

Aus dem Institut für Virologie
der Tierärztlichen Hochschule Hannover
und dem Institut für Virusdiagnostik
des Friedrich-Loeffler-Instituts, Insel Riems

Expression des Hauptstrukturproteins des
Rabbit Haemorrhagic Disease Virus in transgenen
Pflanzen:
Untersuchungen zur Antigenität und Immunogenität

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin
(Dr. med. vet.)
durch die Tierärztliche Hochschule Hannover

Vorgelegt von
Martin Hammer
aus Rostock

Hannover 2006

Aus dem Institut für Virologie
der Tierärztlichen Hochschule Hannover
und dem Institut für Virusdiagnostik
des Friedrich-Loeffler-Instituts, Insel Riems

Expression des Hauptstrukturproteins des
Rabbit Haemorrhagic Disease Virus in transgenen
Pflanzen:
Untersuchungen zur Antigenität und Immunogenität

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin
(Dr. med. vet.)
durch die Tierärztliche Hochschule Hannover

Vorgelegt von
Martin Hammer
aus Rostock

Hannover 2006

Wissenschaftliche Betreuung:

Prof. Dr. med. vet. B. Grummer, Tierärztliche Hochschule Hannover

PD Dr.med. vet. M. Beer, Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems

1. Gutachterin: Prof. Dr. med. vet. B. Grummer

2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. M. Pröpsting

Tag der mündlichen Prüfung: 20.11.2006

Meinen Eltern und Franziska

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	11
2. Literatur	13
2.1 Rabbit Haemorrhagic Disease (RHD)	13
2.1.1 Ätiologie	13
2.1.2 Klinik und Pathogenese	15
2.1.3 Diagnose	16
2.1.4. Bekämpfung	18
2.2 Schleimhautimmunität und orale Immunisierung	20
2.3 Transgene Pflanzen	23
3. Material und Methoden	27
3.1 Material	27
3.1.1 Antikörper und Antiseren	27
3.1.2 Bakterienstämme	27
3.1.3 Oligonukleotid Primer	27
3.1.4 Enzyme	27
3.1.5 Kits	28
3.1.6 Zellkulturen und Medien	28
3.1.7 Viren	28
3.1.8 Puffer und Lösungen	28
3.1.9 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	33
3.1.10 Geräte	34
3.2 Methoden	34
3.2.1 Gensynthese und Klonierung	34
3.2.2 Herstellung und Vermehrung transgener Pflanzen	36
3.2.3 In-vitro-Analyse transgener Pflanzen	37
3.2.3.1 Aufarbeitung	37
3.2.3.2 RNA Isolierung	38
3.2.3.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen	38
3.2.3.4 DNase Behandlung von RNA	38
3.2.3.5 cDNA-Synthese (Reverse Transkription, RT)	39
3.2.3.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	39
3.2.3.7 Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA) zum Antigennachweis	41

Inhaltsverzeichnis

3.2.3.8	Western Blot	41
3.2.3.8.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-Page)	41
3.2.3.8.2	Coomassiefärbung	42
3.2.3.8.3	Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen	42
3.2.3.8.4	Chemolumineszenz	42
3.2.3.9	Proteinquantifizierung mittels Bradford Test	43
3.2.4	Zellkultur und Virusvermehrung	43
3.2.4.1	Kultivierung von Insektenzellkulturen	43
3.2.4.2	Vermehrung rekombinanter Bakuloviren (RBV)	44
3.2.5	Indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT)	44
3.2.6	Reinigung von RBV-VP60 mittels Dichtegradientenzentrifugation	44
3.2.7	Reinigung und Konzentrierung von RHDV	45
3.2.8	Klonierung und DNA Präparation	45
3.2.8.1	Genkonstrukte	45
3.2.8.2	Präparation kompetenter Bakterien	46
3.2.8.3	Transformation	46
3.2.8.4	Präparation bakterieller Plasmid DNA	46
3.2.8.5	DNA Spaltung	47
3.2.8.6	DNA Agarosegelelektrophorese	47
3.2.9	Transiente Expression von VP60 in Crandell Feline Kidney Cells (CRFK)	47
3.2.9.1	Zellkultivierung	47
3.2.9.2	Transfektion	48
3.2.10	Tierexperimentelle Untersuchungen	48
3.2.10.1	Versuchstiere	48
3.2.10.2	Versuchsaufbau und -durchführung	49
3.2.10.3	Inaktivierung von RHDV	50
3.2.10.4	Hämagglutinations-Test (HAT)	51
3.2.10.5	Antikörper-ELISA	51
3.2.10.6	Pelletierung von transgenen Pflanzen	52

4.	Ergebnisse	53
4.1	In vitro Analysen transgener Pflanzen	53
4.1.1	Transgenen Pflanzen mit VP60 Wildtyp-Gen	53
4.1.1.1	Molekulare Analysen mittels PCR	53
4.1.1.2	Antigen ELISA	53
4.1.2	Transgenen Pflanzen mit pflanzenadaptierten Leserahmen	54
4.1.2.1	Molekulare Analyse mittels PCR und Northern Blot	54
4.1.2.2	Antigen ELISA	54
4.1.2.3	Western Blot	58
4.2	Quantifizierung von VP60	59
4.2.1	VP60 Standard	59
4.2.2	Quantifizierung aus Rekombinanten Bakulovirus (RBV-VP60 Substandard)	60
4.2.3	Quantifizierung aus Organmaterial	60
4.2.4	Quantifizierung aus transgenen Pflanzen	61
4.2.5	Quantifizierung aus transient exprimierenden CRFK Zellen	63
4.3	Tierversuche	66
4.3.1	Prüfung von transgenen Tabak nach parenteraler Verabreichung an Mäuse	66
4.3.2	Prüfung von transgenen Kartoffeln (Frischmaterial) nach oraler und parenteraler Verabreichung an Kaninchen	67
4.3.3	Prüfung von ctxB adjuvierten transgenen Kartoffeln nach oraler (Pellet) und parenteraler Verabreichung an Kaninchen	69
4.3.4	Orale Immunisierung von Kaninchen mit originären und bakulovirusexprimierten VP60	70
4.3.5	Ermittlung der minimal schützenden Dosis von VP60 nach parenteraler Applikation an Kaninchen	72
4.3.6	Prüfung der Immunogenität von transient in Säugerzellen exprimierten VP60	73
5.	Diskussion	75
6.	Zusammenfassung	85
7.	Summary	87
8.	Literaturverzeichnis	89

Inhaltsverzeichnis

9.	Anhang	98
9.1	Abkürzungen	98
9.2	Abbildungsverzeichnis	100
9.3	Tabellenverzeichnis	103

1. Einleitung

Die durch ein Calicivirus verursachte Rabbit Haemorrhagic Disease (RHD) ist die wirtschaftlich bedeutendste virale Erkrankung des Hauskaninchens (*Oryctolagus cuniculus*). Darüber hinaus ist sie wesentliche Ursache für den teilweise dramatischen Rückgang der Wildkaninchenpopulation insbesondere in Teilen Mitteleuropas. Hohe Tenazität des Erregers, leichte Übertragbarkeit und hohe Mortalitätsraten nach Infektion haben aber andererseits auch dazu geführt, dass der Erreger zur gezielten Depopulation der Wildkaninchen in Ländern wie Australien und Neuseeland eingesetzt wurde. Einziges wirksames Mittel zur Bekämpfung ist eine rechtzeitige Vakzination. Wegen der Unmöglichkeit, dass Virus in Zellkulturen zu vermehren, sind alle kommerziell erhältlichen Vakzine aus Leberhomogenaten experimentell infizierter Kaninchen hergestellt. Besondere Charakteristika des Virus und der Infektion, wie Existenz von nur einem, für die Induktion virusneutralisierender Antikörper verantwortlichen Hauptstrukturprotein (VP60) und die Verfügbarkeit wirksamer Infektionsmodelle, haben das Virus zu einem interessanten Kandidaten für die Herstellung von gentechnisch hergestellten Subunitvakzinen gemacht. Dazu existieren seit über 10 Jahren zum Teil durchaus erfolgversprechende Ergebnisse aus Kleinexperimenten, die jedoch keine marktreifen Produkte nachfolgen ließen. Wesentliche Ursachen sind in der Regel zu hohe Kosten für Herstellung und teilweise notwendige aufwändige Reinigung des gentechnisch erzeugten Proteins. Andererseits ist in diesen Experimenten vielfach gezeigt worden, dass die alleinige Verabreichung von VP60 eine Immunität erzeugt.

Der Einsatz von Pflanzen als Expressionssystem für immunogene Moleküle in der Impfstoffherstellung wird seit geraumer Zeit intensiv erforscht (ARNTZEN et al. 2005). Die Produktion von Vakzinen in transgenen Pflanzen ist mit einer Reihe von Vorteilen in der Impfstoffherstellung assoziiert. Bisher ist aber kein kommerziell erhältliches Produkt, das auf dieser Technologie basiert, weder im humanmedizinischen, noch veterinärmedizinischen Sektor erhältlich (KIRK und WEBB, 2005). Als bedeutender Vorteil transgener Pflanzen wird deren Potenzial angesehen, oral und damit sehr einfach, verabreicht zu werden. Die damit erzielte Wirkung soll in der Stimulation von lokalen Immunmechanismen (Schleimhautimmunsystem), wie auch in der Induzierung eines systemischen Schutzes bestehen.

Wesentliche Voraussetzungen für eine Erfolg versprechende Strategie der Entwicklung von, auch als „edible vaccines“ bezeichneten, Immunpflanzen sind, dass:

- (1) das transgene Protein eine, dem originären Protein vergleichbare Antigenität aufweist.
- (2) es in ausreichender Quantität in der Pflanze erzeugt werden kann.

(3) eine orale Aufnahme zur Ausbildung einer Immunität führt.

Die Immunogenität von Virusproteinen, die über die Schleimhäute in den Organismus gelangen, ist durch Untersuchungen vielfach belegt. Einige der in Pflanzen generierten transgenen Virusproteine erwiesen sich sowohl nach parenteraler als auch teilweise nach oraler Applikation im Tiermodell als immunogen.

Im Rahmen eines Verbundprojektes mit der Universität Rostock, dem FBN Dummerstorf, dem Kartoffelerzeuger Norika GmbH, Groß Lüsewitz und der BioMath, Rostock wurden Arbeiten zur Herstellung transgener Pflanzen, die virale Proteine exprimieren, unter der Zugrundelegung verschiedener Strategien der Gensynthese, Klonierung und Transformation durchgeführt und die erhaltenen Pflanzen auf Inhaltsstoffe und immunogene Eigenschaften überprüft.

In der vorgelegten Arbeit werden Ergebnisse der Analyse von RHDV VP60 exprimierenden transgenen Tabak, Kartoffeln und Karotten vorgestellt. Neben *in vitro* Analysen zur Identifizierung und Quantifizierung der kodierenden Gene und deren Expressionsprodukte, wurden eine Reihe von Tierexperimenten zur Wirkung verschiedener VP60 Konstrukte nach parenteraler und oraler Applikation an Kaninchen und Mäusen durchgeführt.

2. Literatur

2.1 Rabbit Haemorrhagic Disease (RHD)

2.1.1 Ätiologie

Im Frühjahr 1984 trat in China eine bis dahin unbekannte, verlustreiche Krankheit bei aus Deutschland importierten Angorakaninchen auf (LIU et al. 1984). Sie ist charakterisiert durch einen perakut-akuten Verlauf mit hoher Morbidität und Mortalität bei erwachsenen Kaninchen. Es erkrankten nur Kaninchen der Spezies *Oryctolagus cuniculus* (XU und CHEN, 1989; HAAS und THIEL, 1993; OHLINGER et al. 1993; GRANZOW et al. 1996; TEIFKE et al. 2002). In Europa wurde erstmals 1986 in Italien von dieser Krankheit berichtet (PARRA und PRIETO, 1990), die sich anschließend über den Kontinent und darüber hinaus ausbreitete (MITRO und KRAUSS, 1993). Klinisch ist diese Krankheit dem „European Brown Hare Syndrome“ (EBHS) sehr ähnlich (MORISSE et al. 1991), wurde durch die OIE 1989 als Viral Haemorrhagic Disease (VHS) bezeichnet und in die Liste B des International Animal Health Codes aufgenommen (MORISSE et al. 1991). In der Folgezeit setzte sich die Bezeichnung Rabbit Haemorrhagic Disease (RHD) durch (HAAS und THIEL, 1993).

Durch ultrastrukturelle, physikochemische und molekularbiologische Analysen konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem Erreger der RHD um ein Virus aus der Familie der Caliciviren handelt (GRANZOW et al. 1989; OHLINGER et al. 1990; PARRA und PRIETO, 1990).

Die Familie der Caliciviridae umfasst die Genera, Lagovirus, Norovirus, Sapovirus und Vesivirus (GREEN et al. 2000). Caliciviren sind unbehüllt und weisen ein isometrisches Kapsid mit 32 kelchförmigen Kapsomeren auf, die in ikosaedrischer Symmetrie angeordnet sind (GREEN et al. 2000). Die Größe des Virions variiert zwischen 35-40 nm (HAAS und THIEL, 1993; GRANZOW et al. 1996; GREEN et al. 2000). Das RHDV wird zusammen mit dem Rabbit Calicivirus (RCV) (CAPUCCI et al. 1996) und dem Erreger des EBHS, einer Erkrankung bei Hasen, in das Genus Lagovirus eingeordnet (GREEN et al. 2000). Das EBHSV und das RHDV weisen ähnliche biologische, antigenetische und molekulare Eigenschaften auf, sind jedoch durch monoklonale Antikörper, wie auch durch ihre Wirtsspezifität voneinander unterscheidbar. Das RCV ist ein eng mit dem RHDV verwandtes apathogenes Virus, das im Darm von Kaninchen repliziert und kreuzreaktive Antikörper zum RHDV erzeugt (CAPUCCI et al. 1996; SCHIRRMEIER et al. 1999).

Die RHDV Struktur- und Nichtstrukturproteine werden durch eine einzelsträngige lineare RNA positiver Orientierung kodiert. Neben der genomischen RNA (gRNA) von 7,4 kb kodiert auch eine subgenomische mRNA (sgRNA) von 2,2 kb, die in ihrer Sequenz dem 3'

Ende der gRNA auf einem Drittel ihrer Länge identisch ist für das Hauptstrukturprotein VP60. Die gRNA des RHDV umfasst zwei offene, sich überlappende Leserahmen (ORF1 und ORF 2). Der ORF 1 codiert für ein Polyprotein von ca. 257 kDa Größe, dessen Prozessierung in Nichtstrukturproteinen, VP60 und VP10 resultiert. Darüber hinaus kann aus sgRNA nach Translation ebenfalls VP60 und VP10 entstehen (WIRBLICH et al. 1996). Die sgRNA repräsentiert vermutlich die hauptsächliche Quelle für VP60, welches aber auch durch Prozessierung des Polyproteins (ORF 1) generiert wird (MEYERS et al. 2000). Somit kann die sgRNA als zusätzliches Genom für die Expression des Hauptstrukturproteins angesehen werden (WIRBLICH et al. 1996). VP10 repräsentiert vermutlich einen Teil des Virions (WIRBLICH et al. 1996; MEYERS et al. 2000). Das Hauptstrukturprotein ist das aus 579 Aminosäuren bestehende Kapsidprotein VP60, welches das Kapsid des RHDV Virions bildet und neutralisierende Antikörper induziert (CAPUCCI et al. 1991; WIRBLICH et al. 1996; MEYERS et al. 2000). Die Antigenität des RHDV wird durch die kelchähnlichen Strukturen auf der Oberfläche vermittelt. Die hauptsächlich antigenen Determinanten sind auf dem C-terminalen Ende des VP60, der die äußere Lage des viralen Kapsids bildet, lokalisiert (CAPUCCI et al. 1995; CAPUCCI et al. 1998; SCHIRRMEIER et al. 1999). Darüber hinaus wurden auch im N-terminalen Bereich, der nach proteolytischer Abspaltung eines ca. 36 kDa großes Fragment bildet, immunodominante Regionen nachgewiesen (MARTINEZ-TORRECUADRADA et al. 1998; LAURENT et al. 2002). Untersuchungen zur Variabilität der VP60 Aminosäuresequenz verschiedener RHDV Stämme führten analog zum Felinen Calicivirus (FCV) zur Einteilung in sechs Abschnitte (A-F) von denen die Region E eine besondere Variabilität aufweist (SCHIRRMEIER et al. 1999).

Insbesondere bei protrahierten Krankheitsverlauf wurde in etwa 5 % der RHDV positiven Fälle elektronenmikroskopisch ein zweiter Viruspartikeltyp, der als Core-like-particles (CLP) (GRANZOW et al. 1996), bzw. als smooth-RHDV (s-RHDV) (BARBIERI et al. 1997) bezeichnet wurde, eine glatte Oberfläche, 25-27 nm Durchmesser und ein 28-30 kDa großes Kapsidproteins aufweist, beschrieben. Zwei Hypothesen für das Auftreten dieser Form wurden diskutiert: zum einen wurde trunkiertes RHDV Genom oder defekte Expression vermutet, da sich VP60 experimentell nicht mit α -Chymotrypsin proteolytisch spalten ließ (GRANZOW et al. 1996), bzw. eine immunvermittelte Degeneration in Betracht gezogen (BARBIERI et al. 1997). Bei chronisch erkrankten Tieren ist ab dem vierten bis achten Tag nach der Infektion diese Partikelform dominant in der Leber nachweisbar. Vom RHDV sind Subtypen bekannt. Ein in Italien identifizierter Subtyp wurde als RHDVa bezeichnet (CAPUCCI et al. 1998) und ist mit dem in Deutschland nachgewiesenen Isolat „Triptis“

identisch (SCHIRRMEIER et al. 1999). In Frankreich konnten anhand vergleichender molekularer Analysen drei Genogruppen unterschieden werden (LE GALL et al. 1998). Nach weiterer antigener Analyse konnten zwei RHDV Varianten charakterisiert werden (GALL-RECULE et al. 2003).

Das Virus ist durch eine hohe Tenazität gekennzeichnet. Chloroform-, Ether- und Trypsinbehandlung, die Senkung des pH Wertes auf 3 und die Erhitzung auf 50 °C für eine Stunde beeinträchtigen die Infektiosität nicht (SMID et al. 1991). Das Virus kann in Organsuspension über mindestens 225 Tage bei 4 °C ohne Verlust der Infektiosität aufbewahrt werden. In getrocknetem Material ist es bei Raumtemperatur, mindestens 105 Tage, in Organsuspension bei 60 °C für mindestens zwei Tage stabil (SMID et al. 1991). Zur Inaktivierung des RHDV eignen sich 10 % Natronlauge (NaOH), 1-1,4 % Formaldehyd, 0,2-0,5 % Beta Propionolaktat und Ethylenimin bei 4°C. Die Immunogenität wird hierdurch nicht gemindert (SMID et al. 1991; ANON., 2004).

2.1.2 Klinik und Pathogenese

Die RHD ist durch einen perakuten bis akuten Krankheitsverlauf, einhergehend mit einer hohen Morbidität (bis 100 %) und Mortalität (40-90 %), gekennzeichnet (XU und CHEN, 1989; GRANZOW et al. 1989). Subakute und chronische Formen der RHD treten selten auf (TEIFKE et al. 2002).

Kaninchen bis zu einem Alter von etwa 10 Wochen erkranken nicht an RHD (SMID et al. 1991; TEIFKE et al. 2002; FERREIRA et al. 2004).

Die Übertragung des Virus erfolgt oral, nasal und parenteral (OHLINGER et al. 1993), vor allem durch kontaminiertes Futter und Gegenstände sowie Ausscheidungen erkrankter Kaninchen (MORISSE et al. 1991). Auch Insekten, wie verschiedenen Fliegenarten wird eine Rolle in der Übertragung des Virus zugeschrieben (GEHRMANN und KRETZSCHMAR, 1991; COOKE, 2002). Die Inkubationszeit beträgt 12 bis 72 h (MARCATO et al. 1991). Im perakuten Krankheitsverlauf verenden die Tiere plötzlich, ohne vorherige klinische Symptome. In akuten Fällen äußert sich die Klinik in Inappetenz, Apathie, Fieber bis 42 °C und Tachypnoe. In der agonalen Phase werden häufig Streckkrämpfe und Ophistotonus beobachtet. Gelegentlich tritt bei verendeten Tieren blutig-schaumiger Nasenausfluss auf. Selten sind ikterische Verfärbungen der Schleimhaut infolge der Lebernekrose (HAAS und THIEL, 1993). Nach experimenteller intranasaler oder intramuskulärer Infektion tritt der Tod meistens nach 48-72 h ein (MARCATO et al. 1991). Nach Epidemien können subakute Fälle

mit einem schwächer ausgeprägten klinischen Bild und einem längeren Krankheitsverlauf auftreten (MARCATO et al. 1991).

Die Pathomorphologie der RHD ist gekennzeichnet durch petechiale bis flächenhafte Blutungen in Schleimhäuten, Serosen und zahlreichen Organen, sowie Leberveränderungen.

Letztere manifestieren sich in einer Vergrößerung, einer feuchten hervortretenden Schnittfläche und brüchiger Konsistenz. Das Organ erscheint braun-gelblich, bis zu diffus dunkelrot, mit deutlicher Läppchenzeichnung. Die Milz ist geschwollen und meistens schwarz-rot gefärbt. Die Lunge kann fokal bis diffus dunkelrot gefärbt sein. Oft ist ein alveoläres Ödem zu finden (XU und CHEN, 1989; MARCATO et al. 1991; OHLINGER et al. 1993). Histologisch lassen sich peripher- bis panlobuläre Leberzellnekrosen mit lymphoplasmazytären und monozytären Infiltraten finden. Erhaltene Hepatozyten können verfettet sein. In zahlreichen Organen sind Mikrothromben nachzuweisen.

Bei der selten auftretenden chronischen Form der RHD ist das histopathologische Bild geprägt durch zentrolobuläre Leberzellnekrosen mit Verkalkungsherden und Proliferation von periportalen Hepatozyten und Gallengängen, die gemeinsam mit fibrosierenden, regenerativen Veränderungen das Gesamtbild einer Leberzirrhose ergeben (TEIFKE et al. 2002). Die exakte Pathogenese der Erkrankung ist nicht geklärt. Es wird davon ausgegangen, dass es durch die massive Lebernekrose zu einer Freisetzung von Thromboplastin kommt (PARK et al. 1997). Dies führt zu einer disseminierten intravasalen Koagulopathie (DIC). Durch den Verbrauch von Gerinnungsfaktoren und Blutplättchen, sowie die mikrovaskuläre Thrombose können ausgeprägte Hämorrhagien auftreten. Der thrombotische Gefäßverschluss fördert die Nekrose der Leber, was zu einem Circulus viciosus führt (TEIFKE et al. 2002). Es gibt Hinweise, dass Tiere die eine Erkrankung überleben, Virus, bzw. virale RNA beherbergen, und so immer wiederkehrende Neuinfektionen verursachen können (MOSS et al. 2002). In neuen Untersuchungen wurden im Blut RHDV infizierter Kaninchen, ca. sechs bis zwölf Stunden vor dem Tod, erhöhte Werte unkonjugierten Bilirubins, hinweisend auf Cholestase und erniedrigte Glucosewerte gefunden. Die Hypoglykämie wurde für die Krämpfe in der agonalen Phase verantwortlich gemacht. Eine schwere Leukopenie mit Erniedrigung der Heterophilen, Lymphozyten und Thrombozyten trat ca. sechs Stunden vor dem Tod der infizierten Kaninchen auf (FERREIRA et al. 2006).

2.1.3 Diagnose

Die Diagnosestellung erfolgt auf der Grundlage der pathomorphologischen Untersuchungen, in der Regel kombiniert mit einem Erreger- bzw. Genomnachweis. Serologische Analysen

sind für epidemiologische Erhebungen und Impfstoffprüfungen von Interesse, spielen aber in der Krankheitsdiagnostik keine Rolle.

Der Hämagglutinationstest (HAT) wurde als erster Routinetest in der Diagnostik der RHD eingesetzt (LIU et al. 1984) und basiert auf der Verwendung humaner Erythrozyten, die nach Interaktion mit dem RHDV agglutinieren (XU, 1991). Titer von 1:64 gelten nach OIE Manual als positiv (ANON., 2004). Es sind jedoch Virusisolate beschrieben, die nur unter bestimmten Temperaturbedingungen (CAPUCCI et al. 1996) oder gar nicht hämagglutinieren (SCHIRRMEIER et al. 1999). Darüber hinaus ergibt der HAT in der Routinediagnostik in etwa 10 % der Fälle falsch negative Reaktionen, was in erster Linie auf die bei protrahierten Verläufen auftretenden CLP, bzw. s-RHDV zurückzuführen ist (GRANZOW et al. 1996; BARBIERI et al. 1997). Durch die Elektronenmikroskopie können die elektronendichten Kapside ab einer Dichte von 10^6 Partikeln/ml, die in akuten Fällen in der Leber meist weit überschritten werden, erkannt werden. Bei zweifelhaften Testresultaten empfiehlt sich zur sicheren Abklärung die Immunelektronenmikroskopie (GRANZOW et al. 1989; PARK et al. 1992; ANON., 2004). Eine sensitive Methode ist der Antigennachweis über den Enzym Linked Immunoabsorbant Essay (ELISA) (CAPUCCI et al. 1991). In Formalin fixierten Gewebestücken kann mit biotinylierten seropositiven Kaninchenserum über eine Avidin-Biotin-Komplex-Peroxidase immunhistochemisch der Antigennachweis erfolgen (STOERCKLE-BERGER et al. 1992). Es finden sich intensive nukleäre und zytoplasmatische Färbungen von Hepatozyten, vor allem im periportalen Bereich, wie auch in Makrophagen der Leber und Lunge, Kupffersche Sternzellen, Milzzellen, Lymphknoten und Nierenzellen (STOERCKLE-BERGER et al. 1992). Mit Hilfe monoklonaler Antikörpern ist an Kryoschnitten der Leber und anderer Organe ein indirekter Immunfluoreszenztest durchführbar (PARK et al. 1997). Die Spezifität ist mit der des HAT vergleichbar.

Bei zweifelhaften Resultaten im HAT und ELISA, bzw. wenn das Vorliegen von s-RHDV Partikeln vermutet wird, kann durch eine Western Blot Analyse eine Diagnose erzielt werden. Dabei werden Virusproteine mit polyklonalen oder monoklonalen Antikörpern detektiert. Spezifische Größen sind bei 60 kDa (Kapsidprotein, VP60), 41-28 kDa (Fragmente von VP60, assoziiert mit dem Übergang von RHDV zu s-RHDV) zu erkennen (PARK et al. 1992; CAPUCCI et al. 1996). Die RT-PCR spielte aufgrund anderer, einfach durchzuführender Tests in der Routinediagnostik der RHD in der Vergangenheit keine Rolle ist aber sehr sensitiv (BOGA et al. 1992; GUITTRE et al. 1995), was ihren Einsatz über die Falldiagnostik hinaus für molekularbiologische (MOSS et al. 2002; FORRESTER et al. 2003) und phylogenetische (NOWOTNY et al. 1997; LE GALL et al. 1998; GALL-

RECULE et al. 2003; FORRESTER et al. 2006) Untersuchungen möglich und wertvoll macht.

Durch die in-situ-Hybridisierung kann bereits acht Stunden nach Infektion im Zytoplasma von Hepatozyten virusspezifische mRNA durch markierte Sonden nachgewiesen werden (GELMETTI et al. 1998).

Für serologische Untersuchungen werden der Hämagglutinationshemmtest (LIU et al. 1984; OHLINGER et al. 1990) und indirekte, sowie kompetitive ELISA eingesetzt (RODAK et al. 1990; COLLINS et al. 1995; ANON., 2004).

2.1.4. Bekämpfung

Neben allgemeinen seuchenprophylaktischen Maßnahmen spielt die Immunprophylaxe für den Schutz vor der Erkrankung eine wesentliche Rolle.

Die Vermehrung von RHDV auf Zellkulturen ist bisher nicht gelungen. Zur Herstellung von Impfstoffen werden Kaninchen experimentell infiziert, deren Lebersuspension wird geklärt, inaktiviert und mit einem Adjuvans kombiniert. In dieser Formulierung ist der Impfstoff zur subkutanen und intramuskulären Injektion zugelassen (XU und CHEN, 1989; OHLINGER et al. 1990; SMID et al. 1991). Die Dauer des Impfschutzes wird zwischen mindestens sechs Monaten (HUANG, 1991) bis zu einem Jahr angegeben (ARGUELLO VILLARES, 1991; ANON., 2004). Wegen einer möglichen Hemmung der Immunitätsausbildung durch maternalen Antikörper, werden Kaninchen erst ab einem Alter von sechs Wochen geimpft.

In Deutschland sind derzeit 4 Impfstoffe zugelassen:

- Cunivac RHD[®], Impfstoffwerk Dessau Tornau GmbH, Dessau
- Lapimed[®], Merial GmbH, Laupheim
- Dercunimix[®], Merial GmbH, Laupheim (RHD und Myxomatose)
- Rika-Vacc[®], Riemser Arzneimittel AG, Insel Riems

Die Generierung und Anwendung von Subunitvakzinen auf der Basis von gentechnisch hergestellten VP60 ist seit nunmehr zwölf Jahren beschrieben, wobei unterschiedliche Vektorsysteme verwendet und Expressionsstrategien verfolgt wurden. Bisher ist jedoch keiner dieser Impfstoffe kommerziell verfügbar. VP60 wurde in *E. coli* sowohl als beta-Galactosidase Fusionsprotein, wie auch im T7 RNA Polymerase System exprimiert. Dabei zeigte das Fusionsprotein nur wenig antigene Übereinstimmung mit dem originärem VP60 und war nicht immunogen, während das im T7 exprimierte VP60 eine große Übereinstimmung mit dem nativem VP60 aufwies und immunogen war (BOGA et al. 1994).

Im gleichen Jahr wurde VP60 erstmals unter der Kontrolle des Bakulovirus Polyhedrin Promotors kloniert und rekombinantes Bakulovirus (RBV) generiert. In Zellkulturüberständen wurden elektronenmikroskopisch RHDV Virus-like-particles (VLP) nachgewiesen und VP60 wurde im Western Blot dargestellt. Nach i.m. Applikation an Kaninchen vermittelten gereinigte VLP eine belastbare Immunität (LAURENT et al. 1994b). VP60 wurde unter Kontrolle des Phosphoglycerat Kinase Promotors in Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) exprimiert. Dieses rekombinate VP60 Protein war antigenetisch dem viralen Protein ähnlich, wies in elektronenmikroskopischen Untersuchungen eine RHDV-VLP Struktur auf und induzierte ohne Adjuvans bei Kaninchen einen Schutz gegen RHDV (BOGA et al. 1997). VP60 konnte stabil in einer transgenen Zelllinie exprimiert werden. Mit Zellysaten zweimal immunisierte Kaninchen überlebten eine Belastungsinfektion mit RHDV. Dagegen induzierte gereinigte Plasmid DNA keine Immunität bei Kaninchen, aber eine Serokonversion bei Mäusen (SCHIRRMEIER et al. 1997).

Die Konstruktion eines rekombinanten Vaccinia-RHDV-Virus (BERTAGNOLI et al. 1996b) eröffnete die Möglichkeit, einen vermehrungsfähigen für das Kaninchen nichtpathogenen Erreger einzusetzen. Das rekombinante Virus exprimiert das Kapsidprotein VP60. Oral immunisierte Kaninchen überlebten die Belastungsinfektion mit RHDV ohne klinische Symptome. Auch wurde ein aviäres Kanarienvirus als Vektorsystem für VP60 erprobt (FISCHER et al. 1997). Das so exprimierte VP60 induzierte nach zweimaliger Inokulation eine protektive Immunität. Ein attenuiertes, rekombinantes Myxomatosevirus, welches das RHDV Kapsidprotein VP60 unter Kontrolle des p 7.5 Promotors exprimiert, wurde generiert, um gleichzeitig gegen Myxomatose und RHD immunisieren zu können (BERTAGNOLI et al. 1996a). Nach intradermaler Applikation des Virus konnten virusspezifische Antikörper nachgewiesen werden, die einen Schutz gegen beide Infektionen vermittelten. Ein weiteres, stärker infektiöses Myxomatose-VP60 Virus konnte auch nach oraler Applikation eine Schutzwirkung gegen Myxomatose und RHDV vermitteln und wurde daher speziell für die Immunisierung von Wildkaninchenpopulationen empfohlen (BARCENA et al. 2000). In Hefen (*Pichia pastoris*) gelang die Generierung eines dem nativem RHDV Kapsidprotein ähnlichem VP60, das in hohen Ausbeute isoliert werden konnte, und Kaninchen nach s.c., i.m. und oraler Applikation Immunität vermittelte (FARNOS et al. 2005a), sowie bei Mäusen nach i.n. Gabe rasch eine humorale und zellvermittelte Immunantwort hervorrief (FARNOS et al. 2005b). Auf die Expression von VP60 in pflanzlichen Viren und transgenen Pflanzen wird in einem gesonderten Abschnitt eingegangen (2.3)

2.2 Schleimhautimmunität und orale Immunisierung

Ein bedeutendes Merkmal des Immunsystems der Schleimhaut ist die Fähigkeit zwischen potentiell pathogenen und nicht pathogenen Proteinen zu unterscheiden (SMITH et al. 2000). Die erste Interaktion der meisten Agenzien, infektiös oder nicht, findet auf der Oberfläche der Schleimhaut, der Mukosa statt. Im Speziellen unterscheidet man die nasale, oropharyngeale, respiratorische, genitale und gastrointestinale Mukosa (FREYTAG und CLEMENTS, 2005). Das lymphatische Gewebe, das mit schleimhautinvasiven Pathogenen interagiert, wird entsprechend seiner Lokalisation als Nasal-, Bronchal- und Gut Associated Lymphoid Tissue, (NALT, BALT, GALT), bezeichnet und als Mucosa Associated Lymphoid Tissue (MALT) zusammengefasst (JUNGI, 1996; OGRA et al. 2001). Die Mukosa ist eine einzigartige Struktur, die neben Zellen mit Mikrofalten auf ihrer apikalen Seite, den Mikrofold Zellen (M Zellen), muzinproduzierende Drüsenzellen, Lymphozyten, Plasmazellen, dendritische Zellen (DC) und Makrophagen enthält (OGRA et al. 2001). Diese Zellen exprimieren polymere Immunglobulinrezeptoren (pIgR), Major Histokompatibility Complex (MHC) Klassen I und II, Adhäsionsmoleküle und eine Vielzahl von Zytokinen und Chemokinen (OGRA et al. 2001).

Der Kontakt des Immunsystems mit Fremdanigenen und potentiellen Pathogenen im Darmlumen wird durch die spezialisierten Antigen-transportierende M Zellen vermittelt, welche im Epithel über den Peyerschen Platten präsent sind, das Antigen an ihrer apikalen Seite über Endozytose aufnehmen, es in Vesikeln zu ihrer basolateralen Membran transportieren, von der es über Exozytose in den Lymphozyten besiedelten submukösen Raum geschleust wird. Diese Antigenaufnahme ist von entscheidender Bedeutung für die frühe Erkennung pathogener Mikroorganismen, um spezifische Immunreaktionen des GALT zu initiieren (GEBERT et al. 2004). Neben den M Zellen sind auch DC in der Lage, direkt aus dem Darmlumen mit Hilfe ihre Dendriten Antigen aufzunehmen (FREYTAG und CLEMENTS, 2005). Im subepithelialen Bereich trifft das Antigen auf DC Zellen, CD4⁺ T Zellen und B Zellen (VANCIKOVA, 2002), den „professionellen“ Antigen präsentierenden Zellen (APC) (SMITH et al. 2000), die das Antigen den Lymphozyten präsentieren. Die Lymphozyten sind in einem Follikel organisiert, der zentral B Lymphozyten enthält, die von T Lymphozyten umgeben werden. Das Resultat der Interaktion im Lymphfollikel ist, dass bevorzugt das Hauptimmunglobulin A (IgA) produzierende B Zellen ausgebildet werden. Die B Zellen migrieren, in einem als *homing* benannten Prozess in die tributären Lymphknoten zurück in die Lamina propria der mukosalen Oberflächen. Dort differenzieren sie sich unter Zytokineinfluss zu Plasmazellen und sezernieren polymeres Immunglobulin A (pIgA),

welches über Transzytose in das Darmlumen transportiert und dort in sekretorisches Immunglobulin (sIgA) gespalten wird (VANCIKOVA, 2002). Diese Antikörper neutralisieren virale und bakterielle Pathogene und verhindern dadurch deren Anheftung an Zellen der Mukosa. Durch die Existenz des gemeinsamen mukosalen Immunsystems wird auf der gesamten Schleimhautoberfläche antigenspezifische Immunität vermittelt (FREYTAG und CLEMENTS, 2005).

