

## 1. Einleitung

Das Immunsystem der Fische, den phylogenetisch ältesten Vertebraten ist, im Vergleich zu dem höher stehender Säuger, insbesondere des Menschen und der Maus, unzureichend erforscht. Die wenigen aufgeklärten Immunmechanismen bei Fischen sind denen höherer Vertebraten sehr ähnlich. Wie bei Säugern lassen sich angeborene (innate) und erworbene (adaptive) Mechanismen unterscheiden, die gleichfalls humorale als auch zelluläre Elemente umfassen.

Ein wesentlicher Bestandteil der Abwehr von Virusinfektionen im Säuger erfolgt auf zellulärer Ebene. Dabei werden virusinfizierte Zellen durch zytotoxische Zellen erkannt und abgetötet, wobei NK-Zellen die Zellen des angeborenen Immunsystems und zytotoxische T-Zellen die Zellen des adaptiven Immunsystems repräsentieren. Während NK-Zellen früher als unspezifisch bezeichnete Muster zur Erkennung von Zielzellen nutzen, ist bei der adaptiven spezifischen Erkennung virusinfizierter Zellen durch zytotoxische T-Zellen das MHC- (Haupthistokompatibilitätskomplex) Klasse-I-Molekül von zentraler Bedeutung. Solche Mechanismen sind bei Fischen, insbesondere bei viralen Infektionen, nicht aufgeklärt.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit waren deshalb Untersuchungen zu zellulären Abwehrmechanismen bei Fischen während einer Virusinfektion am Modell der Viralen Hämorrhagischen Septikämie (VHS) der Regenbogenforelle. In einem *in vitro*-Testsystem, bestehend aus MHC-Klasse-I-kompatiblen und -inkompatiblen Effektor-/Targetzellkombinationen, wurden antivirale zytotoxische Reaktionen peripherer Blutleukozyten infizierter beziehungsweise DNA-immunisierter klonaler Forellen untersucht. Die DNA-Immunisierung diente dazu, diskrete Virusstrukturproteine des VHS-Virus (VHSV) im Fisch zur Expression zu bringen, um deren Fähigkeit zur Induktion zytotoxischer Zellen zu testen.

Aufgrund des in dieser Arbeit etablierten Zytotoxizitätsassays sowie parallel durchgeführten durchflusszytometrischen Untersuchungen, mRNA- und Protein-Expressionsanalysen und Antikörpernachweisen ergaben sich wichtige Schlussfolgerungen hinsichtlich der Art zytotoxischer Effektorzellen bei der Regenbogenforelle. Ferner ließen sich Unterschiede in der Fähigkeit einzelner viraler Proteine zur Induktion einer zellvermittelten Zytotoxizität erkennen. Die über mehrere Jahre hinweg durchgeführten Experimente weisen auf jahreszeitliche Schwankungen

der Immunantwort hin, woraus sich wiederum Schlussfolgerungen für die Anwendung von Vakzinen ergeben.

## 2. Literaturübersicht

### 2.1 Die Immunantwort bei Vertebraten - allgemeine Klassifizierung

Das Immunsystem von Vertebraten ist in der Lage Fremdstoffe, Viren, Fremdzellen (Bakterien, Pilze, Parasiten, allogene und xenogene Transplantate) sowie krankhaft veränderte, körpereigene Zellen zu erkennen und diese von körpereigenen, gesunden Zellen zu unterscheiden. Hierbei werden angeborene und erworbene (adaptive) Immunreaktionen unterschieden. Beide Reaktionen sind eng miteinander vernetzt und beinhalten sich gegenseitig ergänzende humorale und zelluläre Komponenten (siehe Tabelle 1).

Die angeborene Immunität dient bei Vertebraten der primären Abwehr, die unmittelbar und direkt aktiviert wird. Diese Abwehr wurde bis vor wenigen Jahren als unspezifisch bezeichnet. Dies ist insofern nicht korrekt, da auch hier eine bestimmte Rezeptor-Liganden-Interaktion vorliegt. Im Gegensatz zur Antigenerkennung bei der adaptiven Immunantwort erfolgt jedoch die Aktivierung von Immunzellen über eine so genannte Mustererkennung, wobei PRRs (pattern recognition receptors) mit entsprechenden PAMPs (pathogen associated molecular patterns) interagieren. Gleichartige PAMPs kommen als Mustermoleküle auf einer ganzen Reihe verschiedener Fremdzellen, besonders auf Bakterien vor. Für angeborene Immunreaktionen ist weiterhin typisch, dass es kein erregerspezifisches immunologisches Gedächtnis gibt, wie das bei der spezifischen erworbenen Abwehr der Fall ist.

Die erworbene Immunität ist die ‚zweite Phalanx‘ der Abwehr. Sie basiert auf antigenspezifisch determinierten Immunzellen, wobei T-Lymphozyten die zelluläre Abwehr und die von B-Lymphozyten gebildeten Immunglobuline die humorale Abwehr vermitteln. Beide Effektorzellarten erhalten ihre Spezifität über Zelloberflächenrezeptoren, die durch damit kompatible Antigenstrukturen stimuliert werden. Die Effektorzellen des erworbenen Immunsystems können komplexe Antigene erst nach deren Prozessierung und Präsentation durch professionelle antigenpräsentierende und andere kernhaltige Körperzellen erkennen. Nach Kontakt mit solchermaßen aufbereiteten Antigenen kommt es zur klonalen Expansion antigen-spezifischer Effektorzellen. Die Eliminierung antigener Elemente erfolgt dann gezielt durch klonal expandierte zytotoxische T-Zellen, sowie durch die von

Plasmazellen (ausdifferenzierte B-Zellen) gebildeten Antikörper. Beide Prozesse gehen mit einer Aktivierung von T-Helferzellen einher, wobei spezifische Gedächtniszellen gebildet werden, die das Immunsystem bei erneutem Kontakt mit dem homologen Antigen schneller und effektiver reagieren lassen. Eine erfolgreiche antivirale Immunantwort ist deshalb dadurch gekennzeichnet, dass NK-Zellen die Infektion zusammen mit angeborenen humoralen Faktoren (siehe Tabelle 1) zunächst eindämmen, wonach antigenspezifische zytotoxische T-Zellen und spezifische Antikörper den Erreger dann eliminieren (Janeway et al., 2001; Roitt et al., 2001; Zinkernagel, 1993).

