

**DNA-Vakzinierung gegen *classical swine fever virus*-
Einfluß von Immunstimulatoren auf
die Effizienz**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt

von

Daniel Wienhold

aus

Zeitz

2002

Tag der mündlichen Prüfung: 26.02.2002

Dekan:	Prof. Dr. H.-U. Schnitzler
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. E. Pfaff
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. D. Ammermann

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Prof. Dr. Eberhard Pfaff an der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere in Tübingen angefertigt.

Bei all denjenigen, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben, möchte ich mich herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt:

-Herrn Prof. Dr. E. Pfaff für die Überlassung und Betreuung des Themas, seine wertvollen Anregungen und seine stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft

-Herrn Prof. Dr. D. Ammermann für die Bereitschaft, diese Arbeit zu begutachten und vor der Fakultät für Biologie zu vertreten

-Herrn Prof. Dr. M. Büttner und Frau B. Hoegen für die Überlassung zahlreicher Materialien und für die vielen wertvollen Tips

-Herrn PD. Dr. A. Saalmüller und Frau Dr. Dr. V. Fachinger für ihre wertvolle Unterstützung bei der Durchführung der Durchflusszytometrischen-Analysen

-Frau Dr. E. Armengol für ihre moralische Unterstützung und Einführung in die immunologischen Methoden

-Frau Sandra Bordel und Frau Ursel Czasko und Frau Gabriele Kuebart für ihre tatkräftige Unterstützung bei den vielen Routinearbeiten im Labor

-Herrn W. Kramer für seine Hilfe bei Ausführung der Fotoarbeiten

Besonders bedanken möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima

INHALTSVERZEICHNIS

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	EINLEITUNG	3
2.1	DNA-Immunisierung	3
2.1.1	Methode	3
2.1.2	Vor- und Nachteile	4
2.1.3	Anwendung	5
2.2	Interleukin 12	6
2.2.1	Struktur	6
2.2.2	Bildungsort	7
2.2.3	Biologische Eigenschaften	7
2.2.4	Regulation	8
2.3	Interleukin 18	9
2.3.1	Struktur	9
2.3.2	Bildungsort	9
2.3.3	Biologische Eigenschaften	9
2.3.4	Regulation	10
2.4	CD40-Ligand	11
2.4.1	Struktur	11
2.4.2	Bildungsort	11
2.4.3	Biologische Eigenschaften	11
2.4.4	Regulation	12
2.5	CSFV	12
2.5.1	Morphologie	12
2.5.2	Genomorganisation und Polyproteinprozessierung	13
2.6	Zielsetzung	14
3	ERGEBNISSE	15
3.1	Konstruktherstellung	15
3.1.1	Konstruktion der E2-Vakzine-Vektoren	15
3.1.2	Herstellung der E2-IL-18/IL-12/CD40L Vakzin-Vektoren	17
3.1.2.1	Isolation der cDNA für porcines IL-18	17
3.1.2.2	Isolation der cDNA für den porcinen CD40L	18
3.1.2.3	Konstruktion der E2-IL-18-/ IL-12-/ CD40L-Vakzine-Vektoren	19
3.2	Überprüfung der <i>in vitro</i> Expression der DNA-Vakzine-Konstrukte	25
3.2.1	<i>In vitro</i> Transkriptionsanalyse der DNA-Vakzine-Konstrukte	25
3.2.2	E2-Expressionsanalyse mittels Immunfluoreszenz	27
3.2.3	CD40L- Expressionsanalyse mittels Immunfluoreszenz	29
3.2.4	Nachweis der IL-18- und IL-12-Expression durch funktionelle NK-Assays	31

3.3	Analyse der DNA-Vakzine-Konstrukte im Tierversuch	34
3.3.1	Optimierung der Applikationsart und Belastungsinfektion	34
3.3.2	Vergleichende Analyse der unterschiedlichen E2-Vektorsysteme	36
3.3.2.1	Analyse der induzierten CSFV-spezifischen humoralen Immunantwort	37
3.3.2.2	Analyse der induzierten CSFV-spezifischen zellulären Immunantwort	42
3.3.2.3	Klinischer Verlauf und Virämie	45
3.3.3	Vergleichende Analyse der E2-IL-18/ IL-12/ CD40L Vektorsysteme	49
3.3.3.1	Analyse der induzierten CSFV-spezifischen humoralen Immunantwort	50
3.3.3.2	Klinischer Verlauf und Virämie	53
3.4	Darstellung von porcinem IL-12, IL-18 und dem CD40L im pro- und eukaryontischen System	61
3.4.1	Prokaryontische Expression und Reinigung des porcinen CD40L	61
3.4.2	Prokaryontische Expression und Reinigung von porcinem IL-12	64
3.4.2.1	Expression der p40-Untereinheit des IL-12	64
3.4.2.2	Expression der p35 Untereinheit des IL-12	67
3.4.3	Prokaryontische Expression und Reinigung von porcinem IL-18	69
3.4.4	Gewinnung spezifischer polyklonaler Antiseren für porcines IL-18 und den CD40L	70
3.4.5	Eukaryontische Expression von porcinem CD40L, IL-18 und IL-12	72
3.4.5.1	Herstellung einer stabilen 293-Zelllinie für porcinen CD40L	72
3.4.5.2	Herstellung einer stabilen 293-Zelllinie für porcines IL-18	74
3.4.5.3	Herstellung einer stabilen 293-Zelllinie für porcines IL-12	76
3.5	Darstellung des E2-Glykoproteins im prokaryontischen System	77
4	DISKUSSION	80
5	MATERIAL	93
5.1	Bakterienstämme, Zelllinien und Virusisolate	93
5.2	Zellkulturmedien	93
5.3	Plasmide und Nukleinsäuren	93
5.3.1	Plasmide	93
5.3.2	Nukleinsäuren	93
5.4	Oligonukleotide	94
5.5	Enzyme und Kits	95
5.5.1	Enzyme	95
5.5.2	Kits	96
5.6	Antiseren und Antikörper	96
5.7	Chemikalien und Reagenzien	97
5.8	Radioaktive Substanzen	99

5.9 Verbrauchsmaterial	99
5.10 Geräte und Laborhilfsmittel	99
5.10.1 Zentrifugen	101
5.10.2 Rotoren	101
5.10.3 Software	101
5.11 Versuchstiere	101
6 METHODEN	102
6.1 Prokaryotische Zellkultur	102
6.1.1 Kultivierung und Kryokonservierung von <i>Escherichia coli</i>	102
6.1.2 Herstellung Transformations-kompetenter <i>E.coli</i>	102
6.1.3 Transformation	103
6.2 Eukaryotische Zellkultur	103
6.2.1 Arbeiten mit humanen und porcinen Zelllinien	103
6.2.1.1 Kultivierung und Kryokonservierung	103
6.2.1.2 Isolierung von <i>PBMC</i>	104
6.2.1.3 Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen	104
6.2.1.4 Transfektion eukaryotischer Zellen	104
6.2.1.5 Herstellung stabiler Zelllinien	105
6.3 Allgemeine Arbeiten mit Nukleinsäuren	106
6.3.1 Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung	106
6.3.2 Phenol/Chloroform-Extraktion	106
6.3.3 Ethanolpräzipitation	107
6.4 Präparation, Analyse und Modifikation von DNA	107
6.4.1 Agarosegelelektrophorese	107
6.4.2 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen	108
6.4.3 Restriktionsverdau von DNA	108
6.4.4 Auffüllen zurückgesetzter 3' Enden	108
6.4.5 Abdau überhängender 5' und 3' Enden	109
6.4.6 Phosphorylierung von DNA	109
6.4.7 Dephosphorylierung von DNA	109
6.4.8 Ligation von DNA	110
6.4.9 Amplifikation von DNA-Fragmenten über PCR	110
6.4.9.1 Präparative PCR-Ansätze:	110
6.4.9.2 Analytische PCR-Ansätze:	110
6.4.10 Präparation von Plasmid-DNA	111
6.4.10.1 Analytische Isolierung von Plasmid-DNA	111
6.4.10.2 Präparative Isolierung von Plasmid-DNA	112
6.4.11 Sequenzierung von DNA	114
6.4.12 Herstellung und Reinigung synthetischer Oligonukleotide	115
6.4.13 Denaturierende Harnstoff-Polyacrylamidgele:	116

6.5	Präparation und Analyse von RNA	116
6.5.1	Isolierung von RNA aus Eukaryoten-Zellen	116
6.5.2	RNA-Agarosegelelektrophorese [KROCZEK, 1990]	117
6.5.3	<i>In vitro</i> Transkription	117
6.5.3.1	Gewinnung IL-18 und CD40L spezifischer Fragmente	118
6.6	Protein-analytische Methoden	118
6.6.1	Konzentrationsbestimmung	118
6.6.2	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	119
6.6.3	<i>Coomassie</i> -Färbung von Proteinen	119
6.6.4	Silberfärbung von Proteinen	120
6.6.5	Detektion [³⁵ S]-markierter Proteine	120
6.6.6	Western Blot Analyse	120
6.6.7	Radioimmunpräzipitations-Analyse	121
6.6.7.1	Metabolische Proteinmarkierung	121
6.6.7.2	Herstellung der Zellysate	121
6.6.7.3	Radioimmunpräzipitation	122
6.7	Bakterielle Expression viraler und porciner Proteine	122
6.8	Native Aufreinigung rekombinanter Fusionsproteine über Ni²⁺-NTA-Agarose	123
6.9	Denaturierende Aufreinigung rekombinanter Fusionsproteine über Ni²⁺-NTA-Agarose	124
6.10	Reinigung rekombinanter Proteine über Elektroelution	125
6.11	Virologische Methoden	125
6.11.1	Virusanzucht	125
6.11.2	Virustitration	126
6.11.3	Virusnachweis aus Blut, Organen und Nasentupfern	126
6.12	Immunologische Methoden	127
6.12.1	Gewinnung von Serum	127
6.12.2	Funktionelle Testsysteme	127
6.12.2.1	Lymphoproliferationstest	127
6.12.2.2	Analyse des Einflusses von IL-18 und IL-12 auf die zytolytischen Aktivität natürlicher Killerzellen	128
6.12.2.3	Nachweis der IL-12 Expression stabiler 293-Zelllinien mittels IFN- γ Produktion nativer PBMC	129
6.12.2.4	IFN- γ -ELISPOT-Test	129
6.12.3	Nichtfunktionelle Testsysteme	130
6.12.3.1	CSFV spezifischer Kompetitions-ELISA	130
6.12.3.2	IgG1/IgG2-isotypspezifischer ELISA	130
6.12.3.3	IFN- γ ELISA	130
6.12.3.4	Serumneutralisationstest	131
6.12.4	Immunfluoreszenzanalyse	131
6.12.4.1	Oberflächenfluoreszenzanalyse	131
6.12.4.2	Cytoplasmatische Fluoreszenzanalyse	131
6.12.4.3	Charakterisierung von Leukozytenpopulationen mit Hilfe der Durchflußzytometrie	132

6.12.5	Infektionsversuche	133
6.12.6	Immunisierungsversuche	133
7	ANHANG	134
7.1	Nukleotid- und Aminosäuresequenz der isolierten porcinen CD40L-cDNA	134
7.2	Aminosäuresequenzvergleich der verschiedenen CD40-Liganden	135
8	LITERATUR	136

ABKÜRZUNGEN

6xHis	Hexahistidin
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BFAV	Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
CIP	<i>calf intestinal phosphatase</i>
CMV	Cytomegalovirus
cmp	<i>counts per minute</i>
CSFV	<i>classical swine fever virus</i>
dATP	2'-Desoxy-Adenosin-5'-Triphosphat
dCTP	2'-Desoxy-Cytidin-5'-Triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	2'-Desoxy-Guanosin-5'-Triphosphat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxy-Thymidin-5'-Triphosphat
dUTP	2'-Desoxy-Uridin-5'-Triphosphat
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
ELISA	Enzym gekoppelter Immunadsorptionstest
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FSC	Vorwärtsstreulicht
IFN	Interferon
IRES	<i>internal ribosome entry site</i>
kb	1000 Basenpaare
kDa	1000 Dalton
g	Gramm
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
h	Stunde
HC	<i>high control</i>

LC	<i>low control</i>
μ	mikro
m	milli
M	molar (mol/ l)
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MEM	Minimalmedium
MHC	Hauptisokompatibilitätskomplex
min	Minute
<i>moi</i>	multiplicity of infection
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NK-Zellen	Zellen mit natürlicher Killeraktivität
NS	<i>non structural</i>
NTA	Nitrilotriacetat
N-Terminus	Amino-Terminus
NTR	nichttranslatierte Region
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
p	pico
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phoshat bufferd saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
RIP	Radioimmunpräzipitation
RNA	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonuklease
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Reverse Transkriptase
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Seitwärtsstreulicht
Tab.	Tabelle
TCID	<i>tissue culture infectious dose</i>
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Unit: Einheit für Enzymaktivität
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
W	Watt

Für die Bezeichnung von Nukleotiden und Aminosäuren wurden die international gebräuchlichen IUB-Einbuchstaben-Codes verwendet.

1 ZUSAMMENFASSUNG

Das Klassische Schweinepest Virus (CSFV) verursacht global eine der wirtschaftlich bedeutensten Tierseuchen. Die eingesetzten klassischen Vakzinen gegen CSFV, die entweder aus attenuierten oder inaktivierten Viren bestehen, erlauben keine serologische Unterscheidung zwischen vakzinierten und infizierten Tieren. Aus diesem Grund wurden von der EU Bekämpfungsmaßnahmen erlassen, die auf einem Vakzinationsverbot und der Ausmerzung infizierter Bestände beruhen. DNA-Vakzinen und Peptidvakzinen könnten als Alternative zu den beschriebenen klassischen Vakzinen eingesetzt werden.

Das Hauptziel dieser Arbeit, bestand daher in der Herstellung einer wirksamen CSFV-spezifischen DNA-Vakzine. Hierfür wurde das E2-Glykoprotein des CSFV in eine Reihe verschiedener eukaryontischer Expressionsvektoren (pcDNA4HisMax und pRC/RSV) kloniert die sich in der Auswahl der verwendeten Promotoren (CMV oder RSV) sowie in den zusätzlich inserierten Genen von Zytokinen und immunstimulatorischen Molekülen (IL-12, IL-18, CD40L) unterschieden. Die anschließende Überprüfung der Expression der E2, IL-12, IL-18 und CD40L-Gene, in den Konstrukten, erfolgte mittels Transfektion in Zellen und anschließender Immunfluoreszenzanalyse bzw. durch funktionelle Tests.

In den Vakzinierungsversuchen im Schwein wurde in einem ersten Schritt die Applikationsart (intramuskulär (i.m.) oder intradermal (i.d.)) sowie die Infektionsdosis optimiert, wobei sich die intramuskuläre Injektion als effektivere Applikationsart erwies. Danach wurde die Schutzwirkung der E2-Grundkonstrukte im Verhältnis zur Schutzwirkung von E2-Konstrukten die zusätzlich die Sequenz eines immunstimulatorischen Moleküls (IL-12, IL-18, CD40L) enthielten analysiert.

Hierbei zeigten sich deutliche Unterschiede in der Wirksamkeit der einzelnen Konstrukte. Während Immunisierungen mit dem pcDNA4HisMax-E2-IL-12 Konstrukt zu einer Verschlechterung der induzierten E2-spezifischen humoralen Immunantwort und Überlebensrate im Verhältnis zu den E2-Grundkonstrukt führte, zeigten das

pcDNA4HisMax-E2-IL-18 Konstrukt eine Steigerung der CSFV-spezifischen Immunantwort aufgrund des inserierten immunstimulatorischen Moleküles.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit bestand in der pro- und eukaryontischen Expression der für die DNA-Vakzine eingesetzten immunstimulatorischen bzw. CSFV-spezifischen Moleküle. Im Verlauf dieses Projektes gelang es, porcines IL-18, den CD40L sowie die p40 Untereinheiten des IL-12, prokaryontisch zu exprimieren, aufzureinigen und über Western Blot bzw. Immunfluoreszenz nachzuweisen. Das exprimierte und aufgereinigte IL-18 und der CD40L wurden zur Gewinnung spezifischer polyklonaler Seren eingesetzt. Für die p35-Untereinheit des IL-12-, und das E2-Glykoprotein gelang ein Nachweis der Expression als GST-(p35) bzw. (E2)-Fusionsprotein durch Western Blot Analyse. Außerdem wurden für die eukaryontische Expression der Moleküle stabile 293-Zelllinien hergestellt und die Expression der CD40L, IL-18 und IL-12-Gene durch Immunfluoreszenzanalyse, Radioimmunpräzipitation, Western Blot bzw. über funktionelle Tests nachgewiesen.

2 EINLEITUNG

2.1 DNA-Immunisierung

Seit ihrer Entdeckung im Jahre 1982 [Will, 1982] wird die Anwendbarkeit der DNA-Immunisierung zur Bekämpfung verschiedenster Erkrankungen analysiert und kontrovers diskutiert. Dabei umfasst das mögliche Einsatzspektrum u.a. bakterielle, virale und parasitäre Erkrankungen. Des Weiteren wird eine Anwendung von DNA-Vakzinen für Tumor-, Autoimmun- und Allergitherapien untersucht.

2.1.1 Methode

Bei der DNA-Vakzinierung erfolgt die Immunisierung nicht wie bei herkömmlichen Vakzinen durch ein exogen zugeführtes Antigen, sondern durch Applikation eines eukaryontischen Expressionsvektors, wodurch nach Aufnahme der DNA in die Zelle eine endogene Proteinexpression mit anschließender Antigenpräsentation erfolgt.

Die Gene der zur Immunisierung eingesetzten Proteine werden in eukaryontische Expressionsvektoren kloniert und stehen dort unter der Kontrolle starker viraler Promotoren. Obwohl es eine Vielzahl von möglichen Promotoren gibt, sind die am häufigsten in den Vakzine-Vektoren eingesetzten Promotoren der des Humanen Cytomegalievirus (CMV) und des Rous-Sarkom-Virus (RSV). Beide Promotoren zeigten im Vergleich zu anderen bei Testansätzen mit einem Luciferase-Reportergen die höchsten Expressionswerte [Manthorpe, 1993]. Für die Konstruktion polyvalenter DNA-Vakzinen oder DNA-Vakzinen mit Adjuvants-Effekt ist es notwendig Vektoren zu konstruieren, die eine Coexpression verschiedener Antigene oder eines Antigen-Zytokin-Gemisches ermöglichen.

Der einfachste Weg besteht in der Koinjektion von unterschiedlichen Expressionsplasmiden [Operschall, 2000]. Eine andere Möglichkeit ist die Herstellung eines Fusionsproteins, sei es als Polyepitop- [Thomson, 1996], Antigen-Ligand- [Boyle, 1998] oder Antigen-Zytokin-Vakzine [Kim, 1997; Maecker, 1997]. Die verbreitetste Methode besteht jedoch in der Konstruktion von Plasmiden mit mehreren unabhängigen Transkriptionseinheiten [Sin, 1999; Lu, 1999; Larsen 1998]. Für die Koexpression der Untereinheiten heterodimerer Moleküle (z.B. IL-12) ist die

Verwendung eines polycistronischen Konstruktes [Johanning, 1995; Clarke, 1997] oder eines Konstruktes mit bidirektionalem Promotor [Kwissa, 2000] erforderlich.

Sowohl das Trägermedium als auch die Applikation der DNA-Vakzine entscheiden über die jeweilige Menge von DNA, die von den Zellen des zu immunisierenden Organismus aufgenommen wird. Für das verwendete Trägermedium haben sich in den letzten Jahren drei Grundprinzipien durchgesetzt. Die wohl einfachste besteht in der Injektion nackter DNA [Davis, 1993; Wolff, 1992]. Andere Trägersysteme verpacken die DNA mittels Liposomen [Toda, 1997; Dow, 1999], Virosomen [Chen, 1998] oder in einem Polymerkomplex [Goldman, 1997].

Für die Applikation der DNA existieren ebenfalls unterschiedliche Möglichkeiten. Die gebräuchlichste besteht in einer intramuskulären oder intradermalen Injektion. Außerdem wird die DNA aber auch intravenös, intraperitoneal, intralymphatisch und subkutan appliziert [Wolff, 1992; Böhm, 1998; Maloy, 2001]. Eine weitere Möglichkeit ist der Einsatz einer Biolistic-Transfection, ein Verfahren, bei dem die DNA an 2-5 µm große Goldpartikel gebunden wird und diese anschließend durch Hochdruck in das Gewebe geschossen werden [Porgador, 1998; Torres, 1997].

Nach Applikation der DNA wird diese von den Zellen aufgenommen und die enthaltenen Fremdgene exprimiert und modifiziert. Durch diese *in situ*-Expression ist sowohl eine MHC-I- als auch eine MHC-II restringierte Antigenpräsentation möglich, wodurch es zur Induktion einer humoralen und zellvermittelten Immunantwort des Organismus kommen kann.

2.1.2 Vor- und Nachteile

Die Erfahrungen, die in den letzten Jahren mit DNA-Vakzinen gemacht wurden, zeigen deutlich die Attraktivität der Methode in Therapie und Prophylaxe. Dies ist zum einen auf die langanhaltende Aktivierung der zellulären und humoralen Immunantwort [Davis, 1996], durch die kontinuierliche Proteinexpression, sowie auf die hohe biologische Sicherheit zurückzuführen, da man gänzlich auf infektiöse Erreger verzichten kann. Außerdem stellt die schnelle und kostengünstige Herstellung der Impfstoffe, im Vergleich zur aufwendigen Reinigung von Antigenen für herkömmliche Vakzinen, sowie die unaufwendige Lagerung und einfache Handhabung hinsichtlich der Applikation (z.B. ist keine besondere Kühlung der

Proben erforderlich) einen kommerziellen Anreiz zur Weiterentwicklung der Methode dar. Gleichzeitig bietet die Methode die Möglichkeit einer Markervakzine, was besonders im Hinblick auf Erkrankungen wie CSF und MKS von Bedeutung ist, da eine Immunisierung der Tiere nur sinnvoll ist, wenn eine Unterscheidung zwischen vakzinierten und infizierten Tieren möglich wäre.

Ein Nachteil der Methode besteht in einer eventuell auftretenden Insertionsmutagenese durch Integration des Plasmides in regulatorische Sequenzen des eukaryontischen Genomes. Jedoch konnte bisher ein Einbau mit nachweisbaren Störungen des Stoffwechsels nicht bestätigt werden [Wolff, 1992].

2.1.3 Anwendung

Die bisher gewonnenen Daten zeigen, dass DNA-Vakzinen die Fähigkeit haben, unterschiedliche Spezies vor einer großen Anzahl bakterieller, viraler und parasitärer Erkrankungen zu schützen. Außerdem gewinnen DNA-Vakzinen zunehmend für die Tumor-, Autoimmun- und Allergitherapie an Bedeutung. Tabelle 1 gibt im Folgenden eine kurze Übersicht über Bereiche, in denen DNA-Vakzinierung eingesetzt wird.

Viren	CSFV [Andrew, 2000; Hammond, 2001] HBV [Davis, 1996 ; Michel, 1995 ; Kwissa, 2000i] HCV [Forns, 2000; Inchauspe, 1997] HIV [Kim, 1999; Akahata, 2000 Kaneko, 2000] Influenza [Wong, 2001; Olsen, 2000; Lunn, 1999] BVDV [Harpin, 1999; Nobiron, 2000/1] FIV [Boretti, 2000]
--------------	---

Bakterien	<i>Mycobakteria leprae</i> [Lowrie, 1994] <i>Mycobakteria bovis</i> [Chambers, 2000] <i>Yersinia enterocolitica</i> [Hornef, 2000]
Parasiten	<i>Schistosoma japonicum</i> [Waine, 1997; Yang 1995] <i>Leishmania major</i> [Gurunathan, 1997] <i>Schistosoma mansoni</i> [Dupre, 2001]
Tumor Vakzinen	[Wei, 1999; Neglia, 1999; Iwasaki, 1998]
Autoimmun-Vakzinen	[Waisman, 1996; Ruiz, 1999]
Allergie-Vakzinen	[Hsu, 1996; Roman, 1997; Spiegelberg, 1997]

2.2 Interleukin 12

2.2.1 Struktur

Das Interleukin 12 (IL-12) ist das einzige bisher bekannte Interleukin mit heterodimerer Struktur. Es besteht aus zwei über Disulfidbrücken gekoppelten Untereinheiten, einer 35 kDa- (p35) und einer 40 kDa (p40) Untereinheit [Kobayashi, 1989; Stern, 1990; Wolf, 1991; Podlaski, 1992; Schoenhaut, 1992]. Die porcine p35-Untereinheit besteht aus 257- und die p40-Untereinheit aus 325 Aminosäuren mit je drei potentiellen Glycosylierungsstellen [Kokuho, 1999]. Die Untereinheiten zeigen untereinander keinerlei Homologien in der Aminosäuresequenz. Vergleicht man die Aminosäuresequenz von porcinem und humanem IL-12, so stellt man eine 85%ige Übereinstimmung fest [Foss, 1997].

Die biologische Aktivität des IL-12 ist immer an beide Ketten und deren Verknüpfung über Disulfidbrücken gebunden. Es konnte keine Aktivität einer Untereinheit oder eines homologen Dimeres festgestellt werden [Wolf, 1991; Gubler, 1991; Podlaski, 1992]. Die Rezeptorbindungsstelle ist auf der p40-Untereinheit lokalisiert. Etwa 20-40% der synthetisierten p40 Untereinheiten liegen unter normalen Bedingungen als Homodimer im Serum vor [Heinzel, 1997]. Bindung von Monomeren oder Homodimeren der p40-Untereinheit an den IL-12-Rezeptor führt zur Hemmung der Wirkung des IL-12 Heterodimers. Diese Tatsache könnte bei der Feedbackregulation der T_H1-

Zellproliferation und Differenzierung eine entscheidende Rolle spielen [Gillesen, 1995; Ling, 1995; Gately, 1996]. Untersuchungen an hybriden Heterodimeren aus Mensch und Maus zeigten, dass die Spezifität von IL-12 an die p35 Untereinheit gebunden ist [Schonhaut, 1992].

2.2.2 Bildungsort

Der primäre Bildungsort für IL-12 sind die „ **Peripheral Blood Mononuclear Cells**“ (PBMC). Als Produzentenzellen kommen sowohl Monozyten und Makrophagen als auch B-Zellen in Betracht [D'Andrea, 1992].

Beide Untereinheiten wurden beim Schwein außer in Makrophagen auch in lymphoidem Gewebe, Thymus, Milz und den Peyerschen Plaques gefunden. Außerdem konnten nach Stimulation von alveolaren Makrophagen mit LPS oder SAC erhöhte Mengen der mRNA der p40-, nicht aber der p35-Untereinheit nachgewiesen werden [Foss, 1997].

2.2.3 Biologische Eigenschaften

Die zentrale Aufgabe des IL-12 liegt in der Festlegung der T-Zell-Differenzierungsrichtung. Untersuchungen im humanen [Manetti, 1993; Wu, 1993, Marshall, 1995] und murinen [Hsieh, 1993; Seder, 1993; Schmitt, 1994] System zeigte, dass IL-12 eine T_H1 -Antwort fördert. Dies erfolgt auf drei Hauptwegen: 1. Durch Induktion der Differenzierung von T_H0 - zu T_H1 -Zellen [Wu, 1993; Seder, 1993]. 2. wirkt IL-12 als ein Costimulus bei der IFN- γ -Sekretion durch die T_H1 -Zellen [Murphy, 1994; DeKruyff, 1995] und 3. durch Stimulation der Entwicklung IFN- γ produzierender T_H1 -Zellen aus der T-Gedächtnis-Zellpopulation [Manetti, 1993; Marshall, 1995; DeKruyff, 1995].

Obwohl die Hauptaufgabe von IL-12 darin besteht eine T_H1 -Antwort zu fördern, konnte in einigen experimentellen Ansätzen eine Verstärkung der T_H2 -Antwort beobachtet werden [Wang, 1994; Schmitt, 1994; Wynn, 1995]. Untersuchungen ergaben, dass IL-12 die IgG2a-, IgG2b- und IgG3- vermittelte T_H1 -assoziierte humorale Immunantwort verstärken kann [Germann, 1995; Buchanan, 1995], während es die T_H2 -assoziierte humorale Immunantwort via IgG1 bei Primärimmunisierung supprimiert [Buchanan, 1995; McKnight, 1994]. Interessanterweise zeigten mehrfach

immunisierte Tiere durch IL-12 eine Verstärkung der IgG1-Produktion [Germann,1995; Buchanan, 1995]. Ob und wie (z.B mittels Induktion der IFN- γ -Sekretion) IL-12 in die humorale Immunantwort eingreift, scheint somit abhängig von dem Zytokinmilieu und dem Entwicklungsstatus der T-Zellen zu sein [Kiniwa, 1992; Morris, 1994; King 1995; Sypek, 1993]. Des weiteren steigert IL-12 nachweislich die zytolytische Aktivität von NK-Zellen (Natural Killer Cells) [Kobayashi, 1989; Stern, 1990;] und CTL (Cytolytic- T-Lymphocyte) [Gately, 1992/94; Chouaib, 1994] und induziert die Proliferation und Differenzierung von hematopoetischen Stammzellen [Jacobsen, 1993; Hirayama, 1994; Bellone, 1994]. Klinische Untersuchungen in den letzten Jahren zeigten außerdem, dass IL-12 eine Rolle bei T_H2-assoziierten Erkrankungen wie Asthma [Wills-Karp, 2001] und Allergien [van der Pouw Kraan, 1997] zu spielen scheint und Potentiale für eine Anwendung in der Krebstherapie enthält [Su, 2001; Oshikawa, 1999].

2.2.4 Regulation

Die IL-12 Produktion wird durch ein Netzwerk von immunologischen Faktoren und Regelmechanismen kontrolliert. Bis heute ist es trotz zahlreicher Bemühungen nur gelungen, Teile dieses Regelwerks aufzuklären. Ein für die IL-12 Produktion stimulierender Einfluss geht von dem, durch NK-Zellen und aktivierte T_H1-Zellen gebildetem IFN- γ aus, was dann wieder durch die gesteigerte IL-12 Produktion der Monozyten und Makrophagen über positive Rückkopplung auf NK-Zellen und T_H1-Zellen wirkt. Interleukin 4, 10 sowie TGF- β und TNF- α hingegen hemmen die IL-12 Produktion, so dass jeweils die Aktivierung des einen Abwehrsystems das andere reprimiert [Trinchieri, 1993; Ma, 2000; Koch, 1996].

Ein weiterer regulatorischer Aspekt ist die Bindung des p40-Homodimers an den Interleukin 12-Rezeptor. Dadurch kommt es zu einer verminderten Wirkung des IL-12 Heterodimers an den jeweiligen Effektorzellen [Gillesen, 1995; Mattner, 1993; Ling, 1995].

2.3 Interleukin 18

2.3.1 Struktur

Interleukin 18 (IL-18) ist ein monomeres Molekül bestehend aus 192 Aminosäuren mit zwei potentiellen Glycosylierungsstellen und einer 35 Aminosäuren langen Leadersequenz [Oem, 2000]. Das Fehlen eines typisch hydrophoben Signalpeptides deutet wie bei humanem und caninem IL-18 auf eine Synthese als 24 kDa großes Vorläuferprotein hin. Dieses wird dann anschließend proteolytisch in ein biologisch aktives 18 kDa Protein gespalten [Muneta, 2001; Ghayur, 1997]. Das porcine IL-18 zeigt eine Aminosäurehomologie von 79 % für humanes und 80,4 % für canines IL-18 [Oem, 2000; Ushio, 1996].

2.3.2 Bildungsort

Eine IL-18 Produktion konnte bisher für PBMC, besonders Makrophagen [Puren, 1999], dendritische Zellen [Stoll, 1998], epidermale Zellen [Stoll, 1997], intestinale Epithelzellen [Takeuchi, 1997] sowie in Zellen des endokrinen [Conti, 1997/2000] und zentralnervösen [Conti, 1999; Prinz, 1999] Systems nachgewiesen werden.

Speziell beim Schwein wurde außer durch die PBMC eine starke konstitutive Expression in der Milz, den Lymphknoten und im Interstinaltrakt und eine schwache in der Lunge und der Niere nachgewiesen [Fournout, 2000].

2.3.3 Biologische Eigenschaften

IL-18 wurde zuerst beschrieben als ein starker IFN- γ induzierender Faktor, besonders in Anwesenheit von IL-12 werden große Mengen von IFN- γ durch T_H1- und NK-Zellen synthetisiert [Okamura, 1995/1998]. Außerdem wirkt es als kostimulatorisches Molekül bei der Produktion von IL-2 und GM-CSF [Yoshimoto, 1998; Kohno, 1997]. Im Gegensatz zu IL-12, das zur Stimulation der T-Zelldifferenzierung befähigt ist, beschleunigt IL-18 ausschließlich die durch IL-12 induzierte Differenzierung der T_H0-Zellen. Des weiteren steigert IL-18 die zytolytische Aktivität von NK-Zellen und CTLs [Dao, 1998; Kohyama, 1998].

Anders als IL-12 hat IL-18 die Fähigkeit, ähnlich wie IL-4 eine T_H2-Zellentwicklung zu induzieren. Es konnte gezeigt werden, dass bei Inkubation von nativen T_H0 –Zellen

mit IL-18 und IL-2 die Produktion großer Mengen von IL-4 und IL-13 induziert werden kann [Yoshimoto, 2000]. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch nach der Inkubation von Basophilen und Mastzellen mit IL-3 und IL-18 erhalten [Yoshimoto, 1999]. Es scheint also, dass IL-18 die T_H1 - oder T_H2 -vermittelte Immunantwort abhängig vom Cytokinmilieu (IL-12 + IL-18 \rightarrow T_H1 , IL-2 + IL-18 \rightarrow T_H2) stimuliert.

Eine entscheidende Rolle spielt IL-18 auch bei der Steuerung der IgE Produktion. Während bei Koinkubation von IL-12 und IL-18 durch die gesteigerte IFN- γ Sekretion eine Inhibition der IgE Produktion erfolgt [Yoshimoto, 1997], hat IL-18 allein die Fähigkeit, dosisabhängig die IgE Konzentration im selben Testsystem zu steigern [Yoshimoto, 2000; Hoshino, 2000].

In Verbindung mit IL-12 konnte in verschiedenen Testsystemen ein anticancerogener Effekt von IL-18 nachgewiesen werden [Hara, 2000; Yamanaka, 1999], und ähnlich wie IL-12 scheint IL-18 außerdem eine wichtige Rolle bei Allergieerkrankungen zu spielen [Hofstra, 1998].

2.3.4 Regulation

Obwohl IFN- α und - β die IL-18 Produktion inhibieren, ist die Regulation der Sekretion von aktivem IL-18 hauptsächlich von der intrazellulären Prozessiermaschinerie abhängig. Die meisten Zytokine tragen sogenannte RNA-destabilisierende Elemente [Cosman, 1987], nicht aber IL-18, was erklären könnte, warum IL-18 konstitutiv exprimiert und anschließend in seiner inaktiven Vorläuferform länger als andere Zytokine in der Zelle vorliegt [Gu, 1997; Okamura, 1995]. Dieses IL-18 Vorläuferprotein wird erst nach Spaltung durch das intrazelluläre IL-1 β -Converting-Enzym aktiviert [Muneta, 2001; Gu, 1997; Ghayur, 1997]. Eine Inhibition der Cystein-Proteinase (IL-1 β -Converting-Enzym) führt entsprechend zu einer Reduktion der IL-18 Sekretion [Gu, 1997]. Wie das intrazelluläre IL-1 β -Converting-Enzym kann allerdings auch die auf der Oberfläche exponierte Proteinase-3 eine Spaltung des Vorläuferproteins in die aktive Form vornehmen [Csernok, 1994; Fantuzzi, 1999].

2.4 CD40-Ligand

2.4.1 Struktur

Der porcine CD40-Ligand (CD40L) ist ein Typ II- Membranprotein, welches aus drei identischen Polypeptidketten besteht [van Kooten, 1996; Foy, 1996]. Der offene Leserahmen des CD40L umspannt 261 Aminosäuren und codiert für ein 33 kDa Protein. Wie für murinen und humanen CD40L beschrieben enthält der porcine eine 32 Aminosäuren lange Signal-Anker-Sequenz [Armitage, 1992; Gauchat, 1993]. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass aufgrund der hohen Aminosäurehomologie (83 %) eine lösliche Form des murinen CD40L an humanes CD40 gebunden wird [Lane, 1993], was abhängig von der Aminosäurehomologie auf eine nicht speziesspezifische Bindung hindeutet.

2.4.2 Bildungsort

Der CD40L wird primär auf aktivierten T-Zellen [Armitage, 1992], aber auch von B-Zellen, Monozyten, Makrophagen sowie epithelialen, endothelialen und dendritischen Zellen exprimiert [Clarke, 2000; Clark, 1990].

2.4.3 Biologische Eigenschaften

Die Interaktion zwischen CD40L und CD40 ist von entscheidender Bedeutung für die Aktivierung der humoralen Immunantwort. Bei Interaktion zwischen antigenbindenden B-Zellen und aktivierten T_H2-Zellen kommt es zur Expression des CD40L auf T_H2-Zellen. Die Bindung von CD40L an CD40 bewirkt die Sekretion von IL-4, IL-5 und IL-6. Dies führt zur Induktion der Proliferation und Differenzierung von B-Zellen zu antikörpersezernierenden Plasmazellen [Banchereau, 1994/i; Foy 1996]. In Verbindung mit anderen Zytokinen übernimmt CD40L eine wichtige Aufgabe beim Antikörper Isotypenwechsel. Untersuchungen an humanen B-Zellen zeigten, dass IL-2 und IL-10 in Verbindung mit CD40L die IgM-, IgG1- und IgA- Sekretion stimulieren, während IL-4 zu einer Erhöhung der IgE- und IgG4- Sekretion beiträgt. Gleichzeitig können die stimulatorischen Effekte (z.B. B-Zellproliferation) des CD40L durch TGF- β inhibiert werden [Armitage, 1992]. Defekte in der CD40L-Expression sind daher in der Regel mit schweren Beeinträchtigungen des Immunsystems korreliert [Aruffo,

1993; Korthauer, 1993]. Die Untersuchungen der immunologischen Eigenschaften des CD40L fokussieren sich u.a. auf mögliche Anwendungen in der Tumorthherapie bzw. bei DNA-Vakzinierung [Gurunathan, 1998; Ihata, 1999].

2.4.4 Regulation

Die Regulation der CD40L Expression ist noch nicht vollständig aufgeklärt, scheint aber zu einem großen Teil vom umgebenden Zytokinmilieu abhängig zu sein. IL-12 und IL-18 haben die Fähigkeit, die CD40L-Expression in verschiedenen Testsystemen zu stimulieren [Peng, 1997; Hoshino, 2000]. Ähnlich wie bei der Inhibition der B-Zellproliferation wurde eine Inhibition der Expression auf T_H2-Zellen durch TGF- β beobachtet [Meenakshi, 1993; Roy, 1993]. Eine Sonderstellung scheint IFN- γ einzunehmen. Während IFN- γ die CD40L-Expression auf NK-Zellen stimuliert, führt es bei aktivierten T_H1- und T_H2-Zellen zu einer Inhibition der Expression [Jyothi, 2000; Meenakshi, 1993].

2.5 CSFV

Die klassische Schweinepest ist eine der ökonomisch bedeutendsten Tierseuchen die durch das "classical swine fever virus" (CSFV) verursacht wird [Edwards, 2000]. Das Virus gehört zum Genus der Pestiviren, zu dem außerdem das Border Disease Virus (BDV) und das Virus der Bovinen Virusdiarrhoe (BVDV) gehören. Den Genus Pestiviren zählt man heute aufgrund der Genomorganisation und Replikationsstrategie zur Familie der Flaviviridae, zu der weiterhin das Hepatitis C Virus und das Flavivirus gehören. Die Übertragung des CSFV erfolgt hauptsächlich durch direkten Kontakt von infizierten mit nicht infizierten Schweinen, aber auch durch kontaminierte Kleidung bzw. Transportfahrzeuge. Das CSFV untergliedert sich in mehrere Isolate, die nach Infektion Krankheitsbilder unterschiedlichen Schweregrades auslösen.

2.5.1 Morphologie

Das CSFV ist ein umhülltes RNA Virus mit einer Größe von 40-60 nm [Enzmann & Weiland, 1978]. Die Virionen bestehen aus einem Nukleocapsid, das von einer mit Glykoproteinen besetzten Lipidhülle umgeben ist.

2.5.2 Genomorganisation und Polyproteinprozessierung

Das einzelsträngige RNA-Genom positiver Polarität des CSFV [Moormann, 1990] ist ca. 12,5 Kilobasen lang und enthält einen offenen Leserahmen (ORF), der für ein Polyprotein von etwa 4000 Aminosäuren kodiert [Meyers, 1989]. 5' und 3' Ende des Genoms sind von nichttranslatierten Bereichen flankiert, wobei das 3'-Ende nicht polyadenyliert ist [Moormann & Hulst, 1988]. Die durch das Genom kodierten viralen Proteine entstehen durch ko- und posttranslationale Prozessierung des hypothetischen Polyproteins. Das p23-Nichtstrukturprotein, das im 5'-Bereich des offenen Leserahmens lokalisiert ist, hat die Fähigkeit sich autoproteolytisch vom N-terminalen Bereich des Polyproteins abzuspalten [Thiel, 1991; Stark, 1993]. In 3'-Richtung folgen das Nukleokapsidprotein p14 und die Glykoproteine E0 (gp 44/48), E1 (gp 33) und E2 (gp 55) [Thiel, 1991; Stark, 1990]. Das Glykoprotein E0, welches Ribonukleaseaktivität aufweist und als Homodimer nachgewiesen wurde, ist auf der Oberfläche des Virions lokalisiert. Das E1-Glykoprotein, das als Transmembranprotein fungiert [Weiland, 1990], ist in der Lage, mit dem Oberflächenprotein E2 ein Heterodimer zu bilden [Weiland, 1990; Thiel, 1991]. Das auf dem Virion nachgewiesene E2-Glykoprotein [Weiland, 1992] ist Träger von Antigen Determinanten [van Rijn, 1996; Armengol; 2001]. Anschließend an die Sequenz der Strukturproteine folgt der Nichtstrukturproteinbereich mit den Proteinen p7 [Elberts, 1996], NS2-3 (p125), NS4A (p10), NS4B (p30), NS5A und NS5B (p130) [Collett, 1988; Meyers, 1990; Wiskerchen & Collett, 1991]. Ähnlich wie für BVDV wird das NS2-3 Protein in NS2 und NS3 gespalten [Thiel, 1991]. Der NS2-3 Bereich von CSFV und BVDV enthält typische Sequenzmotive für Helikase, Potease und NTPase [Gorbalenya, 1989/i; Bazan & Fletterick, 1989]. Im NS5B Bereich konnten Sequenzmotive für RNA-abhängige RNA-Polymerasen nachgewiesen werden [Meyers, 1989].

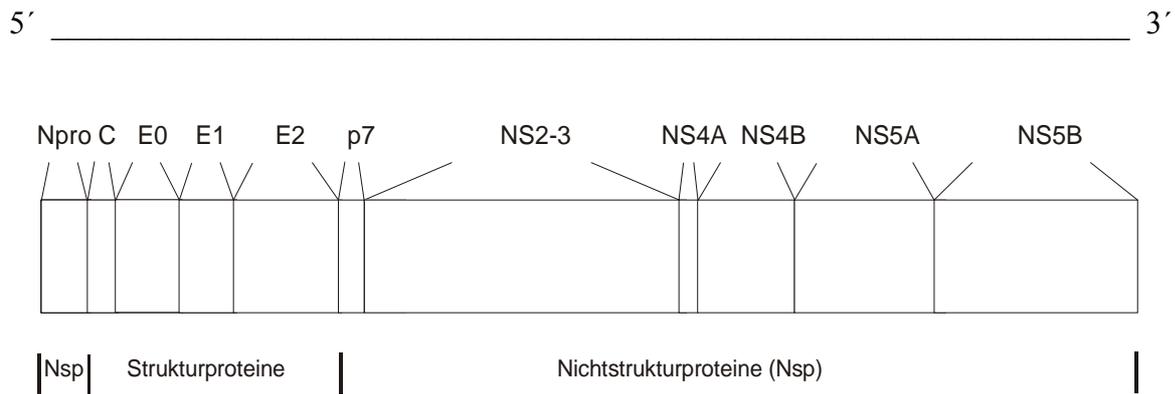


Abb.2-1.: Genomorganisation des CSFV

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

2.6 Zielsetzung

Angesichts der weltweiten Bedeutung des CSFV sollte in der vorliegenden Arbeit eine hochwirksame DNA-Vakzine erstellt werden, die es ermöglicht, die durch das CSFV verursachten hohen wirtschaftlichen Schäden zu vermeiden und vakzinierte von infizierten Tieren zu unterscheiden. Angesichts der Tatsache, dass die in DNA-Vakzinen eingesetzten Vektorsysteme, Zytokine und immunstimulatorischen Moleküle sowie die jeweiligen Trägersysteme und Applikationsarten für jede Erkrankung abhängig vom Wirtssystem eine unterschiedliche Wirksamkeit zeigen, müssen für die Herstellung einer wirkungsvollen DNA-Vakzine mehrere Faktoren analysiert werden. Deshalb sollten vergleichende Untersuchungen zwischen verschiedenen Vektorsystemen (pcR/RSV, pcDNA4-HisMax) in Verbindung mit unterschiedlichen immunstimulatorischen Molekülen (IL-12, IL-18, CD40L) sowie Applikationsarten (intramuskulär, intradermal) *in vivo* für das CSFV durchgeführt werden.

3 ERGEBNISSE

3.1 Konstruktherstellung

Für die Entwicklung einer wirksamen CSFV-spezifischen DNA-Vakzine musste zuerst ein immunogenes Antigen identifiziert werden, das in der Lage ist, eine CSFV-spezifische Immunantwort zu induzieren.

Aus vorangegangenen Arbeiten war bekannt, dass eine von der EU zugelassene und auf dem rekombinanten E2-Glykoprotein des CSFV basierende Marker-Vakzine einen Schutz vor einer CSFV-Infektion induziert [Van Rijn, 1996/1999; van Zijl, 1991]. Weitere Untersuchungen, bei denen das E2-Glykoprotein als Teil einer DNA-Vakzine bzw. in Kombination mit rekombinantem Adenovirus eingesetzt wurde, zeigten die Potenz des E2-Glykoproteins für die Induktion einer CSFV-spezifischen Immunantwort [Andrew, 2000; Hammond, 2001]. Für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Vakzinestudien wurde daher ebenfalls das E2-Glykoprotein als immunogenes Antigen ausgewählt.

Ein wichtiger Faktor für die Expression eines Gens ist unter anderem die Effizienz des verwendeten Promotors im entsprechenden Expressionssystem. Vergleichende Untersuchungen verschiedener Promotoren mit Hilfe von Reportergenen machten deutlich, dass der Promotor des Humanen Cytomegalievirus (CMV) sowie der des Rous-Sarkoma-Virus (RSV) in verschiedenen Testsystemen die höchste Expression des Reportergens induzierten [Zarrin, 1999; Manthorpe, 1993]. Basierend auf diesen Fakten wurden das pcDNA4-HisMAX- (CMV-Promotor) und das pcR/RSV- (RSV-Promotor) Plasmid als Grundplasmide für die Konstruktherstellung gewählt.

3.1.1 Konstruktion der E2-Vakzine-Vektoren

In unserem Labor stand eine mittels RT-PCR isolierte cDNA-Kopie des E2-Glykoproteingens aus dem CSFV-Stamm Glentorf zur Verfügung. Die in diesem Konstrukt (pBacbak9-E2) nicht enthaltene terminale E1-Sequenz (sig), notwendig für die posttranslationale Modifikation des E2 [Ruggli, 1995], wurde zusammen mit dem Startcodon und einer zusätzlichen Hind III-Schnittstelle, mittels eines Oligonukleotid-Linkers (signal 1.seq/rev) über BamH I/Nhe I in das Plasmid eingeführt. Anschließend

wurde diese E2-Sequenz entnommen und über Hind III/Not I in das pRc/RSV- bzw. BamH I/Not I in das pcDNA4HisMax -Plasmid inseriert (Abb. 3-1). Die Spezifität des eingeführten Fragmentes wurde durch Sequenzanalyse bestätigt.

