

## 5. Diskussion

Die Immunreaktionen von Fischen bei der Infektabwehr werden in vielen Fällen nur unzureichend aufgeklärt. Oftmals beschränken sich diesbezügliche Untersuchungen auf die Ermittlung des Antikörperstatus als Parameter der adaptiven humoralen Immunantwort. Humorale Antikörper allein reflektieren jedoch häufig nicht die Fähigkeit eines Organismus, eine Infektionskrankheit erfolgreich abzuwehren, so dass weitere humorale und zelluläre Immunmechanismen in Betracht gezogen werden müssen. Dazu kommt, dass niemals einzelne Immunsystemkomponenten für sich allein die Infektabwehr bedingen. Vielmehr beruht die Infektabwehr auf einem Zusammenspiel angeborener und adaptiver Immunreaktionen auf humoraler und zellulärer Ebene. Bei Fischen, denen im Vergleich zu Säugern, insbesondere zu Mensch und Maus, ein verhältnismäßig untergeordnetes wissenschaftliches Interesse beigemessen wird, sind komplexe Immunreaktionen unzureichend untersucht. Das Verständnis solcher Immunreaktionen erlangt jedoch zunehmend an Bedeutung, da in Zukunft die Aquakultur im wesentlichen Maße zur Versorgung mit hochwertigen Nahrungsmitteln beitragen wird.

Um die oben genannten Defizite im Verständnis der Infektabwehr von Fischen abzubauen, war es Ziel dieser Arbeit, zelluläre Immunparameter bei einer wirtschaftlich bedeutsamen Virusinfektion der Regenbogenforelle als wertvollem Speisefisch der Aquakultur zu untersuchen. Die Arbeit besteht im Wesentlichen aus zwei Abschnitten. Im ersten Teil wurden Parameter der Immunantwort der Regenbogenforelle während der Infektion mit dem VHS-Virus charakterisiert. Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Immunreaktion dahingehend zergliedert, dass die Reaktion des Immunsystems auf diskrete Virusproteine des VHSV untersucht werden konnte. Hierbei kam die DNA-Immunsierung zum Einsatz. Für diese Untersuchungen wurde bei Forellen erstmals ein Testsystem zur Messung der antiviralen zellvermittelten Zytotoxizität nach einer Viruskrankheit etabliert. Die Untersuchungen wurden unter anderem durch Analysen zur Expression immunologisch relevanter Gene mittels quantitativer RT-PCR, durch Darstellung von Leukozytensubpopulationen mittels Durchflusszytometrie und durch Antikörper-nachweise komplementiert.

Der wesentliche Teil der gewonnenen Daten stützt sich auf ein komplexes Testverfahren zur Erfassung der zellvermittelten Zytotoxizität. Bevor die Ergebnisdiskussion im Einzelnen erfolgen kann, muss daher auf die Testentwicklung und die sie beeinflussenden Parameter eingegangen werden. In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sowohl Regenbogenforellen des Klons C25 als auch die Forellenzelllinie RTG-2 das klassische MHC-Klasse-I-Allel *Onmy-UBA\*501* exprimieren (Dijkstra et al., 2003). Dadurch war es möglich, ein Testsystem zu entwickeln, mit dem eine MHC-Klasse-I-restringierte zellvermittelte Zytotoxizität in der Regenbogenforelle untersucht werden konnte. PCR-Untersuchungen mit *Onmy-UBA\*501*-spezifischen Primern sowie Fluoreszenzfärbungen mit einem *Onmy-UBA\*501*-spezifischen mAk hatten gezeigt, dass die als Kontrolltargetzellen verwendeten cypriniden EPC-Zellen erwartungsgemäß keinen den Forellen ähnlichen MHC-Klasse-I exprimieren (unveröffentlicht). Demzufolge kann davon ausgegangen werden, dass der TCR der Effektorzellen des Forellenkons C25 nach der Definition von Doherty und Zinkernagel (1975) mit dem MHC-Klasse-I der EPC-Zellen inkompatibel ist. Im Zuge der Testentwicklung wurden außer der vom Karpfen stammenden EPC-Zelle auch mehrere Regenbogenforellen-Zelllinien getestet, deren MHC-Klasse-I verschieden von dem des Forellenkons C25 ist. Keine dieser potentiellen Kontrollzelllinien war in der Lage, die von uns geforderten Kriterien einer Zielzelle zu erfüllen, nämlich sowohl VHSV zu replizieren als auch eine für den Test ausreichende LDH-Menge freizusetzen.

Es gibt eine Reihe von unterschiedlichen Verfahren zur Zytotoxizitätsmessung. Klassische Verfahren beruhen auf der Freisetzung von Substanzen aus lysierten Targetzellen, die dort entweder physiologisch vorhanden sind (wie LDH) oder mit denen diese artifiziell beladen wurden ( $\text{Cr}^{51}$ , 3H-Thymidin). Andere Verfahren beruhen auf der Messung des Targetzelltodes durch Anfärbung mit Fluoreszenzfarbstoffen, die für lebende Zellen nicht membrangängig sind.

Die Entscheidung für einen LDH-Freisetzungstest und dessen Etablierung wurde von folgenden Kriterien und Feststellungen geleitet. Der Test wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen erfolgreich eingesetzt (Korzeniewski & Callewart, 1983; Weidmann et al., 1995; Sasaki et al., 2002) und wird deswegen neben dem  $\text{Cr}^{51}$ -Test als gleichberechtigt, teilweise sogar als die bevorzugte Methode zur Messung von zytotoxischen Reaktionen bewertet (Decker & Lohmann-Matthes, 1988). Das liegt vor allem daran, dass der LDH-Test gegenüber dem  $\text{Cr}^{51}$ -Freisetzungstest den

Vorteil hat, dass keine radioaktiven Substanzen verarbeitet und entsorgt werden müssen.

Auch die Markierung der Targetzellen mit Fluoreszenzfarbstoffen und die nachfolgende Auswertung des Tests mittels Durchflußzytometrie schienen wenig geeignet für die verwendeten Target-/Effektorzellkombinationen. Voruntersuchungen hatten ergeben, dass die Effektorzellen (PBL), im Gegensatz zur beschriebenen Literatur (Marcusson-Stahl & Cederbrant, 2003), Fluoreszenzfarbstoff aus den von uns verwendeten lysierten Targetzellen absorbierten und somit das Testergebnis verfälschten. Bei den in der Literatur verwendeten fluoreszenzbasierten, durchflusszytometrischen Zytotoxizitätsassays werden zudem meist Suspensionszellkulturen als Targetzellen eingesetzt, während die von uns verwendeten virusinfizierbaren Targetzellen adhärent wachsen. Das Ablösen solcher Zellen von Zellkulturgefäßen erweist sich als problematisch, da insbesondere durch die Virusinfektion die Zellen äußerst fragil werden.