Da sich die vorliegende Arbeit mit zellulären Abwehrmechanismen während einer Viruserkrankung beschäftigt, soll im Folgenden dieser Themenkomplex näher erörtert werden.

**Tab. 1:** Vereinfachte Darstellung der angeborenen und erworbenen Komponenten des Immunsystems.

<b>Komponenten des Immunsystems</b>	<b><u>Angeboren (innate)</u></b> unmittelbare Reaktion ,Mustererkennung'	<b><u>Erworben (adaptiv)</u></b> mittelbare Reaktion spezifische Erkennung immunologisches Gedächtnis
<b>Zellulär</b>	Phagozyten (Makrophagen, Monozyten, Granulozyten) NK-Zellen	T-Lymphozyten B-Lymphozyten
<b>Humoral</b>	Zytokine, Interferone Akute Phase-Proteine Komplementsystem	Antikörper

## 2.2 Zellvermittelte Zytotoxizität (cell-mediated cytotoxicity, CMC)

### 2.2.1 Angeborene Zytotoxizitätsmechanismen

Betrachtet man die zellulären Elemente des angeborenen Immunsystems der **Säuger**, so spielen natürliche Killerzellen (NK-Zellen), insbesondere in der frühen Phase der Infektabwehr eine sehr wichtige Rolle. NK-Zellen von Säugern sind große Lymphozyten mit deutlich erkennbarer Granulierung. Nach derzeitigem Kenntnisstand besitzen sie keine antigenspezifischen Rezeptoren, können jedoch ohne vorherigen Antigenstimulus entartete und virusinfizierte Zellen erkennen und eliminieren (Diefenbach & Raulet, 2003). Die Aktivierung der NK-Zellfunktion wird durch Verschieben der Balance von inhibierenden auf aktivierende Signale reguliert (Lanier, 2003). Die Erkennung von qualitativ und quantitativ korrekt exprimierten MHC-Klasse-I-Molekülen auf körpereigenen Zellen durch so genannte Killerzell-Immunglobulinartige Rezeptoren (KIR; killer-cell-immunoglobulin-like receptors) führt zu einer Verstärkung von inhibierenden Signalen und zu einer Anergie von NK-Zellen gegenüber intakten körpereigenen Zellen (Lanier, 1998; Valez-Gomez et al., 2000).

Die aktivierenden NK-Zellrezeptoren werden unter anderem durch C-Typ-Lektin-artige Rezeptoren (wie Ly49, NKG2D, CD94/NKG2) repräsentiert. NKG2D interagiert mit MHC-Klasse-I-ähnlichen Liganden, wie zum Beispiel MICA/MICB (MHC class I chain related proteins A, B) oder ULBP (UL16 bindende Proteine; UL16 bezeichnet ein Protein des Humanen Zytomegalievirus) (Rolle et al., 2003). Die Expression dieser Liganden wird durch Zellstress (Tumoralterationen, Virusinfektionen et cetera) initiiert, kann aber auch mit einer malignen Transformation assoziiert sein (Bauer et al., 1999; Gasser et al., 2005; Raulet, 2003). Beim Menschen wurde gezeigt, dass das NKG2D-Ligandensystem sowohl an der Tumorüberwachung (Raulet, 2003) als auch an der Immunabwehr bestimmter viraler Infektionen beteiligt ist (Welte et al., 2003; Groh et al., 2001).

NK-Zellen von Säugern können zusätzlich durch Interferone oder Zytokine aktiviert werden (zum Beispiel von CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen sezerniertes Interleukin-2; von Makrophagen sezerniertes Interleukin-12, Interferon  $\alpha$  und  $\beta$ ), wodurch sie in der Lage sind, Tumor- oder virusinfizierte Zielzellen effektiver zu lysieren (Mosmann & Coffman, 1989; Linnemeyer, 1995; Biron et al., 1999; Salazar-Mather et al., 2000).

NK-Zellen von Säugern vermitteln ihre lytische Aktivität über mindestens zwei verschiedene Mechanismen. Ein Ca-abhängiger, sekretorischer Weg induziert membranolytisches Perforin sowie Granzyme, was schließlich zur Fragmentation der DNA in der Zielzelle führt (Kagi et al., 1994a, 1994b; Rouvier et al., 1993). Bei dem ligand-basierten Weg induziert die Interaktion zwischen Fas-Liganden auf den Effektorzellen und den Fas-Rezeptoren der Targetzellen die apoptotische DNA-Fragmentation (Henkart, 1994; Vujanovic et al., 1996).

Es gibt zahlreiche Veröffentlichungen, die bei **Fischen** das Vorhandensein von Zellen belegen, die den NK-Zellen höherer Vertebraten funktionell sehr ähnlich sind. NK-Zell-Aktivitäten konnten bei einer ganzen Reihe von Fischarten nachgewiesen werden: Forelle (Greenlee et al., 1991; Hayden & Laux, 1985; Ristow et al., 1995), Atlantischer Lachs (Moody et al., 1985), Karpfen (Hinuma et al., 1980; Suzumura et al., 1994; Meseguer et al., 1994), Katzenwels (Evans et al., 1984; Graves et al., 1895; Yoshida et al., 1995), Riffbarsch (Mc Kinney & Schmale, 1994), Buntbarsch (Faisal et al., 1989) und Goldbrasse (Cuesta et al., 2002). Dabei werden sogenannte nicht spezifische zytotoxische Zellen (nonspecific cytotoxic cells, NCCs) und NK-ähnliche Zellen unterschieden.

