

Inhaltsverzeichnis

1	<u>Einleitung</u>	1
2	<u>Literaturübersicht</u>	2
2.1	Newcastle Krankheit	2
2.1.1	Aviäre Paramyxoviren (APMV)	2
2.1.2	Newcastle Disease Virus (NDV)	7
2.1.3	Das revers-genetische System	10
2.2	Aviäre Influenza	12
2.2.1	Aviäre Orthomyxoviren	12
2.2.2	Aviäre Influenzaviren (AIV)	18
2.3	AIV-Vakzinen	23
2.4	Ziele dieser Arbeit	28
3	<u>Material und Methoden</u>	29
3.1	Material	29
3.1.1	Versuchstiere und Eier	29
3.1.2	Virusstämme, rekombinante Viren	29
3.1.3	Zellen	30
3.1.4	Bakterien	30
3.1.5	Vektoren und rekombinante Plasmide	31
3.1.6	Antikörper, Antiseren	31
3.1.7	Medien und Lösungen für die Zellkultur	33
3.1.8	Medien und Lösungen für die Bakterienkultur	34
3.1.9	Sonstige Puffer und Lösungen	36
3.1.10	Reagenzien	42
3.1.10.1	Nukleinsäuren und Nukleotide	42
3.1.10.2	Aminosäuren und Proteine	44
3.1.10.3	Enzyme und deren Puffer	45
3.1.10.4	Kits	45
3.1.10.5	Chemikalien	46
3.1.11	Geräte, Laborhilfsmittel	49
3.1.12	Verbrauchsmaterial	50

3.2	Methoden.....	51
3.2.1	Zellkultur.....	51
3.2.1.1	Präparation von Primärzellen aus Hühnerembryonen.....	51
3.2.1.1.1	CEK-Zellen.....	51
3.2.1.1.2	CEF-Zellen.....	51
3.2.1.2	Vermehrung von permanenten Zelllinien.....	52
3.2.1.2.1	Vermehrung von LMH-Zellen.....	52
3.2.1.2.2	Vermehrung von QM9-Zellen.....	52
3.2.1.2.3	Vermehrung von BHK-21/BSR/T7/5-Zellen.....	52
3.2.1.3	Transfektion eukaryontischer Zellen.....	52
3.2.1.4	Transfektion zur Generierung rekombinanter ND-Viren.....	53
3.2.2	Virusvermehrung und -reinigung, -titerbestimmung.....	53
3.2.2.1	Virusvermehrung, Eikultur.....	53
3.2.2.2	Präparation von Virionen.....	54
3.2.2.3	Bestimmung des Virusgehaltes.....	54
3.2.2.3.1	Hämagglutinationstest.....	54
3.2.2.3.2	Zellkultur-infektiöse Dosis 50 (tissue culture infectious dose 50, TCID ₅₀).....	55
3.2.2.3.3	Berechnung der Infektionsdosis für Zellen (MOI).....	55
3.2.2.3.4	Ei-infektiöse Dosis 50 (egg infectious dose 50, EID ₅₀).....	56
3.2.2.4	Bestimmung des Proteingehaltes.....	56
3.2.2.5	Wachstumskinetik.....	56
3.2.3	Isolierung von Nukleinsäuren.....	57
3.2.3.1	Präparation von Gesamtzell-RNA.....	57
3.2.3.2	Präparation von viraler RNA.....	57
3.2.3.3	Anzucht und Präparation von Plasmid-DNA.....	57
3.2.3.3.1	Anzucht Plasmid-DNA tragender Bakterien.....	57
3.2.3.3.2	Präparation von Plasmid-DNA.....	58
3.2.3.4	Aufreinigung von DNA aus wässrigen Lösungen.....	58
3.2.3.5	Phenol / Chloroform-Extraktion.....	58
3.2.3.6	Alkohol-Fällung.....	59
3.2.3.7	Präparative Agarosegelelektrophorese.....	59
3.2.3.8	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration.....	60
3.2.4	Agarosegelelektrophorese und Membrantransfer von Nukleinsäuren.....	60
3.2.4.1	Neutrale Agarosegele (DNA-Gele).....	60