Die im Zytotoxizitätsassay verwendete Targetzellzahl von  $2 \times 10^4$  Zellen war der bestmögliche Kompromiss zwischen der daraus resultierenden Effektorzellzahl, dem Messbereich des Photometers, den unterschiedlichen LDH-Gehalten der beiden verwendeten Targetzelltypen (RTG-2 und EPC) und der Spontanfreisetzung von LDH aus nicht lysierten Targetzellen. Damit konnte ein *in vitro*-Testsystem zur Ermittlung der zellvermittelten Zytotoxizität gegen virusinfizierte Targetzellen bei Forellen etabliert werden, dessen Funktionsfähigkeit durch eine direkt proportionale Abhängigkeit der ermittelten Zytolyse von der Effektorzellzahl weiter unterstrichen wurde.

## 5.1 Immunantwort auf VHSV-Infektion

Die klinischen Symptome und pathologischen Sektionsbefunde bei der VHS der Regenbogenforelle sind seit langem bekannt und umfassend beschrieben (Amlacher, 1992; Smail, 1999). Entsprechende Veränderungen, wie zum Beispiel Blutungen in der Muskulatur und der Haut, Exophthalmus und ödematisierter Gastrointestinaltrakt, waren bei den Versuchstieren der Infektionsgruppen ab Tag 3 nach Infektion feststellbar. Zusätzlich zu einer bereits beschriebenen Anämie, die unter anderem anhand blasser Kiemen identifiziert werden kann (Amlacher, 1992),

war eine massive Leukopenie festzustellen. Die Gesamtanzahl an isolierbaren Leukozyten, welche bei Forellen in vergleichbarem Alter und Ernährungszustand Aufschluss über deren Allgemeinzustand geben kann, war nach Erstinfektion signifikant verringert (10 d p.i. um mehr als 50 %). Auch Hoffmann et al. (1979) beschrieben nach experimenteller Infektion (i.p.) mit VHSV ein deutliches Absinken der Leukozytenzahlen in den subnormalen Bereich (ab 9 d p.i.). Diese klinischen Symptome ließen erkennen, dass die infizierten Forellen an VHS erkrankt waren.

Bei allen Experimenten wurden die PBL immunisierter Forellen hinsichtlich ihrer Subpopulationen charakterisiert. Die Zellzählung im Phasenkontrast diente hierbei zur Orientierung, da die kernhaltigen Thrombozyten sich in Suspension zum größten Teil abkugeln und dann morphologisch nicht mehr von Lymphozyten zu unterscheiden sind. Deshalb wurden die PBL durchflusszytometrisch mittels populationspezifischer mAk klassifiziert. Während der Infektion war der Anteil an Thrombozyten in den isolierten PBL 10 und 11 d p.i. signifikant erniedrigt, wohingegen dieser nach einer erneuten Infektion teilweise signifikant erhöht war. Eine Ursache für den Abfall des Thrombozytenanteils liegt sicherlich in einer Verbrauchskoagulopathie begründet, wie sie bei anderen hämorrhagischen Septikämien, zum Beispiel der Schweinepest (Gomez-Villamandos et al., 2003; Edwards et al., 1985), beschrieben wird. Für die Erhöhung des Thrombozytenanteils nach der zweiten Infektion kann es verschiedene Gründe geben. Zum einen könnte es sich um eine kompensatorische Reaktion nach Koagulopathie handeln, zum anderen ist es auch möglich, dass andere Zellpopulationen im Zuge der Infektion zugrunde gingen, wobei sich zwar nicht die absolute Thrombozytenanzahl, aber deren prozentualer Anteil erhöhte.

Die Ermittlung des prozentualen Anteils der Thrombozyten-, B-Zell- und Monozyten-/Granulozyten-Fractionen lässt eine Berechnung des theoretischen Restanteils an PBL zu, der die Population der putativen s(surface)IgM-negativen Lymphozyten (T- und NK-Zellen) repräsentiert. Dieser Anteil stieg im Verlauf der Infektion mit VHSV kontinuierlich an. Unter Beachtung des Leukopenie-bedingten circa 50 %igen Abfalls der absoluten Anzahl an PBL kann man von einem etwa 2,5fachen Zuwachs an sIgM-negativen Lymphozyten ausgehen. Fischer et al. (2003) konnten nach allogener Sensibilisierung von Forellen zeigen, dass nur solche sIgM-negativen Lymphozyten in der Lage sind, allogene Zellen spezifisch zu lysieren. Weiterhin konnte auch nur für diese Fraktion eine Expression von CD8 $\alpha$ - und TCR $\alpha$ -

mRNA nachgewiesen werden. Diese Effektorzellen besitzen demnach sowohl funktionelle als auch genetische Eigenschaften von zytotoxischen T-Zellen. Der hier gezeigte Anstieg dieser Zellpopulation nach Infektion gibt einen ersten Hinweis darauf, dass zytotoxische T-Zellen an der Abwehr von Virusinfektionen im Fisch beteiligt sind.

Nach Infektion mit VHSV kam es in der Forelle nach etwa 10 Tagen zur Bildung von antiviralen zytotoxischen Zellen, die ausschließlich MHC-Klasse-I-identische Targetzellen lysierten und deren zytotoxische Potenz im Zuge der Infektion weiter anstieg. Da in diesen Effektorzellen zum selben Zeitpunkt eine deutliche Erhöhung der CD8 $\alpha$ -Expression auf mRNA-Ebene festgestellt werden konnte, ist davon auszugehen, dass die spezifischen zytotoxischen Zellen der Regenbogenforelle den CTL's der Säuger sehr ähnlich sind. Auch Boudinot et al. (2001) konnten bei Forellen auf genomischer Ebene den indirekten Beweis für eine T-Zellantwort nach VHSV-Infektion erbringen. Demnach kam es im Zuge der VHS zu infektionsbedingten Veränderungen innerhalb des TCR-Repertoires in der komplementaritätsbestimmenden Region 3 (CDR3, complementary determining region 3).

Auch bei Ginbuna-Karpfen konnte in einer Studie nach Infektion mit CHNV (crucian carp hematopoietic necrosis virus) eine spezifische zellvermittelte Zytotoxizität von Leukozyten gegen virusinfizierte syngene MHC-Klasse-I-kompatible Targetzellen dokumentiert werden (Somamoto et al., 2002). Im Gegensatz zu unseren Untersuchungen wurden jedoch niemals infizierte MHC-Klasse-I-inkompatible (allogene) Targetzellen lysiert, was auf eine Beteiligung von NK-Zellen hindeuten würde.

