

**Untersuchung von gentechnologisch mutierten  
Modifizierten Vacciniaviren Ankara  
als Beitrag zur Entwicklung neuartiger Virusimpfstoffe**

**DISSERTATION**

zur Erlangung des

Doktorgrades der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

der Naturwissenschaftlichen Fakultät III-  
Biologie und Vorklinische Medizin der  
Universität Regensburg

vorgelegt von  
**Kerstin Zarniko**  
aus Lenggries



München, Juli 2005

Promotionsgesuch eingereicht am: 25. Juli 2005

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Susanne Modrow

Prüfungsausschuß:

Vorsitzender: Prof. Dr. Stephan Schneuwly

1. Gutachter: Prof. Dr. Susanne Modrow  
(1. Prüfer) *(Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene,  
Universität Regensburg)*

2. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Gerd Sutter  
(2. Prüfer) *(Institut für Molekulare Virologie, GSF-Neuherberg)*

3. Prüfer: Prof. Dr. Richard Warth

## **Erklärung**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der entsprechenden Literaturzitate gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

München, den 22. Juli 2005

Kerstin Zarniko

# Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS .....	1
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	4
ZUSAMMENFASSUNG.....	8
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>10</b>
1.1 ORTHOPOCKENVIREN .....	10
1.1.1 Historischer Überblick .....	10
1.1.2 Taxonomische Einteilung .....	12
1.1.3 Aufbau des Viruspartikels .....	14
1.1.4 Infektionszyklus.....	15
1.1.4.1 Genexpression.....	17
1.1.4.2 Virus-DNA-Replikation.....	18
1.2 DAS MODIFIZIERTE VACCINIAVIRUS ANKARA .....	19
1.2.1 Entstehung von MVA .....	19
1.2.2 Verwendung von MVA in der Impfstoffentwicklung .....	20
1.3 VIRALE STRATEGIEN ZUR ABSCHWÄCHUNG DER WIRTSSPEZIFISCHEN IMMUNANTWORT .....	22
1.3.1 Der Interleukin-1- $\beta$ -Rezeptor .....	24
1.3.2 Das Interleukin-18-Bindungsprotein .....	25
1.3.3 Die 3 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase / $\Delta^5$ - $\Delta^4$ -Isomerase .....	26
1.4 GENERIERUNG EINES EFFEKTIVEN HOCH ATTENUIERTEN IMPFVEKTORSYSTEMS .....	27
<b>2 MATERIALIEN .....</b>	<b>29</b>
2.1 CHEMIKALIEN UND BIOCHEMIKALIEN .....	29
2.2 PUFFER UND LÖSUNGEN .....	32
2.3 NÄHRMEDIEN .....	34
2.3.1 Nährmedien für Bakterien .....	34
2.3.2 Nährmedien für eukaryontische Zellen .....	34
2.4 VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	35
2.5 KOMMERZIELLE REAKTIONSSÄTZE .....	36
2.6 PLASMIDE .....	37
2.7 SYNTHETISCHE OLIGONUKLEOTIDE (PRIMER) .....	37
2.8 SYNTHETISCHE OLIGOPEPTIDE .....	39
2.9 ENZYME .....	39
2.10 ANTIKÖRPER.....	40
2.11 VIREN .....	41
2.12 ORGANISMEN.....	42
2.12.1 Bakterien .....	42
2.12.2 Eukaryontische Zellen.....	42
2.12.3 Mäuse.....	42
2.13 GERÄTELISTE.....	43
2.14 COMPUTERPROGRAMME.....	45
<b>3 METHODEN.....</b>	<b>46</b>
3.1 BAKTERIOLOGISCHE METHODEN .....	46
3.1.1 Kultivierung von Bakterien .....	46
3.1.2 Kryokonservierung prokaryontischer Zellen .....	46
3.1.3 Herstellung elektrokompenter Bakterien .....	46
3.1.4 Elektrotransformation von Bakterien .....	46
3.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN .....	48
3.2.1 Plasmid-Isolierung.....	48
3.2.1.1 Plasmidisolierung im analytischen Maßstab (Mini-Präp).....	48
3.2.1.2 Plasmidisolierung im präparativen Maßstab (Maxi-Präp).....	48
3.2.2 Präzipitation von Nukleinsäuren.....	48
3.2.3 Amplifikation von Nukleinsäuren.....	49
3.2.3.1 Analytische PCR.....	49

3.2.3.2	Präparative PCR.....	50
3.2.3.3	Aufreinigung des Amplifikats.....	51
3.2.4	Analyse von Nukleinsäuren mittels Gelelektrophorese.....	51
3.2.4.1	Auftrennung von DNA nach Größe in Agarosegelen.....	51
3.2.4.2	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen im präparativen Maßstab.....	51
3.2.5	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	52
3.2.5.1	Photometrische Bestimmung.....	52
3.2.5.2	Abschätzung mittels Gelelektrophorese.....	52
3.2.6	Klonierung rekombinanter MVA-Transferplasmide.....	52
3.2.6.1	Spaltung von Nukleinsäuren durch Restriktionsendonukleasen.....	52
3.2.6.2	Ligation von DNA-Fragmenten.....	53
3.2.7	Sequenzanalyse von Nukleinsäuren.....	54
3.2.8	Bestimmung spezifischer Nukleinsäure- Fragmente durch Hybridisierung mit markierter einzelsträngiger DNA.....	54
3.2.8.1	Transfer von DNA auf eine Nylonmembran (Southern Blot).....	54
3.2.8.2	Hybridisierung von DNA mit einer <sup>32</sup> P-markierten Sonde.....	55
3.3	PROTEINCHEMISCHE METHODEN.....	56
3.3.1	Synthese viraler Proteine.....	56
3.3.2	Analyse von Proteinen mittels Gelelektrophorese.....	57
3.3.2.1	Auftrennung von Proteinen nach Größe in denaturierenden Polyacrylamidgelen.....	57
3.3.2.2	Anfärben der Proteinbanden in Polyacrylamidgelen.....	58
3.3.3	Nachweis von Proteinen im Western-Blot-Verfahren.....	58
3.3.3.1	Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran (Western-Blot).....	58
3.3.3.2	Immunochemischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen.....	58
3.3.4	Funktionsanalyse des vIL-18-Bindungsproteins.....	59
3.4	ZELLKULTUR TECHNIKEN.....	60
3.4.1	Kultivierung eukaryontischer Zelllinien.....	60
3.4.2	Zucht adhärent wachsender Zellen.....	61
3.4.3	Kryokonservierung eukaryontischer Zellen.....	61
3.4.4	Auftauen kryokonservierter eukaryontischer Zellen.....	61
3.4.5	Präparation von primären Hühnerembryo-Fibroblasten („chicken embryo fibroblasts“, CEF).....	62
3.4.6	Transfektion von eukaryontischen Zellen.....	63
3.5	VIROLOGISCHE METHODEN.....	64
3.5.1	Virusamplifikation von MVA.....	64
3.5.2	Aufreinigung von Viren.....	65
3.5.3	Bestimmung der Viruskonzentration.....	65
3.5.4	Bestimmung des Wachstumsverhalten von MVA.....	67
3.5.4.1	One-Step-Growth (Ein-Schritt-Wachstum).....	67
3.5.4.2	Multiple-Step-Growth (Mehr-Schritt-Wachstum).....	67
3.5.5	Extraktion viraler Nukleinsäuren.....	68
3.5.6	Herstellung von MVA-Mutanten.....	68
3.5.6.1	Transfektion MVA -infizierter Zellen mit einem Vektorplasmid.....	69
3.5.6.2	Isolierung transfizierter MVA-Viren.....	69
3.5.7	Virusamplifikation eines MVA-Plaquesolats.....	71
3.6	IMMUNBIOLOGISCHE METHODEN.....	72
3.6.1	Immunisierung von Versuchstieren.....	72
3.6.1.1	Intranasal.....	72
3.6.1.2	Intramuskulär.....	72
3.6.1.3	Intraperitoneal.....	72
3.6.2	Präparation von Immunzellen.....	72
3.6.2.1	Präparation von Immunzellen aus dem Lumen der Lunge.....	72
3.6.2.2	Präparation von Immunzellen aus dem Peritoneum.....	73
3.6.3	Bestimmung des Anteils an Lymphozyten und NK-Zellen.....	73
3.6.4	Bestimmung des IFN $\gamma$ -Gehalts.....	74
3.6.5	Präparation von Lymphozyten aus der Milz.....	74
3.6.6	Intrazelluläre Zytokinfärbung.....	75
3.6.7	Fluoreszenzdurchflusszytometrie (FACS-Analyse).....	77
3.6.8	Bestimmung der Schutzwirkung von Impfungen mit MVA-Deletionsmutanten.....	77
3.6.9	Statistische Auswertung.....	78
4	ERGEBNISSE.....	79
4.1	GENERIERUNG DER MVA vIL-18BP/v $\beta$ 3-HSD-DELETIONSMUTANTEN.....	79
4.1.1	Herstellung der Plasmidvektoren zur Deletion der MVA vIL-18BP/ v $\beta$ 3-HSD-Gensequenzen.....	80

4.1.2	Konstruktion der MVA-Deletionsmutanten .....	84
4.1.2.1	<i>Transiente KIL-Selektion der mutierten Viren</i> .....	84
4.1.2.2	<i>Selektion der markerfreien Deletionsmutanten</i> .....	88
4.2	<i>IN VITRO</i> -CHARAKTERISIERUNG DER GENERIERTEN MVA-DELETIONSMUTANTEN .....	94
4.2.1	Wachstumsanalyse der MVA-Deletionsmutanten .....	94
4.2.2	Analyse der Synthese und Sekretion des viralen IL-18-Bindungsproteins in MVA-infizierten Zellen .....	97
4.2.3	Nachweis der Funktionalität des viralen IL-18-Bindungsproteins.....	100
4.3	VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ZUR IMMUNOGENITÄT DER DELETIONSMUTANTEN UND MVA IM MAUSMODELL.....	102
4.3.1	Einfluß der vIL-1 $\beta$ R-, vIL-18BP- und v3 $\beta$ -HSD-Proteine auf die unmittelbare Immunantwort.....	102
4.3.2	Extrazelluläre INF $\gamma$ -Konzentration in Bronchoalveolarlavage- Suspensionen und primären Milzzellkulturen.....	108
4.3.3	Vergleich der Gedächtnisantwort nach Immunisierung mit MVA und MVA-Deletionsmutanten durch Untersuchung der zellulären Immunantwort.....	113
4.3.4	Schutzwirkung der MVA-Deletionsmutanten gegen eine tödliche Orthopockenvirusbelastung.....	115
5	<b>DISKUSSION</b> .....	119
6	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	129

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin bzw. Ampère
Amp	Ampicillin
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Ara C	Cytosin Arabinose
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
3 $\beta$ -HSD	3 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$ -Isomerase
bp	Basenpaar(e)
BHK-21	„Baby Hamster Kidney“-Zellen
BMS	Basal Medium Supply
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CEF	Chicken Embryo Fibroblasts (Hühnerembryo-Fibroblasten)
Ci	Curie
CIP	Calf Intestinal Phosphatase
cm	Zentimeter
CVA	Chorioallantois Vacciniavirus Ankara
Da	Dalton
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dH <sub>2</sub> O	Destilliertes (vollentsalztes) Wasser
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt destilliertes (vollentsalztes) Wasser
DMEM	Dulbecco's modified Eagle-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	double stranded - doppelsträngig

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay
EMA	Ethidium Monoazid Bromid
EMEM	Modified Essential Medium Eagle
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter (Fluoreszenzaktivierter Zellsorter)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FBS	Fetal Bovine Serum (Fötales Rinderserum)
FSC	Forward Scatter (Vorwärtsstreulicht)
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung
G	Guanin
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
IE	Infektiöse Einheiten
i.m.	intramuskulär
i.n.	intranasal
i.p.	intraperitoneal
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IL-18BP	IL-18-Bindungsprotein
IL-1 $\beta$ R	Interleukin-1 $\beta$ Rezeptor
k	Kilo
l	Liter
LB	Luria Bertani
m	Milli
M	Molar



μ	Mikro
MHC	Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
min	Minute
mm	Millimeter
mRNA	Boten-RNA
MVA	Modifiziertes Vacciniavirus Ankara
MW	Molecular Weight (Molekulargewicht)
n	Nano
NFκB	Nuklear Faktor κ B
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
Ω	Ohm
OD	Optische Dichte
ORF	Open Reading Frame (Offener Leserahmen)
<sup>32</sup> P	Phosphor-Isotop 32
p	Pico
p.i.	post infectionem
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	Phosphat Buffered Saline (Phosphat gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PE	R-Phycoerythrin
PerCP	Peridininchlorophyll Protein
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PO	Peroxidase
r	rekombinant
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)

---

s / sek	Sekunde
SSC	Sideward Scatter (Seitwärtsstreulicht) bzw. Saline Sodium Citrat
T	Thymin
TAE	Tris Acetat EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TE	Tris EDTA-Puffer
TEN	Tris EDTA NaCl
TH1	T-Helfer(zellen)-1
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Uracil bzw. Unit (Enzymeinheit)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v	viral
V	Volt
Vol.	Volumen
VV	Vacciniavirus
VV WR	Vacciniavirus Western Reserve
W	Watt
w	Weight (Gewicht)
WB	Western-Blot
WR	Western Reserve
WT	Wildtyp

## Zusammenfassung

Das Modifizierte Vacciniavirus Ankara (MVA) wurde als hochattenuiertes und in seiner Vermehrungsfähigkeit stark eingeschränktes Vacciniavirus bereits erfolgreich bei der Pockenschutzimpfung eingesetzt. Heute gilt es zudem als vielversprechender Kandidat für die Entwicklung rekombinanter Virusimpfstoffe. Eines der Forschungsziele ist dabei, MVA durch weitere gentechnische Modifikation für den Einsatz als Impfvirus zu optimieren. Möglichkeiten dieses Ziel zu erreichen bestehen in der Eliminierung viraler Gensequenzen, die für Proteine mit potentiell immunmodulierenden Eigenschaften kodieren. Da mit der Deletion des viralen Interleukin-1 $\beta$  Rezeptors (vIL-1 $\beta$ R) bereits ein erfolgreicher Schritt in diese Richtung getan wurde, stellt die Deletion weiterer Gene und vor allem die Generierung von Mehrfachmutanten zur möglichen Potenzierung einzelner, kleiner Effekte ein spannendes Forschungsfeld dar. In dieser Arbeit wurde die Eliminierung von zwei viralen Genprodukten, das IL-18-Bindungsprotein (vIL-18BP) und das Enzym 3 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$ -Isomerase (v3 $\beta$ -HSD) in MVA und der MVA-Deletionsmutante  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R vorgenommen. Die Konstruktion von zwei Einzel-, drei Zweifach- und einer Dreifachdeletionsmutante erfolgte über homologe Rekombination und Selektion der Viren in Zellkultur. Zur Charakterisierung der MVA-Mutanten wurden anschließend *in vitro*- und *in vivo*- Experimente durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass Veränderungen auf genetischer Ebene im Virus ausschließlich an den ausgewählten Genomorten stattgefunden haben und dass das Replikationsverhalten der Viren trotz Deletion von bis zu drei Genen unverändert erhalten geblieben ist. Desweiteren zeigten *in vitro*-Untersuchungen die Synthese eines funktionellen vIL-18BP nach MVA-Infektion und belegten die erfolgreiche Eliminierung des entsprechenden Gens im Genom der hergestellten Virusmutanten. Der *in vitro*-Charakterisierung der MVA-Mutanten folgten *in vivo*-Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit neben der Einzelmutterante  $\Delta$ IL-18BP auf die Mehrfachmutanten  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP und  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP  $\Delta$ 3 $\beta$ -HSD beschränkt wurden. Nach intranasaler Applikation führten die Mehrfachdeletionsmutanten im Vergleich zu MVA zu überwiegend größeren Anteilen an Natürlichen Killerzellen in Lungen- und Peritonealspülungen der untersuchten Mäuse. Diese Ergebnisse bestätigten sich durch den Nachweis einer erhöhten Interferon  $\gamma$ -Sekretion von Immunzellen geimpfter Tiere. In Untersuchungen zur Langzeitimmunität konnten ebenfalls höhere MVA-spezifische Gedächtnis-T-Zellantworten mit der Zweifach- und Dreifachmutante als mit dem

Wildtypvirus beobachtet werden. Zudem zeigten weitere Analysen zur Schutzwirkung nach Impfung noch während der frühen Phase der Immunantwort Vorteile für die Mehrfachmutanten.

Insgesamt lassen die erhaltenen Ergebnisse die Schlußfolgerung zu, dass die Deletion des vIL-1 $\beta$ R-, vIL-18BP- und v3 $\beta$ -HSD-Gens zu einer höheren *in vivo*-Immunogenität im Vergleich zu MVA führt und zeigen damit, dass die Eliminierung auch weiterer potentieller Immunmodulatoren richtungsweisend sein könnte für die Generierung eines optimierten vacciniaviralen Vektorsystems.

# 1 Einleitung

## 1.1 Orthopockenviren

### 1.1.1 Historischer Überblick

Über viele Jahrhunderte hinweg stellte die Erkrankung an Pocken, auch als „echte Pocken“ oder „Blattern“ bekannt, eine der am meisten gefürchteten Krankheiten dar. Hervorgerufen durch das humane Pockenvirus *Variola major*, verbreitete sie sich oft epidemieartig und nahm bei einer großen Anzahl der Erkrankten einen tödlichen Verlauf. Überlebende waren häufig durch Narben der verheilenden Pockenläsionen entstellt.

Alte Aufzeichnungen belegen das Auftreten von Pockenerkrankungen in Asien und Indien vor bereits 3000 Jahren und beschreiben zudem die erste effektive Schutzmaßnahme vor einer Virusinfektion durch Impfung. Bei der sogenannten „Variolation“ wurde Schorf abheilender Pockenläsionen oder Pustelinhalt auf gesunde Personen durch Einbringen in die Nase (China) bzw. in die Haut (Indien) übertragen (*siehe Abbildung 1, S.10, links*). Die folgenden Krankheitsanzeichen waren meistens abgeschwächt und von kurzer Dauer, und die so geimpften Personen anschließend vor einer natürlichen Pockeninfektion geschützt (*Feery 1976; Fenner 1988; Esposito 2001*)



**Abbildung 1: Variolation in China um das 10. Jh. (links) und Vakzination in England gegen Ende des 18. Jh. (rechts);** In China wurde Schorf aus Pockenläsionen von Patienten mit einer Variolainfektion pulverisiert und gesunden Personen zur Impfung intranasal verabreicht (Bildquelle (NHS 2004 a)). 1796 führte Edward Jenner in England die Vakzination ein. Hierbei wurden Bestandteile von Pockenpusteln, verursacht durch das Kuhpockenvirus, in die Haut eingebracht (Bildquelle (NHS 2004 b)).

Über die Türkei wurde die Pockenschutzimpfung im frühen 17. Jahrhundert nach Europa gebracht und hier vor allem in England angewendet. Im Jahr 1796 führte dort der englische Landarzt Edward Jenner die mildere „Vakzination“, die Verabreichung von Kuhpockenviren (Kuh, lat. vacca) anstelle der Impfung mit dem Variolavirus, ein (*siehe Abbildung 1, S.10, rechts*). Er hatte bemerkt, dass Melkerinnen, die sich bei der Arbeit mit Kuhpocken infiziert hatten, nach dem Abheilen der an den Händen gebildeten Pockenpusteln vor der Erkrankung an den „echten Pocken“ geschützt waren. Diesen Beobachtungen folgend inokulierte er dem achtjährigen Jungen James Phipps Pustelbestandteile von der Hand einer mit Kuhpocken infizierten Melkerin und zeigte anschließend, dass der Junge resistent gegen eine Variolavirusinfektion war (*Fenner 1988; Baxby 1999*). Von England breitete sich die „Vakzination“, deren Name im Gedenken an Edward Jenner von Louis Pasteur 1881 als Fachbegriff für alle Impfungen geprägt wurde (*Bordenave 2003*), über den ganzen europäischen Kontinent und die USA aus. Gegen Ende des 19. Jahrhunderts setzte sich die noch mildere Impfung mit den ebenfalls verwandten, aber nicht von den Kuhpockenviren abstammenden Vacciniaviren (*siehe 1.1.2, S.12*) durch. Die aufgrund der erfolgreichen Impfung gelungene weitreichende Eindämmung der Erkrankung wurde durch die Weltgesundheits-Organisation (*world health organisation*, WHO) mit dem Ziel die Pocken auszurotten, fortgesetzt. In einer 1967 gestarteten weltweiten Impfkampagne wurde dieses Ziel erreicht, so dass die WHO 1980 schließlich die Ausrottung des Pockenvirus Variola major erklären konnte (*Fenner 1988*).

Damals wurde vereinbart das Virus nur noch in gut verwahrten Laborbeständen in den USA (*Centers for Disease Control and Prevention (CDC)*, Atlanta) und Russland (nach 1994 im *State Center for Virology and Biotechnology*, Koltsovo) zu erhalten (*WHO 1999; Smith and McFadden 2002*). Die zur Impfung eingesetzten Vacciniaviren und daraus resultierende Derivate wie MVA sind aber weiterhin nicht nur für eine erneute Impfkampagne im Falle doch wiederauftretender Pockenerkrankungen wichtig.

Ein Nutzungsbereich ist ihre Verwendung zur Herstellung rekombinanter Viren für die Expression von Fremdgenen und deren molekularbiologische Untersuchung.

Zunehmendes Interesse gewinnt aber vor allem ihr Einsatz als virale Vektoren. Denn nicht zuletzt dadurch, dass sie sich bereits in der Anwendung am Menschen durch ihre hohe Verträglichkeit bewährt haben, könnten sie als Vektorsysteme zur Entwicklung rekombinanter Impfstoffe gegen zahlreiche andere Erkrankungen in naher Zukunft große Bedeutung erlangen.

### 1.1.2 Taxonomische Einteilung

Die Familie der Pockenviren wird in zwei Unterfamilien, *Chordopoxvirinae* (Wirbeltierpocken) und *Entomopoxvirinae* (Insektenpocken) aufgeteilt (siehe Tabelle 1, S.13). Das zu den *Chordopoxvirinae* gehörende Genus der Orthopockenviren beinhaltet das humanpathogene Variolavirus (*Variola major* und *Variola minor*), die zur Impfung eingesetzten Vacciniaviren und unter anderen die für Kuh, Kamel, Maus oder Affen pathogenen Virusarten.

