1% Agarosegel (2.2.1.15) analysiert, bevor sie für die Elektroporation von SK-6 Zellen eingesetzt wurde.

2.2.1.14 Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Phenol-Chloroform-Extraktion ist eine Methode, die zur Reinigung und Fällung von RNA-Proben geeignet ist. Sie wurde im Anschluss an eine *In vitro*-Transkription (2.2.1.13) durchgeführt. Das gesamte Volumen der RNA-Probe (100 μ l) wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 100 μ l Phenol versetzt, kräftig gemischt und 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der so gewonnene wässrige Überstand wurde in ein neues 1,5 ml

Reaktionsgefäß überführt, mit 100µl Chloroform versetzt, kräftig gemischt und 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde erneut in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und durch Zugabe von 12 µl 2M Kaliumacetat pH 5,6 und 250 µl Ethanol p.a. gefällt. Um die quantitative Ausbeute der Fällung zu erhöhen, wurde die Probe über Nacht bei -20° C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Probe bei 4° C und 14000 rpm für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das RNA-Pellet einmal mit 1 ml 80%igem EtOH gewaschen, bevor es für 5 min in der SpeedVac getrocknet wurde und im Anschluss daran in 20 µl demineralisiertem Wasser gelöst wurde.

2.2.1.15 Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese

RNA-Proben wurden vor ihrem Einsatz in der Elektroporation mittels Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese analysiert.

Zunächst wurden die Proben hierfür mit Glyoxal behandelt, um die Größenauftrennung bei der Elektrophorese zu verbessern. Hierzu wurden 3 µl der Probe mit 4,5 µl DEPC-Wasser, 3,0 µl 5x Phosphatpuffer und 1,8 µl Glyoxal gemischt und für 45 min bei 54° C inkubiert. Danach wurden dem Ansatz 3 µl RNA-Probenpuffer zugefügt und die Probe dann auf ein 0,9%iges Agarosegel mit Zusatz von 13% Formaldehyd aufgetragen und bei 120 V/cm in 1x Phosphatpuffer aufgetrennt. Zusätzlich wurden auf einer Spur des Gels 12 µl 0,5-10 kb RNA Ladder – ebenfalls mit 3 µl RNA-Probenpuffer versetzt - als Größenmarker aufgetragen. Während des Laufs wurde der Laufpuffer kontinuierlich in der Kammer umgepumpt. Nach Ende des Laufs wurde das Gel in *Acridinorange*-Lösung für 5 min gefärbt, danach mehrfach in Laufpuffer entfärbt und die RNA anschließend in der Geldokumentationseinheit bei 254 nm analysiert.

2.2.1.16 Elektroporation

Die Elektroporation ist eine Methode, die dazu genutzt werden kann, um Nukleinsäuren - wie z.B. virale RNA - in Zellen zu bringen.

Für Elektroporations-Experimente wurden SK-6 Zellen am Vortag so umgesetzt, dass am Tag der Elektroporation 10 cm Petrischalen mit dichten Zellrasen vorhanden waren. Eine dichte Schale wurde für die Bearbeitung von drei RNA-Proben benötigt. Die Zellen wurden wie unter 2.2.2.1 beschrieben trypsinisiert und mit *DMEM+FCS* resuspendiert. Danach wurden die Zellen bei 1000 rpm für 8 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen dann noch einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 1,6 ml *PBS* aufgenommen. Jeweils 0,5 ml Zellsuspension wurden mit 3 µl RNA-Probe gemischt und in

einer Küvette im Elektroporator mit zwei Pulsen von je 180V und 490 μ F für jeweils ca. 1 sec elektroporiert. Nach einer Ruhezeit von 3 min wurden die elektroporierten Zellen mit *DMEM+FCS* aus der Küvette gespült und auf zwei 3,5 cm Zellkulturschalen verteilt. Diese wurden dann im 37° C warmen Brutschrank mit einem CO₂-Gehalt von 7 % inkubiert. Eine dieser Schalen wurde dazu benutzt, um 1-2 Tage nach der Elektroporation den Erfolg der Methode mittels indirekter Immunfluoreszenz (2.2.4.6) zu überprüfen und damit die Bildung infektiöser Viruspartikel nachzuweisen. Die andere Schale wurde dazu verwandt, um das neu gewonnene Virus zu vermehren. Dazu wurden die elektroporierten Zellen 2 Tage nach der Elektroporation zunächst in 10 cm Zellkulturschalen umgesetzt und dann nach weiteren 3-4 Tagen (sobald ein dichter Zellrasen vorhanden war) bei -70°C eingefroren. Diese Passage null wurde dann zur Infektion neuer SK-6 Zellen verwandt.

2.2.2 Methoden für die Charakterisierung von Viren

2.2.2.1 Kultivierung von Zellen

SK-6 Zellen wurden zur dauerhaften Verfügbarkeit in 10 cm Zellkulturschalen in *DMEM+FCS* bei 37°C und 7 % CO₂ gehalten. In Abständen von 3-4 Tagen wurden die Zellen vereinzelt und umgesetzt. Die Umsetzfaktoren hingen dabei vom Wachstum der Zellen ab und variierten zwischen 1:8 und 1:15. Die Zellen wurden einmal mit 6 ml *25%Trypsin-EDTA* gewaschen, mit 2 ml *25%Trypsin-EDTA* bedeckt und für 2-3 min bei 37° C inkubiert, bis sich der Zellrasen vom Boden der Zellkulturschale löste. Dann wurden die Zellen vereinzelt, die Trypsinierungsreaktion mit 4 ml *DMEM+FCS* gestoppt und die Zellen gemäß dem gewünschten Umsetzfaktor in *DMEM+FCS* aufgenommen und in neue Zellkulturschalen ausgesät.

2.2.2.2 Infektion von Zellen

Viren brauchen für Ihre Vermehrung lebende Zellen. Für die Infektion wurden am Vortag SK-6 Zellen so eingesät, dass am Tag der Infektion ein zu ca. 60% dichter Zellrasen vorlag. Die Zellen wurden vor der Infektion mit dem Lichtmikroskop auf mikrobielle Kontaminationen überprüft. Die gewünschte Viruspassage wurde schonend aufgetaut, resuspendiert und auf Eis gelagert. Die zu infizierenden Zellen wurden dann einmal mit *DMEM* gewaschen. Anschließend wurde eine Mischung von *DMEM* und Virussuspension wie in Tabelle 8 beschrieben auf die Zellen gegeben.

Mischungsverhältnis von *DMEM* und Virussuspension für die Infektion:

verwendete Zellkulturschale	<i>DMEM</i>	Virussuspension
10 cm Zellkulturschale	1 ml	1 ml
3,5 cm Zellkulturschale	400 µl	150 µl
1 Vertiefung in 24-well-Platte	100 µl	40 µl

Tabelle 8: Infektion von Zellen

Die Zellen wurden dann für 1 h bei 37°C inkubiert, wobei die Schalen alle 20 min vorsichtig geschwenkt wurden. Dann wurden in die 10 cm Schalen 8 ml, in die 3,5 cm Schalen 1,5 ml und in jede Vertiefung einer 24-well-Platte 400 µl *DMEM* +*FCS* gegeben und die Zellen für weitere 3-4 Tage in den Brutschrank gestellt, bevor sie auf -70° C eingefroren und danach für die Reinfektion neuer Zellen verwandt wurden.

2.2.2.3 Titration von Viren und Titerberechnung

Virustitrationen wurden durchgeführt, um die kulturinfektiöse Dosis 50 pro ml (KID_{50}/ml) einer Viruspassage zu bestimmen. Hierzu wurden Titrationsen mit 1:10 Verdünnungsschritten im Doppelansatz in 96-well-Platten durchgeführt. Die zu testenden Viruspassagen wurden schonend aufgetaut und dann auf Eis gelagert, um den Titerverlust zu minimieren. In 1,5 ml Reaktionsgefäßen wurden für jeden Verdünnungsschritt 900 µl *DMEM*+*FCS* vorgelegt. In das erste Reaktionsgefäß wurden dann 100 µl der zu testenden Viruspassage gegeben, gründlich gemischt und je 100 µl der Mischung pro Vertiefung in der ersten Spalte der 96-well-Platte aufgetragen. 100 µl der Mischung wurden in das nächste Reaktionsgefäß überführt und auf diese Weise wurde fortlaufend eine Verdünnungsreihe mit dem Verdünnungsfaktor 10 erstellt. Eine Spalte der 96-well-Platte wurde für die Zellkontrolle genutzt und mit 100 µl *DMEM* +*FCS* beschickt. Dann wurden pro Vertiefung $1,5 \times 10^4$ SK-6 Zellen in 100 µl *DMEM* +*FCS* zugegeben und die Platte bei 37° C inkubiert. Nach 3-4 Tagen wurde die Platte mittels Indirekter Immunfluoreszenz ausgewertet und die Titerberechnung mit der Formel nach Spearman/Kaerber durchgeführt:

Berechnungsformel: $-(x_0 - d/2 + d \sum r/n)$

(x_0 = reziproker Wert des \log_{10} der Verdünnungsstufe, bei der alle Vertiefungen positiv sind / d = \log_{10} des Verdünnungsfaktors / n = Anzahl der Vertiefungen pro Verdünnung / r = Anzahl der positiven Vertiefungen pro Verdünnungsstufe / $\sum r/n$ = Beginn der Summation bei der Verdünnungsstufe x_0).

2.2.2.4 Wachstumskurven

Wachstumskurven wurden angelegt, um das Wachstumsverhalten der zu testenden Virusmutanten im Vergleich zu einem Wildtypvirus über eine Zeitspanne von bis zu 72 Stunden zu vergleichen. Hierzu wurden pro Virus 5×10^6 Zellen mit einer MOI von 0,1 des zu untersuchenden Virus versetzt. Für die Infektion wurde die errechnete Virusmenge in *DMEM* –*FCS* verdünnt und die Zellen damit für 1 h bei 37° C inkubiert. Danach wurden die Zellen bei 1200rpm für 8 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 10 ml *DMEM* +*FCS* resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann in Portionen von 2 ml auf fünf 3,5 cm Zellkulturschalen verteilt und im Brutschrank bei 37° C inkubiert. Nach 8, 24, 32, 48 und 72 Stunden wurden die Zellen durch Einfrieren auf -70° C geerntet. Die Bestimmung der Virustiter erfolgte im Anschluss daran wie unter 2.2.2.3 beschrieben mittels einer Titration.

2.2.2.5 Extraktion viraler RNA aus infizierten Zellen

Virale RNA wurde aus virusinfizierten Zellen extrahiert, um diese danach in einer Reverse-Transkriptase-PCR (2.2.2.6) weiter analysieren zu können.

3-4 Tage vor der RNA-Extraktion wurden SK-6 Zellen in 3,5 cm Zellkulturschalen infiziert. Nach Abnehmen des Mediumüberstandes wurde der Zellrasen zunächst 1x mit *PBS* gewaschen und danach mit 1 ml *peqGold Trifast™* lysiert. Das Zellysate wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 200 µl Chloroform versetzt, kräftig gemischt und nach einer Ruhezeit von 5 min für 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Dabei erfolgte eine Phasentrennung und die obere RNA-haltige wässrige Phase wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 500 µl Isopropanol für die Fällung versetzt, kräftig gemischt und nach einer 15 minütigen Inkubationszeit auf Eis bei 4 ° C und 14000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet zweimal mit 75 % EtOH gewaschen, bevor es für 3 min in der *SpeedVac* getrocknet und anschließend in 20 µl DEPC-Wasser aufgenommen wurde. Die so gewonnene RNA wurde bei -20° C gelagert.

2.2.2.6 Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)

In einer Reverse Transkriptase PCR wird als Template RNA anstelle von DNA als Matrize eingesetzt. Die eingesetzte RNA wird dann im ersten Schritt dieser Reaktion zunächst in cDNA umgeschrieben (Reverse Transkription), bevor in einem zweiten Schritt die neu gewonnene cDNA mithilfe der entsprechenden Oligonukleotide amplifiziert wird. Das Produkt einer RT-PCR kann dann analog zu Plasmid-DNA in der Sequenzierung (2.2.1.12) analysiert

werden. So ist es z.B. möglich zu überprüfen, ob Virusmutanten nach der Passagierung in Zellen oder nach der Passage im natürlichen Wirt (Tierversuchsproben) noch die eingefügten gewünschten Mutationen besitzen.

Für RT-PCRs wurden entweder das *OneStep RT-PCR Kit* von Quiagen oder das *Superscript III RT-PCR Kit* von Invitrogen nach Herstellerprotokoll verwendet.

Für RT-PCRs wurde die PCR-Maschine wie folgt programmiert:

OneStep RT-PCR Kit, Quiagen

Schritt	Prozess	Temperatur [°C]	Dauer [sec.]
reverse Transkription	reverse Transkription	50	30
initiale Denaturierung	Denaturierung	95	15
Synthesesyklen (x35)	Denaturierung	94	120
	Primerhybridisierung	52	120
	Primerextension	72	60/kb
finale Synthese	Primerextension	72	600

Tabelle 9: RT-PCR Programm Quiagen Kit

Superscript III RT-PCR Kit, Invitrogen

Schritt	Prozess	Temperatur [°C]	Dauer [sec.]
reverse Transkription	reverse Transkription	50	30
initiale Denaturierung	Denaturierung	94	120
Synthesesyklen (x40)	Denaturierung	94	15
	Primerhybridisierung	55	30
	Primerextension	68	60/kb
finale Synthese	Primerextension	68	300

Tabelle 10: RT-PCR Programm Invitrogen Kit

Nach Ablauf des PCR-Programms wurden die PCR-Produkte zuerst in der analytischen Agarosegelelektrophorese (2.2.1.2) überprüft, dann über die präparative Agarosegelelektrophorese (2.2.1.3) aufgereinigt und anschließend in der Sequenzierung (2.2.1.12) analysiert.

2.2.3 Methoden für die Durchführung von Tierversuchen

2.2.3.1 Vakzination und Infektion

In den in dieser Arbeit beschriebenen Tierstudien wurden den Versuchstieren die Vakzine- oder Challengeviren entweder intramuskulär und intranasal oder ausschließlich intramuskulär verabreicht. Beide Applikationsrouten haben sowohl Vor- als auch Nachteile. Bei einer intramuskulären Injektion ist einerseits die Sicherheit, dass die komplette gewünschte Virusmenge appliziert wurde, sehr hoch. Andererseits imitiert diese Methode nicht die natürliche oro-nasale Infektionsroute einer Feldinfektion. Die intranasale Applikation wiederum kommt einer natürlichen Infektion sehr nahe, birgt dafür aber das Risiko, dass große Mengen des applizierten Volumens an Virusverdünnung durch Herauslaufen aus der Nase verloren gehen und so die exakt applizierte Virusmenge unklar ist. Für beide Wege wurden die zu verabreichenden Virussuspensionen im Labor in Spritzen aufgezogen, mit aufgesetzten Kanülen oder Gummistopfen verschlossen und auf diese Weise vorbereitet auf Eis in die Tierställe transportiert, um einem möglichen Titerverlust beim Transport entgegen zu wirken.

Bei der intramuskulären Applikation wurde die Virusverdünnung eine Handbreit hinter dem Ohrgrund in den *Musculus brachiocephalicus* injiziert. Überstieg die zu applizierende Menge 1,5 ml, so wurde sie in zwei Portionen aufgeteilt und in zwei Injektionen jeweils eine Handbreit hinter dem rechten und linken Ohrgrund injiziert.

Bei der intranasalen Applikation wurde die errechnete Menge an Virusverdünnung in einer Tuberkulinspritze vorgelegt und ohne Kanüle schussartig in ein Nasenloch appliziert.

2.2.3.2 Rücktitration von Vakzineviren

Zur Kontrolle der Titer der Vakzineviren wurden in jedem Tierversuch je 1 ml der Virussuspensionen nach den verschiedenen Transportschritten einbehalten und titriert (s. 2.2.2.3):

- a) Originalvirus (unverdünnt)
- b) applizierte Virusverdünnung (direkt auf -70° C eingefroren (Rücktitration I))
- c) applizierte Virusverdünnung nach Stalltransport "auf Eis" auf -70° eingefroren (Rücktitration II)

2.2.3.3 Determination der Klinischen Punktzahl

Die Vergabe der Klinischen Punktzahl ist eine Möglichkeit, den klinischen Krankheitsverlauf einer CSFV-Infektion vergleichend für mehrere Tiere oder Tiergruppen darzustellen. Zu diesem Zweck wurde ein von Mittelholzer entworfenes Schema verwendet, das bzgl. des Kotabsatzes modifiziert wurde [57].

1	Lebhaftigkeit	aufmerksam (neugierig, steht sofort auf)	0
		leicht reduziert (steht zögernd auf, aber ohne Hilfe)	1
		müde, steht nur unter Zwang auf, legt sich wieder hin	2
		schlafend, steht auch unter Zwang nicht auf	3
2	Körperspannung	entspannt, gerader Rücken	0
		Steifheit und gekrümmter Rücken während des Aufstehens, anschließend normal	1
		gekrümmter Rücken, steifer Gang bleibt erhalten	2
		Krämpfe	3
3	Körperform	gefüllter Magen, „runder“ Körper	0
		leerer Magen	1
		leerer Magen, dünne Körpermuskulatur	2
		abgemagert, Wirbelsäule und Rippen sichtbar Kopf erscheint im Vergleich zum Körper zu groß	3
4	Atmung	Frequenz 10-15/min, Bewegung des Brustkorbs kaum sichtbar	0
		Frequenz >20/min	1
		Frequenz >20/min, deutliche Bewegung des Brustkorbs	2
		Frequenz >30/min, Atmung durch den offenen Mund	3
5	Gang	gut koordinierte Bewegungen	0
		Zögernder Gang, Überkreuzung der Beine wird nur langsam korrigiert	1
		deutliche Ataxie / Hinterhandlahmheit, fähig zu gehen	2
		massive Lahmheit, Unfähigkeit zu gehen	3
6	Haut	gleichmässig leicht rosa, Haar glatt anliegend	0
		gerötete Hautpartien	1
		lila-farblose und kalte Hautareale, einige Petechien Schwarz-rote Verfärbung der Haut, keine Sensitivität	2
		Grosse Blutungen in der Haut	3
7	Augen / Konjunktiven	leicht rosa-rot	0
		gerötet, klares Sekret	1
		stark gerötet, trübes Sekret	2
		stark gerötet, eitriges Sekret, hervorgehobene Blutgefäße	3
8	Appetit	gierig, hungrig	0
		Frisst langsam bei Fütterung	1
		Frisst nicht bei Fütterung, aber probiert Futter	2

		Frisst gar nicht, zeigt kein Interesse am Futter	3
9	Kotabsatz	weicher Kot, normale Menge	0
		verminderte Kotmenge, trocken / dünner Kot, normale Menge	1
		nur geringe Menge von trockenem, fibrin-überzogenem Kot / Durchfall / flüssig	2
		kein Kot, Schleim im Rektum / wässriger / blutiger Durchfall	3
10	Reste imTrog	Trog leer, sauber	0
		Trog fast leer, fast keine Reste	1
		Futter nur teilweise gefressen	2
		Trog immer noch voll, nichts gefressen	3

Tabelle 11: Klinische Punktzahl für CSFV [57]

2.2.3.4 Körpertemperaturmessung

Die Körpertemperatur der Tiere wurde einmal täglich morgens rektal während der Fütterung gemessen. Tabelle 12 gibt die physiologischen Werte für die Körpertemperatur von Schweinen an [58].

Alter/Geschlecht der Tiere	Rektaltemperatur (°C)
Standardabweichung ca.	+/- 0,3
Alteber	38,3
Sauen / Schlachtschweine	38,8
Absetzferkel	39,3
Saugferkel	39,5

Tabelle 12: Ruhewerte Körpertemperatur Schwein [58]

Der Stress, dem die Tiere bei der Fütterung unterliegen (Rangkämpfe, Futterneid), kann mit einer kurzfristigen Erhöhung der Körpertemperatur verbunden sein. Aus diesem Grund wurde in den hier beschriebenen Tierversuchen der Toleranzbereich nach oben ausgedehnt. Als Fieber wurde eine Erhöhung der Körpertemperatur auf 39,5 ° C und höher bei Sauen und Schlachtschweinen definiert.

2.2.3.5 Blutentnahme

Für die am FLI Tübingen durchgeführten Tierversuche (TV#29; TV#30; TV#31) wurde zur Gewinnung von Heparin-Blut in einer 10 ml Spritze 1 ml *Heparin-Lösung* vorgelegt, die direkt bei der Blutentnahme aus der *Vena jugularis externa* bzw. der *Vena cava cranialis* mit dem entnommenen Blut in einem Verhältnis von ca. 1:10 gemischt wurde. Für die Blutentnahme wurden die Tiere im Stand mit Hilfe einer Oberkieferschlinge fixiert. Die Blutentnahme wurde wenn möglich an der rechten Seite des Tieres vorgenommen, um eine Punktion des linksseitig verlaufenden *Nervus phrenicus* zu vermeiden. Die Einstichstelle für die Venenpunktion lag am Rande des *Musculus brachiocephalicus* am äußeren Rand der Jugularisrinne auf der Linie zwischen dem Vorderrand des Buggelenks und der Brustbeinspitze. Die Kanüle wurde ruckartig durch die Haut gestochen und dann durch leichtes Anziehen des Kolbens der Spritze oder Monovette® ein leichter Unterdruck erzeugt. Dann wurde die Kanüle in dorso-medio-lateraler Richtung vorgeschoben. Sobald Blut in die Spritze oder Monovette® eintrat, wurde die Kanüle in dieser Position fixiert und durch weitere Aspiration die erforderliche Blutmenge entnommen. Danach wurde unter anhaltender Aspiration die Kanüle aus dem Tierkörper gezogen und die Einstichstelle mit dem Daumen kräftig abgedrückt bis die Blutung stand.

Für den am FLI Riems durchgeführten Tierversuch (TV#52_12) wurden für die Gewinnung von EDTA-Blut aus den oben genannten Venen gebrauchsfertige S-Monovetten® EDTA verwendet. Der Grund für diese Änderung des Protokolls ist die Tatsache, dass am Standort Riems für die Leukozytenzählung (2.2.4.1) der Hämatologie-Automat Sysmex xt 2000i zur Verfügung steht, welcher für die Probenbearbeitung EDTA-Blut benötigt, während am Standort Tübingen die Leukozytenzählung in einer Neubauerzählkammer manuell erfolgte (2.2.4.1).

Von jeder Heparin- bzw. EDTA-Blutprobe wurden zunächst 500 µl für die Leukozytenzählung (2.2.4.1) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und bis zur weiteren Verwendung bei RT gelagert. Sowohl die Heparin-Blutproben als auch die EDTA-Blutproben wurden dann jeweils für 15 min bei RT und 1800 rpm zentrifugiert. Dadurch erfolgte eine Phasentrennung. Die obere Plasmaphase wurde abgenommen und bei -70° C gelagert. Die restliche Blutprobe wurde dann für die Präparation von Leukozytenkonzentrat verwendet.

Für die Serumgewinnung wurde in Tübingen nach der Entnahme von Heparin-Blut unter Fixierung der Kanüle die Spritze abgezogen und das native Blut in einem 50 ml Bluecap aufgefangen. Am Standort Riems wurde nach Entnahme von EDTA-Blut die S-Monovette® EDTA ebenfalls unter Fixierung der Kanüle abgezogen und es wurde eine S-Monovette® mit Gerinnungsaktivator auf die Kanüle aufgesetzt und das so gewonnene Blut für die Serumgewinnung verwendet. Die Blutproben wurden dann für ca. 30 min bei RT inkubiert,

damit die Blutgerinnung stattfinden konnte. Im Anschluss daran wurden die Proben bei RT und 6000 rpm für 15 min zentrifugiert und der Serumüberstand in Reaktionsgefäßen bei -70° C gelagert. Bevor die Serumproben zum Nachweis von neutralisierenden Antikörpern im Serumneutralisationstest (2.2.4.5) eingesetzt wurden, wurden sie für 30 min im 56° C warmen Wasserbad inaktiviert.

2.2.3.6 Euthanasie

In den Tierstudien eingesetzte Mastschweine wurden mittels elektrischer Betäubungszange betäubt und anschließend vom Schlachtmeister des FLI durch Entbluten getötet.

Tragende Sauen wurden zunächst mittels intramuskulärer Gabe von Stresnil® (Wirkstoff: Azaperon) sediert. Dann wurden den Tieren VasoVet® Venenverweilkanülen in eine Ohrvene gelegt und über diesen Zugang das Tötungsmittel Release® (Wirkstoff: Pentobarbital-Natrium) verabreicht. Nach auskultatorischem Feststellen des Herzstillstands wurden die Tiere dann ebenfalls entblutet. Diese Methode wurde gewählt, da Pentobarbital in der Lage ist, die Plazentarschranke zu überwinden und die Feten so im Mutterleib euthanasiert werden konnten, bevor sie den Uteri entnommen wurden.

2.2.3.7 Entnahme von Organproben

In der Sicherheitsstudie zur Testung der CSFV Doppelmutante (TV#30) wurden nach Euthanasie der Muttertiere (2.2.3.6) die Feten den Uteri entnommen und einer postmortalen Untersuchung unterzogen. Es wurden von jedem Fetus wenn möglich folgende Organe beprobt: Leber, Milz, Niere, Dünndarm und Thymus. Dazu wurden die Organproben mit sterilem Besteck entnommen und bis zur weiteren Aufarbeitung (2.2.4.3) bei -70° C gelagert.

2.2.4 Methoden für die Analyse von Proben aus Tierversuchen

2.2.4.1 Leukozytenzählung

Ein charakteristisches klinisches Anzeichen einer CSFV Infektion kann ein Abfall der Gesamtleukozytenzahl einige Tage nach Infektion sein. Daher wurden in den Tierstudien TV#29, TV#31 und TV#52/12 die Veränderungen in der Anzahl der Leukozyten im

peripheren Blut in regelmäßigen Abständen über den gesamten Zeitraum der Versuche beobachtet.

Die physiologische Schwankungsbreite der Gesamtleukozytenzahl im peripheren Blut liegt bei Schweinen in einem Bereich zwischen 10500 und 21300 Leukozyten pro μl Blut [58].

Allerdings ist bei der Interpretation der Leukozytenzahlen im Hinblick auf die Beurteilung eines Krankheitsgeschehens nicht die absolute Gesamtanzahl ausschlaggebend, sondern vielmehr der Verlauf der Leukozytenzahl über einen gewissen Zeitraum. Daher ist bei geringen Anweichungen von der Norm bei der Interpretation der Ergebnisse Vorsicht geboten und es sollten weitere klinische Anzeichen mitberücksichtigt werden (Klinische Punktzahl; Körpertemperaturmessung).

Die Leukozytenzählung wurde am Standort Tübingen (TV#29; TV#31) manuell mit Hilfe einer Neubauerzählkammer durchgeführt. Dazu wurde eine Blutmischpipette zunächst bis zur Marke 0,5 mit heparinisiertem Vollblut und anschließend bis zur Marke 11 mit Türckscher Lösung befüllt. Dies entspricht einer Verdünnung um den Faktor 1:20. Während der nachfolgenden Inkubation auf einem Rüttler wurden die Erythrozyten lysiert. Die ersten drei Tropfen des Gemischs wurden anschließend verworfen und dann die Zählkammer mit den folgenden Tropfen beschickt. Die Leukozyten wurden im Doppelansatz in jeweils 4 Quadraten der Kammer ausgezählt, wobei bei einer Abweichung von mehr als 15% die Zählung wiederholt wurde. Die Berechnung der Leukozytenzahl erfolgte dann wie folgt:

Fläche Zählkammer:	1 Eckquadrat	1,0 mm^2
Höhe Zählkammer:	1 Eckquadrat	0,1 mm
Volumen Zählkammer:	1 Eckquadrat	0,1 μl
	4 Eckquadrate	0,4 μl

Zellzahl n	=	Leukozyten in 0,4 μl 1:20 verdünntem Blut
n x 2,5	=	Leukozyten in 1,0 μl 1:20 verdünntem Blut
n x 2,5 x 20	=	Leukozyten in 1,0 μl unverdünntem Blut

Da bei der Blutabnahme (2.2.3.5) die Menge des vorgelegten Heparins in der Spritze zwar immer gleich, die abgenommene Menge Blut aber von Tier zu Tier unterschiedlich war, wurde anschließend noch der individuelle Einfluss der Verdünnung durch das zugesetzte Heparin in die Berechnung mit einbezogen.

Am Standort Riems stand für die Leukozytenzählung der *Hämatologie-Automat Sysmex xt 2000i* zur Verfügung, in dem die EDTA-Blutproben aus TV#52_12 vollautomatisch nach Herstellerprotokoll bearbeitet werden konnten.

2.2.4.2 Präparation von Leukozytenkonzentrat

Leukozytenkonzentrat wurde in den Tierstudien aufgearbeitet, um es zur Virusanzucht auf SK-6 Zellen zu verwenden (2.2.4.4).

Nach Abzentrifugieren und Abnahme der oberen Plasmaphase (2.2.3.5), wurden die verbleibenden zwei Phasen (die Interphase mit den Leukozyten und die Erythrozytenphase) der Proben in einem 50 ml "Bluecap" Röhrchen mit 10 ml kaltem *Lysispuffer* versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei 4° C und 1800 rpm für 5 min wurde der Überstand verworfen und der Lysisschritt noch zweimal wiederholt. Dabei wurde das Leukozytenpellet jeweils durch Schütteln des Röhrchens resuspendiert. Im Anschluss an die Lysisschritte wurden noch zwei Waschschrte mit kaltem *PBS-A* auf die gleiche Weise durchgeführt. Danach wurde das Zellpellet in *PBS-A* aufgenommen, in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer die Zellzahl bestimmt und dann auf eine Konzentration von 10⁷ Zellen/ml eingestellt.

2.2.4.3 Aufarbeitung von Organproben

Aus den Organproben der Feten aus TV#30 wurde ein Filtrat hergestellt, dass im Anschluss zur Virusanzucht auf SK-6 Zellen verwendet wurde (2.2.4.4).

Etwa 0,3 g der Organprobe wurden mit wenig sterilem Seesand in einem Mörser durch Verreiben zerkleinert. Dann wurde die Organprobe mit 3 ml kaltem *PBS-A* verrührt, in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt, der Mörser erneut mit 2 ml *PBS-A* gespült und die Spülflüssigkeit ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen überführt. Die Suspension wurde für 10 min bei 3000 rpm und 4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde dann durch zweimalige Sterilfiltration gereinigt. Dabei wurden im ersten Schritt Einwegfilter mit einer Porengröße von 0,45 µm und im zweiten Schritt Einwegfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm verwendet. Das Filtrat wurde bis zu seiner weiteren Verwendung bei -70° C gelagert.

2.2.4.4 Virusanzucht aus Probenmaterial in Zellkultur

Die Virusanzucht in Zellkultur wurde sowohl mit aufgearbeitetem Leukozytenkonzentrat (2.2.4.2) als auch mit Filtrat aus der Aufarbeitung von Organproben (2.2.4.3) durchgeführt.

Zu diesem Zweck wurden am Vortag in 24-well-Platten SK-6 Zellen wie unter 2.2.2.1 beschrieben eingesät. Es wurden dabei jeweils zwei Vertiefungen pro Probe verwandt. Es wurde zunächst ein Mediumwechsel mit *DMEM +FCS* durchgeführt und danach wurden pro Vertiefung 100 µl Leukozytenkonzentrat oder 200 µl Organfiltrat angeimpft. Die 24-well-

Platten wurden dann für 3-4 Tage bei 37° C inkubiert bis der Zellrasen dicht gewachsen war. Danach wurden sie auf Kontaminationen mit Bakterien oder Pilzen kontrolliert und bei -70° C eingefroren. Für die nächste Passage wurden erneut Sk-6 Zellen eingesät und am nächsten Tag wurden von der Ausgangsinfektion jeweils 100 µl Material auf die neuen 24-well-Platten überimpft, nachdem die Platten der Ausgangsinfektion 2x gefriergetaut worden waren, um das Virus aus den Zellen freizusetzen. Waren vor dem Einfrieren der Ausgangsinfektion Kontaminationen festgestellt worden, so wurde das Material dieser Passage vor dem Überimpfen auf die neue 24-well-Platte zunächst mit Hilfe eines Einwegfilters mit einer Porengröße von 0,2 µl gereinigt. Nach einer Inkubationszeit von 3-4 Tagen bei 37° C wurden die Platten der 1. Passage dann ebenfalls auf Kontaminationen überprüft und anschließend mittels indirekter Immunfluoreszenz (2.2.4.6) ausgewertet.

Mit dem Material, das in der indirekten Immunfluoreszenz positiv war, wurden dann Zellen in 3,5 cm Zellkulturschalen erneut beimpft, um aus diesen 3-4 Tage später RNA zu extrahieren (2.2.2.5). Die darin enthaltene virale RNA wurde dann im Anschluss mittels RT-PCR in DNA transkribiert (2.2.2.6) und danach in der Sequenzierung analysiert (3.2.1.4.1).

2.2.4.5 Serumneutralisationstest

Mit Hilfe des Serumneutralisationstests lassen sich CSFV-spezifische neutralisierende Antikörper in den Seren der Versuchstiere nachweisen. Das Prinzip der Methode beruht darauf, dass den potentiell in den Testseren vorhandenen Antikörpern die Möglichkeit gegeben wird, ein CSFV Testvirus zu neutralisieren, bevor eine definierte Menge an Zellen zum Reaktionsansatz gegeben wird. Nach einer Inkubation von 3-4 Tagen wird der Serumneutralisationstest dann mittels Indirekter Immunfluoreszenz ausgewertet, wobei die in der Färbung negativen Proben als positiv in der Neutralisation bewertet werden, da sie eine erfolgreiche Neutralisation des Testvirus durch die Antikörper in den Testseren anzeigen.

Der Versuch wurde in 96-well-Platten durchgeführt und als Testvirus wurde das CSFV-Wildtypvirus SP50 (Stamm Alfort/Tübingen) eingesetzt. In einem ersten Schritt wurden die zuvor inaktivierten Seren in 1:2 Schritten titriert. Dazu wurde die erste Reihe einer 96-well-Platte mit der ersten Verdünnungsstufe der Seren befüllt (i.d.R. wurde mit einer 1:4 Verdünnung begonnen). In den restlichen Reihen der Platte wurden pro Vertiefung je 50 µl *DMEM+FCS* vorgelegt und die Verdünnungsreihe durch Überführen von 50 µl von einer Reihe in die nächste erstellt. Nach dem letzten Verdünnungsschritt wurden aus den Vertiefungen der letzten Reihe je 50 µl verworfen. Die erste Platte eines Testdurchlaufs wurde für die notwendigen Kontrollen verwendet. Auf dieser wurden ein Positiv- und ein Negativserum in der beschriebenen Weise mitgeführt; zusätzlich wurde eine Spalte für die

Zellkontrolle nur mit je 100 µl *DMEM* +*FCS* beschickt. Die Rücktitration des Testvirus wurde ebenfalls auf der ersten Platte durchgeführt. In jede zu testende Vertiefung (d.h. nicht in die Spalte für die Zellkontrolle) wurden dann 50 µl Testvirus mit einer Konzentration von 100 KID₅₀ gegeben und auf der ersten Platte wurden in die Vertiefungen der ersten Spalte je 100 µl dieser Testvirusverdünnung aufgetragen. Die sich anschließenden Spalten wurden aufeinanderfolgend mit den Verdünnungen 10⁻¹ / 10⁻² / 10⁻³ und 10⁻⁴ befüllt (vgl. auch 2.2.2.3). Nach einer einstündigen Inkubationszeit bei 37° C wurden dann pro Vertiefung 1,5 x 10⁴ SK-6 Zellen hinzugegeben, für 3-4 Tage bei 37°C inkubiert und dann der Serumneutralisationstest mittels indirekter Immunfluoreszenz (2.2.4.6) ausgewertet. Sowohl die Serumtiter als auch der Titer des eingesetzten Testvirus bestimmt in der Rücktitration wurden nach der Formel nach Spearman und Kaerber wie unter 2.2.2.3 beschrieben berechnet. Das Testergebnis wurde nur als valide betrachtet, wenn der in der Rücktitration errechnete Titer für das Testvirus zwischen 63,2 und 200 KID₅₀ / 100 µl lag. War dies nicht der Fall, wurde der Test wiederholt.

2.2.4.6 Konventionelle indirekte Immunfluoreszenz

Die indirekte Immunfluoreszenz wurde zum Nachweis einer spezifischen CSFV-Infektion von SK-6 Zellen angewendet. Die konventionelle Methode wurde für die Auswertung von Titrationen (2.2.2.3), Wachstumskurven (2.2.2.4), Serumneutralisationstests (2.2.4.5), der Virusanzucht aus Tierversuchsproben (2.2.4.4) und für die Erfolgskontrolle von Elektroporationen (2.2.1.16) eingesetzt.

Für eine Färbung mit den monoklonalen Antikörpern A18, 24/16 oder f48 wurden die infizierten Zellen zweimal vorsichtig mit *PBS* gewaschen, dann mit einem 1:1 Aceton-Methanol-Gemisch bedeckt, für 10 min bei -20° C fixiert und anschließend im kalten Luftstrom getrocknet. Danach wurden die Zellen zuerst mit *PBS* rehydriert und ein 30 minütiger Blockschrift mit *BSA-Lösung* durchgeführt, bevor die Zellen noch zweimal mit *PBS* gewaschen und dann die jeweiligen Antikörper in der in beschriebenen Verdünnung auf die Zellen gegeben und diese über Nacht bei 4° C inkubiert wurden.

Für eine Färbung mit dem monoklonalen Antikörper Code 4 wurde eine alternative Fixierung angewendet. Nach dem Waschschrift mit *PBS* wurden die infizierten Zellen für 20 min bei 4°C mit *PFA-Lösung* fixiert, 2x mit *PBS-A* gewaschen, 30 min mit *BSA-Lösung* geblockt, mit *Triton PBS-A* für 30 min bei 4°C permeabilisiert und anschließend noch 2x mit *PBS-A* gewaschen, bevor sie ebenfalls über Nacht mit der unter 2.1.4.3 beschriebenen Code 4-Verdünnung inkubiert wurden.

Am nächsten Tag wurden die Zellen zweimal mit *PBS* (A18, 24/16, f48) oder *PBS-A*

(Code 4) gewaschen und dann mit der unter 2.1.4.3 beschriebenen Verdünnung des sekundären Antikörpers α -Maus-FITC für eine h bei 37° C inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut mit *PBS* respektive *PBS-A* gewaschen und dann am *Fluoreszenzmikroskop Nikon ECLIPSE Ti* analysiert.

2.2.4.7 Indirekte Immunfluoreszenz mittels Zeiss Axiovert 200M mit ApoTome®

Alle Proben, bei denen das Ergebnis der Färbung in Bildern dokumentiert werden sollte, wurden am *Zeiss Axiovert 200M Fluoreszenzmikroskop mit ApoTome® Modul* bearbeitet. Durch dieses *ApoTome® Modul* ist es möglich, mehrdimensionale Bildaufnahmen ohne störendes Streulicht aus anderen Bildebenen zu erstellen.

SK-6 Zellen, die nach Infektion für die Analyse an diesem Mikroskop bestimmt waren, wurden in 24-well-Platten auf mit Lysin beschichteten Deckgläschen (*BD Biocoat™ Poly-D-Lysine Cellware*) ausgesät und dann am nächsten Tag infiziert (2.2.2.2). Nach 3-4 Tagen wurde zunächst die Fixierung und Färbung der Zellen wie unter 2.2.4.6 beschrieben durchgeführt, als Sekundärantikörper wurde jedoch in Abweichung zum Standardprotokoll Alexa Fluor®488 in der unter 2.1.4.3 beschriebenen Verdünnung eingesetzt und für 45 min bei 37° C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen auf den Deckgläschen für die Bearbeitung am Mikroskop mittels *Mowiol-Eindeckelmedium* auf gläsernen Objektträgern fixiert und nach etwa einstündiger Trocknung bei 37° C am Mikroskop analysiert und dokumentiert. Das Eindeckelmedium enthielt den Farbstoff DAPI für die Anfärbung der Zellkerne. Für die Bearbeitung der Aufnahmen wurde die Software *Axiovision 4.5* (Zeiss, Göttingen) verwandt. Hierbei wurden jeweils die Einstellungen der Wildtyp-Positivkontrolle für die weiteren Aufnahmen übernommen, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse sicherzustellen.

3.0 Ergebnisse

3.1 CSFV Doppelmutante

3.1.1 Grundlagen

In unserer Arbeitsgruppe wurde in den letzten Jahren unter anderem an der Entwicklung eines neuartigen Impfstoffes gegen das Virus der Bovinen viralen Diarrhoe (BVDV) gearbeitet. Im Zuge dieser Entwicklung konnte in vorangegangenen Arbeiten gezeigt werden, dass BVDV-Doppeldeletionsmutanten, in denen sowohl die N^{pro}-kodierende Region deletiert als auch die RNase-Funktion des E^{rn5}-Proteins ausgeschaltet ist, im natürlichen Wirt deutlich attenuiert sind und in tragenden Tieren eine vertikale Transmission von der Mutter auf die Feten nicht stattfindet [59]. Es ist daher eine naheliegende Überlegung, eine ähnlich konstruierte CSFV Doppeldeletionsmutante als vielversprechenden Ansatz für einen Impfstoff gegen CSFV zu betrachten. Es gelang in unserer Arbeitsgruppe, eine wachstumsfähige CSFV-Doppeldeletionsmutante zu generieren, die eine Chimäre aus den CSFV-Stämmen ATCC und Alfort/Tübingen darstellt. Im Genom dieser Chimäre entsprechen die 5'-nichttranslatierte Region, ein zwei Codone umfassendes Übergangsfragment und die für das C-Protein kodierende Sequenz dem Genom des CSFV-Stammes ATCC, während die übrigen Bereiche des Genoms der Sequenz des CSFV-Stammes Alfort/Tübingen entsprechen. Die CSFV Doppelmutante ist des Weiteren charakterisiert durch Modifikationen in den N^{pro}- und E^{rn5}-codierenden Regionen: Deletion von N^{pro} mit zwei verbleibenden Codonen (M, G) und Ausschaltung der intrinsischen E^{rn5}-RNase-Aktivität durch die Deletion von Codon 346 E^{rn5} [60].

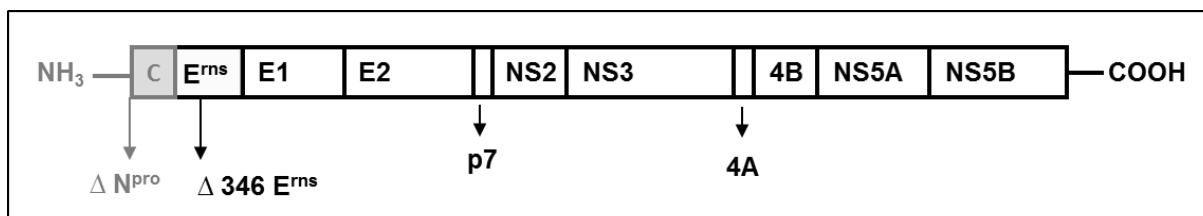


Abbildung 2: Genom der CSFV Doppelmutante EP#6/12

Die Deletion der N^{pro}-codierenden Region und die Inaktivierung der intrinsischen E^{rn5}-RNase-Aktivität durch Deletion von Codon 346 im E^{rn5}-Protein sind durch Dreiecke dargestellt.

Grau dargestellte Bereiche beruhen auf der Sequenz des CSFV-Stammes ATCC; schwarze Schrift auf weißem Grund kennzeichnet Sequenzbereiche des CSFV-Stammes Alfort/Tübingen.

Es konnte bereits durch den Vergleich von Wachstumskurven gezeigt werden, dass die CSFV Doppelmutante und eine CSFV N^{pro}-Einzeldelentionsmutante zwischen 24 und 72 h einen Wachstumsnachteil von 1 bis 2 log-Stufen gegenüber dem Wildtypvirus aufweisen. Erst nach 96 Stunden waren die Titer vergleichbar. Demgegenüber zeigte eine Einzelmutante, die singularär die RNase-Deletion enthielt, über den gesamten Zeitraum eine dem Wildtyp vergleichbare Wachstumskinetik [60].

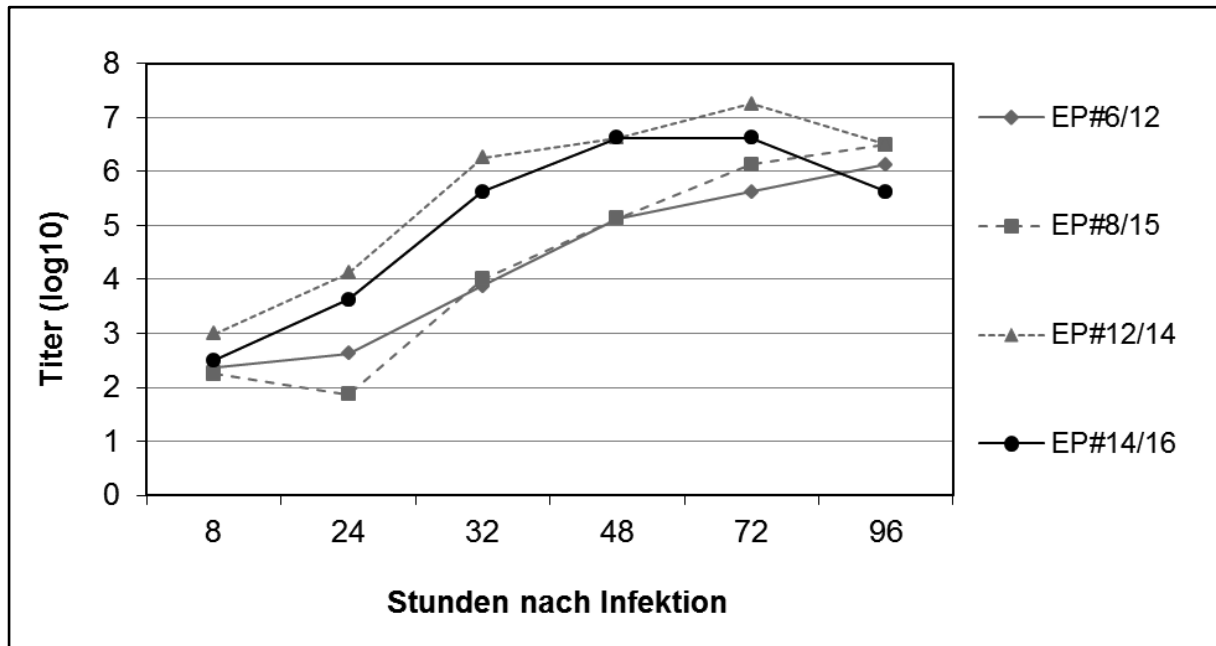


Abbildung 3: Wachstumskurven zur Charakterisierung der Doppeldelentionsmutante

EP#6/12 Doppeldelention (graue Raute, durchgezogene graue Linie): die Doppeldelentionsmutante bleibt bis zu 72 h nach Infektion 1-2 log- Stufen hinter dem Wachstum des Wildtypvirus zurück; allerdings steigt ihr Wachstum im zeitlichen Verlauf konstant an.

EP#8/15 N^{pro}-Deletion (graues Quadrat, gestrichelte graue Linie): diese Mutante verhält sich sehr ähnlich der Doppelmutante; allerdings zeigt ihr Wachstum nach 24 einen leichten Einbruch, bevor es nach 32 h wieder mit dem der Doppelmutante konform ist.

EP#12/14 (graues Dreieck, gepunktete graue Linie): RNase-Deletion: die RNase-Deletion führt offenbar zu keinem Wachstumsnachteil; diese Mutante zeigt im gesamten zeitlichen Verlauf sogar leicht höhere Titer als das Wildtypvirus.

EP#14/16 Alfort/Tübingen Wildtyp (schwarzer Kreis, schwarze durchgezogene Linie): Die Titer aller Mutanten sind nach 96 h höher als die des Wildtypvirus, das zu diesem Zeitpunkt bereits in seiner Replikationsrate rückläufig ist. [60]

3.1.2 Sicherheitsstudie mit tragenden Sauen (TV#30)

In unserer Arbeitsgruppe wurde ein Tierexperiment durchgeführt, in dem die Doppelmutante hinsichtlich ihrer Attenuierung und ihrer Schutzwirkung gegenüber einer Belastungsinfektion mit dem hochpathogenen Wildtypvirus "Eystrup" getestet wurde. In diesem Experiment

konnte gezeigt werden, dass die Doppelmutante nach intramuskulärer Applikation nicht zu einer klinischen Erkrankung führt und sehr wahrscheinlich in der Lage ist, eine protektive Immunantwort gegenüber „Eystrup“ zu induzieren (Daten von Eva-Maria Schürmann, noch nicht veröffentlicht). Bis zu diesem Punkt stimmten die Ergebnisse zur Charakterisierung der CSFV-Doppelmutante mit den Ergebnissen für entsprechende BVDV-Doppelmutanten überein. In einem nächsten Schritt galt es nun zu untersuchen, ob die CSFV-Doppelmutante analog zur BVDV-Doppelmutante nicht transplazentar von der Mutter auf den Fetus übertragen wird und so die Entstehung von persistent infizierten Ferkeln durch die Impfung verhindert werden kann.

Zu diesem Zweck wurde ein Tierexperiment mit sechs tragenden Sauen durchgeführt. Da es nicht möglich war, Sauen in vergleichbaren Stadien der Trächtigkeit zu erwerben, wurden die Tiere zwar alle am gleichen Tag des Experimentes vakziniert, aber zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Trächtigkeit. Drei Sauen wurden mit der CSFV Doppelmutante zwischen Tag 52 und Tag 56 der Trächtigkeit vakziniert, die übrigen Sauen mit dem RNase-negativen Virus TF#283/1 als Positivkontrolle zwischen Tag 33 und Tag 72 der Trächtigkeit.

3.1.2.1 Charakterisierung der in TV#30 eingesetzten Viren

Der Aufbau der CSFV Doppelmutante EP#6/12, die für die Vakzination der Sauen in Gruppe 1 genutzt wurde, ist unter 3.1.1 beschrieben.

In der CSFV-Mutante TF#283/1, die für die Vakzination der Tiere in Gruppe 2 verwendet wurde, ist die E^{rns}-RNase-Aktivität durch eine Punktmutation an Position 297 ausgeschaltet. An dieser Position wurde das Histidin Codon durch ein Lysin Codon ersetzt.

Die Wachstumseigenschaften dieser Varianten wurden bereits in einer früheren Arbeit untersucht (Abbildung 3) [60].