3.2.4.2	Formaldehyd-Gele (RNA-Gele)	60
3.2.4.3	Northern Blot-Analyse	61
3.2.5	Northern Blot-Hybridisierung	62
3.2.5.1	<i>in vitro</i> -Synthese radioaktiver cRNA	62
3.2.5.2	Reinigung der Sonden	62
3.2.5.3	Hybridisierung	62
3.2.6	Polymerasekettenreaktion (PCR)	63
3.2.7	Sequenzierung	65
3.2.8	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	66
3.2.9	Plasmidklonierung	67
3.2.9.1	Klenow-Behandlung	67
3.2.9.2	Phosphorylierung von PCR-Produkten	67
3.2.9.3	Dephosphorylierung der Vektor-DNA	67
3.2.9.4	Ligation	68
3.2.9.5	Herstellung kompetenter Bakterien	68
3.2.9.6	Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA	68
3.2.10	Auftrennung von Proteinen	69
3.2.10.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	69
3.2.11	Immunologische Nachweismethoden	69
3.2.11.1	Western Blot-Analyse	69
3.2.11.2	Immunfluoreszenztest	70
3.2.11.2.1	Infektion und Fixieren der Zellen	70
3.2.11.2.2	Indirekter Immunfluoreszenztest	70
3.2.11.3	Radioimmunpräzipitationsanalyse (RIP)	71
3.2.11.4	Immun-Elektronenmikroskopie	72
3.2.12	Fluorographie	72
3.2.13	<i>in vitro</i> -Translation	72
3.2.14	Durchführung der Tierversuche	73
3.2.14.1	Intracerebraler Pathogenitätsindex (ICPI)	73
3.2.14.2	Infektion der Versuchstiere	73
3.2.14.3	Klinische Bewertung der Versuchstiere	73
3.2.14.4	Serologische Untersuchung der Versuchstiere	76
3.2.14.4.1	Hämagglutinations-Hemmungstest	76
3.2.14.4.2	ELISA	77

3.2.14.5	Gewinnung von Tupferproben und Präparation viraler RNA	77
3.2.14.6	Nachweis viraler RNA mittels real-time RT-PCR	77
3.2.14.7	Tötung der Versuchstiere	80
3.2.15	Statistische Auswertung	80
4	<u>Ergebnisse</u>	81
4.1	Klonierung und Charakterisierung des H9 Hämagglutinin ORF des Stammes AIV A/turkey/Wisconsin/1/66 (H9N2)	81
4.2	Generierung und <i>in vitro</i>-Charakterisierung der NDV-H9 Rekombinante ...	86
4.3	<i>in vivo</i>-Charakterisierung der NDV-H9 Rekombinante	96
4.3.1	ICPI	96
4.3.2	Aufbau des Tierversuches im Huhn und in der Pute	96
4.3.3	Tierversuch im Huhn	97
4.3.4	Klinik nach Immunisierung	98
4.3.4.1	Untersuchung auf Antikörper gegen AIV	98
4.3.4.2	Untersuchung auf Antikörper gegen NDV	99
4.3.5	Klinik nach Belastungsinfektion mit AIV H9N2	100
4.3.5.1	Nachweis von Antikörpern gegen AIV	101
4.3.5.2	Nachweis der AIV-Virusausscheidung	102
4.3.5.3	Pathologische Befunde nach Belastungsinfektion mit AIV	104
4.3.6	Klinik nach Belastungsinfektion mit NDV	105
4.3.6.1	Nachweis von Antikörpern gegen NDV	105
4.3.6.2	Nachweis der NDV-Virusausscheidung	106
4.3.6.3	Pathologische Befunde nach Belastungsinfektion mit NDV	108
4.3.7	Ergebnisübersicht und Fazit	108
4.3.8	Tierversuch in der Pute	111
4.3.9	Klinik nach Immunisierung	111
4.3.9.1	Untersuchung auf Antikörper gegen AIV	112
4.3.9.2	Untersuchung auf Antikörper gegen NDV	113
4.3.10	Klinik nach Belastungsinfektion mit AIV H9N2	114
4.3.10.1	Untersuchung auf Antikörper gegen AIV	115
4.3.10.2	Nachweis der AIV-Virusausscheidung	116
4.3.10.3	Pathologische Befunde nach Belastungsinfektion mit AIV	118
4.3.11	Klinik nach Belastungsinfektion mit NDV	119
4.3.11.1	Nachweis von Antikörpern gegen NDV	120