Weitere sieben Genera gehören zur großen Familie der Wirbeltierpocken, während die Insektenpocken nur drei Genera zählen. Diese Einteilung wurde aufgrund genetischer oder morphologischer Analogien sowie ähnlicher Wirtsspezifitäten vorgenommen. So weisen Kuhpocken-, Variola- und Vacciniavirus eine 90%ige Identität in den Genen auf, die bei allen drei Viren vorkommen (Massung, Liu et al. 1994); (Shchelkunov, Safronov et al. 1998). Eine genaue wirtsspezifische Zuordnung des Vacciniavirus ist bis heute nicht möglich. Es gibt allerdings Hinweise, dass es vom ehemals natürlichen Wirt oder auch vom geimpften Menschen auf indische Büffel übertragen wurde, da aus erkrankten Tieren ein dem Vacciniavirus sehr ähnliches Virus isoliert werden konnte (Dumbell and Richardson 1993). Insgesamt ist bis heute über die evolutionsbiologische Entwicklung und Abstammung der Pockenviren wenig bekannt. Mittlerweile konnte aber durch die Sequenzierung etlicher Virusgenome deren Anzahl gleicher Gene und konservierter Regionen bestimmt und ihre Anordnung im Genom verglichen werden, wodurch die Erstellung des Stammbaumes der Pockenviren weiter voranschreitet (Gubser, Hue et al. 2004).

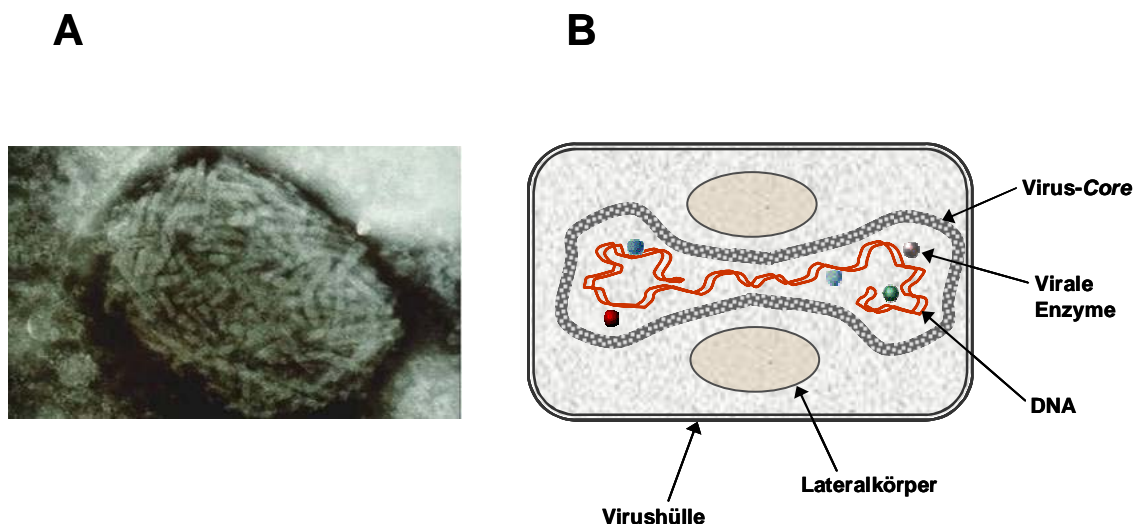
Unterfamilie	Gattung	Art	Ursprünglicher, natürlicher Wirt
<b>Chordopoxvirinae</b>	Orthopoxvirus	Variolavirus	Mensch
		Vacciniavirus	?
		Kuhpockenvirus	Nager
		Kamelpockenvirus	Kamel
		Ectromeliavirus	Nager
		Affenpockenvirus	Eichhörnchen
		Waschbärpockenvirus	Waschbär
		Stinktierpockenvirus	Stinktier
	Parapoxvirus	Pseudokuhpockenvirus	Rind
	Avipoxvirus	viele Arten	Vögel
	Capripoxvirus	Schafpockenvirus	Schaf
		Ziegenpockenvirus	Ziege
	Leporipoxvirus	Myxomvirus	Kaninchen
		Fibromatosevirus	Hase, Kaninchen, Eichhörnchen
	Suipoxvirus	Schweinepockenvirus	Schwein
	Molluscipoxvirus	Molluscum-contagiosum-Virus	Mensch
	Yatapoxvirus	Tanapockenvirus	Nager?
		Yabapockenvirus	Affen?
<b>Entomopoxvirinae</b>	Entomopoxvirus A		
	Entomopoxvirus B		
	Entomopoxvirus C		
		Pockenviren der Käfer, Schmetterlinge und Fliegen	

**Tabelle 1: Klassifikation der Pockenviren (Familie Poxviridae).** Nach (Modrow 2003) und (Pastoret and Vanderplasschen 2003)



### 1.1.3 Aufbau des Viruspartikels

Pockenviren sind die größten bekannten Viren. Sie haben eine backsteinartige, abgerundete Form von ca. 360 x 270 x 250 nm (*siehe Abbildung 2 A, S.14*) und sind damit gerade noch im Lichtmikroskop erkennbar (*Cyrklaff, Risco et al. 2005*). Infektiöse Viruspartikel existieren in zwei Varianten - den extrazellulär vorkommenden EEVs (*extracellular enveloped virus, extrazelluläres umhülltes Virus*), die sich von den innerhalb der Wirtszelle vorliegenden Partikeln, den IMVs (*intracellular mature virions, intrazelluläres reifes Virus*), durch eine zusätzliche Membran unterscheiden (*Payne 1978*); (*Blasco and Moss 1992*; *Roos, Cyrklaff et al. 1996*) Die innere Hüllmembran umgibt das sogenannte *Core* (*siehe Abbildung 2 B, S.14*), welches die doppelsträngige virale DNA im Komplex mit Proteinen und etliche viruskodierte Enzyme, wie RNA-Polymerasen, DNA-Helikasen oder frühe Transkriptionsfaktoren enthält (*Peters and Mueller 1963*) ; (*Kates and McAuslan 1967*). Im Querschnitt betrachtet sind neben dem hantelförmigen *Core* zwei Lateralkörper erkennbar. Ihre genaue Zusammensetzung und Herkunft ist unklar, sie werden als Aggregate von heterogenem Material beschrieben und stellen möglicherweise die Kontaktstelle des Virus-*Core* mit der Membranhülle dar (*Griffiths, Wepf et al. 2001*; *Cyrklaff, Risco et al. 2005*).



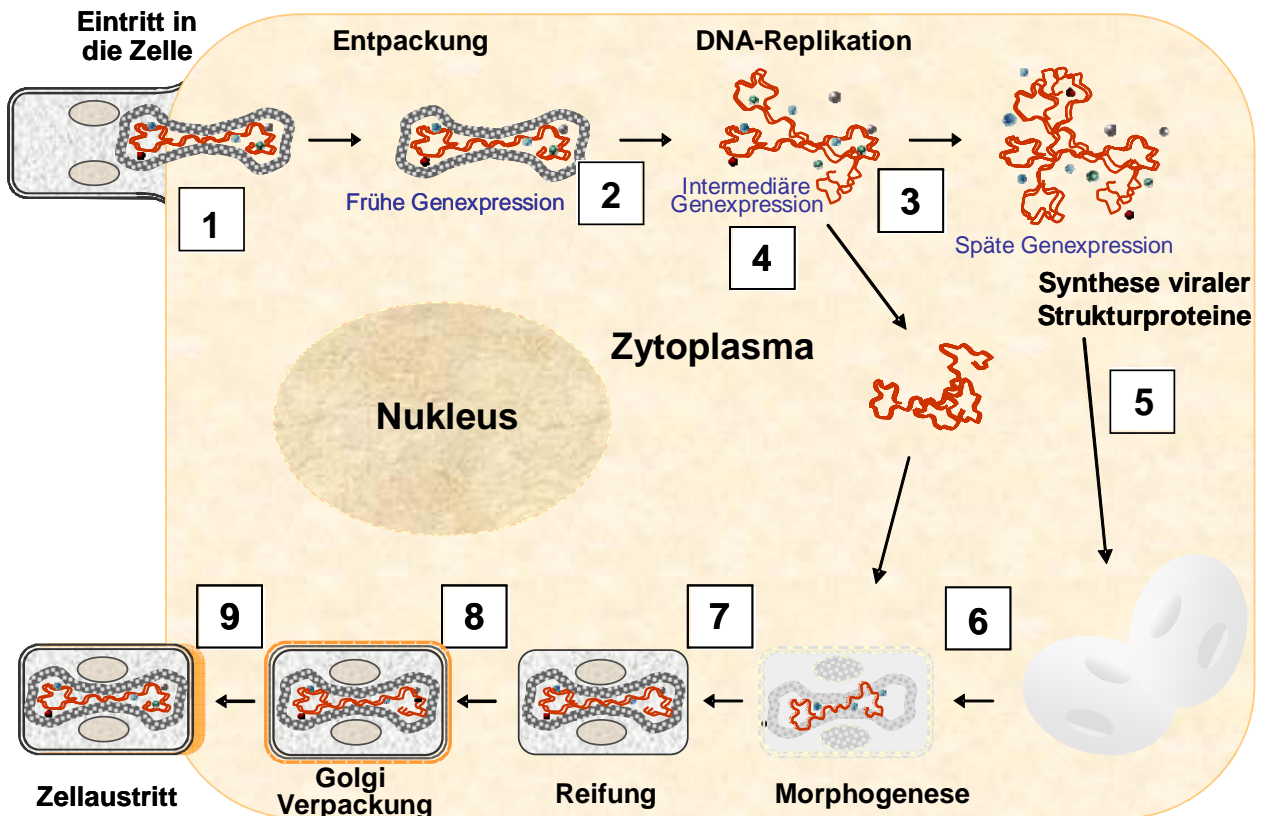
**Abbildung 2: Vacciniavirus.** (A) elektronenmikroskopische Aufnahme von MVA (Bildquelle D.Spehner und G.Sutter); (B) Vacciniavirus-Querschnitt (Schematische Darstellung frei nach (Modrow 2003)).

Die doppelsträngige, linear vorliegende DNA hat eine Länge von ungefähr 130 kbp (Parapoxvirus) bis 300 kbp (Avipoxvirus), das Genom des MVA beträgt 178 kbp (*Antoine, Scheiflinger et al. 1998; 2001*). Beide Genomenden bestehen aus identischen, aber gegenläufig angeordneten Wiederholungssequenzen (ITR, *inverted terminal repeats*), in welchen sich etliche kurze, aufeinanderfolgende tandemartige Sequenzwiederholungen (*tandem repeats*) befinden. Durch einen A+T-reichen Abschnitt jeweils an den Endbereichen der ITRs können sich Haarnadelschleifen ausbilden, über die sich die DNA-Stränge an den Genomenden miteinander verbinden (*Garon, Barbosa et al. 1978; Wittek and Moss 1980; Baroudy, Venkatesan et al. 1982*). Das Genom der Orthopockenviren umfasst 150-200 Gene (MVA 177 Gene), die von beiden DNA-Strängen abgelesen werden und deren Leserahmen sich kaum überschneiden. Hochkonservierte Gene, mit z. B. wichtigen Funktionen in der DNA-Replikation, sind häufig im zentralen Bereich des Genoms zu finden, während Gene, die beispielsweise eine Rolle in der Virus-Wirts-Interaktion spielen, meist in den Endregionen liegen (*Moss 2001*).

#### **1.1.4 Infektionszyklus**

Beide viralen Formen, extrazelluläre und intrazelluläre reife Partikel, EEVs und IMVs, sind in der Lage, Wirtszellen zu infizieren. Das Eindringen in die Zelle erfolgt dabei aufgrund der unterschiedlichen Virusumhüllungen über verschiedene Wege. EEVs werden von einer infizierten, aber noch intakten Zelle abgegeben und sorgen für eine effektive Verbreitung der Viren von Zelle zu Zelle, während die Freisetzung von IMVs durch Zelllyse stattfindet (*Blasco and Moss 1992; Law, Hollinshead et al. 2002*). Im Unterschied zu anderen DNA-Viren verläuft der Infektionszyklus der Pockenviren ausschließlich im Zytoplasma der Zelle (Minnigan und Moyer 1985)(*siehe Abbildung 3 S.16*). Die für die Transkription der viralen Gene und die Virus-DNA-Replikation benötigten Enzyme und Faktoren werden komplett durch virale Gene kodiert, so dass das Virus weitestgehend unabhängig von zellulären Funktionen der Wirtszelle ist. Somit kann unmittelbar nach dem Entlassen des Virus-*Core* ins Zytoplasma die Expression früher viraler Gene beginnen, gefolgt von der Freisetzung der DNA aus dem *Core* und ihrer Replikation (*Woodson 1967; Baldick and Moss 1993*). Nach mittlerer und später Genexpression sind alle Komponenten für den Zusammenbau neuer Viruspartikel vorhanden. Morphogenese und Reifung der entstehenden Viruspartikel in gesonderten, im Elektronenmikroskop granulär erscheinenden Bezirken des Zytoplasmas, führen zur Bildung der von einer Membran umgebenen IMVs (*Carter, Law et al. 2005*).

Durch die Aufnahme in Golgivesikel werden sie mit zwei zusätzlichen Membranen umgeben und über diese zur Zytoplasmamembran gebracht, wo sie durch Exozytose in den Extrazellulärraum entlassen werden (Stokes 1976; Hiller and Weber 1985; Schmelz, Sodeik et al. 1994; Cudmore, Cossart et al. 1995).

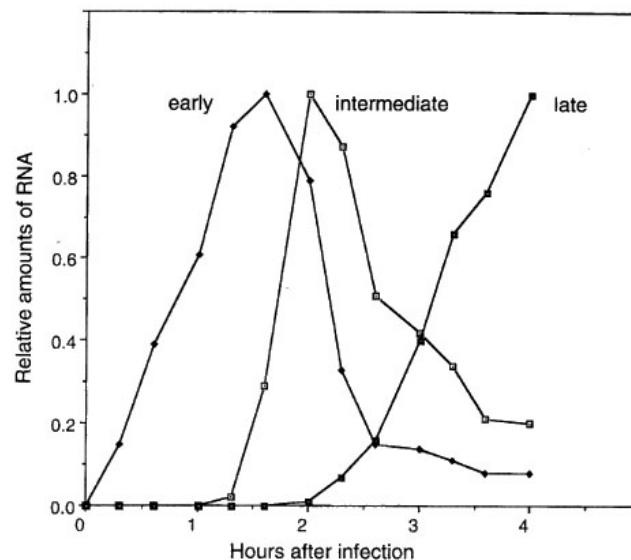


**Abbildung 3: Schematische Darstellung des vacciniaviralen Infektionszyklus.** Nach dem Anheften des Virupartikels an die Zelle wird dieses durch Fusion mit der Zytoplasmamembran oder über Endozytose aufgenommen und das Virus-Core ins Zytoplasma entlassen (1). Im Virus-Core findet die Transkription der frühen Gene, u.a. Enzyme und Faktoren für die DNA-Replikation und intermediäre Transkription, statt, anschließend wird die virale DNA ins Zytoplasma entlassen (2). Nach erfolgter DNA-Replikation (3) und Synthese der mittleren und späten Genprodukte (4), (5), welches u.a. virale Strukturproteine und Enzyme für den Zusammenbau neuer Viruspartikel sind, beginnt die Morphogenese (6). Während des Reifungsprozesses bilden sich IMVs (7), die mit weiteren Membranen umhüllt (8) und schließlich als EEVs aus der Zelle geschleust werden (9). (Abgewandelte Darstellung aus (Moss 2001)).

### 1.1.4.1 Genexpression

Die Expression der viralen Gene verläuft in einer temporären Kaskade, aufgeteilt in die drei Phasen der frühen-, intermediären- und späten Genexpression.

Die Transkription früher Gene findet noch im Virus-Core statt (siehe *Abbildung 3, S.16*), so dass schon 20 min nach Infektion einer Zelle mRNA von diesen Genen zu finden ist (Baldick and Moss 1993) (siehe *Abbildung 4, S.17*). Mittlere und späte Genexpression folgen zeitlich verzögert erst im Anschluß an die DNA-Replikation im Zytoplasma. So treten erste Transkripte der mittleren Phase der Genexpression zum Zeitpunkt des maximalen Anteils früher Gentranskripte, ca. 1 h nach der Infektion auf, gefolgt von der Phase der späten Genexpression.



**Abbildung 4: Zeitverlauf der Expression der viralen Gene nach Infektion einer Zelle.** Bereits 20 min nach der Infektion sind mRNA-Moleküle früh (early) transkribierter Gene vorhanden. Die Transkription der mittleren (intermediate) Gene beginnt 1 h nach der Infektion, gefolgt von den Genen der späten (late) Transkriptionsphase (aus (Moss 2001)).

Ungefähr die Hälfte der viralen Gene wird früh transkribiert (Paoletti and Grady 1977; Boone and Moss 1978) und die virale mRNA wird wie zelluläre mRNA mit einer 5'CAP-Gruppe versehen und am 3'Ende polyadenyliert (Kates and Beeson 1970; Boone and Moss 1977). Die gesamte hierfür benötigte Transkriptionsmaschinerie mit RNA-Polymerase, frühen Transkriptionsfaktoren, capping-Enzym oder Poly(A)-Polymerase wird im Virus-Core mitgeführt, wodurch die Genexpression unabhängig von der Wirtszelle im Zytoplasma

ablaufen kann (*Kates and McAuslan 1967; Munyon, Paoletti et al. 1967*). Frühe, mittlere und späte Gene unterscheiden sich in ihren Promotorsequenzen und kodieren für unterschiedliche Proteine. Frühzeitig werden Gene exprimiert, die für die Virus-Wirts-Interaktion und DNA-Synthese wichtig sind sowie Faktoren für die Einleitung der mittleren Genexpression. Während die Produkte der intermediären Expressionsphase u.a. späte Transkriptionsfaktoren sind, werden in der späten Phase die Enzyme des Transkriptionsapparates, frühe Transkriptionsfaktoren und Strukturproteine für den Zusammenbau neuer Viruspartikel synthetisiert (*Keck, Baldick et al. 1990; 2001*).

#### **1.1.4.2 Virus-DNA-Replikation**

Nach der Synthese der benötigten Enzyme während der frühen Genexpression beginnt nach dem Austreten der Virus-DNA aus dem *Core* die Replikation der viralen DNA. Dabei wird die Virus-DNA im Zytoplasma von Membranen des Endoplasmatischen Reticulums umgeben (*Tolonen, Doglio et al. 2001*). In diesen abgegrenzten Bereichen, den „Virus-Fabriken“ (*Cairns 1960*) werden in einem Zeitraum von sechs Stunden ab Infektion der Zelle ca. 10000 Kopien gebildet und die Hälfte davon unmittelbar als neue Virionen verpackt (*Salzman 1960; Joklik and Becker 1964*). Als Replikationsstartpunkt dienen freie 3'-OH-Enden, die durch Einzelstrangbrüche an beiden Enden des Genoms entstehen (*Pogo, O'Shea et al. 1981*). Die neugebildeten DNA-Doppelstränge formen in den Endbereichen Haarnadelstrukturen, die sich wiederum als Replikationsstartpunkt anbieten. Hierdurch kann die DNA-Neusynthese an etlichen Stellen gleichzeitig ablaufen und immer wieder initiiert werden, wodurch ein mehrfach verzweigtes, konkatameres Virus-DNA-Molekül entsteht (*Merchinsky and Moss 1989*), das anschließend in Moleküle mit einfacher Genomlänge aufgelöst wird. Während der Replikationsphase findet das bei Vacciniaviren sehr häufig vorkommende Ereignis der homologen Rekombination statt (*Ball 1987*). Über die Verknüpfung gleicher DNA-Sequenzen können dazwischenliegende Genomabschnitte aufgenommen bzw. eliminiert oder ausgetauscht werden, wodurch veränderte DNA-Genome und damit Viruspartikel entstehen, die einen Evolutionsvorteil haben könnten. Die hohe Rekombinationsfrequenz dieser Viren wird in der molekularbiologischen Forschung als effektive Methode zur Herstellung von Virusmutanten genutzt.

## 1.2 Das Modifizierte Vacciniavirus Ankara

### 1.2.1 Entstehung von MVA

Zu den Vacciniaviren gehört eine große Anzahl an Virusstämmen, die artifiziell durch Kultivierung in Zellkultursystemen, teilweise mit gezielter Einführung von Modifikationen in biologischen Forschungslaboratorien entstanden sind. Hierzu gehören die meisten verwendeten Impfstämme und auch speziell tierpathogene Stämme wie das Vacciniavirus Western Reserve (VV WR), welches eine hohe Virulenz in Mäusen aufweist.

