

6. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zu zellulären Abwehrmechanismen der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) während einer Infektion mit dem wirtschaftlich bedeutsamen Virus der Viralen Hämorrhagischen Septikämie (VHSV) durchgeführt. Unter Verwendung eines *in vitro*-Testsystems zur Erfassung der zellvermittelten Zytotoxizität wurde festgestellt, dass Forellen ab dem 10. Tag nach Infektion antivirale zytotoxische Abwehrzellen generieren. Anfangs lysierten diese zytotoxischen Leukozyten ausschließlich virusinfizierte Targetzellen mit identischem MHC-Klasse-I und erst später nach Zweitinfektion MHC-Klasse-I-inkompatible Zellen. Ein mit dem Anstieg des Zytotoxizitätsvermögens einhergehender Anstieg der CD8 α -mRNA-Expression im Verlauf der Infektion deutet auf die Beteiligung spezifischer zytotoxischer Zellen bei der antiviralen Abwehr hin. Eine erneute Infektion bereits infizierter Forellen mit homologem Virus führte bei erhöhter CD8 α -mRNA-Expression zu einer gesteigerten zellvermittelten Zytotoxizität. Das deutet darauf hin, dass Forellen, ähnlich wie höhere Vertebraten, über spezifische zytotoxische T-Zellen sowie über ein immunologisches Gedächtnis verfügen.

Im Unterschied zu Säugern konnte eine zytotoxische Aktivität gegen MHC-Klasse-I-inkompatible Targetzellen und damit eine Beteiligung von NK-ähnlichen Zellen zeitlich erst nach der T-Zell-ähnlichen Zytotoxizität gemessen werden, wobei ein Anstieg der mRNA-Expression des indirekten NK-Zellmarkers NKEF durch die Effektorzellen bereits zu einem früheren Zeitpunkt erfolgte. NKEF wird bei Säugern von hämatopoetischen Zellen gebildet. Deshalb ist die erhöhte Expression von NKEF als Folge einer kompensatorischen Reaktion bei der hämorrhagischen Erkrankung VHS zu werten. Zum Zeitpunkt der NK-ähnlichen Aktivität hatte das Niveau VHSV-spezifischer Antikörper ein Maximum erreicht, weshalb die Bewaffnung von NK-ähnlichen Zellen mit Antikörpern denkbar ist, die ihrerseits natives VHSV-Protein auf infizierten Targetzellen erkannt und letztere lysiert haben könnten.

Gegenstand dieser Arbeit war es ferner, den Einfluss des Glyko(G)- beziehungsweise Nukleo(N)-proteins des VHSV auf das zelluläre Abwehrsystem der Forelle zu untersuchen. Dazu wurde die DNA-Immunsierungstechnologie eingesetzt. Nach Applikation von VHSV-Protein-kodierenden Plasmid-DNAs konnte als Voraussetzung für eine erfolgreiche Antigenpräsentation am Applikationsort die Expression viraler

Proteine in den Forellenmuskelzellen gezeigt werden. Ebenso generierten Forellen nach Immunisierung antivirale zytotoxische Zellen gegen beide Proteine. Das Glykoprotein, welches nach der Virusreplikation auf der Virushülle und auch auf der Membran infizierter Wirtszellen exprimiert wird, regte die Bildung von virusspezifischen CTL-ähnlichen, aber auch NK-ähnlichen zytotoxischen Effektorzellen an, da zytotoxische Zellen aus DNA-immunisierten Forellen sowohl infizierte MHC-Klasse-I-identische als auch Zellen mit einem anderen MHC-Klasse-I lysierten. Das Nukleoprotein dagegen bewirkte lediglich die Bildung CTL-ähnlicher Zellen, da ausschließlich MHC-Klasse-I-kompatible Zellen lysiert wurden. Diese Aktivität erreichte nur in den Sommermonaten ein signifikantes Niveau. Solche, bei poikilothermen Vertebraten zu erwartenden saisonbedingten Schwankungen im Niveau und in der Qualität antiviraler zellvermittelter Zytotoxizität, sind bei Fischen bisher nicht beschrieben worden. Diese Unterschiede sind umso bemerkenswerter, als dass die Forellen ganzjährig einem konstanten Temperatur- und Lichtregime ausgesetzt waren.

Die Kombination eines Testsystems für zellvermittelte Zytotoxizität mit Untersuchungen zur mRNA-Expression, zum Antikörperstatus und zur Expression von Leukozyten-Oberflächenmarkern lassen bei paralleler Analyse bereits veröffentlichter Daten wichtige Schlussfolgerungen zum allgemeinen Verständnis der Immunreaktionen bei Fischen zu. Es sind Parallelen aber auch Unterschiede (verspätete NK-zellähnliche Aktivität, Saisonabhängigkeit) zum Immunsystem höherer Vertebraten feststellbar. Ferner leisten diese Ergebnisse einen Beitrag zum Verständnis der Pathogenese der VHS und geben Anhaltspunkte für Vakzinationsstrategien insbesondere von DNA-Vakzinen.