NCCs wurden erstmals bei Katzenwelsen (*Ictalurus punctatus*) charakterisiert. Man findet sie vor allem in der Kopfniere und in der Milz. NCCs sind in der Lage, Tumorzellen, xenogene und virusinfizierte Zellen sowie protozoische Parasiten zu erkennen und spontan zu lysieren (Evans & Jaso-Friedmann, 1992). Auch bei der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) wurden NCCs beschrieben (Hayden & Laux, 1985), die mit allogenen und virusinfizierten Zellen zytotoxisch reagieren (Moody et al., 1985; Greenlee et al., 1991; Yoshinaga et al., 1994; Ristow et al., 1995).

NCCs sind kleine, nicht granulierte Lymphozyten mit pleomorphem Kern und weisen damit deutliche morphologische Unterschiede zu den NK-Zellen der Säuger auf. Es gibt jedoch große funktionelle Ähnlichkeiten zu den NK-Zellen von Säugern, so zum Beispiel bei der Targetzellerkennung und -lysis (Jaso-Friedmann et al., 1994; Kaur et al., 2004a; Bishop et al., 2002; Praveen et al., 2004), bei der Aktivierung durch zytokinähnliche Faktoren (Ruiz et al., 2001), sowie bei der Abwehr von Bakterien und Parasiten (Evans & Jaso-Friedmann, 1992; Oumouna et al., 2002). NCCs exprimieren auf ihrer Oberfläche das so genannte NCC-Rezeptorprotein-1 (NCCRP-1), welches im Katzenwels mittels eines monoklonalen Antikörpers (mAk)

nachgewiesen werden kann (mAk 5C6; Jaso-Friedmann et al., 1997). NCCRP-1, das auch in Buntbarschen (Ishimoto et al., 2004) und Goldbrassen (Cuesta et al., 2005) exprimiert wird, spielt bei der Antigenerkennung und Targetzelllysis, sowie bei der Zytokinfreisetzung eine wichtige Rolle (Jaso-Friedmann et al., 2001, 2002).

Kürzlich wurden auf NCCs von Katzenwelsen, Buntbarschen, Goldbrassen und beim Zebrafisch weitere Moleküle nachgewiesen, die eine Funktion dieser Zellen bei der angeborenen Immunabwehr belegen (Scavenger-Rezeptor-Homolog: Kaur et al., 2003; PRRs und neue Klasse von PRRs: Kaur et al., 2004b; Evans et al., 2005; zytosolischer FasLigand zur Apoptoseinduktion in Zielzellen: Evans et al., 2001; Kaur et al., 2004a).

In den peripheren Blutleukozyten (PBL) von Katzenwelsen wurde eine weitere Klasse von NK-ähnlichen Zellen beschrieben. Diese NK-ähnlichen Zellen sind zur spontanen, MHC-Klasse-I-unabhängigen Lysis allogener (Yoshida et al., 1995) und virusinfizierter autologer Zellen (Hogan et al., 1996) befähigt. Im Gegensatz zu den NCCs exprimieren diese großen, granulierten Lymphozyten nicht das NCCRP-1 und induzieren Apoptose in Zielzellen vorwiegend über den sekretorischen Weg (Granzym/Perforin) (Shen et al., 2002; 2004). Durch *in vitro* Stimulationsexperimente mit PBL vom Katzenwels konnten eine Reihe klonaler, alloreaktiver NK-ähnlicher Zelllinien etabliert werden (Stuge et al., 2000; Shen et al., 2004). Bei einigen dieser Zelllinien konnte ein putativer Fc-Rezeptor (bindet im Fc-Teil von Immunglobulinen) nachgewiesen werden. Folgerichtig waren diese NK-ähnlichen Zellen, wie auch NK-Zellen der Säuger (Lanier et al., 1988; Trinchieri & Valiante, 1993, Sun, 2003), zu einer antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) befähigt (Shen et al., 2003).

Diese Daten demonstrieren, dass Fische zytotoxische Zellen besitzen, die bei der angeborenen Immunabwehr eine Rolle spielen.

### **2.2.2 Adaptive Zytotoxizitätsmechanismen**

MHC-Klasse-I-Moleküle sind membrangebundene Glykoproteine, die von einer Gruppe von Genen, dem Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC), kodiert werden. Die Bedeutung dieser Moleküle wurde bei Säugern zunächst mit der Abstoßung von Allotransplantaten in Zusammenhang gebracht (Rapaport, 1999; Bergan, 1997). Erst

später wurde deren Bedeutung bei der Erregerabwehr entdeckt. Man unterscheidet hierbei zwischen MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Molekülen. MHC-Klasse-II-Moleküle präsentieren im Gegensatz zu MHC-Klasse-I-Molekülen Peptide exogener Proteine, die zuvor von phagozytierenden Zellen und B-Zellen internalisiert und prozessiert wurden. Die MHC-Klasse-II-gebundenen Peptide werden T-Helferzellen präsentiert und induzieren eine adaptive Immunantwort durch humorale Antikörper.

