

T- und B-Zellepitope von Glykoproteinen des Pseudorabiesvirus (Suid Herpesvirus 1)

DISSERTATION

der Fakultät für Biologie
der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

vorgelegt
von

Christina Mattlinger

aus Giengen an der Brenz

2004

Tag der mündlichen Prüfung: 06. Februar 2004

Dekan: Prof. Dr. Hans-Ulrich Schnitzler

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Eberhard Pfaff

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Immunologie der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere in Tübingen durchgeführt.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee danke ich sehr herzlich für das Erstgutachten und seinen besonderen Einsatz, ohne den die Fertigstellung meiner Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Herrn Prof. Dr. Eberhard Pfaff gilt mein herzlicher Dank für das Zweitgutachten.

Weiterhin gilt mein Dank

Frau Berthilde Bauer und Herrn Dipl. Biol. Roger Bernhard für die Einführung in die molekularbiologischen Arbeitstechniken,

Herrn Dr. Timo Fischer für die Einführung in die Technik der RT-PCR,

Herrn Dr. Christoph Kempter für die massenspektrometrische Analyse der Peptide,

Herrn Dr. Bertram Ober für fachliche Diskussionen,

Herrn Dr. Berthold Teufel für die Zusammenarbeit bei der Peptidsynthese.

Auch möchte ich allen namentlich nicht Genannten danken, die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.

Meinen Eltern
und
für Jörg Oliver

in memoriam
Jochen Klein

1 Inhalt

1 Inhalt I

2 Einleitung 1

2.1	Virus-Wirt-Interaktion	1
2.2	Taxonomie	3
2.3	Morphologie	3
2.4	Genomorganisation	4
2.5	Infektionszyklus in Zellkultur	5
2.6	Virale Glykoproteine	7
2.6.1	Rolle der viralen Glykoproteine bei der protektiven humoralen und zellulären Immunantwort	12
2.6.2	Rolle der viralen Glykoproteine bei der Impfstoffentwicklung	15
2.7	Zielsetzung	18

3 Material 19

3.1	Tiere, Zellen und Virusstämme	19
3.1.1	Versuchstiere	19
3.1.2	Zellen	19
3.1.3	Virusstämme	19
3.2	Bakterien, Vektoren, Plasmide und Primer	20
3.2.1	Bakterienstämme	20
3.2.2	Vektoren und Plasmide	20
3.2.3	Primer	21
3.3	Antikörper, Konjugate und Seren	21
3.3.1	Maus anti-Schwein monoklonale Antikörper (mAb)	21
3.3.2	Peroxidasekonjugate	22
3.3.3	Seren	22

3.4	Reagenzien	22
3.4.1	Chemikalien	22
3.4.2	Nukleinsäuren und Nukleotide	23
3.4.3	Proteine	24
3.4.4	Enzyme	24
3.4.5	Reagenzienansätze (<i>Kits</i>)	24
3.5	Geräte und Laborhilfsmittel	25
3.6	Laborartikel	26
3.7	Puffer und Lösungen	26
3.7.1	Puffer und Lösungen für die Zellkultur	26
3.7.2	Puffer und Lösungen für die Bakterienkultur	28
3.7.3	Puffer und Lösungen für DNA-Isolierung, -Klonierung und -Elektrophorese	30
3.7.4	Puffer und Lösungen für die DNA-Sequenzierungen	33
3.7.5	Puffer und Lösungen für die RT-PCR	34
3.7.6	Puffer und Lösungen für ELISA, Peptidchemie, Proteinbestimmung und Zellkultur-Versuche	34
3.7.7	Puffer und Lösungen für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	36
3.7.8	Puffer und Lösungen für Western-Blot-Analysen	38
3.7.9	Puffer für die TALON-Affinitätschromatographie	38

4 Methoden **40**

4.1	Zellkultur	40
4.1.1	Kultivierung von Zellen	40
4.1.2	Einfrieren von Zellen	40
4.1.3	Auftauen von Zellen	41
4.1.4	Zellzahl-Bestimmung	41
4.2	Virusanzucht und -reinigung	41
4.2.1	PRV-Virusanzucht	41
4.2.2	Reinigung von PRV-Virionen	42

4.2.3	Virustitration	42
4.2.4	Virusinaktivierung mit UV	43
4.2.5	Virusinaktivierung mit β -Propiolacton	43
4.2.6	Überprüfung der Virusinaktivierung	43
4.3	Tierversuche	44
4.3.1	Immunisierung der Versuchstiere und Belastungsinfektion	44
4.3.2	Blutprobenentnahme	44
4.3.3	Serumgewinnung	44
4.4	<i>In vitro</i> -Versuche mit peripheren mononukleären Zellen (PBMC)	45
4.4.1	Isolierung mononukleärer Zellen (PBMC-Isolierung)	45
4.4.2	PBMC-Proliferationstest	45
4.4.3	IL-2-Aktivierungstest	46
4.5	DNA-Analysen	47
4.5.1	Methoden zur Präzipitation von Nukleinsäuren	47
4.5.2	Phenol-Extraktion	47
4.5.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	48
4.5.4	DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	48
4.5.5	DNA-Agarosegelelektrophorese	49
4.5.6	„Qiaex“-Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	49
4.6	DNA-Klonierung	50
4.6.1	Phosphatasebehandlung der Vektor-DNA (CIP-Behandlung)	50
4.6.2	Ligation	50
4.6.3	Transformation von Bakterien	51
4.6.4	Identifizierung rekombinanter Klone	52
4.6.5	DNA-Sequenzierung	54
4.7	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	56
4.7.1	Isolierung von Gesamtzell-RNA	56
4.7.2	Reverse Transcription (RT)	56
4.7.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	56
4.8	Bakterielle Expression	57
4.8.1	Expression von Fusionsproteinen in <i>E. coli</i>	57
4.8.2	Differentielle Harnstoffextraktion	58

4.8.3	Proteinbestimmung	58
4.8.4	Reinigung der Fusionsproteine durch Affinitätschromatographie mit einer TALON -Säule	58
4.9	Proteingelelektrophorese und Western-Blotting	60
4.9.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	60
4.9.2	Färbung von Proteingelen	60
4.9.3	Western-Blotting	60
4.10	Synthetische Peptide	61
4.10.1	Multiple Peptidsynthese	61
4.10.2	Abspalten der Peptide vom Harz	62
4.11	ELISA	63
4.11.1	Peptid-ELISA	63
4.11.2	PRV-ELISA	63

5 Ergebnisse **64**

5.1	Glykoprotein gD	64
5.1.1	Ausgangsplasmid pgDBSII	64
5.1.2	Herstellung der Fusionsproteine GD-1, GD-2 und GD	64
5.1.3	Durchführung der Klonierungen und Überprüfung der erhaltenen rekombinanten Klone	65
5.1.4	Sequenzierung	67
5.1.5	Expression und Reinigung der Fusionsproteine	67
5.1.6	PRV-ELISA	74
5.1.7	Herstellung der synthetischen Peptide gD 1-79	76
5.1.8	B-Zellepitopkartierung	77
5.1.9	T-Zellepitopkartierung	81
5.2	Glykoprotein gB	96
5.2.1	Proliferationstests mit den Peptiden gB17 und gB39 und PBMC von Inzuchtschweinen	96
5.2.2	MHC-Restriktion der gB17- und gB39-spezifischen PBMC-Proliferation	98

5.2.3	IL-2-Aktivierungstest, Peptid gB39	100
5.2.4	Proliferationstests mit den Peptiden gB17 und gB39 und PBMC von Auszuchtschweinen	101
5.3	Glykoprotein gC	102
5.3.1	Proliferationstests mit den Peptiden gC50 und gC72 und PBMC von Auszuchtschweinen	102
6	<u>Diskussion</u>	<u>105</u>
6.1	Herstellung bakterieller gD-Fusionsproteine	105
6.2	Pseudorabiesvirale porcine B-Zellepitope	107
6.3	Pseudorabiesvirale porcine T-Zellepitope	109
6.3.1	Inzuchtschwein	109
6.3.2	Auszuchtschwein	112
6.4	Cytokine	116
6.5	Ausblick	121
7	<u>Zusammenfassung</u>	<u>123</u>
8	<u>Literaturverzeichnis</u>	<u>125</u>
9	<u>Anhang</u>	<u>152</u>

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
β-PL	β-Propiolacton
μ	mikro
Abb.	Abbildung
ADCC	antikörper-abhängige zellvermittelte Cytotoxizität
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
BFAV	Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere
BHV	Bovines Herpesvirus
bidest.	zweifach destilliert
bp	Basenpaar(e)
bq	Bequerel
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
BSE	Probenauftragpuffer
bzw.	beziehungsweise
c	<i>complementary</i>
ca.	circa
CD	Differenzierungseinheit (<i>cluster of differentiation</i>)
Ci	Curie
CIP	alkalische Phosphatase vom Kalbsthymus (<i>calf intestinal phosphatase</i>)
Con A	Concanavalin A
cpe	cytopathogener Effekt (<i>cytopathogene effect</i>)
cpm	radioaktive Zerfälle pro Minute (<i>counts per minute</i>)
CTL	cytotoxischer T-Lymphocyt
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat

dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DOCA	Desoxycholsäure
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure
EHV	equines Herpesvirus
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i>
FCS	Fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaciny]-ethan-sulfon-säure
His	Histidin
HMFM	<i>Hogness modified freezing medium</i>
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
hr	human rekombinant
HSV	Herpes-simplex-Virus
I.E.	Internationale Einheiten
IAC	Isoamylalkohol-Chloroform
IE(P)	<i>immediate early (protein)</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin

IL	Interleukin
<i>IR</i>	<i>internal repeat</i>
IS-MS	Ionenspray-Massenspektrometrie
IU	internationale Enzymeinheit (<i>international unit</i>)
k	Kilo
Kan	Kanamycin
l	Liter
LAK	lymphokin-aktivierte Killerzelle
LB	Luria Bertani
m	milli
M	molar
mA	Milliampere
mAb	monoklonaler Antikörper
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MDBK	<i>madin darby bovine kidney</i>
MEM	Minimalmedium (<i>minimum essential medium</i>)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
min	Minute
moi	<i>multiplicity of infection</i>
MOPS	Morpholinopropansäure
n	nano
ng	Nanogramm
NIH	National Institute of Health
NK	natürliche Killer- (<i>natural killer-</i>)
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
OPD	ortho-Phenylendiamin
ori	Replikationsursprung (<i>origin of replication</i>)
p	Plasmid
p.i.	<i>post infectionem</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Saline (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PEG	Polyethylenglykol
Pen	Penicillin
pfu	Plaque bildende Einheiten (<i>plaque forming units</i>)
PIPES	Piperazin-1,4-bis (2-ethansulfonsäure)
PRV	Pseudorabiesvirus
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Reverse Transcriptase, Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
Strep	Streptomycin
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N'N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
Th	T-Helfer-
TM	<i>trade mark</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TR	<i>terminal repeat</i>
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
ÜN	über Nacht
U	Unit (Enzymeinheit)
u. a.	unter anderem
<i>U_L</i>	<i>unique long</i>

<i>U_s</i>	<i>unique short</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
VZV	Varicella Zoster Virus
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen

Aminosäuren und ihre Symbole

Alanin	A	Leucin	L
Arginin	R	Lysin	K
Asparagin	N	Methionin	M
Asparaginsäure	D	Phenylalanin	F
Cystein	C	Prolin	P
Glutamin	Q	Serin	S
Glutaminsäure	E	Threonin	T
Glycin	G	Tryptophan	W
Histidin	H	Tyrosin	Y
Isoleucin	I	Valin	V

2 Einleitung

Das Pseudorabiesvirus (PRV, Suid Herpesvirus 1) gehört der Familie der Herpesviridae an (Sabin, 1934) und ist der Erreger der Aujeszky'schen Krankheit beim Schwein (Aujeszky, 1902). Die Krankheitssymptomatik ist gekennzeichnet durch eine Meningoenzephalomyelitis, die oft von einer Entzündung des oberen Respirationstrakts und der Lunge begleitet wird (Wittmann und Rziha, 1989). Die Aujeszky'sche Krankheit führt zu großen finanziellen Verlusten in der Landwirtschaft. Deshalb werden weltweit Impfprogramme mit Totimpfstoffen (Bartha, 1961) und attenuierten Viren (Tatarow, 1968) durchgeführt. Bei der Entwicklung neuer, verbesserter biotechnologischer PRV-Impfstoffe kommt den PRV-Hüll-Glykoproteinen, aufgrund ihrer Bedeutung für die Generierung einer protektiven Immunität, eine Schlüsselrolle zu (Mengeling et al., 1997; Pensaert et al., 1992; Van Oirschot et al., 1990).

2.1 Virus-Wirt-Interaktion

Unter natürlichen Bedingungen sind die meisten Säugetierarten mit PRV infizierbar. Nur Equiden und höhere Primaten, einschließlich des Menschen, zeigen eine weitgehende oder vollständige Resistenz. Die Krankheit verläuft bei den meisten Säugetierarten innerhalb weniger Tage tödlich, lediglich beim Schwein nimmt die Mortalität mit zunehmendem Alter der infizierten Tiere ab. Aus diesem Grund und der Etablierung einer latenten, reaktivierbaren Infektion, gilt das Schwein als natürlicher Wirt und Haupt-Überträger des PRV (Wittmann und Rziha, 1989).

Die Infektion erfolgt überwiegend durch Aspiration virushaltiger Aerosole. Die Krankheit beginnt meist mit einer primären Virusvermehrung in nasopharyngealen und respiratorischen Epithelzellen. Darauf werden die Tonsillen und die Lunge infiziert. Außerdem befällt das Virus Nervenendigungen des trigeminalen und olfaktorischen Systems und gelangt auf diesem Weg in das zentrale Nervensystem (ZNS). Weiterhin breitet sich das Virus über das periphere Nervensystem oder durch infizierte Zellen des peripheren Bluts in andere Körperregionen aus (Enquist, 1994; Wittmann und Rziha, 1989).

PRV-typische histopathologische Veränderungen werden vor allem im ZNS aufgefunden. Es finden sich Zeichen einer nicht-eitrigen Meningoenzephalomyelitis, perivaskulärer Infiltrationen und der Nekrose der Gliazellen. Schwere ulzeröse Tonsillitiden und interstitielle Pneumonien werden beobachtet. Es wird angenommen, dass bakterielle Sekundärinfektionen durch eine viral-induzierte Immunsuppression begünstigt werden (Wittmann und Rziha, 1989).

Die Aujeszky'sche Krankheit beim Schwein äußert sich in vielfältigen klinischen Symptomen. Es zeigen sich neurologische Symptome in Form von Ataxie, epileptischen Krampfanfällen und Paralysen, respiratorische Symptome, wie Husten und Nasenausfluss und allgemeine Krankheitszeichen, wie Fieber, Inappetenz, Apathie, Anorexie und Vomit. Das Alter und der immunologische Zustand, vermittelt beispielsweise über maternal übertragene Antikörper, des befallenen Tieres einerseits, und die Virulenz und Dosis des infizierenden PRV-Stammes andererseits, können hierbei über den Schweregrad der klinischen Erkrankung bestimmen (Nauwynck, 1997). Während die Sterblichkeit ein bis zwei Wochen alter Ferkel aufgrund neurologischer Störungen meist nahezu 100 % beträgt, nimmt die Mortalität mit zunehmendem Alter der Tiere ab. Beim Mastschwein tritt mehr die respiratorische und allgemeine Symptomatik (Wachstumsretardierung und Gewichtsverlust) und beim adulten Schwein eine mildere Allgemeinsymptomatik sowie verminderte Fertilität, Aborte und Totgeburt auf, wobei die Morbidiät jedoch immer noch 100 % beträgt (Wittmann und Rziha, 1989).

Nach überstandener Krankheit weisen Schweine eine latente Infektion ohne klinische Symptome und ohne Virusausscheidung auf, wobei das Virusgenom in Nervenganglienzellen und in Zellen des hämatopoetischen Systems nachgewiesen werden kann (Beran et al., 1980; Dreyer-Bux, 1997; Gutekunst, 1979; Rziha et al., 1986; Sabo und Grunert, 1971; Sabo und Rajcani, 1976; Sabo et al., 1969; Thiery et al., 1996; Wittmann und Rziha, 1989). Während der Latenz findet eine limitierte Expression des viralen Genomes, in Form der Produktion der sogenannten latenz-assoziierten Transkripte (LATs), statt (Priola und Stevens, 1991). Durch Stresseinwirkung, Temperaturschwankungen oder Immunsuppression kann das latente Virus reaktiviert werden, es kann zur Virusausscheidung und teilweise auch zum erneuten Ausbruch der Krankheit kommen (Rziha et al., 1986; Thawley et al., 1984;

Wittmann et al., 1983). Latent infizierte Tiere stellen somit eine ständige Infektionsquelle für die gesamte Schweinepopulation dar.

2.2 Taxonomie

PRV gehört zu der bislang etwa 100 Arten umfassenden Familie der Herpesviridae, die aufgrund molekularbiologischer Eigenschaften in die drei Subfamilien der α -, β -, und γ -Herpesvirinae untergliedert werden kann (Roizman, 1996).

Die α -Herpesvirinae, denen PRV angehört, weisen ein breites Wirtsspektrum auf. Sie vermehren sich *in vitro* mit kurzen Replikationszyklen und breiten sich in der Zellkultur schnell aus, *in vivo* etablieren sie eine Latenz vorwiegend, aber nicht ausschließlich, in sensorischen Ganglienzellen. Typische Vertreter sind das Herpes-simplex-Virus Typ 1 und 2 (HSV-1, HSV-2 = humanes Herpesvirus 1 und 2), das Varicella-Zoster-Virus (VZV = humanes Herpesvirus 3), das bovine Herpesvirus 1 und 2 (BHV-1, BHV-2) und das equine Herpesvirus 1 (EHV-1).

Die β -Herpesvirinae besitzen dagegen ein enges Wirtsspektrum. Sie haben einen relativ langen Vermehrungszyklus und breiten sich deshalb *in vitro* nur langsam aus. Infizierte Zellen zeigen eine ausgesprochene Größenzunahme (Cytomegalie). Eine latente Infektion wird in sekretorischen Drüsen, lymphoretikulären Zellen und Nierenzellen ausgebildet. Charakteristische Mitglieder sind das humane Cytomegalievirus (HCMV = humanes Herpesvirus 5) und das humane Herpesvirus 6 und 7 (HHV-6, HHV-7).

Die γ -Herpesvirinae weisen ebenfalls ein sehr enges Wirtsspektrum auf, das meist auf eine Spezies begrenzt ist. Sie infizieren lymphoide Zellen, meist entweder B- oder T-Lymphocyten, und etablieren in ihnen den Zustand der Viruslatenz. Bekannte Vertreter sind das Epstein-Barr-Virus (EBV = humanes Herpesvirus 4) und das humane Herpesvirus 8 (HHV-8 = Kaposi-Sarkom-assoziiertes Herpesvirus).

2.3 Morphologie

Alle Herpesviren besitzen eine ähnliche Morphologie (Roizman, 1996). Das Protein-assoziierte Genom aus doppelsträngiger Desoxyribonucleinsäure (dsDNA) bildet eine *Core*-Struktur, die von einem ca. 100 nm großen ikosaedrischen Kapsid aus 162

Kapsomeren (12 Pentomere, 150 Hexomere) umschlossen wird. Dieses Nukleokapsid ist von einer amorphen Proteinschicht, dem Tegument umgeben, das wichtige regulatorische Proteine enthält, welche in infizierte Zellen freigesetzt werden (Mossman et al., 2000). Für PRV sind hierbei u. a. die UL36-, UL46-, UL47-, UL48- und UL49-Genprodukte näher beschrieben, die eine Rolle bei der Virusmorphogenese im Cytoplasma zu spielen scheinen (del Rio et al., 2002; Fuchs et al., 2002b; Klupp et al., 2002; Kopp et al., 2002). Die äußere Virushülle (*envelope*) besteht aus einer Lipiddoppelmembran zellulären Ursprungs, in die virale Proteine, vor allem Glykoproteine, eingelagert sind. Die Größe der umhüllten Virionen variiert zwischen 120 und 300 nm und beträgt ca. 150 nm für PRV.

2.4 Genomorganisation

Das Genom des PRV besteht aus einer linearen dsDNA von ca. 150 kbp Größe und beinhaltet 70 bis 100 virale Gene, die für regulatorische Proteine, Enzyme des Nukleotidstoffwechsels, der DNA-Replikation und der Protein-Prozessierung sowie für virale Strukturproteine kodieren. Der GC-Gehalt beträgt 74 % und zählt zu den höchsten innerhalb der Herpesviridae (Ben-Porat und Kaplan, 1985; Mettenleiter, 1994, 2000).

Nach ihrer Genomorganisation können Herpesviren in 6 Gruppen (A-F) eingeteilt werden, die sich durch Anzahl und Orientierung repetitiver DNA-Elemente unterscheiden (Roizman, 1996). Das Genom des PRV (Abb. 1) wird, wie auch die Genome von VZW, BHV-1 und -5, EHV-1, -3 und -4, der Gruppe D zugeordnet und besteht aus einer *unique long*-Sequenz (U_L) und einer *unique short*-Sequenz (U_S), wobei letztere von zwei inversen Repetitionen, einem *internal repeat* (IR) und einem *terminal repeat* (TR), flankiert wird (Ben-Porat und Kaplan, 1985). Durch Rekombination innerhalb der inversen Repetitionen entstehen, bezüglich der Orientierung der U_S -Region, zwei phänotypisch äquivalente isomere Formen des Genoms, die in Viruspopulationen in gleichen Mengen vorliegen (Ben-Porat und Kaplan, 1985). In den Genomen einiger attenuierter PRV-Stämme ist, aufgrund von Duplikationen und Translokationen, auch die U_L -Region von inversen Repetitionen umgeben und tritt in zwei Orientierungen auf (Lomniczi et al., 1984a, 1987; Lu et al., 1989). Diese

Genomstruktur entspricht derjenigen von HSV-1 und -2 und stellt ein herpesvirales Genom der Gruppe E dar. Auch PRV-Wildtypviren zeigen in geringer Häufigkeit (< 5 %) eine Inversion der U_L -Region, die jedoch nicht auf inverse Repetitionen zurückzuführen ist (De Marchi et al., 1990; Rall et al., 1991).

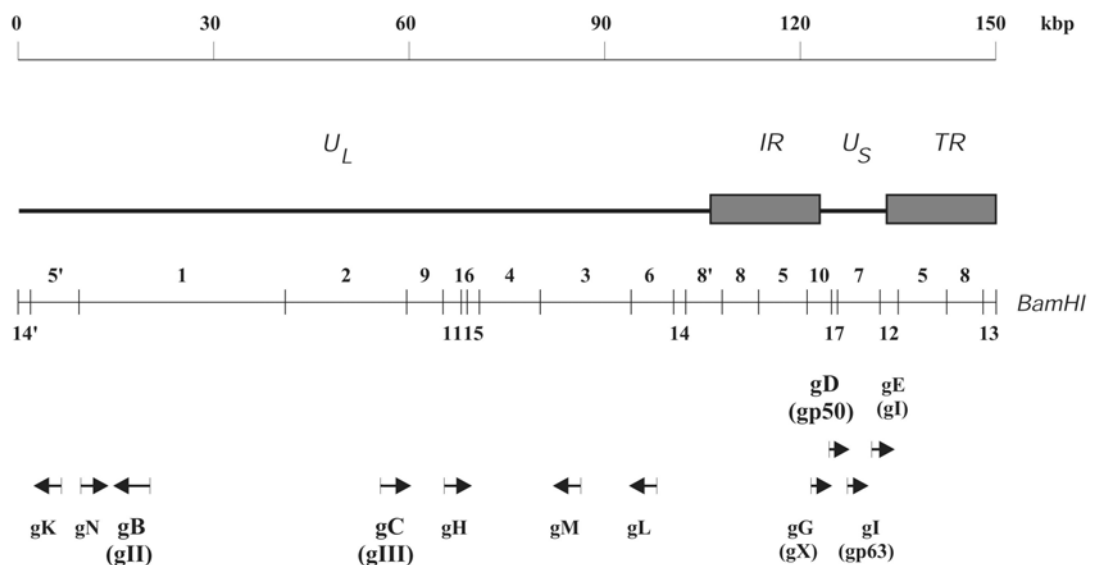


Abb. 1: Dargestellt ist die Unterteilung des 150 kbp großen PRV-Genoms in eine *unique long-* (U_L -) und eine *unique short-* (U_S -) Region, wobei letztere von den inversen Repetitionen *internal repeat* (IR) und *terminal repeat* (TR) flankiert wird. Außerdem ist die topographische Gliederung des PRV-Genoms in BamHI-Fragmente sowie die Lokalisation der elf bislang bekannten Glykoproteine gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gK, gL, gM und gN zu sehen.

2.5 Infektionszyklus in Zellkultur

Der Infektionszyklus des PRV (Ben-Porat und Kaplan, 1985) zeigt viele Gemeinsamkeiten mit dem des HSV (Roizman und Sears, 1996).

Zunächst erfolgt die Adsorption der PRV-Virionen über ihre Hüll-Glykoproteine in einem zweistufigen Schritt an spezifische Rezeptoren auf der Wirtszellmembran (Granzow et al., 1997; Karger und Mettenleiter, 1993). Die anschließende Penetration besteht in einer pH-unabhängigen Fusion der viralen Hülle mit der Zellmembran (Huang und Wagner, 1966; Spear, 1993).

Das freie Nukleokapsid wird zu den Kernporen transportiert, von dort aus wird die virale DNA ins Kernplasma entlassen. Es wird vermutet, dass am Nukleokapsid-Transportprozess zelluläre mikrotubuläre Strukturen beteiligt sind (Luftig, 1982; Granzow et al., 1997). Im Kernplasma finden die Replikation und Transkription sowie die Bildung neuer Nukleokapside (*assembly*) statt. Die viralen Kapsid-Proteine hierzu werden im Cytoplasma synthetisiert und gelangen anschließend durch einen autokatalytischen Prozeß in den Kern (Newcomb et al., 1999).

Die Transkription viraler Gene durch die zelluläre RNA-Polymerase II ist nach einem für Herpesviren charakteristischem Schema kaskadenartig reguliert (Roizman und Sears, 1996), wobei die Genprodukte, abhängig vom Zeitpunkt ihrer stärksten Expression, in die Klassen I - V eingeteilt werden können (Ben-Porat und Kaplan, 1985). Unmittelbar nach der Infektion (0 - 2 h p. i.), und noch vor Beginn der viralen DNA-Replikation, werden die Klasse I- oder *immediate-early*- (IE)-Gene transkribiert, denen genregulatorische Funktionen zukommen. Während für HSV fünf virale IE-Proteine beschrieben wurden (Roizman und Sears, 1996), sind für PRV bislang zwei IE-Proteine bekannt: Das IE180 (Cheung 1989; Ihara, 1983), welches als Transaktivator der frühen Virusgene wirkt und die zelluläre Proteinsynthese hemmt (Ahlers und Feldman, 1987; Cromlish et al., 1989) und außerdem das Rsp40, welches möglicherweise für die effiziente Transkription der frühen und späten Virusgene erforderlich ist (Fuchs et al., 2000; Zhang und Leader, 1990). Die Produkte der Klasse II- oder *early*-Gene werden u. a. für die virale DNA-Replikation benötigt (Ben-Porat und Kaplan, 1985). Die Transkription von Genen der Klasse III oder *early-late* beginnt ebenfalls zu einem frühen Zeitpunkt nach der Infektion (1,5 h p. i.), erreicht ihr Maximum jedoch erst nach Beginn der viralen DNA-Replikation (4 - 9 h p. i.). Die Synthese der Klasse IV- oder *late*-Proteine findet erst nach Beginn der viralen DNA-Replikation statt. Proteine der Klasse V werden während des gesamten Infektionszyklus synthetisiert.

Die Replikation des zunächst zirkularisierten PRV-Genoms initiiert an mindestens zwei Stellen (*origin of replication, ori*), am linken Ende und in der Mitte der U_L -Region (ORI-L; Ben-Porat und Veach, 1980; Klupp et al., 1992a; Kupersmidt et al., 1991; Wu et al., 1986a) und auch in den inversen Repetitionen (ORI-S; Fuchs et al., 2000). Durch einen *rolling circle*-Mechanismus entstehen lineare, konkatemere PRV-DNA-Moleküle

(Ben-Porat und Kaplan, 1985). Diese werden an einer *cleavage encapsidation side* (CES) auf Genomgröße zugeschnitten und in vorgeformte Kapside verpackt (Roizman und Sears, 1996).

Infektiöse Viruspartikel entstehen durch Knospung (*budding*) an Kern- und zellulären Membranen, wobei eine erste Umhüllung an der inneren Kernmembran stattfindet. Für die folgenden Schritte der Herpesvirus-Freisetzung werden zwei Modelle diskutiert (Enquist et al., 1999): Beim sogenannten *luminal model of egress*, wird davon ausgegangen, dass die umhüllten Viruspartikel vom Zellkern auf sekretorischem Weg, über das Endoplasmatische Retikulum (ER) und das Golgi-System, an die Zelloberfläche gelangen, wobei die in der Hülle eingelagerten Glykoproteine prozessiert werden (Campadelli-Fiume et al., 1991; Di Lazzaro et al., 1995; Torrisi et al., 1992). Für das zweite Modell (*reenvelopment model of egress*) wird angenommen, dass die Kapside ihre primäre Hülle durch Verschmelzung mit der äußeren Kernmembran wieder verlieren und ihre endgültige, mit prozessierten Glykoproteinen versehene Hülle im Trans-Golgi-Gebiet erhalten (Gershon et al., 1994; Granzow et al., 1997, 2001; Mettenleiter, 2002a; Skepper et al., 2001; Whealy et al., 1991; Zhu et al., 1995).

Für die primäre Umhüllung scheinen bei PRV das UL31- und das UL34- Genprodukt wichtig zu sein (Fuchs et al., 2002a). An der sekundären Umhüllung sind bei PRV offensichtlich das UL3.5-Genprodukt und das UL37-Genprodukt beteiligt (Fuchs et al., 1996, 1997a; Klupp et al., 2001). Auch das UL20-Genprodukt scheint in verschiedene Schritte bei der Virusfreisetzung involviert zu sein (Fuchs et al., 1997b).

2.6 Virale Glykoproteine

Die viralen Glykoproteine vermitteln wichtige Interaktionen zwischen Virion und Wirt, insbesondere bei der Virusadsorption und -penetration, der Virusausbreitung von Zelle zu Zelle und der Virusfreisetzung. Außerdem werden sie in der Cytoplasmamembran infizierter Zellen exprimiert. Aufgrund ihrer exponierten Lage im Virion und ihrer entscheidenden Beteiligung am Infektionszyklus stellen sie wichtige Angriffspunkte für die Immunantwort dar (Mettenleiter, 1996).

Für PRV sind bislang 11 Glykoproteine beschrieben: gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gK, gL, gM und gN (Mettenleiter, 1994b, 2000; Jöns et al., 1996), die nach homologen

Glykoproteinen bei HSV und anderen α -Herpesviren benannt sind (Spear, 1993). Die Lage der Glykoproteingene im PRV-Genom ist in Abb. 1 gezeigt, eine Übersicht über die wichtigsten Funktionen der Glykoproteine findet sich in Tab.1.

Alle Glykoproteine, mit Ausnahme von gG, sind Bestandteile der viralen Hüllmembran. Das Glykoprotein gG wird von infizierten Zellen ins Medium ausgeschieden (Kimman et al., 1992; Rea et al., 1985; Thomsen et al., 1987). Für das HSV-gG kann aufgrund von *in vivo*-Versuchen an Mäusen eine Beteiligung an der Neurovirulenz vermutet werden (Balan et al., 1994; Weber et al., 1987). Dafür sprechen auch Versuche mit PRV am Ratten-Augenmodell (Kim et al., 1999). Insertionen im PRV-gG-Gen reduzierten die Expression des stromaufwärts davon liegenden Us3-Proteins und inhibierten - vermutlich auf diesem Wege - die Ausbreitung des Virus von Zelle zu Zelle (Demmin et al., 2001).

Für die Replikation von PRV *in vitro* sind gB, gD, gH, gK und gL essentiell (Klupp et al., 1997a,b; Peeters et al., 1992a, 1992b; Rauh und Mettenleiter, 1991). Die Isolierung von gD- und gL-negativen Mutanten durch Selektion in Zellkultur zeigt jedoch, dass die gD- oder gL-Funktionen durch andere Viruskomponenten kompensiert werden können (Klupp et al., 1999; Schmid et al., 1997). Dagegen sind die übrigen Glykoproteine, gC, gE, gG, gI, gM und gN, *in vitro* für die Virusvermehrung nicht essentiell (Dijkstra et al., 1997; Klupp et al., 1997b; Kovacs und Mettenleiter, 1991; Schreurs et al., 1988; Thomsen et al., 1987; Zsak et al., 1989).

Das Glykoprotein gB (Hampl et al., 1984; Mettenleiter et al., 1986; Robbins et al., 1987) ist essentiell für die Viruspenetration und die -ausbreitung von Zelle zu Zelle (Peeters et al., 1992; Rauh und Mettenleiter, 1991). Funktionelle Domänen für diese Prozesse finden sich im C-terminalen gB-Abschnitt (Nixdorf et al., 2000, 2001). Das gB zeigt im Gegensatz zum gC keine Heparansulfat-bindende Aktivität (Klupp et al., 1997a). gB wird posttranslational modifiziert, indem zwei gB-Monomere im Endoplasmatischen Retikulum (ER) zu einem homodimeren Molekül assoziieren, das daraufhin im Golgi-System durch eine zelluläre Protease gespalten wird, wobei die beiden Monomerfragmente über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden bleiben (Lukacs et al., 1985; Whealy et al., 1990; Wölfer et al., 1990). Die Bedeutung der Protease-Spaltung für die gB-Funktion ist noch nicht geklärt (Nixdorf et al., 2000).

Das nicht essentielle Glykoprotein gC (Robbins et al., 1986; Schreurs et al., 1988; Whealy et al., 1988; Zuckermann et al., 1989) vermittelt den Heparin-sensitiven und thermosensitiven ersten Schritt der biphasischen Virusadsorption, indem es an Heparansulfat-tragende Proteoglykan- (HSPG-) Rezeptoren der Wirtszelloberfläche bindet (Karger und Mettenleiter, 1993; Mettenleiter et al., 1990). Bislang wurden drei PRV-bindende HSPGs als Bestandteile der Wirtszellmembran identifiziert (Karger et al., 1996). Im N-terminalen Anteil des gC konnten drei Heparin-bindende Domänen (HBDs) lokalisiert und charakterisiert werden (Flynn et al., 1993; Flynn und Ryan, 1996; Liang et al., 1993, Rue und Ryan, 2002). Weiterhin stellt gC, zusammen mit gE und gI, eine wichtige Virulenzdeterminante dar (Mettenleiter et al., 1988) und besitzt außerdem die Fähigkeit, die C3-Komplementkomponente zu binden und somit in die Komplementkaskade einzugreifen (Huemer et al., 1992; Maeda et al., 2002).

Das Glykoprotein gD (Petrovskis et al., 1986; Wathen und Wathen, 1984) ist essentiell für die Penetration von PRV-Wildtypstämmen, nicht aber für die Ausbreitung von Zelle zu Zelle (Hanssens et al., 1995; Peeters et al., 1992a; Rauh und Mettenleiter, 1991). Es ist am nicht Heparin-sensitiven, zweiten Schritt der biphasischen Virusadsorption beteiligt, indem es, wie die meisten Alphaherpesviren, an sekundäre gD-Corezeptoren bindet (Johnson et al., 1988, 1990, Karger und Mettenleiter, 1993; Karger et al., 1995; Mettenleiter 1994, 2002b; Spear 1993). Für humane Herpesviren wurden bislang einige dieser Zelloberflächenmoleküle identifiziert (Spear et al., 2000):

HveA (HVEM = *herpesvirus entry mediator*), ein Mitglied der Tumor Necrosis Faktor- (TNF-) Rezeptorenfamilie, bindet die meisten der HSV-1 und HSV-2-Stämme (Montgomery et al., 1996; Whitbeck et al., 1997). HveB (*nectin-2*, *Prr2* = *Poliovirus receptor-related protein 2*), das wie auch die folgenden Rezeptoren HveC und HveD zur Immunglobulin-Superfamilie gehört, vermittelt die Adsorption von HSV-2, PRV und einigen HSV-Laborstämmen (ANG, Rid; Martinez und Spear, 2001; Warner et al., 1998). HveC (*nectin-1*, *Prr1*) vermittelt die Adsorption von HSV-1, HSV-2, PRV und BHV-1 (Cocci et al., 1998; Conolly et al., 2001; Geraghty et al., 1998;). Dasselbe gilt auch für porcines HveC (Milne et al., 2001). HveD, der Poliovirusrezeptor, von dem sich HveB und HveC ableiten, vermag PRV und BHV-1 zu binden (Rossmann et al., 2000; Spear et al., 2000).

Die Infektiosität einer gD-negativen und einer gD-gC-negativen PRV-Mutante *in vitro* läßt jedoch für den Vorgang der Adsorption die Existenz noch eines weiteren, bisher unbekanntem Rezeptors sowie die Beteiligung eines weiteren rezeptorbindenden Virion-Proteins vermuten, möglicherweise gB oder den gH/gL-Komplex (Karger et al., 1998; Schmid et al., 1997). Hierfür spricht auch, dass gD-Rezeptor-negative CHO-Zelllinien durch PRV infizierbar sind (Nixdorf et al., 1999). *In vivo* erwies sich die gD-negative Mutante als infektiös für den PRV Modellwirt Maus, nicht aber für den natürlichen Wirt Schwein. Mutationen in den Glykoproteinen gB und gH korrelierten mit der gD-unabhängigen Infektiosität (Schmidt et al., 1997, 2001).

Das nicht essentielle Glykoprotein gE (Hampl et al., 1984; Lukacs et al., 1985; Mettenleiter et al., 1985; Petrovskis et al., 1986b) liegt im Virion als nicht-kovalent gebundener Komplex mit dem ebenfalls nicht essentiellen Glykoprotein gI vor (Petrovskis et al., 1986b; Zuckermann et al., 1988). Es wird angenommen, dass der gE/gI-Komplex eine funktionelle Einheit darstellt, wobei jedoch nicht alle biologischen Funktionen von gE und gI von einem intakten gE/gI-Komplex abhängig sind (Jacobs, 1994; Mettenleiter, 1994; Tirabassi und Enquist, 2000).

Während die Deletion von gE und gI kaum Auswirkungen auf die Virusreplikation *in vitro* hat, stellen gE und gI die Hauptdeterminanten für den Neurotropismus und die (Neuro-) Virulenz in Modellsystemen wie Mäusen und Ratten und im natürlichen Wirt, dem Schwein dar (Babic et al., 1996; Card et al., 1992; Enquist et al., 1999; Husak et al., 2000; Jacobs, 1994; Jakobs et al., 1994; Kimman et al., 1992b; Knapp et al., 1997; Kritas et al., 1994a,b; Lomniczi et al., 1984b; Mettenleiter et al., 1987; Mulder et al., 1994; Rziha et al., 1986; Whealy et al., 1993, 1996). Weiterhin haben gE und gI einen Einfluss auf die direkte Ausbreitung des Virus von Zelle zu Zelle und sind an der Virusfreisetzung aus infizierten Zellen beteiligt (Ben-Porat et al., 1986; Jacobs et al., 1993; Mettenleiter et al., 1997; Zsak et al., 1989, 1992). gE und gI sind auch an der Virusmorphogenese beteiligt: Eine kombinierte Deletion von gE, gI und gM resultierte in einer Blockierung der Bildung von infektiösem Virus (Brack et al., 1999).

Das Glykoprotein gE kann in drei funktionell unterschiedliche Domänen unterteilt werden: eine extrazelluläre, eine transmembranäre und eine cytoplasmatische Domäne (Tirabassi et al., 1997). Während die extrazelluläre Domäne für die gE-vermittelte transsynaptische Ausbreitung notwendig ist, wird die cytoplasmatische Domäne für die

volle Expression der Virulenz benötigt (Tirabassi et al., 1997) und spielt eine Rolle bei der Virusmorphogenese (Brack et al., 2000). Eine Interaktion der cytoplasmatischen gE- und gM-Domäne mit dem C-terminalen Anteil des Tegumentproteins UL49 wurde gezeigt, eine Beteiligung an der sekundären Umhüllung wird vermutet (Fuchs et al., 2002b). Die cytoplasmatische Domäne des gI ist an der Neuroinvasion und Virulenz beteiligt (Tirabassi und Enquist, 2000). Außerdem besitzt der gE/gI-Komplex eine Fc-Bindungsaktivität für porcines IgG und trägt somit zur Reduktion der Komplement-vermittelten Cytolyse bei (Favoreel et al., 1997).

Das essentielle Glykoprotein gH (Klupp und Mettenleiter, 1991; Klupp et al., 1992) und das für PRV-Wildtypstämme essentielle Glykoprotein gL (Klupp et al., 1994) liegen im Virion in einem nicht-kovalent gebundenen Komplex als funktionelle Einheit vor (Mettenleiter, 1994). Der gH/gL-Komplex ist an der Penetration und der Ausbreitung von Zelle zu Zelle beteiligt. gH kann unabhängig von gL in das Virion eingebaut werden, nicht aber umkehrt (Klupp et al., 1997b). Das Glykoprotein gL ist, zusammen mit den Glykoproteinen gB und gH, essentiell für den transneuronalen PRV-Transport (Flamand et al., 2001).

Das Glykoprotein gK (Baumeister et al., 1995) ist essentiell für die Freisetzung von Virionen aus der Zelle, es scheint hierbei eine Fusion zwischen Virushülle und Wirtszellmembran zu verhindern. Dagegen wird gK für das Eindringen der Virionen in die Zelle nicht benötigt. Diese Beobachtungen könnten darauf hinweisen, dass die Aufnahme von α -Herpesviren in die Zelle und die Freisetzung aus der Zelle auf zwei unterschiedlichen Wegen stattfinden (Klupp et al., 1998). Für die Prozessierung des gK ist das UL20-Genprodukt erforderlich (Dietz et al., 2000).

Das nicht essentielle N-glykosylierte Glykoprotein gM und das nicht essentielle O-glykosylierte Glykoprotein gN (Dijkstra et al., 1996; Jöns et al., 1996; Masse et al., 1999) liegen im Virion ebenfalls als nicht-kovalent gebundener Komplex vor (Jöns et al., 1998). gM kann in die Virushülle ohne die Anwesenheit von gN eingebaut werden, während gM für den Einbau von gN erforderlich ist. Der gM/gN-Komplex oder gN allein scheinen an der Viruspenetration beteiligt zu sein (Jöns et al., 1998). Weiterhin zeigen gM-negative PRV-Mutanten einen streng attenuierten Phänotyp im natürlichen Wirt, dem Schwein, wobei für diesen Effekt gM allein oder der gM/gN-Komplex verantwortlich zu sein scheinen (Dijkstra et al., 1997; Jöns, et al., 1998). In einem

virusfreien *in vitro* Zellfusionstest konnte gezeigt werden, dass gM die Membranfusion inhibiert. Im Gegensatz dazu zeigten gM-negative Virusmutanten jedoch keine deregulierte Membranfusion (Klupp et al., 2000).

PRV-gp	essentiell	Funktion
gB ^a (gII) ^b	+ ^c	Penetration, Ausbreitung von Zelle zu Zelle, Induktion virusneutralisierender Serumantikörper
gC (gIII)	- ^d	Adsorption, Virusfreisetzung, (Neuro-) Virulenz, Induktion virusneutralisierender Serumantikörper
gD (gp50)	+	Adsorption, Penetration, Induktion virusneutralisierender Serumantikörper
gE (gI)	-	Virusfreisetzung, Ausbreitung von Zelle zu Zelle, (Neuro-) Virulenz, Komplex mit gI, Induktion virusneutralisierender Serumantikörper (mit Komplement)
gG (gX)	-	kein Bestandteil des Virions, wird von infizierten Zellen sezerniert
gH	+	Penetration, Ausbreitung von Zelle zu Zelle, Komplex mit gL
gI (gp63)	-	Virusfreisetzung, Ausbreitung von Zelle zu Zelle, (Neuro-) Virulenz, Komplex mit gE
gK	+	Virusfreisetzung, Ausbreitung von Zelle zu Zelle
gL	+	Penetration, Ausbreitung von Zelle zu Zelle, Komplex mit gH
gM	-	Penetration, Ausbreitung von Zelle zu Zelle, (Neuro-) Virulenz
gN	-	Penetration, (Neuro-) Virulenz?, Komplex mit gM

Tab. 1: PRV-Glykoproteine. gp = Glykoprotein; ^aneue Nomenklatur, ^balte Nomenklatur, ^c+ = notwendig, ^d- = nicht notwendig für die Virusvermehrung in Zellkultur.

2.6.1 Rolle der viralen Glykoproteine bei der protektiven humoralen und zellulären Immunantwort

Sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunantwort sind wichtig für die protektive Immunität gegen Herpesvirus-Infektion (Nash und Cambouropoulos, 1994). Während einer PRV-Infektion oder -Vakzination werden Antikörper gegen eine Vielzahl viraler Proteine wie Glykoprotein gG (Kimman et al., 1992a), IEP (Cheung et

al., 1990) und Nukleokapsid-Proteine (McGinley et al., 1989) gebildet. Für die Generierung einer protektiven Immunität spielen jedoch Antikörper gegen die viralen Hüll-Glykoproteine eine Schlüsselrolle (Ben-Porat et al., 1986; Nauwynck, 1997, Todd et al., 1987). Hierbei können Antikörper entweder direkt mit den Virionen reagieren oder eine antivirale Aktivität mit Hilfe von Komplement und Leukocyten ausüben (Nauwynck, 1997). Monoklonale Antikörper (mAb) und polyklonale Antiseren gegen gB, gC und gD neutralisierten PRV ohne Komplement (Ben-Porat et al., 1986; Coe und Mengeling, 1990; Eloit et al., 1990; Marchioli et al., 1988; Wathen et al., 1985). Nicht-neutralisierende mAb gegen gB, gC, gD und gE inaktivierten PRV in der Anwesenheit von Komplement (Fuchs et al., 1990; Nakamura et al., 1990; Wathen et al., 1985). Außerdem können spezifische humorale Antikörper an PRV-Glykoproteine binden, die an der Oberfläche infizierter Zellen exprimiert werden, und durch Interaktion mit Fc-Rezeptoren von Phagocyten (Monocyten/Makrophagen und neutrophilen Granulocyten) oder natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) eine antikörper-abhängige zellvermittelte Cytotoxizität (ADCC) induzieren (Nauwynck, 1997). NK-Zellen sind andererseits auch für die angeborene Immunität gegenüber Viren und anderen intrazellulären Pathogenen wichtig (s. u.). Polyklonale, gC-spezifische Antiseren zeigten in Gegenwart neutrophiler Granulocyten eine hohe ADCC-Aktivität, wogegen gB- und gD-Antiseren nur minimale ADCC-Aktivität aufwiesen (Iglesias et al., 1990). Passive Immunisierung mit mAb gegen gB, gC und gD schützte sowohl Mäuse als auch Schweine vor einer letalen Belastungsinfektion mit PRV-Wildtypvirus, während mAb gegen gE nur Mäusen einen protektiven Schutz verliehen (Eloit et al., 1988; Fuchs et al., 1990, Marchioli et al., 1988; Van Oirschot et al., 1990; Wathen et al., 1985).

Für die Glykoproteine gB, gC und gE ist die Lokalisation porciner antigener B-Zelldomänen durch Western-Blot-Analysen mit bakteriellen Fusionsproteinen und synthetischen Peptiden näher beschrieben (Fuchs et al., 1990; Jacobs et al., 1990; Ober et al., 2000; Zaripow et al., 1999). Für gC konnten drei dominante lineare B-Zellepitope identifiziert werden, die sich innerhalb des N-terminalen gC in einem Bereich (gC AS 65-99) befinden, der mit zwei der drei bekannten HBDs (*Heparin Binding Domains*) von gC überlappt. Eine Interferenz der Bindung von komplement-unabhängigen virusneutralisierenden Antikörpern an diese antigene gC-Domäne mit der Virusadsorption wurde gezeigt (Ober et al., 2000).

Allerdings korreliert der Serum-Antikörpertiter nicht mit dem Immunstatus eines Tieres gegen PRV-Wildtypinfektion (Martin et al., 1986; Kimman et al. 1992b; Matsuda-Tsucida et al., 1992). Die zelluläre Immunantwort wird als wichtigster protektiver Effektormechanismus gegen (Herpes-) Virusinfektion angesehen (Kimman et al., 1995, 1996; Manickan und Rouse, 1995; Nash und Cambouropoulos, 1993; Ramshaw et al., 1997; Zinkernagel et al., 1996).

Eine PRV-spezifische zelluläre Immunantwort konnte *in vitro* durch Proliferationsstimulierung und Lymphokin-Sekretion von Lymphocyten PRV-immunisierten Schweine demonstriert werden (Gutekunst et al., 1979; Kimman et al., 1995, Ober et al., 1998; Smith et al., 1977; Summerfield et al., 1996, Wittmann et al., 1976). Hierbei kommt den Glykoproteinen gB, gC, gD und gH eine wichtige stimulatorische Funktion zu (Kimman et al., 1995; Ober, 1993; Ober et al., 1998; Teufel, 1994; Vanderpooten et al., unveröffentlicht). Es wurde gezeigt, dass die CD4⁺CD8⁺ T-Lymphocytenpopulation auch *T-Memory*-Zellen (T-Gedächtniszellen) enthält, die nach Restimulierung mit (PRV-) Antigen proliferieren (Ober et al., 1998; Summerfield et al., 1996; Zuckermann und Husman, 1996). Diese Zellpopulation übt zudem klassische Helferfunktionen aus, wie über die Befähigung zur Cytokinproduktion und zur B-Zellhilfe am Beispiel PRV-spezifischer Lymphocyten gezeigt werden konnte (Fischer et al., 2000; Ober et al., 1998). Restimulierung mit synthetischen gC-Peptiden ermöglichte die Identifikation zweier T-Zellepitope für das Inzuchtschwein vom d/d Haplotyp. Für die Proliferation maßgeblich waren MHC II-restringierte, CD4⁺CD8⁺ *T-Memory*-Zellen (Ober et al., 1998).

Für PRV-Belastungsinfektion nach PRV-Immunsierung besteht eine ausgeprägte Zweiteilung zwischen der sekundären B- und T-Lymphocytenantwort, mit einem Schwerpunkt bei der T-Zellantwort. Dies unterstreicht die Bedeutung einer effektiven proliferativen *T-Memory*-Antwort für die schnelle Viruseliminierung und somit für die Entstehung einer protektiven Immunität (De Bruin et al., 1998; Kimman et al., 1995).

Die lymphoproliferative Antwort nach PRV-Infektion oder -Vakzination schließt auch das Erscheinen cytotoxischer T-Zellen (CTL) mit ein:

Es findet sich einerseits ein Anstieg der nicht MHC-restringierten zellvermittelten Cytotoxizität (Kimman et al., 1996; Wittmann et al., 1985a,b). Hierfür verantwortlich sind Zellen mit typischen Eigenschaften natürlicher Killerzellen oder Lymphokin-

aktivierter Killerzellen (LAK; Kimman et al., 1996). Auf der Oberfläche infizierter Zellen exprimiertes gB und gC waren hierbei in die Erkennung durch LAK-Zellen involviert (Kimman et al., 1996). Andererseits sind PRV-spezifische cytotoxische T-Zellen beteiligt (De Bruin et al., 2000a; Martin und Wardley, 1987; Zuckermann et al., 1990, 1999a). Eine MHC I-restringierte Cytotoxizität porciner CD8⁺ T-Lymphocyten, die vor allem gegen das PRV-Glykoprotein gC, nicht aber gegen die Glykoproteine gE, gG und gI, gerichtet war, konnte nachgewiesen werden (Zuckermann et al., 1990). PRV-Stimulierung induzierte hauptsächlich die Proliferation klassischer MHC I-restringierter CTL und der Zellfraktion, welche T-Memory-Zellen enthält, wogegen Stimulierung mit dem Cytokin Interleukin-2 (IL-2) überwiegend LAK-Zellen mit NK-Aktivität induzierte (De Bruin et al., 2000a). In der T-Memory-Zellfraktion sind offenbar auch T-Lymphocyten vorhanden, die eine MHC II-restringierte cytotoxische Wirkung auf PRV-infizierte Zellen entfalten (De Bruin et al., 2000b).