Für die Effizienz oraler Immunisierungsmaßnahmen werden folgende Voraussetzungen und Kriterien postuliert (DIETRICH et al. 2003):

- effektive Zuführung des Antigens an immunkompetente Bereiche (z.B. Peyersche Platten),
- Steigerung der Immunantwort durch Verwendung lebender attenuierter Vakzinestämme; bzw. mukosaler Immunmodulatoren wie bakterielle Enterotoxine oder Zytokine;
- Regime und Route der Immunisierung, um neben mukosaler auch systemische Immunität zu erreichen.

Unter physiologischen Umständen ist die Reaktion auf lösliches Nahrungsprotein Toleranz, während auf Reize, wie invasive Organismen, oder Antigen in Verbindung mit inflammatorischen Agenzien eine aktive Immunität entwickelt wird (SMITH et al. 2000; JANEWAY et al. 2002). Daher ist die orale Toleranz als eine spezifische immunologische Reaktionslosigkeit definiert (WILLIAMSON et al. 1999; JANEWAY et al. 2002; MOWAT, 2005), die den Erfolg einer oralen Immunisierung beeinträchtigen kann.

Für die Entwicklung der oralen Toleranz werden verschiedene Mechanismen verantwortlich gemacht:

1. durch klonale Deletion von CD4⁺ T Zellen, über Apoptose, bedingt durch sehr hohe Antigenmengen (SMITH et al. 2000; STROBEL, 2002). Dem p55 Tumor Nekrose Faktor Rezeptor wird eine mögliche Rolle in der Induktion der Apoptose bei oraler Toleranz zugeordnet, da er Einfluss auf die Organogenese von lymphatischen Gewebe, besonderes der Peyerschen Platten hat (SMITH et al. 2000).
2. durch klonale Anergie (STROBEL, 2002) von CD4⁺ T Zellen nach Gabe von großen Antigenmengen. Dabei erfolgt keine Kostimulation der T Zellen durch Oberflächenmoleküle der APC. Kostimulierend agieren beispielsweise CD80 und CD86, die, vermittelt über CD28 der CD4⁺ Zelle, diese zu einer Effektorzelle entwickeln. Geschieht dies nicht, unterbleibt die Antigenerkennung, so dass weder die Stimulation weiterer T Zellen, sowie weitere proinflammatorische Effekte erfolgen (JANEWAY et al. 2002).

3. durch das Auftreten regulatorischer T Zellen, die nach erneuter Begegnung mit Antigen spezifische Reaktionen unterdrücken können. Helferzellen, wie T_{H3} Zellen, reagieren auf Antigen mit der Bildung von inhibitorisch wirksamen Interleukinen; IL-4, IL-10 und Tumor Growth Factor beta, TGF-β. Auch werden regulatorische Zellen, wie T_{R1} Zellen aktiviert, die ihrerseits TGF-β IL-10 abhängig produzieren. Dieses Zytokinmuster bewirkt eine Hemmung der Entwicklung der zellulären Immunreaktion. Dadurch kommt es praktisch weder zu einer humoralen- noch T Zell Reaktion (JANEWAY et al. 2002).

Ein wesentlicher Faktor für die Wirkung oral verabreichter Immunogene, einschließlich pflanzenexprimierter Impfstoffe, ist die Verfügbarkeit von sicheren und wirkungsvollen mukosalen Adjuvantien (FREYTAG und CLEMENTS, 2005). Ein Adjuvans ist eine Substanz, die zu einer verstärkten Immunantwort führt, wenn sie zusammen mit Antigen verabreicht wird (JUNGI, 1996).

Diese Wirkung beruht auf 2 Effekten:

- Depot Effekt: das Antigen steht dem Immunsystem für längere Zeit zur Verfügung.
- Immun-Potentation: durch unspezifischer Einwirkung (Reizung, Aktivierung) auf das Immunsystem wird die spezifische Immunantwort verstärkt.

Eine der effektivsten Substanzen für orale Immunisierungsmaßnahmen, besonders für nichtreplizierende Antigene, ist das bakterielle produzierte Cholera toxin (ct) von Cholera bakterien (*Vibrio cholerae*) (OGRA et al. 2001; FREYTAG und CLEMENTS, 2005). Es konnte gezeigt werden, dass die Untereinheit B (ctxB) ein effektives, eine Adjuvanswirkung vermittelndes Konjugat für gentechnisch exprimiertes Fremdprotein darstellt (KIM et al. 2004). Dabei bindet das ctxB Pentamer an spezifische Ceramid-Galaktose Rezeptormoleküle wie G_{M1} Ganglioside, die in der apikalen Plasmamembran von intestinalen Epithelzellen und M Zellen zu finden sind (KIM et al. 2004). CtxB bewirkt die selektive Depletion von zytolytischen CD8⁺ T Zellen aus Lymphknoten durch die Induktion von Apoptose. Daraus resultiert die Aufregulierung der Expression von Aktivierungsmarkern von B Zellen, die Modulation der Zytokinproduktion und die Antigenpräsentation durch Monozyten und Makrophagen (FREYTAG und CLEMENTS, 2005).

Bei den bisher in der Veterinärmedizin zur oralen Immunisierung eingesetzten Vakzinen handelt es sich entweder um attenuierte Erreger oder um Totvakzine. Darüber hinaus induzierten rekombinant generierte VLPs von Rotaviren und Caliciviren in den Untersuchungen von (ESTES et al. 1997) nach oraler Applikation eine Immunität und auch

für RHDV sind Experimente zur oralen Immunisierung mit rekombinanten VP60 beschrieben (PLANA-DURAN et al., 1996, FARNOS et al., 2006);

Derzeit werden oral applizierbare Vakzine besonders in der Geflügelhaltung, zunehmend in der Fischhaltung, sowie bei der Bekämpfung der Klassischen Schweinepest (KSP) und der Tollwut bei Wildtieren eingesetzt (Tab. 1).

Hühner	Krankheit	Impfstofftyp
	Infektiöse Anämie	l
	Infektiöse Laryngotracheitis	l
	Pocken	l
	Aviäre Enzephalomyelitis	l
	Infektiöse Bursitis	l
	Newcastle-Disease	l (P)
	Infektiöse Bronchitis	l (P)
	Salmonellosen	l
	Kokzidosen	l
Puten	Hämorrhagische Enteritis	l
	Newcastle-Disease	l (P)
	Rhinotracheitis	l (P)
Gänse	Salmonellosen	l
Fische	Virale Hämorrhagische Septikämie	l
	Rotmaulseuche	i
Wildtiere	Tollwut	l
	Klassische Schweinepest	l

Tab. 1: In Deutschland verwendete oral/ mukosal wirksame Impfstoffe in der Veterinärmedizin. l = lebend, i = inaktiviert, (P) = primäre Immunisierung, modifiziert nach (SELBITZ und MOOS, 1997a)

2.3 Transgene Pflanzen

Durch die Entwicklung verschiedener Transformationsstrategien für die Expression von Fremdgenen in Pflanzen eröffnen sich interessante Möglichkeiten für deren Anwendung. Das Konzept zur Produktion von Impfstoffen in Pflanzen wurde erstmals 1995 erörtert und in der Folgezeit als weiterer Aspekt der Impfstoffherstellung aufgegriffen (MASON und ARNTZEN, 1995; RICHTER und KIPP, 1999; GIDDINGS et al. 2000; LANGRIDGE, 2000; DUS SANTOS und WIGDOROVITZ, 2005). Ein großer Vorteil bei der Produktion von Vakzinen in transgenen Pflanzen ist die Möglichkeit, essbares Gewebe direkt oral zu verabreichen, ohne eine Reinigung des Antigens vorzunehmen. Solche Pflanzen werden auch als „edible vaccines“, bezeichnet (RICHTER und KIPP, 1999). Vor allem ökonomische Gründe, wie kostengünstige Herstellung durch landwirtschaftlichen Anbau, die Vermeidung von logistischen und personellen Aufwand durch die einfache orale Applikation werden aufgeführt (MASON und ARNTZEN, 1995; GIDDINGS et al. 2000; LANGRIDGE, 2000; OGRA et al. 2001). Ein weiterer wichtiger Aspekt basiert auf der oralen Anwendbarkeit und der damit erwarteten höheren Akzeptanz von Impfstoffen (RICHTER und KIPP, 1999;

RIGANO und WALMSLEY, 2005; GIUDICE und CAMPBELL, 2006). Subkutan und intramuskulär injizierte Vakzine bewirken in der Regel nur eine schwache Immunreaktion in der Schleimhaut, während oral verabreichte Vakzine sowohl Schleimhaut-, als auch systemischen Immunität induzieren (MASON und ARNTZEN, 1995; LANGRIDGE, 2000).

Experimentell konnten viele virale und bakterielle Antigene transgen in Pflanzen exprimiert werden. Mittlerweile sind über 40 Pflanzenarten experimentell mit Fremdgenen transformiert worden (RICHTER und KIPP, 1999). Neben Modellpflanzen, wie dem Tabak (*Nicotina tabacum*) und der Acker-Schmalwand (*Arabidopsis thaliana*) (RICHTER und KIPP, 1999; SCHILLBERG et al. 2005) werden Getreidepflanzen (Reis, Weizen, Mais), Leguminosen (Bohne, Soja, Erbse) Früchte (Banane) und Nachtschattengewächse (Kartoffel, Tomate) verwendet (SCHILLBERG et al. 2005).

Die Expression von Antigenen in Pflanzen kann durch stabile genetische Transformation über die genomische Integration eines Transgens (SCHILLBERG et al. 2005) im Zellkern bzw. im Genom von Chloroplasten oder als transiente Expression in Pflanzen über virale Vektoren erfolgen (ARNTZEN et al. 2005). Im ersten Fall erfolgt zunächst die Integration der genetischen Sequenz des gewünschten Pathogens in einen Pflanzentransformationsvektor. Abhängig vom Vektor kann die kodierende Sequenz in ausgewählten oder allen Pflanzeneilen transformiert und akkumuliert werden. Dieser Vektor kann über *Agrobacterium* vermittelte Transformation, aber auch über andere Methoden, wie z.B. Polyethylen oder Partikel Bombardement in Pflanzenzellen integriert werden. Die daraus entstehenden Pflanzen enthalten die Expressionskassette stabil in ihrer nukleären DNA, so dass das Fremdprotein exprimiert werden kann. Eine Isolierung des Antigens oder die direkte Verfütterung der Pflanze sind dann möglich. Der schematische Ablauf ist in Abb. 1 dargestellt. Rekombinante Pflanzenviren entstehen durch Fusion der genetischen Sequenz eines Epitops mit der Sequenz des Hüllproteins eines Pflanzenvirus (z.B. Tabakmosaikvirus), zu einem chimären Genom. Mit diesem rekombinanten Virus, aber auch nur mit entsprechender RNA kann eine empfängliche Pflanze (z.B. Tabak) infiziert werden. Die nachfolgende Virusreplikation führt zu einer transienten Expression des chimären Hüllproteins, welches sich aus der Pflanze reinigen lässt.

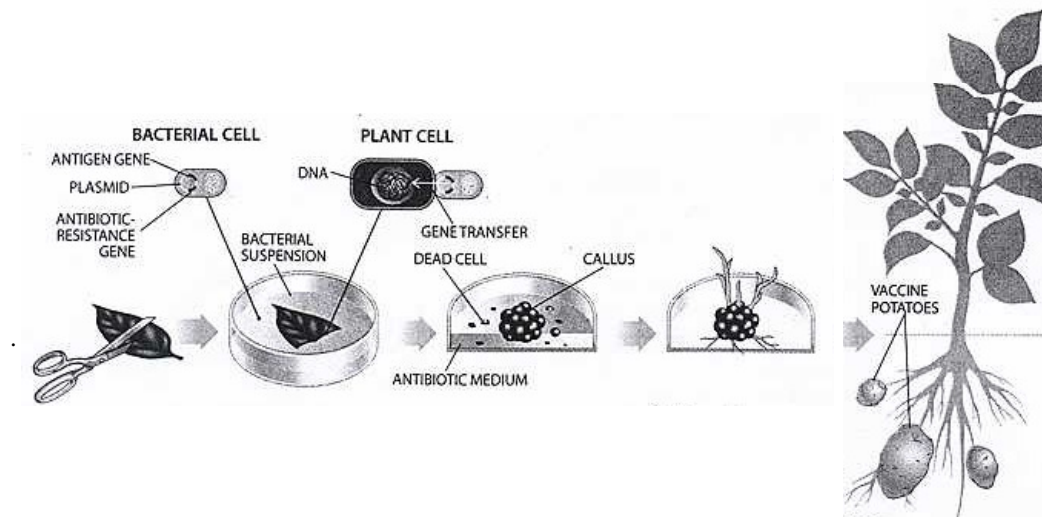


Abb. 1: Schema zur Herstellung einer transgenen Kartoffelpflanze über *Agrobacterium* vermittelten Transfer eines Fremdgens in eine Kartoffelpflanze (LANGRIDGE, 2000)

Die Menge des exprimierten Proteins in transgenen Pflanzen ist oft zu niedrig, um damit immunisieren zu können (CASTANON et al. 2002). Die Expression ist in hohem Maße von der Wahl des Promotors abhängig (CASTANON et al. 2002). Es werden Vektoren für die konstitutive (in allen Teilen der Pflanze gleichmäßig) und spezifische (z.B. nur in Speicherparenchymen von Pflanzen) Expression unterschieden, denen verschiedene Promotoren vorgeschaltet sind. Der häufig verwendete konstitutive Promotor des Blumenkohlmosaikvirus (CaMV35S) führt zu einer relativ geringen Fremdproteinexpression (z.B. Humanes Serumalbumin 0,02 % (SIJMONS et al. 1990) und humanes C-Protein 0,001 % (CRAMER et al. 1996) des gesamtlöslichen Proteins). Ein höherer Anteil am gesamtlöslichen Protein wird durch den Einsatz anderer, stärkerer Promotoren, wie z.B. dem des Glutelins (GANZ, 1996), Legumins (Anteil transgen exprimierter Antikörper am gesamtlöslichen Protein 1-5 %) (CONRAD und FIEDLER, 1998) und dem Schlüsselenzym in der Amylossynthese, der Granula bound starch syntethase (GBSS) beschrieben (VISSER et al. 1991).

Häufig werden immunogene Virushüllproteine exprimiert (MASON et al. 1992; CASTANON et al. 1999; BIEMELT et al. 2003) die in Pflanzen VLP bilden. Diese Strukturen wurden durch elektronenmikroskopische Untersuchungen, u.a. für das Norwalk Virus (NV) aus transgenen Tabak (MASON et al. 1992; MASON und ARNTZEN, 1995) und das Humane Papilliom Virus Typ 16 (HPV-16) aus transgenen Kartoffeln (BIEMELT et al. 2003) und transgenen Tabak (BIEMELT et al. 2003); (VARSANI et al. 2003) nachgewiesen. Die VLP des NV unterschieden sich nicht von der Hülle des Wildvirus (MASON und ARNTZEN, 1995), während VLP von HPV-16 auch teilweise unvollständig und degeneriert gefunden wurden (VARSANI et al. 2003).

Das RHDV Kapsidprotein VP60 wurde bisher erfolgreich in Kartoffeln und Tabak exprimiert. So konnte die VP60 kodierende Sequenz unter Kontrolle des CaMV35S- und eines modifizierten CaMV35S Promotors über *Agrobacterium* vermittelte Transformation in Kartoffeln integriert werden (CASTANON et al. 1999). Der Anteil von rekombinanten VP60 am gesamtlöslichen Protein in den Blättern betrug maximal 0,3 %. Extrakte dieses Materials mit jeweils 12 µg VP60, kombiniert mit kompletten Freundschens Adjuvans, wurden s.c. an zwei Kaninchen appliziert und dreimalig i.m., diesmal mit inkompletten Freundschens Adjuvans kombiniert wiederholt. Nach 67 Tagen wurden Antikörpertiter zwischen 1,5-2 log₁₀ gemessen, die gegen eine Belastungsinfektion mit RHDV schützten.

Über einen knollenspezifischen Pflanzenexpressionsvektor pTUB2T7VP60 konnte in Kartoffelknollenextrakt 3,5 µg VP60/ mg löslichen Gesamtprotein exprimiert werden (MARTIN-ALONSO et al. 2003). Dies entspricht einem Anteil von 0,35 %. Kaninchen wurde zwischen 100-500 µg VP60 als Lyophilisat insgesamt viermal oral verabreicht. Lediglich ein Tier, welches den höchsten Antikörpertiter aus der 500 µg Gruppe aufwies, überlebte die Belastungsinfektion mit RHDV, während Kaninchen mit Antikörpertitern zwischen 1,28-1,4 log₁₀ nach etwa 70 Stunden an RHD verendeten.

Für die Expression von VP60 in Tabak wurde ein Plum Pox Virus Vektor (PPV-NK) ausgewählt, in den stabil die VP60 kodierende Sequenz kloniert wurde (PPV-NK-VP60) (FERNANDEZ-FERNANDEZ et al. 2001). Tabakpflanzen wurden mit diesen Vektoren infiziert und durch Western Blot Analysen von Tabakextrakt die Expression von VP60 nachgewiesen. Teilweise wurde neben kompletten RHDV Kapsidprotein auch Proteine von 33, 38, 44 und 46 kDa Größe gefunden und dies auf Degeneration, bzw. Instabilität der Chimäre zurückgeführt. Kaninchen wurden mit Tabakextrakt vakziniert und nachfolgend Antikörpertiter zwischen 1-6 log₁₀ (60-, 44 kDa Gruppen), 1-2 log₁₀ (38 kDa Gruppe) bestimmt. Die Belastungsinfektion mit RHDV überlebten alle Tiere ohne klinische Symptome.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Antikörper und Antiseren

Anti-RHDV-Maus MAk mix (1G8, 3C12, 4D7, 7G3)	FLI Riems
Anti-VP60-Maus MAk 1G8	FLI Riems
Anti-VP60-Maus MAk 10A6	FLI Riems
Anti-VP60-Maus MAk 6A12	FLI Riems
Anti-VP60-Maus MAk 7-5	FLI Riems
Anti-VP60-Maus MAk mix (1G8, 6A12, 10A6)	FLI Riems
Anti-CT-Kaninchen IgG	Sigma
FITC-Ziege-Anti-Maus IgG	DAKO
FITC-Schwein-Anti-Kaninchen IgG	DAKO
POD-Anti-Kaninchen IgG	Sigma
POD-Anti-Maus IgG	Sigma
VP60 HIS A862 Kaninchen	FLI Riems
VP60 HIS C107 Maus	FLI Riems
NS Kaninchen A895	FLI Riems
NS Maus F27	FLI Riems

3.1.2 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> -Stamm OneShot [®] TOP10	Invitrogen
--	------------

3.1.3 Oligonukleotid Primer

5306, 5727, 6026, 7044	MWG Biotech
oligo (dT) ₂₀ Primer	Invitrogen

3.1.4 Enzyme

Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
Taq-DNA-Polymerase	Promega
DNase I	Roche
RNase A	Sigma
RNase H	Gibco
Reverse Transkriptase	Gibco

Für die Reaktionen wurden die vom jeweiligen Enzymhersteller mitgelieferten Puffer eingesetzt.

3.1.5 Kits

Plasmid Midi Kit [®]	Qiagen
Plasmid Maxi Kit [®]	Qiagen
Super Signal [®] West Pico Chemiluminescent Kits	Pierce
RNA Isolationskit Purescript [®]	Gentra

3.1.6 Zellkulturen und Medien

CRFK Katzen-Nieren-Zelllinie (Crandell Feline Kidney)	Zellbank, FLI Riems
SF9 Insektenzelllinie (<i>Spodoptera frugiperda</i>)	Zellbank, FLI Riems
High V Insektenzelllinie (<i>Spodoptera frugiperda</i>)	Zellbank, FLI Riems
MEM „H“+MEM „E“ 1:1 /NEAS -Medium	Zellbank, FLI Riems
Fetales Kälber Serum	Zellbank, FLI Riems
Insekt. Med. Grace + 10 % FKS	Zellbank, FLI Riems
SF 900 II	Gibco

3.1.7 Viren

RHDV Isolat „Eisenhüttenstadt“ (Acc No: Y15440)	FLI Riems
Rekombinantes Bakulovirus (RBV-VP60)	(LAURENT et al. 1994a)
RBV-VP60 (P10)	FLI Riems

3.1.8 Puffer und Lösungen

IP Puffer pH 7,2 und pH 6,0

8,28	g	NaCl
1,186	g	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
0,2	g	KH ₂ PO ₄
A. dest. ad 1 000 ml		

10 x PBS Puffer

80	g	NaCl
2,0	g	KCl

11,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

2,0 g KH_2PO_4

A. dest. ad 1 000 ml

TE Puffer

10 mM Tris/ HCl (pH 7,5)

1 mM EDTA (pH 8,0)

Fluoreszenzerhaltungspuffer pH 8,6 (JOHNSON et al. 1982)

2,5 g DABCO

10 μl Propidiumjodid (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

PBS ad 10 ml

5 x TBE Puffer

54 g Tris

27,5 g Borsäure

20 ml 0,5M EDTA (pH 8,0)

A. dest. ad 1 000 ml

Westen Blot

10 % Trenngel

3,75 ml Unterpuffer

4,8 ml Acrylamid (30 %) + Bisacrylamid (0,8 %)

6,45 ml A. dest.

30 μl Ammoniumpersulfat (10 %)

15 μl TEMED

5% Sammelgel

2,5 ml Oberpuffer

1,5 ml Acrylamid (30 %) + Bisacrylamid (0,8 %)

6 ml A. dest.

30 μl Ammoniumpersulfat (10 %)

30 μl TEMED

Unterpuffer pH 8,8

18,16 g Tris
0,4 g SDS
A. dest. ad 100 ml

Oberpuffer pH 6,8

6,055 g Tris
0,4 g SDS
A. dest. ad 100ml

5 x Elektrophoresepuffer pH 8,3 Stammlösung

9 g Tris
43,2 g Glycin
3 g SDS
A. dest. ad 600 ml

4 x SDS-Probepuffer

4 ml A. dest.
1 ml 0,5 M Tris HCl (pH 6,8)
1,6 ml SDS (10 %)
0,8 ml Glycerol
0,4 ml Beta-Mercaptoethanol
0,2 ml Bromphenolblau (0,05 %)

Transferpuffer pH 8,4

2,422 g 20 mM Tris
11,41 g 152 mM Glycin
200 ml 20% Methanol
1,0 g 0,1% SDS
A. dest ad 1 000 ml

TBS-T pH 7,6

2,42 g 20mM Tris
8 g 137mM NaCl

0,5 ml Tween
A. dest. ad 1 000 ml

Coomassie Färbelösung

1,25 g Coomassie-Brilliant-Blue R 250
277 ml Methanol
46 ml Essigsäure
A. dest. ad 600 ml

2,5 x Entfärber

750 ml Ethanol
250 ml Essigsäure

ELISA

PBS Tween (PBS-T)(0,05%)Waschpuffer

0,5 ml Tween 20
A. dest. Ad 1000 ml

Carbonatpuffer pH 9,6 (Beschichtungspuffer Antigen-ELISA)

1,59 g Na_2CO_3 , Natriumcarbonat
2,93 g NaHCO_3 , Natriumhydrogencarbonat
A. dest. ad 1 000 ml

Tris NaCl pH 7,6 (Beschichtungspuffer Antikörper-ELISA)

2,422 g Tris
8,766 g NaCl
A. dest. ad 1 000 ml

Serum-Konjugatverdünner

PBS-T Waschpuffer + 5 % Pferdeserum (v/v)

Lösung A

2,1 g $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$
A. dest ad 100 ml

Lösung B

3,56 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$

A. dest ad 100 ml

Stopplösung

4N H_2SO_4

Präparation kompetenter Bakterien**TfB 1 pH 5,8**

30 mM Kaliumacetat

50 mM MnCl_2

100 mM RbCl_2

10 mM CaCl_2

15 % Glycerin

TfB 2

10 mM Mops (pH 7,0)

75 mM CaCl_2

10 mM RbCl_2

15 % Glycerin

Lösung I

25 mM Tris (pH 8,0)

10 mM EDTA (pH 8,0)

50 mM Glucose

Lösung II

0,2 N NaOH

1 % SDS

Lösung III

3 M Kaliumacetat (pH 4,8)

3.1.9 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Agarose Ultra Pure	Gibco
Ammoniumpersulfat	BioRad
BenchMark Prestained Protein Ladder	Invitrogen
BD Microtainer™ SST	Becton Drive
Biotinylated SDS-Page Low Range	Bio Rad
Chloroform	Roth
dNTP	Promega
DTT	Invitrogen
DNA Sample Buffer Blue/ Orange Loading Dye	Promega
1kb DNA Marker	Invitrogen
ExtraAvidin® Peroxidase	Sigma
Filme	Kodak
5 x First Strand Buffer (RT)	Promega
Hyperfilm™	Amersham
LB-Broth fertig	Invitrogen
Magnesiumchlorid (PCR)	Promega
Milchpulver	Amersham
Natriumcarbonat	NaRiedle-De Haän
OPD, ortho-Phenylenediamin	Sigma
Pipettenspitzen	Eppendorf
Propidiumjodid	Sigma
Reaktionsgefäße	Eppendorf
RNasin	Promega
Schwefelsäure	Roth
TEMED	BioRad
SuperSignal™	Pierce
10 x Transkriptionspuffer (PCR)	Promega
Trizol	Roth
Tween 20	Serva
Wasserstoffperoxid	Merck
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Falcon

Chemikalien wurden, soweit nicht anders erwähnt von der Firma Roth bezogen.

3.1.10 Geräte

Bakterienschüttler	New Brunswick Scientific
Brutschränke	
für Bakterien	VEB MLW Medizinische Geräte
für Zellen, CO ₂ begast	Heraeus Instruments
Digitalkamera CAMEDIA C-3040ZOOM	Olympus
Du 640 Spectrophotometer	Beckmann
Elektroporationsgerät Easyjec TM	Equi Bio
Elektroporationsküvette	Peqlab
Fluoreszenz Mikroskop IX50	Olympus
Fluoreszenzeinrichtung U-RFL-T	Olympus
Gene Quant RNA/DNA Calculator	Amersham
MiniCycler	MJ Resarch
Molecular-Light-Imager „night owl“	EG&G Berthold
Pipetten	SL-Pette, Eppendorf
Spectra Mini AP	Tecan
Sonifer Ultraschallgerät	Branson
Thermomixer 5436	Eppendorf
Taumler Schüttelgerät	Polymax 1040, Heidolph
Ultraschallgerät, Sonifer 450	Branson
Vortexer	Janke&Kunkel, IKA [®] Labortechnik
Zentrifugen	
Tischzentrifuge Universal 30RF	Hettich
Tischzentrifuge Z160 M	Hermle
LE-70 Ultrazentrifuge	Beckmann
Optima TM LTX Ultrazentrifuge	Beckmann
Rotoren	
SW 28.1	Beckmann
TST 28.38	Kontron

3.2 Methoden

3.2.1 Gensynthese und Klonierung

Für die Konstruktion der offenen Leserahmen des Hauptstrukturproteins VP60 wurde die Nukleotidsequenz des RHDV Isolates „Eisenhüttenstadt“ verwendet. Um den Einfluss

zellulärer Prozessierungsmechanismen auf die Expressionsstärke und Immunogenität zu untersuchen, wurden verschiedene synthetische VP60 Leserahmen (ORF) hergestellt und im Vergleich zu Wildtyp (wt) VP60-ORF analysiert. Die synthetischen VP60 orientierten sich an denen von der Tabakpflanze bevorzugten Triplets (*codon usage*). Auf diese Weise sollte eine verbesserte Fremdproteinexpression erreicht werden. Ein ebenso modifizierter synthetischer ctxB Leserahmen wurde, mit dem Ziel der Integration eines mukosalen Adjuvans, aminoterminal an VP60 fusioniert. Ein mit dem ctxB assoziiertes Signalpeptid vermittelt den Eintritt in das endoplasmatische Retikulum (ER) und damit die Prozessierung und Glycosylierung des Fusionsproteins. Die carboxyterminal angefügte Aminosäuresequenz SEKDEL (Ser-Glu-Lys-Asp-Glu-Leu), ein pflanzenspezifisches ER-Retentionssignal, sollte eine Rückhaltung und Akkumulation der Fremdproteine im ER bewirken. Konstrukte ohne Signalpeptide, wie ctxB Δ sigVP60 und ctxB Δ sigVP60SEKDEL, können nicht ins ER geschleust werden und dienten als Kontrolle für die strukturelle Integrität der Fremdproteine. Die in Tabelle 3 aufgeführten Konstrukte wurden in Pflanzentransformationsplasmide unter der Kontrolle des konstitutiv exprimierenden 35S-RNA Promotors des Blumenkohlmosaikvirus (pS) und einem knollenspezifisch exprimierenden Promotor des Patatingens (pGBSS) transferiert. Außerdem wurden die Konstrukte auch in einen Expressionsvektor für Säugerzellen kloniert, um die VP60 Varianten vergleichend immunologisch und funktionell zu analysieren. (siehe 3.1.5.1). Diese Arbeiten wurden im Labor von Dr. Keil durchgeführt.

VP60 ORF	DNA	Promotor		Expression in
		pS konstitutiv	pGBSS knollenspezifisch	
wt	pS_VP60 2/18	+	-	Zytoplasma
synthetisch	pS_VP60	+	+	Zytoplasma
	pS_VP60SEDKEL	+	-	Zytoplasma
	pS_ctxB Δ sigVP60	+	+	Zytoplasma
	pS_ctxBVP60	+	+	Intrazellularraum
	pS_ctxB Δ sigVP60SEKDEL	+	-	Zytoplasma
	pS_ctxBVP60SEDKEL	+	-	Endoplasmatisches Retikulum

Tab. 2: Unter der Kontrolle des pS und pGBSS Promotors klonierte VP60-DNA-Konstrukte.

pS = konstitutiv aktiver 35S-RNA-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus

pGBSS = knollenspezifisch exprimierter Promotor des Patatingens, wt = Wildtyp

SEKDEL = Retentionssignal für das Endoplasmatische Retikulum (ER); ctxB = kodierender Bereich für Cholera toxin/ Untereinheit B

Δ sig = Deletion des ctxB - Signalpeptides

Exemplarisch ist das Pflanzentransformationsplasmid pS_ctxBVP60SEKDEL in Abb. 2 dargestellt.

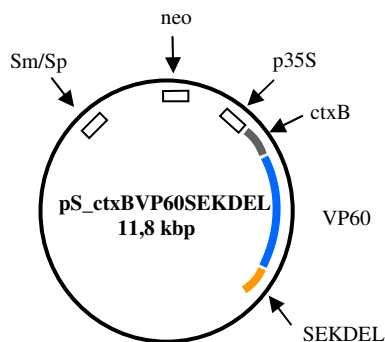


Abb. 2: Pflanzentransformationsplasmid, Beispiel: p35S_ctxBVP60SEKDEL
 Sm/Sp = bakteriell exprimiertes Streptomycin/Spectinomycinresistenzgen
 neo = Neomycinresistenzgen; pS = konstitutiv aktiver 35S-RNA-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus
 ctxB = kodierender Bereich Cholera-Toxin/ Untereinheit B; SEKDEL = ER-Retentionssignal

3.2.2 Herstellung und Vermehrung transgener Pflanzen

Die transgenen Pflanzen wurden vom Fachbereich Agrarökonomie der Universität Rostock (PD Prof. Dr. I. Broer, Dipl.-Biol. H. Mikschofsky) generiert und zur Analyse zur Verfügung gestellt. Durch PEG vermittelten Transfer der Ziel-DNA in Protoplasten, zellwandlose Pflanzenzellen, wurde zunächst transient exprimierendes Pflanzenmaterial (Tabak, Karotte) hergestellt. Die transfizierten Protoplasten wurden lyophilisiert. Mit Hilfe der transformierenden Eigenschaften besitzenden Bodenbakteriums *Agrobacterium tumefaciens* wurden transgene Pflanzen transformiert. Die Fremdgenexpressionskassetten (Tab. 3), unter der Kontrolle konstitutiv exprimierender (pS) und knollenspezifisch exprimierender (pGBSS) Promotoren, wurden über die agrobakteriellen Transferplasmide in verletzte Pflanzenteile oder Kalluszellen geschleust und in das Pflanzengenom integriert. Anschließend konnte durch somatische Embryogenese ein Embryo am Kallusklumpen induziert werden, der in der Lage war, sich durch hormonelle Stimulation zu einer intakten Pflanze zu entwickeln. Zur Untersuchung gelangte lyophilisiertes Pflanzenmaterial von Tabak, Kartoffelknolle und Karotte, Kalluskulturen von Karotte, sowie Tabak- und Kartoffelfrischpflanzen, Kartoffelknollen und Karottewurzeln (Tab. 3).

	Tabak SRI	Kartoffel Desireé			Albatros		Karotte Rote Riesen		Rotin	
		Blatt	Knolle	Knolle lyo	Blatt	Knolle	Kallussusp. lyo	Kallussusp. lyo	Kalluskultur	Rotin Wurzel
wt	1	1	1	-	1	1	-	-	-	-
pS	5	1	2	-	1	1	-	-	-	-
pS_VP60 wt	20	-	-	-	-	-	-	-	7	-
pS_VP60	7	4	4	-	4	5	4	15	-	2
pS_VP60SEKDEL	5	6	6	1	3	4	-	-	-	-
pS_ctxBVP60	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pS_ctxBΔsigVP60	15	-	-	-	6	9	-	-	-	-
pS_ctxBVP60SEKDEL	20	-	-	-	6	8	-	-	-	-
pS_ctxBΔsigVP60SEKDEL	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GBSS	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-
GBSS_VP60	-	-	-	-	20	19	-	-	-	-
GBSS_ctxBVP60	-	-	-	-	18	20	-	-	-	-
GBSS_ctxBΔsigVP60	-	-	-	-	25	26	-	-	-	-

Tab. 3: Übersicht der transgenen Pflanzenlinien (FB Agrarökologie, Universität Rostock)

pS = konstitutiv aktiver 35S-RNA-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus

pGBSS = knollenspezifisch exprimierter Promotor des Patatingens, wt = Wildtyp

SEKDEL = Retentionssignal für das Endoplasmatische Retikulum (ER); ctxB = kodierender Bereich für Cholera-toxin/ Untereinheit B; Δsig = Deletion des ctxB - Signalpeptides

lyo = lyophilisiert; Kallussusp. = Kallussuspension

Knollenmaterial von Kartoffeln wurde entweder als in geschlossenen Systemen (transparente Plastikbehälter mit Nähragar) gezüchteten Mikroknollen von 0,5-1 cm Durchmesser oder als in Erdkultur unter Gewächshausbedingungen (Fa. Norika) gezüchtete normalwüchsige Kartoffel analysiert. Darüber hinaus wurden Kartoffeln einer hochexprimierenden Kartoffellinie „Desireé“ des Konstruktes pS_VP60SEKDEL von der Norika GmbH durch *in vitro* Kultivierung isogen vermehrt und anschließend im Gewächshaus ausgepflanzt. Die aus ca. 4000 Pflanzen erhaltenen 90 kg Kartoffeln wurden hinsichtlich einer gleichmäßigen VP60 Expression untersucht und für Fütterungsversuche verwendet.