MHC-Klasse-I-Moleküle werden bei Säugern von allen kernhaltigen Körperzellen exprimiert und präsentieren Peptide von Proteinen, die während der normalen Zytogenese, aber auch bei Virusinfektionen durch den zelleigenen Syntheseapparat im Zytosol synthetisiert werden. Wie auch die zellulär gebildeten Proteine unterliegen neu synthetisierte, virale Proteine einem ständigen Degradationsprozess. Die Proteine werden durch das Proteasom, einem großen multikatalytischen Proteasekomplex (wichtige Untereinheiten LMP2, LMP7), in Bruchstücke von ca. 8-10 Aminosäuren Länge zerlegt und durch den TAP1/TAP2-Peptidtransporter (TAP = transporter associated with antigen processing) aktiv vom Zytosol in das endoplasmatische Retikulum transportiert (Yewdell et al., 1993). Dort treffen sie auf MHC-Klasse-I-Moleküle, die erst nach Assoziation mit dem  $\beta$ 2-Mikroglobulin ( $\beta$ 2m) ihre endgültige, stabile Tertiärstruktur annehmen (Pamer & Cresswell, 1998; van Endert, 1999). Sobald das Peptid an das MHC-Klasse-I-Molekül gebunden ist, verlässt dieser Komplex das endoplasmatische Retikulum und wird über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert und dort präsentiert (Monaco, 1992). Antigen-spezifische zytotoxische T-Zellen (CTL) erkennen den Komplex aus viralem Peptid und MHC-Klasse-I-Molekül über ihren T-Zellrezeptor (TCR) -Komplex. Dieser besteht aus einem TCR-Molekül, das für die spezifische Erkennung seines Peptid-MHC-Klasse-I-Liganden zuständig ist (Bentley & Mariuzza, 1996) und dem hoch konservierten CD3-Komplex, der für die Signaltransduktion innerhalb der CTLs benötigt wird. Die Aktivierung der CTLs wird durch den Korezeptor CD8 unterstützt, der bei der Antigenerkennung mit dem TCR aggregiert und an der hoch konservierten  $\alpha$ 3-Region des MHC-Klasse-I-Moleküls bindet. Dadurch wird das durch die Bindung des MHC-Klasse-I/Peptid Komplexes an den TCR-Komplex induzierte Signal um ein Vielfaches verstärkt (Zamoyska, 1998; Kwan Lim et al., 1998). Somit wird eine Signaltransduktionskaskade initiiert, die zur klonalen Expansion der CTLs und schließlich über den sekretorischen und/oder ligandbasierten Weg zum Targetzelltod führt (Janeway et al., 2002).



Ein wesentliches Merkmal der spezifischen Antigenerkennung durch CTL ist die MHC-Klasse-I-Restriktion. Dies bedeutet, dass CTLs nur dann ihre Funktion erfüllen können, wenn ihnen das Antigen von körpereigenen MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert wird (Doherty & Zinkernagel, 1975). Dieses Kriterium ist *in vivo* ohnehin erfüllt, muss jedoch bei *in vitro* Untersuchungen zur CMC durch geeignete Kombination MHC-Klasse-I-kompatibler Effektor- und Targetzellen berücksichtigt werden. Ein weiteres, wichtiges Merkmal der CTL-Antwort ist die Peptidspezifität. Klonal expandierte, antigenspezifische CTL-Klone können nur homologe virale Peptide ein und desselben Erregers erkennen und deshalb nur die mit diesem Erreger infizierten Zellen lysieren.

Nicht infizierte Zellen, die körpereigene Peptide präsentieren, werden von CTLs toleriert, da im Zuge der T-Zellreifung nur solche T-Zellen den Thymus verlassen, die nicht gegen körpereigene Strukturen gerichtet sind (Bot et al., 1998 ; Weekes et al., 1999).

**Fische** haben innerhalb der Vertebraten das am einfachsten strukturierte Immunsystem. Sie besitzen keine Lymphknoten und kein Knochenmark. Die lymphatischen Organe der Knochenfische (Niere als Knochenmarkäquivalent, Thymus, Milz, darmassoziiertes lymphatisches Gewebe) sind zudem weniger komplex aufgebaut als bei Säugern. Dennoch haben sich Fische entwicklungs-geschichtlich über Jahrtausende behaupten können.

Die B-Lymphozyten sind die am besten beschriebenen lymphatischen Zellen des adaptiven Immunsystems der **Fische**. Sie entwickeln sich aus Vorläuferzellen in der Kopfniere und reifen in der Milz zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen heran (Irwin & Kaattari, 1986; Razquin et al., 1990; Kaattari, 1992), wobei es nicht wie bei Säugern zur Bildung von Keimzentren kommt. Die Heterogenität der B-Lymphozyten ist deutlich geringer als beim Säuger; ein Ig-Klassenswitch fehlt. Bisher sind lediglich die Isotypen IgM, IgD (Atlantischer Lachs: Hordvik et al., 1999; Katzenwels: Wilson et al., 1997), IgT (Regenbogenforelle; Hansen et al., 2005) und IgZ (Zebrafisch; Danilova et al., 2005) beschrieben, wobei für die Isotypen IgD, IgT und IgZ lediglich die Genomorganisation, aber nicht die entsprechenden Proteine und deren Funktion charakterisiert sind.

Die Entwicklung der T-Lymphozyten und ihre Rolle bei der Immunantwort sind bei Fischen bisher wenig aufgeklärt. Es wurde lange Zeit darüber spekuliert, ob

Fische überhaupt "echte" T-Lymphozyten besitzen. T-Zellen und/oder T-Zellsubpopulationen konnten bis jetzt weder sicher isoliert, noch identifiziert werden (Übersichtsartikel: Fischer et al., 2006), da die Herstellung T-Zell-spezifischer Antikörper mit großen Schwierigkeiten verbunden ist (Scapigliati et al., 1999).