3.1.2.2 Auswahl und Bezeichnung der Tiere

Zwei Wochen vor der geplanten Vakzination wurden sechs tragende Sauen in die Versuchseinrichtung des FLI Tübingen eingestallt, um eine angemessene Akklimatisierungsperiode zu gewährleisten. Die Sauen wurden in zwei Gruppen zu je drei Tieren aufgeteilt. Da es leider nicht möglich war, alle Sauen in vergleichbaren Stadien der Trächtigkeit zu erhalten, wurden die Tiere nach ihrem jeweiligen Trächtigkeitsstand in die Gruppen eingeteilt. Der anvisierte Zeitpunkt für die Vakzination lag um Tag 50 der Trächtigkeit (15 Tage nach Einstallung). Die Tiere, die diesem Kriterium am ehesten entsprachen (also sich zum Zeitpunkt der Einstallung ca. an Tag 35 der Trächtigkeit

befanden), wurden in die Gruppe 1 eingeordnet, die mit der Doppelmutante EP#6/12 vakziniert werden sollte. Die Vakzination mit der RNase-negativen Variante TF#283/1 als Positivkontrolle wurde in der zweiten Gruppe untersucht. Die Tiere in der Gruppe 2 befanden sich bei Einstellung zwischen dem 18. und 57. Tag der Trächtigkeit. Tabelle 13 gibt eine Übersicht über die Gruppeneinteilung und die Trächtigkeitsstadien der einzelnen Tiere.

Gruppe	Virus	Tiernummer	Belegungsdatum	Trächtigkeitstag bei Einstellung
1	EP#6/12	1472	15.02.2010	37
		1473	15.02.2010	37
		1480	11.02.2010	41
2	TF#283/1	1470	31.01.2010	52
		1471	26.01.2010	57
		1478	06.03.2010	18

Tabelle 13: Gruppeneinteilung TV#30

Gruppe 1 (EP#6/12 = Doppelmutante): in diese Gruppe wurden die Sauen eingeordnet, die sich zum Termin der Einstellung am nächsten an Tag 35 der Trächtigkeit befanden, da der anvisierte Vakzinierungstermin um Tag 50 der Trächtigkeit lag.

Gruppe 2 (TF#283/1 = RNase-negative Mutante (Positivkontrolle): die Trächtigkeitsstadien der Tiere in dieser Gruppe sind heterogen, da es nicht möglich war, sechs Tiere mit analogen Trächtigkeitsstadien zu erwerben.

3.1.2.3 Zeitplan

Die sechs tragenden Sauen wurden am 24.3.2010 in die Versuchseinrichtung des Friedrich-Loeffler-Institutes Tübingen eingestallt. Am 8.4.2010 wurden die Tiere mit den jeweiligen Viren vakziniert. Zu diesem Zeitpunkt variierten die Trächtigkeitsstadien der Tiere zwischen Tag 33 (Tier 1478 in Gruppe 2) und Tag 72 (Tier 1471 in Gruppe 2). Die Sauen wurden zwischen Tag 100 und 105 der Trächtigkeit euthanasiert, die Feten reseziert und fetale Gewebeproben entnommen.

Die allgemeine Gesundheitszustand und die rektale Körpertemperatur der Sauen wurden zwischen Tag 0 und 14 dpv täglich kontrolliert. Blutproben für die Serumgewinnung wurden einen Tag vor der Vakzination und am Tag der Euthanasie genommen (Tabelle 14).

Gruppe	Virus	Tiernummer	Datum Belegung	Datum Vakzination	Trächtigkeitstag zum Zeitpunkt der Vakzination	Datum Euthanasie (Trächtigkeitstag)
1	EP# 6/12	1472	15.02.2010	08.04.2010	52	01.06.2010 (105)
		1473	15.02.2010		52	01.06.2010 (105)
		1480	11.02.2010		56	01.06.2010 (105)
2	TF# 283/1	1470	31.01.2010	08.04.2010	67	11.05.2010 (100)
		1471	26.01.2010		72	11.05.2010 (105)
		1478	06.03.2010		33	21.06.2010 (106)

Tabelle 14: Zeitplan TV#30

Da Schweine eine Tragezeit von 112-114 Tagen haben, wurde die Euthanasie auf spätestens 5 Tage vor dem errechneten Geburtstermin terminiert. Die unterschiedlichen Trächtigkeitstage zum Zeitpunkt der Vakzination sind auf die unterschiedlichen Trächtigkeitsstadien der Tiere bei Einstellung zurückzuführen (s. auch Tabelle 13).

3.1.2.4 Infektion und Titration der Viren für Vakzination und Belastungsinfektion

Die CSFV-Mutanten (Gruppe 1: Doppelmutante EP#6/12 / Gruppe 2: RNase-negative Mutante TF#238/1) wurden den Tieren intramuskulär an Tag 0 (0 dpv) verabreicht (2.2.3.1). Zur Kontrolle der Titer der Vakzineviren wurden Rücktitrationen wie unter 2.2.3.2 beschrieben durchgeführt.

Die gewünschte Dosis pro Tier betrug 2×10^5 KID₅₀ / ml. Diese Dosis erhielten die Tiere in Gruppe 1 in 1,1 ml Virussuspension, die Tiere in Gruppe 2 in 0,84 ml. Das benötigte Gesamtvolumen an Virus wurde aufgrund der Ergebnisse von Titrationsen kalkuliert, die vor Beginn des Tierexperimentes durchgeführt worden waren. In diesen Titrationsen war *DMEM+FCS* verwendet worden, wobei das dem *DMEM* zugesetzte *FCS* bestrahlt worden war. Nach Abschluss des Tierversuches war dieses *FCS* jedoch verbraucht und nicht mehr verfügbar. Daher mussten die Rücktitrationen mit einem *FCS* anderer Herkunft durchgeführt werden (*LUA-FCS*). Die resultierenden Titer aus diesen Titrationsen lagen um ca. 1 Log-Stufe niedriger als die Titer, die mit dem *DMEM+FCS* mit bestrahltem *FCS* erreicht worden waren. Aufgrund dieser Veränderung im Testsystem kann nicht genau nachgewiesen werden, ob die Tiere mit der gewünschten Dosis vakziniert wurden oder mit einer deutlich niedrigeren. Weiterhin zeigten die Rücktitrationen, dass während des Transportes zum Stall offenbar ein Titerverlust von ca. 0,5 log stattgefunden hatte und die Tiere daher eine um diesen Verlust niedrigere Dosis erhalten haben. Jedoch zeigen die Rücktitrationen auch, dass alle Tiere in

beiden Gruppen sehr ähnliche Dosen erhalten hatten. Tabelle 15 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der Titrations.

Gruppe 1 (Stall 46) EP#6/12 (CSFV-Doppelmutante)	Titration mit bestrahltem FCS (vor Versuchsdurchführung)	Titration mit LUA-FCS (nach Versuchsdurchführung)
Originalvirus 6. Passage vom 15.02.10	$10^{5,25}$ KID ₅₀ / ml	$10^{4,25}$ KID ₅₀ / ml
Rücktitration I (direkt nach Auftauen auf -70°C)		$10^{3,38}$ KID ₅₀ / ml
Rücktitration II (nach Stalltransport auf -70°C)		$10^{3,31}$ KID ₅₀ / ml
geplante Virusmenge / Tier (basierend auf Titration des Originalvirus mit bestrahltem FCS)	2×10^5 KID ₅₀ = $10^{5,3}$ KID ₅₀ (=1,1 ml)	
tatsächlich eingesetzte Virusmenge nach Stalltransport (basierend auf Titration mit LUA-FCS)	$10^{3,36}$ KID ₅₀ /ml (in 1,1 ml)	

Gruppe 2 (Stall 44) TF#283/1 (RNase negativ)	Titration mit bestrahltem FCS (vor Versuchsdurchführung)	Titration mit LUA-FCS (nach Versuchsdurchführung)
Originalvirus 6. Passage vom 15.02.10	$10^{5,38}$ KID ₅₀ / ml	$10^{4,63}$ KID ₅₀ / ml
Rücktitration I (direkt nach Auftauen auf -70°C)		$10^{4,06}$ KID ₅₀ / ml
Rücktitration II (nach Stalltransport auf -70°C)		$10^{3,81}$ KID ₅₀ / ml
geplante Virusmenge / Tier (basierend auf Titration des Originalvirus mit bestrahltem FCS)	2×10^5 KID ₅₀ = $10^{5,3}$ KID ₅₀ (=0,84 ml)	
tatsächlich eingesetzte Virusmenge nach Stalltransport (basierend auf Titration mit LUA-FCS)	$10^{3,73}$ KID ₅₀ /ml (in 0,84 ml)	

Tabelle 15: Ergebnisse der Rücktitrationen TV#30

Die Tiere in Gruppe 1 erhielten anstelle der geplanten Dosis von $10^{5,0}$ KID₅₀/ml in 1,1ml Virussuspension nur eine Dosis von $10^{3,38}$ KID₅₀/ml.
Den Tieren in Gruppe 2 wurde in 1,1 ml Virussuspension nur eine Dosis von $10^{3,73}$ KID₅₀/ml verabreicht, obwohl auch in dieser Gruppe eine Dosis von $10^{5,0}$ KID₅₀/ml geplant worden war.

3.1.2.5 Körpertemperatur und klinisches Bild der Muttertiere

Der klinische Allgemeinzustand der Muttertiere wurde zwischen Tag 0 und 14 dvp täglich kontrolliert und durch die Erhebung der klinischen Punktzahl wie unter 2.2.3.3 beschrieben dokumentiert. Während dieser Zeit konnten bei keinem Tier Anzeichen einer klinischen Erkrankung festgestellt werden.

Die rektale Körpertemperatur der Sauen wurde zwischen Tag -2 und 14 dpv täglich zur gleichen Zeit bei der Fütterung gemessen. Die Körpertemperaturen aller Tiere blieben über die gesamte Dauer des Versuches unterhalb der physiologischen Höchstgrenze von 39,5 °C (vergl. 2.2.3.4; Abbildung 4).

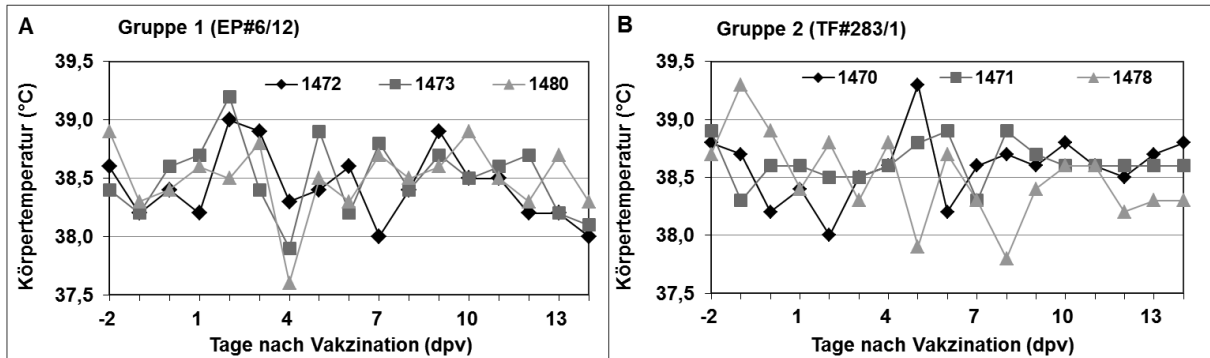


Abbildung 4: Körpertemperatur TV#30

A: Gruppe 1 (vakziniert mit der Doppelmutante EP#6/12)

B: Gruppe 2 (vakziniert mit der RNase negativen Mutante TF#283/1)

Alle Tieren in beiden Gruppen zeigten zu keinem Zeitpunkt Fieber (vergl. 2.2.3.4). Die Körpertemperatur der Tiere in beiden Gruppen schwankte über den Verlauf des Versuches in weiten Teilen zwischen 38,0 und 39,0 °C. Nur an einzelnen Tagen zeigten einzelne Tiere Abweichungen von dieser Schwankungsbreite (Gruppe 1: Tier 1473 an Tag 2 und 4, Tier 1480 an Tag 4; Gruppe 2: Tier 1470 an Tag 5, Tier 1478 an den Tagen -1, 5 und 8).

3.1.2.6 Serologische Untersuchung (SNT)

Serumneutralisationstests (vergl. 2.2.4.5) wurden zur Untersuchung von Serumproben durchgeführt, die einen Tag vor der Vakzination (-1dpv) und am Tag der Euthanasie (33, 50, 54 oder 74 dpv) genommen worden waren. Alle Tiere zeigten in diesen Tests signifikante Titer CSFV spezifischer neutralisierender Antikörper. Die Titer der Tiere in Gruppe 1, welche die CSFV Doppelmutante erhalten hatten, waren jedoch im Vergleich niedriger als die Titer der Tiere aus Gruppe 2, welche mit der RNase negativen Variante vakziniert worden waren (Abbildung 5).

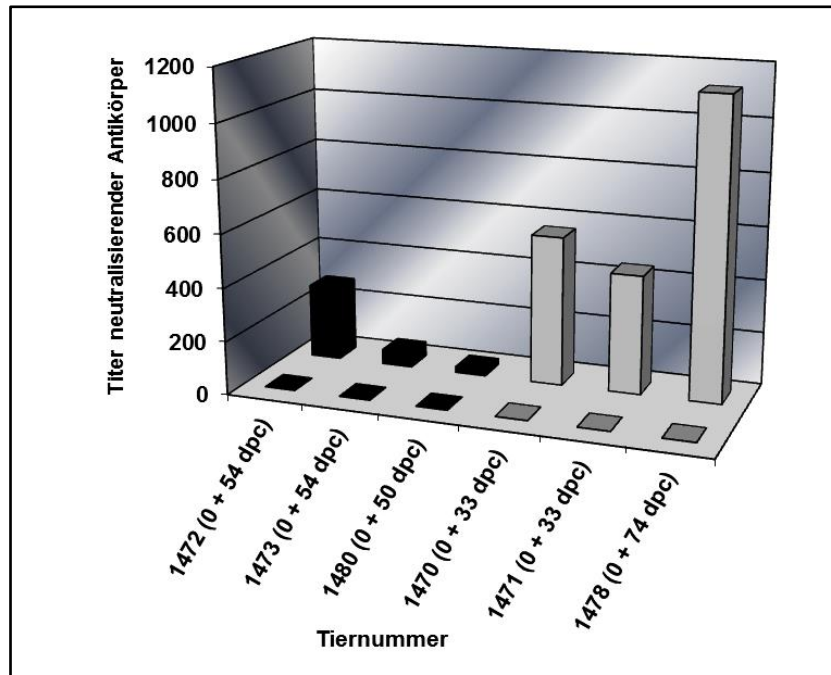


Abbildung 5: SNT TV#30

Die Werte der Tiere der Gruppe 1 (1472; 1473; 1480) sind mit schwarzen Balken dargestellt; die Werte der Tiere der Gruppe 2 (1470; 1471; 1478) mit grauen Balken. Die vordere Datenreihe zeigt die Titer an neutralisierenden Antikörpern vor der Vakzination an; dieser Wert lag wie erwartet bei allen Tieren bei 0. Die hintere Datenreihe zeigt die Titer neutralisierender Antikörper, die am Tag der Euthanasie im Blut der Tiere gemessen werden konnten. Obwohl alle Tiere in beiden Gruppen zu diesem Zeitpunkt signifikante Titer neutralisierender Antikörper gebildet hatten, waren die Titer der Tiere der Gruppe 2 deutlich höher als die Titer der Tiere in Gruppe 1.

3.1.2.7 Postmortale Untersuchung der Feten

Nach Euthanasie der Muttertiere (Tabelle 16) wurden die Feten den Uteri entnommen und jeder Fetus wurde zunächst auf morphologische Veränderungen hin untersucht. Mit Ausnahme von einem Fetus sahen alle Feten der Sauen aus Gruppe 1 (vakziniert mit der Doppelmutante) gesund aus. Ein Fetus von Sau 1472 zeigte jedoch Missbildungen des Schädels (Gaumenspalte, offene Schädeldecke, Schädelverformungen) und ein verknöchertes Schultergelenk. Diese Missbildungen sind jedoch nicht pathognomonisch für eine vertikale CSFV Infektion. Es ist vielmehr wahrscheinlich, dass sie ihre Ursache in Störungen der Embryonalentwicklung haben und bereits vor der Vakzination der Mutter vorhanden waren.

Die Sauen der Gruppe 2 (vakziniert mit der RNase negativen Mutante) hatten insgesamt 34 Feten. Von diesen zeigten 12 pathologische Befunde. Diese reichten von beginnender Autolyse bis zu vollständiger Mumifizierung der Feten. Die übrigen 22 Feten zeigten keine offensichtlichen pathologischen Befunde (Abbildung 6; Tabelle 17).

Gruppe	Virus	Tiernummer	Trächtigkeitstag zum Zeitpunkt der Euthanasie	Tag nach Vakzination zum Zeitpunkt der Euthanasie
1	EP#6/12	1472	105	54
		1473	105	54
		1480	105	50
2	TF#283	1470	100	33
		1471	105	33
		1478	106	74

Tabelle 16: Zeitliches Konzept für die Euthanasie der Muttertiere



Abbildung 6: morphologische Befunde Feten

- A: Fetus Gruppe 1: ohne besonderen Befund
- B: Fetus Gruppe 2: profunde Autolyse
- C: Fetus Gruppe 2: vollständige Mumifizierung

Gruppe	Virus	Tiernummer	Anzahl Feten	Feten mit pathologischen Befunden
1	EP#6/12	1472	14	Nr. 14: Gaumenspalte, unvollständige Schädelkalotte, deformierter Schädel, verknöchertes Schultergelenk
		1473	12	-
		1480	9	-
2	TF#283/1	1470	12	Nr. 9: große Menge an abdominaler Flüssigkeitsansammlung, Nieren von weicher Konsistenz, beginnende Autolyse Nr. 12: profunde Autolyse (keine Probenentnahme)
		1471	11	Nr. 11: profunde Autolyse (keine Probenentnahme)
		1478	11	Nr. 3 + Nr. 4: Autolyse Nrn. 5 – 11: vollständige Mumifizierung

Tabelle 17: Sektion der Feten – Übersicht über pathologische Befunde

3.1.2.8 Virusanzucht aus fetalen Organen

Von jedem Fetus wurden wenn möglich Gewebeproben von Leber, Milz, Niere, Dünndarm und Thymus genommen. Bei zwei Feten (Nr. 12 von Sau 1470 und Nr. 11 von Sau 1471) wurde auf die Probenentnahme verzichtet, da die Autolyse bei diesen Feten bereits sehr weit fortgeschritten war. Bei den mumifizierten Feten konnten leider die verschiedenen Gewebe nicht erkannt werden. Es wurde daher Probenmaterial aus der Bauchhöhle entnommen, wobei nicht bestimmt werden konnte, welches Organ beprobt worden war. Leider war es jedoch nicht möglich, das Probenmaterial der mumifizierten Feten aufzuarbeiten, da das Gewebe zu hart war.

Die entnommenen Organproben wurden aufgearbeitet und das gewonnene Filtrat wurde für die Infektion von Sk-6 Zellen verwandt (2.2.4.3; 2.2.4.4) Die Auswertung erfolgte mittels indirekter Immunfluoreszenz mit dem mAk A18 (2.2.4.6). Alle Gewebeproben der Feten aus Gruppe 1 (EP#6/12, Doppelmutante) brachten in der indirekten Immunfluoreszenz ein negatives Ergebnis. Im Gegensatz dazu wurde in mindestens einem Fetus jeder Sau aus der Gruppe 2 (TF#283/1, RNase negative Mutante) mit dieser Methode Virus nachgewiesen (Tabelle 18).

Die aus den fetalen Gewebeproben reisolierten Viren wurden anschließend mittels RT-PCR (2.2.2.6) und Sequenzierung (2.2.1.12) analysiert. Alle reisolierten Viren aus Feten der Gruppe 2 (TV#283/1) zeigten noch die für die Ausschaltung der E^{rns}-RNase-Aktivität verantwortliche Punktmutation H297K. Da es nicht möglich war, aus fetalen Gewebeproben der Gruppe 1 Virus nachzuweisen, konnte die Stabilität der Doppeldeletion in Virus EP#6/12 nach der Tierpassage nicht verifiziert werden (Tabelle 18).

Gruppe 1 (EP#6/12)							Gruppe 2 (TF#283/1)						
Sau	Fetus	Leber	Milz	Niere	Dünndarm	Thymus	Sau	Fetus	Leber	Milz	Niere	Dünndarm	Thymus
1472	1	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	1470	1	-/-	-/+	+/+	n.d.	+/+
	2	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-		2	+/-	+/+	+/+	+/+	+/+
	3	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-		3	-/-	+/+	+/+	+/+	n.d.
	4	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-		4	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	5	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-		5	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-
	6	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-		6	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	7	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-		7	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-
	8	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-		8	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+
	9	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-		9	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-
	10	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-		10	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+
	11	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-		11	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
	12	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-		12	profunde Autolyse - keine Probe				
	13	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-							
	14	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-							
1473	1	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	1471	1	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
	2	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-		2	-/-	-/-	-/+	-/-	-/-
	3	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-		3	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	4	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-		4	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	5	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-		5	+/+	+/+	+/+	-/+	-/-
	6	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-		6	+/+	+/-	-/-	+/+	-/-
	7	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-		7	-/-	+/-	-/-	-/-	-/+
	8	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-		8	-/-	-/+	-/-	-/-	+/+
	9	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-		9	+/-	+/+	+/+	+/+	+/+
	10	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-		10	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	11	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-		11	profunde Autolyse - keine Probe				
	12	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-							
1480	1	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	1478	1	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-
	2	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-		2	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	3	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-		3*	-/-	n.d.	-/-	n.d.	n.d.
	4	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-		4*	-/-	n.d.	-/-	n.d.	n.d.
	5	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-		5°	n.d.				
	6	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-		6°	n.d.				
	7	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-		7°	n.d.				
	8	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-		8°	n.d.				
	9	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-		9°	n.d.				
								10°	n.d.				
						11°	n.d.						

Tabelle 18: Virusanzucht aus fetalen Organen

* autolytischer Fetus: keine Beprobung des Thymus möglich

° mumifizierter Fetus: keine Differenzierung der Organe möglich, Probennahme aus der Bauchhöhle

In der linken Spalte sind die Befunde der Feten der Gruppe 1 (Doppelmutante EP#6/12) aufgeführt. In keinem Fetus der Sauen aus Gruppe 1 konnte Virus nachgewiesen werden.

In der rechten Spalte sind die Befunde der Feten der Gruppe 2 (RNase negative Mutante TF#283/1) dargestellt. In 9 von 12 Feten von Sau 1470, in 5 von 11 Feten von Sau 1471 und in 1 von 11 Feten von Sau 1478 konnte Virus in mind. einem Gewebe detektiert werden. Jeweils 1 Fetus von Sau 1470 und Sau 1471 und 2 Feten von Sau 1478 waren stark autolytisch; 7 von 11 Feten von Sau 1478 waren mumifiziert.

3.1.2.9 Zusammenfassung Sicherheitsstudie (TV#30)

Keine der tragenden Sauen in diesem Tierexperiment zeigte klinische Symptome einer CSFV Infektion, weder nach intramuskulärer Vakzination mit dem RNase negativen Virus TF#283/1, noch mit der Doppelmutante EP#6/12. Alle Tiere zeigten während des Versuches eine physiologische Körpertemperatur. In der Rücktitration zeigte sich, dass niedrigere Titer als gewünscht in den Impfdosen verabreicht worden waren. Anstelle von der gewünschten Dosis von 2×10^5 KID₅₀/ml wurden den Tieren in Gruppe 1 nur Dosen von jeweils $10^{3,4}$ KID₅₀/ml und den Tieren in Gruppe 2 nur Dosen von jeweils $10^{3,7}$ KID₅₀/ml verabreicht.

Doch trotz dieser geringeren Dosierung konnte bei den Tieren in Gruppe 2 eine transplazentare Infektion des RNase negativen Virus nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Serumneutralisationstests zeigten, dass die Infektion in allen Tieren erfolgreich war. Dennoch waren die erreichten Titer an neutralisierenden CSFV-spezifischen Antikörpern in beiden Gruppen signifikant unterschiedlich. Die Tiere der Gruppe 2 (vakziniert mit der RNase negativen Variante) zeigten deutlich höhere Titer als die Tiere der Gruppe 1 (vakziniert mit der Doppelmutante). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass die Muttertiere durch die Virusausscheidung der persistent infizierten Feten einem ständigen "Boost" unterworfen waren.

Zusammenfassend lässt sich aus den Ergebnissen von TV#30 schließen, dass die Doppelmutante EP#6/12 in diesem Tierexperiment nicht in der Lage war, die Plazentaschranke zu überwinden oder dass sie die Plazentaschranke zwar überwunden hat, aber dennoch nicht in der Lage war, länger bestehende Infektionen in den Feten zu etablieren.

3.2 CSFV DIVA-Vakzine-Mutanten

Die Ergebnisse von TV#30 geben Hinweise darauf, dass die CSFV Doppelmutante zwei wichtige Kriterien für einen neuartigen Impfstoff gegen CSFV erfüllen kann:

1. Die Doppelmutante erzeugt bei intramuskulärer Applikation keine klinische CSFV Symptomatik und der Impferfolg zeigt sich in der Bildung CSFV-spezifischer neutralisierender Antikörper.
2. Die Doppelmutante ist offenbar nicht in der Lage, die Plazentaschranke zu überwinden oder länger andauernde Infektionen in den Feten zu erzeugen und kann so wahrscheinlich die Entstehung persistent infizierter Tiere verhindern.

Die in TV#30 getestete Doppelmutante trägt jedoch noch kein Markierungskonzept, welches die Unterscheidung vakzinierter von infizierten Tieren erlaubt (DIVA). Ein solches Konzept wurde in den folgenden Arbeiten entwickelt.

3.2.1 TAV-Epitop-Basismutanten

3.2.1.1 Markierungskonzept

Als Ansatz für ein DIVA taugliches Markierungskonzept wurde in dieser Arbeit das TAV-Epitop auf dem E2-Protein von CSFV gewählt. Dieses lineare Epitop befindet sich an den Positionen 140 - 148 des E2-Proteins, hat die Aminosäuresequenz TAVSPTTLRT und wird von dem monoklonalen Antikörper (A18) erkannt. Das TAV-Epitop ist spezifisch für CSFV, evolutionär fast zu 100% konserviert und ein Ziel neutralisierender Antikörper [48].

Das Ziel der Versuche war es nun, die Aminosäuresequenz des Epitopes derart zu verändern, dass es nicht mehr von dem monoklonalen Antikörper A18 erkannt werden kann, um auf diese Weise als Negativmarker in einer zukünftigen Vakzine verwendet werden zu können. Dieser Impfstoff müsste dann in Konsequenz von einem korrespondierenden serologischen Testsystem begleitet sein, in dem die Seren von vakzinierten Tieren ein negatives Signal gäben, während die Seren von mit Feldvirus infizierten Tieren ein positives Signal gäben.

3.2.1.2 Konstruktion der benötigten Plasmide

In einem ersten Ansatz zur Generierung der gewünschten Mutanten wurde das Plasmid pSW4 hergestellt. Dieses Plasmid basiert auf dem Vektor pCITE®2a, in den ein ca. 2,1 kb großes NdeI/BglIII CSFV cDNA Fragment eingefügt wurde (2.2.1.4; 2.2.1.6). Dieses Fragment beinhaltet die Sequenzen, die für den Großteil des viralen Proteins E1, die Proteine E2 und p7 und für einen Teil des Proteins NS2 codieren. Im Anschluss daran wurde in pSW4 eine BsiWI-Schnittstelle mittels einer Quik Change®-PCR (verwendete Oligonukleotide: C-BsiWI-E2 / C-BsiWI-E2R; 2.2.1.1.2) eingefügt (Abbildung 7). Das resultierende Plasmid pSW5 wurde dann als Template in vier PCRs (2.2.1.1.1) genutzt, mit Hilfe derer verschiedene Aminosäureaustausche in das TAV-Epitop eingefügt wurden (Tabelle 19). Diese Mutationen wurden durch antisense Primer generiert, die die BsiWI-Schnittstelle und die gewünschten Aminosäureaustausche enthielten, während als sense Primer ein pCITE® Vektor Basisprimer (ol pCITE) verwendet wurde.

TAV-Epitop Mutagenese Primer antisense	insetzte Aminosäureaustausche im TAV-Epitop
	TAVSPTTLRT
CP-7-E2-Epitr	TAV NKD TLR
NY-E2-Epitr	TAV NQD TLR
AATV-E2-Epitr	TAVS AATVR
ASSV-E2-Epitr	TAVS ASSVR

Tabelle 19: TAV-Epitop Mutagenese Primer und resultierende Mutationen

Die Aminosäuresubstitutionen im TAV-Epitop sind **fett** hervorgehoben.

Die PCR-Produkte wurden mit NdeI und BsiWI geschnitten. Daraus gingen 2 kb große Fragmente hervor, welche in pSW5 (NdeI / BsiWI) ligiert wurden und so in den Plasmiden pSW6 (TAV**NKD**TLR), pSW7 (TAV**NQD**TLR), pSW8 (TAVS**AATVR**) und pSW9 (TAVS**ASSVR**) resultierten. Aus diesen Plasmiden wurden dann wiederum 2,1 kb große NdeI/BglIII Fragmente ausgeschnitten und danach in das Plasmid p578 (NdeI/BglIII) ligiert. So entstanden die Plasmide pSW10 (TAV**NKD**TLR), pSW11 (TAV**NQD**TLR), pSW12 (TAVS**AATVR**) und pSW13 (TAVS**ASSVR**). Im nächsten Klonierungsschritt wurden dann CSFV Gesamtklone auf der Basis von Alfort/Tübingen generiert. Dazu wurden aus den zuvor genannten Plasmiden mit Hilfe der Restriktionsenzyme XhoI, BglIII und Scal 3,7 kb große Fragmente exzidiert und in den CSFV Alfort/Tübingen Gesamtklon p1347 (XhoI/BglIII) ligiert. Auf diese Weise wurden die Gesamtklone pSW14 (TAV**NKD**TLR), pSW15 (TAV**NQD**TLR), pSW16 (TAVS**AATVR**) und pSW17 (TAVS**ASSVR**) hergestellt (Abbildung 7).

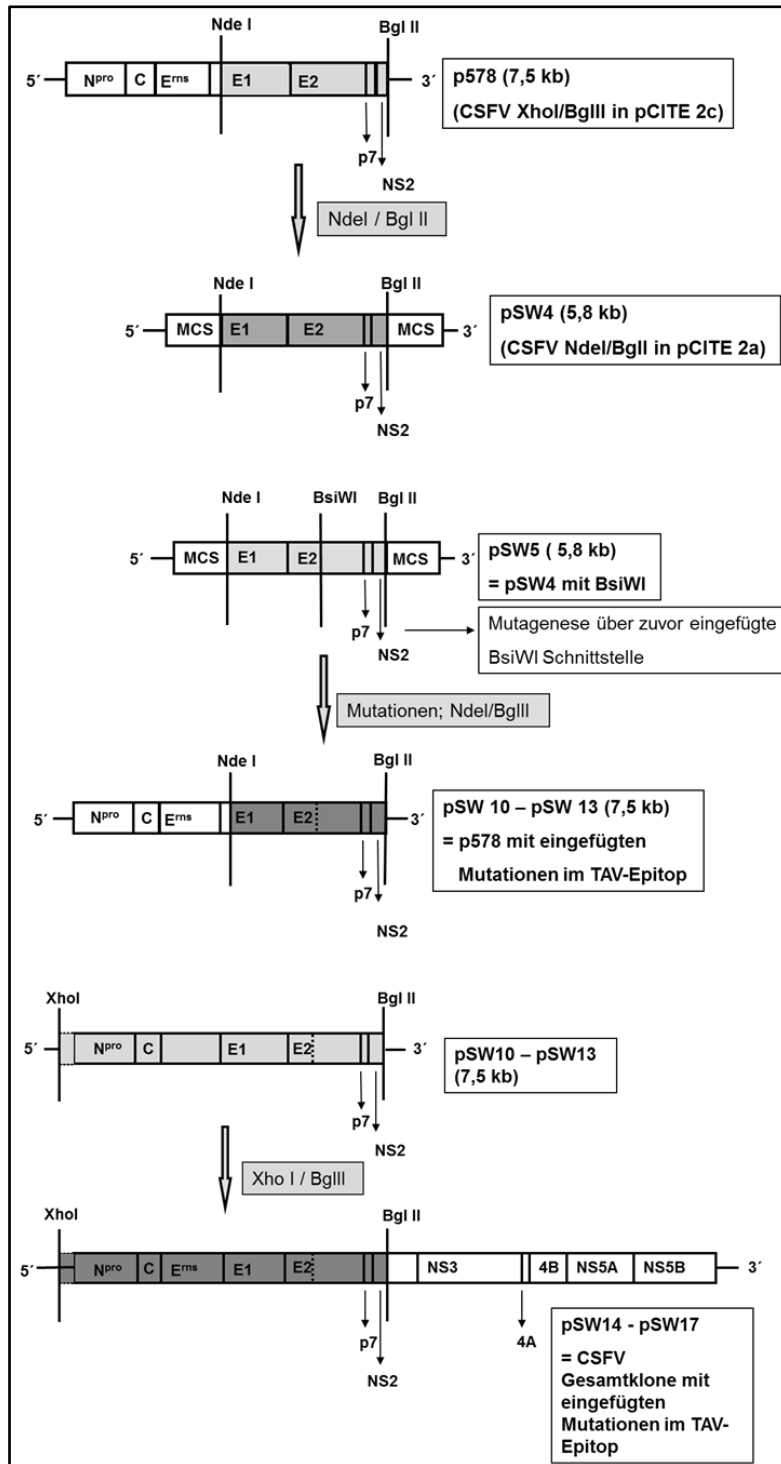


Abbildung 7: Klonierungsschema TAV-Epitop Basismutanten

Ein CSFV NdeI/BglIII cDNA-Fragment wurde in einen pCITE®2a-Vektor inseriert. In das resultierende Plasmid pSW4 wurde dann mittels Quik Change® PCR (2.2.1.1.2) eine BsiWI-Schnittstelle eingefügt, über die in einem nächsten Schritt die gewünschten TAV-Epitop Mutationen mit Hilfe von Standard-PCRs (2.2.1.1.1) inseriert wurden. Nach der Mutagenese wurde aus den resultierenden Klonen jeweils ein NdeI/BglIII Fragment heraus geschnitten und in Plasmid p578 eingefügt (2.2.1.6). Die hieraus hervorgegangenen Plasmide pSW10-pSW13 wurden in einem letzten Schritt mit XhoI und BglIII geschnitten und diese cDNA-Fragmente wurden in ein CSFV Alfort/Tübingen Gesamtklonplasmid (p1347) (XhoI/BglIII) eingefügt. Daraus resultierten die TAV-Epitop Basiskonstrukte pSW14-pSW17 (vergl. Tabelle 20).

3.2.1.3 Herstellung der TAV-Epitop Basismutanten

Die Gesamtklone pSW14 – 17 wurden mit Hilfe des Restriktionsenzymys SmaI linearisiert und danach *in vitro* transkribiert (2.2.1.13). Die Integrität der so gewonnene RNAs wurde zunächst in der Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese (2.2.1.15) überprüft. Danach wurden sie für die Elektroporation (2.2.1.16) von SK-6 Zellen verwendet. Im Anschluss daran wurden zwei verschiedene Antikörperfärbungen für indirekte Immunfluoreszenzexperimente durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen zum einen mit dem monoklonalen Antikörper 24/16 (detektiert E^{ms}) und zum anderen mit dem monoklonalen Antikörper A18 gefärbt (2.2.4.6). Alle Mutanten gaben in der 24/16 Färbung ein positives Signal. Dies zeigte, dass replizierende Viren vorhanden waren. In der A18 Färbung gaben jedoch alle Mutanten ein negatives Signal. Diese Beobachtung war der erste Hinweis darauf, dass das angestrebte Markierungsprinzip funktional sein könnte.

Die infizierten Zellen wurden gefriergetaut und für die Infektion (2.2.2.2) neuer SK-6 Zellen verwandt. Die so gewonnenen Viren wurden daraufhin dreimal passagiert, um ihr Wachstum zu forcieren und die Stabilität der eingefügten Mutationen überprüfen zu können. Die 3. und die 6. Passage der TAV-Epitop Basismutanten wurden für die Extraktion von viraler RNA (2.2.2.5) verwandt und die gewonnenen RNAs wurden in RT-PCRs (2.2.2.6) (Oligonukleotide: SW42r/SW43) eingesetzt.

3.2.1.4 Prüfung des Markierungskonzeptes

3.2.1.4.1 Sequenzierung

Die Produkte der RT-PCRs wurden im Anschluss in der Sequenzierung (2.2.1.12) analysiert. Hierbei zeigte sich, dass in der dritten Passage in jeder der vier Virusmutanten eine der eingefügten Aminosäuresubstitutionen revertiert war. In pSW14 und pSW15 war das eingefügte Asparagin Codon wieder durch ein Serin Codon ersetzt worden und in pSW16 und pSW17 das inserierte Valin Codon wieder durch ein Leucin Codon.

Plasmide / Virusmutanten	pSW14	pSW15	pSW16	pSW17
Originalplasmide	TAV NKD TLRT	TAV NQD TLRT	TAVS AA TVRT	TAVS ASS VRT
3. Passage auf SK-6	TAVS KD TLRT	TAVS QD TLRT	TAVS AA TLRT	TAVS ASS LRRT

Tabelle 20: Ergebnisse der Sequenzierung TAV-Epitop-Basismutanten 3. Passage auf SK-6

In pSW14 und pSW15 sind die Asparagin Codone zu Serin Codonen revertiert.

In pSW16 und pSW17 sind die Valin Codone zu Leucin Codonen revertiert.

Aminosäuresubstitutionen sind **fett** dargestellt.

Daraufhin wurden noch drei weitere Passagen der TAV-Epitop Basismutanten auf SK-6 Zellen durchgeführt. Von der 6. Passage wurde dann erneut RNA gewonnen, diese in RT-PCRs eingesetzt und anschließend die PCR-Produkte sequenziert. Die Ergebnisse der Sequenzierung waren identisch mit denen der dritten Passage (Tabelle 20).

Da keine neuen Veränderungen der Aminosäuresequenz aufgetreten waren, erschien es wahrscheinlich, dass die Reversionen der dritten Passage auch in weiteren Passagen stabil bleiben würden.

3.2.1.4.2 Indirekte Immunfluoreszenz

Zur Verifizierung der Funktionalität des Markierungskonzeptes wurden die TAV-Epitop Basismutanten (6. Passage) in der indirekten Immunfluoreszenz mittels Zeiss Axiovert 200M mit ApoTome® (2.2.4.7) eingesetzt. Es wurden hierbei verschiedene Antikörperfärbungen als interne Positivkontrollen getestet: 24/16 (detektiert E^{ms}), Code 4 (detektiert NS3) und f48 (detektiert E2). Alle vier Mutanten zeigten in diesen Färbungen ein positives Signal. Dies zeigt, dass vermehrungsfähiges CSF-Virus in den Zellen vorhanden war. Alle vier Mutanten erbrachten jedoch das gewünschte negative Signal in der A18 Färbung (erkennt spezifisch das TAV-Epitop). Dieses Ergebnis erlaubt die Schlussfolgerung, dass die in der Sequenzierung detektierten Reversionen keinen Einfluss auf die Funktionalität der eingefügten TAV-Epitop Markierungen haben und diese nach wie vor intakt sind (Abbildung 8).

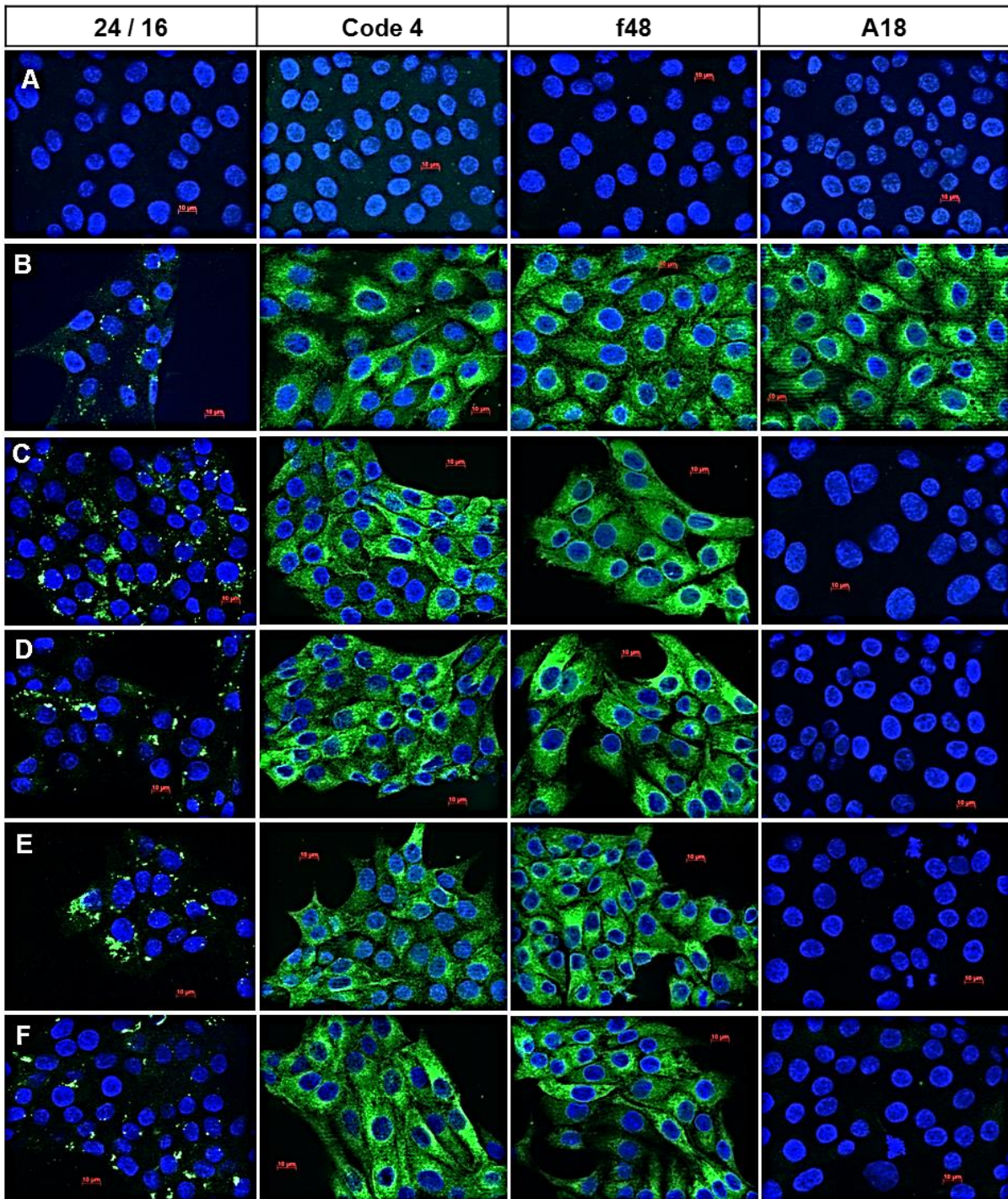


Abbildung 8: Indirekte Immunfluoreszenz TAV-Epitop-Basismutanten

A: Zellkontrolle: negativ in allen Antikörperfärbungen

B: Wildtypkontrolle (Virus: 1347, Stamm Alfort/Tübingen): positiv in allen Antikörperfärbungen

A-F: Zellkerne angefärbt mit DAPI

C: pSW14 6. Passage; D: pSW15 6. Passage; E: pSW16 6. Passage; F: pSW17 6. Passage

Alle vier TAV-Epitop Basismutanten zeigen in den Kontrollfärbungen mit den mAk 24/16 (detektiert E^{ms}), Code 4 (detektiert NS3) und f48 (detektiert ein alternatives E2-Epitop) ein positives Signal; in der A18-Färbung (detektiert das TAV-Epitop) zeigen alle vier Mutanten ein negatives Signal.

3.2.1.5 Wachstumseigenschaften der TAV-Epitop Basismutanten

Die 6. Passagen der TAV-Epitop-Basismutanten wurden titriert (2.2.2.3) und anschließend wurden Wachstumskurven (2.2.2.4) erstellt, um die Wachstumskinetiken der Mutanten im Vergleich zu einem CSFV Alfort/Tübingen Wildtypvirus (EP#98/1) zu vergleichen. Alle Mutanten zeigten hierbei ein dem Wildtyp vergleichbares Wachstumsverhalten (Abbildung 9).

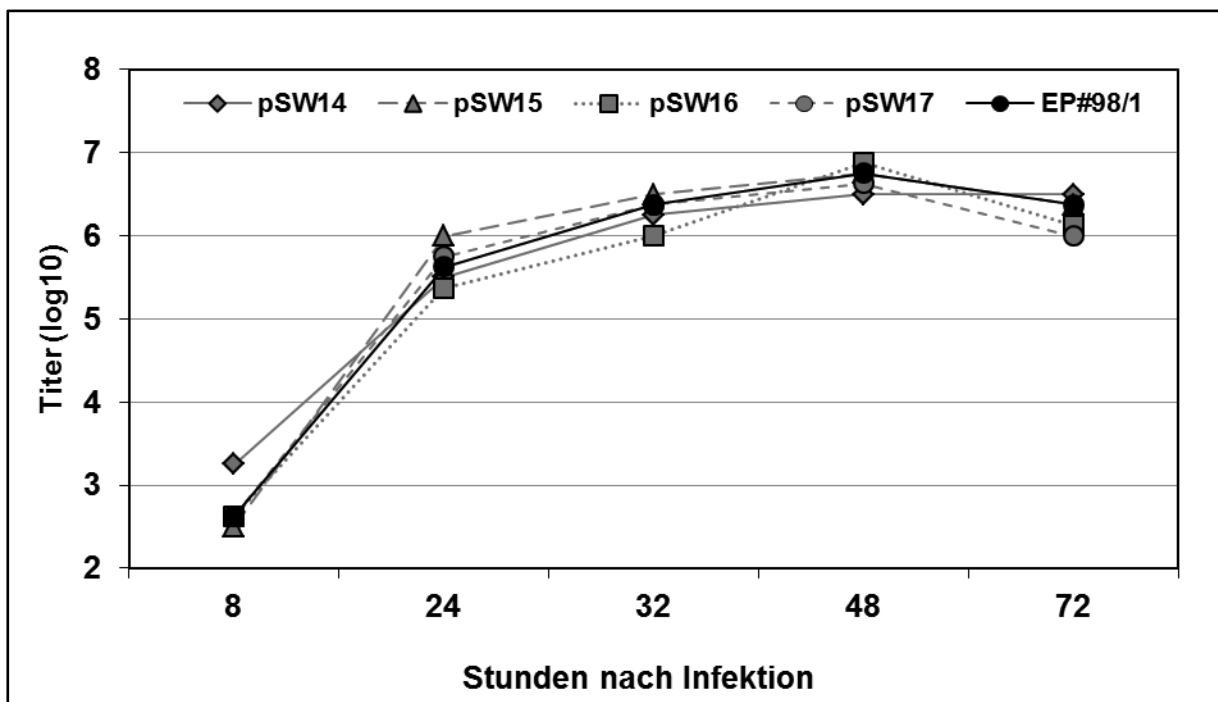


Abbildung 9: Wachstumskurven der TAV-Epitop-Basismutanten

Die Titer der sechsten Passagen der Viren pSW14 (graue Raute, durchgezogene graue Linie), pSW15 (graues Dreieck, gestrichelte graue Linie), pSW16 (graues Quadrat, gepunktete graue Linie), pSW17 (grauer Kreis, gestrichelte graue Linie) und dem Alfort/Tübingen Wildtypvirus EP#98/1 (schwarzer Kreis, schwarze durchgezogene Linie) sind vergleichend für die Zeit zwischen 8 und 72 h nach Infektion dargestellt.

Alle vier TAV-Epitop-Basismutanten zeigten ein dem Wildtypvirus sehr ähnliches Wachstumsverhalten. Die Titer stiegen bis zu 48 h nach der Infektion an, danach war die Replikation bei allen fünf Viren rückläufig.

3.2.2 TAV-Epitop DIVA-Vakzine Kandidaten

In den bisherigen Arbeiten zu den TAV-Epitop-Basismutanten konnte gezeigt werden, dass die eingefügten Negativmarkierungen im TAV-Epitop trotz der beobachteten partiellen Reversionen bzgl. der Verhinderung der Bindung des mAk A18 funktional und über sechs

Passagen der Viren auf SK-6 Zellen stabil blieben (3.2.1.4.1; 3.2.1.4.2). Des Weiteren zeigte sich, dass das Wachstumsverhalten der Mutanten dem eines CSFV Alfort/Tübingen Wildtypvirus sehr ähnlich war (3.2.1.5). Da die TAV-Epitop-Basismutanten jedoch bis auf die eingefügten Markierungen einem CSFV Alfort/Tübingen Wildtypvirus entsprachen, war zu erwarten, dass sie im natürlichen Wirt auch eine dem Wildtypvirus vergleichbare Pathogenität zeigen würden. Es galt daher in einem nächsten Schritt, die TAV-Epitop-Markierungen mit Mutationen zu kombinieren, die die Ausbildung eines attenuierten Phänotyps der Viren zur Folge haben.

3.2.2.1 TAV-Epitop-Kombinationsmutanten

Es wurde im Folgenden auf zwei verschiedene Arten versucht, bereits bekannte attenuierende Mutationen (N^{pro} -Deletion, Ausschaltung der E^{ms} -RNase-Aktivität und die Doppeldeletion als Kombination beider Strategien) miteinander zu kombinieren.

3.2.2.1.1 Konstruktion der benötigten Plasmide – Ansatz 1

In einem ersten Ansatz wurde der Versuch unternommen, ein Set von drei Virusmutanten zu generieren, die alle die TAV-Epitop Markierungen analog zu pSW17 (TAV**ASS**LRT) enthielten. Zusätzlich war in der ersten Mutante N^{pro} deletiert, in der zweiten ausschließlich die E^{ms} -RNase ausgeschaltet und die dritte Mutante enthielt die Doppeldeletion (ΔN^{pro} / RNase -). Zu diesem Zweck wurden drei vorhandene CSFV Alfort/Tübingen Gesamtklone genutzt, die bereits die gewünschten Mutationen enthielten: Plasmid Q14/25 (RNase -), Plasmid Q13/18 (Doppeldeletion) und Plasmid Q15/33 (ΔN^{pro}). Aus jedem dieser Plasmide wurde ein XhoI/SdaI cDNA Fragment mit den gewünschten Mutationen herausgeschnitten (2.2.1.4) und jeweils in pSW17 (XhoI/SdaI) ligiert (2.2.1.6; Abbildung 10). Die resultierenden Gesamtklone pSW67 (Doppeldeletion / TAV**ASSV**RT), pSW68 (RNase - / TAV**ASSV**RT) und pSW69 (ΔN^{pro} / TAV**ASSV**RT) wurden daraufhin in der Sequenzierung (2.2.1.12) überprüft. Hierbei zeigte sich, dass alle drei die gewünschten Mutationen enthielten.