3.2.3 In-vitro-Analyse transgener Pflanzen

3.2.3.1 Aufarbeitung

Unter sterilen Bedingungen wurden Blätter der Tabak- und Kartoffelpflanzen entfernt und 200 mg in Eppendorf Reaktionsbehälter (1,5 ml) eingewogen. Von den Knollen wurde 1 g abgewogen und in feine Scheiben geschnitten. Für die Aufarbeitung wurden die Blätter bzw. Kartoffelscheiben in Mörser überführt. Das Material wurde in flüssigen Stickstoff gefroren und im Mörser zu feinem Pulver verarbeitet. Dieses wurde in PBS (400 µl/ 200 mg Blatt-

bzw. 1 ml/ g Knollenmaterial) aufgenommen, gemischt und für 5 min bei 14 000 g geklärt. Der Überstand wurde bis zur Analyse bei 4 °C aufbewahrt.

3.2.3.2 RNA Isolierung

Die Isolierung der für die cDNA-Synthese benötigten RNA wurde nach Angaben des Herstellers mit dem RNA Isolationskit Purescript® der Firma Gentra durchgeführt. Weiterhin wurde RNA durch Trizol-Extraktion isoliert. Dazu wurden 100 mg Blattmaterial in 1000 µl Trizol homogenisiert und für 5 min bei 3600 g geklärt. Der Überstand wurde mit 200 µl Chloroform versetzt, 15 s kräftig geschüttelt, nach Inkubation bei RT für 3 min, 15 min bei 10 000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand betrug ca. 600 µl. Dieser wurde mit 500 µl Isopropanol versetzt, gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die RNA durch Zentrifugation 10 min bei 10 000 g und 4 °C gefällt. Das entstandene gelartige Pellet wurde mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen und 5 min bei 6400 g bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde im Vakuum getrocknet, in 50 µl Hydrationslösung (RNA Isolationskit Purescript®, Gentra) aufgenommen und 10 min bei 57 °C gelöst.

Die RNA Lösung wurde aliquotiert und bis zur Weiterverwendung bei -70 °C aufbewahrt.

3.2.3.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Nukleinsäurelösungen wurden in TE Puffer verdünnt und in eine Quarzküvette pipettiert. Anschließend wurde mit Hilfe eines Spektrofotometers (Beckman DU® 640) die $OD_{260\text{ nm}}$ der RNA-Lösung bestimmt. Die Konzentration errechnet sich aus der OD bei 260 nm, dem Verdünnungsfaktor und einem für DNA, RNA, oder Oligonukleotide spezifischen Multiplikationsfaktor. Aus dem Verhältnis der $OD_{260\text{ nm}}$ und der $OD_{280\text{ nm}}$ erhält man außerdem eine Aussage über Proteinkontaminationen in der Lösung. Der Quotient aus $OD_{260\text{ nm}}$ und $OD_{280\text{ nm}}$ sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

3.2.3.4 DNase Behandlung von RNA

DNA, die in dem RNA Reinigungsansatz verblieben war, wurde durch das Enzym DNase I verdaut. In einem Reaktionsansatz wurden 5 µg RNA, 10 µl 10x Transkriptionspuffer, 2 µl DNase I und A. dest. ad 100 µl eingesetzt und 60 min bei 37 °C inkubiert (DNA Verdau). Zur RNA-Extraktion wurden 100 µl Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol (im Verhältnis 25:24:1) zugesetzt, 1 min bei RT inkubiert, 5 min bei 16 000 g zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und mit 100 µl Chloroform/ Isoamylalkohol (im Verhältnis 24:1) vermischt, für 1 min bei RT inkubiert, anschließend 5 min bei 16 000 g zentrifugiert, die wässrige Phase

wurde abgenommen und mit 10 µl 3 M Natriumacetat und 300 µl Ethanol üN bei -70 °C präzipitiert. Nach Zentrifugation für 15 min bei 14 000 g und 4 °C wurde das Pellet mit 75 % Ethanol gewaschen, 5 min bei 14 000 g und 4 °C zentrifugiert, getrocknet und in 6 µl Hydrationslösung (RNA Isolationskit Purescript[®], Gentra) 10 min bei 57 °C gelöst. Die RNA-Konzentration wurde wie in 3.2.3.3 beschrieben, photometrisch bestimmt.

3.2.3.5 cDNA-Synthese (Reverse Transkription, RT)

Das Prinzip der cDNA-Synthese besteht in der Ableitung eines einzelsträngigen DNA Stranges von einer RNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase. Als Ausgangsmaterial wurde RNA verwendet, die aus transgenen Pflanzen und aus Lebergewebe RHDV infizierter Kaninchen gewonnen wurde. Mit Hilfe der oligo-(dT) Primer wurde am 3'Ende des Poly-A-Schwanzes des RNA Moleküls ein kurzer doppelsträngiger Bereich hybridisiert, der von der Reversen Transkriptase als Startpunkt für die Synthese des komplementären Stranges benötigt wurde. Im Folgenden entstand ein RNA/ DNA Hybridmolekül, wobei die RNA als Matrize fungierte.

Die an die Reverse Transkriptase gekoppelte RNase H war für den Verdau der RNA des Hybridmoleküls verantwortlich. Die einzelsträngigen cDNA Moleküle konnten nach einer anschließenden Aufreinigung gewonnen werden. In den Reaktionsansatz von 12 µl wurden zwischen 1-5 µg/ µl Gesamt-RNA, 1 µl oligo (dT)₂₀ Primer, 4 µl dNTP-Mix (10 mM) und A. dest. eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde eine Wasserprobe ohne RNA mitgeführt. Der Reaktionsansatz wurde 5 min bei 65 °C denaturiert und dann auf Eis gekühlt. Anschließend wurden 4 µl 5 x Reaktionspuffer, 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl RNasin (40 U/ µl) hinzugefügt. Der Ansatz wurde gemischt, zentrifugiert und 2 min bei 42 °C inkubiert. Nach der Zugabe von 1 µl Reversen Transkriptase (200 U/ µl) wurde der Ansatz 50 min bei 42 °C inkubiert. Danach erfolgte die Inaktivierung des Enzyms 15 min bei 70 °C und Abkühlung auf Eis. Aus dem Reaktionsansatz wurde 1 µl für die Polymerase Kettenreaktion (PCR) entnommen. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

3.2.3.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Das Prinzip der PCR besteht in der hochselektiven Vervielfältigung eines DNA Abschnittes unter Zuhilfenahme eines Oligonukleotidpaares (Primer), welche gegenläufig an der DNA-Amplifikationsmatritze hybridisieren. Das Enzym Taq-Polymerase wird für die Amplifikation der DNA Fragmente in zyklischen Wiederholungen verwendet.

Primer	Nukleotidsequenz 5'→3'	Position	Orientierung
5306 FP	ACT ATG GAG GGC AAA GCC CGC ACA GCG	5306 - 5328	vorwärts
5727 FP	CAT CGA GAT TGG ACC AGG	5727 - 5744	vorwärts
6026 RP	CCT GCG GGT GAA ATT GAG TC	6026 - 6007	rückwärts
7044 RP	TCA GAC ATA AGA AAA GCC ATT GGC	7044 - 7021	rückwärts

Tab. 4: Oligonukleotidprimer zur PCR Amplifikation des RHDV Kapsidproteins VP60 (Position in ORF1: 5306 – 7044, 1738 bp) RP = reverse Primer; FP = forward primer

Dabei werden die Stränge der DNA Matrize bei 94 °C getrennt (Denaturierung), die Primer (Tab. 4) binden an die einzelsträngigen komplementären DNA Sequenzen (Annealing) und durch die hitzebeständige DNA-Polymerase wurden bei 72 °C an das Primer 3'Ende schrittweise Desoxyribonukleotideinheiten (dNTPs) angefügt (Elongation). Es wurden Oligonukleotide für die Amplifikation des gesamten Leserahmens für das VP60, sowie von Teilabschnitten verwendet (Abb. 3). Ausgehend von einem Reaktionsansatz von 25 µl wurden 1 µl (0,1-0,9 µg cDNA), 2,5 µl 10 x PCR Puffer, 0,3 µl dNTP (25mM), 2,5 µl Primer (5 pmol), 2 µl MgCl₂ (25 mM), 0,25 µl Taq-Polymerase (5 U) und A. dest. eingesetzt. Um Verdunstung zu vermeiden, wurden alle Proben mit 50 µl Mineralöl überschichtet. Einer einmaligen Denaturierungszeit von 3 min bei 94 °C, folgten 35 Zyklen mit je 1 min bei 94 °C (DNA-Denaturierung), 1 min Primer-Annealing (Temperatur abhängig von deren GC-Gehalt) und 2 min bei 72 °C (DNA-Synthese). Zum Abschluss folgte ein Inkubationsschritt für 10 min bei 72 °C zur Vervollständigung der DNA-Synthese und nachfolgend die Kühlung der Proben auf 4 °C. Für die Analyse der PCR-Reaktion wurden 10 µl der Proben in einem 1 % Agarosegel getrennt.

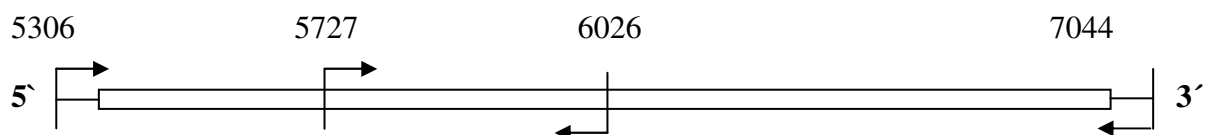


Abb. 3: Charakterisierung der mittels PCR amplifizierten Abschnitte des VP60 ORFs . Die Positionsangaben beziehen sich auf die RHDV Sequenzdaten (GenBank Y 15440). Die Kombination der Primer ergab 4 DNA-Amplifikationsprodukte (in bp = Basenpaaren) 5306 - 6026 (720 bp), 5306 - 7044 (1738 bp), 5727 - 6026 (299 bp) und 5727 - 7044 (1317 bp)

Durch Auswahl der Oligonukleotid Primer war es möglich, Amplifikate verschiedener Länge herzustellen, mit denen die Integrität der 5' und 3' terminalen Bereiche des wt-Leserahmens

überprüft werden konnte. Mit DNase I verdaute RNA wurde durch PCR Reaktionen ohne vorherige reverse Transkription (RT) überprüft, um sicherzustellen, dass positive RT-PCR Ergebnisse von Transkripten und nicht aus transformierter Plasmid-DNA stammten.

3.2.3.7 Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA) zum Antigennachweis

Der Nachweis von pflanzenexprimierten VP60 basierte auf einem am Friedrich-Loeffler-Institut (FLI) etablierten ELISA (SCHIRRMIEIER et al. 1999), der durch Einführung von Standards und paralleler Durchführung von Proteinbestimmungen quantifizierbar gestaltet wurde und auch Aussagen zu exprimierten Proteingehalten erlaubt.

Hochabsorbierende 96 well Mikrotiterplatten (Nunc ImmunoTM) wurden mit einem an Meerschweinchen hergestellten polyklonalen anti-RHDV-Immunsereum 1:2000 verdünnt in Carbonatpuffer, pH 9,6 beschichtet und 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Platten dreimal mit PBS-T gewaschen und mit den zu untersuchenden Homogenaten, in der Regel als unverdünnte und in PBS⁻ verdünnte Probe beschickt. Als Positiv- bzw. Negativstandard dienten Präparationen von bakulovirusexprimierten VP60 (RBV-VP60) bzw. SF9-Zelllysat. Nach Inkubation (1 h, 37 °C) wurde erneut gewaschen und die Platten mit einem Gemisch von drei monoklonalen anti-RHDV Antikörpern (MAk mix) unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Die Antigen-Antikörper-Reaktion wurde mittels POD-Anti-Maus IgG, 1:10 000 in PBST + 5 % Pferdeserum nach 30 min Einwirkung unter Verwendung von OPD detektiert und bei 492 nm mit dem photometrisch (Spectra, Mini AP, Tecan) gemessen. Die Angabe der Ergebnisse erfolgte als OD Wert, bzw. zum objektiveren Vergleich zwischen verschiedenen Ansätzen wurde ein Indizes nach folgender Formel berechnet: $I = 1 + (OD_{\text{Probe}} - OD_{\text{Negativkontrolle}}) / (OD_{\text{Positivkontrolle}} - OD_{\text{Negativkontrolle}})$.

3.2.3.8 Western Blot

3.2.3.8.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-Page)

Durch das Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) werden in nativen Proteinen alle nichtkovalenten Bindungen, mit Ausnahme der Disulfidbrücken zerstört. Denaturiertes Protein bildet mit anionischen SDS einen Komplex, der eine negative Nettoladung besitzt, weshalb in einer SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese Proteine unabhängig von ihrer ursprünglichen Ladung aufgetrennt werden können (LAEMMLI, 1970).

Die zu untersuchenden Proben wurden wie in 3.2.3.1 beschrieben aufgearbeitet. Es wurden jeweils 30 µl in reduzierten Probepuffer (4x) aufgenommen, 5 min bei 85 °C denaturiert und anschließend mit Ultraschall 10 x im Intervall für 1 s behandelt (Sonifer 450, Branson). Dies

war notwendig, um die Viskosität der Probe zu verringern. Die elektrophoretische Trennung der Proteine erfolgte bei 200 V für 45 min in diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen, bestehend aus 10 % Trenngel und 5 % Sammelgel.

3.2.3.8.2 Coomassiefärbung

Proteine können mit dem Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau in Polyacrylamidgelen angefärbt und Banden sichtbar gemacht werden. Dazu wurden die für die Coomassiefärbung bestimmten Acrylamidgele nach der elektrophoretischen Trennung der Proteine 45 min in Coomassie Färbelösung auf dem Taumler bei Raumtemperatur inkubiert. Die Gele wurden mit Entfärbelösung solange gewaschen, bis sich die Coomassie-gefärbten Proteinbanden deutlich auf den Gelen abzeichneten. Das Polyacrylamidgel, sowie 2 Trocknungsfolien DryEase™ Mini Cellulphane (Invitrogen) wurden für 10 min in die Lösung Gel-Dry™ Drying Solution (Invitrogen) eingelegt. Danach wurde das Polyacrylamidgel zwischen den beiden Folien eingespannt und zum Trocknen üN bei RT aufgestellt.

3.2.3.8.3 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen

Die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden nach dem Semidry-Blot-Verfahren durch das Anlegen einer elektrischen Spannung auf Nitrozellulose transferiert (TOWBIN et al. 1979). Die Nitrozellulose Protran® Nitrocellulose Transfer Membrane (Schleicher & Schuell BioScience) und die Filterpapierstücke wurden zunächst in kaltem Transferpuffer pH 8,4 eingelegt. Das Polyacrylamidgel wurde auf zugeschnittene Nitrozellulose gelegt. Die Gel-Membran-Schicht wurde ober- und unterseits mit Filterpapier bedeckt und in ein Elektrophorese-Transfer-Gerät Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio Rad) eingelegt. Die Proteine wurden innerhalb von 30 min durch Anlegen einer konstanten Spannung von 20 V auf die Nitrozellulosemembran transferiert.

3.2.3.8.4 Chemolumineszenz

Unspezifische Bindungsstellen wurden durch das Verbringen der Nitrozellulosemembran für 2 h bei Raumtemperatur in TBS-T Puffer mit 5 % Magermilchpulver (w/v) geblockt und anschließend wie auch nach allen weiteren Inkubationsschritten, viermal (1 x 15 min, 3 x 5 min) mit TBS-T Puffer gewaschen. Die Nitrozellulose wurde zunächst mit dem monoklonalen Anti-VP60 Maus Antikörper 1G8, 1:100 in TBS-T und anschließend mit dem sekundären POD gekoppelten Ziege-Anti-Maus IgG, 1:50 000 in TBS-T (Sigma) Antikörper jeweils 1 h bei RT inkubiert. Mit dem chemolumineszenten Substrat SuperSignal™ (Pierce) wurden die

Nitrozellulosemembranen überschichtet und 5 min bei RT inkubiert. Durch die Zugabe des Substrats wird, unter der Katalyse der Meerrettichperoxidase, Licht emittiert, das Röntgenfilm Hyperfilm™ (Agfa) schwärzt. Die antigenspezifischen Signale wurden durch das Auflegen eines Röntgenfilms zwischen 1-10 min detektiert. Nach dem gleichen Verfahren wurde das Protein VP60 auch durch die Verwendung eines Hyperimmunserums (HIS) detektiert. Die Nitrozellulose wurde zunächst mit Anti- VP60 HIS Kaninchen (RHD HIS E27, 1: 5000 in TBS-T) und anschließend mit dem sekundären Meerrettichperoxidase gekoppelten Maus-Anti-Kaninchen IgG (1:20 000 in TBS-T) Antikörper jeweils 1 h bei RT inkubiert. Für den Nachweis von ctxB diente Anti-Choleratoxin IgG, 1:5000 in TBS-T (Sigma), der in gleicher Verdünnung wie das HIS von sekundären Maus-Anti-Kaninchen IgG erkannt wurde. Mit dem chemolumineszenten Substrat SuperSignal™ (Pierce) wurden die Nitrozellulosemembranen überschichtet und 5 min bei RT inkubiert. Die Detektion der antigenspezifischen Banden erfolgte nach Auflegen eines Röntgenfilms für 1-10 min.

3.2.3.9 Proteinquantifizierung mittels Bradford-Test

Der Gesamtproteingehalt wurde durch Bradford-Test Roti-Nanoquant® (Roth) nach Herstellerangaben durchgeführt. Der Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G250 reagiert mit Proteinen und bildet Komplexe, die ein Adsorptionsmaximum bei 590 nm aufweisen. Die Komplexbildung findet innerhalb von 2 min statt. Ungebundener Farbstoff hat sein Adsorptionsmaximum bei 450 nm. Als Eichprotein wurde Rinder Albumin verwendet (ZOR und SELINGER, 1996). Von allen Proben und der BSA Eichreihe erfolgte eine Doppelbestimmung in 96 Loch Mikrotiterplatten (Greiner). Die Proben wurden 1:50 in A. dest. verdünnt. Pro Vertiefung wurden 50µl BSA Eichprotein bzw. Probe pipettiert. Die Konzentration des gebildeten Farbstoffs wurde durch Zugabe von 200 µl Bradford Reagenz pro Vertiefung nach 5 min photometrisch bei 590 nm und 450 nm bestimmt. Der Quotient beider Messwerte einer Probe verglichen am BSA Standard ergab den Gesamtproteingehalt.

3.2.4 Zellkultur und Virusvermehrung

3.2.4.1 Kultivierung von Insektenzellkulturen

Die SF9-Zelllinie wurde in feuchter Atmosphäre bei 28 °C mit 5 % CO₂ in 75 cm² Zellkulturflaschen mit Insekten Medium Grace + 10 % FKS inkubiert. Nach 4 d Wachstumszeit wurden die Zellen subkultiviert. Zu diesem Zweck wurde das Medium vorsichtig abgegossen, der Zellrasen anschließend mit frischem Medium durch wiederholtes Spülen und Abklopfen abgelöst und 1:4 verdünnt in neue Zellkulturflaschen ausgesät.

3.2.4.2 Vermehrung rekombinanter Bakuloviren (RBV)

Bakulovirus exprimiertes VP60 wurde als Substandard für die ELISA Analysen, sowie für in Tierversuchen als Kontrollantigen eingesetzt.

SF-9 Zellen wurden wie beschrieben subkultiviert, nach Bestimmung der Zellzahl in einer Konzentration von ca. 3×10^5 Zellen/ ml in Zellkulturflaschen mit 162 cm^2 Wachstumsfläche in einem Volumen von 50 ml ausgesät und innerhalb von 3 h nach Zelladhärenz mit 2 ml RBV-VP60 (Titer: 1×10^6 / ml) infiziert. Die Kulturen wurden 4 d bei $28 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5 % CO_2 inkubiert. Mikroskopisch wurde die Virusvermehrung anhand des zytopathischen Effektes (cpe) verfolgt. Bereits 24 h nach der Virusinokulation konnten abschwimmende Zellen mit kleinvakuoligem degeneriertem Zytoplasma beobachtet werden. Nach 4 d waren 70-90 % des Zellrasens abgelöst. Restliche anhaftende Zellen wurden mechanisch gelöst und bei $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

3.2.5 Indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT)

Die Ermittlung des RBV-Virustiters erfolgte durch den indirekten Immunfluoreszenztest. Log 10 Verdünnungsreihen der Virussuspension in Insect Grace Medium wurden in doppelter Ausführung in 96-Loch Mikrotiterplatten angelegt und anschließend mit SF9 Zellen überschichtet. Die Titrations wurden für 4 Tage bei $28 \text{ }^\circ\text{C}$ mit 5 % CO_2 inkubiert und täglich lichtmikroskopisch auf das Auftreten von cpe untersucht. Nach Abnehmen des Mediums wurden die Zellen mit 100 μl eiskalten Ethanol 20 min bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ fixiert und 1 x mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Anti-RHDV-Maus MAk mix (1G8, 3C12, 4D7, 7G3) (1: 20 in PBS) 1 h bei RT inkubiert, zweimal mit PBS gewaschen und 1 h bei RT mit FITC markierten Anti-Maus-IgG (1:200 in PBS) beschichtet. Nach zweimaligen Spülen mit PBS und A. dest. wurden die Kulturen mit Dabco-Fluoreszenz-Erhaltungspuffer eingedeckt. Die Beurteilung der Fluoreszenz erfolgte mit dem UV Mikroskop (Olympus IX 50) unter Verwendung des Filtermoduls U-MWB2 für Breitband-Blauanregung, Anregungsfilter BP 450-480, dichroitischer Teilerspiegel DM500 und Sperrfilter BA590.

3.2.6 Reinigung von RBV-VP60 mittels Dichtegradientenzentrifugation

Vier Tage nach der Inokulation von RBV in SF9-Zellen wurden die virushaltigen Zellkulturen geerntet. Insgesamt wurde 1 l Zellsuspension mit RBV hergestellt. Zunächst wurde die Suspension (10 min, 1400 g, RT) geklärt. Durch Ultrazentrifugation (2 h, 25 000 rpm, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, SW 28.1 Beckmann, OptimaTM LTX Ultrazentrifuge, Beckmann) wurden die Viruspartikel sedimentiert und anschließend in TEN pH 7,6 μN bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ resuspendiert und über

Ultrazentrifugation durch Unterschichtung mit einem 17 % Sascharosekissen (2 h, 25 000 rpm, 4 °C, SW 28.1 Beckmann, Optima™ LTX Ultrazentrifuge, Beckman) gereinigt. Die virushaltigen Pellets wurden in 10 ml TEN pH 7,6 üN resuspendiert und geklärt (10 min bei 3600 g).

3.2.7 Reinigung und Konzentrierung von RHDV

Lebergewebe RHDV infizierter Kaninchen wurden homogenisiert und 1:10 in PBS gelöst, üN bei 4 °C resuspendiert und zentrifugiert (10 min, 1300 g, RT). Der Überstand wurde mit 15 % Chloroform 30 min gemischt und zentrifugiert (30 min, 3600 g, 4 °C) anschließend mit 10 % Polyethylenglykol (PEG) bei 4 °C üN gefällt und geklärt (50 min, 3600 g, 4 °C), üN bei 4 °C in TEN Puffer (pH 7,6) resuspendiert und geklärt. Die Virussuspension wurde durch ein 17 % Sascharosekissen zentrifugiert (2 h, 25 000 rpm, 4 °C, TST 28.38 Kontron, LE-70 Ultrazentrifuge, Beckmann), üN in TEN bei 4 °C resuspendiert, geklärt und auf CsCl Gradienten (1,1/ 1,3/ 1,5 g/ml) geschichtet und zentrifugiert (17 h, 25 000 rpm, 4 °C, TST 28.38 Kontron, LE-70 Ultrazentrifuge, Beckmann). Die sichtbaren Banden wurden gewonnen und im Elektronenmikroskop und ELISA untersucht.

3.2.8 Klonierung und DNA Präparation

3.2.8.1 Genkonstrukte

Zur Prüfung eines möglichen Einflusses der Anpassung der synthetischen Gene an die pflanzlichen Kodonpräferenzen auf Antigenität und Immunogenität des exprimierten Proteins, wurden die für die Herstellung transgener Pflanzen verwendeten DNA Konstrukte in CRFK-Zellen transfiziert und die Expressionsprodukte mittels Immunfluoreszenz, ELISA und Western Blot charakterisiert. Die in Tab. 3 beschriebenen Genkonstrukte wurden in modifizierte piecas Plasmide (pie) des Maus-Zytomegalievirus (MCMV) durch Dr. Keil, FLI, kloniert (Tab. 5).

DNA
pie_VP60 2/ 18 wt
pie_VP60
pie_VP60SEKDEL
pie_ctxBVP60
pie_ctxBΔsigVP60
pie_ctxBVP60SEKDEL
pie_ctxBΔsigVP60SEKDEL

Tab. 5: Für die Transfektion von eukaryotischen CRFK-Zellen verwendete Plasmid-DNA. pie = modifiziertes piecas-Plasmid mit MCMV immediate-early Promotor

3.2.8.2 Präparation kompetenter Bakterien

E.coli Bakterien, (Top10, Invitrogen) wurden üN in 100 ml LB Medium bei 37 °C im Inkubationsschüttler kultiviert. 1 ml der üN-Kultur wurde in 100 ml LB Medium überführt und bei 37 °C unter kontinuierlichen Schütteln inkubiert bis eine optische Dichte von 0,4-0,55, gemessen im Spektralfotometer (Beckmann) bei 660 nm, erreicht war. Die Bakteriensuspension wurde 10 min auf Eis abgekühlt, in zwei 50 ml Zentrifugen-Röhrchen überführt und anschließend zentrifugiert (10 min, 1300 g, 4°C). Das Pellet wurde in 30 ml kalten TfB 1 Puffer aufgenommen (15 ml/ Röhrchen). Die Bakterienzellen wurden für 10 min auf Eis abgekühlt, nochmals zentrifugiert (10 min, 1300 g, 4 °C) und anschließend in 4 ml kalten TfB 2 Puffer (2 ml/ Röhrchen) resuspendiert. Jeweils 60 µl wurden in vorgekühlten Eppendorf Reaktionsgefäßen aliquotiert und bis zur Verwendung bei -70°C aufbewahrt.

3.2.8.3 Transformation

Je 0,5 µl der Plasmid-DNA (Tab. 5) wurde mit 60 µl kompetenter *E.coli* Top10 Bakteriensuspension zunächst für 30 min auf Eis, 45 s bei 42 °C und anschließend 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde jeder Transformationsansatz mit 800 µl LB-Medium versetzt und geschüttelt (1 h, 300 rpm, 37 °C). 100µl aus den Transformationsansätzen wurden auf Selektions-LB-Agarplatten (100 µg/ ml Ampicillin) ausgestrichen und üN bei 37 °C inkubiert. Nach der Retransformation wurden selektionierte Einzelklone in jeweils 2 ml Selektions-LB-Medium (100 µg/ ml Ampicillin) aufgenommen und üN auf dem Schüttler inkubiert.

3.2.8.4 Präparation bakterieller Plasmid DNA

Jeweils 1,5 ml der üN-Kulturen wurden zentrifugiert (1 min, 16 000 g, RT) und der Überstand dekantiert. Das Pellet wurde in 100 µl kalten Puffer I resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Zur Lyse der Bakterien wurden 200 µl Puffer II hinzugefügt, vorsichtig gemischt und 5 min auf Eis belassen. Die Ansätze wurden durch Zugabe von 150µl eiskalten Puffer III neutralisiert und 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zusatz von 500 µl Phenol Chloroform (25:24) wurden die Proben zentrifugiert (7 min, 16 000 g, RT). Die wässrige Phase wurde abgenommen, mit 1 ml Ethanol versetzt, 2 min bei RT inkubiert und zentrifugiert (5 min, 16 000 g, RT). Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, bei 37 °C getrocknet und schließlich in 50 µl H₂O + 20 mg/ ml RNase A gelöst (15 min, 37 °C).

Ausgehend von 50 ml, bzw. 250 ml Bakterien-Zellsuspension in Selektions-LB-Medium (100 µg/ ml Ampicillin) wurden für die Präparation von DNA DNA-Qiagen-Plasmid-Purification Kits angewendet und entsprechend dem mitgelieferten Protokoll abgearbeitet.

Nach alkalischer Lyse der Bakterienzellen und anschließender Neutralisation wurde die Plasmid-DNA mittels Anionenaustauschersäulen aufgereinigt. Die DNA wurde mit Isopropanol gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen, in 100 µl TE Puffer aufgenommen und anschließend die Konzentration fotometrisch bestimmt.

3.2.8.5 DNA Spaltung

Die Puffer und der Zusatz von bovinen Serumalbumin (BSA) zu den Spaltungsansätzen, sowie Temperatur und Dauer der Spaltung orientierten sich nach den Herstellerangaben. In einem 25 µl Ansatz wurden 2 U Restriktionsenzym für 0,5 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Die Spaltung wurde gelelektrophoretisch überprüft.

3.2.8.6 DNA Agarosegelelektrophorese

Die Bewertung restriktionsenzymgespaltener DNA sowie die Analyse von PCR-Produkten erfolgte in 0,6-1 % (w/v) Agarosegelen. Agarose wurde in TBE-Puffer unter Erhitzen gelöst, 10 µg/ml Ethidiumbromid hinzugefügt und ca. 5 mm starke Gele gegossen, nach dem Erstarren in eine Gelkammer gesetzt und mit TBE-Puffer bedeckt. In die Geltaschen wurde 0,2 µg DNA (10 µl aus dem Restriktionsspaltansatz) mit Probenpuffer aufgetragen und für 1 h bei 100 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die Auswertung erfolgte unter UV Licht (256 nm) und wurde fotografisch dokumentiert. Die Größe der Fragmente wurde durch Vergleich mit einem mitgeführten DNA Marker (Invitrogen) bestimmt.

3.2.9 Transiente Expression von VP60 in Crandell Feline Kidney Cells (CRFK)

3.2.9.1 Zellkultivierung

CRFK-Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit 75 cm² Wachstumsfläche bei 37 °C und 2,5 % CO₂ kultiviert. Das in der Zellkulturflasche enthaltene Anzuchtsmedium, MEM „H“ + MEM „E“ 1:1 /NEAS -Medium, wurde vorsichtig abgegossen, der Zellrasen zunächst zweimal mit Trypsinlösung gewaschen und schließlich für den Ablösevorgang mit 3 ml Trypsinlösung pro Zellkulturflasche ca. 3 min bei 37 °C und 2,5 % CO₂ inkubiert. Die resultierende Zellsuspension wurde 1:4 verdünnt in Anzuchtsmedium aufgenommen, auf Zellkulturflaschen verteilt und für 4 d bei 37 °C inkubiert. Während dieser Zeit erfolgte eine lichtmikroskopische Kontrolle. Die Zellzahl des einschichtigen Zellrasens betrug nach 4 d 10⁷ Zellen/ Flasche. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Thoma Zählkammer bestimmt.

3.2.9.2 Transfektion

CRFK-Zellen wurden mechanisch abgelöst, danach in 5 ml PBS Puffer/ Zellokulturflasche aufgenommen, in 50 ml Zentrifugen-Röhrchen gefüllt und anschließend 5 min bei 200 g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Zellpellet mit 10 ml PBS gewaschen und 5 min bei 200 g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt. Die Zellen wurden schließlich in 600 µl PBS Puffer aufgenommen, zu 200 µl Portionen in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäßen aliquotiert und auf Eis platziert. Durch die Elektroporation wurde die Midi/ Maxi Plasmid-DNA der VP60 Expressionskonstrukte in die Zellen transferiert. Zu diesem Zweck wurden 2,5 µg DNA des jeweiligen Konstruktes mit 200 µl des Zellaliquots unmittelbar vor der Elektroporation gemischt und in eine Elektroporationsküvette mit 4 mm Elektrodenabstand gefüllt. Die Elektroporationsküvetten wurden in dem Elektroporationsgerät EasyjecT™ (Equi Bio) einer Spannung von 274 V, 200 Ω und 25 µF ausgesetzt. Die Zellsuspension wurde in 1 ml MEM-Medium aufgenommen und in ein 50 ml Zentrifugen-Röhrchen überführt. Insgesamt elf Elektroporationsansätze pro Konstrukt wurden gepoolt. Das Zell-Medium Gemisch wurde auf 20 ml mit MEM-Medium aufgefüllt und anschließend auf zwei Zellkulturschalen mit 10 cm² Wachstumsfläche (Falcon) à 10 ml verteilt und für 45 h bei 37 °C und 2,5 % CO₂ bebrütet.

Nach gleichem Schema, nur mit einer Elektroporation/ Genkonstrukt wurden auch kleinere Ansätze in CRFK Zellen transfiziert, die in 24-Lochplatten ausgesät wurden. 45 h nach der Elektroporation wurde das Zellkulturmedium vorsichtig entfernt, die Schalen einmal mit 5 ml PBS gewaschen, und die Zellen in 9 ml PBS aufgenommen. Das erhaltene Zell-Puffergemisch wurde anschließend geklärt (10 min, 1300 g), der Überstand dekantiert und das Zellpellet in 5 ml PBS Puffer aufgenommen. Eine Probe von 250 µl wurde für die Expressionskontrolle verwendet. Zellen aus 24-Lochplatten wurden nach Waschen mit PBS in 300 µl PBS oder in 180 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen.

3.2.10 Tierexperimentelle Untersuchungen

3.2.10.1 Versuchstiere

Die Tierversuche wurden gemäß § 8 Abs 1 des Tierschutzgesetzes unter dem Aktenzeichen 310-4/7221.3-1.1-031/03 durch die Regierung des Landes Mecklenburg-Vorpommern genehmigt. Für die VP60-Immunogenitätsstudien mit transgenen Pflanzen, rekombinanten Bakuloviren und VP60 exprimierenden Säugerzellen wurden 6-8 Wochen alte CD 1 und VM 95 Mäuse (Harlan) verwendet und in Gruppen von 2-5 Tieren gehalten. An 3-4 Monate alten Zimmermann-Kaninchen (ZIKA) wurden Immunogenitäts- und Immunitätsstudien, mit

anschließender RHDV-Belastungsinfektion durchgeführt. Die Kaninchen im Alter von 8 Wochen, wurden einzeln und in Gruppen gehalten.

3.2.10.2 Versuchsaufbau und -durchführung

Zielstellung der tierexperimentellen Untersuchungen war die Prüfung von rekombinanten VP60 aus transgenen Pflanzen, aus rekombinanten Bakuloviren und von mittels Säugerzellen transient exprimierten VP60 auf Immunogenität (Tab. 6). Die zu analysierenden Proben wurden Mäusen und Kaninchen parenteral und/oder oral verabreicht. Als Positivkontrollen wurde ein handelsüblicher Impfstoff, Rika Vacc[®] (Riemser Arzneimittel AG), verwendet. Als Negativkontrollen wurden entsprechend der eingesetzten Proben Pflanzen des Wildtyps, native Bakuloviren und CRFK Kontrollzellen eingesetzt. Die Belastungsinfektionen der Kaninchen erfolgten mit $10^{4,5}$ LD₅₀ des RHDV Isolates „Eisenhüttenstadt“ parenteral und oral zu gleichen Teilen. Das Blut wurde den Kaninchen aus der Vena auricularis lateralis mit Kanülen (Neolus) in BD Microtainer[™] SST (Becton Drive) entnommen. Pro Blutentnahme wurde ca. 1 ml Blut gewonnen. Mäusen wurden mit Pasteur Glaspipetten durch Punktion des retrobulbären Venenplexus ca. 100 µl Blut entnommen. Die Blutproben wurden zentrifugiert (3 min, 14 400 g), der Serumüberstand in Eppendorf Reaktionsgefäße überführt, inaktiviert (30 min, 56 °C) und bei -20 °C bis zur Analyse gelagert.