2.6.2 Rolle der viralen Glykoproteine bei der Impfstoffentwicklung

Konventionell oder gentechnologisch erzeugte Mutationen und Deletionen, die eines oder mehrere der viralen Glykoproteine sowie die viruskodierte Thymidinkinase betreffen, führten zur Etablierung attenuierter PRV-Impfvirusstämme (Lomniczi et al., 1987; Mettenleiter et al., 1985; Van Oirschot et al., 1990). Vakzinierung mit attenuierten PRV-Stämmen verleiht zwar einen protektiven Schutz gegen die Aujeszky'sche Krankheit, verhindert aber nicht eine Überinfektion durch PRV-Wildtypstämme, und sowohl Impfviren als auch Wildtypviren können in vakzinieren Tieren Latenz und immunsuppressive Effekte hervorrufen. Es kann zur Virusausscheidung und somit zur Übertragung von Impf- und Wildviren auf andere Tiere kommen. Weiterhin kann die Reversion von PRV-Impfvirusstämmen zur Virulenz durch genetische Rekombination mit PRV-Feldvirusstämmen nicht völlig ausgeschlossen werden (Haagmans et al., 1999; Mettenleiter, 1994; Wittmann und Rziha, 1989). Deshalb wird an der Entwicklung neuer attenuierter PRV-Vakzinen, Vektorvakzinen und Subunitvakzinen gearbeitet (Mengeling et al., 1997; Pensaert et al., 1992; Van Oirschot et al., 1990). Idealziel ist ein PRV-Impfstoff, der sowohl die humorale als auch die zellvermittelte Immunantwort induziert und die Exkretion

virulenter Viren und Impfviren komplett unterbindet oder maximal reduziert (Pensaert et al., 1992). So wurden gentechnisch attenuierte gD-negative PRV-Vakzinen hergestellt, die sich aufgrund der gD-Deletion im vakzinierten Tier nur von Zelle zu Zelle ausbreiten können, und die insofern eine höhere biologische Sicherheit besitzen, da diese nicht auf andere Tiere übertragen werden können, da das Glykoprotein gD essentiell für die Infektiosität freier Viruspartikel ist (Heffner et al., 1993; Mettenleiter, 1994c; Peeters et al., 1993, 1994).

Vektorvakzinen sind attenuierte Lebendimpfstoffe, die zusätzlich die genetische Information für immunogene Proteine anderer Infektionserreger tragen. Bei der Verwendung von lebenden Vektorvakzinen spielen jedoch biologische Sicherheitsaspekte hinsichtlich der Replikationsfähigkeit der Vektoren und der eventuellen Übertragbarkeit auch auf den Menschen, wie beim Vacciniavirus, eine wichtige Rolle (Mengeling et al., 1997). Inaktivierte Vakzinen oder Subunitvakzinen (einzelne Proteine) besitzen eine wesentlich höhere biologische Sicherheit, sind jedoch meist weniger effizient im Induzieren einer zellvermittelten Immunantwort als Vakzinen, die replizierende Organismen enthalten (Bernstein und Stanberry, 1999; Gerds und Mettenleiter, 2001). Als PRV-Vektorvakzinen wurden bereits *in vitro* kultivierte gD-exprimierende immortalisierte Säugierzellen (Marchioli et al., 1987), gB-exprimierendes Baculovirus (Xuan et al., 1995), Adenovirus, das gD exprimiert (Adam et al., 1994; Eloit et al., 1990; Hammond et al., 2001; Monteil et al., 2000) und Vacciniavirus, das gB, gC und gD exprimiert (Marchioli et al., 1987; Mengeling et al., 1994; Riviere et al., 1992) getestet. Glykoprotein gB (Nakamura et al., 1993; Xuan et al., 1995), Glykoprotein gD (Ishii et al., 1988) und anti-Idiotyp-anti-gD Antikörper (Tsuda et al., 1992) wurden als Subunitvakzine verabreicht. In diesen Systemen verliehen die jeweils erwähnten Glykoproteine gB, gC und gD Mäusen, Kaninchen und/oder Schweinen zum Teil eine protektive Immunität gegen PRV-Wildtypinfektion. Attenuierte PRV-Mutanten eignen sich auch als Vektoren zur Expression heterologer Gene (Peeters et al., 1997; Van Zijl et al., 1991). Die Expression des Glykoproteins E2 des Schweinepestvirus durch eine gD-/gE-negative PRV-Impfstoffmutante verlieh Schweinen protektive Immunität sowohl gegen die Aujeszky'sche Krankheit als auch gegen Schweinepest (Peeters et al., 1997).

Neuerdings wird Vakzinierung mit gereinigter DNA durchgeführt (Donelli et al., 1997). Es wurde gezeigt, dass Inokulation mit Plasmid-DNA, die für virale Gene kodiert, zur Expression des kodierten Proteins und zur Induktion einer Immunantwort führt (Ulmer et al., 1993). Obwohl DNA-Vakzinen sich im Wirt nicht replizieren, gibt es andere Aspekte, wie der mögliche Einbau in das Wirtsgenom, die eine sorgfältige Sicherheitsabschätzung dieser neuen Impfstoffe erforderlich machen (Bernstein und Stanberry, 1999). DNA-Impfstoffe befinden sich derzeit noch im Entwicklungsstadium, ihre Wirkung ist bisher meist noch unzureichend (Gerds und Mettenleiter, 2001). Immunisierung mit PRV-gC-DNA induzierte bei Schweinen eine protektive Immunität gegen Belastungsinfektion mit dem mäßig virulenten PRV-Stamm 75V19 (Gerds et al., 1997), nicht aber gegen Infektion mit dem hoch virulenten PRV-Stamm NIA-3 (Fischer et al., 2000; Gerds et al., 1997). Wurde mit einer Mischung aus gB-, gC-, gD- und gE-DNA immunisiert, wies dagegen die Mehrzahl der Versuchstiere einen Schutz gegen letale Belastungsinfektion mit NIA-3 auf (Gerds et al., 1999). Immunisierung mit gD-DNA induzierte neutralisierende Antikörper und eine proliferative Lymphocytantwort und vermittelte vollständigen Schutz gegen NIA-3-Belastungsinfektion sowohl bei Mäusen als auch bei Schweinen, nicht jedoch, falls die Immunisierung bereits bei Saugferkeln erfolgt war (Haagmans et al., 1999; Le Potier et al., 1997). Immunisierung mit gB-DNA induzierte eine zellvermittelte Immunantwort in Schweinen und reduzierte die Virusausscheidung nach der Infektion (Van Rooij et al., 2000). Eine Verstärkung der protektiven Immunantwort konnte mit gB- und gD-DNA-Vakzinen erzielt werden, indem simultan mit DNA des immunstimulatorischen Cytokins GM-CSF (Granulocyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor) immunisiert wurde (Somasundaram et al., 1999).

Alle zur Verfügung stehenden neu entwickelten PRV-Vakzinen, seien es attenuierte PRV-Vakzinen, Vektorvakzinen, Subunitvakzinen oder DNA-Vakzinen, erfüllen momentan lediglich Teilbedingungen für einen idealen PRV-Impfstoff. Zur weiteren Entwicklung verbesserter PRV-Impfstoffe sind weitere Kenntnisse über die porcine PRV-spezifische Immunreaktion erforderlich. Während für die Entwicklung von Impfstoffen gegen humane Herpesviren auf Tier-Modellsysteme zurückgegriffen werden muss, deren Übertragbarkeit auf das humane System nicht unbedingt gegeben

ist, besteht beim PRV die Möglichkeit, ein Virus und antivirale Vakzinen direkt im natürlichen Wirt, dem Schwein, zu untersuchen.

2.7 Zielsetzung

Anhand pseudorabiesviraler Glykoproteine wurden *in vitro* Untersuchungen zur porcinen PRV-spezifischen Immunantwort durchgeführt. Ein Schwerpunkt lag bei der B-Zellepitopkartierung und der T-Zellepitopkartierung und -charakterisierung des Glykoproteins gD. Weiterhin wurden frühere Arbeiten zur Identifizierung von T-Zellepitopen des Glykoproteins gB (Teufel, 1994) fortgesetzt. Die Versuche wurden zunächst mit Serum oder peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) PRV-immunisierter Inzuchtschweine vom d/d Haplotyp, mit definiertem MHC, durchgeführt. Zum Einsatz kamen u. a. Peptidsynthese, Peptid-ELISA, Konstruktion bakterieller Fusionsproteine, Proliferationstests mit PBMC, Cytokin-Tests und -PCR. Schließlich sollte die gD-T-Zellepitopkartierung und die Untersuchung bereits für das Inzuchtschwein bekannter T-Zellepitope des gB, aber auch des gC (Ober, 1993; Ober et al., 1998), auch mit PRV-spezifischen PBMC der natürlichen Schweinepopulation des Hausschweins, mit polymorphem MHC, durchgeführt werden. Diese Untersuchungen wurden im Hinblick auf eine spätere Eignung der T-Zellepitope für die Konstruktion neuer PRV-Vakzinen, wie DNA-Vakzinen, durchgeführt.

3 Material

3.1 Tiere, Zellen und Virusstämme

3.1.1 Versuchstiere

Inzuchtschweine vom d/d Haplotyp (NIH-Minipigs, Sachs et al., 1976): an der BFAV Tübingen gezüchtet.

Hausschweine der Rasse Deutsches Landschwein: vom Versuchsgut „Unterer Lindenhof“ der Universität Hohenheim, Eningen, bezogen.

3.1.2 Zellen

PBMC (porcine mononukleäre periphere Blutzellen): aus dem peripheren Blut der Versuchstiere isoliert, wurden für Proliferationstests verwendet.

MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney; ATCC Nr. CCL 22): permanente Rindernierenzelllinie, zur PRV-Virustitration eingesetzt.

PSEK: permanente Schweinenierenzelllinie, zur PRV-Virusvermehrung (Labor Dr. H.-J. Rziha, BFAV Tübingen).

HT-2-Zelllinie (ATCC Nr. CRL 1841): murine IL-2-abhängige Zelllinie (Ho et al., 1987), wurde für IL-2-Aktivierungstests verwendet.

3.1.3 Virusstämme

Phylaxia: PRV-Wildtyp-Laborstamm, zur Herstellung von Viruslysat für die Zellkultur (Labor Dr. H.-J. Rziha, BFAV Tübingen).

NIA-3: PRV-Wildtyp-Laborstamm, für die Belastungsinfektionen der PRV-immunisierten Versuchstiere verwendet (Labor Dr. H.-J. Rziha, BFAV Tübingen).

Begonia Nobiporvac: PRV-Impfvirusstamm zur Immunisierung der Versuchstiere, gE-negativ und Thymidinkinase-negativ (Firma Intervet; Visser und Lütticken, 1989).

3.2 Bakterien, Vektoren, Plasmide und Primer

3.2.1 Bakterienstämme

E. coli K12-Stämme:

DH5 α F' (Life Technologies)

W6- λ rex, C600-537 (Strebel et al., 1986)

3.2.2 Vektoren und Plasmide

pgDBSII: ein Abkömmling des Plasmides pBluescript II KS (+/-) (Stratagene). Es enthält das vollständige gD-Gen (1.209 bp) sowie stromaufwärts 40 bp des C-Terminus des gG-Gens und stromabwärts 348 bp des N-terminalen Anteiles des gI-Gens und diente als Ausgangsplasmid für die gD-(Sub-) Klonierungen. Freundlicherweise von Dr. A. Jestin, Ploufragan, Frankreich, bereitgestellt.

pSPT18 (Roche): wurde als Klonierungsvektor verwendet, trägt die MCS des pUC18 Plasmides, flankiert von den SP6- und T7-Promotoren.

pEV40a, pEV40b, pEV40c: wurde als Expressionsvektor für die gD-Fusionsproteine verwendet, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. E. Pfaff, BFAV Tübingen.

3.2.2.1 Beschreibung des Expressionsvektors pEV40 a, b, c

Der Expressionsvektor pEV40 leitet sich von den Plasmiden pEX30 bzw. pEX34 (Strebel et al., 1986) ab, mit folgenden für die Expression wichtigen Genelementen:

λ pL: der linke Promotor des Bakteriophagen Lambda, zur Transkription des Fusionsgens, der in Gegenwart des Repressors cI, bzw. dessen temperatursensitiver Variante cI857 abgeschaltet wird.

MS2-Pol: codiert für die ersten 11 Aminosäuren des Replikase-Gens des Bakteriophagen MS2, als bakteriellen Anteil des Fusionsproteins, wird für die Translation benötigt, besitzt eine ribosomale Bindungsstelle (Shine-Dalgarno-Sequenz).

6xHis: sechs eingefügte Histidin-Codons zur späteren Reinigung von Fusionsproteinen über Affinitätschromatographie mittels einer Affinitätssäule und die Erkennungssequenz einer Igase-Spaltstelle.

ori: Replikationsursprung.

MCS (*Multiple Cloning Site*): Klonierungsstelle zur Insertion des Fremdgenabschnittes in den Leserahmen der MS2-Polymerase.

Ap^R: das β -Lactamasegen zur Vermittlung der Ampicillinresistenz für die Selektion rekombinanter Klone.

Je nach Leseraster des Genabschnittes kann in pEV 40 a, b, oder c inseriert werden.

3.2.3 Primer

MS-2-Primer: zur Sequenzierung des Überganges zwischen Expressionsvektor pEV40 und gD-Insert.

GAPDH-, IL-2-, IFN- γ -Primer (Fischer et al., 2000): für RT-PCR, wurden freundlicherweise von Dr. T. Fischer, BFAV Tübingen, zur Verfügung gestellt.

3.3 Antikörper, Konjugate und Seren

3.3.1 Maus anti-Schwein monoklonale Antikörper (mAb)

anti-CD 4, 74-12-4 (IgG2b; κ); (ATCC Nr. HB 147; Pescovitz et al., 1984).

anti-CD 8, 11/295/33 (IgG2a; κ); (Jonjic und Koszinowski, 1984).

anti MHC II, MSA3 (IgG2a; κ); (Hammerberg und Schurig, 1986).

anti-MHC I, 2.27.3a (IgG2a; κ); (Ivanowska et al., 1991).

Die entsprechenden Hybridomaüberstände wurden freundlicherweise von PD Dr. A. Saalmüller, BFAV Tübingen, zur Verfügung gestellt.

3.3.2 Peroxidasekonjugate

Peroxidase-konjugiertes Kaninchen anti-Ziege IgG (H+L) F(ab')₂ (Dianova).

Peroxidase konjugiertes Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L) F(ab')₂ (Dianova).

Peroxidase konjugiertes Ziege anti-Schwein IgG (H+L) F(ab')₂ (Dianova).

3.3.3 Seren

Kaninchenserum: PRV-gD-spezifisch, freundlicherweise von Dr. Krystyna Biénkowska-Szewczyk (Universität Gdansk, Polen) zur Verfügung gestellt.

Schweineseren: PRV-spezifische Seren und Präimmunseren der Versuchstiere.

Ziegenserum: PRV-spezifisches Hyperimmunserum und Präimmunserum (BFAV, Tübingen).

3.4 Reagenzien

3.4.1 Chemikalien

β-Mercaptoethanol	Merck
β-Propiolacton	Serva
4-Chloro-1-Naphtol	Sigma
Acrylamid	Serva
Agarose für Gelelektrophorese	Life Technologies
Agarose (NuSieve)	FMC Bioproducts
Ammoniumpersulfat	Serva
Ampicillin	Life Technologies
Bacto-Tryptone	Difco. Lab.
Bacto-Yeast-Extract	Difco. Lab.
Bind-Silane	Pharmacia-LKB
Bromphenolblau	Sigma
Con A (Concanavalin A)	Pharmacia LKB
Coomassie brillant blue G250 und R250	Serva
Dextransulfat	Sigma
DIC	Fluka
Diethylether	SDS
DMF	Fluka
DMSO	Sigma
DTT (0,1 M)	Life Technologies

EDTA	Life Technologies
Ethanol, unvergällt 99,8 %	Roth
Ethidiumbromid	Roche
Ficoll Hypaque	Pharmacia LKB
Fmoc-Aminosäuren	Nova-Biochem
Formamid (deionisiert)	Life Technologies
Harnstoff	Roth
Heparin (186 IU / mg)	Serva
HEPES	Serva
HOBt	Fluka
Interleukin-2, humanes, rekombinantes	Roche
Kanamycin	Life Technologies
Kationenaustauscher Amberlite MB-1 (20-50)	Serva
LB broth base	Life Technologies
Magnesiumchlorid für PCR (50 mM)	Life Technologies
Methocel (Methylcellulose)	Fluka
OPD (ortho-Phenylendiamin-Dihydrochlorid)	Sigma
PEG (Polyethylenglykol)	Roche
Penicillin	Grünthal
PIPES	Serva
Repel-Silane	Pharmacia-LKB
Rink-Amid-MBHA-Harz	Nova-Biochem
Roentogen (Entwickler)	Tetenal
Silikonlösung in Isopropanol	Serva
Streptomycin	Heyl
Sucrose	Serva
Superfix (Schnellfixierer)	Tetenal
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	BIO-RAD
TFA	SDS
Tris (Tris-hydroxymethyl-aminomethan)	Life Technologies
Trypanblau	Sigma
Trypton	Life Technologies
Tween 20, rein	Serva
Wasserstoffperoxid, H ₂ O ₂	Merck
Zitronensäure-Monohydrat, z.A.	Merck

Alle anderen Chemikalien wurden von den Firmen Fluka, Merck, Serva, Sigma und Roth bezogen.

3.4.2 Nukleinsäuren und Nukleotide

DNA-Größenmarker (123 bp und 1kbp)	Life Technologies
dATP, dCTP, dGTP und dTTP	Pharmacia-LKB

[³ H]-Methyl-Thymin (1 Ci/ ml)	Amersham-Biosciences
[α ³⁵ S] dATP (10 mCi/ml)	Amersham-Biosciences
Random-Primer (lyophilisiert)	Invitrogen

3.4.3 Proteine

BSA (nukleasefrei)	Pharmacia-LKB
Protein-Größenmarker (14-200 kDa)	Life Technologies
Protein-Größenmarker, <i>prestained</i> (7-200 kDa)	BIO-RAD

3.4.4 Enzyme

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

CIP (calf intestinal phosphatase)	Roche
DNase freie RNase (0,5 µg/µl)	Roche
Lysozym aus Hühnereiweiß	Roche
RNase A	Roche
RNasin (200-40 U/µl)	Promega
SuperScriptII™ Reverse Transcriptase	Life Technologies
Taq DNA-Polymerase	Life Technologies
T4 DNA-Ligase (400 U/µl)	New England Biolabs

3.4.5 Reagenzienansätze (*Kits*)

Qiaex Gel Extraction Kit	Qiagen
<i>Silver Stain Kit</i> für SDS-Polyacrylamidgele	BIO-RAD
T7-Sequencing Kit	Pharmacia-LKB
Trizol-Reagenz (RNA-Isolierung)	Life Technologies

3.5 Geräte und Laborhilfsmittel

API III Triple-Quadrupol Ionspray-MS	Sciex
Brutschränke für Bakterienkulturen	Heraeus
Brutschränke für die Zellkultur	Forma Scientific
Cell Harvester	Inotech
Eismaschine AF 20	Scotsman
Elektroblotkammer MilliBlot™ - SDE System	Millipore
ELISA-Reader Multiskan MC	Titertek
Feinwaagen M160 / M80 und SM1000	Sauter
Folienschweißgerät C400	Joisten und Kettenbaum
Geltrockner SE1160	Hoefler
Gießapparatur für Macromould Sequenzgele 2010-100	Pharmacia-LKB
Horizontale Gelelektrophoresesysteme	Life Technologies
Kühlwasserbad Frigomix 1495 mit Thermomix 1441	Braun
Land Camera MP-4	Polaroid
Magnetrührer	IKA Combimag
Mikropipetten, verstellbar	Gilson, Abimed, Eppendorf
Mikrowellenherd Mikromat	AEG
Milli Q-Ultrafiltrationsanlage	Millipore
Neubauer Zählkammer	Brand
PCR-TRIO-Thermoblock™	Biometra
Peptidsynthesizer „Syro Pipettierroboter“	MultisynTech
pH-Messgerät pH 521	WTW
Pipettierhilfe Acuboy	Tecnomara
Polaroidfilme 665, 667	Polaroid
Röntgenfilme Hyperfilm β -Max	Amersham-Biosciences
Röntgenfilmkassette mit Verstärkerfolie Curix MR 600	AGFA
Schüttelinkubator G25	New Brunswick
Schüttler SM 25	Bachofer
Schwarz-Weiß-Densitometer TRD2	Heiland electronic
SDS-PAGE Apparatur „Minigel-Twin“	Biometra
Sequenzapparatur Macrophor 2010	Pharmacia-LKB
Spannungsgerät MACDRIVE 5 (für Sequenzgele)	Pharmacia-LKB
Spannungsgerät Modell 200/2.0	Bio-RAD
Spannungsgerät Power Pack P25	Biometra
Spektrophotometer DU64	Beckman
Spektrophotometer Gene Quant	Pharmacia-LKB
Sterile Arbeitsbänke	CEAG, BDK, Heaeus
Szintillationszähler, Microbeta 1450	Wallac
Transilluminator (254 nm)	Ultra Violet Products
Transilluminator (366 nm)	Bachofer
Ultraschallgerät Sonifier B-12	Branson
Ultrazentrifuge L5-50 (Rotoren: SW 28, SW 41, SW 50.1, 50 Ti, VTi 65)	Beckmann

Umkehrmikroskop Diavert	Leitz
UV-Crosslinker Stratalinker™ 1800	Stratagene
Vakuumkonzentrator	Bachofer
Vakuum Blot System Vacu Aid	Hybaid
Vortex	Scientific Industries
Wasserbäder/Schüttelwasserbäder	Köttermann
Zentrifuge 2 MK	Sigma
Zentrifuge 5415C, 5417R	Eppendorf
Zentrifuge J2-21 (Rotoren JA-10, -14 und -17)	Beckman
Zentrifuge Minifuge 2	Heraeus

3.6 Laborartikel

96-well Mikrotiterplatten und Abdeckplatten	Greiner
Einfrierröhrchen	Greiner
Einschweißfolien, Sample Bag	Wallac
Einweg-Zellkulturgefäße	Costar, Greiner
Eppendorf-Reaktionsgefäße (0,5, 1,5 und 2,0 ml)	Eppendorf
Feststoffsintillator: Meltilex A	Wallac
Gaze (Monodur)	Verseid AG
Glasfaser-Filtermatten: Printed Filtermat A	Wallac
Nitrocellulosemembran BA-S 85 (reinforced)	Schleicher und Schuell
Nylonmembran Hybond-N+	Amersham-Biosciences
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Costar
Pipettenspitzen	Greiner
Polypropylenröhrchen, 15 ml und 50 ml	Greiner
Spritzen und Kanülen (Sterican)	Braun
Sterilfilter 0,2, 0,22 und 0,45 µm	Schleicher und Schuell
TALON™-Säulen	Clontech
Whatman-Blottingpapier	Schleicher und Schuell

3.7 Puffer und Lösungen

3.7.1 Puffer und Lösungen für die Zellkultur

Einfriermedium:

50 % (v/v) RPMI

40 % (v/v) hitzeinaktiviertes FCS

10 % (v/v) DMSO

Kälberserum:

Fötale Kälberserum wurde von der Firma Roche bezogen, 30 min bei 56 °C inaktiviert, portioniert und bei -20 °C gelagert.

MEM und MEM-NEAA:

MEM (*minimum essential medium*) sowie dessen Modifikation MEM-NEAA (*non essential amino acids*, Zusatz nicht essentieller Aminosäuren) wurden als Pulvermedien von der Firma Life Technologies bezogen, nach Angaben des Herstellers einfach oder doppelt konzentriert angesetzt und sterilfiltriert. Allen Medien wurde vor Gebrauch 100 IE/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugesetzt.

Methocelmedium:

15 g Methylcellulose wurden in 300 ml H₂O bidest. autoklaviert, abgekühlt und mit 300 ml doppelt konzentriertem MEM bei 4 °C gerührt, bis die Methylcellulose vollständig gelöst war. Zuletzt wurden 300 ml MEM/10 % FCS/Pen/Strep zugefügt.

Penicillin/Streptomycin:

1 Million IE Penicillin und 1 g Streptomycin wurden in 10 ml PBS gelöst, sterilfiltriert und in Portionen bei -20 °C gelagert.

RPMI:

wie RPMI-complete nur ohne FCS

RPMI-complete:

RPMI 1640-Medium (Life Technologies) wurde nach Angaben des Herstellers angesetzt, sterilfiltriert und mit folgenden Zusätzen versehen:

2 mM	L-Glutamin
5 x 10 ⁻⁵ M	2-Mercaptoethanol
10 mM	HEPES (pH 7,2)
100 IU/ml	Penicillin G
0,1 mg/ml	Streptomycinsulfat
10 % (v/v)	hitzeinaktiviertes FCS

TPB-Lösung:

59 g Tryptose phosphate broth (TPB, Difco) wurden in 2 l H₂O bidest. gelöst und sterilfiltriert.

Versen-Trypsin-Lösung:

0,125 % (w/v) Trypsin

0,025 % (w/v) EDTA

0,4 % (w/v) NaCl

0,01 % (w/v) KCl

0,01 % (w/v) KH₂PO₄

0,057 % (w/v) NaH₂PO₄

3.7.2 Puffer und Lösungen für die Bakterienkultur

Antibiotika:

10 mg/ml Ampicillin (Amp) oder Kanamycin (Kan) wurden in H₂O bidest. gelöst, sterilfiltriert und in Portionen bei -20 °C gelagert.

HMFM (*Hogness modified freezing medium*):

3,6 mM K₂HPO₄

1,6 mM KH₂PO₄

2,0 mM Natriumcitrat

1,0 mM MgSO₄ x 7 H₂O

4,4 % (v/v) Glycerol

autoklavieren.

LB-Medium:

10 g Bacto-Trypton

5 g Bacto-Hefeextrakt

5 g NaCl

2 mM 2 N NaOH (pH 7,0)

ad 1 l H₂O bidest.

autoklavieren und nach dem Abkühlen nach Bedarf 100 µg/ml Amp und/oder 50 µg/ml Kan zugeben.

LB/Amp-Agaroseplatten:

20 g LB broth base

10 g Agarose

ad 1 l H₂O bidest.

autoklavieren und 10 ml Amp-Stammlösung zugeben.

SOB-Medium:

20 g Bacto-Trypton

5 g Bacto-Hefeextrakt

580 mg NaCl

190 mg KCl

ad 1 l mit H₂O bidest.

autoklavieren, nach dem Abkühlen 10 ml sterilfiltriertes 1 M MgCl₂ und 10 ml sterilfiltriertes 1 M MgSO₄ zugeben.

SOC-Medium:

SOB-Medium mit 20 mM Glucose (aus sterilfiltrierter 1 M Glucoselösung)

TB-Medium:

12 g Bacto-Trypton

24 g Bacto-Hefeextrakt

4 ml Glycerol

ad 900 ml H₂O bidest.

autoklavieren, nach dem Abkühlen 100 ml sterilen Kaliumphosphatpuffer und nach Bedarf 100 µg/ml Amp und/oder 50 µg/ml Kan zugeben.

**3.7.3 Puffer und Lösungen für DNA-Isolierung, -Klonierung und -
Elektrophorese**

BSE:

50 % (w/v) Sucrose

50 mM EDTA (pH 8,0)

0,5 % (w/v) SDS

0,06 % (w/v) Bromphenolblau

CIP-Puffer:

50 mM Tris-HCl (pH 8,0)

0,1 mM EDTA (pH 8,0)

DTT-Kaliumacetat:

2,25 M DTT

40 mM Kaliumacetat, pH 6,0

sterilfiltrieren, bei -20 °C lagern.

Ethidiumbromid-Stammlösung:

10 mg/ml Ethidiumbromid wurden in H₂O bidest. gelöst und vor Gebrauch auf 0,3 µg/ml in 1X TAE verdünnt.

Glucose-EDTA-LysozymbLösung:

50 mM Glucose 0,9 g

10 mM EDTA (pH 8,0)

25 mM Tris HCl (pH 8,0)

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

IAC:

24 Teile Chloroform wurden mit einem Teil Isoamylalkohol gemischt.

Kaliumacetat/Essigsäure-Lösung:

60 ml 5 M Kaliumacetat

11,5 ml Eisessig

28,5 ml H₂O bidest.

Kaliumphosphatpuffer:

0,17 M KH₂PO₄

0,72 M K₂HPO₄

NaOH/SDS:

0,2 N NaOH

1 % (w/v) SDS

PEG/NaCl:

20 % (v/v) PEG (6000-8000)

2,5 M NaCl

PMQN:

500 g Phenol

0,5 g 8-Hydroxychinolin

55 ml 0,15 M NaCl

70 ml m-Cresol

Die Lösung wurde durch Extraktion mit 0,1 M Tris-HCl (pH 8,0) auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt, mit TE (pH 8,0) abgesättigt und bei 4 °C aufbewahrt.

50X TAE:

2 M Tris

250 mM Natriumacetat

50 mM EDTA

Mit Essigsäure wurde ein pH-Wert von 7,8 eingestellt.

TE:

10 mM Tris-HCl

1 mM EDTA

Es wurde ein pH-Wert von 7,4 oder 8,0 eingestellt.

TENS-Lösung:

10 ml TE (pH 8,0)

100 µl 10 N NaOH

500 µl 10 % (w/v) SDS

TFB:

10 mM K-MES (pH 6,2)

100 mM RbCl₂

45 mM MnCl₂ x 4 H₂O

10 mM CaCl₂ x 2 H₂O

3 mM Hexamin-Kobalt(III)-Chlorid

sterilfiltrieren und in Portionen bei -20 °C lagern.

TFB-I:

30 mM Kaliumacetat

50 mM MnCl₂

100 mM RbCl₂

10 mM CaCl₂

15 % (v/v) Glycerol

pH 5,8 einstellen, sterilfiltrieren und in Portionen bei -20 °C lagern.

TFB-II:

10 mM MOPS (pH 7,0)

75 mM CaCl₂10 mM RbCl₂

15 % (v/v) Glycerol

sterilfiltrieren und in Portionen bei -20 °C lagern.

3.7.4 Puffer und Lösungen für die DNA-Sequenzierungen**40 % Acrylamidlösung:**

38 g Acrylamid

2 g N'N-Methylen-bisacrylamid

Mit H₂O bidest. wurde auf 100 ml aufgefüllt und gelöst, anschließend mit 5 g Kationenaustauscher Amberlite MB 1 h 30 min gerührt, filtriert und bei 4 °C gelagert.

Sequenzgele (6 % Polyacrylamid/ 7M Harnstoff):

21 g Harnstoff

7,5 ml 40 % Acrylamidlösung

5 ml 10 x TBE

21,5 ml H₂O

Die Lösung wurde 15 min unter Vakuum gerührt, filtriert und vor dem Gießen 300 µl Ammoniumpersulfat und 30 µl TEMED zugegeben.

10X TBE (Tris-Borat-Elektrophoresepuffer):

890 mM Tris

890 mM Borsäure

25 mM EDTA

ad 1000 ml H₂O bidest.

3.7.5 Puffer und Lösungen für die RT-PCR

DEPC/H₂O:

0,1 % (v/v) DEPC wurde in H₂O bidest. ÜN gerührt und anschließend autoklaviert.

dNTP-Mix:

100 mM Stammlösungen der vier dNTP's wurden zu gleichen Teilen gemischt. Die so gewonnene 25 mM Lösung für jedes dNTP wurde mit doppelt autoklaviertem H₂O bidest. auf die gewünschte Endkonzentration gebracht. Der dNTP-Mix wurde portioniert und bei -20 °C gelagert.

First Strand Puffer 5X:

Der Reaktionspuffer für die Erststrangsynthese einer cDNA wurde von Life Technologies bezogen. Er wurde bei -20 °C aufbewahrt.

Paraffinöl:

Das Öl wurde portioniert und zweimal autoklaviert.

PCR-Puffer:

Der 10-fach-konzentrierte PCR-Puffer wurde von Life Technologies bezogen und bei -20 °C gelagert.

3.7.6 Puffer und Lösungen für ELISA, Peptidchemie, Proteinbestimmung und Zellkultur-Versuche

Concanavalin A- (Con A-) Stammlösung:

20 mg Con A auf 20 ml H₂O bidest., sterilfiltrieren (0,45 µm), in 1 ml Portionen bei -20 °C lagern.

Erythrocyten-Lysispuffer:

8,29 g NH₄Cl

1,0 g KHCO₃

0,372 g EDTA

Mit H₂O bidest. auf 1 l auffüllen, mit NaOH und HCl pH 7,3 einstellen.

Formalin 5 %:

5 ml Formalin (37 %ig) wurden mit 95 ml H₂O bidest. vermischt.

Lowry A:

50 ml 2 % (w/v) Na₂CO₃ / 0,1 N NaOH

0,5 ml 1 % (w/v) CuSO₄ x 5 H₂O

0,5 ml 2 % (w/v) Kaliumnatriumtartrat-Tetrahydrat

Lowry B:

8 ml Folin-Ciocalteus Phenolreagenz

5 ml H₂O bidest.

Kristallviolett 1 %:

1 g Kristallviolett wurde in 100 ml 50 % Ethanol gelöst.

OPD-ELISA-Substratpuffer:

4,67 g Zitronensäure

9,15 g NaHPO₄

0,5 g OPD

ad 1 l mit H₂O bidest.,

in Portionen bei -20 °C lagern.

PBS (Phosphat-gepufferte Saline):

8 g NaCl

0,2 g KCl

0,1 g CaCl₂

0,1 g MgCl₂x 6 H₂O

0,2 g KH₂PO₄

1,12 g Na₂HPO₄

ad 1 l mit H₂O bidest.

PBS-A:

PBS ohne CaCl₂ und MgCl₂

Reagenz K:

82,5 % (v/v) TFA

5 % (v/v) Phenol

5 % (v/v) Thioanisol

2,5 % (v/v) 1,2-Ethandithiol

5 % (v/v) H₂O bidest.

Trypanblau:

0,25 % (w/v) Trypanblau

0,15 M NaCl

3.7.7 Puffer und Lösungen für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Acrylamid-Stammlösung 30 %:

29 g Acrylamid

1 g N,N'-Methylen-bisacrylamid

ad 100 ml H₂O bidest.

lösen, filtrieren (0,45 µm), bei 4°C lagern.

Coomassie-Färbelösung:

2,0 g Coomassie Brilliant Blau R 250

0,5 g Coomassie Brilliant Blau G 250

425 ml Ethanol

50 ml Methanol

100 ml Essigsäure

425 ml H₂O bidest.

ÜN unter Rühren lösen und vor Gebrauch filtrieren.

Entfärbelösung:

5 % (v/v) Methanol

7,5 % (v/v) Essigsäure

in H₂O bidest.

Laufpuffer 5X:

15,1 g Tris-Base

72,0 g Glycin

5,0 g SDS

ad 1 l mit H₂O bidest.

pH 8,3 einstellen.

Sammelgellösung (5 %ig, 2 ml pro Gel):

0,33 ml 30 % Acrylamid-Stammlösung

0,4 ml 0,625 M Tris/HCl pH 6,8

0,4 ml 0,5 % (w/v) SDS

0,87 ml H₂O bidest.

2 µl TEMED

10 µl 10 % (w/v) Ammoniumpersulfatlösung

Die Ammoniumpersulfatlösung wurde stets neu zubereitet und bis zum Gebrauch bei 4 °C aufbewahrt.

SDS-Probenpuffer (reduzierend):

2 ml 0,625 M Tris/HCl pH 6,8

0,2 g SDS

5 ml Glycerin

0,5 ml β-Mercaptoethanol

0,1 ml Bromphenolblau (1 % igeLösung in Ethanol)

2,4 ml H₂O bidest.**Trenngellösung (6 ml pro Gel):**

Acrylamidkonzentration in %	10,0	12,5
30 % Acrylamid-Stammlösung in ml	2,0	2,5
1,88 M Tris/HCl pH 8,8 in ml	1,2	1,2
0,5 % (w/v) SDS in ml	1,2	1,2
H ₂ O bidest. in ml	1,6	1,1
TEMED in µl	5	5
Ammoniumpersulfatlösung, 10 %ig in µl	30	30

3.7.8 Puffer und Lösungen für Western-Blot-Analysen

Block-Lösung:

3 % (w/v) BSA

0,05 % (v/v) Tween 20 (rein)

in 1X PBS

alternativ zur 3 % BSA-Lösung wurde eine 10 % (w/v) Magermilchpulver-Lösung verwendet.

Peroxidase-Substratlösung (Chloronaphtol-Lösung):

30 mg 4-Chloro-1-Naphtol wurden in 10 ml Methanol gelöst, direkt vor Gebrauch wurden 40 ml PBS-A und 50 µl Perhydrol (30 % H₂O₂) zugeben und sofort gemischt.

Transferpuffer:

200 ml 5X Laufpuffer für SDS-Page

200 ml Methanol

800 ml H₂O bidest.

Waschlösung: 0,05 % (v/v) Tween 20 (rein), in 1X PBS

3.7.9 Puffer für die TALON-Affinitätschromatographie

Lysis-Puffer

50 mM NaH₂PO₄ (pH 8,0)

10 mM Tris-HCl (pH 8,0)

6 M Harnstoff

100 mM NaCl

pH 8,0

Elution-Puffer

50 mM NaH₂PO₄ (pH 6,0-6,3)

8 M Harnstoff

20 mM PIPES (pH 6,0-6,3)

100 mM NaCl

pH 6,0 - 6,3

Sonication-Puffer

50 mM NaH₂PO₄ (pH 8,0)

10 mM Tris-HCl (pH 8,0)

100 mM NaCl

pH 8,0

4 Methoden

4.1 Zellkultur

4.1.1 Kultivierung von Zellen

Die Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Zellkulturmedien wurden vor Gebrauch, sofern nicht anders angegeben, im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Zellen und Zelllinien wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ in den entsprechenden Kulturmedien in Plastikkulturgefäßen kultiviert. Als Kulturmedium wurde für MDBK-Zellen MEM + 10 % FCS und für PSEK-Zellen MEM + NEAA + 10 % TPB+ 5 % FCS verwendet. HT-2-Zellen wurden in RPMI-complete + 50 U/ml humanem rekombinantem (hr) IL-2 und PBMC in RPMI-complete kultiviert. Die adhären wachsenden MDBK- und PSEK-Zellen wurden meist nach Ausbildung eines konfluenten einschichtigen Zellrasens umgesetzt. Hierzu wurde das Medium abgenommen und der Zellrasen einmal mit Versen-Trypsinlösung (1 ml/25 cm²) gespült, die gleiche Menge Versen-Trypsinlösung erneut zugegeben, und die Zellen während ca. 10 min bei 37 °C vom Kulturgefäßboden abgelöst. Die Einzelzellen wurden resuspendiert, 1 : 2 - 1 : 6 verdünnt und in frische Kulturgefäße ausgesät. Die in Suspensionskultur wachsenden HT-2-Zellen wurden ebenfalls 1 : 2 - 1 : 6 verdünnt in frische Kulturgefäße überführt. Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) wurden kultiviert wie beim PBMC-Proliferationstest (→ 4.4.2) beschrieben.

4.1.2 Einfrieren von Zellen

Eine Zellsuspension wurde 10 min bei 1000 rpm und 4 °C sedimentiert. Portionen von 2 x 10⁷ bis 4 x 10⁷ Zellen wurden auf Eis in 1 ml eiskaltem Einfriermedium resuspendiert und in Einfrierröhrchen gefüllt. Die Zellen wurden zunächst bei -70 °C für 24 h tiefgefroren und danach zur weiteren Lagerung in flüssigen Stickstoff (-196 °C) überführt, in dem sie jahrelang lebensfähig bleiben.

4.1.3 Auftauen von Zellen

Tiefgefrorene Zellen wurden im Wasserbad bei 37 °C rasch bis zum Gefrierpunkt aufgetaut. Dann wurden sie sofort in 20 ml 4 °C kaltem Kulturmedium aufgenommen und 2-mal 10 min bei 1000 rpm und 4 °C gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in der gewünschten Verdünnung mit auf 37 °C vorgewärmtem Kulturmedium in Kultur genommen.

4.1.4 Zellzahl-Bestimmung

Zehn µl einer Zellsuspension wurden mit 90 µl Trypanblau-Lösung gemischt und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt, indem die Anzahl (n) lebender Zellen pro Großquadrat ausgezählt wurde. Blau gefärbte, tote Zellen wurden nicht gezählt. Die Anzahl lebender Zellen pro ml Suspension wurde nach folgender Formel berechnet:

$$n \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 = \text{Zellen/ml.}$$

4.2 Virusanzucht und -reinigung

4.2.1 PRV-Virusanzucht

PSEK-Zellen wurden inkubiert, bis der Zellrasen zu ca. 90 % konfluent war. Dann wurde das Kulturmedium abgenommen und der Zellrasen mit 1 ml Virussuspension pro 25 cm² Kulturgefäßfläche und einer MOI (*multiplicity of infection*) von 0,1 - 1 pfu (*plaque forming units*) pro Zelle infiziert. Nach 1 h Virusadsorption bei 37 °C wurde mit frischem Medium aufgefüllt und bis zur Ausprägung eines vollständigen cytopathogenen Effektes (CPE) weiter inkubiert (ca. 3 - 5 Tage). Daraufhin wurde die Zell-Virussuspension 3-mal bei -70 °C tiefgefroren und bei 37 °C getaut, um Zellen zu lysieren und noch in den Zellen befindliche Virionen freizusetzen. Das Lysat diente als Virusstammlösung und wurde bei -70 °C gelagert.

4.2.2 Reinigung von PRV-Virionen

Eine PRV-Virusstammlösung wurde 15 min bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. In SW28-Zentrifugenröhrchen wurden 25 ml des Überstandes auf 10 ml 30 % (w/v) Sucrose in TE (pH 8,0) geschichtet und 2 h bei 20000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Danach wurde die Lösung abgesaugt, das Virussediment in einem kleinen Volumen PBS aufgenommen, der Proteingehalt bestimmt und die gereinigten PRV-Virionen bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C oder -70 °C aufbewahrt.

4.2.3 Virustitration

Die Anzahl infektiöser Partikel einer Virussuspension wurde über den Plaquetest bestimmt. MDBK-Zellen wurden in 24-well-Makrotiterplatten zu einem einschichtigen konfluenten Zellrasen angezogen. Die zu untersuchende PRV-Virussuspension wurde in MEM in Zehnerschritten verdünnt. Nach Abnahme des MDBK-Mediums wurde der Zellrasen mit jeweils 200 µl/well der verschiedenen Verdünnungsstufen 1 h bei 37 °C zur Virusadsorption inkubiert. Nach Absaugen der Infektionslösung wurde der Zellrasen 2-mal mit PBS gewaschen und mit 1 ml 1X Methocelmedium/well überschichtet. Dieses halb feste Medium minimiert die Freisetzung von Virionen aus den infizierten Zellen, so dass diskrete Virusplaques entstehen können. Nach 3- bis 4-tägiger Inkubation bei 37 °C und Ausbildung sichtbarer Plaques, wurde der Zellrasen mit 5 % Formalin für 30 min bei RT fixiert und mit Leitungswasser gespült. Anschließend wurden die Zellen mit 1 % Kristallviolett in 50 % Ethanol für 20 min angefärbt und nochmals mit Leitungswasser gespült. Die infektiösen Einheiten konnten als *plaque forming units* (pfu) pro ml Zellsuspension durch Auszählen der Virusplaques bestimmt werden. Die Virustitrationen wurden jeweils in Doppelansätzen durchgeführt und die Mittelwerte bestimmt.

4.2.4 Virusinaktivierung mit UV

Eine PRV-Virussuspension mit einem Titer von mindestens 1×10^8 pfu/ml wurde in 10 ml Portionen in Plastik Kulturschalen (58 cm^2 Grundfläche) auf Eis gestellt und 15 min mit kurzwelligem UV-Licht (254 nm) in 10 cm Abstand zur Lichtquelle bestrahlt (UV-Crosslinker StratalinkerTM 1800). Die Virussuspension wurde durch 15 min Zentrifugation bei 4000 rpm und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ von Zelltrümmern geklärt und bis zur weiteren Verwendung bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ oder länger bei $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

4.2.5 Virusinaktivierung mit β -Propiolacton

Eine PRV-Virussuspension mit einem Titer von mindestens 1×10^8 pfu/ml wurde mit einer β -Propiolacton- (β -PL-) Verdünnung (1 : 10 in H_2O bidest.) versetzt, so dass eine β -PL-Endkonzentration von 0,08 % erhalten wurde. Alle nun folgenden Arbeitsschritte wurden unter Einhaltung eines neutralen pH-Wertes durchgeführt, wobei als Anhaltspunkt die Indikatorfarbe des Kulturmediums diente. Der pH-Wert zeigte eine Tendenz zur Abnahme und wurde dann sofort mit 1 N NaOH wieder korrigiert. Zuerst wurde der Ansatz für 30 min auf Eis unter gelegentlichem Schütteln gekühlt, daraufhin 4 h unter ständigem Schütteln bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert und anschließend ohne Schütteln 48 h bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt. Es bildete sich ein weisslicher Bodensatz, der durch 15 min Zentrifugation bei 4000 rpm und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ sedimentiert wurde. Der das inaktivierte Virus enthaltende Überstand wurde in Portionen bei $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert oder bei baldiger Verwendung bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

4.2.6 Überprüfung der Virusinaktivierung

Die Virusinaktivierung wurde durch „Infektion“ von PSEK-Zellen mit UV-inaktiviertem oder β -PL-inaktiviertem PRV und Passage der so behandelten Zellen über 10 Tage überprüft. Zeigte sich kein cytopathogener Effekt (CPE), galt die Virussuspension als inaktiviert.

4.3 Tierversuche

4.3.1 Immunisierung der Versuchstiere und Belastungsinfektion

Die Versuchstiere (Alter ca. 4 - 6 Wochen) wurden 2-mal im Abstand von vier Wochen intranasal mit dem PRV-Impfstamm Begonia (Nobiporvac Aujeszky®) geimpft. Hierbei handelte es sich um eine Thymidinkinase-negative, Glykoprotein gE-Deletionsmutante, die auf der Basis des virulenten Wildtypstammes NIA-3 (McFerran und Dow, 1975; Van Oirschot et al., 1984) hergestellt wurde (Visser und Lütticken, 1989). Die erste Impfung wurde mit 50-facher, die zweite Impfung mit 25-facher Impfdosis (= 1×10^6 pfu) durchgeführt. Belastungsinfektionen wurden zwei bis mehrere Monate nach der zweiten Immunisierung, durch intranasale Verabreichung von 1×10^7 pfu des PRV-Wildtypstammes NIA-3, durchgeführt.

4.3.2 Blutprobenentnahme

Blutproben der Versuchstiere wurden bei der Schlachtung unter sterilen Bedingungen aus der Vena jugularis externa gewonnen und sofort für die Serumgewinnung und die PBMC-Isolierung eingesetzt.

4.3.3 Serumgewinnung

Frisches Blut wurde in 50 ml Plastikröhrchen überführt, bis zur vollständigen Gerinnung bei RT belassen und dann 20 min bei 2000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das klare Serum wurde abgenommen und bis zur weiteren Verwendung in Western-Blot-Analysen oder ELISA-Tests bei -20 °C gelagert.

4.4 *In vitro*-Versuche mit peripheren mononukleären Zellen (PBMC)

4.4.1 Isolierung mononukleärer Zellen (PBMC-Isolierung)

Heparinisiertes Blut (0,1 mg Heparin/ml Blut) wurde 1 : 1 mit PBS-A verdünnt. 15 ml Ficoll-Hypaque (1,077 g/ml; Boyum, 1964) wurden in 50 ml Plastikröhrchen bei RT mit 30 ml Zellsuspension überschichtet und 30 min bei 2000 - 2500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Hierbei sedimentieren Erythrocyten und Granulocyten, die intermediäre Bande zwischen Ficoll und Serum enthält die mononukleären Leukocyten (PBMC). Diese Bande wurde abgenommen, mit dem 10-fachen Volumen eiskaltem PBS-A vermischt und 10 min bei 1500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 4 ml Erythrocyten-Lysispuffer resuspendiert, um noch vorhandene Erythrocyten zu entfernen. Nach 10 min Inkubation bei RT wurde mit 40 ml eiskaltem PBS-A aufgefüllt und erneut zentrifugiert (1500 rpm, 4 °C). Abschließend wurde das Zellsediment in 5 - 10 ml RPMI-complete resuspendiert, die Zellsuspension durch sterile Gaze filtriert und die Zellzahl bestimmt.

4.4.2 PBMC-Proliferationstest

PBMC wurden in Rundboden-Mikrotiterplatten bei einer Zellzahl von $1 - 2 \times 10^5$ Zellen pro well (200 µl Medium/Vertiefung) in einer Zellkonzentration von $1 - 2 \times 10^6$ /ml in RPMI-complete (10 % FCS) ohne Antigen (Spontanproliferation) oder unter Zugabe verschiedener Antigenkonzentrationen oder Concanavalin A (Con A) inkubiert.

Zur Herstellung der Verdünnungen wurden synthetische Peptide in DMSO in einer Konzentration von 10 mg/ml vorgelöst. Synthetische Peptide und Fusionsproteine wurden in den Konzentrationen 20 - 0,01 µg/well, UV- oder β-PL-PRV, als Kontrolle der spezifischen Stimulation, in den Konzentrationen 2,5 oder 1,25 moi/well und Con A als Mitogen zur Kontrolle der unspezifischen Stimulationsfähigkeit der PBMC in der Verdünnung 1 - 10 µg/ml eingesetzt. Die Bestimmung der Zellproliferation erfolgte durch Quantifizierung des Einbaus von ^3H -Thymidin in neu synthetisierte DNA. Hierzu wurden nach 120 h 37 kBq (1 µCi)/well ^3H -Thymidin, das in 20 µl RPMI-complete

(10 % FCS) aufgenommen worden war, zugegeben und die Kulturen für weitere 18 h inkubiert. Dann wurde durch Einfrieren der Mikrotiterplatte bei -20 °C der ³H-Thymidin-Einbau beendet und gleichzeitig die Zellen lysiert. Mit einem *Cell Harvester* wurde der Inhalt der Mikrotiterplatte auf Glasfaser-Filtermatten gesaugt. Diese wurden ÜN bei RT getrocknet. Eine Feststoff-Szintillatorplatte wurde anschließend auf die Filtermatte aufgeschmolzen (Mikrowellenherd, 160 Watt). Nach Abkühlen des Szintillators bei RT wurde die Filtermatte in einen durchsichtigen Plastikbeutel eingeschweißt und die Radioaktivität der Einzelkulturen in *counts per minute* (cpm) im Szintillationszähler (Mikrobeta) gemessen.