Kürzlich konnten Somamoto et al. (2006) ihre Erkenntnisse bei Ginbuna-Karpfen vervollständigen, indem sie zeigten, dass die Effektorzellen dieser virusspezifischen zellvermittelten Zytotoxizität innerhalb einer sIgM-negativen Zellpopulation zu finden sind, die nach antigener Stimulation eine hohe Expression an CD8 $\alpha$ - und TCR $\beta$ -mRNA aufwies. Ähnlich wie schon bei den oben erwähnten Untersuchungen zur Zytotoxizität gegen allogene Zellen (Fischer et al., 2003) konnte für die sIgM-positiven Lymphozyten (B-Zellen) und die neutrophilen Granulozyten weder eine zytotoxische Aktivität gegen virusinfizierte syngene Zellen noch eine erhöhte Expression von CD8 $\alpha$  und TCR $\beta$  festgestellt werden.

Die Auseinandersetzung mit einem Antigen im Säuger hat nach erfolgreicher Abwehr eine Bildung von spezifischen Gedächtniszellen zur Folge. Bei erneutem Kontakt kann der Organismus sehr schnell und effizient darauf reagieren und eine Ausbreitung des Antigens frühzeitig verhindern. Bei der Impfung von Säugern und Vögeln wird der sogenannte ‚Boostereffekt‘ durch mehrmalige Applikation des Antigens genutzt, um einen Immunschutz aufrechtzuerhalten beziehungsweise zu steigern.

Eine erneute Infektion mit der gleichen Virusmenge 22 Tage nach der ersten Infektion hatte bei den hier beschriebenen Versuchen weitaus geringere Auswirkungen auf den allgemeinen Gesundheitszustand der Versuchstiere als die Erstinfektion. Klinische Symptome konnten im Gegensatz zur Erstinfektion nur noch vereinzelt festgestellt werden, und die PBL-Kapazität der Forellen unterschied sich nicht mehr von denen der Kontrolltiere. Das Immunsystem der Forellen hatte offensichtlich die Virusinfektion bereits unter Kontrolle und konnte nach einer erneuten Infektion schneller und effizienter reagieren, was wahrscheinlich Ausdruck eines immunologischen Gedächtnisses ist. Letzteres ist bei Fischen vielfach beschrieben (humoral: Trump & Hildemann, 1970; Arkoosh & Kaattari, 1991; zellvermittelte Immunität: Borysenko & Hildemann, 1970; Botham & Manning, 1981; Hildemann, 1970; Kikuchi & Egami, 1983; Manning et al., 1982; Nakanishi & Ototake, 1999a; Übersichtsartikel: Manning, 1994; Manning & Nakanishi, 1996). Der kurze Zeitraum zwischen Erst- und Zweitinfektion lässt jedoch keine genauen Rückschlüsse auf eine immunologische Gedächtnisleistung zu.

Das zelluläre Abwehrsystem der untersuchten Forellen ließ sich durch erneuten Kontakt mit VHSV auf ein noch höheres Reaktionsniveau bringen. Schon drei Tage nach Zweitinfektion hatten die Zytotoxizitätswerte auf MHC-Klasse-I kompatiblen infizierten Zellen das Niveau von 10 Tagen nach Erstinfektion übertroffen. Gleichzeitig war die CD8 $\alpha$ -Expression in den Effektorzellen im Vergleich zu den Expressionswerten nach Erstinfektion mehr als doppelt so hoch. Die zytotoxischen Zellen der Regenbogenforelle reagierten somit, ähnlich dem Säuger, sehr viel schneller und stärker auf eine weitere Virusbelastung. Auch Somamoto et al. (2002) konnten einen ‚Boostereffekt‘ in Bezug auf die zelluläre Antwort nach einer CHNV-Zweitinfektion im Ginbuna-Karpfen zeigen.

Die Korrelation der CD8 $\alpha$  -Expression mit den Zytotoxizitätswerten, die über einen längeren Zeitraum bestehende ausschließliche Zytotoxizität gegenüber MHC-

Klasse-I-kompatiblen Zellen und das Vorhandensein eines gewissen Boostereffektes sind wichtige Hinweise für die Existenz antiviraler zytotoxischer T-Zellen in der Regenbogenforelle.

Damit gehen die Ergebnisse konform mit Daten, wie sie von höheren Vertebraten bekannt sind. Bei Säugern setzt jedoch die NK-Zell-Antwort nach heutigem Kenntnisstand spontan und bereits vor einer T-Zell-vermittelten Zytotoxizität ein. Deshalb lag bei unseren Untersuchungen der entscheidende Unterschied in einer späteren NK-Zell-ähnlichen Reaktion, die erst am elften Tag nach Zweitinfektion in Form einer Zytotoxizität gegen infizierte, im MHC-Klasse-I nicht kompatible Targetzellen (EPC) gemessen werden konnte. Eine solche verzögerte NK-Zell-ähnliche Antwort ist auch bei Fischen bisher nicht beschrieben worden.

Für die späte antivirale NK-Zell-ähnliche Zytotoxizität gegenüber MHC-Klasse-I inkompatiblen Zellen bietet die ADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; antikörperabhängige CMC) eine mögliche Erklärung. Bei der ADCC können spezifische Antikörper an virusinfizierte Zellen binden, die auf ihrer Oberfläche virale Proteine exprimieren (Opsonierung). Die mit Antikörpern opsonierten Zielzellen können dann durch NK-Zellen zerstört werden, nachdem die an der Zelloberfläche gebundenen Antikörper mit den Fc-Rezeptoren von NK-Zellen in Kontakt getreten sind (Lanier et al., 1988). Die ADCC ist sowohl bei der Regenbogenforelle (Li & Woo, 1995) als auch bei einigen anderen Fischarten (Katzenwels: Shen et al., 2003; Hai: McKinney & Flajnik, 1997) beschrieben worden. Auch Fc-Rezeptoren als eine der molekularen Voraussetzungen für ADCC sind bei Fischen, so zum Beispiel im Katzenwels (Shen et al., 2003), im Hai (Haynes et al., 1988) und im Atlantischen Lachs (einem nahen Verwandten der Regenbogenforelle) (O'Dowd et al., 1998; Joseph et al., 2003), nachgewiesen worden. Auf den ersten Blick könnte man annehmen, dass bei dem hier verwendeten *in vitro* Zytotoxizitätstest eine ADCC ausgeschlossen ist, da durch mehrfache Zentrifugations-, Verdünnungs- und Waschschriffe sämtliche Antikörper aus dem Testsystem entfernt werden. Allerdings gibt es einen Bericht, wonach bei Katzenwelsen NK-ähnliche Zellen bereits *in vivo* Antikörper aus dem Blut an ihren Fc-Rezeptor binden (Shen et al., 2003). Solche „bewaffneten“ NK-Zellen könnten dann *in vitro* eine ADCC ausgelöst haben. Das G-Protein des VHSV wird während des Replikationszyklus als komplettes Protein in die Targetzellmembran eingelagert

(Mas et al., 2004; Rose & Witt, 2001), so dass die entsprechenden Zellen für Antikörper direkt, aber auch für Antikörper-bewaffnete Zellen zugänglich wären. Dass Letzteres bei den Versuchen der hier vorgelegten Arbeit der Fall gewesen sein könnte, wird durch die Korrelation des Auftretens der signifikanten NK-ähnlichen zytotoxischen Aktivität mit einem Peak der ELISA-Antikörpertiter am Tag 11 nach Zweitinfektion unterstützt.

