

Aus der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere,
Standort Tübingen und dem
Institut für Virologie des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. L. Stitz

Charakterisierung eines Borna Disease Virus-spezifischen
T-Zell-Epitops der Lewis Ratte und Einsatz dieses Epitops in
Immunisierungsexperimenten

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Silke Stamer, geb. Hülpüsch
Tierärztin aus Böblingen

Gießen 2002

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. B. Hoffmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. L. Stitz
2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. F. Kaleta

Tag der mündlichen Prüfung: 22.03.2002

Diese Arbeit wurde durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft
finanziert: PI 256/1-1

Teile dieser Arbeit wurden vorab publiziert in:
J. Biol. Chem. 276: 17; Planz et al., 2001

Berichte aus der Veterinärmedizin

Silke Stamer

**Charakterisierung eines
Borna Disease Virus-spezifischen T-Zell-Epitops
der Lewis Ratte und Einsatz dieses Epitops in
Immunisierungsexperimenten**

D 26 (Diss. Universität Giessen)

Shaker Verlag
Aachen 2002

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

Stamer, Silke:

Charakterisierung eines Borna Disease Virus-spezifischen T-Zell-Epitops der Lewis Ratte und Einsatz dieses Epitops in Immunisierungsexperimenten/
Silke Stamer.

Aachen: Shaker, 2002

(Berichte aus der Veterinärmedizin)

Zugl.: Giessen, Univ., Diss., 2002

ISBN 3-8322-0140-8

Copyright Shaker Verlag 2002

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 3-8322-0140-8

ISSN 0945-103X

Shaker Verlag GmbH • Postfach 1290 • 52013 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • eMail: info@shaker.de

INHALTSVERZEICHNIS

	Abkürzungsverzeichnis	V
1.	EINLEITUNG	1
2.	FRAGESTELLUNG	14
3.	MATERIAL	15
3.1	Zelllinien	15
3.2	Virus	15
3.2.1	Virus der Bornaschen Krankheit (BDV)	15
3.2.2	Vaccinia Virus (VV).....	15
3.3	Versuchstiere	16
3.4	Peptide	16
3.5	Nukleinsäuren	17
3.5.1	Plasmide	17
3.5.2	Oligonukleotide	17
3.5.2.1	<i>BDV p40-spezifische Primer</i>	17
3.5.2.2	<i>Weitere Primer</i>	18
3.5.3	Weitere Nukleinsäuren	18
3.6	Bakterien	18
3.6.1	Kompetente Bakterien	18
3.6.2	Weitere Bakterien	18
3.7	Enzyme und Kits	19
3.7.1	Enzyme	19
3.7.2	Kits	19
3.8	Antikörper, Seren, Konjugate	20
3.9	Medien	20
3.9.1	Medienzusätze	22
3.10	Lösungen und Puffer	23
3.10.1	Zellkultur	24
3.10.2	Aufreinigung von Immunglobulinen	24
3.10.3	Isolierung von Gehirnympozyten	24
3.10.4	Aufreinigung rekombinanter Proteine	25
3.10.5	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese und Western Blot-Analyse	25
3.10.6	Durchflusszytometrie	26
3.10.7	Plasmidisolierung	27
3.10.8	Sequenzierung	27
3.10.9	Färbung BDV-infizierter Zellen	28
3.10.10	Vaccinia Plaque-Assay	28
3.11	Chemikalien	28
3.12	Radiochemikalien	31
3.13	Verbrauchsmaterial	31
3.14	Geräte und Laborhilfsmittel	31