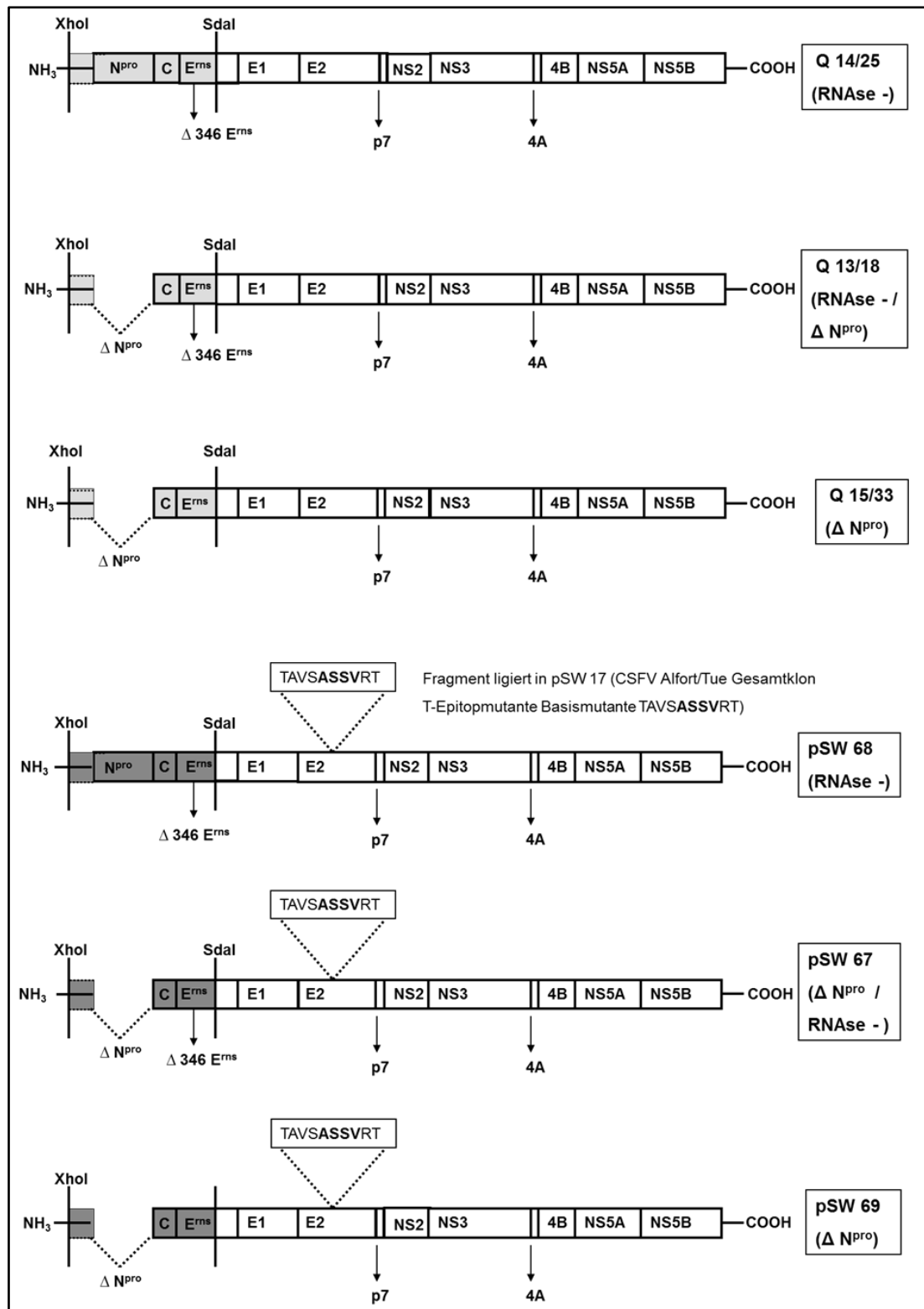


Abbildung 10: Klonierungsschema TAV-Epitop-Kombinationsmutanten – Ansatz 1

Aus drei Alfort/Tübingen Gesamtklonplasmiden mit attenuierenden Mutationen (pQ14/25: RNase -; pQ13/18: RNase - / ΔN^{pro}; pQ15/33: ΔN^{pro}) wurden jeweils XhoI/SdaI cDNA-Fragmente ausgeschnitten (2.2.1.4) und in das TAV-Epitop Basiskonstrukt pSW17 (XhoI/SdaI) (TAVSASSVRT) ligiert (2.2.1.6). Daraus resultierten die cDNA Gesamtklonplasmide pSW68 (RNase- / TAVSASSVRT), pSW67 (ΔN^{pro} / RNase- / TAVSASSVRT) und pSW69 (ΔN^{pro} / TAVSASSVRT).

3.2.2.1.2 Herstellung der Virusmutanten aus cDNA-Konstrukten des Ansatz 1

Die Gesamtklone wurden mit Hilfe des Restriktionsenzym Smal linearisiert und danach *in vitro* transkribiert (2.2.1.13). Die so gewonnene RNA wurde zunächst in der denaturierenden Agarosegelelektrophorese untersucht (2.2.1.15) und danach für die Elektroporation von SK-6 Zellen verwandt (2.2.1.16).

In einem ersten Ansatz wurden die RNAs der Plasmide pSW67 (Doppeldeletion / TAVASSVRT), pSW 69 (ΔN^{pro} / TAVASSVRT) und eines CSFV Alfort/Tübingen Wildtyps elektroporiert. Im Anschluss daran wurden indirekte Immunfluoreszenzexperimente (2.2.4.6) mit zwei verschiedenen Antikörpern durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen zum einen mit dem monoklonalen Antikörper 24/16 (detektiert E^{ms}) und zum anderen mit dem monoklonalen Antikörper A18 gefärbt. Obwohl für alle Ansätze im ersten Versuch in der 24/16 Färbung ein negatives Signal erhalten wurde, wurden die Zellen dennoch gefriergetaut und für die Infektion neuer SK-6 Zellen verwandt. Die erste Passage von Virus EP#69/2 gab dann das gewünschte positive Signal in der 24/16 Färbung und das erwartete negative Signal in der A18 Färbung. Dieses Virus wurde daher weiter passagiert. Die Ergebnisse der ersten Immunfluoreszenz konnten in der fünften Passage reproduziert werden. Die erste Passage von Virus EP#67/2 ergab ein positives Ergebnis in der 24/16 Färbung, jedoch war die A18 Färbung auch positiv (Tabelle 21).

Virus	EP#67/2				EP#69/2				EP#1347/2				mock
Mutationen	ΔN^{pro} / RNAse - / TAVASSLRT				ΔN^{pro} / TAVASSLRT				TAVSPTTLRT				/
Passage	0	1	2	5	0	1	2	5	0	1	2	5	/
24/16	-	+	+	/	-	+	+	+	-	+	+	+	-
A18	-	+	+	/	-	-	-	-	-	+	+	+	-

Tabelle 21: Ergebnisse der Indirekten Immunfluoreszenz EP#67/2 und EP#69/2 (Klonierung 1)

(+ = positiv; - = negativ; / = nicht vorhanden)

Virus EP#69/2 zeigte über 5 Passagen konstant die negative TAV-Epitop Markierung. Die Kontrollfärbung mit dem mAk 24/16 (detektiert E^{ms}) war positiv, während die A18-Färbung (detektiert TAV-Epitop) negativ war. Virus EP#67/2 gab hingegen ab der 2. Passage in beiden Färbungen ein positives Signal.

In einem zweiten Ansatz wurde die Elektroporation von pSW67 gemeinsam mit der Elektroporation von zwei verschiedenen Klonen des Plasmids pSW68 wiederholt. Die ersten Passagen von EP#68/MP1 und EP#68/MP15 waren in der 24/16 Färbung positiv, die A18 Färbung ergab jedoch ein zweifelhaftes Ergebnis, da einige Foci positiver Zellen detektiert werden konnten. Die erste Passage von EP67/3 zeigte sich in beiden Färbungen positiv.

Daher wurde die Elektroporation dieses Plasmides ein drittes Mal wiederholt, diesmal jedoch ohne begleitende Positivkontrolle, um das Risiko einer Kontamination mit Wildtypvirus-RNA zu vermeiden. In diesem Experiment zeigte sich das gewonnene Virus (EP#67/MP2) dann zwar negativ in der A18 Färbung, jedoch war die positive 24/16 Färbung auch schwächer als in den anderen Experimenten. Dieses Ergebnis wiederholte sich auch in der Färbung der zweiten Passage von EP#67/MP2 (Tabelle 22).

Virus	EP#67/3		EP#67/MP2			EP#68/MP1		EP#68/MP15		EP#1347/3			mock
Mutation	ΔN^{pro} / RNAse - / TAVASSLR		ΔN^{pro} / RNAse - / TAVASSLR			RNAse - / TAVASSLR		RNAse - / TAVASSLR		TAVSPTTLR			/
Passage	0	1	0	1	2	0	1	0	1	0	1	2	/
24/16	-	+	-	(+)	(+)	-	+	+	+				
A18	-	+	-	-	-	-	-/+	-	-/+				

Tabelle 22: Ergebnisse der Indirekten Immunfluoreszenz EP#67/3, EP#67/MP2, EP#68/MP1 und EP#68/MP15 (Klonierung 1)

(+ = positiv; - = negativ; / = nicht vorhanden; (+) = schwaches positive Signal; -/+ = negatives Signal, aber vereinzelte Foci positiver Zellen detektiert)

Keine der gezeigten Virusmutanten zeigte eine funktionale negative TAV-Epitop Markierung (negatives Signal in der A18 Färbung, positives Signal in der 24/16 Kontrollfärbung). Die Mutante EP#67/3 zeigte sich in beiden Färbungen positiv, die Mutante EP#67/MP2 war zwar in der A18 Färbung negativ, zeigte jedoch in der Kontrollfärbung auch nur ein sehr schwaches Signal und die beiden Mutanten EP#68/MP1 und EP#68/MP15 zeigten bei einer positiven 24/16 Färbung auch vereinzelte Foci positiver Zellen in der A18 Färbung.

Anschließend wurde RNA aus Zellen extrahiert (2.2.2.5), die mit der fünften Passage von EP#69/2, der ersten Passage von EP#68/MP1 bzw. EP#68/MP15 oder der zweiten Passage von EP#67/MP2 infiziert worden waren. Die gewonnene RNA wurde in RT-PCR Experimenten (zwei verschiedene Primerpaare: SW43/SW42r und OI-Xhol/OI-E03sII) (2.2.2.6) eingesetzt und die PCR-Produkte daraufhin in der Sequenzierung untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass in allen drei Viren die TAV-Epitop Sequenz mit der Sequenz der TAV-Epitop Basismutante pSW17 nach der Passagierung übereinstimmte (Tabelle 20). Auch hier war das durch Mutation inserierte Valin-Codon durch ein Leucin-Codon ersetzt worden. In den Viren EP#68/MP1 und EP#68/MP15 waren die Ergebnisse der Sequenzierung im Bereich der N^{pro} -codierenden Region jedoch nicht eindeutig. Da in den Viren EP#67/MP2, EP#68/MP1 und EP#68/MP15 die Funktionalität der TAV-Epitop Markierung nicht vollständig verifiziert werden konnte (Tabelle 22), wurden diese Viren nicht weiter verwendet.

Die Mutante EP#69/2 wurde für die Testung in einem Tierexperiment (TV#31) ausgewählt, da sie eindeutige Signale in den Immunfluoreszenz Experimenten gegeben hatte (Tabelle 21).

3.2.2.1.3 Konstruktion der benötigten Plasmide – Ansatz 2

Da es in einem ersten Ansatz nicht gelungen war, eine funktionale RNase negative TAV-Epitop Mutante bzw. eine funktionale TAV-Epitopmutante mit Doppeldeletion (ΔN^{pro} / RNase -) zu generieren, wurde dies in einem zweiten Ansatz mit einer alternativen Klonierungsstrategie unter Verwendung anderer TAV-Epitop Markierungen erneut angestrebt.

In diesem zweiten Ansatz wurden zwei Sets von Mutanten generiert. Das erste Set bestand aus drei Mutanten, die alle die TAV-Epitop Markierungen analog zu pSW16 (TAVSAATVRT) trugen. In der ersten Mutante dieses Sets war die N^{pro} codierende Region deletiert, in der zweiten die RNase-Aktivität des Erns-Proteins durch Deletion von Codon 346 ausgeschaltet und in der dritten Mutante wurden diese beiden attenuierenden Mutationen als Doppeldeletion kombiniert. Das zweite Set beinhaltete drei Mutanten, die alle die TAV-Epitop Markierungen analog zu pSW14 (TAVNKDTLRT) aufwiesen. Die attenuierenden Mutationen wurden entsprechend denen des ersten Sets eingefügt.

Zur Herstellung der benötigten Plasmide wurden jeweils ca. 4,0 kb große cDNA Fragmente aus den Plasmiden pSW16 oder pSW14 mit Hilfe der Restriktionsenzyme SdaI und EcoRI ausgeschnitten (2.2.1.4). Danach wurden diese Fragmente in die CSFV Alfort/Tübingen Gesamtklone Q15/33 (ΔN^{pro} Δ), Q14/25 (RNase -) und Q13/18 (ΔN^{pro} / RNase -) ligiert (2.2.1.6), die zuvor mit den gleichen Enzymen geschnitten worden waren.

Aus diesem Schritt resultierten die Plasmide pSW70 (RNase- / ΔN^{pro} / TAVSAATVRT), pSW71 (RNase- / TAVSAATVRT), pSW72 (ΔN^{pro} / TAVSAATVRT), pSW73 (RNase- / ΔN^{pro} / TAVNKDTLRT), pSW74 (RNase- / TAVNKDTLRT) und pSW75 (ΔN^{pro} / TAVNKDTLRT) (Abbildung 11). Die Existenz der eingefügten Mutationen wurde in der Sequenzierung (2.2.1.12) nachgewiesen.

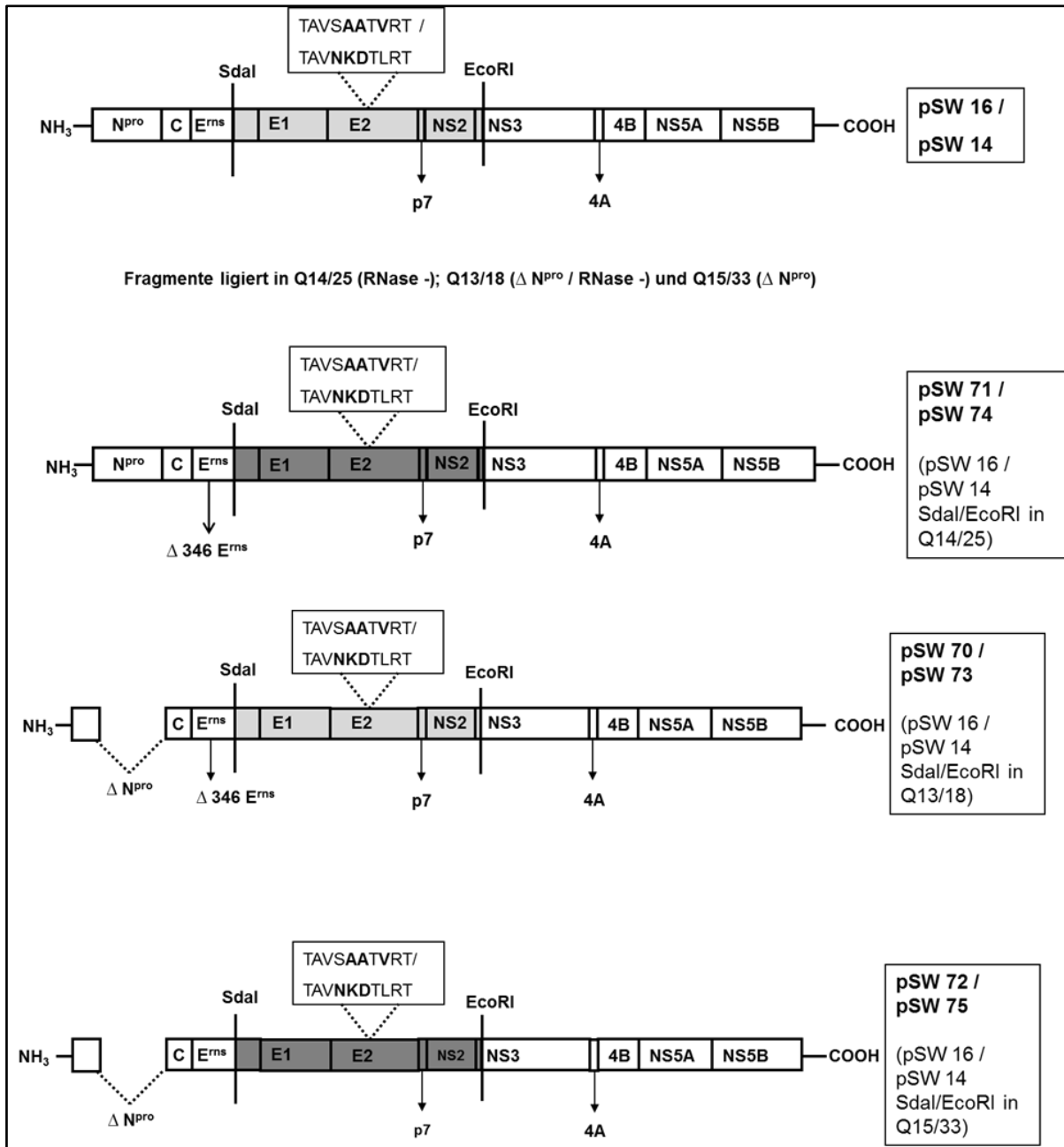


Abbildung 11: Klonierungsschema TAV-Epitop Kombinationsmutanten – Ansatz 2

Aus den TAV-Epitop Gesamtklonplasmiden pSW14 und pSW16 wurden jeweils Sdal/EcoRI cDNA Fragmente ausgeschnitten (2.2.1.4) und in die mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnittenen Gesamtklonplasmide pQ14/25 (RNase-), pQ13/18 (ΔN^{pro} ; RNase-) und pQ15/33 (ΔN^{pro}) eingefügt (2.2.1.6). Daraus resultierten die TAV-Epitop Kombinationsmutanten cDNA Plasmide pSW70 (RNase- / ΔN^{pro} / TAVSAATVRT), pSW71 (RNase- / TAVSAATVRT), pSW72 (ΔN^{pro} / TAVSAATVRT), pSW73 (RNase- / ΔN^{pro} / TAVNKDTRLT), pSW74 (RNase- / TAVNKDTRLT) und pSW75 (ΔN^{pro} / TAVNKDTRLT).

3.2.2.1.4 Herstellung der Virusmutanten aus cDNA-Konstrukten des Ansatz 2

Die Gesamtklonplasmide wurden mit *Sma*I linearisiert (2.2.1.4), *in vitro* transkribiert (2.2.1.13) und anschließend Zellen mit der resultierenden RNA elektroporiert (2.2.1.16). Die so gewonnenen Viren wurden insgesamt 5x auf SK-6 Zellen passagiert und jede Passage wurde in der indirekten Immunfluoreszenz untersucht (2.2.4.6). Auch in diesem Ansatz wurden dazu zwei parallele Färbungen mit 24/16 und A18 durchgeführt. Als Kontrollen wurden jeweils eine nicht infizierte Zellkontrolle und eine mit einem CSFV Alfort/Tübingen Wildtypvirus infizierte Positivkontrolle verwendet. Die Viren EP#70/1 (TAVSAATVRT / ΔN^{pro} / RNase⁻) und EP#71/1 (TAVSAATVRT / RNase⁻) zeigten unerwartet in mehreren Passagen ein positives Signal in der A18 Färbung (Tabelle 23). Daher wurden sie nicht weiter verwendet.

Die übrigen Mutanten EP#72/1(TAVSAATVRT / ΔN^{pro}), EP#73/1 (TAVNKDTLRT, ΔN^{pro} , RNase⁻), EP#74/1 (TAVNKDTLRT, RNase⁻) und EP#75/1 (TAVNKDTLRT, ΔN^{pro}) zeigten konstant in allen Passagen das gewünschte Ergebnis: 24/16 Färbung positiv, A18 Färbung negativ (Tabelle 23; Tabelle 24).

Aus SK-6 Zellen, die jeweils mit den dritten und fünften Passagen der Viren infiziert worden waren (2.2.2.2), wurde RNA extrahiert (2.2.2.5) und diese in RT-PCRs (2.2.2.6) eingesetzt (zwei verschiedene Primerpaare: SW43/SW42r und OI-XhoI/OI-E03sII). Die PCR Produkte wurden in der Sequenzierung (2.2.1.12) untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Viren EP#70/1 und EP#71/1 ihre TAV-Epitop Markierungen eingebüßt hatten und zur Wildtypsequenz revertiert waren. In den übrigen Viren waren die TAV-Epitop Markierungen analog zu pSW14 und pSW16 noch vorhanden, allerdings auch in diesen Viren mit den bereits in den TAV-Epitop Basismutanten beobachteten partiellen Reversionen (Tabelle 24; vergl. Tabelle 20). Da diese Teilreversionen jedoch offenbar die Funktionalität der TAV-Epitop Markierungen nicht beeinträchtigen, wurden zwei Viren aus diesem Set für den Einsatz in einem Tierexperiment (TV#52/12) ausgewählt (EP#74/1 und EP#75/1).

Virus	EP#70/1						EP#71/1						EP#72/1						mock
Mutationen	TAVSPTTLRT / ΔN ^{pro} / RNase-						TAVSPTTLRT / RNase-						TAVSAATLRT / ΔN ^{pro}						/
Passage	0	1	2	3	4	5	0	1	2	3	4	5	0	1	2	3	4	5	/
24/16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
A18	-	-	-	(+)	+	+	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 23: TAV-Epitop Kombinationsmutanten EP#70/1, EP#71/1 und EP#72/1

(+ = positiv, - = negativ, (+) = schwaches positives Signal)

Die Viren EP#70/1 und EP#71/1 zeigten ab der 3. bzw. 2. Passage auf SK-6 Zellen nicht mehr die gewünschte TAV-Epitop Markierung. Beide Viren gaben in der indirekten Immunfluoreszenzfärbung mit beiden Antikörpern ab diesem Zeitpunkt ein positives Signal. In der Sequenzierung zeigte sich, dass diese Viren im Bereich des TAV-Epitops zur Wildtypsequenz revertiert waren. Das Virus EP#72/2 hingegen zeigte über fünf Passagen konstant die gewünschte TAV-Markierung: A18 negativ, 24/16 positiv. Die TAV-Epitop Markierung TAVSAATLRT und die Deletion von N^{pro} konnte für dieses Virus in der Sequenzierung nachgewiesen werden.

Virus	EP#73/1						EP#74/1						EP#75/1						EP#1347 (WT)					
Mutationen	TAVSKD ^{pro} TLRT, ΔN ^{pro} / RNase-						TAVSKD ^{pro} TLRT / RNase-						TAVSKD ^{pro} TLRT, ΔN ^{pro}						TAVSPTTLRT					
Passage	0	1	2	3	4	5	0	1	2	3	4	5	0	1	2	3	4	5	0	1	2	3	4	5
24/16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

Tabelle 24: TAV-Epitop Kombinationsmutanten EP#73/1, EP#74/1 und EP#75/1

(+ = positiv, - = negativ)

Die Viren EP#73/1, EP#74/1 und EP#75/1 waren konstant über 5 Passagen in der indirekten Immunfluoreszenzfärbung mit A18 negativ und in der Kontrollfärbung mit 24/16 positiv. Die Existenz aller eingefügten Mutationen (TAV-Epitop Markierung und attenuierende Mutationen) konnte in der Sequenzierung nachgewiesen werden.

3.2.3 Tierexperimentelle Studien mit CSFV DIVA-Vakzine-Mutanten

3.2.3.1 Vergleichsstudie TV#31

Die Vergleichsstudie TV#31 wurde durchgeführt, um die Pathogenität einer TAV-Epitop Basismutante (pSW16) im Vergleich zu einer TAV-Epitop Kombinationsmutante (EP#69/2) im natürlichen Wirt zu untersuchen. Außerdem sollte die Effizienz der Viren im Hinblick auf die Induktion von neutralisierenden Antikörpern als erster Schritt auf dem Weg zu einer

zukünftigen DIVA-Lebendvakzine getestet werden. Zu diesem Zweck wurden drei Gruppen von je drei Tieren jeweils entweder mit der TAV-Epitop Kombinationsmutante (EP#69/2: TAVSASSLRT, ΔN^{pro}), der TAV-Epitop Basismutante (pSW16: TAVSAATLRT) oder einem CSFV Alfort/Tübingen Wildtypvirus (1347 RTF III) vakziniert.

3.2.3.1.1 Charakterisierung der in TV#31 eingesetzten Viren

Die CSFV TAV-Epitop Kombinationsmutante EP#69/2 vereint die Deletion der für das N^{pro} Protein codierenden Region mit einer TAV-Epitop Markierung (TAVSASSLRT), die CSFV TAV-Epitop Basismutante pSW16 trägt ausschließlich eine alternative TAV-Epitop Markierung (TAVSAATLRT) ohne zusätzliche attenuierende Mutationen. 1347 RTF III ist ein CSFV Alfort/Tübingen Wildtypstamm mittlerer Virulenz, der bereits in vorangegangenen Tierexperimenten erfolgreich als Positivkontrolle eingesetzt wurde (Abbildung 12).

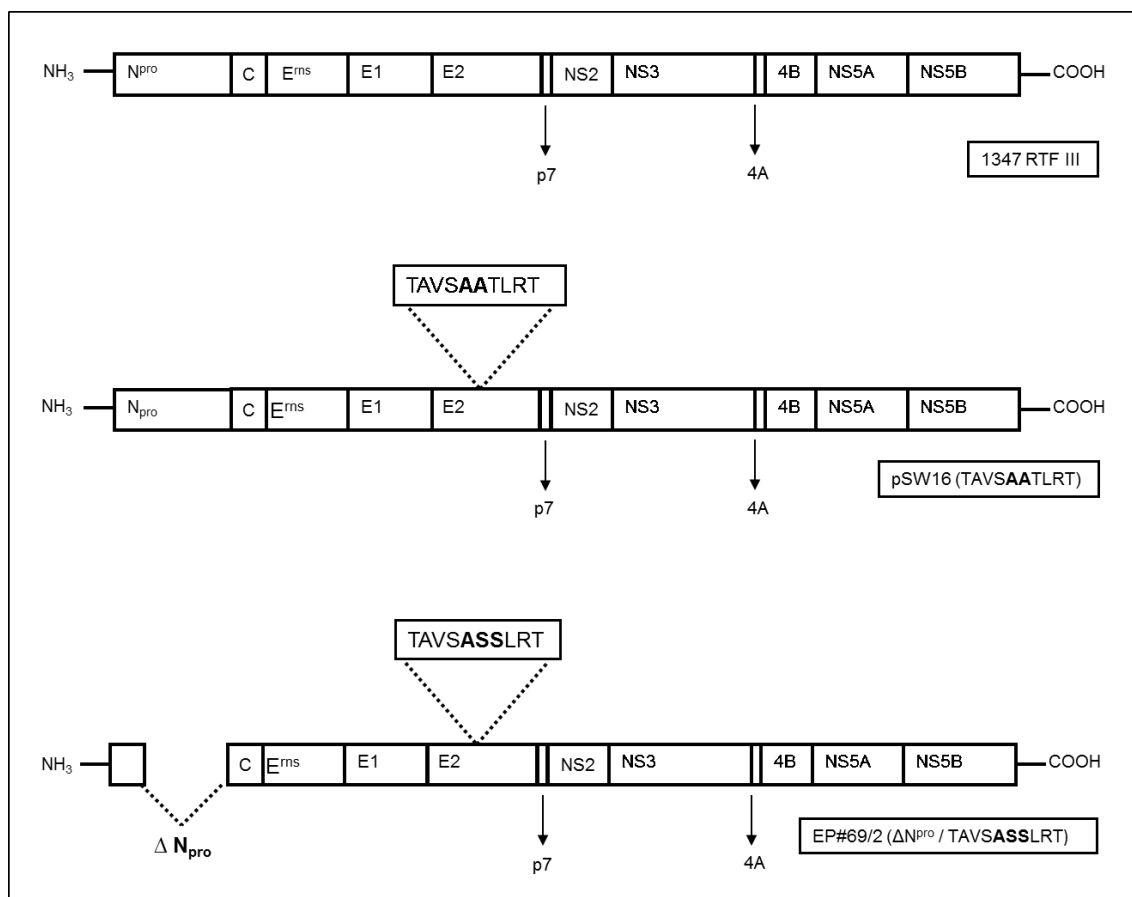


Abbildung 12: Genome der Viren in TV#31

1347 RTF III: CSFV Alfort/Tübingen Wildtyp

pSW16: TAV-Epitop Basismutante; enthält die TAV-Epitop Markierung TAVSAATLRT

EP#69/2: TAV-Epitop Kombinationsmutante; vereint die TAV-Epitop Markierung TAVSASSLRT
Deletion des N^{pro} -Proteins

3.2.3.1.2 Verifizierung des Markierungskonzeptes mittels indirekter Immunfluoreszenz

Die TAV-Epitop Markierungen in beiden getesteten Mutanten dienen als Negativmarker im Hinblick auf das DIVA-Konzept: der monoklonale Antikörper A18, der spezifisch gegen das TAV-Epitop gerichtet ist, ist nicht mehr in der Lage, die veränderten Epitope in den beiden Viren zu erkennen. Daher gaben SK-6 Zellen, die mit pSW16 (6. Passage) oder EP#69/2 (5. Passage) infiziert worden waren, in der indirekten Immunfluoreszenz mit A18 ein negatives Signal, während das Wildtypvirus 1347 RTF III ein positives Signal erbrachte. Als interne Positivkontrolle wurden SK-6 Zellen ebenfalls mit den gleichen Viren infiziert und im Anschluss mit dem monoklonalen Antikörper f48 gefärbt, der ein anderes Epitop auf dem E2-Protein detektiert. In dieser Färbung waren alle Viren wie erwartet positiv (Abbildung 13).

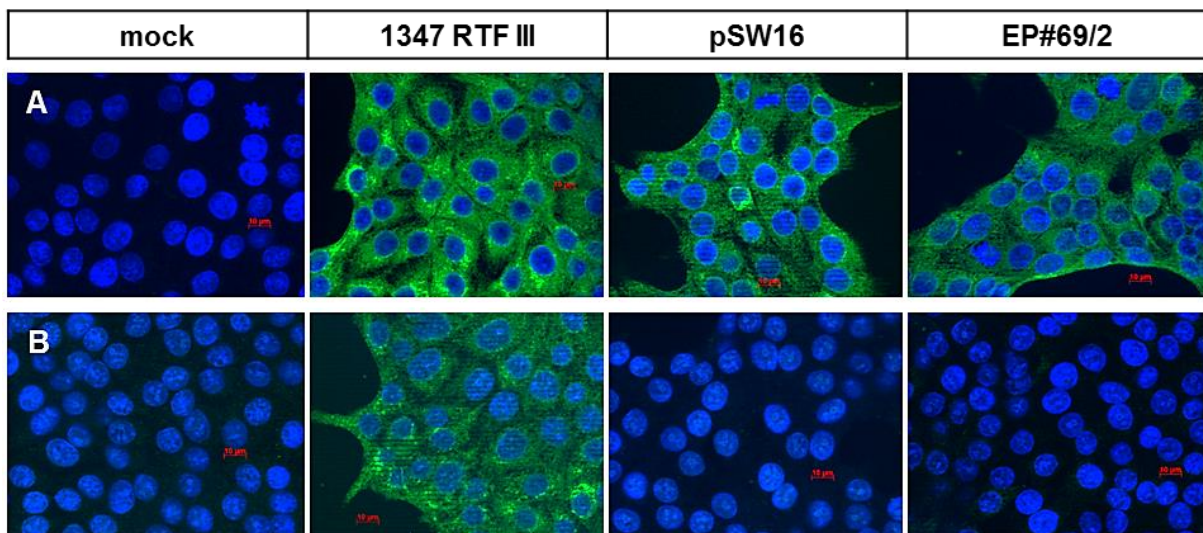


Abbildung 13: Indirekte Immunfluoreszenz Viren TV#31

A: gefärbt mit f48 (interne Positivkontrolle, detektiert E2)

B: gefärbt mit A18 (detektiert TAV-Epitop)

A+B: Zellkerne angefärbt mit DAPI

In der Kontrollfärbung mit f48 gaben alle drei Viren ein positives Signal in der indirekten Immunfluoreszenz. In der Färbung mit A18 zeigten die beiden TAV-Epitop Mutanten pSW16 (TAVS**A**ATLRT) und EP#69/2 (TAVS**A**SSLRT; ΔN^{pro}) ein negatives Signal, das Wildtypvirus zeigte ein positives Signal.

3.2.3.1.3 Wachstumseigenschaften Viren TV#31

Die Wachstumseigenschaften der zwei TAV-Epitop Mutanten (pSW16 und EP#69/2) wurden mit denen des Wildtypvirus (1347 RTF III) verglichen. Zu diesem Zweck wurden Wachstumskurven (2.2.2.4) erstellt, in denen sich zeigte, dass die TAV-Epitop Basismutante pSW16 und das Wildtypvirus 1347 RTF III sehr ähnliche Wachstumseigenschaften haben.

Im Gegensatz dazu wuchs die TAV-Epitop Kombinationsmutante EP#69/2 signifikant schlechter und zeigte eine Wachstumsverzögerung von 1-2 Log-Stufen im Vergleich zum Wildtypvirus. Erst nach 72 Stunden näherte sich diese Mutante dem Titer des Wildtypvirus an (Abbildung 14). Ein Wachstumsnachteil dieser Größenordnung resultiert bekanntermaßen aus der Deletion des N^{pro}-Proteins aus dem viralen Genom und ist vermutlich in einer verminderten Effizienz der Translation der genomischen RNA begründet.

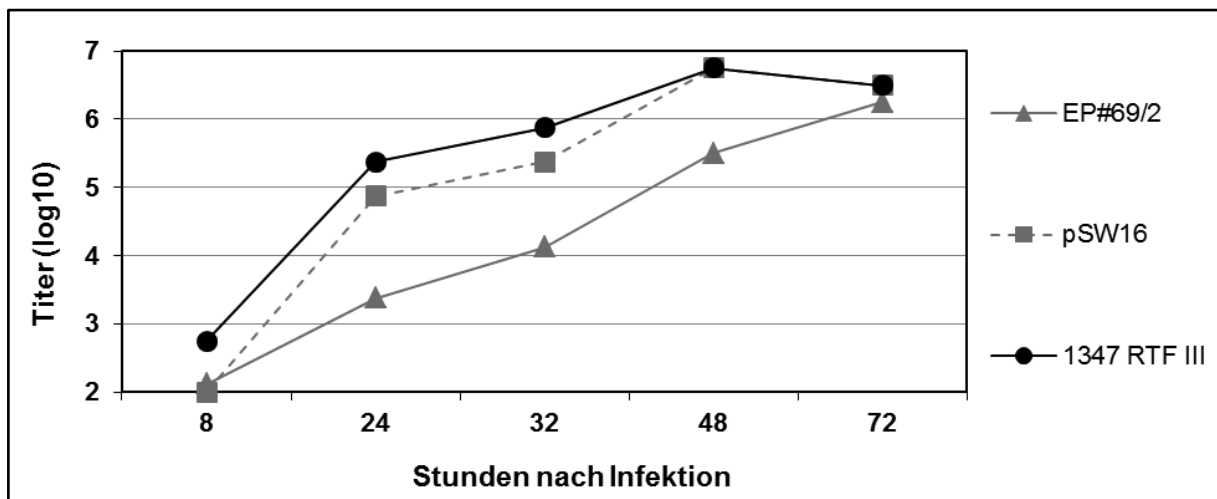


Abbildung 14: Wachstumskurven TV#31

EP#69/2 (TAVSASSLRT; Δ N^{pro}): graues Dreieck, graue durchgezogene Linie

pSW16 (TAVSAATLRT): graues Quadrat, graue gestrichelte Linie

1347 RTF III (TAVSPTTLRT): schwarzer Kreis, schwarze durchgezogene Linie

Die TAV-Epitop Basismutante pSW16 zeigt ein dem Wildtypvirus sehr ähnliches Wachstumsverhalten. Nach 48 h verlaufen die Wachstumskurven dieser Mutante gleich mit denen des Wildtypvirus 1347 RTF III. Die Wachstumskurve der TAV-Epitop Kombinationsmutante EP#69/2 verläuft hingegen deutlich anders als die des Wildtypvirus. Zu den Zeitpunkten 8 h und 48 h liegt das Wachstum dieser Mutante um 1 log Stufe hinter dem des Wildtypvirus zurück, zu den Zeitpunkten 24 h und 32 h sogar 2 log Stufen. Nach 72 h erreicht diese Mutante einen ähnlichen Titer wie das Wildtypvirus.

3.2.3.1.4 Auswahl und Bezeichnung der Tiere

Neun Tage vor der geplanten Vakzination wurden neun Ferkel (ca. 20 kg Körpergewicht) in die Versuchseinrichtung des Friedrich-Loeffler Institutes Tübingen eingestellt, um eine angemessene Akklimatisierungsperiode zu ermöglichen. Die Tiere wurden in drei Gruppen zu je drei Tieren aufgeteilt (Tabelle 25).

Gruppe	vakziniert mit	Tiernummern
Stall 44	pSW16	6655 / 6709 / 6656
Stall 45	1347 RTF III	6711 / 6654 / 6708
Stall 46	EP#69/2	6679 / 6674 / 6681

Tabelle 25: Gruppeneinteilung TV#31

Je drei Ferkel wurden in jede Testgruppe und in die Wildtypkontrollgruppe eingestallt.

3.2.3.1.5 Zeitplan

Die Tiere wurden täglich von Tag -5 dpv bis einschließlich Tag 20 dpv beobachtet, die Körpertemperatur wurde gemessen (2.2.3.4) und die klinischen Symptome nach einem Punkteschema bestimmt (2.2.3.3.). Heparinblutproben (für die Leukozytenzählung und die Gewinnung von Leukozytenkonzentrat) und Nativblutproben (für die Serumgewinnung) wurden an den angegebenen Tagen genommen (2.2.3.5; Tabelle 26).

Ergebnisse

Tage nach Vakzination (dpv)	Klinische Beobachtung	Körpertemperatur- messung	Heparinblut- gewinnung	Nativblut- gewinnung	Schlachtung
-5 dpv	x	x			
-4 dpv	x	x			
-3 dpv	x	x			
-2 dpv	x	x			
-1 dpv	x	x	x	x	
0 dpv	x	x			
1 dpv	x	x			
2 dpv	x	x	x		
3 dpv	x	x			
4 dpv	x	x			
5 dpv	x	x	x		
6 dpv	x	x			
7 dpv	x	x			
8 dpv	x	x	x		
9 dpv	x	x			
10 dpv	x	x			
11 dpv	x	x			
12 dpv	x	x	x		Stall 44:6709
13 dpv	x	x		Stall 45: 6711	
14 dpv	x	x			
15 dpv	x	x	x		
16 dpv	x	x		Stall 45:6708 Stall 44: 6656	Stall 45: 6708 Stall 44: 6656
17 dpv	x	x			
18 dpv	x	x			
19 dpv	x	x			
20 dpv	x	x		Stall 44: 6655 Stall 45: 6654 Stall 46: 6679 / 6674 / 6681	Stall 44: 6655 Stall 45: 6654 Stall 46: 6679 / 6674 / 6681

Tabelle 26: Zeitplan TV#31

An den mit einem x markierten Tagen wurden die angegebenen Tätigkeiten in allen Gruppen und mit allen Tieren durchgeführt. Betrafen die Maßnahmen nur einzelne Tiere, so sind diese einzeln aufgeführt.

3.2.3.1.6 Infektion und Titration der Vakzeviren

Die Tiere in Stall 44 erhielten die TAV-Epitop Basismutante pSW16, die Tiere in Stall 45 erhielten das CSFV-Wildtypvirus 1347 RTF III und die Tiere in Stall 46 erhielten die TAV-Epitop Kombinationsmutante EP#69/2. Jedem Tier wurde eine Dosis von 10^6 KID₅₀/ml in einem Gesamtvolumen von 1 ml *DMEM* verabreicht. Die Hälfte dieser Dosis wurde den Tieren intranasal verabreicht und die zweite Hälfte wurde intramuskulär injiziert (2.2.3.1.). Zur Kontrolle der Titer der Vakzeviren wurden Proben der Virussuspensionen wie unter 2.2.3.2 beschrieben einbehalten und titriert.

Die Menge an Virus, die den Tieren gemäß diesen Titrationen tatsächlich verabreicht wurde, unterschied sich nur sehr geringfügig von den zuvor kalkulierten Impfdosen (Tabelle 27).

	Stall 44		Stall 45		Stall 46	
	pSW16 (TAVS AA TLRT)		1347 RTF III (Wildtyp)		EP#69/2 (TAVS ASS LRT; ΔN^{pro})	
	Titer		Titer		Titer	
	Rücktitration (KID ₅₀ /ml)	erwartet (KID ₅₀ /ml)	Rücktitration (KID ₅₀ /ml)	erwartet (KID ₅₀ /ml)	Rücktitration (KID ₅₀ /ml)	erwartet (KID ₅₀ /ml)
Originalvirus (direkt nach -70°C)	$10^{5,88}$	$10^{6,25}$	$10^{5,75}$	$10^{6,13}$	$10^{6,13}$	$10^{6,56}$
applizierte Verdünnung (i.n. + i.m. appliziert)	$10^{5,75}$	$10^{6,0}$	$10^{5,38}$	$10^{6,0}$	$10^{5,68}$	$10^{6,0}$
Verdünnung (Stalltransport "auf Eis", dann nach -70°C)	$10^{5,68}$	10^6	$10^{5,44}$	$10^{6,0}$	$10^{5,56}$	$10^{6,0}$

Tabelle 27: Rücktitration TV#31

In allen drei Gruppen unterschieden sich die in der Rücktitration bestimmten Titer der Impfdosen nur sehr geringfügig von den erwarteten Titern.

3.2.3.1.7 Klinische Punktzahl

Die klinische Punktzahl wurde täglich bestimmt, um die pathologischen Befunde zu evaluieren (2.2.3.3; 3.2.3.1.5).

Alle Tiere in Stall 45 (Wildtyp) und 44 (pSW16 = TAV-Epitop Basismutante) zeigten deutliche klinische Zeichen von klassischer Schweinepest. Tier 6709 (Stall 44) wurde an Tag 12 dpv tot im Stall gefunden. Ein weiteres Tier in dieser Gruppe (Tier 6656) wurde an Tag 16 dpv aufgrund schwerer Krankheit euthanasiert. Zwei Tiere in Stall 45 (Wildtyp) mussten ebenfalls aus tierschutzrechtlichen Gründen vor dem geplanten Ende des Tierexperimentes getötet werden (Tier 6711 an Tag 13 dpv / Tier 6708 an Tag 16 dpv). Das bedeutet, dass sowohl in Gruppe 44 (pSW16) als auch in Gruppe 45 (Wildtyp) jeweils nur eines von drei Tieren die Infektion bis zum geplanten Ende der Studie überlebte. Im Gegensatz dazu zeigten alle Tiere in Gruppe 46, die mit der TAV-Epitop Kombinationsmutante EP#69/2 vakziniert worden waren, keine oder nur sehr geringe Krankheitsanzeichen und das auch nur über einen Zeitraum von 1-2 Tagen (Abbildung 15).

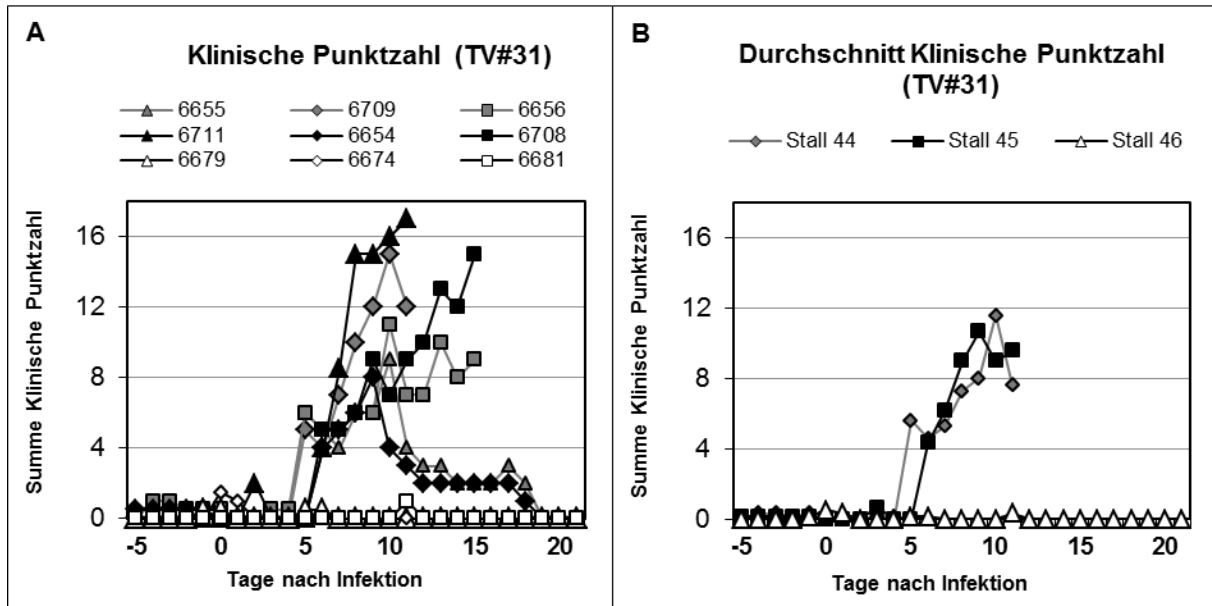


Abbildung 15: Klinische Punktzahlen TV#31

A: Klinische Punktzahlen der einzelnen Tiere der drei Gruppen im Vergleich

Die klinischen Punktzahlen der Tiere in Stall 44 (vakziniert mit pSW16: TAVS**A**ATLRT) sind mit grauen Symbolen und grauen Linien, die klinischen Punktzahlen der Tiere in Stall 45 (vakziniert mit 1347 RTF III: Wildtyp) mit schwarzen Symbolen und schwarzen Linien und die klinischen Punktzahlen der Tiere in Stall 46 (vakziniert mit EP#69/2: TAVS**A**SSLRT; ΔN^{pro}) mit weißen Symbolen und schwarzen Linien dargestellt.

B: Durchschnittliche Klinische Punktzahlen der drei Gruppen im Vergleich. Der letzte Datenpunkt für Stall 44 und 45 wurde an Tag 11 dpv erhoben, da nach diesem Zeitpunkt Tiere starben bzw. euthanasiert wurden; vgl. 3.2.3.1.5 Zeitplan. Die durchschnittlichen klinischen Punktzahlen für die Tiere in Stall 44 sind mit grauen Rauten und grauen Linien, die für die Tiere in Stall 45 mit schwarzen Quadraten und einer schwarzen Linie und die für die die Tiere in Stall 46 mit weißen Dreiecken und schwarzen Linien abgebildet.

Während die Tiere in Stall 46 (vakziniert mit EP#69/2) keine oder nur sehr schwache klinische Symptome zeigten, wurden alle Tiere in den beiden übrigen Gruppen ab Tag 5 dpv ernsthaft krank und mussten zum Teil vorzeitig euthanasiert werden. Die Tiere in den Ställen 45 und 46, die das planmäßige Ende der Studie erlebten, erholten sich ab Tag 10 dpv wieder (Tiere 6654 und 6655).

3.2.3.1.8 Körpertemperatur

Die Körpertemperatur der Tiere wurde täglich zwischen Tag -5 dpv und Tag 20 dpv gemessen (2.2.3.4).

Alle Tiere in den Gruppen 44 (pSW16) und 45 (Wildtyp) entwickelten während des Tierexperimentes Fieber (einen Anstieg der rektalen Körpertemperatur auf über 39,5° C). Die höchsten Werte wurden 8-10 Tage nach der Vakzination erreicht mit Spitzenwerten von 42,5° C (Tier 6656 in Gruppe 44 / Tier 6711 in Gruppe 45). Die Tiere, die aufgrund von schweren Krankheitssymptomen vorzeitig getötet werden mussten, zeigten auch das höchste Fieber (in Gruppe 44: Tier 6709 und Tier 6656 / in Gruppe 45: Tier 6711 und 6708). Die Körpertemperaturen der anderen Tiere in diesen Gruppen, die die Infektion bis zum Ende des Experimentes überlebten, sanken ca. 14 Tage nach der Vakzination wieder auf Normalwerte unter 39,5° C.

In Gruppe 46 (EP#69/2) zeigten zwei Tiere (Tier 6679 und Tier 6681) einen leichten Anstieg der Körpertemperatur. Die Körpertemperaturen dieser beiden Tiere schwankten im Laufe des Experimentes zwischen 39,5° C und 40,0° C. Nur an einem oder zwei Tagen war die Körpertemperatur dieser beiden Tiere stärker erhöht, sie stieg jedoch nie über 40,5° C.

Die Körpertemperatur von Tier 6674 in Gruppe 46 variierte etwas mehr als die Körpertemperatur der anderen beiden Tiere der Gruppe und zeigte einen Höchstwert von 40,2 ° C an Tag 7 dpv. Danach sank die Körpertemperatur dieses Tieres ebenfalls auf physiologische Werte (Abbildung 16).

