

6. Zusammenfassung

Die DNA-Immunisierung ist eine neuartige Immunisierungsmethode, die auf der Injektion von klonierten Genen beruht. Nach Aufnahme der Expressionsplasmide in die Zelle kommt es zur endogenen Synthese des Fremdproteins und zur Induktion einer Immunantwort. Die Immunisierung mit Nukleinsäure wird derzeit bei verschiedensten infektiösen Erkrankungen untersucht. Die Untersuchung einer DNA-Vakzine gegen die Aujeszkysche Krankheit ermöglichte eine Wirksamkeitsprüfung einer derartigen Vakzine in einem natürlichen Virus-Wirts-System.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Gene der Glykoproteine gB, gC, gD und gDgI des Pseudorabies Virus und das Gen der β -Galaktosidase aus *E.coli* in den eukaryontischen Expressionsvektor pRc/CMV kloniert. Mittels indirekter Immunfluoreszenz, Radioimmunpräzipitation und Nachweis der β -Galaktosidaseaktivität konnte die transiente Expression der authentischen Proteine in Zellkultur nachgewiesen werden.

Im ersten Tierversuch wurden Mäuse mit 50 μ g Plasmid DNA der jeweiligen Konstrukte immunisiert. Neben dem histochemischen Nachweis der β -Galaktosidaseaktivität in Muskelgewebe, Lymphknoten und Haut, ließ sich im Western Blot und im Plaquereduktionstest eine Induktion der humoralen Immunantwort nach Immunisierung mit gDgI-CMV und gC-CMV nachweisen. Bereits neun Tage nach erster Immunisierung wurden im Serum der Mäuse spezifische Antikörper gegen gC nachgewiesen. Die DNA wurde den Tieren intramuskulär, intradermal, intravenös und intraperitoneal appliziert. Alle untersuchten Applikationsarten führten zu einer Induktion spezifischer neutralisierender Antikörper, jedoch erwiesen sich die intradermale und die intramuskuläre Injektion als effizienter als die beiden übrigen Methoden. Antikörper ließen sich auch noch 68 Wochen nach erster Immunisierung nachweisen. Die intramuskuläre Applikation von gC-CMV oder gDgI-CMV bewirkte keine Protektion der Mäuse gegenüber einer letalen Belastungsinfektion.

Um die Wirksamkeit der DNA-Immunisierung im natürlichen Wirt zu testen, wurden Absatzferkel viermal mit je 50 μ g gC-CMV und gDgI-CMV immunisiert. Nach vier bis acht Wochen waren bei allen Tieren spezifische Antikörper gegen gC und gD im Western Blot, ELISA und im Plaquereduktionstest nachweisbar. Zur Belastungsinfektion wurden die Tiere neun Wochen nach erster Immunisierung mit 5×10^6 pfu des hochvirulenten PrV Stamms

NIA-3 intranasal infiziert. Zwei der vier mit gC-CMV immunisierten Tiere überlebten die letale Belastungsinfektion, während die Kontrolltiere und die mit gDgI-CMV immunisierten Tiere nach fünf Tagen verendeten.

Im Serum von dreimal mit je 50 µg gC-CMV immunisierten Schweinen ließen sich neutralisierende Antikörper über einen Zeitraum von sieben Monaten nachweisen. Von diesen Tieren isolierte periphere mononukleäre Zellen des Blutes konnten im Lymphozytenproliferationstest durch UV-inaktiviertes Virus restimuliert werden und somit eine Induktion der zellvermittelten Immunantwort nachgewiesen werden.

In weiteren Tierversuchen wurden die intramuskuläre und die intradermale Injektion verschiedener DNA-Mengen mit der intradermalen Applikation durch eine Impfpistole verglichen. Eine dreimalige Immunisierung mit je 1 µg gC-CMV führte bereits zum Schutz einzelner Tiere vor einer Belastungsinfektion mit NIA-3. Die Applikation mittels Impfpistole war dabei effizienter als die intradermale Injektion und vergleichbar der intramuskulären Injektion.

