
INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	3
2.1 Die Immunantwort bei Vertebraten - allgemeine Klassifizierung	3
2.2 Zellvermittelte Zytotoxizität (cell-mediated cytotoxicity, CMC)	5
2.2.1 Angeborene Zytotoxizitätsmechanismen	5
2.2.2 Adaptive Zytotoxizitätsmechanismen	7
2.3 Die Virale Hämorrhagische Septikämie (VHS)	12
2.3.1 Ätiologie	12
2.3.2 Epidemiologie, Pathogenese und Klinik	14
2.3.3 Prophylaxe und Bekämpfung	15
2.3.3.1 Allgemeine Übersichten	15
2.3.3.2 DNA-Immunisierung	16
3. Material und Methoden	19
3.1 Material	19
3.1.1 Versuchstiere	19
3.1.2 Zellen	19
3.1.3 Virus	20
3.1.4 Bakterien, Plasmide	20
3.1.5 Antikörper	20
3.1.6 Enzyme, Kits	21
3.1.7 Chemikalien, Reagenzien	21
3.1.8 Lösungen, Puffer	23
3.1.8.1 Lösungen	23
3.1.8.2 Puffer	26
3.1.8.3 Medien	28
3.1.9 Geräte	29
3.1.10 Verbrauchsmaterialien	30

3.2 Methoden	31
3.2.1 Zellkultur und Virusanzucht	31
3.2.1.1 Kultivierung von Fischzellen	31
3.2.1.2 Vermehrung VHSV	31
3.2.1.3 Virustitration	32
3.2.2 Plasmid-DNA: pRc/CMV, pRc/CMV-VG, pRc/CMV-VN	32
3.2.2.1 Vermehrung der Plasmid-DNA	33
3.2.2.1.1 Herstellung transformationskompetenter <i>Escherischia coli</i> (<i>E. coli</i>) Bakterien	33
3.2.2.1.2 Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> Bakterien mit Plasmid-DNA	33
3.2.2.1.3 Plasmid-DNA-Präparation in großem Maßstab (Maxi-Präparation)	34
3.2.2.2 Überprüfungen der Plasmid-DNA	35
3.2.2.2.1 Restriktionsenzymanalyse	35
3.2.2.2.2 Transfektion von Fischzellen	35
3.2.3 Manipulationen am Tier	36
3.2.3.1 Immunisierung der Forellen mit Plasmid-DNA	36
3.2.3.2 Nachweis der Proteinexpression am Applikationsort	37
3.2.3.3 Infektion der Forellen, Probennahme	38
3.2.4 Zytotoxizitätsassay	38
3.2.4.1 Präparation der Targetzellen	39
3.2.4.2 Ermittlung der für die Targetzellinfektion nötigen Virusmenge (Immunfluoreszenz)	39
3.2.4.3 Präparation von PBL (Effektorzellen)	40
3.2.4.4 PBL-Zellzahlbestimmung	40
3.2.4.5 Zeitlicher Ablauf des Zytotoxizitätstests	41
3.2.4.6 Berechnung der prozentualen Zytotoxizität	42
3.2.5. Serologie	44
3.2.5.1 ELISA	44
3.2.5.1.1 Antigenherstellung (Virusisolierung und -aufreinigung)	44
3.2.5.1.2 ELISA-Durchführung	45
3.2.5.2 Plaque-Neutralisationstest (PNT)	46
3.2.6 Untersuchung von mRNA-Expression	47

3.2.6.1 RNA-Extraktion	47
3.2.6.2 Quantitative RT-PCR	47
3.2.6.2.1 Primer, Sonden	48
3.2.6.2.2 Durchführung, Berechnung	49
3.2.7 Durchflusszytometrie (Facs-Analyse)	51
3.2.8 Statistik	51
4. Ergebnisse	52
4.1 VHSV - Infektion	52
4.1.1 Klinik	52
4.1.2 Untersuchungen zur zellulären Immunantwort	52
4.1.2.1 PBL-Kapazität	52
4.1.2.2 Durchflusszytometrie	53
4.1.2.3 Zellvermittelte Zytotoxizität nach VHSV-Infektion	56
4.1.2.3.1 Entwicklung und Etablierung der Testparameter des CMC- LDH-Assays	56
4.1.2.3.1.1 Targetzellzahl	56
4.1.2.3.1.2 Virusinkubationszeit	57
4.1.2.3.1.3 Virusdosis	58
4.1.2.3.1.4 Abhängigkeit des zytotoxischen Effektes von der Effektorzellzahl	59
4.1.2.3.2 CMC nach Erstinfektion mit VHSV	60
4.1.2.3.3 CMC nach Zweitinfektion mit VHSV	61
4.1.3 Untersuchungen zur humoralen Immunantwort	62
4.1.3.1 ELISA (VHSV-Gesamtantikörper)	62
4.1.3.2 Plaque-Neutralisationstest (PNT)	63
4.1.4 Untersuchungen zur Expression von mRNA kodierend für CD8 α und NKEF in PBL der Versuchstiere	64
4.1.4.1 VHSV – Erstinfektion	64
4.1.4.2 VHSV – Zweitinfektion	66

4.2 DNA - Immunisierung	68
4.2.1 Überprüfung der Plasmid-DNA	68
4.2.1.1 Restriktionsenzymanalyse	68
4.2.1.2 <i>in vitro</i> -Expression von viralem Protein nach Transfektion	69
4.2.1.3 <i>in vivo</i> -Expression von viralem Protein nach i.m. Injektion	70
4.2.2 Untersuchungen zur adaptiven humoralen Immunantwort nach DNA- Immunisierung	71
4.2.3 Untersuchungen zur zellulären Immunantwort nach DNA- Immunisierung	71
4.2.3.1 PBL-Kapazität	71
4.2.3.2 Durchflusszytometrie	72
4.2.3.3 Ergebnisse der Zytotoxizitätstests (CMC-LDH)	73
4.2.3.3.1 Kontrollgruppen	73
4.2.3.3.2 Immunisierung mit pRc/CMV-VG	74
4.2.3.3.3 Immunisierung mit pRc/CMV-VN	74
4.2.3.3.4 Zusammenfassende Darstellung der CMC-Ergebnisse für Effektor-/Targetzell-Ratio 100:1	75
4.2.3.3.5 Virusspezifität der CMC	77
4.2.3.4 Korrelation zwischen Antikörpertiter und CMC	79
4.2.4 Untersuchungen zur Expression von mRNA kodierend für CD8 α und NKEF	79
4.2.4.1 CD8 α -Expression in PBL	79
4.2.4.2 NKEF-Expression in PBL	81
5. Diskussion	82
5.1 Immunantwort auf VHSV-Infektion	84
5.2 Immunantwort auf diskrete virale Proteine des VHSV	91
6. Zusammenfassung	101
7. Literaturverzeichnis	103