Die NK-Zellen der Säuger sind große, granuläre Lymphozyten. Auch im Katzenwels sind NK-ähnliche Zellen dieser Morphologie beschrieben worden (Shen et al., 2002). Chilmonczyk und Monge (1999) berichten von einer Verringerung granulocytärer Zellen durch eine Infektion von Regenbogenforellen mit VHSV, wobei es sich neben Granulozyten und Monozyten eventuell auch um NK-ähnliche Zellen handeln könnte, die ihre Frühfunktion in der Abwehr somit nicht mehr wahrnehmen konnten. Tatsächlich wurde durch eigene Untersuchungen mittels durchflusszytometrischer Analysen der PBL infizierter Fische 11 und 16 d p.i. ein starker Abfall der Monozyten-/Granulozytenfraktion festgestellt, der möglicherweise auch NK-ähnliche Zellen betroffen haben könnte. Es ist jedoch eher wahrscheinlich, dass es sich dabei um einen Abfall klassischer Granulozyten handelte. Bereits 1982 beschrieben Amlacher et al., dass die Granulozytenpopulation durch eine VHSV-Infektion deutlich beeinträchtigt ist. Der Anteil an überreifen oder in Auflösung befindlichen Granulozyten dominierte, da eine kompensatorische Granulopoese in der Kopfniere durch die Infektion zum Erliegen kam.

Für die Regenbogenforelle steht bis heute kein direkter NK-Zell-Marker zur Verfügung. Um dennoch eine mögliche NK-Zellbeteiligung näher zu charakterisieren, wurde in diesen Untersuchungen die Expression des NKEF (natural killer cell enhancement factor) auf mRNA-Ebene bestimmt. NKEF von Säugern gehört zur großen Familie der antioxidativ wirksamen Proteine und besitzt die Fähigkeit, die *in vitro*-Zytotoxizität von NK-Zellen gegen Tumorzellen zu aktivieren (Shau et al., 1993, 1997). NKEF nimmt jedoch primär eine wichtige Regulatorfunktion bei der Hämatopoese, einschließlich der Erythropoese ein (Rabilloud et al., 1995). Da VHSV eine haemorrhagische Erkrankung ist, kann vermutet werden, dass die kompensatorische Neubildung von Erythrozyten mit einer erhöhten NKEF-Expression durch hämatopoetische Stammzellen einhergeht, was seinerseits möglicherweise NK-Zellen aktiviert. Ein signifikanter Anstieg der NKEF-Expression kann schon ab dem dritten Tag nach Erstinfektion gemessen werden, was der



Theorie einer frühzeitig angeschalteten angeborenen Immunantwort entsprechen würde. Die Tatsache, dass das funktionelle Korrelat einer frühen NK-Zell-ähnlichen Immunantwort in Form einer CMC gegen infizierte, MHC-Klasse-I-inkompatible Zellen fehlt, könnte wiederum ein erneuter Hinweis darauf sein, dass neben Monozyten und Granulozyten auch NK-ähnliche Zellen während der VHSV-Infektion beeinträchtigt werden.

In den vorliegenden Versuchen zu den zellulären Reaktionen bei VHS wurde der Zeitpunkt der Zweitinfektion mit 22 d p.i. bewusst relativ früh gewählt, um den Einfluss von gebildeten Antikörpern bei der Auseinandersetzung mit dem erneuten Viruseintrag möglichst zu minimieren. Der prozentuale B-Zellenanteil war während Erst- und Zweitinfektion nach anfänglichem Anstieg über einen größeren Zeitraum hinweg verringert. Nachdem B-Zellen während einer Infektion zu Plasmazellen transformieren, sind Letztere normalerweise im peripheren Blut nicht mehr zu finden. Es kann lediglich spekuliert werden, ob ein solcher Abfall der B-Zellpopulation innerhalb der PBL Ausdruck einer Transformation zu Plasmazellen entspricht, oder ob B-Zellen im Zuge der Infektion lytisch zu Grunde gegangen sind.

Hattenberger et al. (1995) konnten ab 2-3 Monate nach einer VHSV-Infektion virusspezifische neutralisierende Antikörper nachweisen. Erste VHSV-spezifische Antikörper wurden nach experimenteller Infektion mit hochvirulentem VHSV jedoch bereits etwa 30 Tage p.i. mittels ELISA detektiert (Bergmann; persönliche Kommunikation). Tatsächlich konnten in den hier gezeigten Versuchen nennenswerte neutralisierende und ELISA-Antikörpertiter erst nach Zweitinfektion gemessen werden. Ungeachtet dessen traten trotz Klinik keine Mortalitäten auf, so dass zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion andere Komponenten des Immunsystems als Antikörper den Schutz vor den Folgen der Infektion vermittelt haben müssen. Neben einer nach DNA-Vakzination gegen VHS bereits publizierten IFN Typ 1-Expression (Acosta et al., 2006) kommen deshalb für einen frühen Schutz zelluläre Immunreaktionen in Frage.

Die nach Zweitinfektion kontinuierlich ansteigenden VHSV-Gesamtantikörpertiter unterlagen 16 d p.2.i. einem ungewöhnlichen Abfall, wobei nur drei von vier Tieren sehr schwach positiv reagierten. Möglicherweise handelt es sich bei diesem kurzzeitigen Titerabfall um eine Folge des Phänomens der späten Affinitätsreifung von Antikörpern, welches von Kaattari et al. (2002) bei der Regenbogenforelle beschrieben wurde. Es wird vermutet, dass ‚natürliche‘

Antikörper, welche einen ersten unspezifischen Schutz gewährleisten, später durch gereifte, hochaffine Antikörper substituiert werden, die ein entsprechendes Niveau noch nicht erreicht haben, wenn ‚natürliche‘ Antikörper bereits verbraucht sind.

