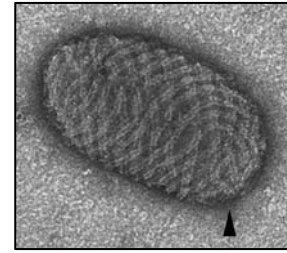


PARAPOCKENVIRUS - ORF VIRUS – NEUE VIRUSVEKTOR-PLATTFORM

Das Parapockenvirus ovis oder Orf Virus (ORFV) ist ein epitheliotropes Pockenvirus des Genus *Parapoxvirus* (PPV) der Familie *Poxviridae*, zu dem auch die Spezies BPSV als Erreger der bovinen papulomatösen Stomatitis, Pseudocowpox virus (PCPV) als Erreger des Melkerknotens beim Menschen, PVNZ, das Parapoxvirus des New Zealand red deer sowie Kamel-PPV (CCEV) oder Seehund-PPV gehören. Alle PPV besitzen einen sehr engen Wirtsbereich. Voraussetzung für die Infektion ist die verletzte Haut, die bei Schaf und Ziege zu einer lokalisierten Virusvermehrung in epidermalen Zellen und Keratinozyten führt und das klinische Bild der kontagiösen pustulären Dermatitis (contagious ecthyma) zeigt. Da es nicht zur systemischen Verbreitung des Virus kommt, bleibt die Infektion immer lokalisiert und die Läsionen verheilen nach ca. 6-8 Wochen komplett. Eine Übertragung des ORFV auf den Menschen über die verletzte Haut ist möglich, bleibt aber in der Regel klinisch unauffällig und nur in seltenen Fällen können proliferative Läsionen auftreten.



Trotz der schnellen Stimulierung sehr starker zellulärer und humoraler Abwehrmechanismen nach ORFV Infektion sind Schafe gegen wiederholte Neuinfektionen nicht geschützt. Die Stimulierung solcher Abwehrmechanismen findet sich auch nach Applikation des ORFV in nicht-permissiven Wirtstieren, die keine infektiösen ORFV-Nachkommen bilden können. Der ORFV Stamm D1701 konnte von A. Mayr (1981) zum Wachstum in Kulturzellen adaptiert und durch multiple Zellkulturpassagen soweit attenuiert werden, dass selbst die Infektion von immunsupprimierten Schafen nahezu symptomlos verläuft. Dieses apathogene ORFV D1701-B besitzt sowohl im permissiven als auch im nicht-permissiven Wirt immunstimulierende Eigenschaften.

Die Organisation des doppelsträngigen DNA-Genoms des ORFV ist dem anderer Pockenviren (z. B. Vaccinia Virus) sehr ähnlich ist. Der zentrale Teil des Virusgenoms ist hoch konserviert und enthält essentielle Gene, die variablen Genomenden kodieren für Gene, die für das Viruswachstum nicht essentiell sind und virale Virulenzfaktoren darstellen. Einige dieser Gene sind spezifisch für PPV oder ORFV und finden sich nicht in anderen Pockenviren. Hierzu gehört das sogenannte VEGF-E Gen des ORFV, das ein funktionelles Homolog des vasculären endothelialen Wachstumsfaktors (vascular endothelial growth factor) von Säugern darstellt (Meyer et al., 1999). Nach Herstellung entsprechender ORFV-Mutanten konnte gezeigt werden, dass das VEGF-E eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung proliferierender, blutiger Läsionen spielt, aber nicht-essentiell für die *in vitro* und *in vivo* Vermehrung des Virus ist. Nach Adaption des ORFV D1701 zum Wachstum in Vero-Zellen erhielten wir ein noch weiter attenuiertes Virus D1701-V, dessen Genom mindestens drei deletierte Regionen im Vergleich zum Ausgangsvirus D1701-B aufweist (Rziha et al., 2000; Büttner & Rziha, 2002).