4.3.11.2	Nachweis der NDV-Virusausscheidung	120
4.3.11.3	Pathologische Befunde nach Belastungsinfektion mit NDV	122
4.3.12	Ergebnisübersicht und Fazit	122
4.4	AIV-N1 exprimierende NDV-Rekombinante (NDV-N1)	124
4.5	Prüfung der Schutzwirkung der NDV-N1 Rekombinante gegen HPAIV.....	125
4.5.1	Aufbau des Tierversuches	126
4.5.2	Klinik nach Immunisierung	126
4.5.2.1	Nachweis von Antikörpern gegen AIV	127
4.5.2.2	Nachweis von Antikörpern gegen NDV	127
4.5.3	Klinik nach Belastungsinfektion mit AIV H5N1	128
4.5.3.1	Untersuchung auf Antikörper gegen AIV	128
4.5.3.2	Nachweis der AIV-Virusausscheidung.....	129
4.5.3.3	Pathologische Befunde.....	129
4.5.4	Ergebnisübersicht und Fazit	130
4.6	AIV H5, AIV H5LP oder AIV H5 und N1 exprimierende NDV-Rekombinanten (NDV-H5, NDV-H5LP und NDV-H5N1)	131
4.7	Prüfung der Schutzwirkung der NDV-H5LP-, der NDV-H5- und der NDV-H5N1 Rekombinante gegen HPAIV	133
4.7.1	Aufbau des Tierversuches im Huhn.....	133
4.7.2	Klinik nach Immunisierung.....	134
4.7.2.1	Nachweis von Antikörpern gegen AIV	135
4.7.2.2	Nachweis von Antikörpern gegen NDV	136
4.7.3	Belastungsinfektion mit HPAIV H5N1 (homolog).....	137
4.7.3.1	Klinik nach Belastungsinfektion	137
4.7.3.2	Nachweis von Antikörpern gegen AIV	138
4.7.3.3	Nachweis der AIV-Virusausscheidung.....	139
4.7.3.4	Pathologische Befunde.....	141
4.7.4	Belastungsinfektion mit HPAIV H5N1 (heterolog)	141
4.7.4.1	Klinik nach Belastungsinfektion	141
4.7.4.2	Nachweis von Antikörpern gegen AIV	142
4.7.4.3	Nachweis der AIV-Virusausscheidung.....	143
4.7.4.4	Pathologische Befunde.....	145
4.7.5	Belastungsinfektion mit HPAIV H5N2 (heterolog)	146
4.7.5.1	Klinik nach Belastungsinfektion	146
4.7.5.2	Nachweis von Antikörpern gegen AIV	147

4.7.5.3	Nachweis der AIV-Virusausscheidung.....	148
4.7.5.4	Pathologische Befunde.....	150
4.7.6	Auswertung (Fazit).....	150
5	<u>Diskussion</u>	154
6	<u>Zusammenfassung</u>	164
7	<u>Summary</u>	166
8	<u>Abbildungsverzeichnis</u>	168
9	<u>Tabellenverzeichnis</u>	171
10	<u>Abkürzungsverzeichnis</u>	172
11	<u>Literaturverzeichnis</u>	175