In einem zweiten Experiment wurden acht dreimal mit je 50 µg gC-CMV immunisierte Tiere mit dem PrV Stamm 75 V 19 infiziert. Alle vakzinierten Tiere blieben frei von zentralnervösen Störungen und überlebten die Infektion. Drei der fünf Kontrolltiere verendeten, die beiden übrigen zeigten schwere zentralnervöse Symptome.

Somit konnte erstmals gezeigt werden, daß die DNA-Immunisierung zum Schutz von Schweinen gegenüber einer letalen Virusinfektion führen kann. Die benötigten niedrigen DNA-Mengen, die lang anhaltende Immunität sowie die Möglichkeit des Einsatzes einer Impfpistole lassen diese Methode auch für einen Einsatz zur Bekämpfung von Virusinfektionen landwirtschaftlicher Nutztiere geeignet erscheinen.

7. Summary

Volker Gerdt

DNA-immunization against Aujeszky's Disease

DNA-immunization represents a new method to elicit an immune response. After injection and uptake of the naked DNA, endogenously synthesized proteins are presented on the cell surface leading to induction of humoral and cell-mediated immune responses. At present, vaccination with genes encoding antigens of different infectious agents are being analyzed in various systems. Testing a DNA-vaccine against Aujeszky's Disease allowed analysis of the efficacy of DNA-immunization in a natural virus-host-system.

In this study, genes encoding the envelope glycoproteins gB, gC, gD and gI of pseudorabies virus and β -galactosidase of *E. coli* were cloned under the control of the immediate-early enhancer/promotor of human cytomegalovirus into plasmid pRc/CMV. To verify the identity of expression products, transient expression of proteins was analyzed by indirect immunofluorescence, radioimmunoprecipitation and X-gal staining. After injection of BALB/c mice, β -galactosidase activity was detected in muscles, lymphnodes and skin. Immunization of mice with 50 μ g plasmid-DNA coding for gC and gDgI led to production of specific neutralizing antibodies against gC and gD respectively. As early as nine days after first immunization antibodies against gC were detectable. To compare different routes of application, animals were vaccinated intramuscularly, intradermally, intravenously and intraperitoneally. All tested routes induced detectable specific antibodies, but intramuscular and intradermal vaccination proved to be more efficient than intradermal and intravenous injection. Antibodies persisted for more than 68 weeks in sera of mice. Intramuscular injection of gC-CMV or gDgI-CMV did not result in protection against lethal challenge infection.

To analyze induction of an immune response in the natural host, ten 5-weeks old piglets were immunized with 50 μ g gC-CMV or gDgI-CMV four times in two weeks intervals. Four to eight weeks after first immunization, neutralizing antibodies were detectable by Western Blot, ELISA and plaque reduction assay in sera of all animals. To test for protection, animals were intranasally challenged with 5×10^6 pfu of the highly pathogenic PrV strain NIA-3 62 days after first immunization. Two of four gC-CMV vaccinated animals developed only respiratory

Summary

symptoms and survived the challenge, whereas all animals vaccinated with gDgI-CMV and control animals developed severe symptoms and died on day five p.i.

In sera of pigs immunized with 50 μ g gC-CMV three times in two weeks intervals persisting neutralizing antibodies against gC were detectable for more than seven months. Isolated PBMCs of these animals could be restimulated by UV-inactivated virus, confirming the induction of cell-mediated immune response.

In additional pig experiments, the influence of the amount of DNA and application routes were analyzed. DNA was injected intramuscularly, intradermally by syringe or intradermally by an injector three times in two weeks intervals. Injection of only 1 μ g gC-CMV resulted in protection against NIA-3 challenge infection. Efficacy of vaccination with the injector was higher than normal injection and was comparable to intramuscular injection.

In a second immunization/ challenge experiment eight piglets were immunized three times with 50 μ g gC-CMV. 62 days after first immunization animals were challenged with PrV strain 75V19. All vaccinated animals survived the challenge and did not develop central nervous disorders. In contrast three of five control animals died and the two surviving control animals exhibited severe central nervous symptoms.

In summary, this study demonstrates for the first time the potential of DNA vaccination in protecting pigs against a lethal virus infection. The low amounts of DNA necessary for immunization, the long-lasting immune response, and the possibility of vaccination by an intradermal injector favour a practical use for this new method of vaccination in animal husbandry.