

Aus der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere,
Standort Tübingen
und dem
Institut für Virologie des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Charakterisierung eines Borna Disease
Virus-spezifischen T-Zell-Epitops der
Lewis Ratte und Einsatz dieses Epitops in
Immunisierungsexperimenten

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Silke Stamer

Gießen 2002

Aus der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere,
Standort Tübingen und dem
Institut für Virologie des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. L. Stitz

Charakterisierung eines Borna Disease Virus-spezifischen
T-Zell-Epitops der Lewis Ratte und Einsatz dieses Epitops in
Immunisierungsexperimenten

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Silke Stamer, geb. Hülpmusch
Tierärztin aus Böblingen

Gießen 2002

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. B. Hoffmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. L. Stitz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. F. Kaleta

Tag der mündlichen Prüfung: 22.03.2002

Diese Arbeit wurde durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft
finanziert: PI 256/1-1

Teile dieser Arbeit wurden vorab publiziert in:
J. Biol. Chem. 276: 17; Planz et al., 2001

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	V
1. EINLEITUNG	1
2. FRAGESTELLUNG	14
3. MATERIAL	15
3.1 Zelllinien	15
3.2 Virus	15
3.2.1 Virus der Bornaschen Krankheit (BDV)	15
3.2.2 Vaccinia Virus (VV)	15
3.3 Versuchstiere	16
3.4 Peptide	16
3.5 Nukleinsäuren	17
3.5.1 Plasmide	17
3.5.2 Oligonukleotide	17
3.5.2.1 BDV p40-spezifische Primer	17
3.5.2.2 Weitere Primer	18
3.5.3 Weitere Nukleinsäuren	18
3.6 Bakterien	18
3.6.1 Kompetente Bakterien	18
3.6.2 Weitere Bakterien	18
3.7 Enzyme und Kits	19
3.7.1 Enzyme	19
3.7.2 Kits	19
3.8 Antikörper, Seren, Konjugate	20
3.9 Medien	20
3.9.1 Medienzusätze	22
3.10 Lösungen und Puffer	23
3.10.1 Zellkultur	24
3.10.2 Aufreinigung von Immunglobulinen	24
3.10.3 Isolierung von Gehirnlymphozyten	24
3.10.4 Aufreinigung rekombinanter Proteine	25
3.10.5 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese und Western Blot-Analyse	25
3.10.6 Durchflusszytometrie	26
3.10.7 Plasmidisolierung	27
3.10.8 Sequenzierung	27
3.10.9 Färbung BDV-infizierter Zellen	28
3.10.10 Vaccinia Plaque-Assay	28
3.11 Chemikalien	28
3.12 Radiochemikalien	31
3.13 Verbrauchsmaterial	31
3.14 Geräte und Laborhilfsmittel	31

Inhaltsverzeichnis

3.14.1	Zentrifugen	31
3.14.2	Rotoren	32
3.14.3	Weitere Geräte	32
4.	METHODEN	33
4.1	Zellkultur	33
4.1.1	Kultivierung von Zellen	33
4.1.2	Kultivierung von adherent wachsenden Zellen auf Microcarriern	33
4.1.3	Einfrieren von Zellen	34
4.1.4	Auftauen von Zellen	35
4.1.5	Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen	35
4.1.6	Transfektion von Zellen	35
4.1.6.1	Transfektion mit <i>Dosper</i>	35
4.1.6.2	Transfektion mit <i>Effectene</i>	36
4.1.7	Herstellen eines Zelllysats	37
4.1.8	Produktion monoklonaler Antikörper im Kulturüberstand von Hybridomzellen	37
4.1.8.1	Reinigung monoklonaler Antikörper	37
4.2	Gewinnung von BDV aus Rattengehirnen	38
4.3	Infektion von Ratten mit BDV	39
4.3.1	Beurteilung klinischer Symptome	39
4.4	Infektion von Ratten mit Vaccinia Virus	40
4.5	Immunisierung von Ratten	40
4.5.1	Intraperitoneale Immunisierung	40
4.5.2	Subkutane Immunisierung	40
4.5.3	Immunisierung in den Fuß	40
4.6	Isolierung von Rattenlymphozyten	41
4.6.1	Isolierung von Lymphozyten aus dem Rattengehirn	41
4.6.2	Isolierung von Lymphozyten aus der Milz	41
4.6.3	Isolierung von Lymphozyten aus den poplitealen Lymphknoten	42
4.7	In vitro Restimulation von Lymphozyten der Lewis Ratte	43
4.7.1	Präparation der zur Antigenpräsentation eingesetzten Zellen (Feederzellen)	43
4.7.2	In vitro Restimulation	43
4.8	Zytotoxizitätstest	44
4.8.1	Zytotoxizitätstest mit Peptiden	45
4.8.1.1	Markierung von Zielzellen mit synthetischen Peptiden	45
4.8.1.2	Markierung von Zielzellen mit HPLC-Fraktionen	46
4.9	Arbeiten mit Vaccinia Viren	46
4.9.1	Gewinnung von Vaccinia Virus	46
4.9.2	Vaccinia Virus-Infektion von Zellen auf Microcarriern	46
4.9.3	Herstellung rekombinanter Vaccinia Viren	47
4.9.3.1	Infektion mit <i>Vaccinia</i> -Wildtyp und Transfektion	47
4.9.3.2	Plaquereinigung rekombinanter Viren	48
4.10	Virustitration	49
4.10.1	Titration des Borna Disease Virus	49
4.10.2	Titration des Vaccinia Virus (Plaque Assay)	50

4.11	Aufreinigung rekombinanter Proteine	51
4.12	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese und Western Blot-Analyse	52
4.12.1	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	52
4.12.2	Western Blot-Analyse	53
4.12.2.1	<i>Transfer von Proteinen auf eine Teflonfolie</i>	<i>54</i>
4.12.2.2	<i>Immunoblotting</i>	<i>54</i>
4.13	Durchflusszytometrie	56
4.13.1	Phänotypische Charakterisierung von Zellen anhand von Oberflächenantigenen	56
4.13.2	Nachweis Vaccinia Virus-spezifischer Proteine im Inneren von Zellen	57
4.13.2.1	<i>Permeabilisierung</i>	<i>57</i>
4.13.2.2	<i>Markierung der Zellen</i>	<i>58</i>
4.13.3	Nachweis von GFP (Green Fluorescent Protein)	58
4.14	Nachweis von GFP (Green Fluorescent Protein) mittels Fluoreszenzmikroskopie	58
4.15	Extraktion viraler Peptide aus infizierten Zellen	59
4.16	Fraktionierung viraler Peptide mittels HPLC	59
4.17	Histologische Untersuchungen	60
4.18	Molekularbiologische Methoden	61
4.18.1	Gewinnen von Plasmiden	61
4.18.1.1	<i>Minipräparation</i>	<i>61</i>
4.18.1.2	<i>Säulenaufreinigung von Plasmid-DNA</i>	<i>62</i>
4.18.2	Gewinnen zellulärer und viraler DNA	62
4.18.3	Auftrennung, Isolierung und Aufreinigung von genomischer und Plasmid-DNA	63
4.18.3.1	<i>Auftrennung</i>	<i>63</i>
4.18.3.2	<i>Isolierung und Aufreinigung</i>	<i>63</i>
4.18.4	Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen	64
4.18.5	RNA-Isolierung	64
4.18.6	Enzymatische Behandlung von Nukleinsäuren	65
4.18.6.1	<i>Spaltung mit Restriktionsenzymen</i>	<i>65</i>
4.18.6.2	<i>Ligation</i>	<i>65</i>
4.18.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Reverse Transkriptase Polymerase- Ketteneaktion (RT-PCR)	66
4.18.7.1	<i>cDNA Synthese</i>	<i>67</i>
4.18.7.2	<i>Polymerase-Kettenreaktion mit der Taq-Polymerase</i>	<i>67</i>
4.18.7.3	<i>Polymerase-Kettenreaktion mit der Pwo-Polymerase</i>	<i>68</i>
4.18.8	Sequenzierung von DNA	69
4.18.8.1	<i>Sequenzierungsreaktion</i>	<i>69</i>
4.18.8.2	<i>Aufreinigung</i>	<i>70</i>
4.18.8.3	<i>Sequenziergel</i>	<i>70</i>
4.18.9	Bakterienkultur	70
4.18.9.1	<i>Anzucht von E.coli in Flüssigmedium</i>	<i>70</i>
4.18.9.2	<i>Anzucht von E.coli in auf festen Nährböden</i>	<i>71</i>
4.18.9.3	<i>Transformation</i>	<i>71</i>
4.18.9.4	<i>Lagerung von Bakterienkulturen</i>	<i>71</i>

Inhaltsverzeichnis

5. ERGEBNISSE	72
5.1 Verkürzte Nukleoproteine	72
5.1.1 Transfektion von LEW Zellen	73
5.1.1.1 Expression des vollständigen Nukleoproteins in LEW Zellen	74
5.1.1.2 Expression von verkürzten Nukleoproteinen in LEW Zellen	79
5.1.2 Herstellung rekombinanter Vaccinia Viren	81
5.2 BDV-spezifische Peptide	88
5.2.1 Synthetische Peptide	88
5.2.1.1 Bestimmung der optimalen Peptidkonzentration für das Beladen von Zielzellen	91
5.2.2 Natürlich prozessierte Peptide	93
5.3 Immunisierungsexperimente mit dem Peptid 9048	99
5.3.1 Periphere Immunisierung (subkutan und intraperitoneal)	99
5.3.2 Lokale Immunisierung	100
5.3.3 Immunisierung von Ratten mit dem Peptid 9048 und anschließende BDV-Infektion	102
5.3.3.1 Immunisierung mit dem Peptid 9048 und anschließende Virusinfektion: Beurteilung des Krankheitsverlaufs, der Virusvermehrung und der entzündlichen Veränderungen im Gehirn (Experiment 1)	103
a. Auftreten BDV-spezifischer Symptome	104
b. Auftreten BDV-spezifischer Antikörper	106
c. Nachweis von infektiösem Virus und entzündlichen Veränderungen im Gehirn	106
5.3.3.2 Immunisierung mit dem Peptid 9048, rekombinantem Nukleoprotein oder Bacterial Ghosts und anschließende Virusinfektion: Beurteilung des Krankheitsverlaufs, der Virusvermehrung im Gehirn (Experiment 2)	107
a. Auftreten BDV-spezifischer Symptome	109
b. Auftreten BDV-spezifischer Antikörper	111
c. Nachweis von infektiösem Virus im Gehirn	112
5.3.3.3 Immunisierung mit den Peptiden 9048, 9050, rekombinantem Nukleoprotein oder Bacterial Ghosts und anschließende Virusinfektion: Aktivierungsgrad von CD8 ⁺ T-Zellen zu einem späten Zeitpunkt nach Infektion (Experiment 3)	113
a. Auftreten BDV-spezifischer Symptome	114
b. Auftreten BDV-spezifischer Antikörper	117
c. In vitro Zytotoxizitätstest	118
5.3.3.4 Immunisierung mit dem Peptid 9048 oder rekombinantem Nukleoprotein und anschließende Virusinfektion : Aktivierungsgrad von CD8 ⁺ T-Zellen zu einem frühen Zeitpunkt nach Infektion (Experiment 4)	120
a. Auftreten BDV-spezifischer Symptome	121
b. Auftreten BDV-spezifischer Antikörper	123
c. In vitro Zytotoxizitätstest	124
6. DISKUSSION	126
7. ZUSAMMENFASSUNG	144
7.A SUMMARY	146
8. LITERATUR	148

Abkürzungen

A	- Adenin
Abb.	- Abbildung
Ak	- Antikörper
Amp	- Ampicillin
APS	- Ammoniumpersulfat
AS	- Aminosäure
ATCC	- American Type Culture Collection
α	- anti
BD	- Borna Disease
BDV	- Borna Disease Virus
BFAV	- Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der
BHK	- Baby Hamster Kidney
bidest.	- bidestillata
bp	- Basenpaare
BrdU	- Bromodeoxyuridin
BSA	- Rinderserumalbumin
BSS	- Buffered Salt Solution
bzw.	- beziehungsweise
C	- Cytosin
°C	- Grad Celsius
cDNA	- komplementäre DesoxyriboNukleinsäure
CFA	- komplettes Freundesches Adjuvans
Con A	- Conavalin A
cpm	- counts per minute
CRL1405	- embryonale Meerschweinchen Zelllinie
^{51}Cr	- Natriumchromat
C-terminal	- carboxyterminal
d.h.	- das heißt
DMEM	- Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	- Dimethylsulfoxid
DNA	- DesoxyriboNukleinsäure
dNTP	- DesoxyNukleosidtriphosphat
DOC	- Desoxycholat
DTH	- Delayed Type Hypersensitivity Reaction
DTT	- 1,4-Dithiothreitol
EAE	- Experimentelle Autoimmune Encephalomyelitis
E. coli	- Escherichia coli
EDTA	- Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	- et altera

Abkürzungen

FACS	- Fluorescence Activated Cell Sorter
ffu	- focus forming units
FITC	- Fluoresceinisothiocyanat
FKS	- Fötale Kälberserum
g	- Gramm
x g	- Vielfaches der Erdbeschleunigung
G	- Guanin
GFP	- Green Fluorescent Protein
GG	- Glutamin/Gentamycin
GMEM	- Glasgow Modified Eagle's Medium
gp	- Glycoprotein
GST	- Glutathion-S Transferase
h	- Stunde
HCl	- Salzsäure
HIV	- Humanes Immunschwäche Virus
HPLC	- High Performance Liquid Chromatographie
i.c.	- intracerebral
i.f.	- in den Fuß
IFA	- inkomplettes Freundsches Adjuvans
IFN	- Interferon
IL	- Interleukin
IMDM	- Iscove Modified Dulbecco's Medium
iNOS	- induzierbare Stickoxidsynthase
i.p.	- intraperitoneal
IPTG	- Isopropyl- β -d-thiogalactosid
i.v.	- intravenös
kb	- Kilobasen
kD	- Kilodalton
l	- Liter
L	- links
lacZ	- β -Galaktosidase
LB	- Luria-Bertani Medium
LCMV	- Virus der lymphozytären Choriomeningitis
LEW	- Fibroblasten der Lewis Ratte
log ₁₀	- dekadischer Logarithmus
M	- Molar
mA	- Milliampère
mAK	- monoklonaler Antikörper
mCi	- Millicurie
μ g	- Mikrogramm
mg	- Milligramm
MHC	- Major Histocompatibility Complex

Abkürzungen

min	- Minute
ml	- Milliliter
µl	- Mikroliter
mM	- Millimolar
MOI	- Multiplicity of Infection
mRNA	- messenger RiboNukleinsäure
n	- Anzahl
NaAc	- Natriumacetat
n.d.	- nicht durchgeführt
ng	- Nanogramm
NI	- nicht immunisiert
NL	- nicht infiziert
NK	- natürliche Killerzelle
nm	- Nanometer
N-terminal	- aminoterminal
OD	- optische Dichte
OPD	- Ortho-phenylendiamin
ORF	- offener Leserahmen
p	- Promotor
PBS	- Phosphat Buffered Saline
PCR	- Polymerase-Kettenreaktion
PE	- Phycoerythrin
PFA	- Paraformaldehyd
pH	- negativer dekadischer Logarithmus der
p.i.	- post infectionem
PMSF	- Phenyl-Methyl-Sulfonylfluorid
POD	- Peroxidase
Pol	- Polymerase
R	- rechts
RNA	- RiboNukleinsäure
RNAse	- Ribonuclease
RNP	- RiboNukleoproteinkomplex
rpm	- Rounds per Minute
RT	- Raumtemperatur
RT-PCR	- Reverse-Transkriptions Polymerase-Kettenreaktion
s.c.	- subkutan
SDS	- Natriumdodecylsulfat
S.E.M.	- mittlere Standardabweichung (standard error of the
spez.	- spezifisch
T	- Thymidin
Tab.	- Tabelle
TAP	- Transporter associated with antigen processing

Abkürzungen

TE	- Tris-EDTA-Puffer
TEMED	- Tetramethylethylendiamin
TF	- Tissue Factor
TK	- Thymidin Kinase
143tk ⁻	- humane Osteosarkomzellen (Thymidin Kinase-
TNF	- Tumor Nekrose Faktor
Tris	- Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton-X-100	- Tertiärbutylphenylpolyoxyethylen
Tween-20	- Polyoxyethylen(20)sorbitanmonolaureat
U	- Unit
u.a.	- unter anderem
UV	- Ultraviolett
V	- Volt
Vol.	- Volumen
VSV	- Virus der vesikulären Stomatitis
VV	- Vaccinia Virus
z.B.	- zum Beispiel
ZNS	- zentrales Nervensystem

Aminosäuren (Ein-Buchstaben-Code)

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

1. EINLEITUNG

1.1 *Das Borna Disease Virus (BDV)*

Geschichte der Bornaschen Krankheit

Eine Erkrankung von Pferden, die in Zusammenhang mit einer Borna Disease Virus Infektion steht, zog schon vor mehreren hundert Jahren die Aufmerksamkeit auf sich. Die ältesten Aufzeichnungen sind auf das Jahr 1660 datiert und berichten von typischen Symptomen, die heute als Bild der Bornaschen Krankheit (BD) bekannt sind. Die betroffenen Pferde werden nach Galiberti (1660) als apathisch und teilnahmslos beschrieben. Ein 1716 veröffentlichtes Buch berichtet von Symptomen wie Schläfrigkeit, Melancholie und auch Erregung, die im Verlauf der Erkrankung auftreten (Trichtern, 1716). Im späten 18. und im 19. Jahrhundert folgen weitere Beschreibungen, welche die Bornasche Krankheit als „hitzige Kopfkrankheit der Pferde“ (Autenrieth, 1813, zitiert nach Zwick, 1939), „halbakute Gehirnentzündung“ (Wörz, 1858, zitiert nach Heinig, 1969), „subakute Meningitis“ (Dinter, 1879) und „Schlafsucht der Pferde“ (Winkler, 1883) erwähnen. 1822 wird von Veith eine detailliertere Beschreibung dieser Gehirnentzündung veröffentlicht. Große Bedeutung bekam die Erkrankung um das Jahr 1900 auf Grund eines Ausbruchs größeren Ausmaßes, der vorwiegend Militärpferde betraf (Walther, 1899). Diesem Ausbruch, in der Umgebung der Stadt Borna in Sachsen, verdankt die Erkrankung ihren Namen.

Charakterisierung des Borna Disease Virus

Hinweise auf die Virusätiologie der Erkrankung ergaben sich erstmals durch die Übertragung bakterienfreien Gehirnhomogenats eines an BD erkrankten Pferdes auf ein Kaninchen und die erfolgreiche Rückübertragung auf ein Pferd (Zwick & Seifried, 1925). Filtrationsstudien und elektronenmikroskopische

Untersuchungen ergaben eine Partikelgröße von 85 bis 125 nm (Elford & Galloway, 1933; Compans et al., 1994; Zimmermann et al., 1994; Kohno et al., 1999). Die Empfindlichkeit gegenüber Detergenzien und UV-Bestrahlung zeigte, dass es sich um ein behülltes Virus handeln muss (Heinig, 1969).

Inzwischen ist bekannt, dass es sich um ein nicht-segmentiertes Einzelstrang RNA-Virus mit negativer Polarität handelt (de la Torre et al., 1990; Lipkin et al., 1990; de la Torre, 1994; Schneemann et al., 1995). Das BDV wird deshalb wie die Filoviridae, Paramyxoviridae und Rhabdoviridae zur Ordnung der Mononegavirales gezählt. Innerhalb dieser Ordnung stellt das Virus den einzigen Vertreter der neu definierten Familie der Bornaviridae dar (Mayo & Pringle, 1998). Es ist zwar von der Genomorganisation den Mononegavirales sehr ähnlich, Replikation und Transkription finden aber im Zellkern, genauer im Nukleolus, infizierter Zellen statt (Briese et al., 1992; Cubitt & de la Torre, 1994; Pyper et al., 1998). Diese Eigenart findet man innerhalb dieser Ordnung nur noch bei den Pflanzenrhabdoviren.

Erstaunlich für ein tierpathogenes, nicht-segmentiertes negativsträngiges RNA-Virus ist der bisher beschriebene hohe Grad an Sequenzhomologie zwischen experimentell und natürlich erhaltenen BDV-Isolaten (Binz et al., 1994; Briese et al., 1994; Cubitt et al., 1994a; de la Torre et al., 1996a; Bode & Ludwig, 1997; Planz et al., 1999). Allerdings wurde erst kürzlich ein BDV-Isolat aus einem erkrankten Pferd charakterisiert, das deutliche Abweichungen sowohl auf Nukleotid- als auch auf Proteinebene aufweist (Nowotny et al., 2000).

Das virale Genom des BDV hat eine Größe von ungefähr 8,9 kb (Briese et al., 1994; Cubitt et al., 1994a) und codiert für sechs offene Leserahmen (ORF) (Briese et al., 1994; Cubitt et al., 1994a; Gonzalez-Dunia, et al., 1997; Wehner et al., 1997).

ORF I: Der erste offene Leserahmen codiert für das Nukleoprotein, das in zwei Isoformen, als p38 oder als p40, vorkommen kann. Das Protein kann mit dem Phosphoprotein (p24) und dem Produkt des ORF x1 (p10) interagieren (Haas et al., 1986; Hsu et al., 1994; Berg et al., 1998; Schwemmle et al., 1998).

ORF II: Dieser Leserahmen codiert für ein 24kD Protein, das sogenannte Phosphoprotein, das durch die Proteinase C α und die Caseinkinase II phosphoryliert wird (Thiedemann et al., 1992; Thierer et al., 1992; Hsu et al., 1994; Kliche et al., 1996; Schwemmle et al., 1997).

ORF x1: Das Produkt dieses offenen Leserahmens, der mit dem Leseraster des ORF II überlappt, ist das p10. Es besitzt Kerntransportfunktion (Wehner et al., 1997; Schwemmle et al., 1998; Malik et al., 1999, 2000; Wolff et al., 2000).

ORF III: Der dritte Leserahmen codiert für das Matrixprotein p16, das posttranslational glykosyliert wird (gp18) (Briese et al., 1994, 1995; Cubitt et al., 1994a; Kliche et al., 1994). Antikörper, die gegen dieses Protein gerichtet sind, haben neutralisierende Eigenschaften. Das spricht dafür, dass das gp18 in der Virushülle verankert ist (Kliche et al., 1994; Hatalski et al., 1995; Stoyloff et al., 1997).

ORF IV: Das Produkt des vierten Leserahmens ist das p57. Die glykosylierte Form des Proteins kann als gp94 vorliegen, das im endoplasmatischen Retikulum angereichert wird oder als dessen C-terminales Spaltprodukt (gp43) (Gonzalez-Dunia et al., 1997, 1998; Richt et al., 1998). Das gp43 findet sich auf der Oberfläche infizierter Zellen. Antikörper, die gegen das Glycoprotein gerichtet sind, haben neutralisierende Eigenschaften. Das Protein ist während der Infektion am Viruseintritt in die Zelle beteiligt (Gonzalez-Dunia et al., 1997, 1998; Schneider et al., 1997; Stoyloff et al., 1998; Furrer et al., 2001).

ORF V: Der fünfte Leserahmen codiert für ein 190kD Protein, bei dem es sich um die virale L Polymerase handelt (Briese et al., 1994, 1995; Cubitt et al., 1994a; Walker et al., 2000).

Bei der Transkription entstehen acht subgenomische RNA-Stränge. Die RNAs, die für das Phospho- und das Nukleoprotein codieren, sind monocistronisch. Die RNAs, die für das Matrix-, das Glycoprotein und die Polymerase codieren, können polycistronisch sein. Da Transkriptionseinheiten und Transkriptionssignale auf dem Genom des BDV häufig überlappen, nutzt das Virus wirtseigene Splicingmechanismen zur posttranslationalen Modifikation verschiedener RNAs (Briese et al., 1994; Cubitt et al., 1994a, b; Schneemann et al., 1994, 1995; Schneider et al., 1994).

Die Replikation des Virus im Nukleolus ist mit der Entstehung von RiboNukleoproteinen (RNPs) assoziiert. RNPs können die Infektion auf permissive Zellen übertragen (Cubitt & de la Torre, 1994).

Die Annahme, dass es sich beim Borna Disease Virus um einen streng neurotrophen Erreger handelt, konnte inzwischen widerlegt werden. Durch Infektionsversuche in Zellkultur und durch Experimente mit immunsupprimierten und chronisch infizierten Ratten wurde nachgewiesen, dass auch nicht neuronales Gewebe für das Virus empfänglich ist (Ludwig et al., 1973; Herzog & Rott, 1980; Herzog et al., 1984; Stitz et al., 1991a, Sierra-Honigmann et al., 1993).

Wirtsspektrum

Ursprünglich wurde angenommen, dass sich die Verbreitung der Bornaschen Krankheit auf endemische Gebiete in Ost- und Süddeutschland sowie der Schweiz beschränken würde, wo die Erkrankung vor allem bei Pferden und Schafen beschrieben wurde (Zwick, 1939; Heinig, 1969; Metzler et al., 1976, 1979). Allerdings ist die natürliche BDV-Infektion geographisch weiter verbreitet, als ursprünglich angenommen. Infektionen wurden in verschiedenen Teilen Europas, in Nordamerika und Asien festgestellt. Zu den betroffenen Tierarten zählen u.a. Pferde (Matthias, 1954; Gosztanyi & Ludwig, 1984; Kao et

al., 1993; Bilzer et al., 1995; Nakamura et al., 1995, Capalazi & Ehrensperger, 1998; Weissenböck et al., 1998a; Hagiwara et al., 2000), Schafe (Matthias, 1954; Capalazi & Ehrensperger, 1998), Rinder (Matthias, 1954; Bode et al., 1994; Capalazi, 1994), Hunde (Weissenböck et al., 1998b), verschiedene Feliden (Lundgren & Ludwig, 1993; Lundgren et al., 1995a, b; Nowotny & Weissenböck, 1995; Berg et al., 1999; Degiorgis et al., 2000), Kaninchen (Otta & Jentzsch, 1960; Johannsen & Bergmann, 1971) und Strauße (Malkinson et al., 1993, 1995).

Auch experimentell ist die Übertragung des Virus über den intracerebralen oder intranasalen Infektionsweg auf verschiedenste Vertebraten möglich. Zu den in Tierexperimenten eingesetzten Spezies gehören Hühner (Zwick et al., 1927, Ludwig et al., 1973), verschiedene Nager, wie Hamster (Anzil et al., 1973), Meerschweinchen (Zwick & Seifried, 1925), Kaninchen (Zwick & Seifried, 1925; Krey et al., 1979a, b), Mäuse (Kao et al., 1984; Rubin et al., 1993; Hallensleben et al., 1998) und Ratten (Nitzschke, 1963; Hirano et al., 1983; Narayan et al., 1983a, b), sowie Spitzhörnchen, die zu den Halbaffen gezählt werden (Sprankel et al., 1978) und Rhesusaffen (Zwick et al., 1939; Stitz et al., 1980).

Da das BDV ein extrem großes Wirtsspektrum aufweist, lag die Frage nahe, ob auch der Mensch einen möglichen Wirt des Virus darstellt und ob eine Korrelation zwischen dem Auftreten psychiatrischer Erkrankungen und einer Infektion mit dem Borna Disease Virus besteht. Bei serologischen Untersuchungen von psychisch kranken Personen wurden bei einem Teil der Untersuchten BDV-spezifische Antikörper detektiert (Amsterdam et al., 1985; Rott et al., 1985; Vande Woude et al., 1990; Bechter et al., 1992). Allerdings fanden sich Antikörper auch im Serum psychisch unauffälliger Probanden (Bode et al., 1992). Neben der Serologie wurde auch das Auftreten BDV-spezifischer

RNA im Blut untersucht. Positive Befunde ergaben sich wiederum bei Psychatriepatienten (Bode et al., 1995; Sauder et al., 1996; Planz et al., 1998) und bei gesunden Blutspendern (Kishi et al., 1995). Eine höhere Prävalenz positiver Befunde wurde jeweils bei den psychisch kranken Personen festgestellt. Inzwischen konnte eingegrenzt werden, dass sich die RNA zu einem erheblichen Teil in der Granulozytenfraktion der mononukleären Zellen befindet (Planz et al., 1999). Mittels Durchflusszytometrie konnte zudem in Blutzellen auch BDV-spezifisches Antigen detektiert werden (Bode et al., 1995). Bei der Untersuchung humaner Gehirne konnte sowohl virale RNA, als auch infektiöses Virus nachgewiesen werden (de la Torre et al., 1996b; Haga et al., 1997; Czygan et al., 1999; Nakamura et al., 2000). Auch nachdem die Ergebnisse verschiedener Untersuchungen darauf hinweisen, dass das Borna Disease Virus auf den Menschen übertragbar ist, bleibt es schwierig, einen kausalen Zusammenhang zwischen dem Auftreten psychischer Veränderungen und einer Infektion mit dem Virus herzustellen.

Bei den verschiedenen empfänglichen Spezies zeigt die Bornasche Krankheit einen sehr unterschiedlichen Verlauf. Während z.B. Rhesusaffen, Ratten und Kaninchen unter deutlichen neurologischen Symptomen leiden, die bis zu Paralyse reichen (Stitz et al., 1980; Narayan et al., 1983a, b; Rott & Becht, 1995), bleiben Mäuse und Hamster meist frei von klinischen Symptomen (Anzil et al., 1973; Kao et al., 1984; Rubin et al., 1993). Bei den Spitzhörnchen dagegen äußert sich die Erkrankung vorwiegend in einem gestörten Sozialverhalten (Sprankel et al., 1978). Das Auftreten klinischer Symptomatik ist aber nicht nur abhängig von der Tierart und dem gewählten Infektionsweg, sondern auch vom Alter, genetischen Hintergrund und dem Immunstatus der Tiere. So gelang es, in bestimmten Mausstämmen mit maus-adaptiertem Virus Verhaltensänderungen oder neurologische Symptome auszulösen (Hirano et al., 1983; Rubin et al., 1993; Hallensleben et al., 1998).

Pathogenese

Über den Infektionsweg ist noch wenig bekannt. Angenommen wird die rhinogene Aufnahme des Virus, möglicherweise über kontaminiertes Futter, Wasser oder den direkten Kontakt zu infizierten Tieren, die das BDV über Speichel oder Nasensekret ausscheiden (Morales et al., 1988; Rott & Becht, 1995). Daneben wird die orale Aufnahme des Virus (Heinig, 1969; Bilzer et al., 1995; Malkinson et al., 1995) und auch die vertikale Übertragung (Hagiwara et al., 2000) diskutiert. Als mögliches Virusreservoir sind Nager oder auch Arthropoden denkbar (Rott & Becht, 1995).

Wird der Erreger intranasal aufgenommen, breitet er sich von den Neurorezeptoren des Riechepithels ausgehend intraaxonal und transsynaptisch in Richtung des zentralen Nervensystems aus. Eventuell ist auch der Liquor cerebrospinalis an der Virusausbreitung beteiligt (Carbone et al., 1987; Morales et al., 1988; Shankar et al., 1992; Rott & Becht, 1995). Durch die experimentelle Infektion von Ratten in den Fuß konnte die Ausbreitung des Virus entlang von Nervenfasern bestätigt werden. Ausgehend vom Nervus ischiaticus gelangte der Erreger zentripetal ins ZNS (Carbone et al., 1987).

Im Gehirn zeigt der Erreger einen Tropismus für das limbische System, einschließlich der Hippocampusregion (Morales et al., 1988; Carbone et al., 1991a; Gosztanyi & Ludwig, 1995). Hier führt er zu einer schweren immunpathologischen Reaktion, die sich in einer nicht-eitrigen Meningoenzephalitis äußert (Stitz et al., 1995).

Über den Tractus opticus kann das Virus in das Auge gelangen und dort eine Retinitis zur Folge haben (Krey et al., 1979a, b; Narayan et al., 1983b; Kacza et al., 2000).

In der chronischen Phase der Infektion breitet sich das Virus anterograd über periphere Nerven in verschiedene Organe aus. In dieser Phase der BD kann der Erreger auch in extraneuralem Gewebe, einschließlich mononukleärer Zellen des peripheren Bluts gefunden werden (Shankar et al., 1992; Sierra-Honigmann,

1993; Gosztonyi & Ludwig, 1995). Das Virus persistiert weiter im Gehirn infizierter Tiere, während die entzündliche Reaktion langsam zurückgeht (Hirano et al., 1983; Narayan et al., 1983a; Rott & Becht, 1995).

Das Borna Disease Virus wird ausgehend von in vitro Experimenten als nicht-zytopathogen eingestuft (Danner et al., 1978; Herzog & Rott, 1980).

In der Zwischenzeit weisen allerdings zahlreiche Untersuchungen darauf hin, dass möglicherweise auch die virale Infektion selbst, neben der immunpathologischen Reaktion, zur Schädigung infizierter Zellen führt. Dazu könne verschiedene Faktoren beitragen. Nach einer Infektion mit BDV wurde eine verstärkte Expression des Tissue Factors (TF) in Astrozyten (Gonzalez-Dunia et al., 1996) gemessen. TF spielt eine initiiierende Rolle in der Bildungskaskade der Protease Thrombin. Eine vermehrte Thrombin-Aktivität könnte zur Störung von Neuronen-Interaktionen führen. Eine ähnliche Wirkung könnte die veränderte Expression verschiedener Dopamin-Rezeptoren in dopaminergen Gehirnregionen haben (Solbrig et al., 1996). Daneben wurde die vermehrte Bildung von mRNA der induzierbaren Stickstoffmonoxid Synthase (iNOS) und von katalysiertem Stickoxid (NO) festgestellt. NO kann als Neurotransmitter fungieren, aber auch toxische Eigenschaften haben (Dietzschold, 1995; Hooper et al., 1995). Im ZNS infizierter Tiere kam es zudem zu einer veränderten mRNA-Expression proinflammatorischer Zytokine, Zytokinrezeptoren und dem Neuropeptid Y (Shankar et al., 1992; Plata-Salaman et al., 1999).

Weiterhin wurden bei Ratten, die als Neugeborene infiziert wurden und daher nicht mit einer Entzündungsreaktion auf das Virus reagierten, Entwicklungsstörungen des Kleinhirns und des Hippocampus festgestellt (Carbone et al., 1991b; Bautista et al., 1995). Bei adult infizierten Ratten war schon vor Auftreten einer Entzündung im Gehirn ein Verlust von cholinergen Fasern zu erkennen (Gies et al., 1998).

Pathohistologie

Histologisch äußert sich die BD in einer schweren nicht-eitrigen Meningoenzephalomyelitis. Sie ist durch das Auftreten von perivaskulären und parenchymatösen Infiltraten gekennzeichnet. Die Infiltrate bestehen aus CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, Makrophagen und B-Zellen. Perivaskulär treten gehäuft CD4⁺ T-Zellen auf, im Parenchym überwiegen dagegen CD8⁺ T-Zellen (Deschl et al., 1990; Bilzer & Stitz, 1993, 1994; Planz et al., 1993; Stitz et al., 1993, 1995; Bilzer et al., 1995).

Die immunologische Reaktion führt zur Degeneration von Neuronen, die in der chronischen Phase der Erkrankung von einem Hydrocephalus internus gefolgt sein kann (Narayan et al., 1983a).

Durch die Ausbreitung des Virus bis ins Auge entwickelt sich bei verschiedenen Tierarten eine Retinitis. Es kann zur Zerstörung von Pigmentepithel und Photorezeptoren und als Folge dessen auch zu einer Retinaatrophie kommen (Krey et al., 1979a, b; Narayan et al., 1983b; Kacza et al., 2000).

Neben den entzündlichen Infiltraten sind die eosinophilen, intranukleären, sogenannten Joest-Degenschen Einschlusskörperchen, für die Infektion mit dem BDV pathognomonisch. Sie wurden bereits Anfang des 20. Jahrhunderts beschrieben (Joest & Degen, 1909, 1911).

Immunhistologisch wurde BDV-spezifisches Antigen in Neuronen, Astrozyten, Ependymzellen, der Oligodendroglia und im Lauf der Infektion auch in den Schwannschen Zellen des peripheren Nervensystems nachgewiesen (Carbone et al., 1989, 1991a; Deschl et al., 1990; Bilzer et al., 1995; Gosztonyi & Ludwig, 1995).

Pathologie und klinische Symptomatik bei der Lewis Ratte

Die meisten Untersuchungen zur Pathogenese der BD werden heute an Lewis Ratten durchgeführt. Der Verlauf der Krankheit ist abhängig vom Alter und Immunstatus der Tiere, sowie dem applizierten Virusisolat und dem

Infektionsweg (Narayan et al., 1983a, b; Herzog et al., 1984, 1985, 1991; Ludwig et al., 1988). Werden adulte, immunkompetente Tiere intracerebral infiziert, zeigt die Erkrankung einen biphasischen Verlauf. Etwa zwei Wochen p.i. beginnt die akute Phase, die gekennzeichnet ist durch Koordinationsstörungen und Lähmungen, die bis zu Paralysen der Hinterextremitäten reichen können. Die Ratten weisen in dieser Zeit eine erhöhte Schreckhaftigkeit auf. Die klinische Symptomatik geht mit dem Auftreten entzündlicher Veränderungen im Gehirn einher, die 20 bis 30 Tage p.i. ihren Höhepunkt erreichen. Die akute BD hält etwa drei Wochen an und geht darauf in die chronische Phase über. Die Ratten zeigen sich zunehmend apathisch und dement. Morphologisch ist eine progressive Gehirnatrophie zu beobachten. (Narayan et al., 1983a, b, Dittrich et al., 1989, Bilzer & Stitz, 1994, Nöske et al., 1998). Trotz Persistenz des Virus geht die entzündliche Reaktion im ZNS langsam zurück (Narayan et al., 1983a). Bei einem Teil der Tiere entwickelt sich in der chronischen Phase der Erkrankung eine Fettsucht (Kao et al., 1983; Herden et al., 2000).

Immunreaktion

Erste Hinweise, dass es sich bei der BD um eine immunpathologische Erkrankung handelt, ergaben sich bei Experimenten, die mit immuninkompetenten Ratten durchgeführt wurden. Die Tiere erkrankten nach der Infektion mit dem BDV nicht (Hirano et al., 1983; Narayan et al., 1983b; Stitz et al., 1989, 1992). Weitere Hinweise ergaben sich beim Transfer von Milzzellen infizierter Ratten auf immuninkompetente syngene Tiere, die ebenfalls infiziert worden waren. Die Rezipienten erkrankten an BDV-spezifischen Symptomen und zeigten eine entzündliche Reaktion im Gehirn. Das wies darauf hin, dass die Erkrankung durch die zelluläre Immunantwort ausgelöst wird (Hirano et al., 1983; Narayan et al., 1983a; Stitz et al., 1989). Als durch den adoptiven Transfer einer CD4⁺ T-Zelllinie auf immunsupprimierte,

BDV-infizierte Ratten BD ausgelöst wurde, führte dies zunächst zu der Annahme, dass die Krankheit durch MHC-Klasse-II-restringierte Lymphozyten vermittelt wird (Richt et al., 1989, 1990). Heute geht man allerdings davon aus, dass $CD8^+$ T-Zellen die Effektorfunktion im Krankheitsgeschehen der BD übernehmen. Bei Experimenten, in denen endogene $CD8^+$ T-Zellen selektiv gehemmt wurden, konnte die Entzündungsreaktion im Gehirn der infizierten Ratten deutlich verringert werden (Stitz et al., 1991b, 1992; Bilzer & Stitz, 1994). Es wurde zudem nachgewiesen, dass MHC-Klasse-I-restringierte Lymphozyten aus den Gehirnen akut infizierter Ratten in vitro zytotoxische Aktivität besitzen (Planz et al., 1993; Sobbe et al., 1997). Wurden wiederum T-Zellen, die in vitro MHC-Klasse-I-restringierte Zytotoxizität aufwiesen, adoptiv in immuninkompetente BDV-Träger transferiert, erkrankten diese an BD. Man kann also davon ausgehen, dass $CD8^+$ T-Zellen in vivo Funktionalität besitzen (Sobbe et al., 1997). Ein weiteres Transferexperiment mit einer BDV-spezifischen $CD4^+$ T-Zelllinie, die in vitro keine BDV-spezifische Zytotoxizität aufwies, machte deutlich, dass die MHC-Klasse II-restringierten Lymphozyten in vivo für die Aktivierung der $CD8^+$ Effektorzellen notwendig sind. Zudem konnte dargestellt werden, dass BDV-spezifische $CD8^+$ T-Zellen nicht nur an der Immunpathologie, sondern auch an der Viruselimination beteiligt sind. Eine Induktion der Effektorzellen zu einem frühen Zeitpunkt nach Infektion führte zur Elimination des Virus im Gehirn (Richt et al., 1994; Nöske et al., 1998). Inzwischen wurde gezeigt, dass die zelluläre Immunantwort hauptsächlich gegen das Nukleoprotein des BDV gerichtet ist (Planz & Stitz, 1999).

Immunkompetente, experimentell infizierte Lewis Ratten entwickeln immer eine humorale Antwort gegen das Virus, wobei sich zu einem späteren Zeitpunkt auch neutralisierende Antikörper im Serum finden (Hirano et al., 1983; Hatalski et al., 1995). Die Funktion der neutralisierenden Antikörper liegt in der Kontrolle des Virus, das durch diese an einer Ausbreitung in die Peripherie

gehindert wird (Stitz et al., 1998). Werden neutralisierende Antikörper schon prophylaktisch, d.h. vor Infektion mit dem Virus appliziert, lässt sich die BD verhindern (Furrer et al., 2001).

Es konnte früh gezeigt werden, dass B-Zellen an der Immunpathogenese der BD nicht beteiligt sind, da neugeboren-infizierte Ratten trotz des Auftretens BDV-spezifischer Antikörper im Serum keine klinische Symptomatik entwickeln. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass der Transfer von BDV-spezifischen Antikörpern auf neugeboren-infizierte Ratten keine Erkrankung auslöst und der Verlauf der BD durch die Unterdrückung der B-Zell-Antwort in infizierten Ratten nicht beeinflusst wird (Hirano et al., 1983; Narayan et al., 1983a, b; Herzog et al., 1985; Stitz et al., 1989).

1.2 Die MHC-Klasse-I-restringierte Antigenpräsentation

Die zelluläre Immunantwort ist im Verlauf der Bornaschen Krankheit von zentraler Bedeutung (Hirano et al., 1983; Narayan et al., 1983a; Stitz et al., 1989). Die Effektorfunktion wird hierbei von CD8⁺ T-Zellen übernommen (Stitz et al., 1991b; Stitz et al., 1992; Bilzer & Stitz, 1994). Diese Lymphozyten erkennen die Virusinfektion einer Zelle, wenn ihrem T-Zell-Rezeptor ein virusspezifisches Peptid im MHC-Klasse-I-Komplex präsentiert wird (Zinkernagel & Doherty, 1974; Townsend et al., 1986; Bjorkman et al., 1987; Rötzschke et al., 1990). Peptide, die auf diese Art präsentiert werden, entstehen aus zytoplasmatischen Proteinen, die mit Hilfe des Proteasom-Komplexes und vermutlich auch unter Mitwirkung zytosolischer Proteasen gespalten werden (Goldberg & Rock, 1992; Rock et al., 1994; Vinitsky et al., 1997). Anschließend gelangen die Peptide mit Hilfe des TAP-Transporters (Transporter associated with antigen processing) aus dem Zytosol in das endoplasmatische Retikulum (ER) (Spies et al., 1992; Shepherd et al., 1993), wo sie in MHC-Klasse-I-Komplexe, die aus der α -Kette und dem β_2 Mikroglobulin bestehen, eingefügt

werden. Ein MHC-Klasse-I-Molekül erlangt erst durch ein eingesetztes Peptid Stabilität. Die α -Kette bildet innerhalb des Moleküls die peptidbindende Furche. Peptide, die an eine bestimmte allele Variante eines MHC-Moleküls binden, besitzen an zwei oder drei spezifischen Sequenzpositionen, den sogenannten Ankerpositionen, dieselben oder ähnliche Aminosäuren. Die bevorzugte Größe der Peptide, die durch die MHC-Klasse-I-Haplotypen RT1.A¹, RT1.A^u, RT1.A^c und RT1.A^a der Labormaus (*Rattus Norvegicus*) präsentiert werden, liegt zwischen neun und zwölf Aminosäuren (Reizis et al., 1997; Stevens et al., 1998). Eine ähnliche Präferenz zeigen auch die MHC-Klasse-I-Komplexe des Menschen und der Maus. Der vollständige Komplex aus α - und β -Kette sowie dem Peptid, gelangt über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche (Rammensee et al., 1993). Allerdings begrenzt nicht nur die Morphologie der peptidbindenden Furche der MHC-Moleküle das Peptidspektrum, das präsentiert werden kann. Auch das TAP-Molekül transportiert bevorzugt Peptide, die eine spezifische Aminosäuresequenz aufweisen. Bei der Ratte existieren, im Gegensatz zu Mensch und Maus, zwei allele Formen des TAP-Transporters, TAP-A und TAP-B, bei denen sich eine Präferenz für unterschiedliche Peptide nachweisen ließ (Heemels et al., 1993, Powis et al., 1993, 1996, Joly & Butcher, 1998).

2. FRAGESTELLUNG

Bei der experimentellen Bornaschen Krankheit (BD) der Ratte handelt es sich um eine virusinduzierte immunpathologische Erkrankung des zentralen Nervensystems. Hierbei führt die durch CD8⁺ T-Zellen vermittelte Lyse neuronalen Gewebes zu irreversiblen Schäden. Das Nukleoprotein (p40) des BDV wird von den virusspezifischen MHC-Klasse-I-restringierten Lymphozyten erkannt. Auf diesem Protein muss daher mindestens ein T-Zell-Epitop lokalisiert sein.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte geklärt werden, wie viele MHC-Klasse-I-restringierte T-Zell-Epitope sich auf dem p40 befinden. Weiterhin sollte deren genaue Lokalisation bestimmt und die Epitope näher charakterisiert werden.

Experimente, in denen T-Helferzellen vor einer Infektion mit BDV in Ratten transferiert wurden, hatten ergeben, dass die BD auf diese Art verhindert werden kann (Richt et al., 1994; Nöske et al., 1998). Um das Virus zu kontrollieren muss es demnach gelingen, zu einem sehr frühen Zeitpunkt nach Infektion das Immunsystem zu aktivieren. Mit dem Ziel in vivo zytotoxische T-Zellen zu induzieren, sollten im zweiten Teil der Arbeit verschiedene Immunisierungsstrategien angewandt werden.