4.4.3 IL-2-Aktivierungstest

Zur Probengewinnung für den IL-2-Aktivierungstest wurden PBMC ohne Antigen (Spontanproliferation) oder mit Antigen (synthetische Peptide, UV- oder β -PL-PRV, Con A) inkubiert, wie für den PBMC-Proliferationstest beschrieben. Für jede Probe wurden sechs Mikrokulturen angelegt. Die Kulturüberstände wurden nach 24, 48, 72, 96 und 114 h abgenommen. Überstände der gleichen Proben wurden vereinigt, 10 min bei 1000 rpm und 4 °C zentrifugiert, um Zelltrümmer zu sedimentieren und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

Zur Durchführung des IL-2-Aktivierungstests wurden 50 μ l der jeweiligen Kulturüberstände pro well in Rundboden-Mikrotiterplatten vorgelegt und 50 μ l/well (4×10^3) HT-2-Zellen in RPMI-complete (2 % FCS) zugemischt. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Als Referenzsubstanz wurde humanes, rekombinantes (hr) IL-2 mit bekannter Zahl internationaler Einheiten (international units, IU) mitgeführt, das in Zweierschritten über mehrere Stufen verdünnt worden war (50, 25, 12, 6,25 IU/ml in RPMI-complete, 2 % FCS). Als testinterne Negativkontrolle wurden HT-2-Zellen in RPMI-complete (2 % FCS) ohne die Zugabe von IL-2 inkubiert. Die Aktivität der HT-2-Zellen wurde durch Bestimmung der DNA-Synthese quantifiziert. Dazu wurden nach 24 h Inkubation 37 kBq (1 μ Ci)/well ³H-Thymidin, das in 20 μ l RPMI-complete (2 % FCS) aufgenommen worden war, zugegeben und die Kulturen weitere 18 h inkubiert. Das anschließende Verfahren entsprach der Messung der PBMC-Proliferation (\rightarrow 4.4.2).

4.5 DNA-Analysen

4.5.1 Methoden zur Präzipitation von Nukleinsäuren

4.5.1.1 Ethanolfällung mit Ammoniumacetat

Zur Nukleinsäurelösung wurden ½ Volumen 7,5 M Ammoniumacetat und 3 Volumina 100 % Ethanol zugegeben, mindestens 30 min oder ÜN bei -20 °C inkubiert und anschließend 15 - 30 min bei 15000 rpm zentrifugiert. Das Sediment wurde ein- bis zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und im gewünschten Volumen H₂O bidest. oder 0,01 M TE (pH 8,0) oder H₂O/DEPC (bei RNA) resuspendiert.

4.5.1.2 Ethanolfällung mit Natriumacetat

Durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 4,8) und 2 - 3 Volumina 100 % Ethanol zur wässrigen DNA- bzw. RNA-enthaltenden Phase und mindestens 1 h Inkubation auf Eis konnten die Nukleinsäuren gefällt und durch 30 min Zentrifugieren bei 15000 rpm und 4 °C sedimentiert werden. Die Natriumacetat-Methode wurde bevorzugt bei der Fällung von RNA eingesetzt. Nach dem Waschen mit 70 % Ethanol und Trocknen des Sedimentes wurde es in entsprechender Menge 0,01 M TE (pH 8,0) oder H₂O/DEPC (bei RNA) aufgenommen.

4.5.1.3 Propanolfällung

Durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 4,8) oder 5 M NaClO₄ und 1 Volumen Propanol (1- oder 2-Propanol) kommt es durch 30 min Inkubation auf Eis zur Fällung der Nukleinsäuren.

4.5.2 Phenol-Extraktion

Um Proteine zu entfernen, wurden DNA-Lösungen mit dem gleichen Volumen PMQN gemischt, 5 min auf Eis gekühlt und anschließend 5 min bei 15000 rpm und 4 °C

zentrifugiert. Denaturiertes Protein reicherte sich in der Interphase an. Die obere, wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen, mit je $\frac{1}{2}$ Volumen PMQN und IAC gemischt, nochmals 5 min gekühlt und erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde gegebenenfalls wiederholt, bis keine flockige Interphase mehr erkennbar war. Nach einer letzten Extraktion mit dem gleichen Volumen IAC wurde die DNA aus der wässrigen Phase mit Ethanol gefällt.

4.5.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

5 μ l DNA- oder RNA-Lösungen wurden mit H₂O bidest. auf ein ein Endvolumen von 1 ml verdünnt. Gegen H₂O bidest. als Leerwert wurden von diesen verdünnten Proben UV-Adsorptionsspektren im Bereich von 320 bis 220 nm Wellenlänge aufgenommen. Nach folgenden Gleichungen konnte aus der Extinktion bei $\lambda = 260$ nm (OD 260) die Konzentration der Nukleinsäure bestimmt werden:

$$\text{OD}_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \mu\text{g DNA/ml}$$

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

$$\text{OD}_{260} \times 20 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \mu\text{g einzelsträngiger Oligonukleotid-DNA}$$

4.5.4 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

DNA-Doppelstränge werden von bakteriellen Restriktionsendonukleasen an jeweils enzymespezifischen, palindromischen Nukleotidsequenzen von meist 4 - 6 Nukleotiden Länge erkannt und geschnitten. Die entstehenden Fragmente haben entweder glatte Enden (*blunt ends*) oder 5'-Phosphat- bzw. 3'-OH-Überhänge (*sticky ends*). Die Restriktionsendonukleasen werden zur physikalischen Kartierung oder zur Klonierung viraler DNA-Fragmente in Plasmiden benutzt. In TE resuspendierte DNA wurde in Volumina von 10 - 100 μ l mit etwa 10 U/ μ g Enzym gespalten. Um eine Beeinträchtigung der Enzymaktivität durch das im Reaktionspuffer enthaltene Glycerol zu vermeiden, betrug die eingesetzte Enzymmenge maximal 10 % des Gesamtvolumens. Entsprechend den Herstellerangaben wurden für die einzelnen Enzyme Reaktionspuffer mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen verwendet. Die

Inkubation erfolgte 1,5 - 2,5 h bei entsprechender Inkubationstemperatur. Durch Zusatz von 1/5 Volumen BSE und 10 min Erhitzen des Restriktionsansatzes auf 65 °C wurden die Enzyme inaktiviert, sofern eine Gelelektrophorese zur Auftrennung der DNA-Fragmente folgte. Außerdem wurde in manchen Fällen eine Phenolextraktion mit anschließender DNA-Ethanol-fällung durchgeführt.

4.5.5 DNA-Agarosegelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe wurden horizontale Elektrophoreseapparaturen unterschiedlicher Größe verwendet. Die Agarosekonzentration der Gele betrug zwischen 0,8 % und 2,0 %. Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten geringer Größe wurde ein Gel verwendet, das 1 % Agarose und 1 % NuSieve-Agarose enthielt. Je nach Konzentration des Gels wurde eine entsprechende Menge Agarose in Elektrophoresepuffer mit 0,3 µg Ethidiumbromid aufgeköcht und nach Abkühlung auf etwa 60 °C zu ca. 5 mm dicken Gelen gegossen. Nach Polymerisation wurde das Gel mit Elektrophoresepuffer der gleichen Ethidiumbromidkonzentration überschichtet, der Kamm gezogen und die mit 1/10 Volumen BSE versetzten DNA-Proben aufgetragen. Nach Beendigung des Laufs wurden die Gele unter kurzwelligem UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) mit einer Polaroidkamera mit einem geeigneten Oranfilter fotografiert. Zur Abschätzung der Größe der DNA-Fragmente wurde jeweils ein DNA-Größenmarker mitgetrennt. Durch Auftragen der Laufstrecke (in cm) gegen den Logarithmus der Größe der bekannten DNA-Größenmarkerfragmente wurde eine Eichgerade erstellt und hierdurch die Größe der DNA-Fragmente bestimmt. Sofern DNA-Fragmente zur Klonierung aus dem Gel ausgeschnitten werden sollten, wurden die Gele nur langwelligem UV-Licht ($\lambda = 366 \text{ nm}$) ausgesetzt.

4.5.6 „Qiaex“-Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Pro 100 mg isolierten Gels wurden 300 µl QX1 und 10 µl Qiaex-Suspension zugegeben. Danach wurde die Agarose durch 10 min Erwärmen bei 50 °C gelöst und gleichzeitig die DNA an die Glaskügelchen der Qiaex-Suspension gebunden. Darauf wurde der

Ansatz 2 min bei 15000 rpm zentrifugiert und das Sediment jeweils 2-mal mit 500 µl QX2 und QX3 gewaschen. Nach Lufttrocknung des Sediments, wurde die DNA von den Glaskügelchen eluiert, indem 20 µl TE (pH 8,0) zugegeben und 5 min bei RT inkubiert wurde. Durch erneutes Zentrifugieren wurde ein klares Eluat der gereinigten DNA erhalten. Der letzte Schritt konnte ein- bis zweimal wiederholt werden.

4.6 DNA-Klonierung

4.6.1 Phosphatasebehandlung der Vektor-DNA (CIP-Behandlung)

Zur Klonierung wurden das Plasmid pSPT18 (Roche) und das Expressionsplasmid pEV40 verwendet. Dabei war darauf zu achten, dass die entstehenden Enden mit denen des zu inserierenden Fragments kompatibel waren. Um eine Rezirkularisierung des Vektors zu vermeiden, wurde eine CIP-Behandlung zur Entfernung der 5'-Phosphatreste der Vektor-DNA durchgeführt. Der Restriktionsansatz wurde mit CIP-Puffer auf ein Endvolumen von 270 µl gebracht, mit 1 µl (1U/µl) CIP (*calf intestinal phosphatase*) 30 min bei 37 °C und nach einer zweiten Zugabe von 1 µl CIP weitere 30 min bei 56 °C inkubiert. Die Inaktivierung der Phosphatase erfolgte durch Zugabe von 30 µl 0,1 M EGTA und Erhitzen auf 65 °C für 5 min. Anschließend wurde 1-mal mit PMQN und 2-mal mit IAC extrahiert, die DNA mit 100 % Ethanol gefällt und das getrocknete Sediment in 100 µl TE (pH 8,0) resuspendiert.

4.6.2 Ligation

CIP-behandelte Vektor-DNA und isoliertes DNA-Fragment wurden im molaren Verhältnis von ca. 1 : 5 (Vektor : Insert) ligiert. Zur Kontrolle wurde die Vektor-DNA ohne Insert ligiert. Die DNA-Endkonzentration sollte etwa 5 - 10 µg/ml betragen. Die Ligation erfolgte in einem Ansatzvolumen von 20 µl unter Zugabe von 1 µl T4-DNA-Ligase (2U/µl) und 2 µl des vom Hersteller gelieferten 10X Ligationspuffers. Der Ansatz wurde zuerst 30 min bei 37 °C, dann 1 h bei RT und darauf ÜN bei 14 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ligationsansatz entweder bis zur Transformation auf Eis gehalten oder bei -20 °C gelagert.

4.6.3 Transformation von Bakterien

4.6.3.1 Herstellung frischer kompetenter Bakterien (Hanahan, 1983)

Eine frische ÜN-Kultur des jeweiligen *E. coli* K12 Bakterienstammes (DH5 α F', W6- χ rex oder C600-537) wurde 1 : 25 in SOB-Medium verdünnt (= Ausgangsvolumen) und bei 37 °C (*E. coli* C600-537 bei 28 °C) geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ von 0,45 - 0,55 erreicht war. Der Ansatz wurde 15 min auf Eis gekühlt und dann 5 min bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde in 1/3 des Ausgangsvolumens TFB resuspendiert und weitere 15 min auf Eis gekühlt. Nun wurde erneut zentrifugiert, das Bakteriensediment in 1/12 des Ausgangsvolumens TFB aufgenommen, 70 μ l DMSO zugegeben und 5 min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 70 μ l DTT-Kaliumacetat wurde weitere 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden nochmals 70 μ l DMSO zugegeben und die kompetenten Bakterienzellen nach weiteren 5 min auf Eis zur Transformation eingesetzt, wobei pro Transformationsansatz 200 μ l verwendet wurden.

4.6.3.2 Herstellung tiefgefrorener kompetenter Bakterien

Eine frische ÜN-Kultur des jeweiligen *E. coli* K12 Bakterienstammes (DH5 α F', W6- χ rex oder C600-537) wurde 1 : 100 in LB-Medium verdünnt (Ausgangsvolumen) und bei 37 °C (*E. coli* C600-537 bei 28 °C) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,45 - 0,55 geschüttelt. Die Bakterien wurden 10 min auf Eis gekühlt und anschließend 10 min bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis und mit vorgekühlten Lösungen durchgeführt: Das Bakteriensediment wurde in 1/10 des Ausgangsvolumens TFB-I resuspendiert, 10 min auf Eis gekühlt und erneut zentrifugiert. Dann wurde das Bakteriensediment in 1/25 des Ausgangsvolumens TFB-II resuspendiert, zu 120 μ l Portionen verteilt und sofort bei -70 °C eingefroren. Die Bakterien konnten frühestens nach 1 h zur Transformation verwendet werden.

4.6.3.3 Transformation

200 µl der frischen kompetenten Bakterien oder 120 µl der rasch aufgetauten und sofort verwendeten tiefgefrorenen kompetenten Bakterien, wurden mit DNA (zwischen 1 - 100 ng DNA) gemischt, wobei 5 % des Gesamtvolumens des Transformationsansatzes nicht überschritten wurden. Der Ansatz wurde 30 min auf Eis gekühlt. Es folgten 2 min Hitzeschock bei 42 °C. Anschließend wurde erneut kurz auf Eis gekühlt, 800 µl SOC-Medium hinzugegeben und die Bakterien 1 h bei 37 °C (*E. coli* C600-537 bei 28 °C) geschüttelt. Verschiedene Volumina des Ansatzes wurden auf Agarplatten, die mit den jeweiligen Antibiotika versehen waren, ausplattiert und ÜN bei 37 °C inkubiert. Im Fall von *E. coli* C600-537 wurde weiter verfahren, wie unter 4.8.1 beschrieben.

4.6.3.4 Lagerung von Bakterien

Bakterienklone konnten bei 4 °C in Flüssigkultur wenige Wochen und auf Agarplatten einige Monate lebensfähig aufbewahrt werden. Zur längerfristigen Lagerung wurden aus frischen ÜN-Kulturen 1 : 20-Verdünnungen in 2 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Selektionsmarker für 2 h bei 37 °C inkubiert. Die Bakterien wurden bei 3500 rpm sedimentiert und in 1 ml HMFM-Medium resuspendiert. In diesem Medium sind sie bei -70 °C langfristig lagerbar.

4.6.4 Identifizierung rekombinanter Klone

4.6.4.1 PEG-Plasmidpräparation (Hattori & Sakaki, 1986)

1,5 ml einer frischen Bakterien-ÜN-Kultur, die unter dem Selektionsdruck der jeweils plasmidkodierte Antibiotikaresistenz gewachsen war, wurden 5 min bei 15000 rpm zentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde in 100 µl Glucose-EDTA-Lysozym-Lösung resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl von NAOH/SDS wurde der Ansatz 5 min auf Eis gekühlt, mit 150 µl Kaliumacetat/Essigsäure versetzt und weitere 5 min auf Eis belassen. Bei allen Schritten wurde immer wieder gemischt. Nach Zentrifugation bei 15000 rpm wurde der Überstand mit einem gleichen Volumen

PMQN geschüttelt, 5 min auf Eis gekühlt und erneut zentrifugiert. Die DNA in der wässrigen Phase wurde durch Zugabe von 2 Volumina 100 % Ethanol 10 min bei RT gefällt. Anschließend wurde erneut 30 min bei 15000 rpm zentrifugiert. Das Sediment wurde 2-mal mit 70 % Ethanol gewaschen, bei 37 °C getrocknet und in 50 µl 0,01 M TE (pH 8,0) resuspendiert. Die Lösung wurde anschließend mit 10 µg/ml RNase A für 30 min bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 30 µl PEG/ NaCl wurde die DNA für 1 h auf Eis präzipitiert. Nach 5 min Zentrifugation wurde das Sediment 2-mal mit 300 µl 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 10 - 20 µl 0,01 M TE (pH 8,0) aufgenommen. Aufgrund der guten Qualität konnte diese Plasmid-DNA auch zur Sequenzierung und Klonierung eingesetzt werden.

4.6.4.2 „Focus“-Plasmidpräparation

1,5 ml einer frischen Bakterien-ÜN-Kultur, die unter dem Selektionsdruck der entsprechenden plasmidkodierten Antibiotikaresistenz gewachsen war, wurden 3 min bei 15000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Bakteriensediment in 150 µl sterilem H₂O bidest. resuspendiert. Durch den starken osmotischen Unterschied zwischen Bakterienzelle und umgebendem Medium wurden die Bakterienzellen aufgeschlossen. Zu jedem Ansatz wurden 350 µl 100 % Ethanol, 500 µl PMQN und 500 µl IAC zugegeben und anschließend kurz am Vortex gemischt. Durch 10 min Zentrifugation bei 15000 rpm wurden die Bakterienbestandteile in der Phase aus PMQN, IAC und Ethanol angereichert. Die Plasmid-DNA wurde in den wässrigen Überstand freigesetzt. Der Überstand (120 µl) wurde mit 2 Volumina 100 % Ethanol (-20 °C) gemischt. Die Plasmid-DNA wurde 15 min auf Eis präzipitiert, 15 min bei 15000 rpm und 4 °C sedimentiert, getrocknet und abschließend in 10 - 20 µl TE (pH 8,0) mit 0,1 mg/ml RNase A aufgenommen.

4.6.4.3 TENS-Plasmidschnellpräparation

1,5 ml einer frischen Bakterien-ÜN-Kultur, die unter dem Selektionsdruck der entsprechenden plasmidkodierten Antibiotikaresistenz gewachsen war, wurden etwa 10 sec bei 15000 rpm zentrifugiert und der Kulturüberstand bis auf ca. 50 - 100 µl

dekantiert. Das Bakteriensediment wurde im verbleibenden Medium am Vortex resuspendiert und mit 300 µl TENS-Lösung zur Denaturierung genomischer DNA und zellulärer Proteine gemischt. Nach 2 - 5 sec Durchmischung am Vortex wurden 150 µl 3 M Natriumacetat pH 5,2 zur Ausfällung der Proteine zugegeben. Die Suspension wurde gemischt und nach kurzer Inkubation auf Eis erneut bei 15000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit dem gleichen Volumen bei -20 °C vorgekühltem 100 % Ethanol zur Fällung der Plasmid-DNA und RNA versetzt und 2 min bei 15000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Abschließend wurde das Sediment noch 2-mal mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 10 - 20 µl TE (pH 8,0) mit 0,1 mg/ml RNase A resuspendiert.

4.6.5 DNA-Sequenzierung

4.6.5.1 Sequenzreaktion

Für die DNA-Doppelstrang-Sequenzierung wurde der T7-Sequenzier-Kit der Firma Pharmacia LKB verwendet. Nach der Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977) wird, ausgehend von einem Primer, einzelsträngige DNA mit Hilfe der T7-Polymerase zum Doppelstrang ergänzt. Dabei wird, außer dTTP, dGTP und dCTP, α -³⁵S dATP zur Synthese angeboten, was zur radioaktiven Markierung des neu synthetisierten Stranges führt. In vier verschiedenen Teilreaktionen kommt es zum Kettenabbruch durch die Anwesenheit je eines Didesoxynukleotids. In jedem Reaktionsansatz entsteht somit eine Mischung aus unterschiedlich langen Fragmenten, die alle mit dem jeweiligen in der Reaktion vorhandenen Didesoxynukleotid enden. Die Fragmentenden stellen somit das entsprechende Didesoxynukleotid der Sequenz dar. Eine Auftrennung der Fragmente erfolgte im Sequenzgel. Als Primer für die DNA-Doppelstrangsequenzierung wurden synthetisch hergestellte Oligonukleotide verwendet. Doppelsträngige DNA muß vor der Durchführung einer Sequenzreaktion in einzelsträngige DNA denaturiert werden. Hierzu wurden 2 - 6 µg der zu sequenzierenden DNA mit H₂O bidest. auf 14 µl aufgefüllt, 2 µl 2 N NaOH und 2 µl 2 mM EDTA (pH 7,4) zugegeben und 5 min auf 85 °C erhitzt. Dann wurden 2 µl eiskaltes 2 mM Ammoniumacetat (pH 4,6) und 60 µl 100 % Ethanol zugegeben und die DNA 15 min auf Eis gefällt. Nach 20 min

Zentrifugation bei 15000 rpm und 4 °C wurde das Sediment einmal mit 70 % Ethanol gewaschen, im Vakuum getrocknet und in 10 µl H₂O bidest. aufgenommen. Zu 10 µl denaturierter DNA wurden 2 µl Primer (5 ng/µl) und 2 µl Primerhybridisierungs-Puffer gegeben und der Ansatz 1 h bei 37 °C und weitere 10 - 30 min bei RT inkubiert. Dem Ansatz wurden 3 µl Markierungs-Mix, 2 µl α-³⁵S dATP und 2 µl T7-Polymerase (2U/µl) zugegeben und 5 min bei RT inkubiert. Nach der Kettenverlängerungsreaktion wurden je 4 µl des Ansatzes zu je 2,5 µl auf RT vorgewärmer Didesoxynukleotidgemische pipettiert, die neben den vier dNTPs jeweils ein 2'3'-Didesoxynukleotid enthielten. Nach 5 min Inkubation bei 37 °C wurden die Reaktionen mit 5 µl Stop-Lösung beendet und bis zur Elektrophorese bei -20 °C aufbewahrt.

4.6.5.2 Sequenzgele

Zur Auftrennung der Proben der Sequenzierreaktionen wurden 6 % Polyacrylamid/7 M Harnstoff-Gele verwendet. Die Gele wurden in Schräglage zwischen eine Thermostatisierplatte und eine Ohrenplatte gegossen. Die Ohrenplatte, die als Gelträgerplatte diente, wurde vor jeder Benutzung 2-mal mit 5 ml einer Lösung aus 10 ml 100 % Ethanol, 260 µl 10 % Essigsäure und 30 µl Bind-Silane beschichtet und danach mit 100 % Ethanol poliert. Zwischen der Beschichtung der Gelträgerplatte und dem Polyacrylamidgel bilden sich kovalente Bindungen aus. Bei der Thermostatisierplatte war eine Beschichtung nur nach jedem fünften Gebrauch notwendig. Da an ihr Gel nicht haften bleiben durfte, wurde sie 2-mal mit 5 ml Repel-Silane behandelt und dann 2-mal mit 100 % Ethanol poliert. Die Elektrophorese erfolgte in 1X TBE bei 2500 V und 56 °C. Die Geltaschen wurden mit einer Einmalspritze gespült, um Luftblasen und Gelreste zu entfernen. Die Proben wurden nach 30 min Vorlauf des Gels und 2 min Denaturierung bei 95 °C aufgetragen. Die Auftrenndauer richtete sich nach der Länge der zu untersuchenden Sequenz und lag zwischen 90 min und 4 h. Nach dem Lauf wurde das an der Ohrenplatte haftende Gel für 20 min in 10 % Essigsäure fixiert, wobei gleichzeitig der Harnstoff hydrolysiert wurde. Anschließend wurde 10 min gewässert und 1 h im Umluftofen bei 80 °C getrocknet. Das Gel wurde dann einem Röntgenfilm für ein bis mehrere Tage zur Exposition ausgesetzt. Durch die

Autoradiographie konnte die DNA-Sequenz anhand der Signalabfolge in den vier Spuren gelesen werden.

4.7 Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

4.7.1 Isolierung von Gesamzell-RNA

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus PBMC wurde das Trizol-Reagenz (Life Technologies) nach Herstellerangaben eingesetzt. Es wurden stets sterile und silikonisierte Reaktionsgefäße verwendet. Außerdem wurden alle Plastikmaterialien für Arbeiten mit RNA getrennt gehalten und immer Latex-Handschuhe getragen. Es wurde nur DEPC-behandeltes Wasser verwendet. Diese Maßnahmen dienten dem Schutz vor RNasen.

4.7.2 Reverse Transcription (RT)

Für die Reverse Transcription (RT) wurde folgendes Standardprotokoll angewendet: 1 - 2 µg Gesamt-RNA (1 µg/µl) wurden mit H₂O-DEPC auf ein Volumen von 11 µl gebracht, 0,5 µl Zufallshexamer-Primer (0,5 µg/µl) zugefügt und der Ansatz zur Auflösung von RNA-Sekundärstrukturen 10 min bei 70 °C inkubiert. Anschließend wurden auf Eis 4 µl 5X First-Strand Buffer, 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl dNTP (je 10 mM), sowie 1 µl RNasin (20 - 40 U/µl) zugefügt und der Ansatz 2 min bei 42 °C inkubiert. Zuletzt wurde durch Zugabe von 0,5 - 1,0 µl SuperScriptIITM-Reverse Transcriptase (200 U/µl) die Reaktion gestartet. Nach 60 min bei 42 °C wurde das Enzym während 15 min bei 70 °C inaktiviert und die cDNA bei 4 °C bis zur Verwendung in der PCR aufbewahrt.

4.7.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

PCR-Ansätze wurden in einem Endvolumen von 50 µl durchgeführt. Hierfür wurden in Standard-Reaktionen 5 µl 10X PCR-Puffer ohne MgCl₂, 5 µl dNTP's (je 0,2 mM), 2 µl

Primer-Mix (je 15 ng/ μ l beider Primer) und 1,5 μ l MgCl₂ (50 mM) mit dem gewünschten Volumen an cDNA versetzt und mit doppelt autoklaviertem H₂O bidest. auf 50 μ l aufgefüllt. Die Proben wurden im Thermocycler auf 80 °C erhitzt. Bei dieser Temperatur wurden 0,5 μ l Taq-Polymerase (5 U/ μ l) zugegeben (*Hot-Start*). Anschließend wurde folgendes Temperaturprogramm fortgeführt:

- Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 96 °C für 80 sec
- Primerannealing bei gewählter Hybridisierungstemperatur für 90 sec
- Primer-Verlängerung bei 72 °C für 90 sec

Diese Schritte wurden in der gewünschten Zykluszahl wiederholt. Nach dem letzten Zyklus wurde die Primer-Verlängerung um 10 min bei 72 °C ausgedehnt. Die Reaktionsansätze wurden bei 4 °C bis zur elektrophoretischen Analyse oder anderer Verwendung aufbewahrt.

4.8 Bakterielle Expression

4.8.1 Expression von Fusionsproteinen in *E. coli* (Strebel et al., 1986)

Die zu exprimierenden Fremdgensequenzen wurden in den pEV40-Vektor (\rightarrow 3.2.2) kloniert. Selektion und Vermehrung rekombinanter Plasmide erfolgten im *E. coli* Stamm W6, der das cI Repressorgen konstitutiv exprimiert. Hierdurch wird eine Expression der Fusionsproteine unterbunden. Mit den rekombinanten Expressionsplasmiden wurden kompetente *E. coli* 537-Bakterien transformiert. Diese tragen ein Plasmid, das für Kanamycinresistenz und einen temperatursensitiven cI-Repressor (cI 587) kodiert, der bei 28 °C noch aktiv ist und durch ansteigende Temperatur inaktiviert wird. Die transformierten Bakterien wurden bei 28 °C zunächst für 1 h in 1 ml SOC geschüttelt, in 10 ml TB/Amp/Kan verdünnt und ÜN weiter geschüttelt. Danach wurde die Expression von Fusionsproteinen durch Inaktivierung des cI-Repressors induziert. Hierzu wurden die ÜN-Kulturen 1 : 5 in vorgewärmtem TB-Medium verdünnt und bei 42 °C für 3 h kräftig geschüttelt. Als Kontrollen wurden stets entsprechende Ansätze bei 28 °C belassen und ebenfalls 3 h geschüttelt.

4.8.2 Differentielle Harnstoffextraktion

Fusionsproteine können aufgrund ihres Löslichkeitsverhaltens aus Bakterienlysaten partiell gereinigt werden. Hierzu wurden 50 ml einer induzierten Bakterienkultur für 10 min bei 6000 rpm sedimentiert, einmal mit 10 ml 50 mM Tris-HCl (pH 8,0)/ 100 mM NaCl gewaschen, erneut sedimentiert und in 5 ml PBS mit 4 mg/ml Lysozym resuspendiert. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurde der Ansatz auf Eis abgekühlt und durch Ultraschallbehandlung (6 x 15 sec, 100 W) homogenisiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand 1 auf Eis bewahrt und das Sediment durch Beschallung in 5 ml 1 M Harnstofflösung resuspendiert. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurde erneut zentrifugiert, der Überstand 2 aufbewahrt und das Sediment durch Beschallung in 5 ml 7 M Harnstofflösung resuspendiert und 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach einer letzten Zentrifugation wurde der Überstand 3 erhalten. Das Sediment aus unlöslichen Proteinen wurde in 5 ml PBS resuspendiert. Proben der vier Fraktionen wurden in der SDS-PAGE und im Western-Blot untersucht.

4.8.3 Proteinbestimmung (Lowry et al., 1951)

Der Proteingehalt von Lösungen wurde durch eine Farbreaktion bestimmt. Hierzu wurde eine Probe der Lösung mit PBS auf 50 µl gebracht und mit 50 µl 10 % DOCA gemischt. Nach Zugabe von 4 ml Lowry A und 400 µl Lowry B wurde der Ansatz 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die optische Dichte (OD) bei 660 nm gegen einen proteinfreien Parallelansatz photometrisch gemessen. Aus dem Messwert wurde die Proteinkonzentration über eine mit definierten BSA-Mengen erstellte Eichkurve bestimmt.

4.8.4 Reinigung der Fusionsproteine durch Affinitätschromatographie mit einer TALON -Säule

In pEV40 exprimierte Fusionsproteine können durch Affinitätschromatographie über eine Affinitätssäule gereinigt werden. Sie sind im vektorialen Anteil mit 6 Histidinen wie mit einem Etikett (*tag*) markiert. Diese Strategie wird auch als *Protein-Tagging*

bezeichnet. Die Reinigungsmethode basiert auf einer Interaktion zwischen elektropositiven Metallen der Übergangsguppe, wie z. B. Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} und Zn^{2+} und den Histidinresten (Porath, 1992). Letztere binden in der Gegenwart starker Denaturantien wie Guanidin oder Harnstoff an die am Harz über Chelatoren fixierten Metall-Liganden. Die Histidinreste können durch Protonierung des Stickstoffes ihrer Imidazol-Seitenkette wieder von der Säule eluiert werden, indem die entstehenden positiv geladenen Ammoniumionen von den ebenfalls positiv geladenen Metallionen abgestoßen werden. Alternativ kann auch durch kompetitive Zugabe von Imidazol eluiert werden.

Zur Reinigung der Fusionsproteine über Affinitätschromatographie wurde eine TALON-Säule (Clontech) verwendet. Die Säule wurde in einem 2 ml Mikrozentrifugengefäß 2 min bei 1800 rpm zentrifugiert, um den Lagerungspuffer zu entfernen. Zur anschließenden Äquilibration wurde 1 ml *Lysis*-Puffer auf die Säule aufgetragen. Die nun folgende Inkubation und Zentrifugation wurde nach jedem weiteren Arbeitsschritt durchgeführt: Die Säule wurde zunächst 1 min ruhig stehengelassen und anschließend 5 min auf einem Taumlergerät langsam geschwenkt. Danach wurde die Säule 2 min bei 1800 rpm zentrifugiert. Der Säulendurchlauf wurde verworfen. Nun wurde 1 ml des Bakterienlysates oder des Überstandes 3 aus der Harnstoffextraktion, jeweils eingestellt auf pH 8,0, aufgetragen. Es folgten Inkubation und Zentrifugation, wobei letztere für visköse Proben wiederholt, und der Säulendurchlauf jeweils verworfen wurde. Nach Zugabe von 1 ml *Lysis*-Puffers (pH 8,0) oder alternativ *Sonication*-Puffer (pH 8,0) folgten Inkubation und Zentrifugation, wobei Pufferzugabe, Inkubation und Zentrifugation ein- bis mehrfach wiederholt, und der Säulendurchlauf jeweils verworfen wurde. Abschließend erfolgte die Elution des 6xHis-markierten Fusionsproteins von der Säule, indem 400 - 600 µl 100 mM EDTA (pH 8,0) aufgetragen wurden. Alternativ wurde *Elution*-Puffer (pH 6,0 - 6,3), der 20 mM PIPES (pH 6,0 - 6,3) enthielt, verwendet. Nach Inkubation wurde die Säule in einem neuen Mikrozentrifugengefäß zentrifugiert und das Eluat aufbewahrt. Die Elution wurde ein- bis mehrfach wiederholt, die Eluate jeweils getrennt aufgefangen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

4.9 Proteingelektrophorese und Western-Blotting

4.9.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)

Zur Proteinauftrennung über SDS-PAGE wurde die „Minigel-Twin“-Apparatur der Firma BIO-RAD verwendet. Der Aufbau der Apparatur und das Gießen des Gels erfolgte nach Herstellerangaben. Die Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel und der übrigen Puffer und Lösungen ist unter → 3.7.7 angegeben. Je nach Größe des untersuchten Proteins wurden 10 - 12,5 % Polyacrylamidtrenngele verwendet. Vor dem Lauf wurden die Taschen des Gels mit Laufpuffer gespült und mit je 15 µl der 1 : 1 mit SDS-PAGE Probenpuffer verdünnten und im Heizblock bei 95 °C für 5 min denaturierten Proben beladen. Fusionsproteine wurden für die SDS-PAGE mit PBS auf eine OD₆₆₀ von 0,3 eingestellt. Es wurden ca. 15 - 20 µg Protein/Spur aufgetragen. Zur sensitiveren Silberfärbung wurde nur 1/10 der angegebenen Probenmenge aufgetragen. Stets wurde zur Molekulargewichtsbestimmung ein Protein-Molekulargewichtsstandard mitgeführt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte während ca. 4 h bei 100 V.

4.9.2 Färbung von Proteingelen

Nach der Elektrophorese bzw. nach dem Western-Blot-Transfer wurden die Trenngele für ca. 10 - 20 min in Coomassie-Färbelösung bewegt und anschließend mehrere h in 5 % Methanol/7,5 % Essigsäure entfärbt. Die Waschlösung wurde mehrmals gewechselt, bis nur noch die Proteinbanden gefärbt waren. Die Silberfärbung wurde mit einem *Silver Stain Kit* nach Angaben des Herstellers (Biometra) durchgeführt.

4.9.3 Western-Blotting

Zum Transfer von Proteinen eines Polyacrylamidgels auf eine Nitrozellulosemembran wurde eine halbtrockene Elektroblokkammer (Firma Millipore) verwendet. Das Gel wurde ebenso wie zwei auf Gelgröße zugeschnittene Whatman-Blottingpapier in Transferpuffer eingeweicht und luftblasenfrei auf die Graphitanode der

Transferapparatur gelegt. Nachfolgend wurde die auf Gelgröße zugeschnittene Nitrocellulose-Membran, das SDS-Polyacrylamidgel sowie zwei weitere in Transferpuffer eingeweichte Blottingpapiere in der genannten Reihenfolge luftblasenfrei aufgelegt. Der Deckel mit der Graphitelektrode wurde fest angeschraubt und mit einem Gewicht beschwert. Die durch SDS negativ geladenen Proteine wurden ca. 1 h bei 150 mA auf die Membran transferiert. Nach dem Transfer wurde das SDS-Gel zur Kontrolle der Übertragungseffizienz mit Coomassie gefärbt. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Nitrocellulose-Membran nach dem Transfer ca. 1 h in Block-Lösung geschwenkt. Anschließend wurde mit dem gewünschten Erstantikörper, der in einer Verdünnung von 1 : 500 - 1 : 3000 in Block-Lösung eingesetzt wurde, mindestens 1 h bei RT unter leichtem Schwenken inkubiert. Daraufhin wurde die Membran 3-mal in Waschlösung geschwenkt. Für die Inkubation mit Zweitantikörper wurde die Membran in Block-Lösung überführt. Die Inkubation mit Peroxidase-konjugiertem Zweitantikörper erfolgte für ca. 1 h in einer Verdünnung von 1 : 1000 - 1 : 3000. Nach 5-maligem Waschen in Waschlösung wurde die Membran in Chloronaphtol-Lösung entwickelt. Sobald die spezifischen Banden klar sichtbar waren, wurde die Membran in PBS gewaschen und getrocknet.

4.10 Synthetische Peptide

4.10.1 Multiple Peptidsynthese

Die multiple Peptidsynthese wurde mit einem Syro-Pipettierroboter (MultiSynTech) durchgeführt, der die gleichzeitige Synthese von bis zu 96 Peptiden ermöglichte. Der Synthesizer wurde von einem PC unter Verwendung der Software Syro 1.05 MultiSynTech gesteuert. Zur Synthese wurden 20 - 35 mg (0,015 mmol) Rink-Amid-MBHA-Harz je Reaktionsgefäß eingewogen. Das Harz wurde vor der Synthese mit DMF vorgequollen. Zur Kupplung wurden die Fmoc-geschützten Aminosäuren (AS) in HOBt (0,6 M in DMF) gelöst und in 10-fachem Überschuß bezogen auf die Harzbelegung eingesetzt. Schwer lösliche AS (z. B. Fmoc-His(Trt)-OH) wurden für 10 - 60 min mit Ultraschall behandelt. Als Kupplungsreagenz wurde DIC/HOBt verwendet.

Reaktionsbedingungen unter denen die Peptidkupplung durchgeführt wurde:

Synthesesyklus	Reagenzien	Wdh.	Vol. [μ l]	Zeit [min]
1. Spülen der Pipettieradel	DMF	1		
2. Quellen des Harzes	DMF	3	400	
3. Zugabe des Abspaltungsreagenz	DMF/Piperidin (1:1)	1	300	
4. Fmoc-Abspaltung				15
5. Spülen der Pipettieradel	DMF	2		
6. Absaugen der Lösung		1		0,5
7. Waschen	DMF	7	400	
8. Spülen der Pipettieradel	DMF	1		
9. Zugabe des Kupplungsreagenz	DIC	1	100	
10. Spülen der Pipettieradel	DMF	1		
11. Zugabe der Aminosäuren	FmocAS in HOBt	1	300	
12. Kupplung der Aminosäure		1		60
13. Spülen der Pipettieradel	DMF	1		
14. Absaugen der Lösungen		1		0,5
15. Wiederholung der Schritte 3-12		*		

* entsprechend der Länge des Peptides, Wdh. = Wiederholung, Vol. = Volumen.

Nach der Synthese wurde das Harz je 3-mal mit 1 ml Methanol und 1 ml Diethylether gewaschen, um verbliebene Reagenzien und DMF zu entfernen und darauf ÜN bei RT getrocknet.

4.10.2 Abspalten der Peptide vom Harz

Die Abspaltung des Peptides vom Harz erfolgte durch Zugabe von 495 μ l TFA und 105 μ l Reagenz K je Reaktionsgefäß. Nach 3 h wurde die Abspalllösung über eine Fritte in ein 15 ml Zentrifugen-Röhrchen filtriert und 5 ml tiefgekühlter Diethylether zugegeben. Zur vollständigen Fällung wurden die Lösungen mindestens 14 h bei -20 °C aufbewahrt und anschließend 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Das sedimentierte Peptid wurde 2-mal mit 2 ml Diethylether gewaschen. Abschließend wurden die Peptide in 5 ml tert.-Butylalkohol/Wasser (1 : 4 verdünnt) gelöst, lyophilisiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

4.11 ELISA

4.11.1 Peptid-ELISA

Die synthetischen Peptide wurden in DMSO in einer Konzentration von 10 mg/ml vorgelöst. Mikrotiterplatten wurden mit 1 µg Peptid/well in 50 µl PBS-A ÜN bei 4 °C beschichtet. Als Positivkontrolle wurde ein gC-spezifisches Peptid (gC14, gC AS 65-79; Ober et al., 2000) eingesetzt. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Nach 2-maligem Waschen mit 0,1 % Tween 20/PBS-A wurden die Platten zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 1 h mit 100 µl/well 3 % BSA/PBS-A bei 37 °C inkubiert. Darauf wurden die Platten 3-mal gewaschen und mit 50 µl/well der Schweine- oder Ziegenserum (Immunsereum/Präimmunsereum) in der Verdünnung 1 : 100 in 3 % BSA/PBS-A für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach 3-maligem Waschen wurden 50 µl/well der Peroxidase-konjugierten Zweitantikörper (Ziege anti-Schwein oder Kaninchen anti-Ziege) in der Verdünnung 1 : 5000 in 3 % BSA/PBS-A aufgebracht. Die Platten wurden für 1 h bei 37 °C inkubiert und 5-mal gewaschen. Dann wurde der Test mit 50 µl/well OPD-Substratlösung bei RT im Dunkeln entwickelt und die Farbreaktion mit 50 µl/well 2 M H₂SO₄ gestoppt. Abschließend wurde der Test in einem ELISA-READER bei einer Wellenlänge von 492 nm gemessen.

4.11.2 PRV-ELISA

Mikrotiterplatten wurden mit 0,3 µg/well aufgereinigtem PRV in 50 µl PBS-A ÜN bei 4 °C beschichtet. Für die Kontrollen wurde eine entsprechende Anzahl an Vertiefungen nur mit PBS-A beschichtet. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Das weitere Vorgehen entsprach dem für den Peptid-ELISA (→ 4.11.1) beschriebenen. Hierbei wurden die Schweineseren in verschiedenen Verdünnungen (1 : 100, 1 : 1000, 1 : 10000) in 3 % BSA/PBS-A (50 µl/well) und der Peroxidase-konjugierte Zweitantikörper (Ziege anti-Schwein) in der Verdünnung 1 : 1000 in 3 % BSA/PBS-A (50 µl/well) eingesetzt.

5 Ergebnisse

5.1 Glykoprotein gD

Das Glykoprotein gD, als eines der haupt-immunogenen Glykoproteine des PRV, sollte auf T- und B-Zellepitope untersucht werden. Deshalb wurden zur näheren Eingrenzung der Lage möglicher Epitope gD-Fusionsproteine im bakteriellen Expressionsvektor pEV40 (→ 3.2.2) konstruiert, um diese in Proliferationstests mit PBMC und in Western-Blot-Analysen mit Seren PRV-immunisierter Tiere zu überprüfen.

5.1.1 Ausgangsplasmid pgDBSII

Als Ausgangsplasmid für die Klonierungen diente das Plasmid pgDBSII (→ 3.2.2). In das Vektor-Plasmid pBluescript II SK (+/-) wurde ein 1.597 bp großes Genomfragment des PRV-Stammes Phylaxia inseriert, welches das gesamte gD-Gen (1.209 bp) sowie stromaufwärts davon 40 bp des C-Terminus des gG-Genes und stromabwärts 348 bp des N-terminalen Anteiles des gI-Genes umfasst.

5.1.2 Herstellung der Fusionsproteine GD-1, GD-2 und GD

In den Expressionsvektor pEV40b (→ 3.2.2) wurden folgende drei gD-Genabschnitte des Ausgangsvektors pgDBSII inseriert (Abb. 1):

GD-1: ein 548 bp großes PstI/SalI-Fragment, das für die C-terminalen 13 Aminosäuren (AS) des Glykoproteins gG und für die N-terminalen 170 Aminosäuren (gD AS 1-170) des Glykoproteins gD kodiert.

GD-2: ein 1049 bp großes SalI/BamHI-Fragment, das für den 233 Aminosäuren umfassenden C-terminalen Bereich (gD AS 170-402) des Glykoproteins gD und für die N-terminalen 116 Aminosäuren des Glykoproteins gI kodiert.

GD: das gesamte PstI/BamHI-Fragment von 1.597 bp, das alle 402 Aminosäuren des Glykoproteins gD, zuzüglich der 13 C-terminalen Aminosäuren des Glykoproteins gG und der 116 N-terminalen Aminosäuren des Glykoproteins gI, repräsentiert.

Das PstI/SalI-Fragment und das SalI/BamHI-Fragment wurden vom pgDBSII zunächst in den Klonierungsvektor pSPT18 subkloniert und dann in den Expressionsvektor pEV40b umkloniert, während das PstI/BamHI-Fragment direkt aus pgDBSII isoliert und in pEV40b inseriert wurde.

Im Folgenden sind bei der Erwähnung der Fusionsproteine nur die gD-spezifischen Aminosäuren der Fragmente, nicht aber die gG- und gI-spezifischen Aminosäuren angegeben: GD = gD AS 1-402, GD-1 = gD AS 1-170 und GD-2 = gD AS 170-402.

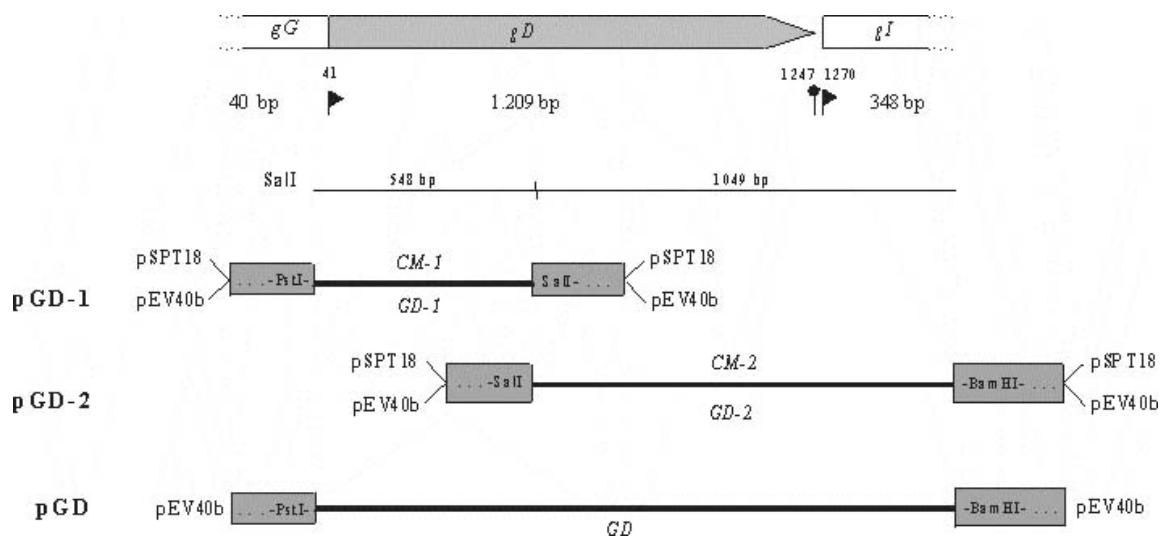


Abb. 1: Klonierungsschema für die Fusionsproteine GD-1, GD-2 und GD. Das 548 bp und das 1.049 bp PRV-gD-Fragment wurden aus pgDBSII in den Klonierungsvektor pSPT18 subkloniert (= CM-1 und CM-2) und dann in den Expressionsvektor pEV40b umkloniert (= GD-1 und GD-2). Das gesamte 1.597 bp PRV-gD-Fragment wurde direkt aus pgDBSII isoliert und in pEV40b inseriert (= GD).

5.1.3 Durchführung der Klonierungen und Überprüfung der erhaltenen rekombinanten Klone

pGD-1 und pGD-2: Das Plasmid pgDBSII wurde mit PstI und SalI bzw. mit SalI und BamHI gespalten, die erhaltenen 548 bp und 1.049 bp großen Fragmente nach präparativer Gelelektrophorese mittels „Qiaex“ (→ 4.5.6) isoliert und in den mit PstI und SalI bzw. SalI und BamHI linearisierten, mit Phosphatase behandelten Klonierungsvektor pSPT18 ligiert. Nach Transformation von *E. coli* K12 DH5- α F⁻-Bakterien wurde die isolierte Plasmid-DNA einzelner Klone mit PstI- und SalI- bzw.

Sall- und BamHI-Spaltung auf erfolgreiche Insertion überprüft (nicht gezeigt). Außerdem wurden zusätzliche Kontrollspaltungen mit KpnI und BssHII durchgeführt (nicht gezeigt). Die erhaltenen Plasmide pCM-1 (548 bp-Fragment) und pCM-2 (1.049 bp-Fragment) wurden erneut mit PstI und Sall bzw. mit Sall und BamHI gespalten, die entstandenen Fragmente isoliert und in den mit PstI und Sall bzw. Sall und BamHI gespaltenen, mit Phosphatase behandelten, Expressionsvektor pEV40b, in den Leserahmen der MS2 Polymerase, inseriert. Mit den Ansätzen wurden *E. coli* K12 W6- λ rex-Bakterien transformiert, und die daraus hervorgegangenen Klone wurden wiederum einer PstI- und Sall- bzw. Sall- und BamHI-Kontrollspaltung (Abb. 2) unterzogen. pGD-1 Klone enthielten zusätzlich zum linearisierten Vektor von 2.800 bp das 548 bp gD-Fragment (Abb. 2 A) und pGD-2 Klone das 1.049 bp gD-Fragment (Abb. 2 B).

pGD: Das Plasmid pgDBSII wurde mit PstI und BamHI gespalten, es wurde weiter vorgegangen wie für GD-1 und GD-2 angegeben, wobei das 1.597 bp gD-Fragment direkt in den mit PstI und BamHI gespaltenen und mit Phosphatase vorbehandelten Expressionsvektor pEV40b ligiert wurde. Die erhaltenen Klone wurden mit PstI- und BamHI-Spaltung überprüft, wie in Abb. 2 C für drei pGD- Klone gezeigt, die zusätzlich zum linearisierten Vektor (2.800 bp) das 1.597 bp gD-Fragment enthielten.

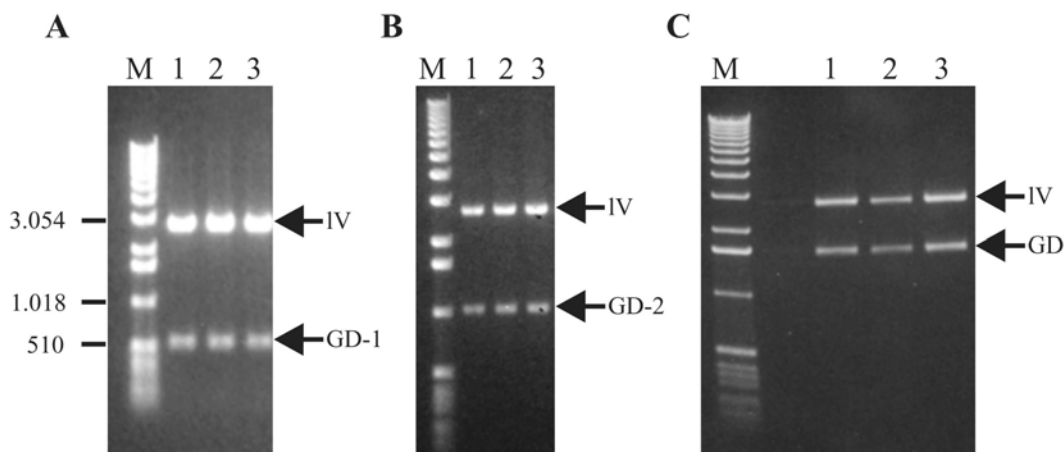


Abb. 2: Kontrollspaltungen der erhaltenen rekombinanten gD-Klone pGD-1 (A), pGD-2 (B) und pGD (C). Dargestellt sind die Kontrollspaltungen von jeweils 3 Klonen (Spuren 1 bis 3). (A) pGD-1-Kontrollspaltung mit PstI und Sall, GD-1-Fragment bei 548 bp. (B) pGD-2-Kontrollspaltung mit Sall und BamHI, GD-2-Fragment bei 1.049 bp. (C) pGD-Kontrollspaltung mit PstI und BamHI, GD-Fragment bei 1.597 bp. M = Marker [bp], IV = linearisierter Vektor pEV40 bei 2.800 bp.

5.1.4 Sequenzierung

Um sicherzustellen, dass die inserierten gD-Genabschnitte der Plasmide pGD-1, pGD-2 und pGD im korrekten Leseraster der MS2 Polymerase vorlagen, wurde der Übergang zwischen Vektor- und Insert-DNA sequenziert (→ 4.6.5). Hierzu wurde ein synthetischer MS2-spezifischer Primer verwendet. Das Vorliegen der Insert-DNA im korrekten Leseraster der MS2-Polymerase konnte für alle drei Konstrukte bestätigt werden (nicht gezeigt).