Inhaltsverzeichnis

3.14.1	Zentrifugen	31
3.14.2	Rotoren	32
3.14.3	Weitere Geräte	32
4.	METHODEN	33
4.1	Zellkultur	33
4.1.1	Kultivierung von Zellen	33
4.1.2	Kultivierung von adherent wachsenden Zellen auf Microcarriern	33
4.1.3	Einfrieren von Zellen	34
4.1.4	Auftauen von Zellen	35
4.1.5	Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen	35
4.1.6	Transfektion von Zellen	35
4.1.6.1	<i>Transfektion mit Dospers</i>	35
4.1.6.2	<i>Transfektion mit Effectene</i>	36
4.1.7	Herstellen eines Zelllysats	37
4.1.8	Produktion monoklonaler Antikörper im Kulturüberstand von Hybridomzellen	37
4.1.8.1	<i>Reinigung monoklonaler Antikörper</i>	37
4.2	Gewinnung von BDV aus Rattengehirnen	38
4.3	Infektion von Ratten mit BDV	39
4.3.1	Beurteilung klinischer Symptome	39
4.4	Infektion von Ratten mit Vaccinia Virus	40
4.5	Immunisierung von Ratten	40
4.5.1	Intraperitoneale Immunisierung	40
4.5.2	Subkutane Immunisierung	40
4.5.3	Immunisierung in den Fuß	40
4.6	Isolierung von Rattenlymphozyten	41
4.6.1	Isolierung von Lymphozyten aus dem Rattengehirn	41
4.6.2	Isolierung von Lymphozyten aus der Milz	41
4.6.3	Isolierung von Lymphozyten aus den poplitealen Lymphknoten	42
4.7	In vitro Restimulation von Lymphozyten der Lewis Ratte	43
4.7.1	Präparation der zur Antigenpräsentation eingesetzten Zellen (Feederzellen)	43
4.7.2	In vitro Restimulation	43
4.8	Zytotoxizitätstest	44
4.8.1	Zytotoxizitätstest mit Peptiden	45
4.8.1.1	<i>Markierung von Zielzellen mit synthetischen Peptiden</i>	45
4.8.1.2	<i>Markierung von Zielzellen mit HPLC-Fractionen</i>	46
4.9	Arbeiten mit Vaccinia Viren	46
4.9.1	Gewinnung von Vaccinia Virus	46
4.9.2	Vaccinia Virus-Infektion von Zellen auf Microcarriern	46
4.9.3	Herstellung rekombinanter Vaccinia Viren	47
4.9.3.1	<i>Infektion mit Vaccinia-Wildtyp und Transfektion</i>	47
4.9.3.2	<i>Plaquereinigung rekombinanter Viren</i>	48
4.10	Virustitration	49
4.10.1	Titration des Borna Disease Virus	49
4.10.2	Titration des Vaccinia Virus (Plaque Assay)	50

4.11	Aufreinigung rekombinanter Proteine	51
4.12	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese und Western Blot-Analyse	52
4.12.1	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	52
4.12.2	Western Blot-Analyse	53
4.12.2.1	<i>Transfer von Proteinen auf eine Teflonfolie</i>	54
4.12.2.2	<i>Immunoblotting</i>	54
4.13	Durchflusszytometrie	56
4.13.1	Phänotypische Charakterisierung von Zellen anhand von Oberflächenantigenen	56
4.13.2	Nachweis Vaccinia Virus-spezifischer Proteine im Inneren von Zellen	57
4.13.2.1	<i>Permeabilisierung</i>	57
4.13.2.2	<i>Markierung der Zellen</i>	58
4.13.3	Nachweis von GFP (Green Fluorescent Protein)	58
4.14	Nachweis von GFP (Green Fluorescent Protein) mittels Fluoreszenzmikroskopie	58
4.15	Extraktion viraler Peptide aus infizierten Zellen	59
4.16	Fraktionierung viraler Peptide mittels HPLC	59
4.17	Histologische Untersuchungen	60
4.18	Molekularbiologische Methoden	61
4.18.1	Gewinnen von Plasmiden	61
4.18.1.1	<i>Minipräparation</i>	61
4.18.1.2	<i>Säulenaufreinigung von Plasmid-DNA</i>	62
4.18.2	Gewinnen zellulärer und viraler DNA	62
4.18.3	Auftrennung, Isolierung und Aufreinigung von genomischer und Plasmid-DNA	63
4.18.3.1	<i>Auftrennung</i>	63
4.18.3.2	<i>Isolierung und Aufreinigung</i>	63
4.18.4	Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen	64
4.18.5	RNA-Isolierung	64
4.18.6	Enzymatische Behandlung von Nukleinsäuren	65
4.18.6.1	<i>Spaltung mit Restriktionsenzymen</i>	65
4.18.6.2	<i>Ligation</i>	65
4.18.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Reverse Transkriptase Polymerase- Kettenreaktion (RT-PCR)	66
4.18.7.1	<i>cDNA Synthese</i>	67
4.18.7.2	<i>Polymerase-Kettenreaktion mit der Taq-Polymerase</i>	67
4.18.7.3	<i>Polymerase-Kettenreaktion mit der Pwo-Polymerase</i>	68
4.18.8	Sequenzierung von DNA	69
4.18.8.1	<i>Sequenzierreaktion</i>	69
4.18.8.2	<i>Aufreinigung</i>	70
4.18.8.3	<i>Sequenziergel</i>	70
4.18.9	Bakterienkultur	70
4.18.9.1	<i>Anzucht von E.coli in Flüssigmedium</i>	70
4.18.9.2	<i>Anzucht von E.coli in auf festen Nährböden</i>	71
4.18.9.3	<i>Transformation</i>	71
4.18.9.4	<i>Lagerung von Bakterienkulturen</i>	71