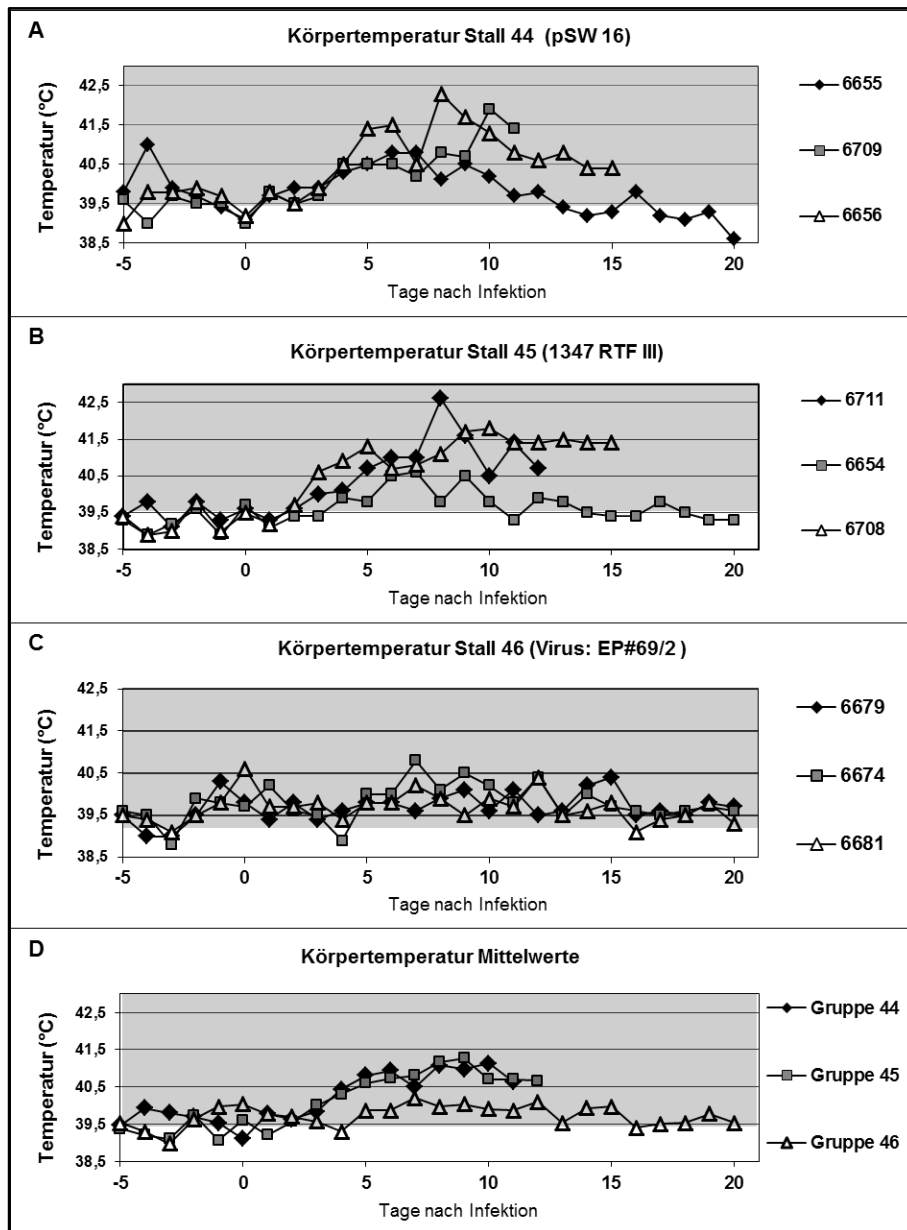


Abbildung 16: Körpertemperatur TV#31

A: Stall 44 (pSW16 = TAV-Epitop Basismutante)

B: Stall 45 (1347 RTF III = Wildtyp)

C: Stall 46 (EP#69/2 = TAV-Epitop Kombinationsmutante)

D: Durchschnittliche Körpertemperaturen der drei Gruppen im Vergleich (der letzte Datenpunkt wurde für die Gruppe 44 und 45 an Tag 11 dpv erhoben, da nach diesem Zeitpunkt Tiere in diesen Gruppen starben bzw. euthanasiert wurden; vgl. 3.2.3.1.5 Zeitplan)

grau unterlegt: Fieber (Temperaturerhöhung auf über 39,5° C) (vergl. Tabelle 12: Ruhewerte Körpertemperatur Schwein [58])

Alle Tiere in den Gruppen 44 (pSW16) und 45 (Wildtyp) entwickelten während des Tierexperimentes Fieber. Die Tiere, die aufgrund von schweren Krankheitssymptomen vorzeitig getötet werden mussten, zeigten auch das höchste Fieber (in Gruppe 44: Tier 6709 und Tier 6656 / in Gruppe 45: Tier 6711 und 6708). Die Körpertemperaturen der anderen Tiere in diesen Gruppen, die die Infektion bis zum Ende des Experimentes überlebten, sanken ca. 14 Tage nach der Vakzination wieder auf Normalwerte unter 39,5°C.

In Gruppe 46 (EP#69/2) zeigten die Tiere einen leichten Anstieg der Körpertemperatur.

3.2.3.1.9 Leukozytenzählung

Die Leukozytenzählung wurde an den Tagen -1, 2, 5, 8, 12 und 15 dpv bestimmt (2.2.4.1). Alle Tiere zeigten einen Abfall der Gesamtleukozytenzahlen an den Tagen 5 und 8 dpv. Dieses Phänomen war in den Tieren der Wildtypgruppe (Stall 45) am deutlichsten ausgeprägt. In den Gruppen 44 (pSW16) und 45 (Wildtyp) zeigten die Tiere die niedrigsten Leukozytenzahlen, die aus tierschutzrechtlichen Gründen vorzeitig getötet werden mussten (Gruppe 44: Tier 6656 / Gruppe 45: Tiere 6711 und 6708) oder im Verlauf des Experimentes starben (Gruppe 44: Tier 6709). Die Tiere in diesen Gruppen, die die Infektion bis zum Ende des Tierexperimentes überlebten, zeigten einen im allgemeinen leichteren Abfall der Leukozytenzahlen und einen Wiederanstieg auf physiologische Werte an Tag 15 dpv (Abbildung 17).

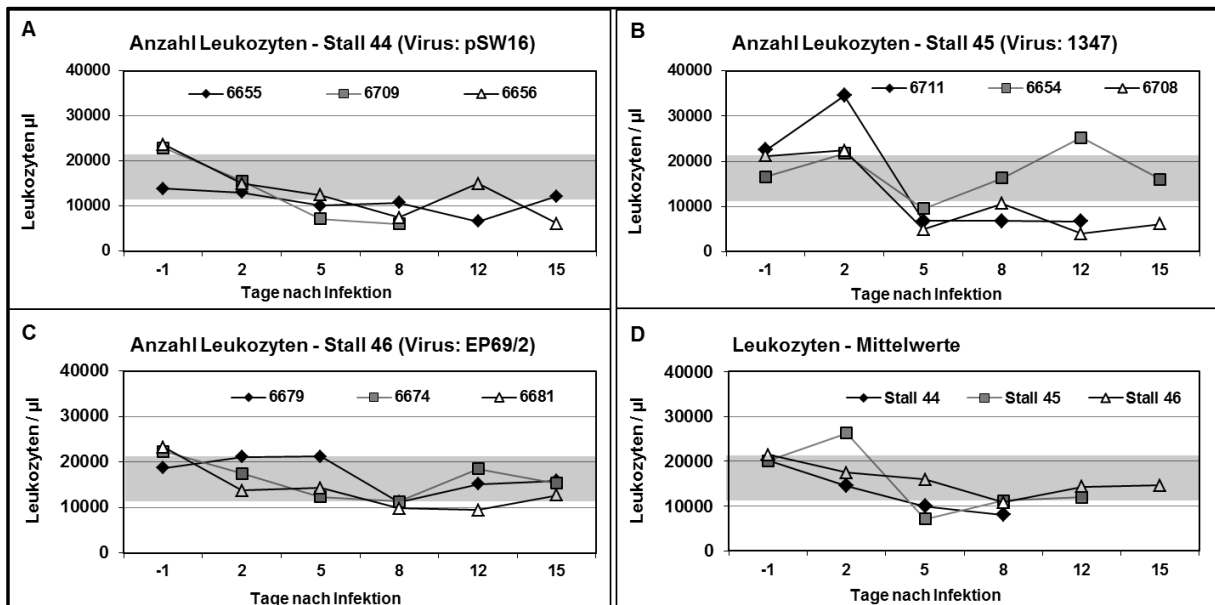


Abbildung 17: Leukozytenzahlen TV#31

A: Leukozytenzahlen Stall 44 (pSW16 = TAV-Epitop Basismutante))

B: Leukozytenzahlen Stall 45 (1347 RTF III = Wildtyp))

C: Leukozytenzahlen Stall 46 (EP#69/2 = TAV-Epitop Kombinationsmutante)

D: Mittelwerte aus den drei Gruppen im Vergleich. Der letzte Datenpunkt für Gruppe 44 wurde an Tag 8 erhoben, für Gruppe 45 an Tag 12, um Verfälschungen der Mittelwerte durch Wegfallen von euthanasierten Tieren zu vermeiden.

grau unterlegt: physiologischer Referenzbereich der Gesamtleukozytenzahl bei Schweinen: zwischen 10500 und 21300 Leukozyten/µl Blut [58]

Alle Tiere zeigten einen Abfall der Gesamtleukozytenzahlen an den Tagen 5 und 8 dpv. In den Gruppen 44 (pSW16) und 45 (Wildtyp) zeigten die Tiere die niedrigsten Leukozytenzahlen, die aus tierschutzrechtlichen Gründen vorzeitig getötet werden mussten (Gruppe 44: Tier 6656 / Gruppe 45: Tiere 6711 und 6708) oder im Verlauf des Experimentes starben (Gruppe 44: Tier 6709). Die Tiere in diesen Gruppen, die die Infektion bis zum Ende des Tierexperimentes überlebten, zeigten einen im allgemeinen leichteren Abfall der Leukozytenzahlen und einen Wiederanstieg auf physiologische Werte an Tag 15 dpv.

3.2.3.1.10 Serologische Untersuchung (SNT)

Serumneutralisationstests wurden zur Untersuchung von Serumproben durchgeführt, die einen Tag vor der Vakzination (-1dpv) und am Tag der Euthanasie (23 dpv) genommen worden waren (2.2.4.5). Drei Tiere mussten vor dem geplanten Ende des Tierexperimentes getötet werden, so dass bei diesen Tieren die Serumproben bereits an Tag 13 bzw. 16 dpv gewonnen wurden (Stall 44: Tier 6711 an Tag 13 dpv und Tier 6708 an Tag 16 dpv / Stall 45: Tier 6656 an Tag 16 dpv). Ein Tier aus Gruppe 45 (Tier 6709) wurde an Tag 12 tot im Stall gefunden, so dass für dieses Tier keine Serumprobe für den zweiten Zeitpunkt verfügbar war. Alle Tiere, die das geplante Ende des Tierexperimentes erlebten, entwickelten signifikante Titer CSFV spezifischer neutralisierender Antikörper. In den Seren der Tiere, die bereits an Tag 16 dpv getötet werden mussten, konnten ebenfalls neutralisierende Antikörper nachgewiesen werden. Die Titer waren jedoch deutlich geringer als bei den übrigen Tieren, die an Tag 23 dpv geschlachtet wurden. Lediglich das Serum des Tieres, welches bereits an Tag 13 dpv getötet wurde (Tier 6711), enthielt keine neutralisierenden Antikörper. Es wurden drei unabhängige Serumneutralisationstests durchgeführt. Tiere, die neutralisierende Antikörper zeigten, taten dies in allen drei Tests. Jedoch variierten die in den einzelnen Tests für die einzelnen Tiere errechneten Titer erheblich (Tabelle 28). Die errechneten Mittelwerte der Titer veranschaulicht Abbildung 18.

Gruppe	Stall 46						Stall 44						Stall 45					
	EP#69/2						pSW16						1347 RTF III					
Tier	6679		6674		6681		6711		6654		6708		6655		6709		6656	
Tag	-1	23	-1	23	-1	23	-1	13	-1	23	-1	16	-1	23	-1	/	-1	16
SNT1	0	89	0	11	0	9	0	0	0	71	0	14	0	28	0	/	0	4
SNT2	0	282	0	56	0	141	0	0	0	447	0	6	0	562	0	/	0	71
SNT3	0	89	0	18	0	35	0	0	0	141	0	7	0	141	0	/	0	18
Mittelwert	0	153	0	28	0	62	0	0	0	220	0	9	0	244	0	/	0	31
SD	0	91	0	20	0	57	0	0	0	163	0	4	0	230	0	0	0	29

Tabelle 28: Titer neutralisierender Antikörper TV#31

Es wurden drei unabhängige SNTs für jeden aufgeführten Zeitpunkt durchgeführt. Tiere, die neutralisierende Antikörper zeigten, taten dies in allen drei Tests. Jedoch variierten die für die einzelnen Tiere ermittelten Antikörper zum Teil erheblich.

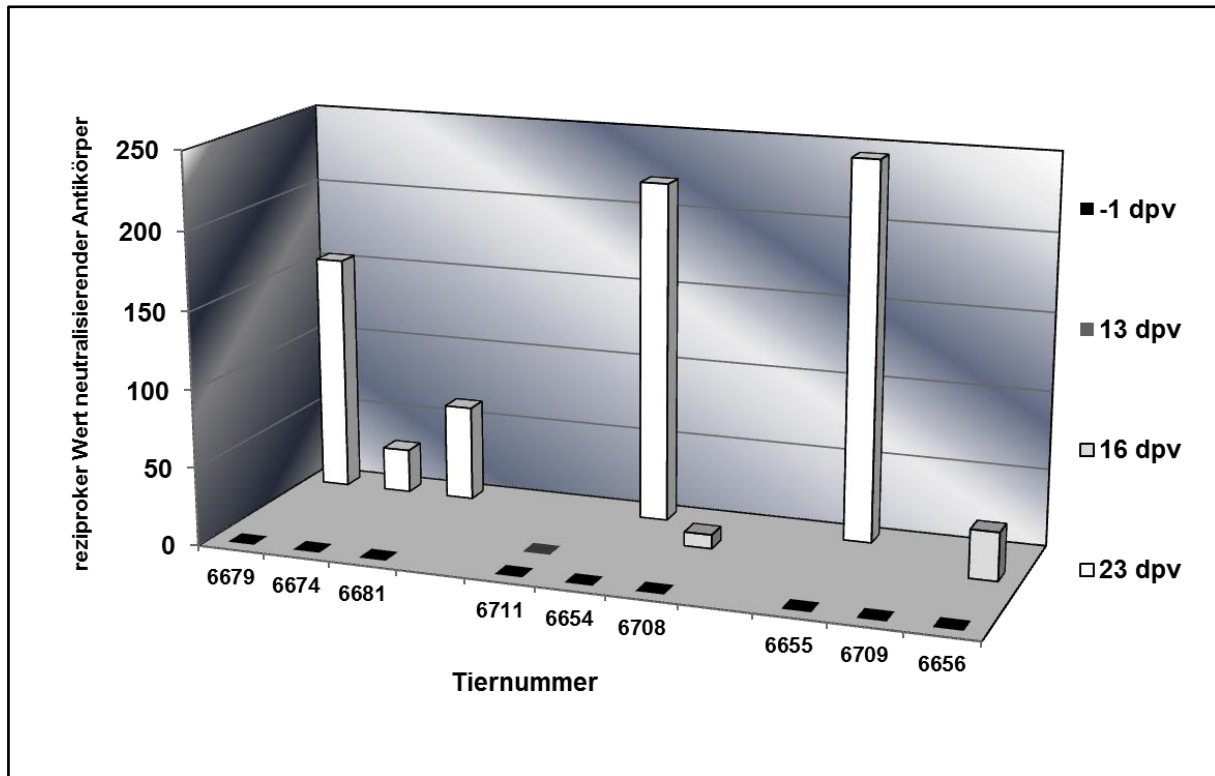


Abbildung 18: Mittelwerte SNTs TV#31

Gruppe 46 (EP#69/2): Tiere 6679; 6674; 6681

Gruppe 45 (1347 RTF III): Tiere 6711; 6654; 6708

Gruppe 44 (pSW16): Tiere 6655; 6709; 6656

Die vordere Datenreihe (schwarze Säulen) zeigt die Titer neutralisierender Antikörpern vor der Vakzination an; dieser Wert liegt bei allen Tieren bei 0. Die mittleren Datenreihen (dunkel- bzw. hellgraue Säulen) zeigen die Titer der Tiere an, die vor dem geplanten Ende des Versuches euthanasiert werden mussten. Für Tier 6711, welches an Tag 13 euthanasiert wurde, konnten zu diesem Zeitpunkt noch keine neutralisierenden Antikörper im Blut detektiert werden. Die an Tag 16 dpv euthanasierten Tiere (6708 und 6656) wiesen zu diesem Zeitpunkt bereits geringe Titer neutralisierender Antikörper auf. Die hintere Datenreihe (weiße Säulen) zeigt die Titer an neutralisierenden Antikörpern, die zum planmäßigen Schlachtermin an Tag 23 dpv im Blut der Tiere detektiert werden konnten. Zu diesem Zeitpunkt waren für alle verbliebenen Tiere signifikante Titer neutralisierender Antikörper nachweisbar.

3.2.3.1.11 Analyse der aus Leukozytenkonzentrat reisolierten Viren

Das aufgearbeitete Leukozytenkonzentrat wurde für die Virusanzucht auf SK-6 Zellen verwendet (2.2.4.4.) Die Auswertung des Experimentes erfolgte durch eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung (2.2.4.6) mit dem mAk 24/16. Hierbei zeigte sich, dass bei jedem Tier an mindestens einem Tag eine Virämie nachgewiesen werden konnte. Tabelle 29 fasst die Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenz der Virusanzucht aus Leukozytenkonzentrat zusammen. Die grau unterlegten Proben wurden in der Sequenzierung untersucht.

	Stall 44 (Virus: pSW16)			Stall 45 (Virus: 1347 RTF III)			Stall 46 (Virus: EP#69/2)		
	6655	6709	6656	6711	6654	6708	6679	6674	6681
-1 dpv	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -
2 dpv	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -
5 dpv	+ / +	+ / -	+ / +	+ / +	- / +	+ / +	- / -	- / -	- / -
8 dpv	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	- / -	+ / +	+ / +	+ / +	- / -
12 dpv	- / -		+ / +	+ / +	- / -	+ / +	- / -	- / -	- / +
15 dpv	- / -		+ / +		- / -	+ / +	- / -	- / -	- / -

Tabelle 29: Virusanzucht aus Leukozytenkonzentrat: Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenz

Die Proben wurden im Doppelansatz angeimpft. Ein "+" kennzeichnet ein positives, ein "-" ein negatives Signal in der Färbung mit 24/16. Grau unterlegte Proben wurden für die Sequenzierung ausgewählt. Eine Virämie konnte an mind. 1 Tag für jedes Tier nachgewiesen werden.

3.2.3.1.11.1 Ergebnis der Sequenzierung

Die aus der Virusanzucht in Zellkultur gewonnene RNA (2.2.2.5) wurde in RT-PCRs (2.2.2.6) mit zwei verschiedenen Primerkombinationen analysiert. Zur Überprüfung von Veränderungen in der N^{pro}- bzw. E^{ms}-codierenden Region wurde die Primerkombination oIXhol / SW88r verwandt und zur Analyse der TAV-Epitop kodierenden Sequenz auf dem E2-Gen die Kombination der Oligonukleotide SW86 / SW87r. In den anschließenden Sequenzierungen (2.2.1.12) der RT-PCR Produkte mit den gleichen Oligonukleotiden zeigte sich, dass die Genome aller aus den Tieren reisolierten Viren noch die eingefügten Mutationen beinhalteten. Lediglich mit dem Leukozytenkonzentrat von Tier 6681 als Template war es trotz mehrmaliger Versuche nicht möglich, ein RT-PCR Produkt mit der Primerkombination (oIXhol / SW88r) zu erhalten, so dass bei dem aus diesem Tier reisolierten Virus die Anwesenheit der N^{pro}-Deletion nicht verifiziert werden konnte (Tabelle 30).

Primer / Virus	pSW16			1347			EP#69/2		
	6655	6709	6656	6711	6654	6708	6679	6674	6681
SW86	TAVS AA TLRT			TAVSP TT LRT			TAVS ASS LRT		
oIXhol	N ^{pro} +			N ^{pro} +			N ^{pro} Δ		/
SW88r	RNase +			RNase +			RNase +		/

Tabelle 30: Virusanzucht aus Leukozytenkonzentrat: Ergebnisse der Sequenzierung

In allen reisolierten Viren konnte die Existenz der TAV-Epitop Markierungen nachgewiesen werden. Die Deletion von N^{pro} konnte für die Tiere 6679 und 6674 nachgewiesen werden; für Tier 6681 konnte leider kein RT-PCR Produkt dieser Region erhalten werden.

3.2.3.1.11.2 Ergebnis der indirekten Immunfluoreszenz

Zur Verifizierung der Funktionalität des TAV-Epitop Markierungskonzeptes nach der Tierpassage wurden weitere Analysen der aus den Leukozytenkonzentraten reisolierten Viren mittels indirekter Immunfluoreszenz unter Verwendung des Zeiss Axiovert 200M Mikroskops mit ApoTome®-Modul durchgeführt (2.2.4.7).

Hierzu wurde Leukozytenkonzentrat von Tier 6679 (Tag 8 dpv) aus Gruppe 46 (EP#69/2), von Tier 6655 (Tag 8 dpv) aus Gruppe 44 (pSW16) und von Tier 6711 (Tag 8 dpv) aus Gruppe 45 (1347 RTF III) verwendet. Diese Proben wurden für die Infektion von SK-6 Zellen verwandt (2.2.2.2). Nach drei Tagen wurden die infizierten Zellen und eine nicht infizierte "mock"-Zellkontrolle sowohl mit dem mAk A18, der spezifisch das TAV-Epitop detektiert, als auch mit dem mAk f 48 (erkennt ein anderes Epitop im E2-Protein) als interner Positivkontrolle gefärbt. Es zeigte sich, dass die reisolierten Viren aus den Tieren, die mit TAV-Epitop Mutanten infiziert worden waren (Tier 6679 und Tier 6655), auch nach der Tierpassage noch die TAV-Epitop Markierung aufwiesen. Die Zellen, die mit dem Leukozytenkonzentrat dieser Tiere infiziert worden waren, zeigten sich in der A18 Färbung negativ. Die Zellen hingegen, die mit dem Leukozytenkonzentrat des Tieres aus der Wildtypgruppe (Tier 6711) infiziert worden waren, gaben in der A18 Färbung ein positives Signal. Die Kontrollfärbung mit f48 war für alle Proben positiv. Dies zeigt, dass in allen drei getesteten Proben vermehrungsfähiges CSF Virus vorhanden war (Abbildung 19).

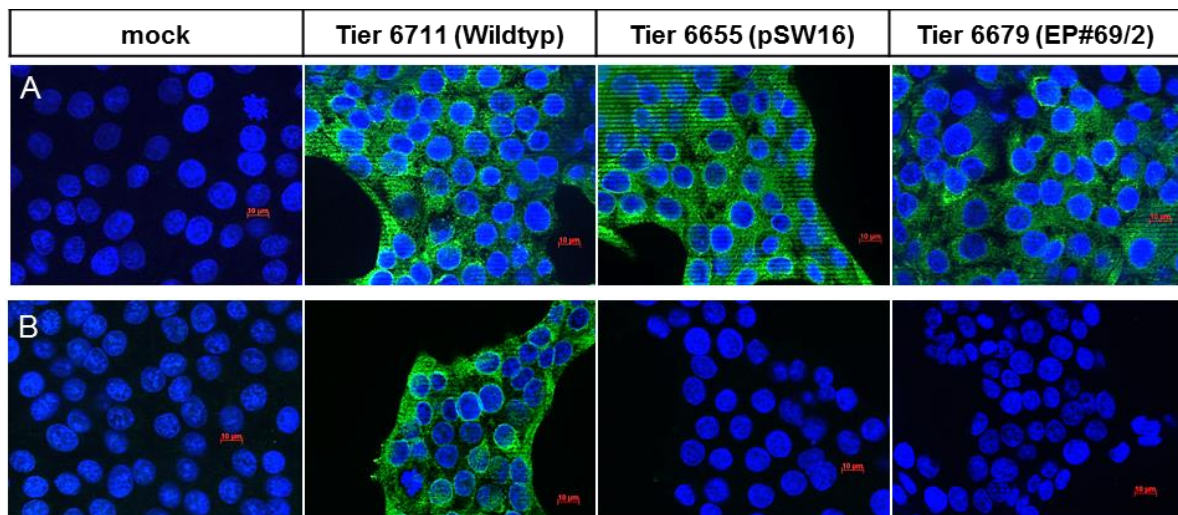


Abbildung 19: Virusanzucht aus Leukozytenkonzentrat: Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenz

A: gefärbt mit f48 (interne Positivkontrolle; detektiert ein alternatives E2-Epitop)

B: gefärbt mit A18 (detektiert TAV-Epitop); A+B: Kernfärbung mit DAPI

SK-6 Zellen wurden mit reisolierten Viren aus dem Leukozytenkonzentrat der Versuchstiere von Tag 8 dpv (Tier 6711, 6655 und 6679) infiziert. Alle reisolierten Viren gaben in der Kontrollfärbung mit f48 ein positives Signal. In der A18 Färbung gab das Tier aus der Wildtyp-Gruppe (6711) ein positives Signal, die Tiere aus den Testgruppen (6655; 6679) gaben das gewünschte negative Signal.

3.2.3.1.12 Zusammenfassung TV#31

Alle Tiere zeigten in diesem Experiment den für eine CSFV-Infektion charakteristischen Abfall der Gesamtleukozytenzahl zwischen Tag 5 und 8 dpv und eine Virämie für die Dauer von mindestens einem Tag. Des Weiteren zeigten alle Tiere in unterschiedlichem Umfang eine Erhöhung der Körpertemperatur. Gemeinsam betrachtet zeigen diese Befunde, dass die Infektion erfolgreich war.

Alle Tiere in Gruppe 44 (pSW16 = TAV-Epitop Basismutante) zeigten klinische Anzeichen von klassischer Schweinepest mit fast der gleichen Intensität wie die Tiere in der Wildtyp-Kontrollgruppe (Gruppe 45). Dieses Ergebnis erlaubt die Vermutung, dass die TAV-Epitop Mutationen alleine nicht zu einer signifikanten Attenuierung der Viren führen.

Die Tiere in Gruppe 46 (EP#69/2 = TAV-Epitop Kombinationsmutante) hingegen zeigten keinerlei klinische Anzeichen einer Schweinepest Erkrankung, lediglich ein leichter Anstieg der Körpertemperatur wies auf eine Infektion hin.

Es war möglich, Virus aus dem Leukozytenkonzentrat der Tiere zu reisolieren und in der Sequenzierung und mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz zu untersuchen. Die Sequenzierung erbrachte das Ergebnis, dass die eingefügten TAV-Epitop Mutationen in den Viren, die aus dem Leukozytenkonzentrat der Tiere in den Gruppen 44 (pSW16) und 46 (EP#69/2) reisoliert worden waren, noch wie gewünscht vorhanden waren. Es zeigten sich auch keine Hinweise auf eine partielle Reversion. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit den Resultaten der Immunfluoreszenz Experimente für diese Viren. Denn die Viren, die aus dem Leukozytenkonzentrat der Tiere aus den Gruppen 44 (Tier 6655: pSW16) und 46 (Tier 6679: EP#69/2) reisoliert worden waren, waren in der Färbung mit dem mAk A18 alle negativ.

Alle Tiere, die das geplante Ende des Tierexperimentes erlebten, zeigten zu diesem Zeitpunkt signifikante Titer CSFV spezifischer neutralisierender Antikörper.

Zusammenfassend erlauben diese Ergebnisse die Schlussfolgerung, dass die Kombination von mindestens einer attenuierenden Mutation (N^{pro} -Deletion und / oder Ausschaltung der E^{ms} -RNase-Aktivität) mit einer TAV-Epitop Negativmarkierung ein erfolgversprechendes Konzept für die Entwicklung einer neuartigen CSFV Vakzine darstellt, sowohl im Hinblick auf die DIVA-Kriterien, als auch unter Berücksichtigung der aufgrund der gemessenen Antikörpertiter zu vermutenden protektiven Eigenschaften.

3.2.3.2 Effizienzstudie TV#52/12

In Tierexperiment TV#52/12 sollten zwei verschiedene DIVA-Vakzine Kandidaten getestet werden, die die gleiche TAV-Epitop Markierung (TAVSKD~~T~~LRT, analog zu pSW14) in Kombination mit unterschiedlichen attenuierenden Mutationen (EP#73/2: Doppeldeletionsmutante = Kombination von N^{pro}-Deletion und Ausschaltung der E^{ms}-RNase-Aktivität durch Deletion von Codon 346 E^{ms} / EP#74/1: ausschließlich Deletion von Codon 346 E^{ms}) trugen. In diesem Experiment sollte untersucht werden, ob diese beiden Kandidaten einen belastbaren Schutz gegenüber einer Belastungsinfektion mit dem hochpathogenen CSFV-Stamm „Eystrup“ bieten können. Des Weiteren sollte die Effizienz der Viren im Hinblick auf die Induktion von CSFV-spezifischen neutralisierenden Antikörpern und die Stabilität der eingefügten Mutationen in der Tierpassage analysiert werden.

3.2.3.2.1 Charakterisierung der in TV#52/12 eingesetzten Viren

Die CSFV-Mutante EP#73/2 kombiniert zwei attenuierende Mutationen – die Deletion der genomischen Region, die für das N^{pro}-Protein codiert, und die Deletion von Histidin 346 E^{ms}, die zur Ausschaltung der E^{ms}-RNase-Aktivität führt – mit der TAV-Epitop Markierung TAVSKD~~T~~LRT. Die CSFV-Mutante EP#74/1 enthält nur eine attenuierende Mutation – die Deletion von Codon 346 E^{ms}, die zur Ausschaltung der RNase führt – und die TAV-Epitop Markierung TAVSKD~~T~~LRT.

„Eystrup“ ist ein hoch pathogener CSFV Feldstamm, der bereits in vorangegangenen Tierexperimenten erfolgreich für Belastungsinfektionen verwendet wurde (Abbildung 20).

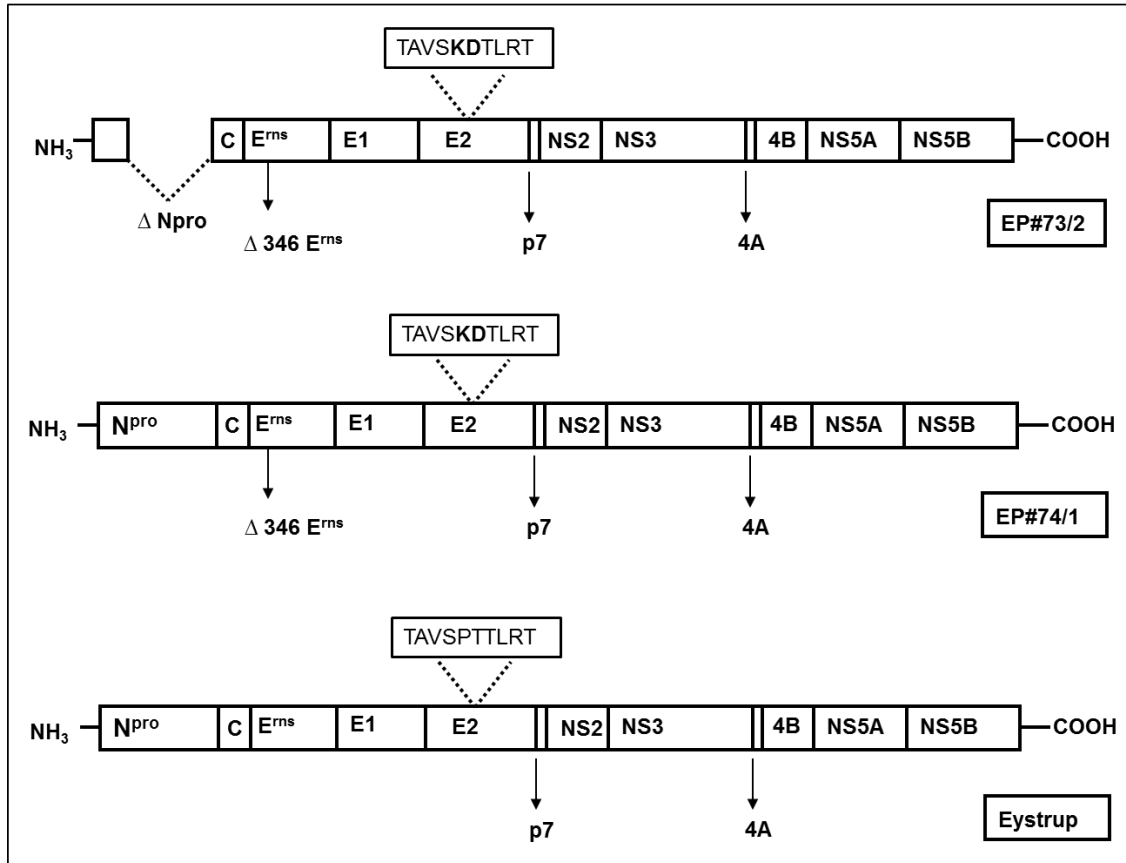


Abbildung 20: Genome der Viren in TV#52/12

Die CSFV-Mutante EP#73/2 kombiniert die Doppeldeletion von N^{pro} und Histidin 346 mit der TAV-Epitop Markierung TAVSKDTLRT. Die CSFV-Mutante EP#74/1 enthält ausschließlich die Deletion von Codon 346 E^{ms} und die TAV-Epitop Markierung TAVSKDTLRT. „Eystrup“ ist ein hoch pathogener CSFV Feldstamm, der bereits in vorangegangenen Tierexperimenten erfolgreich für Belastungsinfektionen verwendet wurde.

3.2.3.2.2 Verifizierung des Markierungskonzeptes mittels indirekter Immunfluoreszenz

Die in den Mutanten EP#73/2 und EP#74/1 verwendete TAV-Epitop Markierung dient als Negativmarker im Hinblick auf das DIVA-Kriterium: der mAk A18, der spezifisch gegen das TAV-Epitop gerichtet ist, ist nicht mehr in der Lage, die veränderten Epitope in den beiden Viren zu erkennen. Daher gaben SK-6 Zellen, die mit EP#73/2 (6. Passage) oder EP#74/1 (6. Passage) infiziert worden waren, in der indirekten Immunfluoreszenz mit A18 ein negatives Signal, während das Wildtypvirus 1347 RTF III ein positives Signal erbrachte. Als interne Positivkontrolle wurden SK-6 Zellen ebenfalls mit den gleichen Viren infiziert und im Anschluss mit dem monoklonalen Antikörper f48 gefärbt, der ebenfalls das E2-Protein detektiert. In dieser Färbung waren alle Viren wie erwartet positiv (Abbildung 21).

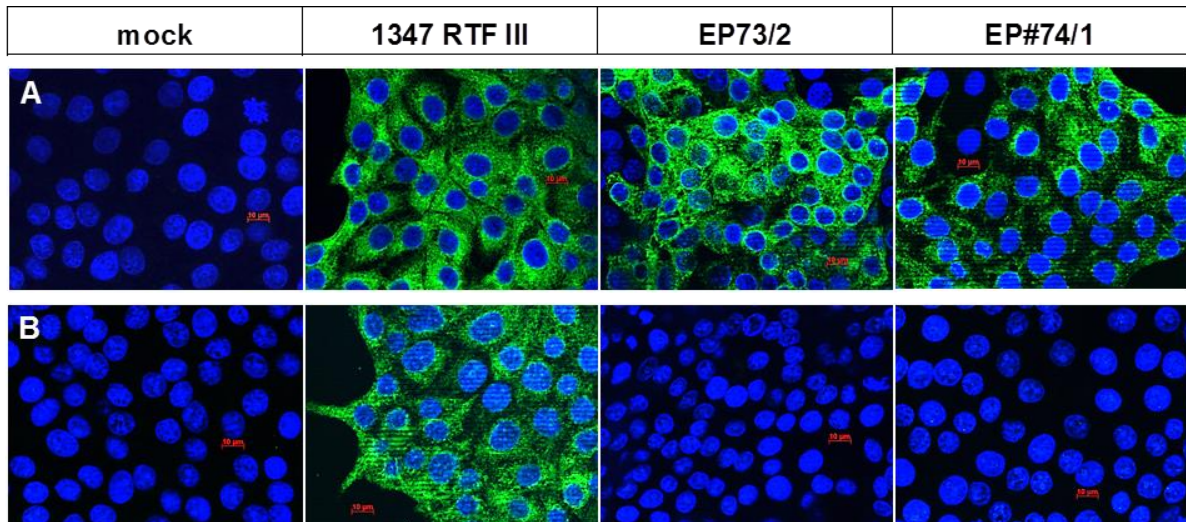


Abbildung 21: Indirekte Immunfluoreszenz Viren TV#52/12

A: gefärbt mit f48 (interne Positivkontrolle; detektiert ein alternatives E2-Epitop)

B: gefärbt mit A18 (detektiert TAV-Epitop)

A+B: Kernfärbung mit DAPI

Die beiden TAV-Epitop Kombinationsmutanten EP#73/2 (TAVSKDTLRT; ΔN^{pro} ; $\Delta 346 E^{ms}$) und EP#74/1 (TAVSKDTLRT; $\Delta 346 E^{ms}$) gaben ein negatives Signal in der Färbung mit A18 (B), das Wildtypvirus 1347 RTF III gab in dieser Färbung ein positives Signal. In der Kontrollfärbung mit f48 (A) gaben alle Viren ein positives Signal.

3.2.3.2.3 Wachstumseigenschaften

Das Wachstumsverhalten der beiden TAV-Epitop Kombinationsmutanten (EP#73/2 / EP#74/1) wurde mit dem eines Alfort/Tübingen CSF Wildtypvirus (1347 RTF III) verglichen. Hierbei zeigte sich, dass die TAV-Epitop markierte RNase negative Mutante EP#74/1 in ihrem Wachstumsverhalten dem Wildtypvirus sehr ähnlich war. Im Gegensatz dazu replizierte die TAV-Epitop markierte Doppeldeletionsmutante EP#73/2 deutlich schlechter und zeigte eine Wachstumsreduktion von 1-2 Log Stufen gegenüber dem Wildtypvirus (Abbildung 22). Dies war nicht überraschend, da ein ähnlicher Wachstumsnachteil ja bereits bei der parentalen nicht markierten Doppelmutante EP#6/12 (vergl. Abbildung 3) beobachtet worden war.

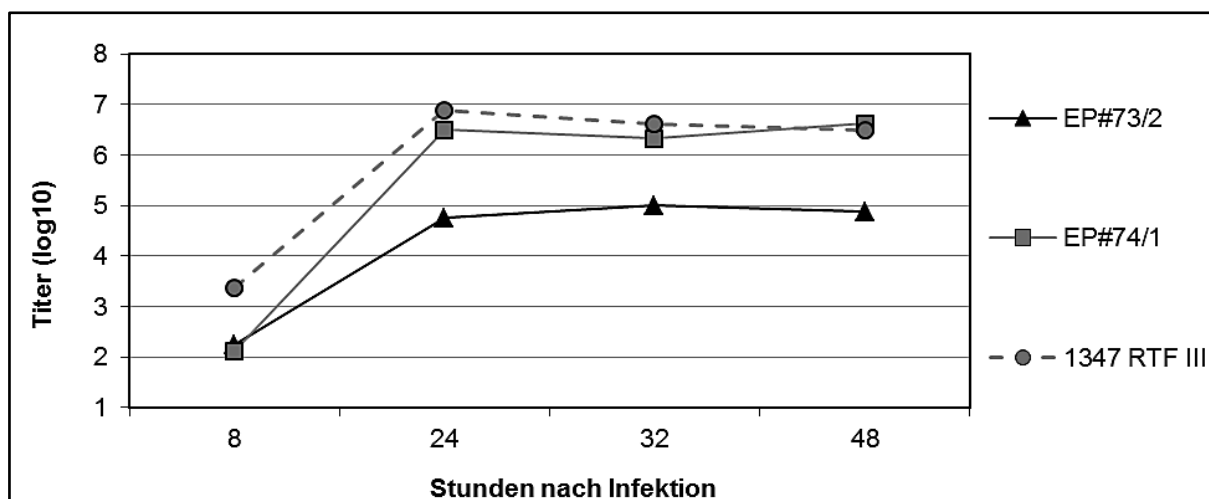


Abbildung 22: Wachstumskurven TV#52/12

Die TAV-Epitop markierte RNase negative Mutante (EP#74/1; graue Quadrate, graue Linie) zeigte ein dem Wildtypvirus (1347 RTF III; graue Kreise, graue gestrichelte Linie) sehr ähnliches Wachstumsverhalten. Die TAV-Epitop markierte Doppelmutante (EP#73/2; schwarze Dreiecke, schwarze Linie) hingegen blieb 1-2 Log Stufen hinter dem Wachstum des Wildtyps zurück.

3.2.3.2.4 Auswahl und Bezeichnung der Tiere

Fünfzehn Tage vor der geplanten Vakzination wurden zwölf Ferkel (ca. 20 kg Körpergewicht) in die Versuchseinrichtung des Friedrich-Loeffler Institutes auf der Insel Riems eingestallt, um eine angemessene Akklimatisierungsperiode zu ermöglichen. Die Tiere wurden in drei Gruppen zu je vier Tieren aufgeteilt. Die Ferkel wurden entweder intramuskulär mit *DMEM* ("mock"-Kontrollgruppe: vier Tiere in Stall 140/1), mit Virus EP#73/2 (vier Tiere in Stall 141/1) oder mit Virus EP#74/1 (vier Tiere in Stall 141/6) vakziniert (2.2.3.1.). Vierundzwanzig Tage nach der Vakzination erhielten alle Tiere die Belastungsinfektion mit dem hochpathogenen CSFV-Stamm „Eystrup“ ebenfalls intramuskulär (Tabelle 31).

Gruppe	Behandlung		Tiernummer
	Vakzination	Belastungsinfektion	
Stall 140/1	DMEM = mock	Eystrup	82/1; 83/2; 84/3; 85/4
Stall 141/1	EP#73/2	Eystrup	86/5; 87/6; 88/7; 89/8
Stall 141/6	EP#74/1	Eystrup	93/9; 94/10; 99/11; 100/12

Tabelle 31: Gruppeneinteilung TV#52/12

3.2.3.2.5 Zeitplan

Die Tiere wurden täglich von Tag -7 dpv bis einschließlich Tag 48 dpv beobachtet, die Körpertemperatur wurde gemessen (2.2.3.4) und die klinischen Symptome mittels eines Punkteschemas dokumentiert (2.2.3.3.) EDTA-Blutproben (für die Leukozytenzählung und die Gewinnung von Leukozytenkonzentrat) und Nativblutproben (für die Serumgewinnung) wurden an den angegebenen Tagen genommen (2.2.3.5; Tabelle 32).

Ergebnisse

Tage nach Vakzination (dpv)	Klinische Beobachtung	Körper- temperatur- messung	EDTA-Blut- gewinnung	Nativblut- gewinnung	Vakzination Belastungsinfektion Schlachtung
-7 – -5 dpv	x	x			
-4 dpv	x	x	x	x	
-3 – 0 dpv	x	x			
0 dpv	x	x			Vakzination
1 – 2 dpv	x	x			
3 dpv	x	x	x		
4 – 6 dpv	x	x			
7 dpv	x	x	x		
8 – 13 dpv	x	x			
14 dpv	x	x	x		
15 – 16 dpv	x	x			
17 dpv	x	x	x		
18 – 20 dpv	x	x			
21 dpv	x	x	x		
22 – 23 dpv	x	x			
24 dpv	x	x	x	x	Belastungsinfektion
25 – 27 dpv	x	x			
28 dpv	x	x	x		
29 dpv	x	x		x (mock)	Schlachtung mock
30 dpv	x	x			
31 dpv	x	x	x		
32 – 34 dpv	x	x			
35 dpv	x	x	x		
36 – 37 dpv	x	x			
38 dpv	x	x	x		
39 – 41 dpv	x	x			
42 dpv	x	x	x		
43 – 44 dpv	x	x			
45 dpv	x	x	x		
46 – 48 dpv	x	x			
49 dpv				x	Schlachtung

Tabelle 32: Zeitplan TV#52/12

An den mit einem x markierten Tagen wurden die angegebenen Tätigkeiten in allen Gruppen und mit allen Tieren durchgeführt. Betrafen die Maßnahmen nur einzelne Gruppen, so sind diese einzeln aufgeführt.

3.2.3.2.6 Infektion und Titration der Viren für Vakzination und Belastungsinfektion

Die CSFV DIVA-Vakzine Kandidaten (Stall 141/1: EP#73/2 / Stall 141/6: EP#74/1) und *DMEM* als „mock“-Kontrolle (Stall 140/1) wurden den Tieren intramuskulär an Tag 0 dpv appliziert (2.2.3.1.). Jedes Tier erhielt eine Dosis von $10^{5,8}$ KID₅₀/ml in einem Gesamtvolumen von 3,6 ml *DMEM* verteilt auf zwei Aliquots von je 1,8 ml, die einzeln in den rechten und linken Musculus brachiocephalicus injiziert wurden. Vierundzwanzig Tage nach der Vakzination erhielt jedes Tier eine Dosis von $10^{6,5}$ KID₅₀/ml des CSFV-Stammes „Eystrup“ für die Belastungsinfektion in einem Gesamtvolumen von 1ml *DMEM* in einer Injektion in den Musculus brachiocephalicus. Zur Kontrolle der Titer der Viren wurden Proben für die Rücktitration einbehalten und titriert (2.2.3.2). Die Menge an Virus, die den Tieren gemäß diesen Titrationen tatsächlich verabreicht wurde, unterschied sich nur sehr geringfügig von den zuvor kalkulierten Impfdosen (Tabelle 33).

	Stall 141/1		Stall 141/6		alle Gruppen	
	EP#73/2 (Doppelmutante; TAVSKDTLRT)		EP#74/1 (RNase - ; TAVSKDTLRT)		Belastungsinfektion "Eystrup"	
	Titer		Titer		Titer	
	Rücktitration (KID ₅₀ /ml)	erwartet (KID ₅₀ /ml)	Rücktitration (KID ₅₀ /ml)	erwartet (KID ₅₀ /ml)	Rücktitration (KID ₅₀ /ml)	erwartet (KID ₅₀ /ml)
Originalvirus (direkt nach -70°C)	$10^{5,94}$	$10^{5,25}$	$10^{6,86}$	$10^{6,25}$	$10^{6,94}$	$10^{7,5}$
applizierte Verdünnung (i.n. + i.m. appliziert)	n.d.	n.d.	$10^{5,63}$	$10^{5,24}$	$10^{5,75}$	$10^{6,5}$
Verdünnung (Stalltransport "auf Eis", dann nach - 70°C)	$10^{5,75}$	$10^{5,25}$	$10^{5,63}$	$10^{5,24}$	$10^{5,82}$	$10^{6,5}$

Tabelle 33: Ergebnisse der Rücktitration TV#52/12

Die in den Rücktitrationen ermittelten Titer unterschieden sich nur geringfügig von den erwarteten Titern. Für das Virus EP#73/2 wurde keine Verdünnung hergestellt, sondern es wurde das Originalvirus unverdünnt appliziert.

3.2.3.2.7 Klinische Punktzahl

Die klinische Punktzahl wurde zwischen Tag -7 dpv und Tag 48 dpv täglich bestimmt (2.2.3.3). Alle Tiere in den Gruppen 141/1 (EP#73/2: TAV-Epitop markierte Doppelmutante) und 141/6 (EP#74/1: TAV-Epitop markierte RNase negative Mutante) zeigten nach der Vakzination keinerlei Anzeichen einer klinischen Erkrankung. Wie erwartet blieben die Tiere in der "mock"-Kontrollgruppe (140/1) in dieser Phase des Experimentes ebenfalls klinisch unauffällig.

Nach der Belastungsinfektion mit "Eystrup" 24 Tage dpv blieben alle Tiere in den Testgruppen (141/1 und 141/6) klinisch gesund und zeigten keinerlei Anzeichen einer Erkrankung mit klassischer Schweinepest. Die Tiere in der "mock"-Kontrollgruppe hingegen erkrankten vier Tage nach der Belastungsinfektion so schwer, dass sie aus tierschutzrechtlichen Gründen vorzeitig getötet werden mussten (Abbildung 23).

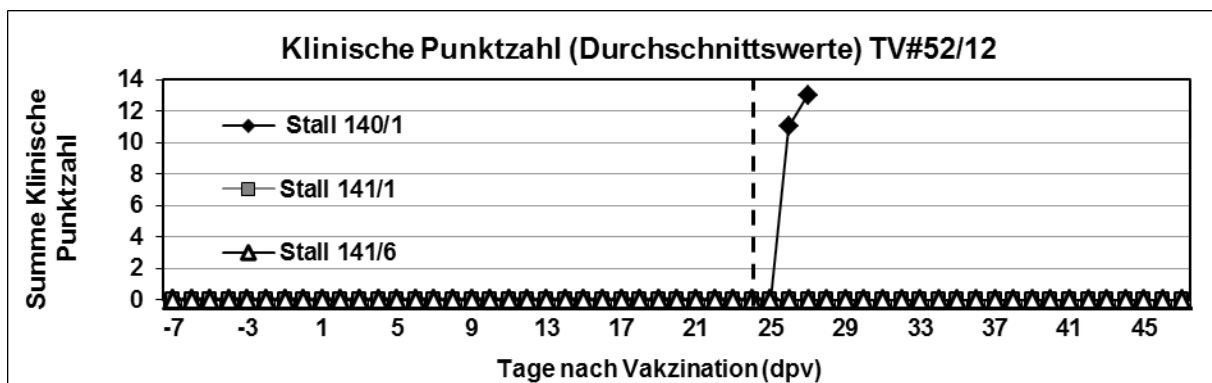


Abbildung 23: Durchschnittliche Klinische Punktzahlen TV#52/12

schwarze Raute, schwarze Linie: Tiere in Stall 140/1 = "mock"-Kontrollgruppe, getötet an Tag 29 dpv

graue Quadrate, graue Linie: Tiere in Stall 141/1 = EP#73/2 (TAV-Epitop markierte Doppelmutante)

weiße Dreiecke, schwarze Linie: Tiere in Stall 141/6 = EP#74/1 (TAV-Epitop markierte RNase negative Mutante)

Der Zeitpunkt der Belastungsinfektion wird durch eine gestrichelte schwarze Linie symbolisiert. Die Tiere in Stall 141/1 und in Stall 141/6 zeigten über den gesamten Verlauf des Versuches keinerlei klinische Symptome einer Schweinepest-Erkrankung. Die Tiere in der mock-Kontrollgruppe waren vier Tage nach der Belastungsinfektion so schwer erkrankt, dass sie getötet werden mussten (vergl. auch Tabelle 32).

3.2.3.2.8 Körpertemperatur

Die Körpertemperatur der Tiere wurde täglich von Tag -7 dpv bis Tag 48 dpv gemessen (2.2.3.4.). In der "mock"-Kontrollgruppe zeigten alle Tiere nach der Belastungsinfektion mit "Eystrup" Fieber (2.2.3.4.). Fünf Tage nach der Belastungsinfektion (d.h. an Tag 29 dpv) wurden alle Tiere dieser Gruppe aus tierschutzrechtlichen Gründen vorzeitig getötet (2.2.3.6).

Kein Tier in den Gruppen 141/1 (EP#73/2) und 141/6 (EP#74/1) zeigte eine signifikante Erhöhung der Körpertemperatur weder nach der Vakzination noch nach der Belastungsinfektion. Es ist jedoch zu beachten, dass bei allen Tieren bereits vor der Vakzination leicht erhöhte Körpertemperaturwerte (z.T. über 39,5° C) gemessen wurden. Die Körpertemperaturen der Tiere verblieben auf einem leicht erhöhten Niveau im Laufe des gesamten Experimentes. Da die Tiere insgesamt ein für Schweine eher scheues Verhalten zeigten, könnte diese leicht erhöhte Körpertemperatur stressinduziert gewesen sein.

In Gruppe 141/1 verblieb die Körpertemperatur der Tiere unter 40° C während des gesamten Versuches. Die Körpertemperaturen der Tiere in Gruppe 141/6 zeigten eine größere Schwankungsbreite und ein Tier zeigte einen Spitzenwert von 40,8 °C an einem Messpunkt (Abbildung 24).