5.1.5 Expression und Reinigung der Fusionsproteine

5.1.5.1 Expression der Fusionsproteine

Mit den charakterisierten Expressionsplasmiden pGD-1 (gD AS 1-170), pGD-2 (gD AS 170-402), pGD (gD AS 1-402) und zur Kontrolle mit pEV40b ohne Insertion wurden *E. coli* K12 C600-537-Bakterien transformiert. Diese tragen ein Plasmid, das u. a. für den temperatursensitiven λ cI-Repressor (cI857) kodiert. Die Kulturen wurden zunächst bei 28 °C über Nacht angezogen. Die Induktion der Expression der Fusionsproteine erfolgte durch Inaktivierung des cI-Repressors bei 42 °C über 3 Stunden (→ 4.8.1).

5.1.5.2 Reinigung der Fusionsproteine über differentielle Harnstoffextraktion

Nach der Induktion wurden die Fusionsproteine GD-1, GD-2 und GD, und zum Vergleich EV40, über differentielle Harnstoffextraktion (→ 4.8.2) gereinigt. Hierbei wurde das unterschiedliche Löslichkeitsverhalten bakterieller Proteine in PBS/Lysozym (Überstand 1), 1 M Harnstoff (Überstand 2) und 7 M Harnstoff (Überstand 3) genutzt. Unlösliche Bestandteile wurden abschließend in PBS aufgenommen (Sediment). Anschließend wurden induzierte und nicht-induzierte Bakterienlysate sowie die einzelnen Überstände nach der Harnstoffextraktion in der SDS-PAGE (→ 4.9.1) und mittels Western-Blot-Analysen (→ 4.9.3) mit PRV-spezifischen Seren untersucht.

GD-1 (gD AS 1-170): Das Fusionsprotein des N-terminalen gD-Abschnittes ließ sich in pEV40 nur in geringer Menge exprimieren und wanderte in der SDS-PAGE bei einer Größe von ca. 27 kDa, übereinstimmend mit dem mittels Computerprogramm kalkulierten Molekulargewicht (Abb. 3 A). Es fand sich nach der Harnstoffextraktion zu einem geringeren Anteil im Überstand 3 und zum Großteil im Sediment (Abb. 3 A). Folglich handelte es sich um ein schwer lösliches bis unlösliches Fusionsprotein. Im Western-Blot zeigte sich nur eine schwache Reaktion mit dem PRV-spezifischen Ziegenserum (Abb. 4). Western-Blots mit den Fraktionen aus der Harnstoffextraktion (nicht gezeigt) bestätigten das Vorhandensein von GD-1 im Überstand 3 und im Sediment, wobei sich wiederum nur eine ausgesprochen schwache Reaktion zeigte.

GD-2 (gD AS 170-402): Das Fusionsprotein für den C-terminalen Abschnitt des gD wurde in pEV40 ebenfalls nur schwach exprimiert und wanderte in der SDS-PAGE bei der erwarteten Größe ca. 33 kDa (Abb. 3 B). Nach Harnstoffextraktion fand sich das GD-2 hauptsächlich im Überstand 3 in geringer Menge wieder (Abb. 3 B). Trotz der geringen Menge GD-2 in der SDS-PAGE, zeigte sich in der Western-Blot-Analyse mit PRV-spezifischem Serum eine starke spezifische Reaktion sowohl im Gesamtproteinlysat (Abb. 4) als auch im Überstand 3 (nicht gezeigt).

GD (gD AS 1-402): Auch dieses Fusionsprotein konnte in pEV40 nur in geringer Menge, etwa vergleichbar mit GD-1, exprimiert werden und wanderte in der SDS-PAGE bei der erwarteten Größe von ca. 65 kDa (nicht gezeigt). In Western-Blot-Analysen mit PRV-spezifischen Seren (Abb. 4, Abb. 5) zeigte sich eine spezifische Reaktion. Neben der Haupt-Bande bei 65 kDa zeigten sich noch weitere spezifische Banden niedrigeren Molekulargewichts bis zum Größenbereich von ca. 42 kDa. Dies ließ auf einen partiellen Verdau des Fusionsproteins bereits während der Induktion schließen. In Fraktionen der Harnstoffextraktion fand sich das GD zu einem geringeren Anteil im Überstand 3 und zum Großteil im Sediment wieder (Abb. 5). Es handelte sich also bei GD wie bei GD-1 um ein unlösliches Fusionsprotein.

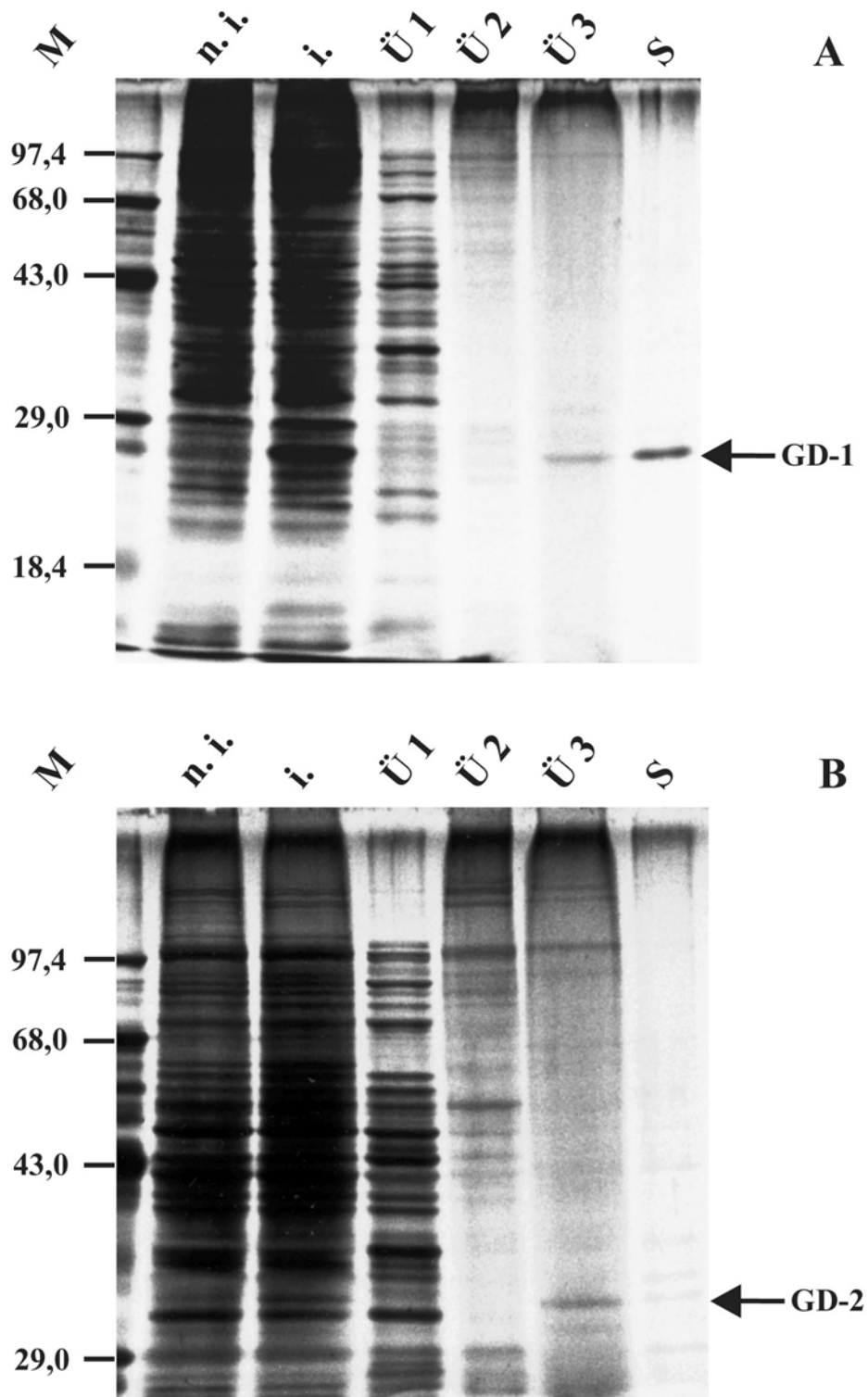


Abb. 3: SDS-PAGE, Silberfärbung, mit den Fraktionen aus der Harnstoffextraktion für GD-1 (A) und GD-2 (B). M = Marker [kDa], n.i. = nicht induziertes, i. = induziertes Bakterienlysat, Ü1 - Ü3 = Überstände 1 - 3, S = Sediment. GD-1 = 27 kDa, GD-2 = 33 kDa.

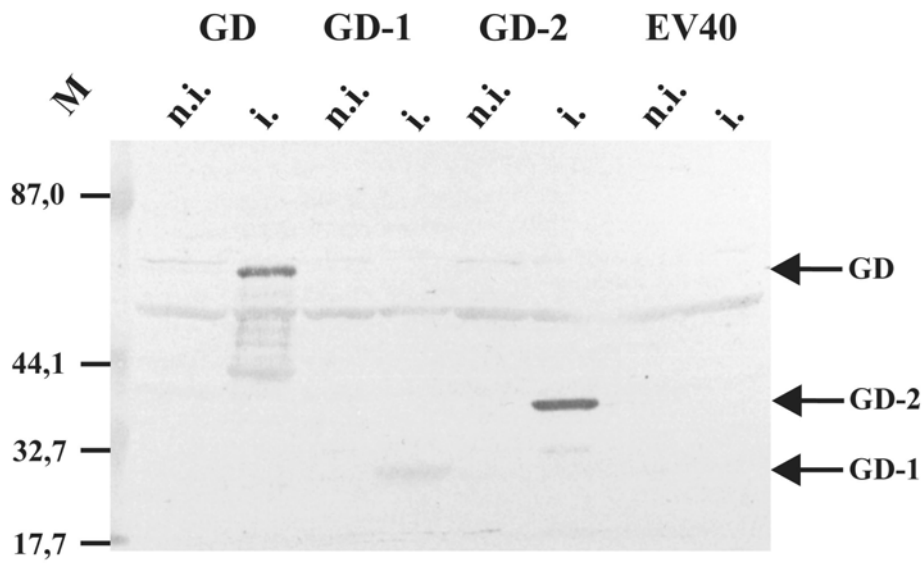


Abb. 4: Western-Blot-Analyse der Bakterienlysate der Fusionsproteine GD, GD-1, GD-2 und der Kontrolle EV40 mit PRV-Hyperimmunserum (Ziege, Verdünnung 1 : 500). M = Marker [kDa], n.i. = nicht induziertes, i. = induziertes Bakterienlysat.

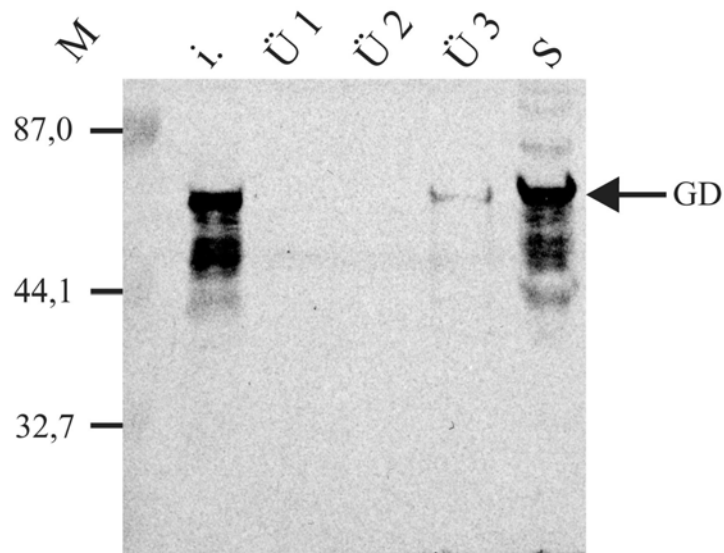


Abb. 5: Western-Blot-Analyse der GD-Fractionen aus der differentiellen Harnstoffextraktion mit PRV-gD-spezifischem Serum (Kaninchen, Verdünnung 1 : 500). M = Marker [kDa], i. = induziertes Bakterienlysat, Ü1 - Ü3 = Überstände 1 - 3, S = Sediment.

Um zu testen, ob nach kürzeren oder längeren Induktionszeiten eine bessere Expressionsrate der gD-Fusionsproteine erhalten werden konnte, wurden während 5 Stunden bei 42 °C stündlich Proben der Bakterienkulturen entnommen. Nach SDS-PAGE und Coomassie-Färbung fand sich jedoch weder vor noch nach 3-stündiger Hitzeinduktion eine verbesserte Expressionsrate jedes Fusionsproteins (nicht gezeigt).

5.1.5.3 Reinigungs- und Anreicherungsversuche der gD-Fusionsproteine durch Affinitätschromatographie an einer Talon-Säule

Da die 6xHis-markierten gD-Fusionsproteine in pEV40 nur in geringer Menge exprimiert wurden und in den jeweiligen Fraktionen der Harnstoffextraktion nur in entsprechend geringer Menge enthalten waren (→5.1.5.2), wurde untersucht, ob eine Anreicherung über Affinitätschromatographie möglich war. Diese Methode bietet auch den Vorteil, 6xHis-markierte Fusionsproteine noch weiter zu reinigen, indem sie weitgehend von nicht 6xHis-markierten, bakteriellen Proteinen oder anderen Bestandteilen aus der Harnstoffextraktion, wie dem Harnstoff selbst, befreit werden können.

Für die Reinigungsversuche wurde eine Talon-Säule (→ 3.6) verwendet. Hierbei wird ein auf Sepharose CL-6B basierendes Harz eingesetzt, das nicht nickelhaltig sondern kobalthaltig ist. Harze auf Nickelbasis zeigen häufig die Tendenz, nicht-6xHis-markierte Wirtsproteine zu binden (Kasher et al., 1993). Dagegen soll Co^{2+} eine hohe Affinität zu 6xHis-markierten Proteinen und eine geringe Affinität zu Wirtsproteinen besitzen. Die Reinigungsversuche über eine Talon-Säule wurden mit den Fusionsproteinen GD-1 und GD-2 durchgeführt. Als Kontrolle wurde das in pEV40 sehr gut exprimierte PRV-Glykoprotein gE-Fragment BF-2 (WF-26, gE AS 33-238, Fuchs et al., 1990) mitgeführt, das sich nach differentieller Harnstoffextraktion im Überstand 3 befand, und dessen spezifische Bande in der SDS-PAGE bei einer Größe von ca. 35 kDa wandert. Zur Reinigung wurden für das Fusionsprotein GD-1 der Überstand 3 und das Sediment und für GD-2 und BF-2 der Überstand 3 aus der differentiellen Harnstoffextraktion verwendet. Zusätzlich wurden noch Reinigungsversuche direkt mit den Bakterienlysaten durchgeführt.

Hier ist repräsentativ das Ergebnis für die Reinigungsversuche anhand der Überstände 3 der Harnstoffextraktion für BF-2 und GD-1 nach einem optimierten Reinigungsprotokoll (→ 4.8.4) gezeigt (Abb. 6). Anhand von BF-2 (Abb. 6 A) konnte demonstriert werden, dass nahezu das gesamte Fusionsprotein an die Säule gebunden hatte. Es war nur in geringen Mengen im Säulendurchlauf, beim Zentrifugationsschritt nach dem Probenauftrag, nachzuweisen. Auch bei den anschließenden Waschschritten (nicht gezeigt) blieb das meiste Fusionsprotein gebunden. BF-2 ließ sich zum Großteil sofort mit dem Eluat 1 wieder von der Säule eluieren und war dann, in immer geringer werdender Menge, in den Eluaten 2 bis 6 (Eluate 4 bis 6 nicht gezeigt) nachzuweisen. Dagegen wurde das Fusionsprotein GD-1 zwar zunächst zum Großteil gebunden, ließ sich dann aber nur im Eluat 1 und nur in sehr geringer Menge nachweisen (Abb. 6 B).

Die Reinigung und Anreicherung von in pEV40 exprimierten Fusionsproteinen mittels einer Talon-Säule funktioniert prinzipiell, wie anhand von BF-2 gezeigt werden konnte, das aus dem Überstand 3 der Harnstoffextraktion und aus dem Bakterienlysat (nicht gezeigt) sehr gut gereinigt und über SDS-PAGE nachgewiesen werden konnte. Das Fusionsprotein GD-1 konnte in den Talon-Eluaten mittels SDS-PAGE nur in sehr geringer Menge nachgewiesen werden, wobei die Ergebnisse für die Anreicherungsversuche mit dem Überstand 3 (Abb. 6 B), dem Sediment (nicht gezeigt) und dem Bakterienlysat (nicht gezeigt) vergleichbar waren. Das Fusionsprotein GD-2 war in den Talon-Eluaten mittels SDS-PAGE, selbst nach Silberfärbung, nicht nachweisbar, gleichgültig ob der Überstand 3 oder das gesamte Bakterienlysat zur Reinigung eingesetzt worden waren.

Aus diesen Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass die Talon-Reinigung nicht geeignet ist, wenn Fusionsproteine aufgrund der geringen Expressionsrate von vorne herein in zu geringer Konzentration vorliegen. Während der Reinigung kommt es zu einem Verlust an Fusionsprotein, der bei hohen Konzentrationen nicht ins Gewicht fällt, der sich aber bei geringen Konzentrationen entsprechend stärker auswirkt und zu geringsten Ausbeuten führt.

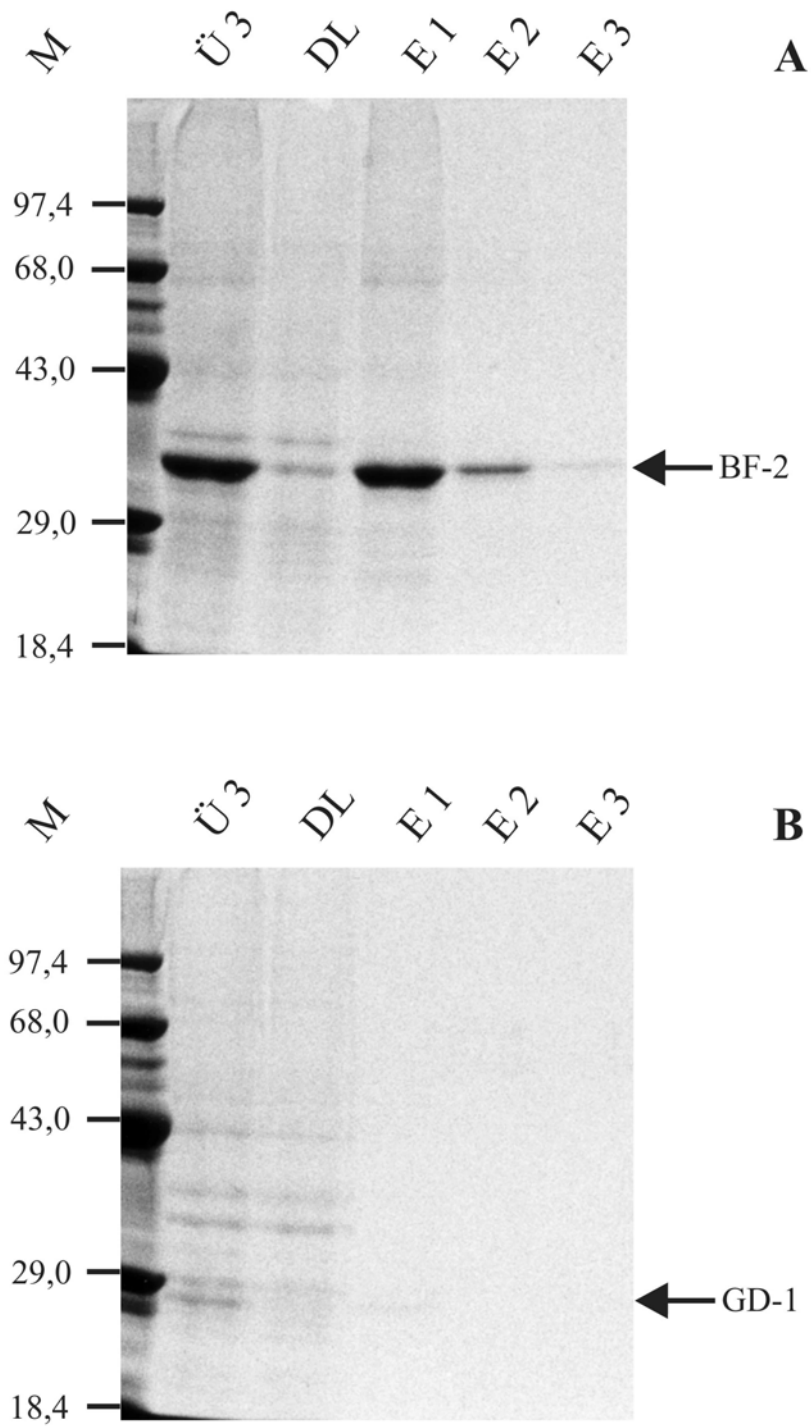


Abb. 6: SDS-PAGE (Coomassiefärbung) der Talon-Aufreinigung BF-2 (A) und GD-1 (B). M = Marker [kDa], Ü3 = Überstand 3 der Harnstoffextraktion, DL = Säulendurchlauf nach Probenaufrag, E1 – E3 = Eluate 1 bis 3.

5.1.6 PRV-ELISA

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die humorale und zelluläre PRV-spezifische Immunantwort von Inzuchtschweinen vom d/d Haplotyp (Sachs et al., 1976) und auch der natürlichen Auszuchtschweinepopulation mit polymorphem MHC (Chardon et al., 1999) untersucht werden. Dazu wurden drei Inzuchtschweine und zwei Auszuchtschweine deutscher Landrasse mit dem PRV-Impfstamm Begonia zweimal im Abstand von vier Wochen intranasal immunisiert (→ 4.3.1).

Während eine PRV-spezifische Reaktion im PRV-ELISA für die drei Inzuchtschweine bereits bekannt war, die sich bis zu einer Serumverdünnung von über 1:10.000 nachweisen ließ (Ober, 1993; Ober et al., 1998), musste die PRV-Immunsierung der beiden Auszuchtschweine noch über einen PRV-ELISA (→ 4.11.2) überprüft werden. Dazu wurden Mikrotiterplatten mit 0,3 µg/well PRV beschichtet. Die Schweineseren vor der Immunisierung und nach der 1. und der 2. Immunisierung wurden in den Verdünnungen 1 : 100, 1 : 1.000 und 1 : 10.000 getestet. Die Ergebnisse sind in Abb. 7 für die Versuchstiere 1 (A) und 2 (B) zu sehen. Die optische Dichte (OD) bei 492 nm ist gegen die Serumverdünnung aufgetragen. Für beide Versuchstiere wurde nach der 1. und nach der 2. Immunisierung im Vergleich zum Präimmunserum eine Steigerung der OD erhalten, die auf einer PRV-spezifischen Antikörperbildung beruhte, und die noch bei einer Serumverdünnung von 1 : 10.000 nachgewiesen werden konnte.

Bei der Verdünnung von 1 : 10.000 wurde für das Schwein 1 (Abb. 7 A) mit dem Präimmunserum eine OD von 0,10 gemessen (= $OD_{Prä.}$), mit dem Serum nach der 1. Immunisierung lag die OD bei 0,45 ($4,5 \times OD_{Prä.}$) und nach der 2. Immunisierung erreichte der OD-Wert 0,51 ($5,1 \times OD_{Prä.}$). Für das Schwein 2 (Abb. 7 B) ergab sich bei der Serumverdünnung 1 : 10.000 ein OD-Wert von 0,09 mit dem Präimmunserum (= $OD_{Prä.}$), mit dem Serum nach der 1. Immunisierung erreichte die OD hier 0,14 ($1,6 \times OD_{Prä.}$) und nach der 2. Immunisierung 0,55 ($6,1 \times OD_{Prä.}$). Die Induktion einer humoralen PRV-spezifischen Immunantwort nach PRV-Vakzinierung konnte somit für beide Tiere gezeigt werden.

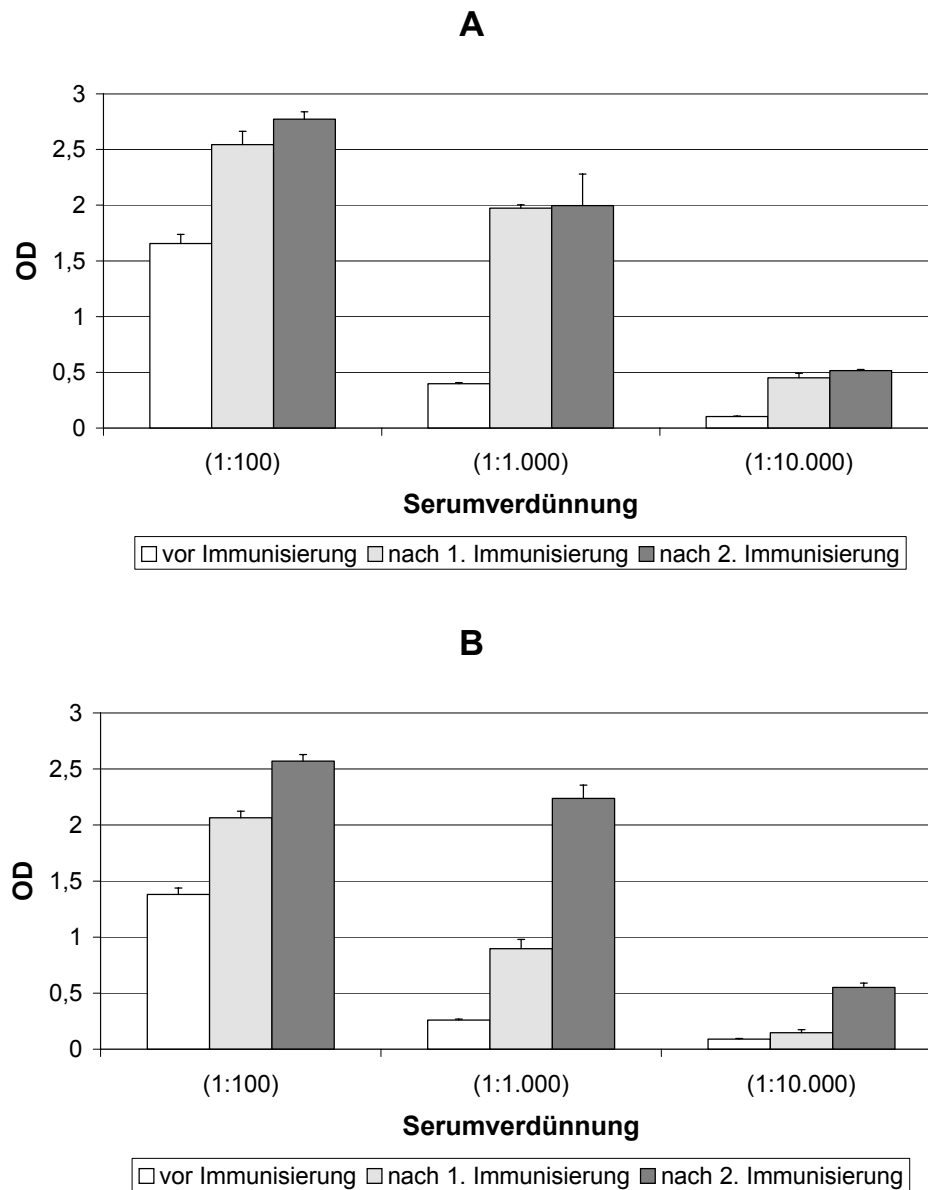


Abb. 7: PRV-ELISA zur Kontrolle der PRV-spezifischen Antikörperbildung nach PRV-Immunisierung der Auszuchtsschweine 1 (A) und 2 (B). Mikrotiterplatten wurden mit 0,3 µg/well PRV beschichtet. Die Schweineseren vor der Immunisierung und nach der 1. und der 2. Immunisierung wurden in den Verdünnungen 1 : 100, 1 : 1.000 und 1 : 10.000 getestet. Der Peroxidase-konjugierte Zweitantikörper (Ziege anti-Schwein Ig) wurde in einer Verdünnung von 1 : 1.000 verwendet. Aufgetragen ist die bei 492 nm gemessene OD gegen die jeweiligen Serumverdünnungen.

5.1.7 Herstellung der synthetischen Peptide gD 1-79

Zur Feinkartierung von B- und T-Zellepitopen des Glykoproteins gD wurden 79 synthetische Peptidamide, von 15 AS Länge und um jeweils 10 AS überlappend, entsprechend der Sequenz des Glykoproteins gD hergestellt (AS-Sequenzen → 9). Die Synthese der Peptidamide wurde, zusammen mit Dr. B. Teufel, an einem multiplen Peptidsynthesizer (→ 3.5) nach der Fmoc-Strategie (→ 4.10.1) durchgeführt. Nach der Synthese wurden die Peptide vom Harz abgespalten, wie unter 4.10.2 beschrieben.

5.1.7.1 Charakterisierung der Peptide über Ionenspray-Massenspektrometrie

Die synthetischen Peptidamide wurden über Ionenspray-Massenspektrometrie (IS-MS) von Dr. C. Kempter analysiert. Es wurde ein Tripel-Quadrupol Massenspektrometer API III mit einem Ionenspray- (IS-) Interface (Sciex, Canada) verwendet. Die Peptide wurden in H₂O/ACN 1 : 1 mit 0,1 % TFA-Gehalt gelöst, so dass Probelösungen von ca. 1 mg/ml erhalten wurden. Die Lösungen wurden über Fliessinjektion analysiert.

Repräsentativ ist das Massenspektrum für das Peptid gD16 (gD AS 76-90) mit der Aminosäuresequenz QVDRLLNEAVAHRRP und der für das Peptidamid berechneten Masse von 1773,3 Da gezeigt (Abb. 8). Die Hauptsignale im Spektrum sind durch die einfach, zweifach und dreifach protonierten Molekülionen zu erklären ($[M+H]^+$: m/z 1773,0; $[M+H]^{2+}$: m/z 887,0; $[M+H]^{3+}$: m/z 592). Aus diesen ergibt sich eine Molekülmasse von 1772 Da. Die Abweichung zwischen der gemessenen und der berechneten Molekülmasse ist einerseits auf die Messungenauigkeit und andererseits auf die Abweichung zwischen monoisotopischer und durchschnittlicher Molekülmasse zurückzuführen. Aus dem Massenspektrum ist zu ersehen, dass das Peptid eine sehr hohe Reinheit aufweist. Die weiteren Massensignale sind über Fragmentbildungen oder geringe Mengen kleinerer Peptide zu erklären.

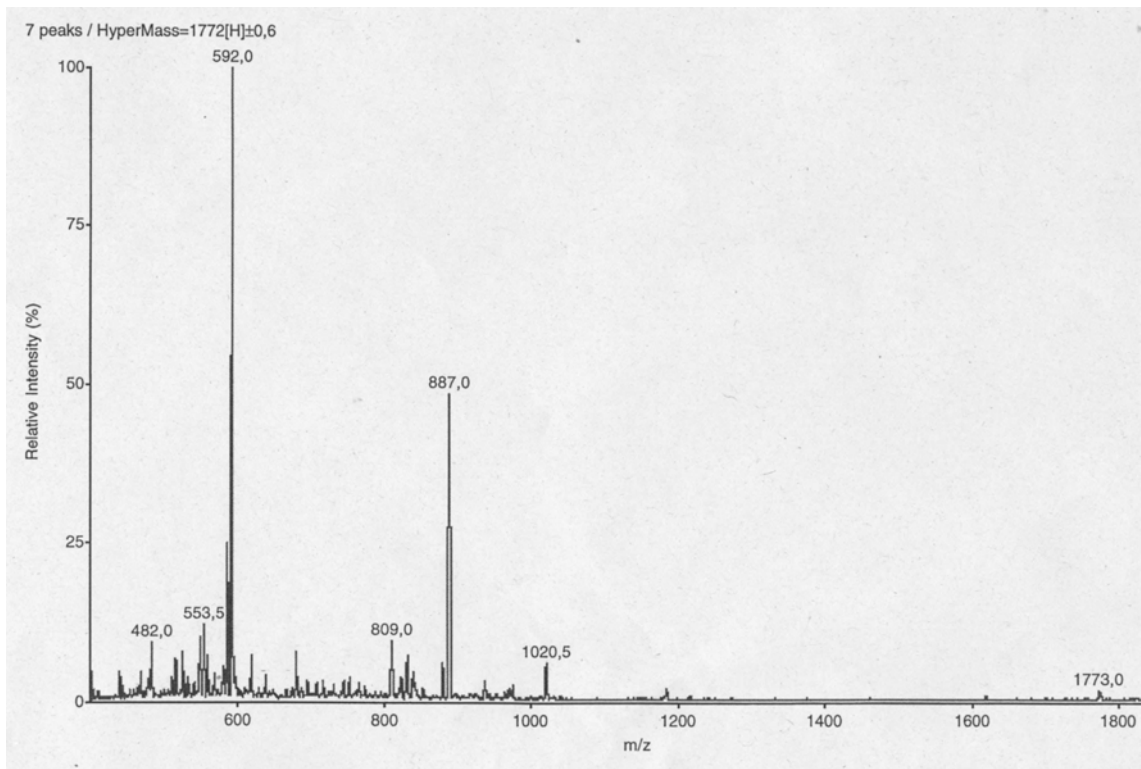


Abb. 8: IS-MS-Massenspektrum, Peptid gD16 (gD AS 76-90; AS-Sequenz: QVDRLLNEAVAHRRP). Aufgetragen ist die relative Intensität gegen das m/z- (Masse/Ladungs-) Verhältnis.

5.1.8 B-Zellepitopkartierung

Ergebnisse der Western-Blot-Analysen mit PRV-spezifischen Seren zeigten, dass vor allem der C-terminale Abschnitt des gD (gD AS 170-402) B-Zellepitope enthält (→ 5.1.5). Auch mit den Seren der PRV-immunisierten Inzuchtschweine und Auszuchtschweine zeigte sich in der Western-Blot-Analyse eine starke Reaktion mit dem Fusionsprotein GD-2 (gD AS 170-402), eine wesentlich schwächere Reaktion mit Gesamt-gD (AS 1-402), wogegen eine sehr geringe Reaktion mit GD-1 (AS 1-170) nur mit den Inzuchtschweinseren, nicht aber mit den Auszuchtschweinseren, nachgewiesen werden konnte (nicht gezeigt).

5.1.8.1 Peptid-ELISA mit PRV-spezifischen Seren und den Peptiden gD1-79

Zur Feinkartierung linearer B-Zellepitope des Glykoproteins gD wurden 79 überlappende Pentadecapeptide, die das gesamte gD repräsentieren (AS-Sequenzen → 9) im Peptid-ELISA (→ 4.11.1) mit Immunsereen getestet.

Mikrotiterplatten wurden mit 1 µg/well Peptid in 50 µl PBS-A über Nacht bei 4 °C beschichtet. Hierdurch konnte, im Vergleich zur bisher gebräuchlichen Beschichtung, die durch Eintrocknen von in Aqua bidest. gelöstem Peptid bei 37 °C erfolgte, der unspezifische Hintergrund gesenkt werden. Als Positivkontrolle wurde das charakterisierte PRV-spezifische gC-B-Zellepitop gC14 (gC AS 65-79, AS-Sequenz STPPVPPPSVSRK; Ober, 1993; Ober et al., 2000) verwendet. Das Ziegenhyperimmunserum und das Serum eines PRV-immunisierten Inzuchtschweines sowie die entsprechenden Präimmunsereen wurden in der Verdünnung 1 : 100 eingesetzt. Ein Peptid wurde als potentielles B-Zellepitop gewertet, wenn bei Inkubation mit dem Immunserum mindestens die doppelte optische Dichte (OD) des Präimmunserums ($2 \times OD_{Prä.}$) erhalten wurde und dieses Ergebnis reproduzierbar war.

In Abb. 9 A ist das Ergebnis für den Peptid-ELISA mit dem Ziegenserum gezeigt. Die OD-Werte sind gegen die Peptidnummer aufgetragen. Die OD-Werte mit dem Serum vor der Immunisierung (weiße Balken) und mit dem Serum nach der Immunisierung (schwarze Balken) sind für die einzelnen Peptide jeweils nebeneinandergestellt. Das PRV-spezifische Ziegen-Hyperimmunserum zeigte eine spezifische Reaktion mit den Peptiden gD55 ($2,0 \times OD_{Prä.}$), gD63 ($3,7 \times OD_{Prä.}$), gD65 ($5,8 \times OD_{Prä.}$), gD66 ($2,1 \times OD_{Prä.}$) und gD79 ($4,0 \times OD_{Prä.}$). Der Wert der gC14-Kontrolle lag bei $14,4 \times OD_{Prä.}$ (nicht gezeigt). Der gemittelte unspezifische Hintergrund aller OD-Werte mit dem Präimmunserum lag bei einer OD von 0,13.

In Abb. 9 B ist, entsprechend zur Abb. 9 A, das Ergebnis für den Peptid-ELISA mit dem Serum des PRV-immunisierten Inzuchtschweines (Tier 3) dargestellt. Das Serum nach der Immunisierung zeigte hier eine spezifische Reaktion mit den Peptiden gD64 ($2,8 \times OD_{Prä.}$), gD65 ($2,3 \times OD_{Prä.}$) und gD77 ($2,0 \times OD_{Prä.}$). Die gC14-Kontrolle lag bei $5,5 \times OD_{Prä.}$ (nicht gezeigt). Der gemittelte unspezifische Hintergrund aller Werte mit dem Präimmunserum fand sich bei einer OD von 0,35 und war somit höher als für das Ziegenserum (OD 0,13).

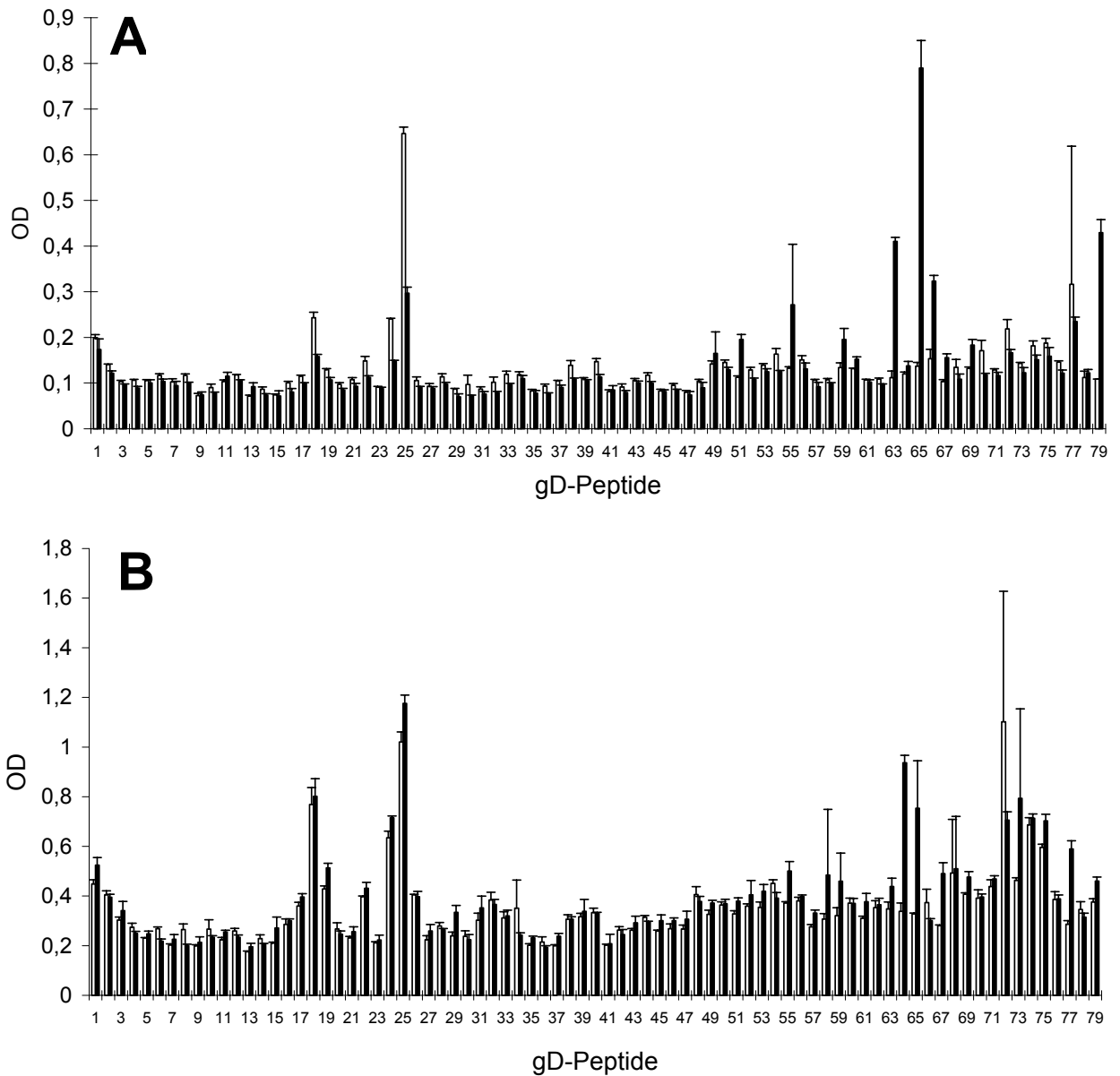


Abb. 9: Peptid-ELISA mit PRV-spezifischem Ziegenhyperimmunserum (A) oder PRV-spezifischem Serum eines Inzuchtschweins vom d/d Haplotyp (B) und den Peptiden gD 1-79 (gD AS 1-402). Aufgetragen sind die bei 492 nm gemessenen OD-Werte gegen die Peptidnummer. Für die Peptide (1 µg/well) sind die OD-Werte mit dem Präimmunserum (weiße Balken) und dem Immunserum (schwarze Balken) jeweils nebeneinandergestellt. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Standardabweichungen sind durch Fehlerbalken angezeigt. Die PRV-spezifischen Seren wurden in der Verdünnung 1 : 100, der Peroxidase-konjugierte Zweitantikörper (Kaninchen anti-Ziege Ig bzw. Ziege anti-Schwein Ig) in der Verdünnung 1 : 5.000 eingesetzt.

Im Vergleich zum Peptid gC14 zeigte sich sowohl für das Ziegen- als auch für das Inzuchtschweinsersum mit allen positiv reagierenden gD-Peptiden eine schwächere Reaktion.

Die über B-Zellepitopkartierung durch einen Peptid-ELISA für das Ziegenhyperimmunserum und für das Inzuchtschwein vom d/d Haplotyp auf dem Glykoprotein gD erhaltenen linearen B-Zellepitope sind in Tab. 1 zusammengefasst. Beide getesteten PRV-spezifischen Seren erkannten im Peptid-ELISA, bis auf das Peptid gD65, auf das mit beiden Seren eine positive Reaktion erfolgte, innerhalb desselben C-terminalen gD-Bereiches (gD AS 271-402) unterschiedliche Peptide.

gD-Peptid	Ziege	Inzuchtschwein
gD 55 (gD AS 271-285)	+	-
gD63 (gD AS 311-325)	+	-
gD64 (gD AS 316-330)	-	+
gD65 (gD AS 321-335)	+	+
gD66 (gD AS 326-340)	+	-
gD77 (gD AS 381-395)	-	+
gD79 (gD AS 391-402)	+	-

Tab. 1: Peptid-ELISA mit den Peptiden gD1-79 und Ziegen- bzw. Inzuchtschweinsersum. (+ = positive Reaktion, - = negative Reaktion).

Um zu sehen, ob mit der PBS-A-Beschichtung der Mikrotiterplatten auch der unspezifische Hintergrund im Peptid-ELISA mit Auszuchtschweinsersum gesenkt werden konnte, wurden mit den Immunseren und Präimmunseren der PRV-immunisierten Auszuchtschweine 1 und 2 ebenfalls Peptid-ELISAs durchgeführt. Es wurden die Peptide gD57-79 getestet (gD AS 281-402). Es konnte jedoch keine spezifische Reaktion der Immunseren mit den Peptiden gezeigt werden (nicht gezeigt).

5.1.9 T-Zellepitopkartierung

5.1.9.1 Proliferationstests mit β -Propiolacton-inaktiviertem PRV

Für Proliferationstests mit PBMC PRV-immunisierter Schweine wurde als Positivkontrolle UV-inaktiviertes PRV (UV-PRV) verwendet. Die Virusinaktivierung erscheint vorteilhaft, vor allem für mehrtägige Versuche, da Zellen der PBMC-Fraktion wie Monocyten und Lymphocyten, darunter sowohl B-Zellen als auch T-Zellen, CD4⁺ Zellen als auch CD8⁺ Zellen, lytisch infiziert werden (Chinsakchai und Molitor, 1992; Dreyer-Bux, 1997; Mulder et al., 1995).

Die UV-Virusinaktivierung wurde mit einem Stratalinker-Gerät bei 254 nm durchgeführt (→ 4.2.4). Mit zunehmender Bestrahlungsdauer wurde häufig eine Abnahme der restimulierenden Wirkung der inaktivierten Virussuspension auf die PBMC beobachtet (nicht gezeigt). Ein Grund könnte die Zerstörung immunogener Epitope durch die UV-Strahlung sein. Außerdem könnten die Oberflächenglykoproteine durch UV-bedingte Quervernetzung für die Antigenerkennung weniger exponiert erscheinen. Als alternative Inaktivierungsmethode wurde getestet, inwieweit sich β -Propiolacton-inaktiviertes PRV (β -PL-PRV) zur Restimulierung der PBMC eignete. β -PL (C₃H₄O₂) ist eine alkylierende Substanz und wirkt auf niedere Organismen mutagen. Es inaktiviert Mikroorganismen wie Bakterien, Pilze, Phagen und Viren. Auch im Tierversuch erweist sich β -PL als hochgradiges Carcinogen (Falbe und Regitz, 1995).

Eine PRV-Virussuspension mit einem Titer von 10⁸ pfu/ml wurde zur Inaktivierung mit 0,08 % β -PL versetzt (→ 4.2.5). Die Virusinaktivierung wurde durch 10-tägige Co-Kultivierung der so behandelten Virussuspension mit PSEK-Zellen überprüft (→ 4.2.6). PRV-immune PBMC des Inzuchtschweines 3 wurden mit verschiedenen Konzentrationen β -PL-PRV (1,5 - 20 moi, entsprechend der Bestimmung vor Virusinaktivierung) für 6 Tage restimuliert. Die spezifische PBMC-Proliferation wurde durch 18 h Einbau von ³H-Thymidin in cpm bestimmt (→ 4.4.2.).

Die PBMC konnten mit β -PL-PRV konzentrationsabhängig restimuliert werden (Abb. 10). Mit 2,5 moi wurde eine maximale PBMC-Proliferation von 42155 cpm gemessen. Dies entspricht dem 11-fachen der Spontanproliferation ohne Antigenzusatz (3940 cpm). Bei den höheren Konzentrationen von 20 und 10 moi/well zeigte sich eine

Hemmung der Proliferation. Die Ergebnisse entsprachen den mit UV-PRV nach optimaler UV-Inaktivierung erhaltenen Stimulationen der Zellproliferation (nicht gezeigt). Daher wurde für alle weiteren Versuche β -PL-PRV in einer Konzentration von 2,5 moi eingesetzt.

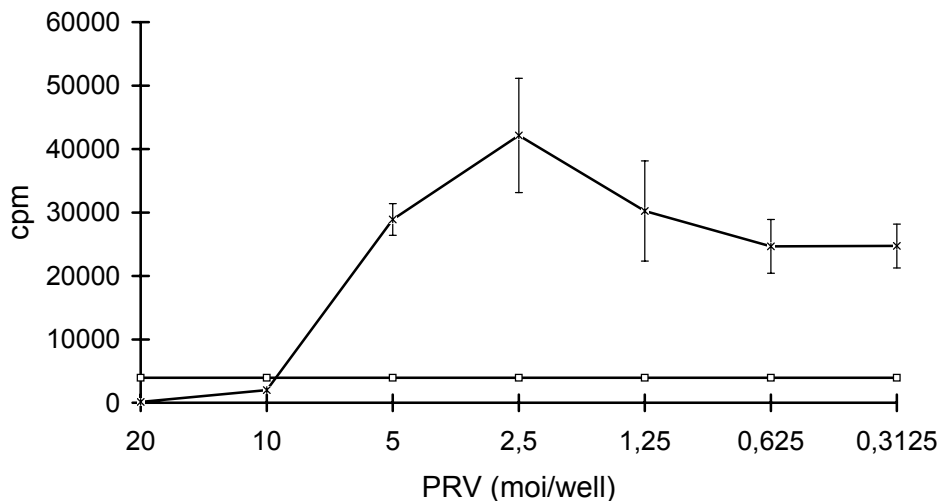


Abb. 10: Proliferationstest mit PBMC und β -PL-PRV. PBMC eines PRV-immunisierten Inzuchtschweines (2×10^5 /well) wurden mit den angegebenen Mengen (moi) β -PL-PRV für 6 Tage inkubiert. Die spezifische Proliferation wurde durch 18 h Einbau von ^3H -Thymidin in cpm bestimmt. Die untere durchgezogene Linie markiert die Spontanproliferation (3940 ± 870 cpm). Dargestellt sind Triplikate, die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken eingetragen.

5.1.9.2 Proliferationstests mit den Fusionsproteinen GD-1, GD-2 und GD

Zur näheren Eingrenzung von T-Zellepitopen auf dem Glykoprotein gD wurden die Fusionsproteinen GD-1 (gD AS 1-170), GD-2 (gD AS 170-402) und GD (gD AS 1-402) zur Restimulation PRV-spezifischer PBMC (\rightarrow 4.4.2) des Inzuchtschweines 3 eingesetzt. Hierzu wurden die Überstände 3 der Harnstoffextraktion verwendet, da die im Expressionsvektor pEV40 exprimierten gD-Fusionsproteine über Affinitätschromatographie nicht weiter angereichert werden konnten (\rightarrow 5.1.5.3). Zum Vergleich wurde EV40 ohne Insert mitgeführt. Es war beobachtet worden, dass der Vektor ohne Insert bereits eine stimulatorische Wirkung auf naive (nicht gezeigt) und PRV-immune PBMC ausübte. Eine Proliferation konnte deshalb nur dann als gD-Fusionsprotein-spezifisch gelten, wenn die mit EV40 erhaltene Proliferation

überschritten wurde. In Abb. 11 sind die Ergebnisse dargestellt. Zunächst sind die Ergebnisse für 1 µg Proteingehalt/well beschrieben.

GD: Mit dem das gesamte gD repräsentierenden Fusionsprotein zeigte sich eine maximale PBMC-Proliferation von 42544 cpm. Der Messwert lag deutlich höher als der mit EV40 gemessene Wert (24262 cpm). Dies sprach für eine GD-spezifische Proliferation und somit dafür, dass auf dem Glykoprotein gD für das Inzuchtschwein T-Zellepitope zu erwarten sind.

GD-1: Mit dem N-terminalen gD-Abschnitt wurde eine maximale Proliferation von 31809 cpm gemessen. Auch dieser Wert lag, wenngleich weniger deutlich als der GD-Wert, über dem EV40-Vergleichswert und wurde als GD-1-spezifisch gewertet. Auf dem N-terminalen gD-Abschnitt konnten T-Zellepitope vermutet werden.

GD-2: Der C-terminale gD-Abschnitt bewirkte eine maximale Proliferation von 19185 cpm. Diese lag unterhalb der mit EV40 erhaltenen Proliferation und wurde somit als unspezifisch betrachtet. Möglicherweise reichte jedoch der geringe GD-2-Anteil in der Probe, trotz gleichen Proteingehaltes, nicht dazu aus, eine stimulatorische Wirkung auf die PBMC zu entfalten. Aus diesem Grund konnte das Vorhandensein von T-Zellepitopen auf dem C-terminalen gD-Abschnitt nicht vollkommen ausgeschlossen werden.

Mit abnehmender Proteinkonzentration (0,1 µg und 0,01 µg/well) näherten sich alle Werte der Spontanproliferation (9150 cpm) an, während die höhere Konzentration von 10 µg Proteingehalt/well mit allen Fusionsproteinen eine Hemmung der PBMC-Proliferation zur Folge hatte, die auf der Wirkung von toxischen Bestandteilen aus der Harnstoffextraktion beruhen könnte.