Inhaltsverzeichnis

5. ERGEBNISSE	72
5.1 Verkürzte Nukleoproteine	72
5.1.1 Transfektion von LEW Zellen	73
5.1.1.1 Expression des vollständigen Nukleoproteins in LEW Zellen	74
5.1.1.2 Expression von verkürzten Nukleoproteinen in LEW Zellen	79
5.1.2 Herstellung rekombinanter Vaccinia Viren	81
5.2 BDV-spezifische Peptide	88
5.2.1 Synthetische Peptide	88
5.2.1.1 Bestimmung der optimalen Peptidkonzentration für das Beladen von Zielzellen	91
5.2.2 Natürlich prozessierte Peptide	93
5.3 Immunisierungsexperimente mit dem Peptid 9048	99
5.3.1 Periphere Immunisierung (subkutan und intraperitoneal)	99
5.3.2 Lokale Immunisierung	100
5.3.3 Immunisierung von Ratten mit dem Peptid 9048 und anschließende BDV-Infektion	102
5.3.3.1 Immunisierung mit dem Peptid 9048 und anschließende Virusinfektion: Beurteilung des Krankheitsverlaufs, der Virusvermehrung und der entzündlichen Veränderungen im Gehirn (Experiment 1)	103
a. Auftreten BDV-spezifischer Symptome	104
b. Auftreten BDV-spezifischer Antikörper	106
c. Nachweis von infektiösem Virus und entzündlichen Veränderungen im Gehirn	106
5.3.3.2 Immunisierung mit dem Peptid 9048, rekombinantem Nukleoprotein oder Bacterial Ghosts und anschließende Virusinfektion: Beurteilung des Krankheitsverlaufs, der Virusvermehrung im Gehirn (Experiment 2)	107
a. Auftreten BDV-spezifischer Symptome	109
b. Auftreten BDV-spezifischer Antikörper	111
c. Nachweis von infektiösem Virus im Gehirn	112
5.3.3.3 Immunisierung mit den Peptiden 9048, 9050, rekombinantem Nukleoprotein oder Bacterial Ghosts und anschließende Virusinfektion: Aktivierungsgrad von CD8 ⁺ T-Zellen zu einem späten Zeitpunkt nach Infektion (Experiment 3)	113
a. Auftreten BDV-spezifischer Symptome	114
b. Auftreten BDV-spezifischer Antikörper	117
c. In vitro Zytotoxizitätstest	118
5.3.3.4 Immunisierung mit dem Peptid 9048 oder rekombinantem Nukleoprotein und anschließende Virusinfektion : Aktivierungsgrad von CD8 ⁺ T-Zellen zu einem frühen Zeitpunkt nach Infektion (Experiment 4)	120
a. Auftreten BDV-spezifischer Symptome	121
b. Auftreten BDV-spezifischer Antikörper	123
c. In vitro Zytotoxizitätstest	124
6. DISKUSSION	126
7. ZUSAMMENFASSUNG	144
7.A SUMMARY	146
8. LITERATUR	148