Diese Begründung kann jedoch nicht für neutralisierende Antikörper geltend gemacht werden, da diese 16 d p.2.i. ähnlich hohe Titer aufweisen wie vor und nach diesem Zeitpunkt. Möglicherweise können neutralisierende Antikörper das an ELISA-Platten gebundene Virus nicht erkennen, da dieses im Gegensatz zu nativem Virus durch die Plattenbindung in seiner Konformation stark verändert ist (Lorenzen, N.; persönliche Kommunikation). Bei Serumuntersuchungen von Forellen, die mit attenuiertem, avirulentem VHSV vakziniert worden waren, konnten ähnliche Titerabfälle mittels der hier verwendeten ELISA-Methode reproduzierbar beobachtet werden (Fichtner, D.; pers. Mitteilung, unveröffentlichte Daten).

## 5.2 Immunantwort auf diskrete virale Proteine des VHSV

Die DNA-Immunisierung ist eine geeignete Methode, um den Einfluss diskreter viraler Proteine auf die Immunantwort bei einer Virusinfektion zu untersuchen. Die viralen Proteine werden dabei in ähnlicher Weise translatiert, prozessiert und exprimiert wie bei einer echten Virusinfektion. Antigen-kodierende Plasmid-DNA kann dadurch sowohl humorale als auch zelluläre Immunantworten im Immunsystem des Empfängers auslösen (Robinson & Torres, 1997).

In den beschriebenen Untersuchungen wurde *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen, dass die verwendete Plasmid-DNA in der Lage ist, die kodierten Proteine des VHSV in der Zelle zur Expression zu bringen. Dabei wurde das **G-Protein**, wie auch schon von Lorenzen et al. (1998) beschrieben, sowohl im Zytoplasma als auch in der Zellmembran der transfizierten Muskelzellen detektiert, während das N-Protein nur im Zytoplasma zu erkennen war. Dies unterstreicht die membranassoziierte Natur des G-Proteins (Coll, 1995). Durch *in situ*-PCR konnten Boudinot et al. (1998) ebenfalls nachweisen, dass das G-Protein bereits sieben Tage nach Verabreichung G-kodierender DNA im Zytoplasma und der Peripherie von Muskelzellen vorhanden ist, und nach 21 Tagen auch in infiltrierenden Zellen und Endothelzellen, die kleinere Blutgefäße auskleiden.

Lorenzen et al. (2005) beschrieben eine durch G-Expression bedingte Entzündungsreaktion, die 21 Tage nach Immunisierung (d p.im.) ihre maximale Ausprägung erreichte, wohingegen die Expression von N-Protein im Fischmuskel keinerlei Entzündungszeichen hervorrief. Bei den hier gezeigten Versuchen war entlang des Einstichkanals 22 Tage nach Plasmid-Applikation eine lokale Entzündungsreaktion zu erkennen. Im Falle des N-Proteins ging diese mit der Einwanderung mononukleärer Zellen von makrophagenähnlicher Morphologie einher, die teilweise virales Protein enthielten. Einen deutlichen Unterschied in der Induktion von Entzündungsreaktionen durch G- beziehungsweise N-Protein-Expression konnte bei den hier erhobenen Daten nicht festgestellt werden. Das liegt möglicherweise an der zur Sichtbarmachung des Stichkanals verwendeten Tätowiertusche, die zusätzlich als Entzündungssignal gedient haben könnte.

Weiterhin wurde in der hier vorgelegten Studie festgestellt, dass zum Zeitpunkt der Untersuchung (22 d p.inj.) die Expression des N-Proteins wesentlich stärker ausgeprägt war als die des G-Proteins. Lorenzen et al. (2005) konnten dies (21 d p.inj.) ebenfalls dokumentieren, wobei sie in einer Verlaufsbeobachtung feststellten, dass die Expression des N-Proteins auch 31 d p.inj. noch präsent war, wohingegen die Expression des G-Proteins im Muskel nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Es ist daher anzunehmen, dass die Expression des G-Proteins eine effektive Entzündungsreaktion induziert, die zu einer rascheren Eliminierung von Virusantigen-exprimierenden Muskelzellen führt. Somit stellen G-Protein transfizierte Zellen wahrscheinlich ein stärkeres immunogenes Signal dar als Zellen, die das N-Protein exprimieren. Diese Vermutung geht unter anderem konform mit den im Folgenden beschriebenen Ergebnissen zur antiviralen zellvermittelten Zytotoxizität, wonach die Immunisierung mit G-kodierender Plasmid-DNA höhere Zytotoxizitäten gegen virusinfizierte Zellen induzierte als die Immunisierung mit N-kodierender Plasmid-DNA.

Bei Fischen gibt es zahlreiche Studien zum schützenden Effekt von DNA-Vakzinen, die für rhabdovirale Antigene kodieren (Übersichtsartikel: Lorenzen & La Patra, 2005; Kurath, 2005). So konnte zum Beispiel bei Forellen für das dem VHSV nah verwandte IHNV gezeigt werden, dass von allen Virusproteinen nur das G-Protein in der Lage ist, die Bildung von neutralisierenden Antikörpern (nAk) und eine schützende Immunität vor einer Belastungsinfektion zu induzieren (Corbeil et al., 1999; Anderson et al., 1996b). Lorenzen et al. (1998) und Heppel et al. (1998)

beschrieben ähnliche Versuche mit DNA-Vakzinen codierend für die Proteine G und N des VHSV. Sie konnten zeigen, dass das G-exprimierende Konstrukt, wie auch bei IHNV, ein sehr hohes Schutzlevel (relative percent survival - RPS von 94%) gegenüber einer letalen Infektion induziert. Vakzination mit dem N-Protein-kodierenden Konstrukt führte ebenfalls zu einem signifikanten Schutz (RPS 66 %). Obwohl dieser Schutz nicht so hoch wie der nach Immunisierung mit einem G-exprimierenden Konstrukts ausfiel, war er jedoch immer noch höher als bei Fischen, die mit inaktiviertem Virus immunisiert worden waren (RPS 56 %). Auch für das fisch-pathogene Hirame Rhabdovirus (HIRRV), welches wie das VHSV zum Genus Novirhabdovirus gehört und vor allem bei der Japanischen Flunder (*Paralichthys olivaceus*) zu einer hämorrhagischen Septikämie führt (Oh & Choi, 1998), konnte kürzlich sowohl für das G-Protein als auch für das N-Protein die Induktion einer signifikant schützenden Immunität gegen eine letale HIRRV-Infektion nachgewiesen werden (G: RPS 95 %; N: RPS 26 %) (Seo et al., 2005). Somit kann man davon ausgehen, dass die Proteine G und N der rhabdoviralen Fischviren einen Einfluss auf das Wirtsimmunsystem ausüben, weshalb diese beiden Proteine des VHSV auch im Fokus der hier dargestellten Untersuchungen zu zellulären Immunreaktionen standen.