Zusätzlich wurden Proliferationstests mit dem Sediment aus der Harnstoffextraktion der Fusionsproteine GD und GD-1 durchgeführt (nicht gezeigt). In der Western-Blot-Analyse hatte sich gezeigt, dass diese Fraktion einen höheren GD- oder GD-1-Anteil hatte, als der Überstand 3 aus der Harnstoffextraktion (→ 5.1.5). Das Sediment war jedoch sehr unlöslich und nicht in eine homogene Lösung mit definiertem Proteingehalt zu bringen. Es übte einen hemmenden Einfluss auf das Zellwachstum aus. Die Tests konnten nicht weiter verwertet werden.

Zunächst sollte der N-terminale gD-Abschnitt weiter auf T-Zellepitope untersucht werden.

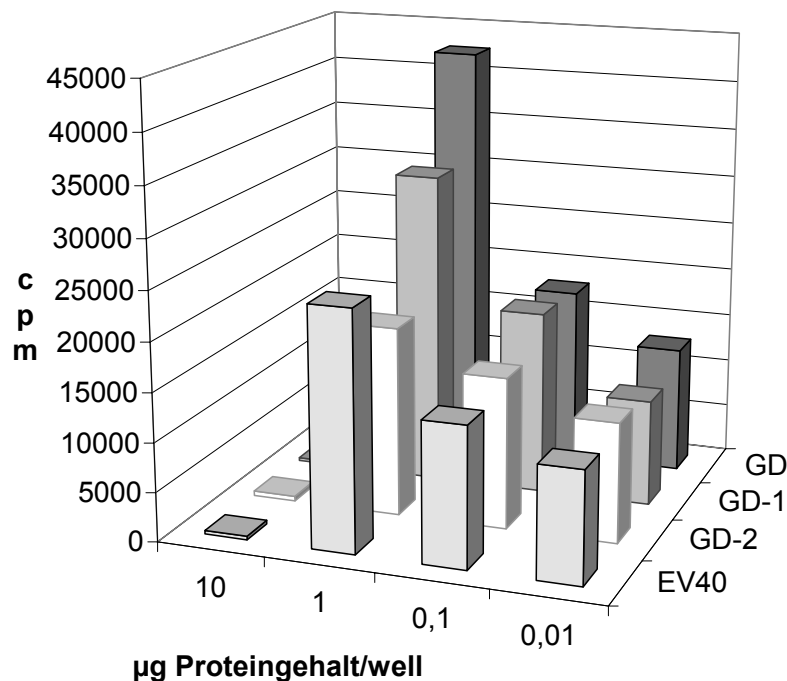


Abb. 11: Proliferationstest mit den Fusionsproteinen GD-1, GD-2 und GD. PBMC eines PRV-immunisierten Inzuchtschweines (2×10^5 /well) wurden mit in Zehnerschritten ($10 \mu\text{g}$ - $0,01 \mu\text{g}$ Proteingehalt/well) verdünnten Fusionsproteinen GD (gD AS 1-402), GD-1 (gD AS 1-170) und GD-2 (gD AS 170-402) für 6 Tage inkubiert. Als Kontrolle wurde EV40, der Expressionvektor ohne Insert, verwendet. Die spezifische Proliferation der PBMC wurde über den 18 h Einbau von ^3H -Thymidin in cpm bestimmt. Spontanproliferation = 9150 cpm. β -PL-PRV-Kontrolle (2,5 moi) = 48536 cpm. Dargestellt sind die Werte triplikativer Kulturen.

5.1.9.3 T-Zellepitopkartierung mit den Peptiden gD1-34 und PBMC von Inzuchtschweinen

Vorausgegangene Proliferationstests mit *E. coli* gD-Fusionsproteinen und PBMC PRV-immunisierten Inzuchtschweine hatten den Hinweis auf das Vorhandensein von T-Zellepitopen im N-terminalen gD-Abschnitt (gD AS 1-170) ergeben (\rightarrow 5.1.9.2). Zur Feinkartierung von T-Zellepitopen wurden 35, diesen Bereich repräsentierende, synthetische Pentadecapeptide (gD AS 1-185, AS-Sequenzen \rightarrow 9) in Proliferationstests (\rightarrow 4.4.2) mit PBMC des PRV-immunisierten Inzuchtschweines 3 eingesetzt. Das Testergebnis ist in Abb. 12 gezeigt. Ein gegenüber der Spontanproliferation um

mindestens das Zweifache erhöhter Stimulationsindex (SI = cpm-Wert mit Peptid/cpm-Wert Spontanproliferation) wurde als spezifisch gewertet.

Hierbei stimulierte das Peptid gD16 bei allen Peptidkonzentrationen, bis auf 10 µg Peptid/well (SI = 1,6), mit Stimulationsindices von 2,2 bis 4,0 (Abb. 12). Die spezifische Stimulierung von PBMC mit gD16 bestätigte sich in weiteren Tests (SI von 2,0 bis 2,5), auch mit PBMC des Inzuchtschweines 2 (nicht gezeigt).

Mit dem Peptid gD17 inkubierte PBMC wiesen bei der Konzentration 1 µg Peptid/well einen SI von 2,0 auf und zeigten bei den übrigen Konzentrationen SI-Werte von 1,4 bis 1,8 (Abb. 12). Auch mit dem Peptid gD34 inkubierte PBMC zeigten bei 10 µg Peptid/well einen SI von 2,0. Die Stimulation mit den übrigen Peptidkonzentrationen lagen unterhalb des Grenzwertes 2,0 (SI: 1,0; 1,6; 1,6). Eine spezifische Stimulierung mit den Peptiden gD17 und gD34 konnte allerdings in weiteren Proliferationstests nicht reproduziert werden (nicht gezeigt). Deshalb wurde davon ausgegangen, dass der für das Peptid gD17 und für das Peptid gD34 bei jeweils einer Peptidverdünnung gemessene SI von 2,0 nicht signifikant war. Währenddessen wurde mit allen weiteren Peptiden (gD1-15, gD18-gD33 und gD35), bei allen Peptidverdünnungen, keine spezifische Stimulierung der PBMC-Proliferation erhalten (Abb. 12).

Um nachzuweisen, dass die Peptid gD16-spezifische Proliferation PRV-spezifisch ist, wurde ein vergleichender Proliferationstest mit PBMC des PRV-immunisierten Inzuchtschweines 3 und eines anderen, nicht PRV-immunisierten Inzuchtschweines durchgeführt. PBMC des PRV-immunisierten Inzuchtschweines konnten mit dem Peptid gD16 konzentrationsabhängig restimuliert werden (SI bis zu 2,5 bei 0,1 µg Peptid/well; Abb. 13). Im Gegensatz dazu wiesen PBMC des nicht PRV-immunisierten Inzuchtschweines nach gD16-Peptidzugabe keine spezifische Stimulierung auf (maximaler SI = 1,2 bei 0,01 µg/well; Abb. 13).

Über T-Zellepitopkartierung mit synthetischen Peptiden konnte für das N-terminale gD (gD AS 1-185) für das Inzuchtschwein vom d/d Haplotyp ein T-Zellepitop: gD16 (gD AS 76-90) identifiziert werden (AS-Sequenz: QVDRLLENEVAHRRP). Nur PRV-immune, nicht aber naive PBMC zeigten eine spezifische Proliferation mit gD16.

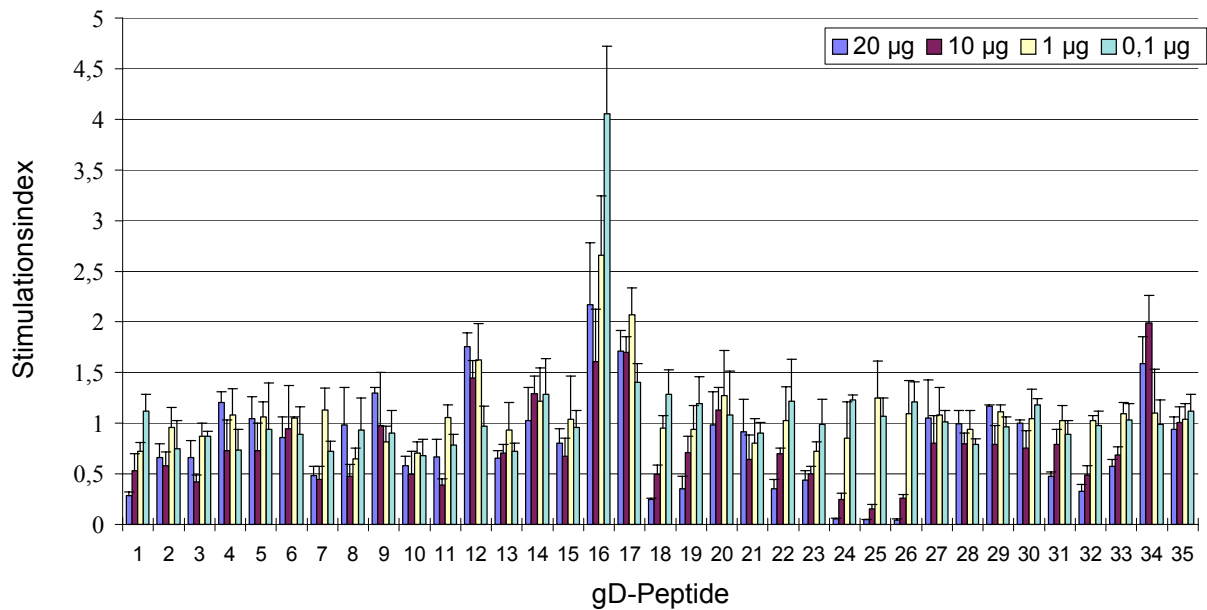


Abb. 12: T-Zellepitop-Feinkartierung mit den Peptiden gD1-35 und PBMC des PRV-immunisierten Inzuchtschweines 3. PRV-immune PBMC wurden zusammen mit den gD-Peptiden gD1-35 (gD AS 1-185) in den angegebenen Verdünnungen in einem Proliferationstest (→ 4.4.2) untersucht. Der Stimationsindex (SI) ist gegen die Peptidnummer aufgetragen. Die β -PL-PRV-Kontrollen (2,5 moi) zeigten SI von 9 bis 13. Dargestellt sind Triplikate, die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken angegeben.

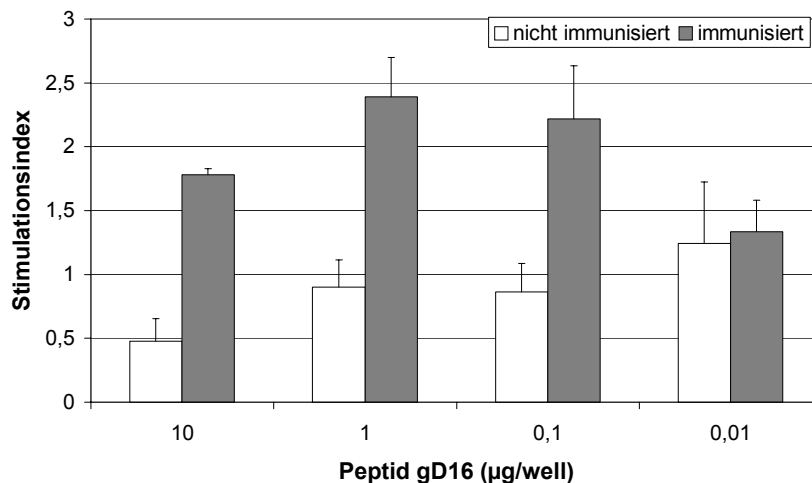


Abb. 13: Proliferationstest (→ 4.4.2) mit dem Peptid gD16, immunisiertes und nicht immunisiertes Inzuchtschwein. Der Stimationsindex (SI) ist gegen die Peptidkonzentration aufgetragen. Die β -PL-PRV-Kontrollen (2,5 moi) wiesen einen SI von 7 (immunisiertes Tier) und 1 (nicht immunisiertes Tier) auf. Die Spontanproliferationen lagen bei 6653 (+/- 1278) cpm (immunisiert) und 5163 (+/- 1605) cpm (nicht immunisiert). Dargestellt sind Triplikate, die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken eingetragen.

5.1.9.4 MHC-Restriktion der Peptid gD16-spezifischen Immunantwort

Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass für die Stimulierung der T-Zellproliferation von PBMC immunisierter Schweine durch PRV die Subpopulation der CD4⁺CD8⁺ T-Helferzellen maßgeblich verantwortlich ist. Die PRV-spezifische PBMC-Immunantwort erwies sich als MHC Klasse II-restringiert (Ober et al., 1998; Summerfield et al., 1996). Dasselbe konnte auch für ein gC-spezifisches T-Zellepitop (gC72, gC AS 355-369; Ober et al., 1998) gezeigt werden. Um die gD16-spezifische Immunantwort PRV-immuner PBMC weiter zu charakterisieren, sollte deshalb deren MHC-Restriktion bestimmt werden.

Dazu wurden PBMC des PRV-immunisierten Inzuchtschweines 3 zusammen mit dem Peptid gD16 (1 µg/well) und Hybridoma-Zellkulturüberständen (100 µl/well) inkubiert, die monoklonale Antikörper (mAb) gegen CD4-, CD8-, MHC I- und MHC II-Moleküle enthalten. Die Zugabe der mAb erfolgte zu Beginn der 6-tägigen Kultivierung.

Wie in Abb. 14 gezeigt, wurde die gD16-spezifische PBMC-Proliferation (22270 cpm) durch mAb, die gegen CD4-Corezeptoren (mAb 74-12-4) und MHC II-Moleküle (mAb MSA 3) gerichtet sind um 97 % (640 cpm) bzw. 79 % (4852 cpm) inhibiert, wie für eine MHC II-Restriktion zu erwarten.

Gegen CD8-Corezeptoren gerichtete mAb (mAb 11/295/33) hemmten die peptidspezifische Proliferation jedoch ebenfalls um 48 % (11646 cpm). Auch der gegen MHC I-Moleküle gerichtete mAb 74-11-10 (anti-MHC I (1)) inhibierte das spezifische Zellwachstum um 47 % (11873 cpm). Dagegen steigerte ein weiterer mAb anti-MHC I (mAb 2.27.3a, anti-MHC I (2)) die spezifische Proliferation um 71 % (38026 cpm).

Die Variation des Tests durch Verringerung der mAb-Kulturüberstände auf 75 µl oder 50 µl sowie die zusätzliche Verwendung weiterer Peptidkonzentrationen (10 µg, 0,1 µg und 0,01 µg) erbrachte keine grundlegende Änderung der Resultate (nicht gezeigt).

In den vorliegenden Untersuchungen zeigte sich eine MHC II-Restriktion der gD16-spezifischen Antwort. CD4- und MHC II-Moleküle sind beteiligt. Eine weitere Abklärung ist erforderlich, inwieweit der CD8-Corezeptor und das MHC I-Molekül an der gD16-spezifischen Proliferation beteiligt sind (→ 6.3.1.1).

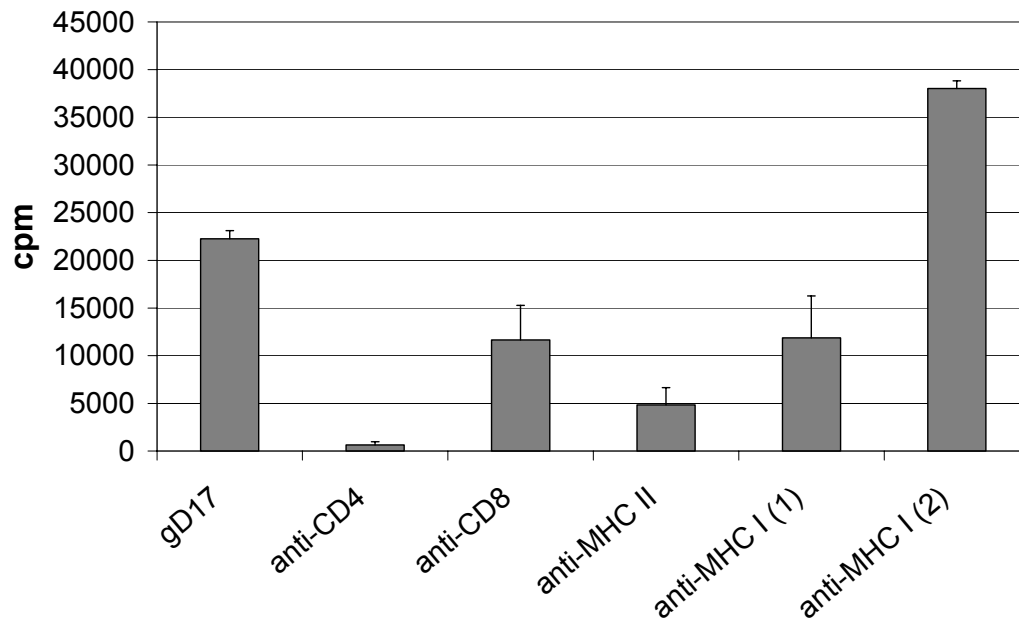


Abb. 14: MHC-Restriktion der gD16-spezifischen PBMC-Proliferation. PBMC eines PRV-immunisierten Inzuchtschweines (2×10^5 /well) wurden mit dem Peptid gD16 unter Zusatz monoklonaler Antikörper (mAb) anti-CD4 (74-12-4), mAb anti-CD8 (11/295/33), mAb anti-MHC II (MSA-3), mAb anti-MHC I (1) (74-11-10) und mAb anti-MHC I (2) (2.27.3a) für 114 h inkubiert. Die Proliferation wurde durch 18 h ^3H -Thymidineinbau in cpm quantifiziert. Die β -PL-PRV-Kontrolle 2,5 moi lag bei 46867 (± 1252) cpm. Dargestellt sind Triplikate, die Standardabweichung ist durch Fehlerbalken angezeigt. Die Spontanproliferation war 8061 (± 4227).

5.1.9.5 IL-2-Aktivierungstest, Peptid gD16

Aktivierte T-Helferzellen zeichnen sich durch eine erhöhte Cytokinproduktion und je nach T-Helfer-Zelltyp (Th1 und Th2) durch ein unterschiedliches Cytokinsekretionsmuster aus. Th1-Zellen sezernieren u. a. Interleukin-2 (IL-2), Interferon- γ (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor- β (TNF- β), Th2-Zellen sezernieren u. a. Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-5 (IL-5), Interleukin-10 (IL-10) und Interleukin-13 (IL-13; Mosmann et al., 1986).

Zum Nachweis der Cytokinsekretion mit dem Peptid gD16 restimulierter PRV-spezifischer PBMC wurde ein IL-2-Aktivierungstest mit der interleukinabhängigen murinen HT-2-Zelllinie (Watson, 1979) durchgeführt. Diese Zelllinie wächst nur in Anwesenheit von IL-2, das sowohl murinen, humanen als auch porcinen Ursprungs sein kann. Die Aktivität der HT-2-Zellen ist somit ein Maß für den IL-2-Gehalt in

Zellkulturüberständen. Dieser wiederum spiegelt die IL-2-Produktion der jeweiligen Zellpopulationen wider.

PBMC (2×10^5 /well) des PRV-immunisierten Inzuchtschweines 3 wurden zusammen mit dem Peptid gD16, das im Proliferationstest zu einer spezifischen Reaktion geführt hatte und dem Peptid gD1, das keine spezifische Reaktion ausgelöst hatte, inkubiert (je $1 \mu\text{g}$ /well). Zudem wurde β -PL-PRV (2,5 moi) und PBMC ohne Antigenzusatz (Kontrolle) eingesetzt. Nach 24, 48, 72, 96 und 114 Stunden wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und für zwei Tage mit der murinen IL-2-abhängigen HT-2-Zelllinie (4×10^3 /well) kultiviert (\rightarrow 4.4.3.). Die Aktivität der HT-2-Zellen wurde durch 18 h ^3H -Thymidineinbau in cpm bestimmt (\rightarrow 4.4.2.).

In Abb. 15 sind die Testergebnisse gezeigt. Die Aktivität der HT-2-Zellen in cpm mit den Kulturüberständen ist gegen die Zeitwerte aufgetragen. Die Cytokinsekretion galt dann als antigenspezifisch, wenn mit dem jeweiligen Kulturüberstand mindestens die doppelte HT-2-Aktivität der Kontrolle ohne Antigen erhalten wurde.

Die mit den 24 h-Kulturüberständen des Peptides gD16 kultivierten HT-2-Zellen zeigten eine Aktivität von 18280 cpm. Dies bedeutete eine im Vergleich zur 24 h-Kontrolle (3170 cpm) 5,8-fach höhere Aktivität und ließ auf eine durch das Peptid gD16 induzierte Cytokinproduktion innerhalb der Ausgangs-PBMC-Population schließen, die aktivierten T-Helferzellen zugerechnet werden kann. Im weiteren Testverlauf kam es zu einer Abnahme der HT-2-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle. Auch nach 48 h war jedoch noch eine gD16-spezifische IL-2-Produktion nachweisbar (18104 cpm = $2,5 \times$ Kontrolle). Nach 114 h zeigten die HT-2-Zellen mit Kulturüberständen des Peptides gD16 noch eine Aktivität von 14109 cpm ($1,8 \times$ Kontrolle).

Mit den 24 h-Kulturüberständen des Peptides gD1 hingegen lag die HT-2-Aktivität mit 2630 cpm im Bereich der Kontrolle ($0,8 \times$ Kontrolle). Dies galt auch für die 48, 72 und 96 h-Werte. Der 114 h-Wert lag mit 12568 cpm beim $1,6$ -fachen der Kontrolle. Daraus konnte geschlossen werden, dass das Peptid gD1 zu keiner spezifischen IL-2-Produktion innerhalb der PBMC-Ausgangspopulation geführt hatte.

Mit dem 24 h-PRV-Kulturüberstand wurde eine HT-2-Aktivität von 6955 cpm ($2,2 \times$ Kontrolle) erreicht. Mit zu den weiteren Zeitpunkten abgenommenen PRV-Kulturüberständen zeigte sich, mit einer vermutlich testbedingten Ausnahme bei 72 h (23728 cpm = $1,6 \times$ Kontrolle), ein Anstieg der HT-2-Aktivität bis auf 36489 cpm ($4,6$

x Kontrolle) nach 114 h. Hiermit konnte auf eine PRV-induzierte Cytokinproduktion innerhalb der PBMC, die bereits innerhalb der ersten 24 h beginnen musste, geschlossen werden. Eine β -PL-spezifische Cytokinproduktion war in weiteren, entsprechenden Tests für beide getesteten Inzuchtschweine 2 und 3 über den gesamten untersuchten Zeitraum von 114 h ohne Ausnahme nachweisbar (nicht gezeigt).

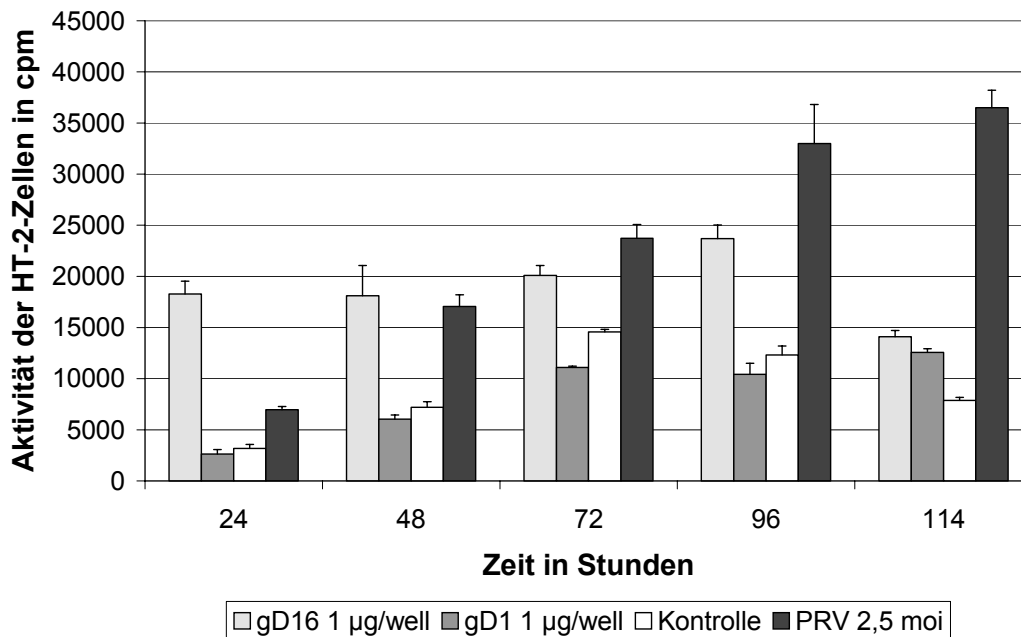


Abb. 15: IL-2-Aktivierungstest mit Inzuchtschwein-PBMC und dem Peptid gD16. PBMC des PRV-immunisierten Inzuchtschweines 3 (2×10^5 /well) wurden zusammen mit Peptid gD16 oder Peptid gD1 ($1 \mu\text{g}/\text{well}$) und β -PL-PRV ($2,5 \text{ moi}$) oder ohne Antigen (Kontrolle) inkubiert. Nach 24, 48, 72, 96 und 114 h wurden die Kulturüberstände abgenommen und für 2 Tage zu der murinen IL-2-abhängigen HT-2-Zelllinie (4×10^3 /well) gegeben. Die spezifische Aktivität der HT-2-Zellen mit den Kulturüberständen wurde über $18 \text{ h } ^3\text{H}$ -Thymidinmarkierung in cpm bestimmt und ist gegen die Zeit aufgetragen. Dargestellt sind Triplikate, die Standardabweichung ist durch Fehlerbalken eingetragen. HT-2-Zellen + 50 U/ml humanem rekombinantem (hr) IL-2 zeigten eine Aktivität von $33395 (+/- 668) \text{ cpm}$, HT-2-Zellen ohne IL-2 eine Aktivität von $880 (+/- 366) \text{ cpm}$.

5.1.9.6 T-Zellepitopkartierung mit den Peptiden gD1-34 und PBMC von Auszuchtschweinen

Für das Inzuchtschwein vom d/d Haplotyp konnte bei der T-Zellepitopkartierung mit überlappenden synthetischen Peptiden für das N-terminale Glykoprotein gD (AS 1-185) das T-Zellepitop gD16 (gD AS 76-90) identifiziert werden (→ 5.1.9.3). Nun sollten Erkenntnisse über die Häufigkeit und die Verteilung von gD-T-Zellepitopen auch in der natürlichen Schweinepopulation mit polymorphem MHC gewonnen werden. Deshalb wurden die gD-Peptide gD1-35 (AS-Sequenzen → 9) ebenfalls in Proliferationstests mit PBMC zweier PRV-immunisierter Auszuchtschweine untersucht, wie für das Inzuchtschwein beschrieben (→ 5.1.9.3). In Abb. 16 sind die Ergebnisse dargestellt. Ein gegenüber der Spontanproliferation um mindestens das Zweifache erhöhter Stimulationsindex (SI) wurde, wie bereits in den Tests für das Inzuchtschwein, als spezifisch gewertet.

Mit PBMC des Auszuchtschweines 1 zeigte sich eine spezifische Reaktion mit 15 gD-Peptiden (gD1-6, gD9, gD11, gD22–28). Stimulationsindices bis 3,7 (Peptid gD4) wurden erhalten (Abb. 16 A). PBMC des Schweines 2 wiesen eine spezifische Reaktion mit 14 gD-Peptiden auf (gD8, gD15-gD22, gD24, gD26, gD 27, gD 30 und gD32, Abb. 16 B). Hierunter befindet sich auch das für das Inzuchtschwein vom d/d Haplotyp positive T-Zellepitop gD16. Stimulationsindices bis maximal 7,9 (Peptid gD15) wurden erreicht. Alle Peptide, mit denen sich eine positive Reaktion ergeben hatte, stellen für das jeweilige Tier potentielle T-Helferepitope dar.

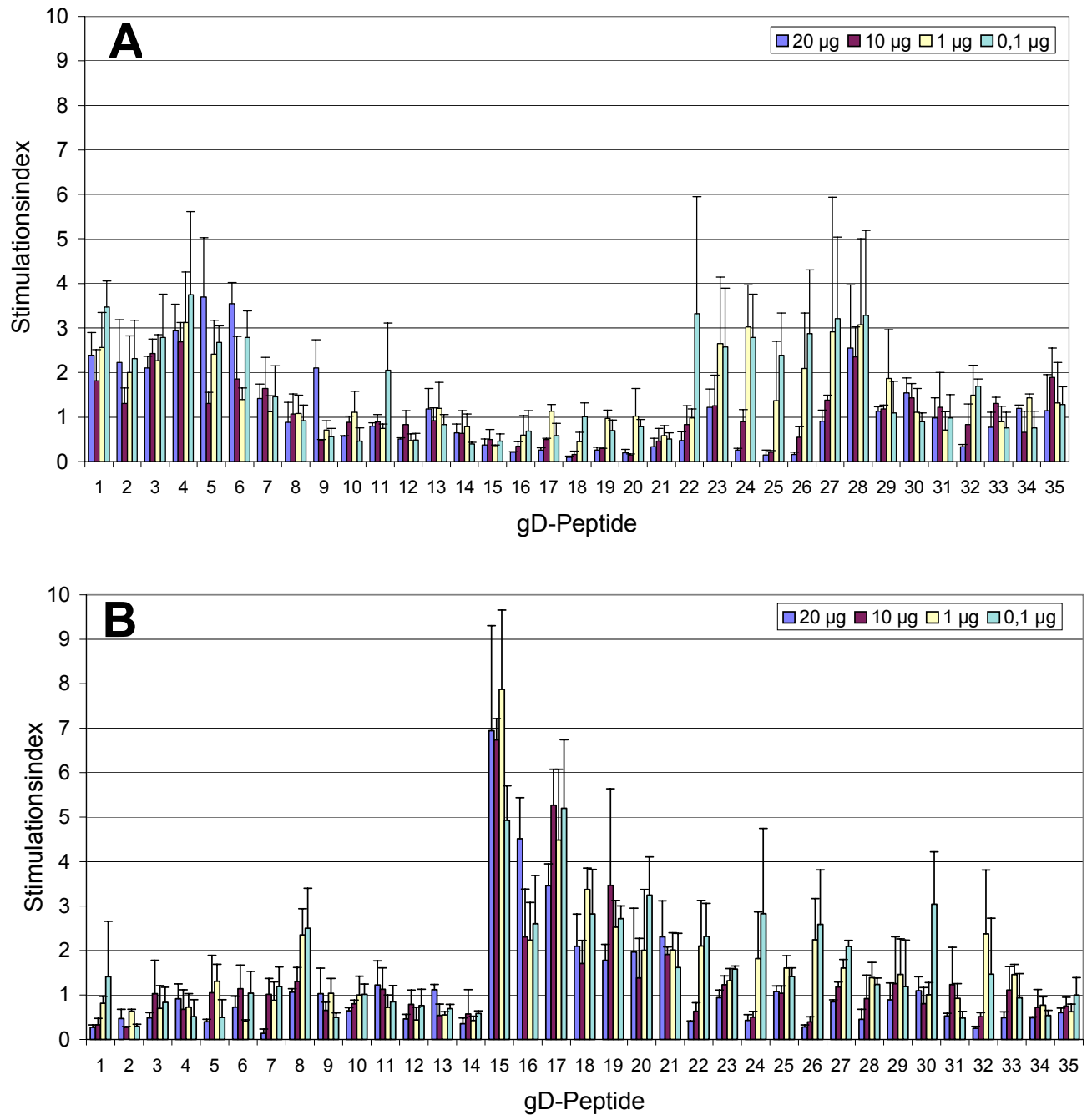


Abb. 16: T-Zellepitop-Feinkartierung mit den Peptiden gD1-35 und PBMC der PRV-immunisierten Auszuchtsschweine 1 (A) und 2 (B). PRV-immune PBMC wurden zusammen mit den Peptiden gD1-35 (gD AS 1-185) in den angegebenen Konzentrationen in einem Proliferationstest (\rightarrow 4.4.2) untersucht. Der Stimulationsindex (SI) ist gegen die Peptidnummer aufgetragen. Die β -PL-PRV-Viruskontrollen (2,5 moi) zeigten einen SI von 12,1 (\pm 3,2) für das Schwein 1 und SI 21 (\pm 5,3) für das Schwein 2. Dargestellt sind Triplikate. Die Standardabweichungen sind durch Fehlerbalken angegeben.

5.1.9.7 Cytokin-Nachweise mit dem Peptid gD15 und PBMC eines Auszuchtsschweines

Das Peptid gD15 (gD AS 71-85) hatte mit PBMC des PRV-immunisierten Auszuchtsschweines 2 zu einer sehr hohen spezifischen Proliferation (SI 7,9) geführt und stellte somit für das Auszuchtsschwein 2 ein potentielles T-Helferepitop dar (→ 5.1.9.6.). Nun sollte zum Nachweis der Cytokinproduktion von mit dem Peptid gD15 restimulierten PRV-immunen PBMC einerseits ein IL-2-Aktivierungstest und andererseits eine RT-PCR durchgeführt werden. Hiermit konnte die Cytokinproduktion sowohl auf Proteinebene als auch auf Transkriptionsebene untersucht und die Ergebnisse miteinander verglichen werden.

5.1.9.7.1 IL-2 Aktivierungstest, Peptide gD2 und gD15 und PBMC eines Auszuchtsschweines

PBMC des PRV-immunisierten Auszuchtsschweines 2 wurden zusammen mit dem potentiellen T-Helferzellepitop gD15 (1 µg/well) inkubiert. Zum Vergleich wurde das Peptid gD2 (1 µg/well) herangezogen, das im entsprechenden Proliferationstest zu keiner spezifischen Proliferation der PBMC geführt hatte (→ 5.1.9.6). Zusätzlich wurden β-PL-PRV (2,5 moi) und PBMC ohne Antigenzusatz (Kontrolle) eingesetzt. Es wurde weiter genau so vorgegangen, wie unter 5.1.9.5 beschrieben.

In Abb. 17 sind die Ergebnisse des IL-2-Aktivierungstests gezeigt. Die Aktivität der HT-2-Zellen in cpm mit den Kulturüberständen ist gegen die Zeitwerte aufgetragen. Die Cytokinsekretion galt, wie auch in den Versuchen mit den Inzuchtsschwein-PBMC, als antigenspezifisch, wenn mit dem jeweiligen Kulturüberstand mindestens die doppelte HT-2-Zellaktivität der Kontrolle erreicht wurde.

Mit den beiden Peptiden gD2 und gD15 wurde über den gesamten Zeitraum von 114 h keine im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle wesentlich erhöhte Cytokinproduktion gemessen. Mit den 24 h-β-PL-PRV-Kulturüberständen zeigte die Aktivität der HT-2-Zellen jedoch ein Maximum (21843 cpm). Dies entsprach dem 30-fachen der 24 h-Kontrolle (736 cpm). Im weiteren Zeitverlauf zeigte sich eine abnehmende Aktivität der HT-2-Zellen mit den β-PL-PRV-Kulturüberständen, die nach 48 h beim 9,8-fachen

(23395 cpm), nach 72 h beim 2,7-fachen (28265 cpm), nach 96 h beim 2,2-fachen (20454 cpm) und nach 114 h beim 1,5-fachen (26827 cpm) der jeweiligen Kontrolle lag.

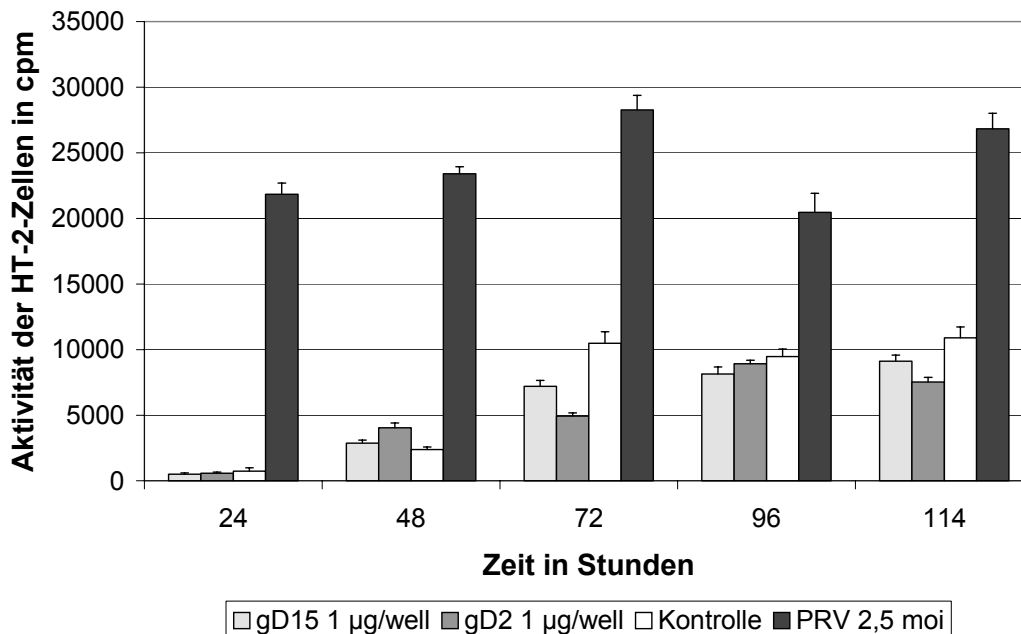


Abb. 17: IL-2 Aktivierungstest, Peptide gD2 und gD15 und PBMC des Auszuchtsschweins 2. PRV-immune PBMC (2×10^5 /well) wurden zusammen mit dem Peptid gD2 oder dem Peptid gD15 (je $1 \mu\text{g/well}$), ohne Antigen (Kontrolle) oder mit β -PL-PRV (2,5 moi) inkubiert. Nach 24, 48, 72, 96 und 114 h wurden die Kulturüberstände abgenommen und für 2 Tage zu der murinen IL-2-abhängigen HT-2-Zelllinie (4×10^3 /well) gegeben. Die spezifische Aktivität der HT-2-Zellen mit den Kulturüberständen wurde über 18 h ^3H -Thymidineinbau in cpm bestimmt und ist gegen die Zeit aufgetragen. Dargestellt sind Triplikate, die Standardabweichung ist durch Fehlerbalken eingetragen. HT-2-Zellen + 50 U/ml humanem rekombinatem IL-2 zeigten eine Aktivität von 23222 (+/- 1575) cpm, HT-2-Zellen ohne IL-2 wiesen eine Aktivität von 350 (+/- 170) cpm auf.

5.1.9.7.2 RT-PCR zum Nachweis der Transkription der Cytokine IL-2 und IFN- γ

Eine Erhöhung der IL-2- als auch der IFN- γ -spezifischen Transkriptionsrate für *in vitro* mit β -PL-PRV-stimulierte PBMC des PRV-immunisierten Auszuchtsschweines 2 war über RT-PCR bereits gezeigt worden (Fischer, 1998). Nun sollte über RT-PCR untersucht werden, welches Cytokinmuster mit dem potentiellen T-Helferepitop gD15 aktivierte PBMC aufweisen.

Die PBMC wurden zu 2×10^5 /well in Mikrotiterplatten über 48 Stunden kultiviert. Das Peptid gD15 und das Peptid gD2 wurden in einer Konzentration von $1 \mu\text{g/well}$

eingesetzt. Als Positivkontrolle wurden mit 2,5 moi β -PL-PRV/well inkubierte PBMC, als Negativkontrolle unstimulierte PBMC (Spontanproliferation) verwendet. Jeder Ansatz hatte eine Gesamtzahl von 7×10^6 Zellen. Die Gesamtzell-RNA wurde isoliert und je 1 μ g zur c-DNA-Synthese eingesetzt (\rightarrow 4.7.).

Das Ergebnis der RT-PCR-Analyse ist in Abb. 18 dargestellt. Für alle vier Fälle (gD2, gD15, unstimulierte PBMC und PRV) ist das Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase- (GAPDH-) spezifische PCR-Produkt (Kontrollgen), dessen erwartete Größe 400 bp beträgt, in gleicher Intensität zu sehen (GAPDH Spuren 1 bis 4). Dadurch lassen sich die Cytokin-spezifischen PCR-Produkte zwischen nicht stimulierten und mit den Peptiden oder PRV-stimulierten PBMC vergleichen.

Für die mit β -PL-PRV-inkubierten PBMC fand sich eine erhöhte Transkription der Gene für IL-2 und für IFN- γ (erwartete Größe der PCR-Produkte 387 bp und 368 bp) im Vergleich zu den nicht restimulierten Zellen (Abb. 18, IL-2 und IFN- γ , Spuren 3 und 4). Mit den Peptiden gD2 oder gD15 inkubierte PBMC zeigten keine erhöhte IL-2- und IFN- γ -Transkription im Vergleich zu nicht restimulierten Zellen (Abb. 18, IL-2 und IFN- γ , Spuren 1, 2 und 3).

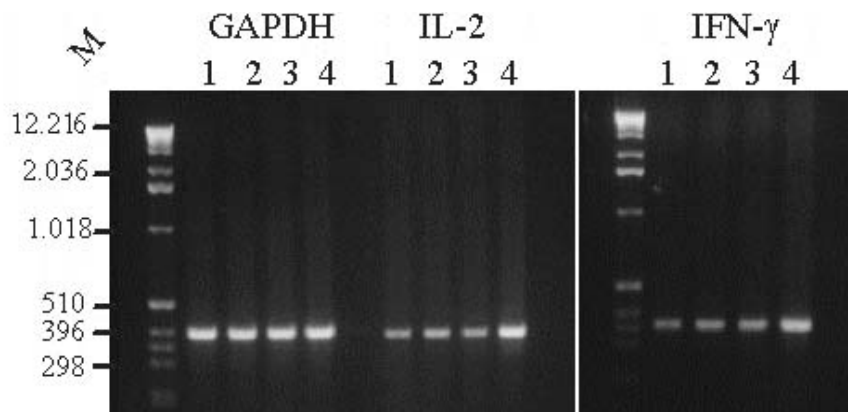


Abb. 18: RT-Cytokin-PCR-Produkte. Vergleich der Cytokin-spezifischen Transkriptionsraten von mit dem Peptid gD2 (1 μ g/well; Spur 1), dem Peptid gD15 (1 μ g/well; Spur 2) stimulierten, nicht stimulierten (Spur 3) und mit β -PL-PRV (2,5 moi) stimulierten (Spur 4) PBMC des PRV-immunisierten Auszuchtsschweines 2. Die Anzahl der PCR-Amplifikationszyklen lag bei 30. GAPDH = Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (Kontrolle); IL-2 = Interleukin-2; IFN- γ = Interferon- γ , M = Marker [bp].

5.1.9.7.3 Vergleich des IL-2 Aktivierungstests mit der RT-PCR

Sowohl im IL-2-Aktivierungstest als auch in der RT-PCR konnte keine spezifische, durch das potentielle T-Helferepitop gD15 induzierte, Cytokinproduktion (IL-2; bzw. IL-2 und IFN- γ) PRV-immuner PBMC des Auszuchtsschweines 2 nachgewiesen werden. Auch mit dem Peptid gD2 zeigte sich keine spezifische Cytokinproduktion. Im Gegensatz dazu konnte eine β -PL-PRV-induzierte Cytokinproduktion im IL-2-Aktivierungstest mit einem Maximum bei 24 h gezeigt werden. Auch in der RT-PCR wurde eine β -PL-PRV-spezifische IL-2- und IFN- γ -Produktion nachgewiesen. Die in RT-PCR für β -PL-PRV erhaltenen Ergebnisse entsprachen jenen von Fischer (1998).

5.2 Glykoprotein gB

5.2.1 Proliferationstests mit den Peptiden gB17 und gB39 und PBMC von Inzuchtsschweinen

Erste Hinweise auf zwei potentielle T-Zellepitope auf dem PRV-Glykoprotein gB konnten aus einer T-Zellepitopkartierung mit überlappenden synthetischen Peptiden für das Inzuchtsschwein vom d/d Haplotyp erhalten werden (Teufel, 1994). Hierbei handelte es sich um das Peptid gB17 (gB AS 341-355) und das Peptid gB39 (gB AS 451-465; AS-Sequenzen \rightarrow 9).

Zunächst wurde die Peptid gB17- und gB39-spezifische Immunantwort der PBMC der drei PRV-immunisierten Inzuchtsschweine in Proliferationstests (\rightarrow 4.4.2) überprüft. Es standen über HPLC gereinigte Peptide (Dr. C. Kempter) zur Verfügung. Als Kontrolle wurde UV-PRV eingesetzt. Für die in Abb. 19 repräsentativ gezeigten Proliferationstests wurden PBMC des PRV-immunisierten Inzuchtsschweines 1 verwendet. Nach Restimulierung mit dem Peptid gB17 (Abb. 19 A) wurde bei einer Konzentration von 2,5 μ g/well eine maximale Stimulation der Proliferation von 6970 cpm erhalten, im Vergleich zu einer Spontanproliferation von 2407 cpm (SI = 2,9). Mit dem Peptid gB39 (Abb. 19 B) zeigte sich bei 2,5 μ g/well eine Proliferation von 5552 cpm, die bei 0,25 μ g/well auf 6578 anstieg, wobei die Spontanproliferation hier bei 2096 cpm lag (SI = 2,6 bzw. 3,1). Die proliferative Wirkung von gB17 und gB39 auf

die PBMC war konzentrationsabhängig, näherte sich für beide Peptide mit abnehmender Konzentration wieder den Werten der Spontanproliferation an. Die Peptide gB17 und gB39 konnten somit als potentielle T-Helfer-Epitope bestätigt werden. Weiterhin wurde eine Peptid gB17- und gB39-spezifische PBMC-Proliferation in weiteren Proliferationstests für alle drei PRV-immunisierten Inzuchtschweine nachgewiesen (nicht gezeigt).

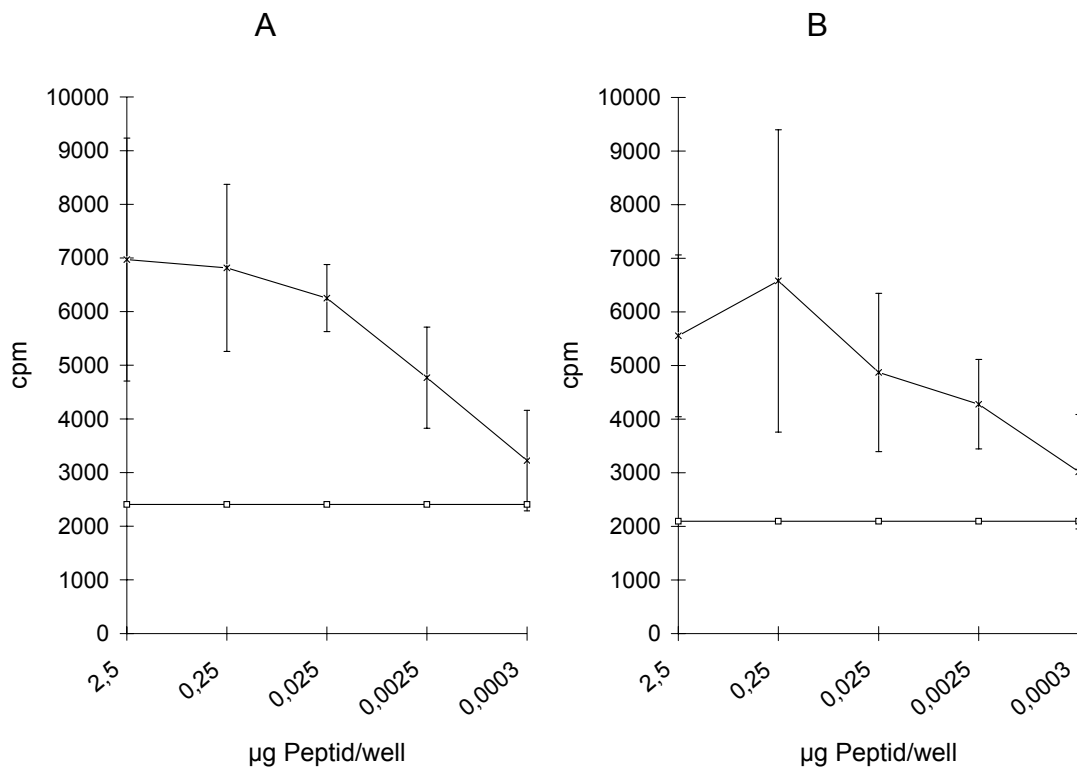


Abb. 19: Proliferationstest mit Inzuchtschwein-PBMC und den Peptiden gB17 (A) und gB39 (B). PBMC des PRV-immunisierten Inzuchtschweines 1 wurden mit den angegebenen Verdünnungen Peptid gB17 (A) oder gB39 (B) inkubiert (→ 4.4.2). Die jeweils untere Linie markiert die Spontanproliferation (2407 +/- 695 cpm bzw. 2096 +/- 518 cpm). Dargestellt sind Triplikate, die Standardabweichung ist durch Fehlerbalken angezeigt. Die UV-PRV-Kontrollen (2,5 moi) zeigten Werte von 18975 (+/- 2821) cpm (A) und 17690 (+/- 1645) cpm (B).

5.2.2 MHC-Restriktion der gB17- und gB39-spezifischen PBMC-Proliferation

Um die Peptid gB17- und gB39-spezifische Immunantwort PRV-immuner PBMC weiter zu charakterisieren, wurde deren MHC-Restriktion bestimmt. Dazu wurden PBMC des PRV-immunisierten Inzuchtschweins 1 zusammen mit den Peptiden gB17 oder gB39 (je 1 µg/well) und Hybridoma-Zellkulturüberständen inkubiert, die monoklonale Antikörper (mAb) gegen CD4-, CD8-, MHC I- und MHC II-Moleküle enthalten. Weiter wurde vorgegangen, wie für das Peptid gD16 beschrieben (→ 5.1.9.4).

Wie in Abb. 20 gezeigt, konnte die gB17- und gB39-spezifische PBMC-Proliferation durch mAb, die gegen CD4-Corezeptoren (mAb 74-12-4) gerichtet sind, inhibiert werden, wobei die gB17-spezifische Proliferation um 53 % (3248 cpm) und die gB39-spezifische Proliferation um 74 % (2101 cpm) inhibiert wurde. Die mAb, die gegen MHC II-Moleküle gerichtet sind (mAb MSA 3) inhibierten die gB17-spezifische PBMC-Proliferation um 58 % (2845 cpm) und die gB39-spezifische PBMC-Proliferation um 77 % (1911 cpm).

Währenddessen unterbanden mAb gegen CD8-Corezeptoren (mAb 11/295/33) und MHC I-Moleküle (mAb 2.27.3a) die peptidspezifische Proliferation nicht. Mit mAb anti-CD8 zeigte sich für das Peptid gB17 nur eine 3%ige PBMC Proliferationshemmung (6653 cpm) und für das Peptid gB39 eine 60%ige PBMC-Proliferationssteigerung (13146 cpm). Mit mAb anti-MHC I wurde für das Peptid gB17 ebenfalls lediglich eine 3%ige PBMC-Proliferationshemmung erhalten (6651 cpm), während für das Peptid gB39 eine PBMC-Proliferationssteigerung von 11,5 % (9150 cpm) gemessen wurde.

Damit konnte gezeigt werden, dass die Proliferation PRV-immuner PBMC, die mit den Peptiden gB17 und gB39 restimuliert worden waren, MHC Klasse II-restringiert ist, und an der Peptiderkennung der CD4-Corezeptor beteiligt ist, wobei der CD8-Corezeptor offensichtlich keine Rolle spielt. Es handelt sich somit um eine klassische T-Helferzell-Antwort.