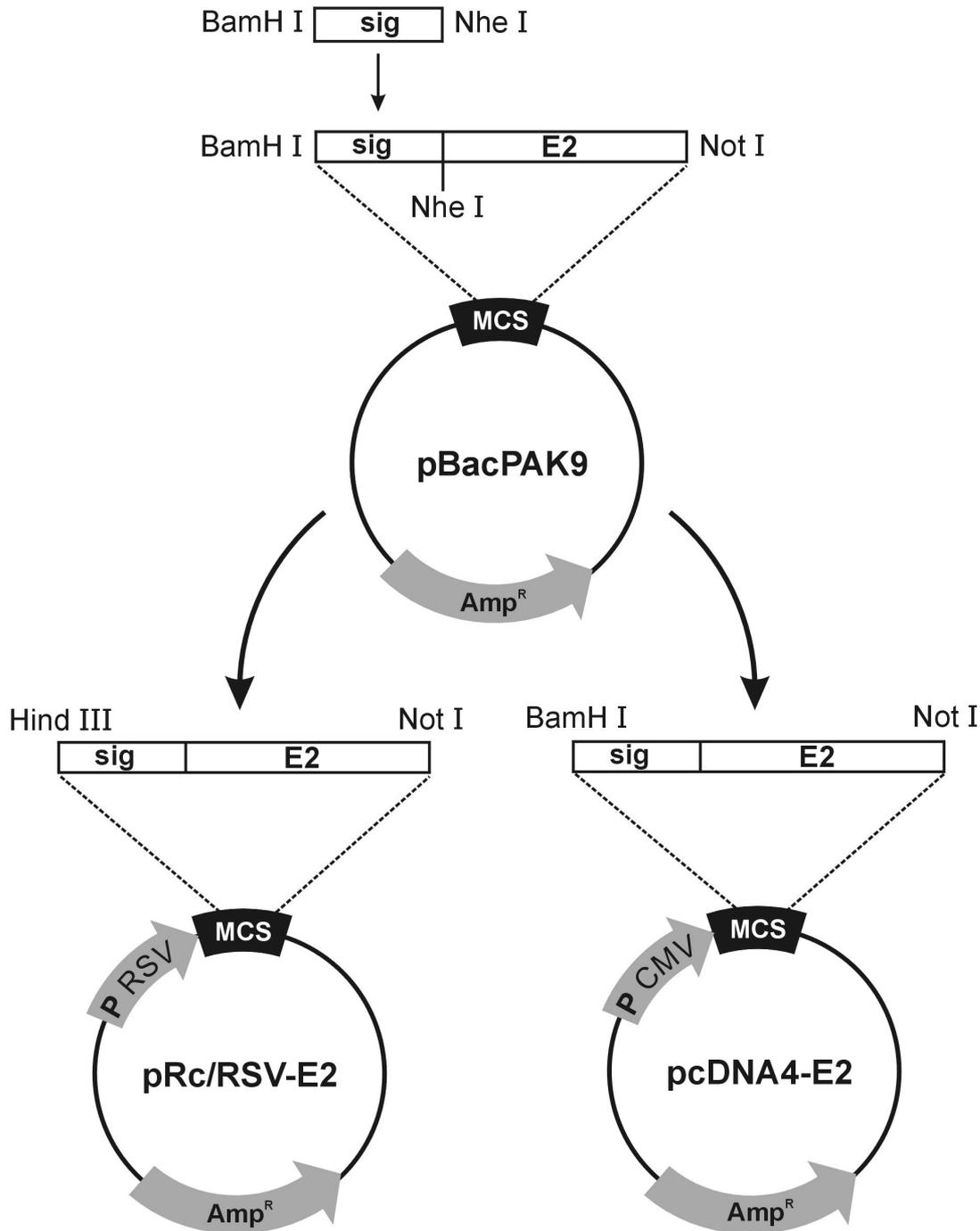


Abb. 3-1: Konstruktion der E2-Vakzine-Vektoren. Zur Einführung einer terminalen E1-Sequenz und einer zusätzlichen Hind III-Schnittstelle wurde das pBacPAK9-E2-Plasmid mit BamH I/Nhe I verdaut und ein Oligonukleotidlinker (signal 1.seq/rev) eingeführt. Das pBacPAK9-E2-Plasmid wurde anschließend mit Hind III/Not I für Insertion in das pRc/RSV- bzw. mit BamH I/Not I für Insertion in das pcDNA4HisMax-Plasmid verdaut und die Fragmente in die identisch vorbehandelten Vektoren inseriert.

3.1.2 Herstellung der E2-IL-18/IL-12/CD40L Vakzin-Vektoren

Die Steigerung der Effizienz einer DNA-Vakzine nach zusätzlicher Insertion von Zytokinen und immunstimulatorischen Molekülen ist bereits für eine Reihe von Erkrankungen beschrieben. Die Wahl der zusätzlich inserierten Zytokingene und Gene anderer immunstimulatorischer Moleküle ist hauptsächlich vom Erreger und dem Immunsystem des Wirtes abhängig. Daher mussten hinsichtlich der zu entwickelnden CSFV-Vakzine verschiedene Moleküle ausgetestet und im Wirtstier analysiert werden. Die bisher für verschiedene Erkrankungen durchgeführten Untersuchungen mit DNA-Vakzinen favorisieren IL-12 [Boretto, 2000; Shan, 1999], IL-18 [Dupre, 2001] und den CD40L [Ihata, 1999] aufgrund ihrer vielseitigen immunologischen Effekte als "Adjuvantien" zur Stimulation einer spezifischen Immunantwort. Daher sollten diese drei Moleküle in die E2-Vakzine-Konstrukt inseriert werden. Die Gene für porcines IL-18 und CD40L wurden hierfür aus PBMC isoliert.

3.1.2.1 Isolation der cDNA für porcines IL-18

Zur Isolation der cDNA für porcines IL-18 wurden zunächst PBMC (3×10^7) in Kultur genommen und mit LPS ($1,5 \mu\text{g/ml}$) stimuliert [Oem, 2000]. Anschließend wurde die Gesamtzell-RNA isoliert und revers transkribiert. Die für die reverse Transkription und die anschließende PCR verwendeten Primer (IL-18-vac.seq/rev) wurden in Anlehnung an bereits veröffentlichte Sequenzen für das porcine IL-18-Gen erstellt (Nr. U68701). Es gelang, ein spezifisches Produkt zu isolieren und aufzureinigen (Abb. 3-2). Nach Klonierung der PCR-Fragmente erfolgte deren Sequenzanalyse.

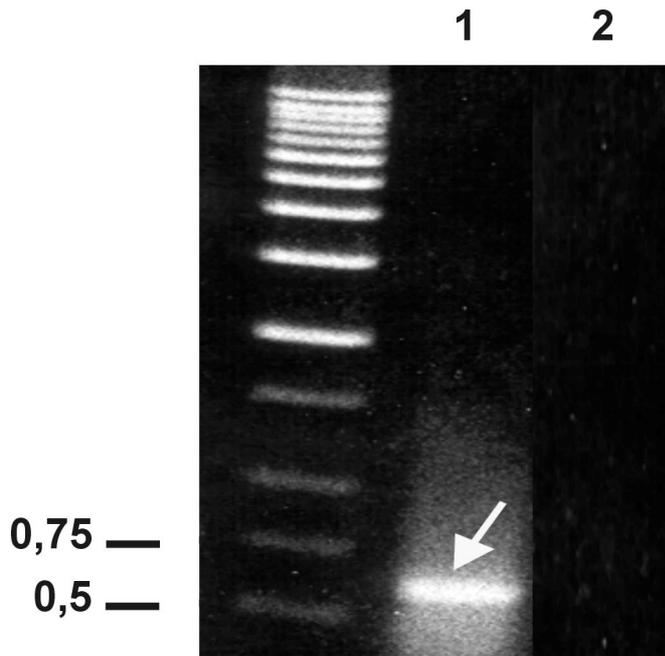


Abb. 3-2: RT-PCR für die cDNA des porcinen IL-18. Je 1/10 des PCR Ansatzes wurden auf das 1%ige, Ethidiumbromid-gefärbte Agarosegel aufgetragen. Das IL-18 spezifische Signal (1) ist durch einen Pfeil gekennzeichnet und besitzt eine Größe von ca. 580 bp. In Spur 2 ist die Wasserkontrolle dargestellt. Der Längenmarker ist partiell am linken Bildrand in kb angegeben.

3.1.2.2 Isolation der cDNA für den porcinen CD40L

Für die Herstellung der cDNA des porcinen CD40L wurden zunächst PBMC in Kultur genommen und mit ConA (5µg/ml) stimuliert. Nach 24stündiger Inkubation wurde die Gesamtzell-RNA isoliert. Da die cDNA-Sequenz des porcinen CD40L bis dato nicht bekannt war, mussten degenerierte Primer auf Basis von Sequenzvergleichen der CD40L-cDNA-Sequenzen von Maus (Nr. X654538), Mensch (Nr. L07414) und Rind (Nr. Z48469) erstellt werden. Mit diesen Primern (CD40L-iso.seq/rev) gelang es durch reverse Transkription und anschließende PCR ein spezifisches Produkt von 786 bp Länge zu isolieren, welches für ein 29 kDa großes Protein kodiert (Abb. 3-3). Nach Klonierung der PCR-Fragmente erfolgte die Sequenzanalyse. Um mögliche Nukleotid-austausche, die auf Fehler der reversen Transkriptase oder High Fidelity-Taq-Polymerase zurückzuführen sind, zu ermitteln, wurde das porcine CD40L-Fragment mehrmals unabhängig voneinander amplifiziert, kloniert und sequenziert. Der Vergleich der Aminosäuresequenz mit bereits publizierten CD40L-Sequenzen anderer Spezies ergab eine 88 %ige, 89 %ige bzw. 93 %ige Übereinstimmung mit humanem, felinem bzw. bovinem CD40L (siehe Anhang).

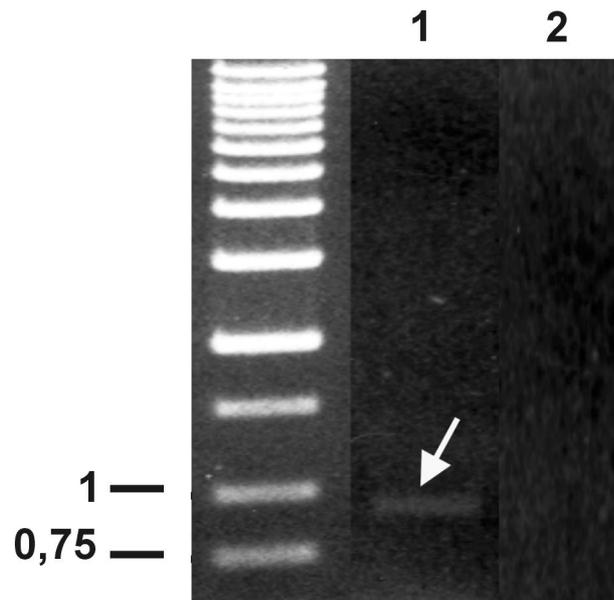


Abb. 3-3: RT-PCR für die cDNA des porcinen CD40L. Je 1/10 des PCR-Ansatzes wurden auf das 1%ige, Ethidiumbromid-gefärbte Agarosegel aufgetragen. Das CD40L-spezifische Signal (1) ist durch einen Pfeil gekennzeichnet und besitzt eine Größe von ca. 780 bp. In Spur 2 ist die Wasserkontrolle dargestellt. Der Längenmarker ist partiell am linken Bildrand in kb angegeben.

3.1.2.3 Konstruktion der E2-IL-18-/ IL-12-/ CD40L-Vakzine-Vektoren

Für die Konstruktion der E2-IL-18-/ IL-12-/ CD40L-Vakzine-Vektoren war es notwendig, Vektoren mit zwei unabhängigen Transkriptionseinheiten zu erstellen, da die verwendeten Zytokine bzw. immunstimulatorischen Moleküle zum einen sekretorisch (IL-18, IL-12), zum anderen aber auch als Oberflächenproteine (CD40L) exprimiert wurden. Abgesehen von möglichen konformationellen Problemen bei der Proteinfaltung würde z.B. ein E2-Cytokin-Fusionsprotein keine gleichzeitige sekretorische Expression des Cytokins und intrazelluläre Expression des E2-Glykoproteins ermöglichen. Im Sonderfall des IL-12-E2-Vakzin-Vektors mussten zwei unabhängige Transkriptionseinheiten verwendet werden, von denen eine zusätzlich eine polycistronische Transkriptionseinheit war, die die gleichzeitig gekoppelte Expression der heterodimeren Moleküle des IL-12 ermöglichte.

Zur Vereinfachung der Klonierungsstrategie sollten die isolierten cDNA-Fragmente der Zytokine in einem Zwischenklonierungsschritt in einen eukaryontischen Expressionsvektor kloniert und anschließend als Transkriptionseinheit in die

vorhandenen E2-Vakzine-Vektoren inseriert werden. Als Plasmid für den Zwischenklonierungsschritt wurde der pcDNA3-Vektor gewählt, da dessen Transkriptionseinheit einen CMV-Promotor enthält. Diese Tatsache ermöglichte uns, eine mögliche Differenz zwischen Transkriptionseinheiten mit homodimerer (CMV/CMV-Promotor) und heterodimerer (RSV/CMV-Promotor) Struktur zu analysieren.

Für die Insertion der cDNA-Sequenzen der verschiedenen Immunmoleküle mussten zusätzliche Schnittstellen in den pcDNA3-Vektor eingeführt werden. Dieser wurde hierfür mit Kpn I und Stu I verdaut und anschließend Schnittstellen für BamH I, Not I, Xho I und Nru I über einen Oligonukleotidlinker (pcDNA3.seq/rev) inseriert.

Die isolierte porcine IL-18 cDNA wurde mit den Primern IL-18-vac.seq/rev amplifiziert. Durch die verwendeten Primer wurden die für die weitere Klonierung benötigten Schnittstellen Kpn I und Not I eingeführt, das resultierende Fragment verdaut und in den analog behandelten pcDNA3-Linker-Vektor kloniert (Abb. 3-4). Die Amplifikation der cDNA des porcinen CD40L erfolgte mit Hilfe der Primer CD40L-vac.seq/rev, wodurch es möglich war, die Schnittstellen für Kpn I und Not I einzuführen. Anschließend wurde das PCR-Fragment Kpn I/Not I verdaut und in den ebenso behandelten pcDNA3-Linker-Vektor inseriert (Abb. 3-4).

Die polycistronische Transkriptionseinheit des p35/p40-Heterodimers (IL-12) war schon partiell durch Vorarbeiten [Wienhold, 1998] vorhanden. Diese wurde für anderweitige Untersuchungen verändert (Dr. Heller, Roche) und die p35-IRES-p40-Sequenz anschließend aus dem pVDB3-swi-IL-12-Plasmid entnommen. Zur Isolation des IL-12 (p35-IRES-p40) musste das pVDB3-swi-IL-12-Plasmid mit Sal I und anschließend partiell mit BamH I verdaut werden. Das resultierende Fragment wurde über BamH I und Sal I in den pcDNA3-Linker-Vektor inseriert (Abb. 3-4).

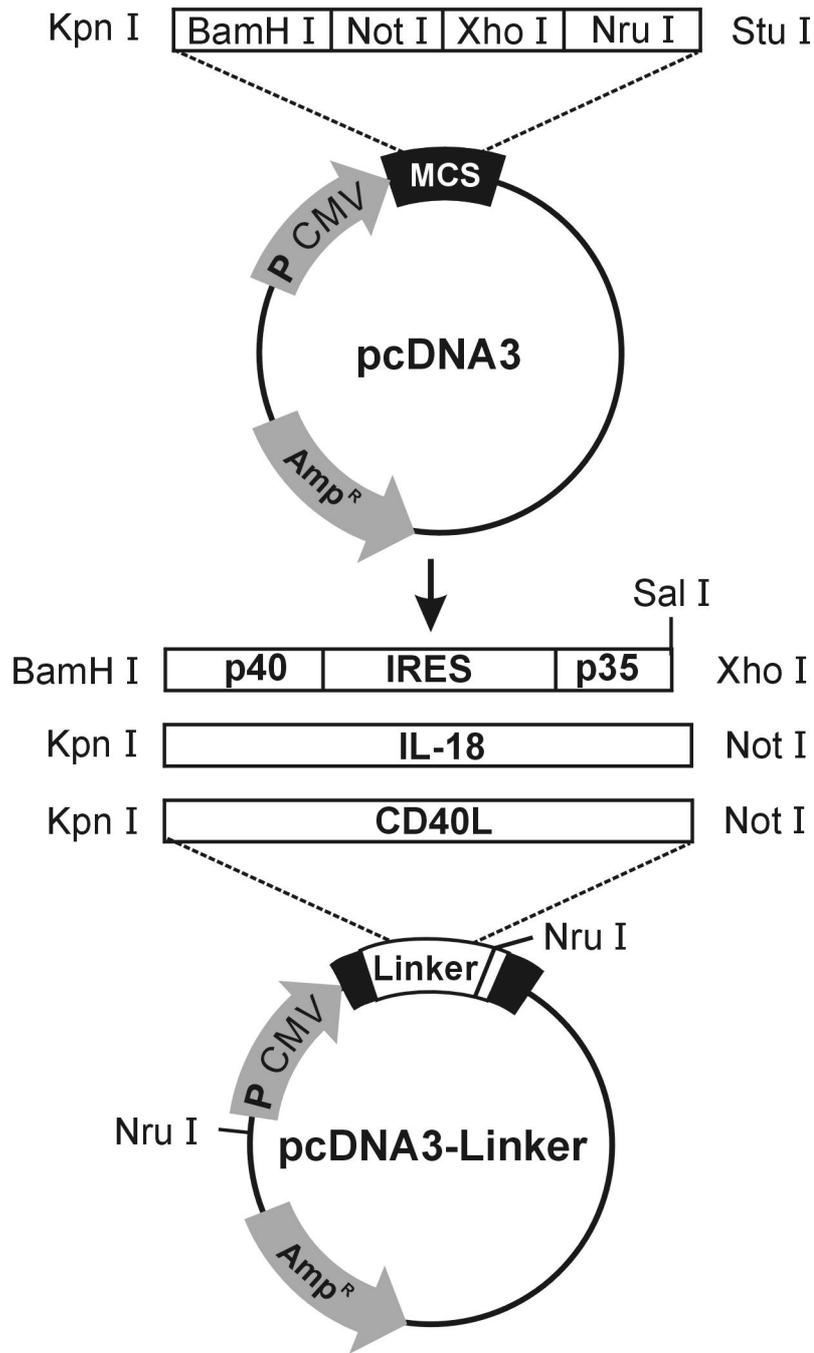


Abb. 3-4: Konstruktion der pcDNA3-IL-18-/ IL-12-/ CD40L-Vektoren. Zur Einführung zusätzlicher Schnittstellen für BamH I, Not I, Xho I und Nru I wurde das pcDNA3-Plasmid mit Kpn I/Stu I verdaut und ein Oligonukleotidlinker (pcDNA3.seq/rev) eingeführt. Nach Amplifikation der porcinen IL-18 cDNA (IL-18-vac.seq/rev) sowie des porcinen CD40L (CD40L-vac.seq/rev) wurde mit Primern die Schnittstellen für Kpn I und Not I eingeführt, und die verdauten Fragmente in das analog vorbereitete pcDNA3-Linker-Plasmid eingesetzt. Die p35-IRES-p40-Sequenz des IL-12 wurde durch Sal I und partiellen BamH I-Verdau aus dem pVDB3-swi-IL-12-Plasmid entnommen und über BamH I und Xho I in das pcDNA3-Linker-Plasmid subkloniert.

Vor Insertion der zweiten Transkriptionseinheit (IL-12, IL-18, CD40L) musste in den pRC/RSV-E2-Vektor eine zusätzliche Hpa I-Schnittstelle eingeführt werden. Dazu wurde das Plasmid mit Sma I und Bstb I verdaut und ein Oligonukleotidlinker (pRSV.seq/rev) inseriert. Das Plasmid wurde anschließend Hpa I verdaut und der Vektor dephosphoryliert. Zur Einführung der zweiten Transkriptionseinheit (IL-12, IL-18, CD40L) in den pcDNA4HisMax-E2-Vektor wurde ein Pml I-Verdau durchgeführt und der Vektor zur Verhinderung einer Religation ebenfalls dephosphoryliert (Abb. 3-5).

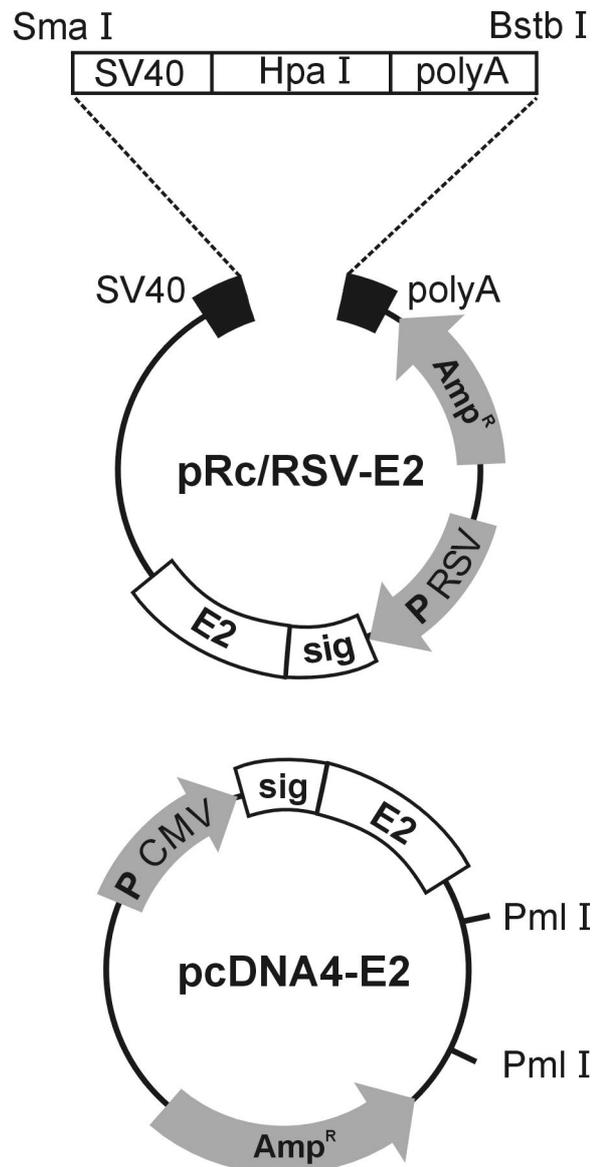


Abb. 3-5: Vorbereitung der E2-Vakzin-Vektoren auf die Insertion der zweiten Transkriptionseinheit (IL-12, IL-18, CD40L). Mittels eines Oligonukleotidlinkers (pRSV.seq/rev) wurde eine Hpa I Schnittstelle über Sma I und Bstb I in den pRc/RSV-E2-Vektor eingeführt, Hpa I verdaut und der Vektor dephosphoryliert. Im Gegensatz dazu wurde der pcDNA4HisMax-E2-Vektor ausschließlich Pml I verdaut und danach dephosphoryliert.

Zur Entnahme der kompletten Transkriptionseinheit (Promotor + Cytokin oder immunstimulatorisches Molekül) wurden die konstruierten pcDNA3-IL-18-/IL-12-/CD40L-Vektoren mit Nru I verdaut und das isolierte Fragment (Transkriptionseinheiten) anschließend in die entsprechend vorbereiteten E2-Vakzine-Vektoren inseriert. Die Transkriptionskassetten wurden für das pcDNA4HisMax-E2-Plasmid *blunt* in die Pml I- und für die pRC/RSV-E2-Plasmide *blunt* in die Hpa I- Schnittstelle eingesetzt. Nachfolgend wurde die Spezifität der Sequenzen durch Sequenzanalyse überprüft und die Plasmide großmaßstäblich aufgereinigt (Abb. 3-6).

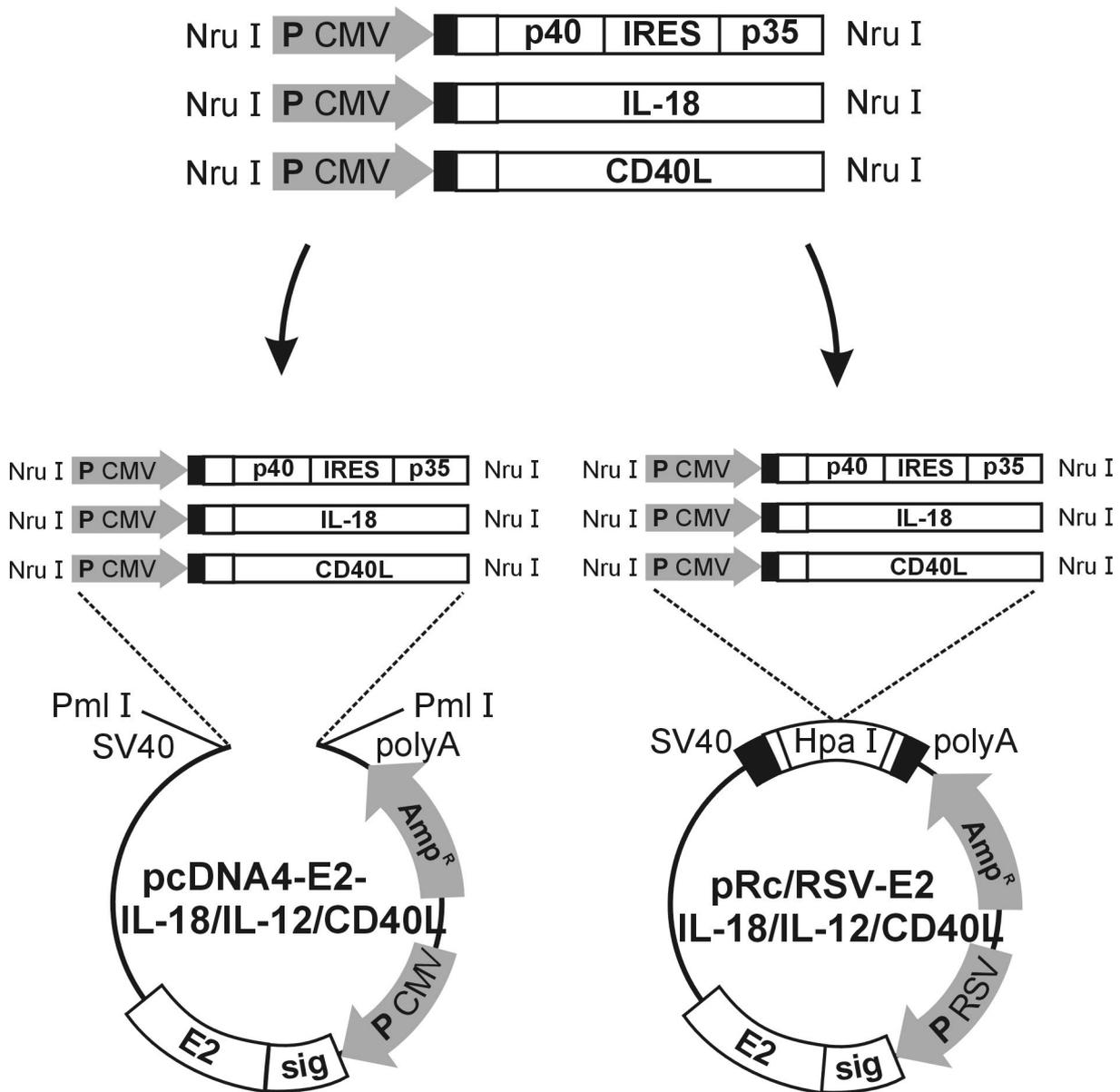


Abb. 3-6: Konstruktion der E2-IL-18-/IL-12-/CD40L-Vakzine-Vektoren. Zur Insertion der zweiten Transkriptionseinheit (IL-12, IL-18, CD40L) in die E2-Vakzine-Vektoren wurden die pcDNA3-IL-18-/IL-12-/CD40L-Vektoren Nru I verdaut und die jeweilige Transkriptionseinheit *blunt* in die E2-Vakzine-Vektoren (pcDNA4HisMax-E2 Nru I auf Pml I, pRC/RSV-E2 Nru I auf Hpa I) inseriert.

Nach Abschluß der Konstruktionsarbeiten waren folgende Plasmide vorhanden (Tab. 3-1)

Bezeichnung	Enthaltene Sequenzen	Promotoren
pcDNA4HisMax	keine	CMV
pcDNA4HisMax-E2	E2	CMV
pcDNA4HisMax-E2-IL-12	E2, IL-12	CMV, CMV
pcDNA4HisMax-E2-IL-18	E2, il18	CMV, CMV
pcDNA4HisMax-E2-CD40L	E2, CD40L	CMV, CMV
pRC/RSV	keine	RSV
pRC/RSV-E2	E2	RSV
pRC/RSV-E2-IL-12	E2, IL-12	RSV, CMV
pRC/RSV-E2-IL-18	E2, IL-18	RSV, CMV
pRC/RSV-E2-CD40L	E2, CD40L	RSV, CMV

Tab. 3-1: Übersicht über die hergestellten Einzelkonstrukte. Die Tabelle enthält alle hergestellten Konstrukte mit ihren jeweils inserierten Sequenzen und den zugeordneten Promotoren.

3.2 Überprüfung der *in vitro* Expression der DNA-Vakzine-Konstrukte

Vor dem Einsatz der Plasmide im Tier sollte deren Funktionsfähigkeit *in vitro* überprüft werden.

3.2.1 *In vitro* Transkriptionsanalyse der DNA-Vakzine-Konstrukte

In allen verwendeten CMV-Transkriptionseinheiten war ein T7-Promotor enthalten, der es ermöglichte, eine *in vitro* Transkription durchzuführen, um die Funktionalität der Plasmide bezüglich der inserierten Sequenzen zu überprüfen. Zur Durchführung einer “Run-Off“-Transkription wurden die Plasmide in einem ersten Schritt linearisiert (Tab. 3-2) und anschließend mittels T7-RNA-Polymerase transkribiert. Da die pRC/RSV-E2-IL-12/ IL-18/ CD40L-Plasmide im Gegensatz zu den pcDNA4HisMax-E2-IL-12/ IL-18/ CD40L-Plasmiden nur einen, vor der Expressionskassette der

Immunstimulatoren lokalisierten, T7-Promotor enthielten, war eine Überprüfung der E2-Transkription für diese Konstrukte nicht möglich.

Konstrukte	Restriktionsverdau	Erwartete RNA-Fragmente
pcDNA4HisMax-E2-IL-12	Xho I, EcoR V	E2: 1200 bp, IL-12 (p40-IRES): 1,8 kb
pcDNA4HisMax-E2-IL-18	Xho I	E2: 1200 bp, IL-18: 588 bp
pcDNA4HisMax-E2-CD40L	Xho I	E2: 1200 bp, CD40L:790 bp
pRC/RSV-E2-IL-12	BstB I	IL-12: (p40-IRES): 1,8 kb
pRC/RSV-E2-IL-18	BstB I	IL-18: 640 bp
pRC/RSV-E2-CD40L	BstB I	CD40L:840 bp

Tab. 3-2: Übersicht des Linearisierungsschemas für die *in vitro* Transkription. Alle hergestellten Konstrukte wurden für eine Run-off-Transkription mit den angegebenen Restriktionsenzymen linearisiert. Außerdem ist die Länge erwarteten RNA-Fragmente in der Tabelle dargestellt.

Für alle pcDNA4HisMax-Konstrukte konnte sowohl ein spezifisches Transkriptionsprodukt für das E2-Glykoprotein als auch für die Zytokine bzw. immunstimulatorischen Moleküle nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurde für die pRC/RSVKonstrukte erwartungsgemäß ausschließlich ein spezifisches Transkriptionssignal für die Zytokine bzw. immunstimulatorischen Moleküle detektiert (Abb. 3-7).

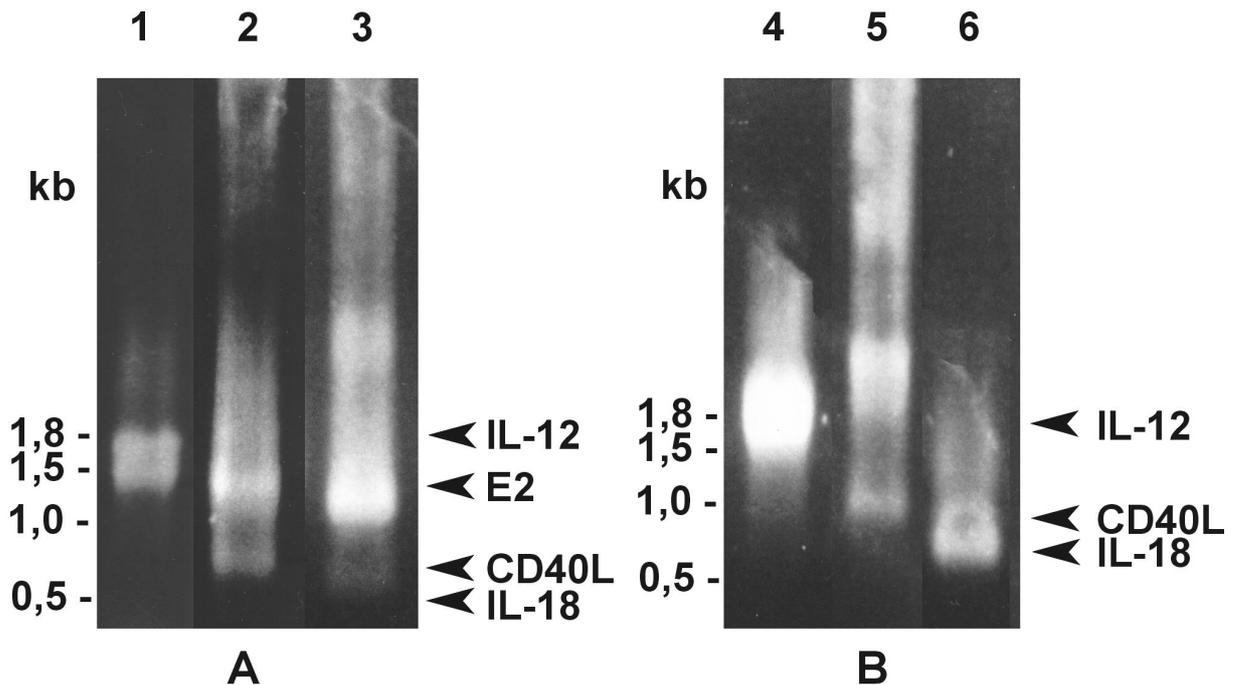


Abb. 3-7: Gelanalyse der pcDNA4HisMax- (A) und pRC/RSV- (B) T7-Transkriptionsansätze. Nach T7-Transkription wurde 1/10 der Transkriptionsansätze in einem denaturierenden 1%igen Agarose-Gel aufgetrennt. A, 1: pcDNA4HisMax-E2-IL-12-Konstrukt, 2: pcDNA4HisMax-E2-CD40L-Konstrukt, 3: pcDNA4HisMax-E2-IL-18-Konstrukt. B, 4: pRC/RSV-E2-IL-12-Konstrukt, 5: pRC/RSV-E2-CD40L-Konstrukt und 6: pRC/RSV-E2-IL-18-Konstrukt. Die spezifischen Signale sind am rechten Bildrand durch Pfeile markiert. Relevante Größen des RNA-Längenmarkers sind an der linken Seite bezeichnet.

3.2.2 E2-Expressionsanalyse mittels Immunfluoreszenz

Um die Expression der Konstrukte *in vitro* zu überprüfen, sollten Zelllinien mit den Plasmiden transfiziert und die Expression mittels verschiedener Methoden analysiert werden. Da aufgrund der möglicherweise unterschiedlichen Transfektionseffizienz die Menge an detektierbarem spezifischen Protein bei transient transfizierten Zellen gering ist, wurde auf die Immunfluoreszenzanalyse zurückgegriffen, welche es erlaubt, die Expression auf Einzelzellniveau zu analysieren. Der hohe Hintergrund bei Einsatz polyklonaler Primärantikörper machte es allerdings erforderlich, einen monoklonalen Antikörper als Detektionsantikörper (Primärantikörper) einzusetzen. Als Zelllinie für die zellulären Expressionsversuche wurden MAX-Zellen [Pauly et al., 1995] gewählt, da sie als porcine Zelllinie das beste Wirtsmodell für die *in vitro* Versuche mit CSFV

darstellten. In einem Vorversuch wurde zuerst die zell-spezifische Transfektionseffizienz einzelner Methoden mit Hilfe des EGFP-Expressionsplasmides pEGFP-N3 ausgetestet werden. Für transiente Transfektionen von Plasmid-DNA in MAX-Zellen wurde hauptsächlich die Liposomen-vermittelte Transfektion mittels Effectene angewandt, da sich zeigte, dass die Effizienz bei anderen Transfektionsmethoden geringer war (Daten nicht gezeigt).

Zur Analyse der *in vitro* Funktionalität der E2-IL-12/ IL-18/ CD40L-Konstrukte wurden MAX-Zellen mit je 1 µg der Plasmid-DNA transfiziert und die Expression des E2-Glykoproteins durch cytoplasmatische Immunfluoreszenzanalyse nach 24 h überprüft.

Hierfür wurde ein E2-spezifischer monoklonaler Maus-Antikörper (a18) [Weiland et al., 1990] als Primär- und ein Ziege-anti-Maus IgG-DTAF-gekoppelten Antikörper als Sekundärintikörper verwendet. Als Negativkontrolle wurden MAX-Zellen mit einer Mischung aus pcDNA4HisMax- und pRC/RSV-Plasmid transfiziert. Für die Positivkontrolle erfolgte eine Infektion der MAX-Zellen mit CSFV (Stamm Glentorf, MOI:1). Beide Kontrollen wurden analog zu den E2-IL-12/IL-18/CD40L-Konstrukten gefärbt.

Eine Expression des E2-Glykoproteines konnte für alle Konstrukte, außer für das Kontrollplasmidgemisch (pcDNA4HisMax und pRC/RSV), nachgewiesen werden.

Ein promoterspezifischer Unterschied der Expression des E2-Glykoproteines war nicht feststellbar, da beide Vektorsysteme im gewählten Zellkulturtestsystem annähernd gleiche Expressionsraten zeigten (Abb. 3-8).

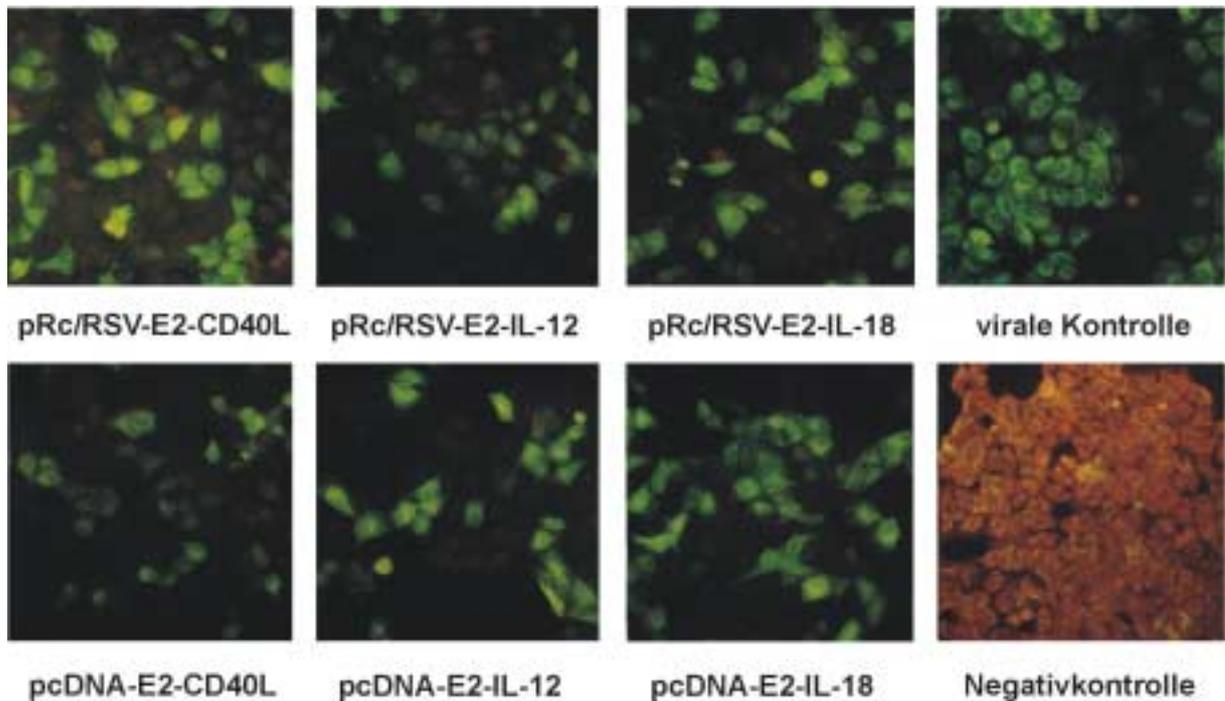


Abb. 3-8: E2-Expressionsanalyse der E2-IL-12/IL-18/CD40L-Konstrukte. Photographische Aufnahme der E2-Expression 24 h nach Transfektion mit je 1 µg der E2-IL-12/IL-18/CD40L-Konstrukte. Die jeweilige Konstruktbezeichnung ist als Bildunterschrift dargestellt. Als Negativkontrolle dienten MAX-Zellen, die mit einem Gemisch aus pcDNA4HisMax- und pRC/RSV-Plasmid transfiziert wurden. Für die Positivkontrolle wurden MAX-Zellen mit CSFV (Stamm Glentorf, MOI:1) infiziert. Zusätzlich wurden die Zellkerne der Zellen mit Propidiumjodid (rot) angefärbt.

3.2.3 CD40L- Expressionsanalyse mittels Immunfluoreszenz

Nachdem für alle Konstrukte der Nachweis der Expression des CSFV-spezifischen E2-Glykoproteines gelungen war, sollte nun die Expression der Zytokine und immunstimulatorischen Moleküle untersucht werden. Da für die Untersuchungen der CD40L-Expression ebenfalls ein monoklonaler Antikörper zur Verfügung stand, wurde auch für die Konstrukte pcDNA4HisMax-E2-CD40L und pRC/RSV-E2-CD40L eine Immunfluoreszenzanalyse durchgeführt. Die Spezifität des monoklonalen anti human-CD40L-Antikörpers konnte in Vorversuchen durch Kreuzreaktion mit rekombinantem porcinen CD40L nachgewiesen werden (siehe 3.4.4). Die MAX-Zellen wurden analog zu 3.2.2 mit dem pcDNA4HisMax-E2-CD40L- bzw. pRC/RSV-E2-CD40L-Plasmid transfiziert und mittels Oberflächenimmunfluoreszenzanalyse untersucht.

Da der gesamte cDNA-Bereich, also auch die Signal-Anker-Sequenz des porcinen CD40L in die Expressionskassette inseriert wurde, war zu erwarten, dass nach Expression eine Präsentation des CD40L auf der Zelloberfläche erfolgt. Daher wurde eine Fixierung verwendet, bei der nur auf der Oberfläche der Zelle lokalisierte Moleküle markiert wurden. In Abb. 3-9 sind die Ergebnisse dargestellt. Für beide E2-CD40L-Konstrukte (pcDNA4HisMax-E2-CD40L- und pRC/RSV-E2-CD40L) konnte eine Expression des porcinen CD40L auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden, während für die entsprechenden Negativkontrollen kein spezifisches Signale detektiert wurde.

Eine durchgeführte Immunfluoreszenzanalyse mittels eines porcinen polyklonalen CD40L-Antiserums (siehe 3.4.4) ergab erwartungsgemäß zu starke Hintergrundsignale (Daten nicht gezeigt).

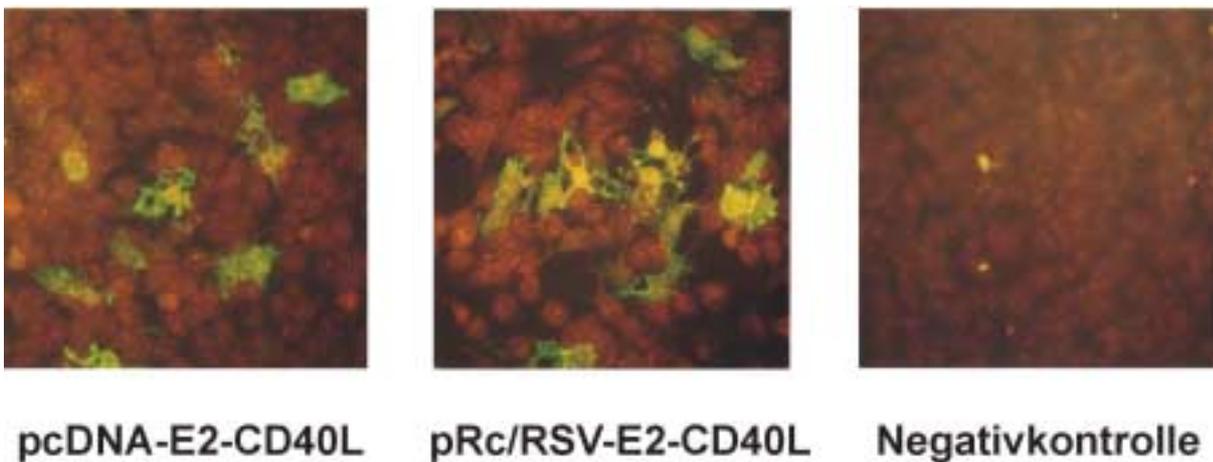


Abb. 3-9: CD40L-Expressionsanalyse der Konstrukte pcDNA4HisMax-E2-CD40L und pRC/RSVE2-CD40L. Photographische Aufnahme der CD40L-Expression 24 h nach Transfektion mit je 1 µg der E2-CD40L-Konstrukte. Dabei verwendete man einen hCD40L-spezifischen monoklonalen Maus-Antikörper als Primär- und einen Ziege-anti-Maus IgG, DTAF-gekoppelten Antikörper als Sekundärantikörper. Zusätzlich wurden die Zellkerne der Zellen mit Propidiumjodid (rot) angefärbt. Die jeweilige Konstruktbezeichnung ist als Bildunterschrift dargestellt. Als Negativkontrolle dienten MAX-Zellen, die mit einem Gemisch des pcDNA4HisMax- und pRC/RSV-Plasmides transfiziert wurden.

3.2.4 Nachweis der IL-18- und IL-12-Expression durch funktionelle NK-Assays

Ein Nachweis der IL-12- und IL-18-Expression durch Immunfluoreszenzanalyse war, bedingt durch die Sekretion von IL-12 und IL-18 in den Zellkulturüberstand nicht möglich.

Es wurde daher ein funktioneller Assay durchgeführt, bei dem die Expression von IL-12 und IL-18 indirekt nachgewiesen werden konnte. Bei diesem funktionellen NK (*natural killer*) -Assay wird die Steigerung der zytolytischen Aktivität von NK durch IL-12 bzw. IL-18 gemessen. Dazu wird eine humane Tumorzelllinie (K562) mit ^{51}Cr markiert und anschließend mit PBMC, die auch NK-Zellen enthalten, inkubiert. Diese NK-Zellen lysieren die humane Tumorzelllinie abhängig von ihrer Aktivierung. Zur Überprüfung der IL-12- und IL-18-Expression wurden die Überstände der mit den IL-12- und IL-18-Plasmiden (pcDNA4HisMax-E2-IL-12/IL-18, pRC/RSV-E2-IL-12/IL-18) transfizierten MAX-Zellen zugesetzt. Die im Überstand enthaltenen Zytokine stimulieren die zytolytische Aktivität der NK-Zellen, so dass nach 18 h die Radioaktivität im Überstand (lysierte Zellen setzten ^{51}Cr frei) ein direktes Maß für die Aktivierung der NK-Zellen darstellt. Als Kontrollen wurden PBMC und Tumorzellen mit Überständen von MAX-Zellen versetzt, die zuvor mit einem E2-Vakzin-Vektorgemisch (E2-pcDNA4HisMax und E2-pRC/RSV) transfiziert wurden. Zur Kontrolle der Spontanlyse wurden Tumorzellen mit PBMC ohne Zusatz von Überständen inkubiert. Als Positivkontrolle für IL-12 stand Zellkulturüberstand zur Verfügung, der rekombinantes porcines adeno-IL-12 enthielt.

In Abb. 3-10 sind die Ergebnisse der NK-Assays zusammengefasst. Für die IL-12- und IL-18-Ansätze konnte gezeigt werden, dass die E2-Konstrukt-Zellüberstände im Verhältnis zur Spontanlyse des Testsystems eine stimulierende Wirkung auf die NK-Zellen ausübten. Weiterhin konnte für die E2-IL-12-Konstrukte eine Erhöhung der Spontanlyse um ca. 35 % im Verhältnis zu den Überständen der E2-Konstrukte beobachtet werden. Vergleichbare Werte wurden auch für die Stimulation mit rekombinantem porcinen adeno-IL-12 beobachtet. Für die Überstände der E2-IL-18-Konstrukte konnte eine Erhöhung der spezifischen Lyse von ca. 25% im Verhältnis zu den Überständen der E2-Konstrukte festgestellt werden. Außerdem war der

stimulierende Effekt für beide Zytokine abhängig von der Konzentration des Überstandes. Die signifikante Steigerung der zytolytischen Aktivität der NK-Zellen sowohl durch Überstände der E2-IL-12- als auch der E2-IL-18-Konstrukte im Vergleich zu den Überständen der E2-Konstrukte bestätigte die Expression von aktivem porcinem IL-12 und IL-18 nach transienter Transfektion von MAX-Zellen (Abb. 3-10).