Es gibt jedoch zahlreiche funktionelle Hinweise auf das Vorhandensein von piscinen CTL, die durch die Analyse homologer, CTL-spezifischer Gene untermauert werden. So konnten zwischen verschiedenen Fischarten und Säugern Sequenzhomologien bei den TCR-Genen nachgewiesen werden (Charlemagne et al., 1998; Hawke et al., 1996; Partula et al., 1996; Rast et al., 1997; Hordvik et al., 1996; Wilson et al., 1998; Wermestam & Pilstrøm, 2001). Auch sind homologe Sequenzen der CD8 Moleküle von Regenbogenforellen (Hansen & Strassburger, 2000), des Atlantischen Lachses (Moore et al., 2005), des Ginkgobaum Karpfens (*Carassius auratus langsdorffii*) (Somamoto et al., 2005) und des Wolfsbarsches (*Dicentrarchus labrax*) (Buonocore et al., 2006; Pinto et al., 2006) beschrieben. Weiterhin sind bei Fischen die wichtigsten homologen Gene von Molekülen sequenziert, die bei der Präsentation von Peptiden über MHC-Klasse-I eine Rolle spielen. MHC-Klasse-I-Gene sind von mehr als 25 Knochen- und Knorpelfischarten isoliert worden (Flajnik et al., 1999; Stet et al., 1996; Manning & Nakanishi, 1996; Stet et al., 1998; Dijkstra et al., 2003). Weiterhin konnten bei Forellen Gene identifiziert werden, die bei höheren Vertebraten im Zuge der intrazellulären Beladung des MHC mit Peptiden eine Rolle spielen. Dazu gehören das  $\beta 2m$  (Shum et al., 1996; Magor et al., 2004), das LMP 2 (low molecular mass protein 2) und der TAP1/TAP2 (transporter associated with antigen processing 1, 2) (Hansen et al., 1999). Boudinot et al. (2001) konnten bei Forellen während einer Virusinfektion Veränderungen innerhalb des TCR-Repertoires in der komplementaritätsbestimmenden Region 3 (CDR3, complementary determining region 3) aufzeigen, was einen indirekten Beweis für eine T-Zellantwort darstellt.

Obwohl piscine T-Zellen bis heute nicht als Einzelzellen dargestellt wurden, legen Funktionstests das Vorhandensein von T-Zellen bei Fischen nahe.

Erste experimentelle Hinweise auf eine MHC-Klasse-I-restringierte Funktion zytotoxischer T-Zellen bei Fischen lieferten Transplantatabstoßungsexperimente (Manning & Nakanishi, 1996; Desvaux & Charlemagne, 1983; Sarder et al., 2003). Die Transplantatabstoßung zeichnet sich wie bei Säugern durch Antigen-spezifität,

immunologisches Gedächtnis (Manning & Nakanishi, 1996) und MHC-Klasse-I-Abhängigkeit (Sarder et al., 2003) aus.

Ein weiterer Hinweis auf adaptive, zellvermittelte Immunmechanismen bei Fischen ist die Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (graft versus host reaction, GVHR). Diese ist ein charakteristisches *in vivo*-Phänomen der zellvermittelten Zytotoxizität gegen allogene Zellen, bei der CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen, aber auch NK-Zellen des Spenders gegen Zielgewebe des Empfängers reagieren (Reddy, 2003, Übersichtsartikel). GVHR konnte bei Amago Lachsen (Qin et al., 2002) und Ginbuna Karpfen (Nakanishi et al., 1999a; Nakanishi et al., 1999b) gezeigt werden. Des Weiteren konnten allospezifische zytotoxische Zellen bei verschiedenen Knochenfischen, so bei Ginbuna Karpfen (Fischer et al., 1998; Hasegawa et al., 1998), Regenbogenforellen (Fischer et al., 2003) und Katzenwelsen (Stuge et al., 2000) *in vitro* funktionell gezeigt werden. Sowohl die GVHR als auch die zellvermittelte Zytotoxizität gegen allogenen Zellen bei Ginbuna-Karpfen erwiesen sich als temperaturabhängige Reaktionen (Fischer et al., 1998).

In der Regenbogenforelle wurden putative alloreaktive T-Zellen durch immunomagnetisches Entfernen von B-Zellen, Monozyten, Granulozyten, Thrombozyten aus PBL mittels populationsspezifischer, monoklonaler Antikörper angereichert. Diese sIgM<sup>-</sup> (surface IgM-negative) Lymphozyten lysierten spezifisch allogene Zellen und exprimierten, im Gegensatz zu den anderen Subpopulationen, TCR und CD8 (Fischer et al., 2003).

Auch *in vitro* Funktionsassays zur Untersuchung der zellvermittelten Zytotoxizität deuten auf das Vorhandensein allospezifischer (Katzenwels: Hogan et al., 1996; Yoshida et al., 1995; Ginbuna Karpfen: Fischer et al., 1998; Hasegawa et al., 1998; Regenbogenforelle: Fischer et al., 2003) und virusspezifischer (Ginbuna Karpfen: Somamoto et al., 2000a; Somamoto et al., 2000b; Regenbogenforelle: Fischer et al., 2000) CTLs hin. Eine MHC-Klasse-I-Restriktion der CMC gilt als wahrscheinlich (Somamoto et al., 2002; Fischer et al., 2000). Überzeugende Hinweise für die Existenz von zytotoxischen T-Zellen bei Knochenfischen lieferte die Entwicklung verschiedener klonaler TCR-exprimierender Langzeit-Zelllinien des Katzenwelses. Eine dieser Zelllinien lysiert allogene Targetzellen über einen perforin-abhängigen sekretorischen Weg und ist damit den CTL der Säuger sehr ähnlich (Stuge et al., 2000; Zhou et al., 2001).

Zytokine spielen bei zellulären Immunmechanismen eine wichtige Rolle. Ein wichtiges, bei viralen Infektionen freigesetztes Zytokin bei **Säugetern**, ist Interferon  $\gamma$  ( $\text{IFN}\gamma$ ). Es hemmt die Virusreplikation und sorgt dafür, dass Viren aus infizierten Zellen eliminiert werden (Schroder et al., 2004). Kürzlich wurden in der Regenbogenforelle (Zou et al., 2005) und im Fugu (*Takifugu rubripes*) (Zou et al., 2004)  $\text{IFN}\gamma$ -Sequenz-Homologe identifiziert und charakterisiert. Bei Infektionen mit piscinen Viren konnte weiterhin eine Induktion der Expression von Interferon-induzierbaren Genen, wie zum Beispiel von Mx-Proteinen gezeigt werden (Trobridge & Leong, 1995; Plant & Thune, 2004; Zhang et al., 2004; Jensen & Robertsen, 2000; Lee et al., 2000; Schultz et al., 2004), deren Expression in Säugerzellen eine Resistenz gegenüber verschiedenen RNA (ribonucleic acid)-Viren vermittelt (Stark et al., 1998). Weitere homologe Gene von Zytokinen, die bei der CMC eine Rolle spielen, wie zum Beispiel das des Interleukin (IL)-2, wurden von Bird et al. (2005) im Fugu identifiziert. In der Regenbogenforelle konnte ein Zytokin-ähnlicher Faktor nachgewiesen werden, der funktionell und strukturell mit dem IL-2 der Säuger vergleichbar ist (Blohm et al., 2003).