Nr.	Versuchstier	Material	VP60 Konstrukt	Adjuvans	Route	
1	Maus	Tabak/ SRI	pS_VP60	+/- ISA 206	i.m.	
			pS_VP60SEKDEL	+/- ISA 206	i.m.	
2	Kaninchen	Kartoffel/ Desirée				
		Knolle/ Presssaft	pS_VP60SEKDEL	ISA 206	i.m.	
		Knolle	pS_VP60SEKDEL		oral	
3	Kaninchen	Kartoffel/ Desireé	pS_VP60SEKDEL		oral/ i.m.	
		Albatros	pS_ctxBVP60SEKDEL		oral/ i.m.	
		oral als Futtermischung				
4	Kaninchen	RBV-VP60	(inaktiviert)		i.m./oral	
		RHDV-Leberhomogenat	(inaktiviert)			
5	Kaninchen	RBV-VP60	(inaktiviert)		i.m.	
6	Maus	transfizierte CRFK-Zellen				
			pie_VP60 wt 2/18	ISA 206	i.m.	
			pie_VP60	ISA 206	i.m.	
			pie_VP60SEKDEL	ISA 206	i.m.	
			pie_ctxBVP60	ISA 206	i.m.	
			pie_ctxB Δ sigVP60	ISA 206	i.m.	
			pie_ctxBVP60SEKDEL	ISA 202	i.m.	
			pie_ctxB Δ sigVP60SEKDEL	ISA 202	i.m.	
	RBV-VP60		ISA 202	i.m.		

Tab. 6: schematischer Aufbau der Tierversuche

ISA 206 = Montanid-Adjuvans Fa Seppic; i.m. = intramuskulär

Die Herstellung der Antigen-Adjuvans Lösung erfolgte als Öl in Wasser Emulsion in einem Mischungsverhältnis von 1:1 nach Angaben des Herstellers.

3.2.10.3 Inaktivierung von RHDV

Die Inaktivierung von RHDV aus Kaninchenleber erfolgte mit Hilfe von Ethylenimin. Dazu wurde eine 0,1 M Inaktivierungslösung hergestellt. 210 mg 2-Bromethylaminohydrobromid (Merck) wurden in 9 ml A. dest. gelöst und mit 1 ml 2 N NaOH versetzt. Die Zyklisierung der Ausgangssubstanz zu Ethylenimin erfolgte während 1 h bei 37 °C in einer geschlossenen Flasche. Der Abschluss der Zyklisierung wurde durch Messung des pH Wertes überprüft (pH 9-9,8). Zu der infektiösen Leberanreicherung wurden 4 % (v/v) Ethylenimin gegeben. Die Virusinaktivierung erfolgte durch Inkubation (24 h, 37 °C). Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe einer dem Ethylenimin äquivalenten Menge 20 % Na-Thiosulfatlösung abgestoppt.

3.2.10.4 Hämagglutinations-Test (HAT)

Die nach der Belastungsinfektion gestorbenen Kaninchen wurden seziiert, auf pathologische Organveränderungen, besonders der Leber, Milz und Lunge untersucht und eine Leberprobe entnommen. Diese wurde gewogen, im Mörser mit dem Stößel zerkleinert und 1:10 in IP (pH 7,2) aufgenommen. Die Suspension wurde inkubiert (12-16 h, 4 °C) und anschließend geklärt (10 min, 1300 g). Die Überstände wurden im Hämagglutinationstest analysiert. Auf 96 Loch Mikrotiterplatten wurden log 2 Verdünnungsreihen virushaltigen Organmaterials in doppelter Ausführung in IP (pH 6,0) angelegt und eine äquivalente Menge einer 1 % Erythrozytensuspension (humanes Blut der Blutgruppe 0) in IP (pH 6,0) hinzugefügt. Die Ansätze wurden inkubiert (1,5 h, 4 °C). Als Hämagglutinationstiter wird diejenige Verdünnung angegeben, bei der die Erythrozyten vollständig hämagglutiniert und gleichmäßig verteilt sind. Virusfreiheit wurde durch die Bildung eines „roten Knopfes“, bestehend aus sedimentierten Erythrozyten, angezeigt. Als Kontrollproben wurden inaktiviertes RHDV, Isolat „Eisenhüttenstadt“ und eine Erythrozytensuspension als Negativprobe mitgeführt.

3.2.10.5 Antikörper-ELISA

Der Nachweis von RHDV-VP60 Antikörpern im Serum von Kaninchen und Mäusen erfolgte in einem indirekten Antikörper-ELISA. 96 Loch F-Boden-Mikrotiterplatten wurden mit gereinigtem und konzentriertem RHDV (1:4000 in Tris-NaCl, pH 7,6) beschichtet und üN bei 4 °C inkubiert, die Seren der Tiere in PBS-T unter Zusatz von 5 % Pferdeserum 1:50, bzw. 1:200, 1:800 und 1:3200 verdünnt und in Doppelansätzen aufgetragen, inkubiert (1 h bei 37 °C) und anschließend dreimal mit TBS-T gespült.

Gebundene VP60 Antikörper wurden mit POD-Anti-Kaninchen 1:20 000 in PBS-T + 5 % Pferdeserum (Sigma), bzw. POD-Anti-Maus IgG, 1:30 000 in PBS-T + 5 % Pferdeserum (Sigma) wurden entsprechend eingesetzt und inkubiert (1 h, 37 °C). Als Kontrollseren dienen Anti-RHDV HIS von Kaninchen (A895) bzw. Maus (C107/108) und Normalseren (NS) von Kaninchen (A 865/ F136) und der Maus (F27). Die OPD (Sigma) Reaktion wurde mit 15 µl 30 % H₂O₂ aktiviert, nach 30 min bei 37 °C mit 4 N Schwefelsäure abgestoppt und die optische Dichte bei 492 nm im ELISA-Reader Spectra Mini AP (Tecan) gemessen. Die Angabe der Ergebnisse erfolgte als OD Wert.

3.2.10.6 Pelletierung von transgenen Pflanzen

Für einen Tierversuch wurden konventionelle Kaninchenpellets mit lyophilisiertem Knollenmaterial (Desireé, VP60SEKDEL) zu einer Futtermischung in pelletierter Form verarbeitet. Dazu wurden konventionelle Kaninchenpellets in einem Mörser zermahlen, in einem Verhältnis von 1:1 mit lyophilisiertem Knollenmaterial gemischt und anschließend durch fraktionierte Zugabe von auf 80 °C erhitzter 3 % Gelatinelösung zu einem Brei verrührt, mechanisch zu Strängen von ca. 5 mm Durchmesser geformt, getrocknet und auf ca. 10 mm Länge zerbrochen. Die entstandenen Pellets wurden an Kaninchen verfüttert.

4. Ergebnisse

4.1 In vitro Analysen transgener Pflanzen

4.1.1 Transgenen Pflanzen mit VP60 Wildtyp-Gen

4.1.1.1 Molekulare Analyse mittels PCR

Zum Nachweis des Transgens in RHDV VP60-wt generierten Kartoffelpflanzen und der korrekten Transkription in mRNA wurden PCR und RT-PCR etabliert.

Kartoffelpflanzen, der Sorte „Desireé“, wurden in agrobakteriellen Pflanzentransformationsplasmiden pS mit den VP60 exprimierenden Leserahmen des RHDV Wildtypvirus [Isolat 3/3 (R592) und 2/18 (R590)] transformiert. Mittels Purescript® isolierte Gesamt RNA wurde nach fotometrischer Konzentrationsbestimmung und DNase I Verdau für reverse Transkription und PCR eingesetzt. In 11 von 12 Proben des Isolates 3/3 (R592) konnten interne (299 bp) und terminale Genabschnitte (720 bp und 1317 bp) des VP60 ORF (3.2.3.6, Material und Methoden) amplifiziert werden. In drei Proben konnte das gesamte Leseraster (1738 bp) nachgewiesen werden. Eine Probe war negativ. Aus Kartoffelpflanzen, die mit dem Isolat 2/18 (R590) transformiert wurden, konnten keine Genabschnitte des Kapsidgens amplifiziert werden. Diese Ergebnisse wurden durch Kontrollen von Wildtyp und mit dem Leervektor pS, transformierte Kartoffelpflanzen, sowie Leberhomogenat RHDV-infizierter Kaninchen überprüft (Tab. 7).

Kartoffel Wildtyp Leserahmen	Linien D				
Produktgröße		299 bp	720 bp	1317 bp	1738 bp
Position		Intern	5´ terminal	3´ terminal	gesamt
Nukleotidposition		5727 - 6026	5306 - 6026	5727 - 7044	5306 - 7044
pS_VP60 wt 3/ 3	12	11/1	11/1	11/1	3/9
pS_VP60 wt 2/ 18	8	0/8	0/8	0/8	0/8

Tab. 7: VP60 spezifische Transkripte mittels RT-PCR aus Blattmaterial RHDV VP60 transformierter Kartoffelpflanzen. D = Desireé, bp = Basenpaare

4.1.1.2 Antigen ELISA

Für die Untersuchungen wurde ein *capture* ELISA mit einem polyklonalem anti RHDV vom Meerschweinchen als Fangantikörper und einem Mix von drei monoklonalen gegen Sequenz-, bzw. Konformationsepitope des RHDV gerichtete monoklonle Antikörper (MAk) eingesetzt. Die Detektion erfolgte mittels POD-markiertem anti-Maus-IgG (Sigma) und OPD als Substrat. Jeweils 200 mg homogenisiertes, in PBS gelöstes Blattmaterial wurde auf diese Weise auf Vorhandensein von VP60 untersucht.

Während in transgenen Tabakpflanzen, die ein VPP60 wt-Insert enthielten, ein geringer, aber nicht immer reproduzierbarer VP60 Gehalt nachgewiesen werden konnte, lagen die VP60

Mengen in vergleichbar generierten Kartoffeln (Blattmaterial) unter der Nachweisgrenze. Auch in Kallusmaterial erster transgener Karotten, die das wt-Gen enthalten, konnte kein VP60 nachgewiesen werden.

4.1.2 Transgenen Pflanzen mit pflanzenadaptierten Leserahmen

4.1.2.1 Molekulare Analyse mittels PCR und Northern Blot

Durch die Anpassung der Nukleotidsequenz an die Kodonnutzung zweikeimblättriger Pflanzen sollte die Translationseffizienz gesteigert werden. Diese synthetischen VPP60-ORF wurden von Pflanzentransformationsplasmiden unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven 35S-RNA-Promotor (pS) des Blumenkohlmosaikvirus und eines knollenspezifisch aktiven Promotors des Patatingens (pGBSS) exprimiert. Die molekulare Analyse der Pflanzen mit synthetischen Leserahmen wurde im Rahmen dieses Projektes durch den Fachbereich Agrarökonomie der Universität Rostock durchgeführt, so dass die hier dargestellten Arbeiten ausschließlich auf den Nachweis und die Charakterisierung der Expressionsprodukte fokussiert waren.

4.1.2.2 Antigen ELISA

FrISChe Tabak- und Kartoffelpflanzen, Kartoffelknollen und Karottewurzeln, sowie lyophilisiertes Material von Kartoffelknollen und Karotten standen für die Analysen zur Verfügung. Insgesamt 75 Tabaklinien, darunter 6 Kontrolllinien (Wildtyp und pS transformiert), wurden im ELISA untersucht (Tab. 8).

Tabak synthetischer Leserahmen	Linien	Expression in	ELISA
pS	5		
pS_VP60	7	Zytoplasma	6/1
pS_VP60SEDKEL	5	Zytoplasma	4/1
pS_ctxB Δ sigVP60	15	Zytoplasma	6/9
pS_ctxBVP60	10	Intrazellularraum	0/10
pS_ctxB Δ sigVP60SEKDEL	12	Zytoplasma	8/4
pS_ctxBVP60SEDKEL	20	Endoplasmatisches Retikulum	9/11

Tab. 8: transgene Tabakpflanzenlinien, positiv/ negativ VP60 spezifisches Signal

Durch die Analyse standardisierter Mengen Pflanzenmaterials im ELISA konnten die Expressionsraten der Fremdgene unmittelbar miteinander verglichen werden (Abb. 4). Die Konstrukte pS_VP60 (6 von 7 VP60 positiv) und pS_VP60SEKDEL (4 von 5 VP60 positiv) waren sowohl hinsichtlich des Anteils positiver Linien als auch durchschnittlich am besten,

während pS_ctxB-VP60 transformierter Tabakpflanzen kein VP60 spezifisches Signal aufwiesen (0 von 10 VP60 positiv). Tabakpflanzen mit den Konstrukten pS_ctxB Δ sigVP60 (6 von 15 VP60 positiv) und pS_ctxB Δ sigVP60SEKDEL (8 von 12 VP60 positiv) exprimierten durchschnittlich etwas besser als mit pS_ctxBVP60SEKDEL (9 von 20 VP60 positiv) transformierter Tabak.

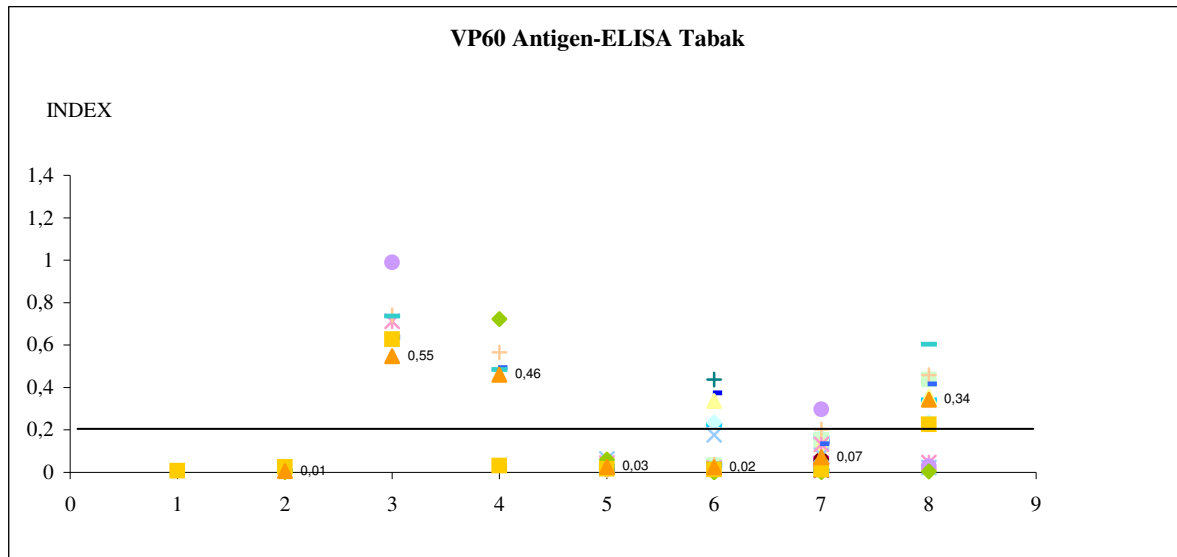


Abb. 4: INDEX Werte der Tabakpflanzenhomogenate im VP60 Antigen-ELISA, Vergleich von synthetischen ORFs mit dem VP60 wt. Der cut-off Wert liegt bei 0,2 (Linie)

pS = agrobakterielles Pflanzentransformationsplasmid, Negativkontrolle

1 = wt

5 = pS_ctxBVP60

2 = pS

6 = pS_ctxB Δ sigVP60

3 = pS_VP60

7 = pS_ctxBVP60SEKDEL

4 = pS_VP60SEKDEL

8 = pS_ctxB Δ sigVP60SEKDEL

Für anschließende Pflanzenanalysen war ein Wechsel von Tabakpflanzen auf Kartoffel vorgesehen. Zunächst wurden Kartoffeln der Sorte „Desireé“ über *Agrobacterium* vermittelten Transfer mit den bereits im Tabak am besten exprimierenden VP60 Konstrukten pS_VP60 und pS_VP60SEKDEL transformiert und vermehrt. Es wurde eine den Tabakpflanzen vergleichbar hohe VP60 Expression in diesen Kartoffeln gemessen (Abb. 5). Insgesamt wurden 12 Kartoffellinien, darunter zwei Kontrolllinien untersucht (Tab. 9). Neben Blattmaterial wurden auch Knollen von insgesamt 13 Kartoffellinien analysiert.

Kartoffel	Blatt	ELISA		Knolle	ELISA		Knolle/lyo	ELISA	
		positiv	negativ		positiv	negativ		positiv	negativ
Desireé	Linien			Linien			Linien		
wt	1	-	1	1	-	1	-	-	-
pS	1	-	1	2	-	2	-	-	-
pS_VP60	4	4	-	4	4	-	-	-	-
pS_VP60SEKDEL	6	5	1	6	5	1	1	1	-

Tab. 9: Auf VP60 untersuchte Kartoffellinien der Sorte „Desireé“.

Durch den Vergleich der Datensätze konnte festgestellt werden, dass in den Linien der Kartoffelpflanzen und -knollen der Sorte „Desireé“ eine ähnlich hohe Expression des Kapsidproteins VP60 unter Verwendung der Konstrukte pS_VP60 (4 von 4 VP60 positiv) und pS_VP60SEKDEL (5 von 6 VP60 positiv) stattfand. Daraufhin wurde die in Knollen höchstexprimierende Linie (pS_VP60SEKDEL, Linie 6) ausgewählt, vermehrt und 4000 Pflanzen im Gewächshaus der Firma Norika gepflanzt, 90 kg Knollen geerntet und als Frischmaterial, wie auch in lyophilisierter Form untersucht.

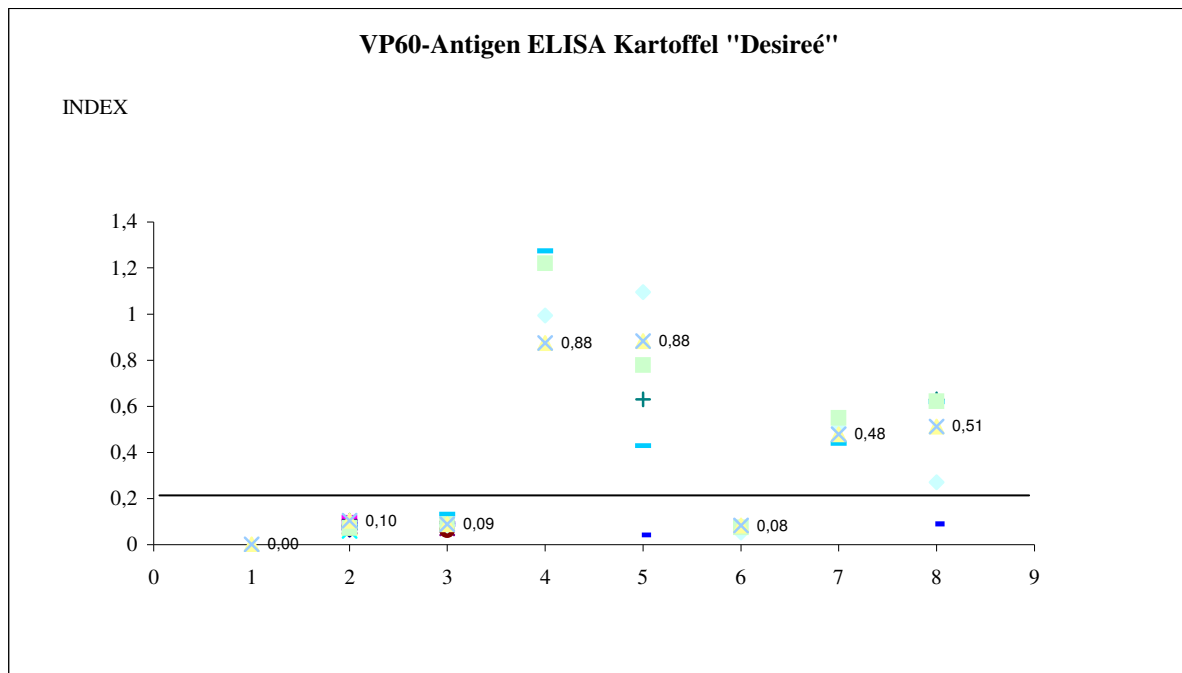


Abb. 5: INDEX Werte transgener Kartoffelpflanzen Sorte „Desireé“ im VP60 ELISA. Der Mittelwert ist beschriftet. Der cut-off Wert liegt bei 0,2 (Linie)

Blatt	1 = pS	Knolle	6 = pS
	2 = pS_VP60 wt 3/ 3		7 = pS_VP60
	3 = pS_VP60 wt 2/ 18		8 = pS_VP60SEKDEL
	4 = pS_VP60		
	5 = pS_VP60SEKDEL		

Durch die Firma „Norika“ erfolgte die Umstellung von der Kartoffelsorte „Desireé“ auf eine eigengezüchtete Sorte „Albatros“. Sie zeichnet sich durch gute Feldeigenschaften und hohe Proteinsynthese aus. Die Analysen wurden unter zusätzlicher Einbeziehung von ctxBVP60 Konstrukten mit dieser Sorte weitergeführt. Von insgesamt 84 Kartoffellinien, darunter zwei Kontrolllinien (Wildtyp und pS transformiert), wurde Blatt- und Knollenmaterial auf VP60 Gehalt untersucht (Tab. 10).

Kartoffel	Blatt	ELISA		Knolle	ELISA	
		Linien	positiv negativ		Linien	positiv negativ
wt	1	-	1	1	-	1
pS	1	-	1	1	-	1
pS_VP60	4	3	1	5	2	3
pS_VP60SEKDEL	3	3	-	4	2	2
pS_ctxBsig-VP60	6	-	6	9	-	9
pS_ctxBVP60SEKDEL	6	-	6	8	-	8
pGBSS_VP60	20	-	20	19	-	19
pGBSS_ctxBVP60	18	-	18	20	-	20
pGBSS_ctxBsig-VP60	25	-	25	26	-	26

Tab. 10: Auf VP60 untersuchte Kartoffellinien der Sorte „Albatros“.

Wiederum waren die Konstrukte pS_VP60 (3 von 4 VP60 positiv) und pS_VP60SEKDEL (3 von 3 VP60 positiv) am stärksten exprimierend, insgesamt aber schwächer als bei „Desireé“. Bei ctxB-VP60 Konstrukten unter Kontrolle des CaMV Promotors konnten ebenso wie bei allen VP60 Konstrukten unter Kontrolle des knollenspezifisch aktiven Promotors pGBSS keine Expression von VP60 nachgewiesen werden (Abb. 6).

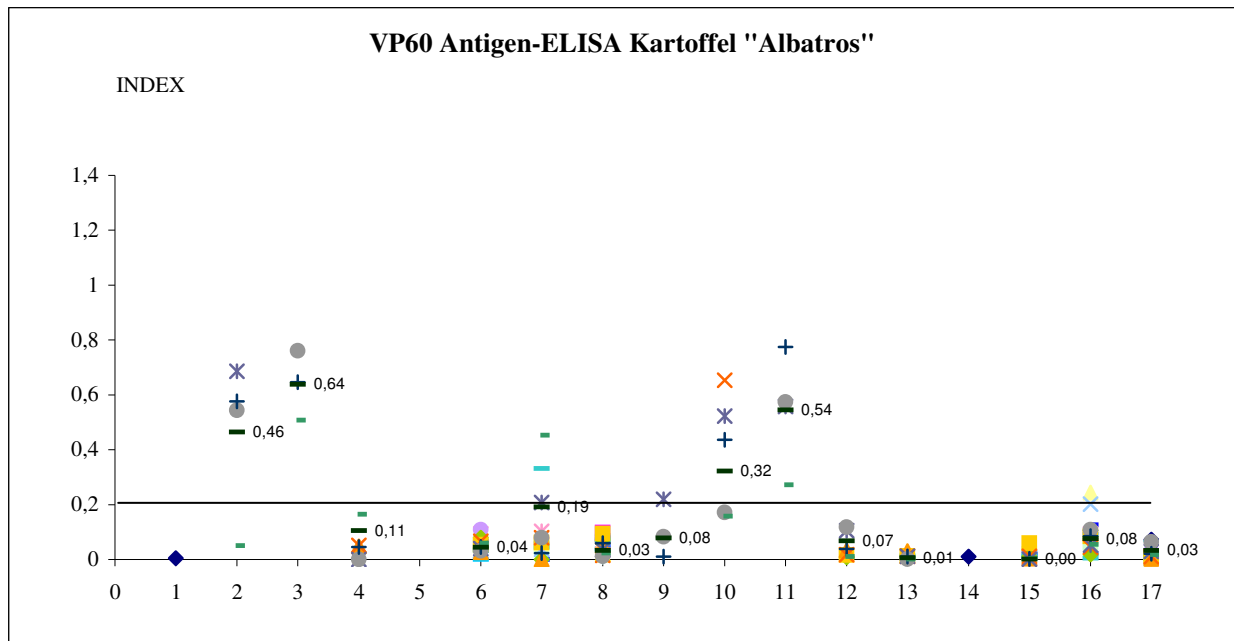


Abb. 6: INDEX Werte transgener Kartoffelpflanzen im VP60 ELISA. Der Mittelwert ist beschriftet. Der cut-off Wert liegt bei 0,2 (Linie)

Blatt	1 = pS	Knolle	9 = pS
	2 = pS_VP60		10 = pS_VP60
	3 = pS_VP60SEKDEL		11 = pS_VP60SEKDEL
	4 = pS_ctxB Δ sigVP60		12 = pS_ctxBVP60SEKDEL
	5 = pS_ctxBVP60SEKDEL		13 = pS_ctxB Δ sigVP60
	6 = pGBSS_ctxBVP60		14 = pGBSS
	7 = pGBSS_VP60		15 = pGBSS_VP60
	8 = pGBSS_ctxB Δ sigVP60		16 = pGBSS_ctxBVP60
			17 = pGBSS_ctxB Δ sigVP60

In Karotten konnte das Konstrukt pS_VP60 in 15 Linien der Sorte „Rotin“ und vier Linien der Sorte „Rote Riesen“ exprimiert werden (Tab. 11). Untersuchungsmaterial waren lyophilisierte Zellkulturen („Rotin“ und „Rote Riesen“) und ganze Wurzelknollen („Rotin“) einer Linie. Die in lyophilisierten Zellkulturmaterial „Rotin“ gemessene VP60 Expression war mit der in Kartoffeln der Sorte „Desireé“ (pS_VP60) vergleichbar, während in der Sorte „Rote Riesen“ geringere VP60 Expressionen gemessen wurden. In einer Wurzelrübe der Linie 9 der Sorte „Rotin“ wurde eine etwa gleich hohe Expression wie in lyophilisierten Zellkulturmaterial gemessen (Abb. 7).

Karotte	Rote Riesen Kallussusp. lyo	ELISA		Rotin	Kallussusp.	ELISA		Rotin	Wurzel	ELISA	
		positiv	negativ			Linien	positiv			negativ	Linien
wt	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	
pS_VP60	4	2	2	15	13	2	2	2	1	1	

Tab. 11: transgener Karottelinien, positiv/ negativ VP60 spezifisches Signal;
Karottesorten: R = Rotin, RR = Rote Riesen
WB = Western Blot

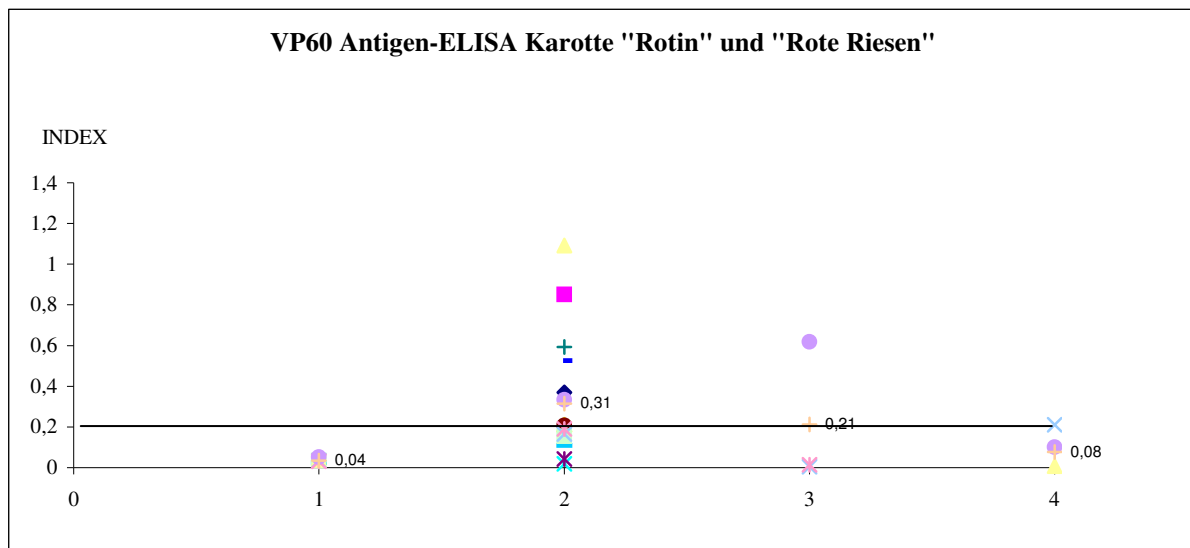


Abb. 7: INDEX Werte transgener Karottepflanzen im VP60 ELISA. Der Mittelwert ist beschriftet. Der cut-off Wert liegt bei 0,2 (Linie)

Rotin Lyophilisat 1 = pS_VP60 wt 2/ 18
 2 = pS_VP60
 Wurzelrübe 3 = pS_VP60
 Rote Riesen Lyophilisat 4 = pS_VP60

4.1.2.3 Western Blot

In 16 von 186 mit VP60 transformierten transgenen Pflanzenlinien konnte der Nachweis der Expression dieses Proteins auch im Western Blot erbracht werden (Tab. 12). Wie im ELISA konnte jedoch gezeigt werden, dass die Expression der transgenen „Albatros“ Kartoffeln

durchschnittlich schlechter ist als die der Sorte „Desireé“. Die in den Karotten vorhandenen VP60 Mengen konnten nicht im Western Blot detektiert werden.

VP60	Linien	positiv	negativ
Tabak	78	4	74
Kartoffel			
"Desireé"	14	7	7
"Albatros"	75	5	70
Karotte			
"Rote Riesen"	4	0	4
"Rotin"	15	0	15

Tab. 12: Western Blot zum VP60 Nachweis in transgenen Pflanzen

Im Western Blot positive Pflanzen:

Tabak pS_VP60, Linie: 1, 7, 11
 pS_VP60SEKDEL, Linie: 3

Kartoffel „Desireé“ pS_VP60, Linie: 6, 12, 21
 pS_VP60SEKDEL, Linie: 6, 15, 17, 25

 „Albatros“ pS_VP60, Linie: 203, 205, 213
 pS_VP60SEKDEL , Linie: 204, 217

In Abb. 8 ist beispielhaft ein Western Blot Ergebnis für Knollenmaterial der im Tierversuch 4.3.2 verwendeten Kartoffellinie dargestellt.

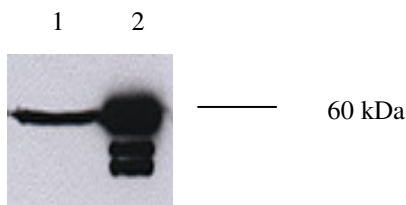


Abb. 8: Western Blot Analyse Kartoffelknolle „Desireé“, Spur 1 = Linie 6, pS_VP60SEKDEL, Spur 2 = RHDV Leberkonzentrat experimentell infizierter Kaninchen aus. Die Banden unterhalb der 60 kDa Bande sind Abbauprodukte des Virusproteins.

4.2 Quantifizierung von VP60

4.2.1 VP60 Standard

Als Standard (VP60-ST) für die Abschätzung absoluter Mengen in den zu untersuchenden Materialien diente ein durch isopyknische Dichtegradientenzentrifugation in Cäsiumchlorid hochgereinigtes RHDV aus Leberkonzentrat experimentell infizierter Kaninchen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit dem Bradford-Test (Nanoquant[®] Roth) durchgeführt und der Gesamtproteingehalt dem VP60 gleichgesetzt. Die ermittelte Konzentration betrug 0,11 µg/µl.

4.2.2 Quantifizierung aus Rekombinanten Bakulovirus (RBV-VP60 Substandard)

Das in Bakuloviren generierte VP60 wurde als Substandard für die ELISA Analysen, sowie für Immunogenitätsanalysen im Tierversuch eingesetzt. Dazu wurde RBV-VP60 auf SF9 Insektenzellen vermehrt. Die Virustiter wurden immunhistologisch im IIFT bestimmt (Abb. 9) und betrug 10^6 KID₅₀/ ml. Es konnten durch den HA-Test 2^{12} hämagglutinierende Einheiten (HAU) pro 50 μ l Zellsuspension festgestellt werden.

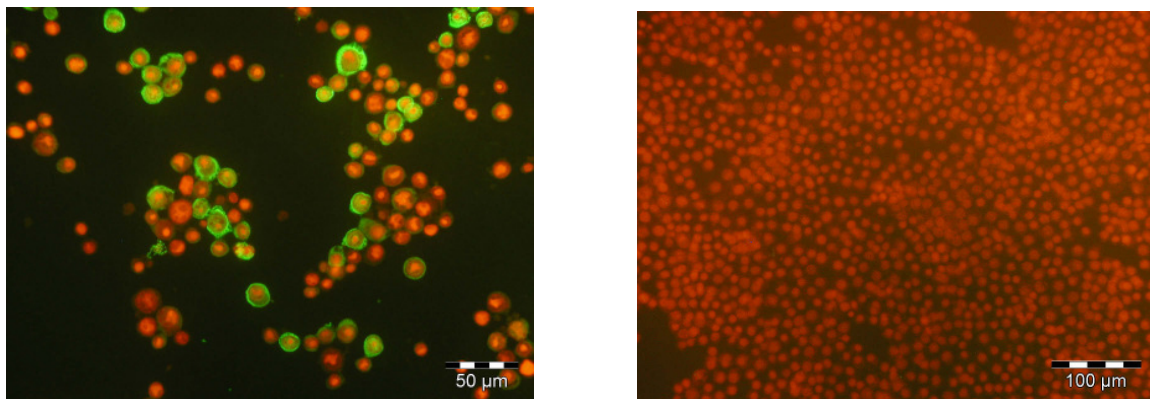
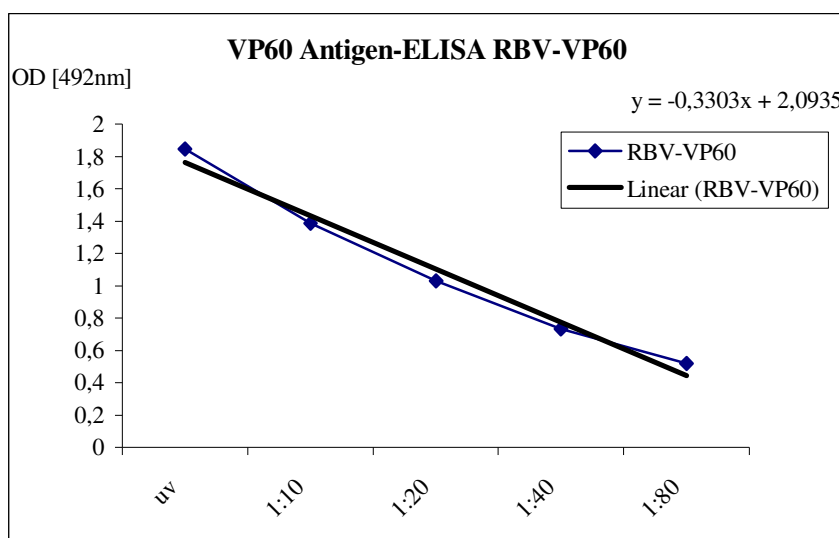


Abb. 9: **a)** RBV-VP60, immunhistologischer Nachweis von VP60 in infizierten SF9 Zellen, mit FITC markierten Anti-VP60 MAk mix **b)** nichtinfizierte SF9-Zellen. Die rote Fluoreszenz kennzeichnet die DNA.