Für die Pockenimpfung wurden verschiedene Virusstämmen eingesetzt, so z. B. Vacciniavirus (VV) Copenhagen, VV Lister, das in Deutschland verwendete VV Elstree (WHO-Referenzvirus) oder das in den USA verwendete VV Wyeth (*New York City Board of Health vaccine Strain*). Da diese Impfviren in immungeschwächten Personen ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von Impfkomplicationen mit sich bringen, wurde versucht, abgeschwächtere Viren herzustellen. Hierfür wurden z. B. Gene, die für Zytokine wie Interleukin 2 oder Interferon- $\gamma$  kodieren in das Virusgenom eingefügt, um dadurch die Immunantwort des Wirtsorganismus gegen das Virus zu stärken (*Flexner, Hugin et al. 1987; Kohonen-Corish, King et al. 1990*). Bei dieser Vorgehensweise ist es sehr wichtig sicherzustellen, dass die inserierten Gene stabil integriert sind, da der Verlust wieder zu der ehemals vorhandenen Virulenz führen würde. Eine weitere Möglichkeit zur Generierung attenuierter Viren ist die gezielte Deletion wahrscheinlicher Virulenzgene, die z. B. zur Herstellung des NYVAC-Virus führte. Insgesamt 18 Leserahmen von Genen des Nukleotidstoffwechsels, mit möglichen Funktionen in der Virus-Wirtsinteraktion oder Virulenz wurden in VV Copenhagen deletiert (*Tartaglia, Perkus et al. 1992*). Das daraus resultierende Virus, NYVAC, kann sich in etlichen humanen Zelllinien nicht mehr vermehren und zeigt im Tiermodell einen attenuierten Phänotyp (*Belyakov, Earl et al. 2003*). Ein älterer, aber ebenso effektiver Ansatz ist das kontinuierliche Passagieren von Virusisolaten in Zellkulturen, die nicht zu dem natürlichen Wirtsspektrum des Virus gehören. Diese Methode führte zum Erhalt von MVA. So wurde das aus der Türkei stammende Vacciniavirus Ankara 1953 im Münchner *Institut für Infektionskrankheiten und Tropenmedizin* auf Chorioallantoismembranen von befruchteten Hühnereiern kultiviert, welches zur Namensweiterung Chorioallantois Vacciniavirus Ankara (CVA) führte (*Sutter and Staib 2003*). In 516 seriellen Passagen von CVA auf primären Hühnerembryo-Fibroblasten (CEF, *chicken embryo fibroblasts*) entstand das Modifizierte Vacciniavirus Ankara (*Mayr, Hochstein-Mintzel et al. 1975*). Während dieser Passagen verlor das Virus große Bereiche seines Genoms (insgesamt 31 kb), wobei

fünf der sechs Hauptdeletionen im rechten und linken Endbereich des Genoms lokalisiert sind (Meyer, Sutter et al. 1991). Fast vollständig deletiert wurde beispielsweise das K1L-Gen. K1L gehört zu den Wirtsspezifitätsgenen, deren Deletion oder Funktionsverlust eine Einschränkung des Wirtsspektrums bewirken. Insgesamt hat das resultierende Virus etliche Gene verloren, deren Funktion vermutlich im Entgegenwirken der Wirtsimmunreaktion liegt oder die das Wirtsspektrum des Virus regulieren. Die hohe Anzahl an Passagen auf CEF-Zellen und die Eliminierung eines Teils des Genoms hat zu einem nahezu vollständigen Verlust der Vermehrungsfähigkeit von MVA auf vielen Säugerzellen geführt. Zwar kann das Virus praktisch alle Zelltypen infizieren, einschließlich nachfolgender Genexpression und Virus-DNA-Replikation, hat aber die Fähigkeit zur Bildung neuer Viruspartikel verloren. Zellen, welche die Virusreproduktion ermöglichen, sogenannte permissive Zellen, sind neben primären Hühnerembryo-Fibroblasten Zellen aus syrischen Hamsternierenfibroblasten (BHK-21, *Baby Hamster Kidney-21*) (Meyer, Sutter et al. 1991; Carroll and Moss 1997; Drexler, Heller et al. 1998).

### **1.2.2 Verwendung von MVA in der Impfstoffentwicklung**

MVA ist durch die fehlende Virulenz und die weitreichende Einschränkung der Reproduktionsfähigkeit in vielen Zelltypen als ein hoch attenuiertes Virus zu bezeichnen und wurde als solches ohne Komplikationen bei der Immunisierung gegen Pocken in 120.000 Personen eingesetzt (Hochstein-Mintzel, Hanichen et al. 1975); (Mayr, Hochstein-Mintzel et al. 1975); (Mayr, Stickl et al. 1978), unter welchen sich auch Patienten mit Immundefekten befanden (Mayr and Danner 1978). Die gute Verträglichkeit von MVA wurde in den folgenden Jahren in Tiermodellen wie Maus oder Makakenaffen unter verschiedenen Bedingungen (Immunstatus der Tiere, Verabreichungsform des Virus) weiter untersucht und bestätigt (Meyer, Sutter et al. 1991; Stittelaar, Kuiken et al. 2001); (Wyatt, Earl et al. 2004) und schließlich auch in klinischen Studien z. B. mit HIV-positiven Patienten gezeigt (Cosma, Nagaraj et al. 2003). Mit Ausrottung der Pocken und Einstellen der generalisierten Impfung der Bevölkerung gewannen die Vacciniaviren zunehmend in einem anderen Gebiet an Bedeutung. Für die Herstellung rekombinanter Impfstoffe auf der Basis viraler Vektorsysteme zählen attenuierte Pockenviren zu den vielversprechendsten Kandidaten (Moss, Carroll et al. 1996). In verschiedener Hinsicht sind sie gegenüber anderen, für diese Anwendung diskutierten Virusfamilien, wie Adeno- oder Herpesviren, besonders gut geeignet. So

vereinen sie eine hohe Aufnahmefähigkeit von Fremdgenen und deren effiziente Produktion (*Smith and Moss 1983; Sutter and Moss 1992; Sutter and Staib 2003*) ebenso wie eine relativ einfache Handhabung als Vakzine mit unerlässlichen Aspekten wie denen der klinischen Sicherheit. MVA hat hier im Vergleich zu anderen Vacciniaviren zusätzlich den Vorteil, dass es als hoch attenuiertes Virus replikationsdefizient ist und sich beim Einsatz im humanen Bereich auch in immungeschwächten Personen als sicher erwiesen hat (*Mayr and Danner 1978*). Die Expression von Fremdgenen, die in MVA inseriert werden erfolgt ebenso effizient wie die Expression viraler Gene und induziert eine antigenspezifische Immunantwort, die sowohl die Bildung von Antikörpern als auch eine zellvermittelte Immunität einschließt (*Seth, Ourmanov et al. 2000; Stittelaar, Wyatt et al. 2000*). In verschiedenen Tiermodellen konnte bereits der Aufbau einer Schutzwirkung gegen Viruserkrankungen durch rekombinante MVA-Viren gezeigt werden. Dabei läßt sich die zielantigenspezifische Immunantwort durch Verabreichung von MVA in Kombination mit anderen Vektorvakzinen (DNA- bzw. Peptidvakzine oder anderer Virusvektor) meist nochmals steigern (*Webster, Dunachie et al. 2005*). Die Verabreichung eines antigenkodierenden DNA-Impfstoffes vor der Immunisierung mit dem entsprechenden rekombinanten MVA hat dabei noch einen weiteren Vorteil. Im Falle einer bereits vorhandenen vektorspezifischen Immunantwort, wie sie z. B. nach einer mit MVA durchgeführten Pockenschutzimpfung vorliegt, kann so trotzdem eine effektive zielantigenspezifische Immunantwort ausgelöst werden (*Yang, Wyatt et al. 2003*).

Erfolgversprechende Ansätze existieren in der Generierung von Vakzinen gegen Infektionen mit HIV (*Amara, Villinger et al. 2001*); (*Barouch, Santra et al. 2001*), Influenzavirus (*Sutter, Wyatt et al. 1994*), Respiratorischem Synzytialvirus (*Wyatt, Whitehead et al. 1999; Olszewska, Suezter et al. 2004*), SARS-Coronavirus (*Bisht, Roberts et al. 2004*) oder Denguevirus (*Men, Wyatt et al. 2000*).

Aber auch gegen parasitäre Krankheiten wie Malaria befinden sich rekombinante MVA-Impfstoffe in der Erprobung (*Schneider, Langermans et al. 2001; McConkey, Reece et al. 2003; Webster, Dunachie et al. 2005*). Ein weiteres Gebiet mit hohem Erfolgspotential ist die Entwicklung von therapeutischen Vakzinen gegen Tumore, mit dem Ziel, durch die Inserierung der kodierenden Sequenzen von Tumor-assoziierten Antigenen in MVA das Immunsystem dahingehend zu stimulieren, diese zu erkennen und die betreffenden Tumorzellen dann zu eliminieren (*Corona Gutierrez, Tinoco et al. 2002; Mulryan, Ryan et al. 2002; Rochlitz, Figlin et al. 2003*).

Für die Nutzung von MVA als viralen Vektor sind vielfältige Anwendungsmöglichkeiten vorhanden, so dass die Entwicklung rekombinanter Impfstoffe auf der Basis von MVA einen

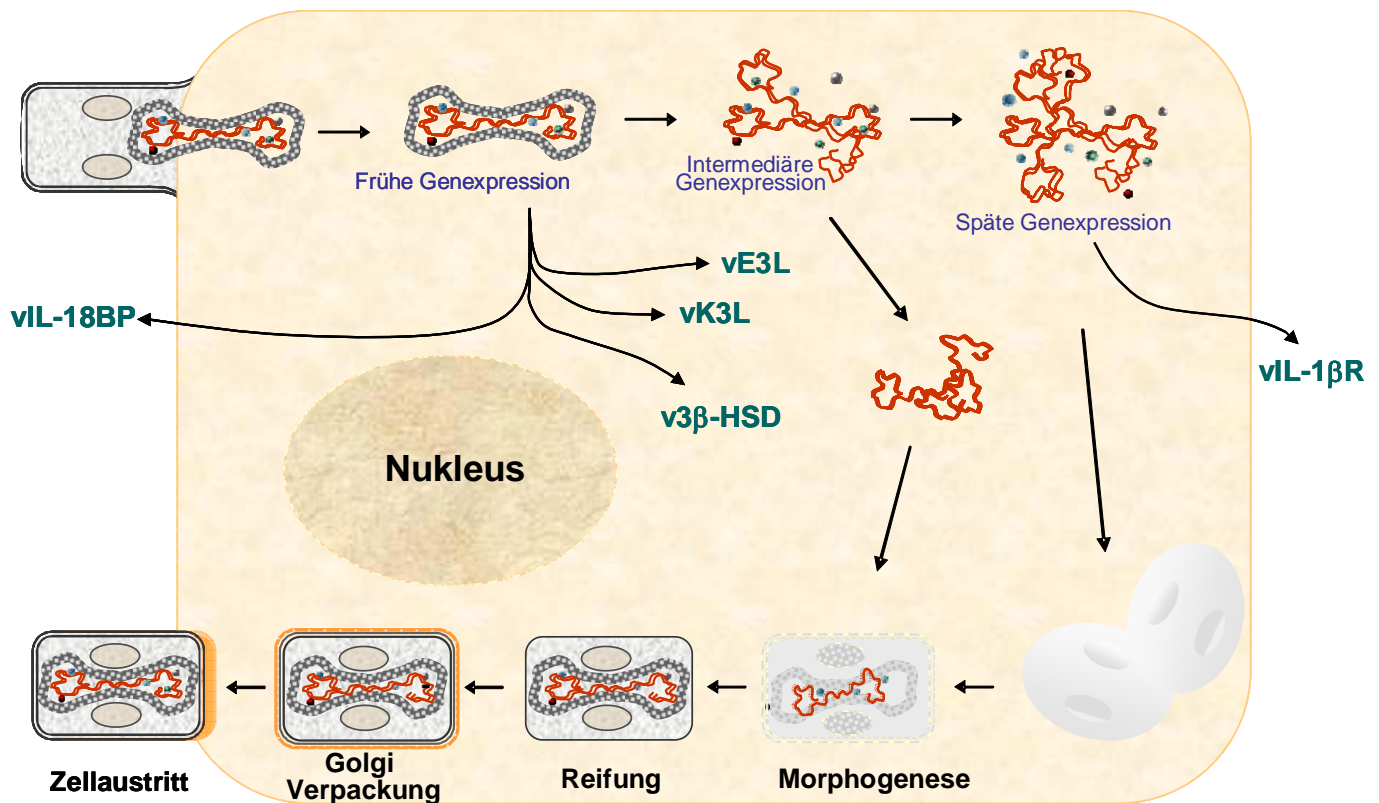


großen zukünftigen Einsatzbereich des Virus darstellen könnte. Ein wichtiger Aspekt zur Generierung effektiver Impfstoffe ist dabei aber auch das Verständnis viraler Mechanismen, die Auswirkungen auf die Virus-Wirtsinteraktionen haben.

### **1.3 Virale Strategien zur Abschwächung der Wirtsspezifischen Immunantwort**

Pockenviren kodieren für eine ganze Reihe an Proteinen, deren Funktion darin besteht, dem Virus zu helfen der Immunantwort des Wirtes zu entgehen.

Diese Immunmodulatoren sind sehr vielfältig und greifen in viele Bereiche der Immunreaktion, durch Interaktion mit der humoralen Immunantwort (Komplementsystem und Antikörper), mit Zytokinen und Interferonen oder letztendlich durch die Hemmung von Apoptose, ein (*Alcami and Koszinowski 2000*). Viele der viralen Faktoren sind dabei Rezeptoren oder Enzyme, die Homologien zu Proteinen aufweisen, die auch im Wirtsorganismus vorhanden sind und dort teilweise regulierende Funktion haben (*Moss 2001*). In MVA sind viele Gene immunmodulierender Proteine deletiert oder fragmentiert. Beispiele hierfür sind das 35 kDa Chemokin-Bindungsprotein, Rezeptoren für den Tumornekrose-Faktor  $\alpha$  oder Interferon- $\alpha$ , - $\beta$  und Interferon- $\gamma$  (*Blanchard, Alcamí et al. 1998*), welche in vielen anderen Pockenviren funktionell exprimiert werden (*Alcami, Khanna et al. 1999; Murphy 2001; (Alcami and Smith 1995)*). Dennoch sind, trotz der in den vielen Passagen entstandenen ausgeprägten Attenuierung des Virus, einige dieser viralen Faktoren funktionell erhalten geblieben (*siehe Abbildung 5, S.23*).



**Abbildung 5: MVA-Proteine mit regulatorischer Wirkung.** Im MVA-Genom sind mehrere Gene für Proteine mit regulatorischer Wirkungsweise kodiert. Das vIL-18BP und der vIL-1βR werden als lösliche Proteine in den Extrazellulärraum abgegeben, die Proteine vE3L, vK3L und v3β-HSD bleiben im Intrazellulärraum. (Abgewandelte Darstellung aus (Moss 2001)).

So exprimiert MVA ein virales ds-RNA-bindendes Protein, E3L, das bei Vacciniaviren die Funktion hat die Interferon-induzierten zellulären Enzyme 2',5'-Oligoadenylat-Synthetase und Proteinkinase PKR zu hemmen oder als ein Homolog zum eukaryontischen Translations-Initiationsfaktor eIF2 das Protein K3L, das bei Vacciniaviren ebenfalls die Wirkung der PKR unterbindet (Chang, Watson *et al.* 1992; Davies, Elroy-Stein *et al.* 1992). Mit der Synthese eines löslichen Interleukin-1β-Rezeptors (Blanchard, Alcamì *et al.* 1998), der proinflammatorisches IL-1β bindet, kann es, wie im Rahmen von Vacciniavirusinfektionen gezeigt, in die unmittelbare Immunantwort eingreifen und durch das lösliche Interleukin-18-Bindungsprotein kann IL-18 gebunden werden (Smith, Bryant *et al.* 2000), wodurch bei einer Vacciniavirusinfektion die Ausschüttung von Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) vermindert wird (Reading and Smith 2003 a). Mit der 3β-Hydroxysteroid Dehydrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$ -Isomerase kodiert MVA für ein Enzym, das wiederum bei Vacciniaviren die Virulenz des Virus fördert, vermutlich

indem es als Schlüsselenzym in der Steroidhormon-Biosynthese die Produktion von immunsupprimierenden Glucokortikoiden steigert (*Reading, Moore et al. 2003*).

Weitere Erkenntnisse über die immunmodulierende Wirkungsweise dieser viralen Proteine im Hinblick auf eine Optimierung des Vektorsystems können durch ihre gezielte Eliminierung und anschließenden Vergleich der entstandenen Viren mit dem Ausgangsvirus erlangt werden. In der vorliegenden Arbeit standen für solche Untersuchungen die viralen Proteine Interleukin-1- $\beta$ -Rezeptor, Interleukin-18-Bindungsprotein und 3 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$ -Isomerase im Mittelpunkt des Interesses.

### 1.3.1 Der Interleukin-1- $\beta$ -Rezeptor

Der virale vIL-1 $\beta$ -Rezeptor ist ein lösliches Protein, das spät im Infektionszyklus von MVA von dem offenen Leserahmen (*open reading frame*, ORF) 184R exprimiert wird. Im Genom von MVA zählt es zu den hochkonservierten Genen - mit VV WR besteht beispielsweise eine 100%ige Übereinstimmung (*Antoine, Scheiflinger et al. 1998*). IL-1 $\beta$  ist ein Zytokin mit einer wichtigen Rolle in der Regulation inflammatorischer Prozesse wie in der unmittelbaren Immunantwort des Wirtes gegen Infektionen (*Überblick in: (Sims 2002)*). Der vacciniavirale IL-1 $\beta$ R bindet mit hoher Affinität murines und humanes IL-1 $\beta$  und wirkt so u.a. fieberhemmend bei Virusinfektionen (*Alcami and Smith 1996; Moss, Symons et al. 1999*). Beide, IL-1 $\beta$  zusammen mit seinem Rezeptor, gehören zur IL-1R/Toll-like Rezeptor-Familie und haben die für diese Familie charakteristischen Mechanismen der Signaltransduktion wie die Aktivierung von NF $\kappa$ B, die im weiteren Verlauf zur Induktion von IFN $\gamma$  führt (*Adachi, Kawai et al. 1998; O'Neill and Greene 1998; O'Neill and Dinarello 2000*).

Die Eliminierung des vIL-1 $\beta$ R wurde bereits in VV WR und MVA durchgeführt. In Vacciniavirus führte die Deletion in intranasal immunisierten Mäusen zu einer Verstärkung der Krankheitssymptome und höherer Todesrate (*Alcami and Smith 1992*), dagegen hatte das Virus in intracerebral immunisierten Tieren eine abgeschwächtere Virulenz (*Spriggs, Hruby et al. 1992*). Die MVA-Deletionsmutante zeigte nach intranasaler Impfung von Mäusen eine verbesserte Langzeitschutzwirkung vor einer tödlichen Orthopockenvirusbelastung (*Staub, Kisting et al. 2005*). Dieses Ergebnis macht die MVA-IL-1 $\beta$ R-Deletionsmutante ( $\Delta$ IL-1 $\beta$ R) zu einem interessanten Virus auch als Basis für die Einführung weiterer Deletionen von immunmodulatorischen Proteinen.

### 1.3.2 Das Interleukin-18-Bindungsprotein

Das Zytokin Interleukin-18 (IL-18), bei seiner Entdeckung 1989 zunächst als „IFN $\gamma$ -induzierender Faktor“ benannt (*Delaleu and Bickel 2004*); (*Ushio, Namba et al. 1996*) ist strukturell homolog zu IL-1 $\beta$ . Damit wirkt es, ebenfalls zur Familie der IL-1R/Toll-like Rezeptoren gehörend, über ähnliche Signaltransduktionswege (*Adachi, Kawai et al. 1998*; *O'Neill and Greene 1998*; *O'Neill and Dinarello 2000*) und beeinflusst so viele verschiedene Reaktionen (*Nakanishi, Yoshimoto et al. 2001*). Als proinflammatorisches Zytokin ist es ein wichtiger Regulator der Aktivität Natürlicher Killerzellen (NK-Zellen) und T-Lymphozyten. In Synergie mit IL-12, dessen Aufgabe vor allem die Steigerung der IL-18-Rezeptor-Genexpression zu sein scheint, induziert es die Ausschüttung von IFN $\gamma$  und wirkt damit in Richtung der TH1-gerichteten Immunantwort (*Yoshimoto, Takeda et al. 1998*). Die Aktivität von IL-18 wird durch IL-18-Bindungsproteine, die glykosyliert sind und in gelöster Form vorliegen, reguliert. Diese zelleigenen Antagonisten existieren in verschiedenen Isoformen und verhindern z. B. die Bindung des Zytokins an seinen Rezeptor (*Kim, Eisenstein et al. 2000*).

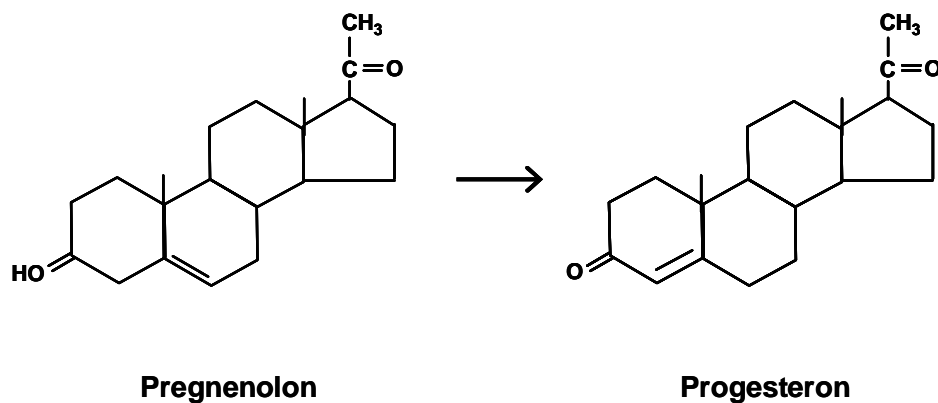
Etliche Pockenviren kodieren für Genprodukte mit hohen Sequenzähnlichkeiten zu IL-18-Bindungsproteinen (*Antoine, Scheifflinger et al. 1998*). Hierzu zählen das Molluscum Contagiosum- und Schweinepockenvirus oder bei den Orthopocken Kuhpocken- und Variolavirus sowie etliche Ectromelia- und Vacciniavirusstämme (z. B. WR, Lister, MVA) (*Novick, Kim et al. 1999*; *Xiang and Moss 1999*). In verschiedenen Ansätzen konnte eine spezifische Bindung der viralen Proteine an IL-18 (human oder murin) gezeigt werden. Dabei waren virusabhängige Unterschiede in der Affinität zu humanem oder murinem IL-18 zu beobachten. So hatten Ectromelia und Kuhpockenviren in Übereinstimmung mit ihrem natürlichen Wirtsspektrum eine größere Bindungsfähigkeit an murines IL-18, da Kuhpocken-, ebenso wie Ectromeliaviren in erster Linie Nagetiere infizieren (*siehe Tabelle 1, S.13*). Allerdings zeigten die vom Molluscum Contagiosumvirus kodierten IL-18-BP ebenso wie das humane IL-18-BP keine speziesspezifische Präferenz (*Xiang and Moss 1999*; *Born, Morrison et al. 2000*; *Smith, Bryant et al. 2000*; *Calderara, Xiang et al. 2001*).

In MVA wird das vIL-18BP mit einer Nukleotidlänge von 363 Basenpaaren (bp) von dem ORF 008L kodiert und in der frühen Phase der Genexpression als ein 13,7 kilo Dalton (kDa) großes Protein exprimiert, welches von der infizierten Zelle sezerniert (*siehe 4.2.2, S.97*) wird. Die Synthese eines vIL-18BP von etlichen Pockenviren deutet auf die Relevanz des IL-18-Zytokins in der Abwehr von Virusinfektionen für den Organismus hin, weshalb die Generierung einer MVA vIL-18BP-Deletionsmutante zu einem verbesserten Impfvirus führen

und aufgrund der Bedeutung von MVA in der humanen Anwendung, dann von großem Nutzen sein könnte.

