

4. Ergebnisse

4.1 VHSV-Infektion

4.1.1 Klinik

Alle Versuchstiere wurden hinsichtlich klinischer Krankheitszeichen der VHS beurteilt.

Nach Erstinfektion gesunder Forellen mit VHSV konnten die typischen Symptome der VHSV-Erkrankung wie Blutungen in der Haut, im Peritoneum und in der Muskulatur, Milzschwellung und Leberveränderungen (Rötung) bei allen (n=20) Versuchstieren zwischen 3 und 16 Tagen nach Infektion festgestellt werden.

Demgegenüber wiesen nur noch 3 von 20 Versuchstieren, die 22 Tage nach Erstinfektion ein zweites Mal infiziert wurden, VHSV-typische Krankheitszeichen auf (Tag 3: 2 Tiere; Tag 10: 1 Tier). Keines der Versuchstiere verendete.

4.1.2 Untersuchungen zur zellulären Immunantwort

4.1.2.1 PBL-Kapazität

Nachdem die Forellen 3, 4, 10, 11 und 16 Tage nach Infektion (d p.i.) beziehungsweise Tage nach Zweitinfektion (d p.2.i.) vollständig entblutet und deren Leukozyten über einen Percoll-Gradienten separiert worden waren, erfolgte die Bestimmung der pro Forelle zur Verfügung stehenden peripheren Blutleukozyten (PBL) durch Zellzählung im Phasenkontrast. Nach Erstinfektion der Forellen war die Gesamtzahl der über Percoll separierten PBL im Durchschnitt um fast 47 % [$0,84 (+/- 0,24) \times 10^8$ PBL; n = 20] gegenüber den Kontrolltieren [$1,58 (+/- 0,35) \times 10^8$ PBL; n = 16] signifikant vermindert, so dass von einer Leukopenie gesprochen werden kann. Die niedrigsten PBL-Zahlen wurden 11 d p.i. [mit $0,69 (+/- 0,15) \times 10^8$ PBL] gemessen (Abbildung 2), was 44 % des Kontrollwertes entspricht.

Bei allen Versuchstieren, die 22 Tage nach Erstinfektion ein zweites Mal infiziert wurden, war die durchschnittliche Gesamtleukozytenzahl im Blut gegenüber den

Kontrolltieren nicht statistisch signifikant erniedrigt [$1,49 (+/- 0,29) \times 10^8$ PBL; $n = 20$; entspricht 94 % des Kontrollwertes; Abbildung 2].

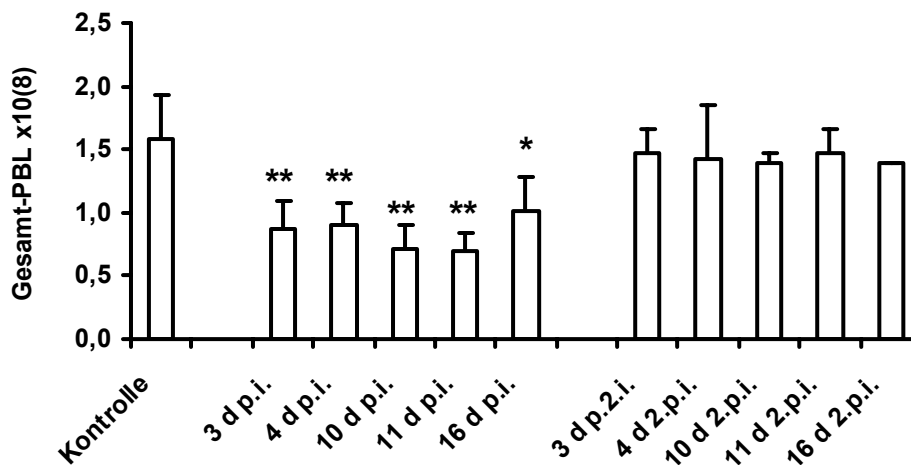


Abb. 2: Gesamt-PBL, die während des Infektionsversuches pro Versuchstier isoliert werden konnten im Vergleich zu nicht infizierten Kontrolltieren ($n=16$). Jeder Balken (außer Kontrolle) gibt den Durchschnittswert von 4 Fischen an, die 3, 4, 10, 11 und 16 d p.i. beziehungsweise d p.2.i. getötet und entblutet wurden. Sternchen kennzeichnen einen statistisch signifikanten Unterschied zu unbehandelten Kontrollfischen (* $p < 0,001$; ** $p < 0,05$).

4.1.2.2 Durchflusszytometrie

Bei jedem Versuchsansatz wurde das Verteilungsmuster bestimmter Leukozytensubpopulationen innerhalb der PBL mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dabei wurden populationsspezifische monoklonale Antikörper (mAk) gegen Forellen-Thrombozyten (mAk 42-1), Forellen-B-Zellen (anti-IgM mAk 4C10) und Forellen-Granulozyten/Monozyten (mAk Q4E) verwendet (Abbildung 3).

Das Verteilungsmuster der Leukozytensubpopulationen unterlag während der Virusinfektion starken Schwankungen. Der Anteil der Thrombozyten (Abbildung 3a) war während der Erstinfektion am zehnten und elften Tag nach Infektion signifikant erniedrigt und nach Zweitinfektion und Drittinfektion zeitweise signifikant erhöht. Der Prozentsatz von B-Zellen (Abbildung 3b) stieg zuerst an und fiel dann signifikant ab. Der Anteil der neutrophilen Granulozyten/Monozyten war sowohl 10 und 16 d p.i. als auch 15 und 16 d p.2.i. deutlich niedriger als bei den Kontrolltieren.

Aus der durchflusszytometrisch ermittelten Summe der oben genannten Subpopulationen lässt sich der Anteil der verbliebenen unmarkierten PBL-Fraktion errechnen, der die slg^- (Oberflächen Immunglobulin-negativen) Lymphozyten repräsentiert. Wie in Tabelle 5 dargestellt, steigt der relative Anteil der slg^- Lymphozyten im Verlauf der Infektion kontinuierlich bis 16 d p.i. an. Aus diesem etwa fünffachen Anstieg des relativen slg^- Lymphozytenanteils resultiert, in Verbindung mit dem etwa 50 %igen Abfall der absoluten PBL-Kapazität, ein etwa 2,5facher absoluter Real-Anstieg dieser Zellpopulation während einer Infektion (bis 16 d p.i.) gegenüber Kontrollen.

Tab. 5: Prozentualer Anteil (+/- Standardabweichung) der slg^- Lymphozyten in PBL von VHSV-infizierten und unbehandelten Forellen. Die Berechnung erfolgte anhand der durchflusszytometrisch ermittelten prozentualen Anteile der Subpopulationen nach folgender Formel: $\text{slg}^- \text{ Lymphozyten\%} = (100 - \text{Thrombozytenanteil} - \text{B-Zellenanteil} - \text{Monozyten-/Granulozytenanteil}) \%$. * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zu Kontrollfischen ($p < 0,05$).

	slg^- Lymphozyten in %	n
Kontrollen	6,2 (+/- 8,1)	16
3 d p.i.	10,4 (+/- 8,8)	4
4 d p.i.	12,0 (+/- 8,3)	4
10 d p.i.	27,4 (+/- 4,1)*	4
11 d p.i.	22,8 (+/- 4,6)*	4
16 d p.i.	33,4 (+/- 9,5)*	4

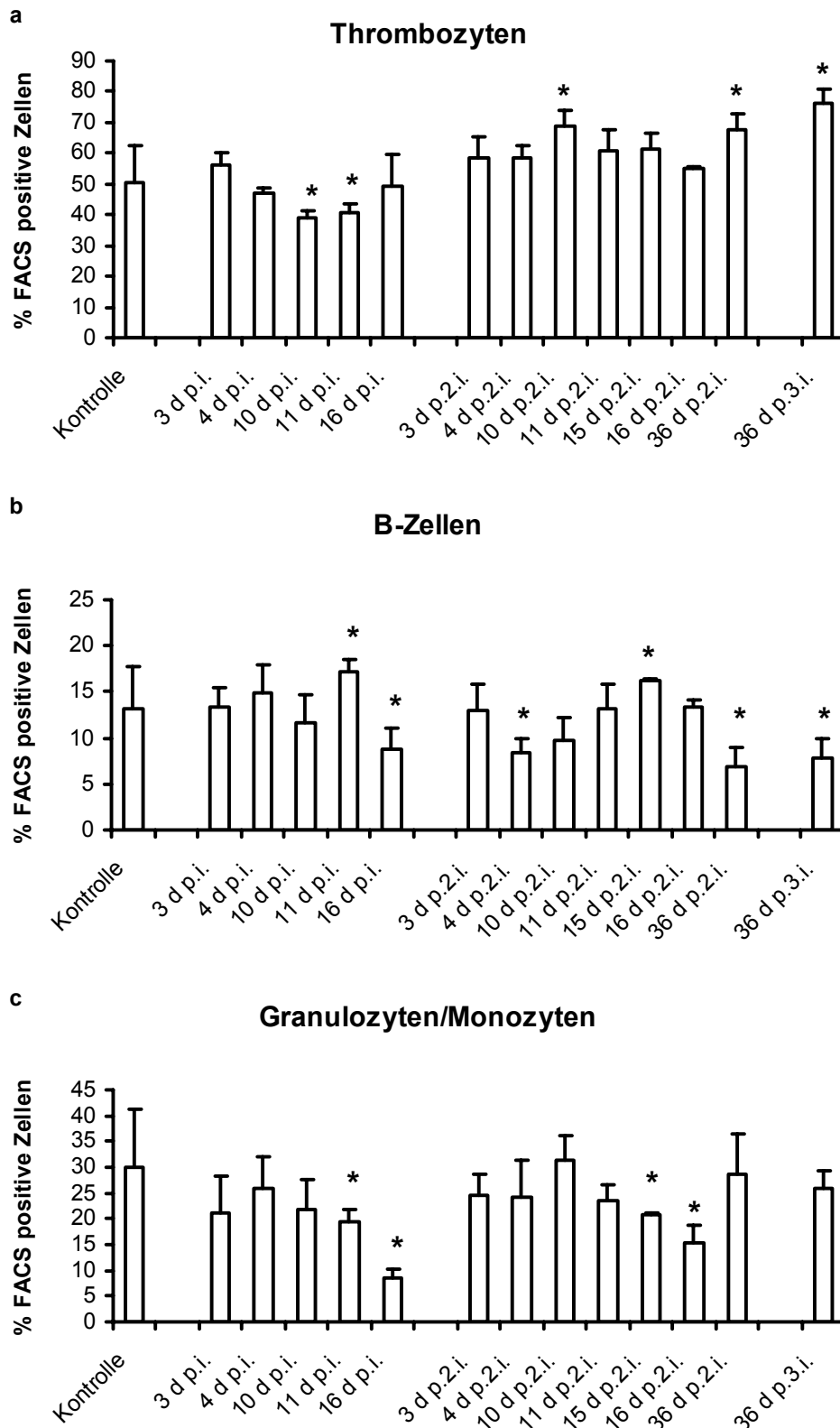


Abb. 3: Analyse der PBL-Subpopulationen VHSV-infizierter Forellen (n=4 pro Tag) mittels Durchflusszytometrie nach Erst- (d p.i.), Zweit- (d p.2.i.) und Drittinfektion (d p.3.i.): a) Thrombozyten, b) B-Zellen und c) neutrophile Granulozyten/Monozyten. Als Kontrollen dienten Daten von unbehandelten Forellen (n=16). * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zu Kontrollfischen ($p < 0,05$).