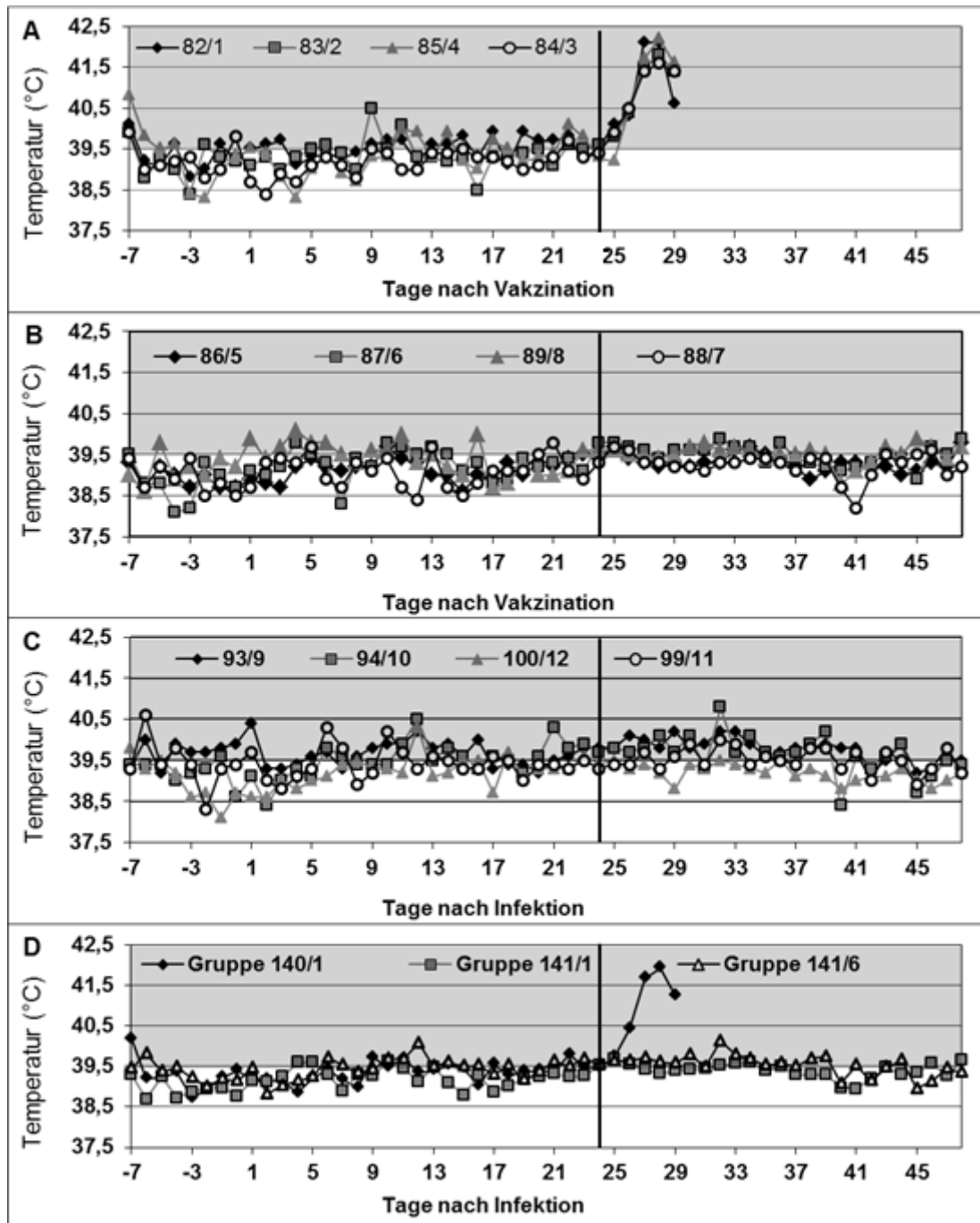


Abbildung 24: Körpertemperatur TV#52/12

A: Körpertemperatur Stall 140/1 ("mock"-Kontrollgruppe); getötet an Tag 29 dpv
 B: Körpertemperatur Stall 141/1 (EP#73/2: TAV-Epitop markierte Doppelmutante)
 C: Körpertemperatur Stall 141/6 (EP#74/1: TAV-Epitop markierte RNase negative Mutante)
 D: Durchschnittliche Körpertemperaturen aller drei Gruppen im Vergleich
 grau unterlegt: Fieber (Körpertemperatur über 39,5 °C) (vergl. Tabelle 12: Ruhewerte
 Körpertemperatur Schwein [58])

Die Belastungsinfektion ist durch einen senkrechten schwarzen Pfeil dargestellt.

Während die Körpertemperaturen aller Tiere in den Ställen 141/1 (B) und 141/6 (C) über die gesamte Dauer des Versuches zwischen 38,5 und 40,5 °C verliefen, stieg die Körpertemperatur der Tiere in der "mock"-Kontrollgruppe in Stall 140/1 (A) nach der Belastungsinfektion bis auf 42 °C an. An Tag 29 dpv wurden die Tiere dieser Gruppe euthanasiert (vergl. Tabelle 32).

3.2.3.2.9 Leukozytenzählung

Die Gesamtleukozytenzahlen der Tiere wurden an den im Zeitplan TV#52/12 angegebenen Tagen bestimmt (vergl. Tabelle 32; 2.2.4.1). Alle Tiere in den Testgruppen (Stall 141/1 und 141/6) zeigten einen deutlichen Abfall der Leukozytenzahlen drei bis sieben Tage nach der Vakzination. Ein, wenn auch weniger auffälliger, Abfall der Leukozytenzahlen war jedoch auch in der "mock"-Kontrollgruppe nach der Vakzination zu beobachten. Des Weiteren war auffällig, dass alle Tiere vor Versuchsbeginn (an Tag -4 dpv) leicht erhöhte Leukozytenzahlen aufwiesen (Tier 82/1 in Stall 140/1 zeigte die signifikanteste Erhöhung mit ca. 35000 Leukozyten/ μ l Blut), die sich dann im Verlauf des Tierexperimentes in den physiologischen Bereich verschoben.

Vier Tage nach der Belastungsinfektion mit "Eystrup" zeigten alle Tiere der nicht geimpften Kontrollgruppe einen rapiden Abfall der Gesamtleukozytenzahlen (um ca. 8000 Leukozyten/ μ l Blut innerhalb von sieben Tagen). Alle Tiere dieser Gruppe mussten an Tag 5 nach der Belastungsinfektion (Tag 29 dpv) aus tierschutzrechtlichen Gründen getötet werden.

Die Leukozytenzahlen der Tiere in den Testgruppen (Stall 141/1 und 141/6) blieben nach der Belastungsinfektion bis zum Ende des Tierexperimentes im physiologischen Bereich (Abbildung 25).

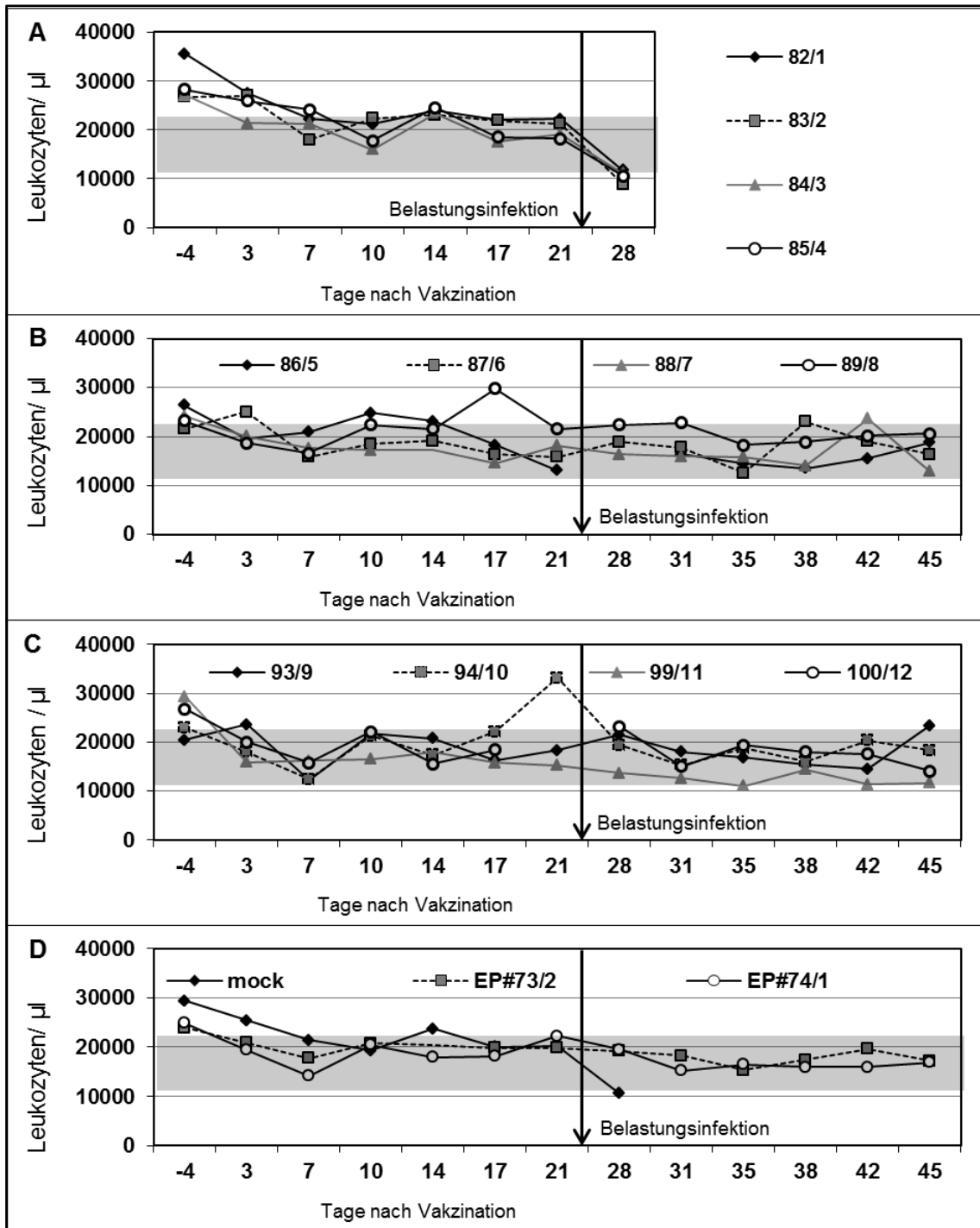


Abbildung 25: Leukozytenzahlen TV#52/12

A: Leukozytenzahlen Stall 140/1 ("mock"-Kontrollgruppe)

B: Leukozytenzahlen Stall 141/1 (EP#73/2 = TAV-Epitop markierte Doppelmutante)

C: Leukozytenzahlen Stall 141/6 (EP#74/1 = TAV-Epitop markierte RNase negative Mutante)

D: Mittelwerte aus den drei Gruppen im Vergleich

Der Termin für die Belastungsinfektion ist durch einen schwarzen Pfeil dargestellt.

grau unterlegt: physiologischer Referenzbereich: 10500 – 21300 Leukozyten / μ l Blut (vergl. [58])

Alle Tiere in den beiden Testgruppen (Stall 141/1 und 141/6) zeigten an Tag 7 dpv den für eine CSFV-Infektion typischen Abfall der Gesamtleukozytenzahl. Vier Tage nach der

Belastungsinfektion fielen die Leukozytenzahlen der Tiere in der "mock"-Kontrollgruppe (A) steil ab, bevor diese Tier an Tag 29 dpv aufgrund schwerer Krankheit euthanasiert werden mussten

3.2.3.2.10 Serologische Untersuchung (SNT)

Serumneutralisationstests wurden zur Untersuchung von Serumproben durchgeführt, die einen Tag vor der Vakzination (-1dpv), am Tag der Belastungsinfektion (24 dpv) und am Tag der Euthanasie (49 dpv) genommen worden waren (2.2.4.5). Die Tiere in der "mock"-Kontrollgruppe (Stall 140/1) mussten vor dem geplanten Ende des Tierexperimentes getötet werden, so dass bei diesen Tieren die Serumproben bereits am Tag 26 dpv gewonnen wurden (vergl. Tabelle 32). In den Seren der Tiere der "mock"-Kontrollgruppe waren zu keinem Zeitpunkt CSFV spezifische neutralisierende Antikörper nachweisbar.

Alle Tiere, die das geplante Ende des Tierexperimentes erlebten, entwickelten signifikante Titer CSFV-spezifischer neutralisierender Antikörper. In den Seren der Tiere in den Testgruppen (141/1 und 141/6) waren diese Antikörper zwar bereits am Tag der Belastungsinfektion nachweisbar, stiegen jedoch bis zum Tag der Euthanasie (49 dpv) noch einmal deutlich an (Tabelle 34; Abbildung 26).

Es wurden drei unabhängige Serumneutralisationstests durchgeführt. Tiere, die neutralisierende Antikörper zeigten, taten dies in allen drei Tests. Jedoch variierten die in den einzelnen Tests für die einzelnen Tiere errechneten Titer zum Teil erheblich (Tabelle 34).

Gruppe	Stall 140/1				Stall 141/1				Stall 141/6			
Virus	mock				EP#73/2 (TAVSKDTLLRT; ΔN^{pro} ; RNase-)				EP#74/1 (TAVSKDTLRT; RNase-)			
day / animal ID	82/1	83/2	84/3	85/5	86/5	87/6	88/7	89/8	93/9	94/10	99/11	100/12
	Mittelwerte aus drei unabhängigen SNTs											
-4 dpv	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24 dpv	0	0	0	0	46	8	39	54	82	40	37	108
29 dpv	0	0	0	0								
49 dpv					333	271	542	131	728	228	240	846
	Standardabweichungen aus drei unabhängigen SNTs											
-4 dpv	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24 dpv	0	0	0	0	30	4	23	26	42	22	25	58
29 dpv	0	0	0	0								
49 dpv					267	73	145	14	313	43	88	195

Tabelle 34: Titer neutralisierender Antikörper TV#52/12

Es wurden drei unabhängige SNTs mit Serumproben durchgeführt, die einen Tag vor der Vakzination (-1dpv), am Tag der Belastungsinfektion (24 dpv) und am Tag der Euthanasie (49 dpv) genommen worden waren. Tiere, die neutralisierende Antikörper zeigten, taten dies in allen drei Tests. Jedoch variierten die in den einzelnen Tests für die einzelnen Tiere errechneten Titer zum Teil erheblich.

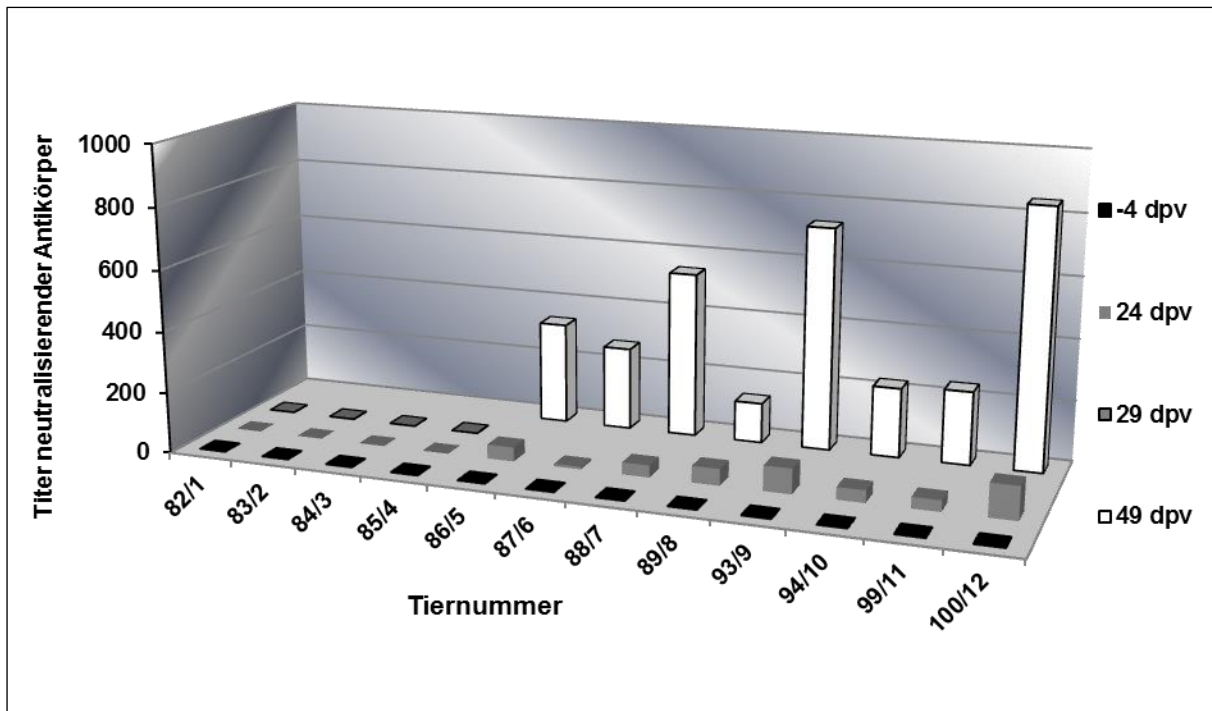


Abbildung 26: Mittelwerte aus drei unabhängigen SNTs TV#52/12

Stall 140/1 ("mock"): Tiere 82/1, 83/2, 84/3, 85/4

Stall 141/1 (EP#73/2): Tiere 86/5, 87/6, 88/7, 89/8

Stall 141/6 (EP#74/1): Tiere 93/9, 94/10, 99/11, 100/12

Die vordere Datenreihe (schwarze Säulen) zeigt die Titer neutralisierender Antikörper vor der Vakzination an; dieser Wert liegt bei allen Tieren bei 0. Die zweite Datenreihe (graue Säulen) zeigt die Titer der Tiere zum Zeitpunkt der Belastungsinfektion an. Für die Tiere in den Testgruppen (Tiere 86/5 - 100/12) konnten an Tag 24 dpv bereits niedrige Titer von Antikörpern nachgewiesen werden. Im Serum der Tiere in der "mock"-Kontrollgruppe (Tiere 82/1 – 85/4) konnten zu keinem Zeitpunkt neutralisierende Antikörper nachgewiesen werden. Zum planmäßigen Schlachtermin an Tag 49 dpv waren für alle Tiere in den Testgruppen (Tiere 86/5 - 100/12) signifikante Titer neutralisierender Antikörper nachweisbar.

3.2.3.2.11 Analyse der aus Leukozytenkonzentrat reisolierten Viren

Die Virusanzucht aus Leukozytenkonzentrat wurde wie für TV#31 beschrieben durchgeführt (vergl. 3.2.3.2.11). Die Auswertung des Experimentes erfolgte durch eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung mit dem mAk 24/16. Hierbei zeigte sich, dass nur bei den vier Tieren der Gruppe in Stall 141/6 (EP#74/1) an einem Tag eine Virämie nachgewiesen werden konnte. Tabelle 35 fasst die Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenz der Virusanzucht aus Leukozytenkonzentrat zusammen. Die positiv getesteten Proben wurden in der Sequenzierung und in der indirekten Immunfluoreszenz untersucht (vergl. 3.2.3.1.11.1; 3.2.3.1.11.2).

Gruppe	Stall 140/				Stall 141/1				Stall 141/6			
	(mock)				(EP#73/2: Doppelmutante; TAVSKD TL RT)				(EP#74/1: RNase-; TAVSKD TL RT)			
Tag / Tiernummer	82/1	83/2	84/2	85/4	86/5	87/6	88/7	89/8	93/9	94/10	99/11	100/ 12
-4 dpv	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
3 dpv	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
7 dpv	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+
10 dpv	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
14 dpv	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
17 dpv	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
21 dpv	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
4 dpc	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
7 dpc	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
11 dpc	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
14 dpc	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
18 dpc	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
21 dpc	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

Tabelle 35: Virusanzucht aus Leukozytenkonzentrat: Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenz

Die Proben wurden im Doppelansatz angeimpft.

+ = positives Signal in der Färbung mit 24/16

- = negatives Signal in der Färbung mit 24/16

n.d. = nicht durchgeführt

Es war möglich, Virus aus dem Leukozytenkonzentrat der Tiere in Stall 141/6 (EP#74/1: TAV-Epitop markierte RNase negative Mutante) an Tag 7 dpv zu reisolieren.

3.2.3.2.11.1 Ergebnis der Sequenzierung

Die aus der Virusanzucht in Zellkultur gewonnene RNA wurde in RT-PCRs mit zwei verschiedenen Primerkombinationen eingesetzt (vergl. 3.2.3.1.11.1.) Zur Analyse der N^{pro} codierenden Region und des Histidins 346 E^{rms} wurde die Primerkombination oIXhoI/SW88r verwandt und zur Überprüfung des TAV-Epitops auf dem E2-Protein die Kombination der Oligonukleotide SW86/SW87r. In der anschließenden Sequenzierung der RT-PCR Produkte mit den gleichen Oligonukleotiden zeigte sich, dass alle aus den Tieren reisolierten Viren noch die eingefügten Mutationen beinhalteten (Tabelle 36).

Ergebnisse

Primer / Virus	EP#74/1			
	Tiernummer	93/9	94/10	99/11
SW86	TAVSKDTLRT			
olXhol	N ^{pro} +			
SW88r	H 346 E ^{ms} deletiert			

Tabelle 36: Virusanzucht aus Leukozytenkonzentrat: Ergebnisse der Sequenzierung

In den Viren, die an Tag 7 dpv aus dem Leukozytenkonzentrat der Tiere reisoliert werden konnten, die mit der RNase negativen TAV-Epitop Kombinationsmutante EP74/1 vakziniert worden waren, waren die eingefügten Mutationen (Deletion von Histidin 346 E^{ms} und TAV-Epitop Markierung TAVSKDTLRT) noch vorhanden.

3.2.3.2.11.2 Ergebnis der Indirekten Immunfluoreszenz

Analog zu TV#31 wurden zur Verifizierung der Funktionalität des TAV-Epitop Markierungskonzeptes nach der Tierpassage weitere Analysen der reisolierten Viren aus den Leukozytenkonzentraten mittels indirekter Immunfluoreszenz am Zeiss Axiovert 200M Mikroskop mit ApoTome®-Modul durchgeführt (vergl. 3.2.3.1.11.2). Hierzu wurde Leukozytenkonzentrat der Tiere aus Stall 141/6 (93/9, 94/10, 99/11 und 100/12) von Tag 7 dpv verwendet. Diese Proben sowie das Leukozytenkonzentrat eines Tieres aus der Wildtypgruppe aus TV#31 (Tier 6708, Tag 8 dpv) als Positivkontrolle wurden für die Infektion von SK-6 Zellen verwandt. Nach drei Tagen wurden die infizierten Zellen und eine nicht infizierte "mock"-Zellkontrolle sowohl mit dem mAk A18, der spezifisch das TAV-Epitop detektiert, als auch mit dem mAk f 48 (erkennt ein anderes Epitop im E2-Protein) als interner Positivkontrolle gefärbt. Es zeigte sich, dass die reisolierten Viren aus den mit EP#74/1 vakzinierten Tieren auch nach der Tierpassage noch die TAV-Epitop Markierung trugen. Die Zellen, die mit dem Leukozytenkonzentrat dieser Tiere infiziert wurden, waren in der A18 Färbung negativ. Die Zellen hingegen, die mit dem Leukozytenkonzentrat des Tieres aus der Wildtypgruppe von TV#31 (Tier 6708) infiziert worden waren, gaben in der A18 Färbung ein positives Signal. Die Kontrollfärbung mit f48 war für alle Proben positiv. Dies zeigt, dass in allen getesteten Proben vermehrungsfähiges CSF-Virus vorhanden war (Abbildung 27).

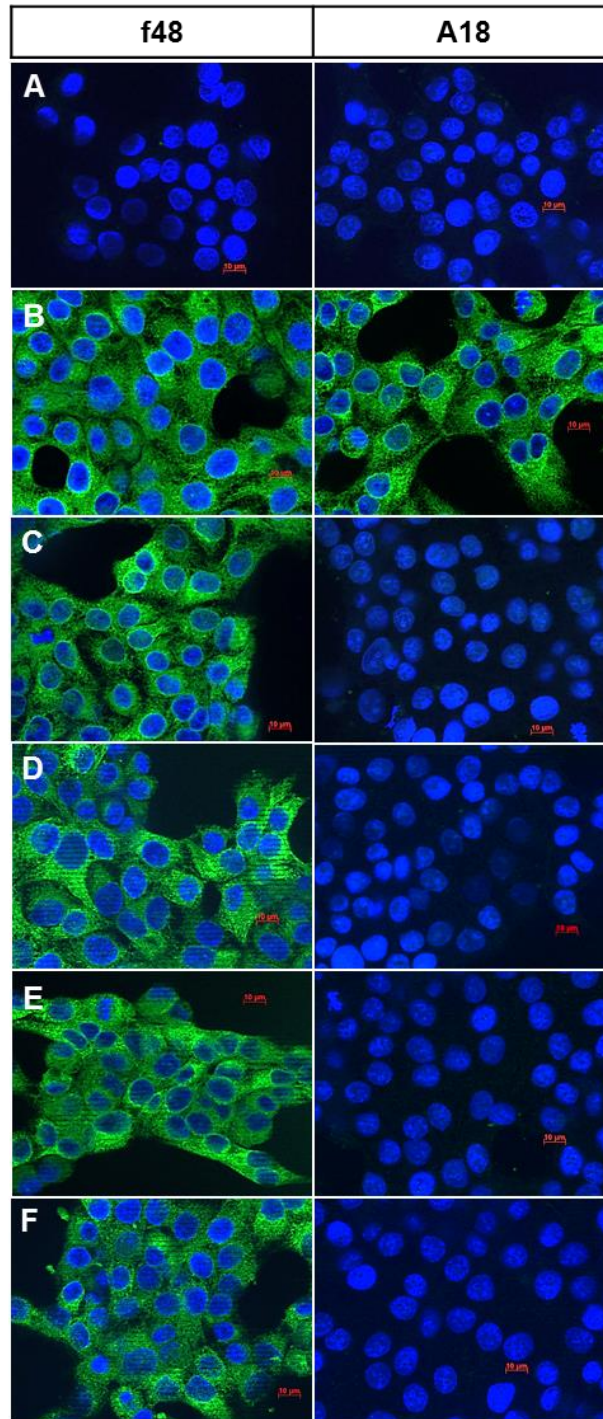


Abbildung 27: Virusanzucht aus Leukozytenkonzentrat: Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenz

A: "mock"-Zellkontrolle

B: Tier 6709, Tag 8 dpv (aus TV#31, vakziniert mit CSFV Alfort/Tübingen Wildtyp 1347 RTF III)

C: Tier 93/9, Tag 7 dpv (vakziniert mit EP#74/1 = TAV-Epitop markierte RNase negative Mutante)

D: Tier 94/10, Tag 7 dpv (vakziniert mit EP#74/1)

E: Tier 99/11, Tag 7 dpv (vakziniert mit EP#74/1)

F: Tier 100/12, Tag 7 dpv (vakziniert mit EP#74/1)

Die Zellen, die mit dem Leukozytenkonzentrat der Tiere aus Gruppe EP#74/1 infiziert wurden, waren in der A18 Färbung negativ (C-F). Die Zellen hingegen, die mit dem Leukozytenkonzentrat des Tieres aus der Wildtypgruppe von TV#31 (Tier 6708) infiziert worden waren, gaben in der A18 Färbung ein positives Signal (B). Die Kontrollfärbung mit f48 war für alle Proben positiv. Dies zeigt, dass in allen getesteten Proben vermehrungsfähiges CSF Virus vorhanden war.

3.2.3.2.11.3 Zusammenfassung TV#52_12

Alle Tiere zeigten in diesem Tierexperiment um den Tag 7 dpv einen Abfall der Gesamtleukozytenzahlen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Infektion erfolgreich war, auch wenn die Tiere in der "mock"-Kontrollgruppe ebenfalls einen leichten Abfall der Leukozytenzahlen nach der Vakzination zeigten. Diese Tiere entwickelten parallel zu dem Abfall der Leukozyten auch eine leichte Erhöhung der Körpertemperatur. Diese Befunde können ihre Ursache in dem Stress haben, der den Tieren durch die Fixation bei der Blutabnahme bzw. der Vakzination zugefügt wird. Es ist nicht unüblich, dass Tiere in unterschiedlichen Gruppen unterschiedlich auf Stress reagieren.

Die Tiere in den Testgruppen (EP#73/2 und EP#74/1) zeigten keine Erhöhung der Körpertemperatur im Verlauf des Tierversuches, wobei bei allen Tieren schon vor Beginn des Experimentes eine leicht erhöhte Körpertemperatur beobachtet wurde. Dies kann ebenfalls in einer erhöhten Stressempfindlichkeit der Tiere begründet sein.

Nach der Vakzination zeigte keines der Tiere klinische Anzeichen einer Erkrankung mit klassischer Schweinepest. Diese Beobachtung kam nicht unerwartet, da beide getesteten Vakzine-Kandidaten attenuierende Mutationen (EP#73/2: Doppeldeletion / EP#74/1: Ausschaltung der E^{ms}-RNase) enthielten.

Alle Tiere in der "mock"-Kontrollgruppe wurden nach der Belastungsinfektion mit "Eystrup" ernsthaft krank und mussten kurz darauf aus tierschutzrechtlichen Gründen getötet werden. Dieser Befund ist ein Hinweis darauf, dass die Infektion erfolgreich war. Unterstützt wird diese Hypothese außerdem dadurch, dass alle Tiere in der "mock"-Kontrollgruppe nach der Belastungsinfektion eine schwere Leukopenie und hohes Fieber zeigten.

Offenbar waren alle Tiere, die mit einem der beiden Vakzine-Kandidaten (EP#73/2 oder EP#74/1) vakziniert worden waren, gegenüber der Belastungsinfektion mit "Eystrup" geschützt, da sie keine Anzeichen einer klinischen Erkrankung, keine Erhöhung der Körpertemperatur und keine pathologischen Veränderungen der Leukozytenzahlen nach der Belastungsinfektion zeigten. Des Weiteren entwickelten alle Tiere in den beiden Testgruppen (Stall 141/1 und 141/6) signifikante Titer CSFV-spezifischer neutralisierender Antikörper. Diese waren bei den Tieren bereits am Tag der Belastungsinfektion (24 dpv) nachweisbar, die Titer stiegen jedoch bis zum festgelegten Schlachttag (49 dpv) noch deutlich an. Im Gegensatz dazu konnten in den Sera der Tiere der "mock"-Kontrollgruppe zu keinem Zeitpunkt Antikörper nachgewiesen werden.

Es war möglich, Virus aus dem Leukozytenkonzentrat der Tiere in Gruppe 141/6 (EP#74/1) zu reisolieren und in der Sequenzierung und mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz zu untersuchen. Die Sequenzierung erbrachte das Ergebnis, dass die eingefügten Mutationen (Deletion von Histidin 346 E^{ms} und die TAV-Epitop Markierung TAVSKD~~TL~~RT) im Leukozytenkonzentrat aller Tiere der Gruppe 141/6 an Tag 7 noch vorhanden waren.

In der indirekten Immunfluoreszenz konnte weiterhin gezeigt werden, dass das negative TAV-Epitop Markierungskonzept in den Viren noch funktional war, die aus dem Leukozytenkonzentrat der Tiere aus der Gruppe 141/6 an Tag 7 dpv reisoliert worden waren. Da für die Tiere in der Gruppe 141/1 (vakziniert mit der TAV-Epitop markierten Doppelmutante) keine Viren aus dem Leukozytenkonzentrat reisoliert werden konnten, war es leider auch nicht möglich, die Funktionalität der TAV-Epitop Markierung der getesteten Doppelmutante nach der Tierpassage zu überprüfen. Die protektiven Eigenschaften der TAV-Epitop markierten Doppelmutante (EP#73/2) gegenüber der Belastungsinfektion mit einem hochpathogenen CSFV Feldstamm ("Eystrup") konnten jedoch in diesem Tierexperiment erfolgreich verifiziert werden.

In einem nächsten Tierexperiment wird erneut versucht werden müssen, aus dem Leukozytenkonzentrat der mit der TAV-Epitop markierten Doppelmutante vakzinierten Tieren Virus zu reisolieren und zu untersuchen. Hierbei könnte es nützlich sein, kurz nach der Vakzination (zwischen Tag 3 und 8 dpv) häufigere Blutabnahmen einzuplanen. Da die Doppelmutante aufgrund ihres Wachstumsnachteils (vergl. Abbildung 22) vermutlich schneller aus dem Blut der Tiere eliminiert wird als z.B. die RNase negative Variante, könnte es auf diese Art gelingen, den richtigen Zeitpunkt für den Virusnachweis zu treffen.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse dieses Experimentes die Schlussfolgerung zu, dass die TAV-Epitop markierte RNase negative Mutante (EP#74/1) sowohl im Hinblick auf ihr Potential als DIVA-Vakzine als auch im Hinblick auf ihre protektiven Eigenschaften gegenüber einer Belastungsinfektion mit "Eystrup" funktional ist. Allerdings zeigte sich in TV#30, dass die parentale nicht TAV-Epitop markierte RNase negative Mutante die Plazentaschranke überwindet und die Feten infiziert. Daher erscheint die Ausschaltung der RNase allein als Attenuierung für eine zukünftige DIVA-Vakzine nicht ausreichend zu sein.

3.3 Dimerisierung des E^{ms}-Proteins

3.3.1 Dimerisierungsnegative Mutanten und Pseudoreversion

In vorangegangenen Tierexperimenten wurden verschiedene CSFV-Mutanten untersucht, bei denen das für die Ausbildung von E^{ms} Homodimeren essentielle Cystein-Codon an Position 171 des E^{ms}-Proteins entweder durch Punktmutationen oder durch Deletion verändert war [60], so dass die Bildung von E^{ms} Homodimeren verhindert wurde. In den oben genannten Arbeiten war bereits gezeigt worden, dass die Verhinderung der E^{ms} Dimerisierung zur Ausprägung eines attenuierten Phänotyps in den getesteten Viren führt [31].

In diesen Tierexperimenten konnten des Weiteren einige interessante Beobachtungen gemacht werden. So zeigte sich, dass die Mutanten, in denen die Dimerisierung von E^{ms} durch Deletion von Codon 171 unterbunden worden war, in allen Versuchen einen deutlich attenuierten Phänotyp zeigten. Für die Mutanten, in denen die Dimerisierung durch Punktmutationen unterbunden war, zeigte sich hingegen ein heterogenes Bild. Die Variante EP#82(1) mit einer Punktmutation an Position 171, die in einem Austausch des Cystein-Codons durch ein Phenylalanin-Codon resultiert, zeigte im Tierversuch (TV#25) zwar eine schwächere Symptomatik als der Wildtyp, war aber dennoch deutlich pathogener als die Deletionsmutante. Die Variante EP#82(2) mit einer Punktmutation an der gleichen Stelle hingegen, die einen Austausch des Cysteins durch ein Serin zu Folge hat, induzierte im Tierversuch (TV#26) keine typischen Symptome einer CSFV-Infektion [60].

Bei den Viren, die in diesen Versuchen aus dem Blut der Versuchstiere reisoliert werden konnten, zeigte sich zum einen, dass die durch Punktmutationen eingefügten Veränderungen zum Teil revertiert waren. Interessanterweise konnte jedoch zum anderen in einigen dieser Viren anstelle der Reversion an Position 171 eine „Second-Site“ Mutation an Position 209 des E^{ms}-Proteins beobachtet werden [60]. Diese „Second-Site“ Mutation hatte den Austausch des Serins an dieser Position mit einem Cystein zur Folge. In *in vitro* Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass ein solcher Austausch dazu führt, dass die Dimerisierung trotz Mutation oder Deletion an Position 171 wieder stattfindet (Daten von Gregor Meyers, noch nicht veröffentlicht).

Es ist daher möglich, dass die Viren dieses neu gewonnene Cystein als Ersatz für das ursprüngliche Cystein an Position 171 für die Bildung von Homodimeren nutzen können und so ihre Virulenz zumindest teilweise wiedererlangen können. Interessant ist jedoch in diesem Zusammenhang auch, dass diese Pseudoreversion auch in einigen Viren beobachtet werden konnte, die aus dem Blut von Tieren stammen, die mit der Deletionsmutante (C171Δ) infiziert worden waren, die sich in den Tierversuchen als deutlich attenuiert dargestellt hatte [60].

Es stellt sich daher die Frage, ob die Reversionen an Position 171, die Pseudoreversionen an Position 209, eine Kombination beider Austausch oder aber noch weitere bisher unbekannte Mechanismen an der Restaurierung der Pathogenität der ursprünglich dimerisierungsnegativen Punktmutationsvariante beteiligt sind.

Zur Beantwortung dieser Frage wurde ein weiteres Tierexperiment durchgeführt.

3.3.1.1 Pathogenitätsstudie TV#29

In TV#29 wurden zwei verschiedene Pseudorevertanten (Virus 849: C171 Δ / S209C; Virus 1990 C III: C171S / S209C) im Vergleich zu einem CSFV Alfort/Tübingen Wildtypvirus (RTF 1347 III) im Hinblick auf ihre Virulenz im natürlichen Wirt untersucht.

Virus 849 ist ein Reisolat aus dem Tier mit der Nummer 849, das in einem vorangegangenen Versuch mit der dimerisierungsnegativen Mutante EP#82(4) (C171 Δ) infiziert worden war. In diesem Virus ist das Cystein Codon an Position 171 E^{ms} deletiert und es zeigt zusätzlich die Pseudoreversion an Position 209 (C209S).

Virus 1990 C III ist ein Mutante, die die Ausschaltung der E^{ms} Dimerisierung durch eine Punktmutation an Position 171 (C171S) mit der Pseudoreversion an Position 209 (S209C) kombiniert.

In diesem Tierexperiment galt es die Frage zu beantworten, ob die Pseudoreversion, die zur Wiederherstellung der Fähigkeit Dimere zu bilden führt, auch die Pathogenität der Viren partiell restauriert.

3.3.1.1.1 Generierung der benötigten Viren

Für die Herstellung eines CSFV Gesamtklons auf der Basis von Alfort/Tübingen mit den Mutationen C171S / S209C wurde das bereits im Labor vorhandene Plasmid p1989c verwendet. Dieses Plasmid basiert auf Plasmid p578, in welches die gewünschten Mutationen (C171S / S209C) bereits eingefügt waren. Ein SdaI/BglII cDNA Fragment aus Plasmid p1989c wurde in den Alfort/Tübingen CSFV Gesamtklon p1347 (SdaI / BglII) ligiert (2.2.1.6.). Dieses cDNA Fragment enthielt Teile von E^{ms} (mit den gewünschten Mutationen), E1, E2, p7 und Teile von NS2 (Abbildung 28). Die Existenz der eingefügten Mutationen im daraus resultierenden CSFV Gesamtklon p1990 C III wurde durch Sequenzierung (2.2.1.12) überprüft.

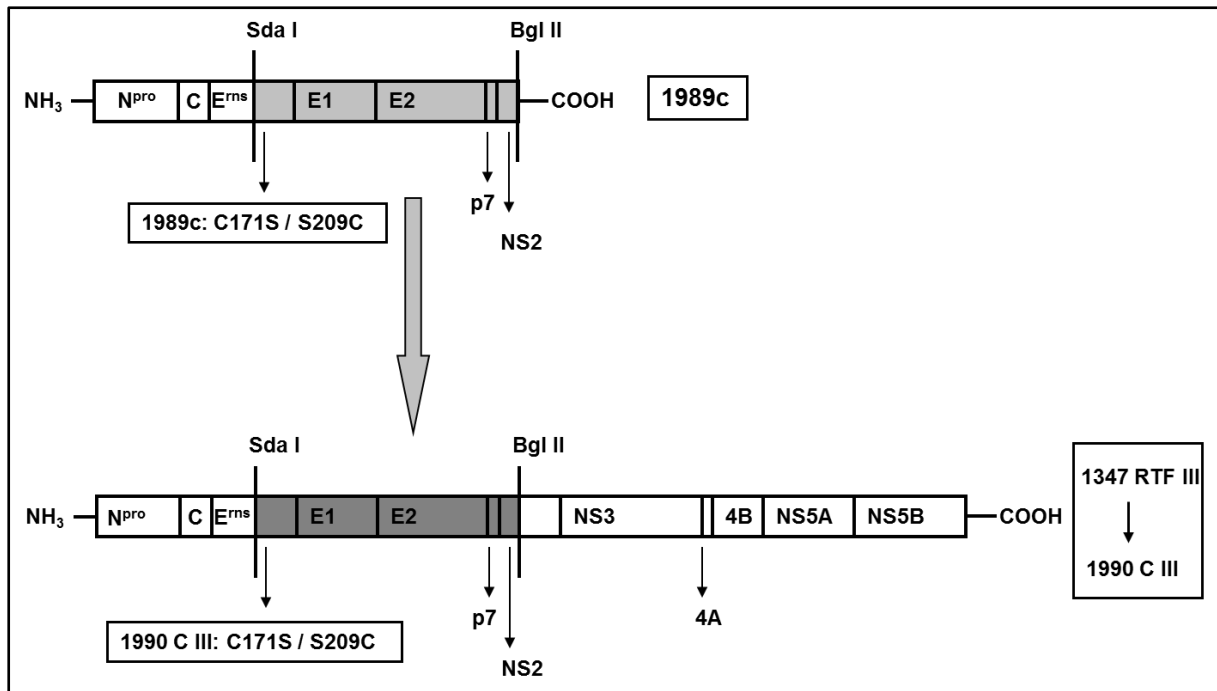


Abbildung 28: Klonierungsschema p1990 C III

Zur Herstellung des CSFV cDNA Gesamtklones p1990 C III wurde ein SdaI / BglIII Fragment aus Plasmid p1989c ausgeschnitten, welches die gewünschten Mutationen im E^{ms}-Gen enthielt (C171S / S209C), und in das Plasmid p1347 RTF III inseriert.

Ein CSFV-Gesamtklonplasmid mit den Mutationen C171Δ / S209C, die den in Tier 849 gefundenen Mutationen entsprechen, wurde ebenfalls im Labor hergestellt. Hierzu wurde das bereits im Labor vorhandene Plasmid p√1677 genutzt. Dieses Plasmid ist ein CSFV-Subklon aus der 5'-Region des Genoms (ca. 1,8 kb groß). Es basiert auf einem bluescript® Vektor, in den ein XhoI / BglIII CSFV cDNA Fragment eingefügt wurde, das die viralen Proteine N^{pro}, C, E^{ms} (mit Deletion von Cystein 171 E^{ms}) und Teile von E1 enthält. In dieses Plasmid wurde dann zusätzlich mit Hilfe einer Quik® Change-PCR die Pseudoreversion an Position 209 (S209C) eingefügt. Aus diesem Schritt resultierte das Plasmid pSW1, welches die Mutationen C171Δ / S209C enthielt. Über einen Zwischenschritt mit dem CSFV Subklonplasmid p578 wurde ein cDNA Fragment mit den gewünschten Mutationen im E^{ms}-Protein schlussendlich in das Gesamtklonplasmid p1347 eingefügt. Aus diesem Schritt resultierte der CSFV Gesamtklon pSW3 (Abbildung 29). Die Existenz der eingefügten Mutationen wurde auch hier in der Sequenzierung überprüft.

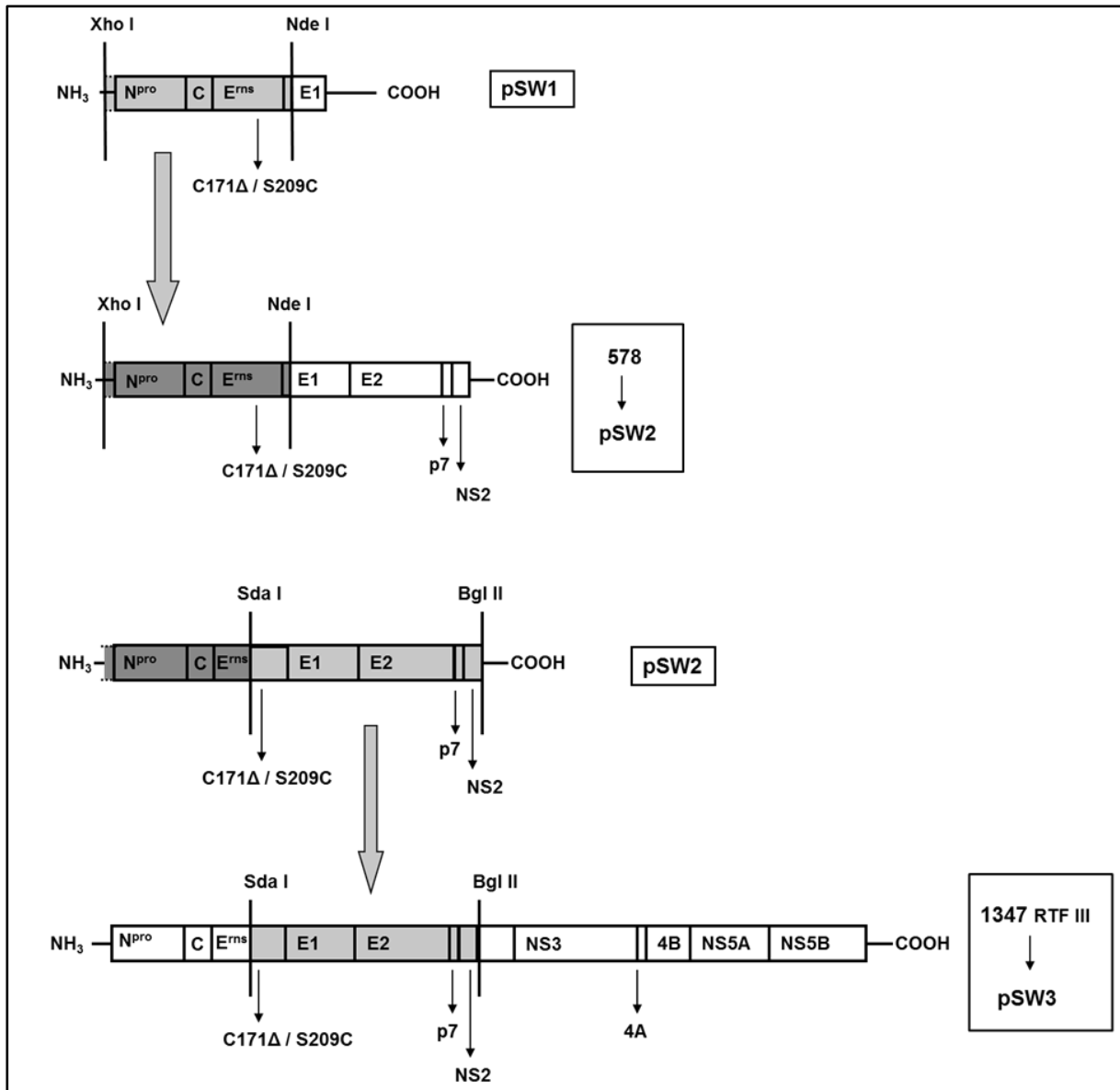


Abbildung 29: Klonierungsschema pSW3

Plasmid pSW1 enthält die Mutationen C171 Δ / S209C im E^{ms} -Gen. Über einen Zwischenschritt mit dem CSFV Subklonplasmid p578 wurde ein cDNA Fragment mit den gewünschten Mutationen im Erns-Protein in das Gesamtklonplasmid p1347 eingefügt. Aus diesem Schritt resultierte der CSFV Gesamtklon pSW3.

Das Gesamtklonplasmid p1990 C III wurde mit SmaI linearisiert (2.2.1.4), *in vitro* transkribiert (2.2.1.13) und elektroporiert (2.2.1.16). Das Virus wurde insgesamt 4x auf SK-6 Zellen passagiert (2.2.2.1) und jede Passage wurde in der indirekten Immunfluoreszenz (2.2.4.6) auf das Vorhandensein von infektiösem Virus hin überprüft. In diesem Ansatz wurde dazu die Färbung mit dem mAk A18 durchgeführt. Als Kontrollen wurden jeweils eine nicht infizierte Zellkontrolle und eine mit einem CSFV Alfort/Tübingen Wildtypvirus infizierte Positivkontrolle verwendet. Jede Passage von 1990 C III ergab in diesen Immunfluoreszfärbungen ein

positives Ergebnis. Parallel zu Virus 1990 C III wurde auch Virus 849 (Reisolat aus dem Blut von Tier 849) auf SK-6 Zellen weiter passagiert (insgesamt 8x).

Aus SK-6 Zellen, die jeweils mit der vierten Passage von Virus 1990C III und der achten Passage von Virus 849 infiziert worden waren, wurde virale RNA extrahiert (2.2.2.5) und diese in RT-PCRs (2.2.2.6) eingesetzt. Die nachfolgende Sequenzierung (2.2.1.12) zeigte, dass in beiden Viren die gewünschten Mutationen noch vorhanden waren (Virus 1990 C III: C171S/S209C; Virus 849 C171Δ/S209C).

3.3.1.1.2 Charakterisierung der eingesetzten Viren

Die Wachstumseigenschaften der vierten Passage von Virus 1990 C III und der achten Passage von Virus 849 wurden in Wachstumskurven (2.2.2.4) mit denen eines CSFV Alfort/Tübingen Wildtypvirus (1347 RTF III) verglichen. Hierbei zeigte sich, dass beide Mutanten in ihren Replikationseigenschaften denen des Wildtypvirus sehr ähnelten. Ein finaler Titer von knapp 10^6 KID₅₀/ml nach 72 h konnte für beide Mutanten ermittelt werden; sie blieben mit diesem Wert um etwa 1 Log-Stufe hinter dem finalen Titer des Wildtypvirus zurück (Abbildung 30).

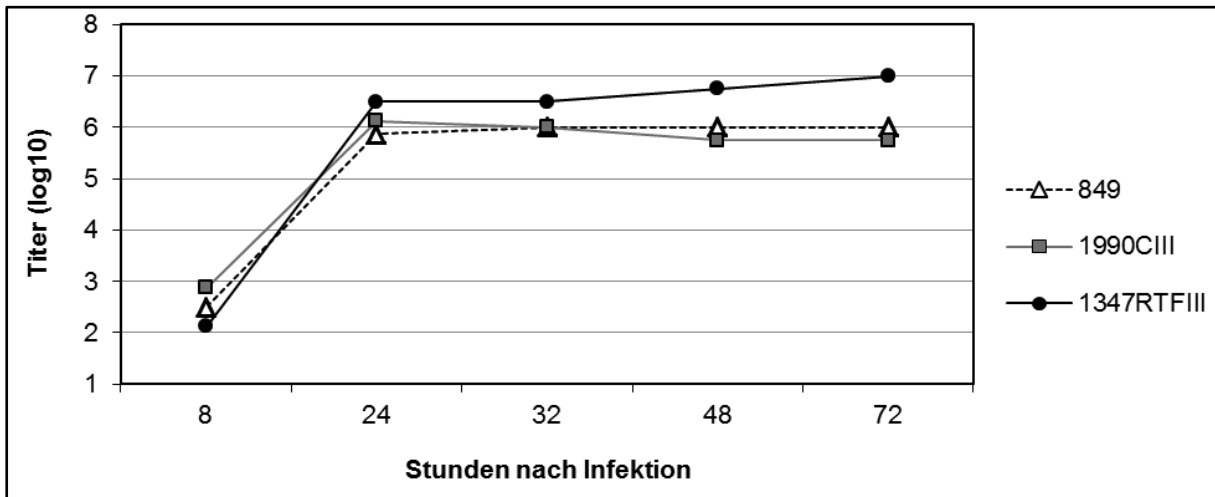


Abbildung 30: Wachstumskurven TV#29

Die Wachstumskurve der Deletions-Pseudorevertante 849 (C171Δ/S209C) ist durch weiße Dreiecke und eine gepunktete schwarze Linie dargestellt, die der Punktmutations-Pseudorevertante 1990 C III (C171S/S209C) durch graue Quadrate und eine graue Linie und die des Wildtypvirus 1347 RTF III (Alfort/Tübingen) durch schwarze Kreise und eine schwarze Linie. Beide Mutanten ähneln in ihrem Wachstumsverhalten dem Wildtypvirus, bleiben jedoch nach 72 h um ca. eine log-Stufe hinter dem Titer des Wildtypvirus zurück.