### 1.3.3 Die 3 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase / $\Delta^5$ - $\Delta^4$ -Isomerase

In der Steroidhormon-Biosynthese wird die 3 $\beta$ -HSD als ein Schlüsselenzym für die Bildung der Hormone aus Cholesterol benötigt. Durch die Abspaltung einer Seitenkette entsteht aus Cholesterol zunächst Pregnenolon. Die anschließende durch die 3 $\beta$ -HSD katalysierte zweistufige Reaktion führt zur Bildung des Gestagens Progesteron (*Stryer 2003*), (siehe Abbildung 6, S.26).



**Abbildung 6: Bildung von Progesteron aus Pregnenolon.** Katalysiert von der 3 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$ -Isomerase erfolgt die Abspaltung der 3 $\beta$ -Hydroxylgruppe von Pregnenolon unter Bildung einer 3-Ketogruppe und die Verlagerung der  $\Delta^5$ -Doppelbindung zu einer  $\Delta^4$ -Doppelbindung, wodurch Progesteron entsteht. (Abgewandelte Darstellung aus (*Stryer 2003*)).

Aus Progesteron können dann in weiteren Schritten die Steroidhormonklassen Glucocorticoide, Mineralcorticoide, Androgene und Östrogene synthetisiert werden. Steroidhormone spielen eine wichtige Rolle für die Differenzierung und das Wachstum verschiedener Gewebe und deren physiologische Funktionen. Glucocorticoide, wie z. B. Cortisol, haben zudem Auswirkungen auf das Immunsystem. Aufgrund der Wichtigkeit der Steroidhormone existiert die 3 $\beta$ -HSD als notwendiges Enzym für deren Biosynthese in unterschiedlichen Isoformen in vielen Spezies und wird in verschiedenen Organen wie Haut, Leber, Lunge, Ovarien und Hoden, vor allem aber in der Nebennierenrinde gebildet. Das

Enzym liegt in den Zellen im Endoplasmatischen Reticulum und in den Mitochondrien membrangebunden vor (Labrie, Simard et al. 1992; Pelletier, Dupont et al. 1992; Martel, Melner et al. 1994);(Simard, Ricketts et al. 2005).

Glucocorticoide beeinflussen das Immunsystem, indem sie z. B. einen hemmenden Effekt auf die Aktivität zytotoxischer T-Lymphozyten ausüben und dadurch immunsuppressiv wirken (Schleimer, Jacques et al. 1984). Damit können sie u.a. in der Therapie entzündlicher und allergischer Symptome oder bei Autoimmunreaktionen eingesetzt werden (Boumpas, Chrousos et al. 1993). Ihre Ausschüttung wird sowohl durch cognitiven als auch physischen Stress angeregt, der wiederum durch bakterielle oder virale Infektionen (Imura and Fukata 1994; Ruzek, Miller et al. 1997) ausgelöst werden kann.

Im Infektionszyklus etlicher Pockenviren wird, wie bei den Vacciniavirusstämmen WR, Copenhagen, Wyeth, Praha oder MVA (Sroller, Kutinova et al. 1998) eine virale 3 $\beta$ -HSD exprimiert. In MVA wird das Enzym durch ein frühes Gen (ORF 157L) kodiert und als Protein mit einer Größe von 39 kDa exprimiert. Entgegen den bereits beschriebenen Proteinen vIL-1 $\beta$ R und vIL-18BP wird die v3 $\beta$ -HSD aber nicht von der infizierten Zelle sezerniert. Da mit diesem Enzym durch eine erhöhte Glucocorticoidsynthese die Möglichkeit gegeben ist die Immunantwort des infizierten Organismus zu beeinflussen, stellt die Eliminierung des Gens mit anschließender Charakterisierung der MVA-3 $\beta$ -HSD-Deletionsmutante einen weiteren möglichen Ansatz zur Konstruktion optimierter MVA-Impfstoffe dar.

## **1.4 Generierung eines effektiven hoch attenuierten Impfvectorsystems**

Rekombinante Viren versprechen ein hohes Einsatzpotential zum Schutz vor viralen Infektionskrankheiten für die bis heute keine Vakzine vorhanden ist (z. B. HIV), wie auch zur Therapie von Tumorerkrankungen. Da Vacciniaviren in der Vergangenheit bereits erfolgreich als Impfviren verwendet wurden und durch die weltweite Ausrottung der Pockenerkrankung nicht mehr zur kontinuierlichen Impfung dagegen benötigt werden, bietet sich ihre Verwendung als Impfvektoren an.

Eine der wichtigsten Anforderungen an ein ausgereiftes virales Vektorsystem ist die sichere medizinische Verwendbarkeit. Dieses schließt die risikofreie Verabreichung an Personen mit schwachem oder noch nicht ausgereiftem Immunsystem wie alte Menschen oder Kinder, oder immunsupprimierte Patienten, z. B. nach Transplantationen, ein.

Ein weiterer Aspekt ist die Immunogenität des Impfvirus, die nötig ist um einen langanhaltenden effektiven Immunschutz zu erzielen. Wünschenswert ist hierfür die Bildung einer Antikörper- und T-Zell-bezogenen Immunantwort. Die Immunreaktion gegen das Vektorkonstrukt ansich sollte dabei geringfügig sein und sich vor allem gegen das inserierte Fremdantigen richten. So kann bei der Impfung gegen eine Infektionskrankheit ein spezifischer, möglichst hoher und dauerhafter Schutz vor dieser aufgebaut werden und zudem ist dadurch ein mehrfacher Einsatz des Vektors mit anderen Antigenen zur Impfung gegen weitere Erkrankungen möglich.

Die Untersuchung viraler Proteine und deren Bedeutung im Infektionszyklus hat zum Ziel, die Vorgänge im Wirtsorganismus nach Infektion mit dem Virus besser zu verstehen. Die Kenntnisse der Mechanismen, die zur Eliminierung des Virus aus dem infizierten Organismus und zum Aufbau einer spezifischen Immunantwort führen, können nachfolgend der Konstruktion eines optimalen Impfvektors dienen. Eine vielversprechende Möglichkeit zur Attenuierung des Virus ist die Deletion viruseigener Genprodukte, die immuninhibierend wirken. Die Herstellung von Einfach- oder auch Mehrfach-MVA-Deletionsmutanten und deren Untersuchung hinsichtlich einer möglichen Steigerung der Immunogenität könnte deshalb einen wichtigen Schritt in der Generierung eines ausgereiften viralen Vektorsystems darstellen.

Die vorliegende Arbeit beinhaltet die Generierung von MVA-Mutanten durch Eliminierung der Gene, die für das virale IL-18-BP oder/und die 3 $\beta$ -HSD kodieren. Die Charakterisierung der hergestellten Viren erfolgte anschließend in *in vitro*-Experimenten und wurde *in vivo* im Tiermodell Maus fortgesetzt.

## 2 Materialien

### 2.1 Chemikalien und Biochemikalien

<i>Bezeichnung</i>	<i>Bezugsquelle</i>
<b><math>\beta_2</math>-Mikroglobulin (<i>human</i>)</b>	Sigma ( <i>München</i> )
<b>1 Kb DNA-Größenstandard</b>	Invitrogen GmbH ( <i>Karlsruhe</i> )
<b>2-Mercaptoethanol</b>	Sigma ( <i>München</i> )
<b>Agarose</b>	Gibco/BRL ( <i>Eggenstein</i> )
<b>Ammoniumperoxodisulfat (APS)</b>	Merck ( <i>Darmstadt</i> )
<b>Ampicillin</b>	Serva ( <i>Heidelberg</i> )
<b>Bacto Agar</b>	Difco Laboratories ( <i>Detroit, USA</i> )
<b>BMS</b>	Biochrom KG ( <i>Berlin</i> )
<b>BMS (<i>Basal Medium Supply</i>)</b>	Biochrom KG ( <i>Berlin</i> )
<b>Brefeldin A (<i>BD Golgi Plug</i>)</b>	BD Pharmingen ( <i>Hamburg</i> )
<b>Bromphenolblau</b>	Serva ( <i>Heidelberg</i> )
<b>BSA</b>	Loewe Biochemica ( <i>Sauerlach</i> )
<b>Casein-Hydrolysat</b>	Gibco/BRL ( <i>Eggenstein</i> )
<b>Chloroform</b>	Merck ( <i>Darmstadt</i> )
<b>Coomassie-Blau G250</b>	Sigma ( <i>München</i> )
<b>Cytosin-Arabinose</b>	Sigma ( <i>München</i> )
<b>D(+)-Glucose</b>	Merck ( <i>Darmstadt</i> )



<b>dCTP, <sup>32</sup>P-markiert</b>	Hartmann Analytic ( <i>Braunschweig</i> )
<b>Desoxyribonukleotide</b>	Roche ( <i>Mannheim</i> )
<b>DMSO</b>	Merck ( <i>Darmstadt</i> )
<b>EDTA</b>	Sigma ( <i>München</i> )
<b>EMA</b>	Invitrogen GmbH ( <i>Karlsruhe</i> )
<b>EMEM</b>	Cambrex, BioWhittaker ( <i>Verviers, Belgien</i> )
<b>Ether</b>	Squibb & Sons ( <i>New York, USA</i> )
<b>Ethidiumbromid</b>	Serva ( <i>Heidelberg</i> )
<b>FBS (<i>Fetal Bovine Serum</i>)</b>	Biochrom KG ( <i>Berlin</i> )
<b>Glyzerin</b>	Roth ( <i>Karlsruhe</i> )
<b>Isoamylalkohol</b>	Merck ( <i>Darmstadt</i> )
<b>Laktalbumin</b>	Invitrogen GmbH ( <i>Karlsruhe</i> )
<b>L-Glutamin</b>	Serva ( <i>Heidelberg</i> )
<b>Magermilchpulver</b>	Töpfer ( <i>Dietmannsried</i> )
<b>N,N'-Bisacrylamid</b>	Serva ( <i>Heidelberg</i> )
<b>Nonidet P-40 (NP-40)</b>	Serva ( <i>Heidelberg</i> )
<b>o-Dianisidine</b>	Sigma ( <i>München</i> )
<b>Pen-Strep</b> (10000 u Penicillin/ml, 10 mg/ml Streptomycin)	Cambrex, BioWhittaker ( <i>Verviers, Belgien</i> )
<b>Phenol</b>	Roth ( <i>Karlsruhe</i> )
<b>PMSF</b>	Sigma ( <i>München</i> )
<b>Probidium-Iodid</b>	BD Pharmingen ( <i>Hamburg</i> )

<b>Protein-Größenstandard „BroadRange“ (6-175 kDa)</b>	New England BioLabs ( <i>Schwalbach</i> )
<b>Psoralen (4` Aminomethyl Trioxalen)</b>	Sigma ( <i>München</i> )
<b>RPMI 1640 (1x)</b>	Biochrom KG ( <i>Berlin</i> )
<b>SDS</b>	Serva ( <i>Heidelberg</i> )
<b>TEMED</b>	Bio-Rad ( <i>München</i> )
<b>Tris</b>	Roth ( <i>Karlsruhe</i> )
<b>Trypanblau</b>	Biochrom KG ( <i>Berlin</i> )
<b>Tween 20</b>	Sigma ( <i>München</i> )
<b>Yeast Extract</b>	Gibco/BRL ( <i>Eggenstein</i> )

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien zum Ansetzen von Medien, Puffer- und Reaktionslösungen wurden von Roth (*Karlsruhe*), Sigma (*München*), Merck (*Darmstadt*) oder Roche (*Mannheim*) bezogen.

## 2.2 Puffer und Lösungen

Falls nicht anders angegeben, wurden die Lösungen mit ddH<sub>2</sub>O angesetzt.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<b>Coomassie-Entfärber</b>	90 ml MeOH 50 % 10 ml Eisessig
<b>Coomassie-Färbelösung</b>	90 ml MeOH 50 % 10 ml Eisessig 0,25 g Coomassie-Blau G250
<b>DNA-Probenpuffer (5x)</b>	50 % TE 50 % Glycerin 0,04 % Bromphenolblau
<b>Erythrozyten-Lysepuffer pH 7,2</b>	0,15 M NH <sub>4</sub> Cl 10 mM KHCO <sub>3</sub> 0,1 mM Na <sub>2</sub> EDTA
<b>FACS-Puffer</b>	PBS-Puffer pH 7,4 1 % FBS 0,02 % NaN <sub>3</sub>
<b>Impfstoffpuffer</b>	1 mM Tris/HCl, pH 7,5
<b>NP40-Zellysepuffer</b>	50 mM Tris pH 7,5 0,15 M NaCl 1,0 % NP-40 0,1 % SDS
<b>PBS-Puffer pH 7,4</b>	0,14 M NaCl 2,7 mM KCl 3,2 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
<b>Proteinase K</b>	1 mg/ml Proteinase K 1,5 mM CaCl <sub>2</sub>
<b>Proteinaseinhibitoren (1000x)</b>	0,2 mg/ml Antipain 0,2 mg/ml Aprotinin 0,2 mg/ml Leupeptin
<b>SDS-PAGE-Laufpuffer (10x) pH 8,3</b>	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % SDS

<b>SDS-PAGE-Probenpuffer (5x)</b>	250 mM Tris pH 6,8 10 % SDS 0,5 % Bromphenolblau 12,5 % 2-Mercaptoethanol 20 % Glyzerin
<b>Southern-Blot-Hybridisierlösung</b>	0,25 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 7,0 % SDS
<b>Southern-Blot-Transferpuffer</b>	0,4 M NaOH 0,6 M NaCl
<b>Southern-Blot-Waschpuffer 1</b>	20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 5,0 % SDS
<b>Southern-Blot-Waschpuffer 2</b>	20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,0 % SDS
<b>SSC (10x) pH 7,5</b>	1,5 M NaCl 0,15 M Na-Citrat
<b>TAE-Puffer</b>	40 mM Tris/HCl pH 8,0 1 mM EDTA 20 mM Natriumacetat
<b>TEN-Puffer (10x) pH 7,4</b>	100 mM Tris 10 mM EDTA 1 M NaCl
<b>TE-Puffer (10/0,1)</b>	10 mM Tris/HCl 0,1 mM EDTA pH 8,0
<b>Trypsin-EDTA</b>	0,25 % Trypsin 0,02 % EDTA in PBS-Puffer pH 7,4
<b>Western-Blot-Transferpuffer pH 8,3</b>	25 mM Tris-Base 192 mM Glycin 20 % MeOH
<b>Western-Blot-Waschpuffer</b>	PBS-Puffer pH 7,4 0,05 % Tween 20

## 2.3 Nährmedien

### 2.3.1 Nährmedien für Bakterien

<i>Bezeichnung</i>	<i>Zusammensetzung</i>
<b>LB-Agar</b>	LB-Medium mit 1,5 % Agar
<b>LB-Medium</b>	1 % Caseinextrakt 0,5 % Yeast Extrakt 0,5 % NaCl 0,1 % Glukose pH 7,0
<b>LB<sub>Amp</sub>-Medium</b>	LB-Medium 100µg/ml Ampicillin

### 2.3.2 Nährmedien für eukaryontische Zellen

<i>Bezeichnung</i>	<i>Zusammensetzung</i>
<b>Basismedium</b>	RPMI 1640 10 % FBS (bei 56 °C hitzeinaktiviert) 1 % Pen-Strep
<b>CEF-Medium</b>	EMEM 10 % BSA 5 % Laktalbumin (ohne Antibiotika)
<b>Einfriermedium</b>	90 % FBS (bei 56 °C hitzeinaktiviert) 10 % DMSO
<b>T-Zell-Medium</b>	Basismedium 50 µM 2-Mercaptoethanol

## 2.4 Verbrauchsmaterialien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b>3MM-Papier</b>	Whatman ( <i>Maidstone, USA</i> )
<b>Einwegpipetten „Cellstar“ (1 - 25 ml)</b>	Greiner ( <i>Nürtingen</i> )
<b>Elektrotransformationsküvetten</b>	Bio-Rad ( <i>München</i> )
<b>Eppendorf-Reaktionsgefäße (0,2 -2,0 ml)</b>	Eppendorf ( <i>Hamburg</i> )
<b>FACS-Röhrchen <i>Titertube</i></b>	Bio-Rad ( <i>München</i> )
<b>Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)</b>	BD Biosciences ( <i>Bedford, USA</i> )
<b>Injektionskanülen (27G <math>\frac{3}{4}</math>) <i>Sterican 100</i></b>	Braun ( <i>Melsungen</i> )
<b>(20G x 1-<math>\frac{1}{2}</math>-Kanüle) <i>Eco Lab</i></b>	NeoLab ( <i>Heidelberg</i> )
<b>Injektionsspritzen (<i>Omnifix-F 1 ml, 5 ml, 20 ml</i>)</b>	Braun ( <i>Melsungen</i> )
<b>Kryoröhrchen „Cryo Tube Vials“</b>	Nunc ( <i>Wiesbaden</i> )
<b>Nitrozellulosefilter</b>	Schleicher & Schuell ( <i>Dassel</i> )
<b>Nitrozellulosemembran (0,2 <math>\mu</math>m) <i>Trans-Blot</i></b>	Bio-Rad ( <i>München</i> )
<b>Nylonmembran <i>Zeta Probe GT</i></b>	Bio-Rad ( <i>München</i> )
<b>Petrischalen</b>	Nunc ( <i>Wiesbaden</i> )
<b>Röntgenfilme (<i>BioMax MR</i>)</b>	Kodak ( <i>Cedex, Frankreich</i> )
<b>Sterilfilter (<i>Minisart 0,2-0,45 <math>\mu</math>m</i>)</b>	Sartorius AG ( <i>Göttingen</i> )
<b>Ultrazentrifugenröhrchen (<i>UltraClear</i>)</b>	Beckman ( <i>München</i> )
<b>Zellkulturplatten / -flaschen</b>	Greiner ( <i>Nürtingen</i> ), Corning Inc. ( <i>New York, USA</i> ) Nunc ( <i>Wiesbaden</i> )

<b>Zellschaber</b>	Corning Inc. (New York, USA)
<b>Zellsiebe (Falcon 100 µm)</b>	BD Biosciences (Bedford, USA)

## 2.5 Kommerzielle Reaktionssätze

<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b>BD Opt EIA™ Mouse IFN<math>\gamma</math> ELISA Set</b>	BD Pharmingen (Hamburg)
<b>BD Cytotfix/Cytoperm</b>	BD Pharmingen (Hamburg)
<b>FuGENE 6® Transfektions-Reagenz</b>	Roche (Mannheim)
<b>Lumi-Light® (Western-Blot Substrat)</b>	Roche (Mannheim)
<b>PCR-Master-Mix</b>	Roche (Mannheim)
<b>QIAGEN Plasmid Maxi Kit</b>	QIAGEN (Hilden)
<b>QIAprep Spin Miniprep Kit</b>	QIAGEN (Hilden)
<b>QIAquick Gel Extraction Kit</b>	QIAGEN (Hilden)
<b>QIAquick PCR Purification Kit</b>	QIAGEN (Hilden)
<b>Rediprime II Random Prime Labelling System</b>	Amersham Biosciences (Freiburg)
<b>TMB-Substrat (ELISA)</b>	BD Pharmingen (Hamburg)

## 2.6 Plasmide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Vektorplasmide standen im Labor bereits zur Verfügung.

Bezeichnung	Bezugsquelle
pΔK1L	(Staib, Drexler et al. 2000)
pΔK1L_2	Im Labor vorhanden, unveröffentlicht (C.Staib)

## 2.7 Synthetische Oligonukleotide (Primer)

Alle Oligonukleotide wurden von Herrn Linzner (GSF, Neuherberg) mit einer ABI-Synthesemaschine hergestellt und lyophilisiert geliefert. Die Oligonukleotide wurden für PCR-Analysen und Sequenzierreaktionen eingesetzt.

### Primer zur Klonierung der flankierenden Sequenzen und Detektion der Gensequenz des MVA-Gens 008L (vIL-18BP):

#### 008L-Flanke 1

Primer 1<sub>008L</sub>: 5' – GCA TGG GCC CAA CTT ATC TAG AGA TAC AGG – 3'

Primer 2<sub>008L</sub>: 5' – CAT GCG GCC GCT AGT GCG TGC TAC TAT TTT TA – 3'

#### 008L-Flanke 2

Primer 3<sub>008L</sub>: 5' – GCA TTT CGA ACT TGC CAA AAT ATC ACT AG – 3'

Primer 4<sub>008L</sub>: 5' – CAT ACG CGT TAT AGC CAT TGC CAT CAA – 3'

#### Geninterner Primer

int<sub>008L</sub>: 5' – AAT CAT CAC TCT ACG TAA AG – 3'



---

**Primer zur Klonierung der flankierenden Sequenzen und Detektion der Gensequenz des MVA-Gens 157L (3 $\beta$ -HSD):**

**157L-Flanke 1**

Primer 1<sub>157L</sub>:        5' – GCA GGG CCC GTC TCA TTA AAA ATT TGG CAA CG – 3'

Primer 2<sub>157L</sub>:        5' – CAT GCG GCC GCC GAA CGA ACA CGG AAA TGG C – 3'

**157L-Flanke 2**

Primer 3<sub>157L</sub>:        5' – GCA TTC GAA TGC TGC CAC TCA TAA TAT CAG – 3'

Primer 4<sub>157L</sub>:        5' – CAT ACG CGT CAC CCC TCT TAT CTC TAT GG– 3'

**Geninterner Primer**

int<sub>157L</sub>:                5' – GAC AAA TTG ATG AAA GTC TTT TAC – 3'

**Primer zur Detektion der K1L-Gensequenz:**

K1Lint-1:              5' – TGA TGA CAA GGG AAA CAC CGC – 3'

K1Lint-2:              5' – GTC GAC GTC ATA TAG TCG AGC – 3'

## 2.8 Synthetische Oligopeptide

<b>Kurzbezeichnung</b>	<b>Aminosäureposition</b>	<b>Aminosäuresequenz</b>	<b>Ursprung</b>
<b>Flu</b>	58-66	GILGFVFTL	Influenza Virus Matrix Protein M1
<b>VP35#1</b>	184-192 bei MVA-H3L	SLSAYIIRV	Hüllprotein VP35 der Orthopockenviren

Die Oligopeptide wurden von der Firma *Affina (Berlin)* bezogen.