Da innerhalb der letzten Jahre erfolgreich MHC-Klasse-I-restringierte T-Zell-Epitope verschiedener Viren zur Aktivierung zytotoxischer T-Zellen eingesetzt werden konnten, sollten für die Immunisierungen neben dem vollständigen Nukleoprotein auch die auf diesem lokalisierten BDV-spezifischen T-Zell-Epitope zum Einsatz kommen.

3. MATERIAL

3.1 Zelllinien

LEW	Ratten-Fibroblasten (Lewis Ratte)
143tk ⁻	humane Osteosarkomzellen (Thymidin Kinase-negativ) (ATCC)
BHK21	Hamster-Nierenzellen (Baby Hamster Kidney) (ATCC)
CRL1405	embryonale Meerschweinchenzellen (von Prof. Dr. H. Hengartner, Zürich; Evans & DiPaolo, 1975)
YAC	Mäuse-Lymphoblasten (ATCC)
OX-18	Monomorphe Determinante des Ratten MHC-Klasse-I (Fukamoto et al., 1982) (ATCC)

Die Zelllinie LEW wurde sowohl persistent BDV-infiziert (BDV-LEW), als auch nicht infiziert (NL-LEW) eingesetzt.

3.2 Virus

3.2.1 Virus der Bornaschen Krankheit (BDV)

Es wurde der Gießener Stamm He/80 (Herzog & Rott, 1980) verwendet. Für die Infektion von Lewis Ratten wurde ein 10 %iges Gehirnhomogenat der vierten Passage in Ratten (BDV 4p ad) verwendet.

3.2.2 Vaccinia Virus (VV)

Vaccinia-Wildtyp Virus (Stamm WR) wurde von Prof. Dr. R. M. Zinkernagel zur Verfügung gestellt, die Vaccinia-BDV-Rekombinante VVp40 von J. C. de la Torre, San Diego (U. S. A.).

3.3 Versuchstiere

Für die Untersuchungen wurden Ratten vom Stamm Lewis im Alter von fünf bis sechs Wochen aus der Kleintierzucht der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen, bezogen.

3.4 Peptide

Die BDV-spezifischen, synthetischen Peptide wurden von Dr. S. Stevanovic aus dem interfakultären Institut für Zellbiologie, Abt. Immunologie der Universität Tübingen, synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Zusätzliche Informationen sind über den Link <http://www.uni-tuebingen.de/uni/kxi> zugänglich.

Bezeichnung	Virus-Protein	AS-Sequenz	AS-Position
8151	p40	DAMEDQDLY	12–20
8154	p40	PSLVFLCLL	18-26
8157	p40	TVVKTAKFY	111-119
8159	p40	TELEISSIF	129-137
9048	p40	ASYAQMTTY	230–238
9050	p40	VAYEIRDFL	258–266
9051	p40	ASLPKLPKGF	24–33
8115	p24	AGFESLSAL	106-114
8096	gp18	NIYFQIDDF	74-82
8098	gp18	PTLMLEIDF	20-28
8099	gp18	NQFLNIPFL	35-43
8100	gp94	DPFECNWFY	115-123
8101	gp94	VSYLNHTTI	59-67
8107	Pol.	DSFVINLDY	440-448
8108	Pol.	HVFTYGCLY	1078-1086
8109	Pol.	KVFQDSALL	1243-1251

3.5 Nukleinsäuren

3.5.1 Plasmide

pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO	Invitrogen, Groningen (NL)
pcDNA3.1-p40	Das Plasmid wurde von W. I. Lipkin, Irvine (USA) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.
pGEX-p40	Das Plasmid wurde von Prof. Dr. P. Staehli, Freiburg, freundlicherweise zur Verfügung gestellt.
p40H/E	Das Plasmid wurde von M. Henkel in der Arbeitsgruppe von Dr. A. Rzhia an der BFAV, Tübingen, hergestellt.
pSC11.3	Das Plasmid wurde von Prof. Dr. R. M. Zinkernagel, Zürich, freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

3.5.2 Oligonukleotide

Die BDV p40- und GAPDH-spezifischen Primer wurden von der Firma GibcoBRL, Eggenstein, der Random-Primer von der Firma Roche, Mannheim, bezogen.

3.5.2.1 BDV p40-spezifische Primer

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Position auf BDV-Gen
<i>sense Primer</i>		
p40-H	CAA AAG CTT CAC ACG CAA TGC CAC	36-59
p40-HKpnI	CAA AAG GTA CCC ACG CAA TGC CAC	36-59
p40-259F	TTC ACA CAG TAA CGC CTA GC	259-278
p40-393F	GTC ATC TCA CCA AGA TGG AGA	429-449
p40-393FKpnI	GCG TGG TAC CAC CGA GAT GGA GA	429-451

antisense Primer

p40-276R	GCA GTC CTG GGA TTA GCA AAC AT	290-312
p40-498R	GCT CGG CTC CTG CCT TAA TCT T	513-534
p40-708R	TTG CGA CAA GCT TAA TCT GGT CC	722-744
p40-805R	GCA TCC ATG CAT TCT GCG GA	786-805
p40-829R	GCA ACT ACG GGG ATT GTA AGG G	808-829
p40-918R	TGG GAA AGC TTC GTG GCG CAA	923-954
p40-1125R	TTA GAC CAG TCA CAC CTA TCA	1141-1161

3.5.2.2 Weitere Primer

GAPDH-Primer

GAPDH-A: 5'-CCT TCA TTG ACC TCA ACT ACA T-3'

GAPDH-B: 5'-CCA AAG TTG TCA TGG ATG ACC-3'

3.5.3 Weitere Nukleinsäuren

1 kb DNA Ladder (DNA Längenstandard 0,07-12,2 kb) GibcoBRL, Eggenstein
dNTP's Pharmacia, Freiburg

3.6 Bakterien

3.6.1 Kompetente Bakterien

E.coli Top 10 Invitrogen, Groningen (NL)
E.coli Top 10F' Invitrogen, Groningen (NL)

3.6.2 Weitere Bakterien

Bacterial Ghosts mit dem BDV-spezifischen Peptid 9048 gefüllte Escherichia coli (Stamm NM 522) wurden uns freundlicherweise von Prof. Dr. W. Lubitz, Universität Wien, zur Verfügung gestellt.

3.7 *Enzyme und Kits*

3.7.1 Enzyme

Collagenase Typ I	Calbiochem, Bad Soden
DNase I	Roche, Mannheim
Expand, Reverse Transkriptase	Roche, Mannheim
Pwo DNA Polymerase	Roche, Mannheim
Restriktionsenzyme	AGS, Heidelberg
	Roche, Mannheim
	New England Biolabs,
	Frankfurt/M
RNAse A	Sigma, Deisenhofen
Taq DNA Polymerase	Roche, Mannheim
Trypsin	Sigma, Deisenhofen
Trypsininhibitor	Sigma, Deisenhofen

3.7.2 Kits

ABI PRISM Dye Terminator, Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin Elmer, Weiterstadt
Effectene Transfektions Reagenz	Qiagen, Hilden
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche, Mannheim
NukleoSpin Extract Kit	Macherey-Nagel, Düren
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAmp Tissue Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Nukleotide Removal Kit	Qiagen, Hilden
Rapid DNA Ligation Kit	Roche, Mannheim
TOPO TA Cloning Kit (pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO)	Invitrogen, Groningen (NL)

3.8 Antikörper, Seren und Konjugate

anti-Spezies-Biotin (Maus, Ratte)	Dianova, Hamburg
anti-Spezies-Peroxidase (Maus, Ratte)	Dianova, Hamburg
anti-Ratte-FITC	Calbiochem, Bad Soden
OX-52-FITC (anti-CD3 der Ratte)	PharMingen, Hamburg
OX-8-PE (anti-CD8 und anti-NK-Zellen der Ratte)	PharMingen, Hamburg
Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase	Ade (Zymed), München
FKS (Fötales Kälberserum)	Pan Systems GmbH, Nürnberg

Im eigenen Labor kultiviert: Pool BDV-spezifischer, monoklonaler Antikörper, die gegen das Nukleoprotein (p40) und gegen das Phosphoprotein (p24) gerichtet sind (mAK-4) und OX-18 (Fukumoto et al., 1982).

3.9 Medien

a. Iscoves Modified	17,10 g IMDM-Pulver
Dulbecco's Medium	3,02 g NaHCO ₃
(IMDM)	auf 1 l
b. Glasgow Modified	12,99 g GMEM-Pulver
Eagle's Medium	1,80 g NaHCO ₃
(GMEM)	auf 1 l
c. Dulbecco's Modified	26,80 g Dulbecco MEM
Eagle's Medium	4,40 g NaHCO ₃
(DMEM) (2x)	auf 1 l
d. RPMI1640	10,50 g RPMI 1640
	2,20 g NaHCO ₃
	0,15 ml HCl (37 %)
	auf 1 l

Material

Die gebrauchsfertigen Medien wurden mit 2 mM sterilfiltriertem L-Glutamin und 100 U/ml Gentamycin versetzt. RPMI1640 und DMEM enthielten 10 % bei 56°C hitzeinaktiviertes FKS. IMDM und GMEM wurde je nach Verwendungszweck 5-10 % hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum zugegeben .

e. T-Zellmedium	IMDM
	2 mM L-Glutamin
	100 U/ml Gentamycin
	5 % syngenes Rattenserum
	5 % Concavalin A-Überstand
	5 x 10 ⁻⁵ M β-Mercaptoethanol

f. Einfriermedium	IMDM
	2 mM L-Glutamin
	100 U/ml Gentamycin
	20 % FKS
	10 % DMSO

g. BFA 38 (2x)	0,016 g Phenolrot
	6,40 g NaCl
	0,40 g KCl
	0,20 g MgSO ₄
	0,20 g CaCl ₂
	0,14 g NaH ₂ PO ₄
	2,75 g NaHCO ₃
	4,50 g Glucose
	0,59 g L-Glutamin
	2,95 g Tryptose-Phos.
	1,0 ml Eisennitrat 0,01 %
	5,0 ml Inositol
	40,0 ml Aminosäuren (50x)
	200 ml Vitamine (100x)
	auf 1 l

Material

h. LB-Medium, pH 7,5	10,0 g Bactotryptone 5,0 g Bacto-Yeastextrakt 5,0 g NaCl auf 1 l
i. 2YT-Medium, pH 7,0	16,0 g Trypton 10,0 g Yeastextrakt 5,0 g NaCl auf 1 l
k. SOC-Medium	12,0 g Trypton 5,0 g Yeastextrakt 0,5 g NaCl 250 mM KCl mit Aqua dest. auf 900 ml auffüllen pH auf 7,0 einstellen autoklavieren 10 ml 1 M MgCl ₂ und 20 ml 1 M Glucose zugeben

3.9.1 Medienzusätze

Concavalin A Überstand

10^7 Milzzellen der Maus wurden für 24 Stunden in IMDM/0,1 % Mäuseserum mit Zusatz von 5 µg/µl Concavalin A kultiviert. Der Überstand wurde abgenommen und die Interleukin-2-Aktivität im CTLL-Bioassay getestet. Bis zur Verwendung wurde der Überstand bei -20°C gelagert.

Uns wurde dieser Überstand von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. R. M. Zinkernagel, Zürich, zur Verfügung gestellt.

3.10 Lösungen und Puffer

- a. PBS-A
- 8,00 g NaCl
 - 0,20 g KCl
 - 1,15 g Na₂HPO₄
 - 0,20 g KH₂PO₄
 - auf 1 l
- b. PBS
- 8,00 g NaCl
 - 0,20 g KCl
 - 1,15 g Na₂HPO₄
 - 0,20 g KH₂PO₄
 - 0,13 g CaCl₂
 - 0,10 g MgCl₂
 - auf 1 l
- c. PBS/Tween-20
- 2,0 l PBS
 - 1,0 ml Tween-20
- d. BSS
- 8,00 g NaCl
 - 0,40 g KCl
 - 0,20 g MgSO₄ x 7H₂O
 - 0,20 g MgCl₂ x 6H₂O
 - 0,06 g KH₂PO₄
 - 0,24 g Na₂HPO₄ x 2H₂O
 - Phenolrot
 - auf 1 l, pH 7,2
- e. Versen-Trypsin
- 8,00 g NaCl
 - 0,20 g KCl
 - 1,15 g Na₂HPO₄
 - 0,20 g KH₂PO₄
 - 1,25 g Trypsin
 - 1,25 g Versen
 - auf 1 l

3.10.1 Zellkultur

Trypanblau-Lösung	0,25 % Trypanblau in 0,15 M NaCl
HBS, pH 7,4	20 mM Hepes 150 mM NaCl
Lyse-Puffer	0,1 % SDS 0,5 % DOC 1 % Triton-X-100 in PBS

3.10.2 Aufreinigung von Immunglobulinen

Phosphat-Puffer (0,02 M, pH 7,0)	57,7 ml 0,2 M Na_2HPO_4 42,3 ml 0,2 M NaH_2PO_4 auf 1l pH einstellen
Elutionspuffer (0,1 M Glycin-HCl, pH 2,7)	7,507 g Glycin 8,7 ml 2M HCl auf 1 l pH einstellen

3.10.3 Isolierung von Gehirnlymphozyten

Enzymgemisch	100 ml BSS 0,24 g Hepes 50 mg Collagenase D 1 mg DNase I 2 µl Trypsininhibitor
--------------	--

Material

Gradientenmedium	75 % Ficoll 25 % RPMI1640, 10 %FKS 0,24 g Hepes/100 ml RPMI
------------------	---

3.10.4 Aufreinigung rekombinanter Proteine

STE-Puffer	150 mM NaCl 50 mM Tris 1 mM EDTA
Elutionspuffer	10 mM Glutathion in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0

3.10.5 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese und Western Blot-Analyse

Trenngel (12,5%)	5,2 ml Acrylamid 50 %/Bisacrylamid 0,8 % 2,0 ml Resolving-Puffer 3,0 ml 8 M Harnstoff 0,1 ml 10 % SDS 10 µl TEMED 225 µl 3 % SDS
Sammelgel	0,6 ml Acrylamid 50 %/Bisacrylamid 1,5 % 0,25 ml Spacer-Puffer 25 µl 10 % SDS 1,5ml 8 M Harnstoff 2,5µl TEMED 75µl 3% APS

Material

Elektrophorese-Puffer	144 g Glycin 30 g Tris 5 g SDS mit Aqua bidest. auf 5 l auffüllen
Probenpuffer	5,0 ml 8 M Harnstoff 2,0 ml Spacer-Puffer 1,0 ml 20% SDS 0,5 ml β -Mercaptoethanol 1,5 ml Glycerin 0,08 ml Bromphenolblau
Semi-Dry-Blotpuffer	5,80 g Tris 2,90 g Glycin 0,37 g SDS 200 ml Methanol mit Aqua bidest. auf 1 l auffüllen
Substrat-Lösung	10 ml PBS 2 ml 4-Chloro-Naphtol in Methanol (0,3 g/100 ml) 5 μ l H_2O_2
Resolving-Puffer	181,5 g Tris 240 ml 1M HCl mit Aqua bidest. auf 500 ml auffüllen
Spacer-Puffer	0,6 M Tris, pH 6,7 pH mit H_3PO_4 einstellen

3.10.6 Durchflusszytometrie

FACS-Puffer	PBS-A 2 % FKS 0,2 % Natriumazid
-------------	---------------------------------------

3.10.7 Plasmidisolierung

TE-Puffer, pH 8,0	10 mM Tris 0,1 mM EDTA
TENS-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 0,1 m NaOH 1 mM EDTA, pH8,0 20% SDS
TAE-Puffer (10x), pH7,8	12,1 g Tris 6,8 g Natriumacetat 1,8 g EDTA auf 1 l pH mit konz. Essigsäure einstellen
Agaroseplatten	28 g Nähragar 1 l Aqua dest.

3.10.8 Sequenzierung

TBE-Puffer (10x)	0,9 M Tris 0,9 M Borsäure 50 mM EDTA
Bio Rad Acrylamid-Gele	21 g Harnstoff 20 ml Aqua dest. 8,4 ml Acrylamid 30 % 6 ml TBE (10x) 350 µl 10 % APS 15 µl Temed

3.10.9 Färbung BDV-infizierter Zellen

Substratlösung	25 mM Zitronensäure
	50 mM Na ₂ HPO ₄
	0,4 % Ortho-phenylendiamin (OPD)
	0,5 µl H ₂ O ₂ (30 %)/ml

3.10.10 Vaccinia Plaque-Assay

Kristallviolett	250 ml Formalin
	7,5 g Kristallviolett in 50 ml Ethanol
	700 ml Aqua bidest.

3.11 Chemikalien

Acrylamid (für SDS-Page)	Roth, Karlsruhe
Acrylamid (für Sequenzier-Gel)	Bio-Rad, München
Äther	Riedel-de-Haen, Seelze
Agarose	GibcoBRL, Eggenstein
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Roche, Mannheim
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Bluo-Gal	Life Technologies, Karlsruhe
Bromodeoxyuridin (BrdU)	Roche, Mannheim
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA (Rinderserumalbumin)	Serva, Heidelberg
Chloroform	Roth, Karlsruhe
4-Chloro-1-Naphtol	Merck, Darmstadt
CultiSpher-S	Integra, Fernwald
Deoxycholat (DOC)	Merck, Darmstadt

Material

Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dinatriumcarbonat (Na_2CO_3)	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck, Darmstadt
DMEM	GibcoBRL, Eggenstein
1,4 Dithiothreitol (DTT)	Roche, Mannheim
Dosper, Transfektionsreagenz	Roche, Mannheim
ECL Lösung	Pharmacia, Freiburg
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roche, Mannheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Formalin	Roth, Karlsruhe
Formamid	Sigma, Deisenhofen
Ficoll Paque	Pharmacia, Freiburg
Freundsches Adjuvans	Sigma, Deisenhofen
Gentamycin	Serva, Heidelberg
Glucose	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Merck, Darmstadt
Glutathion	Sigma, Deisenhofen
Glutathion Sepharose 4B	Pharmacia, Freiburg
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Scharlau, Barcelona (E)
GMEM	GibcoBRL, Eggenstein
Harnstoff	Merck, Darmstadt
Hepes	Serva, Heidelberg
IMDM	GibcoBRL, Eggenstein
Isopropyl- β -D-thiogalactosidase (IPTG)	Roth, Karlsruhe
KCl	Roth, Karlsruhe
Kristallviolett	Merck, Darmstadt
Loading Puffer für Sequenzier Gele	Bio Rad, München
Lympholyte®-Rat	Camon, Wiesbaden
Methanol	Roth, Karlsruhe
Methocel	Sigma, Deisenhofen
NaCl	Roth, Karlsruhe

Material

Nähragar	Difco Laboratories, Michigan (USA)
Natriumazid (NaN_3)	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Natriumhydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	Merck, Darmstadt
Neomycin (G 418)	Roche, Mannheim
N-Larylsarcosine	Sigma, Deisenhofen
Ortho-PermeaFix	Ortho, Neckargemünd
Ortho-phenylendiamin (OPD)	Sigma, Deisenhofen
Paraformaldehyd (PFA)	Serva, Heidelberg
Pefablock	Roche, Mannheim
Pepstatin	Roche, Mannheim
Phenylmethylsulfonyl-Fluorid (PMSF)	Roche, Mannheim
Protein A Sepharose (4 Fast Flow)	Pharmacia, Freiburg
RNAse-Inhibitor	Pharmacia, Freiburg
RPMI1640	GibcoBRL, Eggenstein
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Titermax Gold™ Adjuvans	Sigma, Deisenhofen
Tris	GibcoBRL, Eggenstein
Triton-X-100	Serva, Heidelberg
Trizol	Life Technologies, Karlsruhe
Trypanblau	Serva, Heidelberg
Trypton	Difco Laboratories, Michigan (USA)
Tween-20	Serva, Heidelberg
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt
X-Gal	Roche, Mannheim
Yeastextrakt	Difco Laboratories, Michigan (USA)
Zitronensäure	Merck, Darmstadt

3.12 Radiochemikalien

Natriumchromat (^{51}Cr)

(Aktivität: 200-500mCi/mg)

Amersham, Braunschweig

3.13 Verbrauchsmaterial

Einwegspritzen, Kanülen

Einfrierröhrchen

Filterpapier

Glaswaren

Hyperfilm ECL

Polariodfilm 667

S&S Faltenfilter, Ø500mm

Teflonfolie

Zellkulturplastikwaren

Braun, Melsungen

Nunc, Wiesbaden

Schleicher&Schüll, Dassel

Schott, Mainz

Pharmacia, Freiburg

Polaroid, St.Albanus (UK)

Schleicher&Schüll, Kassel

Millipore, Eschborn

Greiner, Nürtingen

3.14 Geräte und Laborhilfsmittel

3.14.1 Zentrifugen

Tischzentrifugen 5415 / 5417R

Minifuge 2

Omnifuge 2.0 RS

Ultrazentrifuge Beckman L8-55

Eppendorf, Hamburg

Heraeus, Hanau

Heraeus, Hanau

Beckman, Stuttgart

3.14.2 Rotoren

JA-10, JA-17

Beckman, Stuttgart

3.14.3 Weitere Geräte

ABI-PRISM 377 DNA Sequenzer

Perkin Elmer, Weiterstadt

Begasungsbrutschrank

Heraeus, Hanau

Cellspin System

Integra, Fernwald

„Cryo1 Freezing Container“ Einfrierbox

Nalgene, Hamburg

Digital-pH-Meter

Bachofer, Reutlingen

FACS Gerät „FACSCalibur“

Becton Dickinson, Heidelberg

Gamma-Counter „Cobra“

Canberra-Packard, Dreieich

Horizontal-Elektrophoresekammer

JLU Gießen

Inkubationschüttler, -wippe

Fa. Edmund Bühler, Tübingen

Magnetrührer Heidolph 3001

Heidolph, Kehlheim

Mikroskope

Leitz, Wetzlar

Mini-Protean II Gelapparatur

Bio-Rad, München

Powersupplier

Shandon, London

Spectrophotometer DU-40

Beckman, Stuttgart

Speed Vac-Concentrator

Bachofer, Reutlingen

Sterilbank LaminAirHB 2472

Heraeus, Hanau

Thermocycler UNO

Biometra, Göttingen

Thermomixer comfort

Eppendorf, Hamburg

Ultraschallgerät Cell Disruptor B 15

Branson, Dietzenbach

Ultraschallgerät Sonifier B 12

Branson, Dietzenbach

Waage Mettler PE 200

Mettler Toledo, Gießen

4. METHODEN

4.1 Zellkultur

4.1.1 Kultivierung von Zellen

Die Zelllinien LEW, CRL1405, YAC und 143tk⁻ sowie die Hybridomzellen wurden in IMDM/5 % FKS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Gentamycin kultiviert. Für die Erhaltung von BHK21 Zellen wurde GMEM/5 % FKS, 2 mM L-Glutamin und 100 U/ml Gentamycin verwendet.

Sobald die adherent wachsenden Zellen einen Monolayer gebildet hatten, wurde das Wachstumsmedium abgesaugt und 1-3 ml Versen-Trypsin zugegeben. Die Zellen wurden mit dem proteolytischen Enzym Trypsin, das die für die Zelladhäsion wichtigen Proteine spaltet, etwa fünf Minuten inkubiert. Nachdem die Zellen sich abgerundet und vom Boden gelöst hatten, wurden sie in IMDM/5 %FKS resuspendiert und anschließend im Verhältnis 1:5 bis 1:20, je nach Zellart und weiterem Verwendungszweck, umgesetzt.

Die in Suspension wachsenden Hybridomzellen und YAC Zellen wurden alle vier Tage durch Zugabe von frischem Medium 1:10 ausverdünnt.

Kultiviert wurden die Zellen in Inkubatoren bei 37°C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchte.

4.1.2 Kultivierung von adherent wachsenden Zellen auf Microcarriern

Um Zellen in größeren Mengen zu gewinnen, wurden sie auf porösen Gelatineträger (Cultispher-S) gezüchtet. Die Trägermoleküle mit Zellen wurden durch ein Rührsystem (Cellspin System) in Suspension gebracht. Hierzu wurden nicht infizierte und persistent BDV-infizierte LEW Zellen verwendet.

1 g Cultispher-S wird für einen Zellkulturansatz von einem Liter benötigt. Die

Microcarrier müssen vor der Verwendung für eine Stunde in PBS-A aufquellen (1 g in 50 ml) und anschließend autoklaviert werden. Nach dem Abkühlen werden die Microcarrier entweder bei 4°C für bis zu vier Wochen gelagert oder mehrmals mit Zellkulturmedium gewaschen und direkt in der Zellkultur eingesetzt.

Für einen Ansatz von einem Liter wurden 5×10^7 - 1×10^8 Zellen benötigt. Die Zellen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und zunächst mit der Hälfte des benötigten Mediums (IMDM/10 % FKS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Gentamycin) und den Microcarriern in eine Rührflasche mit einem Volumen von zwei Litern gegeben. Innerhalb der nächsten zwölf Stunden wurde die Flasche ohne Rührplatte im Brutschrank kultiviert, um den Zellen das Adhieren auf den Gelatinekugeln zu ermöglichen. Dann wurden die Flaschen auf einen Liter aufgefüllt und für die nächsten sechs bis zehn Tage unter ständigem Rühren (30-40 rpm/Minute) kultiviert. Jeden Tag wurde 1 ml Zellsuspension entnommen, durch Trypsinieren wurden die Gelatinekugeln aufgelöst und lichtmikroskopisch Zellzahl und Vitalität der Zellen überprüft. Wenn keine Zunahme der Zellzahl mehr feststellbar war, wurden die Zellen geerntet. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Microcarrier wurden in ein Becherglas überführt und die Gelatine durch eine 45-minütige Inkubation mit 50 ml auf 37°C erwärmtem Versen-Trypsin unter ständigem Rühren aufgelöst. Die Zellzahl wurde bestimmt, die Zellen pelletiert und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

4.1.3 Einfrieren von Zellen

3×10^6 Zellen wurden in eiskaltem Einfriermedium resuspendiert und in Einfrierröhrchen transferiert. Diese wurden in einer Einfrierbox bei einer Temperaturreduktion von 1°C/Minute eingefroren und anschließend bei -70°C bzw. in flüssigem Stickstoff gelagert.

4.1.4 Auftauen von Zellen

Die bei -70°C oder in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden schnell bei 37°C aufgetaut. Zu den aufgetauten Zellen wurde tropfenweise 10 ml kaltes Wachstumsmedium gegeben, um das im Einfriermedium enthaltene DMSO auszuverdünnen. Die Zellen wurden sofort zehn Minuten bei $200 \times g$ zentrifugiert und anschließend in frischem Medium aufgenommen und zur Kultivierung ausgesät.

4.1.5 Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen

Aus einer Einzelzellsuspension wurde ein Aliquot entnommen und mit Trypanblau-Lösung gemischt. Lebende, d.h. ungefärbte Zellen, wurden anschließend in der Neubauer Zählkammer ausgezählt. Die Zellzahl pro ml Suspension ergab sich aus dem Produkt der Zellzahl in 16 Kleinstquadraten, dem Kammerfaktor (10^4) und dem Verdünnungsfaktor.

4.1.6 Transfektion von Zellen

4.1.6.1 *Transfektion mit Dosper*

Das kationische Liposom Dosper interagiert mit DNA unter Bildung von Liposomen/Polynukleotid-Komplexen, die über Endozytose in die Zellen aufgenommen werden.

Je $2,5 \times 10^5$ der zu transfizierenden LEW Zellen wurden in ein Well einer 6-Well-Platte ausgesät und über 24 Stunden kultiviert. Dann wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und es wurde 1 ml frisches Wachstumsmedium (IMDM/5 % FKS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Gentamycin) zugegeben.

1,5 μg DNA in einem Volumen von 5 μl TE-Puffer und 6 μl des Transfektionsreagenzes Dosper wurden in 50 μl sterilem HBS aufgenommen.

Beide Lösungen wurden gemischt, für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend tropfenweise zu den Zellen gegeben. Die Zellkulturplatten wurden für sechs Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Medium abgesaugt und durch 3 ml frisches Wachstumsmedium ersetzt. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen trypsinisiert und im Verhältnis 1:1 gesplittet. Am dritten Tag nach der Transfektion konnte die transiente Expression in den Zellen beurteilt werden. Um eine stabile Expression zu erreichen, wurden die Zellen anschließend mit antibiotikahaltigem Selektionsmedium kultiviert. Zur Selektion wurde das Antibiotikum G418 (Neomycin) in einer Konzentration von 600 µg/ml Medium eingesetzt.

4.1.6.2 Transfektion mit Effectene

Die negativ geladene DNA wird durch die Interaktion mit einem positiv geladenen „Enhancer“ kondensiert und anschließend mit dem kationischen, nicht-liposomalen Lipid Effectene umhüllt. Die Komplexe können über Endozytose in die Zellen aufgenommen werden.

Je $2,5 \times 10^5$ 143tk⁻ Zellen wurden in die Wells in einer 6-Well-Platte ausgesät. Nach 24-stündiger Kultivierung wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und die Wells mit 1,6 ml Wachstumsmedium befüllt (IMDM/5 % FKS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Gentamycin).

0,4 µg DNA wurde in 100 µl „Puffer EC“ aufgenommen, mit 3,2 µl „Enhancer“ gemischt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 20 µl Effectene zugegeben, die Lösung wurde wieder gemischt und zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden 600 µl Wachstumsmedium zu der Lösung pipettiert und der vollständige Ansatz tropfenweise zu den Zellen gegeben und diese anschließend bei 37°C inkubiert.

4.1.7 Herstellen eines Zelllysats

Es wurden 20 %ige Lysate aus nicht infizierten und mit Vaccinia-Virus infizierten 143tk⁻ Zellen hergestellt. Die Zellen wurden trypsiniert und bei 500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet gewogen, in Lyse-Puffer resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde RNase A zugegeben (1 µg/100µl Lyse-Puffer) und der Ansatz während 20 Minuten bei 37°C in einem Heizblock inkubiert. Das Lysat wurde für 30 Sekunden beschallt und danach bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde in der Western Blot-Analyse überprüft und das Pellet verworfen.

4.1.8 Produktion monoklonaler Antikörper im Kulturüberstand von Hybridomzellen

Kulturen von stabilen Hybridomzellen wurden in IMDM/10 % FKS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Gentamycin kultiviert. Zur Antikörperproduktion wurden 10⁸ Zellen in eine 175 cm²-Flasche transferiert und mit frischem Medium (IMDM ohne FKS) auf 250 ml aufgefüllt. Die Zellen wurden über ihre exponentielle Wachstumsphase hinaus kultiviert, bis etwa 30-50 % der Zellen zugrunde gegangen waren. Dann wurde der Überstand, in dem sich die Antikörper befanden, während 20 Minuten bei 6000 rpm zentrifugiert und dann, bis zur weiteren Verwendung, bei -20°C gelagert.

4.1.8.1 Reinigung monoklonaler Antikörper

Der bei -20°C gelagerte Zellkulturüberstand wurde nach dem Auftauen mit 1 ml Triton-X-100/l versetzt, um noch intakte Zellen aufzuschließen. Anschließend wurde der Überstand für 20 Minuten bei 6000 rpm zentrifugiert und über einen Papierfilter gegeben, um Zelltrümmer zu entfernen.

Ein bis zwei Liter des Überstandes wurden dann in einer Flussgeschwindigkeit von 0,8 ml/Minute über eine Protein A-Sepharose-Säule gegeben. Die Flussgeschwindigkeit wurde durch eine Peristaltikpumpe bestimmt, an welche die Säule angeschlossen war. Anschließend wurde die Säule mit 100 ml 0,02 M Phosphatpuffer gespült. Um die Antikörper zu eluieren wurden 5,0 ml 0,1 M Glycinpuffer über die Säule gegeben und das Eluat in zehn getrennten Fraktionen aufgefangen. Um die Antikörper zu schonen wurde das Eluat sofort neutralisiert, indem in die Eppendorfgefäße, die zum Auffangen der Fraktionen verwendet wurden, 50 µl

1 M Tris, pH 9,0 vorgelegt wurde. Die Fraktionen, in welchen sich die Antikörper befanden, wurden photometrisch ermittelt. Über den gemessenen OD_{280nm}-Wert wurde die Antikörperkonzentration nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{OD}_{280\text{nm}} \times 0,8 = \text{Proteinkonzentration in mg/ml}$$

Die Antikörper wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

4.2 Gewinnen von BDV aus Rattengehirnen und Herstellung eines Virusstocks

Lewis Ratten wurden im Alter von fünf Wochen intracerebral mit 5×10^3 FFU BDV 3p (dritte Passage in Ratten, Stamm He/80) infiziert. Nach 28 Tagen wurde den Tieren das Gehirn entnommen und eine 10 %ige Suspension in GMEM/2 % FKS mittels Ultraschall hergestellt. Die Suspension wurde bei 1000 x g zentrifugiert, der Überstand wurde aliquotiert und bei -70°C eingefroren. Der Virustiter wurde in der Virustitration bestimmt.

Um BDV-spezifisches Antigen (AG) für die Western Blot-Analyse herzustellen, wurden Ratten mit BDV 4p infiziert. Die Tiere wurden in prämoribundem

Zustand getötet und die Gehirne auf die gleiche Art weiterverarbeitet, wie oben beschrieben. Eine Virustitration wurde hierfür nicht durchgeführt.

4.3 Infektion von Ratten mit BDV

Die Infektion von Ratten erfolgte mittels einer Injektion von 50 µl Virusverdünnung von BDV 4p in den Lobus frontalis der linken Gehirnhemisphäre. Es wurden hierzu 5×10^3 FFU Virus eingesetzt.

4.3.1 Beurteilung klinischer Symptome

Der Gesundheitszustand BDV-infizierter Ratten wurde täglich mit demjenigen von nicht infizierten Kontrolltieren verglichen. Die klinischen Krankheitssymptome der infizierten Tiere wurden, abhängig vom allgemeinen Gesundheitszustand und der neurologischen Ausfallerscheinungen, nach folgenden Kriterien in eine Skala von 0 bis 3 eingeteilt.

Stufe 0	ohne besonderen Befund
Stufe 1	leicht gestörtes Allgemeinbefinden, gesträubtes Fell und mangelhafte Fellpflege, leichte Bewegungsinkoordination, leichter Gewichtsverlust
Stufe 2	stark gestörtes Allgemeinbefinden, deutliche Inkoordination und Ataxien, starker Gewichtsrückgang
Stufe 3	Paresen, Paralysen, z.T. Festliegen der Tiere, moribunder Zustand

4.4 Infektion von Ratten mit Vaccinia Virus

Die Infektion erfolgte mittels einer Injektion von 10^7 PFU Virus in die Schwanzvene der Tiere. Es wurden zwischen 50 µl und 500 µl Virussuspension verwendet.

4.5 Immunisierung von Ratten

4.5.1 Intraperitoneale Immunisierung

Das zu verabreichende Antigen wurde mit BSS auf ein Volumen von 250 µl aufgefüllt und mit 250 µl des jeweiligen Adjuvans so lange durch Vortexen gemischt, bis eine stabile Wasser-in-Öl-Emulsion entstanden war. Die Emulsion wurde den Ratten seitlich der Medianen in die Bauchhöhle injiziert.

4.5.2 Subkutane Immunisierung

Das Antigen wurde vorbereitet, wie in 4.5.1 beschrieben. Die Emulsion wurde den Tieren, auf mehrere Stellen verteilt, unter die Haut der Nackenregion appliziert.

4.5.3 Immunisierung in den Fuß

Das Antigen wurde mit BSS auf 200 µl aufgefüllt, mit der selben Menge Adjuvans gemischt, und wie in 4.5.1 beschrieben, verarbeitet. Dann wurde den Tieren je 200 µl der Emulsion tief subkutan, plantar, in beide Hinterpfoten injiziert.

4.6 Isolierung von Rattenlymphozyten

4.6.1 Isolierung von Lymphozyten aus dem Rattengehirn

Mit Äther tief narkotisierten Ratten wurde der Thorax eröffnet und die Vena cava durchtrennt. Anschließend erfolgte die Perfusion der Ratten mit 50 ml BSS über den linken Herzventrikel. Das Gehirn wurde freipräpariert und mit Hilfe eines Stahlsiebs und eines Spritzenstempels mechanisch zerkleinert. Anschließend erfolgte der Verdau der Gehirnsuspension in 25 ml Enzymgemisch während einer Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler. Danach konnten größere Zellverbände der Suspension während einer halben Stunde sedimentieren. Der Überstand wurde abgenommen und für fünf Minuten bei 200 x g zentrifugiert. Es folgte das Resuspendieren des Pellets in PBS-A (10 ml/Gehirn). 10 ml Gradientenmedium wurden mit 5 ml Suspension überschichtet und für 30 Minuten bei 500 x g zentrifugiert. Die im Pellet befindlichen Lymphozyten wurden in PBS-A resuspendiert und zweimal gewaschen, in T-Zell-Medium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

Sollten die Lymphozyten im Zytotoxizitätstest eingesetzt werden, wurden je 3×10^6 Zellen in 1 ml T-Zell-Medium in ein Well einer 24-Well-Platte ausgesät und über Nacht bei 37°C kultiviert. Die Wells wurden am folgenden Tag sorgfältig ausgespült, die Zellen zweimal mit BSS gewaschen, gezählt, auf die benötigte Konzentration eingestellt und auf BDV-spezifische Lyse untersucht.

4.6.2 Isolierung von Lymphozyten aus der Milz

Die Ratten wurden getötet, die Milzen entnommen und mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein Stahlsieb passiert, um eine Einzelzellsuspension herzustellen. Die vereinzelter Zellen wurden in BSS aufgenommen, während fünf Minuten bei 500 x g zentrifugiert und das Pellet in 10 ml IMDM/2 %FKS aufgenommen. Anschließend konnten größere Zelltrümmer während 30 Minuten

sedimentieren. Das entstandene Pellet wurde mit Hilfe einer Pasteurpipette abgesaugt und verworfen. Die Suspension wurde danach wieder auf 10 ml aufgefüllt, und die Zellzahl wurde bestimmt.

Milzzellen, die *in vitro* restimuliert oder als Feederzellen in der *in vitro* Restimulation eingesetzt werden sollten, wurden anschließend mit einem Lympholyte®-Rat Gradienten (Zentrifugation für 20 Minuten; 1000 x g; Raumtemperatur) aufgereinigt. Die Lymphozyten, die sich in der Interphase befanden, wurden mittels einer Pasteurpipette abgesaugt und in ein frisches Röhrchen überführt, zweimal mit BSS gewaschen und nach Bestimmung der Zellzahl in T-Zell-Medium aufgenommen und in einer 24-Well-Platte ausgesät.

4.6.3 Isolierung von Lymphozyten aus den poplitealen Lymphknoten

Hierzu wurden subkutan in die Fußsohlen (i.f.) immunisierte Ratten getötet, die poplitealen Lymphknoten wurden entnommen und zur Herstellung einer Einzelzellsuspension über Stahlnetze passiert. Die Zellen wurden zweimal mit BSS gewaschen und anschließend mit Hilfe eines Lympholyte®-Rat Gradienten (Zentrifugation für 20 Minuten; 1000 x g; Raumtemperatur) angereichert. Die in der Interphase befindlichen Lymphozyten wurden in frische Röhrchen überführt, abzentrifugiert und noch zweimal mit BSS gewaschen. Die Zellzahl wurde bestimmt und die Zellen in T-Zell-Medium aufgenommen.

4.7 *In vitro* Restimulation von Lymphozyten der Lewis Ratte

4.7.1 Präparation der zur Antigenpräsentation eingesetzten Zellen (Feederzellen)

Für die *in vitro* Restimulation von Lymphozyten wurden entweder LEW Zellen eingesetzt, die nicht-infiziert, persistent mit BDV infiziert oder mit Peptid beladen waren oder es wurden Milzzellen von Lewis Ratten verwendet. Die Milzzellen wurden entweder unbehandelt oder mit Peptid beladen im Test eingesetzt.

Die LEW Zellen wurden in einer Konzentration von $1 \times 10^6/\text{ml}$ in T-Zell-Medium aufgenommen, die Milzzellen in einer Konzentration von $5 \times 10^6/\text{ml}$ und in einer $^{51}\text{Cäsium}$ quelle mit 3000 rad bestrahlt. Die Zellen waren dadurch in ihrer Proliferation gehindert, wobei die Fähigkeit zur Antigenpräsentation nicht eingeschränkt wurde.

Anschließend wurden die LEW Zellen in einer Konzentration von 2×10^5 Zellen/Well, die Milzzellen in einer Konzentration von $1 \times 10^6/\text{Well}$ in einer 24-Well-Platte ausgesät und auf ein Volumen von 500 μl aufgefüllt.

4.7.2 *In vitro* Restimulation

Lymphozyten wurden entweder aus der Milz oder den poplitealen Lymphknoten immunisierter Lewis Ratten gewonnen und in einer Konzentration von $2 \times 10^6/\text{ml}$ in T-Zell-Medium aufgenommen. 500 μl dieser Zellsuspension wurden zu den vorbereiteten Feederzellen gegeben.

Die Kultivierung erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C , 5 % CO_2 und 90 % Luftfeuchte. Die Dauer der Restimulation lag zwischen sechs und acht Tagen. Nach Ablauf der Restimulationsperiode wurden die Zellen aus den einzelnen Ansätzen entnommen und einmal mit BSS gewaschen.

4.8 Zytotoxizitätstest

Dieser funktionelle Test dient dem Nachweis der spezifischen zytotoxischen Aktivität von Lymphozyten. Zytotoxische T-Zellen werden mit Zielzellen inkubiert, die radioaktiv markiert sind. Bei der Lyse der Zielzellen wird Radioaktivität freigesetzt, die im Zellüberstand gemessen werden kann.

In diesem Test wurden frisch isolierte oder in vitro restimulierte Lymphozyten, die aus den Gehirnen oder lymphatischen Organen von Lewis Ratten stammten, als Effektoren eingesetzt.

Die Markierung der Zielzellen erfolgte durch Inkubation mit 0,2 mCi ^{51}Cr bei 37°C während einer Stunde. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit BSS gewaschen, um im Überstand vorliegendes ^{51}Cr zu entfernen. Während der einstündigen Inkubationszeit wurde in einer 96-Well-Rundbodenplatte eine 1:3 Verdünnungsreihe der Effektorzellen über vier Stufen hergestellt. Hierzu wurden in den Wells zwei bis vier jeweils 100 µl Medium vorgelegt und in das erste Well 150 µl Effektorzellen pipettiert. Aus der ersten Reihe wurden 50 µl in die zweite Reihe überführt, mehrmals gemischt, 50 µl in die nächste Reihe überführt und der Vorgang entsprechend wiederholt. Zu den so verdünnten Effektoren wurden dann 100 µl der mit ^{51}Cr markierten Zielzellen gegeben.

Zur Feststellung der maximalen ^{51}Cr -Freisetzung wurde in vier Wells je 100 µl Zielzellsuspension mit 1 N HCl inkubiert und zur Messung der spontanen Freisetzung des Chroms in vier Wells die entsprechende Menge Zielzellen nur mit Medium kultiviert.

Die Mikrotiterplatten wurden drei Minuten bei 500 x g in einer Plattenzentrifuge zentrifugiert und anschließend über zehn Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden pro Ansatz 50 µl des Zellüberstandes abgenommen, in Zählröhrchen überführt und das freigesetzte ^{51}Cr im Gamma-Counter gemessen.

Die spezifische Lyse der Zielzellen errechnete sich nach folgender Formel:

$$\frac{\text{cpm Effektor} - \text{cpm Medium}}{\text{cpm Maximal} - \text{cpm Medium}} \times 100 = \% \text{ spezifische Lyse}$$

„Effektor“ steht hierbei für die Anwesenheit der zu testenden Lymphozyten, „Medium“ für die Kontrolle der Zielzellen ohne Effektorzellen zur Feststellung der spontanen ^{51}Cr -Freisetzung. „Maximal“ gibt die maximale ^{51}Cr -Freisetzung aus mit 1 N HCl inkubierten Zielzellen an.

4.8.1 Zytotoxizitätstest mit Peptiden

4.8.1.1 *Markierung von Zielzellen mit synthetischen Peptiden*

Die synthetischen Peptide wurden in einer Konzentration von 1 mg/ml in 10 % bis 100 % DMSO gelöst. 50 µl Medium (IMDM/2 % FKS) wurden auf einer 96-Well-Rundbodenplatte vorgelegt und eine 1:10 Verdünnung des jeweiligen Peptids über drei bis acht Stufen durchgeführt. Hierzu wurde in das erste Well 5 µl Peptid-Suspension gegeben, gemischt, 5 µl in das zweite Well überführt, u.s.w.. Zu den vorbereiteten Peptidverdünnungen wurden 1×10^4 mit ^{51}Cr markierte NL-LEW Zellen in einem Volumen von 50 µl pipettiert. Die Platten wurden über 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurden 3×10^4 Effektorzellen in einem Volumen von 100 µl zugegeben, so dass ein Effektor:Zielzell-Verhältnis von 30:1 bestand. Sollten Zielzellen mit dem Standardpeptid 9048 markiert werden, wurden 2×10^6 NL-LEW Zellen mit 1 µg Peptid während der ^{51}Cr -Markierung, in einem Gesamtvolumen von 500 µl, inkubiert.

4.8.1.2 Markierung von Zielzellen mit HPLC-Fractionen

50 µl der zu testenden Fraktion wurde entnommen, in der Speed Vac bis auf 5 µl konzentriert, mit Medium (IMDM/2 %FKS) auf 50 µl aufgefüllt und dann in die Vertiefung einer 96-Well-Rundbodenplatte pipettiert. Anschließend wurden 1×10^4 mit ^{51}Cr -markierte Zellen, in einem Volumen von 50 µl, zugegeben und die Platte über 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Effektoren in einem Volumen von 100 µl dazu pipettiert.

4.9 Arbeiten mit Vaccinia Viren

4.9.1 Gewinnung von Vaccinia Virus

BHK21 Zellen wurden in 175 cm² Zellkulturflaschen ausgesät und bei 37°C inkubiert bis der Zellmonolayer 70 % konfluent war. Anschließend erfolgte die Infektion der Zellen mit einem MOI von 0,1 in einem Volumen von 10 ml. Nach zwei Stunden Inkubation bei 37°C wurden die Zellkulturflaschen auf 50 ml aufgefüllt und für weitere 48 Stunden kultiviert. Nach der Inkubation wurde der Zellkulturüberstand abgesaugt und die Zellen wurden mit Versen-Trypsin vom Boden der Kulturflasche gelöst und mittels Ultraschall lysiert. Das Lysat wurde für zehn Minuten in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und der Überstand, welcher das Vaccinia Virus in einer hohen Konzentration enthielt, bei -70°C gelagert. Der Virustiter wurde mit Hilfe des Plaque Assays ermittelt.