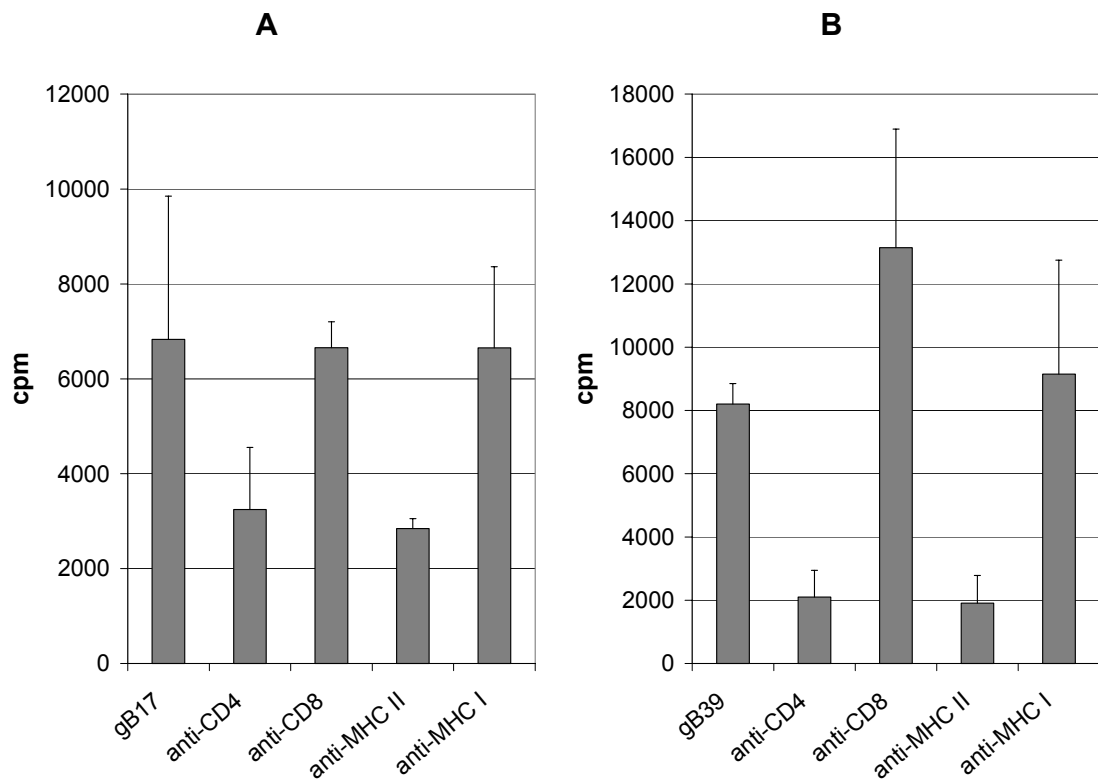


Abb. 20: MHC-Restriktion der gB17- (A) und gB39- (B) spezifischen PBMC-Proliferation. PBMC des PRV-immunisierten Inzuchtschweines 1 wurden mit je 1 µg/well Peptid gB17 (A) und gB39 (B) unter Zusatz monoklonaler Antikörper (mAb; anti-CD4: mAb 74-12-4; anti-CD8: mAb 11/295/33; anti-MHC II: mAb MSA3; anti-MHC I: mAb 2.27.3 a) für 114 h inkubiert (→ 4.4.2). PBMC, die nur zusammen mit dem Peptid inkubiert wurden, dienten als Kontrollen. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken eingetragen. Die Spontanproliferation ohne Antigenzugabe war 2771 (+/- 901) cpm (A) und 4351 (+/- 2110) cpm (B), die UV-PRV-Kontrolle (2,5 moi) war 26983 (+/- 656) cpm (A) und 20535 (+/- 593) cpm (B).

5.2.3 IL-2-Aktivierungstest, Peptid gB39

Im Folgenden wurde untersucht, ob eine Inkubation PRV-immuner PBMC mit dem Peptid gB39 zu einer spezifischen Cytokinproduktion führt, die peptid-aktivierten T-Helferzellen zugeschrieben werden kann. Hierzu wurde ein IL-2-Aktivierungstest mit HT-2-Zellen durchgeführt, wie für das gD-spezifische T-Helferepitop gD16 beschrieben (→ 5.1.9.5).

PBMC des PRV-immunisierten Inzuchtschweines 1 wurden für 114 Stunden mit dem Peptid gB39 (4 µg/well) restimuliert. Als Kontrollen wurden nicht stimulierte PBMC (Spontanproliferation) sowie UV-PRV- und ConA-stimulierte PBMC verwendet. Die Kulturüberstände wurden abgenommen und zu den IL-2-abhängigen HT-2-Zellen gegeben. Für den IL-2 Aktivierungstest wurden, im Gegensatz zu den später mit den gD-Peptiden durchgeführten Tests, 4×10^3 HT-2-Zellen/well mit 100 µl RPMI-complete-Medium eingesetzt, das 10 % FCS enthielt, hinzu wurden 100 µl Zellkulturüberstand gegeben. Das weitere Vorgehen entsprach dem unter 4.4.3 beschriebenen.

Wie in Abb. 21 dargestellt, zeigten HT-2-Zellen, die in Anwesenheit von Kulturüberständen Peptid gB39-restimulierter PBMC (4 µg/well) kultiviert worden waren, eine Verdopplung der Aktivität (7551 cpm), im Vergleich zu HT-2-Zellen, die mit Kulturüberständen nicht stimulierter PBMC kultiviert worden waren (3716 cpm). Mit Kulturüberständen der UV-PRV-Kontrolle (1,25 moi) wurde eine 4,5-fach höhere HT-2-Aktivität erreicht (16573 cpm). Kulturüberstände mit ConA (10 µg/ml) kultivierter PBMC bewirkten einen 5-fachen HT-2-Aktivitätsanstieg (21039 cpm). Weiterhin wurden HT-2-Aktivierungstests mit Kulturüberständen 72, 96 und 114 h nach Restimulierung der PBMC mit gB39 oder gB17 durchgeführt (nicht gezeigt). Die Ergebnisse zeigten keinen messbaren IL-2 Anstieg mit gB39 vor 114 Stunden. Für gB17 zeigte sich kein IL-2 Anstieg.

Durch das Peptid gB39 kommt es, wie mit der UV-PRV-Kontrolle und der ConA-Kontrolle, zu einer Induktion der IL-2-Produktion innerhalb der PBMC-Population, die aktivierten T-Helferzellen zugeschrieben werden kann.

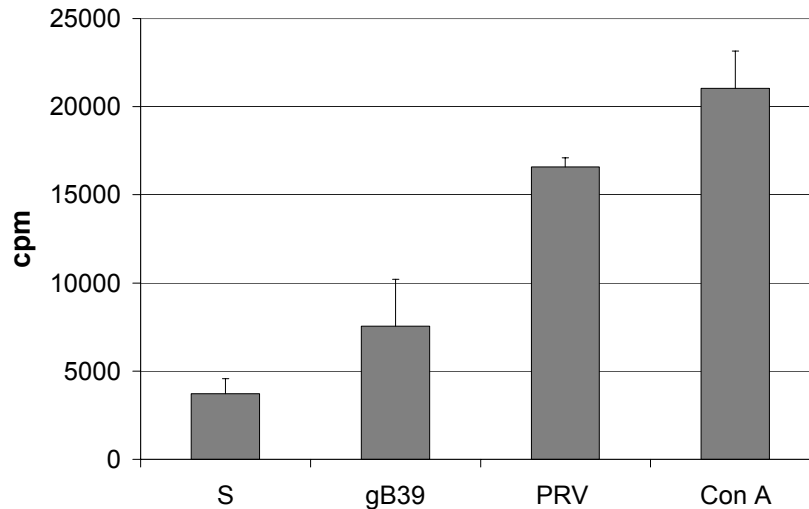


Abb. 21: IL-2-Aktivierungstest, Peptid gB39. PBMC des PRV-immunisierten Inzuchtschweines 1 wurden ohne (Spontanproliferation, S) oder in Anwesenheit von Antigen (Peptid gB39, 4 µg/well, UV-PRV, 1,25 moi oder ConA 10 µg/ml) für 114 h inkubiert. Die Kulturüberstände wurden zu der IL-2-abhängigen HT-2 Zelllinie (4×10^3 /well) gegeben. Die Aktivität der HT-2-Zellen wurde durch 18 h ^3H -Thymidineinbau in cpm bestimmt. Es sind Triplikate dargestellt, die Standardabweichung ist durch Fehlerbalken angezeigt. Die Aktivität der HT-2-Kontrolle ohne IL-2 war 923 (+/- 615) cpm, HT-2-Zellen mit 50 U/ml humanem rekombinarem IL-2 zeigten eine Aktivität von 30008 (+/- 1234) cpm.

5.2.4 Proliferationstests mit den Peptiden gB17 und gB39 und PBMC von Auszuchtschweinen

Nun sollte untersucht werden, ob die T-Helferzellepitope gB17 und gB39 des Inzuchtschweines vom d/d Haplotyp für die beiden PRV-immunisierten Auszuchtschweine ebenfalls T-Helferzellepitope darstellten. Deshalb wurden die Peptide zur Restimulierung PRV-immuner PBMC der beiden Auszuchtschweine eingesetzt (→ 4.4.2). Hierfür wurden die Peptide in Zweierschritten (20 - 0,625 µg/well) verdünnt verwendet, wie in Abb. 22 zu sehen. Der Stimulationsindex (SI) ist gegen die Peptidverdünnungsreihen aufgetragen.

Mit dem Peptid gB17 und PBMC des Schweins 1 oder 2 konnte keine spezifische Proliferation nachgewiesen werden (SI = 0,8 - 1,2 bzw. SI = 0,4 - 1,8; Abb. 22 A). Auch mit dem Peptid gB39 inkubierte PBMC des Schweines 1 oder 2 zeigten keine spezifische Proliferation (SI = 0,8 - 1,4 bzw. SI = 0,5 - 1,8; Abb. 22 B). In einem weiteren Proliferationstests konnte ebenfalls keine gB17- oder gB39-spezifische

Proliferation nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Die Peptide gB17 und gB39 stellen somit vermutlich keine T-Zellepitope für die beiden Auszuchtsschweine 1 und 2 dar.

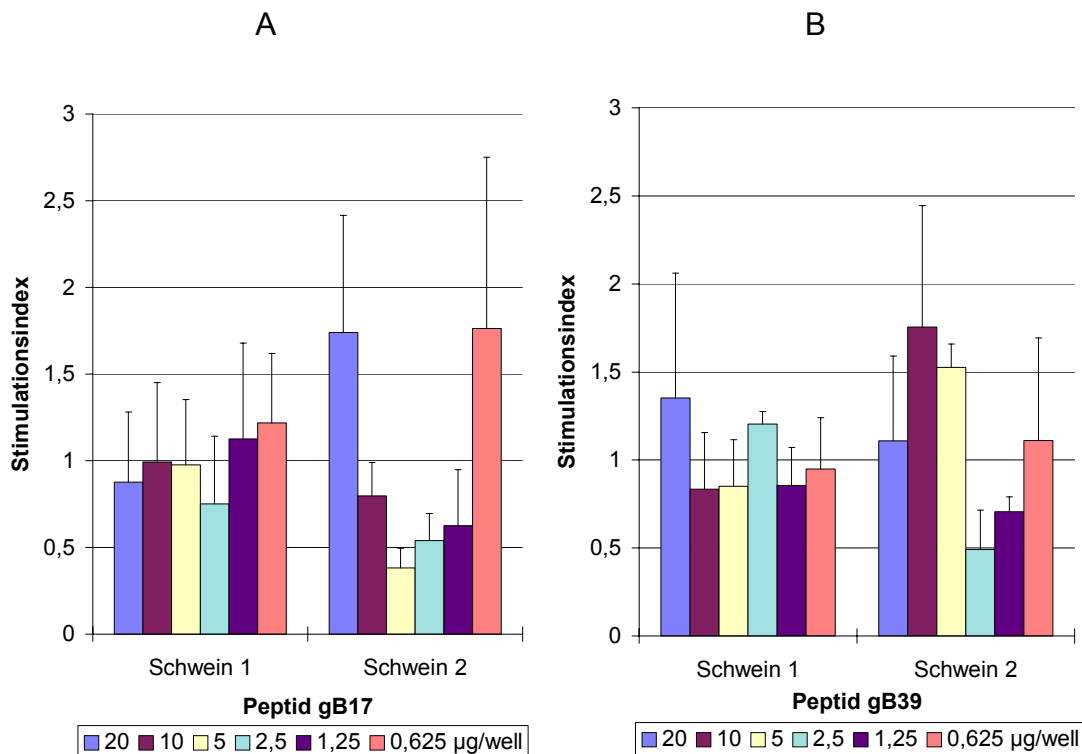


Abb. 22: Proliferationstests (→ 4.4.2) mit den Peptiden gB17 (A) und gB39 (B) und PBMC der Auszuchtsschweine 1 und 2. Der Stimmulationsindex (SI) ist gegen die Peptidverdünnungsreihen aufgetragen. Dargestellt sind Triplikate, die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken angegeben. Schwein 1: Spontanproliferation 6467 (+/- 3517) cpm, UV-PRV (1,25 moi) 49721 (+/- 4542) cpm. Schwein 2: Spontanproliferation 1671 (+/- 793) cpm, UV-PRV (1,25 moi) 33577 (+/- 4542) cpm.

5.3 Glykoprotein gC

5.3.1 Proliferationstests mit den Peptiden gC50 und gC72 und PBMC von Auszuchtsschweinen

Für das Inzuchtsschwein vom d/d Haplotyp sind die beiden gC-spezifischen T-Helferzellepitope gC50 (gC AS 245-259) und gC72 (gC AS 355-369; AS-Sequenzen → 9) bekannt (Ober, 1993; Ober et al., 1998). Wiederum sollte untersucht werden, ob gC50 und gC72 für die beiden PRV-immunisierten Auszuchtsschweine ebenfalls T-

Helferzellepitope darstellten. Hierzu wurden Proliferationstests mit PRV-immunen PBMC durchgeführt (Abb. 23), wie für die gB-spezifischen Peptide gB17 und gB39 beschrieben (→ 5.2.4).

Mit dem Peptid gC50 und PBMC des Schweines 1 wurde eine spezifische Proliferation erhalten (SI maximal 3,4 bei 1,25 µg/well, Abb. 23 A). Mit PBMC des Schweines 2 und gC50 zeigte sich, bei allen Peptidverdünnungen, keine spezifische Proliferation (SI maximal 1,7 bei 10 µg/well, Abb. 23 A). Dagegen wurde mit PBMC des Schweines 1 und dem Peptid gC72 ebenfalls eine spezifische Proliferation erhalten (maximaler SI = 6,3 bei 20 µg/well, Abb. 23 B). Mit PBMC des Schweines 2 und gC72 wurde bei einer einzigen Peptidverdünnung ein Stimulationsindex von 2,0 (bei 20 µg/well) erreicht (Abb. 23 B). In einem weiteren Proliferationstest (nicht gezeigt) konnte gleichfalls eine spezifische Proliferation für die Peptide gC50 und gC72 und PBMC des Schweines 1 nachgewiesen werden, nicht aber mit PBMC des Schweines 2. Die im hier vorgestellten Proliferationstest für PBMC des Schweines 2 und das Peptid gC72 bei einer einzigen Peptid-Verdünnung erhaltene Proliferationsstimulierung erwies sich als vermutlich nicht signifikant. Die T-Helferzellepitope des Inzuchtschweines, gC50 und gC72, stellen somit vermutlich für das Auszuchtschwein 1, nicht aber für das Auszuchtschwein 2, potentielle T-Helferzellepitope dar.

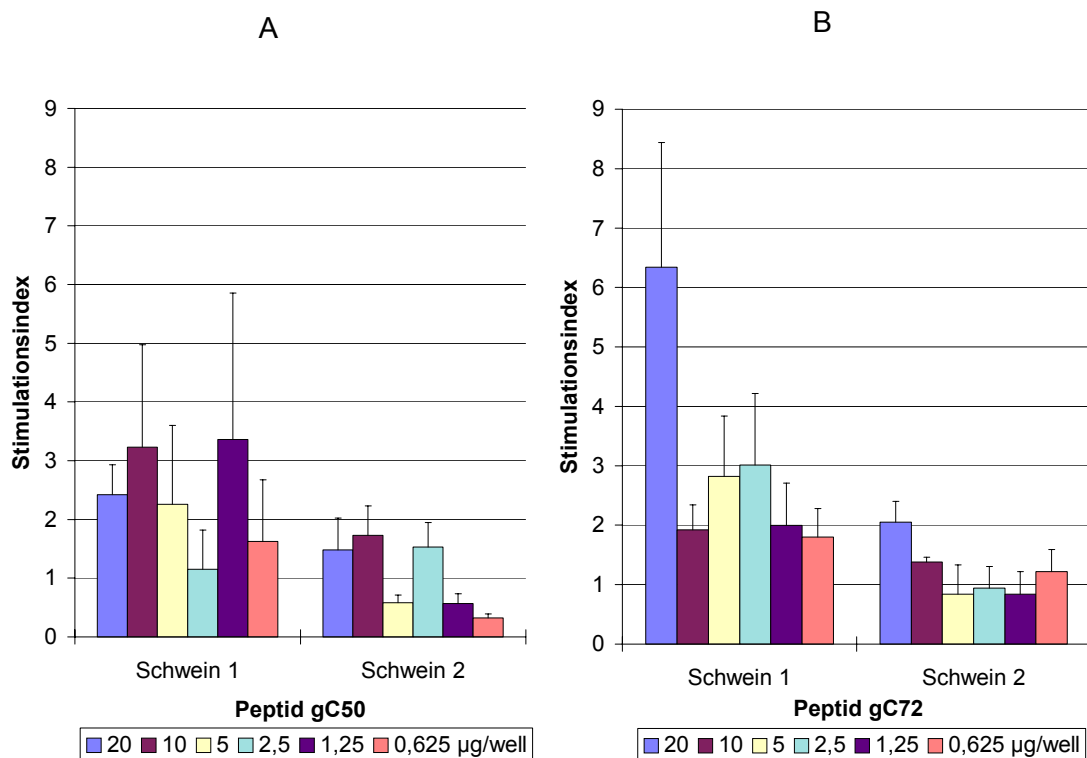


Abb. 23: Proliferationstests (→ 4.4.2) mit den Peptiden gC50 (A) und gC72 (B) und PBMC der Auszuchtsschweine 1 und 2. Der Stimulationsindex (SI) ist gegen die Peptidverdünnungsreihen aufgetragen. Dargestellt sind Triplikate, die Standardabweichungen sind durch Fehlerbalken angezeigt. Schwein 1: Spontanproliferation 669 (+/- 376) cpm, UV-PRV (1,25 moi) 30761 (+/- 17981) cpm. Schwein 2: Spontanproliferation 999 (+/- 435) cpm, UV-PRV (1,25 moi) 9949 (+/- 2779) cpm.

6 Diskussion

Mit den bislang verfügbaren PRV-Impfstoffen kann weder eine Etablierung der Viruslatenz noch die Ausscheidung von Impfviren oder Wildtypviren durch immunisierte Tiere verhindert werden (Wittmann und Rziha, 1989). Für die Entwicklung neuer Impfstoffe, wie Vektorvakzinen, Subunitvakzinen oder DNA-Vakzinen, sind weitere Kenntnisse über die porcine Immunreaktion, die für eine protektive Immunität wichtig ist, notwendig. Die PRV-Hüll-Glykoproteine spielen bei der Generierung einer protektiven Immunität eine wichtige Rolle (Mettenleiter, 1996). Aus diesem Grund stand die Charakterisierung der PRV-spezifischen Immunantwort, am Beispiel der Glykoproteine gD und gB, aber auch gC, im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit.

6.1 Herstellung bakterieller gD-Fusionsproteine

Ein Schwerpunkt der Arbeit lag bei der B- und T- Zellepitopkartierung des Glykoproteins gD, die für das Inzuchtschwein vom d/d Haplotyp, aber auch für das Auszuchtschwein mit polymorphem MHC, durchgeführt wurde.

Der bakterielle Expressionsvektor pEV40 (Strebel et al., 1986; → 3.2.2) hatte sich als sehr gut geeignet zur Expression der PRV-Glykoproteine gB, gC und gE erwiesen (Fuchs et al., 1990; Ober, 1993; Teufel, 1994). Deshalb wurden drei gD-Fusionsproteine in pEV40 hergestellt. Diese sollten in Western-Blot-Analysen mit PRV-spezifischen Seren und in Proliferationstests mit PRV-immunen PBMC eingesetzt werden, um die Lage potentieller B- oder T-Zellepitope zunächst näher einzugrenzen. Hierbei handelte es sich um ein das gesamte gD repräsentierendes Fusionsprotein, GD (gD AS 1-402), ein Fusionsprotein des N-terminalen gD-Abschnittes, GD-1 (gD AS 1-170) und ein den C-terminalen gD-Abschnitt repräsentierendes Fusionsprotein, GD-2 (gD AS 170-402; → 5.1.2). Die Expression der Fusionsproteine wurde über Hitzeinduktion gesteuert (→ 4.8.1). Anschließend wurden die Fusionsproteine über differentielle Harnstoffextraktion gereinigt (→ 4.8.2).

Alle drei Fusionsproteine wurden im pEV40-Expressionssystem nur in sehr geringer Menge exprimiert (→ 5.1.5.2). Außerdem waren GD und GD-1 weitgehend unlöslich.

Da das Fusionsprotein für das gesamte Glykoprotein gD (GD) ebenfalls in geringer Menge exprimiert wurde, kann davon ausgegangen werden, dass mit der für die Konstruktion der Fusionsproteine GD-1 und GD-2 gewählten *Sall*-Restriktionsenzymstrecke (nach gD-Nukleotid 450) kein für die Transkription oder Translation der Fusionsproteine wichtiger Bereich auf dem gD zerstört wurde.

Eine weitere Anreicherung der gD-Fusionsproteine über Affinitätschromatographie (Kasher et al., 1993) wurde für GD-1 und GD-2 versucht (→ 5.1.5.3). Zum Vergleich wurde das in EV40 sehr gut exprimierte gE-Fusionsprotein BF-2 (Fuchs et al., 1990) mitgeführt. Die gD-Fusionsproteine konnten jedoch, im Gegensatz zum BF-2, nicht weiter angereichert werden. Hiermit war gezeigt, dass die Reinigung und Anreicherung über Affinitätschromatographie zwar prinzipiell funktionierte, nicht jedoch, wenn die Fusionsproteine von vorne herein in zu geringer Menge vorliegen.

Das bakterielle Expressionssystem pEV40 erwies sich damit zur Expression der gD-Fusionsproteine als nur bedingt geeignet. Fraktionen aus der Harnstoffextraktion konnten aber in Western-Blot-Analysen eingesetzt werden. Weiterhin war gezeigt worden, dass der Einsatz des Überstandes 3 aus der Harnstoffextraktion in Proliferationstests prinzipiell möglich ist (Teufel, 1994). Um eine höhere Menge und eine bessere Löslichkeit der Fusionsproteine zu erhalten, hätte die Expression des gD in anderen Expressionssystemen getestet werden müssen. Dies war jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr durchführbar.

Eine Möglichkeit wäre die Expression der gD-Fusionsproteine in einem alternativen bakteriellen Expressionssystem, wie dem pQE-System (Bujard et al., 1987; Stüber et al., 1990). Hierbei handelt es sich ebenfalls um His-markierte Fusionsproteine, die jedoch über Isopropyl-Galaktopyrasonid (IPTG) induziert werden. Ein Vorteil wäre, dass die Hitzeinduktion, bei der es zur Produktion von Hitzeschockproteinen kommt, umgangen werden kann. Zudem liegt das Fusionsprotein hier nicht, wie bei pEV40, in *Inclusion-bodies* vor sondern findet sich häufig in einer löslichen Fraktion.

Eine weitere Möglichkeit ist die Expression in einem eukaryontischen Expressionssystem, wie dem Baculovirussystem (Tessier et al., 1991). Die erfolgreiche Expression des PRV-gD in diesem System ist mehrfach beschrieben (Banks et al., 1994; Fischer, 1998; Prud'homme et al., 1997). Das rekombinante gD wurde u. a. in ELISA-Tests zur Serodiagnose des PRV eingesetzt. Ein Vorteil der Baculovirus-Vektoren liegt

darin, dass die in den Insektenzellen gebildeten Fremdproteine korrekt prozessiert und modifiziert, u. a. korrekt phosphoryliert, N-glycosyliert, O-glycosyliert und palmitoyliert werden (O'Reilly et al., 1992). Deshalb sind die im Baculovirussystem exprimierten Fusionsproteine auch für funktionelle Tests geeignet. Möglicherweise ist die (O-) Glykosylierung des gD auch für die effiziente Expression der gD-Fusionsproteine wichtig.

6.2 Pseudorabiesvirale porcine B-Zellepitope

Für das PRV-gD ist das Vorhandensein antigener Domänen beschrieben, deren korrespondierende Antikörper das Virus mit oder ohne Komplement neutralisieren und die eine Rolle bei der Penetration des Virus in die Zelle spielen (Eloit et al., 1988, 1990; Tsuda et al, 1991). Die Lokalisation dieser antigenen Domänen ist jedoch noch nicht weiter charakterisiert.

Um die Lage von B-Zellepitopen auf dem gD zunächst näher einzugrenzen, wurden Western-Blot-Analysen mit den gD-Fusionsproteinen und PRV-spezifischen Ziegen-, Inzucht- und Auszuchtschweineseren durchgeführt (→ 5.1.5). Es zeigte sich eine starke Reaktion aller Seren mit dem C-terminalen gD-Abschnitt, GD-2 (gD AS 170-402), eine schwächere Reaktion mit dem Fusionsprotein für das gesamte gD, GD (gD AS 1-402), wogegen eine sehr geringe Reaktion mit dem N-terminalen gD-Abschnitt, GD-1 (gD AS 1-170), nur mit Ziegen- und Inzuchtschweins serum, nicht aber mit Auszuchtschweins serum, beobachtet werden konnte. Dies ließ das Vorhandensein von B-Zellepitopen vor allem im C-terminalen gD-Anteil vermuten.

Im Einklang damit steht auch, dass in Western-Blot-Analysen mit im Baculovirussystem exprimiertem Gesamt-gD und gD-Fragmenten und denselben PRV-spezifischen Seren ebenfalls eine spezifische Reaktion mit dem Gesamt-gD erhalten wurde, eine sehr geringe oder keine mit einem N-terminalen Fragment (AS 1-170) und keine mit einem internen Fragment (AS 170-238; Fischer, 1998). Der C-terminale gD-Anteil (AS 239-402) war hier jedoch nicht exprimiert worden.

Zur weiteren Eingrenzung von B-Zellepitopen wurden 79, das gesamte gD repräsentierende, und um jeweils 10 Aminosäuren überlappende Pentadecapeptide synthetisiert (→ 5.1.7) und im Peptid-ELISA mit PRV-spezifischen Seren getestet (→

5.1.8.1). Hiermit können lineare B-Zellepitope detektiert werden. Diese sind maximal 8 Aminosäuren lang und werden über 3 bis 4 Aminosäure-Bindungsstellen vom Antikörper erkannt (Geysen, 1985). Eine Überlappung von 10 Aminosäuren wurde gewählt, um ein potentiell B-Zellepitop im ELISA bestmöglich erfassen zu können.

Lineare B-Zellepitope fanden sich im C-terminalen gD-Bereich innerhalb der gD AS 271-402. Mit dem Inzuchtschweinserum erfolgte eine positive Reaktion mit drei Peptiden: gD64, gD65 (gD AS 316-335) und gD77 (gD AS 381-395). Das Ziegenhyperimmunserum reagierte spezifisch mit 5 Peptiden: gD55 (gD AS 271-285), gD63 (gD AS 311-325), gD65, gD66 (gD AS 321-340) und gD79 (gD AS 391-402). Eine gemeinsame positive Reaktion erfolgte lediglich mit Peptid gD65.

Für die PRV-vakzinieren Auszuchtschweine 1 und 2 wurde der gD-Bereich gD57-79 (gD AS 281-402) untersucht, es konnte im Peptid-ELISA, aufgrund der hohen unspezifischen Bindung der Auszuchtschweineseren, keine spezifische Reaktion mit den Peptiden nachgewiesen werden. Eine Möglichkeit, die unspezifische Bindung der Schweineseren zu minimieren und somit den Peptid-ELISA sensitiver zu gestalten, wäre die Synthese biotinylierter Peptide, die an eine Mikrotiterplatte gebunden werden, die mit Avidin oder Streptavidin beschichtet ist (Weiner et al., 1992).

Ein weiterer, genereller Nachteil des Standard-Peptid-ELISA ist, dass nur lineare B-Zellepitope dargestellt werden können, nicht aber Konformationsepitope. Außerdem ist es möglich, dass Peptide mit schlechten Bindungseigenschaften an die Kunststoff-Mikrotiterplatten oder Peptide, die über ihre antigenen Determinanten binden, nicht als lineare B-Zellepitope erfasst werden können.

Das Glykoprotein gD des Herpes-simplex-Virus (HSV) weist eine hohe strukturelle und zudem eine funktionelle Homologie zu PRV-gD auf (Dasika et al., 1999). Mit HSV-1- und HSV-2-gD wurden zahlreiche B-Zellepitopkartierungen in verschiedenen Modellsystemen, wie Inzucht-Mausstämmen, Meerschweinchen, Kaninchen und mit Seren des natürlichen Wirtes Mensch unternommen. Je nach (Tiermodell-) System und entsprechendem genetischem Hintergrund, fanden sich lineare B-Zellepitope über das gesamte gD verstreut, unter Aussparung der transmembranen Region (Cohen et al., 1984; Eisenberg et al., 1985a; Geerligs et al., 1990; Hudecz et al., 1993; Isola et al., 1989; Strynadka et al., 1988; Weijer et al., 1988). Die Peptide gD AS 260-274, 270-284 und 280-294 des C-terminalen HSV-gD-Anteiles wurden jedoch von Seren aller

getesteten Spezies erkannt (Welling-Wester et al., 1991). Für das HSV-1-gD wurde gezeigt, dass ein Schwerpunkt an linearen B-Zellepitopen im C-terminalen Anteil des gD, innerhalb der Region gD AS 300-369, liegt. Eine relativ hohe Prozentzahl an Seren natürlich HSV-1-infizierter Menschen reagierte mit dem Peptid HSV-1-gD AS 300-314 (Damhof et al., 1993; Geerligs et al., 1990; Welling-Wester et al., 1991). Zu den in der vorliegenden Arbeit vorgestellten linearen PRV-gD-B-Zellepitopen im C-terminalen gD-Anteil finden sich demzufolge zahlreiche Parallelen bei HSV.

Die haupt-antigene Determinante des HSV-1-Glykoproteins gD überlappt mit einer Rezeptorbindungsdomäne (Whitbeck et al., 1999). Möglicherweise interferieren auch Antikörper gegen die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen PRV-gD-B-Zellepitope mit PRV-gD-Rezeptorbindungsstellen und verhindern somit den sekundären Attachmentschritt des PRV über das Glykoprotein gD. Hierzu könnten mit den PRV-gD-B-Zellepitopen Virusneutralisationstests durchgeführt werden, wie für gC-spezifische B-Zellepitope beschrieben (Ober et al., 2000). Inwiefern die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten B-Zellepitope im PRV-gD-Bereich AS 271-402 und die bereits beschriebenen antigenen Determinanten des PRV (Eloit et al., 1988, 1990; Tsuda et al., 1991) übereinstimmen, ist noch nicht geklärt.

6.3 Pseudorabiesvirale porcine T-Zellepitope

6.3.1 Inzuchtschwein

Hohe Antikörpertiter sind nicht allein verantwortlich für eine protektive Immunität gegen herpesvirale Infektionen (Kawashima und Platt, 1989; Wittmann und Rziha, 1989). Die zellvermittelte Immunität wird als wichtigster protektiver Effektormechanismus gegen Virusinfektionen (Ramshaw et al., 1997; Zinkernagel et al., 1996), einschließlich HSV und PRV, angesehen (Kimman et al., 1995, 1996; Manickan und Rouse, 1995; Nash und Cambouropoulos, 1993). Es wurde gezeigt, dass gB, gC und gD die Lymphocytenproliferation *in vitro* restimulieren und gB und gC Ziele cytotoxischer T-Zellen *in vitro* sind (Zuckermann et al., 1990; Kimman et al., 1996).

Während bereits eine T-Zellepitopkartierung für das PRV-gC und das Inzuchtschwein vom d/d Haplotyp durchgeführt worden war (Ober, 1993; Ober et al, 1998), galt die vorliegende Arbeit der T-Zellepitopkartierung des Glykoproteins gD. Außerdem wurden Arbeiten zur Identifizierung von T-Zellepitopen des gB (Teufel, 1994) fortgesetzt.

Proliferationstests mit den gD-Fusionsproteinen GD (gD AS 1-402), GD-1 (gD AS 1-170) und GD-2 (gD AS 170-402) und PBMC eines PRV-immunisierten Inzuchtschweines vom d/d Haplotyp hatten eine spezifische Reaktion mit GD und GD-1 ergeben (→5.1.9.2). Dies ließ darauf schließen, dass T-Helferepitope vor allem im N-terminalen gD-Abschnitt vorhanden sind. Deshalb wurden die das N-terminale gD repräsentierenden synthetischen Peptide gD1-34 (gD AS 1-185) zur T-Zellepitopkartierung eingesetzt. T-Helferzellen erkennen Antigene im Zusammenhang mit MHC Klasse II-Molekülen, die Peptide einer Länge von 10 bis 34 Aminosäuren präsentieren (Chicz et al., 1993). Aus diesem Grund können für die T-Zellepitopkartierung dieselben Peptadecapeptide wie zur B-Zellepitopkartierung verwendet werden. Für das Inzuchtschwein vom d/d Haplotyp konnte hiermit das T-Zellepitop gD16 (gD AS 76-90) identifiziert werden.

Es finden sich Übereinstimmungen bei homologen herpesviralen gD-Glykoproteinen insofern, als synthetische Peptide, die den N-Terminus des HSV-1-gD repräsentieren, dazu in der Lage waren, PBMC HSV-1-seropositiver Menschen *in vitro* zu aktivieren (HSV-1-gD AS 8-23; De Freitas et al., 1985). Über eine murine T-Zellantwort auf den N-Terminus des HSV-gD wird ebenfalls berichtet (Heber-Katz et al., 1985; Watari et al., 1987). Immunisierung mit dem synthetischen Peptid gD AS 1-23 schützte Mäuse vor einer letalen Infektionsdosis mit HSV-2 (Eisenberg et al., 1985b; Watari et al., 1987; Wyckoff et al., 1988). Vakzinierung mit demselben Peptid vermittelte im Mausmodell ebenfalls Schutz vor Herpes-Keratitis und -Enzephalitis, verhinderte aber nicht die Etablierung einer latenten Infektion (Heiligenhaus et al., 1995). Auch für BHV-1 und das Rind ist ein T-Helferzellepitop beschrieben, das sich in der N-terminalen Hälfte des gD befindet (Tikoo et al., 1995; BHV-1 gD AS 161-172).

Das Glykoprotein gB stellt eines der konserviertesten Glykoproteine innerhalb der Herpesvirinae dar (Gao et al., 1999; Robbins et al., 1987). Aus einer T-Zellepitopkartierung mit synthetischen Peptiden, welche die gB AS 240-705

repräsentierten, und PRV-immunen PBMC eines Inzuchtschweines vom d/d Haplotyp, wurden erste Hinweise auf zwei T-Zellepitope erhalten (Teufel, 1994). Hierbei handelte es sich um die Peptide gB17 (gB AS 341-355) und gB39 (gB AS 451-465), die in weiteren Proliferationstests als T-Zellepitope bestätigt werden konnten. Interessanterweise sind bei BHV-1 für das Rind ebenfalls zwei T-Helferzellepitope (BHV-1 gD AS 319-340 und BHV-1 gD AS 415-436) beschrieben, die in einer übereinstimmenden gD-Region mit den PRV-T-Zellepitopen liegen, aber keine Sequenzhomologien zu diesen aufweisen (Gao et al., 1999).

6.3.1.1 MHC-Restriktion

Für die Proliferation PRV-immuner PBMC nach Restimulation durch PRV oder das T-Zellepitop gC72 (gC AS 355-369) sind MHC Klasse II-restringierte CD4⁺CD8⁺ T-*Memory*-Zellen verantwortlich (Ober et al., 1998; Summerfield et al., 1996).

Die MHC II-Restriktion der peptidspezifischen Immunantwort konnte für die T-Zellepitope gB17 und gB39 gezeigt werden (→ 5.2.2.). Zur Antigenerkennung sind das MHC Klasse II-Molekül und der CD4-Corezeptor erforderlich, wobei der CD8-Corezeptor für diesen Vorgang offensichtlich keine Rolle zu spielen scheint. Dies spricht für eine klassische T-Helfer-Antwort.

Für das T-Zellepitop gD16 wurde eine MHC II-Restriktion der peptidspezifischen Immunantwort ebenfalls nachgewiesen (→ 5.1.9.4). Es zeigte sich jedoch mit dem gegen den CD8-Corezeptor gerichteten monoklonalen Antikörper (mAb) und mit einem gegen das MHC Klasse I-Molekül gerichteten mAb (mAb 74-11-10) ebenfalls ein hemmender Einfluss auf die peptidinduzierte Zellproliferation. Andererseits zeigte sich mit einem weiteren mAb anti-MHC Klasse I (mAb 2.27.3a) eine proliferationsfördernde Wirkung. So dass eine Beteiligung des CD8-Corezeptors und des MHC Klasse I-Moleküls an der peptidspezifischen Proliferation weder ausgeschlossen noch bestätigt werden konnte.

Es wurden hier andere Antikörper-Chargen verwendet, als zur Bestimmung der MHC-Restriktion der gB17- und gB39- spezifischen PBMC-Antwort. Möglicherweise könnten auch andere Bestandteile der Hybridomakulturüberstände, zum Beispiel das FCS, einen hemmenden oder fördernden Einfluß auf das Zellwachstum ausüben.

Deshalb sollten die Tests mit anderen Antikörper-Chargen oder eventuell anderen Antikörpern wiederholt werden. Zur Kontrolle könnte der polyklonale T-Zell-Aktivator Concanavalin A (Con A) mitgeführt werden (Tikoo et al., 1995); die Zellproliferation mit Con A dürfte durch mAb anti-CD4, anti-CD8, anti-MHC I oder anti-MHC II nicht beeinträchtigt werden.

Generell wird diskutiert, dass bei CD4⁺CD8⁺ porcinen T-Zellen, zusätzlich zum CD4-Corezeptor, auch der CD8-Corezeptor eine Rolle bei der Antigenerkennung spielen kann, indem er, durch Bindung an benachbarte MHC Klasse I-Moleküle, die Interaktion zwischen dem T-Zellrezeptor und dem MHC Klasse II-Molekül verstärkt (Zuckermann 1999). Es ist ein additiver Blockierungseffekt bei der Restimulation von porcinen CD4⁺CD8⁺ Lymphocyten mit viralem Antigen in der Anwesenheit von sowohl mAb anti-CD4 als auch mAb anti-CD8 beschrieben (Zuckermann, 1999).

Weiterhin können sich T-Helfer- und CTL-Determinanten auf einem Pentadecapeptid befinden. Dies ist für ein Maul- und Klauenseuche- (MKS-) Virus-spezifisches T-Zellepitop beschrieben (Armengol et al., 2002). CTL erkennen normalerweise Peptidfragmente zwischen 8 und 11 Aminosäuren, die an MHC Klasse I-Moleküle gebunden sind (Falk et al., 1991). Zum Zeitpunkt der Durchführung der vorliegenden Arbeit standen jedoch für PRV keine verlässlichen CTL-Testsysteme zur Verfügung (Mettenleiter, 1996). Später wurden CTL-Tests entwickelt (Kimman et al., 1996). Als Effektorzellen wurden Zellen des Inzuchtschweins vom d/d Haplotyp und als Zielzellen wurden immortalisierte L14 Zellen des Inzuchtschweins vom d/d Haplotyp (Kaeffer et al., 1990) verwendet, welche PRV-Glykoproteine exprimieren. Für synthetische pseudorabiesvirale Peptide sind noch keine CTL-Testsysteme beschrieben. Die Etablierung solcher Testsysteme wäre aber für die PRV-Impfstoffentwicklung von Bedeutung, da auch CTL-Epitope den Bestandteil einer effektiven neuen PRV-Vakzine darstellen könnten.

6.3.2 Auszuchtschwein

Die bisherigen Untersuchungen zur T-Zellepitopkartierung pseudorabiesviraler Glykoproteine waren an Inzuchtschweinen des d/d Haplotyps durchgeführt worden.

Über die Verteilung pseudorabiesviraler T-Zellepitope in der natürlichen Schweinepopulation mit polymorphem MHC war noch nichts bekannt.

Generell wurden bei Auszuchtsschweinen große individuelle Unterschiede sowohl in der zellvermittelten als auch in der humoralen Immunantwort beobachtet (Hessing et al., 1995). Deshalb liegt nahe, dass die für das Inzuchtsschwein aufgefundenen T- und B-Zellepitope auf ihre Verwendbarkeit in Impfstoffen auch im Auszuchtsschwein getestet werden müssen.

Der MHC-Komplex des Schweines (*swine leucocyte antigen: SLA*) wurde 1970 identifiziert (Vaiman et al, 1970; Viza et al 1970) und ist auf dem Chromosom 7 lokalisiert, indem die MHC Klasse I- und III- Regionen durch das Centromer von von der MHC Klasse II-Region getrennt sind (Vaiman et al., 1998). Ein (MHC-) Haplotyp besteht aus einer Kombination von Allelen von Genen, die auf demselben Chromosom gelegen sind. Es konnten bisher für die MHC Klasse I-Region mindestens 68 Haplotypen nachgewiesen werden, die weltweit in zahlreichen Schweinezuchtlinien wiederholt auftreten. Die genaue Höhe des porcinen MHC-Polymorphismus ist jedoch noch nicht bekannt. Bislang wurden noch in zu wenigen Schweinezuchtlinien serologische MHC Klasse I-Typisierungen durchgeführt (Vaiman et al., 1998). Das Inzuchtsschwein vom d/d Haplotyp weist hierbei in seinem MHC Klasse I Ähnlichkeit mit dem Auszuchtsschwein-Haplotyp SLA H04 auf. Im Gegensatz zu anderen Haplotypen wird der Haplotyp SLA H04 in der Mehrzahl der Schweinezuchtlinien gefunden und wird als einer der konserviertesten Haplotypen bei Auszuchtsschweinen betrachtet (Vaiman et al., 1998).

Die serologische Charakterisierung des MHC Klasse II-Komplexes gestaltet sich aufgrund kreuzreagierender monoklonaler Antikörper sehr schwierig (Vaiman et al., 1998). Aus diesem Grund können über die Häufigkeit des Inzuchtsschwein-MHC Klasse II-Haplotyps in der Auszuchtsschweinepopulation noch keine Aussagen getroffen werden.

Zunächst wurden die bereits bekannten Inzuchtsschwein-T-Zellepitope gC50 (gC AS 245-259) und gC72 (gC AS 353-369; Ober et al., 1998) sowie gB17 (gB AS 341-355) und gB39 (gB AS 451-465) in Proliferationstests mit PBMC der beiden PRV-immunisierten Auszuchtsschweine 1 und 2 eingesetzt. Hierbei zeigte sich, dass gC50 und gC72 für das Schwein 1 vermutliche T-Zellepitope darstellten, nicht aber

für das Schwein 2 (→ 5.2.4). Die Peptide gB17 und gB39 zeigten weder mit PBMC des Tieres 1 noch mit PBMC des Tieres 2 eine spezifische Reaktion (→5.3.1).

Zur T-Zellepitopkartierung für das Glykoprotein gD wurden die das N-terminale gD repräsentierenden Peptide gD1-34 eingesetzt (→ 5.1.9.6). Hierbei wurden für das Auszuchtsschwein 1 15 potentielle T-Zellepitope (gD1-6, gD9, gD11, gD22-28) und für das Auszuchtsschwein 2 14 potentielle T-Zellepitope (gD8, gD15-22, gD24, gD26, gD27, gD30, gD32) nachgewiesen. Eine gemeinsame spezifische Antwort wurde auf vier Peptide (gD22, gD24, gD26, gD27) erhalten. Zusätzlich zu der positiven Reaktion mit fast 45 % der untersuchten Peptide fand sich auch eine hohe Bandbreite der Stimulationsindices (2-7,9). Dagegen war bei der gD-T-Zellepitopkartierung für das Inzuchtsschwein mit denselben Peptiden gD1-34 lediglich das T-Zellepitop gD16 aufgefunden worden (→ 5.1.9.3). Wie oben ersichtlich war das Peptid gD16 auch für das Auszuchtsschwein 2 ein potentielles T-Zellepitop.

Zusammenfassend hatten also die Inzuchtsschwein-T-Zellepitope teils für das Auszuchtsschwein 1 (gC50 und gC72), teils für das Auszuchtsschwein 2 (gD16) und teils für keines der beiden Tiere (gB17 und gB39) potentielle T-Zellepitope dargestellt. Auch wenn es sich hier bislang nur um fünf T-Zellepitope des Inzuchtsschweines, die an zwei Auszuchtsschweinen getestet wurden, handelt zeigt sich trotzdem, dass die Ergebnisse für das Inzuchtsschwein nicht ohne weiteres für das Auszuchtsschwein verallgemeinert werden können.

Da der Immunisierungsvorgang für Inzucht- und Auszuchtsschweine gleichartig war (→ 4.3.1), scheinen für die unterschiedliche Anzahl der im Proliferationstest erkannten Peptide hauptsächlich Unterschiede des MHC-Komplexes verantwortlich zu sein. Das Inzuchtsschwein scheint, vermutlich aufgrund der Homozygotie seines MHC-Komplexes, über eine wesentlich geringere Vielfalt in der Erkennung von T-Helferepitopen zu verfügen als das Auszuchtsschwein.

Auch der Mensch kann als eine „Auszuchtpopulation“ betrachtet werden. Für das HSV-1-gD fand sich eine breite Auswahl an T-Zellepitopen in Proliferationstests mit 28 synthetischen 20-mer Peptiden, die den HSV-1-gD-Anteil AS 1-280 repräsentierten und PBMC acht HSV-1-seropositiver Menschen. Ebenfalls beobachtet wurde ein breiter Stimulationsindex-Bereich (2-14), der in keinem Zusammenhang mit dem im ELISA gemessenen HSV-1-Antikörpertiter stand. Im Proliferationstest erfolgte eine positive

Reaktion der PBMC eines Probanden mit durchschnittlich 38,5 % der getesteten Peptide, während im ELISA von allen Seren insgesamt nur 7 Peptide (20 %) erkannt wurden. Es gab aber kein Peptid, das restimulatorisch für die PBMC aller Probanden wirkte (Damhof et al., 1993). Auch Mäuse, die einer HSV-1-Belastungsinfektion ausgesetzt worden waren, zeigten eine spezifische Reaktion mit mindestens 60 % der untersuchten Peptide (Yamashita et al., 1989).

Diese außergewöhnliche Vielfalt an T-Helferzellepitopen und der Mangel an Immundominanz der humanen T-Zellantwort auf das gD verhinderte, eine hauptimmunodominante T-Zell-Determinante des gD zu definieren, die als einzige Komponente eines zukünftigen HSV-1-Impfstoffes fungiert. Es wurde vorgeschlagen, dass im Falle der HSV-1-gD-Impfstoffentwicklung, ein „Impfcocktail“ aus immunodominanten Epitopen verwendet werden müsse (Damhof et al., 1993).

Die hier für die beiden Auszuchtsschweine *in vitro* erhaltenen Ergebnisse lassen vermuten, dass es sich mit der Immundominanz der PRV-gD-T-Zellepitope ebenso verhalten könnte. Um diesen Verdacht zu erhärten, könnten zunächst T-Zellepitopkartierungen mit den das gesamte gD repräsentierenden synthetischen Peptiden für Auszuchtsschweine in einem größeren Rahmen durchgeführt werden.

Weiterhin wäre es von Interesse, auch die T-Zellepitope des gesamten gB und gC für das Auszuchtsschwein, ebenfalls in einem größeren Rahmen, zu kartieren. Im Vergleich könnte dann auch ermittelt werden, ob es sich bei der hohen Anzahl an spezifischen Reaktionen auf die gD-Peptide eher um eine Ausnahme oder um die Regel handelt.

Auch wenn das Inzuchtsschwein vom d/d Haplotyp ein gutes Modellsystem darstellt, ein Herpesvirus in einem natürlichen Wirt zu untersuchen und grundlegende allgemeine Kenntnisse über das porcine Immunsystem zu gewinnen, stellt es, was die Entwicklung von Impfstoffen gegen porcine Krankheitserreger anbelangt, lediglich ein Basismodell dar. Die hier gezeigten Ergebnisse und die Daten zum porcinen MHC-Polymorphismus (Chardon et al., 1998) unterstreichen, dass zur Entwicklung eines wirkungsvollen Impfstoffes auf Epitopbasis die Überprüfung der T-Helferzellepitope, aber auch der B-Zellepitope und CTL-Epitope, in der natürlichen Schweinepopulation mit polymorphem MHC unumgänglich ist.

6.4 Cytokine

T-Zellen vermitteln ihre Funktionen über Cytokine (Abbas et al., 1996). Für humane, murine und bovine T-Lymphocyten ist die phänotypische Differenzierung undifferenzierter Th (T-Helfer) 0-Zellen in die zwei unterschiedlichen T-Helfer-Zellpopulationen Th1 und Th2 beschrieben, die sich in ihrem Cytokinmuster unterscheiden (Brown et al., 1998; Romagnani et al., 1994; Sinigaglia et al., 1999). Th1-Zellen sezernieren u. a. IL-2, IFN- γ , und TNF- β und induzieren hauptsächlich das zelluläre Immunsystem, indem sie cytotoxische T-Zellen stimulieren, aktivieren aber auch B-Zellen. Th2-Zellen bilden u. a. die Cytokine IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 und induzieren hauptsächlich B-Zellen (Mosman et al., 1986).

Die Beziehung zwischen Th1- und Th2- Zellen ist vornehmlich reziprok reguliert. Wird im Zusammenhang mit einer Immunantwort eine der beiden Th-Populationen zuerst aktiviert, so wird die Entwicklung der anderen Th-Population unterdrückt. Der Endeffekt ist, dass eine bestimmte Immunantwort entweder durch die humorale (Th2) oder die zellvermittelte (Th1) Immunantwort dominiert wird.

Es wurde gezeigt, dass Th1-spezifische Effektor-Funktionen wichtig für die protektive Immunantwort gegen intrazelluläre Pathogene einschließlich Viren sind (Biron, 1999; Ramshaw et al., 1997). Th1-typische CD4⁺ T-Zellen, nicht CD8⁺ Zellen, sind im HSV-Mausmodell für eine protektive Immunität nach HSV-Belastungsinfektion verantwortlich (Manickan et al., 1995, 1997; Milligan, 1995). Auch im PRV-Mausmodell wurde eine typische Th1-Antwort im Zusammenhang mit protektiver Immunität beobachtet (Bianchi et al., 1998; Schijns et al., 1995).

Vor einer Verwendung pseudorabiesviraler T-Zellepitope zur Konstruktion von Vakzinen sollte deshalb ihre Fähigkeit zur Aktivierung von T-Helferzellen zur Cytokinproduktion untersucht werden.

Zum Nachweis der Cytokinsekretion wurden IL-2-Aktivierungstests mit der interleukinabhängigen murinen HT-2-Zelllinie (Watson, 1979) und Kulturüberständen porciner PRV-spezifischer PBMC, die mit Peptiden oder mit β -PL-PRV restimuliert worden waren, durchgeführt (\rightarrow 4.4.3). Die Aktivität der HT-2-Zellen erlaubt einen Rückschluss auf die IL-2-Produktion innerhalb der ursprünglichen PBMC-Ausgangskultur. IL-2, das hauptsächlich von aktivierten T-Helferzellen sekretiert wird,

kann NK-Zellen und cytotoxische T-Zellen aktivieren, IFN- γ bei T-Zellen induzieren und B-Zellen stimulieren (Farrar et al., 1981; Henney et al., 1981).