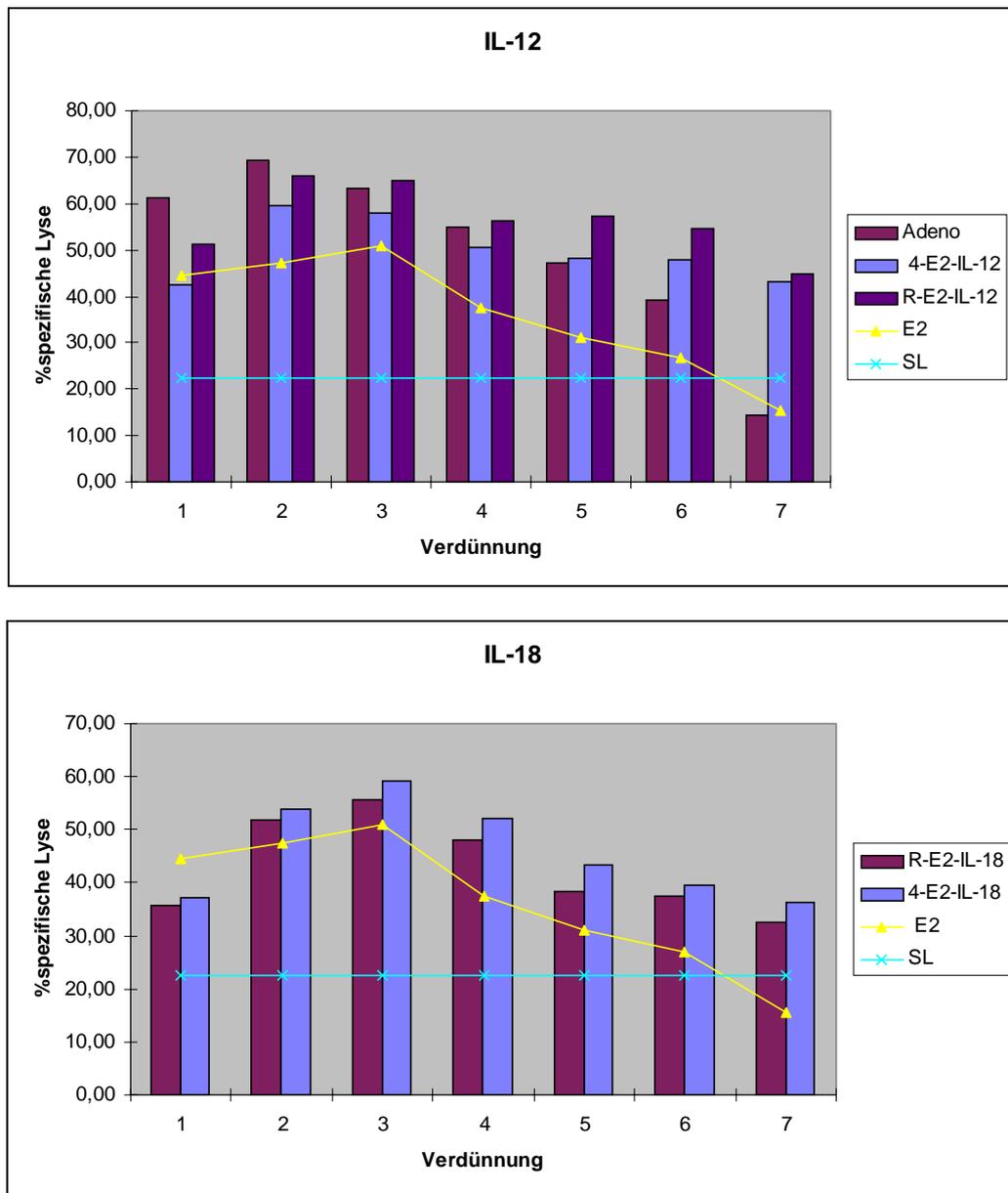


Abb. 3-10: Nachweis der IL-12- und IL-18-Expression der pcDNA4HisMax-E2-IL-12/IL-18- und pRC/RSV-E2-IL-12/IL-18-Konstrukte im funktionellen NK-Assay. Die Grafik zeigt die spezifische Lyse der Zielzellen durch die PBMC, bei Inkubation mit verschiedenen Verdünnungen (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64) der Zellkulturüberstände für Interleukin 12 (IL-12) und Interleukin 18 (IL-18). Die spontane Lyse der Zielzellen durch die PBMC (SL) und die Lyse nach Stimulation mit Überständen pcDNA4HisMax-E2 -und pRC/RSV-E2-transfizierter MAX-Zellen (E2) ist als Linie dargestellt. Für IL-12 wurde eine rekombinantes porcines adeno-IL-12 als Positivkontrolle verwendet (Adeno). Die Einzelkonstrukte, pcDNA4HisMax-E2-IL-12 (4-E2-IL-12), pRC/RSV-E2-IL-12 (R-E2-IL-12), sind in den jeweiligen Legenden bezeichnet.

Die *in vitro* Untersuchungen der Vakzine-Konstrukte erbrachten somit.

- den Nachweis der Proteinexpression sowohl für das E2-Glykoprotein als auch für die Zytokine bzw. immunstimulatorischen Moleküle und
- keine signifikanten Unterschiede in der *in vitro* Expression zwischen Konstrukten mit Transkriptionseinheiten heterodimerer (RSV/CMV-Promotor) oder homodimerer (CMV/CMV-Promotor) Struktur.

Mit dem Abschluß der Expressionsuntersuchungen der Konstrukte *in vitro* waren die nötigen Vorarbeiten erbracht, um die DNA-Vakzine-Vektoren im Tier zu analysieren.

3.3 Analyse der DNA-Vakzine-Konstrukte im Tierversuch

Vor einer Untersuchung der hergestellten Konstrukte im Tier mussten in einem ersten Schritt die Parameter des wirtsspezifischen Testsystems optimiert werden. Ausgehend von früheren Immunisierungsversuchen mit einer auf CSFV-spezifischem E2 basierenden DNA-Vakzine [Andrew, 2000] entschieden wir uns für ein klassisches Immunisierungsschema. Dabei erfolgen nach der ersten Immunisierung im Abstand von je 22 Tagen 2 weitere Immunisierungen. Nach weiteren 22 Tagen wird dann die Wirksamkeit der Immunisierung durch eine experimentelle CSFV-Infektion überprüft.

3.3.1 Optimierung der Applikationsart und Belastungsinfektion

Nach Festlegung des Immunisierungsschemas musste die Impfdosis für die DNA-Immunisierung bestimmt werden. Da die Wirksamkeit der E2-Vakzin-Vektoren im Verhältnis zu den E2-IL-18-/IL-12-/CD40L-Vakzin-Vektoren untersucht werden sollte, musste gewährleistet sein, dass eine gegebenenfalls schwache Schutzwirkung durch die Vektoren selbst und nicht durch eine unzureichende DNA-Menge bedingt ist. Daher wurde für jede Immunisierung 1 mg Plasmid-DNA eingesetzt. Um eine möglichst praxisnahe und einfache Applikation der DNA-Vakzine zu erreichen und die zu untersuchenden Parameter zu begrenzen, sollte auf die Applikation mittels Panjet-Inokulator oder Gen-gun verzichtet und die DNA durch Injektion appliziert werden. Die Frage, ob eine Injektion intramuskulär (i.m.) oder intradermal (i.d.) erfolgt, ist von großer Bedeutung für die Schutzwirkung der DNA-Vakzine [Bohm,

1998; Smooker, 1999]. Deshalb sollte auch die optimale Applikationsart im Tier bestimmt werden.

Des Weiteren musste für die Infektionsversuche ein CSFV-Stamm gefunden werden, der hoch infektiös ist und neben einem akuten Krankheitsverlauf auch eine auffällige Symptomatik induziert. Deshalb wurde der schon in anderen Experimenten erfolgreich eingesetzte CSFV-Stamm Eystrup ausgewählt [Meyers, 1999; König, 1994]. Die Überprüfung der Infektionsdosis, mit der sich ein schwerer Krankheitsverlauf induzieren ließ, erfolgte ebenfalls im Tier.

In einem ersten Vorversuch wurde die Applikationsart (i.m., i.d.) und die *challenge*-Dosis an fünf Tiere ausgetestet. Je zwei der Tiere wurden mit 1 mg der E2-Vakzin-Vektoren intramuskulär (Tier 16, 21) und intradermal (Tier 23, 20) immunisiert. Das fünfte Tier (Tier 19) diente als Positivkontrolle für die Belastungsinfektion (*challenge* Infektion). 22 Tage nach der dritten Immunisierung wurden die Tiere mit $2 \times 10^{5,5}$ TCID₅₀ CSFV (Stamm Eystrup) infiziert und die Fieberkurven sowie die auftretende Symptomatik verfolgt. Es wurde festgestellt, dass die E2-Vakzin-Vektoren die immunisierten Tiere wirkungsvoll gegen die durchgeführte *challenge*-Infektion schützten, während das nicht immunisierte Kontrolltier (Tier 19) über mehr als sechs Tage hohe Fieberwerte (~ 41 °C) aufwies und am neunten Tag *post challenge* verstarb. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der Allgemeinzustand der i.m. immunisierten Tiere (16, 21) besser war als der der i.d. immunisierten Tiere (23, 20). Des Weiteren zeigten die i.m. immunisierten Tiere einen geringeren Anstieg und eine schnellere Normalisierung der Temperatur als die i.d. immunisierten Tiere bei denen zusätzlich, am dritten Tag *post challenge*, Virus im Blut nachgewiesen werden konnte. In diesem Vorversuch wurde gezeigt, dass die verwendete *challenge*-Dosis ausreichend war, um eine letale Virusinfektion in nicht durch Immunisierung geschützten Tieren auszulösen, und dass eine i.m. Immunisierung eine bessere Wirksamkeit der Plasmide ermöglicht. Daher wurde die gewählte *challenge*-Dosis für alle weiteren Infektionsversuche beibehalten und die Tiere i.m. immunisiert.

3.3.2 Vergleichende Analyse der unterschiedlichen E2-Vektorsysteme

Nachdem die Rahmenbedingungen des Vakzine-Testes bestimmt waren, wurde im zweiten Schritt eine Vorauswahl der E2-Vakzine-Konstrukte (pRC/RSV-E2 oder pcDNA4HisMax-E2) anhand der E2-Schutzwirkung im Tierversuch getroffen.

Außerdem sollten verschiedene Testsysteme zum “Monitoring“ der spezifischen Reaktion des Immunsystems etabliert bzw. auf ihre Verwendbarkeit hin analysiert werden. Daher wurden 13 Tiere, wie in Abb. 3-11 dargestellt, immunisiert und anschließend einer *challenge*-Infektion unterzogen (siehe 3.3.1).

Gruppe	Tiernummer	Vektor
1	6	pRC/RSV
	26	pRC/RSV
	45	pcDNA4HisMax
	46	pcDNA4HisMax
	174	pcDNA4HisMax/ pRC/RSV
2	47	pcDNA4HisMax-E2
	48	pcDNA4HisMax-E2
	170	pcDNA4HisMax-E2
	171	pcDNA4HisMax-E2
3	49	pRC/RSV-E2
	50	pRC/RSV-E2
	172	pRC/RSV-E2
	173	pRC/RSV-E2

Abb. 3-11: Immunisierungsschema der Tiergruppen zur vergleichenden Analyse der E2-Vektorsysteme. Es sind die Tiergruppen, Tiernummern und die jeweils applizierten Vektoren dargestellt.

Von den Tieren wurden wöchentlich PBMC und Serum gewonnen und mittels unterschiedlicher Testsysteme untersucht.

Für die Erfassung der Schutzwirkung einer DNA-Vakzine sind neben dem Überleben und dem Allgemeinzustand des Tieres drei Hauptpunkte von Interesse: 1. die humorale Immunantwort, 2. die zelluläre Immunantwort und 3. die Virusvermehrung bzw. -verbreitung.

3.3.2.1 Analyse der induzierten CSFV-spezifischen humoralen Immunantwort

- E2-spezifischer Antikörper ELISA

Zur Erfassung der durch die Immunisierung induzierten E2-Antikörper wurde mit allen Seren ein E2-spezifischer Antikörper-ELISA durchgeführt. Dies sollte Auskunft geben, inwieweit die DNA-Vakzine-Vektoren allein eine CSFV-spezifische humorale Immunantwort induzieren können. In Abb. 3-12 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Alle Tiere der Gruppe 1, die als Kontrolltiere dienten, verstarben acht bzw. neun Tage *post challenge* ohne dass CSFV-spezifische Antikörper nachgewiesen werden konnten. Für die Tiere der Gruppen 2 und 3 konnten hingegen sowohl vor als auch nach erfolgter Infektion E2-spezifische Antikörper detektiert werden. Allerdings waren nicht alle Tiere der Gruppe 3 (pRC/RSV-E2) vor der Infektion geschützt. Tier 49 und 50 verstarben bereits sieben bzw. acht Tage *post challenge*. Die besten E2-Antikörperwerte zeigten die Tiere der Gruppe 2 (pcDNA4HisMax-E2), von denen alle vor einer *challenge*-Infektion geschützt waren und sich rasch erholten.

Vektor	Tier-Nr.	22.Tag	29.Tag	36.Tag	43.Tag	50.Tag	57.Tag	64.Tag	67.Tag	72.Tag	78.Tag
PRC/RSV	6	-	-	-	-	-	-	-	-	Exitus	
PRC/RSV	26	-	-	-	-	-	-	-	-	Exitus	
pcDNA4HisMax	45	-	-	-	-	-	-	-	-	Exitus	
pcDNA4HisMax	46	-	-	-	-	-	-	-	-	Exitus	
pcDNA4HisMax/pRC/RSV	174	-	-	-	-	-	-	-	-	Exitus	
pcDNA4HisMax-E2	47	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
pcDNA4HisMax-E2	48	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
pcDNA4HisMax-E2	170	-	+	+	+	+		+	+	+	+
pcDNA4HisMax-E2	171	-	-	-	+ ?	+	+	+	+	+	-
PRC/RSV-E2	49	-	-	-	-	-	-	-	+	Exitus	
PRC/RSV-E2	50	-	-	+	+	+	+	+	Exitus		
PRC/RSV-E2	172	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
PRC/RSV-E2	173	-	-	+	+ ?	+	+	+	+	+	+

Abb. 3-12: E2-spezifischer Antikörpernachweis. Die Zeitpunkte der Probenentnahme sind in Tagen nach der ersten Immunisierung angegeben, negativ (-) und positiv (+) getestete Tiere sind gekennzeichnet. Grenzwertige Testergebnisse sind als (+ ?) dargestellt. Die nach dem *challenge* (Tag 61) gewonnenen Proben sind **fett** markiert. Zeitpunkte, zu denen eine Serengewinnung für einzelne Tiere nicht möglich war, enthalten keine Markierung.

- Serumneutralisationstest

Zur näheren Charakterisierung der induzierten humoralen Immunantwort wurden weitere Tests durchgeführt. Nicht jeder der detektierten E2-spezifischen Antikörper ist in der Lage, das Virus wirklich zu neutralisieren. Um eine Quantifizierung der tatsächlich neutralisierenden Antikörper vorzunehmen, wurden alle im E2-spezifischen Antikörper-ELISA positiv getesteten Seren in einem Serumneutralisationstest weiter charakterisiert. Auffällig war, dass Gruppe 2 im Vergleich mit Gruppe 3 höhere neutralisierende Antikörpertiter zeigte. Dies korreliert mit den Beobachtungen, die für den Schutz der Tiere nach Infektion gemacht wurden. (Abb. 3-13).

Vektor	Tier-Nr.	22. Tag	29. Tag	36. Tag	43. Tag	50. Tag	57. Tag	64. Tag	67. Tag	72. Tag	78. Tag
pcDNA4HisMax-E2	47	-	-	-	-	64	192	320	>2,5x10⁴	>2,5x10⁴	>2,5x10⁴
pcDNA4HisMax-E2	48	-	-	-	-	48	48	60	2,5x10⁴	>2,5x10⁴	>2,5x10⁴
pcDNA4HisMax-E2	170	-	300	300	800	1600		800	1600	>2,5x10⁴	>2,5x10⁴
pcDNA4HisMax-E2	171	-	-	-	2	4	3	4	6	>256	-
pRC/RSV-E2	49	-	-	-	-	-	-	-	192	Exitus	
pRC/RSV-E2	50	-	-	6	12	96	64	48	Exitus		
pRC/RSV-E2	172	-	-	-	-	24	32	24	48	>2,5x10⁴	>2,5x10⁴
pRC/RSV-E2	173	-	-	48	16	16	16	16	24	1,9x10⁴	1,3x10⁴

Abb. 3-13: Serumneutralisationstest der im E2-spezifischen Antikörper-ELISA positiv getesteten Seren. Die neutralisierenden Antikörpertiter sind zum jeweiligen Zeitpunkt nach Immunisierung als Reziprokwert der Serumverdünnung angegeben, die 100 KCID₅₀ neutralisieren. Daten, die nach dem *challenge* (Tag 61) gewonnen wurden, sind **fett** markiert. Die Zeitpunkte, zu denen die Seren keine neutralisierenden Antikörper enthielten, sind durch (-) gekennzeichnet.

- IgG1/IgG2-isotypspezifischer ELISA

Durch Untersuchungen an B-Zellen ist bekannt, dass die T-Helferzellpopulationen durch die von ihnen ausgeschütteten Zytokine einen Immunglobulin-Klassenwechsel auslösen können [Stavnezer, 1996]. Das von T_H1-Zellen gebildete IFN- γ z.B. induziert die Bildung von IgG2a- und hemmt die Bildung von IgG1-Antikörpern, während das von T_H2-Zellen ausgeschüttete IL-4 einen gegensätzlichen Effekt zeigt. Durch Bestimmung der Klasse der E2-spezifischen Antikörper könnte eine Unterscheidung zwischen einer T_H1- bzw. T_H2-induzierten humoralen Immunantwort ermöglicht werden. Deshalb wurde ein IgG1- und IgG2-spezifischer ELISA etabliert und die Seren der Tiere 45, 48, 170 und 173 in verschiedenen Verdünnungen (unverdünnt, 1:50, 1:100) ausgetestet. Dabei diente das negative Serum von Tier 45 als Kontrolle. Für alle Seren außer für die Negativkontrolle wurden IgG1- und IgG2-E2-spezifische Antikörper nachgewiesen (Abb. 3-14), was sowohl auf eine T_H1- als auch T_H2-induzierte humorale Immunantwort hindeutet. Die Induktion durch eine dominierende T-Helferpopulation konnte nicht bestätigt werden.

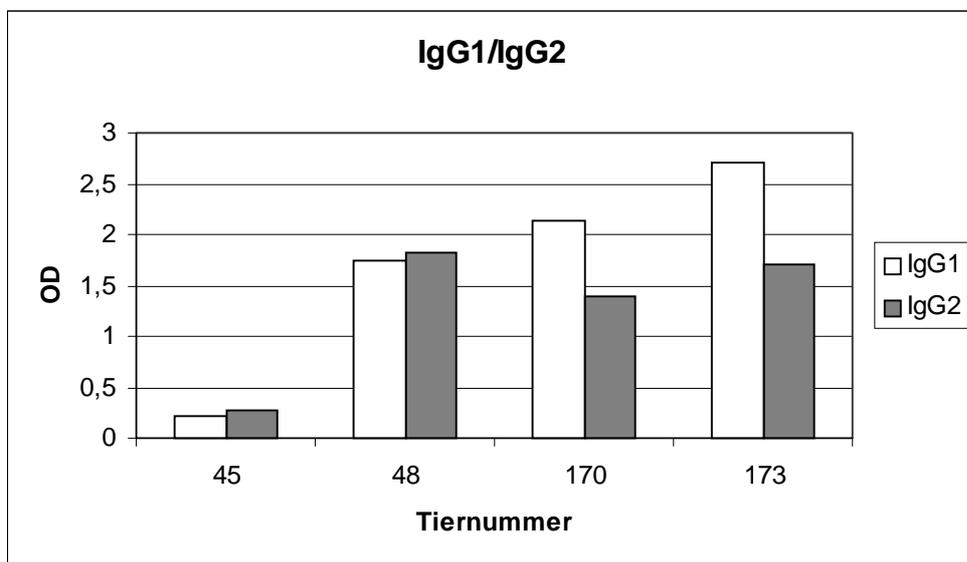


Abb. 3-14: IgG1/IgG2-spezifische Differenzierung der humoralen Immunantwort. Die Säulen geben den im ELISA gemessenen OD-Wert für die einzelnen Seren wieder. Die Seren wurden in dem Test unverdünnt eingesetzt. Als Primäntikörper diente ein monoklonaler anti-porciner IgG1- bzw. IgG2-Maus-Antikörper. Die Detektion erfolgte anschließend durch ein Ziege-anti-Maus-POD-gekoppeltes Antiserum. Beim Test wurde das Serum von Tier 45 (pcDNA4HisMax) als Negativkontrolle verwendet.

Der E2-spezifische Antikörper-ELISA diene aufgrund der hohen Zuverlässigkeit für alle weiteren Untersuchungen zur Bestätigung einer CSFV-E2-spezifischen Immunantwort. Weiterhin wurde auch der Serumneutralisationstest zur Quantifizierung der neutralisierenden Antikörper eingesetzt. Auf eine Differenzierung der E2-spezifischen humoralen Immunantwort in IgG1- und IgG2-spezifische Isotypen wurde in weiteren Versuchen verzichtet, da alle getesteten Seren entweder beide oder keinen der Isotypen aufwiesen.

3.3.2.2 Analyse der induzierten CSFV-spezifischen zellulären Immunantwort

- Proliferationsassay

Eine weitere interessante Frage war, ob eine durch DNA-Vakzine induzierte zelluläre Immunantwort ähnlich wie für die humorale Immunantwort gezeigt durch Testsysteme vor dem *challenge* signifikant erfasst werden kann. Bei Präsentation von Antigenfragmenten über MHC-Moleküle auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen wird bei Erkennung durch naive T-Zellen eine antigenspezifische Immunantwort ausgelöst.

Diese durch *in vivo* Antigenkontakt aktivierten T-Zellen können *in vitro* zur Proliferation, d.h. Zellteilung, angeregt werden. Diese Proliferation kann über den Einbau von radioaktivem [³H]Thymidin in die neusynthetisierte DNA quantifiziert werden. Diese für CSFV beschriebenen Untersuchungen [Armengol, 2001] wollten wir uns zunutze machen, um eine mögliche Induktion der E2-spezifischen zellulären Immunantwort durch DNA-Vakzinen vor der *challenge*-Infektion zu detektieren. Dafür wurden wöchentlich PBMC der einzelnen Tiere aufgereinigt und mit Virus (MOI 1 - 0,125) restimuliert. Als Negativkontrolle wurden PBMC mit Zellkulturüberstand inkubiert.

Es gelang für keines der Tiere, eine E2-spezifische Proliferation vor der *challenge*-Infektion nachzuweisen. Die gewonnenen Daten zeigten eine so hohe Variabilität zwischen den einzelnen Tieren und den Entnahmezeitpunkten, dass die Interpretation eines Trendverlaufs nicht möglich war. Die mögliche Ursache könnte hierbei entweder in der ungenügenden Sensitivität des Testsystems bzw. der nativen Heterogenität der Tiere oder in einer zu geringen Induktion der zellulären Immunantwort liegen.

- IFN- γ -ELISA und IFN- γ -ELISPOT

Ein weiterer Parameter für die Induktion der zellulären Immunantwort ist die IFN- γ -Ausschüttung durch aktivierte T_H1-Zellen. Versuche mit CSFV-infizierten Tieren, deren PBMC gewonnen und anschließend *in vitro* mit CSFV restimuliert wurden, zeigten einen Anstieg der IFN- γ -Ausschüttung durch aktivierte T_H1-Zellen [Armengol, 2001]. Deshalb wurde der Versuch unternommen, eine mögliche Induktion der zellulären Immunantwort nach DNA-Vakzinierung über den Anstieg der IFN- γ -Ausschüttung nach CSFV-Restimulation im IFN- γ -ELISA und IFN- γ -ELISPOT nachzuweisen. Durch den eingesetzten IFN- γ -ELISA sollte die sekretierte Menge an IFN- γ erfasst werden, während durch den IFN- γ -ELISPOT eine Quantifizierung der sekretierenden Zellen erfolgen sollte. Drei immunisierte Tiere wurden ausgewählt, Tier 46: pcDNA4HisMax, Tier 48: pcDNA4HisMax-E2 und Tier 175: pcDNA4HisMax-E2-CD40L. Es konnte für keines der Tiere im IFN- γ -ELISA und -ELISPOT ein spezifischer Anstieg der IFN- γ -Ausschüttung vor der *challenge*-Infektion festgestellt werden. Nach erfolgtem *challenge* zeigten sich hingegen deutlich CSFV-spezifische Steigerungen der IFN- γ -Ausschüttung im IFN- γ -ELISA (Daten nicht gezeigt) und IFN- γ -ELISPOT (Abb. 3-14) für die Tiere 48 und 175. Für das als Negativkontrolle fungierende Tier 46 konnte erwartungsgemäß aufgrund der massiven Virämie und der damit verbundenen Beeinträchtigung des Immunsystems kein Anstieg der IFN- γ -Ausschüttung detektiert werden.

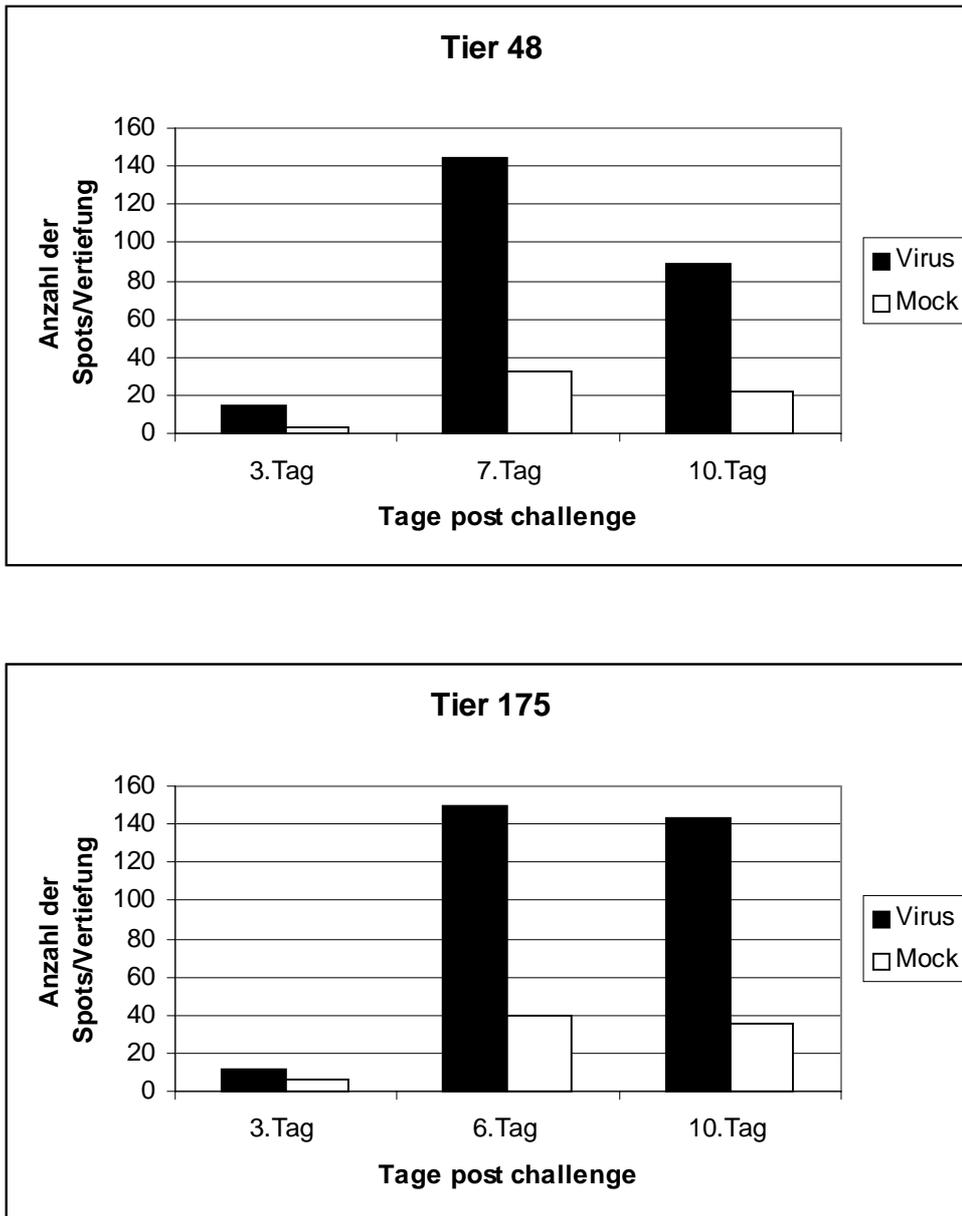


Abb. 3-14: IFN- γ -Sekretion zu verschiedenen Zeitpunkten nach *challenge*-Infektion. Die Abbildung zeigt die Zahl der im ELISPOT detektierten Zellen der Tiere 48 und 175. Die PBMC (1×10^7 Zellen/ml) wurden mit CSFV (MOI 1) inkubiert. Als Kontrolle dienten PBMC der jeweiligen Tiere, die in Medium von Mock-infizierten Zellen kultiviert wurden.

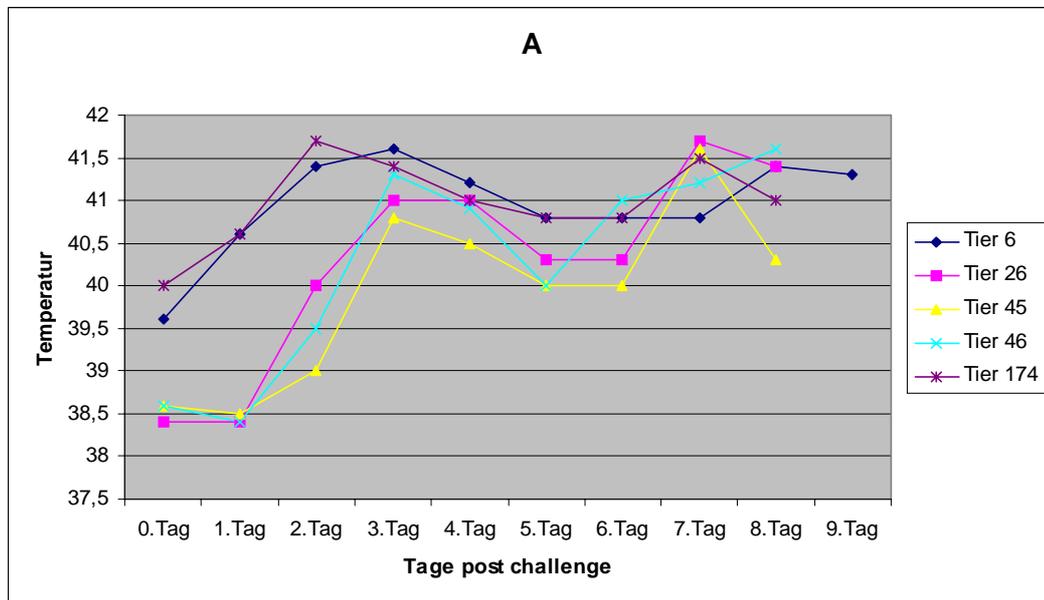
Zusammenfassend war es weder im Proliferationsassay noch mit IFN- γ -ELISA und -ELISPOT möglich, eine E2-spezifische zelluläre Immunantwort durch DNA-Vakzinierung vor dem *challenge* nachzuweisen. Nach erfolgtem *challenge* konnte hingegen bei allen E2-immunisierten Tieren eine starke Stimulation der zellulären Immunantwort detektiert werden. Dieser beobachtete und auf der *challenge*-Infektion basierende Effekt ist aus früheren Arbeiten bekannt [Armengol, 2001].

Deshalb wurde im dritten Versuchsteil auf eine weitere Detektion der zellulären E2-spezifischen Immunantwort verzichtet.

3.3.2.3 Klinischer Verlauf und Virämie

- Fieberkurven

Ein wichtiges Merkmal einer CSFV-Infektion ist der Temperaturanstieg, der je nach Verlaufsform (perakut/akut) variieren kann. Bei dem verwendeten CSFV-Stamm Eystrup kommt es zur Ausbildung eines akuten Krankheitsverlaufs. Das bedeutet u.a einen Anstieg der Körpertemperatur auf Werte $\geq 41^{\circ}\text{C}$ sowie Leukopenie, Nasenfluß zentralnervöse Störungen, Durchfall, Hämorrhagien sowie Zyanosen der Haut. Zur Überprüfung der Temperaturverläufe der einzelnen Tiergruppen (1-3) wurden deshalb Fieberkurven erstellt und analysiert (Abb. 3-15).



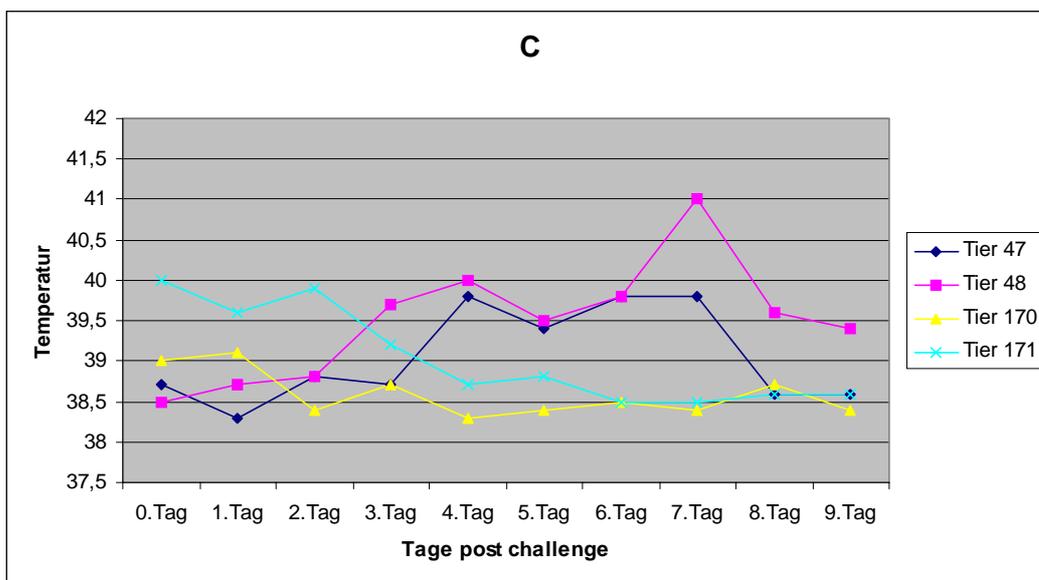
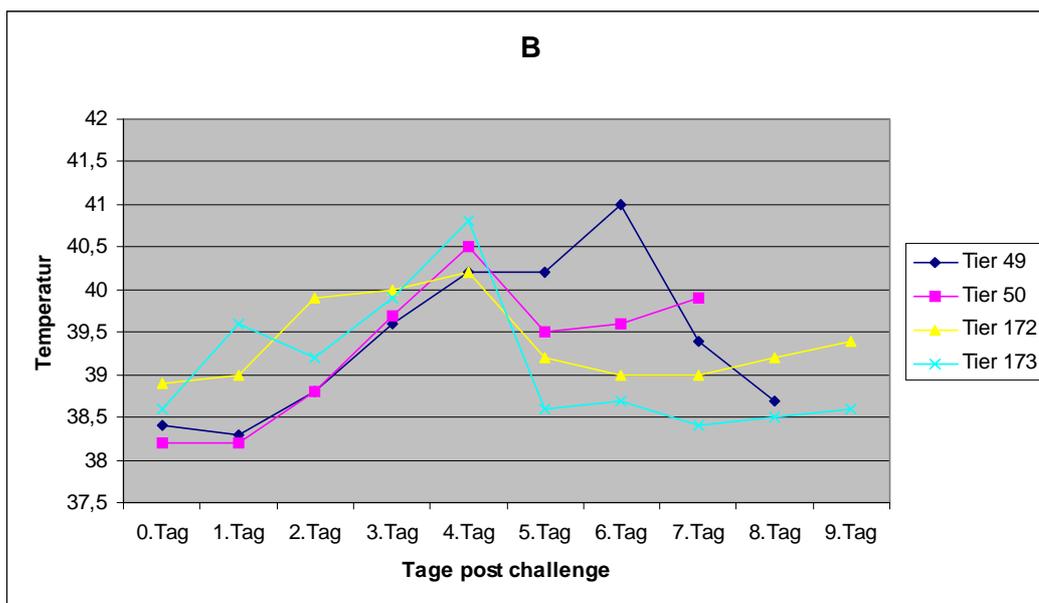


Abb. 3-15: Körpertemperatur der Tiere nach CSFV-Infektion. Die Einzeltemperaturen (°C) wurden in Tagen nach Infektion angegeben. Die Fieberkurven der mit leeren Vektoren immunisierten Tiere sind in Abb.15 A, die mit pRC/RSV-E2- in Abb. 15 B bzw. pcDNA4HisMax-E2 in Abb. 15 C zusammengefasst. Die Tiernummern sind in den jeweiligen Diagrammlegenden ausgewiesen.

Die Fieberkurven zeigen erwartungsgemäß für alle Kontrolltiere einen starken Anstieg der Temperatur ($\geq 41^{\circ}\text{C}$) nach CSFV-Infektion. Demgegenüber kommt es bei den mit E2-Vakzine-Vektoren immunisierten Tieren zu einem geringeren Temperaturanstieg und einer schnelleren Normalisierung der Körpertemperatur. Es fällt auf, dass beim

Vergleich der Tiere der Gruppen 2 und 3 die mit dem pcDNA4HisMax-E2-Plasmid immunisierten Tiere bezogen auf die Körpertemperatur eine schwächere Verlaufsform ausprägen als die mit dem pRC/RSV-E2-Plasmid immunisierten Tiere. Diese Daten decken sich mit den bei der Analyse der E2-spezifischen humoralen Immunantwort gemachten Beobachtungen.

- Virusnachweis in Blut und Organproben

Zur Erfassung der Schutzwirkung einer Vakzine ist die nach Infektion im Blut und in den Organen nachweisbare Virusmenge von entscheidender Bedeutung. Daher wurde Blut zu verschiedenen Zeitpunkten nach CSFV-Infektion entnommen und auf Virus untersucht (Abb. 3-16). Außerdem konnten nach Abschluß der Versuchsreihe Organproben der Tiere entnommen und deren Virusgehalt analysiert werden (Abb. 3-17).

Vektor	Tier-Nr.	3.Tag	6.Tag	8.Tag
pRC/RSV	6	-	$2,5 \times 10^2$	Exitus
pRC/RSV	26	-	$2,5 \times 10^2$	Exitus
pcDNA4HisMax	45	-	$2,5 \times 10^2$	Exitus
pcDNA4HisMax	46	-	$2,5 \times 10^3$	Exitus
pcDNA4HisMax/pRC/RSV	174	-	5×10^3	Exitus
pcDNA4HisMax-E2	47	-	-	-
pcDNA4HisMax-E2	48	-	-	-
pcDNA4HisMax-E2	170	-	-	-
pcDNA4HisMax-E2	171	-	-	-
pRC/RSV-E2	49	-	-	Exitus
pRC/RSV-E2	50	-	Exitus	
pRC/RSV-E2	172	-	-	-
pRC/RSV-E2	173	-	-	-

Abb. 3-16: Virusreisolation aus Vollblut nach CSFV-Infektion. Dazu wurden Blutproben 3, 6 und 8 Tage *post challenge* entnommen und eine Virustitration durchgeführt. Die Virustiter sind in Viruspartikeln/ml angegeben. Negativ getestete Blutproben sind mit (-) gekennzeichnet.

ERGEBNISSE

Vektor	Tier-Nr.	Niere	Milz	Darmlymphknoten	Tonsillen
pRC/RSV	6	-	5×10^4	5×10^4	-
pRC/RSV	26	5×10^3	5×10^4	5×10^4	5×10^2
pcDNA4HisMax	45	5×10^3	5×10^4	$>5 \times 10^4$	5×10^3
pcDNA4HisMax	46	5×10^4	5×10^4	5×10^4	5×10^4
pcDNA4HisMax/pRC/RSV	174	5×10^2	5×10^3	5×10^2	5×10^3
pcDNA4HisMax-E2	47	-	-	-	-
pcDNA4HisMax-E2	48	-	-	-	-
pcDNA4HisMax-E2	170	-	-	-	-
pcDNA4HisMax-E2	171	-	-	-	-
pRC/RSV-E2	49	-	-	-	-
pRC/RSV-E2	50	-	-	-	-
pRC/RSV-E2	172	-	-	-	-
pRC/RSV-E2	173	-	-	-	-

Abb. 3-17: Virusreisolation aus Niere, Milz, Darmlymphknoten und Tonsillen nach CSFV-Infektion. Dazu wurden die Organproben entnommen, das Gewebe zerkleinert und die erhaltenen Überstände für eine Virustitration eingesetzt. Die Virustiter sind in Viruspartikeln/g Organ angegeben. Negativ getestete Organproben sind mit (-) gekennzeichnet.

Sowohl im Blut als auch in den Organen der Kontrolltiere (Gruppe 1) konnte eindeutig Virus unterschiedlicher Menge nachgewiesen werden. Die jeweilige Virusmenge differierte abhängig von der genetischen Heterogenität des Immunsystems der Tiere. Für keines der Tiere der Gruppen 2 und 3 wurde Virus in Blut oder Organproben detektiert. Dies war besonders angesichts der hohen Sterberate (50%) der dritten Gruppe überraschend.

Im zweiten Versuchsteil (3.3.2) konnte anhand der deutlich höheren neutralisierenden Antikörpertiter, der Fieberkurven und nicht zuletzt der Überlebensrate der immunisierten Tiere festgestellt werden, dass die pcDNA4HisMax-E2-Konstrukte einen besseren CSFV E2-spezifischen Schutz induzierten als die pRC/RSV-E2-

Konstrukte. Daher wurden im dritten Versuchsteil die auf dem pcDNA4HisMax-E2-Plasmid basierenden Konstrukte näher analysiert.

Aufgrund der gewonnenen Daten konnte in den folgenden Versuchen auf den Nachweis einer Induktion der zellulären Immunantwort verzichtet werden. Die Dokumentation der Schutzwirkung sollte über die neutralisierenden Antikörpertiter sowie die Virusvermehrung (Blut, Organproben) und Virusausscheidung (Nasentupfer) erfolgen. Zusätzlich wurde der klinische Verlauf anhand der Fieberkurven erfasst und mögliche Unterschiede in der B-Zell-Depletion nach erfolgter CSFV Infektion für die einzelnen Konstrukte durch FACS-Analysen überprüft.

3.3.3 Vergleichende Analyse der E2-IL-18/ IL-12/ CD40L Vektorsysteme

Durch die beiden ersten Versuchsteile war es gelungen, die Rahmenbedingungen des Tierversuchs sowie die zur Überprüfung der Schutzwirkung bestmöglichen Testsysteme zu etablieren und auszuwählen. Außerdem erfolgte eine Selektion der E2-Grundkonstrukte anhand der erzielten Schutzwirkung. Um die Auswirkung der zusätzlich inserierten Zytokine und immunstimulatorischen Moleküle auf die Wirksamkeit der E2-Vakzine zu charakterisieren, wurden 15 Tiere, wie in Abb. 3-18 dargestellt, immunisiert und anschließend einer letalen CSFV-Infektion unterzogen (siehe 3.3.1). Von den Tieren wurde wöchentlich Vollblut und Serum gewonnen und mittels unterschiedlicher Testsysteme (siehe 3.3.2.3) untersucht.

ERGEBNISSE

Gruppe	Tiernummer	Vektor
4	808	pcDNA4HisMax
	852	pcDNA4HisMax
5	806	pcDNA4HisMax-E2
6	854	pcDNA4HisMax-E2-IL-12
	43338	pcDNA4HisMax-E2-IL-12
	801	pcDNA4HisMax-E2-IL-12
	807	pcDNA4HisMax-E2-IL-12
7	818	pcDNA4HisMax-E2-IL-18
	866	pcDNA4HisMax-E2-IL-18
	810	pcDNA4HisMax-E2-IL-18
	830	pcDNA4HisMax-E2-IL-18
8	835	pcDNA4HisMax-E2-CD40L
	834	pcDNA4HisMax-E2-CD40L
	833	pcDNA4HisMax-E2-CD40L
	820	pcDNA4HisMax-E2-CD40L

Abb. 3-18: Immunisierungsschema der Tiergruppen zur vergleichenden Analyse der E2- IL-18/ IL-12/ CD40L-Vektoren. Es sind die Tiergruppen, Tiernummern und die jeweils applizierten Vektoren dargestellt.

3.3.3.1 Analyse der induzierten CSFV-spezifischen humoralen Immunantwort

Wie in den vorangegangenen Versuchsteilen wurden die Serumproben mittels eines E2-spezifischen Antikörper-ELISA untersucht und der Titer der positiv getesteten Seren anschließend mit Hilfe eines Serumneutralisationstestes bestimmt (Abb. 3-19).

Die als Negativkontrollen eingesetzten Tiere (852, 808) zeigten das klassische Bild einer CSFV-Infektion und verstarben sechs bzw. sieben Tage *post challenge*, ohne nachweisbare CSFV-spezifische Antikörper. Die geringsten neutralisierenden

Antikörpertiter vor –und nach CSFV-Infektion wurden für die mit dem pcDNA4HisMax-E2-IL-12-Konstrukt immunisierten Tiere nachgewiesen, von denen 50% vor Abschluss des Versuches verstarben. Die Titer lagen deutlich unter den Werten der Tiere die mit dem pcDNA4HisMax-E2-Konstrukt immunisiert wurden. Im Gegensatz dazu konnte für die Tiere der Gruppen 7 (pcDNA4HisMax-E2-IL-18) und 8 (pcDNA4HisMax-E2-CD40L) während der gesamten Versuchsdauer keine auffällige Symptomatik beobachtet werden. Für beide Gruppen wurden hohe neutralisierende Antikörpertiter vor -und nach erfolgter CSFV-Infektion detektiert. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit der Induktion einer spezifischen humoralen Immunantwort zur Erzeugung einer effektiven CSFV-spezifischen Schutzwirkung .

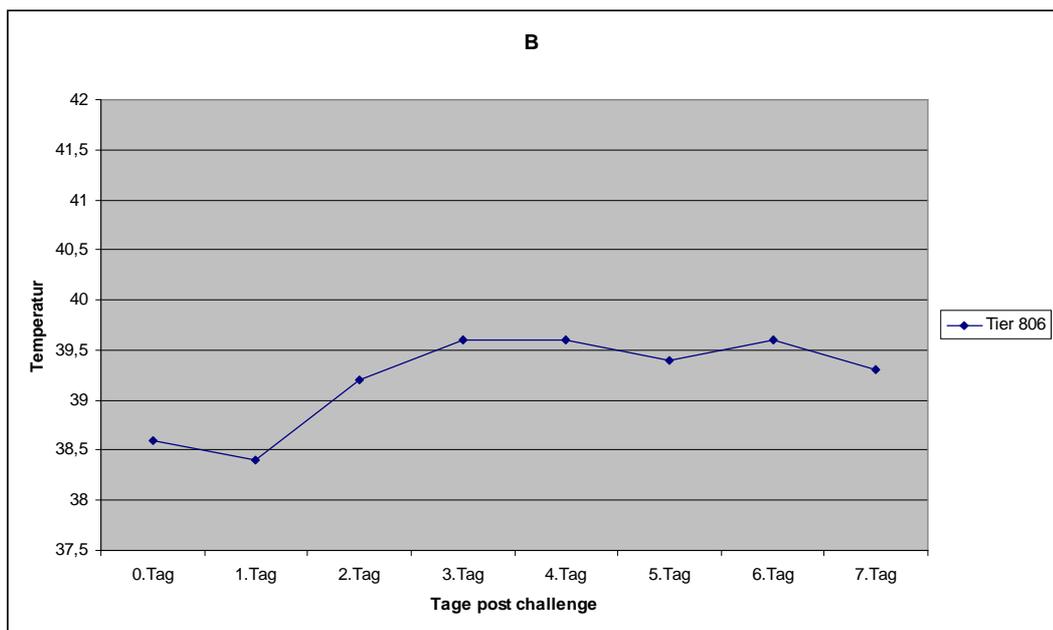
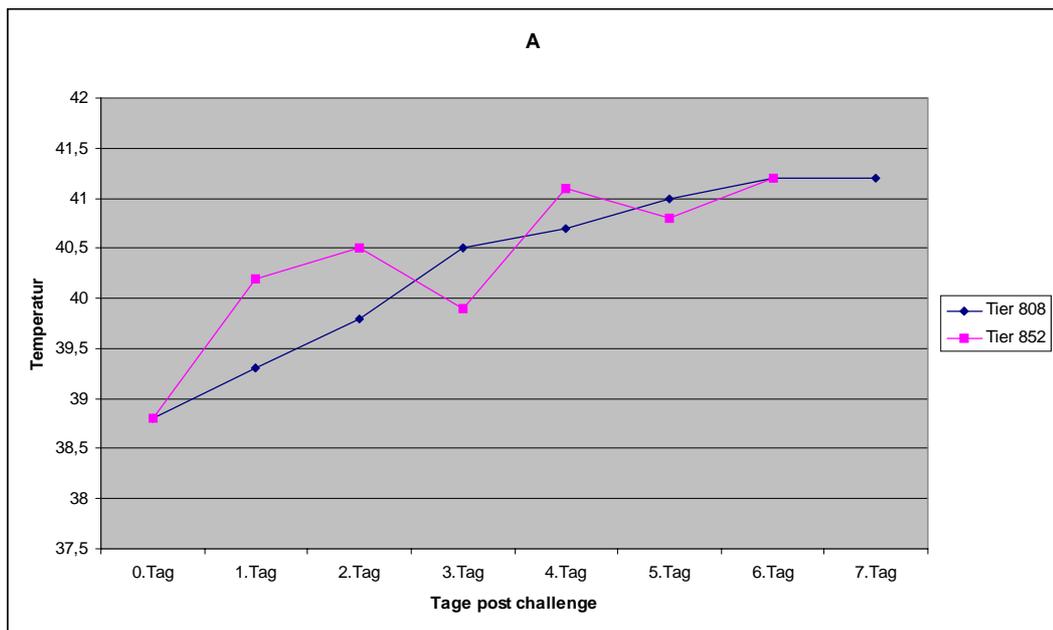
Gruppe	Tiere-Nr.	22. Tag	29. Tag	36. Tag	43. Tag	50. Tag	57. Tag	65. Tag	68. Tag	71. Tag	75. Tag	81. Tag
4	808	-	-	-	x	-	-	-				
	852	-	-	-	x	-	-	-	-			
5	806	-	60	60	x	60	120	240				
6	854	-	-	-	x	-	-	-				
	43338	-	-	-	x	-	-	-	160	1920	1200	2000
	801	-	-	-	x	-	-	-	-			
	807	-	-	-	x	-	20	30	1280	9600	6400	8000
7	818	-	-	-	x	-	30	80	2560	9600	9600	2,4x10⁴
	866	-	-	-	x	40	80	120	1280	2,5x10⁴	2,5x10⁴	3,2x10⁴
	810	-	-	-	x	30	320	480	2560	1,3x10⁴	1x10⁴	1,2x10⁴
	830	-	60	60	x	20	240	320	640	3200	1,3x10⁴	1,2x10⁴
8	835	-	-	-	x	-	6	6	120	480	2400	4000
	834	-	10	15	x	30	60	40	160	1,3x10⁴	1,9x10⁴	3,2x10⁴
	833	-	-	-	x	6	30	20	1920	2,5x10⁴	1,9x10⁴	3,2x10⁴
	820	-	-	-	x	8	120	160	1280	9600	4800	1,6x10⁴

Abb. 3-19: Serumneutralisationstest der im E2-spezifischen Antikörper-ELISA positiv getesteten Seren. Die neutralisierenden Antikörpertiter sind zum jeweiligen Zeitpunkt nach Immunisierung als Reziprokwert der Serumverdünnung angegeben, die 100 KCID₅₀ neutralisieren. Daten, die nach dem *challenge* (Tag 61) gewonnen wurden, sind **fett** markiert. Die Zeitpunkte, an denen die Seren keine neutralisierenden Antikörper enthielten, sind durch (-) gekennzeichnet. Am Tag 43 nach Immunisierung war keine Probenentnahme möglich (x).