4.9.2 Vaccinia Virus-Infektion von Zellen auf Microcarriern

LEW Zellen wurden über acht Tage auf Microcarriern kultiviert, dann wurde das Rührsystem, das die Microcarrier in Suspension hält gestoppt. Sobald die Zellen abgesunken waren, wurde das Medium bis auf 200 ml abgesaugt. Das

Virus wurde zugegeben (MOI 5) und das Rührsystem wieder gestartet. Die Zellen wurden für weitere 18 Stunden bei 37°C kultiviert und anschließend geerntet.

4.9.3 Herstellung rekombinanter Vaccinia Viren

Rekombinante Vaccinia Viren wurden mit Hilfe des Vektors pSC11.3 hergestellt, der für die virale Thymidin Kinase und den Reporter lacZ aus Escherichia coli codiert. Die homologe Rekombination mit Vaccinia-Wildtyp wird über das Thymidin Kinase-Gen, das unter der Kontrolle des Vaccinia-Promotors $p_{7,5}$ (früh/spät) steht, ermöglicht. Das Ergebnis sind Thymidin Kinase-negative rekombinante Viren. Das Reportergen lacZ wird durch den Promotor p_{11} (spät) exprimiert.

Thymidin Kinase-negative Zellen (143tk⁻) wurden zuerst mit Vaccinia-Wildtyp Virus infiziert und anschließend mit dem genannten Plasmid transfiziert. Das Nukleosidanalogen BrdU, das Wildtyp-Virus, nicht aber Thymidin Kinase-negative rekombinante Viren schädigt, wurde zur Selektion eingesetzt. Wird BrdU durch die Thymidin Kinase von Vaccinia-Wildtyp phosphoryliert, kann es in das virale Genom integriert werden. Das führt zu schwerwiegenden Mutationen und zum Absterben des Virus. Die erfolgreiche Rekombination konnte durch die Zugabe von Bluo-Gal nachgewiesen werden. Zellen, die mit rekombinanten Viren infiziert sind und die als Folge dessen das lacZ-Gen exprimieren, können diese Substanz zu einem blauen Farbstoff verarbeiten.

4.9.3.1 Infektion mit Vaccinia-Wildtyp und Transfektion

In die Wells einer 6-Well-Platte wurden je $2,5 \times 10^5$ 143tk⁻ Zellen ausgesät und über 24 Stunden kultiviert. Dann wurden die Zellen mit Vaccinia-Wildtyp Virus

mit einem MOI von 0,01 infiziert und über zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit Hilfe des Transfektionsreagenzes Effectene mit 1,5 µg DNA/Well transfiziert.

Am folgenden Tag wurde das Medium abgesaugt und durch frisches Wachstumsmedium ersetzt, das BrdU (25 µg/ml) und Bluo-Gal (240 µg/ml) enthielt. Färbten sich Virus-Plaques durch die Zugabe von Bluo-Gal blau, wurden die Zellen der entsprechenden Wells geerntet, für 30 Sekunden beschallt und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

4.9.3.2 *Plaquereinigung rekombinanter Viren*

Das nach der Rekombination geerntete Zelllysate wurde über fünf Passagen aufgereinigt. Dazu wurden am Vortag auf 24-Well-Platten ausgesäte 143tk⁻ Zellen, in Anwesenheit von BrdU, mit 10er Verdünnungsstufen der Zelllysate infiziert. BrdU wurde noch weiter eingesetzt, um die Vermehrung von eventuell noch vorhandenem Vaccinia-Wildtyp Virus zu verhindern. Nach zwei bis drei Tagen bildeten sich Virusplaques. Wells, in denen sich Plaques befanden, wurden mit einer 1:1 Mischung aus Agarose (2 % in Aqua bidest.) und BFA38 (2x), die Bluo-Gal enthielt (240 µg/ml), überschichtet. Plaques, die sich blau anfärbten, wurden mit Hilfe einer Pasteurpipette abgesaugt, in ein Eppendorfgesäß, in das 100 µl Wachstumsmedium vorgelegt wurden überführt und über Nacht bei 4°C gelagert, um dem Virus die Gelegenheit zu geben, aus der Agarose zu eluieren. Am folgenden Tag wurde die Suspension für 30 Sekunden beschallt. Das geerntete Virus wurde auf 143tk⁻ Zellen vermehrt und dann in weiteren Durchgängen aufgereinigt.

4.10 Virustitration

4.10.1 Titration des Borna Disease Virus

Mit dieser Methode lässt sich infektiöses Virus aus den Organen von Ratten oder Zelllysaten nachweisen. Der Test erfolgte in einer modifizierten Form, nach der Beschreibung von Battegay und Mitarbeitern (Battegay et al., 1991).

Für die Untersuchungen wurden Organe infizierter Lewis Ratten entnommen und in GMEM/ 2 % FKS ein 10 %iges Homogenat hergestellt. Nachdem das Homogenat zehn Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert worden war, wurden davon 1:6 Verdünnungsreihen in GMEM/2 % FKS vorbereitet. Zu jeweils 100 µl der Proben wurden dann in einer 96-Well-Platte 50 µl CRL1405 Zellen (1×10^5 /ml in IMDM/10 % FKS) gegeben. Anschließend folgte eine Inkubation der Platten für drei Stunden bei 37°C, um dem Virus Zeit für die Infektion der Zellen zu geben. Der folgende Overlay bestand aus einer 1:1 Mischung von DMEM (2x)/10 % FKS und Methocel (2 %). Pro Well wurden 150 µl zugefügt. Danach wurden die Platten für weitere sieben Tage in einem Brutschrank (37°C; 5 % CO₂; 90 % Luftfeuchte) kultiviert. Nach der Inkubation wurden die infizierten Zellen immunzytochemisch angefärbt.

Alle folgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur ausgeführt. Der Medium-Overlay wurde entfernt und der Zellmonolayer mit 100 µl 4 %iger PFA-Lösung für 30 Minuten fixiert. Das PFA wurde verworfen und durch 100 µl PBS/1 % Triton-X-100, das die fixierten Zellen permeabilisiert, ersetzt. Nach 30 Minuten wurden die Platten mit PBS gewaschen. Die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte während 60 Minuten mit 100 µl PBS/10 % FKS. Nach zweimaligem Waschen wurden für 60 Minuten 80 µl eines Gemisches monoklonaler BDV-spezifischer Antikörper (mAK-4; 1:100 in PBS/1 % FKS) zugefügt. Der primäre Antikörper wurde nach einem Waschschrift durch 80 µl eines Biotin-markierten anti-Spezies Antikörpers (1:1000 in PBS/1 % FKS) ersetzt. Nach 45 Minuten Inkubation und erneutem Waschen wurden 80 µl des

Streptavidin-Meerrettich Peroxidase-Konjugats (1:1000 in PBS/1 % FKS) dazugegeben und 30 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte, nach zweimaligem Waschen, die Zugabe von 80 µl Substratlösung (OPD). Die Reaktion wurde nach 15-20 Minuten durch Waschen mit Leitungswasser gestoppt.

Die Berechnung des Titers folgte den untenstehenden Formeln:

$$\text{Titer (log}_{10}\text{)/ml} = \log \left(\frac{\text{Anzahl ffu}}{\text{Vol. im Well (ml)}} \times \frac{1}{\text{Verdünnung}} \right)$$

$$\text{Titer (log}_{10}\text{)/g Organ} = \log \left(\frac{\text{Anzahl ffu}}{\text{Vol. im Well (ml)}} \times \frac{1}{\text{Verdünnung}} \times \frac{100}{\% \text{ Homogenat}} \right)$$

4.10.2 Titration des Vaccinia Virus (Plaque Assay)

Je 1×10^5 143tk⁻ Zellen wurden in einem Volumen von 1 ml in die Wells einer 24-well-Platte ausgesät und während 24 Stunden kultiviert. Von der zu testenden Vaccinia Virus-Suspension wurden in einer 96-Well-Platte 1:10 Verdünnungen vorbereitet. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 µl der 10^{-3} bis 10^{-8} Verdünnungen zu den 143tk⁻ Zellen. Nach zwei Stunden Inkubation wurden 400 µl Overlay, der aus einer 1:1 Mischung von DMEM (2x)/10 % FKS und Methocel (2 %) bestand, zugefügt. Die Zellen wurden für weitere 36 bis 48 Stunden kultiviert und anschließend mit Kristallviolett angefärbt, so dass die Virusplaques gezählt werden konnten.

4.11 Aufreinigung rekombinanter Proteine

Zur bakteriellen Proteinexpression wurden der Vektor pGEX-p40, der für das Nukleoprotein (p40) des BDV codiert, verwendet. Dieses Plasmid wurde auf der Grundlage des Expressionsvektors pGEX-2T (Pharmacia, Freiburg) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. P. Staehli in Freiburg hergestellt. Mit Hilfe des Vektors pGEX-2T können Fusiosproteine mit dem 26 kD Protein Glutathion S-Transferase (GST) in *Escherichia coli* exprimiert und anschließend durch die Bindung an Glutathion Sepharose 4B aufgereinigt werden.

Im Vorfeld wurden kompetente Bakterien mit den entsprechenden Plasmiden transformiert. Dann wurden 10 ml 2YT-Medium/2 % Glucose mit der Bakterienkultur angeimpft, bei 37°C über Nacht kultiviert und am folgenden Tag in 500 ml 2YT-Medium/0,4 % Glucose überführt. Die Kultur wurde bei 37°C so lange kultiviert bis die OD_{600nm} bei 0,5 lag. Die Proteinsynthese wurde daraufhin durch die Zugabe von IPTG (0,1 mM) induziert und die Bakterienkultur für weitere zwei Stunden bei 37°C kultiviert. Durch Zentrifugation bei 7000 x g und 4°C für zehn Minuten wurden die Bakterien pelletiert und anschließend in 30 ml STE-Puffer resuspendiert.

Um die Degradation der Proteine zu verhindern, wurden die Proteaseinhibitoren PMSF (1 mM), Pefablock (1 mM) und Pepstatin (1 µM) zugegeben, bevor die Suspension in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurde. Dieser Vorgang sollte, neben den folgenden Schritten, zum Aufschließen der Bakterien beitragen. Nach dem Auftauen wurde N-Laurylsarcosine (1,5 % Endkonzentration) zugefügt, und die Zellen wurden so lange auf Eis beschallt (80 % duty cycle/pulsed), bis die Bakteriensuspension klar wurde. Anschließend wurde bei 12000 x g und 4°C während zehn Minuten zentrifugiert.

In der Zwischenzeit wurde die Glutathion-Sepharose® 4B vorbereitet. 600 µl Sepharose wurde in 5 ml PBS aufgenommen und 2 Minuten bei 500 x g zentrifugiert. Der Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Zum Überstand der Bakteriensuspension wurden 600 µl gewaschene Sepharose und Triton-X-100 (4

% Endkonzentration) gegeben. Das Detergens sollte zur besseren Löslichkeit der Proteine beitragen. Es folgte die Inkubation über Nacht bei 4°C auf einer Wippe. Am folgenden Tag wurde die Sepharose-Suspension bei 500 x g und 4°C während fünf Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und die Suspension noch dreimal mit je 5 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden 2 ml Elutionpuffer zugegeben und die Suspension für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einer Wippe inkubiert, um das Fusionsprotein von der Sepharose zu eluieren. Nach Zentrifugation bei 500 x g und Raumtemperatur während fünf Minuten wurde der Überstand, der das Fusionsprotein enthielt, abgenommen und die Elution noch einmal durchgeführt. Die Konzentration der Proteine wurde photometrisch bestimmt und die Sepharose nach Angaben des Herstellers regeneriert.

Die Proteinkonzentration wurde photometrisch bei 280 nm bestimmt und nach der folgenden Formel berechnet:

$$\text{OD}_{280\text{nm}} \times \text{Verdünnung des Proteins} \times 5 = \mu\text{g Protein/ml}$$

4.12 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese und Western Blot-Analyse

4.12.1 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Als Gelelektrophorese wird die Wanderung von geladenen Partikeln in einem flüssigen System unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes bezeichnet. Durch die Anlagerung von Natriumdodecylsulfat-Molekülen wird bei dieser Methode eine einheitliche Negativladung aller Proteine erreicht, so dass nur die Größe der Partikel die Wanderungsgeschwindigkeit beeinflusst. Durch Quervernetzung eines Acrylamidpolymers mit einer geringen Menge von Bisacrylamid entsteht

eine charakteristische Porengröße. Der Grad der Vernetzung lässt sich durch die Variation der Verhältnisse der Komponenten verändern. Aufgrund der negativen Ladung wandern die Proteine im Spannungsfeld zum positiven Pol. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine im Gel ist proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts.

Zur Herstellung der Gele wurden die aus je zwei Glasplatten vorgefertigten Gelkammern zu zwei Dritteln mit dem flüssigem Trenngelgemisch gefüllt. Das Gemisch wurde mit Aqua bidest. überschichtet, um eine glatte Oberfläche zu erhalten und polymerisierte 20 Minuten aus. Anschließend wurde das Aqua bidest. abgegossen, das Sammelgel auf das Trenngel gegeben und entweder ein Kamm eingesetzt, der Taschen im Sammelgel ausspart (zum Nachweis unbekannter Proteine) oder wiederum mit Aqua bidest. überschichtet, so dass eine glatte Oberfläche entstand (zum Nachweis unbekannter Seren). Die Gelkonstruktion wurde anschließend in eine Kammer, die mit Elektrophoresepuffer gefüllt war, gestellt.

Die nachzuweisenden Proben wurden 1:1 mit Probenpuffer gemischt und fünf Minuten bei 96°C denaturiert. 30 µl des Probengemisches wurden in die einzelnen, zuvor mit Puffer ausgespülten Aussparungen, bzw. 200 µl des Gemisches auf die glatte Sammelgeloberfläche aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 150 V. Bei 12,5 %igen Gelen erreichte die Laufront den unteren Rand des Gels etwa nach einer Stunde.

4.12.2 Western Blot-Analyse

Unter einer Western Blot-Analyse versteht man den Transfer von Proteinen aus einer Gelmatrix auf eine Membranoberfläche und den nachfolgenden Nachweis der transferierten Proteine. Diese qualitative Nachweismethode eignet sich zur Bestimmung von Antikörpern und Antigenen.

Ein in einem Polyacrylamidgel vorliegendes elektrophoretisch aufgetrenntes Proteingemisch, wird einem senkrecht zur Gel-Ebene wirkenden Spannungsfeld ausgesetzt und auf eine Trägermembran (Teflonfolie) transferiert.

In darauffolgenden Schritt können entweder die unbekannten Proteine oder die unbekannten Antikörper nachgewiesen werden.

4.12.2.1 *Transfer von Proteinen auf eine Teflonfolie*

Eine zugeschnittene Teflonfolie wurde mit Methanol (100 %) gespült und dieses anschließend mit Aqua bidest. gründlich ausgewaschen. Drei Filterpapierblätter wurden, nachdem sie mit Semi-Dry-Blotpuffer getränkt worden waren, auf den positiven Pol der Transferkammer gelegt und die Teflonfolie blasenfrei auf die Filterpapiere platziert. Anschließend folgte das Acrylamidgel, das blasenfrei auf die Folie gelegt wurde. Bevor die Transferkammer geschlossen wurde, wurden nochmals drei getränkte Filterpapiere auf dem Gel platziert. Der Transfer erfolgte bei $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Gel während 90 Minuten.

4.12.2.2 *Immunoblotting*

Nach dem Transfer wurde die Folie für 30 Minuten in PBS/0,05 % Tween-20/2 % BSA/10 % FKS abgesättigt, um unspezifische Bindungsstellen zu besetzen. Nicht gebundene Proteine wurden durch Waschen mit PBS/0,05 % Tween-20 entfernt.

Nachweis unbekannter Proteine

Nach der Absättigung wurde die Folie für eine Stunde mit einem Antikörper-Gemisch bzw. Serum (1:100 in PBS/Tween-20) inkubiert. Anschließend wurde die Folie dreimal mit PBS/Tween-20 gewaschen und mit einem Peroxidase-

markierten anti-Spezies Antikörper (1:3000 in PBS/Tween-20) während 45 Minuten inkubiert. Nach erneutem gründlichen Waschen wurden die Membranen schließlich mit dem ECL-System (Enhanced Chemiluminescent Detektionssystem) nach den Angaben des Herstellers entwickelt. Die Folien wurden in Klarsichtfolie verpackt, und der Röntgenfilm wurde für fünf bis 60 Sekunden belichtet.

Eine andere Nachweismöglichkeit bestand in der Anwendung des Reagenzes Chloronaphtol. Dazu wurde die Folie nach der einstündigen Inkubation mit einem Antikörper-Gemisch oder Serum (1:100 in PBS/Tween-20) und den folgenden Waschschritten für eine Stunde mit einem biotinylierten anti-Spezies Antikörper (1:1000 in PBS/Tween-20) inkubiert. Nach gründlichem Waschen wurde 1:1000 in PBS/Tween-20 verdünntes Streptavidin-Meerrettich Peroxidase-Konjugat zur Folie gegeben und für weitere 45 Minuten inkubiert. Überschüssiges Konjugat wurde durch Waschen entfernt. Die Sichtbarmachung gebundener Antikörper erfolgte durch die Zugabe von Chloronaphtol enthaltendem Substrat. Die Reaktion wurde nach drei bis zehn Minuten mit Leitungswasser abgestoppt. Alle Inkubationsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Nachweis unbekannter Antikörper

Die Folie wurde dazu in eine Mini-Blot-Kammer gelegt, die in 20 Kammern unterteilt ist. In die einzelnen Kammern wurden die unbekannten Antikörperlösungen (1:100 in PBS/Tween-20) pipettiert und während einer Stunde auf einer Wippe inkubiert. Anschließend wurden die Antikörperlösungen abgesaugt, die Folie aus der Mini-Blot-Kammer entfernt und gründlich mit PBS/Tween-20 gewaschen. Darauf folgte die Inkubation mit einem 1:1000 in PBS/Tween-20 verdünnten biotinylierten anti-Spezies Antikörper während einer Stunde, wonach die Folie wieder mit PBS/Tween-20 gewaschen wurde. Im Anschluss wurde die Folie mit 1:1000 in PBS/Tween-20 verdünntem

Streptavidin-Meerrettichperoxidase Konjugat für 45 Minuten inkubiert und danach mehrmals gewaschen. Die Farbreaktion erfolgte durch Zugabe von Chloronaphtol-Substratlösung. Alle Inkubationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur.

4.13 Durchflusszytometrie

Bei der durchflusszytometrischen Messung werden Zellen bezüglich ihrer Größe, ihrer Granulierung und intrazellulärer oder auf der Zelloberfläche exprimierter Antigene charakterisiert. In Suspension befindliche Zellen werden an einem fokussierten Laserstrahl vorbeigeleitet. In Abhängigkeit vom Typ und der Art der Aufbereitung senden die Zellen charakteristische Lichtsignale aus, die von Detektoren aufgenommen werden.

Die Methode wurde in dieser Arbeit zur Charakterisierung frisch isolierter bzw. *in vitro* restimulierter T-Lymphozyten, sowie zum Nachweis Vaccinia-spezifischer Proteine im Inneren infizierter Zellen angewandt. Weiterhin wurden transfizierte Zellen auf die Anwesenheit von GFP (Green Fluorescent Protein) untersucht.

Alle Messungen wurden mit dem FACScan Gerät der Firma Becton Dickinson durchgeführt. Die Daten wurden mit Hilfe des Programms Cellquest an einem Macintosh Computer ausgewertet.

4.13.1 Phänotypische Charakterisierung von Zellen anhand von Oberflächenantigenen

Die zu untersuchenden Zellen wurden mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) oder Phycoerythrin (PE)-markierten monoklonalen Antikörpern, die gegen spezifische Oberflächenantigene gerichtet waren, markiert.

1×10^6 Zellen einer Einzelzellsuspension wurden in 100 μ l FACS-Puffer aufgenommen und mit 1 μ l des mit Fluoreszenzfarbstoff markierten monoklonalen Antikörpers während 25 Minuten auf Eis inkubiert. Durch zweimaliges Waschen wurden nicht gebundene Antikörper entfernt und die Zellen anschließend in 500 μ l FACS-Puffer aufgenommen und analysiert.

4.13.2 Nachweis Vaccinia Virus-spezifischer Proteine im Inneren von Zellen

Um spezifische Proteine im Inneren von Zellen nachweisen zu können, mussten die Zellen in einem ersten Schritt permeabilisiert werden. Zur Permeabilisierung wurde das Reagenz Ortho-PermeaFix™ eingesetzt, das die Zellen auch gleichzeitig fixiert.

4.13.2.1 Permeabilisierung

Die zu testenden Zellen wurden in Suspension gebracht, einmal mit FACS-Puffer gewaschen und anschließend in einer Konzentration von 1×10^6 /ml in die gebrauchsfertige Ortho-PermeaFix™-Lösung (Stammlösung 1:1 in Aqua bidest. verdünnt) aufgenommen. Die Inkubation erfolgte während 45 Minuten bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation bei 250 x g pelletiert und der Überstand verworfen. Die Zellen standen nach zwei Waschschritten zur intrazellulären Markierung zur Verfügung.

4.13.2.2 Markierung der Zellen

10^6 permeabilisierte Zellen wurden in 100 μ l FACS-Puffer mit 1 μ l anti-Vaccinia Serum während 25 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend dreimal mit FACS-Puffer gewaschen. Die zweite Inkubation erfolgte in 100 μ l FACS-Puffer, in den ein FITC-markierter anti-Ratte Antikörper (1:250) vorgelegt wurde, für 25 Minuten auf Eis. Dem erneuten Waschen folgte die Resuspendierung des Pellets in 500 μ l FACS-Puffer und die Analyse der Zellen.

4.13.3 Nachweis von GFP (Green Fluorescent Protein)

Aus 5×10^6 der zu testenden transfizierten Zellen wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt, die einmal mit FACS-Puffer gewaschen wurde. Anschließend wurden die Zellen auf eine Konzentration von 1×10^6 /ml eingestellt und auf die Expression des fluoreszierenden Proteins untersucht.

4.14 Nachweis von GFP (Green Fluorescent Protein) mittels Fluoreszenzmikroskopie

Um zu überprüfen, ob Zellen den „Reporter“ GFP exprimieren, wurden 5×10^4 Zellen in einem Volumen von 50 μ l Kulturmedium in einen Ausschnitt eines Chamber-slides ausgesät. Nach einer Inkubation von 24 Stunden in einer feuchten Kammer wurde vorsichtig das Medium abgesaugt und die Zellen mit einem Deckglas abgedeckt. Anschließend wurden die Zellen sofort unter dem Fluoreszenzmikroskop auf die Expression des Proteins untersucht.

4.15 Extraktion viraler Peptide aus infizierten Zellen

Die Extraktion viraler Peptide wurde freundlicherweise von Dr. T. Dumrese am interfakultären Institut für Zellbiologie, Abt. Immunologie, der Universität Tübingen durchgeführt.

Zwischen $2,2 \times 10^9$ und $2,5 \times 10^{10}$ Zellen wurden in 200 ml Lysepuffer (PBS; 10mM CHAPS; 0,1mM PMSF; Proteaseinhibitor-Cocktail-Tabletten (Roche, Mannheim) resuspendiert und dann mechanisch, mit Hilfe eines Douncers und mittels Ultraschall zerstört. Die Suspension wurde während einer Stunde bei 4°C gerührt und anschließend bei 4000 rpm für zehn Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden in einer Ultrazentrifuge für eine Stunde bei 40000 rpm erneut zentrifugiert, filtriert und, als zusätzlichen Reinigungsschritt, über eine Glycin gekoppelte Cyanogen-Bromid aktivierte Sepharose 4B Säule gegeben. Die MHC-Klasse-I-Moleküle wurden anschließend über Immunnaffinitäts-Chromatographie mittels OX18-gekoppelter, Cyanogen-Bromid-aktivierter Sepharose 4B aufgereinigt. Die MHC-Klasse-I-Komplexe wurden durch 0,1 % TFA (pH 2,0) eluiert und das eluierte Material durch einen Centricon 10-Filter filtriert und in der Speed Vac konzentriert.

4.16 Fraktionierung viraler Peptide mittels HPLC

Die Auftrennung von Peptiden mittels HPLC wurde freundlicherweise von Dr. T. Dumrese, aus dem interfakultären Institut für Zellbiologie, Abt. Immunologie, der Universität Tübingen durchgeführt.

Für die Peptid-Auftrennungen wurde das Pharmacia SMART System mit reversed-phase prepacked columns (C2/C18, 2,1 x 100 mm; Pharmacia, Freiburg) eingesetzt. Die Proben wurden in einem Volumen von 500 µl injiziert. Die Elution wurde folgendermaßen durchgeführt: Lösungsmittel A, 0,1 % TFA in H₂O; Lösungsmittel B, 0,08 1 % TFA in 80 % Acetonitril; 0-10 Minuten,

10 % B; 10-25 Minuten lineare Zunahme bis 20 % B; 25-45 Minuten 1 %/Minute Steigerung auf 40 % B; 45-55 Minuten, 2 %/Minute Steigerung auf 60 % B; 55-60 Minuten lineare Steigerung auf 75 %B und 60-65 Minuten konstant 75 % B. Die Durchflussrate lag bei 150 µl /Minute. Die Proben wurden nach folgendem Schema gewonnen und eluiert: 1-10 Minuten 450 µl/Minute; 10-65 Minuten 150 µl/Minute. Die Elution wurde durch die Messung der Absorption von UV Licht der Wellenlänge 214 nm überwacht. Durch Vakuumzentrifugation wurde das Acetonitril aus dem eluierten Material entfernt. Die Proben wurden mit PBS auf ein Volumen von 150 µl aufgefüllt und bei -70°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.17 Histologische Untersuchungen

Die histologischen Untersuchungen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. T. Bilzer am Institut für Neuropathologie der Heinrich-Heine Universität in Düsseldorf durchgeführt.

Um die Gehirne infizierter Tiere zu untersuchen, mussten im direkten Anschluss an deren Tötung durch Entbluten, Gewebeproben entnommen werden. Die Gehirnproben wurden in 4 %iger Paraformaldehydlösung aufgenommen. Die histologischen Untersuchungen erfolgten an Paraffin-Schnitten, die mit Hämatoxilin-Eosin gefärbt wurden.

4.18 Molekularbiologische Methoden

4.18.1 Gewinnen von Plasmiden

4.18.1.1 Minipräparation

Mit dieser Methode konnten 2-10 µg Plasmid-DNA isoliert werden, wobei die Plasmidisolierung nach dem Prinzip der alkalischen Lyse von Bakterienzellen erfolgte. Dazu wurden einzelne Bakterienkolonien von einer Agarplatte gepickt und in Reagenzröhrchen mit 3 ml ampicillinhaltigem (50 µg/ml) LB-Medium über Nacht in einem Schüttler bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden 1,5 ml der Bakteriensuspension bei 13000 rpm für 30 Sekunden in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend bis auf 50 µl abgenommen und das Bakterienpellet in dieser Restmenge mittels Vortex resuspendiert. Dann erfolgte die Lyse der Zellen mit 300 µl TENS-Puffer und sofortiges Vortexen für vier Sekunden. Die im Puffer enthaltene NaOH lysiert die Bakterienmembranen, SDS bindet an die chromosomale DNA und Proteine der Bakterien. Durch Zusatz von 150 µl eiskaltem 3 M NaAc, pH 5,2 und Vortexen für drei Sekunden wurde der pH-Wert abgesenkt, so dass an SDS gebundene und besonders große Bestandteile ausfielen. Diese wurden mittels Zentrifugation (14000 rpm, fünf Minuten, 4°C) vom plasmidhaltigen Überstand getrennt. Der Überstand wurde in einem neuen Reaktionsgefäß nochmals zentrifugiert, um eine höhere Reinheit zu erzielen. Die DNA wurde durch die Zugabe von 800 µl 100 %igem Ethanol gefällt und zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen (14000 rpm, fünf Minuten, 4°C). Das Pellet wurde in 25 µl TE-Puffer mit 1 µg/ml RNase aufgenommen.

4.18.1.2 Säulenaufreinigung von Plasmid-DNA

Die Methode beruht auf einer alkalischen Lyse mit anschließender Präzipitation von chromosomaler DNA und Protein. Plasmid-DNA wird anschließend in Anwesenheit einer hohen Konzentration chaotrophischer Salze an eine Membran gebunden. Die Elution erfolgt durch Puffer mit niedriger Salzkonzentration.

4.18.1.2.1 Minipräparation

Zur Isolierung von DNA, die in der Sequenzierreaktion eingesetzt werden sollte, wurden 3 ml ampicillinhaltiges (50 µg/ml) LB-Medium mit einer einzelnen Bakterienkultur beimpft und über Nacht in einem Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert. Die Bakterienkultur wurde mit dem High Pure Plasmid Isolation Kit oder dem QIAprep Spin Miniprep Kit nach den Angaben des jeweiligen Herstellers aufgereinigt.

4.18.1.2.2 Maxipräparation

Zur Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA wurden 30 µl Flüssigkultur in 100 ml ampicillinhaltiges (50 µg/ml) LB-Medium gegeben und in einem 1 l-Erlenmeyerkolben über Nacht in einem Schüttelinkubator bei 37°C angezüchtet. Die Plasmidisolierung erfolgte dann mit dem Qiagen Plasmid Maxi Kit nach Angaben des Herstellers.

4.18.2 Gewinnen zellulärer und viraler DNA

Die Methode wurde eingesetzt, um den Erfolg von Transfektionen und der Vaccinia-Rekombination zu überprüfen. Aus 10^6 Zellen wurde mit Hilfe des QIAmp Tissue Kits nach den Angaben des Herstellers die genomische DNA isoliert. Waren die Zellen mit Vaccinia Virus infiziert, wurde die virale DNA

zusammen mit der genomischen aufgereinigt. Die DNA konnte anschließend in der PCR eingesetzt werden.

4.18.3 Auftrennung, Isolierung und Aufreinigung von genomischer und Plasmid-DNA

4.18.3.1 Auftrennung

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte mittels Agarose-Gelen. Da die Poren der Gele kleineren Fragmenten weniger Widerstand entgegenbringen, können diese schneller im elektrischen Feld wandern. Die Laufstrecke verhält sich umgekehrt proportional zum Logarithmus der Fragmentlänge.

Je nach der erwarteten Größe der Fragmente wurde eine Agarosekonzentration zwischen 0,8 % und 2 % gewählt. Zur Herstellung der Gele wurde die entsprechende Menge Agarose in TAE-Puffer aufgekocht. Anschließend wurde Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) zugegeben und das Gel in die Gelkammer gegossen. Ethidiumbromid bindet interkalierend an DNA und erscheint im UV-Licht orange. Die Proben wurden im Verhältnis 1:5 mit Nativmarker verdünnt und in der als geeignet erscheinenden Menge aufgetragen. Zum Größenvergleich wurde ein Standard-Längenmarker verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei 6 V/cm Elektrodenabstand. Dokumentiert wurden die DNA-Gele mit einer Sofortbildkamera.

4.18.3.2 Isolierung und Aufreinigung

Das Fragment gewünschter Länge wurde unter UV Licht-Kontrolle mit einer Skalpellklinge ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Aufreinigung erfolgte mit dem NukleoSpin Extract Kit gemäß Herstellerangaben.

4.18.4 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Zur Nukleinsäurekonzentrationsbestimmung wurde im Spektrum von 320 nm bis 220 nm Wellenlänge im Photometer gemessen. Über den gemessenen OD_{260nm}-Wert wurden die Nukleinsäurekonzentrationen nach folgender Formel bestimmt:

doppelsträngige DNA

$$\text{OD}_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnung der DNA-Lösung} \times 50 = \mu\text{g DNA/ml}$$

einzelsträngige DNA

$$\text{OD}_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnung der DNA-Lösung} \times 33 = \mu\text{g DNA/ml}$$

4.18.5 RNA-Isolierung

Zu 10^7 in einer 75 cm²-Zellkulturflasche adherent wachsender Zellen wurden 1,5 ml Trizol gegeben, die Flasche wurde geschwenkt und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Trizol mit den darin enthaltenen Zellen abgesaugt und in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe von 400 µl Chloroform wurde das Gefäß für 15 Sekunden geschüttelt und wiederum bei Raumtemperatur inkubiert, diesmal für zehn Minuten. Die folgende Zentrifugation wurde für 15 Minuten bei 12000 x g und 4°C durchgeführt. Daraufhin wurde die obere, wässrige Phase abgenommen, mit 1 ml Isopropanol gemischt, zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und zentrifugiert (12000 x g, zehn Minuten, 4°C). Zu dem entstandenen geligen Pellet wurden 2 ml 70 % Ethanol gegeben und noch einmal zentrifugiert (7500 x g, fünf Minuten, 4°C). Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet für zehn Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Die so erhaltene RNA wurde anschließend in 30 µl RNase freiem Wasser aufgenommen. Die Konzentration wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt mit der folgenden Formel berechnet:

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

4.18.6 Enzymatische Behandlung von Nukleinsäuren

4.18.6.1 Spaltung mit Restriktionsenzymen

Verdaut wurden immer 2 µg Plasmid-DNA oder 30 µl Eluat aus der Aufreinigung eines PCR-Produktes.

KpnI-Verdau: Verdaut wurde für zwei Stunden mit Puffer L (Roche, Mannheim).

KpnI und NotI-Verdau: Verdaut wurde während zwei Stunden in Puffer H (Roche, Mannheim)

KpnI und SmaI-Verdau: Der Vektor pSC11.3 wurde zuerst für drei Stunden bei 37°C in Puffer L (Roche, Mannheim) und anschließend mit SmaI über Nacht bei 25°C in Puffer „Violett“ (AGS, Heidelberg) verdaut.

4.18.6.2 Ligation

4.18.6.2.1 Ligationen über TOPO-TA-Cloning

Die für TOPO-TA-Cloning eingesetzten Vektoren werden vom Hersteller linearisiert und durch die Topoisomerase I „aktiviert“ (TOPO-TA Cloning Kit). Die Vektoren besitzen an den 3'-Enden einzelne Desoxythymidin-Überhänge, wodurch eine sehr effektive Ligation mit PCR-Produkten möglich ist, die mit der Taq-Polymerase synthetisiert werden. Die Taq-Polymerase hängt durch ihre template-unabhängige Transferase-Aktivität einzelne Desoxyadenosin-Moleküle an das 3'-Ende von PCR-Produkten.

2 µl frisches PCR-Produkt wurden in der Reaktion, die nach den Angaben des Herstellers durchgeführt wurde, eingesetzt. Zur Transformation wurden 2 µl dieses Ligationsansatzes verwendet.

4.18.6.2.2 andere Ligationen

Bei Ligationen mit der T4-Ligase werden Vektor und Insert über 5'-Phosphatgruppen in Anwesenheit von ATP verbunden.

Die Ligationen wurden mit dem Rapid DNA Ligation Kit, nach den Angaben des Herstellers, in einem Reaktionsvolumen von 20 µl durchgeführt. Als Vektor diente das Plasmid pSC11.3. Die jeweilige DNA-Menge der zu ligierenden Fragmente wurde vor der Reaktion im Agarose-Gel abgeschätzt. DNA-Fragment und Vektor wurden im molekularen Verhältnis 4:1 eingesetzt.

4.18.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Reverse Transkriptions Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die PCR ist eine Methode zur gezielten Vermehrung bestimmter Abschnitte doppelsträngiger DNA (Mullis und Faloona, 1987). Soll RNA analysiert werden, muss diese zunächst in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Dieser Schritt wird als Erststrangsynthese (Reverse Transkription) bezeichnet. Die PCR besteht aus drei Schritten: Trennung der DNA-Doppelstränge durch Erhitzen auf 94°C bis 96°C (Denaturierung), der Anlagerung der spezifischen Primer durch Abkühlen des Reaktionsansatzes auf 40°C bis 60°C (Annealing) und der Synthese des entsprechenden DNA-Stranges, wobei die an die DNA hybridisierten Primer den Startpunkt für die DNA-Polymerase darstellen (Primer-Extension). Das mehrfache Durchlaufen dieser Syntheseyklen (25 bis 40 mal) führt zur exponentiellen Amplifizierung der DNA. Durch die Wahl definierter Primer kann spezifische DNA amplifiziert und nachgewiesen werden.

4.18.7.1 cDNA Synthese

Für die cDNA Synthese wurde 1 µg RNA für fünf Minuten auf 85°C erhitzt und anschließend schnell auf Eis abgekühlt. Es folgte die Zugabe von 0,5 µg Random-Primer, 4 µl 5x Puffer, 2 µl DTT, 1 µl dNTP's (10 mM) und 1 µl RNase-Inhibitor. Der Ansatz wurde für zwei Minuten bei 42°C inkubiert, bevor 1 µl Expand Reverse Transkriptase zugegeben wurde, um die reverse Transkription zu starten. Die Reaktion erfolgte während zwei Stunden bei 42°C. Anschließend wurden die Proben für zehn Minuten auf 85°C erhitzt, um RNA/DNA-Hybride zu trennen und die Reverse Transkriptase zu inaktivieren.

4.18.7.2 Polymerase-Kettenreaktion mit der Taq-Polymerase

Die Taq-Polymerase wurde eingesetzt, um PCR-Produkte herzustellen, die über das TOPO-TA-System ligiert werden sollten und für die Analyse von DNA- und RNA-Isolaten.

Die PCR wurde mit einem 50 µl Reaktionsansatz durchgeführt. Es wurden 5 µl Template aus der Erststrangsynthese oder einer DNA-Isolierung bzw. 10 ng Plasmid-DNA, 5 µl 10x PCR-Puffer, 5 µl dNTP's (0,2mM), je 40 ng sense und antisense Primer gemischt. Da die Taq-Polymerase, um unspezifische Reaktionen zu vermeiden, nicht unterhalb der jeweiligen Annealing-Temperatur zugefügt werden sollte, wurde der Ansatz, ohne die Polymerase, für fünf Minuten auf 95°C erhitzt (Hot Start). Nach kurzzeitigem Abstoppen des Programms wurden 2,5 U Taq-Polymerase zugegeben und das Programm erneut gestartet. Die Reaktion lief nach dem folgendem Schema ab:

Denaturierung	95°C	1 Minute	} 35 Schleifen
Annealing	primerspezifisch	1 Minute	
DNA-Synthese	72°C	1 Minute	
„final extension step“	72°	10 Minuten	
Ende der Amplifizierung	4°C		

Folgende Annealing-Temperaturen wurden für die aufgelisteten Primer-Paare verwendet:

<u>sense Primer</u>	<u>antisense Primer</u>	<u>Annealing -Temperatur</u>
p40-H	p40-276R	49°C / 53°C ^(x)
p40-H	p40-498R	49°C
p40-H	p40-708R	49°C
p40-259F	p40-829R	58°C
p40-HKpnI	p40-918R	48°C
p40-393KpnI	p40-1125R	48°C
GAPDH-A	GAPDH-B	58°C

^(x) Die PCR mit dem Primer-Paar p40-H und p40-276R wurde mit einer Annealing-Temperatur von 49°C durchgeführt, wenn das Produkt in einer Ligation eingesetzt werden sollte. Durch die niedrige Temperatur wurde die Ausbeute des Produkts erhöht. Um DNA-Isolate zu überprüfen, wurde die Annealing-Temperatur auf 53°C hochgesetzt, um die Spezifität der Reaktion zu erhöhen.

4.18.7.3 Polymerase-Kettenreaktion mit der Pwo-Polymerase

Die Pwo-Polymerase wurde in der PCR-Reaktion eingesetzt, um Amplifikate für Ligationen herzustellen. Die Pwo-Polymerase besitzt 3'-5' Exonuklease-Aktivität und hat daher eine bis zu 15 mal geringere Fehlerrate, im Vergleich zur Taq-Polymerase. Die Amplifikate besitzen glatte Enden.

Es wurde ein 50 µl Reaktionsansatz, welcher aus 100 ng Plasmid-DNA, 5 µl 10x PCR-Puffer (ohne Magnesiumchlorid), 1 µl Magnesiumchlorid (25 mM), 1 µl dNTP's (10 mM), sowie 80 ng eines sense und antisense Primers bestand, angesetzt. Zum Schluss wurden 2,5 U Pwo-Polymerase zugegeben und die Reaktion, die nach folgendem Schema ablief, gestartet:

Methoden

Denaturierung	94°C	2 Minuten	
Denaturierung	94°C	15 Sekunden	} 10 Schleifen
Annealing	48°C	30 Sekunden	
DNA-Synthese	72°C	45 Sekunden	
Denaturierung	94°C	15 Sekunden	} 20 Schleifen
Annealing	48°C	30 Sekunden	
DNA-Synthese	72°C	45 Sekunden	
(die DNA-Synthese wurde in jeder Schleife um fünf Sekunden verlängert)			
„final extension Step“	72°C	7 Minuten	
Ende der Amplifizierung	4°C		

4.18.8 Sequenzierung von DNA

4.18.8.1 Sequenzierreaktion

Die Reaktion wurde mit dem ABI PRISM Big Dye Terminator Ready Reaction Kit in einem Volumen von 10 µl durchgeführt. 1 µg säulenaufgereinigte DNA, 4 µl Big Dye, 10 ng eines Primers und Aqua bidest. wurden gemischt. Die Reaktion lief im Thermoblock mit folgendem Profil ab:

96°C	30 Sekunden	}	25 Schleifen
50°C	15 Sekunden		
60°C	4 Minuten		
anschließend Abkühlen auf 4°C			

4.18.8.2 *Aufreinigung*

Die Proben aus der Sequenzierreaktion wurden mit dem QIAquick Nukleotide Removal Kit nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt, anschließend in der Speed Vac getrocknet und bei -20°C gelagert.

4.18.8.3 *Sequenziergel*

Die in der Speed Vac eingetrockneten Proben wurden mit 5 µl Probenpuffer (40 µl Loading Puffer, 160 µl Formamid) gekocht, 1,5 µl wurden dann mittels eines Bio Rad Acrylamid Gels (36 cm, 5% Acrylamid, 7 M Harnstoff und 1 x TBE) aufgetrennt und mit Hilfe des Sequenziergerätes ABI PRISM 377 DNA Sequenzer für zehn Stunden bei 48 Watt und 51°C analysiert. Die Auswertung erfolgte mittels ABI-PRISM-Software an einem Macintosh Computer.

4.18.9 Bakterienkultur

4.18.9.1 *Anzucht von E.coli in Flüssigmedium*

Das mit der Bakterienkolonie bzw. einer Vorkultur von E.coli Top 10 oder E.coli Top 10F' beimpfte LB-Medium wurde im Schüttelinkubator über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach Bedarf wurde auf Antibiotikaresistenz selektiert (Ampicillin; 50 µg/ml).

4.18.9.2 *Anzucht von E.coli auf festen Nährböden*

Etwa 50 µl einer Bakteriensuspension wurde auf LB-Agarplatten ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Zur Selektion wurde ampicillinhaltiger Agar (50 µg/ml) verwendet.

4.18.9.3 *Transformation*

Die bei -70°C gelagerten kompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und die Hälfte eines Ligationsansatzes oder 1 µl Maxi- bzw. Minipräparation und 2 µl 0,5 M β-Mercaptoethanol zur Bakterien-Suspension gegeben und sofort kurz gemischt. Nach der Inkubation für 30 Minuten auf Eis folgte eine Hitzeschockbehandlung für 30 Sekunden bei 42°C. Nach zweiminütigem Abkühlen der Bakterien auf Eis wurden 250 µl SOC-Medium zugegeben und die Bakterien wurden bei 37°C für 45 Minuten im Thermoblock geschüttelt. 50 µl der Suspension wurden auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Wurde ein Vektor verwendet, der für das E.coli lacZ-Gen codierte, wurden 30 Minuten vor Verwendung der Agar-Platten 40 µl X-Gal (40 mg/ml) und 40 µl IPTG (100 mM) auf den Platten ausgestrichen. Die Platten wurden anschließend während 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

4.18.9.4 *Lagerung von Bakterienkulturen*

Zur langfristigen Aufbewahrung von Bakterien wurde 1 ml Flüssigkultur bei 13000 rpm für zwei Minuten in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Glycerin-Medium aufgenommen, sofort auf Eis gestellt und bei -70°C gelagert.

5. ERGEBNISSE

Wie bereits aus einer früheren Arbeit bekannt ist, wird das Nukleoprotein (p40) des Borna Disease Virus von BDV-spezifischen zytotoxischen T-Zellen erkannt. Daher muss auf diesem Protein mindestens ein MHC-Klasse-I-restringiertes T-Zell-Epitop der Ratte lokalisiert sein (Planz & Stitz, 1999). Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, wie viele T-Zell-Epitope, die von MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert und von BDV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen erkannt werden, sich auf dem p40 befinden. Weiterhin sollte deren genaue Lokalisation bestimmt und die Epitope näher charakterisiert werden.

5.1 Verkürzte Nukleoproteine

Im ersten Teil der Arbeit sollten fünf verkürzte Konstrukte, die für das Nukleoprotein codieren, sowie das vollständige Nukleoprotein-Gen in Zellen exprimiert werden (Abb. 1). Diese Zellen sollten anschließend im Zytotoxizitätstest als Zielzellen eingesetzt werden, um auf diese Weise das bzw. die T-Zell-Epitope auf einen Bereich von 70 Aminosäuren genau eingrenzen zu können.

Im ersten Versuchsansatz wurden die verschiedenen DNA-Abschnitte des Nukleoproteins in einen Expressionsvektor kloniert und anschließend Zellen damit stabil transfiziert. Zuerst musste aber geklärt werden, ob es grundsätzlich möglich ist, auf diese Art Zielzellen für den Zytotoxizitätstest mit BDV-spezifischen Effektorzellen herzustellen. Fraglich war, ob durch die Transfektion eine ausreichend hohe Expression der BDV-spezifischen Proteine erreicht werden kann.

Im zweiten Versuchsansatz sollten Zellen mit Vaccinia Viren infiziert werden, welche für die verschiedenen verkürzten BDV Nukleoproteine sowie das

vollständige Protein codieren. Diese Zellen sollten wiederum als Zielzellen verwendet werden. Der Einsatz von Vaccinia Virus-infizierten Zielzellen im Zytotoxizitätstest mit BDV-spezifischen Effektoren stellt ein etabliertes System dar (Planz & Stitz, 1999). Im Vorfeld mussten dazu Vaccinia-Borna-Rekombinante hergestellt werden. Die benötigten DNA-Abschnitte wurden in einen Vektor kloniert, der die homologe Rekombination mit Vaccinia-Wildtyp Viren und somit das Einschleusen der DNA in das Virus ermöglicht.