## 2.9 Enzyme

<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b>Alkalische Phosphatase</b>	Roche ( <i>Mannheim</i> )
<b>Proteinase K</b>	Sigma ( <i>München</i> )
<b>Pwo-DNA-Polymerase</b>	Roche ( <i>Mannheim</i> )
<b>Restriktionsendonukleasen</b>	Roche ( <i>Mannheim</i> ), New England BioLabs ( <i>Schwalbach</i> )
<b>T4-DNA-Ligase</b>	Roche ( <i>Mannheim</i> )
<b>Trypsin-EDTA (10x)</b>	Invitrogen GmbH ( <i>Karlsruhe</i> )

## 2.10 Antikörper

<b>Antikörperspezifität</b>	<b>Konjugat</b>	<b>Isotyp</b>	<b>Einsatzzweck</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b>Anti-IL-18BP</b>	-	Kaninchen polyklonal	Primärantikörper (siehe 3.3.3.2)	Geschenk von Prof. Dr. Marc Buller, Saint Louis, MO, USA
<b>Anti-Mouse CD16/CD32 (monoklonal)</b>	-	Rat IgG <sub>2b</sub>	F <sub>c</sub> -Block (siehe 3.6.3 und 3.6.6)	BD Pharmingen (Hamburg)
<b>Anti-Mouse CD4 (monoklonal)</b>	APC	Rat IgG <sub>2a</sub> , κ	FACS-Färbung (siehe 3.6.3)	BD Pharmingen (Hamburg)
<b>Anti-Mouse CD4 (monoklonal)</b>	PerCP	Rat IgG <sub>2a</sub> , κ	FACS-Färbung (siehe 3.6.3 und 3.6.6)	BD Pharmingen (Hamburg)
<b>Anti-Mouse CD49b/Pan-NK</b>	FITC	Rat IgM, κ	FACS-Färbung (siehe 3.6.3)	BD Pharmingen (Hamburg)
<b>Anti-Mouse CD62L (monoklonal)</b>	APC	Rat IgG <sub>2a</sub> , κ	FACS-Färbung (siehe 3.6.6)	BD Pharmingen (Hamburg)
<b>Anti-Mouse CD8a (monoklonal)</b>	PE	Rat IgG <sub>2a</sub> , κ	FACS-Färbung (siehe 3.6.3 und 3.6.6)	BD Pharmingen (Hamburg)
<b>Anti-Mouse IFN-γ (monoklonal)</b>	FITC	Rat IgG <sub>1</sub>	FACS-Färbung (siehe 3.6.6)	BD Pharmingen (Hamburg)
<b>Anti-Rabbit IgG</b>	Peroxidase	Ziege polyklonal	Sekundärantikörper (siehe 3.3.3.2 und 3.5.3)	Dianova (Hamburg)
<b>Anti-Rat IgG<sub>1</sub>, κ (monoklonal)</b>	FITC	Rat IgG <sub>1</sub> , κ	FACS-Färbung (siehe 3.6.6)	BD Pharmingen (Hamburg)
<b>Anti-Vacciniavirus</b>	-	Kaninchen polyklonal	Primärantikörper (siehe 3.5.3)	Quartett (Berlin)

## 2.11 Viren

<b>Bezeichnung</b>	<b>Beschreibung</b>
<b>Modifiziertes Vacciniavirus Ankara MVA-II<sub>new</sub></b> <b>(MVA (Wildtyp))</b>	Wildtypvirus basierend auf MVA-F6 ( <i>Staib, Lowel et al. 2003</i> ) Virus stand im Labor bereits zur Verfügung
<b>vΔInterleukin-1β Rezeptor</b> <b>(ΔIL-1βR, Δ184R )</b>	Einfach-Deletionsmutante (Delta, Δ), basierend auf MVA-II <sub>new</sub> Virus stand im Labor bereits zur Verfügung
<b>vΔ Interleukin-18 Bindungsprotein</b> <b>(ΔIL-18BP, Δ008L)</b>	Einfach-Deletionsmutante, basierend auf MVA-II <sub>new</sub>
<b>vΔ3β-Hydroxysteroid Dehydrogenase</b> <b>(Δ3β-HSD, Δ157L)</b>	Einfach-Deletionsmutante, basierend auf MVA-II <sub>new</sub>
<b>ΔIL-1βR ΔIL-18BP</b> <b>(Δ184R Δ008L)</b>	Doppel-Deletionsmutante, basierend auf MVA-II <sub>new</sub>
<b>ΔIL-1βR Δ3β-HSD</b> <b>(Δ184R Δ157L)</b>	Doppel-Deletionsmutante, basierend auf MVA-II <sub>new</sub>
<b>ΔIL-18BP Δ3β-HSD</b> <b>(Δ008L Δ157L)</b>	Doppel-Deletionsmutante, basierend auf MVA-II <sub>new</sub>
<b>ΔIL-1βR ΔIL-18BP Δ3β-HSD</b> <b>(Δ184R Δ008L Δ157L)</b>	Dreifach-Deletionsmutante, basierend auf MVA-II <sub>new</sub>

## 2.12 Organismen

### 2.12.1 Bakterien

<b>Bakterienstamm</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b><i>E.coli</i> DH10B</b>	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) F80 <i>lacZ</i> ΔM15 <i>lacX74 recA1 endA1 ara</i> Δ139 Δ( <i>ara, leu</i> )7697 <i>galU</i> <i>galK</i> λ- <i>rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>nupG</i>	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)

### 2.12.2 Eukaryontische Zellen

<b>Zelllinie</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Bezugsnummer</b>
<b>BHK-21</b>	Hamsternieren-Fibroblasten (1Tag alt)	ATCC CCL-10
<b>CEF</b>	Primäre Hühnerembryo-Fibroblasten	
<b>HeLa</b>	Epithelzellen aus humanem, karzinogenem Gebärmutterhalsgewebe	ATCC CCL-2
<b>RK13</b>	Kaninchennierenzellen	ATCC CCL-37
<b>T-Lymphozyten</b>	Primäre murine Lymphozyten	

### 2.12.3 Mäuse

<b>Mausstamm</b>	<b>MHC-Haplotyp</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b>BALB/c</b>	H-2K <sup>d</sup>	Charles River (Sulzfeld)
<b>C57BL/6N</b>	H-2K <sup>b</sup>	Charles River (Sulzfeld)
<b>HHD-I</b>	HLA-A*0201	GSF-Tierhaltung (Neuherberg) (Pascolo, Bervas et al. 1997)

## 2.13 Geräteliste

<b>Gerätebezeichnung</b>	<b>Modell / Typ</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b>Blockthermostat</b>	BT 1302	HLC BioTech (Bovenden)
<b>Elektrotransformator</b>	<i>E. coli</i> Pulser	Bio-Rad (München)
<b>ELISA-Photometer</b>	<i>Sunrise</i>	TECAN (Crailsheim)
<b>Fluoreszenzdurchflusszytometer</b>	FACScalibur	BD Biosciences (Heidelberg)
<b>Gefrierschrank (-20 °C)</b>	Comfort	Liebherr (Ochsenhausen)
<b>Gefrierschrank (-80 °C)</b>	Ult 2090	Revco (Asheville, USA)
<b>Geigerzähler (beta-gamma-Detektor)</b>	LB 122	Berthold (Bad Wildbad)
<b>Gel-Analysegerät</b>	<i>Gel Doc 2000</i>	Bio-Rad (München)
<b>Hämatozytometer</b>	<i>Neubauer Zählkammer</i>	Karl Hecht KG (Sondheim)
<b>Inkubationsschüttler</b>	Innova 4430	New Brunswick Scientific (Nürtingen)
<b>Kühlschrank (4 °C)</b>	UT6-K	Bauknecht (Stuttgart)
<b>Magnetrührer</b>	Ikamag Reo	IKA Werke (Staufen)
<b>Mehrkanalpipetten</b>	Transferpette-12 (20-200)	Brand (Wertheim)
	Calibra 852	Socorex (Ecublens, Schweiz)
<b>Mikropipetten</b>	Pipetman P10-1000	Gilson (Middleton, USA)
<b>Mikroskope</b>	Optech Biostar B5	Binder Labortechnik (Herbertshausen)
	Axiovert 25	Carl Zeiss (Oberkochen)
<b>Mikrowellenherd</b>	900W	Siemens (München)

<b>Netzgeräte</b>	Model 200 / 2.0	Bio-Rad ( <i>München</i> )
	PowerPac 300	Bio-Rad ( <i>München</i> )
<b>PCR-Gerät</b>	GeneAmp 2400	Perkin Elmer ( <i>Rodgau</i> )
	GeneAmp 2700	
<b>pH-Meter</b>	InoLab pH Level 1	WTW GmbH ( <i>Weilheim</i> )
<b>Phosphorimager</b>	Personal Molecular Imager FX	Bio-Rad ( <i>München</i> )
<b>Pipettierhilfe</b>	Pipetus-akku	Hirschmann ( <i>Eberstadt</i> )
<b>Spektralphotometer</b>	Cary 50 Bio	Varian ( <i>Darmstadt</i> )
	Gene Quant II	Pharmacia Biotech
<b>Sterilbank</b>	HERAsafe HS 12	Heraeus ( <i>Hanau</i> )
<b>Thermoschüttler</b>	Thermomixer 5436	Eppendorf ( <i>Hamburg</i> )
<b>Ultraschallgerät</b>	Sonopuls HD200	Bandelin ( <i>Berlin</i> )
	Schallspitzen: TS73, UW200	
<b>UV-Crosslinker</b>	Stratalinker	Stratagene ( <i>La Jolla, USA</i> )
<b>Vortex-Schüttler</b>	VF2	IKA Werke ( <i>Staufen</i> )
<b>Waage</b>	SPO 51	Scaltec, Denver Instruments ( <i>Göttingen</i> )
<b>Wärmeschrank</b>	HERA cell	Heraeus ( <i>Hanau</i> )
<b>Wärmeschüttler</b>		HAT Infors AG ( <i>Bottmingen</i> )
<b>Wasserbad</b>	WB 7 Liter	Memmert ( <i>Schwalbach</i> )
<b>Zentrifuge</b>	Avanti J-25	Beckman ( <i>München</i> )
<b>Zentrifuge</b>	Megafuge 1.0R	Heraeus ( <i>Hanau</i> )
<b>Zentrifuge</b>	Biofuge fresco	Heraeus ( <i>Hanau</i> )
<b>Zentrifuge</b>	Optima LE-80K	Beckman ( <i>München</i> )

## **2.14 Computerprogramme**

Folgende Programme dienen dem Erstellen von Abbildungen und Diagrammen und dem Verfassen dieser Arbeit.

Microsoft Office XP (Excel, PowerPoint, Word)

Adobe Photoshop 5.5

GraphPad Prism 4

Clone Manager 5

EndNote Program 6



## 3 Methoden

### 3.1 Bakteriologische Methoden

#### 3.1.1 Kultivierung von Bakterien

Die Anzucht der Bakterien zur Herstellung elektrompetenter Zellen (*siehe 3.1.4, S.46*) oder zur Isolation von DNA (*siehe 3.2.1 S.48*) erfolgte in LB-Flüssigmedium über Nacht im 37°C-Schüttler. Zum Erhalt von Einzelkolonien wurden LB-Agar-Platten verwendet, die ebenfalls über Nacht bei 37°C inkubiert wurden.

#### 3.1.2 Kryokonservierung prokaryontischer Zellen

Zur Konservierung von Bakterien wurden 1-2 ml einer ÜN-Kultur 1:1 mit einer 50%igen Glycerinlösung versetzt und anschließend in Aliquots bei -80°C gelagert.

#### 3.1.3 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Zur Herstellung elektrokompetenter Bakterien wurde der *E. coli*-Stamm DH10B eingesetzt.

5 ml einer ÜN-Kultur, angeimpft aus einer Einzelkolonie, wurden 1:100 mit LB-Medium verdünnt und weiter im 37°C-Schüttler inkubiert bis die Bakterien die exponentielle Wachstumsphase erreicht hatten, messbar durch eine OD<sub>600</sub> von 0,3-0,5.

Nach Abkühlung der Suspension in einem Eisbad für 20 min wurden die Bakterien bei 5000 Upm 4°C 15 min pelletiert (*Zentrifuge Avanti J-25, Rotor JA-10, Beckman*), 3 x in 500 ml eisgekühltem ddH<sub>2</sub>O gewaschen und in 10 ml 10% Glycerin-Lösung resuspendiert.

Nach einer erneuten Zentrifugation bei 5000 Upm, 4°C für 12 min wurde die Bakterien in 1,5 ml eisgekühlter 10% Glycerin-Lösung aufgenommen und sofort in Aliquots von 50 µl in 0,5 ml-Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

#### 3.1.4 Elektrotransformation von Bakterien

Die elektrokompetenten Bakterienzellen (50 µl) wurden 10 min auf Eis aufgetaut und anschließend 1 min mit 1-5 ng Vektor DNA (z. B. 1-10 µl Ligationsansatz) inkubiert. Die Transformation der Zellsuspension erfolgte in einer Elektrotransformationsküvette (Ø 2 mm)

bei 2,5 kV, 200  $\Omega$  und 25  $\mu$ F (*E. coli* Pulser, Bio-Rad). Die Zellsuspension wurde unmittelbar danach in 1 ml LB-Medium aufgenommen und in einem 1,5 ml- Reaktionsgefäß 1 h bei 120 Upm (*HT Infors AG, Bottmingen*) in einem 37 °C-Schüttler kultiviert.

Von den Bakterien wurden 10% bzw. 90% nach Reduktion des Mediums durch Zentrifugation bei 2000 Upm für 1 min (*Biofuge fresco, Heraeus*) auf ampicillinhaltigen LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die erhaltenen Einzelkolonien wurden auf die transformierte DNA hin durch Plasmidisolierung (*siehe 3.2.1 S.48*) und Restriktionsverdau (*siehe 3.2.6.1, S.52*) untersucht.

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 Plasmid-Isolierung

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*-Zellen beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse der Zellen. Die chromosomale DNA sowie Proteine können hierbei durch Zentrifugation abgetrennt und die Plasmid-DNA dann durch Fällung isoliert werden.

#### 3.2.1.1 Plasmidisolierung im analytischen Maßstab (Mini-Präp)

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*-Zellen ist einfach und schnell mit kommerziell erhältlichen Kits durchzuführen. Verwendung fand für kleinere DNA-Mengen der *QIAprep Spin Miniprep Kit* der Firma *QIAGEN*. Nach der alkalischen Lyse der Zellen erfolgt die Abtrennung der Plasmid-DNA durch Bindung an die Matrix kleiner Säulen.

Es wurden 2 ml LB<sub>Amp</sub>-Medium mit der Bakterienkultur angeimpft und über Nacht im 37°C-Schüttler inkubiert. Nach Zentrifugation bei 2000 Upm für 5 min (*Biofuge fresco*, *Heraeus*) wurde das Bakterienpellet so behandelt wie im Handbuch des Herstellers beschrieben. Eluiert wurde wahlweise mit 50 µl ddH<sub>2</sub>O oder TE-Puffer (10/0,1).

#### 3.2.1.2 Plasmidisolierung im präparativen Maßstab (Maxi-Präp)

Die DNA-Gewinnung im größeren Maßstab erfolgte mit Hilfe des *QIAGEN Plasmid Maxi Kits*. Hierfür wurden 200 ml ampicillinhaltiges LB-Medium mit 2 ml einer Bakterien-Vorkultur angeimpft und über Nacht inkubiert. Gereinigt wurde durch Anionenaustauscher-Säulen unter Verwendung der mitgelieferten Wasch- und Elutionspuffer. Durch anschließende Fällung mit Isopropanol konnte die DNA aufkonzentriert und in 100 µl ddH<sub>2</sub>O oder TE-Puffer (10/0,1) gelöst werden.

### 3.2.2 Präzipitation von Nukleinsäuren

Zur Erhöhung des Reinheitsgrades, zur Aufkonzentration oder für einen Pufferwechsel wurde in Lösung befindliche DNA gefällt und erneut in Lösung gebracht.

Durch Zugabe von 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,8) und 2,5 Vol. Ethanol wurde die DNA 15 min bei –20°C gefällt und anschließend bei 13000 Upm, 4°C für 10 min (*Biofuge fresco*, *Heraeus*) pelletiert. Nach einem Waschschrift mit eisgekühltem 70% Ethanol

wurde das Pellet getrocknet und in dem erforderlichen Volumen ddH<sub>2</sub>O oder TE-Puffer (10/0,1) aufgenommen.

### 3.2.3 Amplifikation von Nukleinsäuren

Die von Kary B. Mullis 1983 entwickelte Methode der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) dient der exponentiellen Amplifikation von DNA Abschnitten.

Die Vervielfältigung der DNA erfolgt in Zyklen. Durch wechselnde Temperaturbedingungen werden die DNA-Doppelstränge zunächst getrennt (Denaturierung), dann erfolgt die Bindung (Annealing) spezifischer Oligonukleotide (Primer) an die 3'- und 5'-Sequenz des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts und die Synthese (Elongation) des neuen DNA-Strangs durch eine hitzebeständige DNA-Polymerase. Über die Primer (*Sequenzen siehe 2.7, S.37*) ist es möglich kurze DNA-Sequenzen, z.B. Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen, einzuführen.

Eingesetzt wurden die *Thermocycler Gene Amp 2400 und 2700* (Perkin Elmer, Rodgau).

#### 3.2.3.1 Analytische PCR

Standardmäßig wurde für die analytische PCR der *PCR Master Kit* (Roche, Mannheim) nach folgendem Protokoll eingesetzt:

PCR-Ansatz:

0,1 µg Plasmid-DNA/ 0,5-1,0µg genomische DNA

25 pmol Primer 1

25 pmol Primer 2

25 µl PCR-Master-Mix (inkl. Taq-DNA-Polymerase, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>)

ad 50 µl ddH<sub>2</sub>O

Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne DNA-Matrize.

PCR-Programm

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initial-Denaturierung	94 °C	2 min	1 x
Denaturierung	94 °C	30 s	} 35 x
Hybridisierung	55 °C *	40 s	
Elongation	72 °C	3 min	
Finale Elongation	72 °C	7 min	1 x

**Tabelle 2: Standardprogramm für die Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte.**

\* Die Hybridisierungstemperatur wurde an jedes Primerpaar angepasst.

Die optimale Hybridisierungs-Temperatur liegt 4°C unter der Schmelztemperatur ( $T_M$ ) der Primer. Um eine optimale Bindung der Primer zu gewährleisten, wurde sie für jedes Primerpaar über deren Basenzusammensetzung separat ermittelt:

$$T_M = 4 \times (G+C) + 2 \times (A+T)$$

**3.2.3.2 Präparative PCR**

Die Amplifikation eines DNA-Abschnitts mit dem Ziel der weiteren Verwendung beispielsweise zur Ligation mit Vektorplasmid-DNA, macht es notwendig eine Polymerase mit einer Funktion zur Fehlerkorrektur einzusetzen. Anstelle des *PCR Master Kit (Roche, Mannheim)* mit der darin enthaltenen Taq-DNA-Polymerase wurde hier die Pwo-DNA-Polymerase (*Roche, Mannheim*) mit 3'→5' Exonukleaseaktivität eingesetzt.

PCR-Ansatz:

0,1 µg Plasmid-DNA/ 0,5-1,0µg genomische DNA

50 pmol Primer 1

50 pmol Primer 2

20 mM dNTP

2,5 U Pwo-DNA-Polymerase

ad 100 µl ddH<sub>2</sub>O

Das PCR-Programm erfolgte wie in 3.2.3.1, S.49 beschrieben.

### **3.2.3.3 Aufreinigung des Amplifikats**

Für die Reinigung des PCR-Produkts von den restlichen Bestandteilen des Ansatzes fand der *QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)* Verwendung. Alternativ konnte das PCR-Produkt durch Agarosegelelektrophorese überprüft und anschließend über den *QIAquick Gel Extractions-Kit (Qiagen)* gereinigt werden.

### **3.2.4 Analyse von Nukleinsäuren mittels Gelelektrophorese**

Die Charakterisierung von DNA-Fragmenten ist anhand ihres Laufverhaltens in der Agarosegelelektrophorese möglich. Durch Anlegen eines elektrischen Spannungsfeldes wandern die negativ geladenen DNA-Fragmente ihrer Größe entsprechend unterschiedlich schnell zum positiven Pol (Anode). Mit Hilfe von zugesetztem Ethidiumbromid können die DNA-Banden visualisiert und ihre Größe anhand eines Längenstandards bestimmt werden.

#### **3.2.4.1 Auftrennung von DNA nach Größe in Agarosegelen**

Die optimale Auftrennung der DNA-Abschnitte konnte über die Wahl des Agaroseanteils in der Gelmixtur erreicht werden. Standardmäßig wurde ein 1% Gel verwendet. Die Agarose wurde im entsprechenden Volumen TAE-Puffer durch Erhitzen gelöst und für den Nachweis der Nukleinsäuren mit Ethidiumbromid (5 mg/ml) versetzt. Nach Überschichtung mit TAE-Puffer konnte die mit Probenpuffer versetzte DNA und ein geeigneter Längenstandard aufgetragen werden. Abhängig von der gewünschten Auftrennungsqualität und Größe der Gelkammer wurde eine Spannung von 40 V bis 100 V angelegt. Die Größenbestimmung der DNA-Banden erfolgte mit Hilfe des aufgetragenen Standards über einem UV-Schirm bei 312 nm (*Gel Doc 2000, Bio-Rad*). Für die fotografische Dokumentation des Ergebnisses wurde der *Video copy processor P68E (Mitsubishi)* verwendet.

#### **3.2.4.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen im präparativen Maßstab**

Für die Präparation der DNA aus dem Gel wurde die gewünschte Bande mit einem Skalpell unter UV-Beleuchtung (312 nm) ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Die Aufbereitung erfolgte unter Verwendung des Gelextraktion-Kits *QIAquick Gel Extraction*

*Kit (Qiagen)* durch Schmelzen der Gelsubstanz mit anschließenden Isolations- und Waschschritten entsprechend den Angaben des Herstellers.

### **3.2.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

#### **3.2.5.1 Photometrische Bestimmung**

Die Konzentration von Nukleinsäuren in Lösungen kann durch photometrische Bestimmung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm ( $OD_{260}$ ) gegen eine  $H_2O$ -Referenzprobe ausgehend vom Lambert-Beerschen Gesetz berechnet werden.

Eine  $OD_{260}$  von 1 entspricht dabei einer Nukleinsäure-Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  für doppelsträngige DNA sowie 37  $\mu\text{g/ml}$  für Oligonukleotide.