4.1.2.3 Zellvermittelte Zytotoxizität nach VHSV-Infektion

Die zellvermittelte Zytotoxizität (CMC; cell-mediated cytotoxicity) wurde *in vitro* mittels LDH (Laktatdehydrogenase)-Freisetzungstest bestimmt.

4.1.2.3.1 Entwicklung und Etablierung der Testparameter des CMC-LDH-Assays

4.1.2.3.1.1 Targetzellzahl

Die Targetzellzahl für den LDH-Freisetzungstest musste so gewählt werden, dass die maximal freizusetzende Menge an LDH hoch genug ist, um nach Umsetzung mit dem chromogenen Substrat einen ausreichend hohen Extinktionswert ($>1,2$) zu erreichen. Höhere Targetzellzahlen würden zwar höhere Maximaextinktionen ergeben, jedoch auch höhere Effektorzellzahlen erfordern, um entsprechende Effektorzell-/Targetzell-Verhältnisse zu erreichen. Weiterhin musste beachtet werden, dass die spontane Freisetzung von LDH durch Targetzellen auf niedrigem Niveau gehalten werden sollte.

Es wurden jeweils 5×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 , 3×10^4 , 5×10^4 RTG-2 beziehungsweise EPC auf 96-Kavitäten-Platten ausgesät, über Nacht kultiviert und am nächsten Tag entsprechend dem späteren Testablauf vier Stunden in BSA-Medium kultiviert. Nach Bestimmung der Extinktionswerte für die spontane (TSR = target cell spontaneous release) und maximale (TMR = target cell maximum release; nach Zugabe von Triton X 100) Freisetzung von LDH wurde eine Targetzellzahl von 2×10^4 pro Kavität als günstigste Targetzellzahl festgelegt (Tabelle 6).

Tab. 6: Extinktionswerte der LDH-Freisetzung von Targetzellen. Dargestellt sind die Mittelwerte von 8 Werten (+/- Standardabweichung). n.e. = nicht erfassbar (oberhalb der Messgrenze des ELISA-Readers).

Zellzahl pro Kavität	RTG-2 TSR	RTG-2 TMR	EPC TSR	EPC TMR
5×10^3	0,11 (+/- 0,06)	0,78 (+/- 0,09)	0,11 (+/- 0,02)	1,32 (+/- 0,17)
1×10^4	0,15 (+/- 0,05)	1,10 (+/- 0,06)	0,15 (+/- 0,02)	1,57 (+/- 0,14)
2×10^4	0,17 (+/- 0,02)	1,46 (+/- 0,15)	0,19 (+/- 0,09)	1,93 (+/- 0,23)
3×10^4	0,27 (+/- 0,08)	2,12 (+/- 0,07)	0,23 (+/- 0,08)	2,43 (+/- 0,34)
5×10^4	0,51 (+/- 0,08)	2,44 (+/- 0,33)	0,29 (+/- 0,06)	n.e.

4.1.2.3.1.2 Virusinkubationszeit

VHSV induziert *in vitro* einen CPE (cytopathogenic effect). Bereits bevor ein CPE mikroskopisch wahrnehmbar ist, kommt es zu einer vermehrten Freisetzung von LDH aus virusinfizierten Zellen. Da der Test zur Bestimmung zellvermittelter, aber nicht virusinduzierter zytotoxischer Effekte dienen sollte, durfte die Inkubationszeit mit dem Virus nicht über den Zeitpunkt hinausgehen, ab dem es zu einer virusbedingten zellulären LDH-Freisetzung kommt. Jeweils 2×10^4 Targetzellen wurden ausgesät, kultiviert und mit VHSV bei einer MOI (MOI= multiplicity of infection) von 5 (das heißt 5 infektiöse Partikel pro Targetzelle) infiziert. Die Zellen wurden dann für 5, 10, 13, 18 und 25 Stunden bei 15 °C inkubiert. Für jede Inkubationszeit wurden die spontane und maximale Freisetzung von LDH aus infizierten und nicht infizierten Zellen bestimmt. Um parallel die Zahl infizierter Zellen zu bestimmen, wurden diese fixiert und mittels Immunfluoreszenztest unter Verwendung VHSV-spezifischer Antikörper analysiert (Abbildung 4).

Nach einer Inkubationszeit von 13 h erreichte die LDH-Freisetzung aus infizierten Zellen durchschnittlich 12 % des maximalen LDH-Gehaltes, wobei nahezu 100 % der Targetzellen infiziert waren. Zum gleichen Zeitpunkt hatten nicht infizierte Targetzellen eine LDH-Spontanfreisetzung von 9 % des Maximalwertes erreicht. Bei kürzeren Inkubationszeiten konnte eine 100 %ige Infektion der Targetzellen nicht sichergestellt werden. Bei längerer Inkubationszeit vergrößerte sich der Unterschied zwischen der spontanen Freisetzung von LDH aus infizierten Zellen und der aus

nichtinfizierten Zellen, so dass eine virusbedingte Targetzelllyse nicht mehr sicher von der zu untersuchenden zellvermittelten Targetzelllyse unterscheidbar gewesen wäre.

4.1.2.3.1.3 Virusdosis

Für eine optimale Funktion des Zytotoxizitätsassays mussten möglichst alle Targetzellen virusinfiziert sein, um von zytotoxischen Effektorzellen erkannt zu werden. Das wird normalerweise durch eine MOI von 5 erreicht. Bei der routinemäßigen Überprüfung der Infizierbarkeit von Targetzellen fiel jedoch auf, dass trotz konstanter Beimpfung mit MOI 5 (berechnet aus CPE-bezogener KID_{50}) der Anteil infizierter Targetzellen manchmal deutlich unter 100 % lag. Deshalb wurde vor jedem Versuchsansatz die optimale Virusdosis für eine nahezu 100 %ige Infektion der Targetzellen mittels VHSV-Immunfluoreszenzfärbung bestimmt. Dazu wurden die Targetzellen mit einer MOI von 2 bis 30 beimpft, 13 h bei 15 °C kultiviert, fixiert und mit einem VHSV-spezifischen Antikörper (Abbildung 3) beziehungsweise IHNV-spezifischen Antikörper (nicht abgebildet) markiert. Die so ermittelte Beimpfungsdosis lag für VHSV zwischen MOI 4 und 8, für IHNV zwischen MOI 10 und 25. Die Einstellung der benötigten Virusmenge zur Beimpfung der Targetzellen wurde regelmäßig und unmittelbar vor jeder Versuchsreihe vorgenommen.

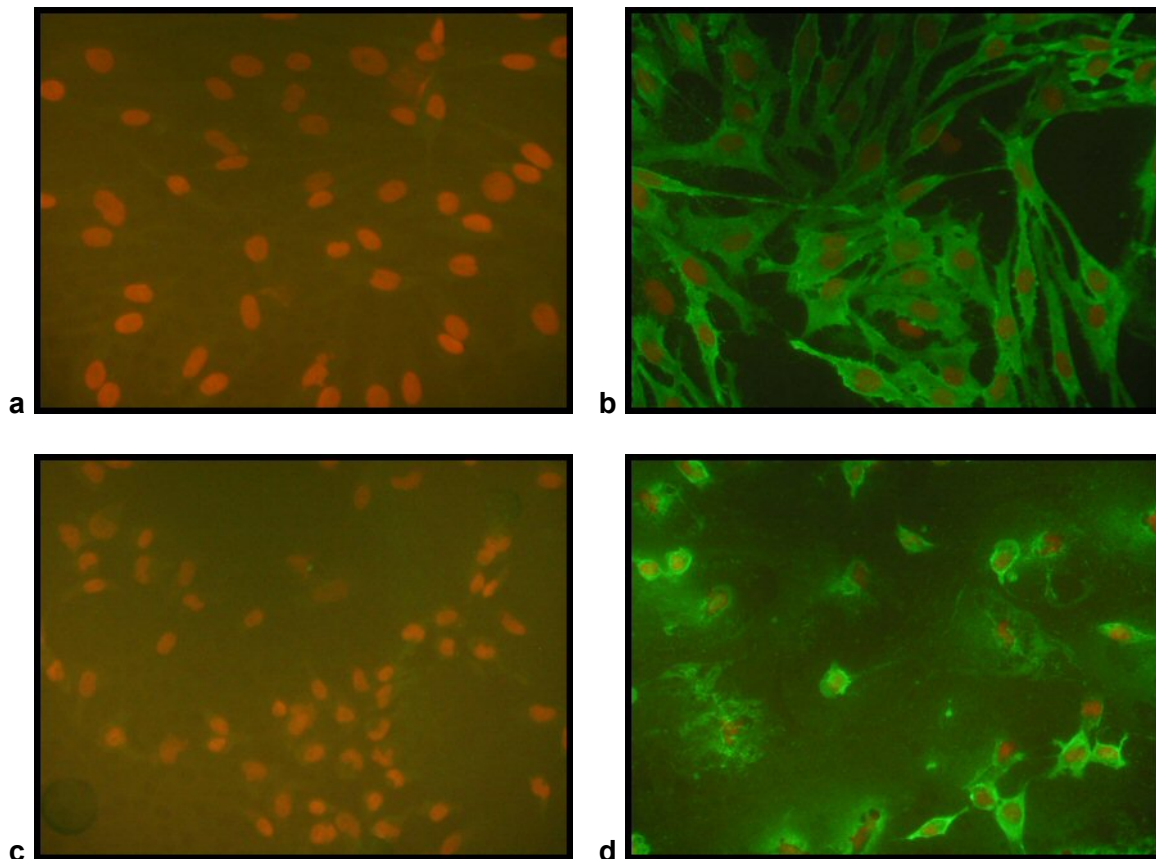


Abb. 4: Immunfluoreszenzfärbung von VHSV-infizierten Targetzellen mit mAk anti-VHSV (BioX), Sekundärantikörper anti-Maus IgG Alexa488, Gegenfärbung mit Propidiumiodid: a) nicht infizierte RTG-2 Kontrolle, b) RTG-2 100 % infiziert, c) nicht infizierte EPC Kontrolle, d) EPC 100 % infiziert. (200fache Vergrößerung).