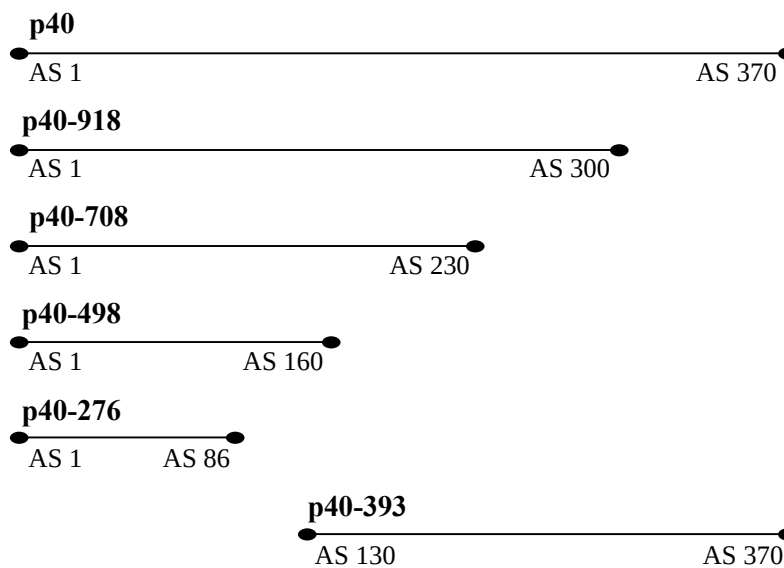


Abbildung 1: Schematische Darstellung der verkürzten Nukleoproteine und des vollständigen p40.

5.1.1 Transfektion von LEW Zellen

Ein Drittel derjenigen Peptide, die im MHC-Klasse-I-Komplex auf der Zelloberfläche präsentiert werden, entstammen der Prozessierung endogener Proteine (Reits et al., 2000). Wird ein Peptid im MHC-Klasse-I-Molekül von einer CD8⁺ T-Zelle erkannt, führt das zur Lyse dieser Zelle. Die Transfektion wiederum bietet die Möglichkeit, Gene der Wahl in Zellen zur Expression zu bringen und die Genprodukte in den MHC-Klasse-I-Präsentationsweg einzuschleusen.

Im folgenden Teil der Arbeit sollte geklärt werden, ob es generell möglich ist, durch die Transfektion von nicht infizierten Fibroblasten der Lewis Ratte (NL-LEW Zellen) mit einem Konstrukt, welches für das Nukleoprotein des BDV codiert, Zielzellen für den in vitro Zytotoxizitätstest herzustellen. Als Effektoren sollten BDV-spezifische zytotoxische T-Zellen aus den Gehirnen infizierter Ratten verwendet werden. Im weiteren Verlauf sollten dann LEW Zellen mit Konstrukten transfiziert werden, die für verkürzte Nukleoproteine codieren. Auch diese Zellen sollten als Zielzellen eingesetzt werden.

5.1.1.1 *Expression des vollständigen Nukleoproteins in LEW Zellen*

LEW Zellen wurden mit dem Plasmid pcDNA3.1-p40 transfiziert. Das Plasmid wurde auf der Basis des Vektors pcDNA3.1, der für die Expression in Eukaryontenzellen gut geeignet ist, hergestellt. In der Arbeitsgruppe von W. I. Lipkin (Irvine, USA) wurde in diesen Vektor das Genom für das p38, d.h. das kürzere Produkt des ORF I des BDV kloniert. Dieses Protein ist um elf Aminosäuren kürzer, als das p40. Freundlicherweise wurde uns das Plasmid zur Verfügung gestellt.

Zur Transfektion wurde das liposomale Reagenz Dosper eingesetzt. Da die Transfektion mit diesem Reagenz in der Arbeitsgruppe bereits etabliert war, konnte auf diese Methode zurückgegriffen werden.

Die LEW Zellen wurden stabil transfiziert und anschließend kloniert. Um das Nukleoprotein stabil zu exprimieren, wurden die Zellen in neomycinhaltigem Selektionsmedium kultiviert. Der eingesetzte Expressionsvektor codiert für einen Resistenzfaktor gegenüber dem Aminoglycosidantibiotikum „Neomycin“ (G 418), das für die Selektion von Säugerzellen gut geeignet ist. Wird das Antibiotikum über das Wachstumsmedium zu den transfizierten Zellen gegeben, führt der ausgeübte Selektionsdruck zur Integration der eingeschleusten DNA in

das zelluläre Genom. Werden die Zellen anschließend kloniert, erhält man homogene Zellpopulationen, die unerlässlich sind, um in weiterführenden Experimenten reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen.

Um den Erfolg der Transfektion zu überprüfen, wurden zahlreiche Zellklone auf das Vorhandensein Nukleoprotein-spezifischer DNA untersucht. Dazu wurde aus 10^6 Zellen die gesamte zelluläre DNA isoliert, wovon 600 ng in der PCR eingesetzt wurden. Als Primerpaar dienten p40-259F und p40-829R, die ein 570 Basenpaare großes Amplifikat erzeugen. Als Negativkontrolle wurde in der PCR Wasser und aus NL-LEW Zellen isolierte DNA mitgeführt. Als Positivkontrolle wurde das Plasmid p40H/E, das die vollständige Sequenz des Nukleoproteins enthält, eingesetzt. Auf diese Art konnten die positiven Zellklone LEW-p40.22 und LEW-p40.23 ermittelt werden (Abb. 2).

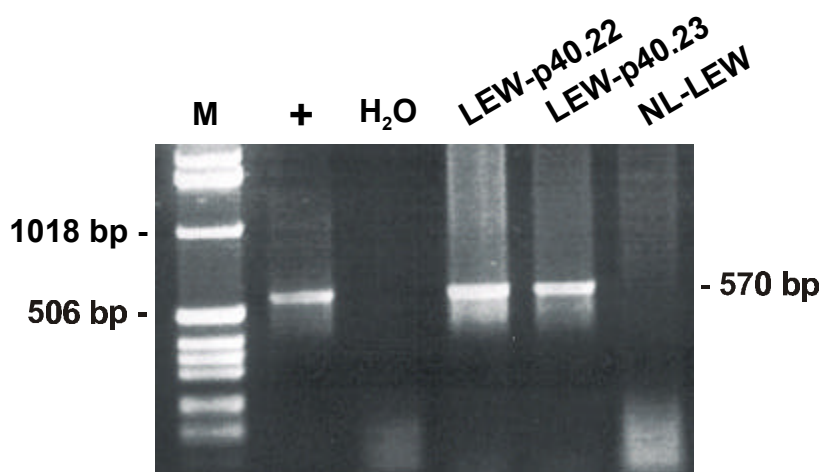


Abbildung 2: PCR zum Nachweis Nukleoprotein-spezifischer DNA in transfizierten LEW Zellen. Ausgehend von der zellulären DNA wurden in den Zellklonen LEW-p40.22 und LEW-p40.23 spezifische PCR-Produkte mit 570 bp Länge amplifiziert. Als Positivkontrolle wurde das Plasmid p40H/E (+), als Negativkontrollen Wasser (H₂O) und NL-LEW Zellen mitgeführt (M: Längenstandard).

Aus den Zellklonen LEW-p40.22 und LEW-p40.23, in denen Nukleoprotein-spezifische DNA nachgewiesen werden konnte, sollte im Folgenden die Transkription des Gens überprüft werden. Dazu wurde mit Hilfe von Trizol

zelluläre RNA isoliert und in der RT-PCR eingesetzt. Für die Erststrangsynthese wurde ein Random-Primer verwendet. Als Kontrolle für die gelungene RNA-Isolierung und Erststrangsynthese wurde eine PCR mit einem für das Enzym GAPDH spezifischen Primerpaar durchgeführt, das ein 450 bp großes Amplifikat erzeugt. Das ubiquitäre Enzym GAPDH zeichnet sich durch eine zwischen den Spezies hoch konservierte Sequenz aus. In der p40-spezifischen PCR wurde das Primerpaar p40-259F und p40-829R verwendet. Als positive Kontrollen diente RNA, die aus persistent BDV-infizierten LEW Zellen (BDV-LEW) bzw. aus dem Gehirn einer mit BDV infizierten Ratte isoliert wurde. Als Negativkontrolle wurde Wasser mitgeführt. In den Zellklonen LEW-p40.22 und LEW-p40.23 konnte Nukleoprotein-spezifische RNA nachgewiesen werden (Abb. 3).

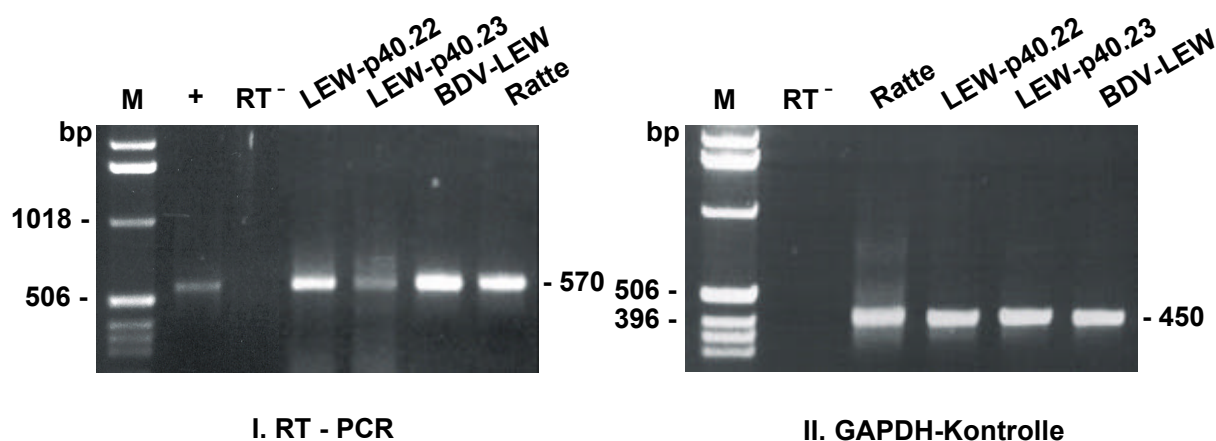


Abbildung 3: RT-PCR zum Nachweis Nukleoprotein-spezifischer RNA in transfizierten Zellen und GAPDH-Kontrolle. In den Zellklonen LEW-p40.22 und LEW-p40.23 wurden Nukleoprotein-spezifische, 570 bp große Produkte amplifiziert. Mit GAPDH-spezifischen Primern wurde in allen Proben, in denen RNA eingesetzt wurde, ein 450 bp großes Produkt amplifiziert. Als Positivkontrolle diente RNA einer mit BDV infizierten Ratte, sowie BDV-LEW Zellen. Als Negativkontrolle wurde Wasser eingesetzt (RT⁻). Als zusätzliche Kontrolle wurde in der p40-spezifischen PCR das Plasmid p40H/E mitgeführt (+) (M: Längenstandard).

Nachdem die erfolgreiche Transfektion und die Transkription des Nukleoprotein-Genoms in den transfizierten LEW Zellen nachgewiesen werden konnten, sollte anschließend untersucht werden, ob sich die transfizierten Zellen

als Zielzellen im Zytotoxizitätstest mit BDV-spezifischen Effektoren eigneten. Es wurden zwei unterschiedliche Versuchsansätze durchgeführt. Im ersten Ansatz, der zweimal durchgeführt wurde, sollten Gehirnlymphozyten BDV-infizierter Ratten als Effektoren dienen. Dazu wurden Tiere intracerebral (i.c.) mit 5×10^3 FFU BDV infiziert und am Tag 19 nach Infektion getötet. Als Zielzellen wurden der Klon LEW-p40.22, BDV-LEW Zellen und NL-LEW Zellen eingesetzt (Tab. 1). Die Gehirnlymphozyten waren in beiden Experimenten in der Lage den Klon LEW-p40.22 zu lysieren. Die spezifische Lyse fiel allerdings deutlich schwächer aus, als die von BDV-LEW Zellen.

Im zweiten Versuchsansatz wurden als Effektoren Lymphozyten aus der Milz von Ratten verwendet, die mit 10^7 PFU Vaccinia-Wildtyp Virus (VV-WR) bzw. einer Vaccinia-p40-Rekombinanten (VV-p40) i.v. infiziert wurden. Am sechsten Tag nach Infektion wurden die Milzen entnommen und aufgearbeitet. Die Milz eines nicht infizierten Tieres diente als Negativkontrolle. Als Zielzellen wurden die transfizierten Zellklone LEW-p40.22 und LEW-p40.23, sowie die nicht klonierte Ausgangskultur LEW-p40 eingesetzt. Als Negativkontrollen wurden NL-LEW Zellen verwendet. Als Kontrolle für die erfolgreiche Infektion der Ratten mit dem Vaccinia Virus wurden mit VV-WR infizierte LEW Zellen mitgeführt. Auch diese Untersuchung wurde zweimal durchgeführt (Tab. 2).

Tabelle 1: BDV-spezifische Lyse von LEW Zellen, die das Nukleoprotein exprimieren. Als Effektoren wurden Gehirnlymphozyten eingesetzt. Das Experiment wurde zweimal durchgeführt.

	<u>Zielzellen</u>		
	NL-LEW	BDV-LEW	LEW-p40.22
Exp.I	1 / 8 / 2	72 / 49 / 21	36 / 21 / 8
Exp.II	2 / 3 / 3	105 / 76 / 53	61 / 47 / 26

Effektor : Zielzellverhältnis 30:1 / 10:1 / 3:1

Die spontane Lyse der Zielzellen lag zwischen 27 % und 45 %.

Ergebnisse

Tabelle 2: BDV-spezifische Lyse von LEW Zellen, die das Nukleoprotein exprimieren. Als Effektoren wurden aus der Milz isolierte Lymphozyten eingesetzt. Das Experiment wurde zweimal durchgeführt.

<u>Effektoren</u>	<u>Zielzellen</u>				
	NL-LEW	LEW-VV-WR	LEW-p40	LEW-p40.22	LEW-p40.23
Exp. I					
NL	3 / 2 / 0	0 / 0 / 0	6 / 0 / 0	n.d.	22 / 4 / 2
VV-WR	10 / 0 / 0	45 / 33 / 3	29 / 18 / 10	n.d.	47 / 31 / 19
VV-p40	7 / 0 / 6	39 / 14 / 0	28 / 15 / 6	n.d.	54 / 22 / 19
Exp. II					
NL	13 / 4 / 3	19 / 2 / 0	0 / 0 / 0	24 / 6 / 0	26 / 7 / 8
VV-WR	7 / 10 / 0	43 / 25 / 6	8 / 0 / 0	28 / 13 / 0	n.d.
VV-p40	0 / 4 / 0	39 / 25 / 0	17 / 1 / 7	25 / 18 / 11	38 / 20 / 15
VV-p40	3 / 6 / 0	54 / 25 / 12	22 / 0 / 4	33 / 22 / 9	32 / 24 / 13

Effektor : Zielzellverhältnis 100:1 / 30:1 / 10:1

Die spontane Lyse der Zielzellen lag zwischen 32 % und 51 %.

Die Milzlymphozyten der Ratten, die mit VV-p40 infiziert wurden, zeigten eine spezifische Lyse der Stammkultur (LEW-p40) sowie der Zellklone LEW-p40.23 und LEW-p40.22. Der Klon LEW-p40.22 wurde nur in einem Durchgang mitgeführt. Allerdings führten auch die Milzlymphozyten der Ratten, die mit Vaccinia-Wildtyp Virus bzw. nicht infiziert wurden, zu einer Lyse der transfizierten Zielzellen. Bei den Ratten lag möglicherweise eine hohe Aktivität natürlicher Killerzellen (NK) in der Milz vor. Dafür spricht, dass keine bzw. nur eine sehr geringe Lyse von NL-LEW Zellen zu beobachten war. Ein Ziel für NK Zellen stellen solche Zellen dar, die als fremd erkannt werden, die infiziert oder auf eine andere Art verändert sind (Gumperez & Parham, 1995). Möglicherweise lag im Tierbestand eine bakterielle oder virale Infektion vor, was zu einer starken Aktivität von NK Zellen, die zur unspezifischen

körpereigenen Abwehr gezählt werden, führen kann. Da die Tiere ein ansonsten ungestörtes Allgemeinbefinden zeigten, konnte es sich aber nur um eine subklinische Infektion handeln. Es kann aus diesem Grund keine klare Aussage über diese Zytotoxizitätstests getroffen werden.

Da die spezifische Lyse des transfizierten Zellklons LEW-p40.22 durch die Gehirnlmphozyten als Beweis für die Proteinexpression der Zellen gewertet werden kann, wurden keine weiteren Untersuchungen zur Charakterisierung der Zellen durchgeführt. LEW Zellen, die das Nukleoprotein stabil exprimieren, stellen demnach geeignete Zielzellen für den Zytotoxizitätstest dar. In den hier durchgeführten Experimenten zeigten sich die Gehirnlmphozyten, im Vergleich zu den aus der Milz isolierten Lymphozyten, als besser geeignete Effektorzellen.

5.1.1.2 *Expression von verkürzten Nukleoproteinen in LEW Zellen*

Im vorangegangenen Experiment konnte gezeigt werden, dass die Möglichkeit besteht LEW Zellen, die das Nukleoprotein stabil exprimieren, als Zielzellen im Zytotoxizitätstest einzusetzen. Jetzt sollten LEW Zellen hergestellt werden, die verkürzte Nukleoproteine exprimieren, um diese im Zytotoxizitätstest zu verwenden. Auf diese Art sollte eingegrenzt werden, auf welchem Abschnitt des Nukleoproteins das oder die T-Zell-Epitope lokalisiert sind.

Zur Herstellung der Konstrukte wurden PCR-Produkte in den Expressionsvektor pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO ligiert, der für das „Green Fluorescent Protein“ (GFP) codiert. Wird dieses Reportergen in Zellen exprimiert, ist es sehr einfach möglich mittels FACS-Analyse oder Fluoreszenzmikroskopie transfizierte von nicht transfizierten Zellen oder Zellklonen zu unterscheiden. Das Plasmid liegt linearisiert vor und ist über die kovalent gebundene Topoisomerase I aktiviert. Da sich an den 3' Enden des Vektors einzelne Desoxythymidin-Überhänge

befinden, ist eine effektive Ligation von PCR-Produkten möglich, die mit der Taq-Polymerase synthetisiert wurden. Die Taq-Polymerase fügt PCR-Produkten über ihre template-unabhängige Transferase-Aktivität an den 3' Enden einzelne Desoxyadenosin-Moleküle an. Als Template für die PCR diente das Plasmid p40H/E, welches für das vollständige Nukleoprotein auf Grundlage des BDV-Stamms He/80 codiert. Dieses Plasmid wurde von M. Henkel in der Arbeitsgruppe von Dr. A. Rzhia an der BFAV Tübingen hergestellt. Dazu wurde RNA aus dem Gehirn einer Ratte, die mit BDV infiziert wurde isoliert und in der RT-PCR eingesetzt. Die Sequenz des Nukleoproteins wurde amplifiziert und das PCR-Produkt in den Vektor pCRII-TOPO ligiert. Das Plasmid wurde uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Begonnen wurde mit der Herstellung der Plasmide, welche die Sequenz für die drei kürzesten Nukleoprotein-Fragmente enthalten: p40-276, p40-498 und p40-708 (Abb. 1). Hierzu wurden die Primerpaare p40-H und p40-276R, p40-H und p40-498R sowie p40-H und p40-708R eingesetzt (Abb. 5). Da der Vektor selbst kein Startcodon am 5' Ende der Multiple Cloning Site beinhaltet, wurde die Signalsequenz in den Primer p40-H integriert. Die PCR-Produkte wurden C-terminal zur Sequenz des GFP kloniert, da auf diese Art bei Expression des fluoreszierenden Proteins auch von der Expression des Genprodukts der klonierten Nukleoproteinsequenz ausgegangen werden kann. Die korrekte Integration und die Sequenz der Konstrukte wurden anschließend mittels Sequenzanalyse überprüft.

Die stabile Transfektion wurde mit Hilfe des liposomalen Reagenzes Dospo unter Einsatz des Antibiotikums „Neomycin“ (G418) durchgeführt. Sowohl die nicht klonierte Stammkultur, als auch zahlreiche Zellklone wurden im Fluoreszenzmikroskop und in der FACS-Analyse auf die Expression von GFP untersucht.

Das Plasmid pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO beinhaltet die Sequenz für eine Mutante des Reportergens GFP, die im Vergleich zum Wildtyp eine bessere

Fluoreszenzintensität bei der Anwendung von Filtersystemen gewährleisten soll, die auf den Einsatz von FITC-markierten Proben eingestellt sind. Optimale Ergebnisse können bei einer Anregungswellenlänge von 395 nm, suboptimale Fluoreszenz bei der Anregung mit 470 nm (Anregungswellenlänge von FITC) erreicht werden (Ausubel et al., 1996). Die Fluoreszenz von GFP fiel unter den angewandten Bedingungen sehr schwach aus. Es war nicht möglich die spezifische Fluoreszenz von GFP von der Eigenfluoreszenz nicht transfizierter Zellen zu unterscheiden. Auch im FACS-Gerät war ein Screening der Zellklone nicht möglich.

5.1.2 Herstellung rekombinanter Vaccinia Viren

Beim Screening der mit den GFP-p40-Fusionsproteinen transfizierten Zellen waren Probleme aufgetreten. Es war nicht möglich die Fluoreszenz von transfizierten Zellen und die Eigenfluoreszenz nicht transfizierter Zellen unter den gegebenen Umständen zu unterscheiden. Auf Grund dessen wurde die Herstellung rekombinanter Vaccinia Viren in den Vordergrund gestellt. Es sollten Viren erzeugt werden, welche für die verschiedenen Abschnitte des BDV Nukleoproteins codieren. Das Virus, welches für das vollständige p40 codiert (VV-p40) wurde uns freundlicherweise von J. C. de la Torre (San Diego, U.S.A.) zur Verfügung gestellt.

Das Vaccinia-System zeichnet sich, im Vergleich zum Einsatz transfizierter Zellen, durch zahlreiche Vorteile aus. Die starke Replikation des Virus in infizierten Zellen führt zu einer sehr guten Expression des Proteins der Wahl. Mit Hilfe des Virus besteht weiterhin nicht nur die Möglichkeit, Zielzellen für den Einsatz im Zytotoxizitätstest zu generieren, sondern auch Effektorzellen in verschiedenen Tierspezies zu induzieren.

Die Sequenzen für die fünf verkürzten Nukleoproteine wurden in den Vektor pSC11.3 kloniert (Abb. 4). Die Expressionskassette des Vektors, die unter der

Kontrolle des Vaccinia-Promotors $p_{7,5}$ (früh/spät) steht, wird von Teilen des Thymidin Kinase-Gens von Vaccinia-Wildtyp flankiert, was die homologe Rekombination mit dem Virus ermöglicht. Zudem enthält das Plasmid die Sequenz für das Reportergen lacZ aus Escherichia coli. Das lacZ-Gen wird durch den Promotors p_{11} (spät) exprimiert.

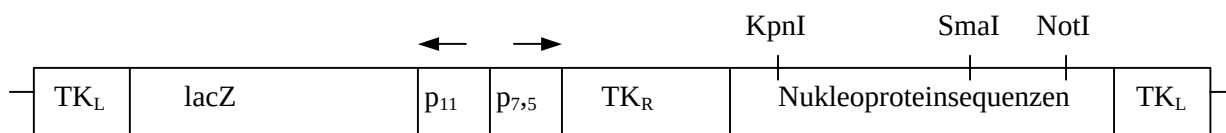


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Vektors pSC11.3 (8060 bp)

Die Expressionskassette, die unter Kontrolle des Vaccinia-Promotors $p_{7,5}$ steht, wird von Segmenten des Vaccinia Thymidin Kinase-Gens flankiert (TK_L und TK_R). Das Reportergen lacZ wird durch den Promotor p_{11} exprimiert. Die Sequenzen für die verkürzten Nukleoproteine wurden über die Schnittstellen KpnI und SmaI bzw. KpnI und NotI kloniert.

Die Sequenzen, welche für die drei kürzeren Nukleoprotein-Fragmente codieren (p40-276, p40-498, p40-708), wurden über die Restriktions-Schnittstellen KpnI und NotI aus den Plasmiden geschnitten, die auf der Basis des Vektors pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO hergestellt worden waren (vgl. 5.1.1.2). Anschließend folgte die gerichtete Ligation in den Vektor pSC11.3, der mit den selben Enzymen linearisiert wurde. Zur Herstellung der Konstrukte mit den beiden längeren Fragmenten (p40-918, p40-393) wurde eine PCR mit der Pwo-Polymerase und den Primerpaaren p40-HKpnI und p40-918R bzw. p40-393KpnI und p40-1125R durchgeführt. Die Pwo-Polymerase wurde verwendet, da sie durch ihre 3'-5' Exonuclease-Aktivität eine etwa 15 mal geringere Fehlerrate aufweist, als die Taq-Polymerase und daher besonders geeignet ist längere DNA-Sequenzen zu amplifizieren. Als Template diente das Plasmid p40H/E (Abb. 5). Durch die beiden Forward-Primer wurde eine KpnI-Schnittstelle in die Sequenzen eingeführt. Die PCR-Produkte wurden mit KpnI, der Vektor mit KpnI und SmaI geschnitten. Da der Einsatz der Pwo-Polymerase

zur Entstehung glatter Enden von PCR-Produkten und die Anwendung des Enzyms SmaI zur Entstehung einer glatten Schnittstelle führt, war eine gerichtete Klonierung möglich.

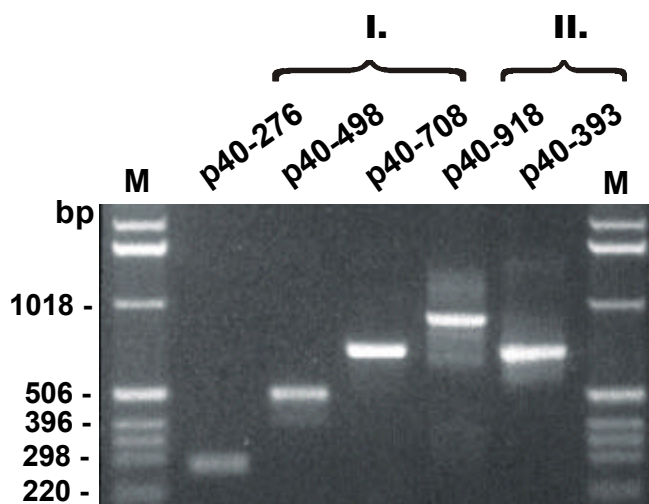


Abbildung 5: PCR zur Herstellung der Konstrukte pSC11.3-276, pSC11.3-498, pSC11.3-708, pSC11.3-918 und pSC11.3-393. Die PCR-Produkte p40-276 (277 bp), p40-498 (499 bp) und p40-708bp (709 bp) (I.) wurden zuerst in den Vektor pcDNA3.1CT/GFP-TOPO ligiert und dann in den Vektor pSC11.3 umklont. Die PCR-Produkte p40-918 (918 bp) und p40-393 (732 bp) (II.) wurden direkt in den Vektor pSC11.3 ligiert (M: Längenstandard).

Für die Vaccinia-Rekombination wurde mit der Thymidin Kinase-negativen Zelllinie 143tk⁻ gearbeitet. Nach Infektion mit Vaccinia-Wildtyp Virus wurden die Zellen mit Hilfe des Transfektionsreagenzes Effectene mit den Konstrukten pSC11.3-276, pSC11.3-498, pSC11.3-708 oder pSC11.3-918 transfiziert. Über das virale Thymidin Kinase-Gen konnte die homologe Rekombination stattfinden, was zu Entstehung Thymidin Kinase-negativer Viren führte. Selektionsdruck wurde durch die Zugabe von Bromodeoxyuridin (BrdU) zum Wachstumsmedium ausgeübt. Wird BrdU, ein Thymidin-Analogon, durch die Thymidin Kinase phosphoryliert, wird es in das virale Genom integriert und führt zum Absterben des Wildtyp Virus. Virus-Plaques, die durch rekombinante Viren entstanden waren, konnten durch die Zugabe von Bluo-Gal blau angefärbt

werden. Nur rekombinante Viren haben auf Grund des für die β -Galactosidase codierenden Reportergens lacZ die Fähigkeit das Substrat Bluo-gal umzusetzen. Auf diese Art war ein einfaches Screening möglich. Mit jedem der vier neu entstandenen Viren wurde fünfmal, unter Zugabe von BrdU, eine Endpunkttitration durchgeführt. Die Herstellung einer Vaccinia-Rekombinanten, welche die Aminosäuren 130-370 exprimieren sollte (VV-393), war im Rahmen dieser Dissertation aus Zeitgründen nicht mehr möglich.

Nach der homologen Rekombination und der Plaque-Reinigung der Viren musste geklärt werden, ob die rekombinanten Vaccinia Viren die gewünschten Gensequenzen des Nukleoproteins in ihr Genom integriert hatten. Das sollte anhand des Nachweises p40-spezifischer DNA in infizierten Zellkulturen überprüft werden. Dazu wurden je 10^6 143tk⁻ Zellen mit den rekombinanten Vaccinia Viren VV-276, VV-498, VV-708 und VV-918 infiziert (MOI 1). Nachdem ein deutlicher zytopathogener Effekt zu erkennen war (24 bis 48 Stunden p.i.), wurden die Zellen geerntet und die gesamte zelluläre und virale DNA isoliert. 500-600 ng DNA wurden in der nachfolgenden PCR eingesetzt. Zur Amplifikation wurden die selben Primerpaare eingesetzt, wie schon zur Herstellung der einzelnen Konstrukte für die Vaccinia-Rekombination: p40H und p40-276R, p40H und p40-498R, p40H und p40-708R bzw. p40HKpnI und p40-918R. Als Positivkontrolle wurde in den einzelnen PCR-Reaktionen das Plasmid p40H/E verwendet. Es konnten DNA-Fragmente in den erwarteten Längen (277 bp, 499 bp, 709 bp und 919 bp) amplifiziert werden (Abb. 6). In den vier PCR-Reaktionen wurde jeweils eine Wasser-Kontrolle mitgeführt, um Kontaminationen durch das Plasmid p40H/E auszuschließen (in der Abbildung nicht dargestellt).

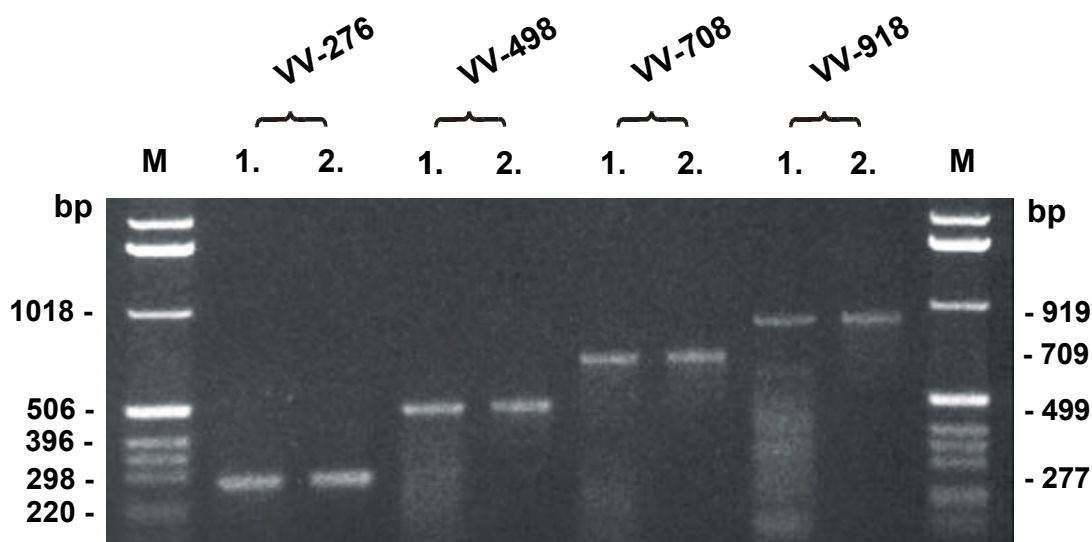


Abbildung 6: PCR zum Nachweis p40-spezifischer DNA in infizierten Zellkulturen. Ausgehend von Gesamtzell-DNA konnten Produkte mit 277 bp, 499 bp, 709 bp und 919 bp Länge amplifiziert werden (1.) In den vier PCR-Ansätzen wurde das Plasmid p40H/E als Positivkontrolle mitgeführt (2.) (M: Längenstandard).

Nachdem abgeklärt worden war, dass die rekombinanten Viren VV-276, VV-498, VV-708 und VV-918 das Genom der verkürzten Nukleoproteine integriert hatten, sollte als nächstes die Proteinexpression in Zellen, die mit diesen Viren infiziert wurden, mit Hilfe der Western Blot-Analyse überprüft werden. Dazu wurde ein zu 90 % konfluenter Zellrasen von 143tk⁻ Zellen mit den rekombinanten Viren infiziert (MOI 1). Nachdem ein deutlicher zytopathogener Effekt aufgetreten war (24 bis 48 Stunden p.i.) wurden die Zellen geerntet, zu Lysaten verarbeitet und in der Western Blot-Analyse untersucht. Als Kontrolle diente ein Zelllysate nicht infizierter Zellen und Lysate von 143tk⁻ Zellen, die mit Vaccinia-Wildtyp Virus bzw. VV-p40 infiziert wurden. Zum Färben wurde zum einen ein Serum angewandt, welches gegen das Nukleoprotein gerichtet war. Das Serum wurde von einer Ratte gewonnen, die dreimal im Abstand von zwei Wochen mit bakteriell exprimiertem Nukleoprotein (Abb. 15) immunisiert und nach zwei weiteren Wochen mit BDV infiziert wurde. Das Serum wurde am Tag 16 nach Infektion entnommen. Das zweite verwendete Serum stammte von einer Ratte, die acht Wochen vor dem Blutungstag mit 10⁷ PFU Vaccinia-Wildtyp Virus i.v. infiziert wurde. Die Seren wurden in einer Verdünnung von 1:100 in

PBS/Tween-20 eingesetzt. Die spezifischen Banden wurden nach der Inkubation mit einem peroxidase-markierten anti-Spezies Antikörper mit Hilfe des ECL-Reagenzes sichtbar gemacht.

Durch das p40-spezifische Serum konnten die vier unterschiedlich großen Nukleoprotein-Bruchstücke (10kD, 18kD, 25kD und 33kD), ebenso wie das vollständige p40 detektiert werden. Die Banden, die das vollständige Nukleoprotein und das Protein p40-918 repräsentieren, stellen sich deutlich stärker dar, als die der kleineren Bruchstücke.

Ein Serum besteht aus einem Gemisch aus Antikörpern, die eine Affinität zu verschiedenen B-Zell-Epitopen haben. Es ist denkbar, dass auf dem vollständigen Nukleoprotein mehr Epitope lokalisiert sind, als auf den verschiedenen p40-Bruchstücken. Wenn also eine größere Zahl Antikörper an die längeren Fragmente bindet, kann das die unterschiedliche Bandenintensität begründen. Es ist weiterhin möglich, dass durch die Lokalisation der B-Zell-Epitope auf den Nukleoprotein-Bruchstücken eine unterschiedliche Affinität der Antikörper auftritt. Es besteht auch die Möglichkeit, dass kürzere Teilstücke eines Proteins in einer Zelle weniger stabil sind, d.h. zu einem früheren Zeitpunkt, im Vergleich zum vollständigen Nukleoprotein, durch Proteasen verdaut werden und aus diesem Grund eine geringere Konzentration der kürzeren Bruchstücke in der Wester Blot-Analyse aufgetragen wurde. Die Banden, die mit dem Vaccinia-spezifischen Serum detektiert wurden, hatten bei allen infizierten Zelllysaten eine etwa gleiche Intensität. Es lässt sich daher annehmen, dass die Zellen bei der Herstellung der Lysate mit einer ähnlichen Anzahl Viruspartikel infiziert waren und dass die unterschiedliche Intensität der Nukleoprotein-Banden nicht auf den Einsatz unterschiedlicher Mengen Virus bei der Infektion der 143tk⁻ Zellen oder eine unterschiedlich starke Vermehrung der einzelnen Rekombinanten in der Zellkultur zurückzuführen war (Abb. 7). Die rekombinanten Vaccinia Viren waren hergestellt worden, um einzugrenzen, wie viele MHC-Klasse-I restringierte T-Zell-Epitope sich auf dem

Nukleoprotein des BDV befinden und in welchem Bereich des Proteins diese lokalisiert sind. Dazu sollten LEW Zellen mit diesen Viren infiziert und auf diese Art Zielzellen für den in vitro Zytotoxizitätstest generiert werden. Als Effektoren sollten Gehirnlmphozyten aus BDV-infizierten Ratten eingesetzt werden. Im Rahmen dieser Dissertation war es aus Zeitgründen allerdings nicht mehr möglich, diese weiterführenden Experimente durchzuführen.

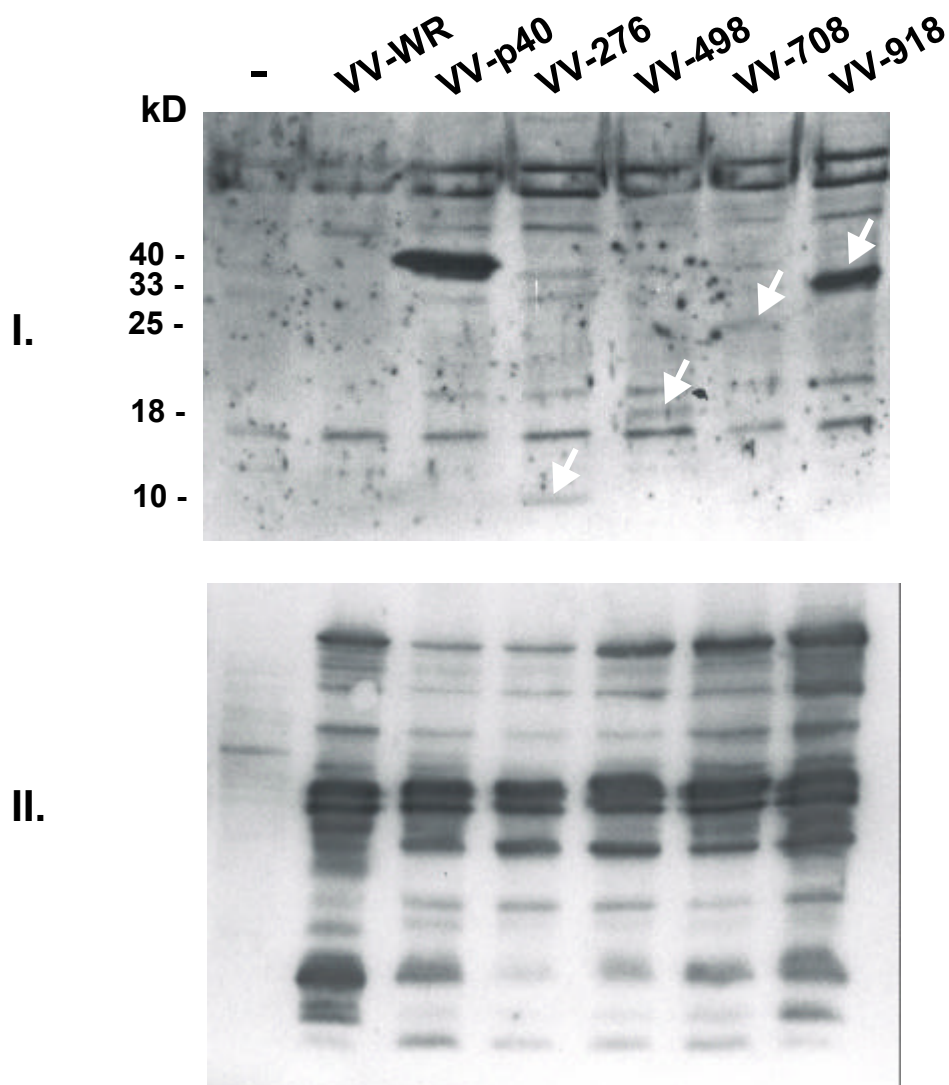


Abbildung 7: Western Blot-Analyse zum Nachweis der Expression verkürzter Nukleoproteine in Zellkultur. 143tk⁻ Zellen wurden mit den Vaccinia Viren VV-276, VV-498, VV-708 und VV-918 infiziert. Zur Kontrolle wurden nicht infizierte 143tk⁻ Zellen (-) bzw. mit VV-WR und VV-p40 infizierte Zellen mitgeführt. Gefärbt wurde mit α -p40-Serum (I.) und α -VV-WR-Serum (II.). Die Pfeile deuten auf die verkürzten Nukleoproteine. Das zweite Serum sollte zeigen, dass die Zellen mit einer vergleichbaren Anzahl Viruspartikel infiziert waren.

5.2 *BDV-spezifische Peptide*

Das heutige Wissen über die Antigenprozessierung und Antigenpräsentation in der Ratte sind im Vergleich zu dem, was über den Menschen und die Maus bekannt ist, nur bruchstückhaft. Nur für die MHC-Klasse-I-Haplotypen RT1.A¹, RT1.A^u, RT1.A^c und RT.1.A^a der Laborratte (*Rattus Norvegicus*) sind bisher Peptidmotive von Liganden bekannt. Diese Peptide zeigen eine Länge zwischen neun und zwölf Aminosäuren. Die bisher gesammelten Erkenntnisse entstammen der Charakterisierung von natürlich prozessierten „Selbst-Proteinen“ (Powis et al., 1993; Reizis et al., 1997; Stevens et al., 1998).

Die Lewis Ratte, die das am besten untersuchte Tiermodell für die Pathogenese der BDV-Infektion darstellt, exprimiert das MHC-Klasse-I-Allel RT1.A¹. Im folgenden Abschnitt der Arbeit wurden BDV-spezifische RT1.A¹-Liganden charakterisiert.

5.2.1 Synthetische Peptide

Für das RT1.A¹-Molekül der Lewis Ratte sind Ankerpositionen und Peptidmotive von Liganden bekannt. Optimal für die Präsentation in diesem Molekül sind z.B. Nonamere, die an Position drei Tyrosin oder Phenylalanin, und an Position neun eine hydrophobe Aminosäure besitzen (Reizis et al., 1997). Die Sequenzen für das BDV-spezifische Nukleoprotein (p40), Phosphoprotein (p24), Matrixprotein (gp18), Glycoprotein (gp94) und die L-Polymerase (Pol) wurden ausgehend von der Datenbank SYFPEITHI (Rammensee et al., 1999) von Dr. S. Stevanovic im Interfakultären Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie, der Universität Tübingen auf das Vorhandensein passender RT1.A¹-Motive überprüft. Für jedes der Proteine wurden nach diesen Vorhersagen, im oben genannten Institut, eine oder mehrere Sequenzen

synthetisiert. NL-LEW Zellen wurden mit den Peptiden beladen und im Zytotoxizitätstest als Zielzellen eingesetzt. Auf diese Art sollte versucht werden, mögliche BDV-spezifische MHC-Klasse-I-Liganden der Lewis Ratte zu charakterisieren.

10^4 NL-LEW Zellen, die mit ^{51}Cr markiert waren, wurden über 90 Minuten mit 5 μg , 500 ng, bzw. 50 ng der verschiedenen Peptide inkubiert und anschließend im Zytotoxizitätstest eingesetzt. Als Effektoren dienten Gehirnlymphozyten von Lewis Ratten, die intracerebral mit BDV infiziert und in der akuten Phase der Erkrankung getötet wurden.

Es wurden jeweils 3×10^5 Lymphozyten zu einem Ansatz peptid-beladener LEW Zellen gegeben, so dass ein Effektor : Zielzellverhältnis von 30:1 entstand (Tab. 3).

Ergebnisse

Tabelle 3: Darstellung der synthetisierten Peptide und Ergebnis der BDV-spezifischen Lyse von Peptid-beladenen LEW Zellen. 10^4 Zellen wurden mit 5 μ g, 500 ng und 50 ng Peptid beladen. Das Effektor : Zielzellverhältnis lag bei 30:1.

Bezeichnung	Virus-Protein	AS-Sequenz	AS-Position ^{a)}	% spezifische Lyse
8151	p40	DAMEDQDLY	12–20	0 / 2 / 1
8154	p40	DLYEPPASL	18-26	0 / 0 / 0
8157	p40	TVVKTAIFY	111-119	0 / 1 / 0
8159	p40	TELEISSIF	129-137	15 / 2 / 8
9048	p40	ASYAQMTTY	230–238	48 / 46 / 50
9050	p40	VAYEIRDFL	258-266	5 / 5 / 0
9051	p40	ASLPKLPQKF	24-33	11 / 4 / 14
8115	p24	AGFESLSAL	106-114	6 / 8 / 6
8096	gp18	NIYFQIDDF	74-82	0 / 6 / 8
8098	gp18	PTLMLEIDF	20-28	1 / 5 / 6
8099	gp18	NQFLNIPFL	35-43	4 / 0 / 4
8100	gp94	DPFECNWFY	115-123	1 / 10 / 7
8101	gp94	VSYLNHTTI	59-67	17 / 16 / 15
8107	Pol	DSFVINLDY	440-448	0 / 4 / 4
8108	Pol	HVFTYGCLY	1078-1086	6 / 10 / 7
8109	Pol	KVFQDSALL	1243-1251	10 / 7 / 10

^{a)} angegeben ist die Position auf dem jeweiligen Virusprotein
Die spontane Lyse der Zielzellen lag zwischen 21 % und 45 %.

Das Peptid 9048 mit der Sequenz ASYAQMTTY, das auf dem Nukleoprotein lokalisiert ist, wurde von BDV-spezifischen zytotoxischen T-Zellen erkannt. Es belegt die Aminosäurepositionen 230-238 des p40. Da die mit diesem Peptid beladenen Zellen lysiert wurden, stellt es nicht nur einen RT1.A¹-Liganden, sondern auch ein Epitop BDV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen dar. Es wird im

Folgenden nur noch mit 9048 bezeichnet. Das Peptid wurde wiederholt auf die beschriebene Art getestet, wobei vergleichbare Ergebnisse erzielt werden konnten. Es stellt sich die Frage, ob die Peptide 8101 und 8159 ebenfalls von den CD8⁺ T-Zellen erkannt wurden oder ob es sich bei der Lyse, der mit diesen Peptiden beladenen Zellen, die bis zu 17 % erreichte, um einen unspezifischen Effekt handelte. Eine geringe spezifische Lyse könnte darauf hindeuten, dass es sich bei den beiden Peptiden um subdominante T-Zell-Epitope handelt. In Experimenten von Planz und Stitz hatten sich bereits Hinweise darauf ergeben, dass auf dem Glycoprotein ein subdominantes Epitop lokalisiert ist (Planz & Stitz, 1999).