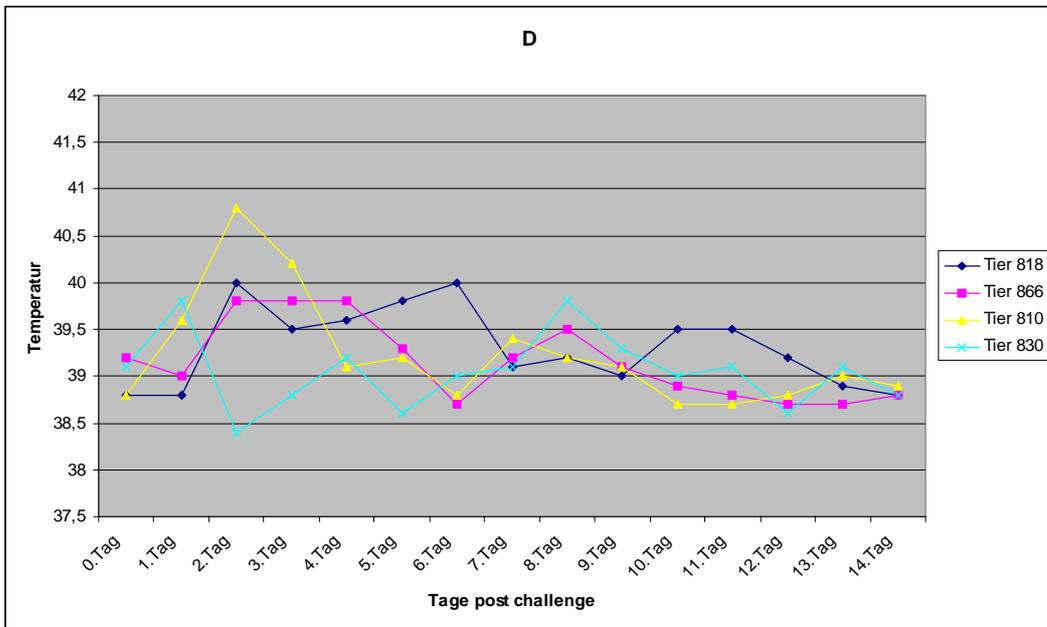
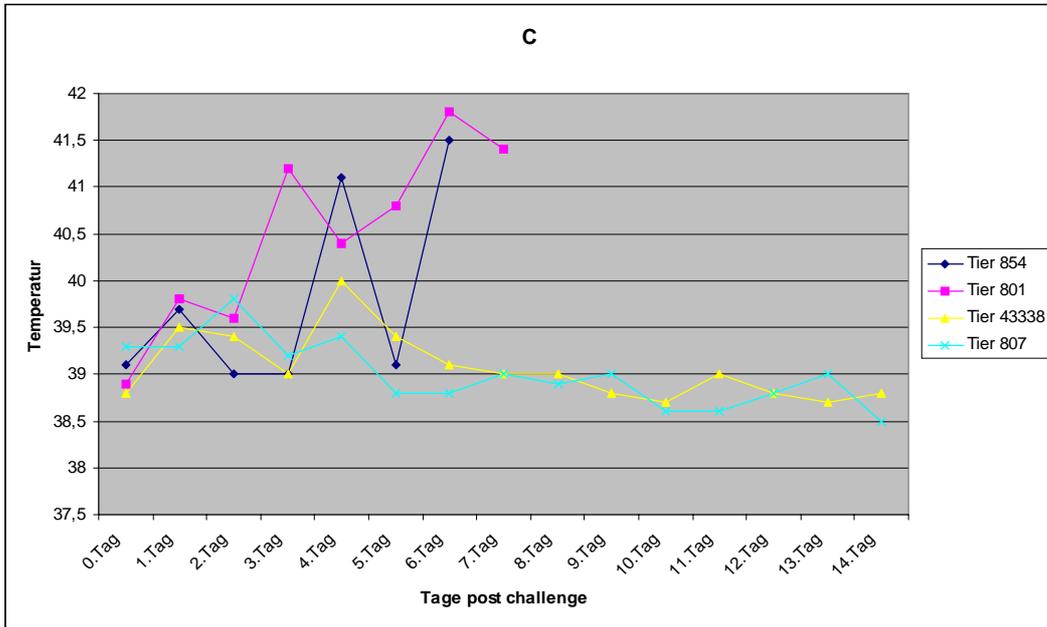
3.3.3.2 Klinischer Verlauf und Virämie

- Fieberkurven

Zur Dokumentation der klinischen Verläufe der einzelnen Tiergruppen nach CSFV Infektion wurden wie in den vorangegangenen Versuchsteilen Fieberkurven erstellt und analysiert (Abb. 3-20).



ERGEBNISSE



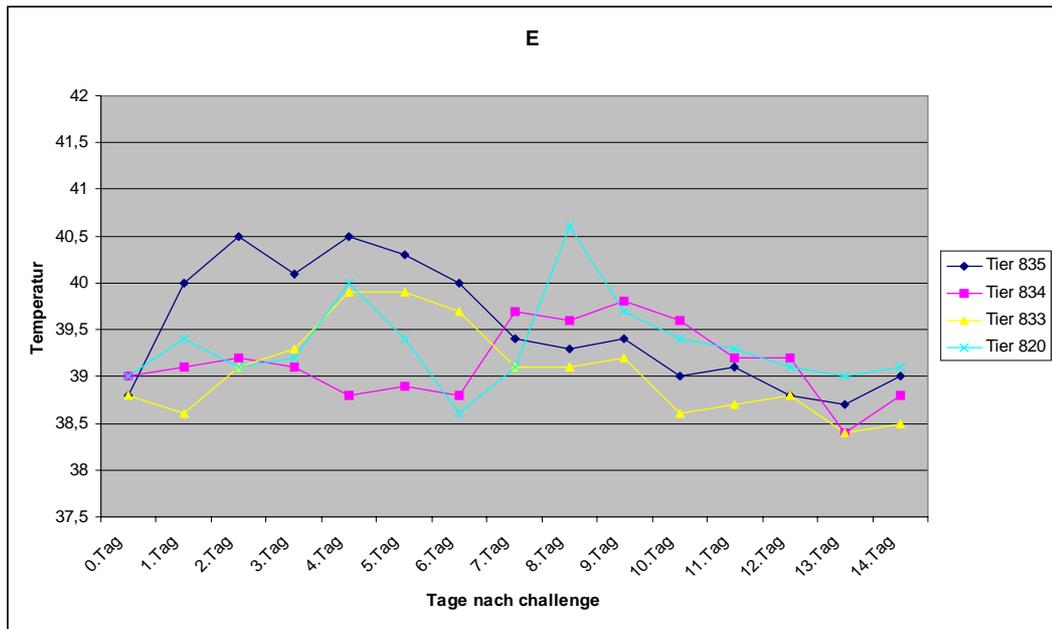


Abb. 3-20: Körpertemperatur der Tiere nach CSFV-Infektion. Die Einzeltemperaturen sind in °C für verschiedene Zeitpunkt nach CSFV-Infektion angegeben. Die Fieberkurven der mit leeren Vektoren immunisierten Tiere sind in Abb. 20 A, die mit dem pcDNA4HisMax-E2-IL-12 sind in Abb. 20 B, mit dem pcDNA4HisMax-E2-IL-18 in Abb. 20 C und die mit dem pcDNA4HisMax-E2-CD40L in Abb. 20 D zusammengefasst. Die Tiernummern sind in den jeweiligen Diagrammlegenden ausgewiesen.

Die Fieberkurven zeigen auch hier für alle Kontrolltiere (808, 852) einen starken und kontinuierlichen Anstieg der Körpertemperatur nach CSFV-Infektion. Für das mit dem E2-Konstrukt immunisierte Tier treten trotz des frühzeitigen Todes abgesehen von einem leichten Anstieg der Temperatur in den ersten vier Tagen *post challenge* keine starken Schwankungen der Temperatur auf. Ähnliche Fieberkurven konnten für die Tiere der Gruppen 7 (pcDNAHisMax-E2-IL-18) und 8 (pcDNAHisMax-E2-CD40L) dokumentiert werden. Im Gegensatz dazu zeigten die Tiere, die mit dem pcDNA4HisMax-E2-IL-12-Plasmid immunisiert wurden, starke Unterschiede innerhalb der Gruppe. Zwei der Tiere (801, 854) entwickelten klassische Symptome einer CSFV-Infektion, u.a. auch hohe Fieberwerte, und verstarben sechs bzw. sieben Tage *post challenge*. Die anderen beiden Tiere der Gruppe 6 überlebten die *challenge*-Infektion und zeigten unauffällige Temperaturverläufe. Diese Daten stimmen mit den gemessenen neutralisierenden Antikörpertitern überein: während für die Tiere 801 und 854 weder *prä* noch *post challenge* neutralisierende Antikörper nachgewiesen wurden,

ERGEBNISSE

zeigten die Tiere 807 und 43338 nur reduzierte Antikörpertiter nach *challenge*-Infektion.

- Virusnachweis in Blut, Organen und Nasensekret

Für die Analyse der Virusausbreitung in Blut und Organen sowie der Virusausscheidung wurden Blut- (Abb. 3-22), Organ- (Abb. 3-21) und Nasentupferproben (Abb. 3-23) zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach CSFV-Infektion entnommen und deren Virusgehalt bestimmt.

Gruppe	Tier-Nr.	Niere	Milz	Darmlymphknoten	Leber	Lunge	Tonsillen
4	808	$>2,5 \times 10^6$	$>2,5 \times 10^6$	$2,5 \times 10^5$	$>2,5 \times 10^6$	5×10^5	5×10^5
	852	$2,5 \times 10^5$	5×10^5	$2,5 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$	5×10^4	$2,5 \times 10^5$
5	806	-	-	-	-	-	-
6	854	-	-	-	-	-	-
	43338	-	-	-	-	-	-
	801	5×10^3	$>5 \times 10^5$	5×10^4	1×10^5	1×10^4	$>5 \times 10^5$
	807	-	-	-	-	-	-
7	818	-	-	-	-	-	-
	866	-	-	-	-	-	-
	810	-	-	-	-	-	-
	830	-	-	-	-	-	-
8	835	-	-	-	-	-	-
	834	-	-	-	-	-	-
	833	-	-	-	-	-	-
	820	-	-	-	-	-	-

Abb. 3-21: Virusreisolation aus Niere, Milz, Darmlymphknoten, Leber, Lunge und Tonsillen nach CSFV-Infektion. Dazu wurden die Organproben entnommen, das Gewebe zerkleinert und die erhaltenen Überstände für eine Virustitration eingesetzt. Die Virustiter sind in Viruspartikeln/ g Organ angegeben. Negativ getestete Organproben sind mit (-) gekennzeichnet.

ERGEBNISSE

Gruppe	Tier-Nr.	4. Tag	7. Tag	10. Tag	14. Tag	20. Tag
4	808	5×10^3	5×10^3			
	852	5×10^3	5×10^4			
5	806	-	-			
6	854	5×10^1	-			
	43338	-	-	-	-	-
	801	-	-			
	807	-	-	-	-	-
7	818	-	-	-	-	-
	866	-	-	-	-	-
	810	-	-	-	-	-
	830	-	-	-	-	-
8	835	-	-	-	-	-
	834	-	-	-	-	-
	833	-	-	-	-	-
	820	-	-	-	-	-

Abb. 3-22: Virusreisolation aus Vollblut nach CSFV-Infektion. Dazu wurden Blutproben 4, 7, 10, 14 und 20 Tage *post challenge* entnommen und eine Virustitration durchgeführt. Die Virustiter sind in Viruspartikeln/ ml Blut angegeben. Negativ getestete Blutproben sind mit (-) gekennzeichnet.

ERGEBNISSE

Gruppe	Tier-Nr.	4. Tag	7. Tag	10. Tag	14. Tag	20. Tag
4	808	-	1x10 ³	Exitus 7.Tag		
	852	1x10 ⁴	Exitus 6.Tag			
5	806	-	-	Exitus 7.Tag		
6	854	-	Exitus 6.Tag			
	43338	-	-	-	-	-
	801	-	-	Exitus 7.Tag		
	807	-	-	-	-	-
7	818	-	-	-	-	-
	866	-	-	-	-	-
	810	-	-	-	-	-
	830	-	-	-	-	-
8	835	-	-	-	-	-
	834	-	-	-	-	-
	833	-	-	-	-	-
	820	-	-	-	-	-

Abb. 3-23: Virusreisolation aus Nasentupferproben nach CSFV-Infektion. Dazu wurden die Proben am Tag 4, 7, 10, 14, und 20 nach Infektion entnommen, in PBS resuspendiert und anschließend für eine Virustitration eingesetzt. Die Virustiter sind in Viruspartikeln/ml Sekre suspension angegeben. Negativ getestete Nasentupferproben sind mit (-) gekennzeichnet.

Die bei der Auswertung der Blut- Organ- und Nasentupferproben gewonnenen Daten korrelieren mit den Daten der CSFV-spezifischen humoralen Immunantwort, den Krankheitsverläufen und der Lebensdauer der Tiere. Alle Kontrolltiere (Gruppe 4) zeigten neben klinischen Symptomen und eines frühzeitigen Todes (6. bzw. 7. Tag *post challenge*) auch hohe Virustiter in Blut-, Organ- und Nasentupferproben. Besonders die hohen Virustiter von 2,5x10³ (Tier 808) bzw. 2,5x10⁴ (Tier 852) Viruspartikeln/ml Gehirnsuspension dokumentieren die Stringenz der *challenge*-Infektion. Überraschenderweise verstarb auch das mit dem E2-Grundkonstrukt immunisierte Tier sieben Tage *post challenge* trotz nachweisbarer neutralisierender

Antikörper und virusfreier Organ-, Blut- und Nasentupferproben. Ähnliches gilt auch für die mit dem pcDNA4HisMax-E2-IL-12-Konstrukt immunisierte Tiergruppe. Hier konnte ein deutlicher Rückgang der neutralisierenden Antikörpertiter im Verhältnis zu den E2-Grundkonstrukten und die Ausprägung von klinischen Symptomen einer CSFV-Infektion mit akutem Verlauf (siehe 3.3.2.3) beobachtet werden. Diese Tatsache bedingt vermutlich u.a. auch den schlechten Allgemeinzustand und die vorzeitige Sterblichkeit von 50% der Tiere. Das zusätzlich inserierte IL-12 scheint hier als klassisches T_H1-Cytokin einen negativen Effekt auf die Induktion einer CSFV-spezifischen Immunantwort auszuüben. Die Tiere der Gruppen 7 (pcDNA4HisMax-E2-IL-18) und 8 (pcDNA4HisMax-E2-CD40L) hingegen waren durch die DNA-Vakzine vor einem letalen CSFV-*challenge* geschützt. Bei den Tieren konnten keine klinischen Symptome einer CSFV-Infektion beobachtet werden. Außerdem stieg die Körpertemperatur bei keinem Tier der Gruppen 7 und 8 über 40 °C. Die verzeichneten leichten Differenzen zwischen den Fieberkurven der E2-IL-18- bzw. E2-CD40L-Konstrukte stimmen mit den geringen Unterschieden der induzierten neutralisierenden Antikörpertiter *prä* und *post challenge* überein. Aufgrund der Heterogenität der erfassten Daten und den nur geringen Unterschieden im Temperaturverlauf bzw. bei den Antikörpertitern im Verhältnis zu dem E2-Grundkonstrukt fällt es schwer, eine vereinzelte Verstärkung der CSFV-spezifischen Immunantwort auf das zusätzlich inserierte IL-18 bzw. den CD40L zurückzuführen.

- Durchflußzytometrische-Analyse

Zur Erfassung der für CSFV beschriebenen B-Zell-Depletion [Meyers, 1999; Susa, 1992] wurden Blutproben zu verschiedenen Zeitpunkten nach CSFV-Infektion entnommen und nach Markierung mittels eines CD21-spezifischen monoklonalen Antikörpers [Denham, 1994/98] im FACS analysiert. Die Auswertung des prozentualen Anteils der CD21⁺-Zellen an den PBMC ergab erwartungsgemäß eine starke B-Zell-Depletion für die Tiere der Kontrollgruppe (4) sowie die vorzeitig verstorbenen Tiere der Gruppen 5 (pcDNAHisMax-E2) (Tier 806) und 6 (pcDNAHisMax-E2-IL-12) (Tier 854, 801). Für die restlichen Tiere der Gruppe 6

ERGEBNISSE

wurde nur eine kurzzeitige Abnahme der B-Zellpopulation am vierten Tag post *challenge* nachgewiesen.

Die vor einer letalen CSFV-Infektion geschützten Tiere der Gruppen 7 (pcDNA4HisMax-IL-18) und 8 (pcDNA4HisMax-CD40L) dagegen zeigten bei durchflußzytometrischer Analyse eine Unterdrückung der B-Zell-Depletion (Abb. 3-24).

Gruppe	Tier-Nr.	Tag 0	Tag 4	Tag 7	Tag 10	Tag 14	Tag 20
4	808	11	1	1			
	852	8	3				
5	806	13	6	8			
6	854	9	2				
	43338	5	2	5	7	8	8
	801	18		1			
	807	5	3	8	10	10	9
7	818	7	3	9	13	12	13
	866	4	3	6	9	10	7
	810	4	6	6	7	9	9
	830	6	10	11	9	12	9
8	835	5	2	3	6	10	9
	834	13	11	8	9	16	13
	833	4	2	4	6	8	7
	820	6	6	12	17	21	13

Abb. 3-24: Prozentualer Anteil der CD21-positiven B-Lymphozyten an den PBMC CSFV-infizierter Tiere. Blut wurde mit einem monoklonalen Maus-anti-Schwein-CD21-Antikörper markiert, und mittels Durchflußzytometrie analysiert. Es sind die Tiergruppen und die jeweiligen Entnahmezeitpunkte angegeben.

Die so erfassten prozentualen Werte geben zwar den relativen Anteil einzelner Zellfraktionen wieder, es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass die scheinbare Zunahme einer Zellfraktion lediglich durch die anteilmäßige Abnahme einer oder

mehrerer anderer Zellfraktionen zustande kommt. Daher wurde für jede Analyse zusätzlich die absolute Zellzahl ermittelt und daraus die absolute Anzahl der B-Zellen bestimmt. Diese Daten bestätigten die vorherigen Beobachtungen (Daten nicht gezeigt) und machen deutlich, dass beim Vergleich mit allen anderen Konstrukten eine Immunisierung mit dem pcDNA4HisMax-E2-IL-18-bzw. pcDNA4HisMax-CD40L-Konstrukt nicht nur eine B-Zell-Depletion unterdrückt, sondern außerdem in einigen Fällen eine Stimulation der B-Zell-Proliferation bewirkt

3.4 Darstellung von porcinem IL-12, IL-18 und dem CD40L im pro- und eukaryontischen System

Ein weiterer wichtiger Aspekt dieser Arbeit bestand in der Expression und Charakterisierung der Zytokine und immunstimulatorischen Moleküle. Dabei wurden zwei grundlegende Strategien verfolgt. Zum einen sollten durch prokaryontische Systeme die Proteine in großen Mengen exprimiert und gereinigt werden, um anschließend, so weit noch nicht vorhanden, spezifische Antiseren herzustellen.

Zum anderen sollten Zytokine und immunstimulatorische Moleküle im eukaryontischen System als aktive Moleküle exprimiert werden, da die fehlenden Glykosylierungen und mögliche konformationelle Unterschiede im prokaryontischen Expressionssystem unter Umständen einen Verlust dieser biologischen Aktivität nach sich ziehen könnten.

Zur Darstellung der Proteine wurde die cDNA von CD40L, IL-12 und IL-18 in prokaryontische und eukaryontische Vektoren kloniert und die Expression anhand von SDS-PAGE und Western Blot sowie gegebenenfalls durch Radioimmunpräzipitation oder funktionelle Assays analysiert.

3.4.1 Prokaryontische Expression und Reinigung des porcinen CD40L

Für die Expression des porcinen CD40L-Gens wurde das pQE-*E.coli*-Expressionssystem ausgewählt, da es bereits mehrfach mit großem Erfolg eingesetzt wurde [Oem, 2000] und die Möglichkeit einer induzierbaren Expression bietet.

Da sich, ausgehend von früheren Erfahrungen, eine Expression membranständiger Moleküle aufgrund der Signal-Anker-Sequenz in prokaryontischen Systemen als

schwierig erwies, sollten zwei Konstrukte erstellt werden, von denen eines die komplette CD40L-cDNA (CD40L⁺-Konstrukt) und ein anderes die cDNA ohne Signal-Anker-Sequenz (CD40L⁻-Konstrukt, ohne AS: 1-44) enthielt. Erwartungsgemäß sollte bei dem Konstrukt ohne Signal-Anker-Sequenz eine Expression des porcinen CD40L als lösliches intrazelluläres Protein erfolgen, da eine Verankerung in der Membran ohne Ankersequenz nicht möglich ist.

Aus diesem Grund wurde die cDNA des porcinen CD40L für das CD40L⁺-Konstrukt mit den Primern CD40L-bak.seq/rev und für die Sequenz des CD40L⁻-Konstruktes mit den Primern Anker.seq/CD40L-bak.rev aus dem pcDNA4HisMax-E2-CD40L-Plasmid amplifiziert. Dadurch verkürzte sich bei dem CD40L⁻-Konstrukt die Sequenz N-terminal um die 44 AS lange Signal-Anker-Sequenz. Außerdem wurden die für die Klonierung erforderlichen Schnittstellen und ein, für die affinitätschromatographische Reinigung des rekombinanten CD40L mittels Ni²⁺-NTA-Agarose notwendiges, carboxyterminales Hexahistidin-Ende durch die verwendeten Primer eingeführt.

Nach Verdau mit den Restriktionsenzymen Sph I/Sal I wurden die Fragmente in den ebenfalls Sph I/Sal I verdauten pQE-51-Vektor kloniert und die Spezifität des Fragmentes durch Sequenzierung bestätigt (Abb. 3-25)

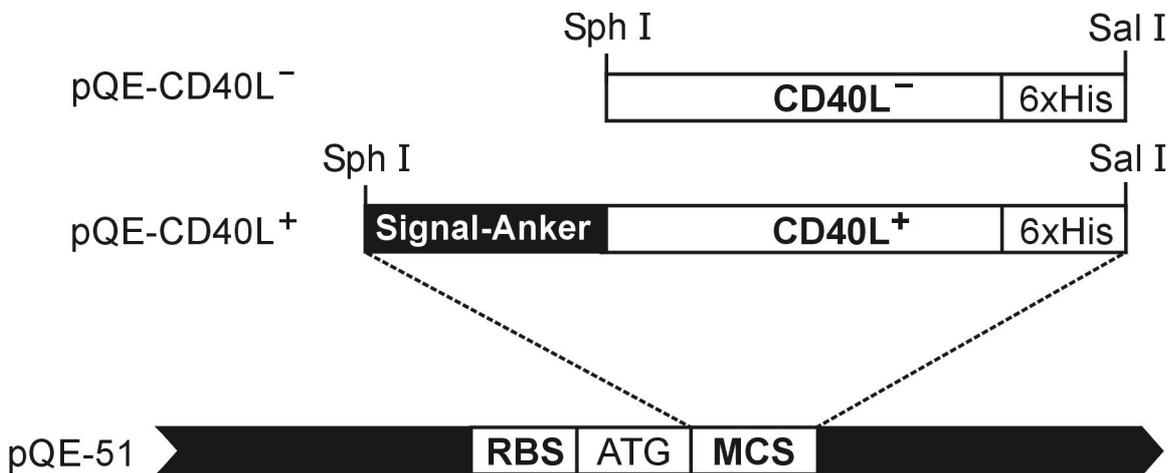


Abb. 3-25: Klonierungsstrategie für die pQE-CD40L-Expressionsplasmide. Für die Herstellung der CD40L-Konstrukte wurde das CD40L-Fragment mit den Primern CD40L-bak.seq/rev (CD40L⁺) sowie Anker.seq/CD40L-bak.rev (CD40L⁻) mittels PCR amplifiziert und über die eingeführten Sph I/Sal I-Schnittstellen nach Verdau in den pQE-51-Vektor inseriert. Bei beiden PCR-Fragmenten wurde zusätzlich ein Hexahistidin-Ende über den Revers-Primer (CD40L-bak.rev) eingeführt.

Nach Transformation von *E.coli* mit den entsprechenden pQE-CD40L^{+/-}-Plasmiden wurden die Übernachtskulturen mit 0,8 mM IPTG induziert. Beim Vergleich von induzierten und nicht induzierten Kulturen in *Coomassie*-gefärbten PAA-Gelen konnten deutliche Mengen von rekombinantem CD40L⁻ detektiert werden (Abb. 3-26 A). Für das CD40L⁺-Konstrukt war es nicht möglich, einen Nachweis der Expression zu erbringen. Der rekombinante CD40L⁻ wurde anschließend nativ bzw. denaturierend mittels Affinitätschromatographie über Ni²⁺-NTA-Agarose aufgereinigt. Allerdings konnten nur bei der denaturierenden Aufreinigung relevante Mengen an rekombinantem Protein in *Coomassie*-gefärbten PAA-Gelen detektiert werden (Abb. 3-26 B). Eine mögliche Ursache liegt in der Unzugänglichkeit des Hexahistidin-Endes bei nativer Proteinfaltung, wodurch eine Bindung an die Ni²⁺-NTA-Agarose-Säule erschwert wird.

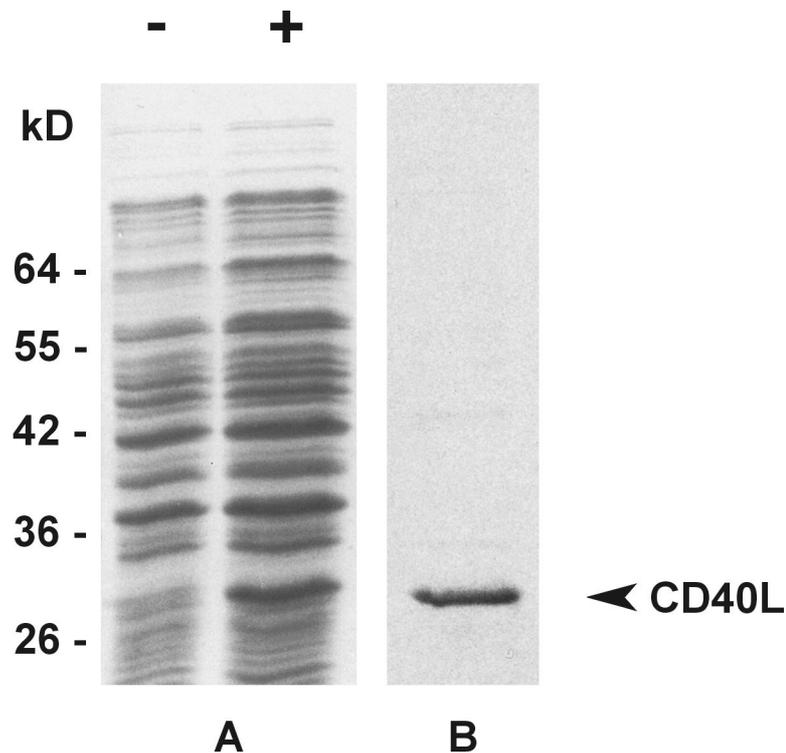


Abb. 3-26: CD40L⁻-Expression als Hexahistidin-Fusionsprotein. A zeigt die Induktion des CD40L⁻ Hexahistidin-Fusionsproteins. Gesamtzelllysat von induzierten (+) und nicht induzierten (-) Kulturen wurde in einem 12,5%igem PAA-Gel aufgetrennt und mit *Coomassie* gefärbt. In Abb. B ist das rekombinante porcine CD40L⁻ nach denaturierender affinitätschromatographischer Reinigung in einem *Coomassie*-gefärbten 12,5%igem PAA-Gel dargestellt. Relevante Größen des Protein-Längenstandards sind jeweils am linken Bildrand bezeichnet.

Da zum damaligen Zeitpunkt kein entsprechendes Antiserum zur Detektion des porcinen CD40L zur Verfügung stand, wurde das gereinigte und anschließend dialysierte CD40L-Protein zur Herstellung eines polyklonalen Kaninchenantisera verwendet (siehe 3.4.4).

3.4.2 Prokaryontische Expression und Reinigung von porcinem IL-12

Bei der Expression des porcinen IL-12 ergab sich das Problem, dass die beiden Untereinheiten (p35/p40) aufgrund der Unwirksamkeit der eingeführten IRES in Bakterien getrennt voneinander exprimiert werden mussten.

3.4.2.1 Expression der p40-Untereinheit des IL-12

Da Versuche einer Expression der kompletten p40-Untereinheit des IL-12 im pQE-51-System nach Optimierung der Induktion keine befriedigenden Ergebnisse erbrachten (Daten nicht gezeigt), wurde ein anderes Expressionskonzept etabliert. Dazu sollte eine N-terminale Sequenz von etwa 30 AS aus der p40-Untereinheit entfernt werden, da aus früheren Experimenten bekannt war, dass Proteine, die einen sehr hydrophoben N-terminalen oder C-terminalen Bereich aufweisen, eine wesentlich geringere Expression in *E.coli* zeigen [Kim, 1999].

Das p40-Fragment wurde mit Hilfe der Primer p40-bak.seq/rev durch PCR aus dem pcDNA4HisMax-E2-IL-12-Plasmid amplifiziert und anschließend in den pQE-60-Vektor, über die durch PCR in das Fragment eingeführten Schnittstellen (Nco I/Bgl II), subkloniert (Abb. 3-27). Der pQE-60-Vektor bietet den Vorteil, dass carboxyterminal ein Hexahistidin-Ende im Vektor vorhanden ist.

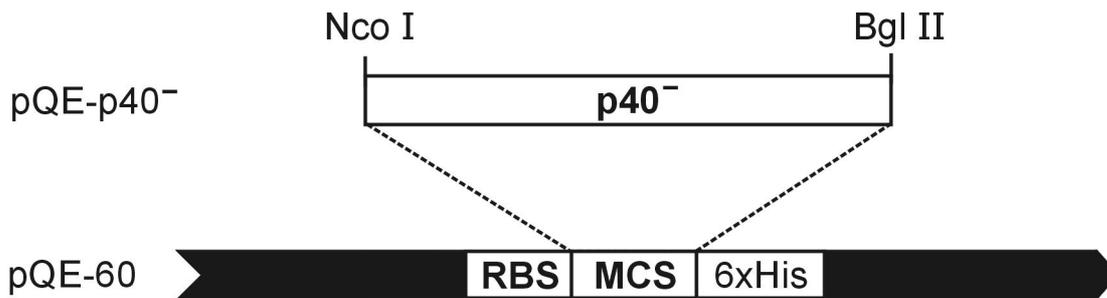


Abb. 3-27: Klonierungsschema für das pQE-p40⁻-Expressionsplasmid. Die Konstruktion des pQE-p40⁻-Plasmides erfolgte durch Subklonierung eines mit den Oligonukleotidprimern p40⁻-bak.seq/rev durch PCR amplifizierten p40⁻-Fragments, welches mit den Restriktionsenzymen Nco I und Bgl II verdaut und anschließend über diese Schnittstellen in den pQE-60 Vektor integriert worden war.

Die Überprüfung der Spezifität des inserierten Fragmentes erfolgte durch Sequenzierung. Anschließend wurde das Plasmid in *E.coli* transformiert und die Kulturen mit 0,8 mM IPTG induziert. Nach Induktion konnte man beim Gesamtzelllysate der induzierten Kultur, im Gegensatz zur nicht induzierten Kultur in einem Coomassie-gefärbten PAA-Gel, eine deutliche Expression feststellen (Abb. 3-28 A).

Bei der Reinigung gelang es allerdings nicht, das rekombinante Protein mit diversen getesteten Lysepuffern der nativen oder denaturierenden Aufreinigung in Lösung zu bringen (Daten nicht gezeigt). Diese Tatsache machte es unmöglich, das Protein mittels Affinitätschromatographie zu reinigen. Daher wurde das Gesamtzelllysate über ein präparatives PAA-Gel aufgetrennt und die spezifische Proteinbande nach Coomassie-Färbung aus dem Gel ausgeschnitten. Anschließend erfolgte die Elektroelution des Proteins aus dem Gel mittels einer Biotrap-Apparatur (Abb. 3-28 B).

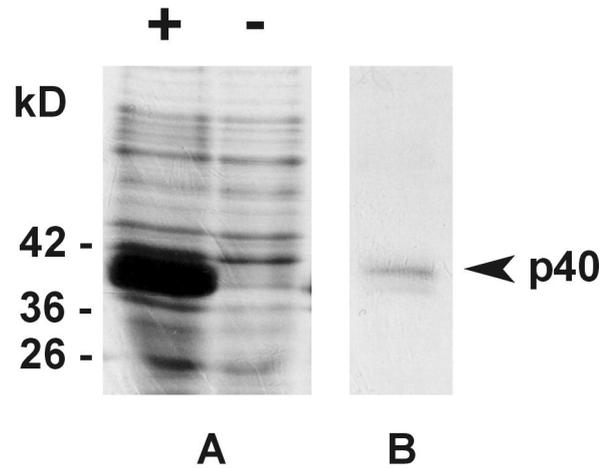


Abb. 3-28: Expression der p40-Untereinheit des IL-12. Die Abbildung zeigt die in einem Coomassie-gefärbten 12,5%igem PAA-Gel aufgetrennten Gesamtzelllysate von induzierten (+)- und nicht induzierten (-)- *E.coli*-Kulturen (A). Die rekombinante, über präparative PAA-Gele und anschließende Elektroelution gereinigte, p40-Untereinheit ist in Abb. 3-28 B dargestellt. Relevante Größen des Protein-Längenstandards sind jeweils am linken Bildrand bezeichnet.

Nach Abschluss der Versuche stand unserem Labor ein polyklonales p40-spezifisches IL-12-Antiserum (ENDOGEN) zur Verfügung, mit dem die Spezifität des rekombinanten IL-12 durch Western Blot-Analyse zusätzlich bestätigt werden konnte (Abb. 3-29).

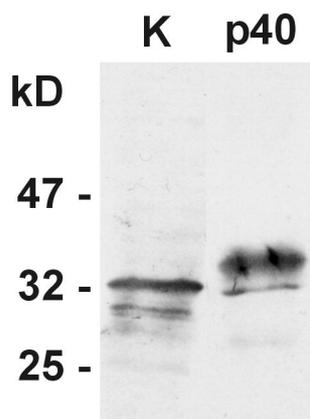


Abb. 3-29: Western Blot-Analyse der rekombinanten porcinen p40-Untereinheit des IL-12. Je 500 ng der rekombinanten p40-Untereinheit des IL-12 (p40) und *E.coli*-Lysat (K) wurden elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit einem p40-spezifischen Antiserum inkubiert. Die p40-Untereinheit ist als deutliches Signal zu erkennen während für die *E.coli*-Negativkontrolle keine unspezifischen Signale detektiert werden konnten. Relevante Größen des Protein-Längenstandards sind jeweils am linken Bildrand bezeichnet.

3.4.2.2 Expression der p35 Untereinheit des IL-12

Die Versuche, die p35-Untereinheit mittels pQE-51- und 60-Vektoren zu exprimieren, erbrachten keine zufriedenstellenden Expressionsdaten. Die Analyse der 2-dimensionalen Struktur des Moleküls zeigte jedoch keinerlei signifikant hydrophobe Bereiche im C- bzw. N-terminalen Teil des Proteins, so dass in Anlehnung an Arbeiten von Pompeia [1997] und Mills [1992] versucht wurde, die p35-Untereinheit als GST-Fusionsprotein zu exprimieren.

Zu diesem Zweck wurde die p35-cDNA mit Hilfe der spezifischen Primer p35-bak.seq/rev durch PCR aus dem pcDNA4HisMax-E2-IL-12-Plasmid amplifiziert und über die eingeführten Schnittstellen nach Verdau mit Sma I/Mun I in den pGEX-2T-Vektor ligiert. Dabei konnte die über die Primer eingeführte Mun I-Schnittstelle auf EcoR I gesetzt werden. Zusätzlich erfolgte über den reversen Primer die Insertion eines carboxyterminalen Hexahistidin-Endes welches eine weitere Reinigungsoption, ergäbe falls eine Isolation des GST-Fusionsproteins über Glutathione-Sepharose nicht möglich wäre (Abb. 3-30).

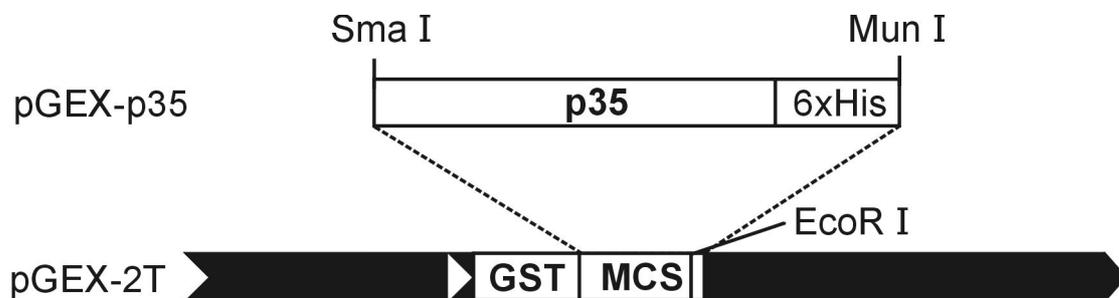


Abb. 3-30: Klonierungstrategie für das pGEX-p35-Expressionsplasmid. Zur Herstellung des p35-Expressionsplasmides wurde die p35-Sequenz mit den Primern p35-bak.seq/rev mittels PCR aus dem pcDNA4HisMax-E2-IL-18-Plasmid amplifiziert, anschließend mit Sma I/Mun I verdaut und über Sma I/EcoR I (Mun I auf EcoR I gesetzt) in den pGEX-2T-Vektor subkloniert. Die für die Klonierung nötigen Schnittstellen sowie ein carboxyterminales Hexahistidin-Ende wurden bei der Amplifikation über die Primer (p35-bak.seq/rev) in das PCR-Fragment eingeführt.

Trotz Sequenzüberprüfung und Optimierung der Induktionsbedingungen gelang es nicht zweifelsfrei (Vergleich induzierte/ nicht induzierte Kulturen), in *Coomassie*-gefärbten PAA-Gelen eine Expression der p35-Untereinheit im Gesamtzelllysate zu detektieren. Weder eine GST-spezifische Reinigung über Glutathione-Sepharose noch eine Hexahistidin-spezifische Reinigung über Ni²⁺-NTA-Agarose erbrachten ein spezifisches Produkt. Da uns kein p35-spezifisches Antiserum zur Verfügung stand, blieb als Option nur die Detektion eines möglichen Produktes durch GST- bzw. Hexahistidin-spezifische Antiseren. Deshalb wurden Gesamtzelllysate von induzierten und nicht induzierten Kulturen im Western Blot mittels GST- bzw. Hexahistidin-spezifischer Antiseren untersucht. p35-spezifische Signale (p35-GST-Hexahistidin-Fusionsprotein hat eine Größe von 64 kDa (35 kDa (p35) + 29 kDa (GST))) konnten sowohl für die GST- (Abb. 3-31 A) als auch für die Hexahistidin-spezifischen Antiseren (Abb. 3-31 B) in induzierten Kulturen nachgewiesen werden.

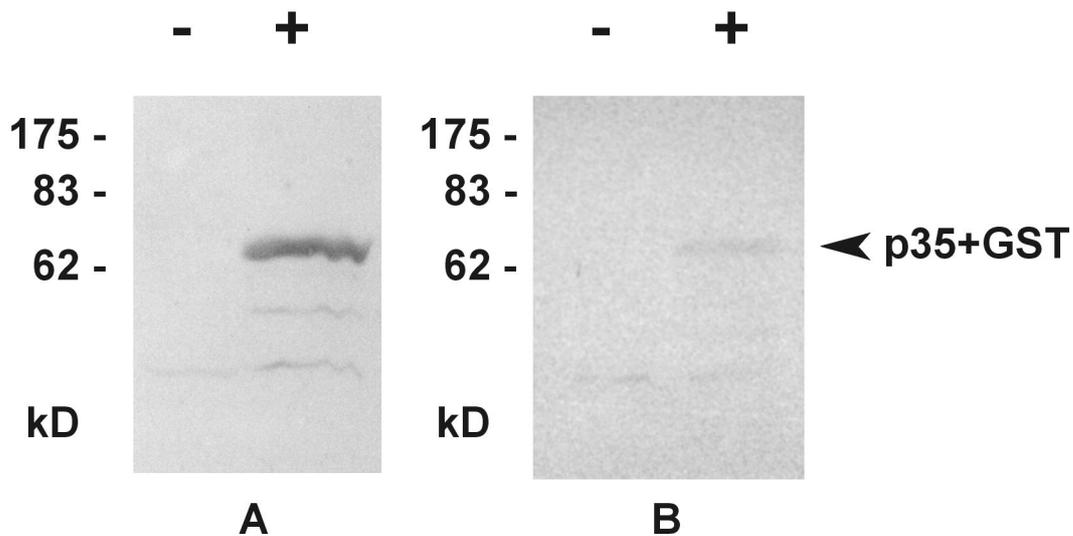


Abb. 3-31: Western Blot-Analyse der rekombinanten porcinen p35-Untereinheit des IL-12. Zur Überprüfung der Expression des p35-GST-Hexahistidin-Fusionsproteins wurde Gesamtzelllysate geelektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit GST- (A) und Hexahistidin-spezifischen (B) Antiseren analysiert. Als Negativkontrolle fungierte Zelllysate nicht induzierter *E.coli*-Kulturen (-). Die induzierten Kulturen sind durch (+) gekennzeichnet. Das p35-GST- und Hexahistidin-Fusionsprotein hat eine Größe von 64 kDa (35 kDa (p35) + 29 kDa (GST)). Relevante Größen des Protein-Längenstandards sind jeweils am linken Bildrand bezeichnet.

Aufgrund der geringen Ausbeuten bei Expression und Reinigung und dem Vorhandensein eines kommerziell erhältlichen polyklonalen IL-12-Antiserums (ENDOGEN) wurde auf weitere Aufreinigungsschritte zur Gewinnung von p35 verzichtet.

3.4.3 Prokaryontische Expression und Reinigung von porcinem IL-18

Ausgehend von den guten Ergebnissen, die bei der Expression des porcinen CD40L mit dem pQE-System erzielt wurden, sollte dieses auch für die Expression des porcinen IL-18 verwendet werden. Für die Herstellung des IL-18-Expressionskonstruktes wurde die cDNA des porcinen IL-18 mittels der Primer IL-18bak-seq/rev aus dem pcDNA4HisMax-E2-IL-18-Plasmid amplifiziert.

Die dadurch eingeführten Schnittstellen für BamH I/Pst I sowie ein carboxyterminales Hexahistidin-Ende wurden für die Klonierung in das pQE-51-Plasmid und spätere Reinigung des exprimierten Proteins verwendet (Abb. 3-32).

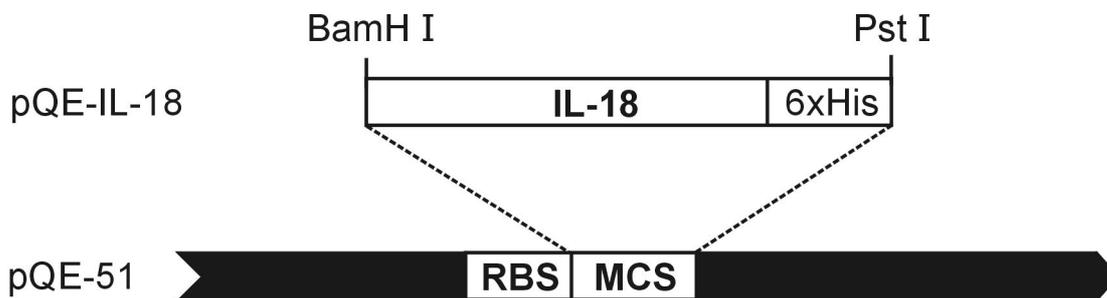


Abb. 3-32: Klonierungsstrategie für das pQE-IL-18-Expressionsplasmid. Die porcine IL-18-Sequenz wurde mit den Primern IL-18bak.seq/rev mittels PCR aus dem pcDNA4HisMax-E2-IL-18-Plasmid amplifiziert, anschließend mit BamH I/Pst I verdaut und in den analog behandelten pQE-51-Vektor kloniert. Die für die Klonierung nötigen Schnittstellen sowie ein carboxyterminales Hexahistidin-Ende wurden bei der Amplifikation über die Primer (IL-18bak.seq/rev) in das PCR-Fragment eingeführt.

Nach Abschluß der Klonierungsarbeiten wurde das Plasmid in *E.coli* transformiert und die Expression nach Induktion mit 0,8 mM IPTG in Coomassie-gefärbten PAA-Gelen analysiert. Auch hier konnte beim Vergleich von induzierten und nicht induzierten Kulturen eine deutliche Expression des porcinen IL-18 nachgewiesen werden (Abb. 3-33 A). Da bei der nativen Aufreinigung des porcinen IL-18 eine hohe Ausbeute erzielt werden konnte, wurde auf eine denaturierende Aufreinigung verzichtet (Abb. 3-33 B).

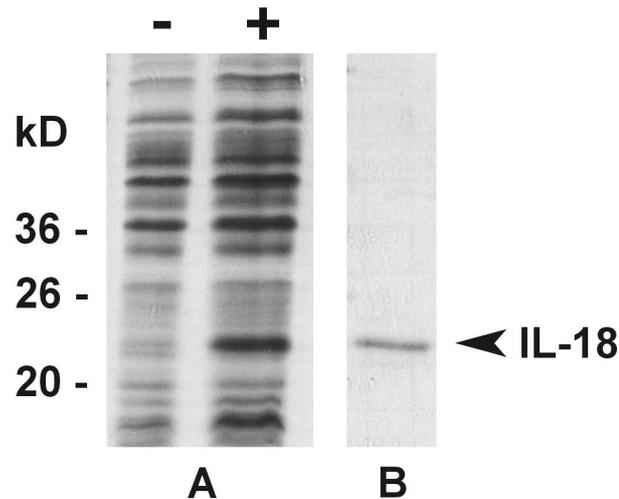


Abb. 3-33 : IL-18-Expression als Hexahistidin-Fusionsprotein. (A) Gesamtzelllysate induzierter (+) bzw. nicht induzierter (-) *E.coli*-Kulturen wurden mittels einer 12,5%igen SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. In Abb B ist das rekombinante porcine IL-18 nach nativer affinitätschromatographischer Reinigung in einem Coomassie-gefärbten 12,5%igen PAA-Gel dargestellt. Relevante Größen des Protein-Längenstandards sind jeweils am linken Bildrand bezeichnet.