## **2.3 Die Virale Hämorrhagische Septikämie (VHS)**

### **2.3.1 Ätiologie**

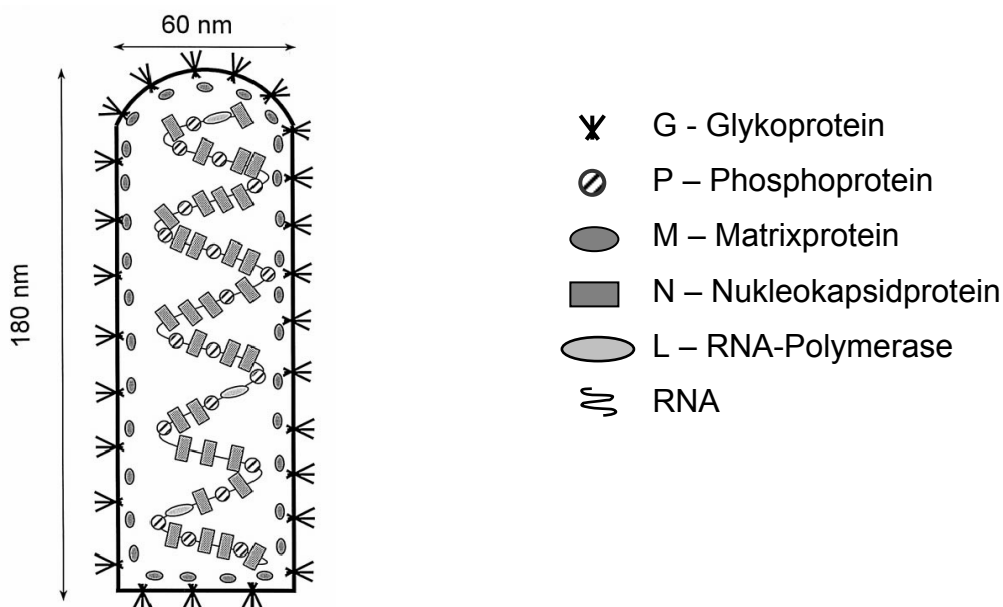
Der Erreger der VHS, das VHS-Virus (VHSV), gehört zur Familie der Rhabdoviridae (Lenoir & De Kinkelin, 1975), Genus Novirhabdovirus (Van Regenmortel et al., 2000) und wurde 1963 erstmals in Europa durch Jensen isoliert (Jensen, 1965). Das Virus wird als finger- bis geschossförmig beschrieben (Abb. 1). Es handelt sich dabei um ein behülltes RNA-Virus, dessen Genom aus einem nicht-segmentierten, einzelsträngigem RNA-Molekül in Negativstrangorientierung besteht. Das vollständig entschlüsselte Genom kodiert für vier Strukturproteine: das Glykoprotein (G), das Nukleokapsidprotein (N), das Phosphoprotein (P) und das Matrixprotein (M), sowie die virusassoziierte Polymerase (L) (Lenoir & De Kinkelin, 1975). Außerdem kodiert es für ein kleines Nicht-Virion-Protein (NV) (Schütze et al., 1996, Kurath et al., 1997), dem eine essentielle Rolle bei der Pathogenität des Virus

zugeschrieben wird (Thoulouze et al., 2004). Die Virusgenomorganisation ist: 3'-N-P-M-G-NV-L-5' (Schütze et al., 1999).

Wie die Säuger-Rhabdoviren (zum Beispiel Tollwutvirus) und das Fisch-Rhabdovirus IHNV (Virus der Infektiösen Hämatoepoetischen Nekrose) ist auch das VHSV von einer Lipoproteinhülle umgeben (Luo et al., 1988; Benmansour et al., 1991). Das Glykoprotein G ist mit dieser Membran assoziiert und stellt das Hauptoberflächenantigen dar (Jørgensen et al., 1995). Das VHSV Glykoprotein ist deshalb Ziel neutralisierender und schützender Antikörper (Lorenzen et al., 1990; Bearzotti et al., 1995).

Im Zuge der Virusreplikation wird das Nukleokapsidprotein vor allen anderen viralen Proteinen gebildet und ist im Vergleich zu den übrigen viralen Strukturproteinen innerhalb des Viruspartikels das dominante Protein (Lenoir & De Kinkelin, 1975; Coll, 1995). Laut Lorenzen et al. (1998) und Heppell et al. (1998) induzieren sowohl das G- als auch das N-Protein des VHSV eine belastbare Immunität, wobei aber lediglich durch das G-Protein (humorale) neutralisierende Antikörper gebildet werden.

Das VHSV repräsentiert ein wertvolles Modell für Studien zu Wirts-Erreger-Interaktionen, da es sich leicht in Zellkultur vermehren lässt und Mortalitäten in Belastungsexperimenten gut reproduzierbar sind.