5.2.1.1 *Bestimmung der optimalen Peptidkonzentration für das Beladen von Zielzellen*

Im folgenden Experiment wurde die Konzentration des Peptids 9048 bestimmt, mit der eine optimale BDV-spezifische Lyse erreicht werden konnte. Je 10⁴ NL-LEW Zellen wurden mit unterschiedlichen Peptidmengen (5 µg – 500 fg) exogen beladen und als Zielzellen im Zytotoxizitätstest eingesetzt. Als Effektoren dienten Gehirnlymphozyten, die am Tag 18 nach intracerebraler Infektion mit BDV aus Ratten isoliert wurden (Abb. 8). Mit dem Einsatz von 5 ng des Peptids konnte das beste Ergebnis erreicht werden. Halbmaximal war die Erkennung der beladenen Zielzellen, wenn 50 pg Peptid verwendet wurden. Auffällig ist die deutliche Steigerung der spezifischen Lyse, wenn die Anfangskonzentration von 5 µg Peptid auf ein Zehntel reduziert wird. In einem folgenden Experiment wurde nur über drei Stufen titriert. Es war eine weniger extreme Steigerung der spezifischen Lyse von Zellen, die mit 500 ng Peptid, im Vergleich zu solchen, die mit 5 µg Peptid beladen wurden, zu beobachten.

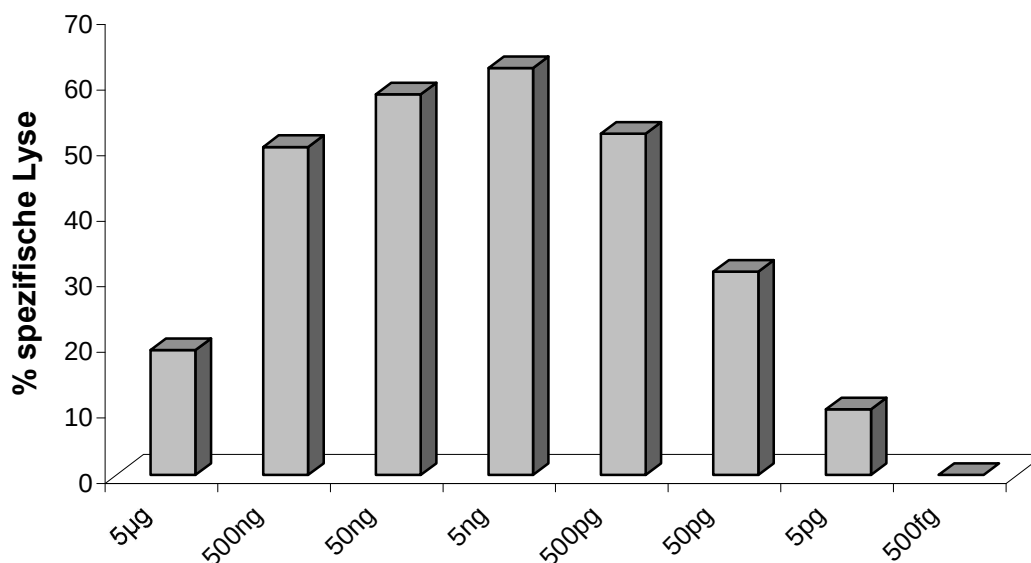


Abbildung 8: BDV-spezifisch Lyse von Zielzellen, die mit unterschiedlichen Mengen des Peptids 9048 beladen wurden. Das Effektor : Zielzellverhältnis lag bei 30:1. Die spontane Lyse der Zielzellen lag bei 28 %.

Nachdem die optimale Konzentration des Peptids 9048 für das Erreichen BDV-spezifischer Lyse bestimmt worden war, sollte im Weiteren die Methode der Gewinnung peptidbeladener Zielzellen für den Zytotoxizitätstest vereinfacht werden. Bisher wurden für ein optimales Ergebnis NL-LEW Zellen in einem ersten Inkubationsschritt über eine Stunde mit ^{51}Cr inkubiert, anschließend dreimal mit BSS gewaschen, gezählt und auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Danach wurden je 10^4 dieser Zellen über 90 Minuten in einem Well einer 96-Well-Platte in einem Volumen von 100 µl mit 5 ng Peptid beladen. Daraufhin folgte die Zugabe der Effektorzellen und die weitere Inkubation für zehn Stunden.

Im folgenden Experiment wurden die NL-LEW Zellen gleichzeitig mit ^{51}Cr markiert und mit dem Peptid 9048 beladen. 10^6 Zellen wurden nach der Zugabe von ^{51}Cr und 500 ng des Peptids 9048 in einem Volumen von 0,5 ml über eine Stunde inkubiert, anschließend gewaschen und auf die benötigte Konzentration eingestellt. Als Effektoren wurden Gehirnlymphozyten aus Ratten in der akuten

Phase der BDV-Infektion eingesetzt. Als Positivkontrolle wurden BDV-LEW Zellen mitgeführt, als Negativkontrolle unbeladene NL-LEW Zellen. Das Experiment wurde dreimal durchgeführt (Tab. 4).

Tabelle 4: BDV-spezifische Lyse verschiedener Zielzellen. NL-LEW Zellen wurden gleichzeitig mit ^{51}Cr markiert und mit dem Peptid 9048 beladen (LEW 9048)

<u>Zielzellen</u>	<u>% spezifische Lyse</u>		
	Experiment I	Experiment II	Experiment III
LEW 9048	98 / 59 / 17	49 / 21 / 11	103 / 76 / 35
BDV LEW	76 / 53 / 25	40 / 16 / 3	50 / 37 / 4
NL LEW	3 / 3 / 0	0 / 0 / 0	13 / 9 / 8

Effektor : Zielzellverhältnis 10:1 / 3:1 / 1:1

Die spontane Lyse der Zielzellen lag zwischen 36 % und 51 %.

Die mit dem Peptid 9048 beladenen Zielzellen wurden von den BDV-spezifischen T-Zellen lysiert. Die Lyse war in den drei unabhängigen Durchgängen sogar deutlich höher, als die von BDV-LEW Zellen. Demnach konnten mit der modifizierten Methode erfolgreich peptidbeladene Zielzellen hergestellt werden.

5.2.2 Natürlich prozessierte Peptide

Nachdem ein synthetisches Peptid charakterisiert werden konnte, das von BDV-spezifischen T-Zellen der Lewis Ratte in Verbindung mit dem RT1.A¹-Molekül erkannt wurde, sollte in diesem Teil der Arbeit untersucht werden, ob dieses Peptid auch von BDV-infizierten Zellen prozessiert und präsentiert wird.

Dazu wurden BDV-LEW Zellen lysiert und mit Hilfe des MHC-Klasse-I-spezifischen Antikörpers OX-18 über Immunaффinitätschromatographie

aufgereinigt. Die MHC-Komplexe wurden eluiert und die gewonnenen Peptide in der HPLC in 60 Fraktionen aufgetrennt (Abb. 10B). Diese Arbeitsschritte wurden von Dr. T. Dumrese im Interfakultären Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie, der Universität Tübingen durchgeführt.

Es wurden $2,5 \times 10^{10}$ BDV-LEW Zellen eingesetzt. Um die große Anzahl Zellen zu produzieren wurden diese auf Gelatine-Trägern (Microcarrier) in einem Rührflaschen-System kultiviert. Solche Gelatine-Träger dienen der Vergrößerung der Oberfläche, auf der sich adherent wachsende Zellen vermehren können.

Nach der Aufreinigung und Fraktionierung der RT1.A1-Liganden der BDV-LEW Zellen wurden ^{51}Cr -markierte NL-LEW Zellen mit Aliquots der verschiedenen HPLC-Fraktionen beladen und im Zytotoxizitätstest eingesetzt. Als Effektorzellen dienten wiederum Gehirnymphozyten erkrankter Ratten. Zur BDV-spezifische Lyse führte das Beladen von Zielzellen mit der Fraktion 24 (Abb. 10C; Tab. 5). Zur Kontrolle wurde das Lysat der BDV-LEW Zellen zusätzlich über eine Säule aufgereinigt, die mit Glycin anstelle des monoklonalen Antikörpers OX-18 gekoppelt war. Das erhaltene Eluat wurde mittels HPLC aufgetrennt und mit den so erhaltenen Fraktionen wurden wieder Zielzellen für den Zytotoxizitätstest hergestellt. Es wurde keine BDV-spezifische Lyse dieser Zielzellen beobachtet (Tab. 5). Als weitere Negativkontrolle wurden 10^{10} NL-LEW Zellen lysiert, über eine OX-18 gekoppelte Säule aufgereinigt und das Eluat in der HPLC fraktioniert. Der Einsatz dieser Fraktionen im Zytotoxizitätstest führte ebenfalls nicht zur BDV-spezifischen Lyse von Zielzellen. Das bedeutet, dass nur die HPLC-Fraktion 24 aus der Aufreinigung persistent BDV-infizierter LEW Zellen Peptide enthielt, die von BDV-spezifischen T-Zellen erkannt wurden.

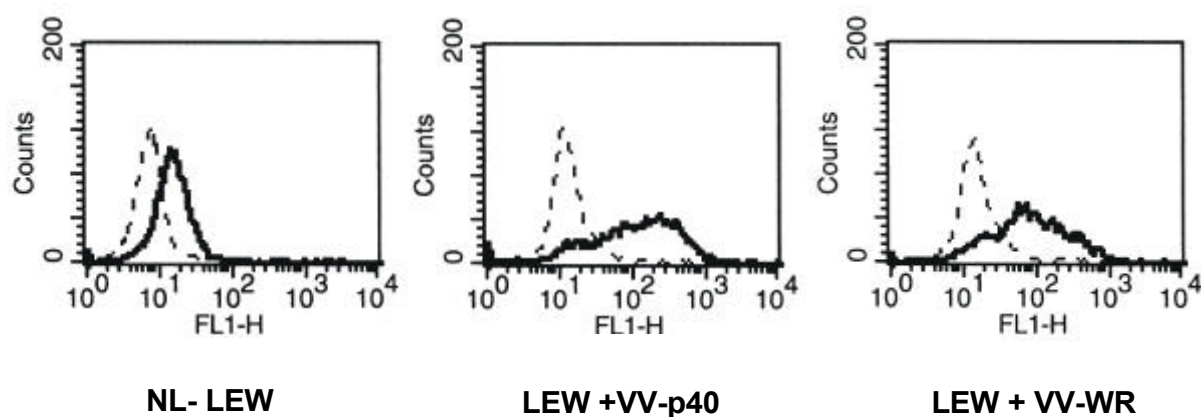
In einem weiteren Versuchsansatz wurden die RT1.A¹-I-Liganden aus $4,5 \times 10^9$ mit VV-p40 infizierten und als Negativkontrolle aus $2,2 \times 10^9$ mit VV-WR infizierte NL-LEW Zellen in der HPLC aufgetrennt. Es wurden weniger

Vaccinia-infizierte, im Vergleich zu den persistent BDV-infizierten Zellen eingesetzt, da in einer mit Vaccinia infizierten Zelle bis zu mehreren tausend Viruspartikel entstehen können (Ausubel et al., 1997). Das bedeutet, dass ebenso viele Kopien des Genoms eines möglichen T-Zell-Epitops, das mit Hilfe des Virus eingeschleust wurde, vorhanden sein müssen. Daher kann auch von einer effizienten Präsentation dieses Epitops ausgegangen werden. Das BDV liegt dagegen in infizierten Zellen nur in einer sehr geringen Kopienzahl vor. Die erfolgreiche Vaccinia-Infektion der LEW Zellen wurde in der FACS-Analyse überprüft (Abb. 9). Als Kontrollansatz wurden die mit VV-p40 infizierten LEW Zellen auch über eine mit Glycin anstelle von OX-18 gekoppelten Säule aufgereinigt und das erhaltene Eluat mit Hilfe der HPLC fraktioniert. Mit den verschiedenen Fraktionen aus der Aufarbeitung von VV-p40-LEW Zellen und VV-WR-LEW Zellen wurden Zielzellen beladen und diese auf BDV-spezifische Lyse untersucht. Als Effektoren wurden Gehirnlymphozyten von Ratten eingesetzt, die 19 Tage nach der Infektion mit BDV gewonnen wurden.

Die Peptide der Fraktionen 23 und 24 aus der Aufarbeitung von VV-p40-LEW Zellen führten in einem von zwei Experimenten zu einer geringen Lyse der Zielzellen, wogegen es durch die zugehörigen Glycin-Fraktionen zu keiner spezifischen Lyse kam. Allerdings wurden auch Zellen in geringem Maße lysiert, welche mit der Fraktion 24 aus der Aufarbeitung der mit VV-WR-infizierten Zellen beladen waren (Tab. 5). Es ist daher wahrscheinlich, dass die Lyse der Zielzellen, die mit den Fraktionen 23 und 24 aus der Aufarbeitung der mit VV-p40 infizierten Zellen beladen wurden, auf einen unspezifischen Effekt zurückzuführen war.

Des Weiteren wurde zur genaueren Charakterisierung der natürlichen RT1.A¹-Liganden 1 µg des synthetischen Peptids 9048, das in Medium (IMDM) aufgenommen wurde, unter den gleichen Bedingungen, wie die zuvor untersuchten MHC-Klasse-I-Liganden, in der HPLC analysiert (Abb. 10A). Es sollte festgestellt werden, in welcher Fraktion das Peptid eluiert. In Abbildung

10A ist das deutliche UV-Signal dargestellt, das im HPLC-Profil bei Fraktion 24 zu erkennen ist. Die zusätzlichen Peaks bei den Fraktionen 13, 28 und 47 resultieren aus Inhaltsstoffen des Mediums. Es zeigte sich, dass der Einsatz der HPLC-Fraktionen 23 und 24 im Zytotoxizitätstest zur BDV-spezifischen Lyse von beladenen NL-LEW Zellen führte (Tab. 5). Die Wiederholung des Experiments führte zum gleichen Ergebnis.



---- Zellen, die nur mit FITC-markiertem Konjugat inkubiert wurden

— Zellen, die mit α -VV-WR-Serum und FITC-markiertem Konjugat inkubiert wurden

Abbildung 9: FACS-Analyse von NL-LEW Zellen, die mit Vaccinia-p40 (VV-p40) und Vaccinia-Wildtyp Virus (VV-WR) infiziert wurden.

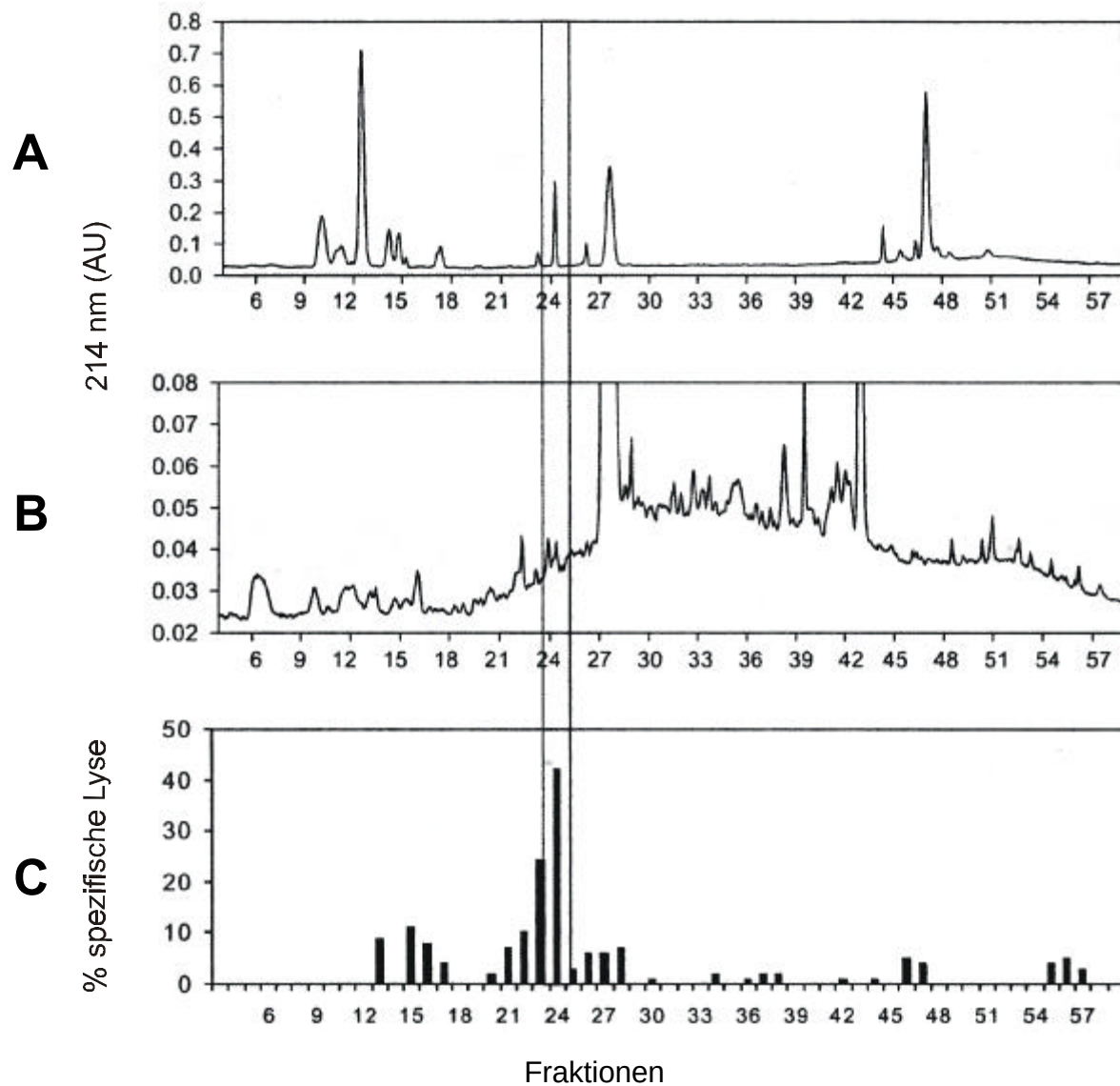


Abbildung 10: HPLC-Profil des synthetischen Peptids 9048 (**A**) und natürlich prozessierter RT1.A1-Liganden aus BDV-LEW Zellen (**B**). In (**C**) ist die spezifische Lyse von NL-LEW Zellen dargestellt, die mit den natürlichen Liganden beladen wurden. Das Effektor : Zielzellverhältnis lag bei 30:1. Die spontane Lyse der Zielzellen lag zwischen 25 % und 40 %.

Tabelle 5: BDV-spezifische Lyse von NL-LEW Zellen, die mit den Fraktionen 23 und 24 verschiedener HPLC-Durchgänge beladen wurden. Angegeben ist die Lyse, die durch das Beladen mit 50 µl, 5 µl und 0,5 µl der jeweiligen HPLC-Fraktionen erreicht wurde. Das Effektor : Zielzellverhältnis lag bei 30:1.

<u>HPLC-Durchgang</u>	<u>% spezifische Lyse</u>	
	Fraktion 24	Fraktion 23
BDV-LEW OX-18	50 / 17 / 0	0 / 7 / 7
BDV-LEW Glycin	7 / 3 / 3	0 / 0 / 0
VV-p40-LEW OX-18	17 / 10 / 0	10 / 1 / 1
VVp40-LEW Glycin	3 / 0 / 3	0 / 0 / 0
VVWR-LEW OX-18	16 / 3 / 4	3 / 5 / 3
9048	79 / 59 / 50	72 / 53 / 15

Die spontane Lyse der Zielzellen lag zwischen 35 % und 39 %.

Das synthetischen Peptid 9048 und die natürlichen prozessierten BDV-spezifischen RT1.A1-Liganden, die von zytotoxischen T-Zellen erkannt werden, eluierten in der selben Fraktion einer unter identischen Bedingungen durchgeführten HPLC-Auftrennung. Es liegt daher die Vermutung nahe, dass das Peptid 9048, mit der Sequenz ASYAQMTTY, einen natürlichen MHC-Klasse-I-Liganden der Lewis Ratte darstellt.

Inzwischen wurden die natürlich prozessierten Liganden, die in Fraktion 24 eluierten, von Dr. M. Schirle im Interfakultären Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie, der Universität Tübingen, massenspektrometrisch untersucht. Es konnte dargestellt werden, dass die Sequenz des natürlichen Liganden identisch mit der Sequenz ASYAQMTTY ist.

5.3 Immunisierungsexperimente mit dem Peptid 9048

Die BD stellt eine immunpathologische Erkrankung des ZNS dar, in deren Verlauf es zu irreversiblen Schäden durch CD8⁺ T-Zellen kommt. In Transfer-Experimenten konnte gezeigt werden, dass Ratten vor diesen Schäden bewahrt werden können, wenn schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt nach Infektion CD8⁺ T-Zellen aktiviert werden, die dann in der Lage sind das Virus zu eliminieren (Richt et al., 1994; Nöske et al., 1998). In den folgenden Experimenten sollte versucht werden, mit Hilfe des Peptids 9048, das ein BDV-spezifisches T-Zell-Epitop darstellt, eine MHC-Klasse-I-restringierte Immunantwort in der Ratte zu induzieren.

Aus verschiedenen Experimenten, die u.a. mit dem humanen Immundefizienz Virus (HIV), dem lymphozytären Choriomeningitis Virus (LCMV), dem Influenza A Virus und dem Sendai Virus durchgeführt wurden ist bekannt, dass mit Peptiden, die virusspezifische MHC-Klasse-I-restringierte T-Zell-Epitope repräsentieren, die Induktion von Effektorzellen in der Maus möglich ist (Aichele et al., 1990; Gao et al., 1991; Hart et al., 1991; Kast et al., 1991; Sastry et al., 1992). Mit LCMV-spezifischen Peptiden immunisierte Tiere konnten durch die Induktion von CD8⁺ Lymphozyten vor einer folgenden Virusinfektion geschützt werden (Schulz et al., 1991; Aichele et al., 1995).

Da bisher keine Erkenntnisse vorliegen, ob die Immunisierungsstrategien, die in der Maus erfolgreich waren, auch auf die Ratte übertragbar sind, wurden verschiedene Versuchsansätze gewählt.

5.3.1 Periphere Immunisierung (subkutan und intraperitoneal)

Arbeiten, die unter anderem mit HIV und mit LCMV durchgeführt wurden, hatten gezeigt, dass durch die subkutane oder intraperitoneale Applikation eines virusspezifischen Peptids, das in Freundschem Adjuvans aufgenommen wurde,

CD8⁺ T-Zellen in der Milz induziert werden konnten (Hart et al., 1991; Aichele et al., 1995; Allsop et al., 1996). Diese Immunisierungsstrategien wurden in den folgenden Experimenten verfolgt.

Ratten wurden entweder mit 20 µg oder mit 200 µg des Peptids 9048 subkutan oder intraperitoneal immunisiert. Zwei Wochen nach der primären Peptidapplikation wurden die Tiere ein zweites Mal immunisiert, zwölf Tage später wurden sie getötet und die Milzen entnommen. Die wiederholte Immunisierung sollte eine eventuell vorhandene, schwache Immunantwort verstärken. Die erste Peptidapplikation erfolgte in komplettem Freundschem Adjuvans (CFA), dem abgetötete Mycobakterienbestandteile beigefügt sind, um die Immunogenität der Wasser-in-Öl-Emulsion zu erhöhen. Für die sekundäre Immunisierung wurde dem Peptid inkomplettes Freundsches Adjuvans (IFA) zugefügt.

Die aus den Milzen der immunisierten Ratten isolierten Lymphozyten wurden entweder direkt im Zytotoxizitätstest auf BDV- und peptidspezifische Lyse untersucht oder vorher über acht Tage in vitro restimuliert.

Weder die primär stimulierten noch die in vitro restimulierten Milzzellen führten zu einer spezifischen Lyse von persistent infizierten oder peptidbeladenen Zielzellen. Da in den Experimenten Gehirnlmphozyten als Kontrolle mitgeführt wurden, kann von der Funktionalität der Zielzellen ausgegangen werden.

5.3.2 Lokale Immunisierung

Mit den beschriebenen subkutanen oder intraperitonealen Immunisierungen mit dem Peptid 9048 war es nicht gelungen, in der Milz eine peptid-spezifische Immunantwort hervorzurufen. Im folgenden Experiment sollte die Frage geklärt werden, ob durch eine lokale Immunisierung peptidspezifische zytotoxische T-

Zellen in den poplitealen Lymphknoten induziert werden können. Hierzu sollte Ratten das Peptid 9048 s.c. in die Fußsohle injiziert werden.

Arbeiten mit LCMV hatten gezeigt, dass etwa eine Woche nach der subkutanen Infektion in die Fußsohle (i.f.) von Mäusen, CD8⁺ T-Zellen in den lokalen Lymphknoten aktiviert wurden, in den Fuß migrierten und dort zu einer entzündlichen Reaktion mit starker Schwellung des Gewebes führten (Moskophidis und Lehmann-Grube, 1989; Moskophidis et al., 1990). Die Gewebeschwellung konnte also als Indikator für das Auftreten von T-Zellen angesehen werden. In den Arbeiten mit LCMV wurde im Gegensatz zu den folgenden Experimenten mit einem infektiösen Agens und nicht mit Peptiden gearbeitet. Aus diesem Grund wurden verschiedene Adjuvantien zur Immunisierung verwendet, um die Immunantwort zu steigern. Es wurde Freundesches Adjuvans oder Titermax Gold™ eingesetzt. Von Kast und Mitarbeitern wird beschrieben, dass mit Hilfe von Titermax Gold™ erfolgreich T-Zellen durch eine Peptidvakzine induziert werden konnten (Kast et al., 1993). Ratten wurden je 100 µg oder 10 µg Peptid s.c. tief in die Fußsohlen der Hinterfüße injiziert. Als Kontrolle erhielten Tiere PBS in Adjuvans und es wurden Füße gar nicht manipuliert. Eine Zunahme der Fußrückendicke war bei den behandelten Tieren ab dem ersten Tag nach der Immunisierung an feststellbar, wobei die stärkste Schwellung an Tag vier bis fünf gemessen wurde. Die Fußrückendicke nahm bei den Ratten, die entweder Adjuvans mit Peptid oder mit PBS bekommen hatten, etwa gleich stark zu. Bei der Immunisierung ohne Peptid stellte sich die Schwellung mit leichter Verzögerung ein.

Die Tiere wurden neun bzw. 12 Tage nach der Immunisierung getötet. Die poplitealen Lymphknoten der Ratten wurden entweder direkt in der Durchflusszytometrie auf das Vorhandensein von CD8⁺ T-Zellen im Verhältnis zu den CD4⁺ T-Zellen untersucht oder vor der weiteren Untersuchung der Zellen *vitro* restimuliert. Für die Restimulation wurden die Lymphozyten mit NL-LEW Zellen bzw. mit syngenischen Milzzellen, die mit dem Peptid 9048 beladen waren,

in IL 2-haltigem T-Zell-Medium kokultiviert. Als Kontrollansätze wurden unbeladene NL-LEW Zellen bzw. Milzzellen eingesetzt. Während der Kultivierung wurden die Lymphozyten mikroskopisch auf das Wachstum der Einzelzellen sowie die Vermehrung der Population untersucht. Die Lymphozyten wurden geerntet, sobald kein Ansteigen der Zellzahl mehr festgestellt werden konnte (sechs Tage nach der Aussaat) und anschließend entweder durchflusszytometrisch untersucht oder alternativ im Zytotoxizitätstest auf das Vorhandensein peptidspezifischer zytotoxischer T-Zellen getestet.

In der FACS-Analyse war im Bezug auf das Vorhandensein von CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu CD4⁺ T-Zellen kein Unterschied zwischen Tieren feststellbar, die mit Freundschem Adjuvans bzw. mit Titer Max Gold™ und Peptid oder mit dem jeweiligen Adjuvans alleine immunisiert wurden. Das Peptid führte zu keiner verstärkten Induktion von CD8⁺ T-Zellen. Im Zytotoxizitätstest sollte abgeklärt werden, ob durch die Peptidimmunisierung T-Zellen mit einer Spezifität für das Peptid 9048 aktiviert werden konnten. In keinem Ansatz konnte eine erhöhte Lyse von peptidbeladenen Zielzellen, im Vergleich zu unbeladenen Zielzellen, festgestellt werden. Auch durch die lokale Applikation des Peptids 9048 war es demnach nicht gelungen eine spezifische T-Zell-Antwort in Ratten zu induzieren.

5.3.3 Immunisierung von Ratten mit dem Peptid 9048 und anschließende BDV-Infektion

Mit den bisherigen Immunisierungsstrategien war es nicht gelungen, CD8⁺ T-Zellen in der Milz oder den poplitealen Lymphknoten von Ratten zu induzieren. In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob sich eine wiederholte Applikation des Peptids 9048 auf eine folgende BDV-Infektion auswirkt. In Untersuchungen, die mit dem lymphozytären Choriomeningitis

Virus (LCMV) durchgeführt wurden, konnte gezeigt werden, dass nach mehrmaliger intraperitonealer Peptidapplikation und anschließender LCMV-Infektion eine Toleranz peptid-spezifischer T-Zellen auftrat. Das verwendete Peptid stellte einen virusspezifischen MHC-Klasse-I-Liganden dar (Aichele et al, 1995). Eine so erzielte Toleranz ist besonders im Hinblick auf immunpathologische Erkrankungen, zu denen auch die BD gehört, von Interesse. Im Verlauf der BD führen CD8⁺ T-Zellen zur Degeneration von Neuronen, was zu massiven neurologischen Erkrankungserscheinungen bei den erkrankten Tieren führt. Eine Induktion von Toleranz der BDV-spezifischen T-Zellen könnte vor chronischen Schäden schützen.

Neben den mit dem Peptid 9048 behandelten Ratten wurden in den nachfolgenden Experimenten verschiedene Kontrollgruppen mitgeführt.

5.3.3.1 *Immunisierung mit dem Peptid 9048 und anschließende Virusinfektion: Beurteilung des Krankheitsverlaufs, der Virusvermehrung und der entzündlichen Veränderungen im Gehirn (Experiment 1)*

In diesem Experiment wurden zwei Gruppen unterschieden. Eine Gruppe wurde dreimal im Abstand von zwei Wochen mit je 50 µg Peptid i.p. immunisiert. Die erste Gabe erfolgte in CFA, die darauffolgenden (Booster) in IFA. Zwei Wochen nach der letzten Immunisierung wurden die Tiere mit BDV infiziert. Eine weitere Gruppe wurde ohne Immunisierung gleichzeitig mit der immunisierten Gruppe infiziert und diente als Kontrollgruppe (Abb. 11). Die Tiere wurden regelmäßig gewogen und ihr Gesundheitszustand wurde beurteilt. In regelmäßigen Abständen wurde den Tieren Blut entnommen, das mit Hilfe der Western Blot-Analyse auf das Vorhandensein von BDV-spezifischen Antikörpern untersucht wurde.

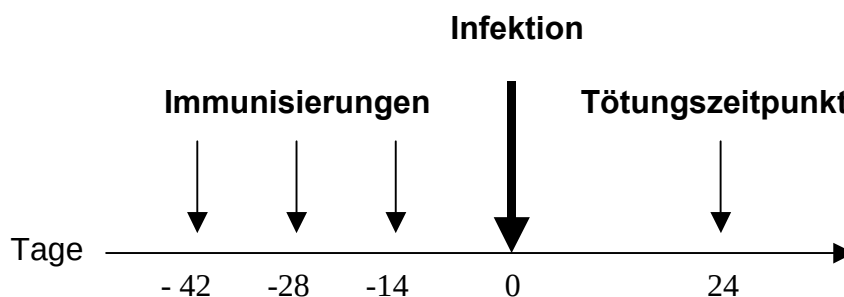


Abbildung 11: Darstellung des Immunisierungsschemas aus Experiment 1.

a. Auftreten BDV-spezifischer Symptome

Bei der Kontrollgruppe traten die ersten BDV-spezifischen klinischen Symptome, wie Koordinationsstörungen, ab Tag 12 nach Infektion auf und führten innerhalb von sieben Tagen zu schweren Krankheitserscheinungen (Stufe 2,5-3,0). Mit dem Auftreten der ersten Symptome begannen zwei der drei Tiere auch an Gewicht zu verlieren. Das Gewicht des dritten Tiers blieb trotz starker klinischer Symptome bis zum Tag 20 nach Infektion stabil.

Bei der immunisierten Gruppe waren erste unspezifische Symptome, wie z.B. struppiges und mangelhaft gepflegtes Fell der Tiere, erst ab Tag 19 nach Infektion feststellbar. Allerdings verschlechterte sich der Zustand der Ratten sehr schnell und die Tiere mussten am Tag 24 p.i. getötet werden, da sie schwere BDV-spezifische Symptome zeigten (Stufe 2,0-2,5). Erste Gewichtsverluste waren bei diesen Tieren am Tag 17 nach Infektion, d. h. zwei Tage vor Einsetzen erster klinischer Symptome zu erkennen (Abb. 12, 13).

Die Peptidimmunisierung der Tiere hatte demnach einen deutlichen Effekt auf die nachfolgende Virusinfektion. Die immunisierten Ratten erkrankten erst mit einer auffälligen Verzögerung von sieben Tagen, verglichen mit den nicht immunisierten Kontrolltieren.

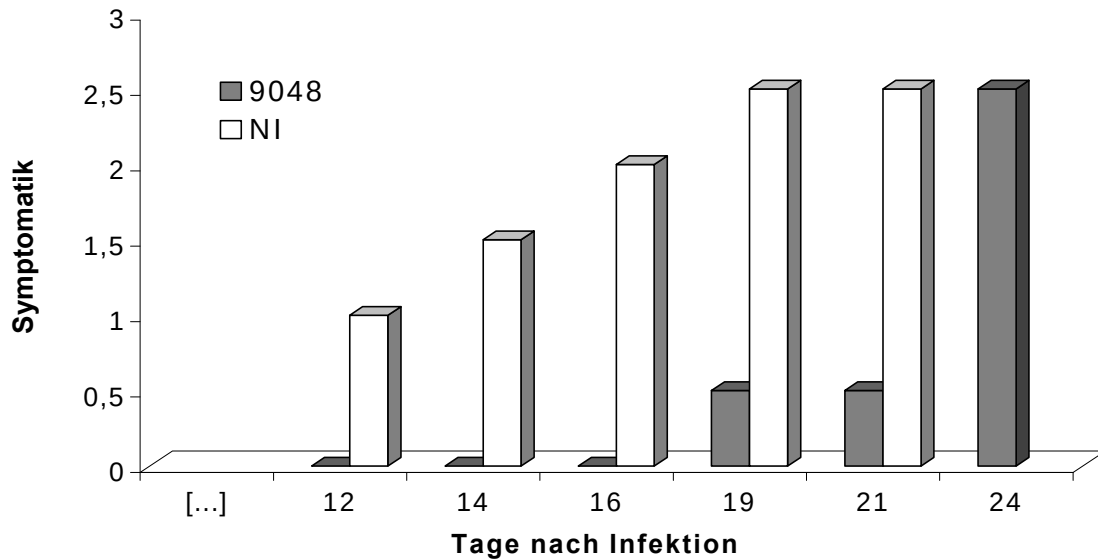


Abbildung 12: Symptomatik von Ratten, die mit dem Peptid 9048 immunisiert wurden (n=2) und einer nicht immunisierten Kontrollgruppe (NI; n=3) nach BDV-Infektion. Dargestellt ist der Mittelwert der Gruppen (S. E. M. < 0,5). Die Kontrollgruppe wurde an Tag 21, die immunisierte Tiergruppe an Tag 24 nach Infektion getötet (Experiment 1).

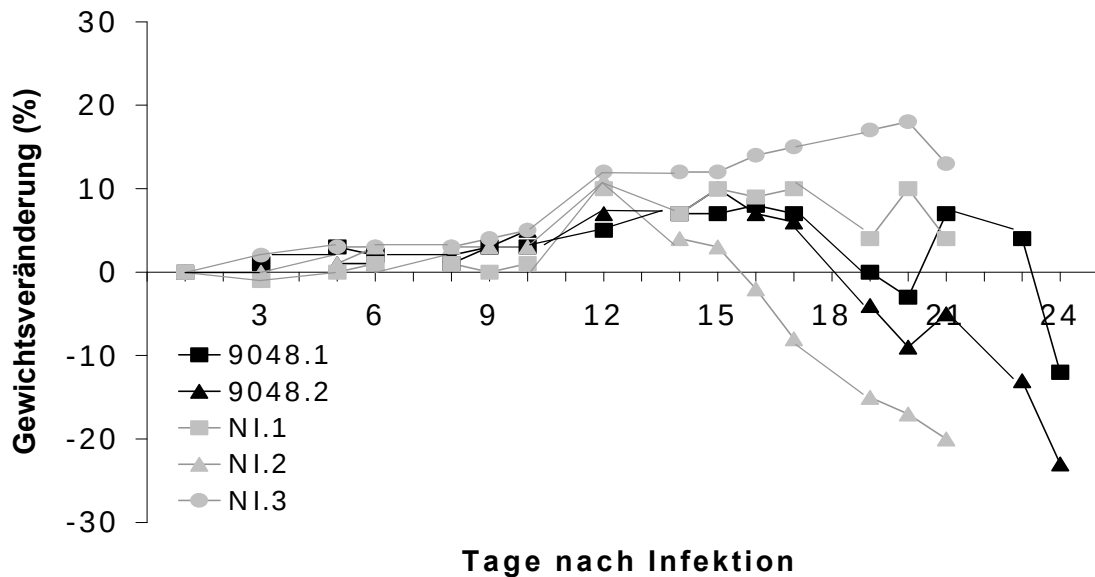


Abbildung 13: Gewichtsveränderung von Tieren, die mit dem Peptid 9048 immunisiert wurden (9048.1 und 9048.2) und der nicht immunisierten Kontrollgruppe (NI.1, NI.2, NI.3) nach BDV-Infektion. Dargestellt ist der Gewichtsverlauf der individuellen Tiere (Experiment 1).

b. Auftreten BDV-spezifischer Antikörper

Antikörper gegen das Nukleoprotein (p40) traten bei der Kontrollgruppe ab Tag 14 nach Infektion auf, bei den immunisierten Tieren am Tag 14 bzw. 21. Erste Antikörper gegen das Phosphoprotein (p24) konnten bei der Kontrollgruppe zwischen Tag 14 und Tag 17 nach Infektion nachgewiesen werden, bei der immunisierten Gruppe mit leichter Verzögerung Tag 17 bzw. Tag 24 (Tab. 6).

Tabelle 6: Auftreten BDV-spezifischer Antikörper gegen das Nukleoprotein (p40) und das Phosphoprotein (p24) nach BDV-Infektion von Ratten, die mit dem Peptid 9048 immunisiert wurden und der nicht immunisierten Kontrollgruppe (NI). Dargestellt sind die Daten der individuellen Tiere (Experiment 1).

Art der Immunisierung	BDV-spezifische Antikörper im Serum (Tage p.i.)									
	10		14		17		21		24	
	p40	p24	p40	p24	p40	p24	p40	p24	p40	p24
9048 (n=2)	-/-	-/-	-/+	-/-	-/+	-/+	+/+	-/+	+/+	+/+
NI (n=3)	-/-/-	-/-/-	+/+/+	-+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+

c. Nachweis von infektiösem Virus und entzündlichen Veränderungen im Gehirn

Der Virustiter im Gehirn der Tiere, der mit Hilfe der Virustitration bestimmt wurde, lag bei der immunisierten Gruppe im Durchschnitt um eine log-Stufe über dem Titer der Kontrollgruppe (Tab. 7). Die PFA-fixierten Gehirne der beiden immunisierten Ratten wurden nach H/E-Färbung histologisch beurteilt. Es wurde eine höchstgradige Enzephalitis festgestellt.

Tabelle 7: Bestimmung des Virustiters im Gehirn von immunisierten Ratten und der nicht immunisierten Kontrollgruppe (NI) nach BDV-Infektion. Dargestellt sind die Daten der individuellen Tiere (Experiment 1).

Art der Immunisierung	Virustiter (Angabe in log ₁₀ ffu/g Organ)	getötet (Tage p.i.)
9048 (n=2)	5,5 / 5,6	24
NI (n=3)	5,0 / 4,7 / 4,1	21

Durch die wiederholte intraperitoneale Applikation des Peptids 9048 vor der Infektion mit BDV wurde das Auftreten BDV-spezifischer Symptome, im Vergleich zu einer nicht immunisierten Kontrollgruppe, deutlich verzögert. Der Zustand der Tiere verschlechterte sich nach Einsetzen der ersten Symptome so stark, dass die Ratten fünf Tage nachdem sie erste Symptome gezeigt hatten, getötet werden mussten. Die Kontrollgruppe wurde neun Tage nach dem Auftreten erster BDV-spezifischer Symptome getötet. Die Untersuchung der Gehirne ergab bei den immunisierten Tieren eine höchstgradige Enzephalitis und einen höheren Virustiter, als bei der Kontrollgruppe. Da die Kontrolltiere drei Tage früher getötet wurden, als die immunisierte Gruppe, könnte das allerdings die unterschiedlich hohen Titer begründen.

5.3.3.2 *Immunisierung mit dem Peptid 9048, rekombinantem Nukleoprotein oder Bacterial Ghosts und anschließende Virusinfektion: Beurteilung des Krankheitsverlaufs und der Virusvermehrung im Gehirn (Experiment 2)*

In diesem Experiment wurde eine Tiergruppe mit dem Peptid 9048 und eine Gruppe mit rekombinantem Nukleoprotein (GST-p40, Abb. 14) behandelt. Die erste Applikation erfolgte in CFA, die folgenden in IFA. Einer weiteren Gruppe

wurden peptidgefüllte Bacterial Ghosts appliziert. Bacterial Ghosts stellen gentechnisch veränderte gram-negative Bakterien dar. Die Lebensfähigkeit der Bakterien im Wirt ist auf wenige Minuten begrenzt. Aus diesem Grund stellen sie für ihn keine Gefährdung dar, sondern erfüllen die Funktion eines effektiven Adjuvans (Szostak et al., 1997; Lubitz et al., 1999). In den dargestellten Experimenten wurden *Escherichia coli* verwendet. Einer Kontrollgruppe wurde in diesem Experiment BSS appliziert. Alle Tiere wurden dreimal im Abstand von zwei Wochen i.p. immunisiert und nach zwei weiteren Wochen mit BDV infiziert (Tab. 8).

Tabelle 8: Darstellung des Immunisierungsschemas aus Experiment 2.

Art der Immunisierung	Tiere (Anzahl)	Menge des Antigens	Booster (Anzahl)	getötet (Tage p.i.)
9048	3	50 ^{a)}	2	16
GST-p40	3	50 ^{a)}	2	16
Bact.Ghosts	3	6,6 x 10 ⁸ ^{b)}	2	16
BSS	3	500 ^{c)}	2	16

^{a)} Angabe in µg; ^{b)} Anzahl Bakterien; ^{c)} Angabe in µl

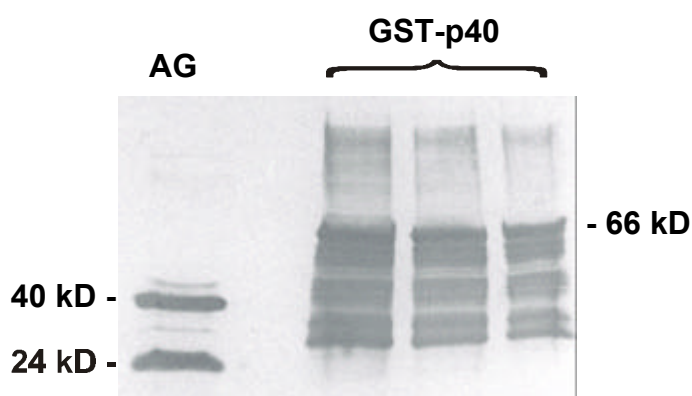


Abbildung 14: verschiedenen Eluate rekombinant hergestellten Nukleoproteins
Es sind je 15 µg Fusionsprotein (GST-p40) aufgetragen. Die Laufhöhe liegt bei 66 kD. Zum Vergleich wurde BDV-spezifisches Antigen (AG) mitgeführt.

Die Tiere wurden regelmäßig gewogen, ihr Gesundheitszustand wurde beurteilt und in regelmäßigen Abständen wurde Serum gewonnen, das in der Western Blot-Analyse auf das Vorhandensein BDV-spezifischer Antikörper untersucht wurde.

Alle Tiere wurden zum gleichen Zeitpunkt, Tag 16 nach Infektion, getötet um eine Vergleichbarkeit des Virustiters im Gehirn zu erreichen.

a. Auftreten BDV-spezifischer Symptome

Erste unspezifische Symptome traten bei einem der mit BSS behandelten Tiere am Tag 13 nach Infektion auf. Ab Tag 15 nach Infektion waren bei zwei Tieren der Gruppe BDV-spezifische neurologische Symptome feststellbar. Das dritte Tier zeigte bis zum Tötungstag eine unspezifische Symptomatik. Vergleichbar sah es bei der Gruppe aus, die mit den Bacterial Ghosts immunisiert wurde. Ab Tag 13 waren erste unspezifische Symptome zu erkennen. Alle mit Bacterial Ghosts behandelten Tiere zeigten am Tötungstag BDV-spezifische klinische Symptome, die unterschiedlich stark ausgeprägt waren (Stufe 1,0-3,0). Zwei der mit Protein immunisierten Ratten zeigten bis zum Tag 15 nur leichte BDV-spezifische Symptome (Stufe 1,0), am Tag 16 waren bei einem Tier deutliche neurologische Symptome (Stufe 2,5) zu erkennen. Das dritte Tier zeigte bis zum Tötungstag nur unspezifische Symptomatik. Die Tiere, denen das Peptid appliziert wurde, zeigten keine BDV-spezifischen klinischen Auffälligkeiten und einen nur geringgradigen Gewichtsverlust. Ein Gewichtsverlust war bei allen Ratten, der mit BSS behandelten Gruppe ab Tag 15 nach Infektion zu beobachten, bei einem Tier, das mit Protein immunisiert wurde, ab Tag 14. Das Gewicht der anderen Tiere dieser Gruppe blieb bis zum Tötungszeitpunkt stabil. Die Tiere der Gruppe, denen die Bacterial Ghosts appliziert wurden zeigten zwischen Tag 13 und 15 p.i. erste Gewichtsverluste (Abb. 15, 16).