Das gereinigte und dialysierte Protein wurde anschließend zur Herstellung eines polyklonalen Kaninchenantiserums verwendet (siehe 3.4.4).

3.4.4 Gewinnung spezifischer polyklonaler Antiseren für porcines IL-18 und den CD40L

Das rekombinante porcine IL-18 sowie der rekombinante CD40L wurden nach Expression und Reinigung mit Hilfe der Bradford-Methode quantifiziert und zur Herstellung polyklonaler Antiseren verwendet. Je 100 µg der rekombinanten Proteine wurden zur mehrfachen Immunisierung von Kaninchen eingesetzt. Die gewonnenen Seren wurden mittels Western Blot-Analyse auf ihre Spezifität überprüft. Als Kontrollen dienten die rekombinanten Protein (Positivkontrolle) und *E.coli*-Lysat (Negativkontrolle).

Für den CD40L stand außerdem ein monoklonaler anti human-CD40L-Antikörper (hCD40L) zur Verfügung. Dieser wurde ebenfalls für Western Blot-Analysen eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass durch Immunisierung mit den rekombinanten Proteinen sowohl für IL-18 (Abb. 3-34) als auch für den porcinen

CD40L (Abb. 3-35 A) spezifische polyklonale Seren gewonnen wurden. Außerdem konnte die Kreuzreaktion zwischen rekombinatem porcinem CD40L und einem monoklonalen anti human-CD40L-Antikörper demonstriert werden (Abb. 3-35 B).

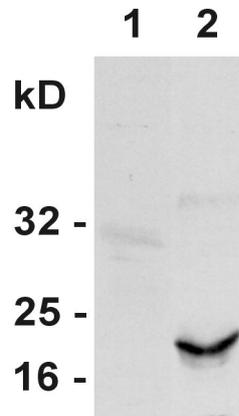


Abb. 3-34: Western Blot-Analyse von rekombinatem porcinem IL-18 mit polyklonalem IL-18-spezifischen Antiserum. Je 500 ng rekombinantes Protein (IL-18) und *E.coli*-Lysat (K) als Negativkontrolle wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit dem gewonnenen spezifischen IL-18- Antiserum behandelt. Relevante Größen des Protein-Längenstandards sind jeweils am linken Bildrand bezeichnet.

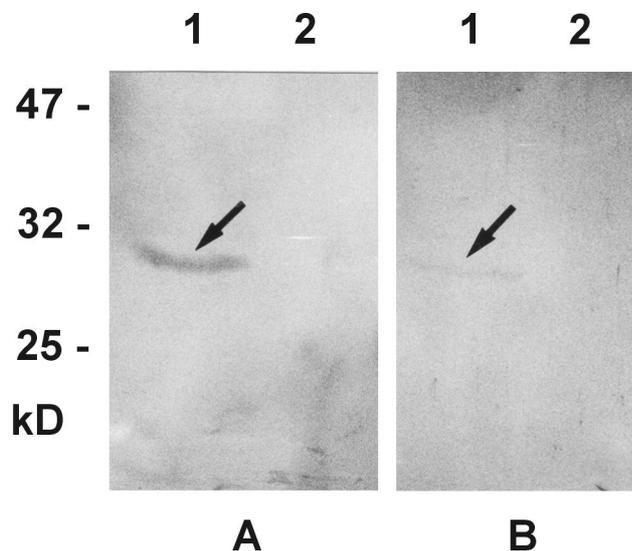


Abb. 3-35: Western Blot-Analyse des rekombinaten porcinen CD40L mit polyklonalem CD40L-spezifischen Antiserum (A) und einem monoklonalen anti human-CD40L-Antikörper (B). Rekombinante Proteine und *E.coli*-Lysat wurden in einem 12,5%igem PAA-Gel aufgetrennt, geblottet und mit den Antiseren inkubiert. Spur 1: 500 ng rekombinantes CD40L, Spur 2: *E.coli*-Lysat. Der rekombinante CD40L ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Relevante Größen des Protein-Längenstandards sind jeweils am linken Bildrand bezeichnet.

3.4.5 Eukaryontische Expression von porcinem CD40L, IL-18 und IL-12

Für Untersuchungen, durch die die verwendeten Zytokine und immunstimulatorischen Stoffe sowie deren Aktivität näher charakterisiert werden sollten, war es erforderlich, die Proteine für die entsprechenden posttranslationalen Proteinmodifikationen (u.a. Glykosylierung, Phosphorylierung und Disulfidbrückenbildung) in einem eukaryontischen System zu exprimieren. Konstitutiv exprimierende stabile Zelllinien erschienen hierfür geeignet, da bei transienten Expressionen wechselnde Transfektionseffizienz sowie unterschiedliche Zellpopulationen bei einer stabil exprimierenden Zelllinie keinerlei Rolle spielen.

Daher sollten für IL-12 und IL-18 sowie den CD40L stabile Zelllinien mittels des pcDNA3-Systems hergestellt werden. Die für die Transfektion verwendeten Plasmide waren bereits als Zwischenklonierungsschritt bei der Herstellung der E2-IL-18-/IL-12-/CD40L-Vakzin-Vektoren erstellt worden (Herstellung der pcDNA3-IL-18-/IL-12-/CD40L-Vektoren siehe 3.1.2.3). In einem ersten Vorversuch wurde die Optimalkonzentration des Selektionsantibiotikums G 418, das zum Absterben nicht resistenter Zellen führt, für 293-Zellen bestimmt. Die optimale Konzentration lag bei 600 µg/ml. Anschließend erfolgte die Herstellung einer stabilen 293-Zelllinie für die verwendeten Zytokine und immunstimulatorischen Stoffe. Um die Rate der korrekt integrierten Plasmid-DNA in die genomische DNA der Zelle zu erhöhen, wurden die Plasmide vor Transfektion linearisiert (pcDNA3-IL-18-/CD40L-Vektoren mit Bgl II und der pcDNA3-IL-12-Vektor mit Mfe I). Nach Transfektion erfolgte eine Selektion resistenter Klone mit 600 µg/ml G 418. Die ersten resistenten Zellklone konnten nach zwei Wochen mittels Klonierungszylinder isoliert werden.

3.4.5.1 Herstellung einer stabilen 293-Zelllinie für porcinen CD40L

Zur Überprüfung der resistenten Zellklone auf konstitutive Expression des CD40L wurden Immunfluoreszenz- und Western Blot- sowie Radioimmunpräzipitationsanalysen (RIP) durchgeführt. Für einzelne Klone konnte sowohl im Western Blot, als auch durch Immunfluoreszenz eindeutig eine stabile CD40L-Expression nachgewiesen werden. Die durchgeführten RIP-Analysen erbrachten überraschenderweise nur mit dem polyklonalen CD40L⁻-spezifischen Antiserum, nicht aber mit dem monoklonalen anti human-CD40L-Antikörper ein spezifisches Signal (Abb. 3-36).

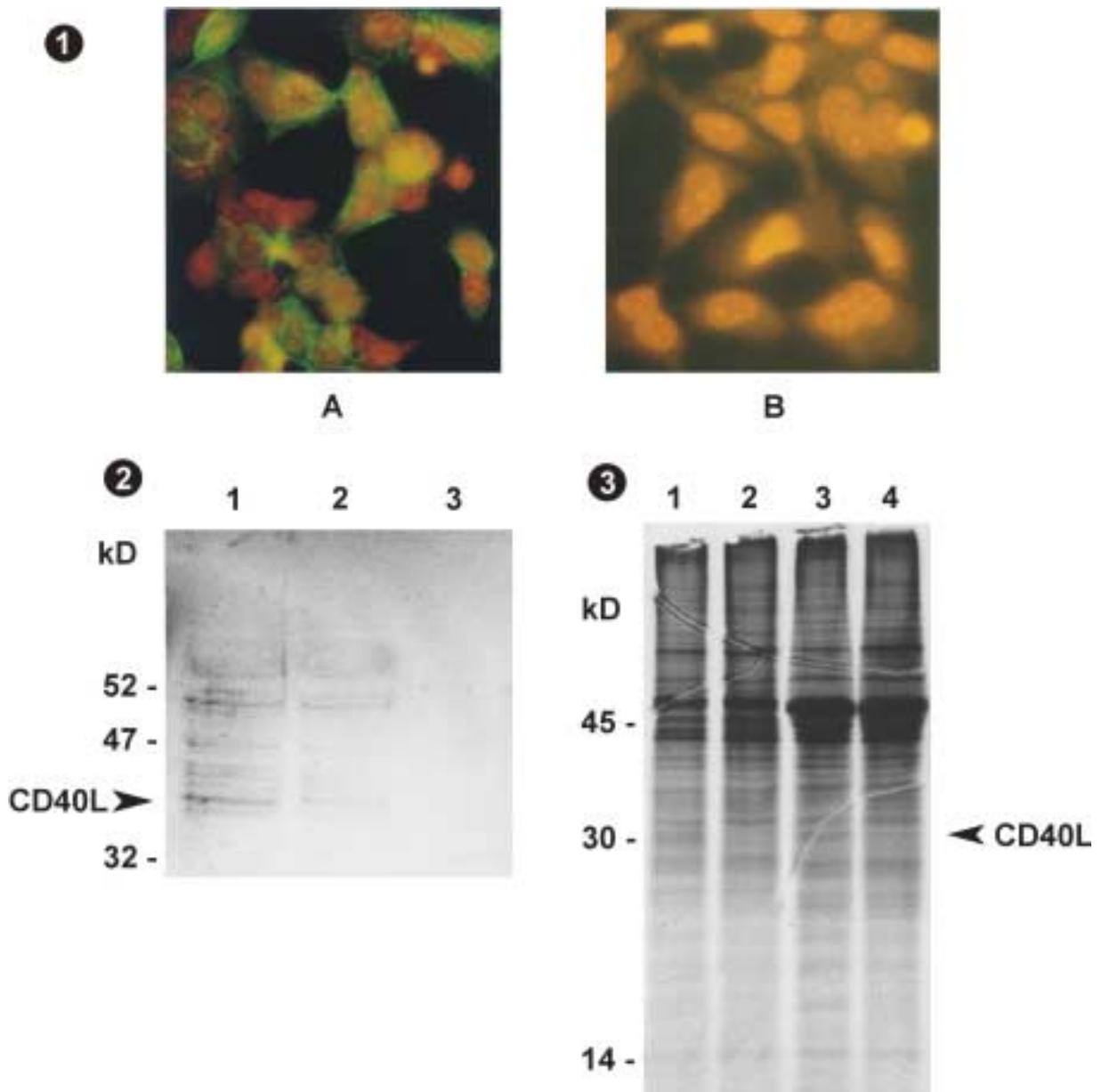


Abb. 3-36: Analyse resistenter Zellklone auf CD40L-Expression durch Immunfluoreszenz (1)- und Western Blot (2)- sowie Radioimmunpräzitationsanalysen (3). Für die Oberflächenimmunfluoreszenzanalyse (1) wurden die Zellen fixiert und anschließend mit einem monoklonalen anti human-CD40L-Antikörper als Primär- und einem Ziege-anti-Maus IgG, DTAF-gekoppelten Antikörper als Sekundärantikörper inkubiert. Die stabile CD40L⁺-293-Zelllinie (A) zeigt im Vergleich zu nativen 293-Zellen (B) grün fluoreszierende Oberflächengranula. Zusätzlich wurden die Zellkerne der Zellen mit Propidiumjodid angefärbt. Abb. 3-36 (2) zeigt die in einem 15%igem PAA-Gel aufgetrennten Gesamtzelllysate nach Blot und Inkubation mit einem monoklonalen anti human-CD40L-Antikörper. Spur 1: 293-CD40L⁺ Klon 4, Spur 2: 293-CD40L⁺ Klon 6 und Spur 3: native 293-Zellen dienen als Negativkontrolle. Das CD40L⁺ spezifische Signal ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. (3) Zur Analyse der resistenter Klone mittels Radioimmunpräzitation wurden [³⁵S]-metabolisch markierte stabile CD40L⁺-293-Zellklone (Spur 1 und 3) und als Negativkontrolle dienende 293-Zellen (Spur 2 und 4) lysiert und mit einem polyklonalen CD40L⁺-spezifischen Antiserum (Spur 3 und 4) bzw. einem monoklonalen anti human-CD40L-Antikörper (Spur 1

und 2) inkubiert. Je 20 µl des Präzipitationsansatzes wurden anschließend in einem 12,5%igem PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und autoradiographisch analysiert. Das CD40L-spezifische Signal ist durch einen Pfeil markiert. Relevante Größen des Protein-Längenstandards sind jeweils am linken Bildrand bezeichnet.

3.4.5.2 Herstellung einer stabilen 293-Zelllinie für porcines IL-18

Die nach Transfektion und Selektion isolierten IL-18-Zellklone wurden ebenfalls durch Western Blot und Radioimmunpräzipitation auf konstitutive IL-18-Expression überprüft. Ein Nachweis durch Immunfluoreszenz war, wie schon unter 3.2.4 ausgeführt, nicht möglich.

Für die getesteten Klone konnte eine eindeutige IL-18- Expression sowohl im Western Blot als auch durch Radioimmunpräzipitation nachgewiesen werden (Abb. 3-37)

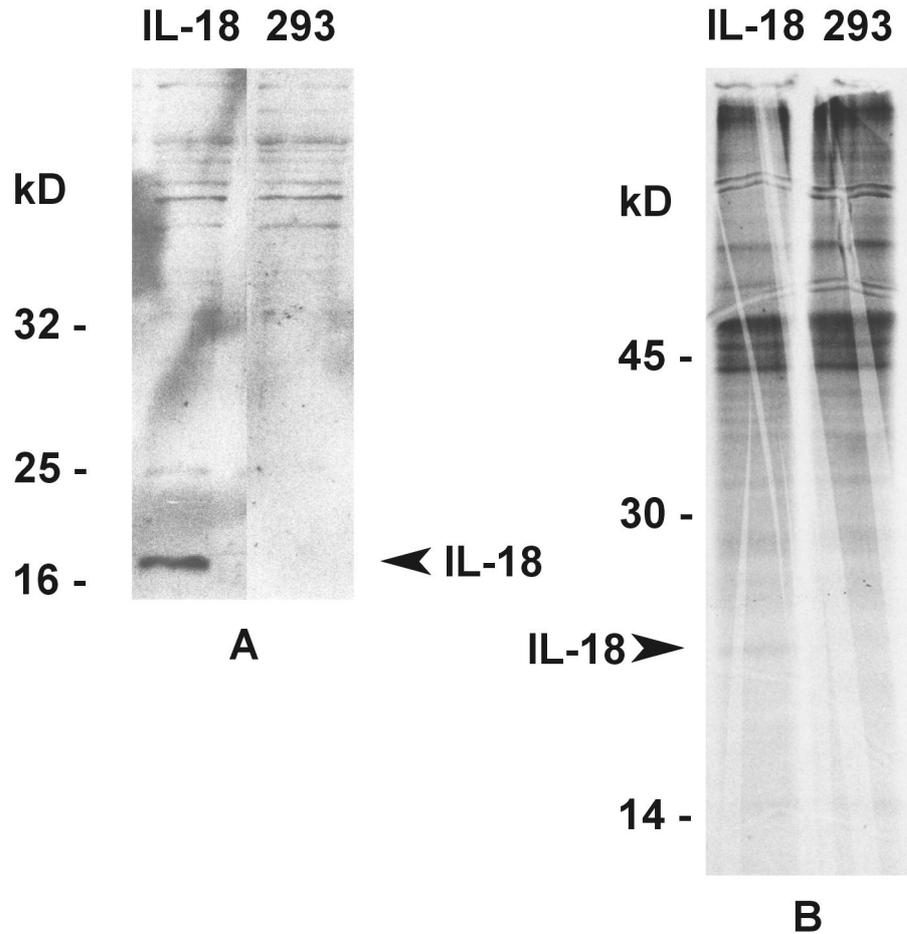


Abb. 3-37: Analyse der IL-18-Expression resistenter Zellklone durch Western Blot (A)- und Radioimmunpräzipitation (B). Für die Western Blot-Analyse resistenter Zellklone wurden Gesamtzelllysate von stabil exprimierenden IL-18-293-Zelllinien (IL-18) und nativen 293-Zellen (293) als Negativkontrolle in einem 15%igem PAA-Gel aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit einem polyklonalen IL-18-spezifischen Antiserum inkubiert. Zur Analyse der resistenten Klone mittels Radioimmunpräzipitation wurden [³⁵S]-metabolisch markierte stabile IL-18-293-Zellklone (IL-18) und als Negativkontrolle dienende 293-Zellen (293) lysiert und mit einem polyklonalen IL-18-spezifischen Antiserum inkubiert. Je 20 µl des Präzipitationsansatzes wurden anschließend in einem 15%igem PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und autoradiographisch analysiert. Die IL-18-spezifischen Signale sind durch Pfeile markiert. Relevante Größen des Protein-Längenstandards sind jeweils am linken Bildrand bezeichnet.

3.4.5.3 Herstellung einer stabilen 293-Zelllinie für porcines IL-12

In einem ersten Schritt erfolgte die Analyse der resistenten Zellklone wie schon für IL-18 durch Western Blot und Radioimmunpräzipitation. Trotz erfolgreicher Transfektion gelang mit keiner der verwendeten Methoden der Nachweis eines IL-12-spezifischen Signals. Um zu klären, ob die von den resistenten Klonen möglicherweise produzierte Menge an IL-12 unterhalb der Detektionsgrenze der verwendeten Methoden lag, wurde ein hochempfindlicher Aktivitätstest eingesetzt.

Dieser beruht auf der Aktivierung von PBMC durch IL-12, was zu einer starken Stimulation der IFN- γ -Produktion führt. Diese Steigerung der IFN- γ -Produktion kann anschließend in einem IFN- γ -ELISA überprüft werden. Deshalb wurden PBMC mit Zellkulturüberständen resistenter Klone und nativer 293-Zellen versetzt, 18 h inkubiert und die daraus gewonnenen Überstände für einen IFN- γ -ELISA eingesetzt. Zur Überprüfung der IL-12-Spezifität einer möglichen stimulatorischen Reaktion wurden PBMC gleichzeitig mit Zellkulturüberständen von resistenten Klonen und nativen 293-Zellen versetzt, die zuvor über Nacht mit einem IL-12-spezifischen polyklonalen Antiserum inkubiert wurden.

Die Daten zeigten eine starke Steigerung der IFN- γ -Ausschüttung nach Inkubation mit Zellkulturüberstand von Klon 7 und gleichzeitig eine Aufhebung dieses Effektes bei Inkubation mit einem IL-12-spezifischen polyklonalen Antiserum (Abb. 3-38). In dem verwendeten Testsystem konnte also für Klon Nr. 7 ein IL-12-spezifischer stimulatorischer Effekt auf die IFN- γ -Produktion nachgewiesen werden.

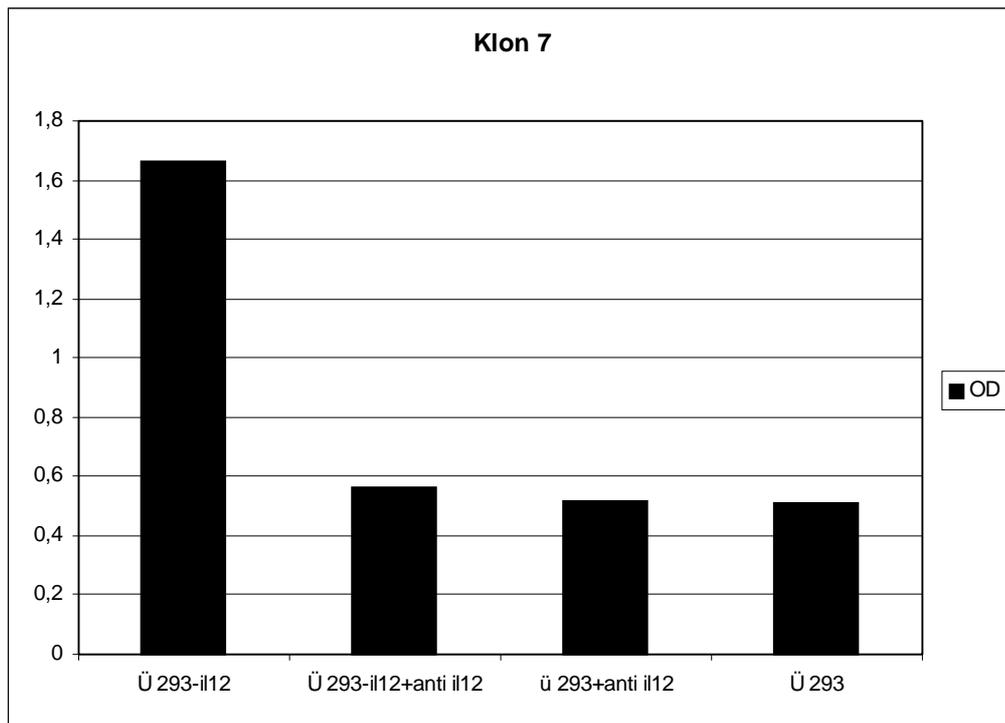


Abb. 3-38: IFN- γ -Produktion von nativen PBMC durch IL-12-Stimulation. PBMC wurden mit Zellkulturüberständen von IL-12-produzierenden 293-Zellen (Ü293-IL-12) und nativen 293-Zellen (293) inkubiert. Gleichzeitig wurden IL-12-293-Zellkulturüberstände (Ü 293-IL-12+anti IL-12) und Überstände von nativen 293-Zellen (Ü 293+ anti-IL-12) mit einem IL-12-spezifischen polyklonalen Antiserum versetzt und anschließend zur Stimulation der PBMC verwendet.

3.5 Darstellung des E2-Glykoproteins im prokaryontischen System

Die Expressionsversuche für das E2-Glykoproteingen im pQE-System zeigten ähnlich wie für das Gen der p35-Untereinheit des IL-12 keine erkennbare Expression, daher wurde mit Hilfe des pGEX-Systems versucht, das E2 als GST-Fusionsprotein zu exprimieren.

In einem ersten Schritt musste das Expressionskonstrukt erstellt werden. Dafür sollte die E2-Sequenz mit Hilfe der Primer E2-bak.seq/rev durch PCR aus dem pcDNA4HisMax-E2-Plasmid amplifiziert und das gewonnene Fragment nach BamH I/EcoR I-Verdau über die eingeführten Schnittstellen in den pGEX-2T-Vektor inseriert werden. Auch hier wurde über die Primer parallel zu den Schnittstellen ein carboxyterminles Hexahistidin-Ende in das PCR-Fragment eingeführt (Abb. 3-39).

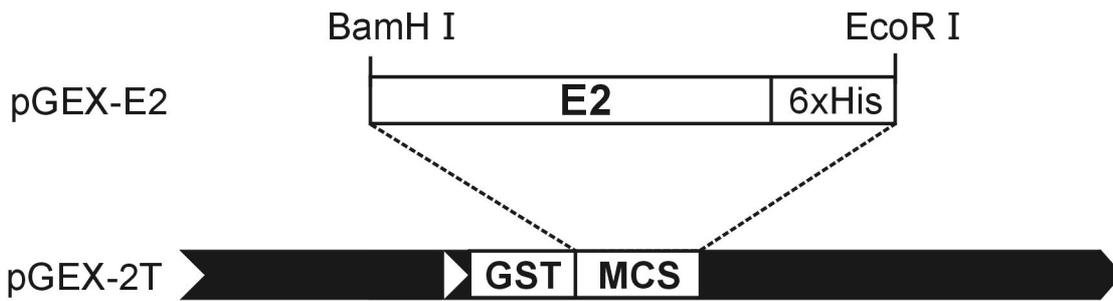


Abb. 3-39: Klonierungsschema für das pGEX-E2-Expressionsplasmid. Die Konstruktion des pGEX-E2-Plasmides erfolgte durch Subklonierung eines mit den Oligonukleotidprimern E2-bak.seq/rev durch PCR amplifizierten E2-Fragments, das mit den Restriktionsenzymen BamH I/EcoR I verdaut und anschließend über diese Schnittstellen in den pGEX-E2-Vektor ligiert worden war. Außer den Schnittstellen wurde durch die Primer zusätzlich ein carboxyterminales Hexahistidin-Ende in das PCR-Fragment eingeführt.

Bei Induktion und anschließender Reinigung konnte weder mit GST- noch mit Hexahistidin-Ende-spezifischen Reinigungsprotokollen eine zufriedenstellende Produktausbeute in einem Coomassie-gefärbten PAA-Gel detektiert werden. Die deshalb durchgeführte Western Blot-Analyse der Gesamtzelllysate mit verschiedenen E2-spezifischen monoklonalen Antikörpern zeigte außer einem spezifischen Signal für das unglykosylierte E2-GST-Fusionsprotein auch eine Reihe von spezifischen Abbauprodukten, was unter Umständen die erfolglosen Reinigungsversuche erklären könnte (Abb. 3-40). Das erhaltene E2-spezifische Signal hatte eine Größe von ca. 74 kDa (45 kDa (E2) + 29 kDa (GST)). Die beobachtete Größe des exprimierten E2 Glykoproteins korreliert somit mit den Daten von Ruglii et al. (1995) für mittels Baculoviren exprimiertem unglykosyliertem E2.

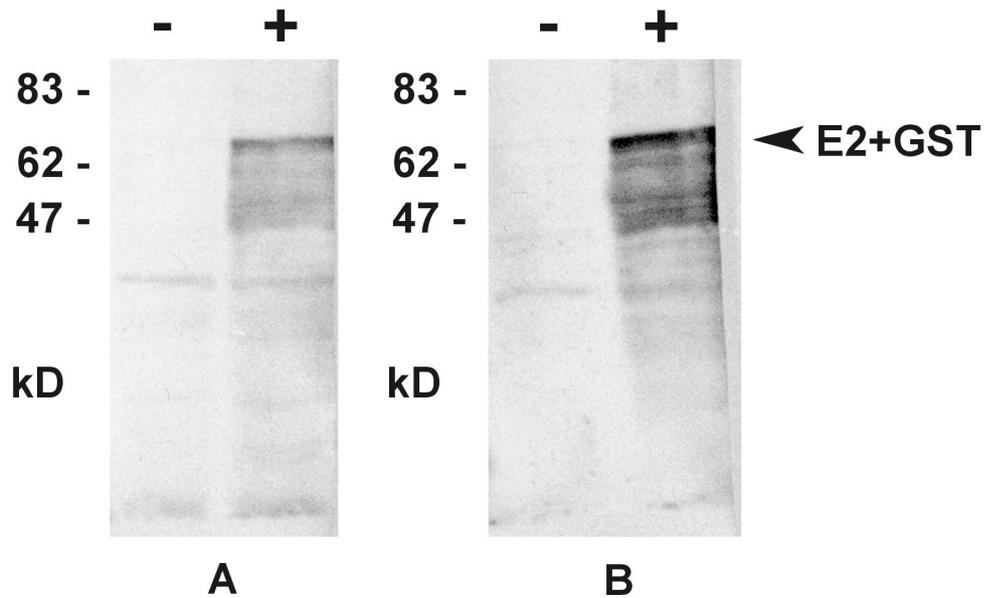


Abb. 3-40: E2-Expression als GST-Fusionsprotein. Gesamtzelllysate induzierter (+) bzw. nicht induzierter (-) *E.coli*-Kulturen wurden mittels einer 12,5%igen SDS-PAGE aufgetrennt, anschließend geblottet und mit E2-spezifischen monoklonalen Antikörpern (MAK7: **A** und C46: **B**) inkubiert. Das detektierte E2-GST-Fusionsprotein hat eine Größe von 74 kDa (45 kDa (unglykosyliertes E2) + 29 kDa (GST)). Relevante Größen des Protein-Längenstandards sind jeweils am linken Bildrand bezeichnet.

Auch durchgeführte Optimierungsversuche der Expressionsbedingungen (*E.coli*-Stämme, Inkubationsdauer und -temperatur) führten nicht zu einer Reduktion der Abbauprodukte.

4 DISKUSSION

Die "Klassische Schweinepest" ist eine hoch kontagiöse Erkrankung [Dahle, 1992], deren Erreger, das *classical swine fever virus* u.a. in frischen Fleischprodukten bzw. Exkrementen relativ stabil ist [Savi, 1965]. Dadurch kommt es trotz aller Vorsichtsmaßnahmen immer wieder zu sporadischen, aber massiven Seuchenzügen (1990-1998) [Moennig, 2000]. Die zur Zeit von der EU angewendete Politik der Ausmerzungen infizierter Bestände hat gezeigt, dass ein Ausbruch in einer nicht vakzinierten Population mit immensen ökonomischen Verlusten verbunden ist [Pittler, 1995; Mintiens, 2001]. Weiterhin gewinnt das Problem der Durchseuchung bzw. Verbreitung durch die europäische Wildschweinpopulation in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung [Harkness, 1988; Moennig, 2000]. Deshalb ist es von großem Interesse, eine wirkungsvolle CSFV-Vakzine zu entwickeln. Einer der wichtigsten Punkte einer EU-weit einsetzbaren CSFV-Vakzine ist die Möglichkeit, zwischen immunisierten und infizierten Tieren zu unterscheiden. Eine im Januar 2001 zugelassene und auf im Baculovirussystem exprimiertem E2-Glykoprotein [van Rijn, 1996] basierende *emergency*-Vakzine bietet die Möglichkeit einer solchen Unterscheidung, allerdings sind deren Schutzwirkung und eine mögliche horizontale bzw. vertikale Infektion durch das CSFV umstritten [Dewulf, 2001; van Rijn, 1996/99; de Smit, 2000].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher der Versuch unternommen, eine hochwirksame DNA-Vakzine herzustellen, die neben einem dauerhaften Schutz, auch die Unterscheidung zwischen immunisierten und infizierten Tieren ermöglicht und eine horizontale Verbreitung des Virus verhindert.

Die Grundlage dieser DNA-Vakzine bildet das E2-Glykoprotein des CSFV, das bereits frühzeitig als hochimmunogenes Protein erkannt wurde [van Rijn, 1994]. Vielversprechende Untersuchungen mit E2 zur Induktion einer CSFV-spezifischen protektiven Schutzwirkung wurden bereits mit rekombinantem E2-Vacciniavirus [König, 1995], rekombinantem E2-Pseudorabiesvirus [Peeters, 1997], rekombinantem

E2-Poxvirus [Hahn, 2001], mit dem im Baculovirussystem exprimierten E2-Glykoprotein selbst [van Rijn, 1996/1999; van Zijl, 1991] sowie einer E2-DNA-Vakzine [Andrew, 2000] durchgeführt.

Bei der Etablierung der in dieser Arbeit untersuchten DNA-Vakzine wurde das Ziel verfolgt, sowohl die endogen exprimierte Menge an E2 zu maximieren als auch eine Steigerung der Immunreaktion durch die Expression zusätzlicher immunstimulatorischer Moleküle zu erreichen. Die exprimierte Proteinmenge ist u.a. abhängig von dem verwendeten Promotor. Daher wurden, ausgehend von Untersuchungen mit Reportergenen, eukaryotische Expressionsplasmide gewählt, die die Promotoren des Humanen Cytomegalievirus (pcDNA4/HisMax) bzw. des Rous-Sarkom-Virus (pRC/RSV) enthielten. Beide Promotoren sind in der Lage hohe Expressionsraten der Reportergene zu induzieren [Zarrin, 1999; Manthorpe, 1993].

Die Wahl der Immunstimulatoren ist von einer Vielzahl von Faktoren wie z.B. der Art der Erreger, dem Krankheitsverlauf und den wirtsspezifischen Besonderheiten des Immunsystems abhängig. Daher kann das für die Erkrankung optimal immunstimulatorische Molekül nur im Wirtssystem selbst bestimmt werden. Für die Stimulation einer CSFV-spezifischen Immunantwort wurden IL-12 [Boretti, 2000; Shan, 1999], IL-18 [Dupre, 2001] und der CD40L [Ihata, 1999] gewählt, die für andere Erkrankungen bereits erfolgreich als Immunstimulatoren eingesetzt wurden.

Eine polycistronische Transkriptionseinheit zur Expression der heterodimeren Molekülstruktur des porcinen IL-12 stand bereits durch vorangegangene Arbeiten [Wienhold, 1998] zur Verfügung.

Die cDNA für porcines IL-18 und des CD40L mussten dagegen im Rahmen dieser Arbeit mittels RT-PCR hergestellt werden. Die Bestätigung der Spezifität der Sequenz für porcines IL-18 erfolgte durch Sequenzvergleich mit bereits beschriebenen Sequenzen [Oem, 2000].

Obwohl die cDNA-Sequenz von porcinem CD40L bis dato nicht bekannt war, gelang die Isolation eines spezifischen Produktes mit Hilfe von degenerierten-Primern mittels RT-PCR. Der offene Leserahmen (ORF) des porcinen CD40L enthält 786 bp und kodiert für ein 29kDa großes Protein. Sequenzvergleiche zwischen der isolierten

porcinen Sequenz und bereits veröffentlichten Sequenzen anderer Spezies zeigten eine Übereinstimmung von 93%, 89%, 86%, bzw. 88% mit bovinem, felinem, caninem bzw. humanem CD40L (siehe 7.2). Wie für den humanen und murinen CD40L beschrieben, enthält der porcine CD40L eine 13 AS lange terminale Sequenz gefolgt von einer 32 AS langen hydrophoben Signal-Anker-Sequenz, welche für ein Typ-II-Membranprotein mit extrazellularem Carboxyterminus charakteristisch ist. [Armitage, 1992; Noelle, 1992]. Im Gegensatz zur humanen CD40L-Sequenz, die zwei potentielle N-Glykosylierungsstellen enthält [Armitage, 1992], konnte in der Sequenz des porcinen CD40L nur eine potentielle N-Glykosylierungsstelle identifiziert werden.

Für beide E2-Vektortypen (pcDNA4HisMax-E2, pRC/RSV-E2) wurden somit Konstrukte hergestellt, die zusätzlich die cDNA eines der immunstimulatorischen Moleküle enthielten. Dabei konnten in die Konstrukte zwei voneinander unabhängige Transkriptionseinheiten inseriert werden, wodurch unterschiedliche Expressionsarten der einzelnen Sequenzen ermöglicht wurden (intrazelluläre- und sekretorische Expression pcDNA4HisMax-E2-IL-12/-IL-18 bzw. intrazelluläre- und membran-assoziierte Expression, pcDNA4HisMax-E2-CD40L). Nach Etablierung eines Testsystems zur Überprüfung der *in vitro* Transkription der Plasmide konnten für alle Konstrukte spezifische Transkriptionsprodukte nachgewiesen werden.

Voraussetzung für eine erfolgreiche Immunisierung ist die Expression eines möglichst authentischen Genproduktes. Daher erfolgte die Analyse der zellulären Expression des E2-Glykoproteins für alle Plasmide durch Immunfluoreszenz nach transienter Transfektion von MAX-Zellen, wobei wie bei virus-infizierten Zellen große Mengen des Proteins nachgewiesen werden konnten [Weiland, 1990]. *In vitro* zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der exprimierten E2-Menge zwischen Plasmiden mit RSV- bzw. CMV-Promotoren.

Der Nachweis der Expression für die immunstimulatorischen Moleküle wurde für den CD40L durch Oberflächenfluoreszenzanalyse nach transienter Transfektion von MAX-Zellen erbracht, wobei gezeigt werden konnte, dass der CD40L als Oberflächenmolekül exprimiert wird und somit für eine Interaktion mit immunregulatorischen Zellen zugänglich ist.

Der Nachweis der sekretierten Zytokine IL-12 und IL-18 erfolgte durch einen funktionellen NK-Assay, da sich durch die geringe Proteinmenge bei transienter Transfektion und dem großen Verdünnungseffekt im Medium andere Detektionsmethoden (z.B. Western Blot) als schwierig erwiesen. Durch den funktionellen Test konnte eine 35%ige Steigerung der cytolytischen Aktivität für die IL-12- bzw. eine 25%ige Steigerung der cytolytischen Aktivität für die IL-18-Konstrukte im Verhältnis zu der Aktivität der E2-Grundkonstrukte festgestellt werden. Der für die IL-12-Plasmide als Positivkontrolle verwendete Überstand von mit rekombinanten porcinen IL-12-Adenoviren infizierten Zellen zeigte annähernd gleiche stimulatorische Wirkung wie die Überstände der mit den E2-IL-12-Konstrukten transfizierten Zellen. Die Steigerung der cytolytischen Aktivität korreliert mit Daten, die von Paul *et al.*, 2000 für rekombinante Adenoviren mit murinem IL-12 bzw. für exogene IL-18-Applikation von Kanda *et al.*, 2000 beschrieben wurden.

Die weiteren durchgeführten *in vitro* Untersuchungen zur Effektivität der homodimeren (CMV/CMV) bzw. heterodimeren (RSV/CMV) Transkriptionseinheiten zeigten keine signifikanten Unterschiede im Verhältnis des exprimierten E2-Glykoproteins zu den immunstimulatorischen Molekülen.

Die Abhängigkeit einer protektiven Schutzwirkung von der Applikationsart und dem jeweiligen Erreger ist seit Jahren bekannt [Wolff, 1992; Böhm, 1998; Maloy, 2001; Smooker, 1999]. Auf Grund der hohen Variabilität von Erregern mit RNA-Genom und der damit verbundenen spezifischen Stimulation einer protektiven Immunantwort konnte bisher eine einheitliche optimale Applikationsmethode nicht gefunden werden. Daher wurde in ersten *in vivo* Versuchen im Schwein die Höhe der gewählten *challenge*-Dosis [Meyers, 1999] sowie die Applikationsart optimiert. Dabei zeigte sich, wie auch für andere DNA-Vakzine-Versuche beschrieben [Böhm, 1998], dass ein Schutz durch eine intramuskuläre Injektion induziert wird, während andere Immunisierungsarten nur zur Ausbildung einer unvollständigen Immunantwort führten.

Zur Auswahl des effektivsten Grundkonstruktes wurden Immunisierungsversuche mit den E2-Plasmiden (pcDNA4HisMax-E2, pRC/RSV-E2) durchgeführt. Außerdem wurden verschiedene Testsysteme zur optimalen Erfassung und Charakterisierung der Induktion einer CSFV-spezifischen zellulären bzw. humoralen Immunantwort etabliert.

Nach dreimaliger intramuskulärer Immunisierung konnten vor der *challenge*-Infektion für die E2-Konstrukte mit Ausnahme eines Tieres der Gruppe 3 und der Kontrollgruppe (Gruppe 1/pcDNA4/HisMax, pRC/RSV) neutralisierende Antikörper ab dem 43. Tag post Immunisierung nachgewiesen werden. Dabei handelte es sich um Titer, die teilweise weit über den für einen protektiven Schutz notwendigen Werten lagen [Terpstra, 1988; van Rijn, 1996, Bouma, 1999] und mit Untersuchungen einer vergleichbaren E2-DNA-Vakzine übereinstimmen [Andrew, 2000].

Nach erfolgter *challenge*-Infektion konnte allerdings ein deutlich stärkerer Anstieg als bei vergleichbaren Immunisierungsversuchen festgestellt werden [Andrew, 2000].

Die nähere Charakterisierung der CSFV-spezifischen humoralen Immunantwort *prä challenge* mittels eines IgG1/IgG2-spezifischen ELISA zeigte ein effizientes *Isotypswitching* zu IgG, wobei IgG1- und IgG2-Antikörper nachgewiesen wurden. Dies deutet sowohl auf eine T_H1- als auch T_H2-induzierte humorale Immunantwort sowie die Ausprägung einer Langzeitgedächtniszell-Reaktion hin [DeFranco, 1997]. Auf eine Untersuchung der induzierten humoralen Immunantwort *post challenge* wurde verzichtet, da diese durch Untersuchungen von Armengol *et al.*, 2001 und Pauly *et al.*, 1995 bereits ausreichend charakterisiert wurde.

Die Untersuchung der zellulären Immunantwort der Tiere *prä challenge* zeigte entsprechend den DNA-Vakzinierungsversuchen für HCV [Forns, 2000] keine signifikante Stimulation der zellulären Immunantwort, wobei eingeräumt werden muss, dass aufgrund der hohen Heterogenität für die im Versuch eingesetzte *outbred*-Schweinepopulation geringe Unterschiede mit dem verwendeten Testsystem (Lymphoproliferationstest) nicht nachgewiesen werden können. Auch die Verwendung eines IFN- γ -ELISA und des erheblich sensitiveren IFN- γ -ELISPOT [Tanguay, 1994] erbrachte keine erkennbare stimulatorische Wirkung, allerdings konnte mit beiden

Testsystemen nach erfolgtem *challenge* ein drastischer Anstieg der IFN- γ -Produktion nachgewiesen werden, was eine Stimulation der zellulären Immunantwort belegt [Trinchieri, 1997].

Diese, durch Arbeiten von Armengol *et al.*, 2001 bestätigten, Untersuchungen zeigen eindeutig, dass für die Induktion einer CSFV-spezifischen zellulären Immunantwort außer dem E2-Glykoprotein noch andere virale Faktoren nötig sind, da die immunstimulatorische Wirkung des E2-Glykoproteins auf seine B-Zell-Epitope zurückzuführen ist [Yu, 1996].

Bei der Erfassung der Parameter der Virämie und des Krankheitsverlaufes war bei allen Kontrolltieren die Ausbildung klassischer Symptome einer CSFV-Infektion [Fields, 1996] zu beobachten. Alle Tiere der Gruppe 1 verstarben erwartungsgemäß acht bis neun Tage *post challenge* [Meyers, 1999], was mit Infektionsexperimenten anderer CSFV-Stämme korreliert [Bouma, 1999, Rumenapf, 1991]. 50% der Tiere der Gruppe 3 (pRC/RSV-E2) konnten durch die verabreichte DNA-Vakzine vor einer letalen CSFV-Infektion geschützt werden, allerdings verzeichneten wurde bei allen Tieren dieser Gruppe einen Temperaturanstieg über 40°C beobachtet. Demgegenüber entwickelten alle Tiere der Gruppe 2 (pcDNA4/HisMax-E2) einen wirksamen Schutz gegen eine letale CSFV-Infektion, wobei nur ein Tier einen kurzzeitigen Temperaturanstieg über 40°C zeigte. Diese für die Immunisierung mit dem pcDNA4HisMax-E2 Konstrukt beobachtete Fieberreduktion im Gegensatz zu Experimenten mit exprimiertem E2-Glykoprotein [Bouma, 1999] bzw. einer anderen E2-DNA-Vakzine [Hammond, 2001] ist vermutlich auf die unterschiedliche Art- und die geringere Anzahl an Immunisierungen zurückzuführen.

Ein weiteres Indiz für die gelungene Induktion einer protektiven Immunantwort ist die Tatsache, dass bei keinem der Tiere der Gruppen 2 (pcDNA4/HisMax-E2) und 3 (pRC/RSV-E2) Virus in Blut- bzw. Organproben gefunden werden konnte, während nach Immunisierung mit dem E2-Glykoprotein vereinzelt Virämie in den Organen detektiert wurde [Bouma, 1999].

Die offensichtlichen Unterschiede der beiden E2-Grundkonstrukte *in vivo* widersprechen den im zellulären System gemachten Beobachtungen. Ein Zeichen dafür, dass die in wirtsspezifischen Zellkultursystemen gewonnenen Daten gerade bei immunologisch relevanten Fragestellungen nicht immer zur Evaluierung spezifischer Sachverhalte ausreichen.

Die Insertion zusätzlicher immunstimulatorischer Moleküle in die E2-DNA-Vakzine führte, mit Ausnahme der E2-IL-12-Konstrukte, ebenfalls zur Ausbildung einer protektiven humoralen Immunantwort.

Auch hier konnten CSFV-spezifische Antikörper vereinzelt schon ab dem 29. Tag post Immunisierung detektiert werden. Der größte Teil der Gruppen 7 (pcDNA4/HisMax-E2-IL-18) und 8 (pcDNA4/HisMax-E2-CD40L) zeigte signifikante Titer [Terpstra, 1988; van Rijn, 1996, Bouma, 1999] ab dem 50. Tag, d.h. nach der dritten Immunisierung. Die Auswertung der Serumneutralisationstests ergab für die E2-IL-18- bzw. E2-CD40L-Konstrukte vergleichbare Werte wie bei Experimenten mit einer E2-DNA-Vakzine allein [Andrew, 2000] bzw. einer Kombination aus einer E2-DNA-Vakzine und einem rekombinanten E2-Adenovirus (*prime boost*) [Hammond, 2001]. Eine Ausnahme bildete das Tier 835 (pcDNA4HisMax-E2-CD40L), bei dem trotz nicht vorhandener neutralisierender Antikörper die Ausbildung einer protektiven CSFV-spezifischen Immunität *prä challenge* detektiert werden konnte. Ähnliche Beobachtungen von vereinzelt auftretenden Schutzwirkungen, die mit dem völligen Fehlen bzw. der nur sehr geringen Induktion neutralisierender Antikörpertiter korreliert sind, wurden bereits bei Experimenten mit rekombinantischem E2-Vakziniavirus [Rümenapf, 1991] bzw. rekombinantischem E2-Adenovirus [Hammond, 2000] beschrieben. Ob die entsprechende Stimulation in diesen Fällen auf das virale Vektorsystem zurückzuführen ist oder andere Faktoren involviert sind, ist bisher unbekannt.

Das zusätzlich inserierte IL-12 bewirkte eine Repression der humoralen Immunantwort. Dieser negative Einfluss des IL-12 ist auf seine Wirkung als klassisches T_H1-Zytokin und dem damit verbundenen Shift der Immunantwort wie schon für HCV beschrieben [Shan, 1999], zurückzuführen. Auch in anderen

Versuchsansätzen wurde eine Beeinflussung der Immunantwort durch IL-12 beobachtet [Schirmbeck, 2001].

Daher zeigte nur ein Tier (807) der Gruppe 6 (pcDNA4/HisMax-E2-IL12) signifikante Antikörpertiter vor der CSFV-Infektion. Die hohe Sterblichkeit der Tiere (50%) belegt damit, dass obwohl CSFV-spezifische zytotoxische T-Lymphozyten in die Ausbildung einer CSFV-spezifischen Immunantwort involviert sind [Pauly, 1995], die tragende Rolle einer Protektion durch die humorale Immunantwort übernommen wird. Im Gegensatz dazu muss für das BVDV zur Ausbildung einer effektiven Schutzwirkung durch DNA-Vakzine, sowohl die Induktion der humoralen- als auch zellulären Immunantwort erfolgen [Cortese, 1998; Harpin, 1999].

Nach der CSFV-Infektion zeigten alle Tiere der Gruppen 7 (pcDNA4HisMax-E2-IL-18) und 8 (pcDNA4HisMax-E2-CD40L) sowie 2 Tiere der Gruppe 6 (pcDNA4HisMax-E2-IL-12) und der Kontrollgruppe (pcDNA4/HisMax) einen Anstieg der CSFV-spezifischen Antikörpertiter. Der überraschende Tod des E2-Kontrolltieres 806 (Gruppe 5) ist vermutlich auf andere Faktoren zurückzuführen, da das Tier *prä* und *post challenge* signifikante neutralisierende Antikörpertiter aufwies und alle ebenso immunisierten Tiere der vorangegangenen Versuchsteile überlebten.

Der klinische Verlauf der Infektion manifestierte sich bei der Kontrollgruppe (4) sowie den beiden Tieren der Gruppe 6 (pcDNA4HisMax-E2-IL-12) mit den klassischen Symptomen [Fields, 1996], gefolgt vom vorzeitigen Ableben sechs bzw. sieben Tage *post challenge*. Besonders auffällig ist die Korrelation zwischen neutralisierenden Antikörpertitern und den Temperaturverläufen in der Gruppe 6: die Tiere ohne neutralisierende Antikörper zeigten hohe Fieberwerte, während es bei den Tieren mit Antikörpern nur zur Ausbildung einer geringen Temperaturerhöhung kam. Die Fieberkurven der Tiere der Gruppen 7, 8 und 5 hingegen sind unauffällig, wobei ein Tier der Gruppe 7 und zwei Tiere der Gruppe 8 einen eintägigen Temperaturanstieg von 40,5°C aufwiesen. Die vereinzelt auftretende Temperaturerhöhung der immunisierten Tiere (Gruppen 7 und 8) konnte ebenso nach Immunisierung mit einer E2-DNA-Vakzine [Andrew, 2000] bzw. einem rekombinanten E2-Adenovirus [Hammond, 2000] beobachtet werden. Obwohl bei Verwendung einer Kombination aus einer E2-DNA-Vakzine und einem rekombinanten E2-Adenovirus eine Reduktion

der Fieberentwicklung erreicht werden konnte, waren auch nicht alle Tiere der Versuchsgruppe fieberfrei [Hammond, 2001]. Die gewonnenen Daten lassen keinen direkten positiven Effekt für das inserierte IL-18 bzw. den CD40L erkennen, da schon bei Immunisierung mit den pcDNA4HisMax-E2-Konstrukten eine starke Fieberreduktion induziert wird.

Bei der Auswertung der Organ- und Blutproben zeigten sich sowohl die Stärke der CSFV-Infektion (Gruppe 4) als auch die Induktion einer CSFV-spezifischen Immunantwort der Gruppen 5, 7 und 8. Der Nachweis von CSFV in Blut und Organproben von Tieren, die mit dem pcDNA4HisMax-E2-IL-12 Konstrukt immunisiert wurden (854, 801), unterstreicht die Abhängigkeit eines wirksamen Schutzes von der Induktion einer CSFV-spezifischen humoralen Immunantwort.