#### **3.2.5.2 Abschätzung mittels Gelelektrophorese**

Die Abschätzung des DNA-Gehalts einer Lösung ist möglich durch die vergleichende Beurteilung der Bandenstärke nach gelelektrophoretischer Auftrennung in Bezug auf den mitgeführten Längenstandard. Bei Verwendung des 1 kbp DNA-Längenstandards der Firma *Invitrogen, Karlsruhe* entspricht das DNA-Fragment mit 1636 bp einer Konzentration von 5  $\text{ng}/\mu\text{l}$  eingesetzten Standards.

### **3.2.6 Klonierung rekombinanter MVA-Transferplasmide**

#### **3.2.6.1 Spaltung von Nukleinsäuren durch Restriktionsendonukleasen**

Die enzymatische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen wurde zur Präparation von DNA-Fragmenten sowie zur Kontrolle von Ligationsergebnissen eingesetzt. Eine Einheit (*Unit*, [U]) bezeichnet dabei die Enzymaktivität, die benötigt wird um 1  $\mu\text{g}$   $\lambda$ -Phagen-DNA in einer Stunde bei optimalen Temperatur-, Puffer- und pH-Bedingungen vollständig zu schneiden. Die einzusetzende Enzymmenge ist somit abhängig von der Größe des zu schneidenden DNA-Fragments und kann mit folgender Formel berechnet werden:

Für 1 µg DNA werden  $x / y$  Units Restriktionsenzym benötigt, wobei

$x = \text{Größe } \lambda\text{-Genom} / \text{Größe DNA-Fragment}$  und

$y = \text{Anzahl d. Schnittstellen im } \lambda\text{-Genom} / \text{Anzahl d. Schnittstellen im DNA-Fragment}$

Um den vollständigen Verdau der vorgelegten DNA sicherzustellen, ist es sinnvoll, mehr als die berechneten Einheiten einzusetzen (in der Regel 1-2 U des Enzyms pro µg DNA). Hierbei ist zu beachten, daß die Enzymmenge 10% des Gesamtvolumens nicht übersteigt, da das im Enzymkonzentrat enthaltene Glyzerin unspezifisches Schneiden (Sternaktivität) begünstigt.

Die benötigten Angaben können den Katalogen der Lieferfirmen der Restriktionsendonukleasen (*Roche, New England BioLabs*) entnommen werden. Dort finden sich auch Angaben zu den benötigten Puffern, Inkubations-Temperatur und -Zeit (meist 37°C, 1-2 h).

### 3.2.6.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Die kovalente Verbindung komplementärer DNA-Fragmente katalysiert das Enzym DNA-Ligase (hier T4-DNA-Ligase (*Roche, Mannheim*)) durch Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 3'-Hydroxylgruppe am Ende einer DNA-Kette und der 5'-Phosphatgruppe am Ende einer anderen Kette. Zur Vermeidung der Religation des zuvor durch Restriktionsspaltung linearisierten DNA-Vektors wurde dieser mit Hilfe einer alkalischen Phosphatase (*calf intestinal phosphatase, CIP, Roche, Penzberg*) dephosphoryliert. Dazu wurden 1-3 µg Vektor-DNA mit 1-2 µl CIP (1 U/µl) und 2 µl 10 x Dephosphorylierungspuffer in 20 µl Volumen für 45 min bei 37 °C inkubiert und das Enzym anschließend durch Hitzeeinwirkung (15 min, 65 °C) inaktiviert. Zur Entfernung von Salzen des Dephosphorylierungspuffers wurde der Ansatz mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)* gereinigt.

Die Ligation wurde in einem Volumen von 20-30 µl mit einem Vektor:Insert-Verhältnis von 1:3 bis 1:10 (molar) angesetzt und unter Verwendung des vom Hersteller mitgelieferten Puffers über Nacht bei 4°C inkubiert. Um den Erfolg der Dephosphorylierung überprüfen und die Anzahl der evtl. dennoch auftretenden Religanden erkennen zu können, wurde zusätzlich eine Negativkontrolle mitgeführt. Dieser Ansatz enthielt lediglich Vektor-DNA, keine Insert-DNA.

Der Reaktionsansatz konnte nachfolgend direkt zur Transformation (*siehe 3.1.4, S.46*) kompetenter *E.coli*-Zellen eingesetzt werden.



### 3.2.7 Sequenzanalyse von Nukleinsäuren

Endgültige Bestätigung über den Erfolg von Klonierungen und die korrekte Sequenz des klonierten DNA-Fragments konnte durch eine Sequenzanalyse erlangt werden. Eingesetzt wurden die bereits für die Klonierung verwendeten Primer und die durch eine Maxi-Präp (siehe 3.2.1.2, S.48) gewonnene hochreine rekombinante Plasmid-DNA. Die Sequenzbestimmung wurde durchgeführt von *SequiServe (Vaterstetten)*.

Die Auswertung der erhaltenen Sequenzen wurde mit dem Programm *Align Plus (SciEd Software, NC, USA)* vorgenommen.

### 3.2.8 Bestimmung spezifischer Nukleinsäure-Fragmente durch Hybridisierung mit markierter einzelsträngiger DNA

#### 3.2.8.1 Transfer von DNA auf eine Nylonmembran (Southern Blot)

Um ein bestimmtes Nukleinsäure-Fragment aus einer größeren DNA-Menge durch Hybridisierung mit einer komplementären einzelsträngigen DNA-Sonde analysieren zu können, wurde die DNA in einem Agarosegel aufgetrennt und durch den Transfer auf eine Nylonmembran (*Southern Blot*) immobilisiert.

Für die Charakterisierung viraler DNA-Abschnitte wurde die virale DNA aus infizierten CEF-Zellen extrahiert (siehe 3.5.5, S.68) und mittels Restriktionsenzymen (siehe 3.2.6.1, S.52) gespalten. Nach Auftrennung in einem 0,8%igen Agarosegel (siehe 3.2.4.1, S.51) bei 40 V über einen Zeitraum von 5-7 h wurde das Gel 10 min in 0,2 M HCl geschwenkt. Dabei erfolgt die Depurinierung der DNA, welches durch Denaturierung während der Übertragung auf die Nylonmembran zur Fragmentierung der DNA führt, wodurch wiederum der gleichmäßige Transfer von unterschiedlich großen DNA-Fragmenten gewährleistet ist. Als Übertragungsmethode wurde der alkalische Kapillartransfer gewählt. Hierfür wurde das Gel auf einem Whatmanpapier (*Whatman, Maidstone (USA)*) plaziert und die Nylonmembran (*Zeta Probe GT, Bio-Rad*) darüber gelegt. Es folgten 3 Lagen Whatmanpapier und ein ca. 15 cm hoher Stapel Papiertücher. Das unten liegende Whatmanpapier wurde an den Enden in Transferpuffer getaucht, so dass die Pufferlösung durch das Gel in den darüber liegenden Papierstapel gesaugt wurde. Der entstandene Sog bewirkt hierbei die Wanderung der DNA-Fragmente auf die Nylonmembran, wo sie aufgrund der geringen Porengröße haften bleiben.

Nach 12-15 h Transferzeit wurde die Nylonmembran mit 2 x SSC- Puffer abgespült und die DNA bei 80 °C für 30 min kovalent auf der Membran fixiert.

#### **3.2.8.2 Hybridisierung von DNA mit einer $^{32}\text{P}$ -markierten Sonde**

Für die Hybridisierung der immobilisierten DNA-Abschnitte wurde eine Sonde gewählt, die nach Auftrennung in zwei Einzelstränge komplementär zu dem gesuchten DNA-Fragment war. Für die radioaktive Markierung wurden 25 ng der Sonden-DNA in 45 µl TE-Puffer (10/1) 5 min bei 95°C denaturiert und mit einem Ansatz aus dNTP (dATP, dTTP, dGTP), exonukleasefreiem Klenow-Enzym und Zufalls-Primern (*Rediprime*, Amersham Biosciences) gemischt. Anschließend wurden 50 µCi  $^{32}\text{P}$ -markiertes dCTP zugegeben und für 10 min bei 37°C inkubiert. Mit 5 µl 0,2 M EDTA-Lösung wurde die Reaktion gestoppt.

Der Hybridisierungsansatz wurde in 20 ml Hybridisierungspuffer zu der in demselben Puffervolumen für 20 min bei 65°C vorbehandelten Membran gegeben und bei 65°C ÜN inkubiert. In einem 2-maligen Waschschrift mit je 20 ml Southern-Waschpuffer 1 und 2 wurde ungebundene Sonde entfernt. Auf der Membran markierte Banden konnten mit einer Phosphorimagerplatte oder mit einem Röntgenfilm detektiert werden.

### 3.3 Proteinchemische Methoden

#### 3.3.1 Synthese viraler Proteine

Die Synthese viraler Proteine setzt bereits 20 min nach Infektion der Zelle mit MVA ein. Frühe Gene, wie das virale IL-18-Bindungsprotein werden über einen Zeitraum von 3-4 h nach der Infektion synthetisiert.

Für den Nachweis der Synthese des vIL-18BP wurden HeLa- oder CEF-Zellen in 6-Loch-Platten ausgesät und subkonfluent mit 12,5-20 IE MVA/Zelle in 1 ml RPMI/ 2% FBS je Vertiefung infiziert. Der Infektionsansatz wurde 30 min bei 4°C auf den Zellen belassen. Dieses diente der Synchronisation des Infektionszyklus, da durch die niedrige Temperatur zunächst nur das Anheften der Viren an die Zellen, nicht aber die Infektion ermöglicht wird. Nach Entfernen des Infektionsansatzes und 2-maligem Waschen mit je 2 ml Medium (RPMI/2% FBS) wurden die Zellen erneut mit 1 ml Medium überschichtet und anschließend der Nullstundenwertes t (0) geerntet. Je nach Versuchsdurchführung wurden zu diesem Zeitpunkt 40 µg/ml Cytosin-Arabinose (Ara C) zugegeben, welches als Nukleotidanalogen zu dCTP in die DNA interkaliert und bei MVA damit die DNA-Replikation und somit den Übergang zur mittleren Phase der Genexpression verhindert. Bis zur Ernte weiterer Stundenwerte erfolgte die Kultivierung bei 37°C in einem Wärmeschrank (95% Luftfeuchtigkeit, 5% CO<sub>2</sub>). Von den zu erntenden Vertiefungen wurde das Medium abgenommen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und sofort bei -20°C gelagert. Der Zellrasen wurde mit 200 µl Trypsin-EDTA behandelt und nach Ablösen der Zellen in 800 µl PBS-Puffer aufgenommen. In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß erfolgte die Sedimentation bei 2000 Upm für 5 min (*Biofuge fresco, Heraeus*) und anschließend die Lyse der Zellen zur Freisetzung der Proteine unter Verwendung von 40 µl vorgekühltem NP40-Puffer und Zugabe von PMSF zur Hemmung von Proteasen. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurde erneut für 5 min bei 2000 Upm zentrifugiert, der Überstand (Zelllysate) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und sofort bei -20°C gelagert.

Zelllysate und geerntetes Kultivierungsmedium konnten dann separat auf den Gehalt an vIL-18BP im Western Blot (*siehe 3.3.3, S.58*) untersucht werden.

### 3.3.2 Analyse von Proteinen mittels Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte elektrophoretisch in Polyacrylamidgelen durch Zugabe eines Überschusses an SDS. Dabei lagert sich das negativ geladene Detergens proportional zum Molekulargewicht an die Proteine an. Deren Eigenladung wird dadurch vollständig abgeschirmt, so daß die Wanderungsgeschwindigkeit zur Anode von der Größe des einzelnen Proteins abhängt.

#### 3.3.2.1 Auftrennung von Proteinen nach Größe in denaturierenden Polyacrylamidgelen

Um die gleichmäßige Auftrennung aller Proteine zu erreichen werden die Proben zunächst in einem niederprozentigeren Sammelgel konzentriert, bevor sie in das Trenngel übergehen. Die optimale Auftrennung von kleinen Proteinen erhält man durch Erhöhung des Anteils an Polyacrylamid im Trenngel:

Mengenangabe für ein 16 x 14 x 0,1 cm Gel:

	<u>Sammelgel (4%)</u>	<u>Trenngel (15%)</u>
Acrylamid (29%)/ Bisacrylamid (1%)	1,0 ml	12,5 ml
Tris-HCl, 1,0 M, pH 6,8	750 µl	—
Tris-HCl, 1,5 M, pH 8,8	—	6,3 ml
SDS, 10%	60 µl	250 µl
H <sub>2</sub> O	4,1 ml	5,7 ml
Ammoniumperoxodisulfatlösung, 10%	60 µl	250 µl
TEMED	6,0 µl	10 µl

Aufbau der Gelapparaturen und Gießen der Gele ist der Beschreibung des Herstellers (*Owl Separation Systems, Portsmouth, NH USA*) zu entnehmen.

Die Proben wurden mit Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95°C denaturiert und in die Geltaschen aufgetragen. Zur Größenbestimmung wurde der Molekulargewichtsstandard *Broad Range (6-175 kDa)* der Firma *New England BioLabs* verwendet. Während der Einlaufzeit ins Sammelgel betrug die angelegte Spannung 100 V, zur Auftrennung der Proteine wurde die Spannung auf 150 V heraufgesetzt.

### **3.3.2.2 Anfärben der Proteinbanden in Polyacrylamidgelen**

Die Anfärbung der in der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteinbanden erfolgte durch 15-minütiges Einlegen des Gels in eine Coomassie-Blau G250 Färbelösung (Bindung des Farbstoffs an Protein) und anschließendes Entfernen von überschüssiger Farbe mit einer Entfärber-Lösung.

Die Färbung wurde vor allem dazu verwendet den möglichst vollständigen Transfer der Proteine vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran (*siehe 3.3.3.1, S.58*) zu bestätigen.

### **3.3.3 Nachweis von Proteinen im Western-Blot-Verfahren**

#### **3.3.3.1 Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran (Western-Blot)**

Die Übertragung der in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine auf eine Membran aus Nitrozellulose (*Trans-Blot, Bio-Rad*) wurde mit der Elektroblobtapparatur *Fastblot* der Firma Biometra (*Göttingen*) nach der *Semidry-Transfer*-Methode durchgeführt. Hierfür wurde die Nitrozellulosemembran mit darüber liegendem Gel zwischen je 4 Lagen Whatman-Papier (*Whatman, Maidstone (USA)*) geschichtet, welche zuvor in Western-Blot-Transferpuffer getränkt wurden. Bei 5 mA/cm<sup>2</sup> Gel erfolgte der Transfer der negativ geladenen Protein-SDS-Komplexe in 30 min. Der im Gel verbliebene Proteinanteil wurde durch Coomassie-Färbung nachgewiesen.

#### **3.3.3.2 Immunochemischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen**

Der Nachweis eines bestimmten Proteins auf einer Nitrozellulosemembran erfolgte durch die spezifische Bindung eines primären Antikörpers, der von einem sekundären Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Antikörper erkannt wird. Durch eine von der Peroxidase katalysierte Lichtreaktion wurde die Proteinbande mit Hilfe eines Röntgenfilms detektierbar.

Um unspezifische Wechselwirkungen der Antikörper mit der Nitrozellulose zu vermeiden, wurde diese nach dem Transfer mindestens 2 Stunden (RT) oder ÜN (4°C) mit einer 5%igen Magermilch/PBS-Lösung abgesättigt. Vor Zugabe des primären Antikörpers wurde, ebenso wie nach allen folgenden Inkubationsschritten, 3 x je 10 min mit WB-Waschpuffer gewaschen. Der primäre Antikörper (Anti-IL-18BP, Geschenk von Prof. Dr. Marc Buller, Saint

Louis, MO, USA) wurde in PBS 1:5000 bis 1:10000 verdünnt und für 2 h (RT) unter stetigem Schwenken auf der Membran belassen. Der sekundäre Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Antikörper folgte 1:7000 verdünnt mit einer Inkubationszeit von 1 Stunde (RT). Zur Detektion wurde der *Lumi-Light* Kit der Firma *Roche* verwendet. Hierfür wurden 50 µl/cm<sup>2</sup> der *Lumi-Light*-Lösungen 1 und 2 im Verhältnis 1:1 gemischt und die Nitrozellulosemembran 5 min darin geschwenkt. Anschließend wurde die Membran auf einem Röntgenfilm 1 s-10 min je nach Intensität der Signale exponiert. Die Größenbestimmung der Proteinbande erfolgte mittels des vorgefärbten Molekulargewichtsstandard *Broad Range* (*New England BioLabs*).

### 3.3.4 Funktionsanalyse des vIL-18-Bindungsproteins

In einem Funktionstest wurde untersucht, ob das virale IL-18-Bindungsprotein von MVA die Fähigkeit zur Interaktion mit Interleukin-18 besitzt. Hierfür wurden primäre Milzzellen von naiven C57BL/6-Mäusen isoliert (*siehe 3.6.5, S.74*) und in 96-Loch-Platten mit  $5 \times 10^5$  Zellen in 50 µl je Vertiefung in T-Zell-Medium ausgesät. Zur Stimulation der IFN $\gamma$ -Sekretion wurden 0,02 ng/ml murines IL-18 und 0,1 ng/ml murines IL-12 (beide *R&D-Systems*) zugefügt. Zur Gewinnung vIL-18BP wurden HeLa-Zellen in 12-Loch-Platten ausgesät und subkonfluent mit 12,5 IE/Zelle MVA oder  $\Delta$ IL-18BP infiziert. Als Kontrolle dienten uninfizierte Zellen. Zur Synchronisation des Infektionszyklus wurden die Zellen für 30 min bei 4°C inkubiert, das Infektionsmedium dann entfernt und die Zellen erneut mit vorgewärmten (37°C) Medium (RPMI/2% FBS, *siehe 3.4.1, S.60*) überschichtet. Nach einer Inkubationszeit von 5 h bei 37°C in einem Wärmeschrank (95% Luftfeuchtigkeit, 5 % CO<sub>2</sub>) wurden die Zellüberstände in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Die weitere Handhabung erfolgte unter stetiger Kühlung der Zellüberstände auf Eis, zur Erhaltung der Funktionalität des synthetisierten vIL-18BP (in den MVA-Überständen). Um in den Überständen möglicherweise noch vorhandene Viruspartikel zu inaktivieren wurde 10µg/ml Psoralen zugegeben und die Ansätze 5 min mit UV-Licht bestrahlt (15 Watt-Birne, *Stratalinker 2400, Stratagene*). Hierdurch werden DNA-Stränge quervernetzt, welches zur Virusinaktivierung führt. Zur Untersuchung der Funktionalität des vIL-18BP wurden die Überstände mit den IL-18/IL-12-stimulierten Milzzellen 36 h, bei 37°C kultiviert und die Konzentration des sezernierten IFN $\gamma$  in einem IFN $\gamma$ -ELISA bestimmt (*siehe 3.6.4, S.74*).

### 3.4 Zellkultur Techniken

#### 3.4.1 Kultivierung eukaryontischer Zelllinien

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in einem mit 5% CO<sub>2</sub> begasten Wärmeschrank unter Wasserdampfatmosphäre (95% Luftfeuchtigkeit) bei 37°C in Zellkulturflaschen (*Nunc*) verschiedener Größe. Sämtliche Arbeitsschritte wurden zur Vermeidung von Kontaminationen innerhalb einer Sterilbank durchgeführt unter Verwendung steriler Lösungen, Medien und Verbrauchsmaterialien.

In *Tabelle 3* (S.60) sind die verwendeten Zelllinien (*siehe 2.12.2, S.42*) und ihre Kultivierungsmedien (*Zusammensetzung siehe 2.3.2, S.34*) aufgelistet.

<u>Zelllinie</u>	<u>Medium</u>
BHK-21	Basismedium
CEF	CEF-Medium
HeLa S3	Basismedium
RK13	Basismedium
T-Lymphozyten	T-Zell-Medium

**Tabelle 3: Übersicht der verwendeten eukaryontischen Zelllinien unter Angabe des Standardkulturmediums.**

### 3.4.2 Zucht adhärent wachsender Zellen

Um ein gleichbleibendes gutes Zellwachstum zu erhalten, ist es notwendig die Zellen regelmäßig zu subkultivieren. Dazu wurden die Zellen alle 2-3 Tage nach Erhalt einer konfluenten Zellschicht im Verhältnis 1:5 bis 1:10 in neue Flaschen überführt. Das Ablösen der Zellen von der Flaschenwand erfolgte durch leichtes Klopfen nach Dekantieren des Mediums, Waschen mit PBS-Puffer und Zugabe von Trypsin-EDTA (2 ml bei einer Fläche von 185 cm<sup>2</sup> entsprechend T185-Zellkulturflaschen) für 2-5 min bei 37°C. Zur Durchführung verschiedener Experimente wurden meist 6-24-Loch-Platten (*Corning Inc.*) eingesetzt, in welche die Zellen 1-2 Tage vor Verwendung in 12 ml Medium pro Platte eingesät wurden.

Die genaue Zellzahl einer Suspension konnte durch eine Neubauer-Zählkammer bestimmt werden. Hierfür wurden die Zellen meist 1:2 mit PBS verdünnt und dann 1:2 mit 0,5% Trypanblau versetzt, welches die Anfärbung toter Zellen ermöglicht. Diese wurden bei der anschließenden Bestimmung der Zellzahl nicht berücksichtigt.

### 3.4.3 Kryokonservierung eukaryontischer Zellen

Zum Einfrieren wurden Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase mit möglichst niedriger Passagenzahl verwendet. Nach Ablösen der Zellen vom Flaschenboden (*siehe 3.4.2, S.61*) wurde die Zellzahl bestimmt und die Suspension bei 1400 Upm (*Megafuge 1.0R, Heraeus*) 5 min zentrifugiert. Mit vorgekühltem Einfriermedium wurden die Zellen vorsichtig resuspendiert und auf ein Volumen von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Das Einfrieren erfolgte in 1 ml Aliquots in Kryoröhrchen (*Nunc*) zunächst bei -20°C für 1 h, dann bei -80°C für 12-24 h. Anschließend wurden die Zellen zur Lagerung in flüssigen Stickstoff (-196 °C) überführt.

### 3.4.4 Auftauen kryokonservierter eukaryontischer Zellen

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden zügig durch Anwärmen in der Hand aufgetaut und sofort in ein *Falcon*-Röhrchen mit 5 ml vorgelegtem Medium (37°C) überführt, um die Konzentration des im Einfriermediums enthaltenen zytotoxischen DMSO herabzusetzen. Nach Zentrifugation bei 1400 Upm, 5 min (*Megafuge 1.0R, Heraeus*) wurden die Zellen in frischem Medium aufgenommen. Die Kultivierung erfolgte bis zum Erreichen einer konfluenten Zellschicht in T25-Zellkulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>), dann wurden die Zellen in Flaschen mit größerer Wachstumsfläche transferiert.