Die Gesamtproteinmenge RBV-VP60 wurde über den Vergleich mit VP60-ST im ELISA bestimmt. Anhand des bekannten VP60-ST Proteingehaltes konnten über den Vergleich der optischen Dichte die Proteinmenge in unverdünnt eingesetzten RBV-VP60 mit 0,11 μ g VP60/ μ l bestimmt werden. Durch den linearen Verlauf der Messgerade konnte einzelnen in Abb. 10 dargestellten Verdünnungsstufen VP60 Konzentrationen zugeordnet werden.



	VP60 [ng/ 100 μ l]
uv	110
1:10	11
1:20	5,5
1:40	2,75
1:80	1,38

Abb. 10: Antigen-ELISA, RBV-VP60 titriert, im linearer Bereich. Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf das eingesetzte Probevolumen von 100 μ l.

4.2.3 Quantifizierung aus Organmaterial

Lyophilisierte, Ethylenimin-inaktivierte Leber von RHDV infizierten Kaninchen wurde zur oralen Immunisierung von Kaninchen verwendet. Die VP60 Konzentration wurde im Western Blot durch Vergleich mit dem VP60-ST bestimmt. Der VP60 Gehalt des für den Tierversuch eingesetzten Lebermaterials betrug 40 µg/ ml rehydrierten Leberlyophilisates (Abb. 11).

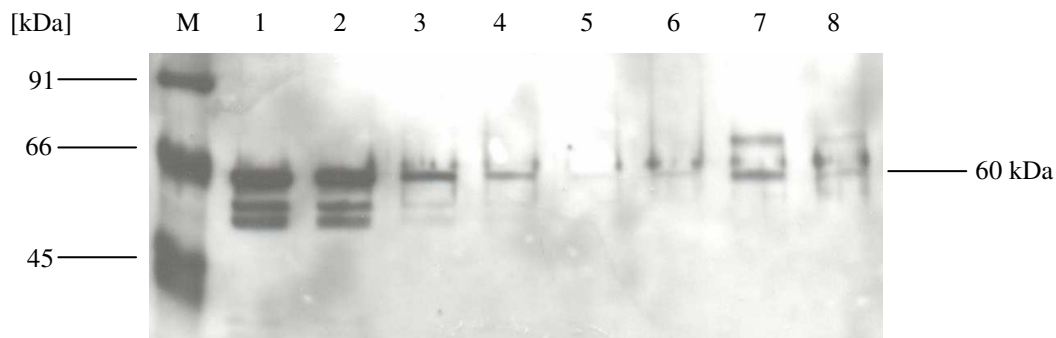


Abb. 11: Western Blot zur Bestimmung der VP60 Konzentration in lyophilisierter Kaninchenleber (7,8)
 1 = VP60-ST 0, 2 µg; 2 = VP60-ST 0,1 µg; 3 = VP60-ST 0,05 µg; 4 = VP60-ST 0,025 µg; 5 = 0,0125 µg;
 6 = VP60-ST 0,00625 µg; 7= lyophilisierter Leber 0,04 µg; 8= lyophilisierter Leber 0,02 µg
 Die Banden unterhalb der 60 kDa stellen degeneriertes/ unvollständiges Virusprotein dar.
 M = Marker BioRad

4.2.4 Quantifizierung aus transgenen Pflanzen

Nach der Bestimmung der VP60 Konzentration in RBV-VP60 (Substandard) konnten im ELISA über den Vergleich der optischen Dichte auch die VP60 Menge in den transgenen Pflanzen, bzw. Lyophilisaten geschätzt werden. Diese Abschätzungen erfolgte unter der angenommenen Voraussetzung, dass die im ELISA testwirksamen antigenen Strukturen und Epitope in gleicher Weise in bakuloexprimierten wie in pflanzenexprimierten VP60 vorliegen.

Von besonderem Interesse war die VP60 Konzentration in den für Immunisierungsversuche verwendeten Pflanzen und Lyophilisate. Dafür wurden 100 µl eines Tabak-Puffergemisches im ELISA untersucht (Abb. 12) und folgende Ergebnisse ermittelt:

- pS_VP60: 0,11 µg VP60; dies entspricht 2,2 µg VP60/ g Frischmasse
- pS_VP60SEKDEL: 0,011 µg VP60; dies entspricht 0,22 µg VP60/ g Frischmasse

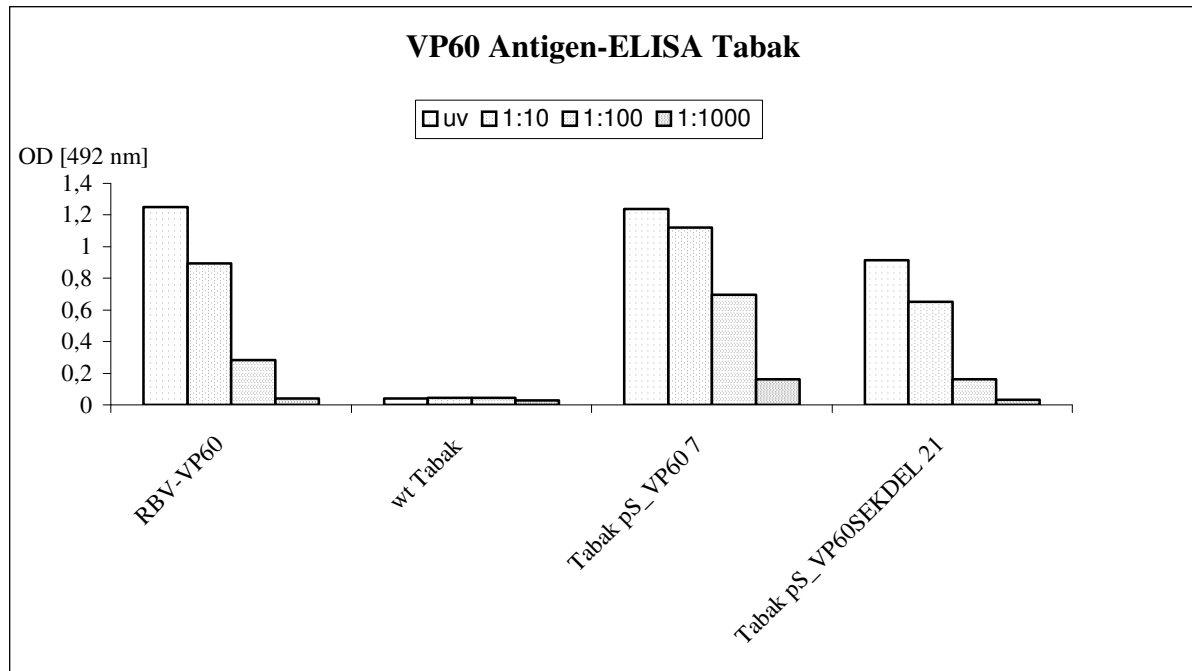


Abb. 12: VP60 ELISA zur Bestimmung des VP60 Gehaltes, Vergleich der optischen Dichten [492nm] mit dem RBV-VP60. Da dieser Test nur einmal durchgeführt wurde sind die eingesetzten Verdünnungsstufen zum besseren Vergleich mit aufgeführt.

VP60 aus RBV-VP60 entspricht Tabak pS_VP60, Linie 7 = 0,11 µg/ 100 µl

VP60 aus RBV-VP60 1:10 entspricht Tabak pS_VP60SEKDEL, Linie 21 = 0,011 µg/ 100 µl

uv = unverdünnt

Analog den Konzentrationsbestimmungen des transgenen Tabaks wurden auch bei den Kartoffeln und Karotten 100 µl eines Lyophilisat-Puffergemisches im ELISA untersucht (Abb. 13) und folgende Ergebnisse ermittelt:

- pS_VP60SEKDEL Kartoffelknollen „Desireé“: 0,011 µg VP60; dies entspricht 0,44 µg VP60/ g Frischmasse
- pS_ctxBVP60SEKDEL Kartoffelknollen „Albatros“: 0,004 µg VP60; dies entspricht 0,16 µg VP60/ g Frischmasse
- pS_VP60 Karotte „Rotin“: 0,55 ng VP60; dies entspricht 2,2 ng VP60/ g Frischmasse

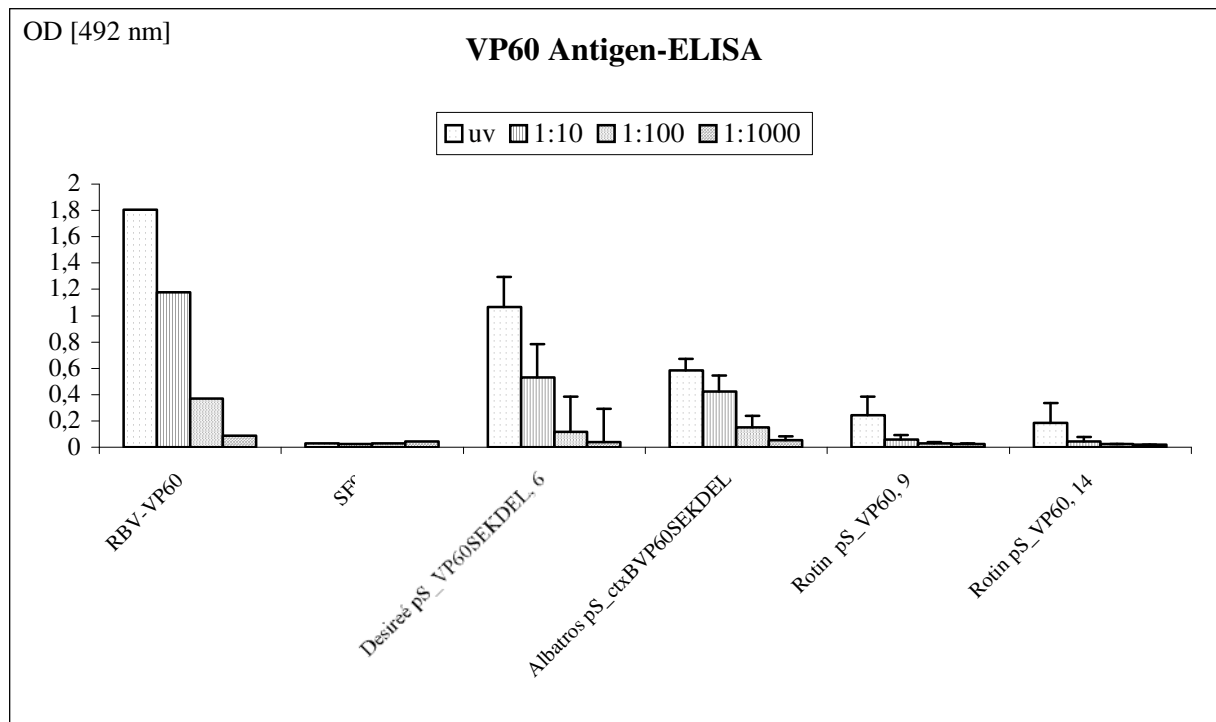


Abb. 13: VP60 Antigen-ELISA zur Bestimmung der Antigenlast in Lyophilisathomogenaten transgener Kartoffelknollen- („Desiree“, „Albatros“) und Karottesuspensionskulturen „Rotin“

Vergleich der optischen Dichten [492nm] mit dem RBV-VP60

VP60 aus „Desiree“ pS_VP60SEKDEL = 0,011 µg/ 100 µl

VP60 aus „Albatros“ pS_ctxBVP60SEKDEL, Linie 234/ 237 gepoolt = 0,004 µg/ 100 µl

VP60 aus „Rotin“ pS_VP60, Linie 9 und Linie 14 = ca. 0,55 ng/ 100µl

Von den für den Tierversuch 4.3.2 verwendeten Kartoffelknollen der Sorte „Desiree“, pS_VP60SEKDEL, Linie 6, wurden 30 statistisch ermittelte Pflanzenstandorte innerhalb des Gewächshausfeldes ausgewählt und der VP60 Gehalt dieser Knollen im ELISA überprüft. Es konnten zwischen 0,11-0,005 µg VP60/ g Knollenfrischmasse ermittelt werden. Als Grundlage der Berechnung des verfütterten VP60 wurde der Mittelwert von 0,055 µg VP60/ g Frischmasse herangezogen.

4.2.5 Quantifizierung aus transient exprimierenden CRFK Zellen

Transient exprimierende CRFK Zellen wurden hergestellt, um das VP60 Expressionsprodukt dem pflanzenexprimierten VP60 gegenüberzustellen. Die in den Pflanzen verwendeten VP60 Konstrukte wurden in piecas-Plasmide (pie) Kontrolle des murinen Zytomegalievirus (MCMV) Promotors (KUHNLÉ et al. 1996) kloniert (Tab. 13). In Immunfluoreszenztests konnte bei allen transfizierten Zellen RHDV spezifische Fluoreszenz mit Ausnahme der Kontrolle beobachtet werden.

DNA Konstrukte	Expression in	ELISA	WB
pS_VP60 2/18	Zytoplasma	+	+
pS_VP60	Zytoplasma	+	+
pS_VP60SEDKEL	Zytoplasma	+	+
pS_ctxB Δ sigVP60	Zytoplasma	-	+
pS_ctxBVP60	Intrazellularraum	-	-
pS_ctxB Δ sigVP60SEKDEL	Zytoplasma	-	+
pS_ctxBVP60SEDKEL	Endoplasmatisches Retikulum	+	+

Tab. 13: transient in CRFK-Zellen exprimierte VP60 Konstrukte

Analog zum pflanzenexprimierten VP60 wurden auch transient in CRFK Zellen exprimiertes VP60 über Vergleich mit der RBV-VP60 Referenz im ELISA getestet. Die mit pie_VP60 und pie_VP60SEKDEL transfizierten Zellen exprimierten in etwa die gleiche Menge wie Pflanzen mit den selben Genkonstrukten. Die VP60-Expression ctxB Δ sig assoziierte Konstrukte, wie auch des VP60 wt lagen deutlich unterhalb dieser Werte. Zellen, die mit vollständigen ctxB Gen und VP60 Gen transfiziert wurden, exprimierten die geringsten Mengen VP60 (Abb. 14).

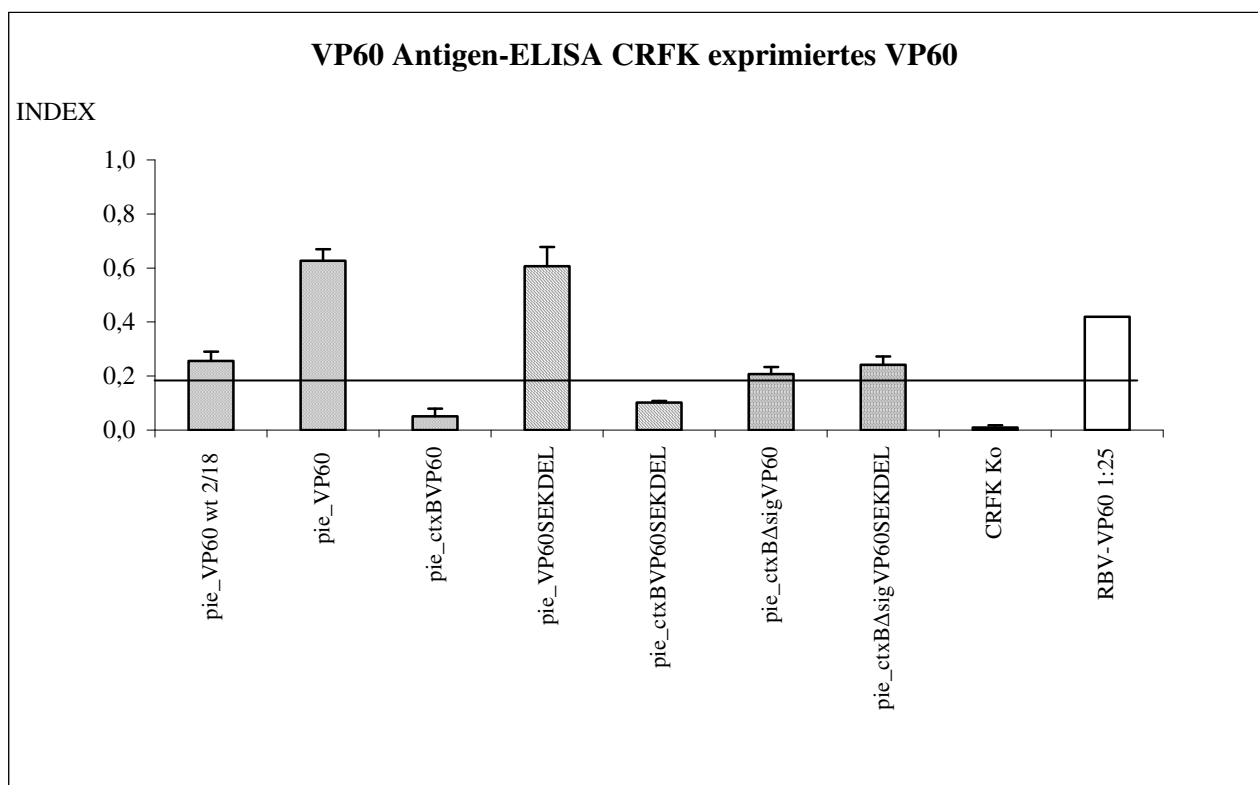


Abb. 14: INDEX Mittelwerte VP60 ELISA transient exprimierenden CRFK-Zellkulturen. Zum Vergleich der Expressionsstärke: RBV-VP60, 1:25 verdünnt in A. dest.

Die Quantifizierung der Proteine erfolgte über den Western Blot durch Vergleich der Intensität der spezifischen Antigenbanden mit VP60-ST. Die Fusion von VP60 mit ctxB ergab Expressionsprodukte unterschiedlicher molekularer Größe. Expressionsprodukte von

ctxBVP60 (1, Abb. 15) und ctxBVP60SEKDEL (3, Abb. 15) stellten sich im Western Blot deutlich über 60 kDa im Bereich von 80 kDa dar. Die Expressionsprodukte von VP60SEKDEL, VP60 und VP60 wt (2, 3, 4, Abb. 15) lagen im Bereich von 60 kDa. Ausgehend von ctxB Δ sigVP60SEKDEL exprimierten Protein (2, Abb. 16), ohne Signalpeptid für das ER wurde in einer molekularen Größe von ca. 72 kDa im Western Blot nachgewiesen. Ein Expressionsprodukt des Konstruktes ctxB Δ sigVP60 (4, Abb. 16) konnte nicht dargestellt werden.

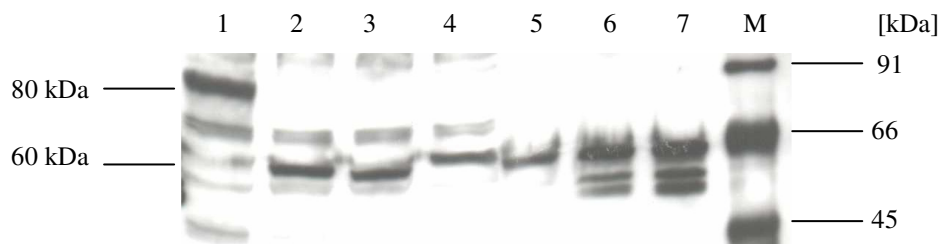


Abb. 15: Western Blot zur Bestimmung der VP60 Konzentration in transfizierten CRFK Zellen, Schätzung der Antigenmenge anhand der Bandenstärke

1 = pie_ctxBVP60, ca. 0,1 μ g	5 = VP60-ST 0,025 μ g
2 = pie_VP60SEKDEL, ca. 0,03 μ g	6 = VP60-ST 0,05 μ g
3 = pie_VP60, ca. 0,03 μ g,	7 = VP60-ST 0,1 μ g
4 = pie_VP60 wt, ca. 0,04 μ g	M = Marker BioRad

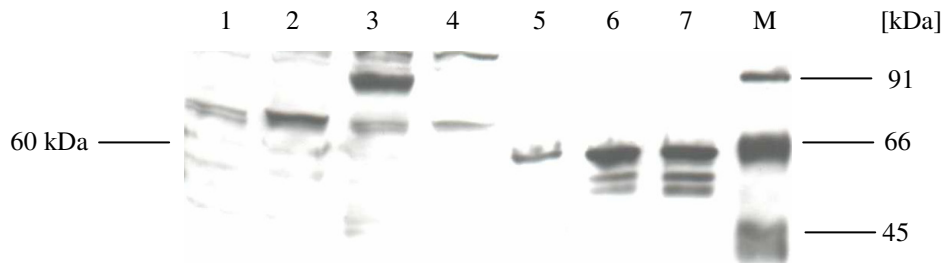


Abb. 16: Western Blot zur Bestimmung der VP60 Konzentration in transfizierten CRFK Zellen, Schätzung der Antigenmenge anhand der Bandenstärke

1 = CRFK Kontrolle	5 = VP60-ST 0,025 μ g
2 = pie_ctxB Δ sigVP60SEKDEL, ca. 0,04 μ g	6 = VP60-ST 0,05 μ g
3 = pie_ctxBVP60SEKDEL, ca. 0,05 μ g	7 = VP60-ST 0,1 μ g
4 = pie_ctxB Δ sigVP60 keine spezifische Bande	M = Marker BioRad

4.3 Tierversuche

4.3.1 Prüfung von transgenen Tabak nach parenteraler Verabreichung an Mäuse

Die Zielstellung dieses Versuches lag in der Prüfung der Immunogenität von Blattmaterial transgener Tabakpflanzen. (pS_VP60 und pS_VP60SEKDEL). Je 2 g Blattmaterial wurden homogenisiert und in 4 ml PBS aufgenommen. Ein Teil wurde 1:1 mit Adjuvans (ISA 206) gemischt. Die Tiere wurden i.m. mit Tabakhomogenat mit und ohne Adjuvans immunisiert und nach 4 Wochen nachimmunisiert. Eine Kontrollgruppe von 4 Tieren blieb unbehandelt. Eine Gruppe von 3 Tieren erhielt 0,5 ml eines handelsüblichen RHD-Impfstoffes für Kaninchen (Rika-Vacc[®]) als i.m. Injektion.

Gruppe	Tierzahl	VP60 Konstrukt	VP60 pro Impfdosis	Immun./ Boost. n. 4 Wo	VP60 gesamt
1	4	pS_VP60	0,550 µg	0,5 ml/ T	1,1 µg
2	4	pS_VP60 + Adjuvans	0,275 µg	0,5 ml/ T	0,55 µg
3	4	pS_VP60SEKDEL	0,055 µg	0,5 ml/ T	0,11 µg
4	4	pS_VP60SEKDEL + Adjuvans	0,0275 µg	0,5 ml/ T	0,055 µg
		Kontrollen	Kontrolle		
5	4	wt Tabak	0 µg	0,5 ml/ T	0 µg
6	4	wt Tabak + Adjuvans	0 µg	0,5 ml/ T	0 µg
7	4	Kontrolle	0 µg	-	0 µg
8	3	-	Rika-Vacc [®]	0,5 ml/ T	k.A.

Tab. 14: Tierversuch mit transgenen Tabak. Adjuvans = Monotanide ISA 206

T = Tier; wt = Wildtyp

Rika-Vacc[®] (Riemser Arzneimittel AG, Insel Riems) RHD-Impfstoff für Kaninchen zur i.m. oder s.c. Injektion, inaktiviert, wässrige Suspension

Eine deutliche VP60 Antikörper-Bildung konnte lediglich für die Rika-Vacc[®] immunisierte Gruppe 8 nachgewiesen werden (Abb. 17). Die Substitution von Adjuvans zu den Tabakhomogenaten hatte keinen immunstimulatorischen Effekt. In den Seren der mit transgenen Material immunisierten Mäuse konnten auch nach einmaliger Boosterung keine Antikörper nachgewiesen werden.

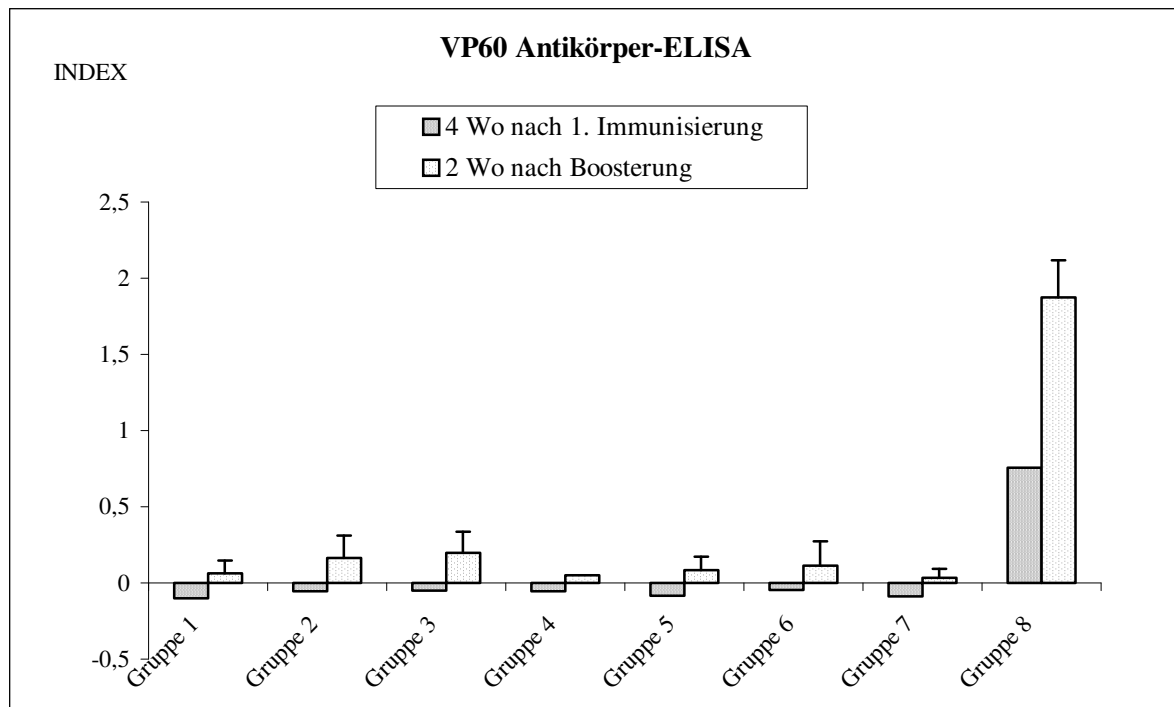


Abb. 17: INDEX Mittelwerte VP60 Antikörper-ELISA, Mausseren 1:50 in PBS Puffer verdünnt
 Gruppe 1 = Tabak wt
 Gruppe 2 = Tabak wt + ISA 206
 Gruppe 3 = Tabak pS_VP60 7
 Gruppe 4 = Tabak pS_VP60 7 + ISA 206
 Gruppe 5 = Tabak pS_VP60SEKDEL 21
 Gruppe 6 = Tabak pS_VP60SEKDEL 21 + ISA 206
 Gruppe 7 = Kontrolle
 Gruppe 8 = Rika-Vacc®
 pS = agrobakterielles Pflanzentransformationsplasmid

4.3.2 Prüfung von transgenen Kartoffeln (Frischmaterial) nach oraler und parenteraler Verabreichung an Kaninchen

Zielstellung dieses Versuchs war die Prüfung der Immunogenität von Kartoffelknollen (Desirée pS_VP60SEKDEL) nach oraler bzw. parenteraler Applikation an Kaninchen, sowie Aussagen zu möglichen Applikationsregime und -rhythmus. Als Versuchstiere wurden 28 Kaninchen verwendet. Je 4 Tiere pro Gruppe wurden einzeln aufgestellt. Die transgenen Kartoffelknollen wurden an 2 Gruppen verfüttert. Die Fütterung erfolgte ad libidum, durch Rückwägung wurden jeweils die aufgenommenen Mengen bestimmt. Die Tiere nahmen durchschnittlich ca. 120 g rohe Knolle pro Tag auf. In Gruppe 1 wurde über 7 Tage gefüttert. Grundfutter wurde über den Zeitraum der Kartoffelfütterung nicht angeboten. Aus Presssaft von Kartoffelknollen wurde eine mit Adjuvans (ISA 206) formulierte Suspension hergestellt, die ca. 55 ng VP60 enthielt und i.m. appliziert wurde (Gruppe 2). Nach dem gleichen Schema wurde mit wt-Kartoffelknollen verfahren (Gruppe 4: Fütterung über 7 Tage + 3 Tage Boosterung; Gruppe 3: 1 ml i.m. 2 x im Abstand von 43 Tagen) Vier Tiere blieben als Kontrollgruppe unbehandelt. Gruppe 5 wurde mit einem handelsüblichen RHD-Impfstoff für Kaninchen (Rika-Vacc®) mit 1 ml i.m. immunisiert (Tab. 15). Die Boosterung der

Fütterungsgruppen 1 und 4 erfolgte über einen Zeitraum von 3 Tagen, 43 Tage nach Ende der ersten Immunisierung. Die Gruppen 2, 3 und 5 wurden 43 Tage nach der ersten Vakzinierung mit der Initialdosis nachimmunisiert. In Gruppe 1 wurden insgesamt zwischen 1,1 kg (60,5 µg VP60)-1,3 kg (71,5 µg VP60) transgener Knollen pro Tier verfüttert. In Gruppe 2 wurde durch die zweimalige parenterale Applikation 0,11 µg VP60 appliziert. In Gruppe 4 wurde insgesamt zwischen 0,54-1,5 kg wt-Knollen pro Tier verfüttert.

Gruppe	Tierzahl	VP60 Konstrukt	VP60 pro Impfdosis	Immun./ Boost. n. 43 Tagen	VP60 gesamt
1	4	pS_VP60SEKDEL	9,6 µg	Fütterung 7 d/ 3 d	60,5 - 71,5 µg
2	4	pS_VP60SEKDEL	0,055 µg	1 x i.m./ 1 x i.m.	0,11 µg
3	4	Kartoffelknolle wt	0 µg	1 x i.m./ 1 x i.m.	0 µg
4	4	Kartoffelknolle wt	0 µg	Fütterung 7 d/ 3 d	0 µg
5	4	-	Rika-Vacc [®]	1 x i.m./ 1 x i.m.	k.A.
6	4	Kontrolle	0 µg	-	0 µg

Tab. 15: Tierversuch zur oralen und parenteralen Immunisierung mit transgenen Kartoffelknollen „Desireé“, synthetischer VP60 ORF: pS_VP60SEKDEL, Linie 6
Rika-Vacc[®] (Riemser Arzneimittel AG, Insel Riems) RHD-Impfstoff für Kaninchen zur i.m. oder s.c. Injektion, inaktiviert, wässrige Suspension
pS = agrobakterielles Pflanzentransformationsplasmid; i.m. = intramuskulär

Die serologischen Ergebnisse sind in Abb. 18 dargestellt. Es wird deutlich, dass in keinem Fall die Verfütterung wie auch die parenterale Verabreichung von transgenen Pflanzenmaterial zu einer messbaren Antikörperantwort führte. Ein leichter Anstieg der Werte, 13 Tage nach der Boosterung muss als im normalen Schwankungsbereich des Testes angesehen werden. Das in den transgenen Kartoffelknollen enthaltenen VP60 konnte keine detektierbare VP60 spezifische Immunantwort auslösen. Auch die intramuskuläre Dosis von 0,11 µg reichte nicht zur Induktion einer spezifischen Immunantwort aus. In der Rika-Vacc[®] Gruppe wurde nach der Boosterung an Tag 49 ein Abfall der Extinktion bei 2 Tieren festgestellt. In den folgenden Serumkontrollen stieg der Antikörpertiter bei allen Tieren dieser Gruppe über das Niveau der ersten Immunisierung, somit erwies sich die Nachimmunisierung als wirksam. Die Ergebnisse einer 4 Wochen nach der Boosterung vorgenommenen Challengeinfektion mit virulentem RHDV „Eisenhüttenstadt“ können nicht in die Bewertung des Versuches eingezogen werden, da das Virus sich nicht als aktiv erwies. Erfahrungswerte über die Beziehung zwischen ELISA-Titern und Suszeptibilität gegenüber einer Infektion lassen jedoch den Schluss zu, dass diese Tiere nicht geschützt waren.

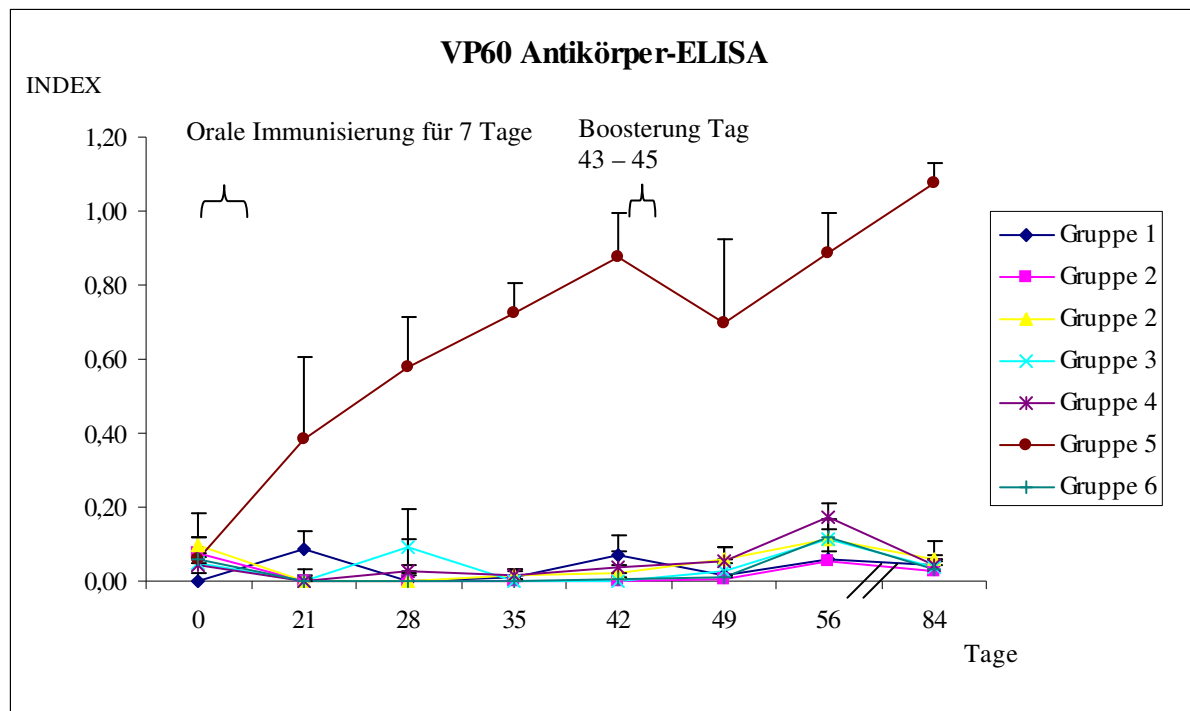


Abb. 18: INDEX Mittelwerte VP60 Antikörper-ELISA, Kaninchenserum 1:50 in PBS Puffer verdünnt
 Gruppe 1 = Kartoffel pS_VP60SEKDEL Fütterung 7 d + 3 d Boosterung
 Gruppe 2 = Kartoffel pS_VP60SEKDEL 1 x i.m. + 1 x i.m. Boosterung
 Gruppe 3 = wt-Kartoffelknolle Fütterung 7 d + 3 d Boosterung
 Gruppe 4 = wt-Kartoffelknolle Fütterung 10 d + 3 d Boosterung
 Gruppe 5 = Rika-Vacc[®]
 Gruppe 6 = Kontrolle/ unbehandelt
 pS = agrobakterielles Pflanzentransformationsplasmid

4.3.3 Prüfung von ctxB-adjuvierten transgenen Kartoffeln nach oraler (Pellet) und parenteraler Verabreichung an Kaninchen

Zielstellung des Versuchs war die Prüfung der Immunogenität von transgenen Kartoffelknollen („Desiree“ pS_VP60SEKDEL und „Albatros“ pS_ctxBVP60SEKDEL) nach oraler und parenteraler Verabreichung von großen Proteinmengen (Lyophilisate) in kaninchengerechter Verabreichung. Aus handelsüblichen Kaninchenfutterpellets und lyophilisierten transgenen Kartoffelknollen wurden unter Zusatz von Gelatine wiederum Pellets formuliert und Kaninchen verfüttert. Als Versuchstiere wurden 2 Kaninchen pro Gruppe verwendet. An den Tagen 0, 46 und 78 wurde Serum gewonnen. An den Tagen 1, 8 und 15 erhielten die Kaninchen der Gruppen 1-3 jeweils 50 g Pellets, am Tag 22 jeweils 80 g Pellets und an den Tagen 49, 56 und 63 jeweils 100 g Pellets. Die Aufnahme der Pellets durch die Kaninchen war sehr gut. Für die Immunisierung der Gruppe 4 wurden jeweils frisch 1 g des transgenen Knollenmaterials in 4 ml IP extrahiert und 1,5 ml bei der Erstimmunisierung, vier Wochen später 1 ml und eine weitere Woche später 4 ml bei der Nachimmunisierung i.m. appliziert (Tab. 16). Die Tiere wurden wöchentlich serologisch kontrolliert. Keines der im

Versuch verwendeten Kaninchen reagierte auf die Applikation transgenen Materials mit einer im ELISA messbaren Antikörperbildung. Alle Tiere verendeten innerhalb von 72 h infolge einer 120 (Oralgruppen) und 99 (Parenteralgruppen) Tage nach Versuchsbeginn vorgenommenen Challengeinfektion mit virulentem RHDV „Eisenhüttenstadt“ an RHD.

