

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	5
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	9
ZUSAMMENFASSUNG	14
SUMMARY	16
1.0 Einleitung	19
1.1 Pestiviren.....	19
1.1.1 Morphologie und Genomaufbau	20
1.1.2 Das Nichtstrukturprotein N ^{pro}	22
1.1.3 Das Glycoprotein E ^{ns}	23
1.1.4 Das Glycoprotein E2	24
1.2 Die klassische Schweinepest.....	25
1.3 „Persistenz“ durch Immunevasion	26
1.4 Zielsetzung der Arbeit	27
2.0 Material und Methoden	28
2.1 Material.....	28
2.1.1 Geräte	28
2.1.2 Chemikalien	30
2.1.3 Medien, Lösungen und Puffer.....	32
2.1.4 Biologische Materialien	35
2.1.4.1 Enzyme	35
2.1.4.2 Bakterien	35
2.1.4.3 Antikörper	35
2.1.5 Oligonukleotide	36
2.1.6 Plasmide	38
2.1.6.1 bereits im Labor vorhandene oder kommerziell erworbene Plasmide	38
2.1.6.2 selbst generierte Plasmide	39
2.1.7 vorgefertigte Komplettsysteme	40
2.1.8 Zelllinien	41
2.1.9 Viren der Klassischen Schweinepest (CSFV)	41
2.1.9.1 CSF Wildtyp-Viren	41
2.1.9.2 rekombinante CSFV-Mutanten	41
2.1.9.3 Versuchstiere	42
2.1.9.3.1 FLI Tübingen	42
2.1.9.3.2 FLI Insel Riems	42
2.1.10 Medikamente	42
2.1.11 Verbrauchsmaterial	42
2.1.12 Verwendete Software	43
2.2 Methoden	44
2.2.1 Methoden für die Herstellung neuer Virusmutanten	44
2.2.1.1 Polymerase Kettenreaktion	44
2.2.1.1.1 Standard-PCR	44
2.2.1.1.2 Quik Change®-PCR	45
2.2.1.2 Agarosegelektrophorese	46
2.2.1.3 Aufreinigung von DNA-Fragmenten mittels Agarosegelektrophorese	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-Agarosegelektrophorese.....	54
2.2.1.16	Elektroporation	54
2.2.2	Methoden für die Charakterisierung von Viren	55
2.2.2.1	Kultivierung von Zellen.....	55
2.2.2.2	Infektion von Zellen	55
2.2.2.3	Titration von Viren und Titerberechnung.....	56
2.2.2.4	Wachstumskurven.....	57
2.2.2.5	Extraktion viraler RNA aus infizierten Zellen.....	57
2.2.2.6	Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR).....	57
2.2.3	Methoden für die Durchführung von Tierversuchen	59
2.2.3.1	Vakzination und Infektion.....	59
2.2.3.2	Rücktitration von Vakzineviren.....	59
2.2.3.3	Determination der Klinischen Punktzahl	60
2.2.3.4	Körpertemperaturmessung	61
2.2.3.5	Blutentnahme	62
2.2.3.6	Euthanasie	63
2.2.3.7	Entnahme von Organproben.....	63
2.2.4	Methoden für die Analyse von Proben aus Tierversuchen	63
2.2.4.1	Leukozytenzählung	63
2.2.4.2	Präparation von Leukozytenkonzentrat	65
2.2.4.3	Aufarbeitung von Organproben.....	65
2.2.4.4	Virusanzucht aus Probenmaterial in Zellkultur	65
2.2.4.5	Serumneutralisationstest.....	66
2.2.4.6	Konventionelle indirekte Immunfluoreszenz	67
2.2.4.7	Indirekte Immunfluoreszenz mittels Zeiss Axiovert 200M mit ApoTome®	68
3.0	Ergebnisse	69
3.1	CSFV Doppelmutante	69
3.1.1	Grundlagen	69
3.1.2	Sicherheitsstudie mit tragenden Sauen (TV#30).....	70
3.1.2.1	Charakterisierung der in TV#30 eingesetzten Viren	71
3.1.2.2	Auswahl und Bezeichnung der Tiere	71
3.1.2.3	Zeitplan.....	72
3.1.2.4	Infektion und Titration der Viren für Vakzination und Belastungsinfektion	73
3.1.2.5	Körpertemperatur und klinisches Bild der Muttertiere	74
3.1.2.6	Serologische Untersuchung (SNT)	75
3.1.2.7	Postmortale Untersuchung der Feten	76
3.1.2.8	Virusanzucht aus fetalen Organen	78
3.1.2.9	Zusammenfassung Sicherheitsstudie (TV#30).....	80
3.2	CSFV DIVA-Vakzine-Mutanten	81
3.2.1	TAV-Epitop-Basismutanten	81
3.2.1.1	Markierungskonzept.....	81
3.2.1.2	Konstruktion der benötigten Plasmide	82
3.2.1.3	Herstellung der TAV-Epitop Basismutanten	84
3.2.1.4	Prüfung des Markierungskonzeptes	84
3.2.1.4.1	Sequenzierung	84
3.2.1.4.2	Indirekte Immunfluoreszenz	85
3.2.1.5	Wachstumseigenschaften der TAV-Epitop Basismutanten	87
3.2.2	TAV-Epitop DIVA-Vakzine Kandidaten.....	87
3.2.2.1	TAV-Epitop-Kombinationsmutanten.....	88

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

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