Diese Daten zeigen im Gegensatz zu Experimenten mit anderen E2-DNA-Vakzinen [Andrew, 2000] bzw. einem rekombinanten E2-Adenovirus [Hammond, 2001], dass durch eine DNA-Vakzine immunisierte Tiere vor einer Virämie geschützt werden können, wobei man einräumen muss, dass dieser Effekt auch stark vom verwendeten Immunisierungsschema abhängig ist [Hammond, 2001].

Anders als bei Immunisierungsversuchen mit einer E2-Marker-Vakzine [Dewulf, 2001] konnte durch die hergestellten Konstrukte (Gruppen 5, 6, 7 und 8) eine horizontale Virusausbreitung verhindert werden. Der Aspekt einer vertikalen Ausbreitung wurde im Rahmen dieser Studie nicht behandelt, wird aber Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Da bei dem verwendeten Immunisierungsschema schon bei dem E2-Grundkonstrukt keinerlei Virusausscheidung detektiert werden konnte, war es nicht möglich, die Verhinderung der Virusausscheidung auf die zusätzlich inserierten immunstimulatorischen Moleküle zurückzuführen.

Die durchgeführte FACS-Analyse bestätigte den für die Kontrollgruppe (4) sowie für Tiere der Gruppen 5 und 6 erwarteten Befund einer CSFV-spezifischen B-Zell-Depletion [Meyer, 1999; Susa, 1992]. Außerdem konnte ein Unterschied in der Reaktion der B-Zell-Populationen zwischen den mit den E2-IL-18- bzw. E2-CD40L-Konstrukten und den mit dem E2-Grundkonstrukt immunisierten Tieren beobachtet werden. Während für das E2-Konstrukt am vierten Tag post *challenge* eine leichte B-

Zell-Depletion zu verzeichnen war, zeigten die Tiere der Gruppen 7 und 8 eine Unterdrückung der B-Zell-Depletion und stellenweise sogar eine Stimulation der B-Zell-Proliferation nach CSFV-Infektion. Dieser positive Effekt ist vermutlich auf die zusätzliche Stimulation der humoralen Immunantwort durch IL-18 [Yoshimoto, 1999/2000] und den CD40L [Banchereau, 1994/i; Foy, 1996] zurückzuführen.

Zusammenfassend kann somit festgestellt werden, dass mit der Konstruktion der pcDNA4HisMax-E2-IL-18- bzw. pcDNA4HisMax-E2-CD40L-Plasmide die Herstellung einer hochwirksamen CSFV-spezifischen DNA-Vakzine gelungen ist, die neben der Induktion eines protektiven Schutzes auch die horizontale Ausbreitung des CSFV bei Infektion verhindert.

Da exprimierte membranständige Proteine wie der CD40L oder das NS5B des HCV aufgrund ihrer stark hydrophoben N- bzw. C-terminalen Struktur häufig Schwierigkeiten bei der Solubilisierung zeigen [Berger, 2001], wurde für die molekulare Charakterisierung des porcinen CD40L pQE-Konstrukte mit und ohne Signal-Anker-Sequenz für die Expression in *E.coli* hergestellt. Mit dem Konstrukt ohne N-terminale Signal-Anker-Sequenz konnten wie für den humanen CD40L beschrieben [Noelle, 1992] große Mengen des löslichen CD40L unter denaturierenden Bedingungen isoliert werden. Für das vollständige Protein gelang es trotz Optimierungsversuchen und affinitätschromatographischer Reinigung nicht, ein spezifisches Produkt nachzuweisen, was vermutlich in der Unlöslichkeit des Proteins aufgrund der Signal-Anker-Sequenz begründet liegt. Mit dem gereinigten Protein wurde anschließend ein polyklonales Antiserum hergestellt, dessen Spezifität durch Western Blot-Analysen und Vergleiche mit einem monoklonalen anti-human-CD40L-Antikörper gesichert wurde. Die beobachtete Kreuzreaktion zwischen einem murinen monoklonalen anti-human-CD40L-Antikörper und porcinem CD40L bestätigt die für Maus und Mensch beschriebenen Sequenzhomologien zwischen den CD40L verschiedener Spezies [Armitage, 1992; Noelle, 1992].

Für die Expression des CD40L in seiner nativen Form konnte eine stabile 293-CD40L Zelllinie etabliert und deren Spezifität durch Oberflächenimmunfluoreszenz-, Western

Blot-Analyse und Radioimmunpräzipitation nachgewiesen werden. Durch die Expression in pro- und eukaryontischen Systemen wurde demonstriert, dass ähnlich wie für die Heparanase [Goldshmidt, 2001] der porcine CD40L ohne Signal-Anker-Sequenz als lösliches Protein und mit Signal-Anker-Sequenz als membranständiges Molekül exprimiert wird.

Die cDNA des porcinen IL-18 wurde mittels RT-PCR hergestellt. Anschließend gelang es, das porcine IL-18 als Hexahistidininfusionsprotein im pQE-E.coli-Expressionssystem zu exprimieren [Oem, 2000] und durch Affinitätschromatographie aufzureinigen. Das gereinigte Protein konnte zur Herstellung eines spezifischen polyklonalen IL-18 Antiserums verwendet werden.

Die IL-18-Expression der hergestellten stabilen 293-IL-18-Zelllinie konnte über Western Blot-Analyse und Radioimmunpräzipitation nachgewiesen werden. Überraschenderweise wurden im Western Blot große Mengen des unter Normalbedingungen sekretierten Proteins intrazellulär detektiert. Anders als viele Zytokine [Cosman, 1987] enthält IL-18 keine RNA-destabilisierenden Elemente und liegt dadurch länger als andere Zytokine in seiner inaktiven Vorläuferform [Muneta, 2001; Ghayur, 1997] in der Zelle vor [Gu, 1997; Okamura, 1995]. Die intrazelluläre Anhäufung des Proteins deutet auf eine verhältnismäßig starke Expression oder geringere Prozessierungsaktivität durch die 293-Zellen hin.

Bedingt durch die heterodimere Molekülstruktur des IL-12 mussten die beiden Untereinheiten durch zwei getrennte Plasmide in *E.coli* exprimiert werden. Für die p40-Untereinheit des IL-12 wurde wie für den CD40L ausschließlich nach Entfernung einer 30 AS langen hydrophoben N-terminalen Sequenz ein spezifisches Translationsprodukt detektiert, dessen Solubilisierung als Hexahistidininfusionsprotein allerdings weder mit nativen noch denaturierenden Reinigungsprotokollen gelang. Die im Vergleich zu nicht induzierten Kulturen immensen Proteinmengen ermöglichten eine Reinigung der p40-Untereinheit über präparative PAA-Gele.

Bei der Expression der p35-Untereinheit zeigten sich vergleichbare Probleme wie bei der Expression der p40-Untereinheit. Die Analyse der zweidimensionalen Struktur der

p35-Untereinheit zeigte keinerlei signifikante hydrophobe Regionen im N- bzw. C-terminalen Bereich. Erst nach Optimierung der Induktionsbedingungen und Expression als GST-Hexahistidinfusionsprotein [Pompeia, 1997; Mills, 1992] konnte ein spezifisches Produkt durch Western Blot-Analyse nachgewiesen werden.

Die möglichen Ursachen für die Schwierigkeiten und starken Unterschiede in den Expressionsraten der p40- und p35-Untereinheiten sind nicht offensichtlich. Auch eine mögliche Verbindung der problematischen Expression der p35-Untereinheit mit dem bei *E.coli* beobachteten Phänomen seltener Kodons innerhalb der ersten 25 Triplets nach dem Startkodon [Chen, 1990] erscheint aufgrund der Fusionsproteinstruktur als unwahrscheinlich.

Da die beiden isolierten Untereinheiten allein keine biologische Aktivität aufweisen [Wolf, 1991; Gubler, 1991; Podlaski, 1992], suchten wir nach einer Möglichkeit, das IL-12 als biologisch aktives Molekül zu exprimieren. Die bei vorangegangenen Versuchen mit transienter Expression in MAX-Zellen gemachten Erfahrungen hatten gezeigt, dass die konstitutiv exprimierte Menge an IL-12 relativ gering ist. Daher wurde zur Steigerung der sekretierten Proteinmenge eine stabile Zelllinie erzeugt.

Nur einer von siebenzig Klonen konnte positiv auf die Expression und Sekretion von porcinem IL-12 im funktionellen Assay getestet werden. Obwohl dieser Klon keine spezifischen Signale in Western Blot-Analysen zeigte, war es möglich, die Spezifität durch Competitionstests mit einem IL-12-Antiserum zu bestätigen. Wie schon durch Experimente zur Herstellung einer stabilen Zelllinie für das NS5B des HCV [Berger, 2001] demonstriert, kommt es abhängig vom jeweiligen Integrationsort und dem verwendeten Zelltyp der Ausgangszelllinie zu unterschiedlichen Expressionsraten der einzelnen Zellklone. Dies kann unter Umständen die geringen Expressionsraten des isolierten 293-Klones erklären.

Nach Expression des viralen E2 als GST-Hexahistidinfusionsprotein in *E.coli* wurde dessen Spezifität durch Western Blot-Analyse bestätigt. Außerdem konnte eine Reihe spezifischer Abbauprodukte detektiert werden, was erklärt, warum diverse native und denaturierende Versuche einer affinitätschromatographischen Reinigung erfolglos blieben. Bei der Expression eines viralen Gens in einem prokaryontischen System

ergeben sich gewisse Schwierigkeiten. Die in *E.coli* und anderen Organismen auftretenden Unterschiede in der *codon usage* von stark und gering exprimierten Genen führen zu einem Unterschied im Expressionsverhalten abhängig von dem enthaltenen Kodonmuster [Makoff, 1989; Kane, 1995]. Das bedeutet, dass bei Verwendung sogenannter “*rare codons*“ eine Reduktion der Expressionsrate des betreffenden Genproduktes zu beobachten ist [Makoff, 1989]. Außerdem führen bestimmte seltene Arginin-Kodone (AGG/AGA) zur Auslösung von ribosomalen *frameshifts*, was die Bildung von nonsens Produkten und den vorzeitigen Abbruch der Translation zur Folge hat [Spanjaard, 1988; Kane, 1995]. Sequenzanalysen zeigen, dass im E2-Glykoprotein 87% der Arginin-Kodone zu dieser Gruppe gehören, was unter Umständen die große Anzahl an Abbauprodukten zur Folge hat.

Die im Rahmen dieser Arbeit gesammelten Daten zeigen hinsichtlich der Entwicklung einer hochwirksamen CSFV-spezifischen DNA-Vakzine mit Hilfe von Immunstimulatoren wichtige Ansatzpunkte auf. Das pcDNA4HisMax-E2-IL-18-Konstrukt enthält große Potentiale und ist somit als mögliche *emergency* Vakzine von Bedeutung. Weitere Detailanalysen mit variablen Dosierungen und Immunisierungsschemata werden zeigen, ob sich die hergestellte DNA-Vakzine als Alternative zu klassischen Impfstoffen behaupten kann.

Ein Vergleich der Testergebnisse nach Applikation mit pro- und eukaryontisch exprimierten IL-12, IL-18 und CD40L wird helfen, wichtige Fragestellungen zur Bedeutung der Proteinprozessierung und Modifikation immunologisch relevanter Moleküle für ihre Funktion zu beantworten. Dies dürfte auch für die Entwicklung von DNA-Vakzinen für andere Erkrankungen von Interesse sein.

5 MATERIAL

5.1 Bakterienstämme, Zelllinien und Virusisolate

<i>E.coli</i> XL 1-Blue	Stratagene
<i>E.coli</i> M15	Stratagene
293	humane Nierenzelllinie (ATCC)
MAX	BFAV [Pauly et al., 1995]
STE	BFAV [McClurkin et al., 1966]
CSFV Stamm Eystrup	Prof. Dr. Büttner BFAV
CSFV Stamm Glentorf	E. Armengol BFAV [Pittler et al., 1968]

5.2 Zellkulturmedien

MEM	Gibco BRL
Markierungsmedium	Gibco BRL
RPMI-1640 (BFA 31)	BFAV
Trypsin (BFA 40)	BFAV
STE-Medium	BFAV

5.3 Plasmide und Nukleinsäuren

5.3.1 Plasmide

pBakPak8/9	Clontech
pBakPak8-E2-sig ⁻	AG-Pfaff, BFAV
pcDNA3	Invitrogen
pcDNA4/HisMax	Invitrogen
pEGFP-N3	Clontech
pRc/RSV	Invitrogen
pVDB3-swi-IL-12 (IRES)	Dr. Heller Roche

5.3.2 Nukleinsäuren

DNA 1 kb Größenmarker	New England Biolabs, Bio-Rad
-----------------------	------------------------------

MATERIAL

DNA 100 bp Größenmarker	Bio-Rad
RNA Längenmarker I	Roche

5.4 Oligonukleotide

Bezeichnung	Nukleotidsequenz 5' → 3'
IL-18-vac.seq	ttttt ggtacc ATGGCTGCTGAACCGGAAGACAA
IL-18-vac.rev	aaaaaaaa agggccgc TCAGTTCTTGTTTTGAACAGTGAACA
IL-18-bak.seq	ttttt ggtacca GCTGCTGAACCGGAAGACAA
IL-18-bak.rev	aaaaa actgcag CTA <i>gtgatggtgatggtgatg</i> GTTCTTGTTTTGAACAG TGAACA
CD40L-iso.seq	GGTACCATGAT KG AAACATACAR Y CAAMCTTC
CD40L-iso.rev	GCGGCCGCTCAGAGTTTGAGTAAGCCAAA
CD40L-vac.seq	ttttt ggtacc ATGATCGAAACATACAGCCAACCTT
CD40L-vac.rev	aaaaaaaa agggccgc TCAGAGTTTGAGTAAGCCAAAAGAC
CD40L-bak.seq	ttttt gcatgca ATCGAAACATACAGCCAACCTT
Anker.seq	ttttt gcatgca TACCTTCACAGAAGATTGGACAA
CD40L-bak.rev	aaaaa agtcgac TC <i>Ag</i> tgatggtgatggtgatgGAGTTTGAGTAAGCCA AAAGAC
p40-bak.seq	ttttt acca TGGCCATATGGGAACTGGAGAAAA
p40-bak.rev	aaaaa agatct ATTGCAGGACACAGATGCCCA
p35-bak.seq	ttttt ccggga TGTCCGCTGCGCAACCTCCT
p35-bak.rev	aaaaa caattg TC <i>Ag</i> tgatggtgatggtgatgGGAAGAATTCAGATAG CTCATCA
E2-bak.seq	ttttt ggtacc ATCGTGCAAGGTGTGATATGGCTG
E2-bak.rev	aaaaa gaattc TC <i>Ag</i> tgatggtgatggtgatgACCAGCGGCGAGTTGTT CTGT

Großbuchstaben kennzeichnen authentische Nukleotidsequenzen, Kleinbuchstaben eingeführte Nukleotide und ein eingefügter His-tag ist kursiv dargestellt.

• Linker

SmaI SV40 **Hpa I** polyA
 pRSV.seq 5' - **ggg**AGCTTGGATATCCATTTTCG**g****tt**aacTATCGCCTTCTTG
 pRSV.rev 3' - **cc**TCGAACCTATAGGTAAAAGCC**ca****att**gATAGCGGAAGAAC

BstBI
 ACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCTGGGG**tt** -3'
 TGCTCAAGAAGACTCGCCCTGAGACCC**ca**g**c** -5'

BamH I Hind III **E2-Signalsequenz**
 Signal 1.seq 5' - **gatcc-aagctt**-agcATGATCGTGCAAGGTGTGATATGGCTGC
 Signal 1.rev 3' - **g-ttcgaa**-tcgTACTAGCACGTTCCACACTATAACCGACG

Nhe I
 TACTAGTAACTGGGGCACAAGGCC**g**
 ATGATCATTGACCCCGTGTTCGGGC**cgatc**

Kpn I BamH I Not I Xho I Nru I Stu I
 pcDNA3.seq 5' - **c-ggatcc-gcggccgc-ctcgag-tcgcga-agg**
 pcDNA3.rev 3' - **catgg-cctagg-cgccggcg-gagctc-agcgcct-tcc**

Für Sequenzreaktionen wurden entsprechende, sequenz- und plasmidspezifische Primer eingesetzt.

5.5 Enzyme und Kits

5.5.1 Enzyme

Alkalische Phosphatase (CIP)	Roche
AMV Reverse Transkriptase	Promega
DNA Polymerase I, Klenow Fragment	New England Biolabs
DNase I	Roche
Expand TM High Fidelity PCR System	Roche

Mung Bean Nuklease	New England Biolabs
Proteinase K	Roche
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, AGS, Roche
RNase Inhibitor	Promega
RNase A	Roche
T4 DNA Ligase	New England Biolabs
T7 RNA-Polymerase	Roche
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Peqlab

Für Reaktionen mit diesen Enzymen wurden die vom jeweiligen Enzymhersteller mitgelieferten Puffer eingesetzt.

5.5.2 Kits

ABI TM PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin Elmer
Mammalian Transfection Kit	Stratagene
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
Ready-to-go TM PCR Beads	Amersham Pharmacia
CHEKIT-CSF-SERO	Hoechst
IFN- γ -Cytoset	Biosource International

5.6 Antiseren und Antikörper

Polyklonales anti-IL-12 Kanninchenserum	Endogen
Monoklonaler anti-human-CD40L-Maus-Antikörper	Saalmüller/Weiland BFAV
Monoklonaler anti-E2-Maus-Antikörper (a18)	BFAV [Weiland et al., 1990]
Monoklonaler anti-E2-Maus-Antikörper (MAK 7)	Weiland BFAV
Monoklonaler anti-E2-Maus-Antikörper (C 46)	Weiland BFAV
Monoklonaler anti-porcines IgG1-Maus-Antikörper	Serotec
Monoklonalesr anti-porcines IgG2-Maus-Antikörper	Serotec
Monoklonaler anti-humanes CD21-Maus-Antikörper	Pharmingen
Ziege-anti-Kanninchen IgG, AP-gekoppelt	Promega

Ziege-anti-Kanninchen IgG, POD-gekoppelt	Bio-Rad
Ziege-anti-Maus IgG, POD-gekoppelt	Bio-Rad
Ziege-anti-Maus IgG, DTAF-gekoppelt	Jackson Immuno Research
Ziege-anti-Maus IgG1, PE-gekoppelt	Jackson Immuno Research

5.7 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid-Stammlösungen	AppliChem, Roth
Agar	Difco
Agarose für Gelelektrophorese	Gibco BRL
Ammoniumpersulfat	Serva
Ampicillin	Boehringer Mannheim
Bacto Hefeextrakt	Difco
Bacto Trypton	Difco
Bromphenolblau	Serva
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma
Cäsiumchlorid	Sigma
Coomassie Brilliant Blue G250	Serva
DEPC	Sigma
Dithiothreitol	Boehringer Mannheim
DMPC	Sigma
DMSO	Merck
DOTAP Transfection Reagenz	Roche
EDTA, Dinatriumsalz	Serva
EGTA	Sigma
En ³ Hance	DuPont
Ethidiumbromid	Serva
FCS (fötales Kälberserum)	PAA
Ficoll-Paque	Pharmacia
Formamid, deionisiert	Gibco BRL
HEPES	Fluka

MATERIAL

Kanamycin	Sigma
L-15	Life Technologies
Leupeptin	Boehringer Mannheim
Ni ²⁺ -NTA-Agarose	Qiagen
Nonidet P40	Boehringer Mannheim
Nukleosidtriphosphate	Roche
Orange G	Fluka
OPD	Sigma
peqGOLD TriFast TM	Peqlab
Tris-gesättigtes Phenol für DNA-Extraktion	AppliChem, Roth
H ₂ O-gesättigtes Phenol für RNA-Extraktion	AppliChem, Roth
Pefablock SC	Boehringer Mannheim
PMSF	Roth
Prestained-SDS-PAGE Proteinlängenmarker	Bio-Rad, New England Biolabs
Szintillationsflüssigkeit rotiszint ecoplus	Roth
SDS-PAGE Proteinlängenmarker	Bio-Rad, New England Biolabs
TEMED	Sigma
Triton X-100	Sigma
Xylencyanol	Fluka

Zusätze für Zellkultur

Doxycyclin	Sigma
FCS (fötale Kälberserum)	PAA
Geneticin (G418)	Sigma
Penicillin G	Grünenthal
Streptomycin	Hefa Pharma
Wasserstoffperoxid	Merck
Zeocin	Invitrogen

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Roth, Sigma oder Scharlau bezogen.

5.8 Radioaktive Substanzen

(Methyl- ³ H)-Thymidin	Amersham Buchler
Na ₂ ⁵¹ CrO ₄	Amersham Buchler
Tran [³⁵ S] Label Mix	ICN
[³⁵ S] L-Methionin	ICN

5.9 Verbrauchsmaterial

Chromatographiepapier 3 mm	Whatman
Dialysierschläuche	Serva, Roth
Elektroporationsküvetten	Eurogentec
Kanülen und Plastikspritzen	Bachhofer, Braun, Terumo
Kieselgelplatte F ₂₅₄	Merck
Mikroreaktionsgefäße	Eppendorf
Nitrozellulose	Schleicher & Schuell
Nylon-Membran, positiv geladen	Roche
Pipettenspitzen	Greiner
Röntgenfilme BioMax MR	Kodak
Sep-Pak C ₁₈ Cartidges	Waters
Zellkulturplastikwaren	Greiner
Zentrifugenröhrchen	Beckman Instruments
Mikrotiterplatten, Rundboden	Greiner
Mikrotiterplatten, Flachboden	Greiner
Nunc-Immuno Plate Maxisorb	Nunc
Szintillationsfilter	Wallac
Feststoffszintillator Meltilex A	Wallac

5.10 Geräte und Laborhilfsmittel

ABI-PRISM 377 DNA Sequencer	Perkin Elmer
Begasungsbrutschrank	Heraeus
Liquid Scintillation Counter	Wallac

MATERIAL

DNA-Synthesizer Mod. Expedite 89	Millipore
Entwicklermaschine Sakura QX60	Sakura
Filmkassetten	Agfa-Gevaert
Fluoreszenz-Mikroskop, Axioskop	Zeiss
Geldokumentationssystem	LFT
Geltrockner 1125B	Bio-Rad
Gene Pulser™	Bio-Rad
Heißluftofen	Heraeus
Heizblock	Liebisch
Horizontal-Elektrophoresekammern	BFAV
Inkubationsschüttler	New Brunswick Scientifc
Magnetrührer	Heidolph
Mikroprozessor pH-Meter	Schott
Mikroskop Labovert	Leitz
Mikrowellengerät HMG 760/62.B	Bosch
Minigel-Elektrophoreseapparatur	Hoefer, Bio-Rad
Phospo-imager	Fuji
Power Supplies	Pharmacia, LKB, Bio-Rad
Reaktionsgefäßmixer 5432	Eppendorf
Spektrophotometer DU-40	Beckmann
Speed Vac Concentrator	Bachofer
Sterilbank Lamin Air	Haraeus
T3 Thermocycler	Biometra
Taumler Reax 2	Heidolph
Thermostat 5320	Eppendorf
Trans-Blot SD Transfer Cell	Bio-Rad
Trio-Thermoblock	Biometra
Ultraschall; Sonifier B12 und B 15	Branson
Vertikal-Elektrophoresekammern	BFAV
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Wasserbäder	Köttermann/Julabo

5.10.1 Zentrifugen

Biofuge A	Heraeus
Biofuge 13	Heraeus
Biofuge pico	Heraeus
Eppendorf Tischzentrifuge 5415	Bachofer
Eppendorf Tischzentrifuge 5402	Bachofer
Microfuge E	Beckman Instruments
Minifuge T	Heraeus Christ
Omnifuge 2.0 RS	Heraeus
Photo-Print System	Vilber Lourmat
Ultrazentrifuge Beckmann L8-55	Beckman Instruments
Ultrazentrifuge Centrikon T-1055	Kontron Instruments
Ultrazentrifuge Centrikon T-2070	Kontron Instruments
Zentrifuge J2-21	Beckman Instruments
Zentrifuge TGA-6	Kontron Instruments

5.10.2 Rotoren

TFT 65.13	Kontron Instruments
VTI 65.2	Kontron Instruments
SW 41	Beckman Instruments
JA-10, -14, -17	Beckman Instruments

5.10.3 Software

Die Analyse und der Vergleich der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen wurde mit Hilfe der *University of Wisconsin Genetics Computer Group* (UWGCG) Software [DEVEREUX, 1984] durchgeführt.

5.11 Versuchstiere

Schweine, Deutsche Landrasse

6 METHODEN

6.1 Prokaryotische Zellkultur

6.1.1 Kultivierung und Kryokonservierung von *Escherichia coli*

Der verwendete *E. coli* Stamm XL1-Blue wurde in LB-Medium angezogen oder auf LB-Agarplatten kultiviert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C über Nacht. Suspensionskulturen wurden bei 200 rpm geschüttelt. Für eine Kryokonservierung wurden 500 µl Kultur mit 30 % Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

LB-Medium: 10 g Bacto Trypton, 5 g Bacto Hefeextrakt, 5 g NaCl,
ad 1 l H₂O; pH 7,5

LB-Agar: LB-Medium mit 1,5% Agar

Selektionsmedien: 100 µg/ml Ampicillin, 25 µg/ml Kanamycin,
12 µg/ml Tetracyclin, 25 µg/ml Zeocin

6.1.2 Herstellung Transformations-kompetenter *E.coli*

Zur Herstellung transformationskompetenter *E.coli* wurde LB-Medium mit einer *E.coli* Übernachtskultur 1:100 angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,4 geschüttelt. Nach Abkühlen auf Eis wurden die Bakterien pelletiert (4000 rpm, 5 min, 4°C), in 0,5 Volumen eiskalter 50 mM CaCl₂-Lösung aufgenommen und 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (4000 rpm, 30 s, 4°C) wurde das Bakterienpellet in 0,05 Volumen eiskalter 50 mM CaCl₂-Lösung vorsichtig resuspendiert. Die kompetenten Bakterien wurden daraufhin entweder direkt zur Transformation eingesetzt oder nach Zugabe von 20 % Glycerin zu je 200 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C bis zur Verwendung gelagert.

6.1.3 Transformation

Für die Transformation wurde 0,1-1 ng Plasmid-DNA oder 5 µl Ligationsansatz zu je 100 µl kompetenter Bakterien gegeben. Der Ansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem 2-minütigen Hitzeschock bei 42°C und 2 min auf Eis erfolgte die Zugabe von 1 ml antibiotikafreiem LB-Medium und eine anschließende Inkubation des Ansatzes für 45 min bei 37°C. Nach kurzer Zentrifugation (4000 rpm, 5 min) wurde das Pellet in 100-200 µl antibiotikafreiem LB-Medium resuspendiert, auf LB-Selektionsagar ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

6.2 Eukaryotische Zellkultur

6.2.1 Arbeiten mit humanen und porcinen Zelllinien

6.2.1.1 Kultivierung und Kryokonservierung

Die Kultivierung der adhärent wachsenden Zellen erfolgte standardmäßig in einem Zellkulturbrutschrank bei 37°C in feuchter Atmosphäre und mit 5% CO₂. 293-Zellen wurden hierbei in MEM, MAX Zellen in BFA 34 kultiviert. Die Medien wurden jeweils mit 1 mM Glutamin, 10% FCS und Penicillin G/Streptomycin (je 100 U/ml) komplementiert. Bei Erreichen einer Konfluenz von etwa 95% wurden die Kulturen im Verhältnis 1:4 bis 1:5 subkultiviert. 293- und MAX Zellen wurden durch Inkubation mittels Trypsin-Lösung bei 37°C abgelöst.

Für die Kryokonservierung wurden die Zellen abgelöst, abzentrifugiert (1000 rpm, 5 min), 2x mit PBS gewaschen und in Aliquots von 5x10⁶ bis 1x10⁷ Zellen in 1 ml 90% FCS/10% DMSO bei -70°C langsam eingefroren. Die Langzeitlagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff. Eingefrorenen Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C bis zum Gefrierpunkt aufgetaut und mit 10-20 ml Medium in T75-Zellkulturflaschen gegeben. Nach 12-24 Stunden wurde das Medium gewechselt und die Zellen bis zur Konfluenz kultiviert.

Trypsin-Lösung: 3,3 mg/ml EDTA, 2,6 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄,
 8 mM Na₂HPO₂, 136 mM NaCl, 0,25% Trypsin,
 16 mg/ml Phenolrot, pH 7,2

PBS: 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,12 g Na₂PO₄, 0,2 g KH₂PO₄
0,1 g CaCl₂, 0,1 g MgCl₂ x 6 H₂O, ad 1l H₂O bidest

6.2.1.2 Isolierung von *PBMC*

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

6.2.1.3 Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen

Zur Bestimmung der Anzahl lebender Zellen wurden 10 µl einer Zellsuspension mit 90 µl Trypanblau-Lösung (0,2% in 0,15 NaCl) verdünnt. Ungefärbte lebende Zellen wurden in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Zellzahl pro ml Zellsuspension ergab sich aus der Zellzahl in 4 Eckquadraten (*Z*), dem Kammerfaktor (*KF*=10⁴) und dem Verdünnungsfaktor (*V*; hier: 10) wie folgt:

$$T \text{ (Zellen/ml)} = KF \times Z \times V$$

6.2.1.4 Transfektion eukaryotischer Zellen

Bestimmung der Transfektionseffizienz

Zur Bestimmung der Transfizierbarkeit verschiedener Zelllinien oder um die Transfektionseffizienz einzelner Methoden zu prüfen wurden Zellen mit dem EGFP-Expressionsplasmid pEGFP-N3 transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurde das Medium abgenommen und die Zellen ohne weitere Fixierung unter einem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Das Verhältnis von fluoreszierenden zu nicht fluoreszierenden Zellen und damit die Transfektionseffizienz wurde optisch abgeschätzt.

Transfektionsmethoden

- Für transiente und stabile Transfektionen von Plasmid-DNA wurde nach Abschätzung der Transfektionseffizienz hauptsächlich die Liposomen-vermittelte Transfektion mittels Effectene angewandt.

Elektroporation:

2×10^6 Zellen wurden pelletiert (1000 rpm, 5 min), 2x in PBS gewaschen und in 100 μ l PBS aufgenommen. Nach Zugabe der zu transfizierenden DNA wurde die vorsichtig, jedoch gut gemischte Zellsuspension in eine Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte im *Gene Pulser* der Firma Bio-Rad für 293- wie MAX-Zellen bei 25 μ F und 800 V. Anschließend wurden die Zellen in Kulturschalen überführt ($\varnothing=3,5$ cm) und in entsprechendem Medium kultiviert.

- Kalziumphosphat-Transfektion:

Kalziumphosphat-Transfektionen wurden mit dem *Mammalian Transfection Kit* (Stratagene) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Standardmäßig wurden auf „6-well“-Platten ausgesäte Zellen transfiziert.

- Liposomen-vermittelte Transfektion:

Für die Liposomen-vermittelte Transfektion wurde das Effectene Transfektionsreagenz (Qiagen) nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

6.2.1.5 Herstellung stabiler Zelllinien

Zur stabilen Integration von Plasmid-DNA in Eukaryotenzellen wurde diese vor der Transfektion entsprechend den Angaben im Text mit einem geeigneten Restriktionsenzym linearisiert. Für die Selektion von resistenten Klonen wurden die Zellen einer 32 mm Kulturschale zwei Tage nach Transfektion auf insgesamt vier 100 mm Schalen umgesetzt und nachfolgend in Selektionsmedium kultiviert. Resistente Einzelkolonien, die nach 2-4 Wochen zu sehen waren, wurden über Klonierungszyylinder isoliert. In der vorliegenden Arbeit wurden stabile Zelllinien des pcDNA3-Expressionssystems hergestellt.

- stabile Zelllinien des pcDNA3-Expressionssystems

Die Herstellung der für das pcDNA3-Expressionssystem benötigten stabilen Zelllinien erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers (INVITROGEN).

Zusammengefaßt wurden hierbei folgende Schritte durchgeführt:

1. Transfektion der linearisierten pcDNA3 Plasmide über Effectene (1 µg Plasmid-DNA)
2. Selektion der transfizierten 293-Zellen mit je 600 µg/ml G418
3. Analyse der isolierten Klone über Western Blot, Radioimmunpräzipitation und Immunfluoreszenzanalyse

6.3 Allgemeine Arbeiten mit Nukleinsäuren

6.3.1 Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren in wässriger Lösung wurde photometrisch bestimmt. Hierzu wurden UV-Absorptionsspektren im Wellenlängenbereich von $\lambda=320-220$ nm aufgenommen. Die Konzentration der Nukleinsäuren errechnet sich aus der Extinktion bei $\lambda=260$ nm (OD_{260}). Eine OD_{260} von 1,0 entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 33 µg/ml einzelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml RNA. Aus dem Verhältnis der Absorptionswerte bei 260 nm und 280 nm (OD_{260}/OD_{280}) läßt sich der Reinheitsgrad der Nukleinsäure ableiten. Für reine DNA liegt dieser Quotient zwischen 1,8 und 2,0, für reine RNA zwischen 1,9 und 2,1.

6.3.2 Phenol/Chloroform-Extraktion

Zur Entfernung von Proteinen wurden wäßrige Nukleinsäure-Lösungen nacheinander mit je einem Volumen Phenol, Phenol/Chloroform (1:1) und Chloroform ausgeschüttelt. Für die Extraktion von DNA wurde eine Tris-gesättigte Phenollösung (pH 7,6), für RNA eine H₂O-gesättigte Phenollösung verwendet (pH 4,0). Um die Trennung der Phasen zu beschleunigen und die Abnahme der wäßrigen Oberphase zu erleichtern, wurden die ausgeschüttelten Fraktionen jeweils kurz zentrifugiert (1 min,

12000 rpm). Nach den Extraktionsschritten wurde die in der wäßrigen Phase gelösten Nukleinsäuren mit Ethanol präzipitiert.

6.3.3 Ethanolpräzipitation

Für die Fällung von DNA wurde die wäßrige Nukleinsäurelösung mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Volumen 100%igem Ethanol versetzt und 15 min bei RT präzipitiert. Nach Zentrifugation (10 min, 12000 rpm) wurde das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und je nach Verwendungszweck in H₂O oder Puffer aufgenommen. Die Präzipitation von RNA erfolgte mit 1/10 Volumen 4 M Lithiumchlorid und 3 Volumen kaltem 100%igem Ethanol. Nach Inkubation für 30 min bei -70°C oder 2 h bei -20°C wurde die gefällte RNA bei 4°C abzenrifugiert (15 min, 12000 rpm) und mit kaltem 70%igen Ethanol gewaschen. Das bei RT getrocknete Pellet wurde anschließend in RNase freiem H₂O aufgenommen.

6.4 Präparation, Analyse und Modifikation von DNA

6.4.1 Agarosegelelektrophorese

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA wurden je nach Größe der zu trennenden Moleküle 0,7-2%ige horizontale Agarosegele mit 1x E-Puffer als Gel- und Elektrophoresepuffer eingesetzt [SAMBROOK, 1989]. Nach Versetzen der Proben mit DNA-Probenpuffer erfolgte die Auftrennung bei einer konstanten Spannung von 5 V/cm. Nach der Elektrophorese wurden die Gele für 10 min in Ethidiumbromid-Lösung (0,5 µg/ml) gefärbt und nachfolgend kurz gewässert. Die Detektion von DNA-Fragmenten, die aus dem Gel isoliert und weiterführend verwendet wurden, erfolgte auf einer Leuchtplatte mit langwelligem UV-Licht ($\lambda=366$ nm). Für photographische Aufnahmen wurde ein digitales Geldokumentationssystem eingesetzt, bei welchem die Gele bei kurzwelligem UV-Licht ($\lambda=254$ nm) analysiert wurden.

20 x E-Puffer: 800 mM Tris, 400 mM Natriumacetat, 40 mM EDTA, mit
Eisessig auf pH 8,3 eingestellt

10x DNA-Probenpuffer: 20 mM EDTA, pH 8,0, 50% Glycerin, 0,2% OrangeG, 0,2% Xylencyanol, 0,1% Bromphenolblau

6.4.2 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen

Nach Auftrennung in einem präparativen Agarosegel und Färbung mit Ethidiumbromid wurden gewünschte DNA-Fragmente unter langwelligem UV-Licht ($\lambda=366$ nm) ausgeschnitten und mittels des *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aus dem Gel isoliert.

6.4.3 Restriktionsverdau von DNA

Für die Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen wurde für einen analytischen Ansatz 0,5-1 μ g DNA in 20 μ l, für einen präparativen Ansatz 5 μ g DNA in 100 μ l Reaktionsvolumen für 1-6 Stunden bei entsprechender Temperatur im Wasserbad inkubiert. Pro μ g DNA wurden 1-3 U Enzym eingesetzt. Die Reaktions- und Inkubationsbedingungen wurden entsprechend den Angaben des Enzymherstellers gewählt. Die Überprüfung der DNA-Spaltungen erfolgte auf analytischen Agarosegelen.

6.4.4 Auffüllen zurückgesetzter 3' Enden

Zur Erzeugung glatter („*blunt*“) DNA-Enden wurden zurückgesetzte 3' Enden mittels des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase I aus *E.coli* aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend nach Zugabe von 10 mM EDTA für 10 min bei 75°C hitzeinaktiviert.

Reaktionsansatz: 1-5 μ g DNA
 10 μ l EcoPol-Puffer, 10x
 33 μ M dNTPs
 5 U DNA-Polymerase I, Klenow-Fragment
 ad 100 μ l H₂O

6.4.5 Abdau überhängender 5' und 3' Enden

Nach Spaltung von DNA entstandene überhängende Einzelstrang-Enden wurden, wenn nötig, mit Hilfe der Mung Bean Nuklease abgedaut. Hierzu wurde die DNA mit 1x Mung Bean Nuklease Puffer zu einer Konzentration von 0,1 µg/µl verdünnt und mit Mung Bean Nuklease (1 U pro µg DNA) für 30 min bei 30°C inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde mittels Phenol/Chloroform-Extraktion inaktiviert, die DNA mit Ethanol gefällt.

6.4.6 Phosphorylierung von DNA

Um Ligationen linearisierter Vektoren mit synthetischen Oligonukleotid-Linkern oder PCR-Fragmenten zu ermöglichen, wurden deren 5'Enden mittels der T4 Polynukleotidkinase (PNK) phosphoryliert.

Reaktionsansatz: 1-5 µg DNA
 5 µl T4-PNK-Puffer, 10x
 1mM rATP
 10 U T4-PNK
 ad 50 µl H₂O

Der Reaktionsansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert, anschließend durch Erhitzen (10 min, 68°C) inaktiviert, Phenol/Chloroform extrahiert und Ethanol präzipitiert.

6.4.7 Dephosphorylierung von DNA

Zur Verhinderung von Religationen linearisierter Vektorfragmente bei Klonierungen wurden die 5' terminalen Phosphatgruppen der DNA-Moleküle mittels der Alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) entfernt. Der Reaktionsansatz wurde für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

Reaktionsansatz: 1-5 µg linearisierte Plasmid-DNA
 5 µl Phosphatasepuffer, 10x
 1 U CIP
 ad 50 µl H₂O

Durch Zugabe von 10 mM EGTA und Inkubation bei 75°C (15 min) wurde die CIP inaktiviert und durch anschließende Phenol/Chloroform-Extraktion aus der Lösung entfernt.

6.4.8 Ligation von DNA

Für die Ligation von Vektor- und Insert-DNA wurde die T4-DNA-Ligase verwendet. Eingesetzt wurden jeweils ca. 200 ng Vektor-DNA und ein äquimolares Verhältnis an Insert-DNA. Die Ligation erfolgte mit 200 U T4-DNA-Ligase in 1x T4-DNA-Ligase-Puffer und einem Gesamtvolumen von 20 µl. Bei glatten Enden der DNA-Moleküle („*blunt/blunt*“-Ligation) wurde der Reaktionsansatz über Nacht bei 14°C inkubiert, bei Ligation von kohäsiven Enden („*sticky/sticky*“) wurde die Reaktion 2 Stunden bei Raumtemperatur oder 6 Stunden bei 16°C durchgeführt.

6.4.9 Amplifikation von DNA-Fragmenten über PCR

Die Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) wurden in Thermocyclern mit beheizbaren Deckel besitzen. Ein Überschichten der Reaktionsansätze mit Mineralöl war aus diesem Grund nicht nötig.

6.4.9.1 Präparative PCR-Ansätze:

Amplifizierte DNA-Fragmente, die nachfolgend für Klonierungen in Plasmid-Vektoren eingesetzt wurden, wurden mittels des ExpandTM High Fidelity PCR Systems (Roche) hergestellt. Der in diesem System eingesetzte Enzymmix aus einer *Taq* und einer *Pfu* DNA-Polymerase resultiert in einer extrem niedrigen Fehlerrate der amplifizierten Sequenz. Reaktionsansätze, -bedingungen und PCR-Zyklen wurden nach den Angaben des Herstellers gewählt. Die *Annealing*-Temperatur (T_a) für die Hybridisierung der Primer an die Matrizen-DNA wurde in Abhängigkeit des GC-Gehaltes der Primersequenz entsprechend der „4+2“-Regel ($T_a = T_m - 2^\circ\text{C}$; $T_m = 4^\circ\text{C} (\text{G+C}) + 2^\circ\text{C} (\text{A+T})$) bestimmt. Nach Reaktionsende wurde 1/10 des PCR-Ansatzes gelelektrophoretisch analysiert, für Klonierungen gewünschte Fragmente wurden aus präparativen Agarosegelen isoliert und gereinigt

6.4.9.2 Analytische PCR-Ansätze:

Für die Analyse isolierter Gene hinsichtlich der Größe des Zielgens wurden PCRs mit „Ready-to go“ PCR Beads (Amersham Pharmacia) durchgeführt. Diese lyophilisierten

Reaktions“kugeln“ enthalten alle benötigten Reaktionssubstanzen mit Ausnahme der jeweils eingesetzten DNA-Matrize sowie dem entsprechenden Primerpaar. Nach Zugabe dieser fehlenden Komponenten wurde der Reaktionsansatz mit H₂O auf 25 µl aufgefüllt und die lyophilisierten „PCR-Kugeln“ darin gelöst.

- Reaktionsansatz für die Analyse isolierter Gene :

0,4 µl Plasmid DNA

+ je 25 pmol seq/rev Primer

PCR-Zyklus Denaturieren 1: 1 min, 94°C

Denaturieren 2: 30 s, 70°C

Annealing: 1 min, 60°-64°C

Elongation: 1 min, 72°C

Nach jeweils 30 Zyklen wurden die Reaktionen durch Kühlen auf 4°C abgebrochen. Je 1/10 der PCR-Ansätze wurde anschließend gelelektrophoretisch analysiert.

6.4.10 Präparation von Plasmid-DNA

6.4.10.1 Analytische Isolierung von Plasmid-DNA

„Schnellminipräparation“ bakterieller Plasmid-DNA [LE GOUILL, 1991]

Für eine schnelle Überprüfung von transformierten Bakterienklonen auf das Vorhandensein rekombinanter Plasmide kann mittels dieser Schnellmethode Plasmid-DNA direkt aus Bakterienkolonien, die auf einer Agarplatte angezogen wurden, isoliert werden. Die Bakterienklone werden hierbei mit einer Pipettenspitze direkt von der Agarplatte gepickt und in einem Eppendorfgefäß in 16 µl Lysepuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 3 µl Lösung 2 wird für 4 min bei 14000 rpm zentrifugiert und der gesamte nukleinsäurehaltige Überstand in einem Agarosegel aufgetrennt.

Lysepuffer: 9 Vol. 10x Auftragspuffer, 11 Vol. H₂O,
40 Vol. 0,2 N NaOH/1%SDS

10x Auftragspuffer: 0,25% Xylencyanol, 0,25% Bromphenolblau,
25% Ficoll 400

Lösung 2: 3 M Kaliumacetat, 1,8 M Ameisensäure

Plasmid-Schnellpräparation [BIRNBOIM, 1979]

3 ml LB-Medium, komplettiert mit dem entsprechenden Antibiotikum, wurden hierfür mit einer transformierten Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C kultiviert. Je 1 ml dieser Übernachtskultur wurde kurz abzentrifugiert (5 min, 6000 rpm) und das Pellet in 100 µl Lösung A resuspendiert. Die alkalische Lyse der Zellen erfolgte anschließend durch die Zugabe von 100 µl Lösung B und nach kurzem, vorsichtigen Mischen durch die Zugabe von 150 µl Lösung C. Proteine und chromosomale DNA wurden hierbei präzipitiert und nach Inkubation der Proben für 20 min auf Eis abzentrifugiert (15 min, 14000 rpm). Die Plasmid-DNA des Überstandes wurde für 15 min bei Raumtemperatur mit 3 Vol. 100%igem Ethanol gefällt, nach Zentrifugation (15 min, 1400 rpm) mit 75%igem Ethanol gewaschen, unter Vakuum getrocknet und in 50 µl TE-Puffer mit 10 µg/ml RNase A aufgenommen. Nach Abdau der RNA bei 37°C für 30 min wurden je 2 µl der Proben im Agarosegel analysiert.

Lösung A: 50 mM Glucose, 25 mM Tris/Cl pH 8,0,
10 mM EDTA, 2 mg/ml Lysozym

Lösung B: 0,1 N NaOH, 1% SDS

Lösung C: 3 M Na-Acetat pH 4,8

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7,6, 1 mM EDTA

6.4.10.2 Präparative Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung größerer Mengen reiner Plasmid-DNA, wie sie für Klonierungen, Sequenzierungen oder Transfektionen benötigt wurden, erfolgte die Präparation mit dem *Plasmid Midi Kit* von Qiagen nach Anleitung des Herstellers oder für Mengen ab 4 mg durch Maxipräparation.

Maxipräparation

18 l einer Übernachtskultur wurden abzentrifugiert (5000 rpm, 5 Min., Rotor JA 10), das Bakterienpellet in 1 l Lösung A resuspendiert und 20 Minuten bei Raumtem-

peratur inkubiert. Nach Zugabe von 1 l Lösung B wurde kurz durchmischt, anschließend 1,4 l kalte Lösung C zupipettiert und wieder geschüttelt. Es folgte eine Inkubation für 20-30 Minuten auf Eis. Die dadurch ausgefällte hochmolekulare DNA sowie Protein wurden abzentrifugiert (10000 rpm, 25 Min., 4°C, Rotor JA 10), die im Überstand enthaltene Plasmid-DNA mit 0.6 Volumen Isopropanol bei Raumtemperatur für 30 Minuten gefällt und anschließend pelletiert (8000 rpm, 20 Min., 4°C, Rotor JA 10). Das Pellet wurde kurz an der Luft getrocknet, in 150 ml dest. Wasser aufgenommen und dreimal mit Phenol/Chloroform extrahiert (1Vol. Phenol, je 0.5 Vol. Phenol u. Chl., 1 Vol. Chl.; 3000 rpm, 5 Min., Minifuge T). Der letzte Überstand wurde mit 3 Volumen Ethanol versetzt, die DNA eine Stunde bei -70°C gefällt und mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nach Zentrifugation (12000 rpm, 20 Min., 4°C, Rotor JA 14) wurde das DNA-Pellet an der Luft getrocknet, in 9 ml CsCl in 20 mM Tris/Cl pH 7.5 (R: 1.387) aufgenommen und in *Quick-Seal-Tubes* (5/8x3 inch, 16x76 mm) gefüllt. Es wurden 400 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugegeben, die *Tubes* DNA mit Paraffin austariert und verschweißt. Durch die anschließende Dichtegradientenzentrifugation (50000 rpm, 20 h, 20°C, Rotor TFT 65.13) erfolgte eine Trennung der Plasmid-DNA von chromosomaler DNA und RNA. Unter UV wurde die Plasmid-DNA-Bande abgezogen und einer zweiten Dichtegradientenzentrifugation unterzogen (*Tubes*: 1/2x2 inch; 60000 rpm, 4 h, 20°C, Rotor VTi 65.2). Eine nochmalige Zugabe von Ethidiumbromid war nicht nötig. Die Plasmidbande wurde erneut abgezogen und das Ethidiumbromid durch mehrmaliges Ausschütteln mit CsCl gesättigtem Isopropanol vollständig entfernt. Um das CsCl zu entfernen, wurde die DNA gegen 5 mM Tris/Cl pH 7.5 dialysiert. Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt.

Lösung A:	50 mM Glukose 25 mM Tris/Cl pH 8.0 10 mM EDTA 2 mg/ml Lysozym <i>vor Gebrauch zugeben</i>
Lösung B:	0.1 N NaOH 1 % SDS
Lösung C:	3 M Na-Acetat pH 4.8 in 2 M Essigsäure

6.4.11 Sequenzierung von DNA

Für Sequenzierungen von DNA wurde der ABITM PRISM *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* verwendet. Die *Cycle Sequencing PCR* (Sequenzreaktion) wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. DNA aus analytischen Präparationen wurde zuvor nochmals mit Ethanol präzipitiert, während DNA aus präparativen Isolierungen direkt in die PCR eingesetzt wurde.