Mit dem ORFV-Stamm D1701-V wurde eine neue, sichere und wirksame Vektorvakzine entwickelt, die folgende Eigenschaften aufweist: (1) Einen sehr engen Wirtsbereich, (2) Keine systemische (virämische) Verbreitung des Virus, (3) Eine schnelle Induktion zellulärer Abwehrmechanismen vor allem auch im nichtpermissiven Wirt, (4) Eine kurzlebige ORFV-spezifische Immunabwehr, die multiple Re-Immunisierungen erlaubt, und (5) Die Möglichkeit der Herstellung von ORFV-Mutanten nach gezielter Entfernung von Virulenzgenen des ORFV (z.B. des VEGF-E Gens). Den erfolgreichen Einsatz dieses neuen Vektorvirus-Systems konnten wir am Beispiel des Herpesvirus Suid 1 (Pseudorabiesvirus) und dem Virus der Borna'schen Erkrankung (BDV) zeigen. Entsprechende D1701-V-Rekombinanten, die die Glykoproteine gC bzw. gD des Pseudorabiesvirus exprimieren vermitteln eine protektive Immunabwehr gegen eine Belastungsinfektion der Maus sowie des Schweines als natürlichen Wirt (Fischer et al., 2003; Dory et al., 2006; van Roij et al., 2010). Weiterhin führte die Immunisierung mit einer Rekombinanten, die das N-Protein des BDV exprimiert, zu einem kompletten und langanhaltenden Schutz gegen intrakraniale BDV-Infektion der Ratte (Henkel et al., 2005).

Schwerpunkte unserer Interessen umfassen:

- ORFV als universell einsetzbare Vektorvirus-Plattform:
Herstellung und Evaluierung der protektiven Wirkung weiterer ORFV D1701-V Rekombinanten, um die generelle Einsatzmöglichkeit dieses Vektorvirus zu zeigen. Derzeit werden ORFV-Rekombinanten des Stammes D1701-V hergestellt, die immunogene Proteine des **Rabies Virus**, von **Caliciviren** (RHDV), **Arboviren** (BTV), **Orthomyxoviren** (HPAIV H5N1), **Paramyxoviren** (NDV, CDV), **Reoviren** (bovines Rotavirus) sowie **Retroviren** exprimieren. Charakterisierung dieser neuen ORFV-Rekombinanten muss den Nachweis erfolgreicher Insertion und Expression der jeweiligen Fremdgene zeigen. Weiterhin wird die Fähigkeit der einzelnen ORFV-Rekombinanten zur Induktion einer Fremdgen-spezifischen Immunantwort sowie zur Schutzimpfung in geeigneten Zieltieren getestet.

- ORFV-induzierte Immunmodulation:
Im Mausmodell untersuchen wir nach Immunisierung mit ORFV und ORFV-Rekombinanten sowohl die angeborene als auch die adaptive Immunabwehr. Neben funktionellen Tests (z.B. natural killer Tests, Proliferationstests nach in vitro Re-Stimulierung von Milzzellen) werden mittels ELISA die Induktion verschiedener Cytokine zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Immunisierung bestimmt.

Literatur:

- Meyer, M., C. Lanz, M. Clauss, A. Lepple-Wienhaus, J. Waltenberger, H.G. Augustin, M. Ziche, M. Büttner, H.-J. Rziha and C. Dehio. 1999. A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling by VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinase. *EMBO J.* **18**, 363-374.
- Rziha, H.-J., M. Henkel, R. Cottone, B. Bauer, U. Auge, F. Götz, E. Pfaff, Röttgen, M., Dehio, C. and M. Büttner. 2000. Generation of recombinant parapoxviruses: Non-essential genes suitable for insertion and expression of foreign genes. *J. Biotechnol.*, **83**, 137-145.
- Büttner, M. and H.-J. Rziha. 2002. Parapoxviruses (PPV): From the lesion to the viral genome. *J. Vet. Med. B.*, **49**, 7-116.
- Fischer, T., O. Planz, L. Stitz and H.-J. Rziha. 2003. Novel recombinant Parapoxvirus vectors induce protective humoral and cellular immunity against lethal herpesvirus challenge infection in mice. *J. Virol.* **77**, 9312-9323.
- Henkel, M., Planz, O., Fischer, T., Stitz, L. and H.-J. Rziha. 2005. Prevention of virus persistence and protection against immunopathology after Borna disease virus infection of the brain by a novel Orf virus recombinant. *J. Virol.* **79**, 314-325.
- Dory, D., T. Fischer, V. Beven, R. Cariolet, H.-J. Rziha and A. Jestin. 2006. Prime-boost immunization using DNA vaccine and recombinant Orf virus protects pigs against Pseudorabies virus (Herpes suid 1). *Vaccine* **24**, 6256-6263.
- van Rooij, E.M.A., Rijsewijk, F.A.M., Moonen-Leusen, H.W., Bianchi, A.T.J. and H.-J. Rziha. 2010. Comparison of different prime-boost regimes with DNA and recombinant Orf virus based vaccines expressing glycoprotein D of pseudorabies virus in pigs. *Vaccine* **28**, 1808-1813.