### 3.4.5 Präparation von primären Hühnerembryo-Fibroblasten („chicken embryo fibroblasts“, CEF)

Zur Generierung und Anzucht von MVA fanden vor allem primäre und sekundäre CEF-Zellen Verwendung, da das Virus auf diesen Zellen durch seriell Passagieren von CVA entstanden ist und sie sich dadurch gut für die Kultivierung eignen.

Primäre CEF-Zellen wurden nach dem von *Mayr et al.* (*Mayr, Bachmann et al. 1974*) beschriebenen Verfahren der fraktionierten Trypsinierung aus 30 bis 40 Hühnereiern nach 10-11-tägiger Bebrütung (*Institut für Geflügelkrankheiten, Oberschleißheim*) hergestellt.

Die Eier wurden mit 80% Ethanol desinfiziert und am stumpfen Pol mit einer sterilen Schere eröffnet. Anschließend wurde die Schalenhaut und die Allantochorionmembran durchstoßen, der Embryo aus dem Ei entnommen und sofort dekapitiert. In einer mit 10 ml sterilen PBS gefüllten Petrischale wurden die inneren Organe und die hinteren Extremitäten entfernt. Die Embryonen wurden erneut mit 10 ml PBS gewaschen und durch eine 12 ml Einwegspritze ohne Injektionskanüle in einen mit 100 ml Trypsin-EDTA gefüllten Erlenmeyer-Kolben gepresst. Die Suspension wurde mit PBS auf 250 ml Volumen aufgefüllt und das Gewebe unter ständigem Rühren für 20-30 min bei Raumtemperatur in Einzelzellen aufgelöst. Die Zellen wurden anschließend durch sterile Gaze filtriert, wobei untrypsinierte Gewebeklumpen im Kolben belassen und erneut für 10 min mit 100 ml Trypsin-EDTA behandelt und anschließend filtriert wurden. Die Filtrate wurden vereinigt und für 10 min bei 4 °C und 1500 Upm (*Megafuge 1.0R, Heraeus*) zentrifugiert. Das Zellsediment wurde 2 x mit Medium gewaschen, in 10 ml CEF-Medium (EMEM mit 10% BMS und 5% Laktalbumin) resuspendiert und auf 2l mit Medium aufgefüllt (je Ei 50-100 ml Medium).

Je 50 ml Zellsuspension wurden in eine T225-Zellkulturflasche ausgesät (ca.  $5 \times 10^5$  Zellen/ml) und bei 37°C im Wärmeschrank kultiviert.

Nach Erreichen eines konfluenten Zellrasens nach 36-48 h konnten die Primärkulturen 1-malig passagiert werden. Hierfür wurden die Zellen 2 x mit PBS gewaschen, mit Trypsin-EDTA abgelöst und die Sekundärkulturen dann im Verhältnis 1:2-1:5 angelegt. Alternativ war die Lagerung der Primärkulturen bis zur Subkultivierung für 5-7 Tage bei 27 °C möglich.

### 3.4.6 Transfektion von eukaryontischen Zellen

Zur Transformation eukaryontischer Zellen wurde die Methode der Liposomen-vermittelten Transfektion angewendet, bei der die DNA durch Interaktion mit Liposomen über Endocytose in die Zellen aufgenommen wird. Verwendung fand die gebrauchsfertige Liposomenlösung *FuGENE 6<sup>®</sup> Transfektions-Reagenz* der Firma Roche. 6 µl *FuGENE 6<sup>®</sup>* wurden 5 min in serumfreiem Medium bei Raumtemperatur inkubiert und zu 1,5 µg DNA (1 µg/µl) geträufelt. Nach einer weiteren 15-minütigen Inkubationszeit wurde das Gemisch tropfenweise auf den subkonfluenten Zellrasen ( $\leq 1 \times 10^6$  Zellen/Vertiefung) einer 6-Loch-Platte gegeben und 48 h bei 37 °C (95% Luftfeuchtigkeit, 5% CO<sub>2</sub>) kultiviert. Die Zellen sowie das Medium wurden dann geerntet, wobei die Zellen mittels eines Zellschabers gelöst wurden, und in 1,5 ml Reaktionsgefäßen bei -20 °C gelagert.

## 3.5 Virologische Methoden

### 3.5.1 Virusamplifikation von MVA

Alle Arbeiten zur Charakterisierung der Viren *in vitro* sowie *in vivo* wurden mit gereinigtem MVA-Virusmaterial durchgeführt. Zur Generierung der Deletionsmutanten sowie als Wildtypvirus wurde MVA-II<sub>new</sub> verwendet, welches durch Entfernen der Restsequenzen des Wirtsspezifitätsgens K1L aus MVA-F6 entwickelt (Staib, Lowel *et al.* 2003) wurde und hier als MVA oder auch Wildtypvirus (WT) bezeichnet wird.

Für die Erstellung dieser Viruspräparationen ist es notwendig, Virus in größerem Maßstab zu vermehren. Hierfür wurden 30-40 subkonfluente T225-Flaschen mit CEF oder BHK mit 0,1-1,0 infektiösen Einheiten Virus/Zelle infiziert und für 2-3 Tage bei 37°C kultiviert. Um in dieser Zeit übermäßiges Zellwachstum zu verhindern, wurde das Kultivierungsmedium (*siehe* 3.4.1, S.60) mit einem Anteil von 10% FBS gegen Medium mit einem 2%igen FBS-Anteil ausgetauscht. Die Zellen wurden zunächst mit dem für die Infektion verwendeten Virus in einem geringen Volumen (ca 5-10% des Kultivierungsvolumens, 5 ml bei T225-Flaschen) überschichtet. Hierdurch und durch wiederholtes Schwenken der Flaschen während der folgenden 90-minütigen Inkubationszeit wurde eine effektive Infektion aller Zellen gewährleistet. Anschließend wurde mit Medium (2% FBS) auf das übliche Volumen aufgefüllt.

Nach Erreichen eines vollständigen zytopathischen Effekts erfolgte die Ernte des Zellrasens durch kurzzeitiges Einfrieren der Flaschen bei -80°C und Abklopfen der Zellen während des Auftauens. Die hierdurch abgelösten Zellen konnten mit den im Medium befindlichen freien Viruspartikeln durch Ultrazentrifugation (*Optima LE 80K, Rotor: Typ 19, Beckman*) bei 16000 Upm, 4°C für 90 min sedimentiert werden.

Das Sediment wurde in 10-15 ml 10 mM Tris-HCl-Puffer, pH 9,0 aufgenommen. 3-maliges Gefriertauen (Trockeneis und 37 °C Wasserbad) sowie die Behandlung mit Ultraschall (*Sonopuls HD200, Bandelin*) wurden zur Freisetzung adhärenter oder noch in den Zellen befindlicher Viruspartikel eingesetzt. Die Suspension konnte anschließend bei -80°C gelagert oder für die Virusaufreinigung verwendet werden.

### 3.5.2 Aufreinigung von Viren

Das durch Amplifikation (*siehe 3.5.1, S.64*) erhaltene Virusmaterial konnte mittels Zentrifugation über ein Saccharosekissen von Zelltrümmern und Proteinen befreit werden. Um die Zellbestandteile zu zerkleinern und membranassoziiertes Virus zu lösen, wurde die Suspension mit Ultraschall behandelt. Verwendung fand das Gerät *Sonopuls HD200* der Firma *Bandelin* unter Einsatz der Nadel *TS73*. Die Beschallung erfolgte 3-mal für je 15s (90% Stärke), wobei die Virussuspension in einem Eisbad gekühlt wurde. Anschließend wurde auf ein Volumen von 105 ml (6 x 17,5 ml) mit 10 mM Tris-HCl-Puffer, pH 9,0 aufgefüllt.

In sechs Zentrifugenröhrchen (*UltraClear, Beckmann*) wurden je 17,5 ml 36%ige steril-filtrierte Saccharose vorgelegt und mit demselben Volumen Virussuspension überschichtet. Bei 13500 Upm, 4°C (*Optima LE 80K, Rotor: SW28, Beckman*) erfolgte für 90 min die Sedimentation des Virus. Dieses wurde in 1 mM Tris-HCl-Puffer, pH 9,0 aufgenommen (~80 µl je T225 Flasche) und nach Bestimmung der Viruskonzentration (*siehe 3.5.3, S. 65*) in Aliquots (Kryoröhrchen, *Nunc*) bei -80 °C gelagert.

### 3.5.3 Bestimmung der Viruskonzentration

Der Gehalt an Viruspartikeln einer Lösung konnte mittels Immunfärbung bestimmt werden.

Bei -80°C gelagertes Virus wurde in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in einem mit Eiswasser (50% Eis) gefüllten Ultraschallbad (*Sonopuls HD200, Bandelin*) bei maximaler Stärke für 3 x 1 min beschallt, um eine homogene Suspension zu erhalten.

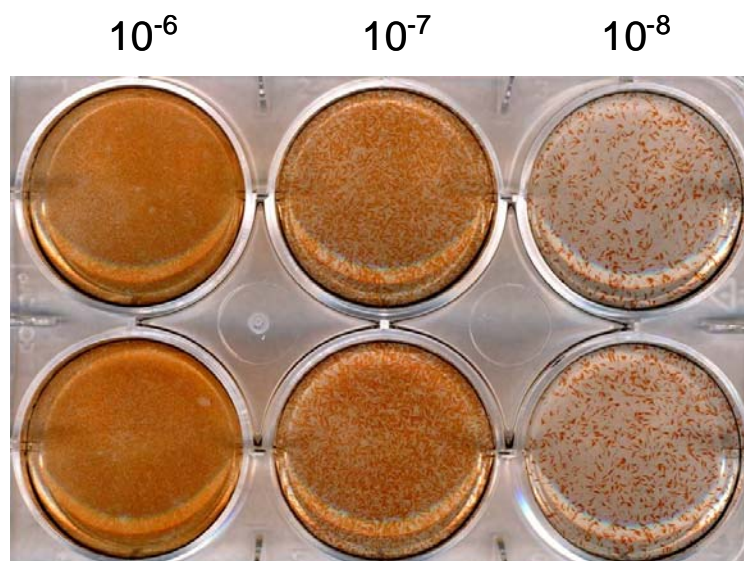
In Volumina von je 3 ml CEF-Medium wurde dann eine log 10-Verdünnungsreihe der Virussuspension von  $10^{-1}$  bis  $10^{-9}$  angelegt. Mit diesen Verdünnungsstufen wurden subkonfluente CEF-Zellen, ausgesät in 6-Loch-Platten, infiziert, wobei je Vertiefung 1 ml Viruslösung das Kultivierungsmedium ersetzte. Die Infektion der Zellen erfolgte im Doppelansatz.

Nach 48 h Inkubation bei 37 °C wurde das virushaltige Medium abgenommen und die Zellen mit einem eisgekühlten 1:1 Aceton/Methanol-Gemisch (1 ml/Vertiefung) für 5 min fixiert, der Überstand entfernt und die Platten mit je 1 ml PBS-Puffer / 2% FBS beschichtet.

Als primärer Antikörper wurde je 1 ml des Anti-Vacciniavirus Antikörpers der Firma *Quartett (Berlin)* 1:1000 in PBS-Puffer / 2% FBS verdünnt in die Vertiefungen der Platten gegeben und 1 h unter stetigem Schwenken bei RT inkubiert. Nach Entfernen von überschüssigem, ungebundenen Antikörper durch 2-maliges Waschen mit PBS-Puffer für

2 min folgte der Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Sekundärantikörper (*Dianova, Hamburg*) ebenfalls 1:1000 verdünnt in PBS-Puffer / 2% FBS für 45 min bei RT. Anschließend wurden die Platten erneut 2 x für 2 min mit PBS-Puffer gewaschen.

Zur Detektion wurde 1 ml/Vertiefung einer vorbereiteten Dianisidine-Lösung eingesetzt. Hierfür wurde in absolutem Ethanol eine gesättigte o-Dianisidinlösung (*Sigma, München*) hergestellt. Ein Überschuß an ungelöstem Dianisidine wurde durch Zentrifugation bei 13000 Upm, 1 min (*Biofuge fresco, Heraeus*) entfernt und 300 µl der Lösung zu 10 ml PBS-Puffer gegeben und filtriert. Unmittelbar vor Zugabe des Substrats auf die Platten wurden 10 µl einer 30%igen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung hinzugefügt. In einer 15-30-minütigen Inkubationszeit erfolgte die Anfärbung von Zell-Foci, verursacht durch die Vermehrung jeweils eines Viruspartikels nach Infektion einer Zelle. Die gefärbten Foci wurden in einer geeigneten Verdünnungsstufe (~20-100 Foci/Vertiefung) im Doppelansatz ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Der Virustiter ergab sich durch Division der jeweiligen Verdünnungsstufe und wird in infektiösen Einheiten (IE)/ml angegeben.



**Abbildung 7: 6-Loch-Platte mit virusinfizierten CEF-Zellen nach Immunfärbung.** Durch Auszählen der gefärbten Zell-foci kann der Virustiter IE/ml der verwendeten MVA-Viruspräparation bestimmt werden.

### 3.5.4 Bestimmung des Wachstumsverhalten von MVA

Durch die Erstellung von Wachstumskurven konnte die Replikationsfähigkeit eines Virus sowie die Effizienz der Ausbreitung auf einem Zellrasen beurteilt werden.

#### 3.5.4.1 One-Step-Growth (Ein-Schritt-Wachstum)

Eine *One-Step-Growth-Curve* dient dazu die Replikationsfähigkeit verschiedener Virusisolate einzuschätzen.

CEF-Zellen wurden mit einer hohen Dosis an infektiösen Einheiten (10 IE/Zelle) infiziert und der Virustiter (*siehe 3.5.3, S.65*) nach verschiedenen Zeitpunkten bestimmt.

Zeigt das Virus ein normales, dem Wildtyp entsprechendes Wachstumsverhalten, so ist nach einer anfänglichen Stagnation ein stetiges Ansteigen der Viruskonzentration, bedingt durch Replikation, zu erwarten.

CEF-Zellen wurden mit 10 IE/Zelle der jeweiligen Viren in 6 Vertiefungen einer 6-Loch-Platte in 1 ml Medium/Vertiefung für 1 h bei 37°C infiziert. Nach dieser Zeit wurde freies, nicht zellassoziiertes Virus mit dem Medium entfernt, 2-mal mit je 2 ml Medium gewaschen und die Zellen erneut mit 1 ml überschichtet. Im Anschluß daran wurde der Nullstundenwert  $t(0)$  geerntet. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden die Zellen vom Boden gelöst, der gesamte Ansatz in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C gelagert. Zu fünf weiteren Stundenzeitpunkten  $t = 4, 8, 12, 24, 48$  wurde je eine Vertiefung nach gleicher Vorgehensweise geerntet und die Zellen bei -80°C bis zur Titerbestimmung (*siehe 3.5.3, S.65*) deponiert.

#### 3.5.4.2 Multiple-Step-Growth (Mehr-Schritt-Wachstum)

In einer *Multiple-Step-Growth-Curve* lässt sich die Replikation sowie die Effizienz der Virusausbreitung von Zelle zu Zelle beurteilen.

Nach Infektion der Zellen mit einer niedrigen Dosis an infektiösen Einheiten (0,05 IE/Zelle) wurden die Zellen je einer Vertiefung zu den Zeitpunkten  $t = 0, 12, 24, 48, 72$  wie bei der *One-Step-Growth-Curve* (*siehe 3.5.4.1, S.67*) beschrieben geerntet und bis zur Bestimmung der Viruskonzentration bei -80°C gelagert.

### 3.5.5 Extraktion viraler Nukleinsäuren

Die Isolation viraler DNA wurde aus Zellen vorgenommen, die mit 5-10 IE/Zelle für 24-48 h infiziert worden waren. Verwendet wurden BHK oder CEF-Zellen, eingesät in 12- oder 6-Loch-Platten. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber gelöst und der gesamte Ansatz in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bei 2000 Upm für 5 min (*Biofuge fresco, Heraeus*) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 400 µl PBS-Puffer resuspendiert und eine Behandlung mit Proteinase K angeschlossen. Diese erfolgte unter Zugabe von 50 µl 10 x TEN- Puffer, 23 µl 20% SDS und 50 µl Proteinase K-Lösung bei 56°C für 2-4 h.

Zur Entfernung von Proteinen und Lipiden wurden 1 Vol. einer 70%igen Phenollösung (w/v in TE-Puffer) und 1 Vol. eines Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (24:1) hinzugefügt, der Ansatz mit Hilfe eines Vortexgerätes gemischt und eine vollständige, schnelle Phasentrennung durch Zentrifugation bei 13000 Upm für 5 min (*Biofuge fresco, Heraeus*) herbeigeführt. Die obere DNA-enhaltende wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und verbliebenes Phenol durch 2-maliges Ausschütteln mit je 1 Vol. des Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches entfernt.

Durch Zugabe von Ethanol wurde die DNA anschließend präzipitiert (*siehe 3.2.2, S.48*) und in dem gewünschten Volumen ddH<sub>2</sub>O oder TE-Puffer (10/0,1) aufgenommen.

### 3.5.6 Herstellung von MVA-Mutanten

Die Deletion einzelner Gene in MVA wurde durch die gezielte Nutzung homologer Rekombination ermöglicht.

In ein Transferplasmid wurden die beidseitig flankierenden Sequenzen (Flanke 1, Flanke 2) des zu deletierenden Gens subkloniert (*siehe Abbildung 10, S.82*). Die Insertionsstellen wurden dabei so gewählt, dass die Flanken eine zur Selektion benötigte Markerkassette umschlossen. Die Markerkassette enthielt den zur Selektion der mutanten Viren benötigten Genlocus (Vacciniavirus K1L), eingerahmt von zwei repetitiven Sequenzen. Nach der Transfektion MVA-infizierter Zellen mit dem rekombinanten Plasmid erfolgte die Deletion des gewünschten Gens bei gleichzeitiger Insertion der Selektionskassette durch homologe Rekombination über die beiden Flanken.

Die mutanten, die Markerkassette enthaltenden MVA-Viren wurden selektiert. Anschließend fand die Eliminierung der Markerkassette unter Kulturbedingungen ohne Selektionsdruck durch intragenomische homologe Rekombination der repetitiven Sequenzen statt.

Für die in dieser Arbeit vorgenommene Deletion der MVA-Gene 008L und 157L wurde das zur Transfektion eingesetzte Vektorplasmid in zwei Ausführungen verwendet, pΔK1L (*Staib, Drexler et al. 2000*) und pΔK1L\_2 (*Staib, unveröffentlicht*). Die Vektorplasmide unterscheiden sich hinsichtlich der an beiden Seiten des K1L-Gens anschließenden repetitiven Sequenzen, die dem *Escherichia coli* β-Galactosidase-Gen (lac Z) entstammen. Der Einsatz unterschiedlicher Vektorplasmide bei der Einführung der einzelnen Deletionen hat den Vorteil, dass bei der Generierung von Mehrfachmutanten keine unbeabsichtigten Rekombinationsereignisse im MVA-Genom an bereits vorhandenen Deletionsstellen mit den dort verbliebenen repetitiven DNA-Fragmenten stattfinden können.

#### **3.5.6.1 Transfektion MVA -infizierter Zellen mit einem Vektorplasmid**

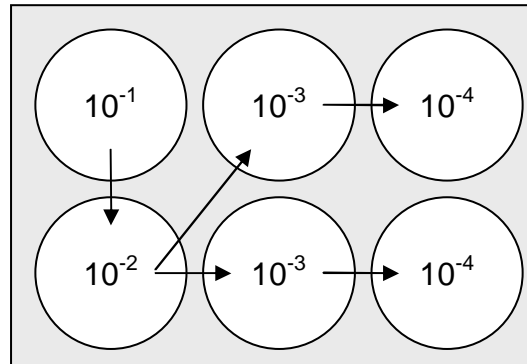
Subkonfluente CEF- oder BHK-21-Zellen einer 6-Loch-Platte wurden mit 0,01 IE MVA/Zelle oder einer bereits vorhandenen MVA-Deletionsmutante in 1 ml Medium pro Loch für 90 min bei 37 °C infiziert. Die anschließende Transfektion erfolgte unter Einsatz von 1,5 µg des rekombinanten Transferplasmids wie in 3.4.6, S.63 beschrieben.

Nach 48 h Inkubation wurde der Zellrasen mit einem Zellschaber im Medium geerntet, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei -80 °C gelagert.

#### **3.5.6.2 Isolierung transfizierter MVA-Viren**

Der geerntete Transfektionsansatz wurde nach 3-maligem Gefriertauen zur Vereinzelung membranassoziierter Viren im Ultraschallbad bei maximaler Stärke 3-mal für 1 min beschallt. Anschließend wurden subkonfluente RK13-Zellen, ausgesät in einer 6-Loch-Platte mit 2 ml Medium je Vertiefung in Verdünnungsschritten nach folgendem Schema infiziert:





**Abbildung 8:** Zur Isolation einzelner Virusplaques wurden die Zellen mit der Virussuspension in verschiedenen Verdünnungsstufen infiziert. Die  $10^{-3}$ - und  $10^{-4}$ -Verdünnungen wurden 2-fach angesetzt, da hier die meisten Einzelplaques zu erwarten waren.

200  $\mu$ l des Transfektionsansatzes wurden in eine Vertiefung gegeben und durch Schwenken der Platte gemischt ( $=10^{-1}$ -Verdünnung). Mit 200  $\mu$ l aus diesem Loch wurden die Zellen einer weiteren Vertiefung infiziert und die Platte durch Schwenken gemischt ( $=10^{-2}$ -Verdünnung). In den folgenden beiden Schritten erfolgte die Infektion von je 2 Vertiefungen mit derselben Verdünnungsstufe ( $10^{-3}$ - und  $10^{-4}$ -Verdünnung).

Nach 48-72 h Inkubation bei 37 °C war die Ausbildung von Zellaggregaten (Plaques), hervorgerufen durch virusinfizierte Zellen, zu beobachten.