Für das Inzuchtschwein vom d/d Haplotyp war gezeigt worden, dass PRV-spezifische T-Memory-Zellen vom CD4⁺CD8⁺-Typ nach Restimulation mit UV-PRV für die IL-2-Sekretion und die Fähigkeit zur B-Zellhilfe verantwortlich sind (Ober et al., 1998). Die dort beschriebenen IL-2-Aktivierungstests waren mit PRV und Kulturüberständen, die nach 72 Stunden abgenommen worden waren, durchgeführt worden. Deshalb wurden die IL-2-Aktivierungstests mit Peptiden zunächst mit PBMC-Kulturüberständen durchgeführt, die nach 72, 96 oder 114 Stunden abgenommen worden waren. Mit Hilfe eines derartigen IL-2-Aktivierungstests konnte für PRV-immune PBMC des Inzuchtschweines und das Peptid gB39 (gB AS 451-465) eine spezifische IL-2-Produktion nach 114 Stunden nachgewiesen werden (\rightarrow 5.2.3). Diese kann aktivierten T-Helferzellen zugerechnet werden. Vermutlich handelt es sich um T-Memory-Zellen. Andererseits könnten, aufgrund der Zeitdauer von 114 Stunden, auch naive T-Zellen beteiligt gewesen sein (Swain et al., 1996), die sich erst nach Antigenkontakt *in vitro* zu T-Effektorzellen differenziert haben. Dieses erscheint jedoch unwahrscheinlich, da nur jede 1×10^4 bis 1×10^6 naive T-Zelle spezifisch auf ein bestimmtes Antigen reagiert und sich somit eine messbare primäre Immunantwort *in vitro* normalerweise nicht induzieren läßt (Janeway et al., 1997). Für PRV-spezifische PBMC des Inzuchtschweines und das Peptid gB17 (gB AS 341-355) konnte auch nach 114 Stunden keine spezifische IL-2-Produktion nachgewiesen werden.

Die IL-2-Aktivierungstests für die Peptide gB17 und gB39 waren mit HT-2-Kulturmedium durchgeführt worden, das 10 % FCS enthielt. Es war jedoch eine nicht unerhebliche unspezifische Proliferation der HT-2-Zellkontrolle, allein mit dem HT-2-Kulturmedium, beobachtet worden. Hierfür verantwortlich waren möglicherweise proliferationsfördernde Bestandteile aus dem FCS. Deshalb wurde für die nun folgenden IL-2-Aktivierungstests mit den gD-spezifischen Peptiden, der IL-2-Test modifiziert, indem ein nur 2 % FCS enthaltendes Medium verwendet wurde. Mit Hilfe des modifizierten Tests konnte die unspezifische HT-2-Zellproliferation gesenkt werden. Außerdem wurden Kulturüberstände verwendet, die nach 24, 48, 72, 96 und 114 Stunden abgenommen worden waren. Hiermit ließ sich für PRV-spezifische PBMC des Inzuchtschweines und das Peptid gD16 (gD AS 76-90) bereits mit den 24 h-

Kulturüberständen eine starke spezifische IL-2-Produktion nachweisen, die aktivierten T-Helferzellen zugeschrieben werden kann (→ 5.1.9.5). Weiterhin spricht die Aktivierung von T-Zellen innerhalb dieses kurzen Zeitraumes für die Aktivierung von T-Memory-Zellen (Swain et al., 1996). Auch mit dem Gesamtvirus war bereits nach 24 Stunden eine IL-2-Produktion nachweisbar. Die spezifische IL-2-Produktion blieb für das Peptid gD16 über 48 Stunden und für das Gesamtvirus, mit einer vermutlich testbedingten Ausnahme bei 72 h, über den gesamten getesteten Zeitraum von 114 Stunden nachweisbar. In wiederholten IL-2-Aktivierungstests mit β -PL-PRV-Kulturüberständen PRV-immuner Inzuchtschwein-PBMC war eine spezifische IL-2-Produktion über den gesamten Zeitraum von 114 Stunden ohne Ausnahme nachweisbar. Um den Verdacht zu erhärten, dass es sich bei den peptidinduzierten und IL-2-produzierenden T-Helferzellen um eben jene $CD4^+CD8^+$ T-Memory-Zellen, wie auch für das Gesamtvirus (Ober et al., 1998) handelt, müssten die IL-2-Aktivierungstests mit Kulturüberständen peptidstimulierter separierter PRV-spezifischer T-Lymphocyten durchgeführt werden.

Möglicherweise hätte sich mit Hilfe des modifizierten IL-2-Aktivierungstests ebenfalls eine spezifische IL-2-Produktion für das Peptid gB17 ergeben. Eventuell hätte eine spezifische Cytokinproduktion für das Peptid gB39 zu einem früheren Zeitpunkt als nach 114 Stunden nachgewiesen werden können. Diese Tests konnten jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit, aufgrund des begrenzten Biomaterials, nicht mehr durchgeführt werden.

Die vorliegenden Ergebnisse sprechen dafür, dass es sich bei Peptid gB39 und Peptid gD16 um T-Helferepitope des Inzuchtschweines handelt, welche, da sie zur IL-2-Produktion befähigen, eine T-Helferantwort vom Th1-Typ induzieren. Für das Peptid gB17 lassen sich aufgrund der hier gezeigten Ergebnisse noch keine Vermutungen äußern, ob es sich eher um ein Th1- oder um ein Th2-Epitop handeln könnte.

Allerdings können genauere Aussagen, ob mittels eines Peptides eher eine Th1- oder Th2-Antwort induziert wird, nur über die Testung weiterer Cytokine, möglichst des Th1- und des Th2-Typs, die in der PBMC-Kultur von dem jeweiligen Peptid induziert werden, gemacht werden. Zum Zeitpunkt der Durchführung der vorliegenden Arbeit standen jedoch keine weiteren Tests für porcine Cytokine auf Proteinebene zur Verfügung. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Analyse des porcinen

Cytokinmusters auf Proteinebene durch den Mangel an immunologischen und biologischen Reagenzien limitiert wird (Dufour et al., 1999). Für die Analyse porciner Cytokine sind nun ELISA für TNF- α , IL-6 und IL-8 kommerziell erhältlich (Dufour et al., 1999). Zusätzlich zum IL-2-Aktivierungstest wurden Bioassays für porcines IL-1, IL-6 und TNF- α entwickelt (Murtaugh, 1994; Vezina et al., 1995). IFN- γ -ELISPOT- (*enzyme linked immunospot*-) Tests (Zuckermann et al., 1998) und IFN- γ -ELISA (Mateu de Antonio et al., 1998) sind beschrieben. Weitere Cytokintests könnten entwickelt werden, um möglichst viele der Cytokine einzuschließen, die während einer Th1- oder Th2-Immunantwort produziert werden.

Eine Alternative ist deshalb die Testung der Cytokine auf Transkriptionsebene mittels RT-PCR (Fischer, 1998). Eine Erhöhung der IL-2- als auch der IFN- γ -spezifischen Transkriptionsrate für 48 Stunden *in vitro* mit inaktiviertem β -PL-PRV stimulierte PBMC des PRV-immunisierten Auszuchtsschweines 2 konnte über RT-PCR bereits gezeigt werden (Fischer, 1998). Eine RT-PCR für mit antigenen Peptiden restimulierte PRV-immune PBMC war noch nicht durchgeführt worden.

Für das Peptid gD15 (gD AS 71-85), das ein potentielles T-Zellepitop für das Auszuchtsschwein 2 darstellt, wurde einerseits ein IL-2-Aktivierungstest und andererseits eine RT-PCR durchgeführt (\rightarrow 5.1.9.7). Hiermit konnte die Cytokinproduktion auf Proteinebene und auf Transkriptionsebene untersucht und die Ergebnisse miteinander verglichen werden. Das Peptid gD15 wurde ausgewählt, da es im Proliferationstest mit PRV-immunen PBMC des Auszuchtsschweines 2 zu der höchsten spezifischen Proliferation (SI 7,9), die im Rahmen dieser Arbeit mit einem Peptid gemessen wurde, geführt hatte (\rightarrow 5.1.9.6). Mittels des IL-2-Aktivierungstests konnte jedoch über den gesamten getesteten Zeitraum von 114 Stunden keine gD15-spezifische erhöhte Cytokinproduktion innerhalb der Ausgangs-PBMC gezeigt werden (\rightarrow 5.1.9.7.1). Für β -PL-PRV wurde allerdings eine spezifische IL-2-Produktion bereits nach 24 Stunden nachgewiesen und war über den gesamten Zeitraum von 114 Stunden nachweisbar (\rightarrow 5.1.9.7.1). Dieses Ergebnis entsprach dem mit β -PL-PRV und PRV-immunen PBMC des Inzuchtsschweines erhaltenen (\rightarrow 5.1.9.5). Übereinstimmend hierzu konnte in der RT-PCR, die mit mRNA durchgeführt wurde, welche aus 48 Stunden kultivierten PBMC gewonnen worden war, ebenfalls keine Peptid gD15-spezifische IL-2- und IFN- γ -Produktion gezeigt werden (\rightarrow 5.1.9.7.2). Möglicherweise

handelt es sich bei dem Peptid gD15 um ein T-Helferepitop, das eine Th2- Antwort induziert. Für β -PL-PRV jedoch konnte, wie bereits anderweitig (s.o.; Fischer, 1998) gezeigt worden war, eine spezifische IL-2- und IFN- γ -Produktion nachgewiesen werden. Das Cytokinmuster deutete demzufolge auf eine virusinduzierte T-Helferantwort vom Th1-Typ hin.

Eine quantitative RT-PCR zum Nachweis der porcinen Cytokine IL-2, IL-4, IL-10 und IFN- γ wurde entwickelt (Fischer et al., 2000), stand aber zum Zeitpunkt der Durchführung der vorliegenden Arbeit noch nicht zur Verfügung. Mittels dieser quantitativen RT-PCR könnte nun auch weiter untersucht werden, welches Cytokinmuster und welche Cytokinmenge die im Rahmen der vorliegenden Arbeit aufgefundenen T-Helferepitope in PRV-immunen PBMC des Inzucht- oder Auszuchtschweines induzieren.

Für die PRV-Impfstoffentwicklung läßt sich ableiten, dass rekombinante Cytokine und antigene Peptide oder Proteine, die bevorzugt eine Th1-Antwort induzieren, zur Verstärkung der Immunantwort gemeinsam in Impfstoffen verabreicht werden könnten. Hiermit könnte die Immunantwort in Richtung einer Th1-Antwort moduliert und eine Th2-Antwort umgangen werden.

Eine *in vivo*-Modulation der Impfstoff-induzierten Immunantwort in Richtung eines Th1-Typs steigerte die Wirksamkeit des Impfstoffes in einem HSV-2-Maus-Modell. Es konnte gezeigt werden, dass eine Th1-typische Immunantwort zu einer besseren protektiven Immunität gegen Herpesvirusinfektion führte, wogegen eine Th2-typische Immunantwort die Krankheit verschlimmerte (Sin et al, 1999). Wurde IL-12 zusammen mit einem PRV-Totimpfstoff bei Schweinen appliziert, konnte die protektive Immunität erhöht werden (Zuckermann et al., 1999).

Bei der Konstruktion von Impfvektoren könnten Th1-Epitope zur Verstärkung der Immunantwort mehrfach wiederholt werden (Tikoo et al., 1995), Th2-Epitope, welche die Immunantwort negativ beeinflussen, könnten ausgelassen werden. Um die MHC-Restriktion der individuellen Epitope zu überwinden oder um eine größere Menge an Effektor-Zellen anzusprechen, wäre es auch möglich, multiple benachbarte minimale Epitope in Form eines Polytopes zu übertragen (Thomson et al., 1996).

6.5 Ausblick

Die Kartierung von T-Zellepitopen im *in vitro* Proliferationstest mit PRV-spezifischen PBMC und die Identifizierung von B-Zellepitopen über Western-Blot-Analysen und ELISA mit PRV-spezifischen Seren, wie in der vorliegenden Arbeit vorgestellt, erlaubt zunächst nur die Charakterisierung der Epitope als antigene Determinanten des untersuchten Proteins. Es ist jedoch sehr wenig darüber bekannt, inwiefern eine *in vitro* gemessene (*Memory*-) Antwort mit der tatsächlich *in vivo* stattfindenden (*Memory*-) Antwort korreliert (Zinkernagel et al., 1996). Sollen diese *in vitro* charakterisierten Epitope in PRV-Impfstoffen auf Epitopbasis verwendet werden, könnten deshalb weiterführende Untersuchungen zur Immunogenität *in vivo*, möglichst am natürlichen Wirt des PRV, dem Schwein, durchgeführt werden. Um T-Helferepitope bereits vor einem Einbau in Vakzinen *in vivo* zu testen, besteht die Möglichkeit DTH- (*delayed type hypersensitivity*-) Tests an Inzucht- und Auszuchtschweinen durchzuführen (Büttner et al., 2000; Scherba et al., 1978). Um allgemeine Kenntnisse darüber zu erhalten, inwiefern die *in vitro* erhaltenen Ergebnisse zur Epitopkartierung auch *in vivo* gelten, könnten die bislang aufgefundenen T-Helfer- und B-Zellepitope des Glykoproteins gC (Ober et al., 1998) und die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Epitope der Glykoproteine gB und gD für das Inzuchtschwein *in vivo*, in verschiedenen Impfstoffzubereitungen, getestet werden. Peptid-ELISA und RT-Cytokin-PCR könnten durchgeführt werden. Hiermit ließen sich erste Erkenntnisse zur epitopspezifischen *in vivo*-Immunantwort gewinnen. Die weitere Impfstoffentwicklung muss letztlich, aufgrund des MHC-Polymorphismus, am Auszuchtschwein durchgeführt werden. Bevor aber für das Auszuchtschwein mit *in vivo*-Versuchen zur Entwicklung von PRV-Impfstoffen auf Epitopbasis begonnen werden kann, sollten hier zunächst T- und B-Zellepitopkartierungen pseudorabiesviraler Glykoproteine in einem großen Rahmen durchgeführt werden. So ließe sich ein Überblick über die genaue Verteilung der Epitope innerhalb der Schweinepopulation gewinnen. Epitope, die innerhalb der Schweinepopulation eine häufige Immunantwort induzieren, könnten dann als alleinige oder zusätzliche Bestandteile beispielsweise von Vektorvakzinen, DNA-Vakzinen oder kombinierter Subunitvakzinen verwendet werden. Nun wäre es möglich, diese Vakzinen *in vivo* am Auszuchtschwein auf ihre Wirksamkeit hin zu testen.

Ziel ist die Entwicklung eines PRV-Impfstoffes, der eine Kombination aus B-Zell-, T-Helferzell- und CTL-Zellepitopen enthält, und der eine effektive protektive Immunität in Form einer Th1-spezifischen *Memory*-Antwort induziert. Fernziel ist die Entwicklung eines PRV-Impfstoffes, der eine sogenannte „sterile Immunität“ (Kimman et al., 1994) erzeugt, eine protektive Immunität, die bei Konfrontation des vakzinierten Tieres mit infektiösem Virus weder die Etablierung einer Latenz noch die Ausscheidung infektiöser Viren erlaubt.

7 Zusammenfassung

Das Pseudorabiesvirus (PRV) ist der Verursacher der Aujeszky'schen Krankheit beim Schwein, die zu starken finanziellen Einbußen in der Landwirtschaft führt. Die zur Verfügung stehenden Impfstoffe erfüllen nicht die Bedingungen für einen idealen Impfstoff. An der Entwicklung neuer Impfstoffe gegen PRV wird gearbeitet. Die PRV-Glykoproteine spielen eine wichtige Rolle bei der Generierung einer protektiven Immunität gegen PRV. Deshalb galt die vorliegende Arbeit der Identifizierung von T- und B-Zellepitopen pseudorabiesviraler Glykoproteine.

Ein Schwerpunkt der Arbeit lag bei der T- und B-Zellepitopkartierung des Glykoproteins gD. Zunächst wurden im bakteriellen Expressionssystem pEV40 drei gD-Fusionsproteine hergestellt: GD (gD AS 1-402), welches das gesamte Glykoprotein gD repräsentierte, GD-1 (GD AS 1-170) für den N-terminalen und GD-2 (gD AS 170-402) für den C-terminalen gD-Anteil. Diese sollten zur näheren Eingrenzung von B- oder T-Zellepitopen in Western-Blot-Analysen mit PRV-spezifischen Seren oder in Proliferationstests mit PRV-immunen PBMC eingesetzt werden. Das bakterielle Expressionssystem pEV40 erwies sich zur Expression der gD-Fusionsproteine jedoch als nur bedingt geeignet. Alle drei Fusionsproteine wurden nur in geringer Menge exprimiert. Zudem waren GD und GD-1 weitgehend unlöslich. Auch Anreicherungsversuche über Affinitätschromatographie erbrachten keine wesentliche Steigerung der Ausbeute. Für weiterführende Versuche mussten die gD-Fusionproteine in Form von 7 M Harnstoffextrakten eingesetzt werden.

Western-Blot-Analysen mit den gD-Fusionsproteinen und PRV-spezifischen Seren erbrachten den Hinweis auf B-Zellepitope vor allem auf dem C-terminalen gD-Anteil (gD AS 170-402). Synthetische, um jeweils 10 AS überlappende Pentadecapeptide, die das gesamte gD repräsentieren (gD1-79), wurden hergestellt und über MS analysiert. Zur Kartierung von B-Zellepitopen wurden Peptid-ELISAs mit PRV-spezifischem Ziegen- und Inzuchtschweinserserum und den Peptiden gD1-79 durchgeführt. Hierbei fanden sich im C-terminalen gD-Bereich (gD AS 271-402) lineare B-Zellepitope.

Zur näheren Lokalisierung von T-Zellepitopen wurden Proliferationstests mit den gD-Fusionsproteinen und PRV-spezifischen PBMC von Inzuchtschweinen durchgeführt. Hier ergab sich der Hinweis auf T-Zellepitope im N-terminalen gD-Anteil (gD AS 1-

170). Die den N-terminalen gD-Bereich repräsentierenden Peptide gD1-35 (gD AS 1-185) wurden zur Kartierung von T-Zellepitopen beim Inzuchtschwein eingesetzt. Hiermit konnte das T-Zellepitop gD16 (gD AS 76-90) identifiziert werden. Die gD16-spezifische PBMC-Proliferation erwies sich als MHC Klasse II-restringiert. Eine Beteiligung des CD8 Corezeptors und des MHC Klasse I-Moleküls blieb offen. Über IL-2-Aktivierungstests konnte eine starke gD16- und β -PL-PRV-spezifische IL-2-Produktion innerhalb der PBMC-Population, die aktivierten T-Helferzellen zugeschrieben werden kann, bereits innerhalb von 24 h nachgewiesen werden.

Im Hinblick auf eine zukünftige Impfstoffentwicklung wurden die gD-Peptide auch zur Kartierung von T-Zellepitopen zweier Auszuchtschweine mit polymorphem MHC eingesetzt. Hiermit konnten für das Tier 1 15 potentielle T-Zellepitope und für das Tier 2 14 potentielle T-Zellepitope identifiziert werden. Es zeigte sich ein starker individueller Unterschied in der peptidspezifischen Reaktion.

Mit dem Peptid gD15 (gD AS 71-85), das für das Tier 2 ein T-Zellepitop darstellt, konnte im IL-2-Aktivierungstest und in der RT-PCR keine spezifische IL-2-Produktion nachgewiesen werden. IL-2-Produktion und somit eine Th-1-typische Reaktion zeigte sich jedoch mit β -PL-PRV bereits innerhalb von 24 h im IL-2-Aktivierungstest und in der PCR nach 48 h.

Die Peptide des Glykoproteins gB: gB17 (gB AS 341-355) und gB39 (gB AS 451-465) konnten in Proliferationstests mit PRV-spezifischen PBMC des Inzuchtschweines als T-Zellepitope bestätigt werden. Die gB17- und gB39-spezifische PBMC-Antwort erwies sich als MHC II-restringiert, als eine klassische T-Helferreaktion. Eine IL-2-Produktion PRV-spezifischer PBMC konnte mit dem Peptid gB39 nachgewiesen werden.

Bislang sind für das Inzuchtschwein die T-Zellepitope gB17, gB39, gC50, gC72 und gD16 bekannt. In Proliferationstest mit PBMC der beiden Auszuchtschweine zeigte sich keine spezifische Reaktion mit den Peptiden gB17 und gB39. Die Peptide gC50 und gC72 erwiesen sich als T-Zellepitope für das Tier 2 und das Peptid gD16 für das Tier 1. Möglicherweise könnten die in der vorliegenden Arbeit aufgefundenen T- und B-Zellepitope Bestandteile eines PRV-Impfstoffes auf Epitopbasis darstellen. Fernziel ist die Entwicklung eines idealen PRV-Impfstoffes, der eine „sterile Immunität“, protektiven Schutz ohne Latenzentwicklung und Virusausscheidung, ermöglicht.

8 Literaturverzeichnis

Abbas, A.K.; Murphy, K.M.; and Sher, A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* **383**:787-793.

Adam, M.; Le Pottier, M.F.; and Eloit, M. (1994). Vaccination of pigs with replication defective adenovirus vectored vaccines: the example of pseudorabies. *Vet. Microbiol.* **42**:205-215.

Ahlers, S.E.; and Feldman, L.D. (1987). Effects of a temperature-sensitive mutation in the immediate-early gene of pseudorabies virus on class II and class III gene transcription. *J. Virol.* **61**:1103-1107.

Armengol, E.; Wiesmüller, K.H.; Wienhold, D.; Büttner, M.; Pfaff, E.; Jung, G.; and Saalmüller, A. (2002). Identification of T-cell-epitopes in the structural and non structural proteins of classical swine fever virus. *J. Gen. Virol.* **83**:551-560.

Aujeszky, A. (1902). Über eine neue Infektionskrankheit bei Haustieren; *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig.* **32**:353-357.

Babic, N.; Klupp, B.; Brack, A.; Mettenleiter, T.C.; Ugolini, G.; and Flamand, A. (1996). Deletion of glycoprotein gE reduces the propagation of pseudorabies virus in the nervous system of mice after intranasal inoculation. *Virology* **219**: 279-284.

Balan, P.; Davis-Poynter, N.; Bell, S.; Atkinson, H.; Browne, H.; and Minson, T. (1994). An analysis of the *in vitro* and *in vivo* phenotypes of mutants of herpes simplex virus type 1 lacking glycoproteins gG, gE, gI or the putative gJ. *J. Gen. Virol.* **75**:1245-1258.

Banks, M. (1994). Aujeszky's disease ELISA using baculovirus expressed glycoproteins. *Acta Vet. Hung.* **42**:359-367.

Bartha, A. (1961). Versuche zur Reduzierung der Virulenz des Aujeszky-Virus. *Mag. Allat. Lapja* **16**:42.

Baumeister, J.; Klupp, B.G.; and Mettenleiter, T.C. (1995). Pseudorabies virus and equine herpesvirus 1 share a nonessential gene which is absent in other herpesviruses and located adjacent to a highly conserved gene cluster. *J. Virol.* **69**:5560-5567.

Ben-Porat, T; and Kaplan A.S. (1985). Molecular biology of pseudorabiesvirus. In: Roizman, B. (ed.). *The Herpesviruses*.

Ben-Porat, T.; and Veach, R.A. (1980). Origin of replication of the DNA of a herpesvirus (pseudorabies). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**:172-175.

- Ben-Porat, T.; De Marchi J.M.; Lomniczi, B.; and Kaplan, A.S.** (1986). Role of glycoproteins of pseudorabies virus in eliciting neutralizing antibodies. *Virology* **154**:325-334.
- Beran, G.W.; Davies, E.B.; Arambulo, P.V., 3d; Will, L.A.; Hill, H.T.; and Rock, D.L.** (1980). Persistence of pseudorabies virus in infected swine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **176**:998-1000.
- Bernstein, D.I.; and Stanberry, L.R.** (1999). Herpes simplex virus vaccines. *Vaccine* **17**:1681-1689.
- Bianchi, A.T., Moonen-Leusen, H.W.; van Milligen, F.J.; Savelkoul, H.F.; Zwart, R.J.; and Kimman, T.G.** (1998). A mouse model to study immunity against pseudorabies virus infection: significance of CD4⁺ and CD8⁺ cells in protective immunity. *Vaccine* **16**:1550-1558.
- Biron, C.A.** (1999). Initial and innate responses to viral infections – pattern setting in immunity or disease. *Curr. Opin. Immunol.* **2**:374-381.
- Boyum, A.** (1964). Separation of white blood cells. *Nature* **204**:793-794.
- Brack, A.R.; Dijkstra, J.M.; Granzow, H.; Klupp, B.G.; and Mettenleiter, T.C.** (1999). Inhibition of virion maturation by simultaneous deletion of glycoproteins E, I, and M of pseudorabies virus. *J. Virol.* **73**:5364-5372.
- Brack, A.R.; Klupp, B.G.; Granzow, H.; Tirabassi, R.; Enquist, L.W.; and Mettenleiter, T.C.** (2000). Role of the cytoplasmic tail of pseudorabies virus glycoprotein E in virion formation. *J. Virol.* **74**:4004-4016.
- Brown, W.C.; Rice-Ficht, A.C.; and Estes, D.M.** (1998). Bovine type 1 and type 2 responses. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **63**:45-55.
- Bujard, H.; Gentz, R.; Lanzer, M.; Stüber, D; Müller, M.; Ibrahimi, I.; Häuptle, M.T.; and Dobberstein, B.** (1987). A T5 promotor based transcription-translation system for the analysis of proteins *in vivo* and *in vitro*. *Methods Enzymol.* **155**:416-433.
- Büttner, M.; Fischer, T.; Saalmüller, A., Henkel, M.; and Rziha, H.-J.** (2000). A gelatin sponge implantation model in swine for the determination of local immune reactions. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **113**:41-45.
- Campadelli-Fiume, G.; Farabegoli, F.; Di Gaeta, S.; and Roizman, B.** (1991). Origin of unenveloped capsids in the cytoplasm of cells infected with herpes simplex virus 1. *J. Virol.* **65**:1589-1595.
- Card, J.P.; Whealy, M.E.; Robbins, A.K.; and Enquist, L.W.** (1992). Pseudorabies virus envelope glycoprotein gI influences both neurotropism and virulence during infection of the rat visual system. *J. Virol.* **66**:3032-3041.

- Chardon, P.; Renard, C.; and Vaiman, M.** (1999). The major histocompatibility complex in swine. *Immunol. Rev.* **167**:179-192.
- Cheung, A.K.** (1989). DNA-nucleotide sequence analysis of the immediate early gene of pseudorabies virus. *Nucleic Acids Research* **17**:4637-4646.
- Cheung, A.K.** (1990). Humoral immune responses to immediate-early protein of pseudorabies virus in swine with induced or naturally acquired infection. *Am. J. Vet. Res.* **51**:222-226.
- Chicz, R.M.; Urban, R.G.; Gorga, J.C.; Vignali, D.A.; Lane, W.S.; and Strominger, J.L.** (1993). Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles. *J. Exp. Med.* **178**:27-47.
- Chinsakchai, S.; and Molitor, T.W.** (1992). Replication and immunosuppressive effects of pseudorabies virus on swine peripheral blood mononuclear cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **30**:247-260.
- Cocci, F.; Menotti, L.; Mirandola, P.M.; and Campadelli-Fiume, G.** (1998). The ectodomain of a novel member of the immunoglobulin subfamily related to the poliovirus receptor has the attributes of a bona fide receptor for herpes simplex virus types 1 and 2 in human cells. *J. Virol.* **72**:9992-10002.
- Coe, N.E.; and Mengeling, W.** (1990). Mapping and characterization of neutralizing epitopes of glycoproteins gIII and gp50 of the Indiana-Funkhauser strain of pseudorabies virus. *Arch. Virol.* **110**:137-142.
- Cohen, G.H.; Dietzschold, B.; Ponce de Leon, M.; Long, D.; Golub, E.; Varrichio, A.; Pereira, L.; and Eisenberg R.J.** (1984). Localization and synthesis of an antigenic determinant of herpes simplex glycoprotein D that stimulates production of neutralizing antibody. *J. Virol.* **49**:102-108.
- Conolly, S.A.; Whitbeck, J.J.; Rux, A.H.; Krummenacher, C.; van Drunen Littel-van den Hurk, S.; Cohen, G.H.; and Eisenberg, R.J.** (2001). Glycoprotein D homologs in herpes simplex virus type 1, pseudorabies virus, and bovine herpes virus type 1 bind directly to human HveC (nectin-1) with different affinities. *Virology* **280**:7-18.
- Cromlish, W.A.; Abmayer, S.M.; Workman, J.L.; Horikoshi, M.; and Roeder, R.G.** (1989). Transcriptionally active immediate-early protein of pseudorabies virus binds to specific sites on class II gene promoters. *J. Virol.* **63**:1869-1879.
- Damhof, R.A.; Drijfhout, J.W.; Scheffer, A.J.; Wilterdink, J.B.; Welling, G.W.; and Welling-Wester, S.** (1993). T cell responses to synthetic peptides of herpes simplex virus type 1 glycoprotein D in naturally infected individuals. *Arch. Virol.* **130**:187-193.

- Dasika, G.K.; and Letchworth, G.J., 3rd.** (1999). Cellular expression of bovine herpesvirus 1 gD inhibits cell-to-cell spread of two closely related viruses without blocking their primary infection. *Virology* **254**:24-36.
- De Bruin, M.G.M.; De Visser, Y.E.; Kimman, T.G.; and Bianchi, A.T.J.** (1998). Time course of the porcine cellular and humoral immune responses *in vivo* against pseudorabies virus after inoculation and challenge: significance of *in vitro* antigenic restimulation. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **65**:75-87.
- De Bruin, T.G.M.; van Rooij, E.M.A.; de Visser, Y.E.; Voermans, J.J.M.; Samsom, J.N.; Kimman, T.G.; and Bianchi, A.T.J.** (2000a). Discrimination of different subsets of cytolytic cells in pseudorabies virus-immune and naive pigs. *J. Gen. Virol.* **81**:1529-1537.
- De Bruin, T.G.; van Rooij, E.M.; De Visser, Y.E.; and Bianchi, A.T.** (2000b). Cytolytic function for pseudorabies virus-stimulated porcine CD4⁺CD8^{dull+} lymphocytes. *Viral. Immunol.* **13**:511-520.
- De Freitas, E.C.; Dietzschold, B.; and Koprowski, H.** (1985). Human T lymphocyte response *in vitro* to synthetic peptides of herpes simplex virus glycoprotein D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**:3425-3429.
- Del Rio, T.; Werner, H.C.; and Enquist, L.W.** (2002). The pseudorabies virus VP22 homologue (UL49) is dispensable for virus growth and has no effect on virulence and neuronal spread in rodents. *J. Virol.* **76**:774-782.
- De Marchi, J.M.; Lu, Z.; Rall, G.; Kupersmidt, S.; and Ben-Porat, T.** (1990). Structural organization of the termini of the L and S components of the genome of pseudorabies virus. *J. Virol.* **64**:4968-4977.
- Demmin, G.L.; Clase, A.C.; Randall, J.A.; Enquist, L.W.; and Banfield, B.W.** (2001). Insertions in the gG gene of pseudorabies virus reduce expression of the upstream Us3 protein and inhibit cell-to-cell spread of virus infection. *J. Virol.* **75**:10856-10869.
- Dietz, P.; Klupp, B.G.; Fuchs, W.; Kollner, B.; Weiland, E.; and Mettenleiter, T.C.** (2000). Pseudorabies virus glycoprotein K requires the UL20 gene product for processing. *J. Virol.* **74**:5083-5090.
- Dijkstra, J.M.; Visser, N.; Mettenleiter, T.C.; and Klupp, B.G.** (1996). Identification and characterization of pseudorabies virus glycoprotein gM as a nonessential virion component. *J. Virol.* **70**:5684-5688.
- Dijkstra, J.M.; Gerdt, V.; Klupp, B.G.; and Mettenleiter, T.C.** (1997). Deletion of glycoprotein gM of pseudorabies virus results in attenuation for the natural host. *J. Gen. Virol.* **78**:2147-51.

- Di Lazzaro, C.; Campadelli-Fiume, G.; and Torrisi, M.R.** (1995). Intermediate forms of glycoconjugates are present in the envelope of herpes simplex virions during their transport along the exocytotic pathway. *Virology* **214**:619-623.
- Donnelly, J.J.; Ulmer, J.B.; Shiver, J.B.; and Liu, M.A.** (1997). DNA vaccines. *Annu. Rev. Immunol.* **15**:617-648.
- Dreyer-Bux, C.** (1997). Pseudorabiesvirus (Suid Herpes 1) Infektion von Subpopulationen porciner peripherer Blutleukozyten *in vivo* und *in vitro*; Dissertation, Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- Dufour, V.; Arnauld, C.; Lantz, O.; Peguillet, I.; Morvilliers, K.; Emmanuel, A.; and Jestin, A.** (1999). Quantification of porcine cytokine gene expression using RT-PCR, a homologous internal control and chemiluminescence for microplate detection. *J. Immunol. Methods* **229**:49-60
- Eisenberg, R.J.; Long, D.; Ponce de Leon, M.; Matthews, J.T.; Spear, P.G.; Gibson, M.G.; Lasky, L.A.; Golub, E.; and Cohen, G.H.** (1985a). Localization of epitopes of herpes simplex virus type 1 glycoprotein D. *J. Virol.* **53**:634-644.
- Eisenberg, J.R.; Cerini, C.P.; Heilmann, C.J.; Joseph, A.D.; Dietzschold, B.; Golub, E.; Long, D.; Ponce de Leon, M.; and Cohen, G.H.** (1985b). Synthetic glycoprotein D-related peptides protect mice against herpes simplex virus challenge. *J. Virol.* **56**:1014-1017.
- Eloit, M.; Fargeaud, D.; L'Haridon, R.; and Toma, B.** (1988). Identification of the pseudorabies virus glycoprotein gp50 as a major target of neutralizing antibodies. *Arch. Virol.* **99**:45-56.
- Eloit, M.; Bouzghaia, H.; and Toma, B.** (1990). Identification of antigenic sites on pseudorabies virus glycoprotein gp50 implicated in virus penetration of the host cell. *J. Gen. Virol.* **71**:2179-2183.
- Eloit, M.; Gilardi-Hebenstreit, P.; Toma, B.; and Perricaudet, M.** (1990). Construction of a defective adenovirus vector expressing the pseudorabies virus glycoprotein gp50 and its use as a live vaccine. *J. Gen. Virol.* **71**:2425-2431.
- Enquist, L.W.** (1994). Infection of the mammalian nervous system by pseudorabies virus (PRV). *Seminars in Virology* **5**:221-223.
- Enquist, L.W.; Husak, P.; Banfield, B.W.; and Smith, G.A.** (1999). Infection and spread of alphaherpesviruses in the nervous system. *Adv. Virus Res.* **51**:237-347.
- Falbe, J.; und Regitz, M.** (1995). *Römpp Chemie Lexikon*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.

- Falk, K.; Röttschke, O.; Deres, K.; Metzger, J.; Jung, G.; and Rammensee, H.G.** (1991). Identification of naturally processed viral nonapeptides allows their quantification in infected cells and suggests an allele-specific T cell epitope forecast. *J. Exp. Med.* **174**:425-434.
- Farrar, W.L.; Johnson, H.M.; and Farrar, J.J.** (1981). Regulation of the production of immune interferon and cytotoxic T-lymphocytes by interleukin-2. *J. Immunol.* **126**:1120-1125.
- Favoreel, H.W.; Nauwynck, H.J.; van Oostveldt, P.; Mettenleiter, T.C.; and Pensaert, M.B.** (1997). Antibody-induced and cytoskeleton-mediated redistribution and shedding of viral glycoproteins, expressed on pseudorabies virus-infected cells. *J. Virol.* **71**:8254-8261.
- Fischer, T.** (1998). Untersuchung Pseudorabiesvirus-spezifischer porciner T-Zellen. Diplomarbeit. Fakultät für Biologie der Universität Konstanz.
- Fischer, T.; Büttner, M.; and Rziha, H.-J.** (2000). T helper 1-type cytokine transcription in peripheral blood mononuclear cells of pseudorabies virus (Suid herpesvirus 1) -primed swine indicates efficient immunization. *Immunology* **101**:378-387.
- Flamand, A.; Bennardo, T.; Babic, N.; Klupp, B.G.; and Mettenleiter, T.C.** (2001). The absence of glycoprotein gL, but not gC or gK, severely impairs pseudorabies virus neuroinvasiveness. *J. Virol.* **75**:11137-11145.
- Flynn, S.J.; Burgett, B.L.; Stein, D.S.; Wilkinson, K.S.; and Ryan, P.** (1993). The amino-terminal one-third of pseudorabies virus glycoprotein gIII contains a functional attachment domain, but this domain is not required for the efficient penetration of vero cells. *J. Virol.* **67**:2646-2654.
- Flynn, S.J.; and Ryan, P.** (1996). The receptor-binding domain of pseudorabies virus glycoprotein gC is composed of multiple discrete units that are functionally redundant. *J. Virol.* **70**:1355-64
- Fuchs, W.; Rziha, H.-J.; Lucàcs, N.; Braunschweiger, I.; Visser, N.; Lütticken, D.; Schreurs, C.S.; Thiel, H.J.; and Mettenleiter, T.C.** (1990). Pseudorabies virus glycoprotein gI: *in vitro* and *in vivo* analysis of immunorelevant epitopes. *J. Gen. Virol.* **71**:1141-1151.
- Fuchs, W.; Klupp, B.G.; Granzow, H.; Rziha, H.-J.; and Mettenleiter, T.C.** (1996). Identification and characterization of the pseudorabies virus UL3.5 protein, which is involved in virus egress. *J. Virol.* **70**:3517-3527.
- Fuchs, W.; Granzow, H.; and Mettenleiter, T.C.** (1997a). Functional complementation of UL3.5-negative pseudorabies virus by the bovine herpesvirus 1 UL3.5 homolog. *J. Virol.* **71**:8886-8892.

- Fuchs, W.; Klupp, B.G.; Granzow, H.; and Mettenleiter, T.C.** (1997b). The UL20 gene product of pseudorabies virus functions in virus egress. *J. Virol.* **71**:5639-5646.
- Fuchs, W.; Ehrlich, C.; Klupp, B.G.; and Mettenleiter, T.C.** (2000). Characterization of the replication origin (OriS) and adjoining parts of the inverted repeat sequences of the pseudorabies virus genome. *J. Gen. Virol.* **81**:1539-1543.
- Fuchs, W.; Klupp, B.G.; Granzow, H.; Osterrieder, N.; and Mettenleiter, T.C.** (2002a). The interacting UL31 and UL34 gene products of pseudorabies virus are involved in egress from the host-cell nucleus and represent components of primary enveloped but not mature virions. *J. Virol.* **76**:364-368.
- Fuchs, W.; Klupp, B.G.; Granzow, H.; Hengartner, C.; Brack, A.; Mundt, A.; Enquist, L.W.; and Mettenleiter, T.C.** (2002b). Physical interaction between envelope glycoproteins E and M of pseudorabies virus and the major tegument protein UL49. *J. Virol.* **76**:8208-8217.
- Gao, Y.; Wang, C.; and Splitter, G.A.** (1999). Mapping T and B lymphocyte epitopes of bovine herpesvirus-1 glycoprotein B. *J. Gen. Virol.* **80**:2699-2704.
- Geerligs, H.J.; Feijlbrief, M.; Bolk, M.; Bos, C.A.; Drijfhout, J.W.; Welling, G.W.; Welling-Wester, S.** (1990). Reactivity of human sera with overlapping synthetic peptides of herpes simplex virus type 1 glycoprotein D. *Arch. Virol.* **114**:251-258.
- Geraghty, R.J.; Krummenacher, C.; Cohen, G.; Eisenberg, R.; and Spear, P.G.** (1998). Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor related protein 1 and poliovirus receptor. *Science* **280**:1618-1620.
- Gerds, V.; und Mettenleiter, T.C.** (2001). DNA-Impfstoffe in der Veterinärmedizin. *Dtsch. tierärztl. Wschr.* **107**:3-10.
- Gerds, V.; Jöns, A.; Makoschey, B.; Visser, N.; and Mettenleiter, T.C.** (1997). Protection of pigs against Aujeszky's disease by DNA vaccination. *J. Gen. Virol.* **78**:2139-2146.
- Gerds, V.; Jöns, A.; and Mettenleiter, T.C.** (1999). Potency of an experimental DNA vaccine against Aujeszky's disease in pigs. *Vet. Microbiol.* **66**:1-13.
- Gershon, A.A.; Sherman, D.L.; Zhu, Z.; Gabel, C.A.; Ambron, R.T.; and Gershon, M.D.** (1994). Intracellular transport of newly synthesized varicella-zoster virus: final envelopment in the trans-Golgy-network. *J. Virol.* **68**:6372-6390.
- Geysen, H.M.** (1985). Antigen-antibody interactions at the molecular level: adventures in peptide synthesis. *Immunol. Today* **6**:364-369.
- Granzow, H.; Weiland, F.; Jöns, A.; Klupp, B.G.; Karger, A.; and Mettenleiter, T.C.** (1997). Ultrastructural analysis of the replication cycle of pseudorabies virus in cell culture: a reassessment. *J. Virol.* **71**:2072-2082.

Granzow., H.; Klupp, B.G.; Fuchs, W.; Veits, J.; Osterrieder, N.; and Mettenleiter, T.C. (2001). Egress of alphaherpesviruses: comparative ultrastructural study. *J. Virol.* **75**:3675-3684.

Gutekunst, D.E. (1979). Latent pseudorabies virus infection in swine detected by RNA-DNA-hybridization. *Am. J. Vet. Res.* **40**:1568-1572.

Gutekunst, D.E.; and Pirtle, E.C. (1979). Humoral and cellular immune responses in swine after vaccination with inactivated pseudorabies virus. *Am. J. Vet. Res.* **40**:1343-1347.

Haagmans, B.L.; van Rooij, E.M.; Dubelaar, M.; Kimman, T.G.; Horzinek, M.C.; Schijns, V.E.; and Bianchi, A.T. (1999). Vaccination of pigs against pseudorabies virus with plasmid DNA encoding glycoprotein D. *Vaccine* **17**:1264-1271.

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

Hammond, J.M.; Jansen, E.S.; Morrissy, C.J.; van der Heide, B.; Goff, W.V; Williamson, M.M.; Hooper, P.T.; Babiuk, L.A.; Tikoo, S.K.; and Johnson, M.A. (2001). Vaccination of pigs with a recombinant porcine adenovirus expressing the gD gene from pseudorabies virus. *Vaccine* **19**:3752-3758.

Hampl, H.; Ben Porat, T.; Ehrlicher, L.; Habermehl, K.O.; and Kaplan, A.S. (1984). Characterization of the envelope glycoproteins of pseudorabiesvirus. *J. Virol.* **52**:583-90.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557-580.

Hanssens, F.P.; Nauwynck, H.J.; and Mettenleiter, T.C. (1995). Role of glycoprotein gD in the adhesion of pseudorabies virus infected cells and subsequent cell-associated virus spread. *Arch. Virol.* **140**:1855-1862.

Hattori, M.; and Sakaki, Y. (1986). Dideoxy sequencing method using denatured plasmid templates. *Anal. Biochem.* **152**:232-238.

Heber-Katz, E.; Hollosi, M.; Dietzschold, B.; Hudecz, F.; and Fasman, G.D. (1985). The T cell response to the glycoprotein D of the herpes simplex virus: the significance of antigen conformation. *J. Immunol.* **135**:1385-1390.

Heffner, S.; Kovacs, F.; Klupp, B.G.; and Mettenleiter, T.C. (1993). Glycoprotein gp50-negative pseudorabies virus: a novel approach toward a nonspreading live herpesvirus vaccine. *J. Virol.* **67**:1529-1537.

Heiligenhaus, A.; Wells, P.A.; and Foster, C.S. (1995). Immunisation against HSV-1 keratitis with a synthetic gD peptide. *Eye* **9**:89-95.

- Henney, C.S.; Kuribayashi, K.; Kern, D.E.; and Gillis, S.** (1981). Interleukin-2 augments natural killer cell activity. *Nature* **291**:335-338.
- Hessing, M.J.C.; Coenen, G.J.; Vaiman, M.; and Renard, C.** (1995). Individual differences in cell mediated and humoral immunity in pigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **45**:97-113.
- Ho, S.N.; Gillis, S.; and McKean, D.J.** (1987). Differential bioassay of interleukin 2 and interleukin 4. *J. Immunol. Methods* **98**:99-104.
- Huang, A.S.; and Wagner, E.K.** (1966). Penetration of herpes simplex into human epidermoid cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **116**:863-896.
- Hudecz, F.; Hilbert, A.; Mezö, G.; Mucsi, I.; Kajtar, J.; Bösze, S.Z.; Kurucz, I; and Rajnavölgyi, E.** (1993). Epitope mapping of the 273-284 region of HSV glycoprotein D by synthetic branched polypeptide carrier conjugates. *Peptide Research* **6**: 263-271.
- Huemer, H.P.; Larcher, C.; and Coe, N.E.** (1992). Pseudorabies virus glycoprotein III derived from virions and infected cells binds to the third component of complement. *Virus Res.* **23**:271-280.
- Husak, P.J.; Kuo, T.; and Enquist, L.** (2000). Pseudorabies virus membrane proteins gI and gE facilitate anterograde spread of infection in projection-specific neurons in the rat. *J. Virol.* **74**:10975-10983.
- Iglesias, G.; Molitor, T.; Reed, D.; and L'Italien, J.** (1990). Antibodies to Aujeszky's disease virus in pigs immunized with purified virus glycoproteins. *Vet. Microbiol.* **24**:1-10.
- Ihara, S.; Feldman, L.; Watanabe, S.; and Ben-Porat, T.** (1983). Characterization of the immediate-early functions of pseudorabies virus. *Virology* **131**:437-454.
- Ishii, H.; Kobayashi, Y.; Kuroki, M.; and Kodama, Y.** (1988). Protection of mice from lethal infection with Aujeszky's disease virus by immunisation with purified gVI. *J. Gen. Virol.* **69**:1411-1414.
- Isola, V.J.; Eisenberg, R.J.; Siebert, G.H.; Heilmann, C.J.; Wilcox, W.C.; and Cohen, G.H.** (1989). Fine mapping of antigenic site II of herpes simplex virus glycoprotein D. *J. Virol.* **63**: 2325-2334.
- Ivanowska, D.; Sun, D.C.; and Lunney, J.K.** (1991). Production of monoclonal antibodies reactive with polymorphic and monomorphic determinants of SLA class I gene products. *Immunogenetics* **33**:220-223.
- Jacobs, L.** (1994). Glycoprotein E of pseudorabies virus and homologous proteins in other alphaherpesvirinae. *Arch. Virol.* **137**:209-228.

Jacobs, L.; Meloen, R.H.; Gielkens, A.L.; van Oirschot, J.T. (1990). Epitope analysis of glycoprotein I of pseudorabies virus. *J. Gen. Virol.* **71**:881-887.

Jacobs, L.; Rziha, H.-J.; Kimman, T.G.; Gielkens, A.L.; and van Oirschot, J.T. (1993). Deleting valine-125 and cysteine-126 in glycoprotein gI of pseudorabies virus strain NIA-3 decreases plaque size and reduces virulence in mice. *Arch. Virol.* **131**:251-264.

Jacobs, L.; Mulder, W.A.; Priem, J.; Pol, J.M.; and Kimman, T.G. (1994). Glycoprotein I of pseudorabies virus (Aujeszky's disease virus) determines virulence and facilitates penetration of the virus into the central nervous system of pigs. *Acta Vet. Hung.* **42**:289-300.

Janeway, C.A.; Travers, P.; Hunt, S.; and Walport, M. (1997). Antigen recognition by T-lymphocytes, p. 4:1-4:49. In *Immunobiology, The Immune System in Health and Disease*. Current Biology ltd. London.

Johnson, D.C.; and Ligas, M.W. (1988). Herpes simplex viruses lacking glycoprotein D are unable to inhibit virus penetration: quantitative evidence for virus-specific cell surface receptors. *J. Virol.* **62**:4605-4612.

Johnson, D.C.; Burke, R., and Gregory, T. (1990). Soluble forms of herpes simplex virus glycoprotein D bind to a limited number of cell surface receptors and inhibit virus entry into cells. *J. Virol.* **64**:2569-2576.

Jonjic, S.; and Koszinowski, U.H. (1984). Monoclonal antibodies reactive with swine lymphocytes. I. Antibodies to membrane structure that define the cytolytic T-lymphocyte subset in the swine. *J. Immunol.* **133**:647-652.

Jöns, A.; Granzow, H.; Kuchling, R.; and Mettenleiter, T.C. (1996). The UL49.5 gene of pseudorabies virus codes for an O-glycosylated structural protein of the viral envelope. *J. Virol.* **70**:1237-1241.

Jöns, A.; Dijkstra, J.M.; and Mettenleiter, T.C. (1998). Glycoproteins M and N of pseudorabies virus form a disulfide-linked complex. *J. Virol.* **72**:550-557.

Kaeffer, B.; Bottreau, E.; Phan Thanh, L.; Olivier, M.; and Salmon, H. (1990). Histocompatible miniature, boar model: selection of transformed cell lines of B and T lineages producing retrovirus. *Int. J. Cancer.* **46**:481-488.

Kawashima, K.; and Platt, K.B. (1989). The effect of human recombinant interleukin-2 on the porcine immune response to a pseudorabies virus subunit vaccine. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **22**:345-353.

Karger, A.; and Mettenleiter, T.C. (1993). Glycoproteins gIII and gp50 play dominant roles in the biphasic attachment of pseudorabies virus. *Virology* **194**:654-664.

- Karger, A.; and Mettenleiter, T.C.** (1996). Identification of cell surface molecules that interact with pseudorabies virus. *J. Virol.* **70**:2138-2145.
- Karger, A.; Saalmüller, A.; Tufaro, F.; Banfield, B.W.; and Mettenleiter, T.C.** (1995). Cell surface proteoglycans are not essential for infection by pseudorabies virus. *J. Virol.* **69**:3482-3489.
- Karger, A.; Schmidt, J.; and Mettenleiter, T.C.** (1998). Infectivity of a pseudorabies virus mutant lacking attachment glycoproteins C and D. *J. Virol.* **72**:7341-7348.
- Kasher, M.S.; Wakulchik, M.; Cook, J.A.; and Smith, M.** (1993). One-step purification of recombinant human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein and its binding to the retinoblastoma gene product. *Bio Techniques* **14**:630-641.
- Kim, J.S.; Enquist, W.; and Card, J.P.** (1999). Circuit-specific coinfection of neurons in the rat central nervous system with two pseudorabies virus recombinants. *J. Virol.* **73**:9521-9531.
- Kimman, T.G.; Brouwers, R.A.M.; Daus, F.J.; van Oirschot, J.T.; and van Zaane, D.** (1992a). Measurement of isotype-specific antibody responses to Aujeszky's disease virus in sera and mucosal secretions of pigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **31**:95-113.
- Kimman, T.G.; De Wind, N.; Oei-Lie, N.; Pol, J.M.A.; Berns, A.J.M.; and Gielkens, A.L.J.** (1992b). Contribution of single genes within the unique short region of Aujeszky's disease virus (suid herpesvirus type 1) to virulence, pathogenesis and immunogenicity. *J. Gen. Virol.* **73**:243-251.
- Kimman, T.G.; Oei-Lie, N.; and van Zaane, D.** (1992c). Role of memory B-cell responses in serum and mucosal fluids of swine for protective immunity against pseudorabies virus. *Am. J. Vet. Res.* **53**:1992-1998.
- Kimman, T.G.; De Wind, N.; de Bruin, T.; de Visser, Y.; and Voermans, J.** (1994). Inactivation of glycoprotein gE and thymidine kinase or the US-3 encoded protein kinase synergistically decrease *in vivo* replication of pseudorabies virus and the induction of protective immunity. *Virology* **205**:511-518.
- Kimman, T.G.; de Bruin, T.M.; Voermans, J.J.; Peeters, B.P.; and Bianchi, A.T.** (1995). Development and antigen specificity of the lymphoproliferation responses of pigs to pseudorabies virus: dichotomy between secondary B- and T-cell responses. *Immunology* **86**:372-378.
- Kimman, T.G.; de Bruin, T.G.; Voermans, J.J.; and Bianchi, A.T.** (1996). Cell-mediated immunity to pseudorabies virus: cytolytic effector cells with characteristics of lymphokine-activated killer cells lyse virus-infected and glycoprotein gB- and gC-transfected L14 cells. *J. Gen. Virol.* **77**:987-990.
- Klupp, B.G.; and Mettenleiter, T.C.** (1991). Sequence and expression of the glycoprotein gH gene of pseudorabies virus. *Virology* **182**:732-741.