3.3.1.1.3 Auswahl und Bezeichnung der Tiere

Acht Tage vor der geplanten Infektion wurden 10 Ferkel der Rasse Deutsches Hybridschwein in die Versuchseinrichtung des Friedrich-Loeffler Instituts in Tübingen eingestallt, um eine angemessene Akklimatisierungsperiode zu ermöglichen. Die Tiere wurden in drei Gruppen aufgeteilt. In die zwei Testgruppen wurden je vier Tiere eingestallt und in die Wildtypkontrollgruppe wurden drei Tiere eingestallt. Tabelle 37 gibt eine Übersicht über die Gruppeneinteilung.

Gruppe	Virus	Tiernummern
1 / Stall 44	849 (C171Δ / S209C)	5040 / 5042 / 5048 / 1584
2 / Stall 45	1990 C III (C171S / S209C)	5039 / 6060 / 5061 / 1594
3 / Stall 46	RTF 1347 III (Wildtyp)	5049 / 6059 / 5060

Tabelle 37: Gruppeneinteilung TV#29

In die beiden Testgruppen wurden jeweils vier Tiere eingruppiert, in die Wildtyp-Kontrollgruppe drei Tiere.

3.3.1.1.4 Zeitplan

Blutproben für die Aufarbeitung von Leukozytenkonzentrat, für die Leukozytenzählung und für die Serumgewinnung wurden an den in Tabelle 38 angegebenen Terminen genommen. Die Tiere wurden zwischen Tag -5 bis einschließlich Tag 22 dpi täglich beobachtet und es wurden die klinischen Punktzahlen und die Körpertemperaturen der Tiere bestimmt. Aus tierschutzrechtlichen Gründen mussten die Tiere der Gruppe 3 bereits vor dem planmäßigen Ende des Tierexperimentes an Tag 9 dpi getötet werden; die Tiere in den übrigen Gruppen wurden wie geplant an Tag 22 dpi getötet (Tabelle 38).

Ergebnisse

Tage nach Vakzination (dpi)	Klinische Beobachtung	Körper- temperatur- messung	Heparinblut- gewinnung	Nativblut- gewinnung	Schlachtung
-5 dpi	x	x			
-4 dpi	x	x			
-3 dpi	x	x			
-2 dpi	x	x			
-1 dpi	x	x	x	x	
0 dpi	x	x			
1 dpi	x	x			
2 dpi	x	x	x		
3 dpi	x	x			
4 dpi	x	x			
5 dpi	x	x	x		
6 dpi	x	x			
7 dpi	x	x			
8 dpi	x	x	x		
9 dpi	x	x	Wildtypkontrolle	Wildtypkontrolle	Wildtypkontrolle
10 dpi	x	x			
11 dpi	x	x			
12 dpi	x	x	x		
13 dpi	x	x			
14 dpi	x	x			
15 dpi	x	x	x		
16 dpi	x	x			
17 dpi	x	x			
18 dpi	x	x			
19 dpi	x	x	x		
20 dpi	x	x			
21 dpi	x	x			
22 dpi	x			Gruppe 849 / Gruppe 1990 C III	Gruppe 849 / Gruppe 1990 C III

Tabelle 38: Zeitplan TV#29

An den mit einem x markierten Tagen wurden die angegebenen Tätigkeiten in allen Gruppen und mit allen Tieren durchgeführt. Betrafen die Maßnahmen nur einzelne Gruppen, so sind diese einzeln aufgeführt.

3.3.1.1.5 Infektion und Titration der Vakzineviren

Die CSFV-Mutanten (Gruppe 1: Virus 849 / Gruppe 2: Virus 1990 C III) und ein CSFV Alfort/Tübingen Wildtypvirus (Gruppe 3: 1347 RTF III) wurden den Tieren an Tag 0 dpi intranasal und intramuskulär verabreicht (2.2.3.1.). Jedes Tier erhielt eine Gesamtdosis von ca. 10^6 KID₅₀/ml in 4,22 ml DMEM. Etwa die Hälfte der Dosis (2 ml) wurde den Tieren jeweils intranasal verabreicht (1 ml pro Nasenloch = total 2 ml intranasal); die restlichen 2,22 ml wurden in den *Musculus brachiocephalicus* injiziert. Zur Kontrolle der Titer wurden Rücktitrationen durchgeführt (2.2.3.2). Die in den Rücktitrationen bestimmten Titer wichen nur gering von den erwarteten Titern ab. Wichtig ist, dass die Titer der getesteten Viren nicht geringer waren als der Titer des Wildtypkontrollvirus (Tabelle 39).

Ergebnisse

A	Stall 44		Stall 45		Stall 46	
	Virus 849 (C171Δ/S209C)		Virus 1990 C III (C171S/S209C)		Virus 1347 RTF III (Wildtyp)	
	Titer		Titer		Titer	
Rücktitration/ml	Rücktitration (KID ₅₀ /ml)	erwartet (KID ₅₀ /ml)	Rücktitration (KID ₅₀ /ml)	erwartet (KID ₅₀ /ml)	Rücktitration (KID ₅₀ /ml)	erwartet (KID ₅₀ /ml)
Originalvirus (direkt nach -70°C)	10 ^{5,63}	10 ^{5,69}	10 ^{5,25}	10 ^{5,38}	10 ^{5,69}	10 ^{6,13}
applizierte Verdünnung (i.n. + i.m. appliziert)	10 ^{5,44}	10 ^{5,38}	n.d.	n.d.	10 ^{5,13}	10 ^{5,38}
Verdünnung (Stalltransport "auf Eis", dann nach -70°C)	10 ^{5,13}	10 ^{5,38}	10 ^{5,13}	10 ^{5,38}	10 ^{5,06}	10 ^{5,38}

B	Stall 44		Stall 45		Stall 46	
	Virus 849 (C171Δ/S209C)		Virus 1990 C III (C171S/S209C)		Virus 1347 RTF III (Wildtyp)	
	Titer		Titer		Titer	
verabreichte Gesamtmenge pro Tier (2,0 ml i.n. / 2,22 ml i.m.)	Rücktitration (KID ₅₀ /ml)	erwartet (KID ₅₀ /ml)	Rücktitration (KID ₅₀ /ml)	erwartet (KID ₅₀ /ml)	Rücktitration (KID ₅₀ /ml)	erwartet (KID ₅₀ /ml)
applizierte Verdünnung (direkt nach -70°C)	10 ^{5,45}	10 ^{5,70}	10 ^{5,45}	10 ^{5,70}	10 ^{5,39}	10 ^{5,70}
Verdünnung (Stalltransport "auf Eis", dann nach -70°C)	10 ^{5,45}	10 ^{5,70}	10 ^{5,45}	10 ^{5,70}	10 ^{5,39}	10 ^{5,70}
Summe	10 ^{5,75}	10 ⁶	10 ^{5,75}	10 ⁶	10 ^{5,68}	10 ^{6,0}

Tabelle 39: Rücktitrationen TV#29

In Tabelle A ist der Vergleich der in der Titration ermittelten Titer für die einzelnen Rücktitrationsproben im Vergleich zu den erwarteten Titern dargestellt. Hierbei ist bei allen drei Viren ein geringer Titerverlust durch den Stalltransport zu verzeichnen.

In Tabelle B ist die Gegenüberstellung der in der Titration ermittelten verabreichten Gesamtmenge an Virus pro Tier (4,22 ml insg.) im Vergleich zu der erwarteten Menge abgebildet. Den Tieren wurden nur geringfügig niedrigere Impfdosen als geplant verabreicht und der Titerverlust war für die beiden Virusmutanten gleich hoch. Der Titerverlust des Wildtypvirus war im Vergleich geringfügig höher.

3.3.1.1.6 Klinische Punktzahl

Der Gesundheitszustand der Tiere wurde täglich kontrolliert und durch die Bestimmung der klinischen Punktzahl dokumentiert (2.2.3.3; Tabelle 38). Alle Tiere in der Wildtypkontrollgruppe (Gruppe 3) wurden nach der Infektion mit Virus 1347 RTF III ernsthaft krank und mussten daher aus tierschutzrechtlichen Gründen an Tag 9 dpi getötet werden. Alle Tiere der Gruppe 2, die mit der Punktmutations-Pseudorevertante (Virus 1990 C III: C171S/S209C) infiziert worden waren, zeigten ebenfalls deutliche klinische Symptome einer CSFV-Infektion. Allerdings war der Schweregrad der Krankheit dieser Tiere im Vergleich zur Wildtypkontrollgruppe deutlich geringer und alle Tiere erholten sich bis zum geplanten Ende des Tierexperimentes. Im Gegensatz dazu zeigten nur zwei Tiere der Gruppe 1, die mit der Deletions-Pseudorevertante (Virus 849: C171 Δ /S209C) infiziert worden waren, sehr leichte klinische Anzeichen einer Erkrankung und das auch nur an einem oder zwei Tagen während des Tierversuches (Abbildung 31).

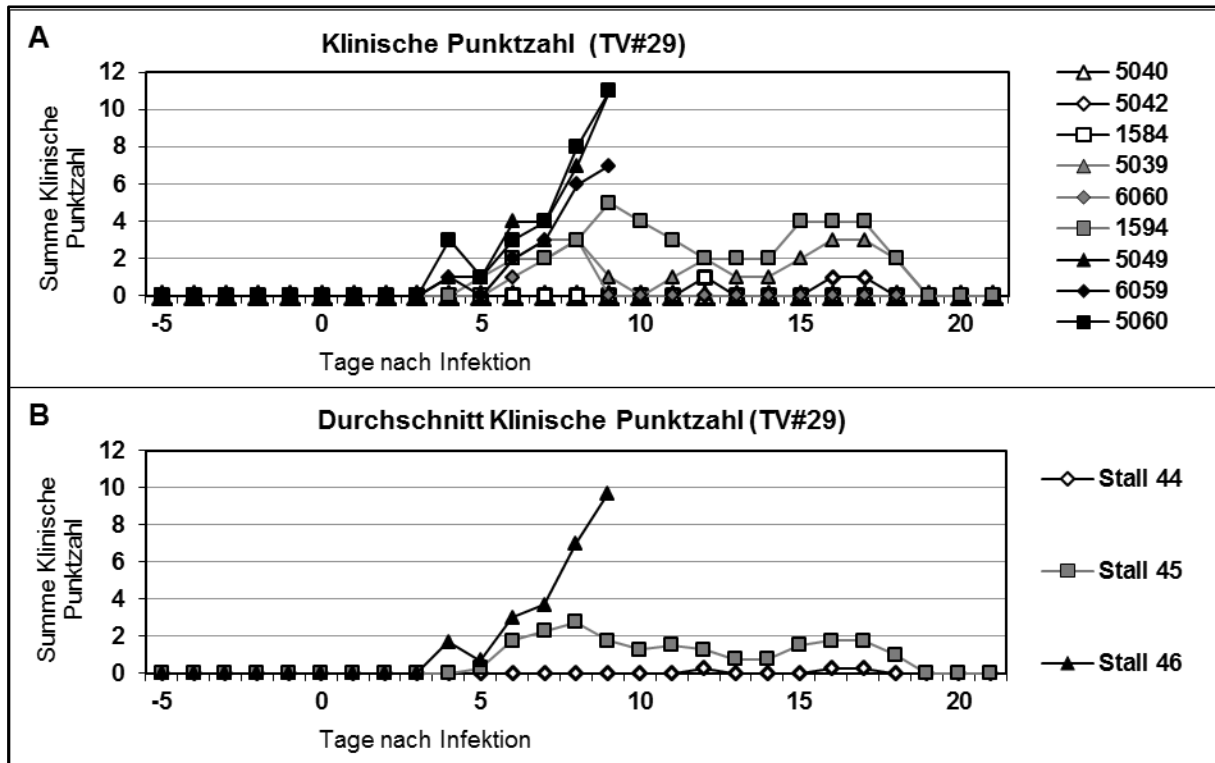


Abbildung 31: Klinische Punktzahlen TV#29

A: Klinische Punktzahlen der einzelnen Tiere der drei Gruppen im Vergleich

Die Tiere in Stall 44 (Virus 849) sind durch weiße Symbole und eine schwarze Linie dargestellt, die Tiere in Stall 45 (Virus 1990 C III) durch graue Symbole und eine graue Linie und die Tiere in Stall 46 (Wildtypkontrollgruppe) durch schwarze Symbole und eine schwarze Linie.

B: Durchschnittliche Klinische Punktzahlen der drei Gruppen im Vergleich

Der letzte Datenpunkt für Stall 46 wurde an Tag 9 dpi erhoben, da an diesem Tag die Euthanasie der Tiere stattfand. Alle Tiere in der Wildtypkontrollgruppe (schwarze Dreiecke, schwarze Linie) wurden nach der Infektion mit Virus 1347 RTF III ernsthaft krank und mussten daher aus tierschutzrechtlichen Gründen an Tag 9 dpi getötet werden. Alle Tiere der Gruppe 2 (Virus 1990 C III: C171S/S209C; graue Quadrate, graue Linie) zeigten ebenfalls deutliche klinische Symptome einer CSFV-Infektion. Allerdings war der Schweregrad der Krankheit dieser Tiere im Vergleich zur Wildtypkontrollgruppe deutlich geringer und alle Tiere erholten sich bis zum geplanten Ende des Tierexperimentes. Nur zwei Tiere der Gruppe 1 (Virus 849: C171Δ/S209C; weiße Raute, schwarze Linie) zeigten sehr leichte Abweichungen von der physiologischen Norm.

3.3.1.1.7 Temperatur

Die Körpertemperatur der Tiere wurde täglich von Tag -3 bis einschließlich Tag 21 dpi gemessen (2.2.3.4). Die Körpertemperaturen aller Tiere vor der Infektion lagen auf leicht erhöhtem Niveau (ca. 39,5° C). Drei bis vier Tage nach der Infektion stiegen die Körpertemperaturen aller Tiere in der Wildtypkontrollgruppe auf deutliche Fieberwerte bis 41,5° C an und blieben erhöht bis zur Tötung der Tiere an Tag 9 dpi. Zum gleichen Zeitpunkt zeigten ebenfalls die Tiere in Stall 44, die mit der Deletions-Pseudorevertante (Virus 849: C171Δ/S209C) infiziert worden waren, einen Anstieg der Körpertemperatur auf Werte bis zu

40,5 °C (d.h. eine Erhöhung der Körpertemperatur um 1° C im Vergleich zu den Ausgangswerten vor Versuchsbeginn). Drei Tage später (Tag 6 dpi) hatten sich die Körpertemperaturwerte dieser Tiere jedoch bereits wieder auf das Ausgangsniveau normalisiert. Auch die Tiere in Stall 45, die mit der Punktmutations-Pseudorevertante (Virus: 1990 C III: C171S/S209C) infiziert worden waren, zeigten einen deutlichen Anstieg der Körpertemperatur auf Werte von max. 41,5° C analog zu den Tieren in der Wildtypkontrollgruppe. Allerdings trat dieser Anstieg der Körpertemperatur mit drei Tagen Verzögerung auf im Vergleich zur Wildtypkontrollgruppe und die Körpertemperaturen der Tiere normalisierten sich bis zum geplanten Ende des Tierexperimentes wieder auf die Ausgangswerte (Abbildung 32).

3.3.1.1.8 Leukozytenzählung

Die Gesamtleukozytenzahlen der Tiere wurden an den Tagen -1, 2, 5, 8, 9 (nur Stall 46), 12, 15 und 19 dpi bestimmt (2.2.4.1.).

Alle Tiere zeigten einen Abfall der Gesamtleukozytenzahlen an den Tagen 5 – 8 dpi. Bei den Tieren in der Wildtypkontrollgruppe (Stall 46) setzte sich dieser Abfall bis zu ihrer Tötung an Tag 9 dpi fort. Bei den Tieren in den anderen beiden Gruppen (Stall 44: Virus 849 / Stall 45: Virus 1990 C III) hatten sich die Gesamtleukozytenzahlen an den Tagen 12 – 15 dpi wieder auf physiologische Werte normalisiert (Abbildung 33).

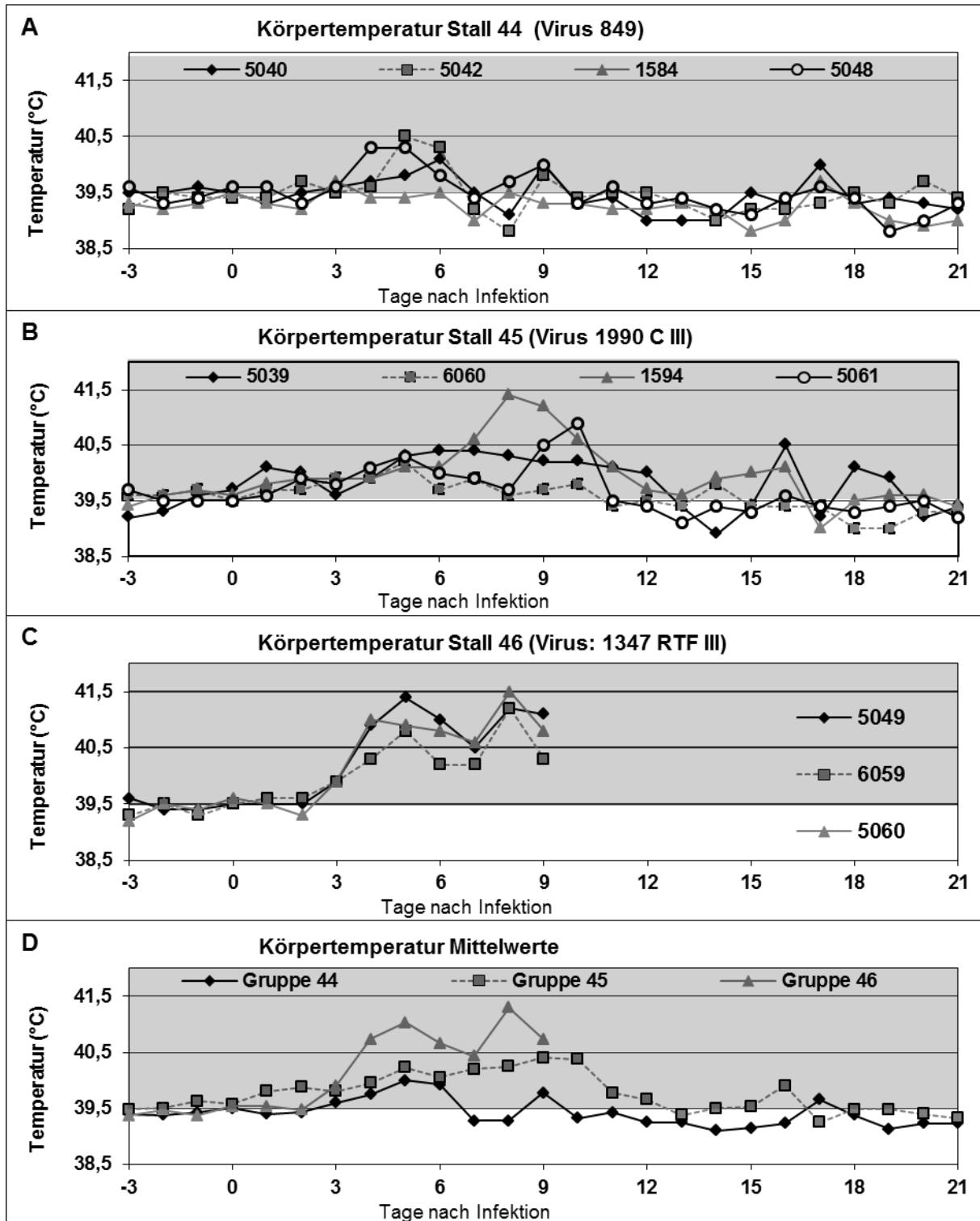


Abbildung 32: Körpertemperatur TV#29

A: Stall 44 (Virus 849 = Deletions-Pseudorevertante: C171Δ/S209C); B: Stall 45 (Virus 1990 C III = Punktmutations-Pseudorevertante: C171S/S209C); C: Stall 46 (Virus 1347 RTF III = CSFV Alfort/Tübingen Wildtyp); D: Durchschnittliche Körpertemperaturen der drei Gruppen im Vergleich grau unterlegt: Fieber (Temperaturerhöhung auf über 39,5 °C; vergl. Ruhewerte Körpertemperatur Schwein [58])

Während die Körpertemperaturen der Tiere in Gruppe 44 (849) nur kurzzeitig nach der Infektion erhöht waren, zeigten die Tiere in den beiden anderen Gruppen (1990 C III / 1347 RTF III) über längere Zeit Fieber.

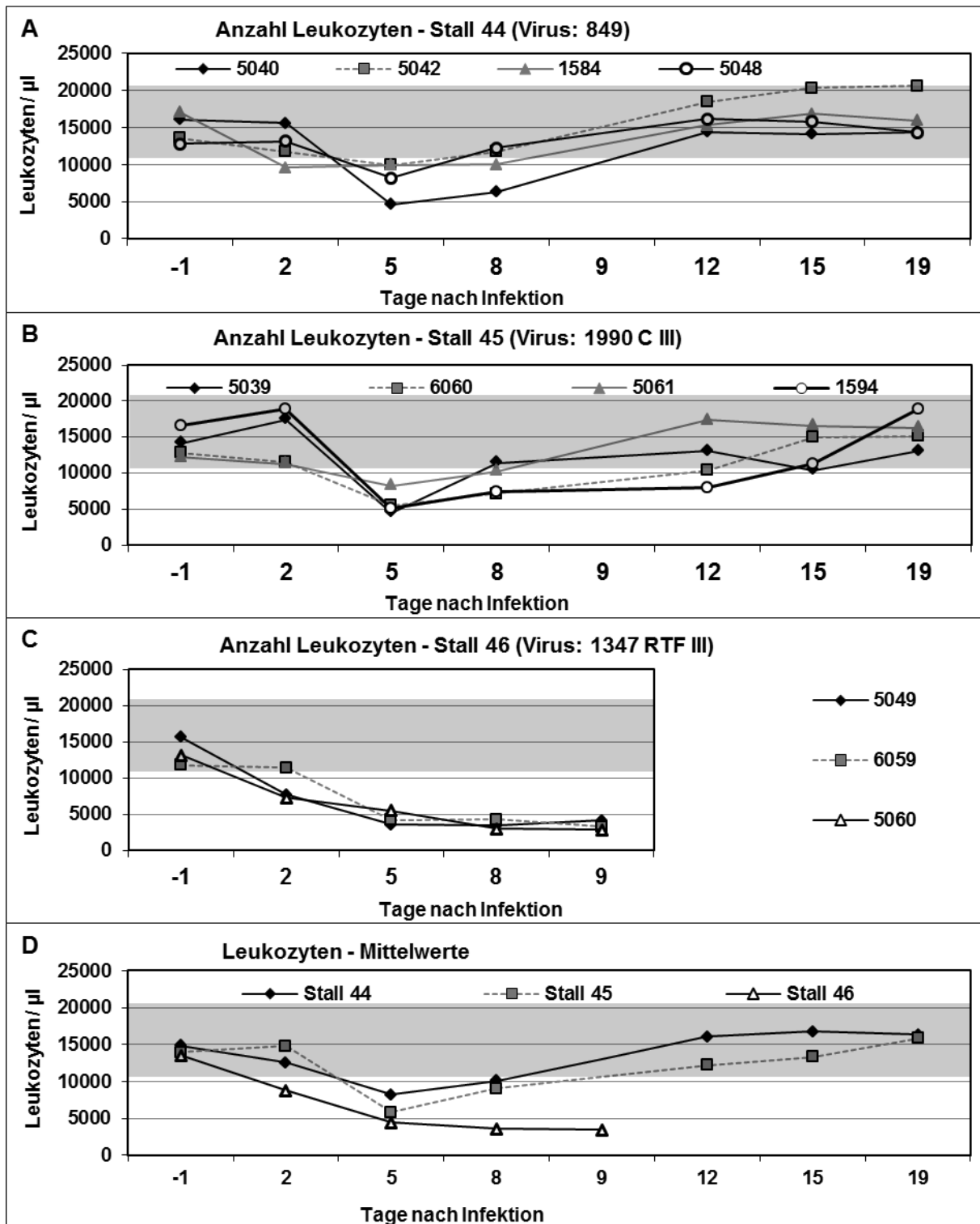


Abbildung 33: Leukozytenzahlen TV#29

A: Leukozytenzahlen Stall 44 (Virus 849: C171Δ/S209C); B: Leukozytenzahlen Stall 45 (Virus: 1990 C III: C171S/S209C); C: Leukozytenzahlen Stall 46 (Virus: 1347 RTF III = Wildtyp); die Tiere dieser Gruppe wurden an Tag 9 dpi euthanasiert; D: Mittelwerte aus den drei Gruppen im Vergleich; grau unterlegt: physiologischer Referenzbereich: 10500-21300 Leukozyten / µl Blut. An den Tagen 5-8 dpi zeigten alle Tiere den für eine CSFV Infektion typischen Abfall der Leukozytenzahlen. Die Leukozytenzahlen der Tiere in Stall 45 und 46 normalisierten sich danach wieder auf physiologische Werte, während die Leukozytenzahlen der Tiere in der Wildtypgruppe bis zur Euthanasie weiter fielen.

3.3.1.1.9 Serologische Untersuchungen

Serumneutralisationstests wurden zur Untersuchung von Serumproben durchgeführt, die einen Tag vor der Vakzination (-1dpi) und am Tag der Euthanasie (23 dpi) genommen worden waren (2.2.4.5). Die Tiere der Gruppe 46 (Wildtypkontrollgruppe) mussten vor dem geplanten Ende des Tierexperimentes getötet werden, so dass bei diesen Tieren die Serumproben bereits an Tag 9 dpi gewonnen wurden.

Alle Tiere, die das geplante Ende des Tierexperimentes erlebten, entwickelten signifikante Titer CSFV spezifischer neutralisierender Antikörper. In den Seren der Tiere, die bereits an Tag 9 dpi getötet werden mussten, konnten zu diesem Zeitpunkt keine neutralisierenden Antikörper nachgewiesen werden (Tabelle 40; Abbildung 34).

	Gruppe 44: Virus 849				Gruppe 45: Virus 1990 C III				Gruppe 46: Wildtyp		
	(E ^{rns} : C171Δ / S209C)				(E ^{rns} : C171S / S209C)				(E ^{rns} : C171 / S209)		
dpi / Tiernummer	5040	5042	5048	1584	5039	6060	5061	1594	5049	6059	5060
-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9									0	0	0
23	45	36	71	224	178	28	141	447			

Tabelle 40: Titer neutralisierender Antikörper TV#29

Serumproben wurden an den Tagen -1, 9 und 23 dpi genommen und in SNTs eingesetzt.

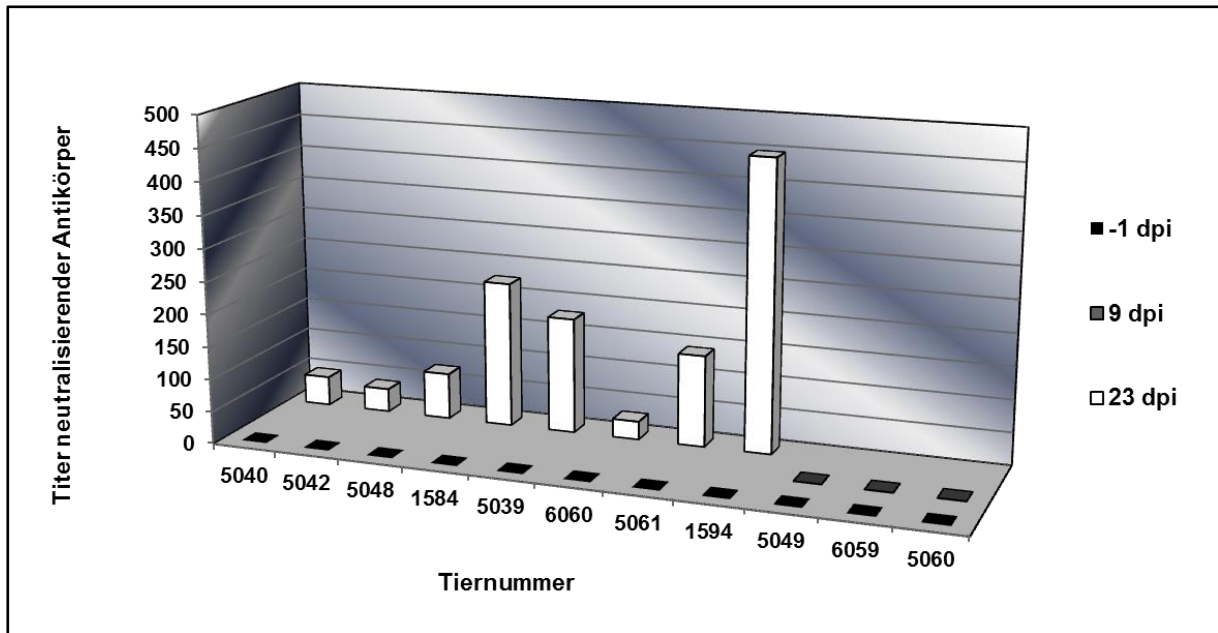


Abbildung 34: SNT TV#29

Gruppe 44 (Virus 849): Tiere 5040; 5042; 5048; 1584

Gruppe 45 (Virus 1990 C III): 5039; 6060; 5061; 1594

Gruppe 46 (Virus 1347 RTF III): 5049; 6059; 5060

Vor der Vakzination (-1 dpi) konnten im Blut der Tiere erwartungsgemäß keine Antikörper gegen CSFV nachgewiesen werden (erste Datenreihe, schwarze Symbole). Zum Zeitpunkt der Schlachtung der Wildtypkontrollgruppe (9 dpi) waren in den Serumproben dieser Tiere ebenfalls noch keine Antikörper nachweisbar (zweite Datenreihe, graue Symbole). An Tag 23 dpi wurden in den Seren aller Tiere in den Gruppen 44 (Virus 849) und 45 (Virus 1990 C III) signifikante Titer neutralisierender Antikörper nachgewiesen (dritte Datenreihe, weiße Symbole).

3.3.1.1.10 Analyse der aus Leukozytenkonzentrat reisolierten Viren

Das aufgearbeitete Leukozytenkonzentrat wurde für die Virusanzucht auf SK-6 Zellen verwendet (2.2.4.4). Die Auswertung des Experimentes erfolgte durch eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung (2.2.4.6) mit dem mAk A18. Bei allen Tieren mit Ausnahme von Tier 1584 der Gruppe 1 konnte an mindestens einem Tag des Tierexperimentes eine Virämie nachgewiesen werden. Die in Tabelle 41 grau unterlegten Proben wurden erneut für die Virusanzucht auf SK-6 Zellen verwandt. Die virale RNA wurde extrahiert (2.2.2.5), in RT-PCRs (2.2.2.6) als Template eingesetzt (Primer 348 M+ / Eo3sII) und anschließend in der Sequenzierung (2.2.1.12) überprüft. Hierbei zeigte sich, dass in allen reisolierten Viren die gewünschten Mutationen noch vorhanden waren.

Tabelle 41 fasst die Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenz der Virusanzucht aus Leukozytenkonzentrat zusammen.

Ergebnisse

Gruppe (Virus)	Tiernummer	-1 dpi	2 dpi	5 dpi	8 dpi	9 dpi	12 dpi	15 dpi	19 dpi
1 (849)	5040	- / -	- / -	+ / -	+ / -	n.d.	- / -	- / -	- / -
	5042	- / -	- / -	+ / +	+ / +	n.d.	- / -	- / -	- / -
	5048	- / -	- / -	+ / -	- / -	n.d.	- / -	- / -	- / -
	1584	- / -	- / -	- / -	- / -	n.d.	- / -	- / -	- / -
2 (1990 C III)	5039	- / -	- / -	+ / -	+ / +	n.d.	+ / +	- / -	- / -
	6060	- / -	- / -	+ / +	+ / +	n.d.	- / -	- / -	- / -
	5061	- / -	- / -	+ / -	+ / +	n.d.	- / -	- / -	- / -
	1594	- / -	- / -	+ / -	+ / +	n.d.	+ / +	- / -	- / -
3 (1347 RTF III)	5049	- / -	- / -	+ / +	+ / +	+ / +			
	6059	- / -	- / -	+ / +	+ / +	+ / +			
	5060	- / -	- / -	+ / +	+ / +	+ / +			

Tabelle 41: Virusanzucht aus Leukozytenkonzentrat: Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenz

Die Proben wurden jeweils im Doppelansatz angeimpft.

+ = positives Signal in der A18 Färbung

- = negatives Signal in der A18 Färbung

grau unterlegt: Probe wurde für die Sequenzierung ausgewählt

Bei allen Tieren mit Ausnahme von Tier 1584 der Gruppe 1 konnte an mindestens einem Tag des Tierexperimentes eine Virämie nachgewiesen werden.

3.3.1.1.11 Zusammenfassung TV#29

Alle Tiere zeigten in diesem Tierexperiment zwischen Tag 5 und 8 dpi einen Abfall der Gesamtleukozytenzahlen. Parallel dazu zeigten alle Tiere ebenfalls zu diesem Zeitpunkt eine deutliche Erhöhung der Körpertemperatur, obwohl auch in diesem Experiment ähnlich wie in TV#52/12 bei allen Tieren schon vor der Infektion eine leicht erhöhte Körpertemperatur beobachtet worden war. Es ist wahrscheinlich, dass dies in dem Stress begründet war, dem die Tiere während der Fütterung (dem Zeitpunkt der Temperaturmessung) unterlagen. Diese beiden Befunde lassen zusammengenommen darauf schließen, dass die Infektion erfolgreich war. Dies wird auch durch die Tatsache unterstützt, dass bei allen Tieren, die das geplante Ende des Tierexperimentes erlebten, signifikante Titer CSFV-spezifischer neutralisierender Antikörper nachgewiesen werden konnten und zehn der elf Tiere an mindestens einem Tag des Experimentes eine Virämie zeigten. Es war ferner möglich, Virus aus dem aufgearbeiteten Leukozytenkonzentrat dieser Tiere zu reisolieren und die Existenz der eingefügten Mutationen in der Sequenzierung nachzuweisen. Somit konnte eine Kontamination mit Wildtypvirus in den beiden Testgruppen (Gruppe 1: Virus 849 / Gruppe 2: Virus 1990 C III) ausgeschlossen werden.

Die Tiere in der Wildtypkontrollgruppe (Gruppe 3) wurden alle nach der Infektion schwer krank, so dass sie an Tag 9 dpi vorzeitig getötet werden mussten.

Nach der Infektion zeigten die Tiere in Gruppe 1 (Virus 849) nur sehr leichte Krankheitssymptome und das auch nur über einen Zeitraum von 1-2 Tagen in Folge. Somit zeigte die hier getestete Deletions-Pseudorevertante 849 (C171 Δ / S209C) eine ähnliche Attenuierung wie ihre parentale dimerisierungsnegative Mutante EP#82 (4) (C171 Δ) in einem vorangegangenen Versuch (TV#26 [60]). In *in vitro* Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass die pseudorevertanten Konstrukte über das an Position 209 bereit gestellte Cystein wieder in der Lage sind, Homodimere zu bilden (Daten von Gregor Meyers, noch nicht veröffentlicht). Trotzdem war es dem hier getesteten Virus jedoch offenbar nicht möglich, seine Pathogenität durch diese Pseudoreversion alleine vollständig zu regenerieren.

Die Tiere der Gruppe 2 (Virus 1990 C III) zeigten ab Tag 5 – 8 dpi für ca. zehn Tage sehr deutliche klinische Anzeichen einer Schweinepest-Erkrankung, die jedoch in ihrem Schweregrad hinter dem der Wildtypgruppe zurück blieb. Dennoch zeigte sich diese Punktmutations-Pseudorevertante 1990 C III (C171S / S209C) im Vergleich zu ihrer parentalen dimerisierungsnegativen Mutante EP#82 (2) (C171S) deutlich virulenter.

Es ergibt sich also aus den Ergebnissen dieses Tierversuches erneut ein heterogenes Bild: die Punktmutations-Pseudorevertante (1990 C III: C171S / S209C) zeigte sich deutlich pathogen, die Deletions-Pseudorevertante (849: C171 Δ / S209C) jedoch nicht. Offenbar reichte also die Pseudoreversion an Position 209 (S209C) alleine nicht aus, um dem Virus 849 die Möglichkeit zu geben, seine Pathogenität partiell wiederherzustellen. Die Position 171 scheint vielmehr trotzdem auch in den Pseudorevertanten einen attenuierenden Effekt zu haben, so dass die Restaurierung der Fähigkeit E^{ms}-Dimere zu bilden nicht ausreicht, um den virulenten Phänotyp wiederherzustellen. Es scheint in diesem Zusammenhang keine Rolle zu spielen, ob die Pseudoreversion bereits in den Viren vorhanden ist, bevor sie den Tieren injiziert werden, oder ob die Viren diese Mutationen erst während der Replikation im Tier erwerben. Die Ergebnisse dieses Tierversuches geben jedoch sehr deutliche Hinweise darauf, dass die Dimerisierung des E^{ms}-Proteins einen Virulenzfaktor von CSFV darstellt.

4.0 Diskussion

4.1 Anforderungen an einen neuartigen CSFV Impfstoff

Das Genus *Pestivirus* innerhalb der Familie *Flaviviridae* beinhaltet verschiedene Viren, die Erreger von wirtschaftlich sehr bedeutsamen Krankheiten bei landwirtschaftlichen Nutztieren darstellen. Zu diesen Viren gehören das Virus der bovinen viralen Diarrhoe (BVDV), das Virus der klassischen Schweinepest (CSFV) und das „Border Disease“ Virus der Schafe (BDV).

In Deutschland sind die klassische Schweinepest und die bovine virale Diarrhoe aufgrund ihrer großen wirtschaftlichen Bedeutung in die Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen aufgenommen, deren Bekämpfung mit staatlichen Mitteln geregelt wird. Die Bekämpfung der klassischen Schweinepest wird im Detail in der Schweinepest Verordnung geregelt, die eine Umsetzung von EG-Rechtsakten in nationales Recht darstellt. Dieser Verordnung ist zu entnehmen, dass in Deutschland ein generelles Impfverbot gegen die klassische Schweinepest besteht. Eine Ausnahme hiervon stellen behördlich angeordnete Notimpfungen im Seuchenfall dar. Im Falle eines Ausbruchs oder auch nur des Verdachts eines Ausbruchs von klassischer Schweinepest sind daher in der Verordnung umfassende Schutzmaßnahmen angeordnet, die unter anderem auch die Tötung ganzer Schweinebestände bereits im Verdachtsfall einschließen. Aber nicht nur in Deutschland, sondern innerhalb der gesamten EU sind Vakzinierungen von Schweinen mit nicht DIVA-Vakzinen außerhalb von Notimpfungsprogrammen verboten. Die nationalen Bekämpfungsprogramme sind in den anderen EU-Staaten ähnlich wie in Deutschland. Diese Politik kann jedoch zu weitreichenden wirtschaftlichen und sozialen Konsequenzen führen, wie sie sich in dem schwerwiegenden Ausbruch von klassischer Schweinepest im Jahr 1997 in den Niederlanden, in Frankreich, in Belgien und in Spanien gezeigt haben [61, 62]. Die Akzeptanz dieser Bekämpfungsstrategien in der Bevölkerung ist nicht gegeben, da aus ethischen, tierschutzrechtlichen und wirtschaftlichen Gründen solche weitreichenden Keulungsaktionen kritisch diskutiert werden. Stünde jedoch ein geeigneter, neuartiger Impfstoff gegen die klassische Schweinepest zur Verfügung, so könnte das generelle Impfverbot in Deutschland und innerhalb der EU eventuell durch ein alternatives flächendeckendes Impfprogramm ersetzt werden und so die Praxis der Keulungen von ganzen Schweinebeständen bereits im Verdachtsfall nicht mehr nötig sein. Des Weiteren ist beschrieben, dass Notimpfungsprogramme mit einer Marker-Vakzine - begleitet von einem korrespondierenden serologischen Testsystem und der Einhaltung genereller Schutzmaßnahmen - eine effektive Strategie sein können, um Epidemien einzudämmen und somit eine konkurrenzfähige Alternative zur Politik des Impfverbotes darstellen [63].

Ein neuartiger Marker-Impfstoff gegen CSFV müsste fünf wesentliche Eigenschaften haben:

- die Apathogenität im geimpften Tier,
- die möglichst schnelle Bereitstellung eines sicheren, belastbaren Schutzes der geimpften Tiere vor Feldvirusinfektionen,
- das Unterbinden der Entstehung von persistent infizierten Tieren,
- die sichere Unterscheidung vakzinierter Tiere von infizierten Tieren (DIVA),
- die Möglichkeit der oralen Applikation für die Vakzination von Wildschweinen (also ist eine attenuierte Lebendvakzine im Gegensatz zu einer Totvakzine zu bevorzugen).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, eine geeignete Virusmutante zu identifizieren, die diese Kriterien erfüllen kann und demnach einen erfolversprechenden Kandidaten für eine neuartige CSFV-DIVA-Lebendvakzine darstellt.

4.2 Der Sonderfall der persistenten Infektion

Eine zentrale Anforderung an einen neuartigen Impfstoff gegen CSFV ist die Verhinderung von persistenten Infektionen der Feten in trächtigen Tieren, da nur auf diese Weise die Ausbreitung des Virus in einer Tierpopulation effizient eingedämmt werden kann. Für die Entwicklung eines solchen Impfstoffes ist es zum einen wichtig, Kenntnisse über die molekularen Mechanismen zu erlangen, die bei der Entstehung von persistenten Infektionen eine Rolle spielen, zum anderen sind belastbare Daten zu generieren, die das kritische Zeitfenster für die Entstehung einer persistenten Infektion eingrenzen.

Für das Virus der bovinen viralen Diarrhoe (BVDV) wurden in den vergangenen Jahren bereits viele Daten erhoben, die im Zusammenhang mit der Entstehung von persistenten Infektionen stehen. So lässt sich zum Beispiel für BVDV der Trächtigkeitzeitpunkt, zu dem eine erfolgreiche persistente Infektion der Feten wahrscheinlich ist, sicher auf den 40. – 120. Tag der Trächtigkeit eingrenzen [64]. Für die klassische Schweinepest gibt es dazu leider bisher nur sehr wenige Angaben. In einem von Meyer et al. durchgeführten Infektionsversuch aus dem Jahr 1980, in dem Sauen in verschiedenen Stadien der Trächtigkeit mit CSFV infiziert wurden, konnten verschiedene Beobachtungen gemacht werden. Die Feten wurden entweder abortiert, kamen persistent infiziert zur Welt oder aber wurden nicht infiziert geboren [65]. In diesem Versuch resultierte eine sehr frühe Infektion der Sauen (vor Tag 41 der Trächtigkeit) in Aborten oder Resorption der Früchte, während eine Infektion zwischen Tag 41 und 85 die Entstehung persistent infizierter Ferkel zur Folge hatte. Bei einer Infektion nach Tag 85 wurden nicht virämische Ferkel geboren, da das sich entwickelnde Immunsystem der Feten anscheinend das Virus erfolgreich bekämpfen konnte.

Diese Daten wurden mit einem niedrig virulenten CSFV-Stamm generiert. Ob die Ergebnisse auch auf Infektionen mit moderat virulenten oder hoch virulenten CSFV-Stämmen übertragbar sind, ist bislang noch nicht ausreichend untersucht. Die Daten, die im Rahmen der Sicherheitsstudie mit tragenden Sauen (TV#30) von uns generiert werden konnten (s. auch 4.4), unterstützen jedoch die von Meyer et al. formulierten Beobachtungen bezüglich des kritischen Zeitfensters für die Entstehung von persistenten Infektionen.

Für BVDV ist bekannt, dass der Biotyp des Virus ausschlaggebend dafür ist, ob eine persistente Infektion möglich ist oder nicht. Es gibt zwei verschiedene Biotypen von BVDV, die sich in ihrem Verhalten in Zellkultur unterscheiden. Eine Infektion mit einem cytopathogenen (cp) BVDV führt zum Zelltod, während nichtzytopathogene Viren (ncp) in der Zelle replizieren ohne die Zelle zu schädigen [2, 66]. Eine persistente BVDV-Infektion kann nur durch einen ncp-Stamm hervorgerufen werden [14].

Im Gegensatz zu BVDV wurden für CSFV bisher nur sehr wenige cp Feldstämme isoliert [67-70] und die bekannten cp CSFV Feldisolate stellen Kombinate aus defekten Deletionsmutanten und Helferviren dar. Dabei komplettiert das Helfervirus den Defekt der Deletionsmutante, während letztere für den cp Phänotyp sorgt. Diesen defekten Viren fehlen die genomischen Regionen, die für die Strukturproteine und für N^{pro}, p7 und NS2 codieren [71-74]. Experimentelle Infektionen von Schweinen mit solchen cp Subgenomen und ncp Helferviren haben zu konträren Ergebnissen geführt. Die Virulenz solcher Helfervirus abhängiger cp Subgenome im Vergleich zu dem ncp Helfervirus allein wurde entweder als leicht erhöht [73] oder als attenuiert [72] beschrieben. Gallei et al. gelang es, eine cp CSFV-Mutante zu generieren, die unabhängig von einem Helfervirus ist. Diese Mutante zeigte sich im natürlichen Wirt attenuiert [75]. Ob sich jedoch cp und ncp CSFV-Stämme analog zu ebensolchen BVDV-Stämmen in ihrer Fähigkeit unterscheiden, persistente Infektionen in trächtigen Tieren zu etablieren, ist bisher noch nicht untersucht. Es scheint jedoch der Fall zu sein, dass cp CSFV-Stämme im Feld von untergeordneter Bedeutung sind. In dieser Arbeit wurde als Grundgerüst für einen zukünftigen Impfstoff mit dem ncp CSFV-Stamm Alfort/Tübingen bzw. mit Chimären aus Alfort/Tübingen und dem ebenfalls ncp CSFV-Stamm ATCC gearbeitet.

4.3 Die Inhibierung des angeborenen Immunsystems durch N^{pro} und E^{ns}

Für die Entwicklung eines Lebendimpfstoffes ist es essentiell, eine ausreichende Attenuierung des Impfvirus zu erreichen, damit das Virus für die Impflinge unschädlich und sicher ist. Eine Möglichkeit hierfür ist die Generierung von Mutanten, die in ihrer Replikation beeinträchtigt sind. Bei diesem Konzept muss jedoch beachtet werden, dass ein hoher

Selektionsdruck auf die Viren wirkt und die Gefahr der Reversion zum virulenten Ausgangsvirus nicht ausgeschlossen werden kann. Als Alternative hierzu besteht die Möglichkeit, in den Virusmutanten gezielt Mechanismen auszuschalten, die mit dem Immunsystem des Wirtes interferieren. In Kulturzellen können solche Viren i.d.R. zu normalen Titern vermehrt werden, haben also keine Wachstumsnachteile. Im natürlichen Wirt kann den Viren ein Wachstumsnachteil entstehen, den sie aber in der kurzen Phase effizienter Virusvermehrung bei entsprechender Gestaltung der Veränderung nicht reparieren können. Ihre Angreifbarkeit für Komponenten des angeborenen Immunsystems kann auf diese Art erhöht werden. Ein zentraler Mechanismus des angeborenen Immunsystems, der in einem sehr frühen Stadium von Infektionen zum Einsatz kommt, ist das Interferonsystem. Im Falle der Pestiviren bieten sich zwei Proteine als Angriffspunkte für eine Attenuierungsstrategie an, die auf die Verhinderung der Interferenz der Viren mit Komponenten des angeborenen Immunsystems abzielt. Das Nichtstrukturprotein N^{pro} und das Glykoprotein E^{ms} sind essentielle Mediatoren bei der Blockierung des angeborenen Immunsystems durch Pestiviren. Einige Faktoren des angeborenen Immunsystems, mit denen diese beiden Proteine interagieren, konnten bereits identifiziert werden. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass N^{pro} in der Lage ist, die durch virale RNA induzierte Apoptose der infizierten Zelle zu inhibieren und durch Aktivierung des proteasomalen Abbaus von IRF-3 die Transkription des INF- β Gens zu verhindern [23-25, 76-82]. Durch die fehlende Aktivierung dieses Gens wird in Folge die Interferon-Expression und damit die Etablierung eines antiviralen Status der infizierten Zelle und ihrer umgebenden Zellen unterdrückt. Es wurde beschrieben, dass das in N^{pro} gefundene Zink bindende Motif für den Abbau von IRF-3 notwendig ist [26]. Das gleiche Zink bindende Motif ist auch essentiell für die Interaktion von N^{pro} mit IRF-7. Zudem konnte gezeigt werden, dass in CSFV infizierten plasmatoiden dendritischen Zellen diese Interaktion zu einer Reduktion der Interferon-I Expression vermittelt durch geringere IRF-7 Level führt [27]. CSFV N^{pro}-Deletionsmutanten sind *in vivo* attenuiert [22], aber interessanterweise können CSFV-Mutanten, denen die Fähigkeit des N^{pro}, den Abbau von IRF-3 zu induzieren, fehlt, je nach Virulenz des parentalen Stammes *in vivo* dennoch virulent sein [30]. Diese Beobachtung ist ein Hinweis darauf, dass N^{pro} noch mit weiteren Faktoren außer IRF-3 und IRF-7 wechselwirken kann. Eine Interaktion von N^{pro} mit I- κ B α [28] und HAX-1 [29] wurde bereits beschrieben. Diese beiden Faktoren sind involviert in der Aktivierung von NF- κ B und in der Inhibierung der Apoptose. Trotz seiner wichtigen Rolle bei der Inhibierung des angeborenen Immunsystems stellt das N^{pro}-Protein keinen essentiellen Faktor für die Pestivirusreplikation dar. In der vorliegenden Arbeit wurden erfolgreich CSFV-Mutanten generiert, in denen das N^{pro}-Protein deletiert wurde und es gelang ferner, die Deletion von N^{pro} mit weiteren attenuierenden Mutationen zu kombinieren (s. 4.4).