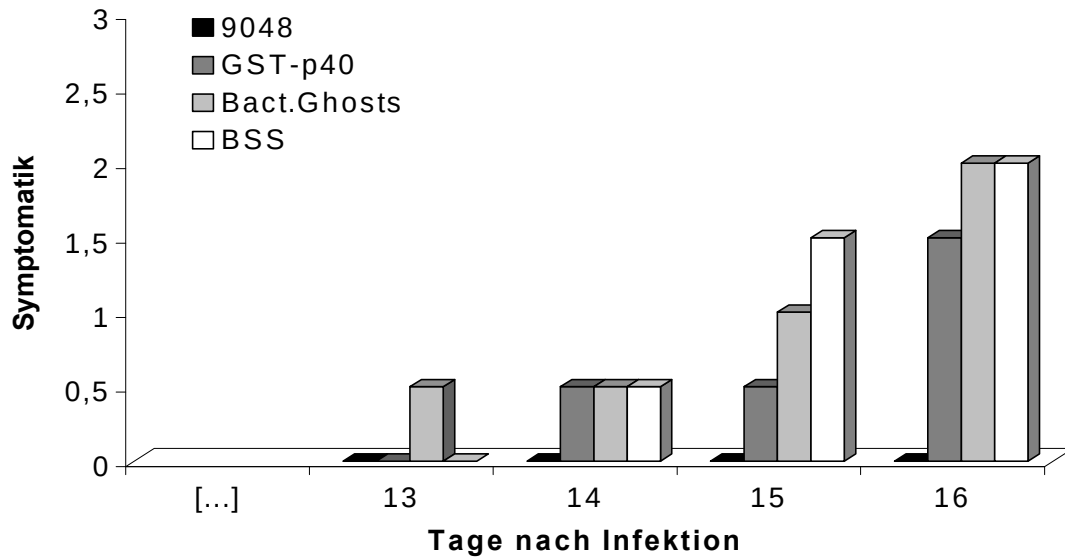


Abbildung 15: Symptomatik von immunisierten Ratten nach BDV-Infektion. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Tieren (S. E. M. < 1,2) (Experiment 2).

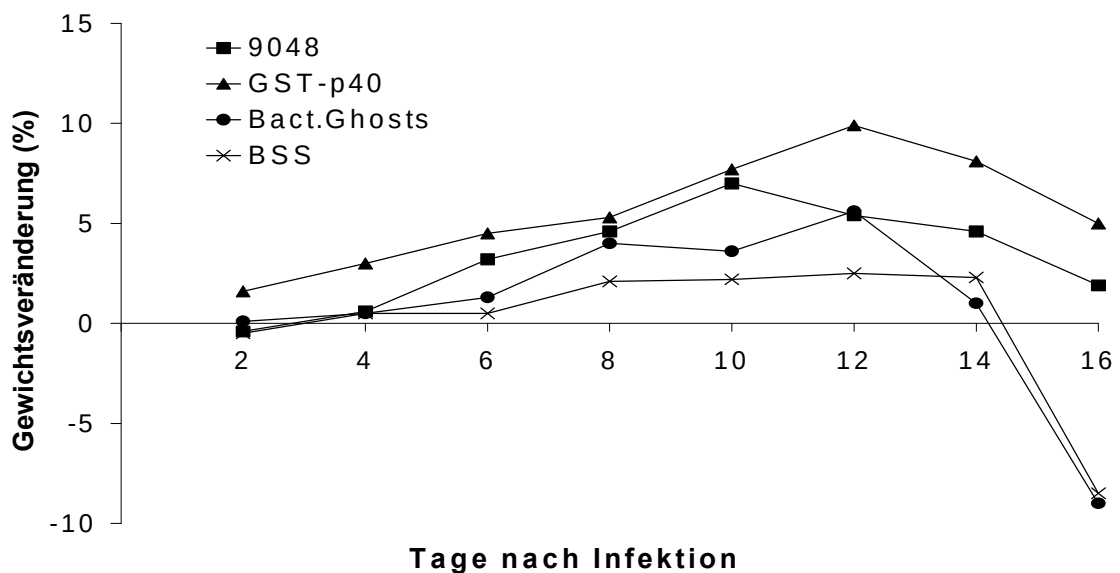


Abbildung 16: Gewichtsveränderung von immunisierten Ratten nach BDV-Infektion. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Tieren (S. E. M. < 4,3) (Experiment 2).

b. Auftreten BDV-spezifischer Antikörper

Die serologischen Untersuchungen ergaben bei zwei Tieren der Kontrollgruppe und der Gruppe, die mit dem Peptid 9048 immunisiert wurde, zwischen Tag zehn und 16 nach Infektion Antikörper gegen das Nukleoprotein. Bei der Gruppe, die mit Bacterial Ghosts behandelt wurde, traten p40-spezifische Antikörper zwischen Tag 14 und 16 nach Infektion auf. Die Gruppe, die mit Protein immunisiert wurde, zeigte Antikörper gegen das Nukleoprotein schon vor der Infektion. Antikörper gegen das Phosphoprotein konnten bei allen Gruppen zwischen Tag 14 und 16 nach Infektion nachgewiesen werden (Tab. 9). Bei einem Tier, der mit BSS behandelten Gruppe, waren bis zum Tötungszeitpunkt weder gegen das Nukleoprotein, noch gegen das Phosphoprotein Antikörper nachweisbar.

Tabelle 9: Auftreten BDV-spezifischer Antikörper gegen das Nukleoprotein (p40) und das Phosphoprotein (p24) nach BDV-Infektion von immunisierten Ratten. Dargestellt sind die Daten der individuellen Tiere der Gruppen (n=3) (Experiment 2).

Art der Immunisierung	BDV-spezifische Antikörper im Serum (Tage p.i.)							
	-5		10		14		16	
	p40	p24	p40	p24	p40	p24	p40	p24
9048	-/-/-	-/-/-	+/+/+	-/-/-	+/+/+	+/+/-	+/+/+	+/+/+
GST-p40	+/+/+	-/-/-	+/+/+	-/-/-	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+
Bact.Ghosts	-/-/-	-/-/-	+/+/-	-/-/-	+/+/+	-/-/+	+/+/+	+/+/+
BSS	-/-/-	-/-/-	+/-/-	-/-/-	+/-/+	+/-/+	+/-/+	+/-/+

c. Nachweis von infektiösem Virus im Gehirn

Der Virustiter im Gehirn der Ratten wurde mit Hilfe der Virustitration bestimmt. Zwischen den Ratten, die mit dem Peptid 9048, GST-p40 bzw. den Bacterial Ghosts immunisiert wurden und der mit BSS behandelten Kontrollgruppe zeigten sich keine Unterschiede (Tab. 10).

Tabelle 10: Bestimmung des Virustiters im Gehirn von immunisierten Lewis Ratten nach BDV-Infektion. Dargestellt sind die Daten der individuellen Tiere (n=3) (Experiment 2).

Art der Immunisierung	Virustiter (Angabe in log ₁₀ ffu/g Organ)	getötet (Tage p.i.)
9048	5,0 / 4,9 / 4,9	16
GST-p40	5,0 / 4,7 / 4,7	16
Bact.Ghosts	4,7 / 4,9 / 4,9	16
BSS	4,9 / 5,0 / 4,6	16

In diesem Experiment konnte der veränderte Krankheitsablauf der mit Peptid immunisierten Ratten, der im ersten Experiment festgestellt wurde, bestätigt werden. Bis zum Tötungszeitpunkt zeigten die Tiere keine BDV-spezifischen Symptome. Auch die mit dem rekombinanten Nukleoprotein immunisierten Tiere erkrankten im Untersuchungszeitraum nicht so stark, wie die mit BSS behandelten Kontrollen. Im Bezug auf den Virustiter im Gehirn war zwischen den einzelnen Gruppen kein Unterschied feststellbar.

5.3.3.3 *Immunisierung mit den Peptiden 9048, 9050, rekombinantem Nukleoprotein oder Bacterial Ghosts und anschließende Virusinfektion: Aktivierungsgrad von CD8⁺ T-Zellen zu einem späten Zeitpunkt nach Infektion (Experiment 3)*

Ziel dieses Experimentes war es, nach der BDV-Infektion immunisierter Ratten Gehirnlymphozyten zu isolieren und diese im Zytotoxizitätstest einzusetzen. Dieser funktionelle Test sollte zeigen, ob die Immunisierung einen Einfluss auf die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen hatte. Es sollte überprüft werden, ob es durch die Applikation des Peptids 9048 bzw. des Nukleoproteins zu einer Aktivierung oder Hemmung peptid-spezifischer T-Zellen gekommen war. Die Tiere wurden zu einem Zeitpunkt getötet, an dem deutliche BDV-spezifische Symptome erkennbar waren.

Es wurden sechs Gruppen unterschieden, das Immunisierungsschema ist in Tabelle 11 dargestellt. Wie im vorangegangenen Experiment wurden Tiere mit dem Peptid 9048, rekombinantem Nukleoprotein und peptid-gefüllten Bacterial Ghosts immunisiert. Die Kontrollgruppe erhielt wiederum BSS. In diesem Experiment wurden zwei weitere Gruppen mitgeführt. Einer der zusätzlichen Gruppen wurde das Peptid 9048 ohne folgende Boosterinjektion appliziert. Die Tiere erhielten das Peptid nur einmal, zwei Wochen vor der BDV-Infektion. Die zweite Gruppe wurde mit dem Peptid 9050 immunisiert. Dieses Nonamer ist, wie auch das Peptid 9048, auf dem Nukleoprotein des BDV lokalisiert. In vorangegangenen Experimenten (Kapitel 5.2.1) wurde das Peptid nicht von BDV-spezifischen zytotoxischen T-Zellen erkannt (Tab. 3). Es sollte mit dieser Immunisierung geklärt werden, ob die Applikation eines Peptids unspezifische Auswirkungen hat.

Alle Tiere wurden im Abstand von zwei Wochen i.p. immunisiert, zwei Wochen nach dem letzten Booster wurden die Ratten mit BDV infiziert. Die erste Gabe

der Peptide bzw. des Proteins erfolgte in CFA, die folgenden in IFA. Die Bacterial Ghosts und das BSS wurden ohne Adjuvans appliziert.

Wie in den beiden vorangegangenen Experimenten wurde wiederum der Verlauf der BD beobachtet. Die Ratten wurden regelmäßig gewogen und ihr Gesundheitszustand wurde beurteilt. In regelmäßigen Zeitabständen wurde das Serum der Tiere auf das Auftreten von BDV-spezifischen Antikörpern untersucht.

Tabelle 11: Darstellung des Immunisierungsschemas aus Experiment 3.

Art der Immunisierung	Tiere (Anzahl)	Menge des Antigens	Booster (Anzahl)	getötet (Tage p.i.)
9048 (3x)	3	50 ^{a)}	2	23
9048 (1x)	3	50 ^{a)}	-	20
9050	3	50 ^{a)}	2	20
GST-p40	3	50 ^{a)}	2	23
Bact.Ghosts	3	6,6 x 10 ⁸ ^{b)}	2	20
BSS	3	500 ^{c)}	2	20

^{a)} Angabe in µg; ^{b)} Anzahl Bakterien; ^{c)} Angabe in µl

a. Auftreten BDV-spezifischer Symptome

Bei der Kontrollgruppe, die BSS erhalten hatte, traten erste BDV-spezifische Symptome, wie Koordinationsstörungen, ab Tag 14 nach Infektion auf und führten innerhalb der nächsten acht Tage zu einer schweren Erkrankung der Tiere (Stufe 2,5-3,0). Vergleichbar entwickelte sich die Erkrankung bei den Tieren, die einmal das Peptid 9048 und dreimal das Peptid 9050 erhalten hatten. Die Gruppe, die mit Bacterial Ghosts immunisiert wurde, zeigte einen ähnlichen

Krankheitsverlauf, mit der Ausnahme eines Tieres, das bis zum Tötungszeitpunkt nur unspezifische Symptome zeigte. Diese Gruppen wurden am Tag 20 nach Infektion getötet, da das Allgemeinbefinden aller Tiere, bis auf eine Ratte die Bacterial Ghosts erhalten hatte, zu diesem Zeitpunkt stark beeinträchtigt war (Stufe 2,0-3,0).

Besonders auffallend war, dass die Tiere, denen dreimal das Peptid 9048 appliziert wurde, erst mit einer deutlichen Verzögerung, im Vergleich zu allen anderen Gruppen erkrankten. Diese Ratten zeigten erst nach Tag 18 p.i. erste unspezifische Symptome. Der Gesundheitszustand von zwei der drei Ratten verschlechterte sich innerhalb von fünf Tagen stark (Stufe 2,5-3,0). Ein Tier blieb bis zum Tötungszeitpunkt frei von klinischer Symptomatik.

Bei den Tieren, die das rekombinante Nukleoprotein erhalten hatten, äußerten sich schon am Tag 14 nach Infektion leichte BDV-spezifische Symptome (Stufe 1,0), der Zustand der Ratten verschlechterte sich allerdings bis zum Tötungszeitpunkt nicht (Abb. 17).

Alle Tiere verloren mit dem Auftreten der ersten Symptome auch an Gewicht (Abb. 18).

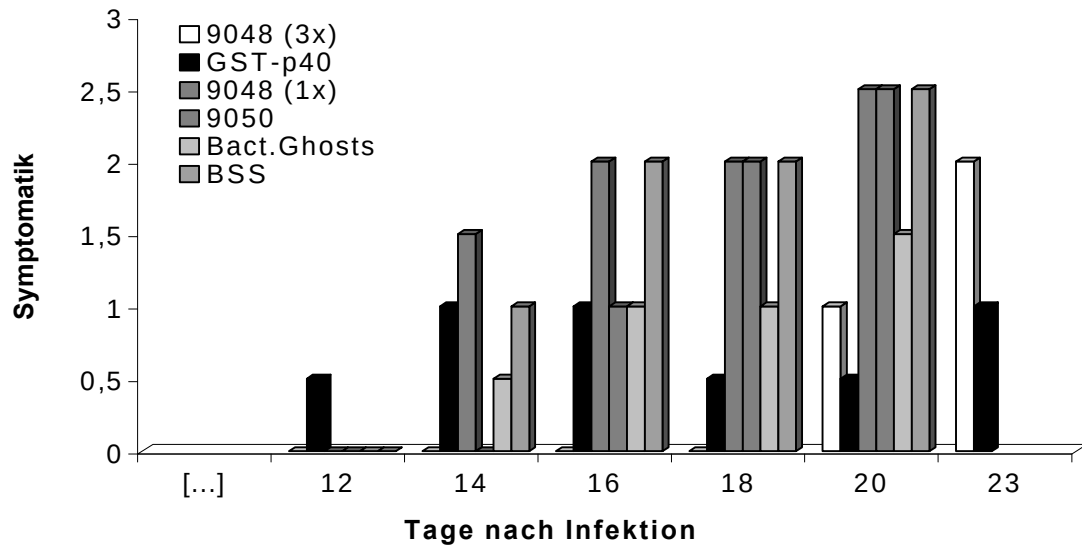


Abbildung 17: Symptomatik von immunisierten Ratten nach BDV-Infektion. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Tieren (S. E. M. < 1,3) (Experiment 3).

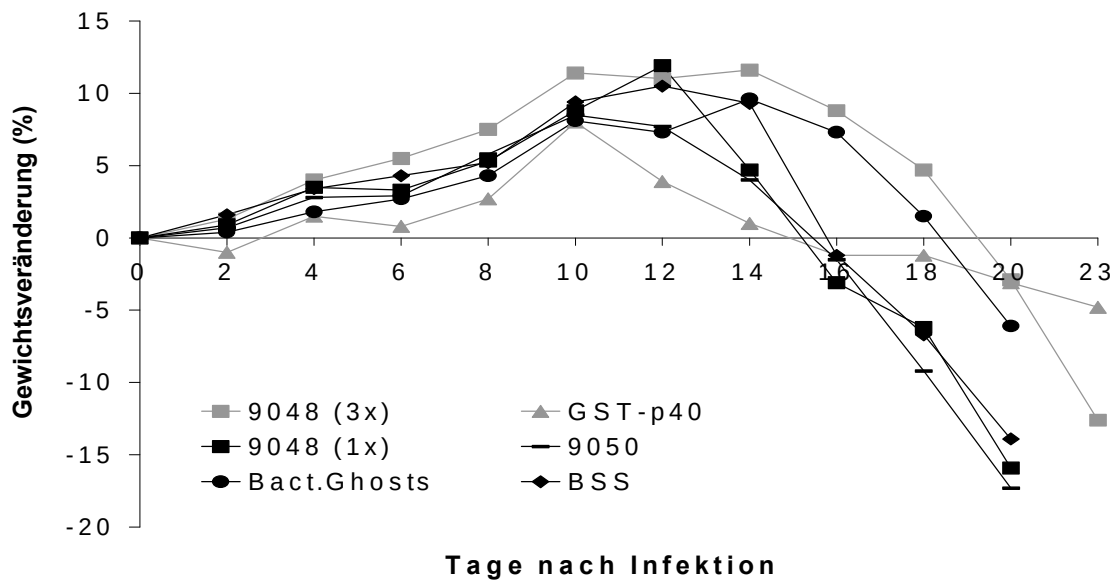


Abbildung 18: Gewichtsveränderung von immunisierten Ratten nach BDV-Infektion. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Tieren (S. E. M. < 8,2) (Experiment 3).

b. Auftreten BDV-spezifischer Antikörper

Die serologischen Untersuchungen wurden mit Hilfe der Western Blot-Analyse durchgeführt. Antikörper gegen das Nukleoprotein (p40) traten bei den Ratten, die mit rekombinantem Nukleoprotein immunisiert wurden, vor der Infektion mit BDV auf. Bei den anderen Tiergruppen waren Antikörper zwischen Tag zehn und 14 bzw. bei einem Tier, das mit BSS behandelt wurde, erst ab Tag 20 nach Infektion nachweisbar. Eine Antikörperantwort gegen das Phosphoprotein (p24) wurde bei den meisten Tieren zwischen Tag 14 und 17 nach Infektion nachgewiesen. Eine Ratte, der Bacterial Ghosts appliziert wurden, zeigte schon nach zehn Tagen eine Antikörperantwort gegen das p24. Bei einem Tier das mit rekombinantem Nukleoprotein behandelt wurde, konnten dagegen erst nach 23 Tagen Antikörper nachgewiesen werden (Tab. 12).

Tabelle 12: Auftreten BDV-spezifischer Antikörper gegen das Nukleoprotein (p40) und das Phosphoprotein (p24) nach BDV-Infektion von immunisierten Ratten. Dargestellt sind die Daten der individuellen Tiere (n=3) (Experiment 3).

Art der Immunisierung	BDV-spezifische Antikörper im Serum (Tage p.i.)							
	10		14		17		20	
	p40	p24	p40	p24	p40	p24	p40	p24
9048 (3x)	+/+/-	-/-/-	+/+/+	-/-/-	+/+/+	+/+/-	+/+/+	+/+/+
9048 (1x)	+/+/-	-/-/-	+/+/+	-/-/-	+/+/+	-/-/-	+/+/+	+/+/+
9050	-/-/-	-/-/-	+/+/+	-/-/-	+/+/+	-/-/-	+/+/+	+/+/+
GST-p40	+/+/+	-/-/-	+/+/+	+/-/+	+/+/+	+/-/+	+/+/+	+/-/+
Bact.Ghosts	-/+/-	-/+/-	+/+/+	-/+/-	+/+/+	-/+/-	+/+/+	+/+/+
BSS	-/-/-	-/-/-	+/-/+	-/-/-	+/-/+	-/-/-	+/+/+	+/+/+

c. *In vitro* Zytotoxizitätstest

In diesem Teil des Experiments sollte die Funktionalität der aus den Gehirnen der immunisierten Ratten isolierten zytotoxischen Lymphozyten überprüft werden. Die dreimal mit dem Peptid 9048 behandelte Gruppe wurde am Tag 23 nach Infektion getötet. Genauso wurde mit den Tieren verfahren, die mit rekombinantem Protein behandelt wurden. Die anderen Gruppen wurden am Tag 20 nach Infektion getötet.

Da die Ausbeute bei der Isolierung von Gehirnlymphozyten sehr gering ist (10^6 /Tier) wurden die Gehirne der Tiere einer Gruppe in einen Ansatz überführt. Der Zytotoxizitätstest zeigte, dass die Gehirnlymphozyten aller Gruppen in der Lage waren Zielzellen, die mit dem Peptid 9048 beladen waren, zu erkennen und zu lysieren. Auch die Tiergruppe, die mit rekombinantem Nukleoprotein behandelt wurde, zeigte trotz der nur schwachen klinischen Symptomatik eine deutliche spezifische Lyse der Zielzellen. Da die Tiergruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten getötet wurden, mussten zwei unabhängige Tests durchgeführt werden. Es wurden jeweils Gehirnlymphozyten von Kontrolltieren mitgeführt, die in der akuten Phase der Erkrankung, getötet wurden (Tab. 13).

Ergebnisse

Tabelle 13: In vitro Zytotoxizitätstest mit Gehirnlymphozyten immunisierter Ratten nach BDV-Infektion (Experiment 3).

<u>Effektorzellen</u>	getötet (Tage p.i.)	<u>Zielzellen</u> LEW 9048	NL LEW
I.			
9048 (1x)	20	117 / 82 / 32	5 / 2 / 3
9050	20	110 / 75 / 20	4 / 1 / 1
Bact.Ghosts	20	111 / 82 / 35	4 / 3 / 3
BSS	20	100 / 63 / 23	5 / 5 / 4
Kontrollen	19	72 / 29 / 0	2 / 1 / 1
II.			
9048 (3x)	23	71 / 20 / 10	5 / 3 / 4
GST-p40	23	74 / 30 / 10	0 / 9 / 2
Kontrollen	20	98 / 49 / 17	4 / 8 / 5

Effektor : Zielzellverhältnis 10:1 / 3:1 / 1:1

Die spontane Lyse der Zielzellen lag zwischen 30 % und 36 %.

Auch in diesem Experiment konnte der deutlich verzögerte Krankheitsablauf der mit dem Peptid 9048 behandelten Tiere beobachtet werden. Die mit dem rekombinanten Nukleoprotein immunisierten Tiere zeigten nur unspezifische Symptome oder BDV-spezifische klinische Erscheinungen, die nicht über leichte Bewegungsinkoordinationen hinausgingen (Stufe 1,0). Im Zytotoxizitätstest war bei allen Gruppen peptid-spezifische Lyse zu beobachten.

5.3.3.4 *Immunisierung mit dem Peptid 9048 oder rekombinantem Nukleoprotein und anschließende Virusinfektion: Aktivierungsgrad von CD8⁺ T-Zellen zu einem frühen Zeitpunkt nach Infektion (Experiment 4)*

Das vorangegangene Experiment hatte gezeigt, dass aus den Gehirnen von immunisierten und infizierten Ratten peptidspezifische zytotoxische T-Zellen isoliert werden konnten und zwar zu einem Zeitpunkt, an dem deutliche BDV-spezifische Symptome auftraten. Durch die mehrmalige Applikation des Peptids 9048 bzw. des Nukleoproteins ließ sich demnach keine Hemmung von peptidspezifischer T-Zellen, die eine Spezifität für das Peptid 9048 besitzen, induzieren.

Im folgenden Experiment sollten die immunisierten Tiere zu einem frühen Zeitpunkt nach Infektion getötet werden, die Gehirnlymphozyten der Tiere isoliert und im Zytotoxizitätstest eingesetzt werden. Der Test sollte zeigen, ob auch schon vor dem Auftreten neurologischer Symptome BDV-spezifische zytotoxische T-Zellen im Gehirn immunisierter Ratten nachweisbar sind. Das würde bedeuten, dass die Immunisierung zu einer Aktivierung von T-Zellen führt. Eine Gruppe wurde mit dem Peptid 9048 immunisiert, die zweite mit rekombinantem Nukleoprotein. Eine Kontrollgruppe erhielt BSS (Tab. 14).

Die Tiere wurden dreimal im Abstand von zwei Wochen immunisiert und nach zwei weiteren Wochen mit BDV infiziert. Die erste Gabe des Peptids bzw. Proteins erfolgte in CFA, die folgenden in IFA. BSS wurde ohne die Zugabe von Adjuvans appliziert.

Die Tiere wurden regelmäßig gewogen und ihr Gesundheitszustand beurteilt. In regelmäßigen Zeitabständen wurde das Serum der Ratten auf das Auftreten BDV-spezifischer Antikörper untersucht. Am Tag 16 nach Infektion wurden die Tiere getötet.

Tabelle 14: Darstellung des Immunisierungsschemas aus Experiment 4

Art der Immunisierung	Tiere (Anzahl)	Menge des Antigens	Booster (Anzahl)	getötet (Tage p.i.)
9048	3	50 ^{a)}	2	16
GST-p40	3	50 ^{a)}	2	16
BSS	3	500 ^{b)}	2	16

^{a)} Angabe in µg; ^{b)} Angabe in µl

a. Auftreten BDV-spezifischer Symptome

Bei der Gruppe, die BSS erhalten hatte, traten erste BDV-spezifische Symptome ab Tag 13 nach Infektion auf. Bis zum Tötungstag verschlechterte sich der Allgemeinzustand von zwei der drei Tiere stark (Stufe 2,5). Das dritte Tier zeigte auch zum Tötungszeitpunkt nur leichte klinische Symptome (Stufe 1,0). Bei einer Ratte, der das rekombinante Nukleoprotein appliziert wurde, traten ab Tag 12 nach Infektion erste BDV-spezifische Symptome auf. Bei den anderen Tieren der Gruppe waren ab Tag 13 bzw. 14 nach Infektion Koordinationsstörungen erkennbar. Der Gesundheitszustand der Ratten verschlechterte sich bis zum Tag 16 nach Infektion nicht. Aus der Tiergruppe, die mit dem Peptid immunisiert wurde, zeigte ein Tier unspezifische Symptome, wie z.B. gesträubtes Fell. Die anderen beiden Ratten blieben bis zum Tötungszeitpunkt ohne erkennbare Symptomatik (Abb. 19). Ein Gewichtsverlust trat bei der mit Peptid immunisierten Gruppe ab Tag 12 nach Infektion auf, bei den anderen Gruppen erst ab Tag 16 (Abb. 20).

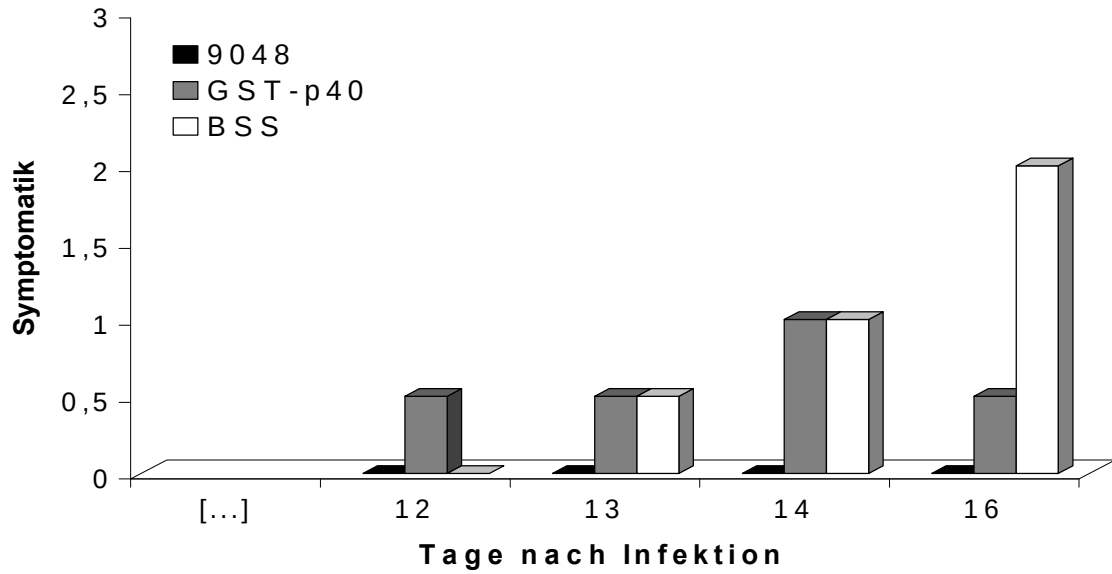


Abbildung 19: Symptomatik von immunisierten Ratten nach BDV-Infektion. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Tieren (S. E. M. < 0,9) (Experiment 4).

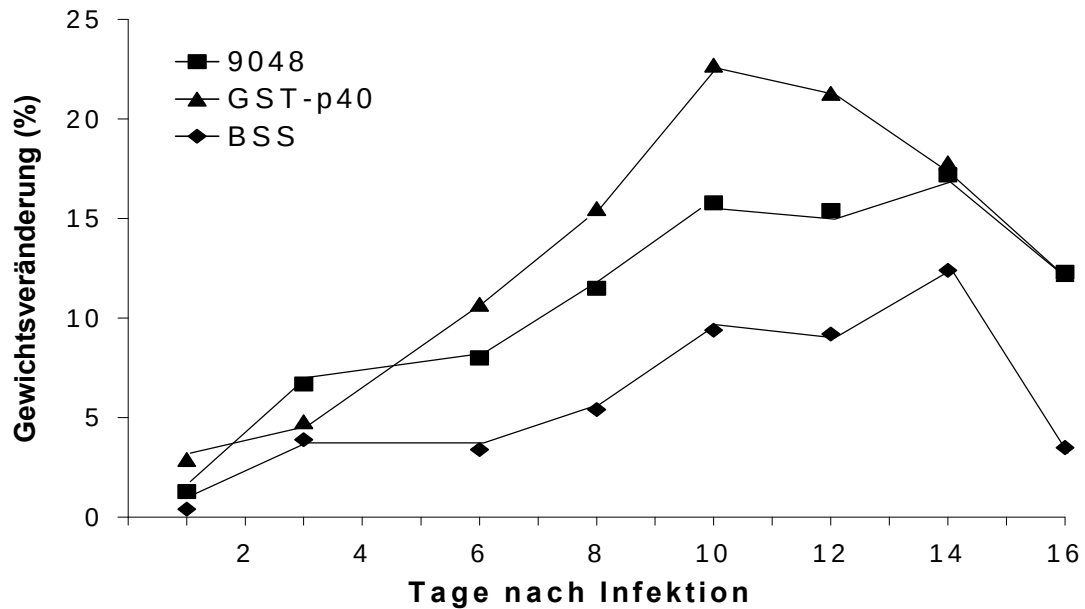


Abbildung 20: Gewichtsveränderung von immunisierten Ratten nach BDV-Infektion. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Tieren (S. E. M. < 8,5) (Experiment 4).

b. Auftreten BDV-spezifischer Antikörper

Die serologischen Untersuchungen wurden wieder mit Hilfe der Western Blot-Analyse durchgeführt. Antikörper gegen das Nukleoprotein (p40) traten bei den Tieren, die mit dem rekombinanten Nukleoprotein immunisiert wurden, schon vor der Infektion mit BDV auf. Bei der Gruppe, die das Peptid erhalten hatte, waren Antikörper ab Tag zehn nach Infektion nachweisbar. Die mit BSS behandelte Tiergruppe zeigte erste Antikörper gegen das Nukleoprotein zwischen Tag 14 und 16 nach Infektion. Eine Antikörperantwort gegen das Phosphoprotein (p24) war bei den Tieren, die mit Protein immunisiert wurden, 16 Tage nach Infektion nachweisbar. Bei der Gruppe, die das Peptid erhalten hatte, war eine Antikörperantwort gegen das Phosphoprotein zwischen Tag 14 und Tag 16 zu erkennen. Die mit BSS behandelte Gruppe zeigte bis zum Tag 16 nach Infektion keine Antikörper gegen das Phosphoprotein (Tab. 15).

Tabelle 15: Auftreten BDV-spezifischer Antikörper gegen das Nukleoprotein (p40) und das Phosphoprotein (p24) nach BDV-Infektion von immunisierten Ratten. Dargestellt sind die Daten der individuellen Tiere (n=3) (Experiment 4).

Art der Immunisierung	BDV-spezifische Antikörper im Serum (Tage p.i.)							
	-4		10		14		16	
	p40	p24	p40	p24	p40	p24	p40	p24
9048	n.d.	n.d.	+/+/+	-/-/-	+/+/+	+/-/-	+/+/+	+/+/+
GST-p40	+/+/+	-/-/-	+/+/+	-/-/-	+/+/+	-/-/-	+/+/+	+/+/+
BSS	n.d.	n.d.	-/-/-	-/-/-	n.d./-/+	-/-/-	+/+/+	-/-/-

c. In vitro Zytotoxizitätstest

In diesem Teil des Experiments sollte überprüft werden, ob durch die Immunisierung mit dem Peptid 9048 oder rekombinantem Nukleoprotein schon zu einem Zeitpunkt, an dem noch keine bzw. nur schwache neurologische Symptomen erkennbar sind, eine zytotoxische T-Zell-Antwort im Gehirn messbar ist. Die Gehirne der Tiere einer Gruppe wurden zusammen aufgearbeitet, da die Ausbeute bei der Präparation der Lymphozyten sehr gering ist. Alle Tiere wurden am Tag 16 nach Infektion getötet. Die mit BSS behandelte Gruppe wurde als positive Kontrolle für den Zytotoxizitätstest im Experiment mitgeführt. Bei diesen Tieren konnte am Tag 16 p.i. mit einer zytotoxischen T-Zell-Antwort gerechnet werden, bei den immunisierten Tieren dagegen nicht. Werden Ratten mit dem BDV infiziert, sind zytotoxische T-Zellen im Gehirn zeitgleich mit dem Auftreten neurologischer Symptome nachweisbar.

Die Gehirnlymphozyten aller Gruppen waren in der Lage peptidbeladene Zielzellen zu lysieren. Die deutlichste Lyse zeigte sich bei der Tiergruppe, die mit rekombinantem Nukleoprotein immunisiert wurde. (Tab. 16).

Tabelle 16: In vitro Zytotoxizitätstest mit Gehirnlymphozyten immunisierter Ratten, Tag 16 nach BDV-Infektion (Experiment 4).

	<u>Effektorzellen</u>	<u>Zielzellen</u>
	LEW 9048	NL LEW
9048	79 / 33 / 13	4 / 0 / 0
p40	110 / 90 / 57	2 / 0 / 0
BSS	73 / 46 / 14	2 / 0 / 0

Effektor : Zielzellverhältnis 30:1 / 10:1 / 3:1

Die spontane Lyse der Zielzellen lag zwischen 34 % und 35 %.

Durch die systemische Verabreichung des Peptids 9048 vor der Infektion mit BDV war es gelungen den Krankheitsverlauf der BD zu beeinflussen. Die immunisierten Ratten erkrankten mit deutlicher Verzögerung an BDV-spezifischen neurologischen Symptomen, verglichen mit Tieren einer nicht behandelten Kontrollgruppe oder mit Tieren, denen nur BSS appliziert wurde. Zudem veränderte sich auch der zeitliche Verlauf der BD bei den mit Peptid immunisierten Ratten. Vom Beginn der Symptome bis zum Auftreten schwerer neurologischer Ausfallserscheinungen vergingen, im Vergleich zu den Kontrolltieren, deutlich weniger Tage.

Auch bei Ratten, die mit dem kompletten Nukleoprotein immunisiert wurden, änderte sich der Ablauf der Erkrankung. Die Tiere zeigten keine oder nur leichte BDV-spezifische Symptome. Die Immunisierung von Ratten mit peptid-gefüllten Bacterial Ghosts hatte keinen Einfluss auf eine nachfolgende BDV-Infektion.

Allerdings war es weder durch die Immunisierung mit dem Peptid 9048, noch mit dem Nukleoprotein gelungen, die Viruslast in den Gehirnen der Ratten zu vermindern. Dagegen konnten zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion peptid-spezifische zytotoxische T-Zellen aus den Gehirnen der immunisierten Ratten isoliert werden und das sogar schon bevor erste BDV-spezifische Symptome erkennbar waren. Das bedeutet, dass die Immunisierung mit dem Peptid bzw. Protein zu einer Aktivierung von T-Zellen geführt hatte.

6. DISKUSSION

Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht auf Peptidebene die Epitope, die für die pathogenetisch entscheidende zelluläre Immunreaktion im Verlauf einer BDV-Infektion relevant sind zu identifizieren, näher zu charakterisieren und deren Funktionalität in vivo zu überprüfen.

Die Bornasche Krankheit stellt eine immunpathologische Erkrankung des zentralen Nervensystems dar. Mit dem Auftreten von Entzündungszellen im Gehirn gehen neurologische Symptome einher (Narayan et al., 1983a). In den Infiltraten im Entzündungsgebiet treten neben $CD8^+$ und $CD4^+$ T-Zellen auch Makrophagen und B-Zellen auf (Deschl et al., 1990; Stitz et al., 1993). Ein Einfluss der zellulären Immunantwort auf die Pathogenese der BD konnte von Narayan und Mitarbeitern erstmals durch adoptive Transfer-Experimente, bei denen T-Zellen auf infizierte immuninkompetente Ratten übertragen wurden, nachgewiesen werden (Narayan et al., 1983a). Die Tiere entwickelten nach dem Transfer BDV-spezifische Symptome. Man kann heute davon ausgehen, dass die BDV-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen in der akuten Phase der Infektion die Effektorfunktion ausüben und im Wesentlichen für die Zerstörung virusinfizierter Zellen verantwortlich sind. Die $CD4^+$ Lymphozyten fungieren hierbei als Helferzellen. (Stitz et al., 1991a; Planz et al., 1993, 1995; Bilzer & Stitz, 1994). Obwohl den $CD8^+$ T-Zellen eine entscheidende Rolle bei der Immunpathologie zukommt, sind sie andererseits unter bestimmten Bedingungen auch in der Lage Virus zu eliminieren, ohne BDV-spezifische Symptome auszulösen. So konnte nachgewiesen werden, dass die Rekrutierung BDV-spezifischer Effektoren vor der Infektion, durch den adoptiven Transfer von $CD4^+$ T-Zellen, die Krankheit verhindern kann (Richt et al., 1994; Nöske et al., 1998). Durch neuere Untersuchungen konnte geklärt werden, dass die zelluläre Immunantwort gegen ein Epitop auf dem Nukleoprotein (p40) des Virus gerichtet ist (Planz & Stitz, 1999).

Im ersten Teil der Arbeit sollte die Lokalisation des oder der Peptide, gegen die sich die BDV-spezifische T-Zell-Antwort richtet, auf etwa 70 Aminosäuren eingegrenzt werden. Die Strategie bestand darin Zellen, welche Bruchstücke des Nukleoproteins stabil exprimieren, als Zielzellen im Zytotoxizitätstest zu verwenden. Es wurden Haut-Fibroblasten der Lewis Ratte (LEW Zellen) transfiziert, um die Expression des Nukleoproteins zu erreichen. Da etwa ein Drittel derjenigen Peptide, die als Substrat für MHC-Klasse-I-Moleküle dienen, der Prozessierung endogener Proteine entstammen (Reits et al., 2000), stellt die Transfektion eine geeignete Methode dar, um T-Zellen Peptide zu präsentieren. Es wurde beschrieben, dass schon ein einzelnes Zielmolekül, das auf der Zelloberfläche präsentiert wird ausreichen kann, um zur Lyse einer Zelle durch zytotoxische T-Zellen zu führen (Sykulev et al., 1996). Demnach genügt schon eine niedrige Expression eines eingeschleusten Gens, um durch die Transfektion Zielzellen für den Zytotoxizitätstest zu generieren.

Um das System zu etablieren wurden LEW Zellen mit dem Nukleoprotein (p38) stabil transfiziert. Das p38 stellt das kürzere der beiden Produkte des ersten offenen Leserahmens des BDV dar. Um eine optimale Reproduzierbarkeit der Zytotoxizitätstests zu gewährleisten wurden die LEW Zellen, die als Zielzellen fungieren sollten, stabil transfiziert und subkloniert. Auf diese Art konnte mit Zellklonen, anstatt mit heterogenen Kulturen gearbeitet werden, was einen Vorteil gegenüber der transienten Expression darstellt. In der Vergangenheit wurden Experimente mit Influenza beschrieben, in denen stabil transfizierte Zellen erfolgreich als Targets im Zytotoxizitätstest eingesetzt wurden (Townsend et al., 1985). Die stabil transfizierten Zellklone wurden in der PCR auf die Anwesenheit von p38-spezifischer DNA und RNA untersucht, um den Erfolg der Transfektion und die Transkription des eingeschleusten Gens zu überprüfen. Im Zytotoxizitätstest wurden die p38-exprimierenden Zellklone von den BDV-spezifischen T-Zellen lysiert. Die transfizierten Zellen waren demnach geeignete Zielzellen für virusspezifische zytotoxische T-Zellen.

Im Folgenden wurden fünf Konstrukte hergestellt, die für Sequenzen für sich überlappende Teilstücke des Nukleoproteins codierten. Als Vektor diente das Plasmid pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO, das die Sequenz für eine Variante des Wildtyp Reportergens GFP (Green Fluorescent Protein) enthält. GFP sollte das Screening der transfizierten Zellen erleichtern. Zellen, die dieses fluoreszierende Protein exprimieren, können bei geeigneter Art der Anregung im Fluoreszenzmikroskop oder in der FACS-Analyse dargestellt werden.

LEW Zellen wurden mit den verschiedenen Nukleoprotein-Konstrukten transfiziert. Es stellte sich allerdings heraus, dass mit den zur Verfügung stehenden Geräten die von GFP emittierte Fluoreszenz nicht nachgewiesen werden konnte. Es stellte sich die Frage, ob die verwendeten Geräte keine Detektion von GFP ermöglichten oder ob die Expression der GFP-Gensequenz in den LEW Zellen nicht möglich war und aus diesem Grund keine Fluoreszenz nachgewiesen werden konnte. Für eine schlechte Expression des eingeschleusten Gens in den Zellen können mehrere Gründe vorliegen. Die cDNA für das fluoreszierende Protein GFP entstammt der Qualle *A. victoria*. Es gibt keine Untersuchungen, ob die verwendeten Codons in allen Säugerzelltypen effizient translatiert werden. Außerdem ist die von *A. victoria* abgeleitete RNA nicht in allen Organismen stabil (Ausubel et al., 1996). Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass die verwendeten LEW Zellen, eine primäre Fibroblasten-Zelllinie, eingeschleuste Fremdgene nur schlecht exprimieren oder dass die gebildeten GFP-Fusionproteine in den LEW Zellen nur eine kurze Halbwertszeit aufweisen und zu einem frühen Zeitpunkt nach der Translation von zellulären Proteasen degradiert werden. Außerdem war sowohl das Filtersystem des Fluoreszenzmikroskops als auch der Laser des FACS-Geräts auf die Exzitation von FITC-markierten Proben adaptiert und somit nicht optimal auf die Analyse von GFP eingestellt.

Auf Grund der Probleme, die bei der Überprüfung der Transfektion und dem Nachweis von GFP auftraten und da nicht geklärt werden konnte, ob die

Schwierigkeiten auf das Detektions-system oder die verwendete Zelllinie zurückzuführen waren, wurde ein anderes Expressionssystem gewählt. Es sollten rekombinante Vaccinia Viren hergestellt werden, welche Nukleoprotein-Bruchstücke enthielten. Das Vaccinia-System weist im Vergleich zur Transfektion zahlreiche Vorteile auf. Durch die Infektion mit diesem Virus können sowohl Zielzellen als auch Effektoren für den in vitro Zytotoxizitätstest generiert werden. In Zielzellen wird, in Abhängigkeit des für die Infektion gewählten Virus : Zell-Verhältnisses, eine sehr gute Expression des Gens der Wahl erreicht. In infizierten Zellen können bis zu mehreren 1000 Viruspartikel generiert werden (Ausubel et al., 1997). Außerdem stellt der Einsatz des viralen Vektors in der Lewis Ratte, mit dem Ziel der Aktivierung von MHC-Klasse-I-restringierten T-Zellen, insbesondere auch in Zusammenhang mit einer BDV-Infektion, ein etabliertes System dar (Zinkernagel et al., 1977; Planz & Stitz, 1999). Nach i.v. Infektion von Ratten mit Vaccinia-Borna-Rekombinanten werden große Anzahlen BDV-spezifischer Effektorzellen in der Milz induziert. Mögliche Anwendungsgebiete des rekombinanten Virus beschränken sich aber nicht nur auf die Lewis Ratte. Eine große Anzahl von Zelllinien und Tierspezies sind für das Virus empfänglich (Mackett et al., 1984). Es wären u.a. auch Experimente mit dem Schaf, einem natürlichen Wirt des BDV, denkbar. Neben der Identifizierung von T-Zell-Epitopen könnten die rekombinanten Viren ebenfalls bei Untersuchungen zur Lokalisation von B-Zell-Epitopen eingesetzt werden.

Die Sequenzen für die Nukleoprotein-Bruchstücke wurden in den Vektor pSC11.3 kloniert. Mit Hilfe des Vektors konnten die gewünschten Gene über homologe Rekombination in das Thymidin Kinase-Gen des Vaccinia-Wildtyp Virus eingeführt werden. Diese Methode wurde von Mackett und Mitarbeitern beschrieben (Mackett et al., 1984). Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier rekombinante Viren hergestellt, die für die Sequenzen unterschiedliche großer N-terminaler Anteile des Nukleoproteins codieren. Zusätzlich stand bereits das

VV-p40 zur Verfügung, welches für das vollständige Nukleoprotein codiert. Damit ist der gesamte Bereich des BDV-Nukleoproteins mit überlappenden Bereichen abgedeckt. Eine Eingrenzung bzw. Kartierung von T-Zell-Epitopen auf 70 Aminosäuren ist mit Hilfe der Rekombinanten möglich. Die Konstruktion eines fünften Virus das eine C-terminalen Anteil des p40 abdecken sollte, konnte aus Zeitgründen nicht mehr erfolgreich durchgeführt werden.

Die erfolgreiche Rekombination wurde über die Isolierung und anschließende PCR-Analyse der DNA infizierter Zellen überprüft. Zur abschließenden Charakterisierung sollte die Expression der verkürzten Nukleoproteine in infizierten LEW Zellen untersucht werden. Dazu wurden Lysate dieser Zellen in der Western Blot-Analyse eingesetzt. Alle Bruchstücke wurden von einem p40-spezifischen Serum erkannt. Das bedeutet, dass durch die Infektion mit den rekombinanten Viren die Nukleoprotein-Bruchstücke in Zellen exprimiert wurden. Im Rahmen dieser Arbeit war der Einsatz der rekombinanten Viren in weiterführenden Experimenten nicht mehr möglich.