Die Entwicklung spezifischer zytotoxischer Zellen gegenüber beiden Proteinen kann, vom evolutionären Standpunkt eines infizierten Fisches aus gesehen, als physiologisch sinnvoll betrachtet werden. In zahlreichen Untersuchungen anderer Autoren konnte einerseits belegt werden, dass das G-Protein als virales Oberflächenprotein Ziel neutralisierender Ak ist (Engelking & Leong, 1989; Lorenzen et al., 1990; Boudinot et al., 1998, Anderson et al., 1996b; Corbeil et al., 1999). Lorenzen et al. (1998) beschrieben andererseits, dass nur 72 % der Seren VHSV G-immunisierter Forellen (67 d p.inj.) nAk enthalten. Zusätzlich wurde in Infektionsversuchen mit VHSV-G-DNA-immunisierten Fischen gezeigt, dass ein Schutz vor VHSV nicht immer mit der Höhe der nAk-Titer korreliert (Lorenzen et al., 1999b). Das macht eine Beteiligung von weiteren Faktoren an der VHSV-G-induzierten Immunität wahrscheinlich. Auch die hier besprochenen Untersuchungen zeigen, dass VHSV-spezifische Gesamtantikörper bei lediglich 86 % der G-immunisierten Fische im Serum detektiert wurden.

Weiterhin wurde beschrieben, dass das rhabdovirale interne N-Protein weder neutralisierende noch im ELISA messbare Antikörper (Seo et al., 2005; Lorenzen &

La Patra, 1999, Anderson et al., 1996; Corbeil et al., 1999), wohl aber einen Schutz vor VHSV-Infektion induziert (Lorenzen et al., 1998; Seo et al., 2005). Auch in den hier vorgestellten Untersuchungen konnten nach DNA-Immunisierung gegen das N-Protein weder neutralisierende noch im ELISA messbare Antikörper im Serum detektiert werden.

Im Zuge der VHSV-Replikation wird das N-Protein früher gebildet als das G-Protein (Rose & Whitt, 2001). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass das N-Protein in der Wirtszelle bereits vor dem G-Protein im Proteasom prozessiert und als virales Peptid im MHC-Klasse-I dem Immunsystem präsentiert wird. Eine frühe MHC-Klasse-I vermittelte adaptive Immunantwort wäre die logische Folge. Diese Hypothese konnte in den hier beschriebenen Experimenten jedoch nicht belegt werden, da das N-Protein besonders während der Wintermonate nicht zur Generierung zytotoxischer Zellen führte. Der Einfluss der zeitlich abhängigen Präsentation von N-Protein durch virusinfizierte Targetzellen auf die Entwicklung einer zellvermittelten Zytotoxizität hätte mittels *in vitro* CMC-Test nicht untersucht werden können, da dieser Test sich über mehrere Stunden hinzieht. Währenddessen werden mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht nur das N-Protein sondern auch andere virale Proteine zeitlich parallel prozessiert. Solche Untersuchungen hätten Targetzellen erfordert, die lediglich einzelne virale Proteine prozessieren, zum Beispiel stabil transfizierte Zellen.

Zusammenfassend zeigen die hier diskutierten Ergebnisse, dass das G-Protein des VHSV eine höhere Potenz zur Induktion zytotoxischer Zellen besitzt als das N-Protein. Die ausschließlich nach DNA-Immunisierung gegen das G-Protein gebildeten Antikörper korrelierten dabei nicht mit der Höhe der CMC. Die DNA-Immunisierung hatte im Vergleich zur Infektion weder einen Einfluss auf die Gesamtzahl an isolierbaren Leukozyten noch konnte in der durchflusszytometrischen Analyse eine Veränderung im Verteilungsmuster der gemessenen Leukozytenpopulationen festgestellt werden. Die Untersuchungen zur zytotoxischen Aktivität von virusproteinsensibilisierten PBL der Forelle wurden wieder jeweils in einem MHC-Klasse-I-kompatiblen und einem MHC-Klasse-I-inkompatiblen System aus Effektor- und Targetzellen vorgenommen, um Schlussfolgerungen bezüglich der Effektorzellart ziehen zu können.

Dabei konnte gezeigt werden, dass das **Glykoprotein** des VHSV zytotoxische Zellen generiert, die sowohl infizierte MHC-Klasse-I-kompatible als auch nicht

kompatible Targetzellen lysieren. Die zytotoxische Aktivität gegenüber infizierten MHC-Klasse-I-kompatiblen Zellen war dabei jedoch stets höher als die gegenüber infizierten MHC-Klasse-I-inkompatiblen Targetzellen. Das deutet sowohl auf eine Beteiligung von CTL als auch von NK-ähnlichen Zellen hin. In den zytotoxischen Effektorzellen konnte ganzjährig eine erhöhte CD8 $\alpha$ -Expression gegenüber Kontrollzellen festgestellt werden, die, obwohl statistisch nicht signifikant, gleichfalls eine Aktivierung von CTL-ähnlichen Zellen repräsentiert. Für das HIRRV der japanischen Flunder wurde gezeigt, dass das G-Protein die Expression von TCR- und MHC-Genen stimuliert (Takano et al., 2004), und Estepa et al. (1999) haben gezeigt, dass das VHSV-G-Protein die Proliferation von antigen-abhängigen T-Zell-Langzeitkulturen VHSV-immunisierter Forellen anregt, was mit einer erhöhten Expression von TCR-kodierender mRNA einherging. Somit ist bei der Antwort auf eine VHSV-Infektion eine Beteiligung von CTL-ähnlichen Zellen, die auf das G-Protein reagieren, anzunehmen.

Ein weiterer wichtiger Anhaltspunkt für die Generierung spezifischer zytotoxischer Zellen konnte durch die Untersuchung der Virusspezifität der CMC gewonnen werden. VHSV-infizierte Targetzellen wurden von VHSV-G-sensibilisierten PBL effizienter lysiert als IHN-Infizierte Targetzellen, wobei die festgestellte Zytotoxizität gegenüber letzteren so niedrig war, dass sie statistisch nicht von denen der Kontrollen zu unterscheiden war. Damit ist die CMC von VHSV-G-sensibilisierten Zellen virusspezifisch.

Die in diesen Untersuchungen gemessene NK-Zell-ähnliche Aktivität von VHSV-G-DNA-sensibilisierten Leukozyten könnte Zeichen einer Mustererkennung in Form von zellmembranständigem viralem Protein sein. Wie bereits erwähnt, wird das Glykoprotein von Rhabdoviren während der Replikation auch als natives unprozessiertes Protein in die Wirtszellmembran eingelagert (Mas et al., 2004; Rose & Whitt, 2001). Das Glykoprotein könnte einem solchen Muster entsprechen, dass von NK-ähnlichen Zellen MHC-Klasse-I unabhängig erkannt wird. Die hier gezeigten Untersuchungen zur NKEF-Expression in den zytotoxischen Effektorzellen deuten trotz fehlender Signifikanz zudem darauf hin, dass das G-Protein eine gewisse Stimulation auf unspezifische zelluläre Reaktionen ausübt.