Im Gegensatz zu N^{pro} ist das Glykoprotein E^{ms} unentbehrlich für die Bildung infektiöser Viruspartikel. E^{ms} besitzt keinen klassischen Membrananker und wird zum Teil von infizierten Zellen in den Extrazellularraum sekretiert [12, 32, 35, 39, 83-85]. Die intrinsische RNase-Aktivität von E^{ms} ist für ein Glykoprotein eines RNA-Virus eine sehr ungewöhnliche Eigenschaft und macht dieses Protein besonders interessant [34]. Obwohl die RNase-Aktivität des E^{ms}-Proteins für das Virus verzichtbar ist, führt ihre Ausschaltung durch gezielte Mutagenese zur Attenuierung des Virus *in vivo* [36, 86]. In der Literatur finden sich Hinweise darauf, dass sezerniertes E^{ms} möglicherweise an der Blockierung einer Interferonantwort beteiligt sein könnte, die normalerweise auf eine Detektion von extrazellulärer dsRNA folgt. Die Funktionalität der E^{ms}-RNase scheint hierbei für diesen Prozeß essentiell zu sein [38, 39, 85]. N^{pro} blockiert wie oben beschrieben sehr effizient die Interferonantwort in der infizierten Zelle. Eine Hypothese zur Aufgabe von E^{ms} ist daher, dass die sekretierte Form von E^{ms} mit ihrer RNase-Funktion in der Lage ist, extrazelluläre RNA außerhalb der Zelle abzubauen, so dass sie nicht mehr für die Erkennung durch Komponenten des abgebohrten Immunsystems zur Verfügung steht [87]. Dieser Theorie zufolge übernehme die sekretierte Form von E^{ms} die biologische Funktion der Blockierung einer Immunantwort auf einen Trigger außerhalb der Zelle, die innerhalb der Zelle von N^{pro} ausgeübt wird. Es muss allerdings angemerkt werden, dass es keine Hinweise auf die Anwesenheit von extrazellulärer RNA gibt, wenn es sich um ncp Pestiviren handelt. Eine andere Hypothese beruht auf der Eigenschaft der E^{ms}-RNase, bevorzugt ssRNA am 5'-Ende von Uridin-Resten zu schneiden [33, 88]. Denn genau mit diesem bevorzugten Substrat der E^{ms}-RNase (der GU-reichen RNA) interagiert auch der Toll-like Rezeptor 7. Dieser TLR ist jedoch in Endosomen innerhalb der Zelle zu finden. Es erscheint aufgrund dieser Beobachtung also auch denkbar, dass nach Internalisierung der E^{ms}-RNase innerhalb der Endosomen verhindert wird, dass pestivirale RNA-Fragmente für die Erkennung durch TLR-7 dort zur Verfügung stehen. Demzufolge wäre der Wirkungsort der E^{ms}-RNase innerhalb zellulärer Kompartimente lokalisiert und nicht etwa im extrazellulären Raum. Obwohl es also unterschiedliche Hypothesen zur biologischen Funktion der E^{ms}-RNase gibt, konnte bislang keine davon zweifelsfrei bewiesen werden. Wahrscheinlich ist jedoch, dass E^{ms} auf unterschiedliche Weise daran beteiligt ist, die Erkennung von pathogenassoziierten molekularen Mustern (PAMPs) zu reduzieren. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche Attenuierungskonzepte untersucht, die das E^{ms}-Protein als Angriffspunkt haben. Zum einen wurden Mutanten generiert und charakterisiert, in denen die RNase-Funktion von E^{ms} ausgeschaltet wurde. Es war ferner möglich, die Ausschaltung der RNase erfolgreich mit der Deletion des N^{pro}-Proteins zu kombinieren (s. 4.4). Zum anderen wurden Mutanten im natürlichen Wirt untersucht, bei denen die Fähigkeit zur Homodimerisierung des E^{ms}-Proteins ausgeschaltet war (s. 4.5).

4.4 BVDV und CSFV Doppeldeletionsmutanten als Vakzine-Kandidaten

Die Ergebnisse, die im Rahmen der BVDV-Impfstoffentwicklung in unserer Arbeitsgruppe mit Doppeldeletionsmutanten, in denen die N^{pro}-kodierende Region deletiert und die RNase-Funktion des E^{ms}-Proteins ausgeschaltet sind, erhalten wurden zeigten, dass durch diese Kombination eine deutliche Attenuierung der Viren erreicht und eine Übertragung des Virus auf die Feten in trächtigen Tieren verhindert wird [59, 60]. Daher war es naheliegend, eine ähnlich aufgebaute CSFV Doppeldeletionsmutante als Grundlage für einen Impfstoff gegen die klassische Schweinepest zu testen.

Trotz der nahen Verwandtschaft von BVDV und CSFV weisen diese beiden Systeme signifikante Unterschiede auf. Es handelt sich trotz aller Gemeinsamkeiten um zwei verschiedene Viren mit anderer Wirtsspezifität und mit Anpassungen an den jeweiligen Wirt, die vermutlich nur bedingt vergleichbar sind. Ein Beispiel dafür sind die oben erläuterten Unterschiede der Biotypen und ihre Rolle bei der Persistenzentwicklung. Hinzu kommt für die vertikale Infektion die Tatsache, dass sich die Plazenten von Rindern und Schweinen voneinander unterscheiden. Die verschiedenen Plazentatypen lassen sich zum einen nach der Anordnung der Oberflächenvergrößerungen des Chorions einteilen. Den Plazentatyp des Schweines bezeichnet man als *Semiplacenta diffusa incompleta*. Bei diesem Plazentatyp sind die Zotten bzw. Falten über nahezu das gesamte Chorion verteilt. Das Rind bildet im Gegensatz dazu eine *Semiplacenta multiplex bzw. cotyledonaria* aus, bei der sich Zottenfelder (Kotyledonen) herausbilden, die sich mit den Uteruskarunkeln zu Plazentomen vereinigen. Die übrigen Chorionanteile sind zottenfrei. Eine andere mögliche Einteilung von Plazenten richtet sich nach dem Grad der Trennung zwischen maternalem und fetalem Blutkreislauf. In diesem Punkt stimmen die beiden Plazentatypen von Schwein und Rind überein. Beide Tierarten bilden eine *Placenta epitheliochorealis* aus [89]. Dieser Plazentatyp weist von allen Plazentatypen der Haussäugetiere die größtmögliche Trennung zwischen fetalem und maternalem Blutkreislauf aus. Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Tierarten ist die Tatsache, dass Rinder monopar und Schweine pluripar sind.

Um zu überprüfen, ob die CSFV Doppelmutante analog zu BVDV Doppelmutanten nicht in der Lage ist, die Plazentaschranke zu überwinden oder länger andauernde Infektionen in den Feten hervorzurufen, wurde ein Tierexperiment mit sechs tragenden Sauen durchgeführt (s. 3.1.2). Drei Sauen wurden mit der CSFV Doppelmutante zwischen Tag 52 und 56 der Trächtigkeit vakziniert, die übrigen drei Sauen mit dem RNase negativen Virus TF#283/1 als Positivkontrolle zwischen Tag 33 und Tag 72 der Trächtigkeit. Keine der tragenden Sauen in diesem Tierexperiment zeigte klinische Symptome einer CSFV Infektion oder Abweichungen von der physiologischen Körpertemperatur, weder nach intramuskulärer Vakzination mit dem RNase negativen Virus TF#283/1 noch mit der Doppelmutante EP#6/12. In der Rücktitration

zeigte sich, dass niedrigere Titer als gewünscht in den Impfdosen verabreicht worden waren. Anstelle von der gewünschten Dosis von 2×10^5 KID₅₀/ml wurden den Tieren in Gruppe 1 (Doppelmutante) nur Dosen von jeweils $10^{3,35}$ KID₅₀/ml und den Tieren in Gruppe 2 (RNase negative Mutante) nur Dosen von jeweils $10^{3,74}$ KID₅₀/ml verabreicht. Trotz dieser geringeren Dosierung konnte der Impferfolg bei allen Tieren in beiden Gruppen durch den Nachweis von CSFV spezifischen neutralisierenden Antikörpern nachgewiesen werden. Bei den Tieren in Gruppe 2 konnte zudem eine transplazentare Infektion des RNase negativen Virus detektiert werden. Über Wachstumskurven konnte gezeigt werden, dass die Doppelmutante im Vergleich zum Wildtypvirus und auch im Vergleich zur RNase negativen Mutante einen deutlichen Wachstumsnachteil (1-2 log Stufen) hat. Daher ist leider nicht auszuschließen, dass die verabreichte Dosis von $10^{3,35}$ KID₅₀/ml für eine transplazentare Infektion in diesem Tierexperiment zu gering war. Dagegen spricht jedoch zum einen, dass die verabreichte Dosis ausreichend für eine erfolgreiche Infektion der Muttertiere war, wie über den Antikörpernachweis gezeigt werden konnte. Zum anderen sprechen auch die bereits generierten Daten aus dem BVDV-System gegen diese Vermutung [59, 60].

In diesem Tierexperiment war die getestete CSFV Doppelmutante EP#6/12 nicht in der Lage, die Plazentaschranke zu überwinden oder bei Überwinden der Plazentaschranke eine länger bestehende Infektion in den Feten zu etablieren. Dennoch muss diese Doppelmutante noch in umfangreicheren Studien mit höheren Tierzahlen weiter untersucht werden, um ein statistisch belastbares Ergebnis zu erhalten. In dem bisher durchgeführten Tierexperiment erschwerten die unterschiedlichen Trächtigkeitsstadien der Tiere in den beiden Gruppen zum Zeitpunkt der Vakzination die Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Die Tiere in der Kontrollgruppe (TF#283/1=RNase neg.) wurden zu anderen Zeitpunkten infiziert als die Tiere in der Testgruppe für die Doppelmutante. Dies war darin begründet, dass es leider nicht möglich war, Sauen in vergleichbaren Stadien der Trächtigkeit zu erwerben. Da für CSFV bisher nur wenig untersucht ist, in welchem Trächtigkeitsstadium die Generierung von PI-Tieren am wahrscheinlichsten ist [65, 90, 91], wurde aufgrund der vorhandenen Daten der Zeitpunkt für die Vakzination um den Tag 50 der Trächtigkeit gewählt. Die Tiere, die in ihren Trächtigkeitsstadien diesem Zeitpunkt am nächsten waren (zwischen Tag 52 und 56), wurden in die Testgruppe für die Doppelmutante eingruppiert, während die RNase negative Kontrollgruppe aus Tieren in heterogenen Trächtigkeitsstadien bestand (Tag 33, Tag 67, Tag 72 bei Vakzination). Innerhalb der Kontrollgruppe waren von den Feten der Sau 1478, die bereits an Tag 33 ihrer Trächtigkeit vakziniert wurde, 7 von 11 Feten mumifiziert und 2 von 10 waren autolytisch. Nur 2 von 11 Feten dieser Sau waren optisch normal und in einem von beiden konnte Virus nachgewiesen werden. Von den insgesamt 23 Feten der beiden anderen Sauen (1470 und 1471; vakziniert an Tag 67 und 72 ihrer Trächtigkeit) in der Kontrollgruppe waren nur 2 autolytisch, die restlichen erschienen äußerlich normal. In 16 dieser 23 Feten konnte das RNase negative Virus (TF#283/1) nachgewiesen werden.

Zusammengefasst unterstützen diese Befunde die Daten aus der Literatur, wonach bei einer CSFV Infektion zwischen Tag 41 und 85 der Trächtigkeit verstärkt mit dem Auftreten von persistent infizierten Feten zu rechnen ist, während bei einer Infektion vor Tag 41 verstärkt Feten resorbiert oder mumifiziert werden [65, 90, 91]. Diese Befunde lassen außerdem die Schlussfolgerung zu, dass der von uns gewählte Vakzinationszeitpunkt um Tag 50 der Trächtigkeit für die Tiere in der Doppelmutante-Testgruppe höchstwahrscheinlich innerhalb des Zeitfensters für die Entstehung von persistent infizierten Ferkeln lag. Dennoch sollte aus Sicherheitsgründen in einem nächsten Tierexperiment mit mehreren Tiergruppen mit unterschiedlichen Infektionszeitpunkten für jedes zu testende Virus gearbeitet werden. Auch vor dem Hintergrund, dass die Daten von Meyer et al.[65] aus dem Jahr 1980 mit einem niedrig virulenten CSFV-Stamm generiert wurden, während unsere CSFV Doppelmutante auf den moderat virulenten Stämmen ATCC und Alfort/Tübingen beruht. Es ist trotz aller bisher beobachteten Übereinstimmungen nicht auszuschließen, dass es stammspezifische Unterschiede zwischen verschiedenen CSF Viren im Hinblick auf die Erzeugung persistenter Infektionen gibt, die auch das kritische Zeitfenster betreffen könnten.

In einer folgenden Studie sollten deshalb mehrere Tiere an Tag 30, 40, 50, 60, 70 und 80 der Trächtigkeit mit den gleichen Viren vakziniert werden, um den optimalen Zeitpunkt für eine vertikale Infektion zu ermitteln und die Vergleichbarkeit zwischen den Gruppen zu den einzelnen Zeitpunkten zu gewährleisten.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Ergebnisse aus dem Tierexperiment #30 Hinweise darauf geben, dass die CSFV Doppelmutante analog zur BVDV Doppelmutante nicht durch vertikale Infektion auf die Feten in trächtigen Tieren übertragen werden kann und im adulten Tier bei intramuskulärer Applikation apathogen ist. Diese Beobachtung muss jedoch noch in weiteren Studien bekräftigt werden.

4.5 Die Dimerisierung des E^{rns}-Proteins als Virulenzfaktor von CSFV

In den Studien zu BVDV und CSFV Doppeldelentionsmutanten konnte gezeigt werden, dass die Kombination von N^{pro}-Deletion und Ausschaltung der E^{rns}-RNase-Aktivität zu Virusmutanten führt, die nicht mehr in der Lage sind, eine persistente diaplazentare Infektion der Feten in trächtigen Tieren zu etablieren. In diesen Doppeldelentionsmutanten ist die virusinduzierte Blockierung des angeborenen Immunsystems aufgehoben. Die Ergebnisse dieser Studien zeigen, dass verschiedene virale Funktionen an der Ausbildung der Virulenz in den infizierten Tieren und an der Entstehung von persistenten Infektionen beteiligt sind. Die Rolle der E^{rns}-RNase wurde in Kapitel 4.3 bereits diskutiert. E^{rns} besitzt zudem die Fähigkeit, Homodimere auszubilden. Die E^{rns}-Proteine von unterschiedlichen Virusstämmen

enthalten in der Regel 9 konservierte Cysteine. Die ersten 8 dieser Cysteine bilden intramolekulare Disulfidbrücken, die die 3D-Struktur des Proteins stabilisieren. Über das neunte Cystein an Position 171 des E^{ms}-Proteins können E^{ms}-Homodimere ausgebildet werden [13, 16, 92]. Es war bereits bekannt, dass die E^{ms} Dimerisierung nicht essentiell für die Replikation ist und es gab Hinweise, dass Viren ohne Dimerisierung attenuiert sind (s.u.). In der vorliegenden Arbeit galt es über Versuche mit CSFV-Mutanten, in denen die Fähigkeit des E^{ms}-Proteins zur Homodimerisierung ausgeschaltet war, zu untersuchen, ob sich die Dimerisierung von E^{ms} grundsätzlich als alternativer Angriffspunkt zur E^{ms} RNase für das Attenuierungsprinzip eines zukünftigen Impfstoffes eignet.

Für CSFV- und BVDV-Mutanten konnte bereits publiziert werden, dass die Viren trotz Aufhebung der Dimerisierung lebensfähig sind und ihnen keine signifikanten Wachstumsnachteile in der Zellkultur entstehen [31, 93, 94]. Es lag daher nahe zu untersuchen, wie sich dimerisierungsnegative CSFV-Mutanten im natürlichen Wirt verhalten würden. Da diese Mutanten in der Zellkultur keine signifikanten Nachteile gezeigt hatten, war zu vermuten, dass die E^{ms}-Dimerisierung vielleicht Effekte *in vivo* besitzt, die sich *in vitro* nicht zeigen. Im Rahmen ihrer Doktorarbeit hat Eva-Maria Schürmann in der Arbeitsgruppe von Prof. Meyers verschiedene Tierstudien mit dimerisierungsnegativen CSFV-Mutanten durchgeführt [60]. In diesen Tierexperimenten konnten einige interessante Beobachtungen gemacht werden. Es zeigte sich, dass die Mutanten, in denen die Dimerisierung von E^{ms} durch Deletion von Codon 171 unterbunden worden war, in allen Versuchen einen deutlich attenuierten Phänotyp in zeigten. Für die Mutanten, in denen die Dimerisierung durch Punktmutationen unterbunden war, zeigte sich hingegen ein heterogenes Bild. Die Variante EP#82(1) mit einer Punktmutation an Position 171, die in einem Austausch des Cystein-Codons durch ein Phenylalanin-Codon resultiert, zeigte im Tierversuch (TV#25) zwar eine schwächere Symptomatik als der Wildtyp, war aber dennoch deutlich pathogener als die Deletionsmutante. Die Variante EP#82(2) mit einer Punktmutation an der gleichen Stelle, die aber einen Austausch des Cysteins durch ein Serin zu Folge hat, zeigte im Tierversuch (TV#27) keine typischen Symptome einer CSFV-Infektion [60]. Bei den Viren, die in diesen Versuchen aus dem Blut der Versuchstiere reisoliert werden konnten, zeigte sich zum einen, dass die durch Punktmutationen eingefügten Veränderungen zum Teil revertiert waren. Interessanterweise konnte jedoch zum anderen in einigen dieser Viren anstelle der Reversion an Position 171 eine „Second-Site“ Mutation an Position 209 des E^{ms}-Proteins beobachtet werden [60]. Diese „Second-Site“ Mutation hatte den Austausch des Serins an dieser Position gegen ein Cystein zur Folge. In *in vitro* Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass ein solcher Austausch dazu führt, dass die Dimerisierung trotz Mutation oder Deletion an Position 171 wieder stattfindet (Daten von Gregor Meyers, noch nicht veröffentlicht). Es ist daher möglich, dass die Viren dieses neu gewonnene Cystein als Ersatz für das ursprüngliche Cystein an Position 171 für die Bildung von Homodimeren

nutzen und so ihre Virulenz zumindest teilweise wiedererlangen können. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch, dass diese Pseudoreversion auch bei einigen Viren beobachtet werden konnte, die aus dem Blut von Tieren stammten, die mit der Deletionsmutante (C171Δ) infiziert worden waren, die sich in den Tierversuchen als deutlich attenuiert dargestellt hatte [60]. Es stellte sich daher die Frage, ob die Reversionen an Position 171, die Pseudoreversionen an Position 209, eine Kombination beider Austauschere oder aber noch weitere bisher unbekannte Mechanismen an der Restaurierung der Pathogenität der ursprünglich dimerisierungsnegativen Punktmutationsvariante beteiligt waren. Um diesen Punkt weiter zu untersuchen, wurde ein Tierexperiment durchgeführt, in dem die Pathogenität einer Deletions-Pseudorevertante (Virus 849: C171Δ/S209C) und einer Punktmutations-Pseudorevertante (Virus 1990 C III: C171S/S209C) im Vergleich zu einem CSFV-Wildtypvirus (1347 RTF III: Alfort/Tübingen) in drei Tiergruppen untersucht wurde.

Bei allen Tieren in diesem Experiment konnte über die Leukozytenzählung, die Körpertemperaturmessung und die Virusisolierung aus Leukozytenkonzentrat nachgewiesen werden, dass die Infektion erfolgreich war. Zusätzlich konnten bei allen Tieren, die das geplante Ende des Tierexperimentes erlebten, signifikante Titer CSFV neutralisierender Antikörper nachgewiesen werden. Eine Kontamination mit Wildtypvirus konnte in den beiden Testgruppen (Gruppe 1: Virus 849 / Gruppe 2: Virus 1990 C III) mit Hilfe der Sequenzierung ausgeschlossen werden. Die Tiere in der Wildtypkontrollgruppe (Gruppe 3) wurden alle nach der Infektion schwer krank, so dass sie an Tag 9 dpi vorzeitig getötet werden mussten.

Nach der Infektion zeigten die Tiere in Gruppe 1 (Deletions-Pseudorevertante 849: C171Δ/S209C) nur sehr leichte Krankheitssymptome über 1-2 Tage. Die hier getestete Deletions-Pseudorevertante 849 (C171Δ / S209C) zeigte somit eine ähnliche Attenuierung wie ihre parentale dimerisierungsnegative Mutante EP#82 (4) (C171Δ) in einem vorangegangenen Versuch (TV#26; [60]). In vorangegangenen *in vitro* Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass die pseudorevertanten Konstrukte über das an Position 209 bereitgestellte Cystein wieder in der Lage sind, Homodimere zu bilden (Daten von Gregor Meyers, noch nicht veröffentlicht). Trotzdem war es dem hier getesteten Virus offenbar nicht möglich, seine Pathogenität durch diese Pseudoreversion alleine vollständig zu regenerieren.

Die Tiere der Gruppe 2 (Punktmutations-Pseudorevertante 1990 C III: C171S/S209C) zeigten ab Tag 5 – 8 dpi für ca. zehn Tage sehr deutliche klinische Anzeichen einer Schweinepest-Erkrankung, die jedoch in ihrem Schweregrad hinter dem der Wildtypgruppe zurück blieb. Dennoch zeigte sich diese Punktmutations-Pseudorevertante 1990 C III (C171S / S209C) im Vergleich zu ihrer parentalen dimerisierungsnegativen Mutante EP#82 (2) (C171S) deutlich virulenter.

Es ergibt sich also aus den Ergebnissen dieses Tierversuches erneut ein heterogenes Bild: die Punktmutations-Pseudorevertante (1990 C III: C171S / S209C) zeigte sich deutlich

pathogen, die Deletions-Pseudorevertante (849: C171 Δ / S209C) jedoch nicht. Offenbar reichte also die Pseudoreversion an Position 209 (S209C) alleine nicht aus, um beim Virus 849 die Pathogenität wiederherzustellen obwohl das E^{ms}-Protein dieser Virusmutante Dimere bildet. Die Deletion an Position 171 scheint vielmehr trotzdem auch in den Pseudorevertanten einen attenuierenden Effekt zu haben. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte die Tatsache sein, dass die Position 209 deutlich weiter stromabwärts lokalisiert ist als die Position 171 und bereits im Membrananker des Proteins liegt. Es ist möglich, dass über diese Position dimerisiertes Protein weniger funktionsfähig ist als über Position 171 dimerisiertes. Der Austausch des Serins mit einem Cystein an Position 209 ermöglicht zwar die Bildung von E^{ms}-Homodimeren, könnte aber die Virulenz der Viren dennoch über eine Störung der Funktion des Membranankers beeinträchtigen. Eine andere mögliche Erklärung für die fehlende bzw. verminderte Virulenz der Pseudorevertanten bei intakter Dimerisierung über Position 209 könnte in der Funktionalität der Position 171 selbst begründet sein. Wir konnten beobachten, dass die Deletion von Codon 171 einen größeren Störeffekt hat als eine Substitution von Cystein 171 mit Phenylalanin, dass aber die Phenylalanin-Substitution wiederum mehr stört als eine Substitution mit Serin an der gleichen Stelle. Wenn an Position 171 eine Deletion oder andere Aminosäure vorhanden ist als Cystein oder Serin, wird das System offenbar instabil. Dies kann zum einen darin begründet sein, dass durch die Eingriffe an Position 171 das E^{ms}-Protein in seiner Struktur beeinträchtigt wird. Zum anderen ist es jedoch auch möglich, dass die Austausche weitere bisher unbekannte Funktionen der Position 171 beeinträchtigen. Biochemisch gesehen ist ein Austausch von Phenylalanin zu Cystein bzw. eine Deletion an Position 171 nämlich ein weitaus größerer Eingriff in die Integrität des Proteins als ein Austausch von Cystein zu Serin.

Um die Pathogenität der parentalen dimerisierungsnegativen Mutanten und der korrespondierenden Pseudorevertanten akkurat vergleichen zu können, sollten sie in einem zukünftigen Tierexperiment parallel zueinander getestet werden. Ein möglicher Ansatz wäre z.B., die dimerisierungsnegative apathogene Punktmutationsmutante C171S im Vergleich zu der in TV#29 als nicht attenuiert beobachteten Pseudorevertante C171S/S209C und einem Wildtypvirus zu untersuchen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass weiterhin unklar ist, ob durch die Pseudoreversion an Pos. 209 auch die bisher unbekannt biologischen Funktionen der Pos. 171 wieder hergestellt werden oder aber ausschließlich die Fähigkeit zur Dimerisierung. Das Auftreten von Pseudoreversionen zeigt jedoch eindeutig, dass die Dimerisierung von E^{ms} für die Viren wichtig ist. Dass die Dimerisierung kausal mit weiteren biologischen Funktionen des Proteins verknüpft ist, erscheint aufgrund der bisherigen Ergebnisse sehr wahrscheinlich. Am Beispiel der „Bovinen Seminalen“-Ribonuklease (BS-RNase) konnte gezeigt werden, dass die Dimerisierung einen Einfluss auf die Funktion biologisch aktiver

RNasen hat. Nur die Dimere weisen eine biologische Aktivität auf, obwohl die Monomere immer noch aktive RNasen darstellen [95]. Es ist möglich, dass die Dimerisierung von E^{ms} und seine RNase-Funktion auf ebensolche Weise funktional miteinander verknüpft sind. Es gibt aber bisher kein Modell, das erklären könnte, warum Viren mit dimerisierungsnegativem E^{ms} nicht mehr virulent sind. Die Bedeutung der E^{ms} Dimerisierung für die Virulenz von Pestiviren bleibt demnach nach wie vor ein sehr spannender Punkt, der in weiteren Arbeiten untersucht werden sollte. Dabei ist besonders die Rolle des zugrunde liegenden molekularen Mechanismus sehr interessant. Ob attenuierte dimerisierungsnegative CSFV-Mutanten auf einer praktischen Ebene Potential für die Impfstoffentwicklung haben, lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht absehen. Es ist jedoch aus Sicherheitsgründen fraglich, ob sich für einen zukünftigen Impfstoff ein Angriffspunkt für eine Attenuierung eignet, der offenbar einem deutlichen Selektionsdruck unterworfen ist.

4.6 Konventionelle CSFV Lebendvakzine

Es gibt eine Reihe von Vakzinen gegen die klassische Schweinepest, die auf dem *Chinese* oder *C-Stamm* beruhen. Ein Beispiel hierfür ist die *RIEMSER Schweinepestvakzine*®, die als Injektionslösung für Hausschweine und als Fraßködern für Wildschweine erhältlich ist.

C-Stamm-Vakzinen gelten schon lange Zeit als im Allgemeinen sehr sicher und effizient im Hinblick auf ihre protektiven Eigenschaften [96] und sind unter den Nicht-DIVA-Vakzinen als „Goldstandard“ bei der Bekämpfung der klassischen Schweinepest anzusehen. Sie induzieren keine klinischen Symptome in Ferkeln oder trächtigen Sauen, selbst wenn die Ferkel vor der Impfung mit Kortikosteroiden immunsupprimiert wurden [96]. Im Rahmen einer neueren Studie konnte gezeigt werden, dass die *RIEMSER Schweinepestvakzine*® fünf Tage nach Vakzination einen vollständigen Schutz gegenüber der Belastungsinfektion mit zwei verschiedenen Genotypen von Challengeviren bietet. Sogar nach nur einem bzw. drei Tagen nach Vakzination war in dieser Studie bereits ein partieller Schutz zu beobachten [97]. Dieser schnell einsetzende Schutz ist besonders bei Notimpfungen wichtig. In älteren Studien zeigte sich, dass Vakzination mit dem *C-Stamm* nicht nur zu nahezu 100%igem Schutz vor Krankheit führte, sondern auch, dass in vakzinierten Tieren keine Virämie nachgewiesen wurde und dass diese Tiere auch kein Challengevirus ausschieden [96].

Trotz ihrer hohen Sicherheit und ihrer sehr guten protektiven Eigenschaften hat die *C-Stamm*-Vakzine auch Defizite. Ein großer Nachteil dieser Vakzine ist, dass sie keine Markereigenschaften besitzt und daher keine serologische Unterscheidung vakzinierter von infizierten Tieren nach der Impfung möglich ist. Somit ist sie zumindest für den europäischen Markt nicht verwendbar. Ein weiterer Nachteil dieser Vakzine ist, dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass das Virus von der Sau auf den Fetus übertragen wird. Es liegen keine

publizierten Daten dazu vor, dass die Übertragung von C-Stamm-Virus auf den Fetus zur Etablierung von persistenten Infektionen führt [98, 99]. Dagegen ist die Vermutung berechtigt, dass die Impfung mit dem *C-Stamm* kongenitale Infektionen verhindern kann. Der *C-Stamm* ist offenbar in der Lage, die Replikation von Challengeviren in geimpften Tieren nahezu komplett zu unterdrücken und hat sich in der Vergangenheit im Feld als sehr effizient erwiesen [96]. Ein Defizit des *C-Stammes* ist weiterhin, dass bislang nicht bekannt ist, welche Mechanismen für seine Attenuierung verantwortlich sind. Auch sein Ursprung lässt sich nicht genau benennen. Bekannt ist jedoch, dass der ursprüngliche *C-Stamm* mehrere hundert Male in Kaninchen passagiert wurde [96]. Der *C-Stamm* besitzt im Vergleich zu einem virulenten Stamm [100, 101] und seinem Ursprungsstamm [102] eine U-reiche Insertion von 13 aufeinanderfolgenden Nukleotiden in der 3'-Region. Ob diese Insertion jedoch an der Attenuierung beteiligt ist, ist unbekannt [96].

Vergleicht man die CSFV Doppelmutante aufgrund der Basis von Daten, die wir bisher generieren konnten, mit den *C-Stamm*-Vakzinen, so lassen sich folgende Beobachtungen festhalten. Die Doppelmutante induziert in adulten Tieren keine Krankheit, in Ferkeln muss sie im Hinblick auf Sicherheit und Protektivität jedoch noch weiter untersucht werden. In trächtigen Tieren konnten wir die Beobachtung machen, dass die Doppelmutante die Plazentaschranke nicht überwand bzw. keine länger andauernden Infektionen in den Feten etablierte. In diesem Punkt scheint diese Vakzine also den *C-Stamm*-Vakzinen überlegen zu sein. Dieser Punkt muss noch im größeren Maßstab in weiteren Studien untersucht werden. Ein weiterer Vorteil der Doppelmutante gegenüber *C-Stamm*-Vakzinen ist, dass die genetischen Grundlagen ihrer Attenuierung bekannt sind (N^{pro}-Deletion und Ausschaltung der E^{ms}-RNase). Die hier getestete Doppelmutante ist jedoch ebenso wie die *C-Stamm*-Vakzine noch keine DIVA-Vakzine. Aber sie könnte aufgrund ihrer vielversprechenden Eigenschaften als Grundgerüst für eine neuartige DIVA-Vakzine dienen.

4.7 CSFV DIVA-Vakzine

4.7.1 Eigenschaften der kommerziell verfügbaren CSFV DIVA-Vakzine

Gegenwärtig sind auf dem europäischen Markt zwei Arten von CSFV Impfstoffen kommerziell verfügbar: attenuierte Lebendvakzine ohne DIVA-Eigenschaften wie die *C-Stamm* Vakzine (z.B. die *RIEMSER Schweinepestvakzine*®) und *E2 Subunit Vakzine* als DIVA-Vakzine. Die Vor- und Nachteile der *C-Stamm* Vakzine wurden im vorangegangenen Kapitel bereits diskutiert. Bei den *E2 Subunit Vakzinen* handelt es sich um Totimpfstoffe, die auf CSFV E2-Protein beruhen, das mittels eines Baculovirussystems exprimiert wird. In der

BAYOVAC® CSF Marker Vakzine wird das E2-Gen des CSFV-Stammes Brescia eingesetzt, in der *Porcilis® Pesti Vakzine* das E2-Gen von CSFV Alfort/Tübingen. Beide Vakzinen werden von einem korrespondierenden E^{ms}-ELISA begleitet: *Chekit Marker®* für die *Porcilis Pesti® Vakzine* und *Ceditest® Marker* für die *BAYOVAC CSFV Marker® Vakzine* [54]. Die *E2 Subunit Vakzinen* wirken durch die Induktion von neutralisierenden Antikörpern gegen das E2-Protein. Werden also Antikörper in einem Tier detektiert, die gegen andere virale Proteine gerichtet sind, so sollten diese durch eine Feldvirusinfektion hervorgerufen sein. Der korrespondierende serologische Test detektiert Antikörper gegen das E^{ms}-Protein. Ein Tier, das in diesem Test ein positives Ergebnis gibt, gilt demnach als „CSFV-infiziert“ und „nicht-geimpft“. In einer großangelegten, von der EU-Kommission finanzierten Studie wurden die beiden *E2 Subunit Vakzinen* und ihre korrespondierenden serologischen Tests sowohl in Ferkeln, als auch in tragenden Sauen getestet [103-105]. In der Ferkelstudie zeigte sich, dass beide Vakzine zwar einen partiellen Schutz vor einer klinischen Erkrankung induzieren konnten, dass jedoch keine der getesteten Vakzine einen vollständigen, belastbaren Schutz vor Infektion oder Virusausscheidung bieten konnte [105]. Die Sauenstudie ergab, dass beide Vakzine zwar die Wahrscheinlichkeit einer transplazentaren Infektion herabsetzen konnten, aber nicht in der Lage waren, eine transplazentare Virusausbreitung vollständig zu verhindern [103]. Auch die diskriminierenden Testsysteme offenbarten in dieser Studie ihre Schwächen. Keiner der beiden E^{ms}-ELISAs konnte zuverlässig *E2 Subunit-vakzinierte* Ferkel nach der Belastungsinfektion mit einem CSFV-Wildtypstamm korrekt als „CSFV-positiv“ detektieren. Achtzehn Prozent der viruspositiven Ferkel serokonvertierten in diesen Tests nicht [104, 105]. In einer neueren Studie zeigte sich des Weiteren, dass einer der beiden Tests nicht spezifisch für CSFV ist. Der *Chekit Marker®* ELISA erkannte auch Schweine als „E^{ms}-positiv“, die mit ruminanten Pestiviren infiziert worden waren [106]. Die korrespondierenden Testsysteme zu den *E2-Subunit-Vakzinen* müssen demnach weiter optimiert werden, um im Feld sichere Ergebnisse liefern zu können. Diese Ergebnisse erlauben die Schlussfolgerung, dass die momentan verfügbaren *E2 Subunit Vakzine* im Hinblick auf ihre protektiven Eigenschaften und im Hinblick auf ihre Sicherheit den modifizierten Lebendvakzinen (*C-Stamm Vakzine*) noch deutlich unterlegen sind. Eine Impfung mit den *C-Stamm-Vakzinen* induziert eine belastbare Immunität in der Herde 1-2 Wochen früher als die Impfung mit *E2-Subunit-Vakzinen* [96]. Daher ist bei Notimpfungen den *C-Stamm-Vakzinen* der Vorzug zu geben. Während eine einmalige Impfung mit einer *C-Stamm-Vakzine* innerhalb von 7 Tagen bereits einen nahezu vollständigen Schutz vor einer Belastungsinfektion mit einem virulenten Feldvirus bieten kann, wird für die Induktion eines vergleichbaren Schutzes durch die Impfung mit einer *E2-Subunit-Vakzine* eine zweifache Applikation innerhalb von vier Wochen benötigt und die Immunität ist erst zwei Wochen nach der zweiten Impfung voll ausgebildet [96]. Es konnte gezeigt werden, dass die mit *C-Stamm-Vakzinen* geimpften Tiere nach der Belastungsinfektion keine Virämie zeigen und kein

„Challenge“-Virus ausscheiden. Im Gegensatz dazu fand bei Tieren, die 7 Tage nach der Vakzination mit einer *E2-Subunit-Vakzine* einer Belastungsinfektion unterzogen wurden, eine Transmission des „Challenge“-Virus auf alle nicht-vakzinierten Kontakttiere statt [96]. In Tieren, die mit C-Stamm-Vakzinen geimpft wurden, konnten zum Teil Jahre nach der Impfung noch neutralisierende Antikörper nachgewiesen werden. Es gibt Hinweise darauf, dass der durch die *C-Stamm-Vakzinierung* hervorgerufene Schutz sogar lebenslang anhält [96]. Im Gegensatz dazu wurde in einer Studie zur Effektivität der *E2-Subunit-Vakzine* berichtet, dass in 2 von 8 Tieren 13 Monate nach der Impfung keine neutralisierenden Antikörper mehr nachzuweisen waren [107]. Ein weiterer großer Nachteil der *E2-Subunit-Vakzine* ist die Tatsache, dass sie als Totimpfstoffe bisher nicht für die Vakzination von Wildschweinen geeignet sind, die nach wie vor das Hauptreservoir für CSFV in Europa darstellen.

4.7.2 Aktuelle Ansätze zur Entwicklung neuartiger CSFV DIVA-Vakzinen

In den vergangenen zwei Jahrzehnten wurden verschiedene Marker-Vakzine Kandidaten und Konzepte für neuartige CSFV-Vakzinen entwickelt und getestet. Die Ansätze hierfür waren und sind sehr unterschiedlich: es sind rekombinante chimäre Vakzinen (z.B. mit BVDV als Vektor), rekombinante Deletionsvakzinen (z.B. E^{ms}- oder E2- Deletionsmutanten), DNA-Vakzinen, Subunit-Vakzinen sowie Peptid-Vakzinen beschrieben [54, 108]. Jeder dieser Ansätze ist interessant und mit individuellen Vor- und Nachteilen behaftet. Eine ausführliche Beschreibung aller dieser Konzepte findet sich in den Reviews von Dong und Chen [54] und Beer et al. [108]. An dieser Stelle sollen im Besonderen die Kandidaten diskutiert werden, die auf chimären Pestiviren oder auf anderen viralen Vektoren beruhen, da sie für die Entwicklung einer neuen CSFV DIVA-Vakzine im Augenblick am erfolgversprechendsten erscheinen. Denn es sind diese Kandidaten, die nach heutigem Wissensstand das Potential haben, eine ähnlich starke Immunität zu induzieren wie die konventionellen attenuierten Lebendvakzinen (z.B. *C-Stamm Vakzinen*) und gleichzeitig das DIVA-Kriterion mit einer zuverlässigen Negativmarkierung zu erfüllen [108].

Prinzipiell gibt es drei verschiedene Markierungsstrategien für die Entwicklung einer Marker-Vakzine: die Negativmarkierung, die extrinsische Positivmarkierung und die intrinsische Positivmarkierung. Negativmarkierungsstrategien zeichnen sich dadurch aus, dass dem Vakzinevirus mindestens ein antigenes Epitop, eine antigene Domäne oder ein immunogenes Protein im Vergleich zum Wildtypvirus fehlt [54]. Sie müssen von einem korrespondierenden serologischen Testsystem begleitet sein, welches z.B. Antikörper detektiert, die spezifisch gegen das Epitop, die Domäne oder das Protein gerichtet sind, das

im Vakzinevirus deletiert ist. So können Tiere als „infiziert“ diagnostiziert werden, die in diesem Test positiv sind, während Tiere als „vakziniert“ oder „ohne Feldviruskontakt“ erkannt werden, die in diesem Test ein negatives Signal geben [54]. Bei einer extrinsischen Positivmarkierung wird ein dem Virus nicht zugehöriges, immundominantes Epitop oder Protein zu einer bestehenden Vakzineformulierung zugefügt. Walders et al. haben z.B. den Ansatz gewählt, eine bestehende *Mycoplasma hyopneumoniae* Vakzine mit Peptid-KLH als Positivmarkierung zu verbinden [109]. Eine intrinsische Positivmarkierung beruht auf dem Einfügen einer virusfremden immunogenen Sequenz in das virale Proteom, was zum Auftreten einer Antikörperantwort gegen die eingefügte Sequenz führt, die bei einer Wildtypvirusinfektion ausbleibt. Ein Beispiel für dieses Markierungsprinzip sind Peptid-Vakzinen, bei denen z.B. viruseigene Epitope an synthetische Peptide gebunden werden, die dann eine epitop-spezifische neutralisierende Antikörperantwort in den geimpften Tieren hervorrufen zudem aber auch Antikörper gegen das Trägerpeptid generieren [54]. Der entscheidende Nachteil einer Positivmarkierung ist jedoch, dass mit dem dazugehörigen Testsystem die Feldvirusinfektion selbst nicht erkannt wird. Es kann mit einer solchen Positivmarkierung vielmehr die Unterscheidung „geimpft“ versus „nicht-geimpft“ vorgenommen werden. Jedoch ist „nicht-geimpft“ nicht gleichzusetzen mit „ohne Feldviruskontakt“. Wird ein Tier zuerst mit einer solchen Vakzine geimpft und infiziert sich anschließend mit einem Feldvirus, kann es vorkommen, dass sich die Antikörperantwort nicht verändert und das Tier so zu einem unerkannten chronischen Träger der Feldvirusinfektion werden kann.

Bislang beruhen die meisten Kandidaten für neuartige DIVA-Vakzinen gegen CSFV auf dem Negativmarkierungsprinzip [54]. Die Verwendung viraler Vektorsysteme ist ein Ansatz für die Entwicklung von CSFV Marker-Vakzinen, die auf Negativmarkierungen beruhen. Es konnte bereits Mitte der 1990er Jahre gezeigt werden, dass Rekombinanten, die das Vaccinia-Virus als Vektor nutzen und CSFV E2- oder E^{ms}-Protein exprimieren, Schweine vor einer Belastungsinfektion mit CSFV schützen können [110]. Diese frühen Vakzinekandidaten hatten jedoch den Nachteil, dass sie in hochtitrigen Dosen intravenös appliziert werden mussten. Es wurden weitere virale Vektorsysteme getestet, die auf Pseudorabies-Virus (PRV) [111-114], porzinen Adenoviren (PAV) [115-118], Schweinepocken-Viren [119] oder Parapox-Viren [120] beruhen und das E2-Protein von CSFV exprimieren (rPRV-E2, rPAV-E2 oder rPPV-E2). Obwohl beschrieben wurde, dass rPRV-E2, rPAV-E2 und rPPV-E2 avirulent und in ihrer Schutzwirkung effektiv sind [112, 118], gibt es bisher keine belastbaren Daten aus Feldversuchen oder in einem größeren Rahmen angelegten Vakzinierungsstudien zur Sicherheit der entwickelten Vakzine-Kandidaten. Es wurde bisher auch nicht gezeigt, ob diese Vakzine im trächtigen Tier gegen fetale Infektionen schützen. Vor allem bleibt die Frage zu beantworten, ob die durch die viralen Vektoren induzierte Immunität Re-Vakzinierungen beeinflussen kann. Es ist z.B. möglich, dass in Regionen, die frei sind von

Aujesky'scher Krankheit, der Einsatz von PRV-basierten Vakzinen serologische Surveillance-Programme beeinflussen kann. Im Hinblick auf die Markierungsstrategie ist jedoch zu betonen, dass alle E2-exprimierenden Vektorvakzinen prinzipiell mit einer DIVA-Strategie basierend auf E^{ms}- oder NS3-spezifischen serologischen Essays kompatibel sind [108].

Aufgrund der Befürchtung, dass replizierende chimäre Pestiviren zu virulenten Viren revertieren könnten oder andere unerwartete negative Eigenschaften zeigen könnten (z.B. Veränderungen in ihrem Wirtstropismus), wurden *trans*-komplementierte CSFV E^{ms}- oder E2-Deletionsmutanten (Replikons) konstruiert [121-124]. Diese Mutanten gehören zu den sogenannten DISC-Vakzinen („defective in second cycle“-Vakzinen), die zwar in der Lage sind, im Tier zu replizieren, bei deren Replikation jedoch keine infektiösen Viruspartikel entstehen. Dem Argument der hohen Sicherheit dieser Vakzine-Kandidaten steht allerdings auch eine geringere Effektivität im Gegensatz zu konventionellen Lebendvakzinen gegenüber. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass der Grad des induzierten Schutzes durch die Impfung mit diesen Kandidaten sehr stark von der Applikationsroute abhängt. Die besten Ergebnisse konnten durch intradermale Applikation erreicht werden [123]. Diese Methode ist jedoch für einen Einsatz im Feld und bei hohen Tierzahlen sehr ungeeignet, da sie im Vergleich zur intramuskulären Applikationsroute zeitaufwendig ist und einer sehr guten Fixation des zu impfenden Tieres bedarf. Ob solche Replikon-basierten Vakzine daher in Zukunft eine Alternative zu anderen Vakzine-Konzepten darstellen können, lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht sagen.

Ein momentan sehr vielversprechendes Beispiel für ein chimäres Pestivirus als Vakzine-Kandidat ist hingegen *CP7_E2alf*, dessen Entwicklung und Charakterisierung in den letzten Jahren stark vorangetrieben worden ist. *CP7_E2alf* beruht auf dem cp-BVDV-Stamm CP7, dessen E2-Gen gegen das E2-Gen vom CSFV-Stamm Alfort/Tübingen ausgetauscht wurde [125]. Die Sicherheit und Effizienz dieses Vakzine-Kandidaten konnte bereits in Schweinen und in Wildschweinen über die intramuskuläre und auch über die orale Applikationsroute verifiziert werden [125-130]. In verschiedenen Studien zeigte sich *CP7_E2alf* völlig avirulent; eine Virämie in den geimpften Tieren oder Transmission des Virus auf Kontakttiere konnte nicht nachgewiesen werden. CSFV-spezifische neutralisierende Antikörper konnten in den geimpften Tieren ab elf Tagen nach der Vakzination aufwärts nachgewiesen werden [108, 125]. Es wurde auch gezeigt, dass die durch *CP7_E2alf* induzierte Immunität über sechs Monate anhält [128]. Das DIVA-Prinzip des *CP7_E2alf* beruht ebenso wie das der *E2 Subunit Vakzine* auf der Detektion E^{ms} spezifischer Antikörper, die nur bei Feldvirusinfektionen, nicht aber bei der Impfung mit *CP7_E2alf* in „nicht-geimpften“ Tieren induziert werden. Ein in einem E^{ms}-Antikörper-ELISA „positives“ Tier gilt in diesem System demnach als zuvor oder akut „feldvirusinfiziert“. Die Schwächen der kommerziell erhältlichen E^{ms}-ELISAs wurden unter 4.7.1 bereits beschrieben. Parallel zur Entwicklung von *CP7_E2alf*

wurde daher auch an neuen korrespondierenden Testsystemen gearbeitet. In einer Studie aus dem Jahr 2012 von Hofmann et al. wurden zwei erfolgversprechende neue E^{ms}-ELISAs vorgestellt. Beide Tests waren in dieser Studie in der Lage, CSFV-infizierte Tiere von mit *CP7_E2alf* vakzinieren Tieren zu unterscheiden. Des Weiteren erlaubten sie auch die Diskriminierung von CSFV-spezifischen Antikörpern von durch ruminante Pestiviren induzierten Antikörpern [131]. Bisher noch unerforscht ist jedoch die Frage, ob *CP7_E2alf* in trächtigen Tieren eine diaplastentare Infektion etablieren kann und wenn ja mit welchen Folgen. Diese wichtige Frage muss noch beantwortet werden. Zusammenfassend lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt festhalten, dass *CP7_E2alf* aufgrund seiner bisher beschriebenen Eigenschaften und begleitet von einem zuverlässigen neuen ELISA einen sehr vielversprechenden Kandidaten für eine zukünftige DIVA-Vakzine darstellt. Allerdings gibt es einen Sicherheitsaspekt aufgrund dessen sich die Zulassung dieses Impfstoffes trotz seiner guten Eignung schwierig gestalten könnte. Das in *CP7_E2alf* eingesetzte Vektorvirus CP7 ist ein cytopathogener BVDV-Stamm, der aus einem an *mucosal disease* erkrankten Rind isoliert wurde [132]. BVDV gehört zum gleichen Genus wie CSFV und ist zudem weniger wirtsspezifisch. Neben Rindern können auch andere Paarhufer von diesem Virus infiziert werden. Es ist schon seit über zehn Jahren bekannt, dass durch RNA-Rekombination zwischen einem persistierenden ncp-BVDV-Stamm und einem cp-BVDV-Vakzinestamm die Induktion der zu 100% letal verlaufenden *mucosal disease* bei Rindern möglich ist [133]. Daher kann der Einsatz einer Chimäre wie *CP7_E2alf* im Feld ein potenzielles Sicherheitsrisiko für „Nicht-Zieltierarten“ darstellen, selbst wenn die Vakzine für Haus- und Wildschweine völlig apathogen ist. In einer Studie von 2011 wurden deshalb Schaf- und Ziegenlämmer, Kälber und Kaninchen oral mit *CP7_E2alf* vakzinieren, um die Auswirkungen der Vakzine auf diese „Nicht-Zieltierarten“ zu untersuchen. In dieser Studie konnten bei keinem Tier klinische Krankheitsanzeichen, Fieber, Leukopenie, eine Virämie oder Virusausscheidung nachgewiesen werden. Auch eine Transmission des Virus auf ungeimpfte Kontakttiere wurde nicht beobachtet [134]. Doch trotz der positiven Ergebnisse dieser ersten Studie mit „Nicht-Zieltierarten“ bleibt der Einsatz einer Chimäre wie *CP7_E2alf* im Feld mit einem Restrisiko behaftet. Es muss daher unter Feldbedingungen noch weiter untersucht werden, ob die chimäre Vakzine eventuell mit einer bereits bestehenden Anti-BVDV- bzw. Anti-BDV-Immunität interferiert [54]. Denn obwohl von CP7 induzierte Antisera *CP7_E2alf* nicht neutralisieren [125], kann eine mögliche Störung der zellulären Immunantwort noch nicht ausgeschlossen werden [54]. Es bleibt der Sicherheitsaspekt in „Nicht-Zieltierarten“, der die Marktfähigkeit von *CP7_E2alf* auf globaler Ebene in Frage stellt.

4.7.3 Die TAV-Epitop markierte CSFV Doppelmutante als DIVA-Vakzine

In der vorliegenden Arbeit wurde als Ansatz für ein DIVA-taugliches Markierungskonzept für eine CSFV Vakzine ebenfalls eine *Negativmarkierung* bevorzugt. Als Angriffspunkt hierfür wurde das lineare TAV-Epitop auf dem E2-Protein von CSFV gewählt. E2 ist ein integrales Membranprotein und das Hauptantigen, das neutralisierende Antikörper in CSFV infizierten Tieren induziert [16, 41, 42]. Verschiedene wichtige antigene Regionen sind in der Literatur für das E2-Protein beschrieben. Dazu gehören konformationelle [43-46] und lineare Epitope [47-51]. Das lineare TAV-Epitop befindet sich an den Positionen 140-148 des E2-Proteins, hat die Aminosäuresequenz TAVSPTTLRT und wird von dem monoklonalen Antikörper A18 erkannt. Das TAV-Epitop ist spezifisch für CSFV, evolutionär fast zu 100% konserviert und ein Ziel neutralisierender Antikörper [48, 52]. Das Ziel der Versuche in der vorliegenden Arbeit war es nun, die Aminosäuresequenz des Epitopes derart zu verändern, dass es nicht mehr von dem mAk A18 erkannt werden kann, um auf diese Weise als Negativmarker in einer zukünftigen Vakzine verwendet werden zu können. Dieser Impfstoff müsste dann in Konsequenz von einem korrespondierenden serologischen Testsystem begleitet sein, in dem die Seren von vakzinierten Tieren ein TAV-Epitop negatives Signal gäben, während die Seren von mit Feldvirus infizierten Tieren ein TAV-Epitop positives Signal gäben.