Reaktionsansatz: 100-500 ng DNA
 1,5-3 pmol Primer
 2,5 µl *Big Dye reaction mix*
 ad 10 µl H₂O

Cycle Sequencing PCR: 30 s, 96°C
 15 s, 50°C
 4 min, 60°C
 24 Zyklen

Der Reaktionsansatz wurde anschließend mit 25 µl 100%igem Ethanol für 15 min bei Raumtemperatur gefällt und 45 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Die pelletierte DNA wurde mit 150 µl 75%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und bis zum weiteren Gebrauch bei 4°C gelagert. Für die Analyse der Sequenzreaktion auf einem denaturierenden DNA-Sequenzgel wurde die Probe in 5 µl Probenpuffer (Perkin Elmer) resuspendiert und 2 min bei 95°C denaturiert. Auf das Gel aufgetragen wurden jeweils 3 µl der Probe.

Die gelelektrophoretische Analyse der Sequenzreaktionen erfolgte mit dem ABI PRISM 377 *DNA Sequencer* der Firma Perkin Elmer. Für die benötigten 48 cm langen, 4,25%igen denaturierenden Gele wurden 7,5 ml 30%ige Acrylamidstammlösung, 6 ml 10x TBE und 21 g Harnstoff und 21 ml H₂O gemischt, über ein 0,2 µm Zellulosefilter filtriert und entgast. Nach Zugabe von 350 µl 10% APS und 15 µl TEMED wurde die Lösung mit Hilfe einer Spritze in die zum System gehörende Gelkammer gedrückt. Nach zweistündiger Polymerisation des Gels erfolgte der Einbau in die *Sequencer* Apparatur, mit 1x TBE als Elektrophorese-Puffer. Sobald beim Vorlauf (50 W) eine

konstante Geltemperatur von 51°C erreicht war, wurden die Proben aufgetragen und der Hauptlauf gestartet (2700 V, 12 h). Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte automatisch mittels der zum System gehörenden Software (DNA Sequencing Analysis Software, Version 2.1.1).

5x TBE: siehe 6.4.13

6.4.12 Herstellung und Reinigung synthetischer Oligonukleotide

Die Synthese der für PCR, Sequenzreaktionen und DNA-Linker verwendeten Oligonukleotide erfolgte mit einem DNA-Synthesizer der Millipore (Modell Expedite). Für die Abspaltung der Oligonukleotide vom Trägerharz wurde dieses 1 h in 1 ml 25%igem Ammoniak bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abkühlen auf -70°C wurde die Lösung lyophilisiert und anschließend in 100 µl H₂O aufgenommen. Zur Abtrennung verkürzter Syntheseprodukte wurde die Lösung mit dem gleichen Volumen 2x Formamid-Farbmarker versetzt, 5 min bei 95°C denaturiert und je nach Größe des Oligonukleotides auf ein 8-20%iges, denaturierendes Polyacrylamid-Harnstoff-Gel aufgetragen. Die gelektrophoretische Trennung erfolgte bei einer konstanten Leistung von 30 W, mit 0,5 x TBE als Elektrophoresepuffer. Anschließend wurde das Gel auf eine fluoreszierende Kieselgelplatte gelegt und unter UV-Licht ($\lambda=254$ nm) analysiert. Die DNA-Banden werden als Schatten sichtbar und das gewünschte Oligonukleotid kann auf diese Weise ausgeschnitten werden.

Das Oligonukleotid wurde über Nacht bei 56°C mit 1 M TEAB aus dem Gel eluiert und anschließend über eine Sep-Pak C₁₈ -Kartusche chromatographisch gereinigt. Hierfür wurde die Kartusche nacheinander mit je 5 ml Acetonitril, 10 mM TEAB und 1 M TEAB äquilibriert und nach Auftrag des Oligonukleotid-Eluats und Waschen der Kartusche mit 20 ml 10 mM TEAB wurde das Oligonukleotid mit 3 ml 30% Acetonitril in 10 mM TEAB von der Säule eluiert. Das Eluat wurde lyophilisiert, in 200 µl H₂O aufgenommen und die Konzentration des Oligonukleotids spektrophotometrisch bestimmt.

1M TEAB: eine 1 M Triethylaminlösung (in H₂O) wird mit CO₂ auf pH 7,2 eingestellt

2x Farbmarker 95% Formamid, 50 mM Tris-HCl, pH 8,3,
50 mM Borsäure, 20 mM EDTA, 0,05% Bromphenolblau,
0,05% Xylencyanol in H₂O

6.4.13 Denaturierende Harnstoff-Polyacrylamidgele:

Je nach Größe der aufzutrennenden Oligonukleotide wurden 8-20%ige denaturierende Gele verwendet. Hierzu wurde eine 29:1 Acrylamid-Stammlösung (30%) in 0,5x TBE-Puffer entsprechend verdünnt und mit 7 M Harnstoff versetzt. Für die Polymerisation wurden 1/5000 Vol. TEMED und 1/100 Vol. APS (10%) zugesetzt.

29:1 Acrylamid-Lösung: 29% (w/v) Acrylamid, 1% (w/v) N,N'-Methylenbis-acrylamid in H₂O

5x TBE: 450 mM Tris, pH 8,3, 450 mM Borsäure,
10 mM EDTA in H₂O

6.5 Präparation und Analyse von RNA

Für Arbeiten mit RNA wurden fabrikverpackte Chemikalien und Verbrauchsmaterialien benutzt. Zur Inaktivierung möglicher RNasen wurden Elektrophoresekammern mit H₂O₂ oder aktivem DEPC/DMPC-H₂O behandelt, Glaswaren und Eppendorfreaktionsgefäße wurden für 3 Tage bei 100°C gebacken. H₂O und Lösungen, die keine Amine enthielten, wurden mit 0,1% DEPC oder 0,1% DMPC versetzt und über Nacht gerührt. Das DEPC/DMPC wurde anschließend durch Autoklavieren inaktiviert.

6.5.1 Isolierung von RNA aus Eukaryoten-Zellen

Die Präparation von Gesamtzell-RNA aus eukaryotischen Zellen erfolgte mittels des *peqGold TriFast*-Reagenz (Peqlab) oder des *RNeasy Kits* (Qiagen) jeweils nach Angaben der Hersteller.

6.5.2 RNA-Agarosegelelektrophorese [KROCZEK, 1990]

Einzelsträngige RNA-Moleküle bilden im nativen Zustand Sekundärstrukturen aus, die das Laufverhalten der RNA während der Elektrophorese beeinträchtigen. Daher erfolgt zum einen die Vorbereitung der Proben für den Gelauftrag wie auch die elektrophoretische Auftrennung der RNA unter denaturierenden Bedingungen. Für die Denaturierung der RNA vor der Elektrophorese wurde die RNA mit einem Formaldehyd/Formamid-haltigen Probenpuffer im Verhältnis 5:1 gemischt, 15 min bei 65°C erhitzt und auf Eis abgeschreckt. Die anschließende Auftrennung der RNA erfolgte in 1,3%igen, formaldehydhaltigen Agarosegelen. Hierzu wurden 1,3 g Agarose in 80 ml DEPC-behandeltem H₂O aufgeköcht. Nach Abkühlen der Agarose auf etwa 60°C wurden 10 ml 10x MOPS/EDTA und 3 ml Formaldehyd zugegeben. Nach einem 30minütigen Vorlauf bei 50 V wurden die Proben aufgetragen und bei 80 V über 3-4 Stunden aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 1x MOPS/EDTA.

10x MOPS/EDTA: 0,2 M MOPS, 10 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA pH
7,0 (eingestellt mit Eisessig)

RNA-Probenpuffer: 200 µl 10x MOPS/EDTA, 1 ml Formamid (deionisiert),
345 µl Formaldehyd (37%), 5 µl Ethidiumbromid
(10 mg/ml), 100 µl Formamid-Dye

Formamid-Dye: 0,1% Bromphenolblau, 0,1% Xylenxyanol, 10 mM EDTA

6.5.3 *In vitro* Transkription

Die Herstellung der T7-Transkripte für *in vitro* Transkriptionsanalyse erfolgte über *in vitro* Transkriptionsreaktionen mit T7 RNA-Polymerasen (Roche). Die zu transkribierende Plasmid-DNA („Transkriptions-Matrize“) wurde zuvor mit einem entsprechenden Restriktionsenzym linearisiert, bei Bedarf mit Mung Bean Nuklease behandelt, mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol präzipitiert. Die Vollständigkeit der Linearisierung wurde in der Gelelektrophorese überprüft.

Reaktionsansatz: 1 µg DNA
2 µl 10x Transkriptionspuffer (Roche)
2 µl 10 mM rNTPs

1 μl RNase Inhibitor, 20 U/ μl
2 μl T7 bzw. SP6 RNA-Polymerase, 20 U/ μl
ad 20 μl H₂O, DEPC-behandelt

Die Reaktion wurde für 2 h bei 37°C inkubiert.

Die Transkriptionsreaktionen wurden nachfolgend zur Entfernung der DNA-Matrize mit 2 μl DNase I behandelt (15 min, 37°C). Nach Abstoppen des DNA-Verdaus mit 2 μl 0,2 M EDTA (pH 8,0) wurden die RNA-Transkripte mit 2,5 μl 4M LiCl und 75 μl kaltem, 100 %igen Ethanol gefällt, mit 70%igen Ethanol gewaschen und bis zur Verwendung bei -70°C aufbewahrt. Die Analyse der Transkripte erfolgte in denaturierenden RNA-Agarosegelen.

6.5.3.1 Gewinnung IL-18 und CD40L spezifischer Fragmente

Reverse Transkription

Für die reverse Transkription (RT) wurde pro Ansatz 10 μg Gesamtzell-RNA mit 4,5 pM Primer versetzt und durch fünfminütiges Erhitzen auf 65°C denaturiert. Anschließend wurde der Ansatz 20 min bei 42°C inkubiert, um ein Annealing der Primer zu ermöglichen. Für die Reverse Transkription wurde der Ansatz mit 5 μl 5x RT-Puffer, 2,5 μl dNTPs (40mM) und 20 U RNAsin versetzt und mit H₂O auf 25 μl aufgefüllt. Gestartet wurde die Reaktion bei 42°C durch Zugabe von 20U Reverse Transkriptase. Nach 30 min wurden weitere 20 U Reverse Transkriptase zugesetzt und die Reaktion anschließend durch Hitzeinaktivierung gestoppt.

6.6 Protein-analytische Methoden

6.6.1 Konzentrationsbestimmung

Proteinbestimmungen wurden nach der Methode von BRADFORD (1976) mit dem Proteinassay-Farbreagenz von Bio-Rad nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zu 800 μl Probenvolumen (\leq 25 μg Protein) wurden je 200 μl Farbreagenz zugegeben und sorgfältig vermischt. Nach 10 min wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen und die Proteinkonzentration der Probe durch Vergleich mit zuvor durchgeführten BSA-Standardreihen bestimmt.

6.6.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte durch eine diskontinuierliche SDS-PAGE nach LAEMMLI (1970). Soweit im Text nicht anders vermerkt wurden Trenngelle mit einer Konzentration von 12,5% Acrylamid und Sammelgelle mit 5% Acrylamid verwendet. Vor dem Auftrag wurden die Proben mit 0,25 Volumen 4x SDS-Probenpuffer versetzt und durch 10minütiges Erhitzen auf 95°C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte in Tris-Glycin-Puffer bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA in einer Minigelapparatur.

	<u>Sammelgel</u>	<u>Trenngel</u>
Acrylamid	5%	12,5%
30% Acrylamid	1,67 ml	12,5 ml
1% N,N'-Methylenbisacrylamid	1,30 ml	3,1 ml
1 M Tris-HCl, pH 8,8	-	11,2 ml
1M Tris-HCl, pH 6,8	1,25 ml	-
20% SDS	0,05 ml	0,15 ml
ad H ₂ O	10 ml	30 ml
TEMED	5 µl	10-20 µl
10% Ammoniumpersulfat (APS)	50 µl	400 µl

4x SDS-Probenpuffer: 8% SDS, 20% β-Mercaptoethanol, 20% Glycerin,
0,004% Bromphenolblau, 250 mM Tris-HCl, pH 6,8

Tris-Glycin-Puffer: 192 mM Glycin, 25 mM Tris-OH, 0,1% SDS

6.6.3 Coomassie-Färbung von Proteinen

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden durch Färben mit *Coomassie Brilliant Blue* sichtbar. Hierfür wurde das Gel 1 h in *Coomassie*-Färbelösung geschwenkt und anschließend in Fixierlösung so lange entfärbt, bis der Hintergrund klar und die Proteinbanden deutlich sichtbar waren.

Coomassie-Färbelösung: 0,1% *Coomassie Brilliant Blue*, 10% Essigsäure,
30% Ethanol

Fixierlösung 10% Essigsäure, 30% Ethanol

6.6.4 Silberfärbung von Proteinen

Proteine geringer Konzentration, die durch eine Färbung mit *Coomassie Brilliant Blue* nicht detektiert werden konnten, wurden mit Silber gefärbt. Die Silberfärbung erfolgte mit dem *Bio-Rad Silver Stain Kit* entsprechend den Angaben des Herstellers.

6.6.5 Detektion [³⁵S]-markierter Proteine

Die Detektion von [³⁵S]-markierten Proteinen, die in der SDS-PAGE aufgetrennt wurden, erfolgte über Autoradiographie. Die Gele wurden nach der Elektrophorese für 30 min in Fixierlösung inkubiert, danach für 30 min in En³Hance geschwenkt, anschließend für 2x 10 min gewässert, getrocknet und auf einem Röntgenfilm exponiert.

6.6.6 Western Blot Analyse

Der Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf Nitrozellulose erfolgte nach dem „semi-dry“-Verfahren mit der *Trans-Blot SD*-Apparatur der Firma Bio-Rad. Entsprechend den Angaben des Herstellers wurden Minigele für 30 min bei 10 V in geblottet. Anschließend wurde die Nitrozellulose zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 30 min in TBS mit 3% BSA geschwenkt. Die Inkubation mit dem ersten Antiserum (Verdünnung in TBS-T) erfolgte über Nacht bei 4°C oder für mindestens 2 h bei Raumtemperatur. Nach dem Waschen der Membran für 3x 15 min in TBS-T wurde der zweite, mit Alkalischer Phosphatase (AP) -konjugierter Antikörper (Verdünnung 1:7500 in TBS-T) zugegeben und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für je 15 min in TBS-T wurde die Membran kurz in AP-Puffer geschwenkt und anschließend gefärbt. Die Färbereaktion erfolgte für 5-20 min in 10 ml AP-Puffer mit 66 µl NBT-Stocklösung und 33 µl BCIP-Stocklösung. Die Reaktion wurde durch eine 5minütige Inkubation der

Nitrozellulosemembran in 3%iger TCA-Lösung und anschließendem Schwenken in H₂O abgestoppt.

TBS:	10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl
TBS-T:	20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 500 mM NaCl, 0,05% Tween 20
AP-Puffer:	100 mM Tris-HCl (pH 9,5), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂
NBT-Stocklösung:	50 mg/ml Nitroblue-Tetrazoliumchlorid (NBT) in 70% Dimethylformamid (DMF)
BCIP-Stocklösung:	50 mg/ml 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (BCIP)- Disodiumsalz in 100% DMF

6.6.7 Radioimmunpräzipitations-Analyse

Die hier angewandten Präzipitationsbedingungen sowie die Herstellung der Zellysate richten sich im Wesentlichen nach der von TOMEI, 1993, beschriebenen Methode.

6.6.7.1 Metabolische Proteinmarkierung

Für die metabolische Markierung wurden die Zellen auf Zellkulturschalen (Ø 6 cm) ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80% kultiviert. Nach Entfernung des Normalmediums wurden die Zellen einmal mit Markierungsmedium (Zellkulturmedium ohne Cystein und Methionin) gewaschen und für 1 Stunde darin (1 ml) inkubiert. Die Markierung erfolgte anschließend durch Zugabe von 150 µl *Trans Label* (L-[³⁵S]-Methionin/Cystein-Mix) über Nacht.

Zur Analyse der induzierbaren Proteinexpression wurden die entsprechenden Zellen bereits 30 h vor der metabolischen Markierung in Induktionsmedium kultiviert. Nachfolgend waren allen verwendeten Markierungsmedien die jeweiligen Induktionssubstanzen zugesetzt, so dass die gesamte Induktionszeit der für die metabolische Proteinmarkierung eingesetzten induzierbaren Zellen etwa 48 Stunden betrug.

6.6.7.2 Herstellung der Zellysate

Die über Nacht markierten Zellen wurden in 500 µl IPB mit 1 mM Pefabloc, 1 mM EDTA und 10 mM Dithiothreitol (DTT) von der Zellkulturschale abgelöst und in

sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Die SDS-Konzentration wurde auf 2%, die DTT-Konzentration auf 10 mM eingestellt. Die Proben wurden 3x für 15 s beschallt und schließlich für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Lysate für 10 min auf 95°C erhitzt und auf Eis abgekühlt.

6.6.7.3 Radioimmunpräzipitation

Für die Präzipitation wurden zu je 50 µl Zelllysat 5 µl polyklonales Serum zugegeben, mit IPB auf 100 µl aufgefüllt und über Nacht bei 4°C getaumelt. Für die Präzipitation der Antigen/Antikörper-Komplexe wurden pro Ansatz 10 mg Protein A Sepharose in H₂O gequollen (1 h, 37°C), mehrmals mit IPB gewaschen, in 300 µl IPB aufgenommen und anschließend zum Präzipitationsansatz zugegeben. Die Suspension wurde erneut über Nacht bei 4°C oder für 4 h bei Raumtemperatur (RT) getaumelt. Das Sepharose-Präzipitat wurde schließlich abzentrifugiert (14000 rpm, 10 min, RT), 2x mit je 500 µl 0,5xNDET/0,3% SDS gewaschen, in 25 µl H₂O und 25 µl 4x SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 10 min auf 95°C erhitzt. Nach Zentrifugation (14000 rpm, 10 min) wurde der Überstand mit den gelösten Proteinen in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut für 10 min bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden 20 µl eines Ansatzes in einer SDS-PAGE analysiert. Das Gel wurde für die autoradiographische Detektion der aufgetrennten [³⁵S]-markierten Proteine für je 30 min in Fixierer und En³Hance geschwenkt, gewässert, getrocknet und auf einem Röntgenfilm exponiert.

IPB: 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100

0,5xNDET 0,5% Nonidet P40, 0,2% Natriumdesoxycholsäure, 33 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7,4)

6.7 Bakterielle Expression viraler und porciner Proteine

Zur Expression wurden die rekombinanten pQE-51- oder pGEX-Vektoren in *E.coli* M15 transformiert. Das in diesem Stamm in mehreren Kopien vorhandene Plasmid pREP4 trägt eine Kanamycinresistenz und das für den lac-Repressor kodierende lacI-Gen. Die Möglichkeit den lac-Repressor durch IPTG zu inaktivieren gestattet eine

induzierbare Expression des gewünschten Proteins [Stüber et al 1990]. Transformierte *E.coli* (M15) Bakterien wurden unter Ampicillin-(100 µg/ml) und Kanamycinselektion (25 µg/ml) über Nacht bei 37°C in 250 ml geschüttelt. Am nächsten Tag erfolgte die 1:4 Verdünnung der Übernachtskultur mit antibiotikahaltigem LB-Medium und die Fortsetzung der Inkubation für 30 min bei 37°C. Zur Induktion der Synthese des gewünschten Proteins wurde IPTG bis zu einer Endkonzentration von 0,8 mM zugegeben und weitere 3 h bei 37°C inkubiert.

6.8 Native Aufreinigung rekombinanter Fusionsproteine über Ni²⁺-NTA-Agarose

Die mittels pQE-51- oder pGEX-System bakteriell exprimierten Fusionsproteine wurden nachfolgend nativ über Ni²⁺-NTA-Agarose affinitätschromatographisch gereinigt. Transformierte M15 wurden 3 h nach Induktion pelletiert (5000 rpm, 10 min, 4°C), der Überstand verworfen und das Pellet in 20 ml L1 Puffer resuspendiert. Nach Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von 5 M NaCl bis zu einer Endkonzentration von 1 M und das Schockgefrieren der Suspension in flüssigem Stickstoff. Nach dem Auftauen wurde das Bakterienlysat 3 mal 3 min auf Eis beschallt und anschließend für 45 min bei 17 000 rpm und 4°C (JA-17 Rotor) zentrifugiert. Der lösliche Überstand wurde nachfolgend für die Affinitätschromatographie eingesetzt. Die Ni²⁺-NTA-Säule wurde nach Angaben des Hersteller (Qiagen) mit 2 ml einer 50%igen Ni²⁺-NTA-Agarose-Suspension gepackt. Nach Äquilibrieren der Säule mit L1-Puffer wurde der zuvor mit Puffer L1 1:1 verdünnte Überstand auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde nachfolgend mit 20 ml Waschpuffer gewaschen. Die Durchfluß- und Waschfraktionen wurden getrennt aufgefangen und für die gelelektrophoretische Analyse bei 4°C aufbewahrt. Die Elution der Fusionsproteine erfolgte in 3 Schritten mit je 500 µl Elutionspuffer. Die einzelnen Fraktionen wurden in einer SDS-PAGE auf ihre Reinheit und ihren Proteingehalt überprüft. Produkthaltige Fraktionen wurden bei 4°C gegen PBS dialysiert.

PBS: siehe 6.2.1.1

L1-Puffer:	50 mM Tris-HCl (pH 7,6), 0,1 mM EDTA (pH 8), 20 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM Pefablock, 5 % Glycerin, 1 mg/ml Lysozym
Waschpuffer :	50 mM Tris-HCl (pH 7,6), 0,1 mM EDTA (pH 8), 20 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM Pefablock, 5 % Glycerin, 0,5 M NaCl, 0,03 M Imidazol
Elutionspuffer:	Waschpuffer mit 350 mM Imidazol
Auftrag SDS-PAGE:	Bakterienlysat: 8 μ l ÜL1 12 μ l Durchfluß-/Wasch-/Elutionsfraktionen: je 20 μ l

6.9 Denaturierende Aufreinigung rekombinanter Fusionsproteine über Ni²⁺-NTA-Agarose

Die mittels pQE-51- oder pGEX-System bakteriell exprimierten Fusionsproteine wurden nachfolgend denaturierend über Ni²⁺-NTA-Agarose affinitätschromatographisch gereinigt. Transformierte M15 wurden 3 h nach Induktion pelletiert (5000 rpm, 10 min, 4°C), der Überstand verworfen und das Pellet in 20 ml Puffer A resuspendiert. Nach Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur [Crowe & Henco et al., 1992] wurde das Bakterienlysat 3 mal 3 min beschallt und anschließend für 15 min bei 14 000 rpm und 4°C (JA-17 Rotor) zentrifugiert. Der lösliche Überstand wurde nachfolgend für die Affinitätschromatographie eingesetzt. Die Ni²⁺-NTA-Säule wurde nach Angaben des Hersteller (Qiagen) mit 2 ml einer 50%igen Ni²⁺-NTA-Agarose-Suspension gepackt. Nach Äquilibrieren der Säule mit Puffer A wurde der zuvor mit Puffer A 1:1 verdünnte Überstand auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde nachfolgend mit 10 ml Waschpuffer gewaschen. Die Durchfluß- und Waschfraktionen wurden getrennt aufgefangen und für die gelelektrophoretische Analyse bei 4°C aufbewahrt. Die Elution der Fusionsproteine erfolgte in 3 Schritten mit je 700 μ l Elutionspuffer B, C, D. Die einzelnen Fraktionen wurden in einer SDS-PAGE auf ihre

Reinheit und ihren Proteingehalt überprüft. Produkthaltige Fraktionen wurden bei 4°C gegen PBS dialysiert.

PBS:	siehe 6.2.1.1
Puffer A:	8 M Harnstoff, 0,1 M NaH ₂ PO ₄ , 0,01 M Tris pH 8
Waschpuffer :	8 M Harnstoff, 0,1 M NaH ₂ PO ₄ , 0,01 M Tris pH 6,3
Elutionspuffer B:	8 M Harnstoff, 0,1 M NaH ₂ PO ₄ , 0,01 M Tris pH 5,9
Elutionspuffer C:	8 M Harnstoff, 0,1 M NaH ₂ PO ₄ , 0,01 M Tris pH 4,5
Elutionspuffer D:	6 M GuHCl, 0,2 M HAc
Auftrag SDS-PAGE:	Bakterienlysate: 8 µl Überstand 12 µl Durchfluß-/Wasch-/Elutionsfraktionen: je 20 µl

6.10 Reinigung rekombinater Proteine über Elektroelution

Die mittels pQE- oder pGEX-System bakteriell exprimierte Fusionsproteine deren Affinitätschromatographische Reinigung nicht möglich war, wurden nachfolgend mittels eines Elektroseparationssystems aufgereinigt.

Dazu wurde die Lokalisation des Proteins mittels Western blot oder Vergleichsanalyse (induzierte/nicht induzierte Bakterienkultur) bestimmt und die entsprechende Bande aus einem Coomassie gefärbten SDS-Gel ausgeschnitten. Die im Gel enthaltenen Proteine wurden anschließend mittels einer Biotrap-Apparatur (Schleicher&Schuell) nach den Angaben des Herstellers elektroeluiert. Die gewonnene proteinhaltige Fraktionen wurden bei 4°C gegen PBS dialysiert.

6.11 Virologische Methoden

6.11.1 Virusanzucht

Zur Vermehrung von CSFV wurden STE-Zellen in Suspension mit Virus bei einer MOI von 0,02 bis 0,2 in Kulturgefäßen infiziert. Nach 3 Tagen Inkubation bei 37 °C

wurden die infizierten Zellkulturen bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren, um durch Lyse der Zellen intrazelluläres CSFV freizusetzen. Zur Abtrennung der Zelltrümmer von virushaltigem Überstand wurde das Lysat bei $2000 \times g$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 30 min zentrifugiert. Die Virusernte wurde aliquotiert und bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

6.11.2 Virustitration

Zur Bestimmung der Viruskonzentrationen wurden CSFV-haltige Suspensionen in Kulturmedium über mehrere Stufen titriert und $100\text{ }\mu\text{l}$ auf Flachbodenmikrotiterplatten ausgebracht.

STE-Zellen wurden so auf die Platte gesplittet, dass nach 3-tägiger Inkubation (STE-Medium: 40 % MEM-NEAA, 40 % L-15 10 % TPB 10 % Pferdeserum 100 U/ml Penicillin G 0,1 mg/ml Streptomycinsulfat, $37\text{ }^{\circ}\text{C}/5\text{ }\%$ CO_2) 100 % Konfluenz erreicht war. Nach Inkubation wurde der Zellrasen gewaschen, getrocknet und für 20 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit $100\text{ }\mu\text{l}$ Ethanol pro Vertiefung fixiert. Anschließend wurde die Platte getrocknet und ein anti-E2 monoklonaler Antikörper (mAk a18; 1:40 in PBS) dazugegeben. Nach einer Stunde Inkubation bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde die Platte dreimal gewaschen und ein Peroxidase-konjugierter Ziege-anti-Maus-Antikörper (1:1000 in PBS) zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde die Platte fünfmal gewaschen und AEC Substratlösung mit $0,1\text{ }\mu\text{l}/\text{ml}$ H_2O_2 ($50\text{ }\mu\text{l}/\text{Vertiefung}$) zugegeben. Nach ca. 15-20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde der Zellrasen einmal gewaschen und der Virustiter durch Auszählen der gefärbten Plaques im Mikroskop bestimmt.

6.11.3 Virusnachweis aus Blut, Organen und Nasentupfern

Für den Virusnachweis wurden die Proben wie folgt vorbereitet.

- Blut: 1 ml Vollblut wurde mit 1 ml Lysepuffer (8,29 g NH_4Cl , 1 g KHCO_3 , 0,372 g EDTA ad 1L pH 7,3) versetzt und bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Diese Lösung wurde anschließend für eine Virustitration eingesetzt.
- Nasentupfer: Die Nasentupfer wurden in 1ml PBS resuspendiert, sterilfiltriert und anschließend für die Virustitration eingesetzt.

- Organe: Je 500 mg einer Organprobe wurden in einem sterilen Keramikmörser unter Zusatz von Seesand und 3 ml MEM-Medium verrieben. Abschließend wurde die Suspension für 8 min bei 2000 rpm zentrifugiert um Organreste und Seesand zu pelletieren. Der Überstand wurde abgenommen und mittels eines 22 µm Filters sterilfiltriert. Bis zum Einsatz in einer Virustitration wurden die Proben bei -70 °C eingefroren.

Die Virustitration wurde analog zu 6.11.2 durchgeführt.

6.12 Immunologische Methoden

6.12.1 Gewinnung von Serum

Zur Gewinnung von Serum wurde das Blut bei Raumtemperatur inkubiert bis es geronnen war. Das Fibrin und die Blutzellen wurden durch Zentrifugation bei $2300 \times g$ für 20 min abgetrennt und die Überstände bei -20 °C eingefroren.

6.12.2 Funktionelle Testsysteme

6.12.2.1 Lymphoproliferationstest

PBMC wurden in einer Konzentration von 10^6 Zellen/ml in Lymphozytenkulturmedium resuspendiert und in einer Rundbodenmikrotiterplatte ausplattiert. Die Zellen wurden mit Virus (MOI 1, 0,5, 0,25, 0,125 CSFV Glentorf pro Vertiefung) stimuliert. Nach Inkubation der Zellen für 5 Tage bei 37 °C in 5 % CO_2 wurde 37 kBq ($1\text{ }\mu\text{Ci}$) [^3H]Thymidin pro Vertiefung zugegeben und die Kultur für weitere 18 Stunden inkubiert. Die Mikrotiterplatte wurde eingefroren um den [^3H]Thymidineinbau zu stoppen und die Zellen zu lysieren. Mit Hilfe eines Zellerntegerätes (Cell Harvester) wurde der Inhalt der Mikrotiterplatte auf Filtermatten gesaugt. Nach Trocknen der Filter in einem Mikrowellengerät (160 W, ca. 5 min) wurde die Feststoffszintillatorplatte auf diese Filter aufgeschmolzen. Schließlich konnten die abgekühlten Filter in einen Folienbeutel eingeschweißt und die Menge des eingebauten [^3H]-Thymidins im Szintillationszähler gemessen werden. Alle Experimente wurden als Vierfachbestimmung durchgeführt. Der Stimulationsindex

(SI) berechnete sich als cpm mit Virus stimulierte Mikrokulturen/cpm mit Medium stimulierte Mikrokulturen.

6.12.2.2 Analyse des Einflusses von IL-18 und IL-12 auf die zytolytischen Aktivität natürlicher Killerzellen

Der Aktivitätsnachweis von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) erfolgte mittels der humanen Tumorzelllinie K562, die als Zielzellen eingesetzt wurden. 1×10^6 Tumorzellen wurden für 1 h im Brutschrank mit $100 \mu\text{Ci Na}^{51}\text{CrO}_4$ markiert und anschließend 3 mal mit Medium gewaschen. Jeweils $50 \mu\text{l}$ einer Suspension von 2×10^4 Zellen/ml wurden zu $50 \mu\text{l}$ einer Suspension von 4×10^6 PBMC/ml gegeben. Die il18 und IL-12 enthaltenden Zellkulturüberstände wurden unverdünnt eingesetzt (je $100 \mu\text{l}$). Nach einer kurzen Zentrifugation (5min, 100g) wurde der Ansatz 18 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen sedimentiert (10min, 600g) und die freigesetzte Radioaktivität im Überstand gemessen.

Die Berechnung der spezifischen Lyse erfolgte nach folgender Formel:

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

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

Als Kontrolle diente die Chromfreisetzung mit Medium behandelte Zielzellen, die mit Effektorzellen inkubiert wurden.

6.12.2.3 Nachweis der IL-12 Expression stabiler 293-Zelllinien mittels IFN- γ Produktion nativer PBMC

Zum Nachweis der IL-12 Expression stabiler 293-Zelllinien wurden je 100 μ L Zellkulturüberstände der nativen und IL-12 exprimierenden 293-Zelllinien mit 3×10^6 PBMC für 18 h in MEM-Medium mit 1 μ g/ml Conavalin A inkubiert. Für die Kompetition wurden die Zellkulturüberstände vor Zugabe der PBMC 1:80 mit einem anti IL-12-Antiserum versetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Die Zellkulturüberstände wurden anschließend in einem IFN- γ -ELISA (siehe 6.13.3) analysiert.

6.12.2.4 IFN- γ -ELISPOT-Test

Zu einer Quantifizierung von IFN- γ freisetzenden Zellen wurde der IFN- γ ELISPOT-Test eingesetzt.

Eine Nitrozelluloseplatte wurde mit einem monoklonalen Antikörper gegen porcines IFN- γ (5 μ g/ml in PBS-A; 100 μ l/Vertiefung) über Nacht bei 4 °C beschichtet. Die Vertiefungen wurden mit PBS-A gewaschen und mit 200 μ l Lymphozytenkulturmedium für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. 1×10^6 PBMC/Mikrokultur aus CSFV infizierten Schweinen wurden mit 100 μ l Virussuspension (5×10^4 TCID₅₀ CSFV-Glentorf/Vertiefung) in zwei Parallelansätzen in der mit Antikörper beschichteten Platte inkubiert. Als Kontrollen dienten PBMC, die mit Überstand aus Medium-infizierten Zellen inkubiert wurden. Die Platte wurde für 44-48 Stunden bei 37 °C in 5 % CO₂ inkubiert. Nach Waschen der Platten mit PBS-A erfolgte die Zugabe eines in PBS-A verdünnten anti-IFN- γ -Kaninchenserums (2,5 μ g/ml). Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Platte mit PBS-A gewaschen und ein Peroxidase-gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (1:200 in PBS-A verdünnt) zugegeben. Nach Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur wurden die Vertiefungen mit PBS-A gewaschen. Die Färbung der IFN- γ spezifischen Spots erfolgte durch Zugabe von 3,3'-Diaminobenzidine (DAB). Nach 4-7 min wurde die Reaktion durch Waschen mit PBS-A und dH₂O gestoppt. Die Platten wurden anschließend über Nacht getrocknet und die Spots mit einem Stereomikroskop ausgezählt.

6.12.3 Nichtfunktionelle Testsysteme

6.12.3.1 CSFV spezifischer Kompetitions-ELISA

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

6.12.3.2 IgG1/IgG2-isotypspezifischer ELISA

Für den Nachweis von IgG1 und IgG2 CSFV spezifischen Antikörpern in *porcinen* Seren wurde ein isotypspezifischer ELISA verwendet.

Zunächst wurde eine Flachbodenmikrotiterplatte (Nunc Immuno Plate) über Nacht mit einem CSFV-E2 Glycoprotein (300 ng/Vertiefung) beschichtet. Anschließend wurde die Platte 4 mal mit einer PBS-Tween-Lösung (PBS mit 0,1 % Tween) gewaschen und die Seren in Verdünnungen von 0, 1:50 und 1:100 in PBS-Tween mit 3 % BSA aufgetragen. Nach 1stündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde 4 mal mit PBS-Tween-Lösung gewaschen und die Platte mit einem Maus-anti-Schwein-IgG1 bzw. IgG2 Antikörper inkubiert (IgG1 1:200, IgG2 1:500, in PBS-Tween mit 3 % BSA). Nach Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur wurde die Platte erneut 4 mal mit PBS-Tween-Lösung gewaschen, mit einem anti-Maus-Peroxidase konjugierten Antikörper (1:1000 in PBS-Tween mit 3 % BSA) versetzt und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 4 weiteren Waschschrritten wurde eine Substratlösung zugegeben. Als Substrat diente in Citratpuffer gelöstes Othophenylendiamin (OPD), das mit 1µl/5ml H₂O₂ versetzt wurde. Die Umsetzung des Substrates durch die Peroxidase des Konjugates in Form einer Farbreaktion erfolgte bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach ca.15 min wurde die Reaktion mit 2 M H₂SO₄ gestoppt. Die Bestimmung der OD-Werte erfolgte mit Hilfe eines ELISA-Readers (Titertek) bei einer Wellenlänge von 492 nm.

6.12.3.3 IFN-γ ELISA

Zum Nachweis von IFN-γ im Zellkulturüberstand wurde ein Enzymimmuntest (swine-IFN-γ-Cyto-Set) verwendet. Der Test wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

6.12.3.4 Serumneutralisationstest

Für die Bestimmung der Titer, der im Serum enthaltenen neutralisierenden Antikörper wurde das Serum in log-2 Stufen in Flachbodenmikrotiterplatte verdünnt (je 50 µl) und je 100 KID₅₀/ 50 µl CSFV (Stamm Alfort) zugegeben. Nach 1 stündiger Inkubation bei 37 °C wurde 100 µl einer STE-Zellsuspension zugegeben, so dass nach 3 Tagen eine Konfluenz von 100 % erreicht war. Als Kontrollen wurden STE-Zellen ohne Virus bzw. ein Serum mit bekanntem Titer mitgeführt und der Titer des eingesetzten Virus bestimmt.

Die nach 3 Tagen durchgeführte Fixierung und Färbung der Reaktion wurde analog zu 6.11.2 durchgeführt.

6.12.4 Immunfluoreszenzanalyse

6.12.4.1 Oberflächenfluoreszenzanalyse

Zur Oberflächenfluoreszenzanalyse wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend für 5 min mit 100 % ETOH fixiert. Nach 3maligem Waschen wurden die Zellen mit einem monoclonalen Ab versetzt und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut 3 mal mit PBS gewaschen und mit einem fluorescein-isothiocyanate (FITC)-konjugierten Zweitantikörper versetzt. Nach 1 stündiger Inkubation wurden die Zellen 3 mal mit PBS gewaschen und mit DABCO-Fluoreszenzerhaltungspuffer überschichtet.

Die Fluoreszenz der Zellen wurde unter einem Fluoreszenzmikroskop analysiert

6.12.4.2 Cytoplasmatische Fluoreszenzanalyse

Für die Analyse der cytoplasmatischen Expression wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend für 20 min mit 3 % Paraformaldehyd mit 0,2 % Triton-X fixiert. Alle weiteren Schritte erfolgten analog zu 6.13.5.1.

6.12.4.3 Charakterisierung von Leukozytenpopulationen mit Hilfe der Durchflußzytometrie

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

Immunfluoreszenzmarkierung von Zellen

Um den Phänotyp von B-Zellen zu charakterisieren wurde eine Dreifarbenimmunfluoreszenz durchgeführt. 100 µl Vollblut wurden nach folgendem Protokoll markiert:

1. Inkubation mit jeweils 50 µl anti swine-CD21 Antikörper (mAk)
2. Inkubation mit jeweils 50 µl von folgendem isotypspezifischen Antikörpern: goat-anti maus α IgG₁-PE

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

Durchflußzytometrische Analysen

Die fluoreszenzmarkierten Zellen wurden mit einem Durchflußzytometer, das mit einem Argon- und Helium-Neon-Laser ausgerüstet war, analysiert. Streulicht- und Fluoreszenzsignale einzelner Zellen wurden mit Hilfe spezifischer Detektoren gemessen. Die Streulichtparameter enthalten das Vorwärtsstreulicht und das Seitwärtsstreulicht. Das Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) definiert Zellpopulationen aufgrund ihrer Größe. Das Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC)

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

6.12.5 Infektionsversuche

- Überprüfung der Wirksamkeit der Belastunginfektion

5 Schweine (Deutsche Landrasse) wurden intramuskulär mit je 1 mg Plasmid-DNA immunisiert und anschließend intramuskulär (i.m.) und intranasal mit $2 \times 10^{5,5}$ TCID₅₀ CSFV (Stamm Eystrup) infiziert. Plasma bzw. Serum und Blutproben wurden vor Infektion und zu bestimmten Zeitpunkten nach der Infektion entnommen.

6.12.6 Immunisierungsversuche

28 Schweine (Deutsche Landrasse) wurden intramuskulär (i.m.) mit je 1 mg Plasmid-DNA immunisiert. Die Tiere wurden 2 mal im Abstand von 22 Tagen, mit je 1 mg Plasmid-DNA, *geboosted* und nach weiteren 22 Tagen einer Belastungsinfektion mit $2 \times 10^{5,5}$ TCID₅₀ CSFV (Stamm Eystrup) unterzogen. Plasma bzw. Serum und Blutproben wurden vor Infektion und zu bestimmten Zeitpunkten nach der Infektion entnommen.

7 ANHANG

7.1 Nukleotid- und Aminosäuresequenz der isolierten porcinen CD40L-cDNA

Abgebildet ist die über RT-PCR mit den Primern CD40L-iso.seq und CD40L-iso.rev amplifizierte CD40L-cDNA-Sequenz sowie deren abgeleitete Aminosäuresequenz. Die potentielle Glykosylierungsstelle ist unterstrichen und die Signal-Anker-Sequenz **fett** gekennzeichnet.

```

          10              30              50
ATGATCGAAACATACAGCCAACCTTCGCCCCGCTCTGTGGCCGCTGGACCACCCGTCAGT
M I E T Y S Q P S P R S V A A G P P V S

          70              90              110
ATGAAAATCTTTATGTATTTACTTACTGTTTTTCTTATCACCCAGATGATTGGGTCAGCA
M K I F M Y L L T V F L I T Q M I G S A

          130              150              170
CTTTTTGCAGTGTACCTTCACAGAAGATTGGACAAGATAGAAGATGAAAGGAATCTTCAT
L F A V Y L H R R L D K I E D E R N L H

          190              210              230
GAAGATTTTGTGTTTCATAAAAACGATACAGAGATGCAAGCAAGGAGAGGGGTCCTTATCC
E D F V F I K T I Q R C K Q G E G S L S

          250              270              290
TTATTGAAGTGTGAGGAAATCAGAAGCCAGTTTGAAGACCTGGTCAAGGGTATAATGCAA
L L N C E E I R S Q F E D L V K G I M Q

          310              330              350
AGCAAAGAAGTGAAGAAGAAAGAAAAAGCTTTGAAATGCACAAAGGCGATCAGGATCCT
S K E V K K K E K S F E M H K G D Q D P

          370              390              410
CAAATGCGGCACATGTCATAAGCGAGGCCAGTAGTAAAACAGCATCTGTCCTGCAGTGG
Q I A A H V I S E A S S K T A S V L Q W

          430              450              470
GCCCCAAAGGGTACTACACCCTCAGCACCAACTTGGTGACCCTGGAAAACGGGAGACAG
A P K G Y Y T L S T N L V T L E N G R Q

          490              510              530
CTGGCCGTCAAAGACAAGGAATCTATTACATCTACGCCCAAGTCACCTTCTGCTCCAAC
L A V K R Q G I Y Y I Y A Q V T F C S N

          550              570              590
CGGGACGCCGGGTCAAGCTCCCTTCATAGCCAGCCTCTGCCTGAGGTCCCCAAGCGGG
R D A A G Q A P F I A S L C L R S P S G
    
```

ANHANG

```

        610                630                650
TCGGAGAGAATCTTACTCCGCGCGGCCAACACCCACAGTTCCTCCAAGCCCTGCGGGCAG
S E R I L L R A A N T H S S S K P C G Q

        670                690                710
CAATCCATTCACTTGGGCGGAGTCTTCGAGTTGCAACCCGGCGCTTCGGTGTTCGTCAAC
Q S I H L G G V F E L Q P G A S V F V N

        730                750                770
GTGACTGATCCAAGCCAAGTGAGCCACGGGACCGCTTCACGTCTTTGGCTTACTCAA
V T D P S Q V S H G T G F T S F G L L K

CTCTGA
L *
```

7.2 Aminosäuresequenzvergleich der verschiedenen CD40-Liganden

Dargestellt ist die porcine CD40L-Aminosäuresequenz, verglichen mit den Sequenzen für bovinen (Z48469), felines (AF079105), caninen (AF086711), humanen (L07414) und murinen (X65453) CD40L. Zur porcinen Sequenz identische Aminosäuren sind durch (-) gekennzeichnet.

	10	30	50	70
Schwein	MIETYSQPSRVAAGPPVSMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFIKTIQ			
Rind	-----T-----			-----M-----
Katze	-----TA-----P-----			-----Y-----M--L-
Hund	-----TA-----T-----			-----Y-----M--L-
Mensch	-----N-T-----A-T-L-I-----			-----M-----
Maus	-----T-L-A-----		-----V-----	-----V-E-V-----KLK
	90	110	130	
	RCKQEGESLSLLNCEEIRSQFEDLVKIGIMQSKEVKKKEKSFEMHKGDPQIAAHVISEASSKTASVLQW			
	--NK-----R-----D--N-----N-----E-----T-----			
	K-NK---A-----K-R--AFL-E--LN--T.---NVA-Q-----RV-----S-----			
	K-NK-----K---AFL-E--LNN-M.---ENIA-Q-----R-----NP---R-			
	--NT--R-----K---GF--D--LN--ET--N---Q---N-----T-----			
	--NK-----M-R-----D-TLN--E.---N---QR--E-----V--N-NA-----			
	150	170	190	210
	APKGYTTLSTNLVTLNENGRQLAVKRQGIYYIYAQVTFCSNRDAAGQAPFIASLCLRSPSGSERILLRAAN			
	-----N-----K-----F---T-----ETLS-----K-----			
	-----I-S-----K-----L-----E-SS-----H-----V-----			
	-----I-S---S---K-----L--V-----A-SS---V---H---T--V---S			
	-E-----M-N-----K--T-----L-----E-SS-----K--GRF-----			
	-K-----MKS---M---K--T---E-L--V-T-----EPSS-R---VG-W-KPSI-----K---			
	230	250		
	THSSSKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVTDPSQVSHGTGFTSFGLLKL*			
	-----S-----*			
	AR-----H-----*			
	SRG-----H-----*			
	-----A-----*			
	-----QL-E---V-----A-----EA---I-RV--S-----*			

8 LITERATUR

Akahata, W., Ido, E., Shimada, T., Katsuyama, K., Yamamoto, H., Uesaka, H., Ui, M., Kuwata, T., Takahashi, H., Hayami, M. (2000). DNA vaccination of macaques by a full genome HIV-1 plasmid which produces noninfectious virus particles. *Virology* **15**, 116-124

Andrew, M.E., Morrissy, C.J., Lenghaus, C., Oke, P.G., Sproat, K.W., Hodgson, A.L.M., Johnson, M.A., Coupar, B.E.H. (2000). Protection of pigs against classical swine fever with DNA-delivered gp55. *Vaccine* **18**, 1932-1938.

Armengol, E., (2001). Identifizierung von B- und T-Zell-Epitopen des klassischen Schweinepestvirus mittels synthetischer Peptide. Dissertation Fakultät für Chemie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

Armitage, R.J., Fanslow, W.C., Strockbine, L., Sato, T.A., Clifford, K.N., Macduff, B.M., Anderson, D.M., Gimpel, S.D., Davis-Smith, T., Maliszewski, C.R. (1992). Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature* **357**, 80-82.

Aruffo, A., Farrington, M., Hollenbaugh, D., Li, X., Milatovich, A., Nonoyama, S., Bajorath, J., Grosmaire, L.S., Stenkamp, R., Neubauer, M. (1993). The CD40 ligand, gp39, is defective in activated T cells from patients with X-linked hyper-IgM syndrome. *Cell* **72**, 291-300.

Banchereau, J., Briere, F., Liu, Y.J., Rousset, F. (1994). Molecular control of B lymphocyte growth and differentiation. *Stem Cells* **12**, 278-288.

Banchereau, J., Bazan, F., Blanchard, D., Briere, F., Galizzi, J.P., van Kooten, C., Liu, Y.J., Rousset, F., Saeland, S. (1994/i). The CD40 antigen and its ligand. *Annu Re. Immuno.* **12**, 881-922.

Bazan, J. F. & Fletterick, R. J. (1989). Detection of a trypsin-like serine protease domain in flaviviruses and pestiviruses. *Virology* **171**, 637-639.

Bellone, G., Trinchieri, G. (1994). Dual stimulatory and inhibitory effect of NK cell stimulatory factor/IL-12 on human hematopoiesis. *J Immunol* **153**, 930-937.

Berger, N. (2001). Hepatitis C Virus: Expression und Charakterisierung der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase *in vitro* und in einem zellulären Replikations-Testsystem. Dissertation der Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

- Birnboim, H.C., Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-1523.
- Böhm, W., Mertens, T., Schirmbeck, R., Reimann, J. (1998).** Routes of plasmid DNA vaccination that prime murine humoral and cellular immune responses. *Vaccine* **16**, 949-954.
- Boretti, F.S., Leutenegger, C.M., Mislin, C., Hofmann-Lehmann, R., König, S., Schroff, M., Junghans, C., Fehr, D., Huettner, S.W., Habel, A., Flynn, J.N., Aubert, A., Pedersen, N.C., Wittig, B., Lutz, H. (2000).** Protection against FIV challenge infection by genetic vaccination using minimalistic DNA constructs for FIV env gene and feline IL-12 expression. *AIDS* **14**, 1749-1757.
- Bouma, A., de Smit, A.J., de Kluijver, E.P., Terpstra, C., Moormann, R.J. (1999).** Efficacy and stability of a subunit vaccine based on glycoprotein E2 of classical swine fever virus. *Vet Microbiol* **66**, 101-114.
- Boyle, J.S., Brady, J.L., Lew, A.M. (1998).** Enhanced responses to a DNA vaccine encoding a fusion antigen that is directed to sites of immune induction. *Nature* **392**, 408-411.
- Bradford, M.M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Buchanan, J.M., Vogel, L.A., Van Cleave, V.H., Metzger, D.W. (1995).** Interleukin 12 alters the isotype-restricted antibody response of mice to hen eggwhite lysozyme. *Int Immunol* **7**, 1519-1528.
- Csernok, E., Ernst, M., Schmitt, W., Bainton, D.F., Gross, W.L. (1994).** Activated neutrophils express proteinase 3 on their plasma membrane in vitro and in vivo. *Clin Exp Immunol* **95**, 244-250.
- Chambers, M.A., Vordermeier, H., Whelan, A., Commander, N., Tascon, R., Lowrie, D., Hewinson, R.G. (2000).** Vaccination of mice and cattle with plasmid DNA encoding the Mycobacterium bovis antigen MPB83. *Clin Infect Dis* **3**, 283-287.
- Chen, G.F., Inouye, M. (1990).** Suppression of the negative effect of minor arginine codons on gene expression; preferential usage of minor codons within the first 25 codons of the Escherichia coli genes. *Nucleic Acids Res* **18**, 1465-1473.
- Chen, S.C., Jones, D.H., Fynan, E.F., Farrar, G.H., Clegg, J.C. (1998).** Protective immunity induced by oral immunization with a rotavirus DNA vaccine encapsulated in microparticles. *J Virol* **72**, 5757-5761.