4.1.2.3.1.4 Abhängigkeit des zytotoxischen Effektes von der Effektorzellzahl

Ein Kriterium für die Funktionalität eines *in vitro* Zytotoxizitätsassays ist die Abhängigkeit des zytotoxischen Effektes vom Effektor- /Targetzellverhältnis (E/T-Ratio). Um diese Dosisabhängigkeit der zellvermittelten Zytotoxizität zu prüfen, wurden bei jedem CMC-Assay vier verschiedene Zellzahlen von PBL jeweils in Zweierstufen verdünnt und mit einer konstanten Anzahl von Targetzellen inkubiert. In Abbildung 5 ist eine solche Dosisabhängigkeit an einem repräsentativen Beispiel dargestellt. Der Anstieg der Zytotoxizität in Abhängigkeit von der Effektorzellzahl ist in diesem Fall nahezu linear, was jedoch auf Grund der Komplexität des Testansatzes nicht in jedem Fall erreicht wurde. Assays ohne Dosisabhängigkeit wurden nicht gewertet.

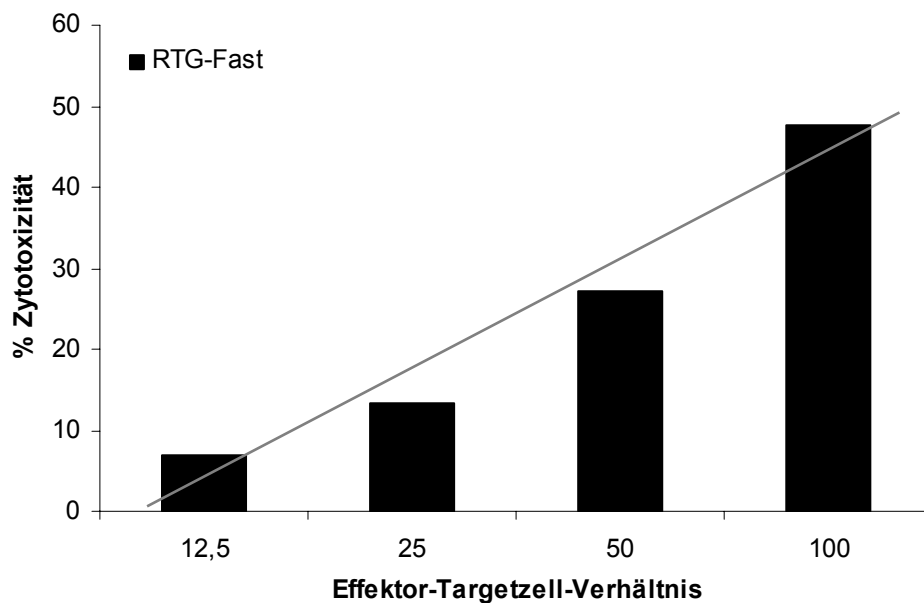


Abb. 5: Zytotoxische Aktivität von Leukozyten VHSV-infizierter Forellen gegen VHSV-infizierte Targetzellen (RTG-2). Beispielhafte Darstellung der Dosisabhängigkeit.

4.1.2.3.2 CMC nach Erstinfektion mit VHSV

Im CMC-Assay wurden jeweils die maximal zur Verfügung stehenden PBL als Effektorzellen eingesetzt. Da, bedingt durch die Leukopenie nach Erstinfektion, weniger PBL pro Forelle separiert werden konnten (siehe 4.1.2.1.) als nach Zweitinfektion, wurden bei konstanter Targetzellzahl unterschiedliche maximale E/T-Ratios erreicht. Diese lagen nach Erstinfektion meistens bei 50:1 und nach Zweitinfektion (wie bei den Kontrolltieren) bei 100:1. Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, erfolgte für die im Folgenden beschriebenen CMC-Assays die Auswertung bei einem E/T-Verhältnis von 50:1.

Die zytotoxische Aktivität von PBL infizierter Forellen gegenüber nicht infizierten und VHSV-infizierten Targetzellen wurde 3, 10, 11 und 16 Tage nach der Infektion an je vier Forellen untersucht (Abbildung 6). Eine positive CMC-Reaktion konnte ab dem zehnten Tag nach Infektion gemessen werden, die sich bis zum 16. Tag noch weiter erhöhte. Die zytotoxische Reaktion war nur gegen infizierte RTG-2-Zellen gerichtet, während infizierte EPC-Zellen nicht lysiert wurden. Nicht infizierte Targetzellen wurden durch PBL infizierter und naiver Forellen nicht lysiert. Dabei spielte es keine

Rolle, welche Targetzellen (RTG-2 oder EPC) verwendet wurden (Ergebnisse nicht dargestellt).

Für eine antivirale zellvermittelte Zytotoxizität mussten also folgende Bedingungen erfüllt sein:

1. Die Effektorzellen stammten von VHSV-infizierten Forellen,
2. die Targetzellen waren VHSV-infiziert,
3. als Targetzellen wurden RTG-2 verwendet. Anmerkung: RTG-2-Zellen exprimieren im Gegensatz zu EPC-Zellen den gleichen MHC-Klasse-I, wie die Effektorzellspender (C25-Forellen).

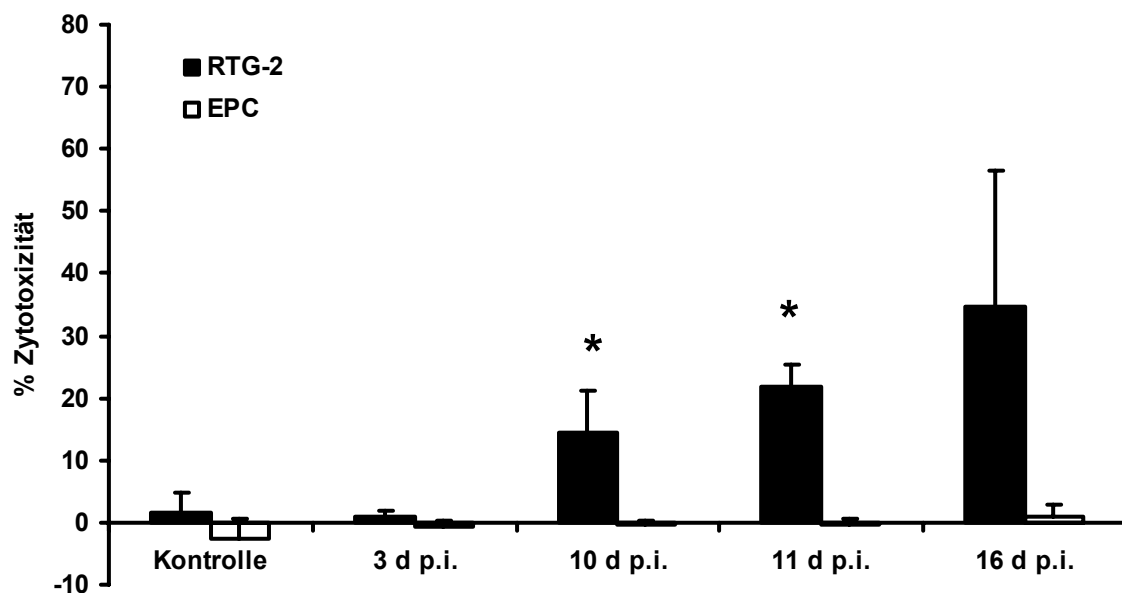


Abb. 6: Zytotoxische Aktivität von PBL VHSV-infizierter Forellen gegen VHSV-infizierte Targetzellen (%) in Abhängigkeit vom d p.i.. Verglichen wurden die Zytotoxizitätswerte bei einem E/T-Ratio von 50:1. * kennzeichnet einen statistisch signifikanten Unterschied zu den Kontrollwerten ($p < 0,05$).

4.1.2.3.3 CMC nach Zweitinfektion mit VHSV

Um die Restimulierbarkeit des Regenbogenforellen-Immunsystems zu prüfen, wurden bereits infizierte Forellen 22 Tage nach der ersten Infektion ein zweites Mal mit VHSV infiziert. Eine zelluläre zytotoxische Reaktion gegen infizierte MHC-Klasse I-kompatible RTG-2-Zellen war über den gesamten Zeitraum der Untersuchungen

messbar, wobei der Maximalwert 11 d p.2.i. erreicht wurde. Dieser lag jedoch nicht signifikant höher als 16 d p.i..

Gegen infizierte MHC-Klasse I-inkompatible EPC-Zellen konnte nur am 11. d p.2.i. eine signifikante zytotoxische Reaktion gemessen werden, die allerdings ein deutlich niedrigeres Niveau aufwies als die gegen RTG-2-Zellen (Abbildung 7).

Nicht infizierte Targetzellen wurden wie nach Erstinfektion zu keinem Zeitpunkt lysiert (nicht dargestellt).

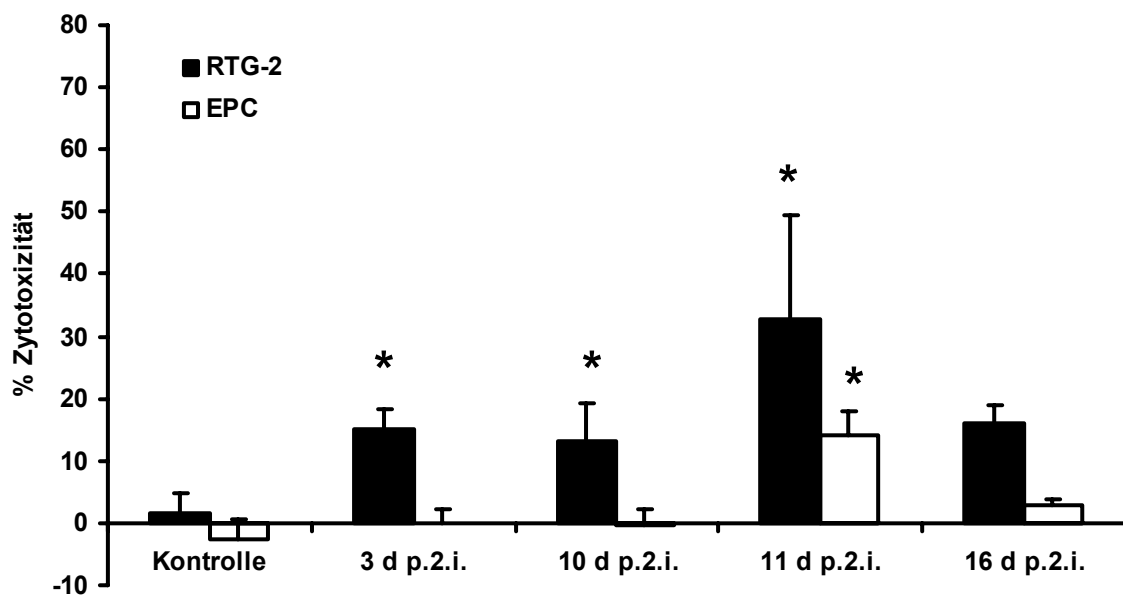


Abb. 7: Zytotoxische Aktivität von Leukozyten zweifach VHSV-infizierter Forellen (Infektionsintervall 21 Tage) gegen VHSV-infizierte Targetzellen (%). Verglichen wurden die Zytotoxizitätswerte für ein E/T-Ratio von 50:1. * kennzeichnet einen statistisch signifikanten Unterschied zu den Kontrollwerten ($p < 0,05$).