Es wurden verschiedene TAV-Epitop markierte Mutanten hergestellt und auf ihre Funktionalität im Hinblick auf die Markierung untersucht. Dabei wurden in einem ersten Schritt Mutanten generiert, die ausschließlich verschiedene TAV-Epitop Markierungen trugen (3.2.1). In einem zweiten Schritt wurde dann der Versuch unternommen, die TAV-Epitop Markierungen mit bekannten attenuierenden Mutationen (N^{pro} -Deletion und/oder Ausschaltung der E^{ms} -RNase durch Deletion von Histidin 346) zu kombinieren (3.2.2). Während der *in vitro* Charakterisierung der Mutanten zeigte sich, dass in jedem Virus eine der eingefügten Aminosäuresubstitutionen revertiert war (vergl. Tabelle 20). Die übrigen eingefügten Aminosäureaustausche blieben jedoch in der Gewebekultur stabil und die beobachteten Reversionen beeinträchtigten nicht die Funktionalität der Markierung. Nach Verifizierung der eingefügten Mutationen mittels Sequenzierung und Kontrolle des Markierungskonzeptes durch Immunfluoreszenzexperimente wurden einige vielversprechende Kandidaten für die Testung im natürlichen Wirt ausgewählt.

In einer ersten Vergleichsstudie (TV#31) wurden eine TAV-Epitop Mutante auf Grundlage des Wildtypvirus (Virus pSW16: TAVS**AA**TTLRT) und eine N^{pro} -Deletionsmutante mit verändertem TAV-Epitop (Virus EP#69/2: TAVS**ASS**LRT / N^{pro} -Deletion) im Vergleich zu einem CSFV-Wildtypvirus (Virus 1347 RTF III: Alfort/Tübingen) im Hinblick auf ihre Pathogenität, auf die Stabilität des Markierungskonzeptes und auf ihre Effizienz bzgl. der Induktion von neutralisierenden Antikörpern untersucht. In einer darauf folgenden Effizienzstudie (TV#52_12) wurden eine TAV-Epitop markierte RNase negative Mutante

(Virus EP#74/1: TAVSKD~~L~~R~~R~~T / Deletion von Histidin 346) und eine TAV-Epitop markierte Doppelmutante (Virus EP#73/2: TAVSKD~~L~~R~~R~~T / Deletion von Histidin 346 / N^{pro}-Deletion) im Vergleich mit einer nicht vakzinierten Kontrollgruppe auf ihre Fähigkeit untersucht, Schweine vor einer Belastungsinfektion mit dem hochpathogenen CSFV-Stamm „Eystrup“ zu schützen. Auch in diesem Versuch sollte außerdem die Stabilität des Markierungskonzeptes und die Induktion von neutralisierenden Antikörpern untersucht werden.

Die Tiere, die im Zuge der Vergleichsstudie (TV#31) mit der TAV-Epitop Mutante pSW16 infiziert worden waren, zeigten Fieber und klinische Anzeichen von klassischer Schweinepest mit fast der gleichen Intensität wie die Tiere in der Wildtypkontrollgruppe. Zwei von drei Tieren in dieser Gruppe erlebten das planmäßige Ende des Tierexperimentes nicht. Diese Befunde erlaubten die Schlussfolgerung, dass die TAV-Epitop Markierung alleine nicht zu einer signifikanten Attenuierung der Viren führt. Im Gegensatz dazu zeigte keines der Tiere aus den Gruppen, die mit einer der drei Kombinationsmutanten (EP#69/2, EP#74/1 oder EP#73/2) vakziniert worden waren, klinische Symptome von klassischer Schweinepest oder eine signifikante Erhöhung der Körpertemperatur im Verlauf der Experimente. Alle Tiere in beiden Studien, die das planmäßige Ende der Experimente erlebten, zeigten im SNT signifikante Titer CSFV-spezifischer neutralisierender Antikörper. In der Effizienzstudie (TV#52_12) konnte sowohl die Vakzination mit der RNase negativen TAV-Epitop markierten Mutante (EP#74/1), als auch die Vakzination mit der TAV-Epitop markierten Doppelmutante (EP#73/2) alle Tiere in beiden Gruppen vor den Folgen der Belastungsinfektion mit „Eystrup“ schützen. Eine Virämie konnte in der Vergleichsstudie (TV#31) an mindestens einem Tag des Experimentes für alle Tiere nachgewiesen werden. In der Effizienzstudie TV#52_12 konnte eine Virämie nur an einem Tag des Experimentes (Tag 7dpv) und nur in der Gruppe nachgewiesen werden, die mit der TAV-Epitop markierten RNase negativen Mutante (EP#74/1) vakziniert worden war. Eine Virämie konnte hingegen für die Tiere, die mit der TAV-Epitop markierten Doppelmutante vakziniert worden waren, nicht detektiert werden. In keinem der Tiere in dieser Studie konnte das Challengevirus im Blut nachgewiesen werden. Bei den Tieren in der nicht vakzinierten Kontrollgruppe ist dies nach bisherigen Erfahrungen darin begründet, dass sie vor dem Zeitpunkt starben (Schlachtung an Tag 5 dpv), zu dem das Challengevirus im Blut nachweisbar sein sollte. In einem vorangegangenen Tierexperiment war das gleiche Challengevirus in der mock Kontrollgruppe bei zwei von drei Tieren erst an Tag 11 dpc im Blut nachgewiesen worden (Daten von Eva-Maria Schürmann et al., noch nicht veröffentlicht). Dass das Challengevirus jedoch in den beiden Testgruppen über den gesamten Zeitraum der Effizienzstudie (TV#52_12) nicht im Blut nachweisbar war, könnte ein Hinweis darauf sein, dass diese beiden Vakzine-Kandidaten (EP#74/1 und EP#73/2) ähnlich sicher wie der *C-Stamm* im Hinblick auf die Hemmung der Virusvermehrung sind. Um dies weiter zu untersuchen, müssten in einem nächsten Experiment zusätzlich zur Blutuntersuchung auch Kotproben auf Virusausscheidung hin

untersucht werden. Für die Hypothese, die Doppelmutante könnte ebenso sicher wie der *C-Stamm* sein, spricht auch der Befund, dass in der Gruppe 1 (EP#73/2) über den gesamten Zeitraum des Experimentes keine Virämie im Blut nachweisbar war. Dies bedeutete jedoch auch, dass für dieses Virus (EP#73/2) die Stabilität der TAV-Epitop Markierung nach der Tierpassage leider nicht verifiziert werden konnte. Die in dieser Mutante eingesetzte Markierung war jedoch identisch mit der in der TAV-Epitop markierten RNase negativen Variante (EP#74/1), die in den Immunfluoreszenzexperimenten nach der Tierpassage ein eindeutig negatives Signal zeigte. Alle TAV-Epitop Markierungen in den aus Leukozytenkonzentrat reisolierten Viren erwiesen sich als stabil und auch als funktionsfähig im Sinne des DIVA-Kriteriums. Alle Befunde sprechen also dafür, dass die getesteten Markierungen in der Tierpassage stabil bleiben, obwohl das TAV-Epitop evolutionär zu fast 100% konserviert und damit offenbar sehr wichtig für CSF Viren ist.

Zusammenfassend erlauben die Ergebnisse der beiden Tierstudien TV#31 und TV#52_12 die Schlussfolgerung, dass das Konzept der Kombination von einer TAV-Epitop Markierung mit bekannt attenuierenden Mutationen wie der N^{pro}-Deletion und/oder der Ausschaltung der E^{ms}-RNase für eine neuartige CSFV DIVA-Vakzine vielversprechend ist. Das größte Potential scheint nach den bisherigen Ergebnissen die TAV-Epitop markierte Doppelmutante zu haben. Die parentale nicht markierte Doppelmutante (EP#6/12) war in der Lage, die Entstehung von persistent infizierten Ferkeln zu verhindern (TV#30; 3.1.2). Die TAV-Epitop markierte Doppelmutante muss jedoch in einem zukünftigen Tierexperiment ebenfalls in trächtigen Tieren getestet werden um zu untersuchen, ob die Ergebnisse aus TV#30 sich mit der TAV-Epitop markierten Doppelmutante reproduzieren lassen. In einem nächsten Tierexperiment sollten des Weiteren häufigere Blutabnahmetermine nach der Vakzination bzw. der Belastungsinfektion eingeplant werden. Zudem gilt es der Frage nachzugehen, ob in mit der TAV-Epitop markierten Doppelmutante vakzinierten Tieren eine Virämie nach Vakzination bzw. Challenge nachweisbar ist. Ist dies nicht der Fall, wäre das ein weiterer Hinweis auf die Sicherheit der Vakzine. Kann jedoch eine Virämie nachgewiesen werden, so sollte Virus aus Leukozytenkonzentrat isoliert werden und in der Sequenzierung und in Immunfluoreszenzexperimenten analysiert werden, um die TAV-Epitop Markierung zu verifizieren. Auch Kotproben sollten auf Virusausscheidung hin untersucht werden. Parallel zur weiteren Charakterisierung der TAV-Epitop markierten Doppelmutante ist es wichtig, ein korrespondierendes serologisches Testsystem zu etablieren, um das DIVA-Prinzip zu komplettieren. Denkbar wäre z.B. ein TAV-Epitop spezifisches ELISA-System. Dieses System sollte dann bei Antikörpern aus den Seren von Tieren, die mit der TAV-Epitop markierten Doppelmutante geimpft wurden, keine positive Reaktion zeigen, sondern nur bei Seren von mit Wildtypvirus infizierten Tieren reagieren, die ein unmarkiertes, intaktes TAV-Epitop besitzen.

Das TAV-Epitop ist zwar evolutionär zu fast 100% konserviert, aber es ist nicht auszuschließen, dass CSFV Feldstämme auftreten können, die ein verändertes TAV-Epitop besitzen. Diese Feldstämme könnten dann eventuell in einem wie oben beschriebenen TAV-Epitop-ELISA nicht erkannt werden, die infizierten Tiere sich also wie vakzinierter Tiere in diesem System darstellen. So könnten falsch-negative Ergebnisse entstehen. Um diesem Fall vorzubeugen und so die Sicherheit einer zukünftigen DIVA-Vakzine zu erhöhen, muss versucht werden, noch zusätzliche Markierungen in die TAV-Epitop markierte Doppelmutante zu integrieren. Denkbar wäre es z.B. ein zweites konserviertes CSFV spezifisches Epitop als Angriffspunkt zu wählen und dieses dann nach dem gleichen Prinzip wie das TAV-Epitop zu verändern. Peng et al. haben 2008 ein konserviertes lineares CSFV spezifisches B-Zell Epitop identifiziert, das sich an Position 83-89 des E2-Proteins befindet und die Aminosäuresequenz LFDGTNP hat [49]. Dieses Epitop wird von dem mAk HQ06 erkannt und könnte als zweiter potentieller Negativmarker in der TAV-Epitop markierten Doppelmutante getestet werden. Dennoch ist bei diesen Überlegungen zu beachten, dass die konservierten Epitope als Ziel neutralisierender Antikörper wichtig sind für die Induktion einer protektiven Immunantwort durch die Vakzine. Nimmt man dem Vakzinevirus zu viele seiner konservierten Epitope, so besteht die Gefahr, dass dann keine breite, protektive Immunität mehr induziert werden kann. Der Mittelweg zwischen Risikostreuung durch zwei oder mehr Markierungen dieser Art in einem Vakzinevirus einerseits und der Erhaltung einer belastbaren, protektiven Immunantwort andererseits bleibt daher eine Herausforderung für künftige Arbeiten. Ein weiterer Ansatz zur Erhöhung der Sicherheit des DIVA-Konzeptes könnte die Verwendung eines zweiten Testsystems sein, das nicht auf einer serologischen Differenzierung beruht (wie z.B. ein ELISA), sondern auf der Sequenzebene angreift („genetic DIVA“) [108]. Parallel zur Entwicklung von *CP7_E2alf* wurde erfolgreich an neuartigen rRT-PCR („realtime Reverse-Transkriptase-PCR“) Systemen gearbeitet, die eine Diskriminierung vakzinierter von infizierten Tieren ermöglichen können [126, 135-137]. Auch wenn diese Systeme zunächst für die Arbeit mit *CP7_E2alf* entwickelt wurden, sind sie prinzipiell als Ergänzung zu jeder DIVA-Vakzine geeignet, solange sich der genetische Hintergrund des eingesetzten Vakzine-Stammes von dem des Wildtypstammes unterscheidet [108].

Die in dieser Arbeit vorgestellten DIVA-Vakzine Kandidaten gegen CSFV sind als genetisch modifizierte Prototypen zu verstehen und ihre Testung und Optimierung ist noch lange nicht abgeschlossen. Sollte es jedoch gelingen, ausgehend von den vorgestellten Mutanten einen weiter entwickelten Kandidaten gemeinsam mit seinem korrespondierenden serologischen Testsystem bis zur Marktreife zu optimieren, so könnte dies eine Wende in der Politik der Bekämpfung von klassischer Schweinepest innerhalb Europas herbeiführen. Von den in dieser Arbeit vorgestellten Ansätzen hat nach heutigem Wissensstand die TAV-Epitop

markierte CSFV Doppelmutante großes Potential und wird in nachfolgenden Arbeiten weiter charakterisiert werden.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Genomorganisation von Pestiviren	23
Abbildung 2: Genom der CSFV Doppelmutante EP#6/12	71
Abbildung 3: Wachstumskurven zur Charakterisierung der Doppeldeletionsmutante	72
Abbildung 4: Körpertemperatur TV#30	77
Abbildung 5: SNT TV#30	78
Abbildung 6: morphologische Befunde Feten	79
Abbildung 7: Klonierungsschema TAV-Epitop Basismutanten	85
Abbildung 8: Indirekte Immunfloreszenz TAV-Epitop-Basismutanten	88
Abbildung 9: Wachstumskurven der TAV-Epitop-Basismutanten	89
Abbildung 10: Klonierungsschema TAV-Epitop-Kombinationsmutanten – Ansatz 1	91
Abbildung 11: Klonierungsschema TAV-Epitop Kombinationsmutanten – Ansatz 2	95
Abbildung 12: Genome der Viren in TV#31	98
Abbildung 13: Indirekte Immunfluoreszenz Viren TV#31	99
Abbildung 14: Wachstumskurven TV#31	100
Abbildung 15: Klinische Punktzahlen TV#31	105
Abbildung 16: Körpertemperatur TV#31	107
Abbildung 17: Leukozytenzahlen TV#31	108
Abbildung 18: Mittelwerte SNTs TV#31	110
Abbildung 19: Virusanzucht aus Leukozytenkonzentrat: Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenz	112
Abbildung 20: Genome der Viren in TV#52/12	115
Abbildung 21: Indirekte Immunfluoreszenz Viren TV#52/12	116
Abbildung 22: Wachstumskurven TV#52/12	117
Abbildung 23: Durchschnittliche Klinische Punktzahlen TV#52/12	121
Abbildung 24: Körpertemperatur TV#52/12	123
Abbildung 25: Leukozytenzahlen TV#52/12	125
Abbildung 26: Mittelwerte aus drei unabhängigen SNTs TV#52/12	127
Abbildung 27: Virusanzucht aus Leukozytenkonzentrat: Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenz	130
Abbildung 28: Klonierungsschema p1990 C III	135
Abbildung 29: Klonierungsschema pSW3	136
Abbildung 30: Wachstumskurven TV#29	137
Abbildung 31: Klinische Punktzahlen TV#29	143
Abbildung 32: Körpertemperatur TV#29	145
Abbildung 33: Leukozytenzahlen TV#29	146
Abbildung 34: SNT TV#29	148

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Beispielhafter Reaktionsansatz für eine PCR	46
Tabelle 2: Programm für eine Standard-PCR	47
Tabelle 3: Programm für eine Quik Change®-PCR	47
Tabelle 4: Ligationsansatz	50
Tabelle 5: Reaktionsansatz für die PCR-gestützte Sequenzierung	53
Tabelle 6: Programmablauf für die Sequenzierungs-PCR	54
Tabelle 7: Reaktionsansatz für die <i>In vitro</i> -Transkription mit <i>RiboMAX™</i> Kit	55
Tabelle 8: Infektion von Zellen	58
Tabelle 9: RT-PCR Programm Quiagen Kit	60
Tabelle 10: RT-PCR Programm Invitrogen Kit	60
Tabelle 11: Klinische Punktzahl für CSFV [57]	63
Tabelle 12: Ruhewerte Körpertemperatur Schwein [58]	63
Tabelle 13: Gruppeneinteilung TV#30	74
Tabelle 14: Zeitplan TV#30	75
Tabelle 15: Ergebnisse der Rücktitrationen TV#30	76
Tabelle 16: Zeitliches Konzept für die Euthanasie der Muttertiere	79
Tabelle 17: Sektion der Feten – Übersicht über pathologische Befunde	79
Tabelle 18: Virusanzucht aus fetalen Organen	81
Tabelle 19: TAV-Epitop Mutagenese Primer und resultierende Mutationen	84
Tabelle 20: Ergebnisse der Sequenzierung TAV-Epitop-Basismutanten 3. Passage auf SK-6	86
Tabelle 21: Ergebnisse der Indirekten Immunfluoreszenz EP#67/2 und EP#69/2 (Klonierung 1)	92
Tabelle 22: Ergebnisse der Indirekten Immunfluoreszenz EP#67/3, EP#67/MP2, EP#68/MP1 und EP#68/MP15 (Klonierung 1)	93
Tabelle 23: TAV-Epitop Kombinationsmutanten EP#70/1, EP#71/1 und EP#72/1	97
Tabelle 24: TAV-Epitop Kombinationsmutanten EP#73/1, EP#74/1 und EP#75/1	97
Tabelle 25: Gruppeneinteilung TV#31	101
Tabelle 26: Zeitplan TV#31	102
Tabelle 27: Rücktitration TV#31	103
Tabelle 28: Titer neutralisierender Antikörper TV#31	109
Tabelle 29: Virusanzucht aus Leukozytenkonzentrat: Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenz	111
Tabelle 30: Virusanzucht aus Leukozytenkonzentrat: Ergebnisse der Sequenzierung	111
Tabelle 31: Gruppeneinteilung TV#52/12	117
Tabelle 32: Zeitplan TV#52/12	119
Tabelle 33: Ergebnisse der Rücktitration TV#52/12	120
Tabelle 34: Titer neutralisierender Antikörper TV#52/12	126
Tabelle 35: Virusanzucht aus Leukozytenkonzentrat: Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenz	128
Tabelle 36: Virusanzucht aus Leukozytenkonzentrat: Ergebnisse der Sequenzierung	129
Tabelle 37: Gruppeneinteilung TV#29	138
Tabelle 38: Zeitplan TV#29	139
Tabelle 39: Rücktitrationen TV#29	141
Tabelle 40: Titer neutralisierender Antikörper TV#29	147
Tabelle 41: Virusanzucht aus Leukozytenkonzentrat: Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenz	149

Literaturverzeichnis

1. Lindenbach, B.D., H.J. Thiel, and C.M. Rice, *Flaviviridae: The Viruses and Their Replication*, in *Fields Virology*, D.M. Knipe and P.M. Howley, Editors. 2007, Lippincott - Raven Publishers: Philadelphia, New York. p. 1101-1152.
2. Kümmerer, B.M., et al., *The genetic basis for cytopathogenicity of pestiviruses*. *Vet Microbiol*, 2000. **77**(1-2): p. 117-28.
3. Krey, T., et al., *Function of bovine CD46 as a cellular receptor for bovine viral diarrhea virus is determined by complement control protein 1*. *J.Virol.*, 2006. **80**(8): p. 3912-3922.
4. Krey, T., et al., *Role of the low-density lipoprotein receptor in entry of bovine viral diarrhea virus*. *J.Virol.*, 2006. **80**(21): p. 10862-10867.
5. Fauquet, C.M.M., M.A.; Maniloff, J.; Desselberger, U.; Ball, L.A. et al., *Family Flaviviridae*, in *Virus Taxonomy. VIIIth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*.2005, Academic Press: San Diego, California.
6. Riedel, C., et al., *The core protein of classical Swine Fever virus is dispensable for virus propagation in vitro*. *PLoS Pathog*, 2012. **8**(3): p. e1002598.
7. Collett, M.S., et al., *Proteins encoded by bovine viral diarrhea virus: The genome organization of a pestivirus*. *Virology*, 1988. **165**: p. 200-208.
8. Meyers, G., T. Rümepf, and H.J. Thiel, *Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus*. *Virology*, 1989. **171**: p. 555-567.
9. Collett, M.S., et al., *Bovine viral diarrhea virus genomic organization*. *Arch.Virol.Suppl*, 1991. **3**: p. 19-27.
10. Fletcher, S.P. and R.J. Jackson, *Pestivirus internal ribosome entry site (IRES) structure and function: elements in the 5' untranslated region important for IRES function*. *J Virol*, 2002. **76**(10): p. 5024-33.
11. Poole, T.L., et al., *Pestivirus translation occurs by internal ribosome entry*. *Virology*, 1995. **206**: p. 750-754.
12. Aberle, D., *Der Membrananker des pestiviralen Glykoproteins E^{rns} - Untersuchungen zur Lipidbindungsspezifität und Struktur*, in *Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät 2013*, Eberhard Karls Universität Tübingen.
13. Thiel, H.J., et al., *Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus*. *J Virol*, 1991. **65**: p. 4705-4712.
14. Thiel, H.J., P.G.W. Plagemann, and V. Moennig, *Pestiviruses*, in *Fields Virology*, B.N. Fields, D.M. Knipe, and P.M. Howley, Editors. 1996, Lippincott - Raven Publishers: Philadelphia, New York. p. 1059-1073.
15. Lazar, C., et al., *The pestivirus E(rns) glycoprotein interacts with E2 in both infected cells and mature virions*. *Virology*, 2003. **314**(2): p. 696-705.
16. Weiland, E., et al., *Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide linked heterodimer*. *J Virol*, 1990. **64**(8): p. 3563-3569.

17. Lackner, T., et al., *Persistence of bovine viral diarrhea virus is determined by a cellular cofactor of a viral autoprotease*. J.Virol., 2005. **79**(15): p. 9746-9755.
18. Xu, J., et al., *Bovine viral diarrhea virus NS3 serine proteinase: polyprotein cleavage sites, cofactor requirements, and molecular model of an enzyme essential for pestivirus replication*. J Virol, 1997. **71**(7): p. 5312-5322.
19. Steffens, S., H.J. Thiel, and S.E. Behrens, *The RNA-dependent RNA polymerases of different members of the family Flaviviridae exhibit similar properties in vitro*. J Gen Virol, 1999. **80**: p. 2583-2590.
20. Xiao, M., et al., *Classical swine fever virus NS5B-GFP fusion protein possesses an RNA-dependent RNA polymerase activity*. Arch Virol, 2002. **147**(9): p. 1779-87.
21. Tratschin, J.D., et al., *Classical swine fever virus leader proteinase Npro is not required for viral replication in cell culture*. J Virol, 1998. **72**(9): p. 7681-4.
22. Mayer, D., M.A. Hofmann, and J.D. Tratschin, *Attenuation of classical swine fever virus by deletion of the viral N(pro) gene*. Vaccine, 2004. **22**(3-4): p. 317-328.
23. Gil, L.H., et al., *The amino-terminal domain of bovine viral diarrhea virus Npro protein is necessary for alpha/beta interferon antagonism*. J.Virol., 2006. **80**(2): p. 900-911.
24. Hilton, L., et al., *The NPro product of bovine viral diarrhea virus inhibits DNA binding by interferon regulatory factor 3 and targets it for proteasomal degradation*. J.Virol., 2006. **80**(23): p. 11723-11732.
25. Rüggli, N., et al., *N(pro) of classical swine fever virus is an antagonist of double-stranded RNA-mediated apoptosis and IFN-alpha/beta induction*. Virology, 2005. **340**(2): p. 265-276.
26. Szymanski, M.R., et al., *Zinc binding in pestivirus N(pro) is required for interferon regulatory factor 3 interaction and degradation*. J Mol Biol, 2009. **391**(2): p. 438-49.
27. Fiebach, A.R., et al., *Classical Swine Fever virus npro limits type I interferon induction in plasmacytoid dendritic cells by interacting with interferon regulatory factor 7*. J.Virol., 2011. **85**(16): p. 8002-8011.
28. Doceul, V., et al., *The Npro product of classical swine fever virus interacts with I{kappa}B{alpha}, the NF-{kappa}B inhibitor*. J.Gen.Virol., 2008. **89**(Pt 8): p. 1881-1889.
29. Johns, H.L., et al., *The classical swine fever virus N-terminal protease N(pro) binds to cellular HAX-1*. J Gen Virol, 2010. **91**(Pt 11): p. 2677-86.
30. Rüggli, N., et al., *Classical swine fever virus can remain virulent after specific elimination of the interferon regulatory factor 3-degrading function of Npro*. J.Virol., 2009. **83**(2): p. 817-829.
31. Tews, B.A., E.M. Schürmann, and G. Meyers, *Mutation of cysteine 171 of pestivirus E rns RNase prevents homodimer formation and leads to attenuation of classical swine fever virus*. J Virol, 2009. **83**(10): p. 4823-34.
32. Tews, B.A. and G. Meyers, *The Pestivirus Glycoprotein Erns Is Anchored in Plane in the Membrane via an Amphipathic Helix*. J.Biol.Chem., 2007. **282**(45): p. 32730-32741.
33. Hausmann, Y., et al., *Classical swine fever virus glycoprotein E rns is an endoribonuclease with an unusual base specificity*. J.Virol., 2004. **78**(10): p. 5507-5512.
34. Schneider, R., et al., *Identification of a structural glycoprotein of an RNA virus as a ribonuclease*. Science, 1993. **261**: p. 1169-1171.

35. Rümenapf, T., et al., *Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses*. J Virol, 1993. **67**: p. 3288-3295.
36. Meyers, G., A. Saalmüller, and M. Büttner, *Mutations abrogating the RNase activity in glycoprotein e(rns) of the pestivirus classical swine fever virus lead to virus attenuation*. J Virol, 1999. **73**(12): p. 10224-35.
37. Von Freyburg, M., et al., *Comparison of the effects of RNase-negative and wild-type classical swine fever virus on peripheral blood cells of infected pigs*. J.Gen.Virol., 2004. **85**(Pt 7): p. 1899-1908.
38. Iqbal, M., et al., *Role for bovine viral diarrhea virus Erns glycoprotein in the control of activation of beta interferon by double-stranded RNA*. J.Virol., 2004. **78**(1): p. 136-145.
39. Magkouras, I., et al., *RNase-dependent inhibition of extracellular, but not intracellular, dsRNA-induced interferon synthesis by Erns of pestiviruses*. J.Gen.Virol., 2008. **89**(Pt 10): p. 2501-2506.
40. Hulst, M.M. and R.J. Moormann, *Inhibition of pestivirus infection in cell culture by envelope proteins E(rns) and E2 of classical swine fever virus: E(rns) and E2 interact with different receptors*. J.Gen.Virol., 1997. **78** (Pt 11): p. 2779-2787.
41. Hulst, M.M., et al., *Glycoprotein E1 of hog cholera virus expressed in insect cells protects swine from hog cholera*. J.Virol., 1993. **67**(9): p. 5435-5442.
42. König, M., et al., *Classical swine fever virus: independent induction of protective immunity by two structural glycoproteins*. J Virol, 1995. **69**: p. 6479-6486.
43. Chang, C.Y., et al., *Antigenic domains analysis of classical swine fever virus E2 glycoprotein by mutagenesis and conformation-dependent monoclonal antibodies*. Virus Res, 2010. **149**(2): p. 183-9.
44. van Rijn, P.A., *A common neutralizing epitope on envelope glycoprotein E2 of different pestiviruses: implications for improvement of vaccines and diagnostics for classical swine fever (CSF)?* Vet Microbiol, 2007. **125**(1-2): p. 150-6.
45. van Rijn, P.A., et al., *Antigenic structure of envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus*. J Virol, 1994. **68**: p. 3934-3942.
46. van Rijn, P.A., et al., *Epitope mapping of envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus strain Brescia*. J.Gen.Virol., 1993. **74** (Pt 10): p. 2053-2060.
47. Kortekaas, J., et al., *Rational design of a classical swine fever C-strain vaccine virus that enables the differentiation between infected and vaccinated animals*. J Virol Methods, 2010. **163**(2): p. 175-85.
48. Lin, M., et al., *Deletions of structural glycoprotein E2 of classical swine fever virus strain alfort/187 resolve a linear epitope of monoclonal antibody WH303 and the minimal N-terminal domain essential for binding immunoglobulin G antibodies of a pig hyperimmune serum*. J.Virol., 2000. **74**(24): p. 11619-11625.
49. Peng, W.P., et al., *Identification of a conserved linear B-cell epitope at the N-terminus of the E2 glycoprotein of Classical swine fever virus by phage-displayed random peptide library*. Virus Res, 2008. **135**(2): p. 267-72.
50. Yu, M., et al., *Fine mapping of a C-terminal linear epitope highly conserved among the major envelope glycoprotein E2 (gp51 to gp54) of different pestiviruses*. Virology, 1996. **222**(1): p. 289-92.

51. Zhang, F., et al., *Characterization of epitopes for neutralizing monoclonal antibodies to classical swine fever virus E2 and Erns using phage-displayed random peptide library*. Arch Virol, 2006. **151**(1): p. 37-54.
52. Liu, S., et al., *The protective immune response induced by B cell epitope of classical swine fever virus glycoprotein E2*. J Virol Methods, 2006. **134**(1-2): p. 125-9.
53. Moennig, V. and P.G.W. Plagemann, *The pestiviruses*. Adv Vir Res, 1992. **41**: p. 53-98.
54. Dong, X.N. and Y.H. Chen, *Marker vaccine strategies and candidate CSFV marker vaccines*. Vaccine, 2007. **25**(2): p. 205-30.
55. Floegel-Niesmann, G., et al., *Virulence of recent and former classical swine fever virus isolates evaluated by their clinical and pathological signs*. J.Vet.Med.B Infect.Dis.Vet.Public Health, 2003. **50**(5): p. 214-220.
56. Wensvoort, G. and C. Terpstra, *[Swine fever: a changing clinical picture]*. Tijdschr Diergeneeskd, 1985. **110**(7): p. 263-9.
57. Mittelholzer, C., et al., *Analysis of classical swine fever virus replication kinetics allows differentiation of highly virulent from avirulent strains*. Vet.Microbiol., 2000. **74**(4): p. 293-308.
58. Waldmann K.-H.; Wendt, M., *Lehrbuch der Schweinekrankheiten*. 4. Auflage ed2004, D-70469 Stuttgart: Parey Verlag in MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH & Co. KG.
59. Meyers, G., et al., *Bovine viral diarrhoea virus: Prevention of persistent foetal infection by a combination of two mutations affecting the Erns RNase and the Npro protease*. J.Virol., 2007. **0**(JVI.): p. 02372-06.
60. Schürmann, E.-M., *Viren der Bovinen Virusdiarrhoe und der Klassischen Schweinepest - Einfluss von Mutationen auf Persistenzentwicklung, Virulenz und Induktion einer Interferonantwort*, in *Fachbereich Veterinärmedizin 2010*, Justus-Liebig-Universität: Giessen.
61. Greiser-Wilke, I., et al., *Molecular epidemiology of a large classical swine fever epidemic in the European Union in 1997-1998*. Vet Microbiol, 2000. **77**(1-2): p. 17-27.
62. Stegeman, A., et al., *The 1997-1998 epidemic of classical swine fever in the Netherlands*. Vet Microbiol, 2000. **73**(2-3): p. 183-96.
63. Mangen, M.J., et al., *Spatial and stochastic simulation to compare two emergency-vaccination strategies with a marker vaccine in the 1997/1998 Dutch Classical Swine Fever epidemic*. Prev Vet Med, 2001. **48**(3): p. 177-200.
64. Collen, T. and W.I. Morrison, *CD4(+) T-cell responses to bovine viral diarrhoea virus in cattle*. Virus Res., 2000. **67**(1): p. 67-80.
65. Meyer, H.L., B.; Hermanns, W.; Trautwein, G., *Experimentelle, diaplastentare Infektion von Schweinefeten mit dem Virus der Europäischen Schweinepest (ESP)*. Virologische und serologische Untersuchungen in der postnatalen Phase. Fortschritte der Veterinärmedizin. Suppl.Zbl.Vet.Med., 1980: p. 140-144.
66. Meyers, G. and H.J. Thiel, *Molecular characterization of pestiviruses*. Advances in virus research, 1996. **47**: p. 53-117.
67. De Castro, M.P., *An infectious agent causing "spontaneous" degeneration of swine cells in vitro*. In Vitro, 1973. **9**(1): p. 8-16.

68. Gillespie, J.H., B.E. Sheffy, and J.A. Baker, *Propagation of hog cholera virus in tissue culture*. Proc Soc Exp Biol Med, 1960. **105**: p. 679-81.
69. Laude, H., [*Isolation of a cytolytic strain of hog cholera virus from IB-RS2 cells (author's trans)*]. Ann Microbiol (Paris), 1978. **129**(4): p. 553-61.
70. van Bekkum, J.G. and S.J. Barteling, *Plaque production by hog cholera virus*. Arch Gesamte Virusforsch, 1970. **32**(2): p. 185-200.
71. Aoki, H., et al., *Characterization of classical swine fever virus associated with defective interfering particles containing a cytopathogenic subgenomic RNA isolated from wild boar*. J Vet Med Sci, 2001. **63**(7): p. 751-8.
72. Aoki, H., et al., *Pathogenicity and kinetics of virus propagation in swine infected with the cytopathogenic classical swine fever virus containing defective interfering particles*. Arch Virol, 2003. **148**(2): p. 297-310.
73. Kosmidou, A., M. Büttner, and G. Meyers, *Isolation and characterization of cytopathogenic classical swine fever virus (CSFV)*. Arch Virol, 1998. **143**(7): p. 1295-309.
74. Meyers, G. and H.J. Thiel, *Cytopathogenicity of classical swine fever virus caused by defective interfering particles*. J Virol, 1995. **69**(6): p. 3683-3689.
75. Gallei, A., et al., *Cytopathogenicity of classical Swine Fever virus correlates with attenuation in the natural host*. J.Virol., 2008. **82**(19): p. 9717-9729.
76. Baigent, S.J., S. Goodbourn, and J.W. McCauley, *Differential activation of interferon regulatory factors-3 and -7 by non-cytopathogenic and cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus*. Vet.Immunol.Immunopathol., 2004. **100**(3-4): p. 135-144.
77. Baigent, S.J., et al., *Inhibition of beta interferon transcription by noncytopathogenic bovine viral diarrhea virus is through an interferon regulatory factor 3-dependent mechanism*. J.Virol., 2002. **76**(18): p. 8979-8988.
78. Bauhofer, O., et al., *Classical swine fever virus Npro interacts with interferon regulatory factor 3 and induces its proteasomal degradation*. J.Virol., 2007. **81**(7): p. 3087-3096.
79. Chen, Z., et al., *Ubiquitination and proteasomal degradation of interferon regulatory factor-3 induced by Npro from a cytopathic bovine viral diarrhea virus*. Virology, 2007. **366**(2): p. 277-292.
80. La Rocca, S.A., et al., *Loss of interferon regulatory factor 3 in cells infected with classical swine fever virus involves the N-terminal protease, Npro*. J.Virol., 2005. **79**(11): p. 7239-7247.
81. Rüggli, N., et al., *Classical swine fever virus interferes with cellular antiviral defense: evidence for a novel function of N(pro)*. J.Virol., 2003. **77**(13): p. 7645-7654.
82. Seago, J., et al., *The Npro product of classical swine fever virus and bovine viral diarrhea virus uses a conserved mechanism to target interferon regulatory factor-3*. J.Gen.Virol., 2007. **88**(Pt 11): p. 3002-3006.
83. Kawai, T. and S. Akira, *Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1143**: p. 1-20.
84. Burrack, S., et al., *A new type of intracellular retention signal identified in a pestivirus structural glycoprotein*. FASEB J, 2012. **26**(8): p. 3292-305.

85. Mätzener, P., et al., *The viral RNase E(rns) prevents IFN type-I triggering by pestiviral single- and double-stranded RNAs*. Virus Res., 2009. **140**(1-2): p. 15-23.
86. Meyer, C., et al., *Recovery of virulent and RNase-negative attenuated type 2 bovine viral diarrhoea viruses from infectious cDNA clones*. J.Virol., 2002. **76**(16): p. 8494-8503.
87. Peterhans, E. and M. Schweizer, *BVDV: a pestivirus inducing tolerance of the innate immune response*. Biologicals, 2013. **41**(1): p. 39-51.
88. Windisch, J.M., et al., *RNase of Classical swine fever virus: Biochemical characterization and inhibition by virus-neutralizing monoclonal antibodies*. J Virol, 1996. **70**: p. 352-358.
89. Schnorr, B.K., M., *Embryologie der Haustiere*. Vol. 5. Auflage. 2006, Stuttgart: Enke Verlag.
90. Frey, H.R., et al., *Experimental transplacental transmission of hog cholera virus in pigs. I. Virological and serological studies*. Zentralbl Veterinarmed B, 1980. **27**(2): p. 154-64.
91. Meyer, H., et al., *Experimental transplacental transmission of hog cholera virus in pigs. IV. Virological and serological studies in newborn piglets*. Zentralbl Veterinarmed B, 1981. **28**(8): p. 659-68.
92. Langedijk, J.P., et al., *A structural model of pestivirus E(rns) based on disulfide bond connectivity and homology modeling reveals an extremely rare vicinal disulfide*. J.Virol., 2002. **76**(20): p. 10383-10392.
93. Tews, B.A., E.M. Schurmann, and G. Meyers, *Mutation of cysteine 171 of pestivirus E rns RNase prevents homodimer formation and leads to attenuation of classical swine fever virus*. J Virol, 2009. **83**(10): p. 4823-34.
94. van Gennip, H.G., et al., *Dimerization of glycoprotein E(rns) of classical swine fever virus is not essential for viral replication and infection*. Arch.Virol., 2005. **150**(11): p. 2271-2286.
95. Kim, J.S., et al., *Mechanism of ribonuclease cytotoxicity*. J Biol Chem, 1995. **270**(52): p. 31097-102.
96. van Oirschot, J.T., *Vaccinology of classical swine fever: from lab to field*. Vet Microbiol, 2003. **96**(4): p. 367-84.
97. Graham, S.P., et al., *Challenge of pigs with classical swine fever viruses after C-strain vaccination reveals remarkably rapid protection and insights into early immunity*. PLoS One, 2012. **7**(1): p. e29310.
98. Tesmer, S., et al., *[Effect of attenuated hog cholera virus vaccine from the inoculation virus strain "C" on pregnant sows and their progeny]*. Monatsh Veterinarmed, 1973. **28**(7): p. 251-4.
99. Bran, L.M., S.; Popa, M.; Totorcea, N., *Trans-uterine and transplacental transmission of attenuated rabbit-adapted swine fever virus strains in pregnant sows*. Arch. Vet Bucuresti, 1971: p. 11-20.
100. Moormann, R.J.M., et al., *Infectious RNA transcribed from an engineered full-length cDNA template of the genome of a pestivirus*. J Virol, 1996. **70**(2): p. 763-770.
101. Wong, M.L., et al., *Cloning and sequencing of full-length cDNA of classical swine fever virus LPC strain*. Virus Genes, 2001. **23**(2): p. 187-92.
102. Wu, H.X., et al., *Attenuated lapinized chinese strain of classical swine fever virus: complete nucleotide sequence and character of 3'-noncoding region*. Virus Genes, 2001. **23**(1): p. 69-76.

103. Depner, K.R., et al., *Classical swine fever (CSF) marker vaccine. Trial II. Challenge study in pregnant sows*. Vet Microbiol, 2001. **83**(2): p. 107-20.
104. Floegel-Niesmann, G., *Classical swine fever (CSF) marker vaccine. Trial III. Evaluation of discriminatory ELISAs*. Vet Microbiol, 2001. **83**(2): p. 121-36.
105. Uttenthal, A., et al., *Classical swine fever (CSF) marker vaccine. Trial I. Challenge studies in weaner pigs*. Vet Microbiol, 2001. **83**(2): p. 85-106.
106. Schroeder, S., et al., *Evaluation of classical swine fever virus antibody detection assays with an emphasis on the differentiation of infected from vaccinated animals*. Rev Sci Tech, 2012. **31**(3): p. 997-1010.
107. de Smit, A.J., et al., *Duration of the protection of an E2 subunit marker vaccine against classical swine fever after a single vaccination*. Vet Microbiol, 2001. **78**(4): p. 307-17.
108. Beer, M., et al., *Novel marker vaccines against classical swine fever*. Vaccine, 2007. **25**(30): p. 5665-70.
109. Walders, B., et al., *Blending of a conventional Mycoplasma hyopneumoniae vaccine with a positive marker: tracking of immunised pigs by peptide-specific antibodies raised to the marker component*. Res Vet Sci, 2005. **78**(2): p. 135-41.
110. König, M., et al., *Classical swine fever virus: independent induction of protective immunity by two structural glycoproteins*. J Virol, 1995. **69**(10): p. 6479-86.
111. Hooft van Iddekinge, B.J., et al., *Comparison of the protective efficacy of recombinant pseudorabies viruses against pseudorabies and classical swine fever in pigs; influence of different promoters on gene expression and on protection*. Vaccine, 1996. **14**(1): p. 6-12.
112. Mulder, W.A., et al., *Virulence and pathogenesis of non-virulent and virulent strains of pseudorabies virus expressing envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus*. J Gen Virol, 1994. **75** (Pt 1): p. 117-24.
113. Peeters, B., et al., *Biologically safe, non-transmissible pseudorabies virus vector vaccine protects pigs against both Aujeszky's disease and classical swine fever*. J Gen Virol, 1997. **78** (Pt 12): p. 3311-5.
114. van Zijl, M., et al., *Live attenuated pseudorabies virus expressing envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus protects swine against both pseudorabies and hog cholera*. J Virol, 1991. **65**: p. 2761-2765.
115. Hammond, J.M., et al., *Protection of pigs against 'in contact' challenge with classical swine fever following oral or subcutaneous vaccination with a recombinant porcine adenovirus*. Virus Res, 2003. **97**(2): p. 151-7.
116. Hammond, J.M., et al., *Oral and sub-cutaneous vaccination of commercial pigs with a recombinant porcine adenovirus expressing the classical swine fever virus gp55 gene*. Arch Virol, 2001. **146**(9): p. 1787-93.
117. Hammond, J.M. and M.A. Johnson, *Porcine adenovirus as a delivery system for swine vaccines and immunotherapeutics*. Vet J, 2005. **169**(1): p. 17-27.
118. Hammond, J.M., et al., *Vaccination with a single dose of a recombinant porcine adenovirus expressing the classical swine fever virus gp55 (E2) gene protects pigs against classical swine fever*. Vaccine, 2000. **18**(11-12): p. 1040-50.

119. Hahn, J., et al., *Construction of recombinant swinepox viruses and expression of the classical swine fever virus E2-Protein*. J Virol Methods, 2001. **93**(1-2): p. 49-56.
120. Voigt, H., *Rekombinante Parapockenvakzine gegen klassische Schweinepest: Vergleichende Charakterisierung der Immunreaktion im Schwein.*, in *Fachbereich Veterinärmedizin 2005*, LMU München: München.
121. Frey, C.F., et al., *Classical swine fever virus replicon particles lacking the Erns gene: a potential marker vaccine for intradermal application*. Vet.Res., 2006. **37**(5): p. 655-670.
122. Maurer, R., et al., *Oronasal vaccination with classical swine fever virus (CSFV) replicon particles with either partial or complete deletion of the E2 gene induces partial protection against lethal challenge with highly virulent CSFV*. Vaccine, 2005. **23**(25): p. 3318-3328.
123. van Gennip, H.G., et al., *Experimental non-transmissible marker vaccines for classical swine fever (CSF) by trans-complementation of E(rns) or E2 of CSFV*. Vaccine, 2002. **20**(11-12): p. 1544-56.
124. Widjojatmodjo, M.N., et al., *Classical swine fever virus E(rns) deletion mutants: trans-complementation and potential use as nontransmissible, modified, live-attenuated marker vaccines*. J.Virol., 2000. **74**(7): p. 2973-2980.
125. Reimann, I., et al., *An avirulent chimeric Pestivirus with altered cell tropism protects pigs against lethal infection with classical swine fever virus*. Virology, 2004. **322**(1): p. 143-157.
126. Blome, S., et al., *Genetic differentiation of infected from vaccinated animals after implementation of an emergency vaccination strategy against classical swine fever in wild boar*. Vet Microbiol, 2011. **153**(3-4): p. 373-6.
127. Eble, P.L., et al., *Efficacy of chimeric Pestivirus vaccine candidates against classical swine fever: protection and DIVA characteristics*. Vet Microbiol, 2013. **162**(2-4): p. 437-46.
128. Gabriel, C., et al., *Towards licensing of CP7_E2alf as marker vaccine against classical swine fever-Duration of immunity*. Vaccine, 2012. **30**(19): p. 2928-36.
129. König, P., et al., *CP7_E2alf: a safe and efficient marker vaccine strain for oral immunisation of wild boar against Classical swine fever virus (CSFV)*. Vaccine, 2007. **25**(17): p. 3391-3399.
130. Tignon, M., et al., *Classical swine fever: comparison of oronasal immunisation with CP7E2alf marker and C-strain vaccines in domestic pigs*. Vet Microbiol, 2010. **142**(1-2): p. 59-68.
131. Aebischer, A., M. Muller, and M.A. Hofmann, *Two newly developed E(rns)-based ELISAs allow the differentiation of Classical Swine Fever virus-infected from marker-vaccinated animals and the discrimination of pestivirus antibodies*. Vet Microbiol, 2013. **161**(3-4): p. 274-85.
132. Corapi, W.V., R.O. Donis, and E.J. Dubovi, *Monoclonal antibody analyses of cytopathic and noncytopathic viruses from fatal bovine viral diarrhea infections*. J Virol, 1988. **62**: p. 2823-2827.
133. Becher, P., M. Orlich, and H.J. Thiel, *RNA recombination between persisting pestivirus and a vaccine strain: generation of cytopathogenic virus and induction of lethal disease*. J Virol, 2001. **75**(14): p. 6256-64.
134. König, P., et al., *Innocuousness and safety of classical swine fever marker vaccine candidate CP7_E2alf in non-target and target species*. Vaccine, 2011. **30**(1): p. 5-8.

135. Hoffmann, B., et al., *Classical swine fever virus detection: results of a real-time reverse transcription polymerase chain reaction ring trial conducted in the framework of the European network of excellence for epizootic disease diagnosis and control*. J Vet Diagn Invest, 2011. **23**(5): p. 999-1004.
136. Leifer, I., et al., *Development of a highly sensitive real-time RT-PCR protocol for the detection of Classical swine fever virus independent of the 5' untranslated region*. J Virol Methods, 2011. **171**(1): p. 314-7.
137. Leifer, I., et al., *Differentiation of C-strain "Riems" or CP7_E2alf vaccinated animals from animals infected by classical swine fever virus field strains using real-time RT-PCR*. J Virol Methods, 2009. **158**(1-2): p. 114-22.

Publikationsverzeichnis

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Schürmann, E.-M.; Wirtz, S.; Tews, B. A.; Meyers, G. (2010).: *Attenuierung des Virus der Klassischen Schweinepest durch Aufhebung der Homodimerisierung des E^{ms}-Proteins*; wissenschaftliches Poster; 31. Jahrestagung der DVG-FG AVID Bad Staffelstein / Kloster Banz.

Wirtz, S.; Schürmann, E.M.; Tews, B.A.; Meyers, G. (2011): *E^{ms} homodimer formation is important for virulence of classical swine fever virus (CSFV)*; wissenschaftliches Poster; 8th Pestivirus Symposium Hannover.

Danksagung

Diese Arbeit wurde von August 2009 bis September 2013 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gregor Meyers im Institut für Immunologie des Friedrich-Loeffler Instituts in Tübingen und auf der Insel Riems angefertigt und durch die Firma Boehringer Ingelheim Pharma GmbH und Co. KG finanziert.

Ich möchte mich gerne sehr herzlich bei allen bedanken, die mich bei der Bewältigung dieser Arbeit und in meiner Zeit am FLI auf verschiedene Weise unterstützt haben.

Dubbele Merci (ein herzliches Dankeschön!) an:

Prof. Dr. **Gregor Meyers** für die Bereitstellung dieses interessanten Themas, die stets kompetente und nette Betreuung und einen Arbeitsplatz mit Alb- bzw. Meerblick. Vielen Dank für das entgegengebrachte Vertrauen, für die vielen fruchtbringenden Gespräche und dafür, dass es keine dummen Fragen gibt. Es hat mir viel Freude gemacht, ein Teil Deiner Arbeitsgruppe zu sein.

Univ.-Prof. Dr. **Klaus Osterrieder** für seine prompte Bereitschaft, die Betreuung meiner Arbeit an der FU Berlin zu übernehmen.

alle ehemaligen und gegenwärtigen Mitglieder der AG Meyers und des gesamten IFl für die schöne Zeit und für Eure Kollegialität.

Im Einzelnen möchte ich mich gerne bedanken bei:

Daniel für die tatkräftige und kompetente Unterstützung in allen Fragen und Lebenslagen – im und außerhalb des Labors. Vielen Dank für Deine Freundschaft. Du hast meine Zeit auf der Insel durch Deine Gegenwart lustiger, leichter und lebenswerter gemacht.

Maren für die geduldige Begleitung meiner ersten Schritte im Labor.

Petra für die sympathische Einführung in die Geheimnisse der erfolgreichen Zellkultur.

Gaby - der Hüterin des gregorianischen Systems - für das Suchen und Finden unzähliger Dinge.

Derya für die tatkräftige Unterstützung meines ersten „eigenen“ Tierversuches. çok teşekkürler

Eva und **Anna** für den Zusammenhalt unter uns Tierärzten und die kompetente Einarbeitung bzw. Nachfolge.

Tine für Deine Hilfsbereitschaft und Diskussionsfreudigkeit in fachlichen und allen anderen Dingen.

Birke für die vielen hilfreichen Tips und Hilfestellungen – nicht nur was IFs angeht.

Maria für die lustige Zeit als Labor- und Arbeitsplatznachbarin.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich gerne bei meiner Familie bedanken, die mir in diesen vier Jahren den Rücken freigehalten und mir so diese Arbeit überhaupt erst möglich gemacht hat:

Papa, Du fehlst mir sehr. Vielen Dank für alles, was ich bin. Ich trage Dich immer in mir.

Mama, vielen Dank für Deine Liebe, Deine Unterstützung und Deinen festen Glauben an mich.

Benyamin, mein Fels in der Brandung. Vielen Dank für Dein Vertrauen, Deine Liebe und das Zuhause, das Du mir sein möchtest, egal an welchem Ende der Welt ich auch gerade bin.

Angela und **Savaş**, vielen Dank für Eure Unterstützung und für Eure liebevolle Fürsorge für meinen kleinen Gepetto.

Ganz zum Schluss noch ein Dankeschön an meine vierbeinigen Freunde, die vielleicht treuesten von allen:

Gepetto, der uns alle so gut im Griff hat. Danke an den pfiffigsten, charmantesten kleinen Hund der Welt für jedes Lächeln, das Du mir entlocken kannst. Vielen Dank auch an **Nestor**, unseren „großen Mann“, der bestimmt nach wie vor über uns wacht – auch wenn wir ihn jetzt nicht mehr sehen können.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis eingehalten.

Aachen, den 4.6.2014

Sabine Wirtz