Als weiteren Ansatz für die Charakterisierung BDV-spezifischer MHC-Klasse-I-restringierter T-Zell-Epitope wurden mit Hilfe der Datenbank SYFPEITHI (Rammensee et al., 1999) mögliche Peptidmotive vorhergesagt und diese Peptide synthetisiert. Für die Labormaus (*Rattus norvegicus*) sind Peptidmotive bekannt, die in den MHC-Klasse-I-Molekülen RT1.A¹, RT1.A^u, RT1.A^c und RT1.A^a präsentiert werden. Die Informationen entstammen der Analyse von natürlich prozessierten „Selbst-Proteinen“ (Powis et al., 1993, 1996; Reizis et al., 1997; Stevens et al., 1998). Die Lewis Ratte exprimiert das RT1.A¹-Allel. Als Grundlage für die Peptidvorhersagen wurde nicht nur die Sequenz des Nukleoproteins verwendet, das als Zielprotein für CD8⁺ T-Zellen beschrieben wurde (Planz & Stitz, 1999), sondern auch die der anderen BDV-spezifischen Proteine. Möglicherweise sind auch auf diesen Proteinen T-Zell-Epitope lokalisiert, die jedoch eine weniger starke oder erst zu einem späteren Zeitpunkt

nach Infektion messbare zelluläre Immunantwort induzieren. Im Verlauf einer BDV-Infektion ist das p40 das erste Protein, welches in infizierten Zellen nachweisbar ist (Carbone et al., 1993; Stitz et al., 1998) und gegen das sich auch die frühe Antikörperantwort richtet (Hatalski, et al., 1995). Daher ist es plausibel, dass auch die zelluläre Immunantwort in der akuten Phase der Erkrankung gegen dieses Protein gerichtet ist. Studien mit LCMV haben zu der Annahme geführt, dass T-Zellen, die sich gegen subdominante Epitope richten, erst in der chronischen Phase einer Virusinfektion nachweisbar sind (Van der Most et al., 1996). Für das LCMV konnten z.B. neben drei immundominanten auch zwei subdominante T-Zell-Epitope der C57BL/6-Maus charakterisiert werden (Oldstone et al., 1988; Schulz et al., 1989; Klavinskis et al., 1992; Gallimore et al., 1998a; Van der Most et al., 1998). Subdominante BDV-spezifische Epitope zu charakterisieren könnte allerdings mit Problemen verbunden sein, da die Anzahl und die zytotoxische Aktivität von CD8⁺ T-Zellen im Gehirn ab Tag 21 p.i. deutlich abnimmt (Planz, 1993; Planz et al., 1993; Sobbe et al., 1997). Es wurden bereits Experimente durchgeführt, die darauf hinweisen, dass auf dem gp94 des BDV ein weiteres, möglicherweise subdominantes, Epitop lokalisiert ist (Planz & Stitz, 1999).

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurden 15 vorhergesagte Peptide dahingehend charakterisiert ob Zellen, die mit dem jeweiligen Peptid beladen waren, im Zytotoxizitätstest von BDV-spezifischen Effektorzellen lysiert wurden. Allerdings führte nur eine der Aminosäuresequenzen zu einer deutlichen Lyse der Zielzellen: das Peptid 9048 mit der Sequenz ASYAQMTTY, das die Aminosäurepositionen 230-238 des Nukleoproteins des BDV belegt. Um eine optimale Lyse der Zielzellen zu erreichen, mussten 10⁴ Zellen mit 5 ng Peptid inkubiert werden. Auch das Peptid 8101, das die Aminosäurepositionen 59-67 des gp94 abdeckt führte zu einer schwachen Lyse der Zielzellen. Es stellt sich die Frage, ob es sich dabei um spezifische Lyse oder um einen unspezifischen Effekt handelte. Eine

schwache spezifische Lyse würde die These von Planz und Stitz stützen, dass auf dem Glycoprotein ein weiteres, eventuell subdominantes, T-Zell-Epitop lokalisiert ist. Da mit dem Peptid 9048 beladene Zielzellen die stärkste Lyse aufwiesen, kann von einem wichtigen Epitop auf dem Nukleoprotein ausgegangen werden. Aus diesem Grund wurden alle folgenden Untersuchungen mit dem Peptid 9048 durchgeführt.

Zunächst sollte überprüft werden, ob das Peptid 9048 auch von BDV-infizierten Zellen prozessiert und präsentiert wird. Das würde bedeuten, dass das Peptid einen natürlichen MHC-Klasse-I-Liganden darstellt. Dazu wurden die MHC-Klasse-I-Moleküle von BDV-LEW Zellen aufgereinigt und mit Hilfe der HPLC in 60 Fraktionen aufgetrennt. Mit den einzelnen Fraktionen wurden Zielzellen für den Zytotoxizitätstest beladen und auf BDV-spezifische Lyse untersucht. Die Untersuchungen ergaben, dass Zellen, die mit der Fraktion 24 beladen wurden, ein Ziel für BDV-spezifische Effektoren darstellten. Experimente von Falk und Mitarbeitern hatten gezeigt, dass ein großer Teil der Peptide, die eine Zelle generiert und über MHC-Klasse-I-Moleküle präsentiert, in den Fraktionen 18-30 eines HPLC-Gradienten eluierten (Falk et al., 1992).

In einem Co-Elutionsexperiment wurde anschließend das synthetische Peptid 9048 unter den selben Bedingungen, wie zuvor die MHC-Klasse-I-Liganden der BDV-LEW Zellen, in der HPLC aufgetrennt. Der Einsatz von Fraktion 24 und auch von Fraktion 23 im Zytotoxizitätstest führten zur BDV-spezifischen Lyse beladener Zielzellen. Das bedeutet, dass das synthetische Peptid 9048 in der HPLC im gleichen Bereich eluierte, wie das natürlich prozessierte BDV-spezifische Peptid.

Inzwischen wurde in weiterführenden Experimenten auch die Sequenz des natürlich prozessierten Peptids, das in der Fraktion 24 eluierte, massenspektrometrisch analysiert (Planz et al., 2001). Es wurde die Aminosäuresequenz ASYAQMTTY ermittelt. Das von den infizierten Zellen generierte Peptid, das von den BDV-spezifischen Effektorzellen erkannt wurde,

ist also identisch mit dem Peptid 9048. Es war somit gelungen den ersten viralen RT1.A¹-Liganden zu identifizieren und zu charakterisieren. Die Kenntnis dieses definierten Epitops wird bei weiteren Untersuchungen der immunpathologischen Mechanismen der BD hilfreich sein.

Ursprünglich wurde davon ausgegangen, dass lebende, d.h. sich replizierende Viruspartikel notwendig sind, um eine zytotoxische T-Zell-Antwort zu induzieren. In Experimenten mit verschiedenen Erregern, wie dem Influenza A Virus, dem Hepatitis B Virus, LCMV und dem Virus der vesikulären Stomatitis (VSV) gelang es nicht, mit inaktivierten Viruspartikeln eine schützende zytotoxische T-Zell-Antwort hervorzurufen (Kurrle, et al., 1979; Bianchi, 1981; Bachmann et al., 1993, 1994). Da der praktische Einsatz von vermehrungsfähigem Virus jedoch nicht ungefährlich ist, musste über neue Immunisierungsstrategien nachgedacht werden. Erfolgreich konnten virusspezifische Effektorzellen mit dem Einsatz von rekombinant hergestellten viralen Proteinen in Versuchen mit LCMV, Hepatitis B und VSV aktiviert werden (Bachmann et al., 1994; Schirmbeck & Reimann, 1994). Seit genauerer über die Präsentation viraler Antigene bekannt ist und MHC-Klasse-I-Liganden unterschiedlicher Viren charakterisiert werden konnten, wurden zahlreiche Versuche unternommen diese Epitope in Immunisierungen einzusetzen. Die Applikation von Peptiden, die an einen Lipid-Anteil gekoppelt waren, führte zur Aktivierung zytotoxischer T-Lymphozyten und damit zu ersten Erfolgen mit einem MHC-Klasse-I-restringierten Epitop (Deres et al., 1989). Bei Experimenten mit HIV, LCMV, Sendai Virus und dem Influenza A Virus gelang es mit löslichen, ungekoppelten Peptiden zytotoxische T-Zellen zu aktivieren (Aichele, et al., 1990; Gao, et al., 1991; Hart et al., 1991; Kast, et al. 1991; Sastry et al., 1992). Es konnte zudem gezeigt werden, dass es nicht nur möglich war T-Zellen in lymphatischen Organen zu induzieren, sondern dass die T-Zell-Antwort auch ausreichte, um Mäuse vor einer folgenden Virusinfektion

zu schützen (Kast et al., 1991; Schulz et al., 1991). Die viralen Peptide wurden zum Zweck der Immunisierung über verschiedene Wege, u.a. intradermal (Sastry et al., 1992, 1994), subkutan (Schulz et al., 1991) und intraperitoneal (Allsopp et al., 1996) und unterschiedlich häufig appliziert. Eingesetzt wurden zwischen 10 µg und 500 µg des jeweiligen Peptids. Die meisten Peptidimmunisierungen wurden bisher mit Mäusen durchgeführt, da für diese Spezies zahlreiche T-Zell-Liganden charakterisiert werden konnten. Der Einsatz von Peptidimpfstoffen in der Praxis würde dann Sinn machen, wenn T-Zell-Liganden verwendet werden, die an multiple MHC-Haplotypen binden oder wenn ein solcher Impfstoff aus einer Mischung verschiedener Liganden bestehen würde (Kuebler & Nixon, 1996).

Allerdings ist noch immer nicht ganz geklärt, wie exogene Antigene in den MHC-Klasse-I-Präsentationsweg gelangen, da eigentlich davon auszugehen ist, dass diese im MHC-Klasse-II-Komplex präsentiert werden. Um im MHC-Klasse-II-Molekül präsentiert zu werden, muss das Antigen von antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen und anschließend in deren endosomalem Kompartiment degradiert werden (Lanzavecchia, 1990; Brodsky & Guagliardi, 1991). Möglicherweise treten zum Teil „undichte“ Stellen in den Endosomen auf, über die aufgenommene Peptide oder Proteine in den TAP (Transporter associated with antigen processing)-abhängigen Prozessierungsweg gelangen können. Nach einem anderen Modell nimmt eine Makrophage in zu großem Maß Antigen auf, so dass die Phagosomen-Membran reißt und das Antigen in das Zytoplasma der Zelle gelangt (Reis e Sousa & Germain, 1995; Jondal et al., 1996).

Im folgenden Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob auch durch die Immunisierung mit dem Peptid 9048, das ein BDV-spezifisches T-Zell-Epitop darstellt, die Aktivierung naiver T-Zellen möglich ist. Es wurde überprüft, ob durch die subkutane Immunisierung mit dem Peptid eine Aktivierung von T-Zellen in der Milz erreicht werden kann. Mit HIV und LCMV konnte gezeigt

werden, dass die mehrmalige subkutane Peptidapplikation zur Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen in der Milz führte (Hart et al., 1991; Aichele et al., 1995). Schon durch die einmalige subkutane Applikation von Nonapeptiden des Influenza A Virus konnten virusspezifische zytotoxische T-Zellen in den Milzen von Mäusen induziert werden (Zhou et al. 1992). Bei einer Arbeit mit LCMV-spezifischen Peptiden zeigte sich, dass immunisierte Mäuse vor einer zehn Tage später erfolgenden Infektion geschützt waren. Der Schutz wurde durch die in Folge der Immunisierung rasch aktivierten CD8⁺ T-Zellen vermittelt (Schulz et al., 1991). In verschiedenen Experimenten mit Mäusen, in denen CD8⁺ T-Zellen durch eine Peptidvakzine aktiviert werden sollten, konnte allerdings erst durch eine in vitro Restimulation zytotoxische Aktivität induziert werden. Zeiträume, die zwischen fünf und sieben Tagen lagen führten bei der Restimulation zum Erfolg (Hart et al., 1991; Zhou, et al., 1992 ; Partidos et al., 1996a; Van der Most et al., 1998). Fraglich war, ob die gleichen Restimulationszeiträume bei der Lewis Ratte zum Erfolg führen würden. Experimente mit BDV hatten gezeigt, dass virusspezifische Lymphozyten der Lewis Ratte erfolgreich über acht Tage in vitro restimuliert werden konnten. Diese Effektoren wurden aus den cervicalen Lymphknoten der Tiere isoliert (Batra, 2000).

Für die hier beschriebenen Experiment wurde Ratten das Peptid 9048 unter Zugabe von Freundschem Adjuvans subkutan appliziert. Nach zwei Wochen erfolgte eine sekundäre Immunisierung. Aus der Milz isolierte Lymphozyten wurden direkt nach der Entnahme, zwölf Tage nach der wiederholten Immunisierung oder nach einer achttägigen in vitro Restimulation auf peptid- und BDV-spezifische Lyse untersucht. Weder die primär stimulierten noch die in vitro restimulierten Lymphozyten erkannten und lysierten die Zielzellen.

Da die subkutane Immunisierung mit dem Peptid 9048 nicht zum Erfolg geführt hatte wurde ein alternativer Applikationsweg gewählt. Allsopp und Mitarbeiter konnten mit der mehrmaligen intraperitonealen Applikation eines Lipopeptids zytotoxische T-Zellen in der Milz von Mäusen aktivieren (Allsopp et al., 1996).

Aichele und Mitarbeiter verwendeten für eine intraperitoneale Immunisierung LCMV-spezifische Peptide, die aufgenommen in Freundschem Adjuvans, eine Reaktion hervorriefen (Aichele et al.; 1995). Auch mit einem Masern-spezifischen Epitop führte die gleiche Applikationsart zur Aktivierung von zytotoxischen Lymphozyten (Partidos et al., 1996b).

Lewis Ratten wurden zweimal im Abstand von zwei Wochen mit dem Peptid 9048 intraperitoneal immunisiert. Aus den Tieren gewonnene Milzlymphozyten wurden direkt im Zytotoxizitätstest auf BDV- und peptidspezifische Zytotoxizität untersucht oder vorher über acht Tage in vitro restimuliert. Im Zytotoxizitätstest konnte weder mit den primär stimulierten noch mit den in vitro restimulierten Lymphozyten eine spezifische Lyse der Zielzellen nachgewiesen werden. Das bedeutet, dass es nicht möglich war die Immunisierungsprotokolle, die in Mäusen zur Induktion einer T-Zell-Antwort geführt hatten, direkt auf Ratten zu übertragen. Über die subkutane oder intraperitoneale Applikation eines MHC-Klasse-I-Liganden konnten keine zytotoxischen T-Zellen in der Milz induziert werden.

Auffallend war in beiden Immunisierungsexperimenten die deutliche spezifische Lyse der mitgeführten YAC Zellen durch die primär stimulierten Milzlymphozyten. YAC Zellen stellen ein Ziel für natürliche Killerzellen (NK) dar. NK Zellen sind in der frühen Phase einer Infektion aktiv und kontrollieren verschiedene intrazelluläre Krankheitserreger (Gumperez & Parham 1995). Die starke Aktivität dieser Zellen in den Milzen der immunisierten Ratten könnte auf eine unterschwellige bakterielle oder virale Infektion hindeuten. Die Tiere zeigten ein ansonsten ungestörtes Allgemeinbefinden. Es stellt sich die Frage, ob eine mögliche Infektion der immunisierten Ratten einen hemmenden Effekt auf die Rekrutierung von peptidspezifischen T-Zellen hatte und aus diesem Grund auch in keinem Ansatz eine spezifische zytotoxische Aktivität nachgewiesen werden konnte. Im Rahmen dieser Arbeit war es jedoch nicht mehr möglich die Experimente zu wiederholen.

Da es nach peripherer Immunisierung nicht möglich war $CD8^+$ T-Zellen in der Milz zu aktivieren wurde schließlich ein weiterer Versuchsansatz gewählt. In Experimenten, in denen Mäuse mit LCMV subkutan in die Sohlen der Hinterfüße infiziert worden waren, konnte eine sogenannte DTH-Reaktion (Delayed Type Hypersensitivity) hervorgerufen werden, die einen klassisch biphasischen Verlauf zeigte. Ab dem sechsten Tag nach Infektion war eine Schwellung des Gewebes feststellbar, die mit der Anwesenheit von $CD8^+$ T-Zellen einherging. Einige Tage später wurde das Entzündungsgeschehen von $CD4^+$ T-Zellen dominiert. Wurden die Versuche dagegen mit nicht-infektiösem Antigen durchgeführt, kam es nur zur Einwanderung $CD4^+$ T-Zellen (Moskophidis & Lehmann-Grube, 1989; Moskophidis et al., 1990). Im BDV-Modell kam es in Experimenten, die mit BDV-spezifischem Antigen durchgeführt wurden, durch die subkutane Immunisierung in die Fußsohlen von Ratten zur Aktivierung von Lymphozyten in den poplitealen Lymphknoten (Richt et al., 1989; Planz, et al., 1995; Nöske et al., 1998).

Ausgehend von diesen Erkenntnissen wurde im folgenden Experiment Ratten das Peptid 9048 subkutan in den Fuß appliziert. Da kein infektiöses Agens zum Einsatz kam wurden verschiedene Adjuvantien hinzugezogen, um die Immunogenität des Peptids zu verstärken. Es wurde Titermax Gold™ eingesetzt. Dieses Adjuvans gilt als geeignet, um mit Hilfe von Peptidimpfstoffen eine T-Zell-Antwort zu induzieren (Kast et al., 1993). Ferner wurde Freundsches Adjuvans für die Experimente verwendet. Aus den poplitealen Lymphknoten isolierte Zellen wurden direkt bzw. nach in vitro Restimulation in der FACS Analyse auf den Anteil von $CD8^+$ T-Zellen an der gesamten T-Zell-Population untersucht. Es war, im Bezug auf die prozentualen Anteile der einzelnen T-Zell-Populationen, kein Unterschied zwischen den mit Peptid immunisierten Tieren und einer Kontrollratte, die nur das Adjuvans erhalten hatte, feststellbar. Ein weiteres Ziel dieser Experimente sollte es sein festzustellen, ob die vorhandenen $CD8^+$ T-Zellen der mit Peptid immunisierten Ratten im Vergleich zu den Tieren,

die nur Adjuvans erhalten hatten, spezifisch für das Peptid 9048 waren. Ein Teil der Lymphozyten wurden daher direkt nach der Isolation im Zytotoxizitätstest auf peptidspezifische Lyse untersucht. Ein weiterer Teil der Lymphozyten wurde in vitro restimuliert und anschließend auf peptidspezifische zytotoxische Aktivität untersucht. Es stellte sich heraus, dass keine der angebotenen Zielzellen, weder von den primär stimulierten, noch von den in vitro restimulierten Lymphozyten, lysiert wurde. Demnach konnte durch die subkutane Applikation des Peptids 9048 in die Fußsohlen von Ratten keine peptidspezifischen T-Zellen in den poplitealen Lymphknoten aktiviert werden. Mit den Immunisierungsexperimenten war es nicht gelungen BDV-spezifische CD8⁺ T-Zellen in der Milz oder den poplitealen Lymphknoten zu induzieren. Daher sollte untersucht werden, ob und wie sich die mehrmalige Applikation des Peptids 9048 oder des vollständigen Nukleoproteins auf eine folgende BDV-Infektion auswirkt. In Experimenten mit LCMV konnte gezeigt werden, dass die Applikation eines viralen MHC-Klasse-I-Liganden zur Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen oder aber zur Toleranz von peptidspezifischen T-Zellen während einer folgenden Virusinfektion führen kann (Kyburz et al., 1993; Aichele et al., 1995). Verschiedene Faktoren bestimmen, ob ein Protein zu einer T-Zell-Antwort führt oder ob es zur Toleranz von T-Zellen kommt. So spielen sowohl die Menge und Stabilität des Antigens, Route und Häufigkeit der Applikation, als auch die Verwendung von Adjuvantien eine Rolle (Dresser, 1962; Mitchinson, 1964; Chiller et al., 1971; Aichele et al., 1995). Die Induktion von Toleranz durch MHC-Klasse-I-Liganden kann eine Möglichkeit darstellen, vor T-Zell-induzierten Immunpathologien oder Autoimmunerkrankungen zu schützen. Entsprechende Ergebnisse zeigten sich bei Experimenten mit der experimentellen autoimmunen Enzephalitis (EAE) und dem autoimmunen Diabetes mellitus (Clayton et al., 1989; Gaur et al., 1992; Kaufmann et al., 1993; Metzler & Wraith, 1993; Tisch et al., 1993; Aichele et al., 1994).

Da die BD eine immunpathologische Krankheit darstellt, in deren Verlauf zytotoxische T-Zellen virusinfizierte Zellen im ZNS zerstören, könnte die Induktion BDV-spezifischer Toleranz auf Ebene der T-Zellen eine Möglichkeit darstellen, um diese irreversiblen Schäden zu verhindern. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass nicht nur die Immunantwort alleine zur Schädigung im ZNS führt. Auch das Virus selbst kann zu Veränderungen im Gehirn führen, deren Tragweite noch geklärt werden muss (Gies et al. 1998). Weiterhin besteht die Gefahr Virusträgartiere, d. h. Tiere die möglicherweise Virus ausscheiden und eine Infektionsquelle für andere darstellen, zu etablieren.

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden Ratten dreimal im Abstand von zwei Wochen mit dem Peptid 9048 intraperitoneal immunisiert und nach zwei weiteren Wochen mit BDV infiziert. Es zeigte sich, dass die Tiere im Vergleich zu Kontrollen, die nicht immunisiert wurden oder die nur BSS erhalten hatten, später an BDV-spezifischen Symptomen erkrankten. Waren allerdings erste Krankheitsanzeichen aufgetreten, verschlechterte sich der Zustand der Ratten innerhalb nur weniger Tage stark. Es war also eine Verschärfung des Krankheitsablaufs zu beobachten. Bei der Überprüfung der Funktionalität von T-Zellen aus den Gehirnen der immunisierten Tiere wurde festgestellt, dass keine Toleranz gegenüber dem Peptid 9048 vorlag. Mit diesem Peptid beladene Zielzellen wurden im Zytotoxizitätstest lysiert. Erstaunlich war die Tatsache, dass auch schon vor dem Auftreten klinischer Symptome Lymphozyten aus den Gehirnen immunisierter Ratten isoliert werden konnten, die in vitro zytotoxische Aktivität zeigten. Nach der Infektion von Ratten mit BDV sind zytotoxische Lymphozyten erst mit dem Auftreten von BDV-spezifischen klinischen Symptomen nachweisbar (Planz, 1993; Planz et al., 1993; Sobbe et al., 1997). Die schon vor dem Beginn klinischer Symptomatik auftretenden zytotoxischen T-Zellen sprechen dafür, dass durch die Peptidimmunisierung anstatt der vermuteten Induktion von Toleranz, eine Aktivierung von T-Zellen stattgefunden hatte. Wurden Ratten nur

einmal vor der Infektion mit BDV mit dem Peptid immunisiert, kam es zu keinem der beschriebenen Effekte. Die Erkrankung verlief wie bei den Kontrolltieren. Im Bezug auf die Viruslast im Gehirn der immunisierten Tiere wurde in einem Experiment ein um eine Log-Stufe erhöhter Titer der mit Peptid immunisierten Ratten im Vergleich zu den Kontrolltieren festgestellt. Da die Kontrollgruppe aber drei Tage vor der immunisierten Gruppe getötet wurde, kann nicht mit Sicherheit von einem Effekt der Immunisierung ausgegangen werden. Im folgenden Experiment, in dessen Verlauf die Tiere zum gleichen Zeitpunkt getötet wurden, waren alle Virustiter vergleichbar hoch. Richt bzw. Nöske und Mitarbeiter stellten dar, dass BDV-spezifische zytotoxische Lymphozyten, wenn diese zu einem sehr frühen Zeitpunkt nach Infektion aktiviert werden, in der Lage sind das Virus zu eliminieren und so vor einer Erkrankung schützen (Richt et al., 1994; Nöske et al., 1998). Entweder waren die durch die Peptidimmunisierung aktivierten Lymphozyten demnach nicht früh genug oder nicht in ausreichender Anzahl vorhanden, um das Virus kontrollieren zu können. Lewis und Mitarbeiter unternahmen den Versuch Ratten mit einem rekombinanten Vaccinia Virus, welches für das Nukleoprotein des BDV codiert (VV-p40), gegen eine folgende Infektion mit BDV zu immunisieren. Auch durch diese Immunisierung konnte die Erkrankung der Ratten nicht verhindert werden. Allerdings war die Viruslast im Gehirn der Tiere niedriger, im Vergleich zu nicht immunisierten Kontrollen (Lewis et al., 1999). Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass die Immunisierung mit einem einzelnen T-Zell-Epitop im Fall der BD nicht ausreicht, um eine Immunantwort zu induzieren, die zur Elimination von Virus führt. Aus Arbeiten mit verschiedenen anderen Viren ist bekannt, dass es häufig nicht möglich war mit einem T-Zell-Epitop alleine eine zytotoxische T-Zellantwort hervorzurufen. Für das Hepatitis C Virus wurde beschrieben, dass die gleichzeitige Immunisierung mit einem für zytotoxische T-Zellen spezifischen Epitop und einem T-Helfer-Epitop zur effektiven Aktivierung CD8⁺ T-Zellen führte

(Hiranuma et al., 1999). Es ist denkbar, dass sich auf dem Nukleoprotein des BDV ein T-Helfer-Epitop befindet und aus diesem Grund die Immunisierung mit VV-p40, im Vergleich zur Peptidimmunisierung, zu einer, wenn auch nur unvollständigen, Elimination von Virus aus dem Gehirn der immunisierten und infizierten Tiere und einer daraus resultierenden abgeschwächten Symptomatik führen konnte. Interessant wären in diesem Zusammenhang Immunisierungsexperimente mit den im Rahmen dieser Arbeit hergestellten rekombinanten Vaccinia Viren, die für N-terminale Bruchstücke des Nukleoproteins codieren. Es ließe sich feststellen, welcher Abschnitt des p40 einen Effekt hervorrufen kann.

Eventuell treten aber auch Schwierigkeiten beim Einschleusen des synthetischen Peptids 9048 in den MHC-Klasse-I-Präsentationsweg auf. Damit Influenza A-spezifische Peptide in diesen Weg gelangen konnten, wurden sie kovalent an einen Lipid-Anker gebunden. Möglicherweise führte die Anwesenheit des Lipidanteils zusätzlich auch zur Aktivierung von Makrophagen und der Freisetzung von Zytokinen, die hilfreich für die Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen waren (Deres et al., 1989). Franksson und Mitarbeiter beobachteten, dass durch die Applikation von peptidbeladenen Zellen zytotoxische Effektorzellen in vivo induziert werden konnten (Franksson et al., 1993).

Es ist weiterhin denkbar, dass zytotoxische T-Zellen, die das Peptid 9048 erkennen, in vivo nicht in der Lage sind die Infektion zu kontrollieren und so zum Schutz vor einer folgenden BDV-Infektion zu führen. Experimente mit LCMV zeigten, dass T-Zell-Epitope, die im Verlauf einer Virusinfektion eine starke zytotoxische T-Zell-Antwort auslösen, die in vitro nachgewiesen werden kann, nicht unbedingt in der Lage sein müssen Virus in vivo effektiv zu eliminieren (Gallimore et al., 1998b).

In Experimenten mit dem Hepatitis B Virus konnte beobachtet werden, dass die Immunisierung mit einem rekombinant hergestellten virusspezifischen Lipoprotein zu einer lange anhaltenden zellulären Immunantwort führte. Keinen

Effekt hatte dagegen die Applikation ungekoppelter viraler T-Zell-Epitope, die auf die gleiche Art wie die Lipoproteine verabreicht wurden (Schirmbeck & Reimann, 1994).

Parallel zu den Peptidimmunisierungen wurden Ratten daher mit bakteriell exprimiertem Nukleoprotein immunisiert, das dreimal im Abstand von zwei Wochen appliziert wurde. Nach zwei weiteren Wochen erfolgte die Infektion mit BDV. Die so behandelten Ratten zeigten über den Beobachtungszeitraum von bis zu 23 Tagen p.i. nur unspezifische oder leichte BDV-spezifische Symptome. Trotz der fehlenden oder nur schwachen Symptomatik konnten Lymphozyten aus den Gehirnen der Ratten isoliert werden, die in vitro spezifische Zytotoxizität gegenüber Zielzellen zeigten, die mit dem Peptid 9048 beladen waren. Durch Lymphozyten, die zu einem frühen Zeitpunkt nach Infektion isoliert wurden, konnte im Vergleich zu den mit dem Peptid 9048 immunisierten Ratten eine deutlich stärkere spezifische Lyse im Zytotoxizitätstest hervorgerufen werden. Mit Hilfe des Nukleoproteins konnten demnach CD8⁺ T-Zellen aktiviert werden. Von Bachmann und Mitarbeitern wurde beschrieben, dass die Immunisierung mit rekombinanten viralen Proteinen, die mit Hilfe des Baculovirus-Systems exprimiert wurden, zu einer schützenden zytotoxischen T-Zell-Antwort führte (Bachmann et al., 1994). Die Experimente wurden mit dem Glycoprotein und dem Nukleoprotein des lymphozytären Choriomeningitis Virus und dem Nukleoprotein des vesikulären Stomatitis Virus durchgeführt. Zellulärer Debris, der bei der Proteinaufreinigung nicht entfernt wurde, fungierte als eine Art Adjuvans. Die Proteine wurden mit Hilfe dieses Adjuvans besser von antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen. In Kontrollexperimenten führte die Immunisierung mit inaktiviertem LCMV oder VSV dagegen nicht zu einer Aktivierung der zellulären Immunantwort. Wie die Western Blot-Analyse des hier eingesetzten, bakteriell exprimierten BDV-spezifischen Nukleoproteins zeigte, liegen neben dem rekombinanten Protein auch Abbauprodukte desselben und vermutlich auch bakterieller

Zelldebris vor, der zur Immunogenität des Proteins beitragen könnte. Da alle mit diesem Protein immunisierten Tiere schon vor der Infektion mit BDV Antikörper gegen das Nukleoprotein aufwiesen, kann davon ausgegangen werden, dass die Reinheit für eine Immunisierung, mit dem Ziel einer p40-spezifischen Immunantwort, ausreichend war.

Die Immunisierung mit dem rekombinanten Nukleoprotein führte demnach in Bezug auf die zytotoxische Aktivität zu einer frühen und im Vergleich zur Immunisierung mit dem Peptid 9048 auch effektiveren zellulären Immunantwort. Zwar konnte das Virus nicht eliminiert werden, aber offensichtlich bestand ein Gleichgewicht zwischen der Immunantwort und der Virusvermehrung und Ausbreitung, welche die Immunpathologie verhinderte. Am Beispiel von LCMV wurde beschrieben, dass ebendieses Gleichgewicht darüber entscheidet, ob es zum Schutz vor der Krankheit oder zu deren Ausbruch kommt (Oehen et al., 1991).

7. ZUSAMMENFASSUNG

Innerhalb dieser Arbeit konnte ein Borna Disease Virus-spezifisches T-Zell-Epitop identifiziert werden, das auf dem Nukleoprotein des Virus lokalisiert ist. Es handelt sich dabei um den ersten beschriebenen viralen MHC-Klasse-I-Liganden der Ratte.

Dazu wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H.-G. Rammensee aus dem Interfakultären Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie, der Universität Tübingen zum einen natürlich prozessierte MHC-Klasse-I-Liganden aus persistent BDV-infizierten Zellen gewonnen und mittels HPLC fraktioniert. Weiterhin wurden auf Grundlage der Datenbank SYFPEITHI (Rammensee et al., 1999) mögliche Liganden vorhergesagt und synthetisiert. Die natürlich prozessierten und die synthetisch hergestellten Peptide wurden dahingehend untersucht, ob sie von BDV-spezifischen zytotoxischen T-Zellen erkannt werden. Dazu wurden Zellen mit den jeweiligen Peptiden beladen und im Zytotoxizitätstest als Zielzellen eingesetzt. Zellen, die mit dem synthetischen Peptid mit der Aminosäuresequenz ASYAQMTTY beladen waren, wurden von den T-Zellen erkannt und lysiert, ebenso wie Zielzellen, die mit der Fraktion 24 der HPLC-Auftrennung der natürlichen Liganden beladen waren.

In der Zwischenzeit konnte am Interfakultären Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie, der Universität Tübingen massenspektromertisch nachgewiesen werden, dass die natürlich prozessierten Liganden, die von T-Zellen erkannt wurden, ebenfalls die Sequenz ASYAQMTTY aufweisen.

Weiterhin wurden vier rekombinante Vaccinia Viren hergestellt, die für unterschiedlich große N-terminale Bruchstücke des BDV Nukleoproteins codieren. Diese Viren stehen in Zukunft für die weitere Charakterisierung der p40-spezifischen Immunantwort in der Ratte und anderen Spezies zu Verfügung.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde das Peptid ASYAQMTTY sowie bakteriell exprimiertes Nukleoprotein in verschiedenen Immunisierungsexperimenten eingesetzt mit der Zielsetzung, zytotoxische T-Zellen zu induzieren. Die Applikation des Nonamers vor der Infektion mit BDV konnte den Verlauf der Erkrankung bei Ratten beeinflussen, wobei das Virus nicht aus dem Gehirn der Tiere eliminiert wurde. Die immunisierten Ratten erkrankten aber im Vergleich zu Kontrolltieren deutlich später. Auch die Immunisierung mit dem Nukleoprotein vor einer BDV-Infektion führte zu einem veränderten Ablauf der BD. Bei den immunisierten Ratten waren nur unspezifische oder leichte BDV-spezifische Symptome zu beobachten, wobei es aber ebenfalls nicht zur Elimination von Virus aus dem ZNS kam. In beiden Experimenten wurden T-Zellen mit BDV-spezifischer zytotoxischer Aktivität nachgewiesen, bevor neurologische Symptome auftraten. Die Immunisierung sowohl mit dem MHC-Klasse-I-Liganden, als auch mit dem Nukleoprotein führte demnach zur Aktivierung von T-Zellen.

7A. SUMMARY

In this doctoral thesis an epitope recognized by BDV-specific T cells could be identified. This is the first viral ligand of the rat MHC class I molecule being described. The epitope is located on the viral Nukleoprotein.

In a cooperation with the team of Prof. Dr. H.-G. Rammensee of the „Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie, Universität Tübingen“, naturally processed MHC class I ligands were extracted from persistently BDV-infected cells and fractionated by HPLC. In addition, on the basis of the databank SYFPEITHI (Rammensee et al., 1999), potential ligands were predicted and synthesized. Cells were pulsed with the naturally processed or the synthetic peptides and were used as target cells in an in vitro cytotoxicity assay. The purpose of this experiment was to determine if any of the peptides were recognized by BDV-specific T cells. Target cells which had been labeled with the synthetic peptide with the aminoacid sequence ASYAQMTTY were lysed by the T cells as well as cells loaded with fraction 24 of the HPLC peptide separation.

In the meantime also the sequence of the naturally processed molecule, which was recognized by the T cells, could be confirmed as ASYAQMTTY.

In the second part of this doctoral thesis four recombinant Vaccinia viruses, encoding for n-terminal sequences of the BDV Nukleoprotein, were constructed. The recombinant viruses will be useful for the further characterization of the Nukleoprotein-specific immune response in the rat and other species.

Furthermore the peptide ASYAQMTTY and bacterially expressed BDV Nukleoprotein were used in immunization experiments with the intention of inducing cytotoxic T cells. When rats were immunized with the peptide and infected with BDV thereafter, this changed the course of BD, although the virus could not be eliminated from the CNS of the animals. Symptoms of BD

occurred significantly later, compared to controls. The immunization with the Nukleoprotein before the infection with BDV led to a changed course of BD, as well. The rats showed either very slight BDV-specific symptoms or no symptoms at all but an elimination of virus from the CNS could not be achieved either. In both experiments BDV-specific T cells could be demonstrated before the animals established clinical symptoms. Accordingly both, the immunization with the peptide ASYQMTTY or with the Nukleoprotein, led to the activation of virus-specific T cells.

8. LITERATUR

- Aichele, P., Hengartner, H., Zinkernagel, R. M. and Schulz, M. (1990).** Antiviral cytotoxic T cell response induced by in vivo priming with a free synthetic peptide. *J. Exp. Med.* **171**: 1815.
- Aichele, P. Kyburz, D., Ohashi, P. S., Odermatt, B., Zinkernagel, R. M., Hengartner, H. and Pircher, H. (1994).** Peptide-induced T-cell tolerance to prevent autoimmune diabetes in a transgenic mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 444.
- Aichele, P., Brduscha-Riem, K., Zinkernagel, R. M., Hengartner, H. and Pircher, H. (1995).** T cell priming versus T cell tolerance induced by synthetic peptides. *J. Exp. Med.* **182**: 261.
- Allsopp, C. E. M., Plebanski, M., Gilbert, S., Sinden, R. E., Harris, S., Frankel, G., Dougan, G., Hioe, C., Nixon, D., Paoletti, E., Layton, G. and Hill, A. V. S. (1996).** Comparison of numerous delivery systems for the induction of cytotoxic T lymphocytes by immunisation. *Eur. J. Immunol.* **26**: 1951.
- Amsterdam, J. D., Winokur, A., Dyson, W., Herzog, S., Gonzalez, F., Rott, R. and Koprowski, H. (1985).** Borna disease virus. A possible etiologic factor in human affective disorders ? *Arch. Gen. Psychiatry* **42**: 1093.
- Anzil, A. P., Blinzinger, K. and Mayr, A. (1973).** Persistent Borna virus infection in adult hamsters. *Arch. Gesamte Virusforsch.* **40**: 52.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K., (1996).** Use of the *A. Victoria* green fluorescent protein to study protein dynamics in vivo. *Curr. Protocols. Mol. Biol.* (John Wiley & Sons, Inc.) **2**: 9.7.22
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K., (1997).** Expression of proteins in mammalian cells using Vaccinia viral vectors. *Curr. Protocols. Mol. Biol.* (John Wiley & Sons, Inc.) **3**: 16.15.1

- Bachmann, M. F., Kündig, T. M., Kalberer, C. P., Hengartner, H. and Zinkernagel, R. M. (1993).** Formalin inactivation of vesicular stomatitis virus impairs T-cell but not T-help-independent B-cell responses. *J. Virol.* **67**: 3917.
- Bachmann, M. F., Kündig, T. M., Freer, G., Li, Y., Yong Kang, C., Bishop, D. H., Hengartner, H. and Zinkernagel, R. M. (1994).** Induction of protective cytotoxic T cells with viral proteins. *Eur. J. Immunol.* **24**: 2128.
- Batra, A. (1996).** Untersuchungen zur in vitro Stimulation Borna Disease Virus-spezifischer CD8+ T-Zellen der Ratte. *Diplomarbeit, Fachber. Biologie, Gießen*
- Batra, A. (2000).** In vivo und in vitro Untersuchungen zur Stimulation Borna Disease virusspezifischer CD8+ Lymphozyten der Ratte, und Nachweis viraler Proteine in und auf infizierten Zellen mit Hilfe der Durchflußzytometrie. *Rer. Nat. Diss., Gießen.*
- Battegay, M., Cooper, S., Althage, A., Bänziger, J., Hengartner, H. and Zinkernagel, R. M. (1991).** Quantification of lymphocytic choriomeningitis virus with an immunological focus assay in 24- or 96-well plates. *J. Virol. Meth.* **33**: 191.
- Bautista, J. R., Rubin, S. A., Moran, T. H., Schwartz, G. J. and Carbone, K. M. (1995).** Developmental injuries to the cerebellum following perinatal Borna disease virus infection. *Dev. Brain Res.* **90**: 45.
- Bechter, K., Herzog, S. and Schüttler, R. (1992).** Possible significance of Borna disease for humans. *Neurol. Psychiatry and Brain Res.* **1**: 23.
- Berg, A. L., Johannisson, A., Johannsson, M., Hein, A., Berg, M. and Dorries, R. (1999).** Peripheral and intracerebral T cell immune response in cats naturally infected with Borna disease virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **68**: 241.
- Berg, M., Ehrenborg, C., Blomberg, J., Pipkorn, R. and Berg, A.-L. (1998).** Two domains of the Borna disease virus p40 protein are required for interaction with the p23 protein. *J. Gen. Virol.* **79**: 2957.

- Bianchi, L. (1981).** The immunopathology of acute type B hepatitis. *Springer Semin. Immunopathol.* **3**: 421.
- Bilzer, T. and Stitz, L. (1993).** Brain cell lesions in Borna disease are mediated by T cells. *Arch Virol.* **7**: 153.
- Bilzer, T. and Stitz, L. (1994).** Immune-mediated brain atrophy: CD8⁺ T cells cause tissue destruction during Borna disease. *J. Immunol.* **153**: 818.
- Bilzer, T., Planz, O., Lipkin, W. I. and Stitz, L. (1995).** Presence of CD4⁺ and CD8⁺ T cells and expression of MHC class I and MHC class II antigen in horses with Borna disease virus-induced encephalitis. *Brain Pathol.* **5**: 223.
- Binz, T., Lebelt, J., Niemann, H. and Hagenau, K. (1994).** Sequence analysis of the p24 gene of Borna disease virus in naturally infected horse, donkey and sheep. *Virus Res.* **34**: 281.
- Bjorkman P. J., Saper, M. A., Samraoui, B., Bennet, W. S., Strominger, J. L. and Wiley, D. C. (1987).** Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* **329**: 506
- Bode, L., Riegel, S., Lange, W. and Ludwig, H. (1992).** Human infections with Borna disease virus: seroprevalence in patients with chronic diseases and healthy individuals. *J. Med. Virol.* **36**: 309
- Bode, L., Dürwald, R. and Ludwig, H. (1994).** Borna virus infection in cattle associated with fatal neurological disease. *Vet. Rec.* **135**: 283.
- Bode, L., Zimmermann, W., Ferszt, R., Steinbach, F. and Ludwig, H. (1995).** Borna disease virus genome transcribed and expressed in psychiatric patients. *Nat. Med.* **1**: 232
- Bode, L. and Ludwig, H. (1997).** Clinical similarities and close genetic relationship of human and animal Borna disease virus. *Arch. Virol. Suppl.* **13**: 167.
- Briese, T., de la Torre, J. C., Lewis, A., Ludwig, H. and Lipkin, W. I. (1992).** Borna disease virus, a negative-strand RNA virus, transcribes in the Nukleus of infected cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* **89**: 11486.

- Briese, T., Schneemann, A., Lewis, A. J., Park, Y.-S., Kim, S., Ludwig, H. and Lipkin, W. I. (1994).** Genomic organization of Borna disease virus. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* **91**: 4362.
- Briese, T., Lipkin, W. I. and de la Torre, J. C. (1995).** Molecular biology of Borna disease virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **190**: 1.
- Brodsky, F. M. and Guagliardi, L. E. (1991).** The cell biology of antigen processing and presentation. *Annu. Rev. Immunol* **9**: 707.
- Caplazi, P., Waldvogel, A., Stitz, L., Braun, U. and Ehrensperger, F. (1994).** Borna disease in naturally infected cattle. *J. Comp. Path.* **111**: 65.
- Caplazi, P. and Ehrensperger, F. (1998).** Spontaneous Borna disease in sheep and horses: immunophenotyping of inflammatory cells and detection of MHC-I and MHC-II antigen expression in Borna encephalitis lesions. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **61**: 203.
- Carbone, K. M., Duchala, C. S., Griffin, J. W., Kincaid, A. L. and Narayan, O. (1987).** Pathogenesis of Borna disease in rats: Evidence that intra-axonal spread is the major route for virus dissemination and the determinant for disease incubation. *J. Virol.* **61**: 3431.
- Carbone, K. M., Trapp, B. D., Griffin, J. W., Duchala, C. S. and Narayan, O. (1989).** Astrocytes and Schwann cells are virus-host cells in the nervous system of rats with Borna disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **48**: 631.
- Carbone, K. M., Moench, T. R. and Lipkin, W. I. (1991a).** Borna disease virus replicates in astrocytes, Schwann cells and ependymal cells in persistently infected rats: location of viral genomic and messenger RNAs by in situ hybridization. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **50**: 205.
- Carbone, K. M., Park, S. W., Rubin, S. A., Waltrip, R. W.^{2nd} and Vogelsang, G. B. (1991b).** Borna disease: association with a maturation defect in the cellular immune response. *J. Virol.* **65**: 6154.

- Carbone, K. M., Rubin, S. A., Sierra-Honigmann, A. M. and Lederman, H. M. (1993).** Characterization of a glial cell line persistently infected with Borna disease virus (BDV): influence of neurotrophic factors on BDV protein and RNA expression. *J. Virol.* **67**: 1453.
- Chiller, J. M., Habicht, G. S. and Weigle, W. O. (1971).** Kinetic differences in unresponsiveness of thymus and bone marrow. *Science* **171**: 813.
- Clayton, J. P., Gammon, G. M., Ando, D. G., Kono, D. H., Hood, L. and Sercarz, E. E. (1989).** Peptide-specific prevention of experimental allergic encephalomyelitis. Neonatal tolerance induced to the dominant T cell determinant of myelin basic protein. *J. Exp. Med.* **169**: 1681.
- Compans, R. W., Melsen, L. R. and de la Torre, J. C. (1994).** Virus-like particles in MDCK cells persistently infected with Borna disease virus. *Virus Res.* **33**: 261
- Cubitt, B., Oldstone, C. and de la Torre, J. C. (1994a).** Sequence and genome organization of Borna disease virus. *J. Virol.* **68**: 1382.
- Cubitt, B., Oldstone, C., Valcarcel, J. and de la Torre, J. C. (1994b).** RNA splicing contributes to the generation of mature mRNAs of Borna disease virus, a nonsegmented negative-strand RNA virus. *Virus Res.* **34**: 69.
- Cubitt, B. and de la Torre, J. C. (1994).** Borna disease virus (BDV), a nonsegmented RNA virus, replicates in the nuclei of infected cells where infectious BDV ribonucleoproteins are present. *J. Virol.* **68**: 1371.
- Czygan, M., Hallensleben, W., Hofer, M., Pollak, S., Sauder, C., Bilzer, T., Blumcke, I., Riederer, P., Bogerts, B., Falkai, P., Schwarz, M. J., Masliah, E., Staehli, P., Hufert, F. T. and Lieb, K. (1999).** Borna disease virus in the brain with a rare form of hippocampal degeneration but not in brains of patients with common neuropsychiatric disorders. *J. Infect. Dis.* **180**: 1695.