4.1.3 Untersuchungen zur humoralen Immunantwort

4.1.3.1 ELISA (VHSV-Gesamtantikörper)

Die Forellenserum des Infektionsversuches wurden in einem Antigen-ELISA auf das Vorhandensein von VHSV-spezifischen Antikörpern (Ak) untersucht. Bereits 3 d p.i. konnte in einem von vier Seren ein geringer VHSV-Antikörper-Titer gemessen

werden. Bis 16 d p.i. stiegen die Ak-Titer nur leicht an. Zu keinem Testzeitpunkt nach der ersten Infektion waren alle Tiere (n = 4) VHSV-Antikörper-positiv (Tabelle 7).

Bereits 3 d p.2.i. hatten sich die Ak-Titer mehr als verdoppelt und stiegen bis 11 d p.2.i. weiter an. 16 d p.2.i. kam es zu einem Titerabfall, wobei nur noch drei von vier Tieren Serum-AK-positiv waren. Diese Seren wurden mehrfach im ELISA getestet, wobei sich die Ergebnisse jeweils bestätigten. 36 Tage nach einer dritten Infektion (d p.3.i.), die 14 Wochen nach Zweitinfektion gesetzt wurde, war das Antikörperniveau wieder angestiegen (Tabelle 7).

Tab. 7: Antikörperantwort nach VHSV-Erst- und Zweitinfektion. Die Antikörpertiter wurden durch einen VHSV-ELISA (3fache Bestimmung) ermittelt und sind als Reziprokwert derjenigen Serumverdünnung angegeben, die noch ein positives Signal ergab (≥ 200).

	Titer	Zahl der ELISA-positiven Seren
3 d p.i.	≤ 200	1 von 4
4 d p.i.	≤ 200	2 von 4
10 d p.i.	≤ 200	1 von 4
11 d p.i.	≤ 400	1 von 4
16 d p.i.	≤ 400	3 von 4
3 d p.2.i.	≤ 800	4 von 4
4 d p.2.i.	≤ 1600	4 von 4
10 d p.2.i.	≤ 1600	4 von 4
11 d p.2.i.	≥ 1600	4 von 4
16 d p.2.i.	≤ 400	3 von 4
36 d p.3.i.	≤ 800	6 von 6
pos. Ko.	> 1600	4 von 4
neg. Ko.	< 200	4 von 4

4.1.3.2 Plaque-Neutralisationstest (PNT)

Die Seren aus dem VHSV-Infektionsversuch wurden zusätzlich in einem PNT auf das Vorhandensein von (Virus-) neutralisierenden Antikörpern (nAk) untersucht. Diese Arbeiten wurden im Labor von Dr. Niels Lorenzen, Danish Veterinary Institut, Arhus, Dänemark durchgeführt. Wie in Tabelle 8 dargestellt, wurden bereits 16 d p.i. alle Seren als positiv getestet. Die nAk-Titer stiegen nach Zweitinfektion kontinuierlich an und blieben im Gegensatz zu den ELISA-Titern ab dem 11 d p.2.i. auf einem konstant hohen Niveau.

Tab. 8: Neutralisierende Antikörper nach VHSV-Infektion (PNT). Die PNT-Titer sind als Reziprokwert derjenigen Serumverdünnung angegeben, welche, im Vergleich zu einer Forellenserumkontrolle, eine 50 %ige Reduktion der Plaqueanzahl ergab. Werte unterhalb eines Titers von 160 wurden als negativ gewertet.

	Titer	Zahl der PNT-positiven Seren
4 d p.i.	≤ 40	0 von 4
11 d p.i.	< 160	0 von 4
16 d p.i.	≥ 1280	4 von 4
4 d p.2.i.	≥ 2560	4 von 4
11 d p.2.i.	> 20480	4 von 4
16 d p.2.i.	> 20480	4 von 4
36 d p.3.i.	> 20480	4 von 4
pos. Ko.	> 10240	6 von 6
neg. Ko.	<160	6 von 6

4.1.4 Untersuchungen zur Expression von mRNA kodierend für CD8 α und NKEF in PBL der Versuchstiere

4.1.4.1 VHSV-Erstinfektion

Die Expression von CD8 α und NKEF mRNA in den Effektor-PBL wurde überprüft, um die antiviralen Effektorzellen näher zu charakterisieren.

Es konnte nachgewiesen werden, dass 10 und 16 d p.i. die CD8 α mRNA-Expression in den PBL infizierter Tiere gegenüber der Expression in Kontroll-PBL erhöht war (Abbildung 8).

Eine signifikante Erhöhung des NKEF-Expressionsniveaus in den PBL infizierter Tiere konnte im Gegensatz zur CD8 α -Expression bereits ab dem 3. d p.i. festgestellt werden (Abbildung 9). Ein Maximum wurde 10 d p.i. erreicht.

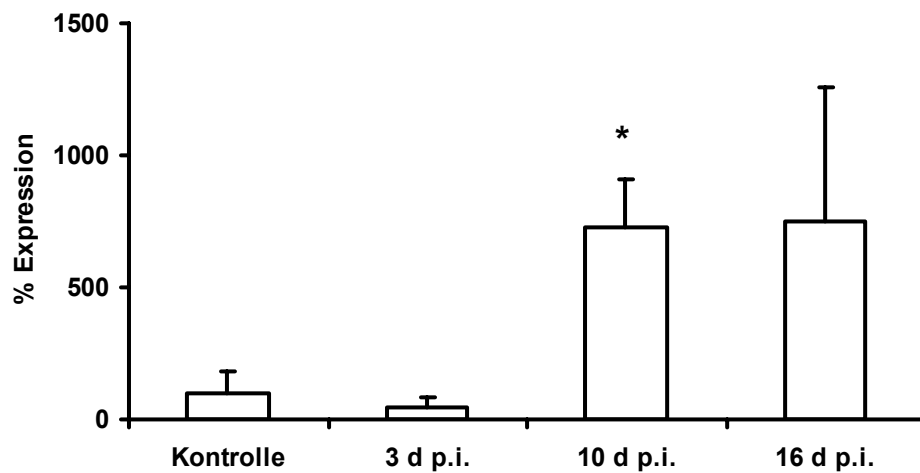


Abb. 8: Expression von CD8 α -mRNA in PBL VHSV-infizierter Forellen. Die Expressionswerte wurden mittels quantitativer RT-PCR bestimmt (n = 4). Die Angabe der Expression erfolgt relativ in Prozent zum Kontrollwert (100 %). * kennzeichnet einen statistisch signifikanten Unterschied zu den Kontrollwerten (p < 0,05).

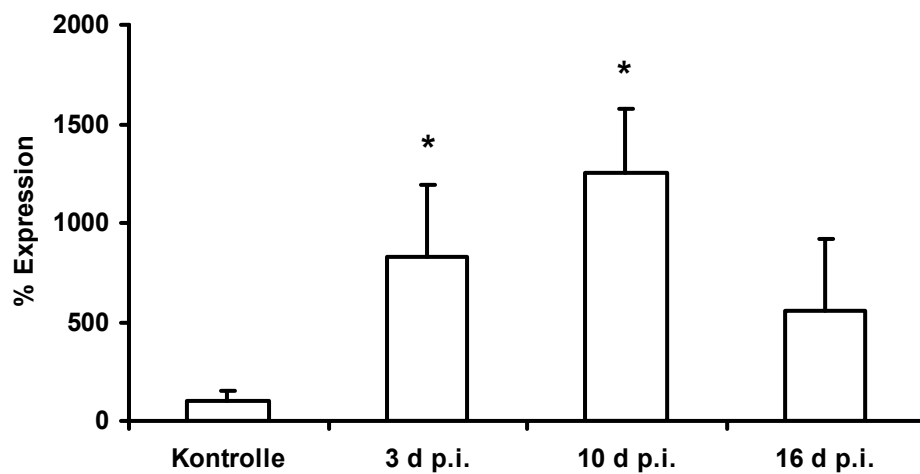


Abb. 9: Expression von NKEF-mRNA in PBL VHSV-infizierter Forellen. Die Expressionswerte wurden mittels quantitativer RT-PCR bestimmt (n = 4). Die Angabe der Expression erfolgt relativ in Prozent zum Kontrollwert (100 %). * kennzeichnet einen statistisch signifikanten Unterschied zu den Kontrollwerten (p < 0,05).

4.1.4.2 VHSV - Zweitinfektion

Abbildung 10 zeigt, dass über den gesamten Untersuchungszeitraum nach Zweitinfektion die Expression von CD8 α -mRNA gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht war. Das Expressionsniveau war dabei fast doppelt so hoch wie nach Erstinfektion.

Eine signifikante Erhöhung der NKEF mRNA-Expression gegenüber den Kontrollwerten konnte auch nach Zweitinfektion gemessen werden. Im Vergleich zur Erstinfektion war das Expressionsniveau jedoch niedriger (Abbildung 11).

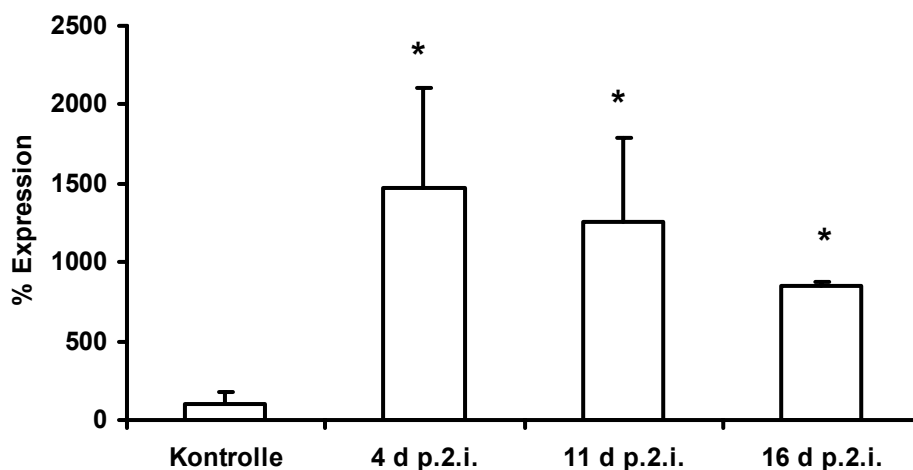


Abb. 10: Expression von CD8 α -mRNA in PBL zweifach VHSV-infizierter Forellen. Die Expressionswerte wurden mittels quantitativer RT-PCR bestimmt (n = 4). Die Angabe der Expression erfolgt relativ in Prozent zum Kontrollwert (100 %). * kennzeichnet einen statistisch signifikanten Unterschied zu den Kontrollwerten (p < 0,05).