Gruppe	Tierzahl	VP60 Konstrukt	VP60/ Immunisierung	Route	VP60 gesamt
1	2	pS_VP60SEKDEL	3 x 10 µg/ 16 µg/ 3 x 20 µg	oral	106 µg
2	2	pS_ctxBVP60SEKDEL	3 x 2,5 µg/ 4 µg/ 3 x 5 µg	oral	26,3 µg
3	2	pS_VP60SEKDEL	150 ng/ 100 ng/ 200 ng	i.m.	450 ng
4	2	pS_ctxBVP60SEKDEL	37,5 ng/ 25ng/ 50 ng	i.m.	112,5 ng

Tab. 16: Tierversuch zur oralen und parenteralen Immunisierung mit Lyophilisat von transgenen Kartoffelknollen „Desireé“ VP60 ORF: pS_VP60SEKDEL Gruppe 1, 3 und „Albatros“ VP60 ORF: pS_ctxBVP60SEKDEL Gruppe 2, 4

4.3.4 Orale Immunisierung von Kaninchen mit originären und bakulovirusexprimierten VP60

Neben der Fragestellung, ob pflanzengeneriertes VP60 immunogene Eigenschaften hat, sind Ergebnisse zur prinzipiellen Eignung einer oralen Verabreichung von inaktivierten Antigen von besonderer Bedeutung hinsichtlich strategischer Aussagen zur Technologie der „edible vaccines“. Durch die Verwendung maximal möglicher Antigenmengen sollte der Versuch einen Beitrag zu dieser Fragestellung leisten. Dazu wurde dichtegradientengereinigtes und konzentriertes rekombinant in Bakuloviren exprimiertes VP60 und Ethylenimin (EI) inaktiviertes RHDV aus Lebern RHDV infizierter Kaninchen auf Immunogenität nach oraler Applikation an Kaninchen geprüft. Insgesamt wurden 32 Tiere in Gruppen zu vier Tieren gehalten. Eine mit handelsüblichen RHD-Impfstoff (Rika-Vacc®) i.m. immunisierte Gruppe diente als Kontrolle. Den Kaninchen wurde an fünf aufeinander folgenden Tagen mit einer Spritze 2 ml Antigen oral appliziert (Tab. 17). Am Tag 35 wurden die Tieren der Gruppen 2, 4 und 6 einmalig oral nachimmunisiert.

Gruppe	Tierzahl	VP60 Gehalt pro Impfdosis	Immun./ Boost. n. 4 Wo	VP60 gesamt
1	4	1,33 µg	5 d oral	6,65 µg
2	4	1,33 µg	5 d oral/ 1 d oral	7,98 µg
3	4	3,33 µg	5 d oral	16,65 µg
4	4	3,33 µg	5 d oral/ 1 d oral	19,98 µg
		Kontrolle		
5	4	Inf. Leber 40 µg	5 d oral	200 µg
6	4	Inf. Leber 40 µg	5 d oral/ 1 d oral	240 µg
7	4	PBS Puffer	5 d oral	0 µg
8	4	Rika-Vacc®	1 x i.m.	k.A.

Tab. 17: Tierversuch zur oralen Immunisierung mit VP60 aus RBV-VP60 und RHDV aus infizierten Kaninchenlebern, Ethylenimin-inaktiviert Rika-Vacc® (Riemser Arzneimittel AG, Insel Riems) RHD-Impfstoff für Kaninchen zur i.m. oder s.c. Injektion, inaktiviert, wässrige Suspension

Wöchentlich wurden Serumproben gewonnen und im indirekten ELISA auf VP60 Antikörper untersucht.

Die Verabreichung von insgesamt 6,65-19,98 µg VP60, gewonnen aus rekombinanten Bakuloviren (Gruppen 1-4), wie auch 200-240 µg VP60 aus Lebern RHDV infizierter Kaninchen (Gruppen 5, 6) reichten nicht aus, um eine VP60-spezifische Immunantwort zu induzieren. Die Belastungsinfektion erfolgte nach 49 Tagen mit $10^{4,5}$ LD₅₀ RHDV pro Tier. Insgesamt starben 26 Kaninchen an der RHDV-Infektion. Die mittlere Überlebenszeit betrug 57,8 h. Neben den Tieren der Rika Vacc[®] Impfgruppe (Gruppe 8) überlebten je ein Tier der Gruppen 2 und 3 die Infektion. Im ELISA konnte bei diesen Tieren keine Reaktion gemessen werden, die auf das Vorhandensein von VP60 spezifischen Antikörpern hindeutete (Abb. 19). Den an der RHDV-Infektion verstorbenen Kaninchen wurde eine Leberprobe entnommen und aufgearbeitet, um die Virustiter im Hämagglutinationstest (HAT) ermitteln zu können. Es wurden Titer zwischen 2^7 und 2^{14} hämagglutinierende Einheiten (HAU) pro 50 µl Lebersuspension festgestellt werden.

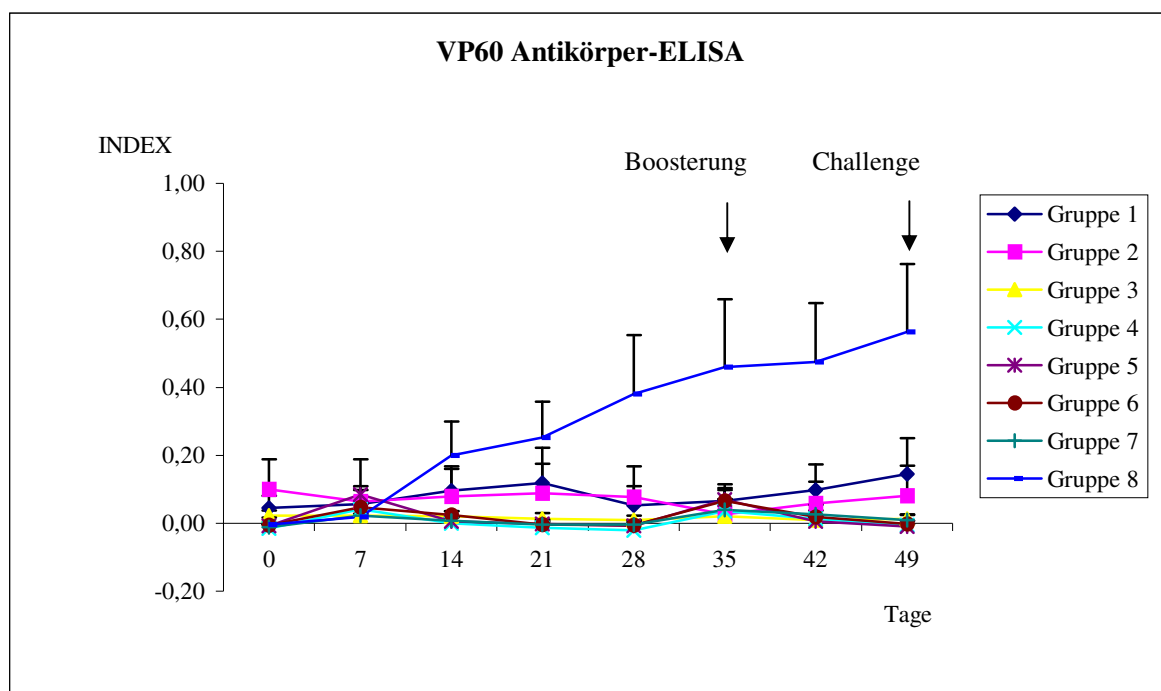


Abb. 19: Nachweis von VP60 Antikörpern im indirekten ELISA; Gruppenmittelwerte

Gruppe 1 = RBV-VP60 1,33 µg 5 Tage oral

Gruppe 2 = RBV-VP60 1,33 µg 5 Tage oral/ Boosterung

Gruppe 3 = RBV-VP60 3,33 µg 5 Tage oral

Gruppe 4 = RBV-VP60 3,33 µg 5 Tage oral/ Boosterung

Gruppe 5 = Infizierte Kaninchenleber 40 µg 5 Tage oral

Gruppe 6 = Infizierte Kaninchenleber 40 µg 5 Tage oral/ Boosterung

Gruppe 7 = PBS Puffer

Gruppe 8 = Rika-Vacc[®]

RBV-VP60 = VP60 exprimierendes rekombinantes Bakulovirus

4.3.5 Ermittlung der minimal schützenden Dosis von VP60 nach parenteraler Applikation an Kaninchen

Da in vorhergehenden Versuchen auch nach i.m. Verabreichung von pflanzengenerierten VP60 in Mengen, die denen eukaryotisch bzw. rekombinant in Bakuloviren erzeugten annähernd adäquat waren, keine Immunität induziert werden konnte, war die Frage nach der minimal notwendigen VP60 Menge, die in der Lage ist, eine Immunität beim Kaninchen auszulösen, von entscheidender Bedeutung für die Gesamtbewertung der bisher erzielten Ergebnisse und zukünftiger Verfahrensweisen. Zur Ermittlung der minimal vor RHDV Infektion schützenden Dosis, wurde Kaninchen RBV-VP60 einmalig i.m., in log 4 Stufen verdünnt, appliziert. Es wurden 6 Gruppen zu jeweils 4 Kaninchen gebildet (Tab. 17).

Gruppe	Tierzahl	Impfstoff	VP60 gesamt
1	4	RBV-VP60 uv	550 ng
2	4	RBV-VP60 1: 4	137,5 ng
3	4	RBV-VP60 1: 16	34,5 ng
4	4	RBV-VP60 1: 64	8,5 ng
5	4	Rika Vacc [®]	k.A.
6	4	Kontrolle	-

Tab. 18: Tierversuch zur Bestimmung der minimal vor RHDV schützenden Dosis.

Die serologische Kontrolle im ELISA erfolgte an den Tagen 10, 20, 32 und 45 nach der Immunisierung. Die Serokonversion ist in Abb. 21 dargestellt. Alle Tiere der Rika Vacc[®] Impfgruppe und der Gruppen 1-3 reagierten auf die Antigenapplikation mit einer deutlichen Antikörperbildung, während die der Gruppe 4 (1:64 verdünnten RBV-VP60) deutlich zurückhaltender ausfiel (Abb. 20). Am Tag 45 wurden alle Tiere mit $10^{4,5}$ LD₅₀ RHDV infiziert. Die Kaninchen der Kontrollgruppe verstarben innerhalb von 72 h nach der Challengeinfektion (6 Wochen nach Immunisierung) während die anderen Kaninchen, auch die der Gruppe 4, keine klinischen Symptome entwickelten und überlebten. Somit kann festgestellt werden, dass eine Dosis von 8,5 ng VP60, i.m. appliziert in der Lage ist eine Immunität zu induzieren.

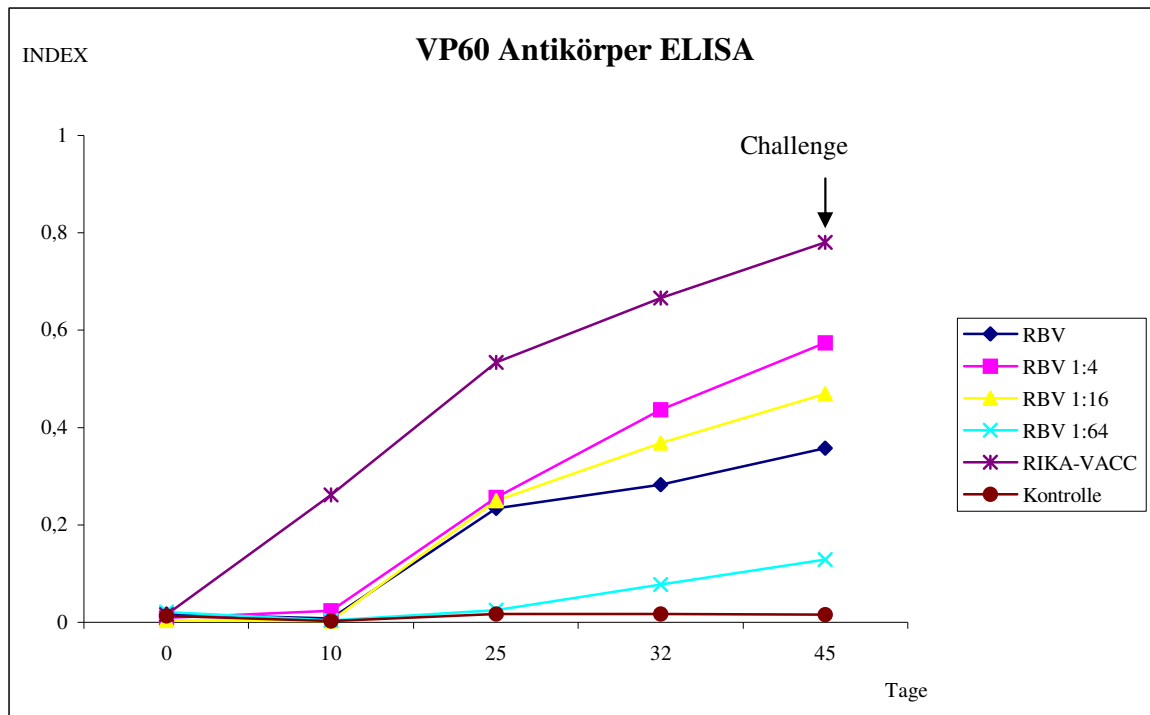


Abb. 20: Nachweis von VP60 Antikörpern im indirekten ELISA, Gruppenmittelwerte.

4.3.6 Prüfung der Immunogenität von transient in Säugerzellen exprimierten VP60

Zielstellung dieses Versuchs war die Überprüfung der Funktionalität der synthetischen Leserahmen und Ermittlung eines möglichen immunmodulatorischen Einflusses der pflanzenkodonpräferierten Gene. Dazu wurde mit synthetischen VP60 Genen transfizierte CRFK-Zellsuspension 1:1 mit ISA 206 adjuviert und 0,5 ml i.m. an Mäuse appliziert. Insgesamt 11 Gruppen zu fünf Tieren wurden für den Versuch eingesetzt (Tab. 19).

Gruppe	Tierzahl	VP60 Konstrukt	VP60 Immun./ Boost.	Immun./ Boost. n. 4 Wo	VP60 gesamt
1	4	pie_VP60 wt 2/18	3,4 ng/ 6,8 ng	0,5 ml/ T + ISA/ 0,5 ml/ T	10,2 ng
2	4	pie_VP60	137 ng/ 275 ng	0,5 ml/ T + ISA/ 0,5 ml/ T	412 ng
3	4	pie_VP60SEKDEL	137 ng/ 275 ng	0,5 ml/ T + ISA/ 0,5 ml/ T	412 ng
4	4	pie_ctxBVP60	0,27 ng/ 0,54 ng	0,5 ml/ T + ISA/ 0,5 ml/ T	0,81 ng
5	4	pie_ctxBΔsigVP60	1,75 ng/ 3,25 ng	0,5 ml/ T + ISA/ 0,5 ml/ T	5 ng
6	4	pie_ctxBVP60SEKDEL	0,375 ng/ 0,75 ng	0,5 ml/ T + ISA/ 0,5 ml/ T	1,25 ng
7	4	pie_ctxBΔsigVP60SEKDEL	2,5 ng/ 5 ng	0,5 ml/ T + ISA/ 0,5 ml/ T	7,5 ng
		Kontrolle			
8	4	Rika-Vacc®	k.A.	0,5 ml/ T	k.A.
9	4	CRFK Leerzelle	-	0,5 ml/ T + ISA/ 0,5 ml/ T	-
10	4	RBV-VP60 1:25	5 ng/ 10 ng	0,5 ml/ T + ISA/ 0,5 ml/ T	15 ng
11	4	RBV-VP60 uv	275 ng/ 550 ng	0,5 ml/ T + ISA/ 0,5 ml/ T	825 ng

Tab. 19: Tierversuch zur parenteralen Immunisierung mit transient in CRFK-Zellen exprimierten VP60 und mit Bakulovirus exprimierten VP60 (RBV-VP60 1:25 und unverdünnt).

Vier Wochen nach Versuchsbeginn wurde Serum im ELISA auf VP60 Antikörper untersucht und die Tiere mit 0,5 ml Antigen ohne Adjuvans nachimmunisiert. Zehn Tage nach der zweiten Immunisierung wurden erneut Seren auf Antikörper im ELISA untersucht. Die Gruppen 1 (pie_VP60 wt 2/ 18) und 10 (RBV-VP60 1:25), 8 (Rika Vacc[®]) und 11 (RBV-VP60) wiesen vergleichbar hohe Antikörperspiegel auf. Ebenso vergleichbar waren die Gruppen 3 (pie_VP60SEKDEL) und 7 (pie_ctxB Δ sigVP60SEKDEL) und die Gruppen 4 (pie_ctxBVP60) und 6 (pie_ctxBVP60SEKDEL). Mäuse der Gruppe 5, die mit pie_ctxB Δ sigVP60 transfizierten Zellen immunisiert wurden wiesen praktisch keinen Antikörpertiter auf (Abb. 21). Die Ergebnisse zeigen, dass trotz beträchtlicher Schwankungsbreiten und im Einzelfall nicht nachvollziehbare Unterschiede zwischen verabreichten VP60 Mengen und Stärke der Immunantwort, die Verabreichung von VP60 in Größenordnungen, die in etwa einer 1:25 verdünnten RBV-VP60 Präparation wie auch durchschnittlich in transgenen Pflanzen erreichbaren Expressionsstärken entspricht, eine Serokonversion erzielt werden konnte.

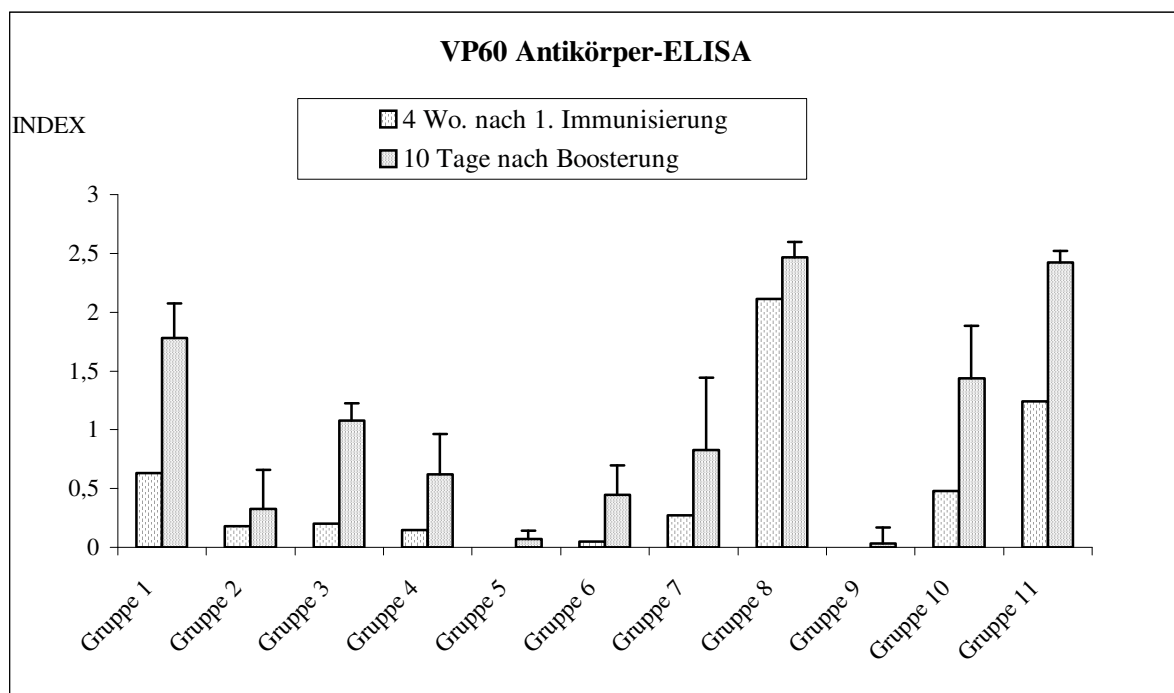


Abb. 21: Nachweis von VP60 Antikörpern im indirekten ELISA; Gruppenmittelwerte 10 d nach der 2. Immunisierung

Gruppe 1 = pie_VP60 wt 2/ 18

Gruppe 2 = pie_VP60

Gruppe 3 = pie_VP60SEKDEL

Gruppe 4 = pie_ctxBVP60

Gruppe 5 = pie_ctxB Δ sigVP60

Gruppe 6 = pie_ctxBVP60SEKDEL

Gruppe 7 = pie_ctxB Δ sigVP60SEKDEL

Gruppe 8 = Rika-Vacc[®]

Gruppe 9 = CRFK Leerzelle

Gruppe 10 = RBV-VP60 1:25

Gruppe 11 = RBV-VP60 unverdünnt

pie = piecas Plasmid, RBV-VP60 = VP60 exprimierendes rekombinantes Bakulovirus

5. Diskussion

Alle weltweit verfügbaren Impfstoffe gegen die RHD basieren auf Leberhomogenaten von experimentell mit RHDV infizierten Kaninchen. Eine effiziente Vermehrung des Virus auf Zellkulturen ist derzeit nicht möglich. Tierexperimente haben jedoch vielfach gezeigt, dass die Immunisierung mit VP60, dem Hauptstrukturprotein des RHDV, eine Immunität erzeugt. Es stellte sich daher die Frage, ob gentechnisch in Pflanzen generiertes VP60 nach oraler Applikation immunisiert und eventuell als Vakzinebasis genutzt werden kann. Durch *in vitro* Analysen transgener Pflanzen und tierexperimentellen Arbeiten am Maus- und Kaninchenmodell wurde diese Fragestellung bearbeitet.

Dazu wurde die Gensequenz von VP60 des RHDV Stammes „Eisenhüttenstadt“ in Pflanzentransformationsvektoren unter der Kontrolle des Cauliflowermosaikvirus (CaMV)-Promotors über *Agrobacterium* vermittelte Transformation transient in Tabak und später stabil in Tabak- und auch Kartoffelpflanzen der Sorte „Desirée“ integriert. Die transiente Expression in Tabak führte zu einer geringen VP60 Expression. Über Polyethylenglycol (PEG) vermittelten Transfer wurde native VP60-cDNA in Kalluszellen von Karotten transformiert, ein VP60 Expressionsprodukt jedoch nicht nachgewiesen. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen, denen mit nativer VP60-cDNA des spanischen RHDV Stammes AST/ 89 nach *Agrobacterium* vermitteltem Transfer in Kartoffelpflanzen der gleichen Sorte ein deutlicher VP60 Nachweis gelang (CASTANON et al. 1999; MARTIN-ALONSO et al. 2003). Analysen ergaben dabei bis zu 18 µg VP60/ g Frischmasse (3,5 µg VP60/mg Totalprotein) in Kartoffelknollen, bzw. 12 µg/ml Pflanzenextrakt (1,6 µg VP60/mg Totalprotein) (CASTANON et al. 1999; FERNANDEZ-FERNANDEZ et al. 2001; MARTIN-ALONSO et al. 2003). Die Sequenzunterschiede zwischen den Isolaten „Eisenhüttenstadt“ und dem spanischen Isolat „AST/ 89“ sind nur sehr gering und scheinen die Translationsunterschiede nicht zu erklären. Der genetische Code von Pflanzen ist jedoch degeneriert, so dass für einzelne Aminosäuren meistens mehrere Tripletts zur Verfügung stehen. Daher wurde für die weiteren Arbeiten die kodierende Sequenz des VP60 Gens entsprechend der pflanzlich bevorzugten Tripletts der Tabakpflanze modifiziert, um eine gesteigerte Proteinsynthese zu erreichen. Eine Steigerung der Immunogenität sollte dann zusätzlich durch die Integration der kodierenden Sequenz des oral wirksamen Adjuvans ctxB erzielt werden.

Die Herstellung Pflanzen-angepasster Leserahmen erfolgte über gekoppelte *Ligase Chain Reaction* (LCR-PCR) und ermöglichte eine schnelle DNA Synthese. An der Fusionsstelle von ctxB und VP60 traten jedoch Deletionen auf, die mit einer Vermehrung der Trägerbakterien

unvereinbar waren. Daraufhin wurden Punktmutationen eingeführt, so dass das Bakterienwachstum ermöglicht wurde. Nach Transformation der so modifizierten Zielsequenzen konnte VP60 in Tabak und Kartoffelpflanzen nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass im Tabak ein VP60 Gehalt von bis zu 2,2 µg VP60/ g Frischmasse erzielt werden konnte.

In einer Arbeit über die partielle Modifikation der DNA des Insekten-Kontrollgens (*cyrIA*) von *Bacillus thuringiensis* an die pflanzen-typische Polyadenylierung, konnte nach *Agrobacterium* vermittelter Transformation in Tabak und Tomaten eine 10-fach, durch komplette Adaption eine 100-fach höhere Proteinausbeute des Genprodukts gemessen werden (PERLAK et al. 1991). Es konnte zudem festgestellt werden, dass die Sequenz durch Adaptation an den pflanzlichen Kodongebrauch nur zu etwa 3 % verändert wurde. Auch selten durch die Pflanze verwendete Kodone führen wahrscheinlich nicht primär zu niedrigen Mengen rekombinanten Proteins. Die Höhe der mRNA korreliert ebenso nicht unbedingt mit der Höhe der Proteinexpression, so dass anzunehmen ist, dass durch die Pflanze bevorzugte Kodone eher die Translationseffizienz verbessern. Durch Anpassung der genkodierenden Sequenz des Kern-neutralisierenden Epitops des Porcinen Epidemischen Diarrhoe Virus (PEDV) an die Kodonnutzung des Tabaks konnte eine 30-fach höhere Expression erreicht werden, was ca. 5 % des gesamtlöslichen Proteins entsprach (KANG et al. 2004).

Die Ursache niedriger Genexpression scheint somit eher in der Translation, als in der Akkumulation des Proteins in Organellen der Zelle zu liegen. Peptidsignale wie SEKDEL bewirken eine Verzögerung des Transfers sekretorischer Proteine vom ER in den Golgi Apparat, insbesondere nach Fusion mit dem Zielprotein (ZAGOURAS und ROSE, 1989). Eine erhöhte Stabilität des rekombinanten Proteins konnte hierdurch erreicht werden (FAYE et al. 2005). Die C-terminale Fusion des ER-Retentionssignals SEKDEL (Ser-Glu-Lys-Asp-Glu-Leu) an VP60 sollte eine Rückhaltung und damit eine Anreicherung der exprimierten Proteine im ER bewirken. Kartoffelknollen der Sorte „Desirée“ (VP60SEKDEL), die für Fütterungsversuche an Kaninchen verwendet wurden, enthielten etwa 55 ng VP60/ g Frischmasse. Dieser beträchtliche Unterschied in der Expression des Kapsidproteins gegenüber tabakexprimierten VP60 ist wahrscheinlich neben pflanzenspezifisch verschiedenen hoher Expressionsraten auch auf den schwierigeren Aufschluss der Kartoffelknollen gegenüber dem Tabak zurückzuführen.

Nicht ER-gängige Proteine, wie VP60SEKDEL, *ctxB*ΔsigVP60 und *ctxB*ΔsigVP60SEKDEL dienten als strukturelle Kontrolle der Konstrukte, um zu überprüfen, welchen Einfluss das ER als Expressionsort gegenüber der ribosomalen zytoplasmatischen Proteinsynthese hat, bzw.

überhaupt ein Unterschied festzustellen ist. Für das Fusionsprotein ctxBVP60 wurde beispielsweise gezeigt, dass erst durch die SEKDEL vermittelte Retention Protein in messbarer Größenordnung nachweisbar war, was auf Akkumulation im Endoplasmatischen Retikulum und wahrscheinlich unveränderte Proteinstruktur hindeutet. Ob die N-terminale Fusion von ctxB Auswirkungen auf die Struktur und damit auf die Immunogenität hat, da bisher nur die C-terminale Fusion beschrieben wurde, ist nicht untersucht.

C-terminal an die Proteinsequenz ergänztes SEKDEL resultierte in Affenzellen in einer sechsfachen Verzögerung des Proteintransportes zwischen Endoplasmatischen Retikulum und Golgi Apparat (ZAGOURAS und ROSE, 1989).

Huang et al. (2001) testeten drei verschiedene Expressionskonstrukte des Masernvirus-Hämagglutinins in Pflanzen. SEKDEL gekoppelte Konstrukte erzeugten die höchste Proteinausbeute. Intraperitoneal, wie auch über eine Magensonde appliziert konnten in Mäuseseren spezifische Antikörper nachgewiesen werden (HUANG et al. 2001). Durch SEKDEL wurde kein negativer Einfluss auf die Immunogenität des synthetischen Proteins festgestellt. Das SEKDEL-vermittelte ER-Retention nicht uneingeschränkte Gültigkeit für jedes exprimierte Protein hat, zeigt sich in der fehlenden Akkumulation von rekombinanten pentameren ctxB in Tomatenpflanzen (JANI et al. 2002).

Auf der Suche nach einem möglichst effektiv exprimierten immunogenen Antigen wurden weitere, jeweils in Synthese und Proteinspeicherung verschiedene Konstrukte konzipiert (Fusion von ctxB mit/ohne Signalpeptid für das ER (sig/ Δ sig) und mit/ohne SEKDEL), die unter der Kontrolle eines konstitutiven Blumenkohlmosaikvirus (CaMV) Promotors pS durch *Agrobacterium*-vermittelte Transformation hergestellt wurden.

Die von Castanon et al. (1999) durchgeführten Untersuchungen ergaben, dass die Verwendung von modifizierten Blumenkohlmosaikvirus-Promotoren (double-enhancer CaMV 35S) die VP60-Expression, im Vergleich zu unmodifizierten CaMV Promotoren, verdreifachte und sich VP60 mit monoklonalen VP60-Antikörpern nachweisen ließ. Der in diesem Fall gezogene Schluss, dass rekombinant exprimiertes VP60 keiner posttranslationalen Modifikation unterzogen wird, kann unter dem Gesichtspunkt des Nachweises mittels monoklonaler VP60 Antikörper entsprochen werden. Zumindest werden relevante Bereiche nicht verändert, so dass eine Bindung zwischen Epitop und Antikörper stattfinden kann. Dies scheint jedoch nur eingeschränkt für ctxB konjugiertes VP60 zu gelten, da hier kein Antigennachweis über Antikörper stattfand, welches aber auch auf eine zu geringe Konzentration des Proteins zurückgeführt werden kann.

Die Expression chimärer ctxBVP60 Proteine erfolgte in Tabakpflanzen und Kartoffeln der Sorte „Albatros“. Der Wechsel der Kartoffelsorte sollte eine verbesserte Expression bewirken, da „Albatros“ bessere Feldeigenschaften als „Desirée“ besitzt. Nicht ganz unerheblich war auch die Entscheidung der Firma „Norika“ eine firmeneigene Kartoffelsorte einzusetzen. Ohne ctxB Signalpeptid (Δ sig) erfolgte kein Eintritt in das Endoplasmatische Retikulum. Das Retentionssignal SEKDEL diente der Kontrolle der strukturellen Integrität, bei Konstrukten ohne Signalpeptid. In Tabak, transformiert mit ctxB Δ sigVP60 und ctxB Δ sigVP60SEKDEL, wurde weniger Protein als bei VP60 ohne ctxB gemessen. Knapp oberhalb der Nachweisgrenze konnte im Endoplasmatischen Retikulum akkumuliertes ctxBVP60SEKDEL gemessen werden. In Kartoffelknollen der Sorte „Albatros“ konnte zusätzlich im Endoplasmatischen Retikulum gespeichertes VP60 (ctxBVP60SEKDEL) nur in sehr geringen Konzentrationen gemessen werden. VP60 im Zytosol (ctxB Δ sigVP60) konnte im Blatt, nicht aber in der Knolle nachgewiesen werden. Konstrukte mit ctxB Signalpeptid passierten anders als VP60, oder Signalpeptid-deletierte Konstrukte, das Endoplasmatische Retikulum, bzw. wurden verzögert aus diesem Kompartiment, SEKDEL bedingt, entlassen. Es stellt sich daher die Frage, ob die Fusion dieser beiden Proteine bereits Konsequenzen in der Transkription und/ oder nachfolgend in der Translation erfahren hat. Eine gegenseitige Beeinflussung der beiden Proteine ist ebenso nicht auszuschließen.

Durch den Einsatz des konstitutiven Promotors in Verbindung mit dem synthetischen VP60 Konstrukt konnten im ELISA, mit Bakulovirus exprimierten VP60 vergleichbare Proteinmengen, gemessen werden. Der Wahl des Promotors spielt eine große Rolle, so konnte mit modifizierten CaMV35S Promotoren eine deutliche Steigerung in der VP60 Synthese erzielt werden (CASTANON et al. 2002). Allerdings lassen sich auch gegenteilige Angaben zur Eignung dieser Promotoren zur Expression von Proteinen in Pflanzen finden (SIJMONS et al. 1990; CRAMER et al. 1996). Durch die Fusion mit ctxB wurde deutlich weniger Protein durch die Tabakpflanze gebildet. Dieser Trend konnte auch bei der Kartoffel, unabhängig von der Sorte beobachtet werden. Dies lässt den Schluss zu, dass chimäres ctxB-VP60 Protein in geringerem Umfang als VP60 ohne weiteren Fusionspartner translatiert wird. Allein in Tomaten exprimiertes ctxB konnte im Widerspruch dazu als funktionelles GM₁ Rezeptor bindendes Pentamer exprimiert werden (JANI et al. 2002). Möglicherweise sind auch Ursachen in der pflanzlichen Proteinsynthese zu finden, da chimäres in *E.coli* exprimiertes *Helicobacter pylori*-Adhesin-ctxB, bzw. Adhesin-ctxA2/B nachgewiesen werden konnte (KIM et al. 2001).

In Kartoffeln der Sorten „Desireé“ und „Albatros“ wurde in Blattmaterial mehr VP60 als in den Knollen festgestellt. In den grünen Pflanzenteilen der Sorte „Desireé“ wurde insgesamt mehr VP60 als in der Sorte „Albatros“ gemessen. In Knollen der Sorte „Desireé“ wurde weniger VP60 als im Blattmaterial nachgewiesen, bei „Albatros“ war dagegen die VP60 Expression in Blattmaterial und Knolle vergleichbar hoch. Die Expression eines Fremdproteins, wie VP60 in Blatt- und Knollenmaterial mit gleichen Promotoren ist wenig untersucht worden. Mit konstitutiven Promotoren konnte aber auch in Kartoffelknollen VP60 exprimiert werden (MARTIN-ALONSO et al. 2003), in etwa vergleichbarer Quantität wie in Kartoffelblättern (CASTANON et al. 1999). In der Wurzelrübe der Karottensorte „Rotin“, Linie 9 war VP60 in gleicher Konzentration wie in „Albatros“ vorhanden. Somit sind nicht nur bei den verschiedenen Pflanzenarten, sondern auch bei unterschiedlichen Sorten einer Art erhebliche Unterschiede in der Proteinexpression zu erkennen. Unterschiedliche Feldeigenschaften wie Frohwüchsigkeit und Proteinspeicherkapazität, scheinen in diesem Punkt entscheidende Faktoren zu sein.