- Danner, K., Heubeck, D. and Mayr, A. (1978).** In vitro studies on Borna disease. I. The use of cell cultures for the demonstration, titration and production of Borna virus. *Arch. Virol.* **57**: 63.
- Degiorgis, M. P., Berg, A. L., Hard Af Segerstad, C., Morner, T., Johannson, M. and Berg, M. (2000).** Borna disease in a free-ranging lynx (*Lynx lynx*). *J. Clin. Microbiol.* **38**: 3087.
- De la Torre, J. C., Carbone, K. M. and Lipkin, W. I. (1990).** Molecular characterization of the Borna disease agent. *Virology* **179**: 853.
- De la Torre, J. C. (1994).** Molecular biology of Borna disease virus: Prototype of a new group of animal viruses. *J. Virol.* **68**: 7669.
- De la Torre, J. C., Bode, L., Dürrwald, R., Cubitt, B., and Ludwig, H. (1996a).** Sequence characterization of human Borna disease virus. *Virus Res.* **44**: 33.
- De la Torre, J. C., Gonzalez-Dunia, D., Cubitt, B., Mallory, M., Mueller-Lantzsch, N., Grasser, F. A., Hansen, L. A. and Masliah, E. (1996b).** Detection of Borna disease virus antigen and RNA in human autopsy brain samples from neuropsychiatric patients. *Virology* **223**: 272.
- Deres, K., Schild, H., Wiesmüller, K.-H., Jung, G. and Rammansee, H.-G. (1989).** In vivo priming of virus-specific cytotoxic T lymphocytes with synthetic peptides. *Nature* **342**: 561.
- Deschl, U., Stitz, L., Herzog, S., Frese, K. and Rott, R. (1990).** Determination of immune cells in expression of major histocompatibility complex class II antigen in encephalitic lesions of experimental Borna disease. *Acta Neuropathol.* **81**: 41.
- Dietzschold, B. (1995).** The role of nitric oxide in the pathogenesis of virus-induced encephalopathies. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **196**: 51.
- Dinter, E. (1879).** Meningitis cerebrospinalis bei Pferden. *Ber. Vet. Wes. Sachsen.* **24**:121

- Dittrich, W., Bode, L., Ludwig, H., Kao, M. and Schneider, K. (1989).** Learning deficiencies in Borna disease virus-infected but clinically healthy rats. *Biol. Psychiatry* **26**: 818.
- Dresser, D. W. (1962).** Specific inhibition of antibody production: II. Paralysis induced in adult mice by small quantities of protein antigen. *Immunology* **5**: 378.
- Elford, W. J. and Galloway, I. A. (1933).** Filtration of the virus of Borna disease through graded collodion membranes. *Brit. J. Exper. Path.* **14**: 196.
- Evans, C. H. and DiPaolo, J. A. (1975).** Neoplastic transformation of guinea pig fetal cells in culture induced by chemical carcinogens. *Cancer Res.* **35**: 1035.
- Falk, K., Rötzschke, O. and Rammensee, H. G. (1992).** Specificity of antigen processing for MHC class I restricted presentation is conserved between mouse and man. *Eur. J. Immunol.* **22**: 1323.
- Franksson, L., Petersson, M., Kiessling, R. and Kärre, K. (1993).** Immunization against tumor and minor histocompatibility antigens by eluted cellular peptides loaded on antigen processing defective cells. *Eur. J. Immunol.* **23**: 2606.
- Fukamoto, T., McMaster, W. R. and Williams, A. F. (1982).** Mouse monoclonal antibodies against rat major histocompatibility antigens. Two Ia antigens and expression of Ia and class I antigens in rat thymus. *Eur. J. Immunol.* **12**: 237.
- Furrer, E., Bilzer, T., Stitz, L. and Planz, O. (2001).** Neutralizing antibodies in persistent Borna disease virus infection: Prophylactic effect of gp94-specific monoclonal antibodies in preventing encephalitis. *J. Virol.* **75**: 943.
- Galiberti, J. B. (1660).** Neugebahnter Tümmelplatz, und eröffnete Reitschul. Samt beygefügter Gestütt Ordnung und gründlicher Einzäumung wie auch der Pferde Cur und Artzney. (Übersetzt vom Italienisch ins Teutsch und mit denen darzu gehörigen Figuren geziert durch Mathaeum Drummern von Pabenbach). *Verlegung Michael Riegers Buchhandlers, Vienna.*

- Gallimore, A., Hengartner, H. and Zinkernagel, R. M. (1998a).** Hierarchies of antigen-specific cytotoxic T-cell responses. *Immunol. Rev.* **164**: 29.
- Gallimore, A., Dumrese, T., Hengartner, H., Zinkernagel, R. M. and Rammensee, H. G. (1998b).** Protective immunity does not correlate with the hierarchy of virus-specific cytotoxic T cell responses to naturally processed peptides. *J. Exp. Med.* **187**: 1647.
- Gao, X.-M., Zheng, B., Liew, F. Y., Brett, S. and Tite, J. (1991).** Priming of influenza virus-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo by short synthetic peptides. *J. Immunol.* **147**: 3268.
- Gaur, A., Wiers, B., Liu, A., Rothbard, J. and Fathman, C. G. (1992).** Amelioration of autoimmune encephalomyelitis by myelin basic protein synthetic peptide-induced anergy. *Science* **258**: 1491.
- Gies, U., Bilzer, T., Stitz, L. and Staiger, J. F. (1998).** Disturbance of the cortical cholinergic innervation in Borna disease prior to encephalitis. *Brain Pathology* **8**: 39.
- Goldberg, A. L. and Rock, K. L. (1992).** Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. *Nature* **357**: 375.
- Gonzalez-Dunia, D., Eddleston, M., Mackman, N., Carbone, K. M. and de la Torre, J. C. (1996).** Expression of tissue factor is increased in astrocytes within the central nervous system during persistent infection with Borna disease virus. *J. Virol.* **70**: 5812.
- Gonzalez-Dunia, D., Cubitt, B., Grässer, F. A. and de la Torre, J. C. (1997).** Characterization of Borna disease virus p56 protein, a surface glycoprotein involved in virus entry. *J. Virol.* **71**: 3208.
- Gonzalez-Dunia, D., Cubitt, B. and de la Torre, J. C. (1998).** Mechanism of Borna disease virus entry into cells. *J. Virol.* **72**: 783.
- Gosztonyi, G. and Ludwig, H. (1984).** Borna disease of horses. An immuno-histological and virological study of naturally infected animals. *Acta Neuropathol (Berl.)* **64**: 213
- Gosztonyi, G. and Ludwig, H. (1995).** Borna disease - neuropathology and pathogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **190**: 39.

- Gumperez, J. E. and Parham, P (1995).** The enigma of the natural killer cell. *Nature* **378**: 245
- Haas, B., Becht, H. and Rott, R. (1986).** Purification and properties of an intranuclear virus-specific antigen from tissues infected with Borna disease virus. *J. Gen. Virol.* **67**: 235.
- Haga, S., Yoshimura, M., Motoi, Y., Arima, K., Aizawa, T., Ikuta, K., Tashiro, M. and Ikeda, K. (1997).** Detection of Borna disease virus genome in normal human brain tissue. *Brain Res.* **770**: 307.
- Hagiwara, K., Kamitani, W., Takamura, S., Taniyama, H., Nakaya, T., Tanaka, H., Kirisawa, R., Iwai, H. and Ikuta, K. (2000).** Detection of Borna disease virus in an pregnant mare and her fetus. *Vet. Microbiol.* **72**: 207.
- Hallensleben, W., Schwemmle, M., Hausmann, J., Stitz, L., Volk, B., Pagenstecher, A. and Staeheli, P. (1998).** Borna disease virus-induced neurological disorder in mice: infection of neonates results in immunopathology. *J. Virol.* **72**: 4379.
- Hart, M. K., Weinhold, K. J., Searce, R. M., Washburn, E. M., Clark, C. A., Palker, T. J. and Haynes, B. F. (1991).** Priming of anti-human immunodeficiency virus (HIV) CD8⁺ cytotoxic T cells in vivo by carrier-free HIV synthetic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 9448.
- Hatalski, C. G., Kliche, S., Stitz, L. and Lipkin, W. I. (1995).** Neutralizing antibodies in Borna disease virus-infected rats. *J. Virol.* **69**: 741.
- Heinig, A. (1969).** Die Bornasche Krankheit der Pferde und Schafe. In: *Handbuch der Virusinfektionen bei Tieren* (H. Röhrer). VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 4: 83.
- Heemels, M.-T., Schumacher, T. N. M., Wonigeit, K. and Ploegh, H. L. (1993).** Peptide translocation by variants of the transporter associated with antigen processing. *Science* **262**: 2059.

- Herden, C., Herzog, S., Richt, J. A., Nessler, A., Christ, M., Failing, K. and Frese, K. (2000).** Distribution of Borna disease virus in the brain of rats infected with an obesity-inducing virus strain. *Brain Pathol.* **10**: 39.
- Herzog, S. and Rott, R. (1980).** Replication of Borna disease virus in cell culture. *Med. Microbiol. Immunol.* **168**: 153.
- Herzog, S., Kompter, C., Frese, K. and Rott, R. (1984).** Replication of Borna disease virus in rats: age-dependent differences in tissue distribution. *Med. Microbiol. Immunol.* **173**: 171.
- Herzog, S., Wonigeit, K., Frese K., Hedrich, H. J. and Rott, R. (1985).** Effect of Borna disease virus infection on athymic rats. *J. Gen. Virol.* **66**: 503.
- Herzog, S., Frese, K. and Rott, R. (1991).** Studies on the genetic control of resistance of black hooded rats to Borna disease. *J. Gen. Virol.* **72**: 535.
- Hirano, N., Kao, M. and Ludwig, H. (1983).** Persistent, tolerant or subacute infection in Borna disease virus-infected rats. *J. Gen. Virol.* **64**: 1521.
- Hiranuma, K., Tamaki, S., Nishimura, Y., Kusuki, S., Isogawa, M., Kim, G., Kaito, M., Kuribayashi, K., Adachi, Y. and Yasutomi, Y. (1999).** Helper T cell determinant peptide contributes to induction of cellular immune response by peptide vaccines against hepatitis C virus. *J. Gen. Virol.* **80**: 187.
- Hooper, D. C., Ohnishi, S. T., Kean, R., Numagami, Y., Dietzschold, B. and Koprowski, H. (1995).** Local nitric oxide production in viral and autoimmune diseases of the central nervous system. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* **92**: 5312.
- Hsu, T.-A., Carbone, K. M., Rubin, S., Vonderfecht, S. L. and Eiden, J. J. (1994).** Borna disease virus p24 and p38/40 synthesized in a baculovirus expression system: virus protein interactions in insect and mammalian cells. *Virology* **204**: 854.

- Joest, E. and Degen, H. (1909).** Über eigentümliche Kerneinschlüsse der Ganglienzellen bei der enzootischen Gehirn-Rückenmarksentzündung der Pferde. *Zschr. Inf.krkh. Haustiere* **6**: 348.
- Joest, E. und Degen, H. (1911).** Untersuchungen über die pathologische Histologie, Pathogenese und postmortale Diagnose der seuchenhaften Gehirn-Rückenmarksentzündung (Bornasche Krankheit) des Pferdes. *Zschr. Inf.krkh. Haustiere* **9**: 1
- Johannsen, U. und Bergmann, A. (1971).** Zum spontanen Auftreten der Bornaschen Krankheit (nicht-eitrige Meningo-Enzephalitis) bei Kaninchen. *Mh. Vet. Med.* **26**: 931.
- Joly, E. and Butcher, W. (1998).** Why are there two rat TAPs?. *Immunol. Today* **19**: 580.
- Jondal, M., Schirmbeck, R. and Reimann, J. (1996).** MHC class I-restricted CTL responses to exogenous antigens. *Immunity* **5**: 295.
- Kacza, J., Vahlenkamp, T. W., Enbergs, H., Richt, J. A., Germer, A., Kuhrt, H., Reichenbach A., Muller, H., Herden, C., Stahl, T. and Seeger, J. (2000).** Neuron-glia interactions in the rat retina infected by Borna disease virus. *Arch. Virol.* **145**: 127.
- Kao, M., Gosztonyi, G. and Ludwig, H. (1983).** Obesity syndrome in Borna disease virus infected rats. *Zbl. Bakt. Mikrobiol. Hygiene A* **225**: 173.
- Kao, M., Ludwig, H. and Gosztonyi, G. (1984).** Adaptation of Borna disease virus to the mouse. *J. Gen. Virol.* **65**: 1845.
- Kao., M., Hamir, A. N., Rupprecht, C. E., Fu, Z. F., Shankar, V., Koprowski, H. and Dietzschold B. (1993).** Detection of antibodies against Borna disease virus in sera and cerebrospinalfluid of horses in the U.S.A.. *Vet. Rec.* **132**: 241.
- Kast, W. M., Roux, L., Curren, J., Blom, H. J. J., Voordouw, A. C., Meloen, R. H., Kolakofsky, D. and Melief, C. J. M. (1991).** Protection against lethal Sendai virus infection by in vivo priming of virus-specific cytotoxic T lymphocytes with a free synthetic Peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**: 2283.

- Kast, W. M., Brandt, R. M. P. and Melief, C. J. M. (1993).** Strict peptide length is not required for the induction of cytotoxic T lymphocyte-mediated antiviral protection by peptide vaccination. *Eur. J. Immunol.* **23**: 1189.
- Kaufmann, D. L., Clare-Salzler, M., Tian, J., Forsthuber, T., Ting, G. S. P., Robinson, P., Atkinson, M. A., Sercarz, E. E., Tobin, A. J. and Lehmann, P. V. (1993).** Spontaneous loss of T-cell tolerance to glutamic acid decarboxylase in murine insulin-dependent diabetes. *Nature* **366**: 69.
- Kishi, M., Nakaya, T., Nakamura, Y., Zhong, Q., Ikeda, K., Senjo, M., Kakinuma, M., Kato, S. and Ikuta, K. (1995).** Demonstration of human Borna disease virus RNA in human peripheral blood mononuclear cells. *FEBS-Lett.* **364**: 293.
- Klavinskis, L. S., Whitton, J. L., Joly, E. and Oldstone, M. B. A. (1992).** Vaccination and protection from a lethal viral infection: identification, incorporation and use of a cytotoxic T lymphocyte glycoprotein epitope. *Virology* **178**: 333393.
- Kliche, S., Briese, T., Henschen, A. H., Stitz, L. and Lipkin, W. I. (1994).** Characterization of a Borna disease virus glycoprotein, gp18. *J. Virol* **68**: 6918.
- Kliche, S., Stitz, L., Mangalam, H., Shi, L., Binz, T., Niemann, H., Briese, T., and Lipkin, W. I. (1996).** Characterization of the Borna disease virus phosphoprotein, p23. *J. Virol.* **70**: 8133.
- Kohno, T., Goto, T., Takasaki, T., Morita, C., Nakaya, T., Ikuta, K., Kurane, I., Sano, K., and Nakai, M. (1999).** Fine structure and morphogenesis of Borna disease virus. *J. Virol.* **73**: 760.
- Krey, H. F., Ludwig, H., and Boschek, C. B. (1979a).** Multifocal retinopathy in Borna disease virus infected rabbits. *American Journal of Ophthalmology* **87**: 157.
- Krey, H. F., Ludwig, H. and Rott, R. (1979b).** Spread of infectious virus along the optic nerve into the retina in Borna disease virus-infected rabbits. *Arch. Virol.* **62**: 161.

- Kuebler, P. J. and Nixon, D. F. (1996).** Cytotoxic T cell induction with ratchet peptide libraries. *Vaccine* **14**: 1664.
- Kurrle, R. H., Wagner, H., Rollinghoff, M. and Rott, R. (1979).** Influenza virus-specific T cell-mediated cytotoxicity: integration of the virus antigen into the target cell membrane is essential for target cell formation. *Eur. J. Immunol.* **9**: 107.
- Kyburz, D., Aichele, P., Speiser, D. E., Hengartner, H., Zinkernagel, R. M. and Pircher, H. (1993).** T cell immunity after a viral infection versus T cell tolerance induced by soluble viral peptides. *Eur. J. Immunol.* **23**: 1956.
- Lanzavecchia, A. (1990).** Receptor-mediated antigen uptake and its effect on antigen presentation to class II-restricted T Lymphocytes. *Ann. Rev. Immunol.* **8**: 773.
- Lewis, A. J., Whitton, J. L., Hatalski, C. G., Weissenböck, H. and Lipkin, W. I. (1999).** Effect of immunpriming on Borna disease. *J. Virol.* **73**: 2541.
- Lipkin, W. I., Travis, G. H., Carbone, K. M. and Wilson, M. C. (1990).** Isolation and characterization of Borna disease agent cDNA clones. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **67**: 4184.
- Lubitz, W., Witte, A., Eko, F. O., Kamal, M., Jechlinger, W., Brand, E., Marchart, J., Haidinger, W., Huter, V., Felnerova, D., Stralis-Alves, N., Lechleitner, S., Melzer, H., Szostak, M. P., Resch, S., Mader, H., Kuen, B., Mayr, B., Mayrhofer, P., Geretschlager, R., Haslberger, A. and Hensel, A. (1999).** Extended recombinant bacterial ghost system. *J. Biotechnol.* **73**: 261.
- Ludwig, H., Becht, H. and Groh, L. (1973).** Borna disease (BD), a slow virus infection. Biological properties of the virus. *Med. Microbiol. Immunol.* **158**: 275.
- Ludwig, H., Bode, L. and Gosztonyi, G. (1988).** Borna disease: a persistent disease of the central nervous system. *Prog. Med. Virol.* **35**: 107.

- Lundgren, A. L. and Ludwig, H. (1993).** Clinically diseased cats with non-suppurative meningoencephalomyelitis have Borna disease virus-specific antibodies. *Acta Vet. Scand.* **34**: 101.
- Lundgren, A. L., Lindberg, R., Ludwig, H. and Gosztanyi, G. (1995a).** Immunoreactivity of the central nervous system in cats with a Borna disease-like meningoencephalomyelitis (staggering disease). *Acta Neuropathol.* **90**: 184.
- Lundgren, A. L., Zimmermann, W., Bode, L., Czech, G., Gosztanyi, G., Lindberg, R. and Ludwig, H. (1995b).** Staggering disease in cats: isolation and characterization of the feline Borna disease virus. *J. Gen. Virol.* **76**: 2215.
- Mackett, M., Smith, G. L. and Moss, B. (1984).** General method for producing and selection of infectious vaccinia virus recombinants expressing foreign genes. *J. Virol.* **49**: 857.
- Malik, T. H., Kobayashi, T., Ghosh, M., Kishi, M. and Lai, P. K. (1999).** Nuclear localization of the protein from the open reading frame X1 of Borna disease virus was through interactions with the viral Nukleoprotein. *Virology* **258**: 65.
- Malik, T. H., Kishi, M. and Lai, P. K. (2000).** Characterization of the P protein-binding domain on the 10-kilodalton protein of the Borna disease virus. *J. Virol.* **74**: 3413
- Malkinson, M., Weisman, Y., Ashash, E., Bode, L. and Ludwig, H. (1993).** Borna disease in ostriches. *Vet. Rec.* **133**: 304.
- Malkinson, M., Weisman, Y., Perl, S. and Ashash, E. (1995).** A Borna-like disease in ostriches in Israel. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **190**: 31.
- Matthias, D. (1954).** Der Nachweis von latent infizierten Pferden, Schafen und Rindern und deren Bedeutung als Virusreservoir bei der Bornaschen Krankheit. *Arch. Exp. Vet. Med.* **8**: 506.
- Mayo, M. A. and Pringle, C. R. (1998).** Virus taxonomy 1997. *J. Gen. Virol.* **79**: 649.

- Metzler, A., Frei, U. and Danner, K. (1976).** Virologisch gesicherter Ausbruch der Bornaschen Krankheit in einer Schafherde der Schweiz. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* **118**: 483.
- Metzler, A., Minder, H. P., Wegmann, C. and Zindel, W. (1979).** Die Bornasche Krankheit, ein veterinärmedizinisches Problem von regionaler Bedeutung. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* **121**: 207.
- Metzler, B and Wraith, D. C. (1993).** Inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis by inhalation but not oral administration of the encephalitogenic peptide: influence of MHC binding affinity. *Int Immunol.* **5**: 1159.
- Mitchinson, N. A. (1964).** Induction of immunological paralysis in two zones of dosage. *Roy. Soc. Proc.* **161**: 275.
- Mullis, K. B. and Faloona, F. A. (1987).** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymology* **155**: 335.
- Morales, J. A., Herzog, S., Kompter, C., Frese, K. and Rott, R. (1988).** Axonal transport of Borna disease virus along olfactory pathways in spontaneously and experimentally infected rats. *Med. Microbiol. Immunol.* **177**: 51.
- Moskophidis, D and Lehmann-Grube, F. (1989).** Virus-induced delayed type hypersensitivity reaction is sequentially mediated by CD8+ and CD4+ T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 3291.
- Moskophidis, D., Fang, L., Gossmann, J., Drjupin, R., Löhler, J., Bruns, M. and Lehmann-Grube, F. (1990).** Virus-specific delayed-type hypersensitivity (DTH): cells mediating lymphocytic choriomeningitis virus-specific DTH reaction in mice. *J. Immunol.* **144**: 1926.
- Nakamura, Y., Kishi, M., Nakaya, T., Asahi, S., Tanaka, H., Sentsui, H., Ikeda, K. and Ikuta, K. (1995).** Demonstration of Borna disease virus RNA in peripheral blood mononuclear cells from healthy horses in Japan. *Vaccine* **13**: 1076.

- Nakamura, Y., Nakaya, T., Hagiwara, K., Momiyana, N., Kagawa, Y., Taniyama, H., Ishihara, C., Sata, T., Kurata, T. and Ikuta, K. (1999).** High susceptibility of Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) to Borna disease virus. *Vaccine* **17**: 480.
- Nakamura, Y., Takahashi, H., Shoya, Y., Nakaya, T., Watanabe, M., Tomonaga, M., Iwahashi, K., Ameno, K., Momiyama, N., Taniyama, H., Sata, T., Kurata, T., de la Torre, J. C. and Ikuta, K. (2000).** Isolation of Borna disease virus from human tissue. *J. Virol.* **74**: 4601.
- Narayan, O., Herzog, S., Frese, K., Scheefers, H. and Rott, R. (1983a).** Behavioural disease in rats caused by immunopathological response to persistent Borna virus in the brain. *Science* **220**: 1401.
- Narayan, O., Herzog, S., Frese, K., Scheefers, H. and Rott, R. (1983b).** Pathogenesis of Borna disease in rats: immune-mediated viral ophthalmoencephalopathy causing blindness and behavioural abnormalities. *J. Infect. Disease* **148**: 305.
- Nitzschke, E. (1963).** Untersuchungen über die experimentelle Bornavirus-Infektion bei der Ratte. *Zbl. Vet. Med. B* **10**: 470.
- Nöske, K., Bilzer, T., Planz, O. and Stitz, L. (1998).** Virus-specific CD4⁺ T cells eliminate Borna disease virus from the brain via induction of cytotoxic CD8⁺ T cells. *J. Virol.* **72**: 4387.
- Nowotny, N. and Weissenböck, H. (1995).** Description of feline nonsuppurative meningoencephalomyelitis („staggering disease“) and studies of its etiology. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 1668.
- Nowotny, N., Kolodziejek, J., Jehle, C. O., Suchy, A., Staehli, P. and Schwemmle, M. (2000).** Isolation and characterization of a new subtype of Borna disease virus. *J. Virol.* **74**: 5655.
- Oehen, S., Hengartner, H. and Zinkernagel, R. M. (1991).** Vaccination for disease. *Science* **251**: 195.
- Oldstone, M. B. A., Whitton, J. L., Lewicki, H. and Tishon, A. (1988).** Fine dissection of a nine amino acid glycoprotein epitope, a major determinant recognized by lymphocytic choriomeningitis virus class I restricted H-2D^b cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **168**: 559.

- Otta, J. and Jentsch, K.-D. (1960).** Spontane Infektion mit dem Virus der Bornaschen Krankheit bei Kaninchen. *Mh. Vet. Med.* **15**: 127.
- Partidos, C. D., Vohra, P. and Steward, M. W. (1996a).** Induction of measles virus-specific cytotoxic T-cell responses after intranasal immunization with synthetic peptides. *Immunology* **87**: 179.
- Partidos, C. D., Vohra, P. and Steward, M. W. (1996b).** Priming of a measles virus-specific CTL responses after immunisation with afusogenic CTL epitope linked to a fusogenic peptide. *Virology* **215**: 107.
- Planz, O. (1993).** Bedeutung von CD8⁺ T-Zellen für die Immunpathogenese der Bornaschen Krankheit. *Rer. Nat. Diss., Gießen.*
- Planz, O., Bilzer, T., Sobbe, M. and Stitz, L. (1993).** Lysis of major histocompatibility complex class I-bearing cells in Borna disease virus-induced degenerative encephalopathy. *J. Exp. Med.* **178**: 163.
- Planz, O., Bilzer, T. and Stitz, L. (1995).** Immunpathogenic role of T-cell subsets in Borna disease virus-induced progressive encephalitis. *J. Virol.* **69**: 896
- Planz, O., Rentzsch, C., Batra, A., Rziha, H. J. and Stitz, L. (1998).** Persistence of Borna disease virus-specific nucleic acid in blood of psychiatric patient. *Lancet* **352**: 9128.
- Planz, O., Rentzsch, C., Batra, A., Batra, A., Winkler, T., Büttner, M., Rziha, H. J. and Stitz, L. (1999).** Pathogenesis of Borna disease virus: Granulocyte fractions of psychiatric patients harbor infectious virus in the absence of antiviral antibodies. *J. Virol.* **73**: 6251.
- Planz, O. and Stitz, L. (1999).** Borna disease virus Nukleoprotein (p40) is a major target for CD8⁺ T cell mediated immune response. *J. Virol.* **73**: 1715.
- Planz, O., Dumrese, T., Hülppusch, S., Schirle, M., Stevanovic, S. and Stitz, L. (2001).** A naturally processed rat major histocompatibility complex class I-associated viral peptide as target structure of Borna disease virus-specific CD8⁺ T cells. *J. Biol. Chem.* **276**: 13689.

- Plata-Salaman, C. R., Ilyn, S. E., Gayle, D., Romanovitch, A. and Carbone, K. M. (1999).** Persistent Borna disease virus infection of neonatal rats causes brain regional changes of mRNA for cytokines, cytokine receptor components and neuropeptides. *Brain Res. Bull.* **49**: 441.
- Powis, S. J., Young, L. L., Barker, P. J., Richardson, L., Howard, J. C. and Butcher, G. W. (1993).** Major histocompatibility complex-encoded ABC transporters and rat class I peptide. *Transplant. Proc.* **25**: 2752.
- Powis, S. J., Young, L. L., Joly, E., Barker, P. J., Richardson, L., Brandt, R. P., Melief, C. J., Howard, J. C. and Butcher, G. W. (1996).** The rat cim effect: TAP allele-dependent changes in a class I MHC anchor motif and evidence against C-terminal trimming of peptides in the ER. *Immunity* **4**: 159.
- Pyper, J. M., Clements, J. E. and Zink, M. C. (1998).** The Nukleolus is the site of Borna disease virus RNA transcription and replication. *J. Virol.* **72**: 9.
- Rammensee, H. G., Falk, K., Rötzschke, O. (1993).** MHC molecules as peptide receptors. *Curr. Opin. Immunol.* **5**: 35.
- Rammensee, H. G., Bachmann, J., Emmerich, N. P., Bachor, O. A. and Stefanovic, S. (1999).** SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* **50**: 213.
- Reis e Sousa, C. and Germain, R. N. (1995).** Major histocompatibility complex class I presentation of peptides derived from soluble exogenous antigen by a subset of cells engaged in phagocytosis. *J. Exp. Med.* **182**: 841.
- Reits E. A. J., Vos, J. C., Gromme, M. and Neefjes, J. (2000).** The major substrates for TAP in vivo are derived from newly synthesized proteins. *Nature* **404**: 774.
- Reizis, B., Schild, H., Stefanovic, S., Mor, F., Rammensee, H. G. and Cohen, I. R. (1997).** Peptide binding motifs of the MHC class I molecules (RT1.A1) of the Lewis rat. *Immunogenetics* **45**: 278.

- Richt, J. A., Stitz, L., Wekerle, H. and Rott, R. (1989).** Borna disease, a progressive meningoencephalomyelitis as a model for CD4⁺ T cell-mediated immunopathology in the brain. *J. Exp. Med.* **170**: 1045.
- Richt, J. A., Stitz, L., Deschl, U., Frese, K. and Rott, R. (1990).** Borna disease virus-induced encephalomyelitis caused by a virus-specific CD4⁺ T cell mediated immune reaction. *J. Gen. Virol.* **71**: 2565.
- Richt, J. A., Schmeel, A., Frese, K., Carbone, K. M., Narayan, O. and Rott, R. (1994).** Borna disease virus-specific T cells protect against or cause immunopathological Borna disease. *J. Exp. Med.* **179**: 1467.
- Richt, J. A., Fürbringer, T., Koch, A., Pfeuffer, I., Herden, C., Bause-Niedrig, I. and Garten, W. (1998).** Processing of the Borna disease virus glycoprotein gp94 by the subtilisin-like endoprotease furin. *J. Virol.* **72**: 4528.
- Rock, K. L., Gramm, C., Rothstein, L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D. and Goldberg, A. L. (1994).** Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* **78**: 761.
- Rötzschke, O., Falk, K., Deres, K., Schild, H., Norda, M., Metzger, J., Jung, G. and Rammensee, H. G. (1990).** Isolation and analysis of naturally processed viral peptides as recognized by cytotoxic T cells. *Nature* **348**: 252
- Rott, R., Herzog, S., Fleischer, B., Winokur, A., Amsterdam, J., Dyson, W. and Koprowski, H. (1985).** Detection of serum antibodies to Borna disease virus in patients with psychiatric disorders. *Science* **10**: 755.
- Rott, R. and Becht, H. (1995).** Natural and experimental Borna disease in animals. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **190**: 17.
- Rubin, S. A., Waltrip II, R. W., Bautista, J. R. and Carbone, K. M. (1993).** Borna disease virus in mice: host-specific differences in disease expression. *J. Virol.* **67**: 548.

- Sauder, C., Müller, A., Cubitt, B., Maer, J., Steinmetz, J., Trabert, W., Ziegler, B., Wanker, K., Müller-Lantzsch, N., de la Torre, J. C. and Grässer, F. (1996).** Detection of Borna disease virus (BDV) antibodies and BDV RNA in psychiatric patients: evidence for high sequence conservation of human blood-derived BDV RNA. *J. Virol.* **70**: 7713.
- Sastry, K. J., Nehete, P. N., Venkatnarayanan, S., Morkowski, J., Platsoucas, C. D. and Arlinghaus, R. B. (1992).** Rapid in vivo induction of HIV-specific CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes by a 15-amino acid unmodified free peptide from the immunodominant V3-loop of GP 120. *Virology* **188**: 502.
- Sastry, K. J., Bender, B. S., Bell, W., Small Jr, P. A. and Arlinghaus, R. B. (1994).** Effects of influenza virus-specific cytotoxic T-lymphocyte responses induced by a synthetic Nukleoprotein peptide on the survival of mice challenged with a lethal dose of virus. *Vaccine* **12**: 1281
- Schirmbeck, R. and Reimann, J. (1994).** Targeting of exogenous protein antigens to a novel endosomal processing pathway for class I-restricted presentation. *Behring Inst. Mitt.* **95**: 14.
- Schneemann, A., Schneider, P. A., Kim, S. and Lipkin, W. I. (1994).** Identification of signal sequences that control transcription of Borna disease virus, a nonsegmented, negative-strand RNA virus. *J. Virol.* **68**: 6514.
- Schneemann, A., Schneider, P. A., Lamb, R. A. and Lipkin, W. I. (1995).** The remarkable coding strategy of Borna disease virus: a new member of the nonsegmented negative-strand RNA viruses. *Virology* **210**: 1.
- Schneider P. A., Schneemann, A., and Lipkin, W. I. (1994).** RNA splicing in Borna disease virus, a nonsegmented, negative-strand RNA virus. *J. Virol.* **68**: 5007.
- Schneider, P. A., Hatalski, C. G., Lewis, A. J. and Lipkin, W. I. (1997).** Biochemical and functional analysis of the Borna disease virus G protein. *J. Virol.* **71**: 331.

- Schulz, M., Aichele, P., Wollenweider, M., Bobe, F. W., Cardinaux, F., Hengartner, H. and Zinkernagel, R. M. (1989).** Major Histocompatibility Complex-dependent T cell epitopes of lymphocytic choriomeningitis virus Nukleoprotein and their protective capacity against viral disease. *Eur. J. Immunol.* **19**: 1657.
- Schulz, M., Zinkernagel, R. M. and Hengartner, H. (1991).** Peptide-induced antiviral protection by cytotoxic T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 991.
- Schwemmle, M., De, B., Shi, L., Banerjee, A. and Lipkin, W. I. (1997).** Borna disease virus P-protein is phosphorylated by protein kinase C ϵ and casein kinase II. *J. Biol. Chem.* **272**: 21818.
- Schwemmle, M., Salvatore, M., Shi, L., Richt, J. A., Lee, C. H. and Lipkin, W. I. (1998).** Interactions of the Borna disease virus P, N, and X proteins and their functional implications. *J. Biol. Chem.* **273**: 9007.
- Shankar, V., Kao, M., Hamir, A. N., Sheng, H., Koprowski, H. and Dietzschold, B. (1992).** Kinetics of virus spread and changes in levels of several cytokine mRNAs in the brain after intranasal infection of rats with Borna disease virus. *J. Virol.* **66**: 992.
- Shepherd, J. C., Schumacher, T. N., Ashton-Rickardt, P. G., Imeda, S., Ploegh, H. L., Janeway, C. A. jr. and Tonegawa, S. (1993).** TAP1-dependant peptide translocation in vitro is ATP dependant and peptide selective. *Cell* **74**: 577.
- Sierra-Honigsmann, A. M., Rubin, S. A., Estafanous, M. G., Yolken, R. H. and Carbone, K. M. (1993).** Borna disease virus in peripheral blood mononuclear and bone marrow cells of neonatally and chronically infected rats. *J. Neuroimmunol.* **45**: 31.
- Sobbe, M., Bilzer, T., Gommel, S., Nöske, K., Planz, O. and Stitz, L. (1997).** Induction of degenerative brain lesions after adoptive transfer of brain lymphocytes from Borna disease virus-infected rats: presence of CD8⁺ T cells and perforin mRNA. *J. Virol.* **71**: 2400.
- Solbrig, M. V., Koob, G. F., Joyce, J. N. and Lipkin, W. I. (1996).** A neural substrate of hyperactivity in Borna disease: changes in dopamine receptors. *Virology* **222**: 332.

- Spies, T., Cerundolo, V., Colonna, M., Cresswell, P., Townsend, A. and DeMars, R. (1992).** Presentation of viral antigen by MHC class I molecules is dependent on a putative peptide transporter heterodimer. *Nature* **355**: 644.
- Sprankel, H., Richarz, K., Ludwig, H. and Rott, R. (1978).** Behaviour alterations in tree shrews (*Tupaia glis*) induced by Borna disease virus. *Med. Microbiol. Immunol.* **165**: 1.
- Stevens, J., Wiesmuller, K. H., Walden, P. and Joly, E. (1998).** Peptide length preferences for rat and mouse MHC class I molecules using random peptide libraries. *Eur. J. Immunol.* **28**: 1272
- Stitz, L., Krey, H. and Ludwig, H. (1980).** Borna disease in rhesus monkeys as a model for uveo-cerebral symptoms. *J. Med. Virol.* **6**: 333.
- Stitz, L., Soeder, D., Deschl, U., Frese, K. and Rott, R. (1989).** Inhibition of immune-mediated meningoencephalitis in persistently Borna disease virus-infected rats by cyclosporine A. *J. Immunol.* **143**: 4250.
- Stitz, L., Schilken, D., Frese, K. and Rott, R. (1991a).** Atypical dissemination of the highly neurotropic Borna disease virus during persistent infection of cyclosporin-A-treated, immunosuppressed rats. *J. Virol.* **65**: 457.
- Stitz, L., Planz, O., Bilzer, T., Frey, K. and Fontana, A. (1991b).** Transforming growth factor-beta modulates T cells mediated encephalitis caused by Borna disease virus: Pathogenic importance of CD8⁺ cells and suppression of antibody formation. *J. Immunol.* **147**: 2581.
- Stitz, L., Sobbe, M., and Bilzer, T. (1992).** Preventive effects of early anti-CD4 or anti-CD8 treatment on Borna disease in rats. *J. Virol.* **66**: 3316.
- Stitz, L., Bilzer, T., Richt, J. A. and Rott, R. (1993).** Pathogenesis of Borna disease. *Arch. Virol.* **7**: 135
- Stitz, L., Dietzschold, B. and Carbone, K. M. (1995).** Immunopathogenesis of Borna disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **190**: 75.

- Stitz, L., Nöske, K., Planz, O., Furrer, E., Lipkin, W. I. and Bilzer, T. (1998).** A functional role for neutralizing antibodies in Borna disease: influence on virus tropism outside the central nervous system. *J. Virol.* **72**: 8884.
- Stoyloff, R., Strecker, A., Bode, L., Franke, P., Ludwig, H. and Hucho, F. (1997).** The glycosylated matrix protein of Borna disease virus is a tetrameric, membrane-bound viral component essential for infection. *Eur. J. Biochem.* **246**: 252.
- Stoyloff, R., Bode, L., Borchers, K. and Ludwig, H. (1998).** Neutralization of Borna disease virus depends upon terminal carbohydrate residues (α -D-Man, β -D-GlcNAc) of glycoproteins gp17 and gp94. *Intervirology* **41**: 135.
- Sykulev, Y. M., Joo, M., Vturina, T. J., Tsomides, T. J. and Eisen, H. N. (1996).** Evidence that a single peptide-MHC complex on a target cell can elicit a cytotoxic T cell response. *Immunity* **4**: 565.
- Szostak, M. P., Mader, H., Truppe, M., Kamal, M., Eko, F. O., Huter, V., Marchart, J., Jechlinger, W., Haidinger, W., Brand, E., Denner, E., Resch, S., Dehlin, E., Katinger, A., Kuen, B., Haslbeger, A., Hensel, A. and Lubitz, W. (1997).** Bacterial ghosts as multifunctional vaccine particles. *Behring Inst. Mitt.* **98**: 191.
- Thiedemann, N., Preske, P., Rott, R. and Stitz, L. (1992).** Antigenic relationship and further characterization of two major Borna disease virus-specific proteins. *J. Gen. Virol.* **73**: 1057.
- Thierer, J., Riehle, H., Grebenstein, O., Binz, T., Herzog, S., Thiedemann, N., Stitz, L., Rott, R., Lottspeich, F. and Niemann, H. (1992).** The 24K protein of Borna disease virus. *J. Gen. Virol.* **73**: 413.
- Tisch, R., Yang, X. D., Sinfer, S. M., Liblau, R. S., Fugger, L. and McDevitt, H. O. (1993).** Immune response to glutamic acid decarboxylase correlates with insulinitis in non-obese diabetic mice. *Nature* **366**: 72.
- Townsend, A. R. M., Gotch, F. M. and Davery, J. (1985).** Cytotoxic T cells recognize fragments of the influenza Nukleoprotein. *Cell* **42**: 457.

Townsend, A. R. M. , Bastin, J., Gould, K. and Brownlee, G. G. (1986). Cytotoxic T lymphocytes recognize influenza haemagglutinin that lacks a signal sequence. *Nature* **324**: 575

Trichtern, V. (1716). Pferd-Anatomie, oder Neu auserlesen vollkommen verbessert und ergänztes Roß Arzney Buch. *In* Verlegung des Autors. Gedruckt zu finden in Frankfurt und Leipzig bey A. J. Felßenecker 192-203.

Van der Most, R. G., Sette, A., Oseroff, C., Alexander, J., Murali-Krishna, K., Lau, L. L., Southwood, S., Sidney, J., Chestnut, R. W., Matloubian, M. and Ahmed, R. (1996). Analysis of cytotoxic T cell responses to dominant and subdominant epitopes during acute lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J. Immunol.* **157**: 5543.

Van der Most, R. G., Murali-Krishna, K., Whitton, J. L., Oseroff, C., Alexander, J., Southwood, S., Sidney, J., Chestnut, R. W., Sette, A. and Ahmed, R. (1998). Identification of D^b and K^b-restricted subdominant cytotoxic T-cell responses in lymphocytic choriomeningitis virus-infected mice. *Virology* **240**: 158.

Vande Woude, S., Richt, J. A., Zinz, M. C., Rott, R., Narayan, O. and Clements, J. E. (1990). A Borna disease virus cDNA encoding a protein recognized by antibodies in humans with behavioural diseases. *Science* **250**: 1278.

Vasiliakos, J. P. and Michael, J. G. (1993). Herpes Simplex Virus class I-restricted peptide induces cytotoxic T lymphocytes in vivo independent of CD4⁺ T cells. *J. Immunol.* **150**: 2346.

Veith, J. H. (1822). *In Handbuch der Veterinär Kunde in besonderer Beziehung auf die Seuchen der nutzbarsten Haussäugethiere für Physiker, Kreis Chirurgen, Thierärzte und Oekonomen.* Verlag der Geistinger'schen Buchhandlung auf dem Kohlmarkte, Vienna 394-396.

Vinitsky, A., Anton, L. C., Snyder, H. L., Orlowski, M., Bennink, J. R. and Yewdell, J. W. (1997). The generation of MHC class I-associated peptides is only partially inhibited by proteasome inhibitors: involvement of nonproteasomal cytosolic proteases in antigen processing? *J. Immunol.* **159**: 554.

- Walker, M. P., Jordan, I., Briese, T., Fischer, N. and Lipkin, W. I. (2000).** Expression and characterization of the Borna disease virus polymerase. *J. Virol.* **74**: 4425
- Walther, F. (1899).** Gehirn-Rückenmarksentzündung bei Pferden und Schafen in der Amtshauptmannschaft Borna. In *Mitteilungen aus den Berichten der Bezirksthierärzte auf das Jahr 1899.* *Ber. Veterinärwesen Königr. Sachsen* **44**: 80.
- Wehner, T., Ruppert, A., Herden, C., Frese, K., Becht, H. and Rott, R. (1997).** Detection of a novel Borna disease virus encoded 10 kDa protein in infected cells and tissues. *J. Gen. Virol.* **78**: 2459.
- Weissenböck, H., Suchy, A., Caplazi, P., Herzog, S. and Nowotny, N. (1998a).** Borna disease in Austrian horses. *Vet. Rec.* **143**: 1.
- Weissenböck, H., Nowotny, N., Caplazi, P., Kolodziejek, J. and Ehrensperger, F. (1998b).** Borna disease in a dog with lethal meningoencephalitis. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 7.
- Winkler (1883).** Über die Ursachen der subakuten Gehirnentzündung. *Arch. Wiss. Prakt. Tierhk.* **9**: 419
- Wolff, T., Pfleger R., Wehner T., Reinhardt J. and Richt J. A. (2000).** A short leucine-rich sequence in the Borna disease virus p10 mediates association with the viral phospho- and Nukleoprotein. *J. Gen. Virol.* **81**: 939
- Zhou, X., Berg, L., Abdel Motal, U. M. and Jondal, M. (1992).** In vivo primary induction of virus-specific CTL by immunisation with 9-mer synthetic peptides. *J. Immunol. Methods* **153**: 193.
- Zinkernagel, R. M. and Doherty, P. C. (1974).** Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngenic or semiallogenic system. *Nature* **248**: 701
- Zinkernagel, R. M., Althage, A. and Jensen, F. C. (1977).** Cell-mediated immune response to lymphocytic choriomeningitis and vaccinia virus in rats. *J. Immunol.* **119**: 1242

- Zimmermann, W., Breter, H., Rudolph, M. and Ludwig, H. (1994).**
Borna disease virus: Immunoelectron microscopic characterization of cell-free virus and further information about the genome.
J. Virol. **68**: 6755.
- Zwick, W. und Seifried, O. (1925).** Übertragbarkeit der seuchenhaften Gehirn-Rückenmarksentzündung des Pferdes (Bornasche Krankheit) auf kleine Versuchstiere (Kaninchen).
Berliner tierärztl. W.schr. **41**: 129.
- Zwick, W., Seifried, O. and Witte, J. (1927).** Experimentelle Untersuchungen über die seuchenhafte Gehirn-Rückenmarksentzündung des Pferdes (Bornasche Krankheit).
Zschr. Infekt. Krkh. Haustiere, Berlin **32**: 150.
- Zwick, W. (1939).** Bornasche Krankheit und Enzephalomyelitis der Tiere.
In: *Handbuch der Viruskrankheiten* (Herausgeber: F. Gildemeister, E. Haagen, O. Waldmann). G. Fischer Verlag, Jena **2**: 254.

Danksagung

Zum Abschluss möchte ich mich bei allen bedanken, die mir beim Erstellen dieser Arbeit geholfen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. L. Stitz für die Möglichkeit, meine Dissertation im Institut für Immunologie der BFAV Tübingen durchzuführen, sowie für die wissenschaftliche Betreuung bei der Durchführung der Versuche und der Abfassung dieser Arbeit.

Ebenfalls möchte ich ganz besonders Herrn Dr. O. Planz für die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes, des Themas dieser Arbeit, die Unterstützung und wissenschaftliche Betreuung der Versuche und die Unterstützung bei der Erstellung der Arbeit danken.

Prof. Dr. H.-G. Rammensee, Dr. S. Stevanovic, Dr. M. Schirle (Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie, der Universität Tübingen) und Dr. T. Dumrese (Universitätsspital Zürich, Abteilung Pathologie, Institut für experimentelle Immunologie) möchte ich danken, da erst durch die Zusammenarbeit Teile der Arbeit ermöglicht wurden. Insbesondere möchte ich Dr. S. Stevanovic für die Durchführung der Peptidvorhersagen danken, Dr. T. Dumrese für die Durchführung der HPLC-Auftrennungen und Dr. M. Schirle für die massenspektrometrischen Untersuchungen.

Prof. Dr. T. Bilzer möchte ich für die Durchführung und Beurteilung der histologischen Untersuchungen danken.

Dr. Arvind Batra, Dr. Esther Furrer, Marita Lohmann und Dr. Alfons Weilbach danke ich für die gute Zusammenarbeit und die jederzeit gewährte fachliche Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Erdmute Diehl, die mich beim Erstellen dieser Arbeit geduldig unterstützt hat.

Bei Silke Gommel, Katja Österle und Mandy Lauckner möchte ich mich besonders für die immer gute Atmosphäre im Labor bedanken.

Mein Dank gilt ferner allen Mitarbeitern der BFAV Tübingen für die freundliche Aufnahme und Unterstützung.