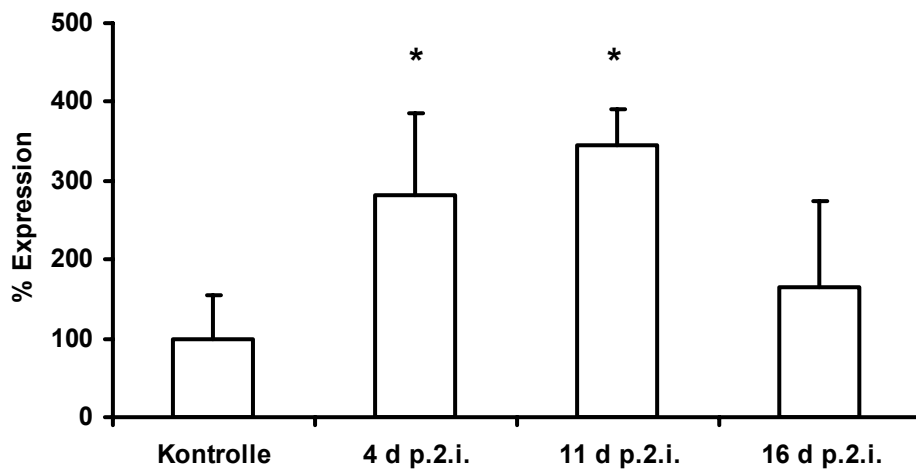


Abb. 11: Expression von NKEF-mRNA in PBL zweifach VHSV-infizierter Forellen. Die Expressionswerte wurden mittels quantitativer RT-PCR bestimmt (n = 4). Die Angabe der Expression erfolgt relativ in Prozent zum Kontrollwert (100 %). * kennzeichnet einen statistisch signifikanten Unterschied zu den Kontrollwerten ($p < 0,05$).

4.2 DNA-Immunisierung

4.2.1 Überprüfung der Plasmid-DNA

Die für die Strukturproteine G und N des VHSV kodierenden Plasmid-DNA-Konstrukte (von Frau Dr. Heike Schütze, Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems zur Verfügung gestellt) wurden vor der Applikation an Versuchstiere durch Restriktionsenzymanalyse sowie durch *in vitro* und *in vivo* Transfektion auf ihre Potenz zur Translationsinduktion der viralen Proteine überprüft.

4.2.1.1 Restriktionsenzymanalyse

Durch die Spaltung der Plasmid-DNA-Konstrukte mit der Enzymkombination Hind III / Not I wurde das VHSV-Insert herausgeschnitten, und es entstanden zwei Produkte unterschiedlicher Länge (Tabelle 2).

Durch Spaltung mit zwei weiteren Enzymen (Verdau mit Pst I ergibt bei pRc/CMV-VG und pRc/CMV-VN jeweils zwei Spaltprodukte; Verdau mit Bam HI ergibt bei pRc/CMV-VG drei Spaltprodukte und bei pRc/CMV-VN zwei Spaltprodukte) konnte die Identität der Konstrukte bestätigt werden.

Auch das leere Kontrollplasmid pRc/CMV wurde mittels Restriktionsenzymanalyse überprüft (Abbildung 12).

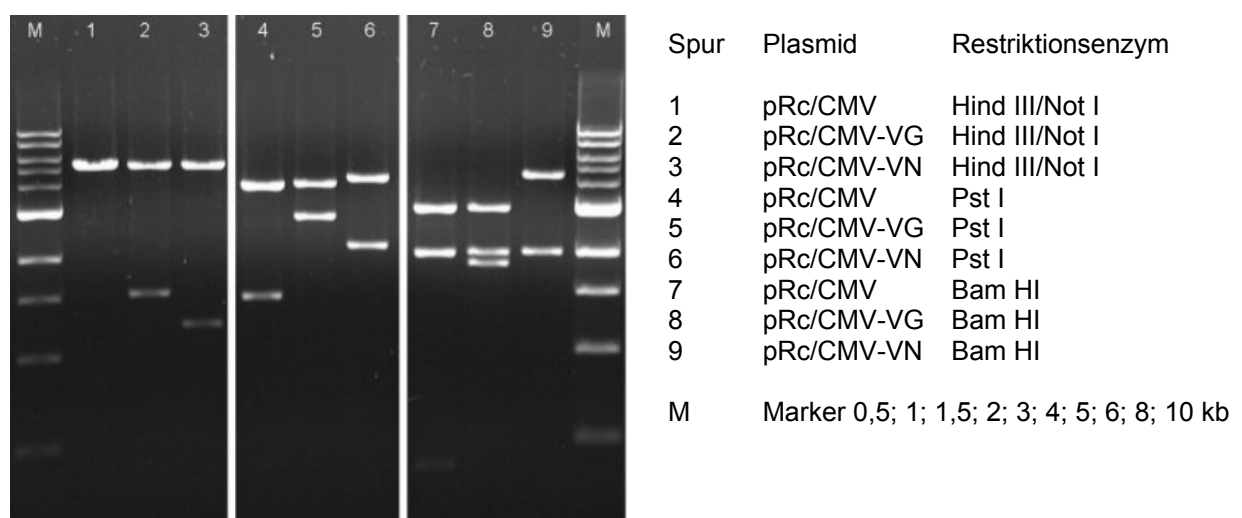


Abb. 12: Agarose-Gel mit Spaltprodukten nach Restriktionsenzymanalyse.

4.2.1.2 *in vitro*-Expression von viralem Protein nach Transfektion

Zur Überprüfung der Plasmidkonstrukte hinsichtlich ihrer Potenz, in Fischzellen die Synthese des jeweiligen viralen Proteins zu induzieren, wurden semikonfluente EPC-Zellen unter Verwendung von Fugene® transfiziert. Sowohl das Plasmid pRc/CMV-VG als auch das Plasmid pRc/CMV-VN wurden in EPC-Zellen transkribiert und in das entsprechende Protein translatiert (Abbildung 13). Die transfizierten Zellen exprimierten die jeweiligen viralen Proteine im Zytoplasma, wobei das G-Protein (Abbildung 13b) auch als feine Linie auf der Plasmamembran zu erkennen war. Das leere Kontrollplasmid pRc/CMV (Abbildung 13a) induzierte keine Virusproteinsynthese.

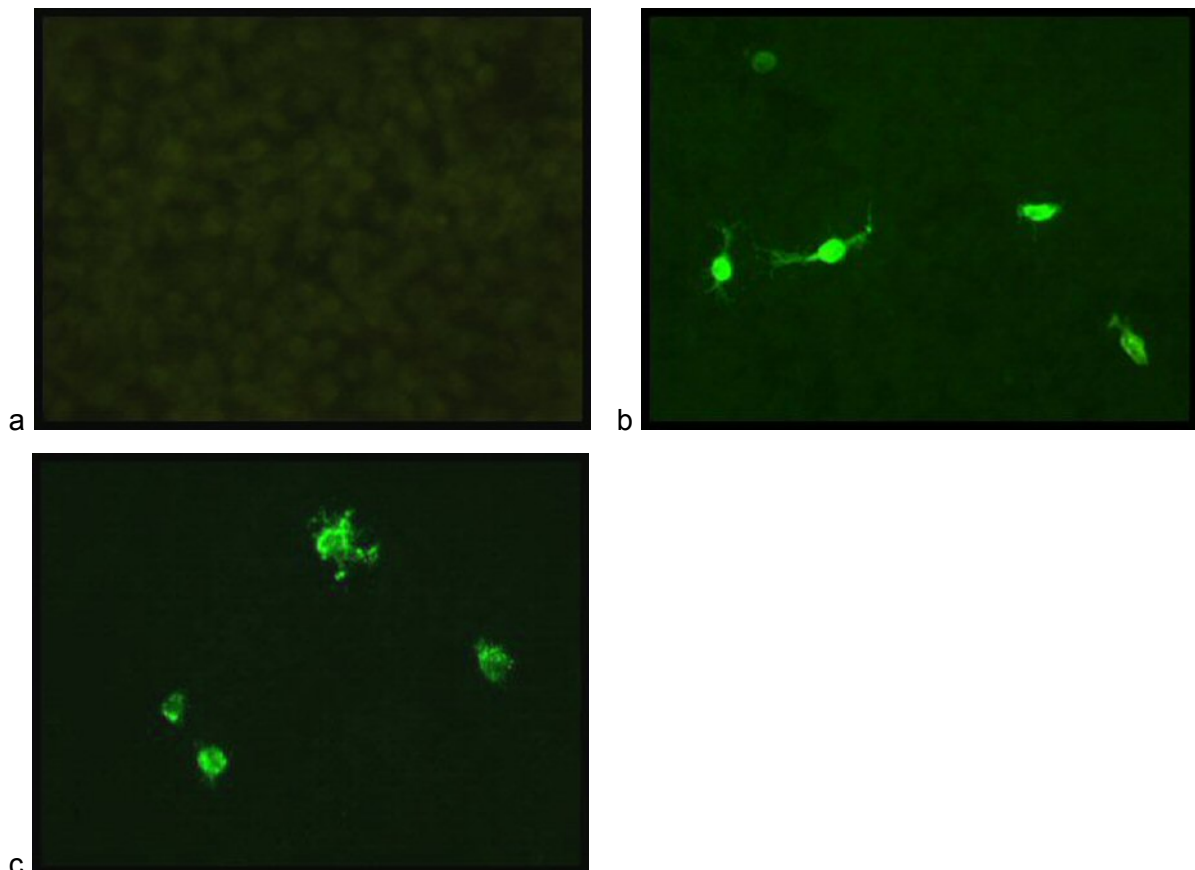


Abb. 13: Transfizierte EPC-Zellen (Aceton-fixiert): a) Transfektion mit leerem Kontrollplasmid (pRc/CMV), b) Transfektion mit pRc/CMV-VG, c) Transfektion mit pRc/CMV-VN. Der Nachweis der gebildeten Virusproteine erfolgte mit einem anti-VHSV-Serum vom Kaninchen und einem anti-Kaninchen-IgG-FITC Konjugat (grün). Vergrößerung: 200fach.

4.2.1.3 *in vivo*-Expression von viralem Protein nach i.m. Injektion

Es konnte gezeigt werden, dass 22 d p.im. (Tage nach Immunisierung) sowohl das Plasmid pRc/CMV-VG als auch das Plasmid pRc/CMV-VN in Muskelzellen DNA-immunisierter Fische eine Proteinexpression an der Applikationsstelle (dorsales Muskelgewebe) induzieren.