**Abb. 1:** Schematische Darstellung VHSV. Modifiziert nach Lorenzen et al., 1999a.

### 2.3.2 Epidemiologie, Pathogenese und Klinik

Die Virale Hämorrhagische Septikämie (VHS) ist zusammen mit der IHN (Infektiöse Hämato-poetische Nekrose) die Viruserkrankung mit der größten ökonomischen Bedeutung für die Fischwirtschaft in Europa. In Wildgewässern tritt die Krankheit jedoch nur selten auf. Betroffen sind dort neben Regenbogenforellen auch Äsche, Bachforelle, Hecht, Lachs und Saibling (Übersicht bei Smail, 1999). VHSV ist für letztere weniger pathogen, wobei jedoch persistent infizierte Fische das Virus in die Teichwirtschaften eintragen können (Konrad und Enzmann, 1987). In Deutschland gehört die VHS zu den anzeigepflichtigen Krankheiten (Office International des Epizooties (O.I.E.), 2005).

Die Übertragung des Virus erfolgt über verseuchtes Wasser, akut infizierte und Trägerfische (sog. ‚Carrier‘), Wasservogel, Geräte, Fahrzeuge und das Personal der Teichwirtschaft (Amlacher, 1992, Smail, 1999). Auch eine Infektion über Eier gilt als wahrscheinlich (Jørgensen & Meyling, 1972).

Als Eintrittspforten werden hauptsächlich die Kiemen (Neukirch et al. 1984, 1985), die Haut (Yamamoto et al., 1990) und die Flossen (Quillet et al., 2001) angesehen. Die Infektion führt zu einer Schädigung der Endothelien mit nachfolgenden Blutungen in sämtlichen Organen und zu nekrotischen Schädigungen der Leber (Hoffmann et al., 1979; Meier & Pfister, 1981; De Kinkelin & Le Berre, 1977). Die ausgeprägte Nekrose des lymphohämatopoetischen Gewebes der Niere und der Milz bedingt den Verlust von hämatopoetischen Zellen und eine damit verbundene Immunsuppression (Hoffmann et al., 1979). Infektiöses Virus lässt sich aus dem Blut und den meisten Organen isolieren (Jørgensen & Meyling, 1972).

Klinische und pathologisch-anatomische Befunde sind vor allem Absonderung vom Hauptschwarm, Apathie, Dunkelfärbung der Haut, Exophthalmus, blasse Kiemen, Ascites, sowie die für eine hämorrhagische Septikämie typischen punktförmigen Blutungen (Petechien) in Muskulatur, Kiemen, Flossenansätzen und Gefäßen des viszeralen Peritoneums (Bauchfell) (Amlacher, 1992, Smail, 1999).

Die Krankheit tritt vor allem bei Winter- beziehungsweise Frühjahrstemperaturschwellen auf. Niedrige Temperaturen (7-10 °C) erhöhen die Mortalität und begünstigen einen Ausbruch und dessen Dauer. Ab 16-18 °C nehmen die Erkrankungs-raten stark ab.

Alle Altersklassen von Fischen können betroffen sein, allerdings tritt die höchste Mortalität (40-100% Verlust) bei Jungsetzlingen auf (McLauchlan et al., 2003; Smail, 1999).

Die VHS kann bislang nicht spezifisch therapiert werden.

### **2.3.3 Prophylaxe und Bekämpfung**

#### **2.3.3.1 Allgemeine Übersichten**

Die beste Prophylaxe ist die Isolierung gesunder Forellen von möglichen Infektionsquellen (Ghittino, 1972). In der Praxis werden Ausbrüche der VHS über die Tötung aller im Bestand vorhandenen Tiere, gefolgt von der Schließung und Dekontamination der Anlagen, kontrolliert, was eine kosten- und arbeitsintensive Prozedur darstellt. Deshalb werden große Anstrengungen unternommen, die Tiere vor einer Infektion zu schützen.

Vakzination ist eine gezielte Methode zur Verhütung und Bekämpfung von Viruserkrankungen. Hierbei unterscheidet man zwischen herkömmlichen vollvirusbasierten, attenuierten Vakzinen, Totvirus-Vakzinen, Subunitvakzinen und DNA-Vakzinen. Bei traditionellen Vakzinen gegen Viruserkrankungen im Fisch basierend auf inaktiviertem oder attenuiertem Virus (Jørgensen, 1982; De Kinkelin et al., 1995; Christie, 1997; Lorenzen & Olesen, 1997; Winton, 1997; Anderson et al., 2005, Fichtner et al., 1998) konnte ein gewisses Maß an Schutz gegen wichtige Fischviren, unter anderen auch die VHS, nachgewiesen werden. Attenuiertes Virus besitzt gegenüber inaktiviertem Virus einige Vorteile. Da es im Vergleich zu inaktiviertem Virus im Fisch repliziert, sind nur geringe Antigendosen nötig (Gudding et al., 1999), so dass es kostenminimiert verabreicht werden kann. Die Freisetzung von lebendem Virus ist jedoch aus epidemiologischer Sicht problematisch, da sich das Impfvirus unkontrolliert ausbreiten kann. Dabei kann es zur Rekombination des attenuierten Virus und zu höherer Virulenz kommen. Ein Impfstoff auf der Basis eines attenuierten, avirulenten VHS-Virus wurde in Deutschland bis 2002 auf der Grundlage einer Sondergenehmigung im Feld eingesetzt (Fichtner et al., 1998). Problematisch ist der Einsatz solcher Vakzinen vor allem in pathogenfreien Gebieten oder im Zusammenhang mit Eradikationsprogrammen in infizierten Gebieten, wie sie

in der europäischen Union zur Schaffung von pathogenfreien Gebieten angestrebt werden (Richtlinie 93/53/EWG, Richtlinie 91/67/EWG). Eine Unterscheidung zwischen Antikörpern, die durch Feldvirus und solchen, die durch Impfvirus induziert wurden, ist nicht möglich.

