

# Inhaltsverzeichnis

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

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

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

<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>172</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>173</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>174</b>
<b>PUBLIKATIONSVERZEICHNIS.....</b>	<b>183</b>
<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>184</b>
<b>SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....</b>	<b>185</b>