Die Expression des G-Proteins wurde durch den mAk IP1D11 in der Zellmembran von Muskelzellen, aber kaum in deren Zytoplasma nachgewiesen (Abbildung 14a). Im Vergleich dazu war die Expression des N-Proteins (Abbildung 14b), gemessen an der Farbintensität nach Markierung mit dem mAk IP5B11 zum selben Zeitpunkt, wesentlich deutlicher ausgeprägt, wobei sowohl im Zytoplasma als auch in der Zellmembran größere Antigenmengen akkumulierten. Infolge der DNA-Applikation war entlang des gesamten Stichkanals eine lokale Entzündungsreaktion zu beobachten. Diese war durch Einwanderung mononukleärer Zellen gekennzeichnet. Ein Teil dieser mononukleären Zellen mit makrophagenähnlicher Morphologie enthielt virales Protein (Abbildung 14b).

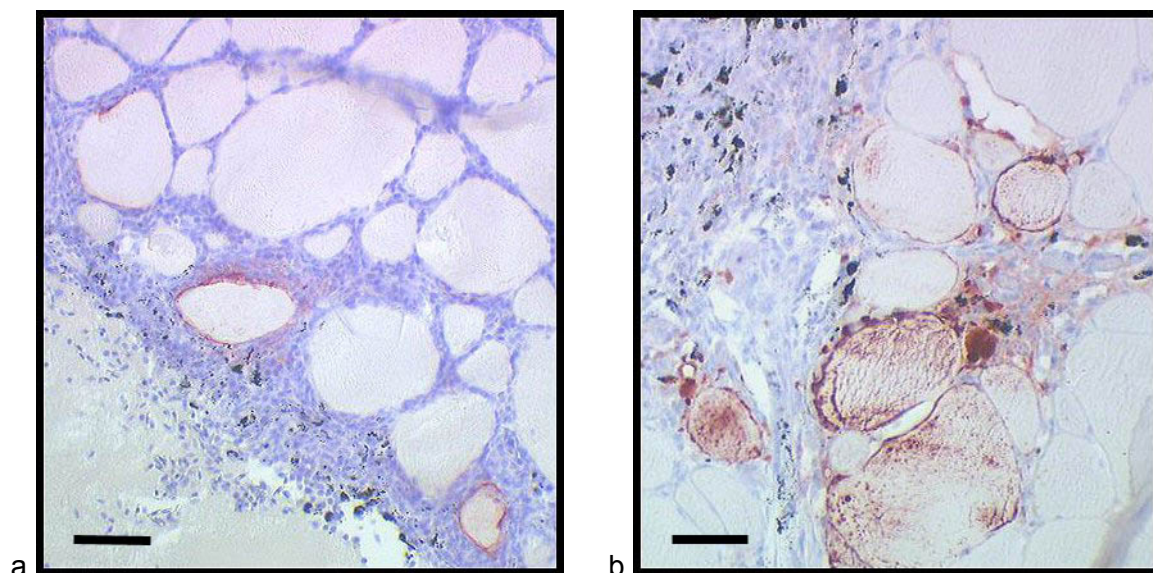


Abb. 14: Expression von viralen Proteinen an der Applikationsstelle im dorsalen Muskelgewebe des Fisches. Der Stichkanal wurde mit Tätowiertusche (schwarz) sichtbar gemacht, welche der Plasmid-DNA-Suspension beigemischt war. Die Färbung der Muskelschnitte erfolgte mit der ABC-Methode (virale Proteine rotbraun). a) 22 Tage nach Applikation des Konstruktes pRc/CMV-VG; b) 22 Tage nach Applikation des Konstruktes pRc/CMV-VN; Gegenfärbung mit Hämatoxylin. [Bar(a) = 150 μ m, Bar(b) = 80 μ m]

4.2.2 Untersuchungen zur adaptiven humoralen Immunantwort nach DNA-Immunisierung

Die Seren sämtlicher Forellen aus den Immunisierungsversuchen wurden in einem VHSV-Antigen-ELISA auf das Vorhandensein VHSV-spezifischer Antikörper untersucht. In 86 % aller Seren von Forellen, die dreimalig mit dem Plasmid pRc/CMV-VG (n = 66) immunisiert wurden, konnten VHSV-spezifische Antikörper detektiert werden. Als positiv wurden nur solche Seren gewertet, bei denen im ELISA bei Verdünnung 1:200 noch eine positive Extinktion gemessen werden konnte. Einige Seren wiesen Titer von über 1:1600 auf. In den Seren von pRc/CMV-VN immunisierten Forellen (n = 18) und von pRc/CMV-Kontrollforellen (n = 14) konnten keine VHSV-spezifischen Antikörper detektiert werden. Ein Serum von insgesamt 40 Kontrollforellen, denen anstelle von Plasmid-DNA PBS⁻ verabreicht wurde, war bei einem niedrigen Titer von 1:200 (falsch) positiv (Tabelle 9).

Tab. 9: Antikörperantwort nach DNA-Immunisierung. Bestimmung der Antikörpertiter im VHSV-ELISA durch Errechnung des Reziprokwertes derjenigen Serumverdünnung, die gerade noch ein positives Signal ergab (Werte ab 200).

AK-Titer	pRc/CMC-VG	pRc/CMV-VN	pRc/CMV	PBS ⁻
% positiv	86	0	0	2
> 1600	3	-	-	-
1600	6	-	-	-
800	9	-	-	-
400	18	-	-	-
200	21	-	-	1
< 200 (negativ)	9	18	14	40

4.2.3 Untersuchungen zur zellulären Immunantwort nach DNA-Immunisierung

4.2.3.1 PBL-Kapazität

Nachdem die Forellen vollständig entblutet und deren Leukozyten über eine Percoll-Gradienten (Dichte 1,075g/cm³) separiert wurden, erfolgte die Bestimmung der pro Forelle zur Verfügung stehenden peripheren Blutleukozyten (PBL). Dabei wurde

deutlich, dass eine dreimalige DNA-Immunisierung zu keinen diesbezüglich signifikanten Veränderungen führte (Tabelle 10).

Tab. 10: Anzahl der Gesamtleukozyten, die während der Immunisierungsversuche von den Versuchstieren isoliert werden konnten (+/- Standardabweichung).

Immunisierung	pRc/CMV-VG	pRc/CMV-VN	PBS ⁻	pRc/CMV	Kontrollen
PBL-Zahl	1,1 (+/-0,4) x 10 ⁸	1,5 (+/-0,9) x 10 ⁸	1,1 (+/-0,5) x 10 ⁸	1,2 (+/-0,3) x 10 ⁸	1,2 (+/-0,5) x 10 ⁸
n	68	32	42	21	48

4.2.3.2 Durchflusszytometrie

Bei jedem Versuchsansatz wurde das Verteilungsmuster bestimmter Leukozytensubpopulationen innerhalb der PBL der Forellen mittels populationsspezifischer mAk gegen Forellen-Thrombozyten (mAk 42-1), Forellen-B-Zellen (mAk 4C10) und Forellen-Granulozyten/Monozyten (mAk Q4E) durchflusszytometrisch bestimmt (Abbildung 15)

Es konnten keine signifikanten Verschiebungen im Verteilungsmuster der untersuchten Leukozytenfraktionen nach DNA-Immunisierung festgestellt werden.

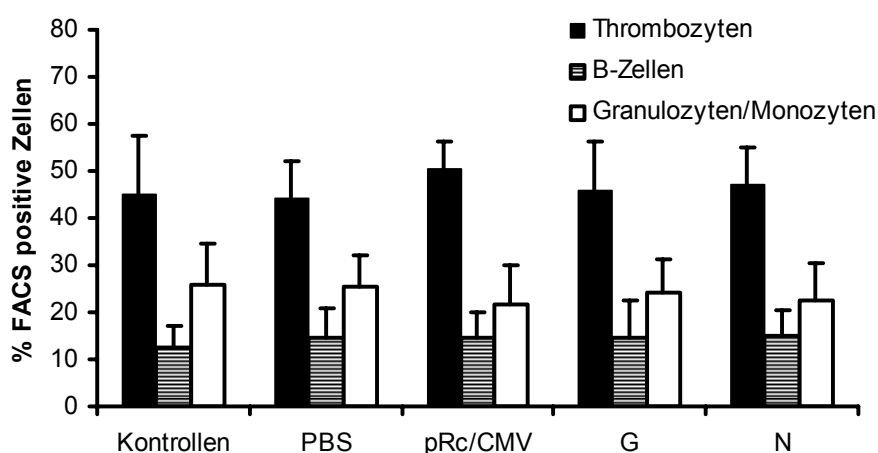


Abb. 15: Durchflusszytometrische Analyse der PBL nach DNA-Immunisierung. (Kontrollen = naive Forellen; PBS = Scheinimmunisierung mit PBS⁻; pRc/CMV = Scheinimmunisierung mit pRc/CMV-Leerplasmid; G = Immunisierung mit pRc/CMV-VG; N = Immunisierung mit pRc/CMV-VN).

4.2.3.3 Ergebnisse der Zytotoxizitätstests (CMC-LDH)

Die zytotoxische Aktivität von PBL immunisierter Forellen wurde in mehreren Parallelversuchen über einen Zeitraum von mehr als 2 Jahren gemessen. Die Forellen waren mit Plasmid-DNA pRc/CMV-V \mathbf{G} (kodierend für das Glykoprotein; n = 43) oder pRc/CMV-V \mathbf{N} (kodierend für das Nukleokapsidprotein; n = 21) immunisiert worden. Kontrolltieren wurde eine entsprechende Menge PBS⁻ (n=38) beziehungsweise leeres Plasmid (pRc/CMV) injiziert (n = 13).

Zunächst wurden alle Daten ohne saisonalen Bezug über den gesamten Versuchszeitraum zusammengefasst und bewertet. Dabei fielen jedoch Unterschiede beim Vergleich der Zytotoxizitätswerte für die Sommer- (März bis August) und die Wintermonate (September bis Februar), insbesondere nach DNA-Immunisierung mit pRc/CMV-V \mathbf{N} , auf. Deshalb erfolgt die Darstellung der Ergebnisse für die Sommer- und Wintermonate separat.

4.2.3.3.1 Kontrollgruppen

Als Kontrolltiere wurden Forellen verwendet, denen entweder PBS⁻ [n=19 (Sommer); n=19 (Winter)] oder leere Plasmid-DNA (pRc/CMV) [n=5 (Sommer); n=8 (Winter)] injiziert worden war. Die saisonbezogene Auswertung der Messdaten der Kontrollgruppen wurde in Abbildung 16a (Sommer), b (Winter) (jeweils drittes und viertes Balkenpaar) dargestellt.

Eine geringe zytotoxische Grundaktivität ist dabei zu erkennen. Für beide Kontrollgruppen konnten jedoch keine saisonalen Unterschiede in der Basiszytotoxizität errechnet werden.

Weder in der Sommer-, noch in der Winterperiode konnte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Kontrollgruppen festgestellt werden.

4.2.3.3.2 Immunisierung mit pRc/CMV-VG

PBL von Fischen, die mit Plasmid-DNA pRc/CMV-VG [n=23 (Sommer); n=20 (Winter)] immunisiert wurden, waren über das gesamte Jahr in der Lage, sowohl infizierte **RTG-2**-Zellen als auch infizierte **EPC**-Zellen statistisch signifikant verschieden von den Kontrollen zu lysieren. Es ließen sich jedoch jahreszeitliche Unterschiede feststellen (Abbildung 16a; b; jeweils erstes Balkenpaar).