Chouaib, S., Chehimi, J., Bani, L., Genetet, N., Tursz, T., Gay, F., Trinchieri, G., Mami-Chouaib, F. (1994). Interleukin 12 induces the differentiation of major histocompatibility complex class I-primed cytotoxic T-lymphocyte precursors into allospecific cytotoxic effectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 12659-12663.

Clark, E.A. (1990). CD40: a Zytokine receptor in search of a ligand. *Tissue Antigens* **36**, 33-36.

Clarke, N.J., Hissey, P., Buchan, K., Harris, S. (1997). PPV: a novel IRES-containing vector to facilitate plasmid immunization and antibody response characterization. *Immunotechnology* **3**, 145-153.

Clarke, S.R. (2000). The critical role of CD40/CD40L in the CD4-dependent generation of CD8+ T cell immunity. *J Leukoc Biol* **67**, 607-614.

Collett, M. S., Larson, R., Belzer, S. K & Retzel, E. (1988 b). Proteins encoded by bovine viral diarrhea virus: the genomic organization of a pestivirus. *Virology* **165**, 200-208.

Conti, B., Jahng, J.W., Tinti, C., Son, J.H., Joh, T.H. (1997). Induction of interferon-gamma inducing factor in the adrenal cortex. *J Biol Chem* **272**, 2035-2037.

Conti, B., Park, L.C., Calingasan, N.Y., Kim, Y., Kim, H., Bae, Y., Gibson, G.E., Joh, T.H. (1999). Cultures of astrocytes and microglia express interleukin 18. *Brain Res Mol Brain Res* **67**, 46-52.

Conti, B., Sugama, S., Kim, Y., Tinti, C., Kim, H., Baker, H., Volpe, B., Attardi, B., Joh, T. (2000). Modulation of IL-18 production in the adrenal cortex following acute ACTH or chronic corticosterone treatment. *Neuroimmunomodulation* **8**, 1-7.

Cortese, V.S., West, K.H., Hassard, L.E., Carman, S., Ellis, J.A. (1998). Clinical and immunologic responses of vaccinated and unvaccinated calves to infection with a virulent type-II isolate of bovine viral diarrhea virus. *J Am Vet Med Assoc* **213**, 1312-1319.

Cosman, D., (1987). Control of messenger RNA stability. *Immunol Today* **8**, 16-18.

Crowe, J., Henco, K. (1992). The QIAexpressionist-2nd ed. Qiagen GmbH, Hilden Germany

Dahle J, Liess B. (1992). A review on classical swine fever infections in pigs: epizootiology, clinical disease and pathology. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **15**, 203-211.

- D'Andreas, A., Rengaraju, M., Valiante, N.M., Chehimi, J., Kubin, M., Aste, M., Chan, S.H., Kobayashi, M., Young, D., Nickbarg, E. (1985).** Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. *J Exp Med* **176**, 1387-1398.
- Davis, H.L., Mancini, M., Michel, M.L., Whalen, R.G. (1996)** DNA-mediated immunization to hepatitis B surface antigen: longevity of primary response and effect of boost. *Vaccine* **14**, 910-915.
- Dao, T., Mehal, W.Z., Crispe, I.N. (1998).** IL-18 augments perforin-dependent cytotoxicity of liver NK-T cells. *J Immunol* **161**, 2217-2222.
- Davis, H.L., Wahlen, R.G., Demeneix, B.A. (1993).** Direct gene transfer into skeletal muscle in vivo: factors affecting efficiency of transfer and stability of expression. *Hum Gene Ther* **4**, 151-159.
- Davis, H.L., McCluskie, M.J., Gerin, J.L., Purcell, R.H. (1996).** DNA vaccine for hepatitis B: evidence for immunogenicity in chimpanzees and comparison with other vaccines. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 7213-7218.
- DeFranco, A.L., (1997).** B lymphocyte activation. *Fundamental immunology*. Raven Press, New York, NY p.505-529.
- DeKruyff, R.H., Fang, Y., Wolf, S.F., Umetsu, D.T. (1995).** IL-12 inhibits IL-4 synthesis in keyhole limpet hemocyanin-primed CD4+ T cells through an effect on antigen-presenting cells. *J Immunol* **154**, 2578-2587.
- Denham, S., Shimizu, M., Bianchi, A.T., Zwart, R.J., Carr, M.M., Parkhouse, R.M. (1994).** Monoclonal antibodies recognising differentiation antigens on porcine B cells. *Vet Immunol Immunopathol* **43**, 259-267.
- Denham, S., Zwart, R.J., Whittall, J.T., Pampusch, M., Corteyn, A.H., Bianchi, A.T., Murtaugh, M.P., Parkhouse, R.M., Tlaskalova, H., Sinkora, J., Sinkora, M., Rehakova, Z. (1998).** Monoclonal antibodies putatively identifying porcine B cells. *Vet Immunol Immunopathol* **60**, 317-328.
- de Smit, A.J., Bouma, A., de Kluijver, E.P., Terpstra, C., Moormann, R.J. (2000).** Prevention of transplacental transmission of moderate-virulent classical swine fever virus after single or double vaccination with an E2 subunit vaccine. *Vet Q* **22**, 150-153.
- Dewulf, J., Laevens, H., Koenen, F., Mintiens, K., de Kruif, A. (2001).** An E2 subunit marker vaccine does not prevent horizontal or vertical transmission of classical swine fever virus. *Vaccine* **20**, 86-91.

Dow, S.W., Fradkin, L.G., Liggitt, D.H., Willson, A.P., Heath, T.D., Potter, T.A. (1999). Lipid-DNA complexes induce potent activation of innate immune responses and antitumor activity when administered intravenously. *J Immunol* **163**, 1552-1561.

Dupre, L., Kremer, L., Wolowczuk, I., Riveau, G., Capron, A., Loch, C. (2001). Immunostimulatory effect of IL-18-encoding plasmid in DNA vaccination against murine *Schistosoma mansoni* infection. *Vaccine* **19**, 1373-1380.

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

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

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

Fantuzzi, G., Dinarello, C.A. (1999). Interleukin-18 and interleukin-1 beta: two cytokine substrates for ICE (caspase-1). *J Clin Immunol* **19**, 1-11.

Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. (1996) Virology (Third Edition) Volume 1 S. 1059-1073

Forns X, Payette, P.J., Ma, X., Satterfield, W., Eder, G., Mushahwar, I.K., Govindarajan, S., Davis, H.L., Emerson, S.U., Purcell, R.H., Bukh, J. (2000). Vaccination of chimpanzees with plasmid DNA encoding the hepatitis C virus (HCV) envelope E2 protein modified the infection after challenge with homologous monoclonal HCV. *Hepatology* **32**, 618-625.

Foss, D.L., Murtaugh, M.P. (1997). Molecular cloning and mRNA expression of porcine interleukin-12. *Vet Immunol Immunopathol* **57**, 121-134.

Fournout, S., Dozois, C.M., Yerle, M., Pinton, P., Fairbrother, J.M., Oswald, E., Oswald, I.P. (2000). Cloning, chromosomal location, and tissue expression of the gene for pig interleukin-18. *Immunogenetics* **51**, 358-365.

Foy, T.M., Aruffo, A., Bajorath, J., Buhlmann, J.E., Noelle, R.J. (1996). Immune regulation by CD40 and its ligand GP39. *Annu Rev Immunol* **14**, 591-617.

Gately, M.K., Wolitzky, A.G., Quinn, P.M., Chizzonite, R. (1992). Regulation of human cytolytic lymphocyte responses by interleukin-12. *Cell Immunol* **143**, 127-142.

Gately, M.K., Warriar, R.R., Honasoge, S., Carvajal, D.M., Faherty, D.A., Connaughton, S.E., Anderson, T.D., Sarmiento, U., Hubbard, B.R., Murphy, M. (1994). Administration of recombinant IL-12 to normal mice enhances cytolytic lymphocyte activity and induces production of IFN-gamma in vivo. *Int Immunol* **6**, 157-167.

Gately, M.K., Carvajal, D.M., Connaughton, S.E., Gillessen, S., Warriar, R.R., Kolinsky, K.D., Wilkinson, V.L., Dwyer, C.M., Higgins, G.F. Jr., Podlaski, F.J., Faherty, D.A., Familletti, P.C., Stern, A.S., Presky, D.H. (1996). Interleukin-12 antagonist activity of mouse interleukin-12 p40 homodimer in vitro and in vivo. *Ann N Y Acad Sci* **795**, 1-12.

Gauchat, J.F., Aubry, J.P., Mazzei, G., Life, P., Jomotte, T., Elson, G., Bonnefoy, J.Y. (1993). Human CD40-ligand: molecular cloning, cellular distribution and regulation of expression by factors controlling IgE production. *FEBS Lett* **315**, 259-266.

Germann, T., Bongartz, M., Dlugonska, H., Hess, H., Schmitt, E., Kolbe, L., Kolsch, E., Podlaski, F.J., Gately, M.K., Rude, E. (1995). Interleukin-12 profoundly up-regulates the synthesis of antigen-specific complement-fixing IgG2a, IgG2b and IgG3 antibody subclasses in vivo. *Eur J Immunol* **25**, 823-829.

Ghayur, T., Banerjee, S., Hugunin, M., Butler, D., Herzog, L., Carter, A., Quintal, L., Sekut, L., Talanian, R., Paskind, M., Wong, W., Kamen, R., Tracey, D., Allen, H. (1997). Caspase-1 processes IFN-gamma-inducing factor and regulates LPS-induced IFN-gamma production. *Nature* **386**, 619-623.

Gillessen, S., Carvajal, D., Ling, P., Podlaski, F.J., Stremlo, D.L., Familletti, P.C., Gubler, U., Presky, D.H., Stern, A.S., Gately, M.K. (1995). Mouse interleukin-12 (IL-12) p40 homodimer: a potent IL-12 antagonist. *Eur J Immunol* **25**, 200-206.

Goldman, C.K., Soroceanu, L., Smith, N., Gillespie, G.Y., Shaw, W. (1997). In vitro and in vivo gene delivery mediated by a synthetic polycationic amino polymer. *Nature Biotechnol* **15**, 462-466.

Goldshmidt, O., Zcharia, E., Aingorn, H., Guatta-Rangini, Z., Atzmon, R., Michal, I., Pecker, I., Mitrani, E., Vlodaysky, I. (2001). Expression pattern and secretion of human and chicken heparanase are determined by their signal peptide sequence. *J Biol Chem* **276**, 29178-29187.

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

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

Gu, Y., Kuida, K., Tsutsui, H., Ku, G., Hsiao, K., Fleming, M.A., Hayashi, N., Higashino, K., Okamura, H., Nakanishi, K., Kurimoto, M., Tanimoto, T., Flavell, R.A., Sato, V., Harding, M.W., Livingston, D.J., Su, M.S. (1997). Activation of interferon-gamma inducing factor mediated by interleukin-1beta converting enzyme. *Science* **275**, 206-209.

Gubler, U., Chua, A.O., Schoenhaut, D.S., Dwyer, C.M., McComas, W., Motyka, R., Nabavi, N., Wolitzky, A.G., Quinn, P.M., Familletti, P.C. (1991). Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor. *Proc Natl Acad Sci* **88**, 4143-4147.

Gurunathan, S., Sacks, D.L., Brown, D.R., Reiner, S.L., Charest, H., Glaichenhaus, N., Seder, R.A. (1997). Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with *Leishmania major*. *J Exp Med* **186**, 1137-1147.

Gurunathan, S., Irvine, K.R., Wu, C.Y., Cohen, J.I., Thomas, E., Prussin, C., Restifo, N.P., Seder, R.A. (1998). CD40 ligand/trimer DNA enhances both humoral and cellular immune responses and induces protective immunity to infectious and tumor challenge. *J Immunol* **161**, 4563-4571.

Hahn, J., Park, S.H., Song, J.Y., An, S.H., Ahn, B.Y. (2001). Construction of recombinant swinepox viruses and expression of the classical swine fever virus E2 protein. *J Virol Methods* **93**, 49-56.

Hammond, J.M., McCoy, R.J., Jansen, E.S., Morrissy, C.J., Hodgson, A.L., Johnson, M.A. (2000). 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* **18**, 1040-1050.

Hammond, J.M., Jansen, E.S., Morrissy, C.J., Goff, V.W., Meehan, C.G., Lenghaus, W.C., Sproat, K.W., Andrew, M.E., Coupar B.E.H., Johnson, M.A. (2001). A prime-boost vaccination strategy using naked DNA followed by recombinant porcine adenovirus protects pigs from classical swine fever. *Veterinary Microbiology* **80**, 101-119.

Hara, I., Nagai, H., Miyake, H., Yamanaka, K., Hara, S., Micallef, M.J., Kurimoto, M., Gohji, K., Arakawa, S., Ichihashi, M., Kamidono, S. (2000). Effectiveness of cancer vaccine therapy using cells transduced with the interleukin-12 gene combined with systemic interleukin-18 administration. *Cancer Gene Ther* **7**, 83-90.

- Harkness, J. W. & Roeder, P. L. (1988).** The comparative biology of classical swine fever virus. In: Liess, B. (ed.): Classical swine fever and related viral infections. Martinus Nijhoff Publishing, Boston, Dordrecht, Lancaster. pp 233-288.
- Harpin, S., Hurley, D.J., Mbikay, M., Talbot, B., Elazhary, Y. (1999).** Vaccination of cattle with a DNA plasmid encoding the bovine viral diarrhoea virus major glycoprotein E2. *J Gen Virol* **80**, 3137-3144.
- Heinzel, F.P., Hujer, A.M., Ahmed, F.N., Rerko, R.M. (1997).** In vivo production and function of IL-12 p40 homodimers. *J Immunol* **158**, 4381-4388.
- Hirayama, F., Katayama, N., Neben, S., Donaldson, D., Nickbarg, E.B., Clark, S.C., Ogawa, M. (1994).** Synergistic interaction between interleukin-12 and steel factor in support of proliferation of murine lymphohematopoietic progenitors in culture. *Blood* **83**, 92-98.
- Hofstra, C.L., Van Ark, I., Hofman, G., Kool, M., Nijkamp, F.P., Van Oosterhout, A.J. (1998).** Prevention of Th2-like cell responses by coadministration of IL-12 and IL-18 is associated with inhibition of antigen-induced airway hyperresponsiveness, eosinophilia, and serum IgE levels. *J Immunol* **161**, 5054-5060.
- Hornef, M.W., Noll, A., Schirmbeck, R., Reimann, J., Autenrieth, I.B. (2000).** DNA vaccination using coexpression of Zytokine genes with a bacterial gene encoding a 60-kDa heat shock protein. *Med Microbiol Immunol* **189**, 97-104.
- Hoshino, T., Yagita, H., Ortaldo, J.R., Wiltrout, R.H., Young, H.A. (2000).** In vivo administration of IL-18 can induce IgE production through Th2 Zytokine induction and up-regulation of CD40 ligand (CD154) expression on CD4+ T cells. *Eur J Immunol* **30**, 1998-2006.
- Hsieh, C.S., Macatonia, S.E., Tripp, C.S., Wolf, S.F., O'Garra, A., Murphy, K.M. (1993).** Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* **260**, 547-549.
- Hsu, C.H., Chua, K.Y., Tao, M.H., Lai, Y.L., Wu, H.D., Huang, S.K., Hsieh, K.H. (1996).** Immunoprophylaxis of allergen-induced immunoglobulin E synthesis and airway hyperresponsiveness in vivo by genetic immunization. *Nat Med* **2**, 540-544.
- Ihata, A., Watabe, S., Sasaki, S., Shirai, A., Fukushima, J., Hamajima, K., Inoue, J., Okuda, K. (1999).** Immunomodulatory effect of a plasmid expressing CD40 ligand on DNA vaccination against human immunodeficiency virus type-1. *Immunology* **98**, 436-442.
- Inchauspe, G. (1997).** Gene vaccination for hepatitis C. *Springer Semin Immunopathol* **19**, 211-221.

Iwasaki, A., Barber, B.H. (1998). Induction by DNA immunization of a protective antitumor cytotoxic T lymphocyte response against a minimal-epitope-expressing tumor. *Cancer Immuno. Immunother* **45**, 273-279.

Jacobsen, S.E., Veiby, O.P., Smeland, EB. (1993). Cytotoxic lymphocyte maturation factor (interleukin 12) is a synergistic growth factor for hematopoietic stem cells. *J Exp Med* **178**, 413-418.

Johanning, F.W., Conry, R.M., LoBuglio, A.F., Wright, M., Sumerel, L.A. (1995). A Sindbis virus mRNA polynucleotide vector achieves prolonged and high level heterologous gene expression in vivo. *Nucleic Acids Res* **23**, 1495-1501.

Jyothi, M.D., Khar, A. (2000). Regulation of CD40L expression on natural killer cells by interleukin-12 and interferon gamma: its role in the elicitation of an effective antitumor immune response. *Cancer Immunol Immunother* **49**, 563-572.

Kanda, T., Tanaka, T., Sekiguchi, K., Seta, Y., Kurimoto, M., Wilson McManus, J.E., Nagai, R., Yang, D., McManus, B.M., Kobayashi, I. (2000). Effect of interleukin-18 on viral myocarditis: enhancement of interferon- gamma and natural killer cell activity. *J Mol Cell Cardiol* **32**, 2163-2171.

Kane, J.F. (1995). Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in Escherichia coli. *Curr Opin Biotechnol* **6**, 494-500.

Kaneko, H., Bednarek, I., Wierzbicki, A., Kiszka, I., Dmochowski, M., Wasik, T.J., Kaneko, Y., Kozbor, D. (2000). Oral DNA vaccination promotes mucosal and systemic immune responses to HIV envelope glycoprotein. *Virology* **267**, 8-16.

Kim, J.J., Ayyavoo, V., Bagarazzi, M.L., Chattergoon M.A., Dang, K. (1997). In vivo engineering of a cellular immune response by coadministration of IL-12 expression vector with a DNA immunogen. *J Immunol* **158**, 816-826.

Kim, J.J., Einer, D.B. (1999). Development of multicomponent DNA vaccination strategies against HIV. *Curr Opin Mol Ther* **1**, 43-49.

Kim, K.S., Kim, K.H., Choi, S.E., Yoon, J.W., Kang, Y. (1999) Soluble expression in Escherichia coli of murine endogenous retroviral transmembrane envelope protein having immunosuppressive activity. *Protein Expr Purif* **16**, 19-26.

King, C.L., Hakimi, J., Shata, M.T., Medhat, A. (1995). IL-12 regulation of parasite antigen-driven IgE production in human helminth infections. *J Immunol* **155**, 454-461.

Kiniwa, M., Gately, M., Gubler, U., Chizzonite, R., Fargeas, C., Delespesse, G. (1992). Recombinant interleukin-12 suppresses the synthesis of immunoglobulin E by interleukin-4 stimulated human lymphocytes. *J Clin Invest* **90**, 262-266.

- Kobayashi, M., Fitz, L., Ryan, M., Hewick, R.M., Clark, S.C., Chan, S., Loudon, R., Sherman, F., Perussia, B., Trinchieri, G. (1989).** Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a Zytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med* **170**, 827-845.
- Koch, F., Stanzl, U., Jennewein, P., Janke, K., Heufler, C., Kampgen, E., Romani, N., Schuler, G. (1996).** High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *J Exp Med* **184**, 741-746.
- Kohno, K., Kataoka, J., Ohtsuki, T., Suemoto, Y., Okamoto, I., Usui, M., Ikeda, M., Kurimoto, M. (1997).** IFN-gamma-inducing factor (IGIF) is a costimulatory factor on the activation of Th1 but not Th2 cells and exerts its effect independently of IL-12. *J Immunol* **158**, 1541-1550.
- Kokuho, T., Watanabe, S., Yokomizo, Y., Inumaru, S. (1999).** Production of biologically active, heterodimeric porcine interleukin-12 using a monocistronic baculoviral expression system. *Vet Immunol Immunopathol* **72**, 289-302.
- Kohyama, M., Saijyo, K., Hayasida, M., Yasugi, T., Kurimoto, M., Ohno, T. (1998).** Direct activation of human CD8+ cytotoxic T lymphocytes by interleukin-18. *Jpn J Cancer Res* **89**, 1041-1046.
- König, M. (1994).** Virus der klassischen Schweinepest: Untersuchungen zur Pathogenese und zur Induktion einer protektiven Immunantwort. Ph.D. thesis Veterinary School of Hannover, Hannover, Germany.
- König, M., Lengsfeld, T., Pauly, T., Stark, R., Thiel, H.J. (1995).** Classical swine fever virus: independent induction of protective immunity by two structural glycoproteins. *J Virol* **69**, 6479-6486.
- Korthauer, U., Graf, D., Mages, H.W., Briere, F., Padayachee, M., Malcolm, S., Ugazio, A.G., Notarangelo, L.D., Levinsky, R.J., Kroccek, R.A. (1993).** Defective expression of T-cell CD40 ligand causes X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature* **361**, 539-541.
- Kroccek, R.A., Siebert, E. (1990).** Optimization of northern analysis by vacuum-blotting, RNA-transfer visualization, and ultraviolet fixation. *Anal Biochem* **184**, 90-95.
- Kwissa, M., Unsinger, J., Schirmbeck, R., Hauser, H., Reimann, J. (2000).** Polyvalent DNA vaccines with bidirectional promoters. *J Mol Med* **78**, 495-506.

Kwissa, M., von Kampen, J., Zurbriggen, R., Glueck, R., Reimann, J. (2000i). Efficient vaccination by intradermal or intramuscular inoculation of plasmid DNA expressing hepatitis B surface antigen under desmin promoter/enhancer control. *Vaccine* **18**, 2337-2344.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Lane, P., Brocker, T., Hubele, S., Padovan, E., Lanzavecchia, A., McConnell, F. (1993). Soluble CD40 ligand can replace the normal T cell-derived CD40 ligand signal to B cells in T cell-dependent activation. *J Exp Med* **177**, 1209-1213.

Larsen, D.L., Dybdahl, S.N., McGregor, M.W., Drape, R., Neumann, V. (1998). Coadministration of DNA encoding interleukin-6 and hemagglutinin confers protection from influenza virus challenge in mice. *J Virol* **72**, 1704-1708.

Le Guill, C., Dery, C.V. (1991). A rapid procedure for screening of recombinant plasmids. *Nucleic Acid Res* **19**, 6655.

Ling, P., Gately, M.K., Gubler, U., Stern, A.S., Lin, P., Hollfelder, K., Su, C., Pan, Y.C., Hakimi, J. (1995). Human IL-12 p40 homodimer binds to the IL-12 receptor but does not mediate biologic activity. *J Immunol* **154**, 116-127.

Lowrie, D.B., Tascon, R.E., Colston, M.J., Silva, C.L. (1994). Towards a DNA vaccine against tuberculosis. *Vaccine* **12**, 1537-1540.

Lu, Y., Xin, K.Q., Hamajima, K., Tsuji, T., Aoki, I. (1999). Macrophage inflammatory protein-1 α expression plasmid enhances DNA vaccine induces immune response against HIV-1. *Clin Exp Immunol* **115**, 335-341.

Lunn, D.P., Soboll, G., Schram, B.R., Quass, J., McGregor, M.W., Drape, R.J., Macklin, M.D., McCabe, D.E., Swain, W.F., Olsen, C.W. (1999). Antibody responses to DNA vaccination of horses using the influenza virus hemagglutinin gene. *Vaccine* **17**, 2245-2258.

Ma, X., Sun, J., Papasavvas, E., Riemann, H., Robertson, S., Marshall, J., Bailer, R.T., Moore, A., Donnelly, R.P., Trinchieri, G., Montaner, L.J. (2000). Inhibition of IL-12 production in human monocyte-derived macrophages by TNF. *J Immunol* **164**, 1722-1729.

Maecker, H.T., Umetsu, D.T., DeKruyff, R.H., Levy, S. (1997). DNA vaccination with Zytokine fusion constructs biases the immune response to ovalbumin. *Vaccine* **15**, 1687-1696

Makoff, A.J., Ozer, M.D., Romanos, M.A., Fairweather, N.F., Ballantine, S. (1989). Expression of tetanus toxin fragment C in *E. coli*: high level expression by removing rare codons. *Nucleic Acids Res* **17**, 10191-10202.

Maloy, K.J., Erdmann, I., Basch, V., Sierro, S., Kramps, T.A., Zinkernagel, R.M., Oehen, S., Kundig, T.M. (2001). Intralymphatic immunization enhances DNA vaccination. *Proc Natl Acad Sci* **98**, 3299-3303.

Manetti, R., Parronchi, P., Giudizi, M.G., Piccinni, M.P., Maggi, E., Trinchieri, G., Romagnani, S. (1993). Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J Exp Med* **177**, 1199-1204.

Manthorpe, M., Cornefert-Jensen, F., Hartikka, J., Felgner, J., Rundell, A., Margalith, M., Dwarki, J. (1993). Gene therapy by intramuscular injection of plasmid DNA: Studies on firefly luciferase gene expression in mice. *Hum Gene Ther* **4**, 419-431.

Mattner, F., Fischer, S., Guckes, S., Jin, S., Kaulen, H., Schmitt, E., Rude, E., Germann, T. (1993). The interleukin-12 subunit p40 specifically inhibits effects of the interleukin-12 heterodimer. *Eur J Immunol* **23**, 2202-2208.

Marshall, J.D., Secrist, H., DeKruyff, R.H., Wolf, S.F., Umetsu, D.T. (1995). IL-12 inhibits the production of IL-4 and IL-10 in allergen-specific human CD4⁺ T lymphocytes. *J Immunol* **155**, 111-117.

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

McKnight, A.J., Zimmer, G.J., Fogelman, I., Wolf, S.F., Abbas, A.K. (1994). Effects of IL-12 on helper T cell-dependent immune responses in vivo. *J Immunol* **152**, 2172-2179.

Meenakshi, R., Waldschmidt, T., Aruffo, A., Ledbetter, J.A., Noelle, R.J. (1993). The regulation of the expression of gp39, the CD40 ligand, on normal and cloned CD4⁺ T cells. *J Immunol* **151**, 2497-2510.

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

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

Meyers, G., Saalmuller, A., Buttner, M. (1999). Mutations abrogating the RNase activity in glycoprotein E(rns) of the pestivirus classical swine fever virus lead to virus attenuation. *J Virol* **73**, 10224-10235.

Michel, M.L., Davis, H.L., Schleef, M., Mancini, M., Trollais, P., Whalen, R.G. (1995). DNA-mediated immunization to the hepatitis B surface antigen in mice: aspects of the humoral response mimic hepatitis B viral infection in humans. *Proc Natl Acad Sci* **92**, 5307-5311.

Mills, H.R., Berry, N., Burns, N.R., Jones, I.M. (1992). Simple and efficient production of the core antigens of HIV-1, HIV-2 and simian immunodeficiency virus using pGEX expression vectors in Escherichia coli. *AIDS* **6**, 437-439.

Mintiens, K., Deluyker, H., Laevens, H., Koenen, F., Dewulf, J., De Kruif, A. (2001). Descriptive epidemiology of a classical swine fever outbreak in the Limburg Province of Belgium in 1997. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **48**, 143-149.

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

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

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

Morris, S.C., Madden, K.B., Adamovicz, J.J., Gause, W.C., Hubbard, B.R., Gately, M.K., Finkelman, F.D. (1994). Effects of IL-12 on in vivo Zytokine gene expression and Ig isotype selection. *J Immunol* **152**, 1047-1056.

Muneta, Y., Inumaru, S., Shimoji, Y., Mori, Y. (2001). Efficient production of biologically active porcine interleukin-18 by coexpression with porcine caspase-1 using a baculovirus expression system. *J Interfero Zytokine Res* **21**, 125-130.

Murphy, E.E., Terres, G., Macatonia, S.E., Hsieh, C.S., Mattson, J., Lanier, L., Wysocka, M., Trinchieri, G., Murphy, K., O'Garra, A. (1994). B7 and interleukin 12 cooperate for proliferation and interferon gamma production by mouse T helper clones that are unresponsive to B7 costimulation. *J Exp Med* **180**, 223-231.

Neglia, F., Orengo, A.M., Cilli, M., Meazza, R., Tomassetti, A., Canevari, S., Melani, C., Colombo, M.P., Ferrini, S. (1999). DNA vaccination against the ovarian carcinoma-associated antigen folate receptor alpha (FRalpha) induces cytotoxic T lymphocyte and antibody responses in mice. *Cancer Gene Ther* **6**, 349-357.

- Nobiron, I., Thompson, I., Brownlie, J., Collins, M.E. (2000).** Co-administration of IL-2 enhances antigen-specific immune responses following vaccination with DNA encoding the glycoprotein E2 of bovine viral diarrhoea virus. *Vet Microbiol* **76**, 129-142
- Nobiron, I., Thompson, I., Brownlie, J., Collins, M.E. (2001).** Zytokine adjuvancy of BVDV DNA vaccine enhances both humoral and cellular immune responses in mice. *Vaccine* **19**, 4226-4235.
- Noelle, R.J., Roy, M., Sheoherd, D.M., Stamenkovic, I., Ledbetter, J.A., Aruffo, A. (1992).** A 39-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 6550-6554.
- Oem, J.K., Song, H.J., Kang, S.W., Jeong, W.S. (2000).** Cloning, sequencing, and expression of porcine interleukin-18 in *Escherichia coli*. *Mol Cells* **10**, 343-347.
- Okamura, H., Tsutsi, H., Komatsu, T., Yutsudo, M., Hakura, A., Tanimoto, T., Torigoe, K., Okura, T., Nukada, Y., Hattori, K. (1995).** Cloning of a new Zytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature* **378**, 88-91.
- Okamura, H., Tsutsui, H., Kashiwamura, S., Yoshimoto, T., Nakanishi, K. (1998).** Interleukin-18: a novel Zytokine that augments both innate and acquired immunity. *Adv Immunol* **70**, 281-312.
- Olsen, C.W. (2000).** DNA vaccination against influenza viruses: a review with emphasis on equine and swine influenza. *Vet Microbiol* **74**, 149-164.
- Operschall, E., Pavlovic, J., Nawarath, M., Molling, K. (2000).** Mechanism of protection against influenza A virus by DNA vaccine encoding the hemagglutinin gene. *Intervirology* **43**, 322-30.
- Oshikawa, K., Shi, F., Rakhmievich, A.L., Sondel, P.M., Mahvi, D.M., Yang, N.S. (1999).** Synergistic inhibition of tumor growth in a murine mammary adenocarcinoma model by combinational gene therapy using IL-12, pro-IL-18, and IL-1beta converting enzyme cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13351-13356.
- Paul, D., Qazilbash, M.H., Song, K., Xu, H., Sinha, B.K., Liu, J., Cowan, K.H. (2000).** Construction of a recombinant adeno-associated virus (rAAV) vector expressing murine interleukin-12 (IL-12). *Cancer Gene Ther* **7**, 308-315.
- Pauly, T., Elbers, K., König, M., Lengsfeld, T., Saalmüller, A. & Thiel, H. J. (1995).** Classical swine fever virus-specific cytotoxic T lymphocytes and identification of a T cell epitope. *J Gen Virol* **76**, 3039-3049.

- Peeters, B., Bienkowska-Szewczyk, K., Hulst, M., Gielkens, A., Kimman, T. (1997).** Biologically safe, non-transmissible pseudorabies virus vector vaccine protects pigs against both Aujeszky's disease and classical swine fever. *J Gen Virol* **78**, 3311-3315.
- Peng, X., Remacle, J.E., Kasran, A., Huylebroeck, D., Ceuppens, J.L. (1998).** IL-12 up-regulates CD40 ligand (CD154) expression on human T cells. *J Immunol* **160**, 1166-1172.
- Pittler, H., Brack, M., Schulz, L. C., Rohde, G., Witte, K. & Liess, B. (1968).** Untersuchungen über die Europäische Schweinepest. I. Mitteilung: Ermittlungen zur gegenwärtigen Seuchensituation in Norddeutschland. *Dtsch Tierärztl Wochenschr* **75**, 537-542.
- Podlaski, F.J., Nanduri, V.B., Hulmes, J.D., Pan, Y.C., Levin, W., Danho, W., Chizzonite, R., Gately, M.K., Stern, A.S. (1992).** Molecular characterization of interleukin 12. *Arch Biochem Biophys* **294**, 230-237.
- Pompeia, C., Ortis, F., Armelin, M.C. (1997).** Use of pEX and pGEX bacterial heterologous protein expression systems for recombinant oncoprotein production and antisera generation. *Biotechnol Appl Biochem* **25**, 207-215.
- Porgador, A., Irvine, K.R., Iwasaki, A., Barber, B.H., Restifo, N.P., Germain, R.N. (1998).** Predominant role for directly transfected dendritic cells in antigen presentation to CD8⁺ T cells after gene gun immunization. *J Exp Med* **188**, 1075-1082.
- Prinz, M., Hanisch, U.K. (1999).** Murine microglial cells produce and respond to interleukin-18. *J Neurochem* **72**, 2215-2218.
- Puren, A.J., Fantuzzi, G., Dinarello, C.A. (1999).** Gene expression, synthesis, and secretion of interleukin 18 and interleukin 1beta are differentially regulated in human blood mononuclear cells and mouse spleen cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2256-2261.
- Roman, M., Spiegelberg, H.L., Broide, D., Raz, E. (1997).** Gene immunization for allergic disorders. *Springer Semin Immunopathol* **19**, 223-232.
- Roy, M., Waldschmidt, T., Aruffo, A., Ledbetter, J.A., Noelle, R.J. (1993).** The regulation of the expression of gp39, the CD40 ligand, on normal and cloned CD4⁺ T cells. *J Immunol* **151**, 2497-2510.
- Ruggli, N., Moser, C., Mitchell, D., Hofmann, M., Tratschin, J.D. (1995).** Baculovirus expression and affinity purification of protein E2 of classical swine fever virus strain Alfort/187. *Virus Genes* **10**, 115-126.

- Ruiz, P.J., Garren, H., Ruiz, I.U., Hirschberg, D.L., Nguyen, L.V., Karpuj, M.V., Cooper, M.T., Mitchell, D.J., Fathman, C.G., Steinman, L. (1999).** Suppressive immunization with DNA encoding a self-peptide prevents autoimmune disease: modulation of T cell costimulation. *J Immunol* **162**, 3336-3341.
- Rumenapf, T., Stark, R., Meyers, G., Thiel, H.J. (1991).** Structural proteins of hog cholera virus expressed by vaccinia virus: further characterization and induction of protective immunity. *J Virol* **65**, 589-597.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989).** Molecular Cloning. A Laboratory Manual, second edition.
- Savi, P., Torlone, V. & Titoli, F. (1965).** Recherches sur la survie du virus de la peste porcine classique dans certains produits de charcuterie. *Bull. OIE* **63**, 87-96.
- Schirmbeck, R., Reimann, J. (2001).** Modulation of Gene-Gun-Mediated Th2 Immunity to Hepatitis B Surface Antigen by Bacterial CpG Motifs or IL-12. *Intervirology* **44**, 115-123.
- Schmitt, E., Hoehn, P., Germann, T., Rude, E. (1994).** Differential effects of interleukin-12 on the development of naive mouse CD4+ T cells. *Eur J Immunol* **24**, 343-347.
- Schoenhaut, D.S., Chua, A.O., Wolitzky, A.G., Quinn, P.M., Dwyer, C.M., McComas, W., Familletti, P.C., Gately, M.K., Gubler, U. (1992)** Cloning and expression of murine IL-12. *J Immunol* **148**, 3433-3440.
- Seder, R.A., Gazzinelli, R., Sher, A., Paul, WE. (1993).** Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10188-10192.
- Shan, M., Liu, K., Fang, H. (1999).** DNA vaccination of the induction of immune responses by codelivery of IL-12 expression vector with hepatitis C structural antigens. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* **7**, 236-239.
- Sin, J.I., Kim, J.J., Arnold, R.L., Shroff, K.E., McCallus, D. (1999).** IL-12 gene as a DNA vaccine adjuvant in a herpes mouse model: IL-12 enhances Thi-type CD4+ Tcell-mediated protective immunity against herpes simplex virus-2 challenge. *J Immunol* **162**, 2912-2921.
- Smooker, P.M., Steeper, K.R., Drew, D.R., Strugnell, R.A., Spithill, T.W. (1999).** Humoral responses in mice following vaccination with DNA encoding glutathione S-transferase of *Fasciola hepatica*: effects of mode of vaccination and the cellular compartment of antigen expression. *Parasite Immunol* **21**, 357-364.

Spanjaard, R.A., van Duin, J. (1988). Translation of the sequence AGG-AGG yields 50% ribosomal frameshift. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 7967-7971.

Spiegelberg, H.L., Orozco, E.M., Roman, M., Raz, E. (1997). DNA immunization: a novel approach to allergen-specific immunotherapy. *Allergy* **52**, 964-970.

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

Stark, R., Meyers, G., Rümenapf, T. & Thiel, H. J. (1993). Processing of pestiviral polyprotein: cleavage site between autoprotease and nucleocapsid protein of classical swine fever virus. *J Virol* **67**, 7088-7095.

Stavnezer, J. (1996). Immunoglobulin class switching. *Curr Opin Immunol* **8**, 199-205.

Stern, A.S., Podlaski, F.J., Hulmes, J.D., Pan, Y.C., Quinn, P.M., Wolitzky, A.G., Familletti, P.C., Stremlo, D.L., Truitt, T., Chizzonite, R. (1990). Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxic lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci* **87**, 6808-6812.

Stoll, S., Muller, G., Kurimoto, M., Saloga, J., Tanimoto, T., Yamauchi, H., Okamura, H., Knop, J., Enk, A.H. (1997). Production of IL-18 (IFN-gamma-inducing factor) messenger RNA and functional protein by murine keratinocytes. *J Immunol* **159**, 298-302.

Stoll, S., Jonuleit, H., Schmitt, E., Muller, G., Yamauchi, H., Kurimoto, M., Knop, J., Enk, AH. (1998). Production of functional IL-18 by different subtypes of murine and human dendritic cells (DC): DC-derived IL-18 enhances IL-12-dependent Th1 development. *Eur. J Immunol* **28**, 3231-3239.

Stueber, D., Matile, H., Garotta, G. (1990). System for high-level production in E.coli and rapid purification of recombinant proteins: application to epitope mapping, preparation of antibodies, and structure-function analysis. *Immunological Methods* **4**, 121-152.

Su, W., Ito, T., Oyama, T., Kitagawa, T., Yamori, T., Fujiwara, H., Matsuda, H. (2001). The direct effect of IL-12 on tumor cells: IL-12 acts directly on tumor cells to activate NF-kappaB and enhance IFN-gamma-mediated STAT1 phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* **280**, 503-512.

Susa, M., Konig, M., Saalmuller, A., Reddehase, M.J., Thiel, H.J. (1992). Pathogenesis of classical swine fever: B-lymphocyte deficiency caused by hog cholera virus. *J Virol* **66**, 1171-1175.

Sypek, J.P., Chung, C.L., Mayor, S.E., Subramanyam, J.M., Goldman, S.J., Sieburth, D.S., Wolf, S.F., Schaub, R.G. (1993). Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. *J Exp Med* **177**, 1797-802.

Takeuchi, M., Nishizaki, Y., Sano, O., Ohta, T., Ikeda, M., Kurimoto, M. (1997). Immunohistochemical and immuno-electron-microscopic detection of interferon-gamma-inducing factor ("interleukin-18") in mouse intestinal epithelial cells. *Cell Tissue Res* **289**, 499-503.

Tanguay, S., Killion, J.J. (1994). Direct comparison of ELISPOT and ELISA-based assays for detection of individual Zytokine-secreting cells. *Lymphokine Zytokine Res* **13**, 259-263.

Terpstra C, Wensvoort G. (1988). The protective value of vaccine-induced neutralising antibody titres in swine fever. *Vet Microbiol* **16**, 123-128.

Thiel, H. J., Stark, R., Weiland, E., Rumenapf, T. & Meyers, G. (1991). Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus. *J Virol* **65**, 4705-4712.

Thomson, S.A., Elliott, S.L., Sherritt, M.A., Sproat, K.W., Coupar, B.E. (1996). Recombinant polyepitope vaccines for the delivery of multiple CD8 cytotoxic T cell epitopes. *J Immunol* **157**, 822-826.

Toda, S., Ishii, N., Okada, E., Kusakabe, K.I., Arai, H., (1997). HIV-1-specific cell-mediated immune responses induced by DNA vaccination were enhanced by mannan-coated liposomes and inhibited by anti-interferon-g antibody. *Immunology* **92**, 111-117.

Tomei, L., Failla, C., Santolini, E., De Francesco, R., La Monica, N. (1993). NS3 is a serine protease required for processing of hepatitis C virus polyprotein. *J Virol* **67**, 4017-4026.

Torres, C.A., Iwasaki, A., Barber, B.H., Robinson, H.L. (1997). Differential dependence on target site tissue for gene gun and intramuscular DNA immunizations. *J Immunol* **158**, 4529-4532.

Trinchieri, G. (1993). Interleukin-12 and its role in the generation of TH1 cells. *Immunol Today* **14**, 335-338

Trinchieri, G. (1997). Zytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN-gamma). *Curr Opin Immunol* **9**, 17-23.

Ushio, S., Namba, M., Okura, T., Hattori, K., Nukada, Y., Akita, K., Tanabe, F., Konishi, K., Micallef, M., Fujii, M., Torigoe, K., Tanimoto, T., Fukuda, S., Ikeda, M., Okamura, H., Kurimoto, M. (1996). Cloning of the cDNA for human IFN-gamma-inducing factor, expression in Escherichia coli, and studies on the biologic activities of the protein. *J Immunol* **156**, 4274-4279.

van der Pouw Kraan, T.C., Boeijs, L.C., de Groot, E.R., Stapel, S.O., Sniijders, A., Kapsenberg, M.L., van der Zee, J.S., Aarden, L.A. (1997). Reduced production of IL-12 and IL-12-dependent IFN-gamma release in patients with allergic asthma. *J Immunol* **158**, 5560-5565.

van Kooten, C., Banchereau, J. (1996). CD40-CD40 ligand: a multifunctional receptor-ligand pair. *Adv Immunol* **61**, 1-77.

van Rijn, P.A., Miedema, G.K., Wensvoort, G., van Gennip, H.G., Moormann, R.J. (1994). Antigenic structure of envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus. *J Virol* **68**, 3934-3942.

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

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

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

Waine, G.J., Yang, W., Scott, J.C., McManus, D.P., Kalinna, B.H. (1997). DNA-based vaccination using Schistosoma japonicum (Asian blood-fluke) genes. *Vaccine* **15**, 846-848.

Waisman, A., Ruiz, P.J., Hirschberg, D.L., Gelman, A., Oksenberg, J.R., Brocke, S., Mor, F., Cohen, I.R., Steinman, L. (1996). Suppressive vaccination with DNA encoding a variable region gene of the T-cell receptor prevents autoimmune encephalomyelitis and activates Th2 immunity. *Nat Med* **2**, 899-905.

Wang, Z.E., Zheng, S., Corry, D.B., Dalton, D.K., Seder, R.A., Reiner, S.L., Locksley, R.M. (1994). Interferon gamma-independent effects of interleukin 12 administered during acute or established infection due to Leishmania major. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 12932-12936.

Wei, W.Z., Shi, W.P., Galy, A., Lichlyter, D., Hernandez, S., Groner, B., Heilbrun, L., Jones, R.F. (1999). Protection against mammary tumor growth by vaccination with full-length, modified human ErbB-2 DNA. *Int J Canc* **81**, 748-754.

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

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

Wienhold, D. (1998). Entwicklung eukaryontischer Expressionsvektoren für den Einsatz als DNA-Vakzine am Beispiel der Maul- und Klauenseuche. Diplomarbeit Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

Will, H., Cattaneo, R., Koch H.G., Darai, G., Schaller, H., Schellekens, P.M., Van Eerd, Deinhardt, F. (1982). Cloned HBV DNA causes hepatitis in chimpanzees. *Nature* **299**, 740-742.

Wills-Karp, M. (2001). IL-12/IL-13 axis in allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* **107**, 9-18.

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

Wolf, S.F., Temple, P.A., Kobayashi, M., Young, D., Dicig, M., Lowe, L., Dzialo, R., Fitz, L., Ferenz, C., Hewick, R.M. (1991). Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric Zytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. *J Immunol* **146**, 3074-3081.

Wolff, A., Ludtke, J., Acsadi, G., Williams, P., Jani, A. (1992). : Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum Mol Gen* **1**, 363-369.

Wong, J.P., Zabielski, M.A., Schmaltz, F.L., Brownlee, G.G., Bussey, L.A., Marshall, K., Borralho, T., Nagata, L.P. (2001). DNA vaccination against respiratory influenza virus infection. *Vaccine* **19**, 2461-2467.

Wu, C.Y., Demeure, C., Kiniwa, M., Gately, M., Delespesse, G. (1993). IL-12 induces the production of IFN-gamma by neonatal human CD4 T cells. *J Immunol* **151**, 1938-1949.

Wynn, T.A., Jankovic, D., Hieny, S., Zioncheck, K., Jardieu, P., Cheever, A.W., Sher, A. (1995). IL-12 exacerbates rather than suppresses T helper 2-dependent pathology in the absence of endogenous IFN-gamma. *J Immunol* **154**, 3999-4009.

Yamanaka, K., Hara, I., Nagai, H., Miyake, H., Gohji, K., Micallef, M.J., Kurimoto, M., Arakawa, S., Kamidono, S. (1999). Synergistic antitumor effects of interleukin-12 gene transfer and systemic administration of interleukin-18 in a mouse bladder cancer model. *Cancer Immunol Immunother* **48**, 297-302.

Yang, W., Waine, G.J., McManus, D.P. (1995) Antibodies to *Schistosoma japonicum* (Asian bloodfluke) paramyosin induced by nucleic acid vaccination. *Biochem Biophys Res Commun* **212**, 1029-1039.

Yoshimoto, T., Okamura, H., Tagawa, Y.I., Iwakura, Y., Nakanishi, K. (1997). Interleukin 18 together with interleukin 12 inhibits IgE production by induction of interferon-gamma production from activated B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3948-3953.

Yoshimoto, T., Takeda, K., Tanaka, T., Ohkusu, K., Kashiwamura, S., Okamura, H., Akira, S., Nakanishi, K. (1998). IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production. *J Immunol* **161**, 3400-3407.

Yoshimoto, T., Tsutsui, H., Tominaga, K., Hoshino, K., Okamura, H., Akira, S., Paul, W.E., Nakanishi, K. (1999). IL-18, although antiallergic when administered with IL-12, stimulates IL-4 and histamine release by basophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13962-13966.

Yoshimoto, T., Mizutani, H., Tsutsui, H., Noben-Trauth, N., Yamanaka, K., Tanaka, M., Izumi, S., Okamura, H., Paul, W.E., Nakanishi, K. (2000). IL-18 induction of IgE: dependence on CD4⁺ T cells, IL-4 and STAT6. *Nat Immunol* **1**, 132-137.

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

Zarrin, A.A., Malkin, L., Fong, I., Luk, K.D., Ghose, A., Berinstein, N.L. (1999). Comparison of CMV, RSV, SV40 viral and λ 1 cellular promoters in B and T lymphoid and non-lymphoid cell lines. *Biochim Biophys Acta* **1446**, 135-139.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Daniel Wienhold
Geburtsdatum: 20.04.1973
Geburtsort: Zeitz
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung/Berufsausbildung

1979-1989 Allgemeinbildende polytechnische Oberschule
1989-1992 Gymnasium Erwin Hoernle Neubrandenburg
1989-1992 Parallel Ausbildung zum Instandhaltungsmechaniker für Technologische Ausrüstungen

Hochschulausbildung

1993-1995 Grundstudium im Diplomstudiengang Biologie
1995-1997 Hauptstudium und Diplomprüfung
1997-1998 Diplomarbeit an der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere in Tübingen unter Anleitung von Prof. Dr. Pfaff
Thema: Entwicklung eukaryotischer Expressionsvektoren für den Einsatz als DNA-Vakzine am Beispiel der Maul- und Klauenseuche
1999- 03/2002 Dissertation an der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere in Tübingen unter Anleitung von Prof. Dr. Pfaff
Thema: DNA-Vakzinierung gegen *classical swine fever virus*-Einfluß von Immunstimulatoren auf die Effizienz

Im Selbstverlag herausgegeben von: Daniel Wienhold
Austrasse 63
72144 Dusslingen