Weiterhin kam ein knollenspezifisch-aktiver Promotor des Patatingens (pGBSS = granule bound starch synthetase) in Kartoffelpflanzen zum Einsatz, um die große Knollenbiomasse optimal auszunutzen und eventuelle Entwicklungs- und Wachstumsbeeinträchtigung transgener Kartoffelpflanzen, wie sie nach Integration von Fremdgenen auftreten kann, vermindert werden, da die Expression rekombinanten Proteins erst zum Knollenwachstum einsetzt.

Über den knollenspezifisch aktiven Promotor pGBSS vermittelte Expression von VP60 (VP60, ctxBVP60, ctxB Δ sigVP60) konnte nicht nachgewiesen werden.

Nicht regelgerechtes Spleißen, Polyadenylierung, nukleärer Transport oder Instabilität der zytosolischen mRNA kann sich in der nur geringen Akkumulation von mRNA und dem daraus resultierenden Protein darstellen. Viele Proteine benötigen schrittweise Faltung mit nachfolgender Prozessierung der gefalteten Strukturen, um aktives Protein darzustellen. Findet dieser Prozess nicht statt, kann dies in Inaktivität, Instabilität und schneller Degeneration des Proteins resultieren (KOZIEL et al. 1996). Die in der pflanzlichen Zelle im sekretorischen Weg und ubiquitär vorkommenden Proteasen stellen jedoch auch eine große Hürde für die effiziente Produktion von rekombinanten Proteinen dar. Neben der Expressionsrate ist auch die Stabilität des resultierenden Proteins während des gesamten Expressions- und Speicherungsprozesses, wie in anderen heterologen Expressionssystemen auch, entscheidend für die Menge rekombinanten Proteins. Proteasen aus verschiedenen Kompartimenten, v.a. vakuoläre Proteasen haben großen Einfluss auf die Stabilität des

Fremdproteins. Die pflanzenspezifischen postranslationalen Modifikationen, insbesondere die Glykosylierung, unterscheidet sich von der in Säugerzellen und kann zu entscheidenden Strukturänderungen geführt haben (GIDDINGS et al. 2000; MARQUET-BLOUIN et al. 2003).

Geringer Nachweis von Protein könnte neben einer unzureichenden Synthese auch auf fehlerhafte Faltung und den damit verbundenen Verlust der biologischen Aktivität zusammenhängen. Jedes Protein faltet sich, vorgegeben durch die Aminosäuresequenz, mit dem geringsten Energieaufwand in der Regel nur in einer einzigen stabilen Konformation. Dieser kann sich jedoch ändern, wenn Wechselwirkungen mit anderen zellulären Molekülen auftreten. Diese Abweichung kann die Funktion eines Proteins maßgeblich beeinflussen (ALBERTS et al. 2004). Bereits geringe Veränderungen in der Primärstruktur können so zum Verlust der eigentlichen Faltung und damit zum Funktionsverlust führen. Fehlerhaft gefaltetes Protein führt im Zytosol zur Auslösung einer Hitzeschockreaktion, die eine gesteigerte Expression von zytosolischen Hitzeschockproteinen (Chaperonen) nach sich zieht, die diese Proteine in eine korrekte Konformation überführen. Eine Akkumulation fehlgefalteter Proteine im Endoplasmatischen Retikulum ist der Auslöser erhöhter Transkription von Genen für ER-Chaperone und Enzyme, die am Proteinabbau im ER beteiligt sind (ALBERTS et al. 2004). Es ist möglich, dass eine negativ auf die Expressionshöhe auswirkende gegenseitige Beeinflussung zwischen VP60 und ctxB bestand.

In einer Studie über die Charakterisierung der Struktur von rekombinanten ctxB-Chimären wurden Unterschiede zu nativem ctxB gefunden. Der Einfluss der Lokalisation und Größe des ctxB Fusionspartners, auf die physikalischen und biologischen Eigenschaften von ctxB, in Bezug auf Immunogenität des chimären Proteins sind nicht genau bekannt (DERTZBAUGH und ELSON, 1993).

VP60 wurde in unterschiedlicher Quantität von 0,055 µg aus transgenen Tabak bis zu 5,3 mg über die Verfütterung von lyophilisierter Kartoffel in pelletierter Form pro Tier verabreicht. Pflanzenextrakte aus Tabak und Kartoffeln wurden mit dem Adjuvans ISA 206 versetzt und parenteral an Kaninchen und Mäuse appliziert. Dabei konnte jedoch weder nach oraler noch nach parenteraler Applikation einer Serokonversion von Mäusen und Kaninchen nachgewiesen werden. Es bestand keine Immunität gegen RHDV bei Kaninchen. Dies steht im Widerspruch zu experimentellen Untersuchungen mit rekombinanten, pflanzenexprimierten VP60 anderer Arbeitsgruppen. So konnte nach subkutaner und folgender dreimaliger intramuskulärer Applikation von jeweils 12 µg rekombinanten,

kartoffel-exprimierten VP60 die Bildung spezifische VP60 Antikörper und Immunität bei Kaninchen erzielt werden. Durch die geringe Anzahl der Versuchstiere (zwei Kaninchen) sind diese Ergebnisse statistisch allerdings nur von geringem Wert (CASTANON et al. 1999). Nach subkutaner Applikation von rekombinanten, tabak-exprimierten VP60 an Kaninchen konnte neben der Serokonversion protektive Immunität gegen RHDV erreicht werden (FERNANDEZ-FERNANDEZ et al. 2001). Nach fünfmaliger oraler Verabreichung von konzentriertem Kartoffelknollenmaterial in Mengen von 100 µg bzw. 500 µg VP60 je Applikation an jeweils fünf Kaninchen konnte eine Antikörperbildung bei vier Tieren der 500 µg Gruppe festgestellt werden (MARTIN-ALONSO et al. 2003). Allerdings überlebte nur ein Tier die RHDV-Belastungsinfektion.

In einer Studie über die Wirksamkeit oral applizierter pflanzen-exprimierter Proteine war das Oberflächenantigen des Hepatitis B Virus (HBVsAg) immunogen und eine Serokonversion erfolgte im Gegensatz zu anderen Proteinen, wie dem Puumala virus nucleocapsid protein (PUUVN) und dem VP60 des RHDV. Diskutiert wird, dass die beiden letztgenannten Proteine möglicherweise sensitiv gegenüber gastrointestinalen Enzymen, wie Trypsin und Pepsin sein könnten, während das HBVsAg keine Schnittstellen für diese Enzyme hatte und somit effektiver die immunologisch relevanten Lymphzentren im Darm erreichen kann. (KHATTAK et al. 2004). Diese Aussagen sind jedoch nicht konform mit den Ergebnissen von Martin-Alonso et al. (2003), die eine spezifische Immunreaktion in Form einer Serokonversion durch orale Applikation von transgenen VP60-haltigen Kartoffelmaterial erreichten und müssen daher kritisch betrachtet werden.

Eine zu niedrige Expression des RHDV Kapsidproteins VP60 in den transgenen Pflanzen als Ursachen für geringe Immunogenität wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen vermutet (CASTANON et al. 2002). Die Ergebnisse der Tierversuche entsprechen dieser Aussage jedoch nur bedingt, da das CRFK-exprimierte VP60 im Gegensatz zu Tabak- und Kartoffel-exprimierten VP60 sogar bei viel geringerer Dosis immunogen war. Diese Ergebnisse bestätigen, dass neben der VP60 Dosis (CASTANON et al. 2002), vielmehr der Struktur des pflanzen-exprimierten Fremdproteins eine entscheidende Rolle für die Antigenität zukommt.

Viele der wie das VP60 löslichen Proteine wirken, oral aufgenommen, nur schwach immunogen und induzieren ohne geeignetes Adjuvans orale Toleranz (WILLIAMSON et al. 1999). Besonders oral verabreichtes pflanzen-exprimiertes Antigen, welches die gleiche Route wie Futterprotein nimmt, läuft Gefahr, mit hoher Wahrscheinlichkeit Toleranz anstelle von spezifischer Immunität zu erzeugen (MOWAT, 2005). Durch die Zuhilfenahme eines schleimhautwirksamen Adjuvans kann über die Induktion einer Entzündungsreaktion die

Gefahr der oralen Toleranz auf das zugeführte Protein erheblich vermindert werden. Durch die Fütterung von Cholera-toxin wird ebenso Toleranz gegen gleichzeitig oral aufgenommene lösliche Antigene verhindert (WILLIAMSON et al. 1999). Abweichend davon wurde die Funktion von rekombinanten ctxB als mukosales Adjuvans diskutiert und die enzymatisch aktive Untereinheit A des Cholera-toxins für die orale Adjuvanswirkung verantwortlich gemacht (FREYTAG und CLEMENTS, 2005). Kim et al. (2004) fusionierten das Gen der ctxB Untereinheit an ein regulatorisches Protein eines Simian Immundefizienzvirus und zeigten, dass ctxB als Fusionsprotein in Kartoffelpflanzen nachweisbar war (KIM et al. 2004). Durch Choi et al. (2005) konnten diese Ergebnisse mit einem anderen Fusionspartner, einem Rotavirusprotein (VP7), bestätigt werden und biologisch aktive ctxB Pentamere nachgewiesen werden (CHOI et al. 2005). In unseren Untersuchungen zeigte die Fusion von ctxB mit VP60 jedoch keinen Einfluss auf die Immunogenität von VP60. Pflanzenexprimiertes chimäres ctxB-VP60 Protein konnte zudem im Western Blot nicht dargestellt werden. Die insgesamt niedrigere Expression im Vergleich zu den VP60, bzw. VP60SEKDEL Proteinen könnte auf strukturelle und damit funktionelle Veränderungen infolge der Fusion ctxB-VP60 zurückzuführen sein. Bereits DERZBAUGH und ELSON (1993) weisen darauf hin, dass Diskrepanzen bei der Anwendung von ctxB als Adjuvans auf eine Reihe von Faktoren zurückgeführt werden können, wie die Dosis, die Konjugation an das Antigen und die Art des verwendeten Antigens. So war z.B. die Immunogenität erhöht, wenn ctxB an das Antigen konjugiert war, statt nur zugemischt.

Mit der Herstellung rekombinanter transient VP60 exprimierender CRFK Zellen sollte der Frage nachgegangen werden, ob die für die Expression in Pflanzen erforderlichen Veränderungen auch in Säugerzellen zur Expression von immunogenen Proteinen führt.

Es zeigte sich dabei, dass die eigentlich für Tabakpflanzen adaptierte Sequenz des VP60, gefolgt von VP60SEKDEL am stärksten exprimiert wurde und nicht die VP60 wt-Sequenz. Biemelt et al. (2003) beobachteten diesen Effekt bei dem Hauptkapsidprotein (L1) des humanen Papillomvirus (HPV-16), dessen pflanzenadaptierter Leserahmen im Vergleich zu unmodifizierten Leserahmen in Säugerzellen vermehrt exprimiert wurde und vermuteten als Grund dafür einen pflanzenspezifischen erhöhten Durchsatz der mRNA (BIEMELT et al. 2003).

Die chimären ctxB-VP60 Proteine ctxB Δ sigVP60SEKDEL, ctxB Δ sigVP60, ctxBVP60SEKDEL und ctxBVP60 wurden in deutlich geringerem Ausmaß als VP60 und VP60SEKDEL von CRFK-Zellen exprimiert. Dies wird dadurch bestätigt, dass die

Konstrukte, ohne Signalpeptid für das Endoplasmatische Retikulum, also nur ribosomal translatiert, eine höhere Expression aufwiesen. Der Nachweis dieser Proteine im Western Blot lässt auf die Existenz von VP60, bzw. ctxB spezifischen Epitopen schließen.

Die orale Applikation von gereinigtem VP60 (200-240 µg VP60), rekombinant exprimiert in RBV, und inaktiviertem RHDV aus Leberhomogenat (6,65-20 µg VP60) führte nach mehrmaliger Verabreichung nicht zu messbaren VP60 spezifischen Antikörpertitern und folglich nicht zur Immunität. Dagegen serokonvertierten einmalig intramuskulär mit RBV-VP60 (pro Tier 8,5-550 ng VP60) immunisierte Kaninchen und waren gegen die RHDV-Belastungsinfektion geschützt. Das zeigt, dass oralen Verabreichung inaktiverter Antigene im Hinblick auf die Induktion protektiver Immunität auch bei hohen Antigengaben Grenzen gesetzt zu sein scheinen. Andererseits waren in den Untersuchung von PLANA-DURAN et al. (1996) Kaninchen nach zweimaliger oraler Applikation von 3 µg VP60 bakulovirusexprimierten VP60 immun.

In unseren Untersuchungen konnte in Immunisierungsstudien an Mäusen mit transient in CRFK exprimierten VP60 gezeigt werden, dass in eukaryotischen Zellen exprimiertes, an die pflanzliche Kodonnutzung adaptiertes VP60 nach einmaliger i.m. Gabe immunogen ist. Diese Untersuchungen wurden durchgeführt um auszuschließen, dass die Anpassung an das pflanzliche *codon usage* Ursache für die fehlende Immunogenität des in Pflanzen produzierten VP60 war. Dazu wurden Mäusen verschiedener Gruppen je Tier die gleiche Menge Zell-Puffer-Lösung injiziert, welche aber bedingt durch die unterschiedliche Expressionshöhe unterschiedliche Antigenmengen enthielt. Während 0,81 ng ctxBVP60, immunogen waren, trat dieser Effekt bei 5 ng ctxBΔsigVP60 nicht auf. Bemerkenswert waren die deutlichen Unterschiede zwischen VP60 2/18 wt (10,2 ng VP60) und VP60 (412 ng VP60). Vom Wildtyp abgeleitetes Protein, trotz einer 40-fach niedrigeren Antigenmenge, rief eine bedeutend stärkere Immunantwort hervor, als das von der synthetischen, pflanzenadaptierten Sequenz translatierte VP60. Durch VP60SEKDEL konnte mit einer Dosis von 412 ng eine deutlich stärkere Immunität als durch 412 ng VP60 induziert werden. Dies ist interessant, da das VP60SEKDEL, genau wie VP60 ribosomal synthetisiert wurde, also keine Modifikation des Proteins im Endoplasmatischen Retikulum stattgefunden haben kann.

Die Expression von Impfstoffen in Pflanzen erlaubt eine kostengünstige Herstellung, vorausgesetzt, dass diese Pflanzen direkt, d.h. ohne Aufreinigung des gewünschten Wirkstoffs, als Vakzine eingesetzt werden können. Im Ergebnis unserer Experimente lässt

sich jedoch feststellen, dass auch die hier vollzogenen neuen Ansätze der Integration von zellspezifischen Signalen und der Fusion von VP60 mit dem Adjuvans nicht zur ausreichenden Antigenität von pflanzenexprimierten VP60 führten. Daher war es mit den in diesem Projekt verwendeten Konstrukten nicht möglich, immunogenes VP60 herzustellen. Folglich war keine wirksame Immunisierung von Kaninchen möglich.

Die bisher erfolgten Versuche mit *edible vaccines* Immunisierungen durchzuführen gestalten sich schwieriger als erwartet, da das Zusammenspiel einer Vielzahl von Faktoren, wie gewählte Pflanzenart, Konstruktion des Antigens, Promotor, Gewinnung, Applikationsart und -form, beträchtliche individuelle Unterschiede aufweisen und stets neu im Experiment gefunden werden müssen.

Der ursprüngliche Gedanke, „*edible*“ - essbare - Vakzine in Form intakter, verzehrbare Pflanzen einsetzen zu können, dürfte jedoch nicht kurzfristig realisierbar sein. Gründe dafür sind bisher zu niedrige Ausbeute von Antigen in den Pflanzen, die eine teure und aufwendige Konzentrierung über Gefriertrocknung notwendig machen und damit das wichtigste Argument, die kostengünstige Produktion solcher Pflanzen, zunichte machen. Letztlich stoßen besonders in Deutschland Projekte zu Feldversuchen mit gentechnisch manipulierten Pflanzen unabhängig von der Rechtslage auf Widerstand in der Öffentlichkeit.

6. Zusammenfassung

Expression des Hauptstrukturproteins des Rabbit Haemorrhagic Disease Virus in transgenen Pflanzen: Untersuchungen zur Antigenität und Immunogenität

Martin Hammer

In der vorliegenden Arbeit werden anteilige Ergebnisse aus einem Verbundprojekt mehrerer Partner über die „Nachhaltige Produktion von Impfstoffen gegen virale Krankheitserreger in transgenen Pflanzen“ vorgestellt. Das Ziel bestand darin, den für das Kapsidprotein (VP60) des *Rabbit Haemorrhagic Disease Virus* (RHDV) kodierenden Genabschnitt in Pflanzen zu übertragen, um auf diese Weise Pflanzen zu generieren, die das VP60 exprimieren und für Immunisierungsversuche eingesetzt werden können. Das RHDV, ein Vertreter aus der Familie der *Caliciviridae* führt zu schweren, meist letal verlaufenden Erkrankungen bei Haus- und Wildkaninchen. Eingesetzte Impfstoffe basieren auf Leberhomogenaten infizierter Kaninchen, gentechnisch hergestellte Subunitvakzine sind im Experiment erprobt, jedoch nicht bis zur kommerziellen Reife entwickelt. Die Produktion immunogener Proteine über Pflanzen stellt eine mögliche alternative Lösung dar. Die Expression des VP60 über transgene Pflanzen hat somit Modellcharakter für die Herstellung von Immunogenen aus nachwachsenden Rohstoffen, trägt im konkreten Fall zudem den Erfordernissen des Tierschutzes Rechnung (Ablösung der Impfstoffherstellung am Tier) und ist wegen der Spezifik des gewählten Modells (Vorhandensein von nur einem protektiven Protein, etabliertes Prüfmodell) von allgemeiner Aussagekraft.

Der Schwerpunkt der Untersuchungen lag auf der Analyse der Translationsprodukte von Pflanzen (Tabak *Nicotina tabacum*, Kartoffel *Solanum tuberosum* und Karotte *Daucus carota*). Insgesamt wurden 69 Tabaklinien von sechs Konstrukten, 193 Kartoffellinien von sieben Konstrukten und 19 Karottelinien von einem Konstrukt in die Analysen einbezogen.

Die erhaltenen Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Prinzipiell gelang es, in Tabak, Kartoffeln und Karotten, das Kapsidprotein des RHDV in nachweisbaren Mengen (ELISA, Western Blot) zu exprimieren.
- Erst durch die Anpassung der gewählten synthetischen Leserahmen an die pflanzliche Kodonpräferenz gelang der Antigennachweis im ELISA.
- Die Konstruktion von ctxB_VP60 Fusionsproteinen ergab eine geringere Syntheserate als ohne ctxB (VP60, VP60SEKDEL).

- Sowohl Pflanzenart als auch -sorte haben Einfluss auf die Expressionshöhe. Tabak und Kartoffeln der Sorte „Desireé“ wiesen insgesamt höhere Expression an VP60 auf als Kartoffeln der Sorte „Albatros“, ebenso wie Karotten der Sorte „Rotin“ besser exprimierten als „Rote Riesen“.

Ausgewählte Pflanzen wurden in Tierversuchen auf ihre immunogene Wirkung nach parenteraler und oraler Verabreichung an Mäuse und Kaninchen untersucht. Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- Mit keiner der eingesetzten Pflanzen, unabhängig von der Menge und Verabreichungsform, konnte eine spezifische Immunantwort erzielt werden.
- Gegen eine experimentelle RHDV Infektion bei Kaninchen konnte kein Schutz erreicht werden.

Eine orale Verabreichung, auch großer Mengen aus inaktiviertem Lebermaterial bzw. durch Bakulovirusexpression generierten VP60 an Kaninchen führte zu keinem Schutz vor einer experimentellen RHDV Infektion, was die limitierten Möglichkeiten einer oralen Immunisierung mit inaktivierten Antigenen unterstreicht.

Nach parenteraler Immunisierung mit VP60 aus Bakuloviren wurde die minimal schützende Dosis mit 8,6 ng VP60/Impfdosis bestimmt, während 450 ng VP60/ Impfdosis aus transgener Kartoffel nicht protektiv wirkte.

Die Wildtyp (wt) und pflanzenadaptierte VP60-Leserahmen, unter der Kontrolle des Promotors (pie) des murinen Zytomegalievirus (MCMV), wurden in Säugerzellen (CRFK) zur transienten Expression des Kapsidproteins verwendet. Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Die Expression von RHDV Kapsidprotein ist durch Wildtyp- und pflanzenadaptierte Leserahmen in Säugerzellen (CRFK) möglich.
- Es konnte in der Expressionshöhe eine Präferenz der zytoplasmatisch exprimierten VP60 Konstrukte (VP60 wt 2/18, VP60, VP60SEKDEL) gegenüber den ctxB-VP60 Fusionsproteinen festgestellt werden.
- Nach parenteraler Applikation VP60 enthaltender transgener Zellsuspension konnte eine spezifische Immunantwort beobachtet werden, die jedoch nicht mit der Menge applizierten Antigens korrelierte.

Dies zeigt, dass neben quantitativen, vor allem qualitative Eigenschaften, wie der physikochemische Zustand des Antigens für die Erzeugung einer Immunität von Bedeutung sind.

7. Summary

Expression of the capsid protein of the Rabbit Haemorrhagic Disease Virus in transgen plants: antigenicity and immunogenicity

Martin Hammer

The project *Sustainable Production of Vaccines Against Viral Pathogens Using Transgenic Plants* is described. The gene coding sequence of Rabbit Haemorrhagic Disease Virus (RHDV) capsid protein (VP60) was used to generate VP60 expressing plants for immunization tests. Rabbit Haemorrhagic Disease Virus (RHDV) is a calicivirus that induces severe symptoms in rabbits and is associated with a high mortality rate. Vaccines offer protection but liver material from experimentally RHDV infected rabbits is necessary for vaccine production. Genetically engineered subunit vaccines are showed to be effective but are not market-ready. The production of VP60 expressing plants could serve as an alternative solution and offer animal welfare advantages (elimination of vaccine production in animals).

The main focus of this project was the analysis of translation products expressed in the plants *Nicotina tabacum* (tobacco), *Solanum tuberosum* (potato) and *Daucus carota* (carrot). The effect of plant adapted VP60 codon usage was examined. Multiple VP60 constructs containing the Endoplasmic Reticulum Retention Signal (SEKDEL), the mucosal adjuvants Cholera toxin Subunit B (ctxB) and ctxB VP60 fusion proteins with and without the secretoric pathway supporting signal peptide (sig) were created and analysed. These constructs were under control of the Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) promoter (35S); selected constructs under control of the Granule Bound Starch Synthetase (GBSS) promoter were also implemented with capsid protein expression concentrated in potato tubers. Sixty-nine tobacco lines including 6 different constructs, 193 potato lines including 7 different constructs and 19 carrot lines including one construct were analysed. The results showed that

- expression of RHDV capsid protein VP60 in detectable level (ELISA, Western Bot) is possible in tobacco, potato and carrot plants.
- construction of plant adapted VP60 codon usage revealed a much stronger protein expression compared to the unmodified VP60 open reading frame.
- lower protein expression levels were found in ctxB_VP60 constructs compared to constructs containing ctxB (VP60, VP60SEKDEL).

- expression was dependent on plant type and variety. Potatoes of the variety *Desirée* and tobacco revealed higher VP60 protein expression levels compared to the potato variety *Albatross*. Carrots of the variety *Rotin* showed increased expression compared to the variety *Rote Riesen*.

Rabbits and mice were immunized orally and parenterally with material of selected plants. No plant, regardless of construct, formulation and quantity was shown to be immunogenic. Protection could not be achieved against a challenge infection with RHDV.

Oral administration of inactivated RHDV-positive liver material and Baculovirus expressed VP60 did not confer protection against RHDV challenge infection in rabbits.

Parenteral administration of 8,6 ng Baculovirus vaccine (expressed via VP60) per immunization dose was shown to be protective against RHDV, while 450 ng plant vaccine (expressed via VP60) per immunization dose was not shown to afford immunity.

The unmodified and synthetic VP60 open reading frames under control of the Murine Cytomegaly Virus (MCMV) promoter (pie) were expressed transient in mammalian cell lines, namely Crandle Renal Kidney Cells (CRFK).

- The expression of RHDV capsid protein VP60 in CRFK cells is possible with wild-type and synthetic VP60 constructs.
- Cytoplasmic VP60 products (VP60 wt, VP60, VP60SEKDEL) revealed higher expression levels compared to ctxB_VP60 fusion proteins.
- Parenteral application of transgenic cell suspension showed a specific immune reaction dependent on the applied VP60 quantity.

In addition to antigen quantity, qualitative antigenic properties such as the physical and chemical conditions of the antigen are important for conferring immunity. Attempts to achieve immunity with plant derived antigens were more difficult than anticipated. Many factors such as plant type, antigen construct, promoter, harvest method and application route influence immunity.

8. Literaturverzeichnis

- ALBERTS, B., A. JOHNSON, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS und P. WALTER (2004): Molekularbiologie der Zelle.
- ANON. (2004): OIE Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals. **5th Edition**
- ARGUELLO VILLARES J.L. (1991) Viral haemorrhagic disease of rabbits: vaccination and immune response. *Rev.Sci.Tech.* **10**, 459-480.
- ARNTZEN C., PLOTKIN S. & DODET B. (2005) Plant-derived vaccines and antibodies: potential and limitations. *Vaccine* **23**, 1753-1756.
- BARBIERI, I., A. LAVAZZA, E. BROCCHI, M. KONIG und L. CAPUCCI (1997): Morphological, structural and antigenic modifications of rabbit haemorrhagic disease virus in the course of the disease. *Proceedings of the 1th Symposium on Calicivirus of the European Society of Veterinary Virology* , 182-193
- BARCENA J., MORALES M., VAZQUEZ B., BOGA J.A., PARRA F., LUCIENTES J., PAGES-MANTE A., SANCHEZ-VIZCAINO J.M., BLASCO R. & TORRES J.M. (2000) Horizontal transmissible protection against myxomatosis and rabbit hemorrhagic disease by using a recombinant myxoma virus. *J.Virol.* **74**, 1114-1123.
- BERTAGNOLI S., GELFI J., LE GALL G., BOILLETOT E., VAUTHEROT J.F., RASSCHAERT D., LAURENT S., PETIT F., BOUCRAUT-BARALON C. & MILON A. (1996a) Protection against myxomatosis and rabbit viral hemorrhagic disease with recombinant myxoma viruses expressing rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein. *J.Virol.* **70**, 5061-5066.
- BERTAGNOLI S., GELFI J., PETIT F., VAUTHEROT J.F., RASSCHAERT D., LAURENT S., LE GALL G., BOILLETOT E., CHANTAL J. & BOUCRAUT-BARALON C. (1996b) Protection of rabbits against rabbit viral haemorrhagic disease with a vaccinia-RHDV recombinant virus. *Vaccine.* **14**, 506-510.
- BIEMELT S., SONNEWALD U., GALMBACHER P., WILLMITZER L. & MULLER M. (2003) Production of human papillomavirus type 16 virus-like particles in transgenic plants. *J.Virol.* **77**, 9211-9220.
- BOGA J.A., CASAIS R., MARIN M.S., MARTIN-ALONSO J.M., CARMENES R.S., PRIETO M. & PARRA F. (1994) Molecular cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the capsid protein gene from rabbit haemorrhagic disease virus (Spanish isolate AST/89). *J.Gen.Virol.* **75**, 2409-2413.
- BOGA J.A., MARIN M.S., CASAIS R., PRIETO M. & PARRA F. (1992) In vitro translation of a subgenomic mRNA from purified virions of the Spanish field isolate AST/89 of rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV). *Virus Res.* **26**, 33-40.

- BOGA J.A., MARTIN ALONSO J.M., CASAIS R. & PARRA F. (1997) A single dose immunization with rabbit haemorrhagic disease virus major capsid protein produced in *Saccharomyces cerevisiae* induces protection. *J.Gen.Virol.* **78**, 2315-2318.
- CAPUCCI L., FALLACARA F., GRAZIOLI S., LAVAZZA A., PACCIARINI M.L. & BROCCHI E. (1998) A further step in the evolution of rabbit hemorrhagic disease virus: the appearance of the first consistent antigenic variant. *Virus Res.* **58**, 115-126.
- CAPUCCI L., FRIGOLI G., RONSHOLD L., LAVAZZA A., BROCCHI E. & ROSSI C. (1995) Antigenicity of the rabbit hemorrhagic disease virus studied by its reactivity with monoclonal antibodies. *Virus Res.* **37**, 221-238.
- CAPUCCI L., FUSI P., LAVAZZA A., PACCIARINI M.L. & ROSSI C. (1996) Detection and preliminary characterization of a new rabbit calicivirus related to rabbit hemorrhagic disease virus but nonpathogenic. *J.Virol.* **70**, 8614-8623.
- CAPUCCI L., SCICLUNA M.T. & LAVAZZA A. (1991) Diagnosis of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome. *Rev.Sci.Tech.* **10**, 347-370.
- CASTANON S., MARIN M.S., MARTIN-ALONSO J.M., BOGA J.A., CASAIS R., HUMARA J.M., ORDAS R.J. & PARRA F. (1999) Immunization with potato plants expressing VP60 protein protects against rabbit hemorrhagic disease virus. *J.Virol.* **73**, 4452-4455.
- CASTANON, S., J. M. MARTIN-ALONSO, M. S. MARIN, J. A. BOGA, P. ALONSO, F. PARRA und R. J. ORDAS (2002): The effect of the promotor on expression of VP60 gene from rabbit haemorrhagic disease virus in potato plants. *Plant Science* **162**, 87-95
- CHOI N.W., ESTES M.K. & LANGRIDGE W.H. (2005) Synthesis and assembly of a cholera toxin B subunit-rotavirus VP7 fusion protein in transgenic potato. *Mol.Biotechnol.* **31**, 193-202.
- COLLINS B.J., WHITE J.R., LENGHAUS C., BOYD V. & WESTBURY H.A. (1995) A competition ELISA for the detection of antibodies to rabbit haemorrhagic disease virus. *Vet.Microbiol.* **43**, 85-96.
- CONRAD U. & FIEDLER U. (1998) Compartment-specific accumulation of recombinant immunoglobulins in plant cells: an essential tool for antibody production and immunomodulation of physiological functions and pathogen activity. *Plant Mol.Biol.* **38**, 101-109.
- COOKE B.D. (2002) Rabbit haemorrhagic disease: field epidemiology and the management of wild rabbit populations. *Rev.Sci.Tech.* **21**, 347-358.
- CRAMER C.L., WEISSENBORN D.L., OISHI K.K., GRABAU E.A., BENNETT S., PONCE E., GRABOWSKI G.A. & RADIN D.N. (1996) Bioproduction of human enzymes in transgenic tobacco. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **792:62-71.**, 62-71.
- DERTZBAUGH M.T. & ELSON C.O. (1993) Reduction in oral immunogenicity of cholera toxin B subunit by N-terminal peptide addition. *Infect.Immun.* **61**, 384-390.
- DIETRICH G., GRIOT-WENK M., METCALFE I.C., LANG A.B. & VIRET J.F. (2003) Experience with registered mucosal vaccines. *Vaccine.* **21**, 678-683.

- DUS SANTOS M.J. & WIGDOROVITZ A. (2005) Transgenic plants for the production of veterinary vaccines. *Immunol.Cell Biol.* **83**, 229-238.
- ESTES M.K., BALL J.M., CRAWFORD S.E., O'NEAL C., OPEKUN A.A., GRAHAM D.Y. & CONNER M.E. (1997) Virus-like particle vaccines for mucosal immunization. *Adv.Exp.Med.Biol.* **412:387-95.**, 387-395.
- FARNOS O., BOUE O., PARRA F., MARTIN-ALONSO J.M., VALDES O., JOGLAR M., NAVEA L., NARANJO P. & LLEONART R. (2005a) High-level expression and immunogenic properties of the recombinant rabbit hemorrhagic disease virus VP60 capsid protein obtained in *Pichia pastoris*. *J.Biotechnol.* **117**, 215-224.
- FARNOS O., RODRIGUEZ M., CHIONG M., PARRA F., BOUE O., LORENZO N., COLAS M. & LLEONART R. (2005b) The recombinant rabbit hemorrhagic disease virus VP60 protein obtained from *Pichia pastoris* induces a strong humoral and cell-mediated immune response following intranasal immunization in mice. *Vet.Microbiol.* .,
- FAYE L., BOULAFLOUS A., BENCHABANE M., GOMORD V. & MICHAUD D. (2005) Protein modifications in the plant secretory pathway: current status and practical implications in molecular pharming. *Vaccine* **23**, 1770-1778.
- FERNANDEZ-FERNANDEZ M.R., MOURINO M., RIVERA J., RODRIGUEZ F., PLANNA-DURAN J. & GARCIA J.A. (2001) Protection of rabbits against rabbit hemorrhagic disease virus by immunization with the VP60 protein expressed in plants with a potyvirus-based vector. *Virology.* **280**, 283-291.
- FERREIRA P.G., COSTA-E-SILVA, MONTEIRO E., OLIVEIRA M.J. & AGUAS A.P. (2004) Transient decrease in blood heterophils and sustained liver damage caused by calicivirus infection of young rabbits that are naturally resistant to rabbit haemorrhagic disease. *Res.Vet.Sci.* **76**, 83-94.
- FERREIRA P.G., COSTA-E-SILVA, OLIVEIRA M.J., MONTEIRO E., CUNHA E.M. & AGUAS A.P. (2006) Severe leukopenia and liver biochemistry changes in adult rabbits after calicivirus infection. *Res.Vet.Sci.* **80**, 218-225.
- FISCHER L., LE GROS F.X., MASON P.W. & PAOLETTI E. (1997) A recombinant canarypox virus protects rabbits against a lethal rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) challenge. *Vaccine.* **15**, 90-96.
- FORRESTER N.L., ABUBAKR M.I., ABU ELZEIN E.M., AL AFALEQ A.I., HOUSAWI F.M., MOSS S.R., TURNER S.L. & GOULD E.A. (2006) Phylogenetic analysis of rabbit haemorrhagic disease virus strains from the Arabian Peninsula: did RHDV emerge simultaneously in Europe and Asia? *Virology.* **344**, 277-282.
- FORRESTER N.L., BOAG B., MOSS S.R., TURNER S.L., TROUT R.C., WHITE P.J., HUDSON P.J. & GOULD E.A. (2003) Long-term survival of New Zealand rabbit haemorrhagic disease virus RNA in wild rabbits, revealed by RT-PCR and phylogenetic analysis. *J.Gen.Virol.* **84**, 3079-3086.
- FREYTAG L.C. & CLEMENTS J.D. (2005) Mucosal adjuvants. *Vaccine.* **23**, 1804-1813.