Aus der Literatur geht hervor, dass rhabdovirales G-Protein schon sehr früh nach Verabreichung von Plasmid-DNA einen unspezifischen Schutz gegen heterologes Virus induziert (VHSV und IHN: Lorenzen et al., 2000; Lorenzen et al.,

2002b; La Patra et al., 2001; IHNV und SHRV, SVCV: Kim et al., 2000). Dieser frühe Schutz korrelierte mit dem Nachweis von Mx-Protein (Boudinot et al., 1998; Kim et al., 2000; Acosta et al., 2005), welches im Säuger als antivirales, interferoninduzierbares Protein fungiert (Pavlovic & Staeheli, 1991; Schneider-Schaulies et al., 1994; Frese et al., 1996). Dies lässt vermuten, dass die DNA-Immunisierung gegen rhabdovirale G-Proteine mit einer frühen Aktivierung unspezifischer Schutzmechanismen einhergeht.

In den Versuchen von Lorenzen et al. (2002b) und La Patra et al. (2001) konnte weiterhin gezeigt werden, dass der kreuzreaktive Schutz nach einer bestimmten Zeit nicht mehr messbar ist, während die spezifische Immunität gegenüber dem homologen Virus anhält. Das Immunisierungsschema unserer Untersuchungen beinhaltete drei Applikationen im Abstand von 21 Tagen, wobei sieben Tage nach der letzten Applikation die CMC-Tests durchgeführt wurden. Somit lassen sich diese Experimente nicht mit den oben genannten Untersuchungen zum Immunschutz gegenüber einer Belastungsinfektion vergleichen. Es kann jedoch geschlussfolgert werden, dass das G-Protein sowohl angeborene (unspezifische) als auch erworbene (spezifische) zelluläre Immunreaktionen induziert. Entsprechend konnten durch DNA-Immunisierung gegen das G-Protein Effektorzellen induziert werden, die sowohl Eigenschaften von NK-Zellen (Lyse von MHC-Klasse-I-inkompatiblen Targetzellen) als auch von CTL (Expression von CD8 $\alpha$  in G-sensibilisierten Effektorzellen und Lyse von MHC-Klasse-I-kompatiblen Targets auf höherem Niveau) aufweisen.

Im Vergleich zum G-Protein des VHSV induzierte das **Nukleoprotein** lediglich eine CTL-ähnliche spezifische zellvermittelte Zytotoxizität. N-Protein-sensibilisierte zytotoxische Effektorzellen lysierten ausschließlich infizierte MHC-Klasse-I-kompatible RTG-2-Targetzellen, aber niemals infizierte MHC-Klasse-I-inkompatible EPC-Targetzellen. Unterstützt wird diese Vermutung dadurch, dass die CD8-mRNA-Expression auch in diesen Effektorzellen gegenüber den Kontroll-PBL stark erhöht war, wenn auch keine statistische Signifikanz festgestellt wurde. ADCC kann als Wirkmechanismus mit relativer Sicherheit ausgeschlossen werden, weil keine VHSV-spezifischen Antikörper im Blut N-immunisierter Versuchstiere detektiert wurden. Auch in der Literatur konnte bisher für keines der rhabdoviralen Fischviren eine N-induzierte Antikörperbildung nachgewiesen werden (Seo et al., 2005; Lorenzen et al., 1999, Anderson et al., 1996; Corbeil et al., 1999). Eine NK-Zell-vermittelte Reaktion

auf das N-Protein kann auch deshalb ausgeschlossen werden, da es nicht, wie das G-Protein, unprozessiert auf der Zelloberfläche erscheint und somit von NK-Zellen weder als PAMP noch mittels ADCC erkannt werden kann.

Da bei den hier vorliegenden Untersuchungen keine Belastungsexperimente mit immunisierten Forellen vorgenommen wurden, können keine Aussagen dazu gemacht werden, ob die induzierte Zytotoxizität, insbesondere durch das N-kodierende Konstrukt für einen effektiven Schutz vor der Erkrankung ausgereicht hätte.

In den Untersuchungen zur Ausbildung einer schützenden Immunität durch das N-Protein des VHSV, IHNV und HIRRV (Lorenzen et al., 1998; Heppel et al., 1998; Corbeil et al., 1999; Seo et al., 2005) wurden die Protein-kodierenden Konstrukte jeweils nur einmal verabreicht. Möglicherweise hätte durch eine mehrfache Immunisierung, wie bei den hier dargestellten Untersuchungen, ein gewisser (IHNV) beziehungsweise höherer (VHSV, HIRRV) Schutz erzielt werden können.

Trotz eines jahreszeitlich nahezu konstanten Licht- und Temperaturregimes konnten über zwei Jahre hinweg statistisch signifikante Unterschiede zwischen den im Sommer und im Winter gemessenen Zytotoxizitätswerten dokumentiert werden. Das Immunsystem von wechselwarmen Wirbeltieren, wie den Fischen, muss sich jahreszeitlich bedingten Temperaturschwankungen anpassen. Es wird allgemein vermutet, dass im Winter vor allem angeborene unspezifische Mechanismen die Infektionsabwehr übernehmen, da sie schnell und relativ temperaturunabhängig agieren können, während temperaturabhängige adaptive Mechanismen auf ein Minimum reduziert sind. Niedrige Temperaturen und verkürzte Photoperiodik bedingen möglicherweise eine geringere Leistungsfähigkeit der adaptiven Prozesse, wohingegen höhere Temperaturen diese begünstigen (Avtalion, 1981; Clem et al., 1991; Ellis, 2001).

Im Karpfen (*Cyprinus carpio*) konnte nachgewiesen werden, dass die Temperatur einen direkten Effekt auf zelluläre Immunfunktionen ausübt. Niedrige Umgebungstemperaturen erhöhten die Aktivität von nicht spezifischen zytotoxischen Zellen (NCC) gegenüber xenogenen Targetzellen, womit der Abfall von spezifischen Immunparametern möglicherweise ausgeglichen werden kann (Le Morvan et al., 1996). Verlhac et al. (1990) wiesen beim Karpfen eine Beeinträchtigung der



spezifischen CMC gegenüber Hapten-modifizierten syngenen Zellen bei niedrigen Temperaturen nach. Auch bei Ginbuna-Karpfen konnten Fischer et al. (1999) zeigen, dass die spezifische CMC gegen allogene Zellen bei niedrigen Umgebungstemperaturen stark supprimiert ist.