Die zytotoxische Aktivität von PBL **G**-immunisierter Forellen gegen infizierte **RTG-2**-Zellen war im Winter statistisch signifikant höher als im Sommer ($p < 0,05$), wohingegen die Zytotoxizitätswerte gegenüber infizierten **EPC**-Zellen keinen saisonalen Schwankungen unterlagen.

Eine zytotoxische Aktivität gegen infizierte **RTG-2**-Zellen konnte im Winter bereits bei einem E/T-Ratio von 12,5:1, im Sommer bei 25:1 festgestellt werden (nicht abgebildet). Bei **EPC**-Zellen konnte sowohl im Sommer als auch im Winter ab einem E/T-Ratio von 50:1 eine zytotoxische Aktivität nachgewiesen werden (nicht abgebildet).

Während der Sommermonate konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zytotoxizitätswerten gegenüber infizierten **RTG-2**-Zellen und denen gegen infizierte **EPC**-Zellen festgestellt werden, wohingegen in der Winterperiode die Zytotoxizität gegenüber infizierten **RTG-2**-Zellen signifikant höher war als gegenüber infizierten **EPC**-Zellen ($p > 0,01$).

4.2.3.3.3 Immunisierung mit pRc/CMV-VN

Im Gegensatz zur G-immunisierten Gruppe lysierten PBL **N**-immunisierter Forellen [n=13 (Sommer); n=8 (Winter)] ausschließlich infizierte **RTG-2**-Zellen (Abbildung 16a, b; jeweils zweites Balkenpaar).

Die zytotoxische Aktivität der PBL gegenüber infizierten **RTG-2**-Zellen war im Sommer ab einem E/T-Ratio von 50:1 statistisch signifikant höher als die der Kontrollen. Die Zytotoxizitätswerte aus der Sommerperiode sind außerdem signifikant höher als die im Winter ermittelten Messwerte ($p < 0,05$).

In der Winterperiode waren die Zytotoxizitätswerte bei allen E/T-Ratios zu niedrig, als dass signifikante Unterschiede im Vergleich zu Kontrollgruppen festgestellt werden konnten.

4.2.3.3.4 Zusammenfassende Darstellung der CMC-Ergebnisse für E/T-Ratio 100:1

Um den Einfluss der Virusproteine G und N auf die Generierung zytotoxischer Abwehrzellen im Fisch für eine abschließende Beurteilung übersichtlicher herauszustellen, wurden die CMC-Ergebnisse für ein konstantes E/T-Ratio von 100:1 in jeweils einem Diagramm pro Saison zusammengestellt (Abbildung 16a, b).

In der Sommersaison wurden sowohl von **G**- als auch von **N**-Protein-immunisierten Forellen antivirale zytotoxische Zellen generiert. PBL von C25 Forellen, die mit pRc/CMV-VN immunisiert wurden, lysierten lediglich MHC-Klasse-I-kompatible virusinfizierte **RTG-2**-Zellen, nicht aber infizierte **EPC**-Zellen.

In der Wintersaison waren nur PBL von **G**-Protein-immunisierten Forellen befähigt, antivirale zytotoxische Effektorzellen zu bilden, wobei wie auch im Sommer MHC-Klasse-I-kompatible **RTG-2** und nicht kompatible **EPC**-Zellen lysiert wurden.

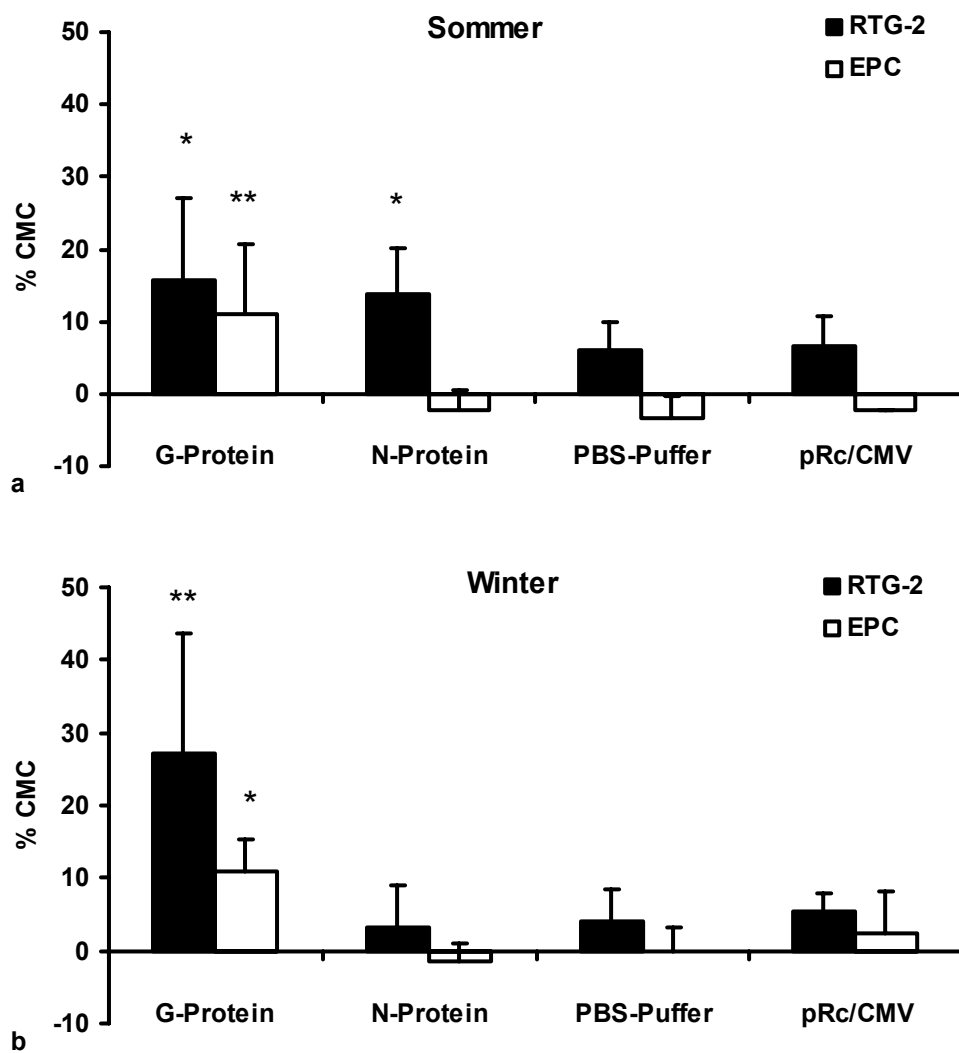


Abb. 16: Zytotoxische Aktivität von PBL Plasmid-DNA immunisierter Forellen gegen VHSV-infizierte Targetzellen. a) im Sommer, b) im Winter. Verglichen wurden die Zytotoxizitätswerte bei einem E/T-Ratio von 100:1. Statistisch signifikante Unterschiede zu beiden Kontrollgruppen (PBS, pRc/CMV) sind mit * ($p < 0,05$) und ** ($p < ,001$) gekennzeichnet.

4.2.3.3.5 Virusspezifität der CMC

Zur Prüfung der Virusspezifität zytotoxischer Effektorzellen DNA-immunisierter Forellen wurde in einem Versuchsansatz die CMC gegen VHSV-infizierte Targetzellen (autologes Virus) mit der CMC gegen IHNV-infizierte Targetzellen (heterologes Virus) verglichen. Der Versuch wurde im November (Wintersaison) durchgeführt.

Da die Effektorzellen bei diesem Ansatz auf die doppelte Anzahl von Targetzellen aufgeteilt werden mussten, wurden E/T-Ratios von höchstens 60:1 erreicht.

PBL von Forellen die mit pRc/CMV-VG immunisiert worden waren, lysierten, wie schon zuvor beschrieben, sowohl VHSV-infizierte RTG-2- als auch VHSV-infizierte EPC-Targetzellen bei statistisch signifikantem Unterschied zu den Kontrollen (pRc/CMV) (Abbildung 17a).

IHNV-infizierte Targetzellen wurden von PBL pRc/CMV-VG-immunisierter Forellen zwar lysiert (Abbildung 17b), jedoch in geringerem Maße als VHSV-infizierte Targetzellen. Statistisch gesehen waren zu den Kontrollwerten allerdings keine Unterschiede festzustellen.

PBL von Protein **N**-sensibilisierten Forellen konnten sowohl VHSV-infizierte (Abbildung 17a; zweites Balkenpaar) als auch IHNV-infizierte RTG-2-Zellen (Abbildung 17b; zweites Balkenpaar) auf einem niedrigen Niveau lysieren, nicht aber infizierte EPC-Zellen. Die ermittelten Werte waren jedoch statistisch nicht signifikant verschieden von den pRc/CMV-Kontrollen (Abbildung 17a, b; jeweils drittes Balkenpaar).