Die Verabreichung einer Vektorvakzine (eine so genannte ‚subunit vaccine‘), bei der ein Teil des VHSV-Glykoprotein-Gens in einen avirulenten Stamm von *Aeromonas salmonicida* (Erreger der Furunkulose bei Salmoniden) inkloniert wurde, induzierte einen 75 %igen Schutz vor einer VHSV-Infektion (Noonan et al., 1995). Diese als sicher eingestufte Immunisierungsstrategie wurde aber aus Kostengründen nicht weiterentwickelt.

Für virale Vakzinen in Form von rekombinanten viralen Proteinen, die in gentechnisch veränderten *Escherichia coli* produziert wurden, konnte für die Rhabdoviren VHSV und IHNV nur eine beschränkte oder schwer zu reproduzierende Schutzwirkung gezeigt werden (Lorenzen & Olesen, 1997; Winton, 1997).

Ein viel versprechender Ansatz der Immunprophylaxe ist dagegen die DNA-Immunisierung, bei der im Gegensatz zu herkömmlichen Impfstoffen nicht ein Antigen, sondern die genetisch kodierte Information für ein Antigen in Form von Plasmid-DNA verabreicht wird. Ein sehr guter Schutz vor Infektion konnte mit Plasmidvektoren erreicht werden, die für das Glykoprotein des VHSV kodieren (Lorenzen & La Patra, 2005). Die DNA-Vakzination von Brütlingen oder Jungfischen durch intramuskuläre (i.m.) Injektion ist derzeit noch nicht profitabel. Auch unter dem Aspekt der Lebensmittelsicherheit sind Vektoren, die für Antibiotikaresistenzen kodieren, und Promotoren, die Säugerzellen beeinflussen könnten, problematisch.

In der vorgelegten Arbeit wird die DNA-Immunisierung jedoch nicht als direktes Mittel zur Prophylaxe betrachtet. Es sollte vielmehr die Expression diskreter viraler Proteine im Fisch induziert werden, um deren Einfluss auf die Induktion antiviraler zellvermittelter Immunmechanismen zu untersuchen.

### **2.3.3.2 DNA-Immunisierung**

Nach Applikation eines Expressionsplasmids wird dieses von körpereigenen Zellen zum Beispiel Muskelzellen aufgenommen und die enthaltene genetische Information in das entsprechende Protein translatiert (Wolff et al., 1990). Die



endogene Synthese des fremden Proteins kann humorale und zellvermittelte Immunmechanismen induzieren (Gerds & Mettenleiter, 2000), da die Präsentation von endogen synthetisierten Antigenen sowohl in Assoziation mit MHC-Klasse-I, als auch mit MHC-Klasse-II stattfindet (Ciernik et al., 1996; Tang et al., 1992; Manickan et al., 1995). Folglich induziert DNA-Immunisierung in Säugern neben spezifischen Antikörpern auch eine starke CTL Antwort (Donnelly et al., 1997; Manickan et al., 1997).

Da die viralen Proteine nach Verabreichung von Plasmid-DNA, ähnlich wie bei einer echten Virusinfektion, innerhalb der Zelle translatiert werden, ist anzunehmen, dass diese auch in ähnlicher Weise prozessiert und präsentiert werden. Die DNA-Immunisierung ist somit ein ideales Werkzeug, um den Einfluss diskreter viraler Proteine im Zuge der Immunantwort, insbesondere bei der zellulären Abwehr zu untersuchen.

Erste modellhafte Untersuchungen bei Regenbogenforellen wurden mit Plasmid-DNA kodierend für diverse Reportergene (Luciferase, beta-Galaktosidase, green fluorescent protein) durchgeführt, um deren Gewebeverteilung und Expressionsdauer zu untersuchen (Hansen et al., 1991; Anderson et al., 1996a; Heppell et al., 1998). Experimente mit DNA-Vakzinen gegen die salmoniden Rhabdoviren VHSV und IHNV (Leong et al., 1995), die im Fisch nach i.m. Verabreichung die Expression viraler Glykoproteine induzierten, zeichneten sich durch eine hohe Schutzwirkung gegenüber nachfolgender homologer Infektion aus (Lorenzen et al., 1998; Boudinot et al., 1998; Anderson et al., 1996b; Leong et al., 1997). Interessanterweise korrelierte dieser Schutz, wie auch bei anderen Vakzinationsmethoden, nicht immer mit dem Antikörpertiter, und neutralisierende Antikörper werden im Verlauf der Infektion erst sehr spät gebildet, so dass sie in der akuten Phase der Infektion noch wirksam werden können (Lorenzen et al., 1999b). Aktuelle Arbeiten konzentrieren sich deshalb zunehmend auf die Erforschung zellulärer Mechanismen (Boudinot et al., 1998; Lorenzen et al., 2000; Lorenzen et al., 2002a; Somamoto et al., 2002; McLauchlan et al., 2003; Takano et al., 2004; Lorenzen et al., 2005; Lorenzen & La Patra, 2005).

Vor kurzer Zeit wurden erstmals zwei veterinärmedizinische DNA-Vakzinen für den Gebrauch im Feld zugelassen. Eine dieser Vakzinen (Apex-IHN<sup>®</sup>) wird in Kanada zum Schutz von in der Aquakultur gehaltenen Atlantischen Lachsen vor IHNV-Infektionen eingesetzt und kodiert für das Glykoprotein des IHNV

(Pressemitteilungen Novartis Animal Health Inc. und Vical Inc. im Juli 2005; Traxler et al., 1999). Die zweite DNA-Vakzine wurde in den USA lizenziert und zur Immunisierung von Pferden gegen West Nile Virus eingesetzt (Pressemitteilung Wyeth, Fort Dodge Animal Health, Juli 2005; Powell, 2004; Hall & Khromykh, 2004). Die Zulassung dieser veterinärmedizinischen DNA-Vakzinen schüren die Hoffnungen, ähnliche Vakzinen im humanmedizinischen Bereich gegen Erkrankungen wie AIDS, Hepatitis, Malaria, Ebola und SARS zu entwickeln und einsetzen zu können.