Mehrere Untersuchungen zum Immunsystem niederer Vertebraten (Yamaguchi et al., 1981; Leceta & Zapata, 1986; Zapata et al., 1983, 1992) bestätigen unsere Beobachtung, wonach deren Immunreaktionen selbst bei konstanter Photoperiodik und Temperatur saisonale Unterschiede aufweisen. Zapata et al. (1992) machen dafür neuroendokrine Faktoren (wie zum Beispiel Kortikosteroide) verantwortlich, die jahreszeitlichen Schwankungen unterliegen.

Die NK-ähnliche Zytotoxizität von VHSV-G-sensibilisierten PBL gegenüber VHSV-infizierten MHC-Klasse-I-inkompatiblen EPC-Zellen erreichte über das gesamte Jahr ein ähnlich hohes Niveau. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass angeborene zelluläre Abwehrmechanismen in Gestalt einer NK-Zell-vermittelten CMC eine gewisse jahreszeitliche Konstanz zeigen. Dahingegen konnte weder im Sommer noch im Winter eine NK-Zell-ähnliche CMC nach Immunsierung gegen VHSV-N detektiert werden. Auffallend war jedoch, dass durch das Nukleoprotein des VHSV während der Sommersaison eine spezifische CTL-ähnliche CMC gegenüber MHC-Klasse-I-kompatiblen Zellen induziert werden konnte, die im Winter ausblieb. Parallel dazu verblieb die CD8 $\alpha$ -Expression nach N-Protein-Immunsierung im Winter auf dem Level der Kontroll-PBL. Auch diese Daten erhärten die Vermutung, dass adaptive zellvermittelte Immunprozesse im Winter unterdrückt sind.

DNA-Immunsierung führt nicht nur zur Expression des vom Insert kodierten Proteins und zur Reaktion auf dieses Protein im vakzinierten Organismus. Die meisten Vektoren besitzen sog. CpG-Motive (nichtmetylierte Cytosin-Guanidin-Dinukleotide mit bestimmten flankierenden Basensequenzen), wie sie auch in bakterieller und viraler DNA vorkommen (Krieg et al., 1995). Solche Motive werden von den Immunzellen als PAMPs erkannt und haben einen stimulatorischen Effekt auf das angeborene und das adaptive Immunsystem (Krieg, 2002; Klinman et al., 1996; Manders & Thomas, 2000; Hemmi et al., 2000). Im Säuger konnte nachgewiesen werden, dass DNA-Vakzinen effizienter sind, wenn bestimmte CpG-Motive vorhanden sind (Klinman et al., 1997; Pontarollo et al., 2002; Sato et al., 1996). Auch bei Salmoniden wurde gezeigt, dass die Verabreichung von

Oligonukleotiden mit bestimmten CpG-Motiven die Sekretion von immunmodulierenden Faktoren stimuliert und die Resistenz gegenüber viralen Infektionen erhöht (Jørgensen, 2001a, 2001b; Shen et al., 2006; Jørgensen et al., 2003).

Die in der hier vorgelegten Arbeit verwendeten Plasmidkonstrukte enthalten ebenfalls einige CpG-Motive. In diesen Untersuchungen konnte aber bei der Messung der zytotoxischen Aktivität zwischen beiden Kontrollgruppen (Injektion mit PBS<sup>-</sup>-Puffer und mit nicht insertierter Vektor-DNA) kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, was darauf hinweist, dass dieser Vektor-Hintergrund keinen immunstimulatorischen Einfluss auf die Generierung zytotoxischer Zellen hat. Auch Lorenzen et al. (2000) berichten, dass nach intramuskulärer Applikation eines leeren Vektors mit CpG-Motiven kein Schutz vor einer Belastungsinfektion generiert wird. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass CpG-Motive eine accessorische immunstimulatorische Wirkung während der Induktion zytotoxischer Zellen durch virale Proteine, wie zum Beispiel vermehrte Zytokinausschüttung, zur Folge haben.

Zusammenfassend lassen sich aus den hier vorgelegten Untersuchungen eine ganze Reihe von Schlussfolgerungen ziehen, die zu einem besseren Verständnis des Immunsystems von Fischen beitragen. Im Zuge einer Infektion mit dem ökonomisch bedeutsamen VHSV wird die zelluläre Zytotoxizität bei der Regenbogenforelle sowohl von CTL-ähnlichen als auch NK-ähnlichen Zellen vermittelt, wobei die unspezifische NK-ähnliche Reaktion erst später als die spezifische erscheint und zudem schwächer ist. Der Einfluss diskreter viraler Proteine auf die Induktion zytotoxischer Zellen ist dabei sehr unterschiedlich. Das vermutlich sowohl durch MHC-Klasse-I präsentierte als auch nativ auf der Zelloberfläche infizierter Zellen erscheinende Glykoprotein des VHSV induzierte ganzjährig sowohl CTL-ähnliche als auch NK-ähnliche zytotoxische Effektorzellen. Das G-Protein kann somit offensichtlich den in der Literatur beschriebenen effektiven Schutz vor einer VHSV-Infektion durch eine Kombination humoraler und zellulärer Immunmechanismen induzieren. Demgegenüber induziert das nicht in die Zellmembran eingebaute Nukleoprotein keine humoralen Antikörper und lediglich im Sommer zytotoxische Abwehrzellen, die aufgrund ihrer Eigenschaften als CTL-ähnlich einzustufen sind. Somit sind dies die ersten Untersuchungen bei Fischen, in denen eine saisonabhängige zellvermittelte Zytotoxizität gezeigt wurde. Gleichfalls

sind dies die ersten Untersuchungen, die die Induktion antiviraler zytotoxischer Zellen durch diskrete virale Proteine mittels DNA-Immunsierung bei Fischen beschreiben.

Obwohl nicht vordergründiges Ziel dieser Arbeit geben die besprochenen Ergebnisse wichtige Anhaltspunkte für Vakzinationsstrategien bei der Verwendung von DNA-Vakzinen gegen die VHS. So kann vom Standpunkt der Induktion einer antiviralen zellvermittelten Zytotoxizität die Anwendung DNA-basierter Vakzinen, die für rhabdovirale Glykoproteine kodieren, empfohlen werden, zumal eine zellvermittelte Immunantwort hierdurch ganzjährig induzierbar ist. Das Nukleokapsidprotein hingegen triggert eine zellvermittelte Zytotoxizität lediglich über die Sommermonate, was den Einsatz einer für beide Proteine kodierenden DNA-Kombinationsvakzine auf diese Jahreszeit beschränken würde.