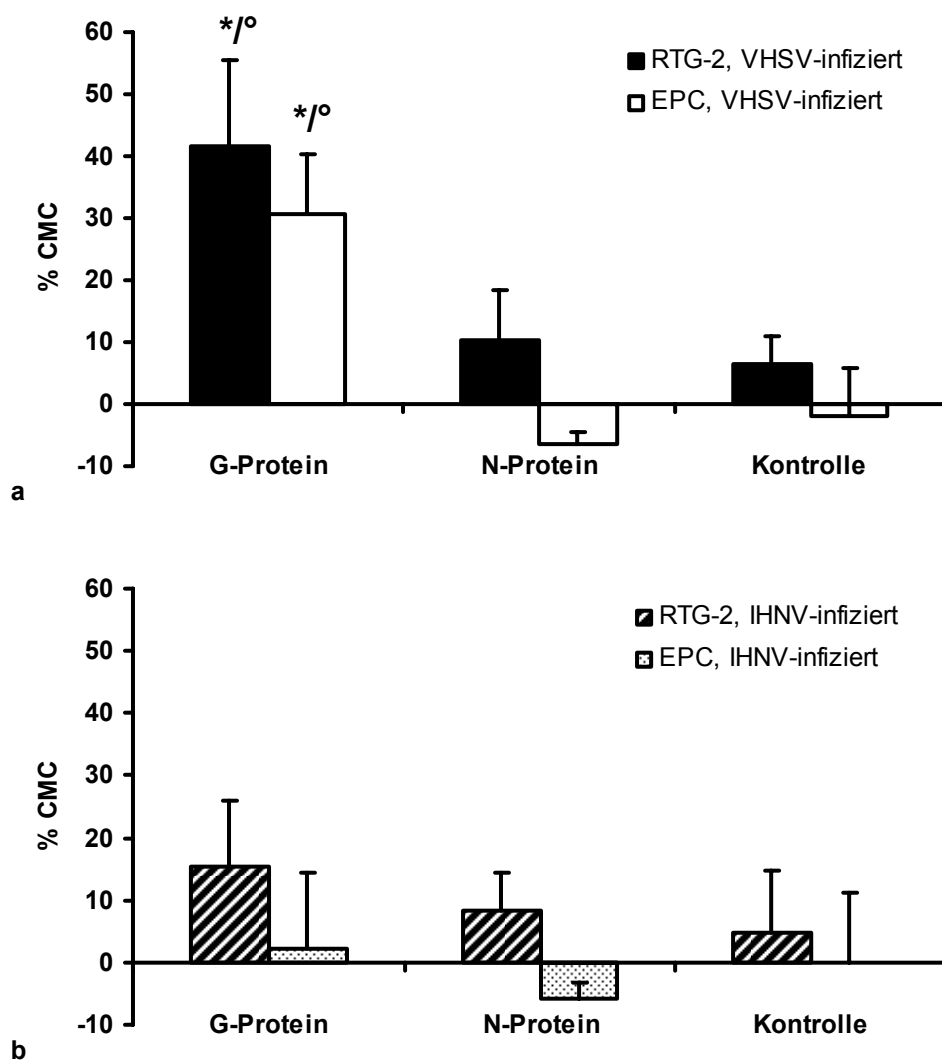


Abb. 17: Zytotoxische Aktivität von PBL Plasmid-DNA immunisierter Forellen ($n = 6$) gegen a) VHSV-infizierte Targetzellen und b) IHNV-infizierte Targetzellen. Verglichen wurden die Zytotoxizitätswerte bei einem E/T-Ratio von 60:1. Den Kontrolltieren wurde das leere Plasmid pRc/CMV verabreicht. * kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zu den Kontrollen ($p < 0,05$); ° kennzeichnet statistisch signifikante Unterschiede zu den Zytotoxizitätswerten auf den jeweils homologen IHNV-infizierten Targetzellen ($p < 0,05$).

4.2.3.4 Korrelation zwischen Antikörpertiter und CMC

Eine Antikörperbildung erfolgte ausschließlich nach Immunisierung mit VHSV-G-Protein kodierender DNA. Dabei wiesen 86 % aller Tiere (n = 66) Antikörpertiter von mindestens 1:200 auf. Die Titer lagen im Durchschnitt bei 1:600. Bei einem Vergleich der Höhe der ermittelten Antikörpertiter mit der Höhe der Werte, die im Zytotoxizitätstest erreicht wurden, konnte keine Korrelation festgestellt werden.

4.2.4 Untersuchungen zur Expression von mRNA kodierend für CD8 α und NKEF

4.2.4.1 CD8 α -Expression in PBL

PBL von DNA-immunisierten und Kontroll-Fischen wurden auf ihre Expression von CD8 α -mRNA mittels quantitativer RT-PCR untersucht. Die Daten wurden jeweils wieder saisonal getrennt erhoben.

Die Abbildung 18a zeigt eine Erhöhung der CD8 α -mRNA-Expression in den PBL nach Immunisierung mit G-Protein- und N-Protein-kodierender DNA in den Sommermonaten. Im Unterschied dazu konnte im Winter (Abbildung 18b) ausschließlich eine Erhöhung der CD8 α -mRNA-Expression in G-Protein-sensibilisierten PBL festgestellt werden. Die ermittelten Werte unterlagen großen individuellen Schwankungen und waren deshalb zu Kontrollgruppen statistisch nicht signifikant verschieden.

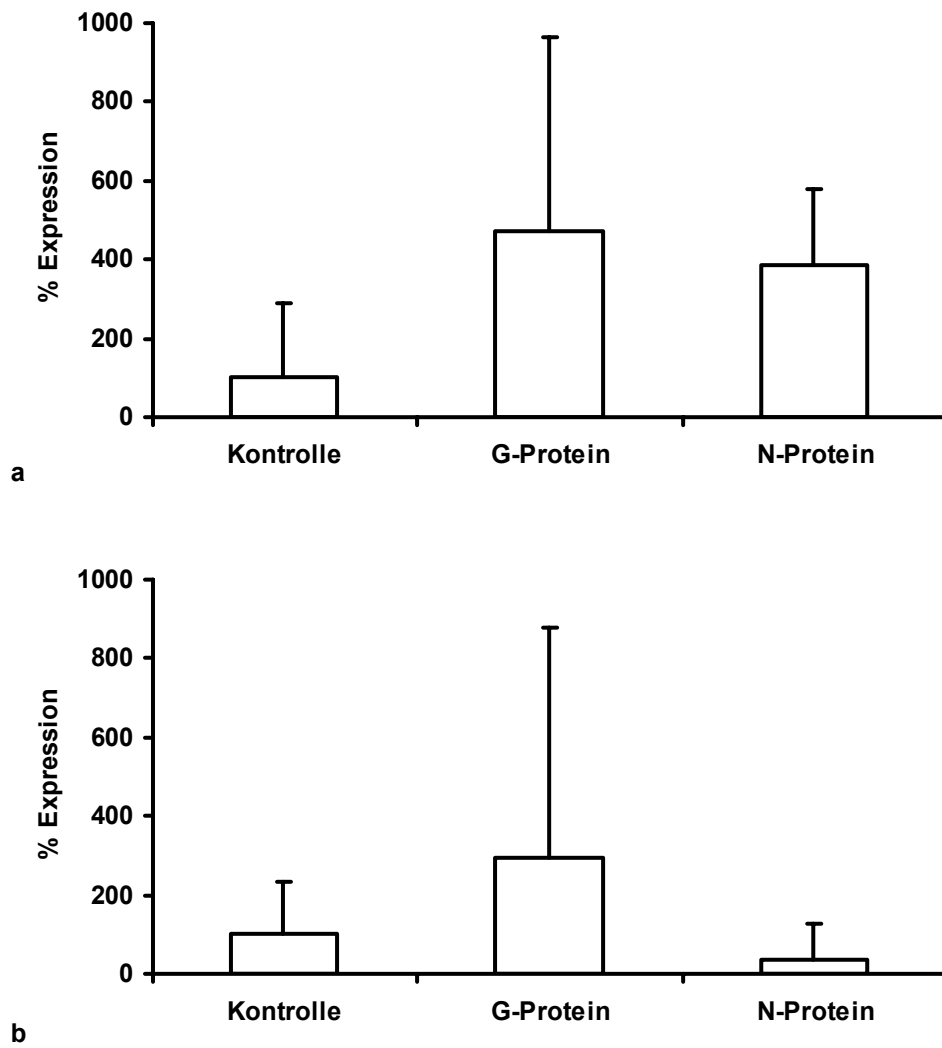


Abb.18: Expression von CD8 α -mRNA in PBL DNA-immunisierter Forellen. a) im Sommer und b) im Winter. Die Expressionswerte wurden mittels quantitativer RT-PCR bestimmt (n = 6). Die Angabe der Expression erfolgt relativ in Prozent zum Kontrollwert (100 %).

4.2.4.2 NKEF-Expression in PBL

Die Abbildungen 20a und b zeigen vor allem während der Sommermonate eine Erhöhung der NKEF-mRNA-Expression in den PBL nach Immunisierung mit G-Protein-kodierender DNA. Die ermittelten Werte unterlagen großen individuellen Schwankungen und waren zu den Kontrollgruppen statistisch nicht signifikant verschieden. In PBL von N-immunisierten Forellen konnte keine Erhöhung der NKEF-Expression festgestellt werden.

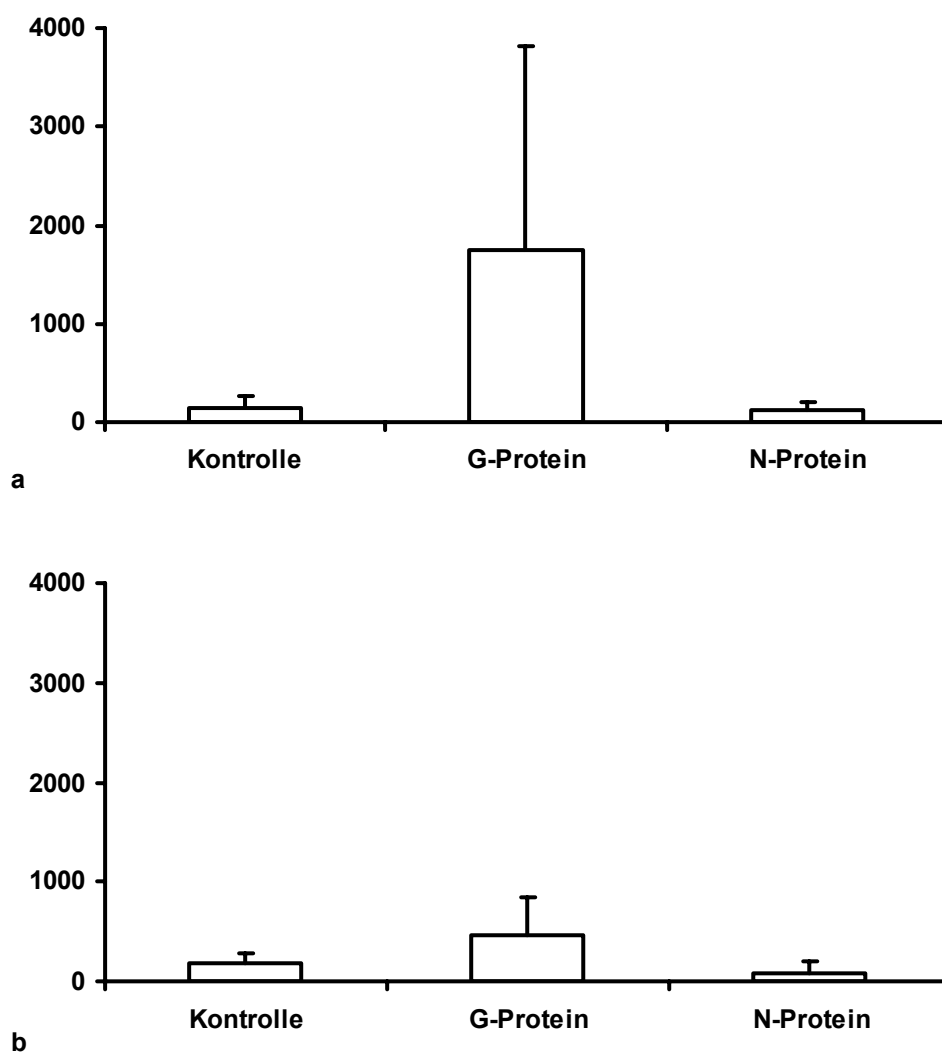


Abb. 20: Expression von NKEF-mRNA in PBL DNA-immunisierter Forellen a) im Sommer und b) im Winter. Die Expressionswerte wurden mittels quantitativer RT-PCR bestimmt (n = 6). Die Angabe der Expression erfolgt relativ in Prozent zum Kontrollwert (100 %).