- GALL-RECULE G., ZWINGELSTEIN F., LAURENT S., DE BOISSESON C., PORTEJOIE Y. & RASSCHAERT D. (2003) Phylogenetic analysis of rabbit haemorrhagic disease virus in France between 1993 and 2000, and the characterisation of RHDV antigenic variants. *Arch.Virol.* **148**, 65-81.
- GANZ, P. R. (1996): Expression of human blood proteins in transgenic plants: cytokine GM-CSF as model protein. *Transgenic Plants* , 281-297
- GEBERT A., STEINMETZ I., FASSBENDER S. & WENDLANDT K.H. (2004) Antigen transport into Peyer's patches: increased uptake by constant numbers of M cells. *Am.J.Pathol.* **164**, 65-72.
- GEHRMANN B. & KRETZSCHMAR C. (1991) [An experimental contribution to the epizootiology of viral hemorrhagic septicemia of rabbits (rabbit hemorrhagic disease, RHD)--transmission by flies]. *Berl Munch.Tierarztl.Wochenschr.* **104**, 192-194.
- GELMETTI D., GRIECO V., ROSSI C., CAPUCCI L. & LAVAZZA A. (1998) Detection of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) by in situ hybridisation with a digoxigenin labelled RNA probe. *J.Virol.Methods.* **72**, 219-226.
- GIDDINGS G., ALLISON G., BROOKS D. & CARTER A. (2000) Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nat.Biotechnol.* **18**, 1151-1155.
- GIUDICE E.L. & CAMPBELL J.D. (2006) Needle-free vaccine delivery. *Adv.Drug Deliv.Rev.* **58**, 68-89.
- GRANZOW, H., H. SCHIRRMEIER und H. TEWS (1989): Hämorrhagische Septikämie der Kaninchen - Erregernachweis und erste elektronenmikroskopische Charakterisierung. *Mh.Vet.Med.* **4**, 379-380
- GRANZOW H., WEILAND F., STREBELOW H.G., LIU C.M. & SCHIRRMEIER H. (1996) Rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV): ultrastructure and biochemical studies of typical and core-like particles present in liver homogenates. *Virus Res.* **41**, 163-172.
- GREEN K.Y., ANDO T., BALAYAN M.S., BERKE T., CLARKE I.N., ESTES M.K., MATSON D.O., NAKATA S., NEILL J.D., STUDDERT M.J. & THIEL H.J. (2000) Taxonomy of the caliciviruses. *J.Infect.Dis.* **181 Suppl 2:S322-30.**, S322-S330
- GUITTRE C., BAGINSKI I., LE GALL G., PRAVE M., TREPO C. & COVA L. (1995) Detection of rabbit haemorrhagic disease virus isolates and sequence comparison of the N-terminus of the capsid protein gene by the polymerase chain reaction. *Res.Vet.Sci.* **58**, 128-132.
- HAAS B. & THIEL H.J. (1993) [The hemorrhagic disease of rabbits. "Rabbit hemorrhagic disease" (RHD)]. *Dtsch.Tierarztl.Wochenschr.* **100**, 131-137.
- HUANG H.B. (1991) Vaccination against and immune response to viral haemorrhagic disease of rabbits: a review of research in the People's Republic of China. *Rev.Sci.Tech.* **10**, 481-498.

- HUANG Z., DRY I., WEBSTER D., STRUGNELL R. & WESSELINGH S. (2001) Plant-derived measles virus hemagglutinin protein induces neutralizing antibodies in mice. *Vaccine* **19**, 2163-2171.
- JANEWAY, C. A., P. TRAVERS und M. WALPORT (2002): Immunologie.
- JANI D., MEENA L.S., RIZWAN-UL-HAQ Q.M., SINGH Y., SHARMA A.K. & TYAGI A.K. (2002) Expression of cholera toxin B subunit in transgenic tomato plants. *Transgenic Res.* **11**, 447-454.
- JOHNSON G.D., DAVIDSON R.S., MCNAMEE K.C., RUSSELL G., GOODWIN D. & HOLBOROW E.J. (1982) Fading of immunofluorescence during microscopy: a study of the phenomenon and its remedy. *J.Immunol.Methods.* **55**, 231-242.
- JUNGI, T. W. (1996): Zelluläre und molekulare Grundlagen der Immunologie.
- KANG T.J., KANG K.H., KIM J.A., KWON T.H., JANG Y.S. & YANG M.S. (2004) High-level expression of the neutralizing epitope of porcine epidemic diarrhea virus by a tobacco mosaic virus-based vector. *Protein Expr.Purif.* **38**, 129-135.
- KHATTAK S., DARAI G. & ROSEN-WOLFF A. (2004) Puumala virus nucleocapsid protein expressed in transgenic plants is not immunogenic after oral administration. *Virus Genes.* **29**, 109-116.
- KIM B.O., SHIN S.S., YOO Y.H. & PYO S. (2001) Peroral immunization with Helicobacter pylori adhesin protein genetically linked to cholera toxin A2B subunits. *Clin.Sci.(Lond).* **100**, 291-298.
- KIM T.G., RUPRECHT R. & LANGRIDGE W.H. (2004) Synthesis and assembly of a cholera toxin B subunit SHIV 89.6p Tat fusion protein in transgenic potato. *Protein Expr.Purif.* **35**, 313-319.
- KIRK D.D. & WEBB S.R. (2005) The next 15 years: taking plant-made vaccines beyond proof of concept. *Immunol.Cell Biol.* **83**, 248-256.
- KOZIEL M.G., CAROZZI N.B. & DESAI N. (1996) Optimizing expression of transgenes with an emphasis on post-transcriptional events. *Plant Mol.Biol.* **32**, 393-405.
- KUHNLE G., COLLINS R.A., SCOTT J.E. & KEIL G.M. (1996) Bovine interleukins 2 and 4 expressed in recombinant bovine herpesvirus 1 are biologically active secreted glycoproteins. *J.Gen.Virol.* **77**, 2231-2240.
- LAEMMLI U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680-685.
- LANGRIDGE W.H. (2000) Edible vaccines. *Sci.Am.* **283**, 66-71.
- LAURENT S., KUT E., REMY-DELAUNAY S. & RASSCHAERT D. (2002) Folding of the rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein and delineation of N-terminal domains dispensable for assembly. *Arch.Virol.* **147**, 1559-1571.
- LAURENT S., VAUTHEROT J.F., MADELAINE M.F., LE GALL G. & RASSCHAERT D. (1994a) Recombinant rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein expressed in

- baculovirus self-assembles into viruslike particles and induces protection. *J.Virol.* **68**, 6794-6798.
- LAURENT S., VAUTHEROT J.F., MADELAINE M.F., LE GALL G. & RASSCHAERT D. (1994b) Recombinant rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein expressed in baculovirus self-assembles into viruslike particles and induces protection. *J.Virol.* **68**, 6794-6798.
- LE GALL G., ARNAULD C., BOILLETOT E., MORISSE J.P. & RASSCHAERT D. (1998) Molecular epidemiology of rabbit haemorrhagic disease virus outbreaks in France during 1988 to 1995. *J.Gen.Virol.* **79**, 11-16.
- LIU, S. J., H. P. XUE, B. Q. PU und N. H. QUIAN (1984): A new viral disease in rabbits. *Animal Husbandry and Veterinary Medicine* **16**, 253-255
- MARCATO P.S., BENAZZI C., VECCHI G., GALEOTTI M., DELLA S.L., SARLI G. & LUCIDI P. (1991) Clinical and pathological features of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome. *Rev.Sci.Tech.* **10**, 371-392.
- MARQUET-BLOUIN E., BOUCHE F.B., STEINMETZ A. & MULLER C.P. (2003) Neutralizing immunogenicity of transgenic carrot (*Daucus carota* L.)-derived measles virus hemagglutinin. *Plant Mol.Biol.* **51**, 459-469.
- MARTIN-ALONSO J.M., CASTANON S., ALONSO P., PARRA F. & ORDAS R. (2003) Oral immunization using tuber extracts from transgenic potato plants expressing rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein. *Transgenic Res.* **12**, 127-130.
- MARTINEZ-TORRECUADRADA J.L., CORTES E., VELA C., LANGEVELD J.P., MELOEN R.H., DALSGAARD K., HAMILTON W.D. & CASAL J.I. (1998) Antigenic structure of the capsid protein of rabbit haemorrhagic disease virus. *J.Gen.Virol.* **79**, 1901-1909.
- MASON H.S. & ARNTZEN C.J. (1995) Transgenic plants as vaccine production systems. *Trends Biotechnol.* **13**, 388-392.
- MASON H.S., LAM D.M. & ARNTZEN C.J. (1992) Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **89**, 11745-11749.
- MEYERS G., WIRBLICH C., THIEL H.J. & THUMFART J.O. (2000) Rabbit hemorrhagic disease virus: genome organization and polyprotein processing of a calicivirus studied after transient expression of cDNA constructs. *Virology.* **276**, 349-363.
- MITRO S. & KRAUSS H. (1993) Rabbit hemorrhagic disease: a review with special reference to its epizootiology. *Eur.J.Epidemiol.* **9**, 70-78.
- MORISSE J.P., LE GALL G. & BOILLETOT E. (1991) Hepatitis of viral origin in Leporidae: introduction and aetiological hypotheses. *Rev.Sci.Tech.* **10**, 269-310.
- MOSS S.R., TURNER S.L., TROUT R.C., WHITE P.J., HUDSON P.J., DESAI A., ARMESTO M., FORRESTER N.L. & GOULD E.A. (2002) Molecular epidemiology of Rabbit haemorrhagic disease virus. *J.Gen.Virol.* **83**, 2461-2467.

- MOWAT A.M. (2005) Dendritic cells and immune responses to orally administered antigens. *Vaccine*. **23**, 1797-1799.
- NOWOTNY N., BASCUNANA C.R., BALLAGI-PORDANY A., GAVIER-WIDEN D., UHLEN M. & BELAK S. (1997) Phylogenetic analysis of rabbit haemorrhagic disease and European brown hare syndrome viruses by comparison of sequences from the capsid protein gene. *Arch.Virol.* **142**, 657-673.
- OGRA P.L., FADEN H. & WELLIVER R.C. (2001) Vaccination strategies for mucosal immune responses. *Clin.Microbiol.Rev.* **14**, 430-445.
- OHLINGER V.F., HAAS B., MEYERS G., WEILAND F. & THIEL H.J. (1990) Identification and characterization of the virus causing rabbit hemorrhagic disease. *J.Virol.* **64**, 3331-3336.
- OHLINGER V.F., HAAS B. & THIEL H.J. (1993) Rabbit hemorrhagic disease (RHD): characterization of the causative calicivirus. *Vet.Res.* **24**, 103-116.
- PARK J.H., LEE Y.S. & ITAKURA C. (1997) Fibrin(ogen)-related antigens in rabbits experimentally infected with rabbit haemorrhagic disease virus. *Res.Vet.Sci.* **63**, 123-127.
- PARK J.H., OCHIAI K. & ITAKURA C. (1992) Detection of rabbit haemorrhagic disease virus particles in the rabbit liver tissues. *J.Comp Pathol.* **107**, 329-340.
- PARRA F. & PRIETO M. (1990) Purification and characterization of a calicivirus as the causative agent of a lethal hemorrhagic disease in rabbits. *J.Virol.* **64**, 4013-4015.
- PERLAK F.J., FUCHS R.L., DEAN D.A., MCPHERSON S.L. & FISCHHOFF D.A. (1991) Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **88**, 3324-3328.
- RICHTER L. & KIPP P.B. (1999) Transgenic plants as edible vaccines. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* **240:159-76.**, 159-176.
- RIGANO M.M. & WALMSLEY A.M. (2005) Expression systems and developments in plant-made vaccines. *Immunol.Cell Biol.* **83**, 271-277.
- RODAK L., SMID B., VALICEK L., VESELY T., STEPANEK J., HAMPL J. & JURAK E. (1990) Enzyme-linked immunosorbent assay of antibodies to rabbit haemorrhagic disease virus and determination of its major structural proteins. *J.Gen.Virol.* **71**, 1075-1080.
- SCHILLBERG S., TWYMAN R.M. & FISCHER R. (2005) Opportunities for recombinant antigen and antibody expression in transgenic plants--technology assessment. *Vaccine*. **23**, 1764-1769.
- SCHIRRMEIER H., REIMANN I., KOLLNER B. & GRANZOW H. (1999) Pathogenic, antigenic and molecular properties of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) isolated from vaccinated rabbits: detection and characterization of antigenic variants. *Arch.Virol.* **144**, 719-735.

- SCHIRRMEIER, H., I. REIMANN und R. RIEBE (1997): Genetic immunization studies and development of VP60expressing transgenic cell lines. *4th International Congress On Veterinary Virology Conference Proceedings*, 258-262
- SELBITZ, H. J. and M. MOOS (1997a): Tierärztliche Impfpraxis.
- SELBITZ, H. J. and M. MOOS (1997b): Tierärztliche Impfpraxis.
- SIJMONS P.C., DEKKER B.M., SCHRAMMEIJER B., VERWOERD T.C., VAN DEN ELZEN P.J. & HOEKEMA A. (1990) Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants. *Biotechnology (N.Y.)*, **8**, 217-221.
- SMID B., VALICEK L., RODAK L., STEPANEK J. & JURAK E. (1991) Rabbit haemorrhagic disease: an investigation of some properties of the virus and evaluation of an inactivated vaccine. *Vet.Microbiol.* **26**, 77-85.
- SMITH K.M., EATON A.D., FINLAYSON L.M. & GARSIDE P. (2000) Oral tolerance. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* **162**, S175-S178
- STOERCKLE-BERGER N., KELLER-BERGER B., ACKERMANN M. & EHRENSPERGER F. (1992) Immunohistological diagnosis of rabbit haemorrhagic disease (RHD). *Zentralbl.Veterinarmed.B.* **39**, 237-245.
- STROBEL S. (2002) Oral tolerance, systemic immunoregulation, and autoimmunity. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **958:47-58.**, 47-58.
- TEIFKE J.P., REIMANN I. & SCHIRRMEIER H. (2002) Subacute liver necrosis after experimental infection with rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV). *J.Comp Pathol.* **126**, 231-234.
- TOWBIN H., STAHELIN T. & GORDON J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **76**, 4350-4354.
- VANCIKOVA Z. (2002) Mucosal immunity--basic principles, ontogeny, cystic fibrosis and mucosal vaccination. *Curr.Drug Targets.Immune.Endocr.Metabol.Disord.* **2**, 83-95.
- VARSANI A., WILLIAMSON A.L., ROSE R.C., JAFFER M. & RYBICKI E.P. (2003) Expression of Human papillomavirus type 16 major capsid protein in transgenic *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi. *Arch.Virol.* **148**, 1771-1786.
- VISSER R.G., STOLTE A. & JACOBSEN E. (1991) Expression of a chimaeric granule-bound starch synthase-GUS gene in transgenic potato plants. *Plant Mol.Biol.* **17**, 691-699.
- WILLIAMSON E., WESTRICH G.M. & VINEY J.L. (1999) Modulating dendritic cells to optimize mucosal immunization protocols. *J.Immunol.* **163**, 3668-3675.
- WIRBLICH C., THIEL H.J. & MEYERS G. (1996) Genetic map of the calicivirus rabbit hemorrhagic disease virus as deduced from in vitro translation studies. *J.Virol.* **70**, 7974-7983.

- XU W.Y. (1991) Viral haemorrhagic disease of rabbits in the People's Republic of China: epidemiology and virus characterisation. *Rev.Sci.Tech.* **10**, 393-408.
- XU Z.J. & CHEN W.X. (1989) Viral haemorrhagic disease in rabbits: a review. *Vet.Res.Commun.* **13**, 205-212.
- ZAGOURAS P. & ROSE J.K. (1989) Carboxy-terminal SEKDEL sequences retard but do not retain two secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *J.Cell Biol.* **109**, 2633-2640.
- ZOR T. & SELINGER Z. (1996) Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Anal.Biochem.* **236**, 302-308.

9 Anhang

9.1 Abkürzungen

AG	Antigen
AK	Antikörper
BSA	Bovines Serum Albumin
bp	Basenpaare
c	complementary (DNA)
cpe	cytopathischer Effekt
CRFK	Crandell Feline Kidney cells
CaMV	Cauliflower (Blumenkohl) Mosaikvirus
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI	Ethylenimin
FITC	fluorescein-isothiocyanate
FKS	Fetales Kälberserum
h	Stunde(n)
ISA	Montanid Adjuvans
HIS	Hyperimmunserum
IFA	inkomplettes Freundsches Adjuvans
IP	isotoner Phosphatpuffer
ISA 206	Monotanide Adjuvans
inf.	infiziert
LB	Luria-Bertani
LD	letale Dosis
m	messenger (RNA)
MAk mix	monoklonaler Antikörpermix
min	Minute(n)
μF	mikro Farad
mm	Millimeter
MCMV	Maus Cytomegalovirus

NS	Normalserum
OPD	o-Phenylenediamine
Ω	Ohm
pi	post infectionem
PBS	Phosphat Buffered Saline
PEG	Polyethylenglycol
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RBV	rekombinantes Bakulovirus
(m)RNA	(messenger) Ribonukleinsäure
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
TA	Tris-Acetat-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEN	Tris-EDTA-Natriumchlorid-Puffer
TEMED	N,N,N',N`;-Tetramethylethylendiamin
Tween	Polyoxyethylene sorbitan monolaurate
U	Units
üN	über Nacht
VP	Virusprotein

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schema zur Herstellung einer transgenen Kartoffelpflanze über *Agrobacterium* vermittelten Transfer eines Fremdgens in eine Kartoffelpflanze (LANGRIDGE, 2000). 15

Abb. 2: Pflanzentransformationsplasmid, Beispiel: p35S_ctxBVP60SEKDEL
Sm/Sp = bakteriell exprimiertes Streptomycin/Spectinomycinresistenzgen
neo = Neomycinresistenzgen; pS = konstitutiv aktiver 35S-RNA-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus
ctxB = kodierender Bereich Cholera-toxin/ Untereinheit B; SEKDEL = ER-Retentionssignal 27

Abb. 3: Charakterisierung der mittels PCR amplifizierten Abschnitte des VP60 ORFs .
Die Positionsangaben beziehen sich auf die RHDV Sequenzdaten (GenBank Y 15440).
Die Kombination der Primer ergab 4 DNA-Amplifikationsprodukte (in bp = Basenpaaren)
5306 - 6026 (720 bp), 5306 - 7044 (1738 bp), 5727 - 6026 (299 bp) und 5727 - 7044 (1317 bp) 31

Abb. 4: INDEX Werte der Tabakpflanzenthomogenate im VP60 Antigen-ELISA, Vergleich von synthetischen ORFs mit dem VP60 wt . Der cut-off Wert liegt bei 0,2 (Linie)
pS = agrobakterielles Pflanzentransformationsplasmid, Negativkontrolle
1 = wt 5 = pS_ctxBVP60
2 = pS 6 = pS_ctxBΔsigVP60
3 = pS_VP60 7 = pS_ctxBVP60SEKDEL
4 = pS_VP60SEKDEL 8 = pS_ctxB ΔsigVP60SEKDEL 46

Abb. 5: INDEX Werte transgener Kartoffelpflanzen Sorte „Desireé“ im VP60 ELISA. Der Mittelwert ist beschriftet. Der cut-off Wert liegt bei 0,2 (Linie)
Blatt 1 = pS Knolle 6 = pS
2 = pS_VP60 wt 3/ 3 7 = pS_VP60
3 = pS_VP60 wt 2/ 18 8 = pS_VP60SEKDEL
4 = pS_VP60
5 = pS_VP60SEKDEL 47

Abb. 6: INDEX Werte transgener Kartoffelpflanzen im VP60 ELISA. Der Mittelwert ist beschriftet. Der cut-off Wert liegt bei 0,2 (Linie)
Blatt 1 = pS Knolle 9 = pS
2 = pS_VP60 10 = pS_VP60
3 = pS_VP60SEKDEL 11 = pS_VP60SEKDEL
4 = pS_ctxBΔsigVP60 12 = pS_ctxBVP60SEKDEL
5 = pS_ctxBVP60SEKDEL 13 = pS_ctxBΔsigVP60
6 = pGBSS_ctxBVP60 14 = pGBSS
7 = pGBSS_VP60 15 = pGBSS_VP60
8 = pGBSS_ctxBΔsigVP60 16 = pGBSS_ctxBVP60
17 = pGBSS_ctxBΔsigVP60 48

Abb. 7: INDEX Werte transgener Karottepflanzen im VP60 ELISA. Der Mittelwert ist beschriftet. Der cut-off Wert liegt bei 0,2 (Linie)
Rotin Lyophilisat 1 = pS_VP60 wt 2/ 18
2 = pS_VP60
Wurzelrübe 3 = pS_VP60
Rote Riesen Lyophilisat 4 = pS_VP60 49

Abb. 8: Western Blot Analyse Kartoffelknolle „Desireé“, Spur 1 = Linie 6, pS_VP60SEKDEL, Spur 2 = RHDV Leberkonzentrat experimentell infizierter Kaninchen aus. Die Banden unterhalb der 60 kDa Bande sind Abbauprodukte des Virusproteins. 50

Abb. 9: a) RBV-VP60, immunhistologischer Nachweis von VP60 in infizierten SF9 Zellen, mit Anti-VP60 MAk mix (Vergrößerung: 20x) b) nichtinfizierte SF9-Zellen (Vergrößerung: 10x) 51

Abb. 10: Antigen-ELISA, RBV-VP60 titriert, im linearer Bereich. Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf das eingesetzte Probevolumen von 100 µl. 51

- Abb. 11:** Western Blot zur Bestimmung der VP60 Konzentration in lyophilisierter Kaninchenleber (7,8)
 1 = VP60-ST 0, 2 µg; 2 = VP60-ST 0,1 µg; 3 = VP60-ST 0,05 µg; 4 = VP60-ST 0,025 µg; 5 = 0,0125 µg;
 6 = VP60-ST 0,00625 µg; 7= lyophilisierter Leber 0,04 µg; 8= lyophilisierter Leber 0,02 µg
 M = Marker BioRad 52
- Abb. 12:** VP60 ELISA zur Bestimmung des VP60 Gehaltes Vergleich der optischen Dichten [492nm] mit dem RBV-VP60
 VP60 aus RBV-VP60 entspricht Tabak pS_VP60, Linie 7 = 0,11 µg/ 100 µl
 VP60 aus RBV-VP60 1:10 entspricht Tabak pS_VP60SEKDEL, Linie 21 = 0,011 µg/ 100 µl
 uv = unverdünnt 53
- Abb. 13:** VP60 Antigen-ELISA zur Bestimmung der Antigenlast in Lyophilisathomogenaten transgener Kartoffelknollen- („Desireé“, „Albatros“) und Karottesuspensionskulturen „Rotin“
 Vergleich der optischen Dichten [492nm] mit dem RBV-VP60
 VP60 aus „Desireé“ pS_VP60SEKDEL = 0,011 µg/ 100 µl
 VP60 aus „Albatros“ pS_ctxBVP60SEKDEL, Linie 234/ 237 gepoolt = 0,004 µg/ 100 µl
 VP60 aus „Rotin“ pS_VP60, Linie 9 und Linie 14 = ca. 0,55 ng/ 100µl 54
- Abb. 14:** INDEX Mittelwerte VP60 ELISA transient exprimierenden CRFK-Zellkulturen. Zum Vergleich der Expressionsstärke: RBV-VP60, 1:25 verdünnt in A. dest. 55
- Abb. 15:** Western Blot zur Bestimmung der VP60 Konzentration in transfizierten CRFK Zellen, Schätzung der Antigenmenge anhand der Bandenstärke
 1= pie_ctxBVP60, ca. 0,1 µg 5 =VP60-ST 0,025 µg
 2 = pie_VP60SEKDEL, ca. 0,03µg 6 = VP60-ST 0,05 µg
 3 = pie_VP60, ca. 0,03 µg, 7 = VP60-ST 0,1 µg
 4 = pie_VP60 wt, ca. 0,04 µg M = Marker BioRad 56
- Abb. 16:** Western Blot zur Bestimmung der VP60 Konzentration in transfizierten CRFK Zellen, Schätzung der Antigenmenge anhand der Bandenstärke
 1= CRFK Kontrolle 5 =VP60-ST 0,025µg
 2 = pie_ctxBΔsigVP60SEKDEL, ca. 0,04 µg 6 = VP60-ST 0,05 µg
 3 = pie_ctxBVP60SEKDEL, ca. 0,05 µg 7 = VP60-ST 0,1 µg
 4 = pie_ctxB ΔsigVP60 keine spezifische Bande M = Marker BioRad 56
- Abb. 17:** INDEX Mittelwerte VP60 Antikörper-ELISA, Mausseren 1:50 in PBS Puffer verdünnt
 Gruppe 1 = Tabak wt Gruppe 5 = Tabak pS_VP60SEKDEL 21
 Gruppe 2 = Tabak wt + ISA 206 Gruppe 6 = Tabak pS_VP60SEKDEL 21 + ISA 206
 Gruppe 3 = Tabak pS_VP60 7 Gruppe 7 = Kontrolle
 Gruppe 4 = Tabak pS_VP60 7 + ISA 206 Gruppe 8 = Rika-Vacc®
 pS = agrobakterielles Pflanzentransformationsplasmid 57
- Abb. 18:** INDEX Mittelwerte VP60 Antikörper-ELISA, Kaninchenseren 1:50 in PBS Puffer verdünnt
 Gruppe 1 = Kartoffel pS_VP60SEKDEL Fütterung 7 d + 3 d Boosterung
 Gruppe 2 = Kartoffel pS_VP60SEKDEL 1 x i.m. + 1 x i.m. Boosterung
 Gruppe 3 = wt-Kartoffelknolle Fütterung 7 d + 3 d Boosterung
 Gruppe 4 = wt-Kartoffelknolle Fütterung 10 d + 3 d Boosterung
 Gruppe 5 = Rika-Vacc®
 Gruppe 6 = Kontrolle/ unbehandelt
 pS = agrobakterielles Pflanzentransformationsplasmid 60

Abb. 19: Nachweis von VP60 Antikörpern im indirekten ELISA; Gruppenmittelwerte
 Gruppe 1 = RBV-VP60 1,33 µg 5 Tage oral
 Gruppe 2 = RBV-VP60 1,33 µg 5 Tage oral/ Boosterung
 Gruppe 3 = RBV-VP60 3,33 µg 5 Tage oral
 Gruppe 4 = RBV-VP60 3,33 µg 5 Tage oral/ Boosterung
 Gruppe 5 = Infizierte Kaninchenleber 40 µg 5 Tage oral
 Gruppe 6 = Infizierte Kaninchenleber 40 µg 5 Tage oral/ Boosterung
 Gruppe 7 = PBS Puffer
 Gruppe 8 = Rika-Vacc[®]
 RBV-VP60 = VP60 exprimierendes Rekombinantes Bakulovirus 62

Abb. 16: Western Blot zur Bestimmung der VP60 Konzentration in transfizierten CRFK Zellen, Schätzung der Antigenmenge anhand der Bandenstärke
 1 = pie_ctxBVP60, ca. 0,1 µg 5 = VP60-ST 0,025 µg
 2 = pie_VP60SEKDEL, ca. 0,03 µg 6 = VP60-ST 0,05 µg
 3 = pie_VP60, ca. 0,03 µg, 7 = VP60-ST 0,1 µg
 4 = pie_VP60 wt, ca. 0,04 µg M = Marker BioRad 54

Abb. 17: Western Blot zur Bestimmung der VP60 Konzentration in transfizierten CRFK Zellen, Schätzung der Antigenmenge anhand der Bandenstärke
 1 = CRFK Kontrolle 5 = VP60-ST 0,025 µg
 2 = pie_ctxBΔsigVP60SEKDEL, ca. 0,04 µg 6 = VP60-ST 0,05 µg
 3 = pie_ctxBVP60SEKDEL, ca. 0,05 µg 7 = VP60-ST 0,1 µg
 4 = pie_ctxB ΔsigVP60 keine spezifische Bande M = Marker BioRad 54

Abb. 18: INDEX Mittelwerte VP60 Antikörper-ELISA, Kaninchenserum 1:50 in PBS Puffer verdünnt
 Gruppe 1 = Kartoffel pS_VP60SEKDEL Fütterung 7 d + 3 d Boosterung
 Gruppe 2 = Kartoffel pS_VP60SEKDEL 1 x i.m. + 1 x i.m. Boosterung
 Gruppe 3 = wt-Kartoffelknolle Fütterung 7 d + 3 d Boosterung
 Gruppe 4 = wt-Kartoffelknolle Fütterung 10 d + 3 d Boosterung
 Gruppe 5 = Rika-Vacc[®]
 Gruppe 6 = Kontrolle/ unbehandelt
 pS = agrobakterielles Pflanzentransformationsplasmid 60

Abb. 19: Nachweis von VP60 Antikörpern im indirekten ELISA; Gruppenmittelwerte
 Gruppe 1 = RBV-VP60 1,33 µg 5 Tage oral
 Gruppe 2 = RBV-VP60 1,33 µg 5 Tage oral/ Boosterung
 Gruppe 3 = RBV-VP60 3,33 µg 5 Tage oral
 Gruppe 4 = RBV-VP60 3,33 µg 5 Tage oral/ Boosterung
 Gruppe 5 = Infizierte Kaninchenleber 40 µg 5 Tage oral
 Gruppe 6 = Infizierte Kaninchenleber 40 µg 5 Tage oral/ Boosterung
 Gruppe 7 = PBS Puffer 62
 Gruppe 8 = Rika-Vacc[®]
 RBV-VP60 = VP60 exprimierendes Rekombinantes Bakulovirus 62

Abb. 20: Nachweis von VP60 Antikörpern im indirekten ELISA, Gruppenmittelwerte. 64

Abb. 21: Nachweis von VP60 Antikörpern im indirekten ELISA; Gruppenmittelwerte 10 d nach der 2. Immunisierung
 Gruppe 1 = pie_VP60 wt 2/ 18
 Gruppe 2 = pie_VP60
 Gruppe 3 = pie_VP60SEKDEL
 Gruppe 4 = pie_ctxBVP60
 Gruppe 5 = pie_ctxBΔsigVP60
 Gruppe 6 = pie_ctxBVP60SEKDEL
 Gruppe 7 = pie_ctxBΔsigVP60SEKDEL
 Gruppe 8 = Rika-Vacc[®]
 Gruppe 9 = CRFK Leerzelle
 Gruppe 10 = RBV-VP60 1:25
 Gruppe 11 = RBV-VP60 unverdünnt
 pie = piecas Plasmid, RBV-VP60 = VP60 exprimierendes Rekombinantes Bakulovirus 65

9.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: In Deutschland verwendete oral/ mukosal wirksame Impfstoffe in der Veterinärmedizin. l = lebend, i = inaktiviert, (P) = primäre Immunisierung, modifiziert nach (SELBITZ und MOOS, 1997b)	13
Tab. 2: Unter der Kontrolle des pS und pGBSS Promotors klonierte VP60-DNA-Konstrukte. pS = konstitutiv aktiver 35S-RNA-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus pGBSS = knollenspezifisch exprimierter Promotor des Patatingens, wt = Wildtyp SEKDEL = Retentionssignal für das Endoplasmatische Retikulum (ER); ctxB = kodierender Bereich für Cholera-Toxin/ Untereinheit B Δsig = Deletion des ctxB – Signalpeptides	26
Tab. 3: Übersicht der transgenen Pflanzenlinien (FB Agrarökologie, Universität Rostock) pS = konstitutiv aktiver 35S-RNA-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus pGBSS = knollenspezifisch exprimierter Promotor des Patatingens, wt = Wildtyp SEKDEL = Retentionssignal für das Endoplasmatische Retikulum (ER); ctxB = kodierender Bereich für Cholera-Toxin/ Untereinheit B; Δsig = Deletion des ctxB - Signalpeptides lyo = lyophilisiert; Kallussusp. = Kallussuspension	28
Tab. 4: Oligonukleotidprimer zur PCR Amplifikation des RHDV Kapsidproteins VP60 (Position in ORF1: 5306 – 7044, 1738 bp) RP = reverse Primer; FP = forward primer	31
Tab. 5: Für die Transfektion von eukaryotischen CRFK-Zellen verwendete Plasmid-DNA. pie = modifiziertes piecas-Plasmid mit MCMV immediate-early Promotor	36
Tab. 6: schematischer Aufbau der Tierversuche ISA 206 = Montanid-Adjuvans Fa Seppic; i.m. = intramuskulär Die Herstellung der Antigen-Adjuvans Lösung erfolgte als Öl in Wasser Emulsion in einem Mischungsverhältnis von 1:1 nach Angaben des Herstellers.	40
Tab. 7: VP60 spezifische Transkripte mittels RT-PCR aus Blattmaterial RHDV VP60 transformierter Kartoffelpflanzen. D = Desireé, bp = Basenpaare	44
Tab. 8: transgene Tabakpflanzenlinien, positiv/ negativ VP60 spezifisches Signal	44
Tab. 9: Auf VP60 untersuchte Kartoffellinien der Sorte „Desireé“.	46
Tab. 10: Auf VP60 untersuchte Kartoffellinien der Sorte „Albatros“.	48
Tab. 11: transgener Karottelinien, positiv/ negativ VP60 spezifisches Signal; Karottesorten: R = Rotin, RR = Rote Riesen WB = Western Blot	48
Tab. 12: Western Blot zum VP60 Nachweis in transgenen Pflanzen	50
Tab. 13: transient in CRFK-Zellen exprimierte VP60 Konstrukte	55
Tab. 14: Tierversuch mit transgenen Tabak. Adjuvans = Monotanide ISA 206 T = Tier; wt = Wildtyp Rika-Vacc® (Riemser Arzneimittel AG, Insel Riems) RHD-Impfstoff für Kaninchen zur i.m. oder s.c. Injektion, inaktiviert, wässrige Suspension	57
Tab. 15: Tierversuch zur oralen und parenteralen Immunisierung mit transgenen Kartoffelknollen „Desireé“, synthetischer VP60 ORF: pS_VP60SEKDEL, Linie 6 Rika-Vacc® (Riemser Arzneimittel AG, Insel Riems) RHD-Impfstoff für Kaninchen zur i.m. oder s.c. Injektion, inaktiviert, wässrige Suspension pS = agrobakterielles Pflanzentransformationsplasmid; i.m. = intramuskulär	58

Tab. 16: Tierversuch zur oralen und parenteralen Immunisierung mit Lyophilisat von transgenen Kartoffelknollen „Desireé“ VP60 ORF: pS_VP60SEKDEL Gruppe 1, 3 und „Albatros“ VP60 ORF: pS_ctxBVP60SEKDEL Gruppe 2, 4. 60

Tab. 17: Tierversuch zur oralen Immunisierung mit VP60 aus RBV-VP60 und RHDV aus infizierten Kaninchenlebern, Ethylenimin-inaktiviert Rika-Vacc® (Riemser Arzneimittel AG, Insel Riems) RHD-Impfstoff für Kaninchen zur i.m. oder s.c. Injektion, inaktiviert, wässrige Suspension 60

Tab. 18: Tierversuch zur Bestimmung der minimal vor RHDV schützenden Dosis. 63

Tab. 19: Tierversuch zur parenteralen Immunisierung mit transient in CRFK-Zellen exprimierten VP60 und mit Bakulovirus exprimierten VP60 (RBV-VP60 1:25 und unverdünnt). 63

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Dr. med. vet. Schirrmeier angefertigt. Ihm danke ich für die Überlassung des Themas, die intensive Betreuung und die große Geduld bei der Korrektur dieser Arbeit.

Herrn PD Dr. med. vet. M. Beer und Frau Prof. Dr. med. vet. B. Grummer danke ich für die Unterstützung und die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. T. C. Mettenleiter danke ich für die Möglichkeit der Anfertigung der Dissertation am Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems.

Herrn Dr. rer. nat. G. M. Keil und Herrn PD Dr. med. vet. E. Mundt danke ich für die Unterstützung in den Fragen der Molekularbiologie.

Den Mitarbeitern des Friedrich-Loeffler-Instituts danke ich für die freundliche Aufnahme und die große Hilfsbereitschaft. Besonders bei Frau B. Meinke und Fr. H. Wege möchte ich mich für die geduldige und stets freundliche Hilfestellung bei der praktischen Arbeit bedanken. Den nicht namentlich genannten Wissenschaftlern und Doktoranden danke ich für konstruktive Diskussionen und Anregungen sowie für die gute Stimmung und freundliche Atmosphäre.

Bei meiner Familie bedanke ich mich für die emotionale Unterstützung und das entgegengebrachte Verständnis.