Klupp, B.G.; and Mettenleiter, T.C. (1999). Glycoprotein gL-independent infectivity of pseudorabies virus is mediated by a gD-gH fusion protein. *J. Virol.* **73**:3012-3022.

Klupp, B.G.; Kern, H.; and Mettenleiter, T.C. (1992a). The virulence-determining genomic BamHI fragment 4 of pseudorabies virus contains genes corresponding to the UL15 (partial), UL18, UL19, UL20, and UL21 genes of herpes simplex virus and a putative origin of replication. *Virology* **191**:900-908.

Klupp, B.G.; Visser, N.; and Mettenleiter, T.C. (1992b). Identification and characterization of pseudorabies virus glycoprotein gH. *J. Virol.* **66**:3048-3055.

Klupp, B.G.; Baumeister, J.; Karger, A.; Visser, N.; and Mettenleiter, T.C. (1994). Identification and characterization of a novel structural glycoprotein in pseudorabies virus, gL. *J. Virol.* **68**:3868-3878.

Klupp, B.G.; Karger, A.; and Mettenleiter, T.C. (1997a). Bovine herpesvirus 1 glycoprotein B does not productively interact with cell surface heparan sulfate in a pseudorabies virion background. *J. Virol.* **71**:4838-4841.

Klupp, B.G.; Fuchs, W.; Weiland, E.; and Mettenleiter, T.C. (1997b). Pseudorabies virus glycoprotein L is necessary for virus infectivity but dispensable for virion localization of glycoprotein H. *J. Virol.* **71**:7687-7695.

Klupp, B.G.; Baumeister, J.; Dietz, P.; Granzow, H.; and Mettenleiter, T.C. (1998). Pseudorabies virus glycoprotein gK is a virion structural component involved in virus release but is not required for entry. *J. Virol.* **72**:1949-58.

Klupp, B.G.; Nixdorf, R.; and Mettenleiter, T.C. (2000). Pseudorabies virus glycoprotein M inhibits membrane fusion. *J. Virol.* **74**:6760-6768.

Klupp, B.G.; Granzow, H.; Mundt, E.; and Mettenleiter, T.C. (2001). Pseudorabies virus UL37 gene product is involved in secondary envelopment, *J. Virol.* **75**:8927-8926.

Klupp, B.G.; Fuchs, W.; Granzow, H.; Nixdorf, R.; and Mettenleiter, T.C. (2002). Pseudorabies virus UL36 tegument protein physically interacts with the UL37 protein. *J. Virol.* **76**:3065-3071.

Knapp, A.C.; Husak, P.J.; and Enquist, L.W. (1997). The gE and gI homologs from two alphaherpesviruses have conserved and divergent neuroinvasive properties. *J. Virol.* **71**:5820-5827.

Kopp, M.; Klupp, B.G.; Granzow, H.; Fuchs, W.; and Mettenleiter, T.C. (2002). Identification and characterization of the pseudorabies virus tegument proteins UL46 and UL47: role for UL47 in virion morphogenesis in the cytoplasm. *J. Virol.* **76**:8820-8833.

- Kovacs, F.; and Mettenleiter, T.C.** (1991). Firefly luciferase as a marker for herpesvirus (pseudorabies virus) replication *in vitro* and *in vivo*. *J. Gen. Virol.* **72**:2999-3008.
- Kritas, S.K.; Pensaert, M.B.; and Mettenleiter, T.C.** (1994a). Invasion and spread of single glycoprotein deleted mutants of Aujeszky's disease virus in the trigeminal nervous pathway of pigs after intranasal inoculation. *Vet. Microbiol.* **40**:323-334.
- Kritas, S.K.; Pensaert, M.B.; and Mettenleiter, T.C.** (1994b). Role of envelope glycoproteins gI, gp63 and gIII in the invasion and spread of Aujeszky's disease virus (ADV) in the olfactory nervous pathways of the pig. *J. Gen. Virol.* **75**:2319-2327.
- Kupersmidt, S.; De Marchi, J.M.; Lu, Z.; and Ben-Porat, T.** (1991). Analysis of an origin of replication at the L-terminus at the genome of pseudorabies virus. *J. Virol.* **64**:5730-5737.
- Laemmli, U.K.** (1979). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Le Potier, M.F.; Monteil, M.; Houdayer, C.; and Eloit, M.** (1997). Study of the delivery of the gD gene of pseudorabies virus to one-day-old piglets by adenovirus or plasmid DNA as ways to by-pass the inhibition of immune response by colostral antibodies. *Vet. Microbiol.* **55**:75-80.
- Liang, X.; Babiuk, L.A.; and Zamb, T.J.** (1993). Mapping of heparin-binding structures on bovine herpesvirus 1 and pseudorabies virus gIII glycoproteins. *Virology* **194**:233-243.
- Lomniczi, B.; Blankenship, M.L.; and Ben-Porat, T.** (1984a). Deletions in the genome of pseudorabies virus vaccine strains and existence of four isomers of the genomes. *J. Virol.* **49**:970-979.
- Lomniczi, B.; Watanabe, S.; Ben-Porat, T.; and Kaplan, A.S.** (1984b). Genetic basis of the neurovirulence of pseudorabies virus. *J. Virol.* **52**:168-205.
- Lomniczi, B.; Watanabe, S.; Ben-Porat, T.; and Kaplan, A.S.** (1987). Genome location and identification of functions defective in the Bartha vaccine strain of pseudorabies virus. *J. Virol.* **61**:796-801.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; and Randall, R.J.** (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265-275.
- Lu, Z.; De Marchi, J.M.; Harper, L.; Rall, G.F.; Ben-Porat, T.** (1989). Nucleotide sequences of recombinational junctions present in pseudorabies virus variants with an invertible L component. *J. Virol.* **63**:2690-2698.

Lukacs, N.; Thiel, H.J.; Mettenleiter, T.C.; and Rziha, H.-J. (1985). Demonstration of three major species of pseudorabiesvirus glycoproteins and identification of a disulfide-linked glycoprotein complex. *J. Virol.* **53**:166-173.

Luftig, R.B. (1982). Does the cytoskeleton play a significant role in animal virus replication? *J. Theor. Biol.* **99**:173-191.

Maeda, K.; Hayashi, S.; Tanioka, Y.; Matsumoto, Y.; and Otsuka, H. (2002). Pseudorabies virus (PRV) is protected from complement attack by cellular factors and glycoprotein C (gC). *Virus Res.* **20**:79-87.

Manickan, E., and Rouse, B.T. (1995). Roles of different T-cell subsets in control of herpes simplex virus infection determined by using T-cell-deficient mouse-modells. *J. Virol.* **69**:8178-8179.

Manickan, E.; Rouse, R.J.D.; Yu, Z.; Wire, W.S.; and Rouse, B.T. (1995). Genetic immunization against herpes simplex virus-protection is mediated by CD4⁺ T lymphocytes. *J. Immunol.* **155**:259-265.

Manickan, E.; Kanangat, S.; Rouse, R.J.; Yu, Z.; and Rouse, B.T. (1997). Enhancement of immune responses to naked DNA-vaccine by immunization with transfected dendritic cells. *J. Leukocyte Biol.* **61**:125-132.

Mateu de Antonio, E.; Husman, R.J.; Hansen, R.; Lunney, J.K.; Strom, D.; Martin, S.; and Zuckermann, F.A. (1998). Quantitative detection of porcine interferon-gamma in response to mitogen, superantigen and recall viral antigen. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **61**:265-277.

Marchioli, C.C.; Yancey, R.J., Jr.; Petrovskis, E.A.; Timmins, J.G.; and Post, L.E. (1987). Evaluation of pseudorabies virus glycoprotein gp50 as a vaccine for Aujeszky's disease in mice and swine: expression by vaccinia virus and Chinese hamster ovary cells. *J. Virol.* **61**:3977-3982.

Marchioli, C.; Yancey, R.J., Jr.; Timmins, J.G.; Post, L.E.; Young, B.R.; and Povendo, D.A. (1988). Protection of mice and swine from pseudorabies virus-induced mortality by administration of pseudorabies virus-specific mouse monoclonal antibodies. *Am. J. Vet. Res.* **49**:860-864.

Martin, S.; Wardley, R.C.; and Donaldson, A.I. (1986). Functional antibody responses in pigs vaccinated with live and inactivated Aujeszky's disease virus. *Res. Vet. Sci.* **41**:331-335.

Martin, S.; and Wardley, R.C. (1987). Local humoral and cellular responses in Aujeszky's disease virus infection in pigs. *Res. Vet. Sci.* **42**:170-174.

Martinez, W.M.; and Spear, P.G. (2001). Structural features of nectin-2 (HveB) required for herpes simplex virus entry. *J. Virol.* **75**:111185-111195.

- Masse, M.T.; Jöns, A.; Dijkstra J.M.; Mettenleiter, T.C.; and Flamand, A.** (1999). Glycoprotein gM and gN of pseudorabies virus are dispensable for viral penetration and propagation in the nervous system of adult mice. *J. Virol.* **73**:10503-10507.
- Matsuda-Tsucida, A.; Katayama, S.; Okada, N.; Okabe, T.; and Sasaki, N.** (1992). Protection from pseudorabies virus challenge in mice by a combination of purified gII, gIII and gIV antigens. *J. Vet. Med. Sci.* **54**:447-453.
- McFerran, J.B.; and Dow, C.** (1975). Studies on immunization of pigs with the Bartha strain of Aujeszky's disease virus. *Res. Vet. Sci.* **19**:17-22.
- McGinley, M.J.; and Platt, K.B.** (1989). Antibody response of pseudorabies virus subunit-vaccinated pigs to viral nucleocapsid proteins following low-dose virus challenge of immunity. *Am. J. Vet. Res.* **50**:1290-1293.
- Mengeling, W.L.; Brockmeier, S.L.; and Lager, K.M.** (1994). Evaluation of a recombinant vaccinia virus containing pseudorabies (PR) virus glycoprotein genes gp50, gII, gIII as a PR vaccine for pigs. *Arch. Virol.* **134**:259-269.
- Mengeling, W.L.; Brockmeier, S.L.; Lager, K.M.; and Vorwald, A.C.** (1997). The role of biotechnologically engineered vaccines and diagnostics in pseudorabies (Aujeszky's disease) eradication strategies. *Vet. Microbiol.* **55**:49-60.
- Mettenleiter, T.C.** (1994). Pseudorabies (Aujeszky's disease) virus: state of the art. *Acta Vet. Hung.* **42**:153-177.
- Mettenleiter, T.C.** (1996). Immunobiology of pseudorabies (Aujeszky's Disease). *Vet. Immunol. Immunopathol.* **54**:221-229.
- Mettenleiter, T.C.** (2000). Aujeszky's disease (pseudorabies) virus: the virus and molecular pathogenesis – State of the art, June 1999. *Vet. Res.* **31**:99-115.
- Mettenleiter, T.C.** (2002a). Herpesvirus assembly and egress. *J. Virol.* **76**:1537-1547.
- Mettenleiter, T.C.** (2002b). Brief overview on cellular virus receptors. *Virus Res.* **82**:3-8.
- Mettenleiter, T.C.; Lukacs, N.; and Rziha, H.-J.** (1985). Mapping of the structural gene of pseudorabies virus glycoprotein A and identification of two non-glycosylated precursor polypeptides. *J. Virol.* **53**:52-57.
- Mettenleiter, T.C.; Lukacs, N.; and Rziha, H.-J.** (1985). Pseudorabies virus avirulent strains fail to express a major glycoprotein. *J. Virol.* **56**:307-311.
- Mettenleiter, T.C.; Lucàcs, N.; Thiel, H.J.; Schreurs, C.S.; and Rziha, H.-J.** (1986). Location of the structural gene of pseudorabiesvirus glycoprotein complex gII. *Virology* **152**:66-75.

Mettenleiter, T.C.; Zsak, L.; Kaplan, A.S.; Ben-Porat, T.; and Lomniczi, B. (1987). Role of a structural glycoprotein of pseudorabies virus in virus virulence. *J. Virol.* **61**:4030-4032.

Mettenleiter, T.C.; Schreurs, C.; Zuckermann, F.; Ben-Porat, T.; and Kaplan, A.S. (1988). Role of glycoprotein gIII of pseudorabies virus in virulence. *J. Virol.* **62**:2712-2717.

Mettenleiter, T.C.; Zsak, L.; Zuckermann, F.; Sugg, N.; Kern, H.; and Ben-Porat T. (1990). Interaction of glycoprotein gIII with a cellular heparinlike substance mediates adsorption of pseudorabies virus. *J. Virol.* **64**:278-286.

Mettenleiter, T.C.; Klupp, B.G.; Weiland, F.; and Visser, N. (1994). Characterization of a quadruple glycoprotein-deleted pseudorabies virus mutant for use as a biologically safe live virus vaccine. *J. Gen. Virol.* **75**:1723-1733.

Milligan, G.N.; and Bernstein, D.I. (1995). Analysis of herpes simplex virus-specific T cells in the murine female genital tract following genital infection with herpes simplex virus type 2. *Virology* **212**:481-489.

Milne, R.S.; Conolly, S.A.; Krummenacher, C.; Eisenberg, R.J.; and Cohen G.H. (2001). Porcine HveC, a member of the highly conserved HveC/nelectin 1 family, is a functional alphaherpesvirus receptor. *Virology* **15**:315-328.

Monteil, M.; Le Pottier, M.F.; Ristov, A.A.; Cariolet, R.; L'Hospitalier, R.; Klonjowski, B.; and Eloit, M. (2000). Single inoculation of replication-defective adenovirus-vectored vaccines at birth in piglets with maternal antibodies induces high level of antibodies and protection against pseudorabies. *Vaccine* **18**:1738-1742.

Montgomery, R.; Warner, M.S.; Lum, B.J.; and Spear P.G. (1996). Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell* **87**:427-436.

Mosmann, T.R.; Cherwinski, H.; Bond, M.W.; Giedlin, M.A.; and Coffman, R.L. (1986). Two types of murine helper T cell clone: I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* **136**:2348-2357.

Mossman, K.L.; Sherburne, R.; Lavery, C.; Duncan, J.; and Smiley, J.R. (2000). Evidence that herpes simplex virus VP16 is required for viral egress downstream of the initial envelopment event. *J. Virol.* **74**:6287-6299.

Mulder, W.A.; Jacobs, L.; Priem, J.; Kok, G.L.; Wagenaar, F.; Kimman, T.G.; and Pol, J.M. (1994). Glycoprotein gE-negative pseudorabies virus has a reduced capability to infect second- and third-order neurons of the olfactory and trigeminal routes in the porcine central nervous system. *J. Gen. Virol.* **75**:3095-3106.

- Mulder, W.A.; Priem, J.; Pol, J.M.; and Kimman, T.G.** (1995). Role of viral proteins and concanavalin A in *in vitro* replication of pseudorabies virus in porcine peripheral blood mononuclear cells. *J. Gen. Virol.* **76**:1433-1442.
- Murtaugh, M.P.** (1994). Porcine cytokines. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **43**:37-44.
- Nakamura, T.; Ihara, T.; Nunoya, T.; Kuwahara, H.; Ishihama, A.; and Ueda, S.** (1993). Role of pseudorabies virus glycoprotein II in protection from lethal infection. *Vet. Microbiol.* **36**:83-90.
- Nash, A.A.; and Cambouropoulos, P.** (1993). The immune response to herpes simplex virus. *Virology* **4**:181-186.
- Nauwynck, H.J.** (1997). Functional aspects of Aujeszky's disease (pseudorabies) viral proteins with relation to invasion, virulence and immunogenicity. *Vet. Microbiol.* **55**:3-11.
- Newcomb, W.N.; Homa, F.L.; Thomsen, D.R.; Trus, B.L.; Cheng, N.; Steven, A.; Booy, F.; and Brown, J.C.** (1999). Assembly of herpes simplex virus procapsid from purified components and identification of small complexes containing the major capsid and scaffolding proteins. *J. Virol.* **73**:4239-4250.
- Nixdorf, R.; Schmid, J.; Karger, A.; and Mettenleiter, T.C.** (1999). Infection of Chinese hamster ovary cells by pseudorabies virus. *J. Virol.* **73**:8019-8026.
- Nixdorf, R.; Klupp, B.G.; Karger, A.; and Mettenleiter, T.C.** (2000). Effects of truncation of the carboxy terminus of pseudorabies virus glycoprotein B on infectivity. *J. Virol.* **74**:7137-7145.
- Nixdorf, R.; Klupp, B.G.; and Mettenleiter, T.C.** (2001a). Role of the cytoplasmic tails of pseudorabies virus glycoproteins B, E, and M in intracellular localization and virion incorporation. *J. Gen. Virol.* **82**:215-226.
- Nixdorf, R.; Klupp, B.G.; and Mettenleiter, T.C.** (2001b). Restoration of function of carboxy-terminally truncated pseudorabies virus glycoprotein B by point mutations in the ectodomain. *J. Virol.* **75**:11526-11533.
- Ober, B.** (1993). Kartierung von B- und T- Zellepitopen mittels synthetischer Peptide und Fusionsproteine des Glykoproteins gIII des Pseudorabies- (Suid Herpes 1) Virus. Diplomarbeit, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- Ober, B.T.; Summerfield, A.; Mattlinger, C.; Wiesmüller, K.H.; Jung, G.; Pfaff, E.; Saalmüller, A.; and Rziha, H.-J.** (1998). Vaccine-induced, pseudorabies virus-specific, extrathymic CD4⁺CD8⁺ memory T-helper cells in swine. *J. Virol.* **72**:4866-4873.

Ober, B.T.; Teufel, B.; Wiesmüller, K.H.; Jung, G.; Pfaff, E.; Saalmüller, A.; and Rziha, H.-J. (2000). The porcine humoral immune response against pseudorabies virus specifically targets attachment sites on glycoprotein gC. *J. Virol.* **74**:1752-1760.

O'Reilly, D.R.; Miller, L.K.; and Luckow, V.A. (1992). *Baculovirus expression vectors*. W.H. Freeman and Company, New York.

Peeters, B.; de Wind, N.; Hooisma, M.; Wagenaar, F.; Gielkens, A.; and Moormann, B. (1992a). Pseudorabies virus envelope glycoprotein gp50 and gII are essential for virus penetration, but only gII is involved in membrane fusion. *J. Virol.* **66**:894-905.

Peeters, B.; de Wind, N.; Hooisma, M.; Wagenaar, F.; Gielkens, A.; and Moormann, R. (1992b). Glycoprotein H of pseudorabies virus is essential for entry and cell-to-cell-spread of the virus. *J. Virol.* **66**:3888-3892.

Peeters, B.; Pol, J.; Gielkens, A.; and Moormann, R. (1993). Envelope glycoprotein-gp50 of pseudorabies virus is essential for virus entry but is not required for viral spread in mice. *Arch. Virol.* **131**:251-264.

Peeters, B.; Bouma, A.; de Bruin, T.; Moormann, R.; Gielkens, A.; and Kimman, T. (1994). Non-transmissible pseudorabies virus gp50 mutants: a new generation of safe live vaccines. *Vaccine* **12**:375-380.

Peeters, B.; Bienkowska-Szewczyk, K.; Hulst, M.; Gielkens, A.; and 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.

Pensaert, M.; Gielkens, A.L.J.; Lomniczi, B.; Kimman, T.G.; Vannier, P.; and Eloit, M. (1992). Round table on control of Aujeszky's disease and vaccine development based on molecular biology. *Vet. Microbiol.* **33**:53-67.

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

Petrovskis, E.A.; Timmins, J.G.; Armentrout, M.A.; Marchioli, C.C.; Yancey, R.J.; and Post, L.E. (1986a). DNA sequence of the gene for pseudorabiesvirus gp50, a glycoprotein without N-linked glycosylation. *J. Virol.* **59**:216-223.

Petrovskis, E.A.; Timmins, J.G.; and Post, L.E. (1986b). Use of lambda gt11 to isolate genes for two pseudorabies virus glycoproteins with homology to herpes simplex virus and varicella-zoster virus glycoproteins. *J. Virol.* **60**:185-193.

Porath, J. (1992). Immobilized metal ion affinity chromatography. *Prot. Express & Purif.* **3**:263-281.

- Priola, S.A.; and Stevens, J.G.** (1991). The 5' and 3' limits of transcription in the pseudorabies virus latency associated transcription unit. *Virology* **182**:852-856.
- Prud'homme, I.; Zhou, E.M.; Traykova, M.; Trotter, H.; Chan, M.; Afshar, A.; and Harding, M.J.** (1997). Production of a baculovirus-derived gp50 protein and utilisation in a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of pseudorabies virus. *Can. J. Vet. Res.* **61**: 286-291.
- Rall, G.F.; Kupersmidt, S.; Lu, Z.; Mettenleiter, T.C.; and Ben-Porat, T.** (1991). Low level inversion of the L component of pseudorabies virus is not dependent on sequence homology. *J. Virol.* **65**:7016-7019.
- Ramshaw, I.A.; Ramsay, A.J.; Karupiah, G.; Rolph, M.S.; Mahaligan, S.; and Ruby, J.C.** (1997). Cytokines and immunity to viral infections. *Immunol. Rev.* **159**:119-135.
- Rauh, I.; and Mettenleiter, T.C.** (1991). Pseudorabies virus glycoprotein gII and gp50 are essential for virus penetration. *J. Gen. Virol.* **70**:2541-2553.
- Rea, T.J.; Timmins, J.G.; Long, G.W.; and Post, L.E.** (1985). Mapping and sequence of the gene for the pseudorabies virus glycoprotein which accumulates in the medium of infected cells. *J. Virol.* **54**:21-29.
- Riviere, M.; Tartaglia, J.; Perkus, M.E.; Norton, E.K.; Bongermimo, C.M.; Lacoste, F.; Duret, C.; Desmettre, P.; and Paoletti, E.** (1992). Protection of mice and swine from pseudorabies virus conferred by vaccinia virus-based recombinants. *J. Virol.* **66**:3424-3434.
- Robbins, A.K.; Watson, R.J.; Whealy, M.E.; Hays, W.W.; and Enquist, L.W.** (1986). Characterization of a pseudorabies virus glycoprotein gene with homology to herpes simplex virus type 1 and type 2 glycoprotein C. *J. Virol.* **58**:339-347.
- Robbins, A.K.; Dorney, D.J.; Wathen, M.W.; Whealy, M.E.; Gold, C.; Watson, R.J.; Holland, L.E.; Weed, S.D.; Levine, M.; Glorioso, J.C.; and Enquist, L.W.** (1987). The pseudorabiesvirus gII gene is closely related to the gB glycoprotein gene of herpes simplex virus. *J. Virol.* **61**:2691-2701.
- Van Rooij, E.M.; Haagmans, B.L.; Glansbeck, H.L.; de Visser, Y.E.; de Bruin, M.G.; Boersma, W.; and Bianchi, A.T.** (2000). A DNA vaccine coding for glycoprotein B of pseudorabies virus induces cell-mediated immunity in pigs and reduces virus excretion early after infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **74**:121-136.
- Roizman, B.** (1996). Herpesviridae. *Fields Virology*, Third Edition, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia: 2221-2230.
- Roizman, B.; and Sears, A.** (1996). Herpes simplex viruses and their replication. *Fields Virology*, Third Edition. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia:2231-2295.

Romagnani, S. (1994). Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu. Rev. Immunol.* **12**:227-257.

Rossmann, M.G.; Bella, J.; Kolatkar, P.; He, Y.; Wimmer, E.; Kuhn, R.J.; and Baker, T.S. (2000). Cell recognition and entry by rhino- and enteroviruses. *Virology* **269**:239-247.

Rue, C.A.; and Ryan, P. (2002). Characterization of pseudorabies virus glycoprotein C attachment to heparan sulfate proteoglycans. *J. Gen. Virol.* **83**:301-309.

Rziha, H.-J.; Mettenleiter, T.C.; Ohlinger, V.; and Wittmann, G. (1986). Herpesvirus (pseudorabies virus) latency in swine: occurrence and physical state of viral DNA in neural tissues. *Virology* **155**:600-613.

Sabin, A.B. (1934). The immunological relationships of pseudorabies (infectious bulbar paralysis, mad itch). *Br. J. Exp. Pathol.* **15**:372-380.

Sabo, A.; and Grunert, S. (1971). Persistence of virulent pseudorabies virus in herds of vaccinated and non-vaccinated pigs. *Acta Virol.* **15**:87-94.

Sabo A.; and Rajcani, J. (1976). Latent pseudorabies virus infection in pigs. *Acta Virol.* **20**:208-214.

Sabo, A.; Rajcani, J.; and Blaskovic, D. (1969). Studies on the pathogenesis of Aujeszky's disease. III. The distribution of virulent virus in piglets after intranasal infection. *Acta Virol.* **13**:407-414.

Sachs, D.H.; Leight, G.; Cone, J.; Schwarz, S.; Stuart, L.; and Rosenberg, S. (1976). Transplantation in miniature swine. I. Fixation of the major histocompatibility complex. *Transplantation* **22**:559-567.

Sanger, F.; Nicklen, S.; and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**:5463-5467.

Scherba, G.; Gustafson, D.P.; Kanitz, C.L.; and Sun, I.L. (1978). Delayed hypersensitivity reaction to pseudorabies virus as a field diagnostic test in swine. *JAVMA* **173**:1490-1493.

Schijns, V.E., Haagmans, B.L.; and Horzinek, M.C. (1995). Il-12 stimulates an antiviral type 1 cytokine response but lacks adjuvant activity in IFN-gamma-receptor-deficient mice. *J. Immunol.* **155**:2525-2532.

Schmidt, J.; Klupp, B.G.; Karger, A.; and Mettenleiter, T.C. (1997). Adaptability in herpesviruses: glycoprotein D-independent infectivity of pseudorabies virus. *J. Virol.* **71**:17-24.

- Schmidt, J.; Gerds, V.; Beyer, J.; Klupp, B.G.; and Mettenleiter, T.C.** (2001). Glycoprotein D-independent infectivity of pseudorabies virus results in an alteration of *in vivo* host range and correlates with mutations in glycoprotein B and H. *J. Virol.* **75**:10054-10064.
- Schreurs, C.; Mettenleiter, T.C.; Zuckermann, F.; Sugg, N.; and Ben-Porat, T.** (1988). Glycoprotein gIII of pseudorabies virus ist multifunctional. *J. Virol.* **62**:2251-2257.
- Sin, J.I.; Kim, J.J.; Boyer, J.D.; Ciccarelli, R.B.; Higgins, T.J.; Weiner, D.B.** (1999). *In vivo* modulation of vaccine-induced immune responses toward a Th1 phenotype increases potency and vaccine effectiveness in a herpes simplex virus type 2 mouse model. *J. Virol.* **73**:501-509.
- Sinigaglia, F.; D'Ambrosio, D.; Panina-Bordignon, P.; and Rogge, L.** (1999). Regulation of the IL-12/IL-12R axis: a critical step in T-helper cell differentiation and effector function. *Immunol. Rev.* **170**:65-72.
- Skepper, J.N.; Whiteley, A.; Browne, H.; and Minson, A.** (2001). Herpes simplex virus nucleocapsids mature to progeny virions by an envelopment - deenvelopment - reenvelopment pathway. *J. Virol.* **75**:5697-5702.
- Smith, P.C.; and Mengeling, W.L.** (1977). A skin test for pseudorabies virus infection in swine. *Can. J. Comp. Med.* **41**:364-367.
- Somasundaram, C.; Takamatsu, H.; Andreoni, C.; Audonnet, J.C.; Fischer, L.; Lefevre, F.; and Charley, B.** (1999). Enhanced protective response and immunoadjuvant effects of porcine GM-CSF on DNA vaccination of pigs against Aujeszky's disease virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **70**:277-287.
- Spear, P.G.** (1993). Entry of alphaherpesviruses into cells. *Sem. Virol.* **4**:167-180.
- Spear, P.G.; Eisenberg, R.J.; and Cohen, G.H.** (2000). Three classes of cell surface receptors for alphaherpesvirus entry. *Virology* **275**:1-8.
- Strebel, K.; Beck, E.; Strohmaier, K.; and Schaller, H.** (1986). Characterization of foot-and-mouth disease virus gene products with antisera against bacterially synthesized fusion proteins. *J. Virol.* **57**:983-991.
- Stryndaka, N.; Redmond, M.; Parker, J.M.R.; Scraba, D.G.; and Hodges, R.** (1988). Use of synthetic peptides to map the antigenic determinants of glycoprotein D of herpes simplex virus. *J. Virol.* **62**:3474-3483.
- Stüber, D.; Matile, H.; and Garotta, G.** (1990). System for high-level purification in *Escherichia coli* and rapid purification of recombinant proteins: application to epitope mapping, preparation of antibodies, and structure-function analysis. In: *Immunological Methods*, Lefkovits, I. and Pernis, B. eds. Vol. IV, Academic Press, New York, pp. 121-152.

- Summerfield, A.; Rziha, H.-J.; and Saalmüller, A.** (1996). Functional characterization of porcine CD4⁺CD8⁺ extrathymic T lymphocytes. *Cell. Immunol.* **168**:291-296.
- Swain, S.L.; Croft, M.; Dubey, C.; Hayes, L.; Rogers, P.; Zhang, X.; and Bradley, L.M.** (1996). From naive to memory T cells. *Immunol. Rev.* **150**:143-167.
- Tang, D.; de Vit, M.; and Johnston, S.A.** (1992). Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* **356**:152-154.
- Tatarov, G.** (1968). Apathogener Mutant des Aujeszky-Virus, induziert von 5-Jodo-2-Deoxyuridin (JUDR). *Zentralbl. Veterinärmed.* **15B**:847-853.
- Tessier, D.C.; Thomas, D.Y.; Khouri, H.E.; Laliberté, F.; and Vetnet, T.** (1991). Enhanced secretion from insect cells of a foreign protein fused to the honeybee melittin signal peptide. *Gene* **98**:177-183.
- Teufel, B.** (1994). Einsatz synthetischer Peptide zur Identifizierung und Feinkartierung von B- und T-Zellepitopen zweier Glykoproteine des Pseudorabiesvirus. Diplomarbeit, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- Thawley, D.G.; Solorzano, R.F.; and Johnson, M.E.** (1984). Confirmation of pseudorabies virus infection, using virus recrudescence by dexamethasone treatment and *in vitro* lymphocyte stimulation. *Am. J. Vet. Res.* **45**:981-983.
- Thiery, R.; Pannetier, C.; Rziha, H.-J.; and Jestin, A.** (1996). A fluorescence-based quantitative PCR method for investigation of pseudorabies virus latency. *J. Virol. Methods* **61**:79-87.
- Thomsen, D.R.; Marchioli, C.C.; Yancey, R.J., Jr.; and Post, L.E.** (1987). Replication and virulence of pseudorabies virus mutants lacking glycoprotein gX. *J. Virol.* **61**:229-232.
- Thomson, S.A.; Elliott, S.L.; Sherritt, M.A.; Sproat, K.W.; Coupar, B.E.; Scalzo, A.A.; Forbes, C.A.; Ladhams, A.M.; Mo, X.Y.; Tripp, R.A.; Doherty, P.C.; Moss, D.J.; and Suhrbier, A.** (1996). Recombinant polypeptide vaccines for the delivery of multiple CD8 cytotoxic T cell epitopes. *J. Immunol.* **157**:822-826.
- Tikoo, S.K.; Campos, M.; Popowych, Y.I.; van Drunen Littel-van den Hurk, S.; and Babiuk, L.A.** (1995). Lymphocyte proliferative responses to recombinant bovine herpes virus type 1 (BHV-1) glycoprotein gD (gIV) in immune cattle: identification of a T cell epitope. *Viral Immunol.* **8**:19-25.
- Tirabassi, R.S.; and Enquist, L.W.** (2000). Role of the pseudorabies virus gI cytoplasmic domain in neuroinvasion, virulence, and posttranslational N-linked glycosylation. *J. Virol.* **74**:3505-3516.

- Tirabassi, R.S.; Townley, R.A.; Eldridge, M.G.; and Enquist, L.W.** (1997). Characterization of pseudorabies virus mutants expressing carboxy-terminal truncations of gE: evidence for envelope incorporation, virulence, and neurotropism domains. *J. Virol.* **71**:6455-6464.
- Todd, D.; Hull, J.; and McNair, J.** (1987). Antigenically important proteins Aujeszky's disease (pseudorabies) virus identified by immunoblotting. *Arch. Virol.* **96**:215-224.
- Torrisi, M.; Di Lazzaro, C.; Pavan, A.; Pereira, L.; and Campadelli-Fiume, G.** (1992). Herpes simplex virus envelopment and maturation studied by fracture label. *J. Virol.* **66**:554-561.
- Tsuda, T., Yamada, S.; Murakami, Y.; and Sugimura, T.** (1991). Characterization of complement-independent neutralizing epitopes on pseudorabies virus glycoprotein gp50. *J. Vet. Med. Sci.* **53**:533-535.
- Tsuda, T.; Onodera, T.; Sugimura, T.; and Murakami, Y.** (1992). Induction of protective immunity and neutralizing antibodies to pseudorabies virus by immunization of anti-idiotypic antibodies. *Arch. Virol.* **124**:291-300.
- Ulmer, J.B.; Donnelly, J.J.; Parker, S.E.; Rhodes, G.H.; Felgner, P.L.; Dwarki, V.J.; Gromkowski, S.H.; Deck, R.R.; Dewitt, C.M.; Friedman, A.; Hawe, L.A.; Leander, K.R.; Martinez, D.; Perry, H.C.; Shiver, J.W.; Montgomery, D.L.; and Liu, M.A.** (1993). Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* **259**:1745-1749.
- Vaiman, M.; Renard, C.; la Frage, P.; Ameteau, J.; and Nizza, P.** (1970). Evidence for a histocompatibility system in swine (SL-A). *Transplantation* **10**:155-164.
- Vaiman, M.; Chardon, P.; and Rothschild, M.F.** (1998). Porcine major histocompatibility complex. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* **17**:95-107.
- Van Oirschot, J.T.; and Gielkens, A.L.J.** (1984). Intranasal vaccination of pigs against pseudorabies virus: absence of vaccinal virus latency and failure to prevent latency of virulent virus. *Am. J. Vet. Res.* **45**:2099-2103.
- Van Oirschot, J.T.; Quint, W.G.V.; Gielkens, A.L.J.; De Leeuw, P.W.; and Berns, A.J.M.** (1984). On the immunity induced in pigs by conventional vaccines and deletion mutants of Aujeszky's disease virus. CEC seminar on immunity to herpesvirus infections of domestic animals, 4-5 December, Brussels:281-290.
- Van Oirschot, J.T.; Gielkens, A.L.J.; Moorman, R.J.M.; and Berns, A.J.M.** (1990). Marker vaccines, virus protein-specific antibody assays and the control of Aujeszky's disease. *Vet. Microbiol.* **23**:85-101.
- Van Oirschot, J.T.; Kaashoek, M.J.; Rijsewijk, F.A.; and Stegeman, J.A.** (1996). The use of marker vaccines in eradication of herpesviruses. *J. Biotechnol.* **44**:75-81.

Van Rooij, E.M.A.; Haagmans, B.L.; Glansbeek, H.L.; de Visser, Y.E.; de Bruin, M.G.M.; Boersma, W.; and Bianchi, A.T.J. (2000). A DNA vaccine coding for glycoprotein B of pseudorabies virus induces cell-mediated immunity in pigs and reduces virus excretion early after infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **74**:121-136.

Van Zijl, M.; Wensvoort, G.; de Kluyver, E.; Hulst, M.; van der Gulden, H.; Gielkens, A.; Berns, A.; and 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.

Vezina, S.A.; Roberge, D.; Fournier, M.; Dea, S.; Oth, D.; and Archambault, D. (1995). Cloning of porcine cytokine-specific cDNAs and detection of porcine tumor necrosis factor alpha, interleukin 6 (IL-6), and IL-1 beta gene expression by reverse transcription PCR and chemiluminescence hybridization. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **2**:665-671.

Visser, N.; and Lütticken, D. (1989). Experiences with a gI/TK-modified live pseudorabies virus vaccine: strain Begonia. In: Van Oirschot, J.T. (Editor). *Proceedings of the CEC Seminar on Vaccination and Control of Aujeszky's disease*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht:37-44.

Viza, D.; Sugar, J.R.; and Binns, R.M. (1970). Lymphocyte stimulation in pigs: evidence for the existence of a single major histocompatibility locus PL-A. *Nature* **227**:949-950.

Warner, M.S.; Geraghty, R.J.; Martinez, W.; Montgomery, R.; Whitbeck, J.C.; Xu, R.; Eisenberg, R.; Cohen, G.; and Spear, P.G. (1998). A cell surface protein with herpesvirus entry activity (HvE) confers susceptibility to infection by mutants of herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2, and pseudorabies virus. *Virology* **246**:179-189.

Watari, E.; Dietzschold, B.; Szokan, G.; and Heber-Katz, E. (1987). A synthetic peptide induces long-term protection from lethal infection with herpes simplex virus type 2. *J. Exp. Med.* **165**: 459-470.

Wathen, M.W.; and Wathen, L.M.K. (1984). Isolation, characterization and physical mapping of a pseudorabies virus mutant containing antigenically altered gp50. *J. Virol.* **51**:57-62.

Wathen, L.M.K.; Platt, K.B.; Wathen, M.W.; van Deussen, R.A.; Whetstone, C.A.; and Pirtle, E.C. (1985). Production and characterization of monoclonal antibodies directed against pseudorabies virus. *Virus Res.* **4**:19-29.

Watson, J. (1979). Continuous proliferation of murine antigen-specific helper T lymphocytes in culture. *J. Exp. Med.* **150**:1510-1519.

- Weber, P.C.; Levine, M.; and Glorioso J.C.** (1987). Rapid identification of nonessential genes of herpes simplex virus type 1 by Tn5 mutagenesis. *Science*. **236**:576-579.
- Weijer, W.J.; Drijfhout, J.W.; Geerligs, H.J.; Bloemhoff, W.; Feijlbrief, M; Bos, C.A.; Hoogerhout, P.; Kerling, K.E.T.; Popken-Boer, T.; Slopsema, K.; Wilterdink, J.B.; Welling, G.W.; and Welling-Wester, S.** (1988). Antibodies against synthetic peptides of herpes simplex virus type 1 glycoprotein D and their capability to neutralize viral infectivity *in vitro*. *J. Virol.* **62**:501-510.
- Weiner, A.J.; Geysen, H.M.; Christopherson, C.; Hall, J.E.; Mason, T.J.; Saracco, G.; Bonino, F.; Crawford, K.; Marion, C.D.; Crawford, K.A.; Brunetto, M.; Barr, P.J.; Miyamura, T.; McHutchinson, J.; and Houghton, M.** (1992). Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:3468-3472.
- Welling-Wester, S.; Scheffer, A.J.; and Welling, G.W.** (1991). B and T cell epitopes of glycoprotein D of herpes simplex virus type 1. *FEMS Microbiol. Immunol.* **76**:59-68.
- Whealy, M.E.; Robbins, A.K.; and Enquist, L.W.** (1988). Pseudorabies glycoprotein III is required for efficient virus growth in tissue culture. *J. Virol.* **62**:2512-2512.
- Whealy, M.E.; Robbins, A.K.; and Enquist, L.W.** (1990). The export pathway of the pseudorabiesvirus gB homolog gII involves oligomer formation in the endoplasmic reticulum and protease processing in the golgi apparatus. *J. Virol.* **64**:1946-1955.
- Whealy, M.E.; Card, J.P.; Meade, R.P.; Robbins, A.K.; and Enquist, L.W.** (1991). Effect of brefeldin A on alphaherpesvirus membrane protein glycosylation and virus egress. *J. Virol.* **65**:1066-1081.
- Whealy, M.E.; Card, J.P.; Robbins, A.K.; Dubin, J.R.; Rziha, H.-J.; and Enquist, L.W.** (1993). Specific pseudorabies virus infection of the rat visual system requires both gI and gp63 glycoproteins. *J. Virol.* **67**:3786-3797.
- Whitbeck, J.C.; Peng, C.; Lou, H.; Xu, R.; Willis, S.H.; Ponce de Leon, M.; Peng, T.; Nicola, A.V.; Montgomery, R.I.; Warner, M.S.; Soulika, A.M.; Spruce, L.A.; Moore, W.T.; Lambris, J.D.; Spear, P.G.; Cohen, G.H.; and Eisenberg, R.J.** (1997). Glycoprotein D of herpes simplex virus (HSV) binds directly to HVEM, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily and a mediator of HSV entry. *J. Virol.* **71**:6083-6093.
- Wittmann, G.; Bartenbach, G.; and Jakubik, J.** (1976). Cell-mediated immunity in Aujeszky's disease virus-infected pigs. 1. Lymphocyte stimulation. *Arch. Virol.* **50**:215-222.

- Wittmann, G.; Ohlinger, V.F.; and Rziha, H.-J.** (1983). Occurrence and reactivation of latent Aujeszky's disease virus following challenge in previously vaccinated pigs. *Arch. Virol.* **75**:29-41.
- Wittmann, G.; Leitzke, I.; and Hohn, U.** (1985a). Cell-mediated cytotoxicity and lymphocyte stimulation with Aujeszky's disease. I. In experimentally infected pigs. *Zentralbl. Veterinaermed. Reihe B* **32**:101-105.
- Wittmann, G.; Leitzke, I.; and Hohn, U.** (1985b). Cell-mediated cytotoxicity stimulation with Aujeszky's disease. II. After vaccination of pigs followed by infection. *Zentralbl. Veterinaermed. Reihe B* **32**:181-191.
- Wittmann, G.; and Rziha, H.-J.** (1989). Aujeszky's disease (pseudorabies) in pigs. In: Wittmann G., eds. *Herpesvirus disease of cattle, horses and pigs*. Boston, MA: Kluwer Academic Publishers:230-325.
- Wölfer, U.; Kruft, V.; Sawitzky, D.; Hampl, H.; Wittmann-Liebold, B.; and Habermehl, K.O.** (1990). Processing of pseudorabiesvirus glycoprotein gII. *J. Virol.* **64**:3122-3125.
- Wu, C.A.; Harper, L.; and Ben-Porat, T.** (1986). Cis functions involved in replication and cleavage-encapsidation of pseudorabies virus. *J. Virol.* **59**:318-327.
- Wyckoff, J.H., Osmand, A.P.; Eisenberg, J.; Cohen, G.H.; and Rouse, B.T.** (1988). Functional T cell recognition of synthetic peptides corresponding to continuous antibody epitopes of herpes simplex virus type 1 glycoprotein D. *Immunobiology* **177**:134-148.
- Xuan, X.; Nakamura, T.; Ihara, T.; Sato, I.; Tuchiya, K.; Nosetto, E.; Ishihama, A.; and Ueda, S.** (1995). Characterization of pseudorabies virus glycoprotein gII expressed by recombinant baculovirus. *Virus Res.* **36**:151-161.
- Yamashita, K.; and Heber-Katz, E.** (1989). Lack of immunodominance in the T cell response to herpes simplex virus glycoprotein D after administration of infectious virus. *J. Exp. Med.* **170**:997-1002.
- Zaripov, M.M.; Morenkov, O.S.; Fodor, N.; Brown, A.; Schmatchenko, V.V.; and Fodor, I.** (1999). Distribution of B-cell epitopes on the pseudorabies virus glycoprotein B. *J. Gen. Virol.*:537-541.
- Zhang, G.; Stevens, R.; and Leader, D.P.** (1990). The protein kinase encoded in the short unique region of pseudorabies virus: description of the gene and identification of its product in virions and in infected cells. *J. Gen. Virol.* **71**:1757-1765.
- Zhu, Z.; Gershon, M.D.; Hao, Y.; Ambron, R.T.; Gabel, C.A.; and Gershon, A.A.** (1995). Envelopment of varicella zoster virus: targeting of viral glycoproteins to the trans-Golgi-network. *J. Virol.* **69**:7951-7959.

Zinkernagel, R.M.; Bachmann, M.F.; Kundig, T.M., Oehen, S.; Pirchet, H.; and Hengartner, O.H. (1996). On immunological memory. *Annu. Rev. Immunol.* **14**:333-267.

Zsak, L.; Mettenleiter, T.C.; Sugg, N.; and Ben-Porat, T. (1989). Release of pseudorabies virus from infected cells is controlled by several viral functions and is modulated by cellular components. *J. Virol.* **63**:5475-5477.

Zsak, L.; Zuckermann, F.; Sugg, N.; and Ben-Porat, T. (1992). Glycoprotein gI of pseudorabies virus promotes cell fusion and virus spread via direct cell-to-cell transmission. *J. Virol.* **66**:2316-2325.

Zuckermann, F.A.; Mettenleiter, T.C.; Schreurs, C.; Sugg, N.; and Ben-Porat, T. (1988). Complex between glycoprotein I and gp63 of pseudorabies virus: its effect on virus replication. *J. Virol.* **62**:4622-4626.

Zuckermann, F.A., Zsak, L.; Sugg, N.; and Ben-Porat, T. (1989). Early interactions of pseudorabies virus with host cells: functions of glycoprotein gIII. *J. Virol.* **63**:3323-2229.

Zuckermann, F.A.; Zsak, L.; Mettenleiter, T.C.; and Ben-Porat, T. (1990). Pseudorabies virus glycoprotein gIII is a major target antigen for murine and swine virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *J. Virol.* **64**:802-812.

Zuckermann, F.A.; and Husmann R.J. (1996). Functional and phenotypic analysis of porcine peripheral blood CD4/CD8 double positive T cells. *Immunology* **87**:500-512.

Zuckermann, F.A.; Husmann, R.J.; Schwartz, R.; Brandt, J.; Mateu de Antonio, E.; and Martin, S. (1998). Interleukin-12 enhances the virus-specific interferon gamma response of pigs to an inactivated pseudorabies virus vaccine. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **63**:57-67.

Zuckermann, F.A. (1999). Extrathymic CD4/CD8 double positive cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **72**:55-66.

Zuckermann, F.A.; Martin, S.; Husmann, R.J.; and Brandt, J. (1999). Use of interleukin 12 to enhance the cellular immune response of swine to an inactivated herpesvirus vaccine. *Adv. Vet. Med.* **41**:447-61.

9 Anhang

Synthetisierte Peptidamide

gD-Peptide

gD-Peptid-Nr.	gD-AS	Sequenz
1	1-15	MLLAALLAALVARTT
2	6-20	LLAALVARTTLGADV
3	11-25	VARTTLGADVDAVPA
4	16-30	LGADVDAVPAPTFPP
5	21-35	DAVPAPTFPPPAYPY
6	26-40	PTFPPPAYPYTESWQ
7	31-45	PAYPYTESWQLTLTT
8	36-50	TESWQLTLTTVPSPF
9	41-55	LTLTTVPSPFVGPAD
10	46-60	VPSPFVGPADVYHTR
11	51-65	VGPADVYHTRPLEDP
12	56-70	VYHTRPLEDPCGVVA
13	61-75	PLEDPCGVVALISDP
14	66-80	CGVVALISDPQVDRL
15	71-85	LISDPQVDRLLEAV
16	76-90	QVDRLLEAVAHRRP
17	81-95	LNEAVAHRRPTYRAH
18	86-100	AHRRPTYRAHVAVWR
19	91-105	TYRAHVAVYRIADGC
20	96-110	VAVYRIADGCAHLLY
21	101-115	IADGCAHLLYFIEYA
22	106-120	AHLLYFIEYADC DPR
23	111-125	FIEYADC DPRQVFGR
24	116-130	DC DPRQVFGR CRRRT
25	121-135	QVFGR CRRRTTPMWW
26	126-140	CRRRTTPMWWTPSAD

27	131-145	TPMWWTPSADYMFPT
28	136-150	TPSADYMFPTTEDELG
29	141-155	YMFPTTEDELGLLMVA
30	146-160	EDELGLLMVAPGRFN
31	151-165	LLMVAPGRFNEGQYR
32	156-170	PGRFNEGQYRRLVSV
33	161-175	EGQYRRLVSV DGVNI
34	166-180	RLVSV DGVNILTDFM
35	171-185	DGVNILTDFMVALPE
36	176-190	LTDFMVALPEGQECF
37	181-195	VALPEGQECPFARVD
38	186-200	GQECPFARVDQHRTY
39	191-205	FARVDQHRTYKFGAC
40	196-210	QHRTYKFGACWSDDS
41	201-215	KFGACWSDDSFKRGV
42	206-220	WSDDSFKRGVDVMRF
43	211-225	FKRGVDVMRFLTPFY
44	216-230	DVMRFLTPFYQQPPH
45	221-235	LTPFYQQPPHREVVN
46	226-240	QQPPHREVVNYWYRK
47	231-245	REVVNYWYRKNRRTL
48	236-250	YWYRKNRRTL PRAHA
49	241-255	NRRTL PRAHAAATPY
50	246-260	PRAHAAATPYAIDPA
51	251-265	AATPYAIDPARPSAG
52	256-270	AIDPARPSAGSPRPR
53	261-275	RPSAGSPRPRPRPRP
54	266-280	SPRPRPRPRPRPRPK
55	271-285	PRPRPRPRPKPEPAP
56	276-290	RPRPKPEPAPATPAP
57	281-295	PEPAPATPAPPDRLP
58	286-300	ATPAPPDRLPEPATR

59	291-305	P D R L P E P A T R D H A A G
60	296-310	E P A T R D H A A G G R P T P
61	301-315	D H A A G G R P T P R P P R P
62	306-320	G R P T P R P P R P E T P H R
63	311-325	R P P R P E T P H R P F A P P
64	316-330	E T P H R P F A P P A V V P S
65	321-335	P F A P P A V V P S G W P Q P
66	326-340	A V V P S G W P Q P A E P F Q
67	331-345	G W P Q P A E P F Q P R T P A
68	336-350	A E P F Q P R T P A A P G V S
69	341-355	P R T P A A P G V S R H R S V
70	346-360	A P G V S R H R S V I V G T G
71	351-365	R H R S V I V G T G T A M G A
72	356-370	I V G T G T A M G A L L V G V
73	361-375	T A M G A L L V G V C V Y I F
74	366-380	L L V G V C V Y I F F R L R G
75	371-385	C V Y I F F R L R G A K G Y R
76	376-390	F R L R G A K G Y R L L G G P
77	381-395	A K G Y R L L G G P A D A D E
78	386-400	L L G G P A D A D E L K A Q P
79	391-402	A D A D E L K A Q P G P *

gB-Peptide

gB-Peptid-Nr.	gB-AS	Sequenz
17	341-355	D S R L R A S E S V T R N R L
39	451-465	P E V Y L A R G G F V V A F R

gC-Peptide

gC-Peptid-Nr.	gC-AS	Sequenz
14	65-79	S T P P V P P P S V S R R K P
50	245-259	P V L F G E P F R A V C V V R
72	355-369	S V R F V E G F A V C D G L C

Impressum:

Im Selbstverlag herausgegeben von:

Christina Mattlinger

ISBN 3-00-013434-4