Unter einem Mikroskop wurden die Plaques aus möglichst hohen Verdünnungsstufen auf der Unterseite der 6-Loch-Platte mit einem Stift markiert und anschließend durch Einsaugen mit Hilfe einer 20  $\mu$ l-Pipette unter sterilen Bedingungen in 1,5 ml Reaktionsgefäße in je 500  $\mu$ l reduziertes Medium (2% FBS) überführt. Mit dem Virusisolat wurden nach 3-maligem Gefriertauen und Ultrabeschallung erneut RK13-Zellen infiziert, um nicht-rekombinantes Wildtypvirus auszuverdünnen. Nach 2-4 Passagen waren die Isolate meist frei von Wildtypvirus. Dieses wurde durch PCR-Analysen (*siehe 3.2.3.1, S.49*) von extrahierter Virus-DNA (*siehe 3.5.5, S.68*) mit spezifischen Primern (*Sequenzen siehe 2.7, S.37*) bestätigt.

Reine K1L-haltige Virusisolate wurden zur Deletion der Markerkassette über homologe Rekombination der repetitiven Sequenzen auf CEF- oder BHK21-Zellen passagiert. Da K1L als Wirtsspezifitätsgen auf diesen für MVA permissiven Zellen nicht benötigt wird, konnten nach wenigen Passagen Plaques mit Deletionsmutanten isoliert werden. Die Reinheit dieser Virusisolate wurde mittels PCR-Analyse (*siehe 3.2.3.1, S.49*) überprüft.

### 3.5.7 Virusamplifikation eines MVA-Plaueisols

Die Virusvermehrung von einem Plaueisolat (*siehe 3.5.6.2, S.69*) erfordert mehrere Amplifikationsschritte. 200µl eines in 500µl aufgenommenen Plaueisols wurden verwendet um den Zellrasen der Vertiefung einer 6-Loch-Platte zu infizieren. Nach 2-3 Tagen wurde der komplette Ansatz (2 ml) geerntet und 500 µl zur Infektion einer subkonfluenten T85-Flasche (10 ml) eingesetzt. Nach Erreichen eines ausgeprägten zytopathischen Effekts nach 2-3 Tagen erfolgte die erneute Infektion von drei T185-Flaschen mit je 2 ml Virussuspension bis zum selben Stadium. Unter Verwendung eines Zellschabers wurden die Zellen vom Flaschenboden gelöst und das Medium durch Zentrifugation bei 1500 Upm, 15 min (*Megafuge 1.0R, Heraeus*) auf 5 ml reduziert. Mit der Hälfte des Volumens konnten 15 T225-Flaschen infiziert werden. Das aus diesen Flaschen erhaltene Virusmaterial wurde bei 16000 Upm für 90 min in der Ultrazentrifuge (*Optima LE 80K, Rotor: Typ 19, Beckman*) pelletiert und nach Resuspension in 15 ml 10 mM Tris-HCl-Puffer, pH 9,0 als Primärstock bei -80°C gelagert.

Bei der weiteren Amplifikation (*siehe 3.5.1, S.64*) dienten je 1 ml des Primärstocks zur Infektion von 10 Flaschen T225.

Allen Amplifikationsschritten folgte 3-maliges Gefriertauen und Beschallen der Zellen mittels Ultraschall. Die Infektion erfolgte immer in Medium (2% FBS) in geringem Volumen für die ersten 90 min.

## 3.6 Immunbiologische Methoden

### 3.6.1 Immunisierung von Versuchstieren

Für alle *in vivo*-Experimente wurden ausschließlich weibliche BALB/c (*Charles River, Sulzfeld*) oder HLA-A\*0201- (HHD1) Mäuse (*GSF-Tierhaltung, Neuherberg (Pascolo, Bervas et al. 1997)*) verwendet und im institutseigenen Tierstall unter pathogenfreien Bedingungen gehalten. Die zur Immunisierung eingesetzten gereinigten MVA-Viren wurden in sterilem Impfstoffpuffer (1 mM Tris-HCl-Puffer, pH7,5) auf die gewünschte Viruskonzentration eingestellt.

#### 3.6.1.1 Intranasal

Zur intranasalen Verabreichung von Virus wurden die Tiere durch eine kurzzeitige Ethernarkose sediert. Die Virussuspension wurde in einem Volumen von 30 µl mit einer 200 µl-Pipettenspitze auf die Nasenöffnung der Maus gegeben und durch Einatmen inokuliert.

#### 3.6.1.2 Intramuskulär

Die intramuskuläre Immunisierung der Mäuse erfolgte in einem Volumen von 2 x 50 µl in den *Tibialis anterior* über eine 27G  $\frac{3}{4}$ -Kanüle.

#### 3.6.1.3 Intraperitoneal

Das Virus wurde in einem Volumen von 250 µl verabreicht, wobei das Tier auf den Rücken gedreht und die Virussuspension vorsichtig über eine 27G  $\frac{3}{4}$ -Kanüle ins Peritoneum abgegeben wurde.

### 3.6.2 Präparation von Immunzellen

#### 3.6.2.1 Präparation von Immunzellen aus dem Lumen der Lunge

Immunzellen aus den Schleimhäuten und dem Lumen der Lunge wurden durch eine Bronchoalveolarlavage gewonnen. Hierfür wurde das Tier durch CO<sub>2</sub> euthanasiert und die

Lufttröhre sowie der Brustkorb freigelegt. Eine Durchtrennung des Zwerchfells ermöglichte die optimale Ausdehnung der Lunge beim Lavagieren.

Für die Spülung wurde eine 20G x 1-½-Kanüle in die Lufttröhre auf Höhe der oberen Knorpelspangen eingeführt und mit einem Faden fixiert. Als Spüllösung wurde vorgekühltes steriles T-Zell-Medium oder PBS-Puffer verwendet und die Lavage in einem Volumen von 5 x 1 ml durchgeführt.

### **3.6.2.2 Präparation von Immunzellen aus dem Peritoneum**

Zur Extraktion von Immunzellen aus dem Bauchraum wurde die Bauchhöhle und das umgebende Bauchfell (Peritoneum) gespült. Das Tier wurde getötet und auf dem Rücken liegend fixiert. Fell und Hautschichten wurden entfernt wobei darauf zu achten war die Bauchhöhle nicht zu eröffnen, um die Zellen kontaminationsfrei gewinnen zu können. Die Lavage erfolgte über eine 20G x 1-½-Kanüle, die knapp oberhalb des Beckens in die Bauchhöhle eingeführt wurde. Als Spüllösung diente vorgekühlter, steriler PBS-Puffer (5 ml), der in 1-2 ml Volumina vorsichtig in den Bauchraum abgegeben und wieder aufgenommen wurde.

Die gewonnenen Zellen konnten durch Färbung mit unterschiedlichen Antikörpern gegen Oberflächenmarker (*siehe 3.6.3, S.73*) und daran anschließender FACS-Analyse (*siehe 3.6.7, S.77*) charakterisiert werden.

### **3.6.3 Bestimmung des Anteils an Lymphozyten und NK-Zellen**

Die in den Lavagen gewonnenen Zellsuspensionen wurden auf ihren Gehalt an NK-Zellen sowie aktivierten CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten untersucht.

Alle verwendeten Antikörper und ihre gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe sind unter 2.10, S.40 aufgelistet. Bei den im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritten wurden die Zellen permanent auf Eis gekühlt sowie ausschließlich gekühlte Lösungen und eine auf 4°C vorgekühlte Zentrifuge (*Megafuge 1.0R, Heraeus*) verwendet.

Nach Sedimentation der Zellen bei 1500 Upm, 4°C für 5 min wurden vorhandene Erythrozyten durch 2-minütige Inkubation mit 200 µl Erythrozytenlysepuffer durch hypotonische Lyse entfernt. Es folgte ein Waschschrift mit 5 ml T-Zell-Medium und Zentrifugation bei 1500 Upm, 4°C für 5 min und anschließende Resuspension der Zellen in 250 µl FACS-Puffer unter Zugabe von 5 µg/ml anti-CD16/CD32 (F<sub>c</sub>-Block). Um zu

verhindern, dass die zur Erkennung und Anfärbung der verschiedenen Zelltypen verwendeten Antikörper nicht nur mit ihrem Antigen, sondern auch mit den F<sub>c</sub>-Rezeptoren anderer Zellen (z.B. B-Lymphozyten, Makrophagen) interagieren, wurden diese Rezeptoren durch den F<sub>c</sub>-Block abgesättigt. Die Zellen wurden nach 20 min Inkubation auf eine 96-Loch-Spitzboden-Platten überführt, wobei ein kleiner Teil der Zellen für die Anfärbung mit jeweils nur einem Antikörper, zur Kompensation der Signale bei der späteren FACS-Analyse (*siehe 3.6.7, S.77*), separiert wurde. Zur Entfernung von überschüssigem F<sub>c</sub>-Block folgte 3-maliges Waschen mit 150 µl FACS-Puffer je Vertiefung und Zentrifugation bei 1400 UPM, 4°C für 2 min. Für die Anfärbung der Zellen wurden die Antikörper zur Erkennung spezifischer zellulärer Oberflächenproteine von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten und NK-Zellen 1:100 in FACS-Puffer in einem Volumen von 50 µl je Vertiefung verdünnt und mit den Zellen für 20 min unter Lichtabschluß inkubiert. Nach erneutem 3-maligen Waschen wurden die Zellen in 200 µl FACS-Puffer (1:100) versetzt mit Probidium-Iodid resuspendiert. Probidium-Iodid ermöglicht durch Anlagerung an Nukleinsäuren die selektive Anfärbung toter Zellen. Die Proben wurden in FACS-Röhrchen überführt und der Gehalt der verschiedenen gefärbten Zellen mittels Fluoreszenzdurchflusszytometrie (*siehe 3.6.7, S.77*) bestimmt.

### 3.6.4 Bestimmung des IFN $\gamma$ -Gehalts

Um die Konzentration an IFN $\gamma$  in einer Lavage oder aus Zellüberständen zu bestimmen, wurden darin vorhandene Zellen durch Zentrifugation entfernt (1500 Upm, 5 min, 4°C; *Megafuge 1.0R, Heraeus*) und die IFN $\gamma$ -Konzentration in den Überständen anschließend mit dem ELISA- (Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay) Kit *BD Opt EIA™* der Firma *BD Biosciences Pharmingen* gemessen. Alle Lösungen wurden wie vom Hersteller empfohlen zusammengestellt und verwendet.

Zur Bestimmung der Absorption der im letzten Schritt stattfindenden Farbreaktion in Abhängigkeit der jeweiligen IFN $\gamma$ -Konzentration wurde das Photometer *Sunrise (TECAN, Crailsheim, Programm für Datenanalyse: Magellan 2)* eingesetzt.

### 3.6.5 Präparation von Lymphozyten aus der Milz

Da die Differenzierung der Lymphozyten zu einem großen Teil in der Milz stattfindet, stellt sie ein wichtiges Organ für die Untersuchung von T-Zell bezogenen Immunantworten dar.

Zur Gewinnung der Lymphozyten wurde zunächst die Milz aus der Maus herauspräpariert. Hierzu wurde das Tier durch zervikale Dislokation (Genickbruch) getötet. Nach dem Eröffnen der Bauchhöhle unterhalb des linken Rippenbogens wurde die Schnittstelle zur Vermeidung von Kontaminationen mit 80% Ethanol gespült und die Milz mit Hilfe einer Pinzette steril entnommen. Das Organ wurde von Fett und Bindegewebe befreit und in 5 ml gekühltes T-Zell-Medium überführt.

In einer Petrischale ( $\varnothing = 6$  cm) wurde die Milz in 5 ml T-Zell-Medium mit dem Stempel einer 10 ml Spritze auf einem Metallsieb homogenisiert. Die Suspension wurde zur weiteren Vereinzelung der Zellen über ein Zellsieb in ein 50 ml *Falcon* überführt und mit 10 ml T-Zell-Medium nachgespült. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 1500 Upm, 4°C für 5 min (*Megafuge 1.0R*, *Heraeus*) wurden die in dem Zellsediment enthaltenen Erythrozyten durch hypotonische Lyse mit 2 ml Erythrozyten- Lysepuffer für 2 min eliminiert. Anschließend wurden die Zellen mit 10 ml Medium gewaschen, durch ein Zellsieb filtriert und in frischem Medium resuspendiert. Mittels einer Neubauer-Zählkammer (*siehe 3.4.2, S.61*) konnte dann die Zellzahl (hier in einer 1:40-Verdünnung) bestimmt werden, wobei in Abhängigkeit von der Größe der Milz und dem Alter des Tieres eine Gesamtzellzahl von  $80\text{-}120 \times 10^6$  zu erwarten war.

### 3.6.6 Intrazelluläre Zytokinfärbung

Bei der Milzpräparation gewonnene Zellen (*siehe 3.6.5, S.74*) wurden mit MVA oder einem MVA-spezifischen CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Epitop stimuliert und der Anteil an aktivierten IFN $\gamma$ -produzierenden T-Zellen durch eine intrazelluläre Zytokinfärbung bestimmt. Eine genaue Auflistung aller verwendeten Antikörper und ihrer Bezugsquellen ist unter 2.10, S.40 zu finden.

In die Vertiefungen einer 24-Loch-Platte wurden je 2 ml T-Zell-Medium mit  $1 \times 10^7$  Zellen für die Peptidstimulation und in 15 ml *Falcons*  $3\text{-}5 \times 10^7$  Zellen für die Virusstimulation verteilt. Als Stimulatorpeptid wurde das MVA-spezifische HLA-A\*0201 restringierte Epitop VP35#1 (Drexler, Staib et al. 2003) eingesetzt, als Negativkontrolle diente ein Peptid aus dem Influenza Matrixprotein M1 (*Flu*). Zur Negativkontrolle der MVA-stimulierten Zellen wurde die gleiche Anzahl an Proben uninfiziert belassen. Die Stimulation erfolgte mit 1  $\mu\text{g}$ / Peptid für 5 h bzw. 1 IE/Zelle eines gereinigten MVA-Virusstocks für 90 min und nach Auffüllen auf 4,5 ml für weitere 18 h bei 37°C. Durch Zugabe von 1  $\mu\text{l}$ /ml Brefeldin A (*BD GolgiPlug*) nach 2 h Inkubation zu den peptidstimulierten Zellen sowie nach 7 h zu den virusstimulierten

Zellen wurde eine Anreicherung der Zytokine in den Zellen erreicht. Nach Ablauf der Inkubationszeit konnten die Zellen der 24-Loch-Platte in 15 ml *Falcons* überführt und bei 4°C ÜN gelagert werden.

Bei allen folgenden Arbeitsschritten wurden die Zellen permanent auf Eis gekühlt sowie ausschließlich gekühlte Lösungen und eine auf 4°C vorgekühlte Zentrifuge (*Megafuge 1.0R*, *Heraeus*) verwendet. Die Zellen wurden für 5 min bei 1500 Upm zentrifugiert und das Sediment in 250 µl FACS-Puffer resuspendiert, welchem 1 µg/ml Ethidium Bromid Monoazid (EMA) zur Anfärbung toter Zellen und 5 µg/ml anti-CD16/CD32 (F<sub>c</sub>-Block) zur Absättigung zellulärer F<sub>c</sub>-Rezeptoren (*siehe 3.6.3, S.73*) zugesetzt wurden. Nach 20 min Inkubationszeit unter Lichtabschluß wurden die Zellen im Doppelansatz auf 96-Loch-Spitzboden-Platten verteilt und 10 min mit sichtbarem Licht beleuchtet. EMA verbindet sich unter Lichteinfluss photochemisch mit Nukleinsäuren und färbt so selektiv tote Zellen an. Zur Markierung zellulärer Oberflächenproteine wurden die Zellen nach Zentrifugation bei 1400 Upm für 2 min in 50 µl FACS-Puffer mit PE-anti-CD8a (1:100), APC-anti-CD62L (1:200) und sofern MVA-stimuliert mit PerCP-anti-CD4 (1:200) Antikörpern resuspendiert und für 20 min unter Lichtabschluß auf Eis inkubiert. Nach 3-maligem Waschen mit FACS-Puffer wurden die Zellen mit 100 µl *Cytofix/Cytoperm* der Firma *BD Pharmingen (Hamburg)* für 15 min permeabilisiert. Im Anschluß daran konnten intrazelluläre Proteine markiert werden. Die Zellen wurden 2-mal mit *Perm/Wash (BD Pharmingen, Hamburg)* gewaschen und eine Hälfte des Doppelansatzes mit einem FITC-anti-IFN-γ Antikörper, verdünnt (1:500) in *Perm/Wash*, versetzt. Dem anderen Teil des Doppelansatzes wurde ein Antikörper gleichen Isotyps, aber irrelevanter Spezifität (FITC-anti-Ratte-IgG1 (1:500)) zugegeben, um unspezifische Färbungen z.B. über F<sub>c</sub>-Rezeptoren nachweisen zu können. Nach 30 min Inkubation im Dunkeln wurde 3-mal mit *Perm/Wash* gewaschen und die Zellen dann in 250 µl PBS / 1% Paraformaldehyd (PFA) aufgenommen. PFA ermöglichte die Konservierung der Ansätze indem es zelluläre Proteine kreuzvernetzt, die morphologische Struktur der Zelle dabei aber weitgehend erhalten bleibt. Die so behandelten Zellen wurden in FACS-Röhrchen überführt und konnten bis zur Messung am Fluoreszenzdurchflusszytometer (*siehe 3.6.7, S.77*) bis zu 2 Tage bei 4°C unter Lichtabschluss gelagert werden.

### 3.6.7 Fluoreszenzdurchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Die Fluoreszenzdurchflusszytometrie ermöglicht es, verschiedene Zelltypen durch Markierung mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern entsprechend ihrer Oberflächenbeschaffenheit, Größe und Granularität zu unterscheiden und genauer zu charakterisieren.

Die Zellen werden in einer Trägerflüssigkeit aufgenommen und durch eine Kapillare gesaugt, wobei die Zellen einzeln den Lichtstrahl eines Argon-Ionen-Lasers (488 nm) passieren. Durch Auftreffen des Lasers wird eine Streuung des Lichts verursacht, die Rückschlüsse auf die Größe und Granularität der Zelle zulässt. Dabei ist das Vorwärtsstreulicht (FSC, forward scatter) des Lasers proportional zur Größe der Zelle, während das Seitwärtsstreulicht (SSC, sideward scatter) ein Maß für die Granularität darstellt. Dieses ermöglichte eine erste morphologische Unterscheidung der verschiedenen Zellpopulationen (z.B. Lymphozyten, Makrophagen, Granulozyten) und den Ausschluß von Zelltrümmern, toten Zellen und Zellaggregaten von der weiteren Analyse. Durch Anregung der Antikörpergekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe wie z.B. FITC, PE, APC oder PerCp können die Zellen darüber hinaus hinsichtlich ihrer genaueren Funktion und ihres Aktivierungszustandes charakterisiert werden. Auf Grund der unterschiedlichen Emissionsspektren der Fluoreszenzfarbstoffe, ist die Analyse der Signale durch ein komplexes System von Filtern und Prismen gleichzeitig möglich. Da sich die emittierten Wellenlängen dabei zu einem gewissen Grad überschneiden, ist es erforderlich die Signale zu kompensieren.

Die vom FACS-Gerät (*FACScalibur, BD Biosciences*) aufgezeichneten Signale wurden anschließend mit der Software *FlowJo 6.2 (TreeStar, OR, USA)* oder *CellQuest Pro 4.02 (BD Biosciences, Heidelberg)* ausgewertet.

### 3.6.8 Bestimmung der Schutzwirkung von Impfungen mit MVA-Deletionsmutanten

Für die Ermittlung des Immunschutzes nach einer 1-maligen Impfung mit MVA und MVA-Deletionsmutanten gegen eine tödliche Infektion mit VV WR wurden 6-8 Wochen alte BALB/c-Mäuse eingesetzt. Zur Verabreichung der Impf- bzw. Infektionsdosen wurden die Tiere mit Ether narkotisiert. Die Impfung mit MVA oder den Deletionsmutanten erfolgte intranasal mit  $10^7$  IE oder intramuskulär mit  $10^8$  IE, die Infektion mit VV WR ausschließlich intranasal (*siehe 3.6.1, S.72*). Hierfür wurde eine 20-fache Lethale Dosis<sub>50</sub> (LD<sub>50</sub>), welches  $10^6$  IE entspricht, eingesetzt und 48 h nach der Immunisierung verabreicht. Als Kontrolle



dienten 2 Gruppen mit gleicher Anzahl an Tieren ( $n=5$ ), wobei eine Gruppe weder immunisiert noch infiziert, die Andere ohne vorhergehende Immunisierung zeitgleich mit den restlichen Versuchsgruppen mit VV WR infiziert wurde.

Die tägliche Bestimmung des Körpergewichts der Tiere über einen Zeitraum von bis zu 14 Tagen erlaubte die genaue Beurteilung des Krankheitszustandes der infizierten Tiere, wie bereits bei *Alcami et al.* (*Alcami and Smith 1996*) beschrieben. Tiere mit schweren Krankheitssymptomen und/oder einem Gewichtsverlust von mehr als 30% wurden euthanasiert. In der Versuchsauswertung ist das mittlere Gewicht der Tiere jeweils einer Impfgruppe immer als prozentualer Anteil des Durchschnittswertes vom Tag der Infektion mit VV WR angegeben.

### 3.6.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Versuche zur Ermittlung möglicher signifikanter Unterschiede zwischen den Ergebnissen, erfolgte durch einen 2-seitigen T-Test.

Dieser wurde als nicht-gepaarter T-Test, in Abhängigkeit der Varianz (Var) als Typ 2 oder Typ 3, durchgeführt.

Typ 2:  $\text{Var}_{\text{Mittelwert 1}} : \text{Var}_{\text{Mittelwert 2}} \leq 1:1,5$

Typ 3:  $\text{Var}_{\text{Mittelwert 1}} : \text{Var}_{\text{Mittelwert 2}} > 1:1,5$

Zwei Werte unterscheiden sich signifikant, wenn im T-Test  $p < 0,05$  ermittelt wurde.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Generierung der MVA vIL-18BP/v3 $\beta$ -HSD-Deletionsmutanten

Im Genom von MVA befindet sich eine Reihe von Genen, die hinsichtlich ihrer Funktion und Wirkungsweise auf den infizierten Organismus noch nicht charakterisiert sind. Zur genaueren Untersuchung von Genen, deren Expressionsprodukte in die Immunreaktion des Organismus eingreifen, wurden MVA-Mutanten durch gezielte Deletion kodierender Gensequenzen hergestellt. Diese wurden in *in vitro* und *in vivo* Experimenten mit MVA verglichen und charakterisiert.

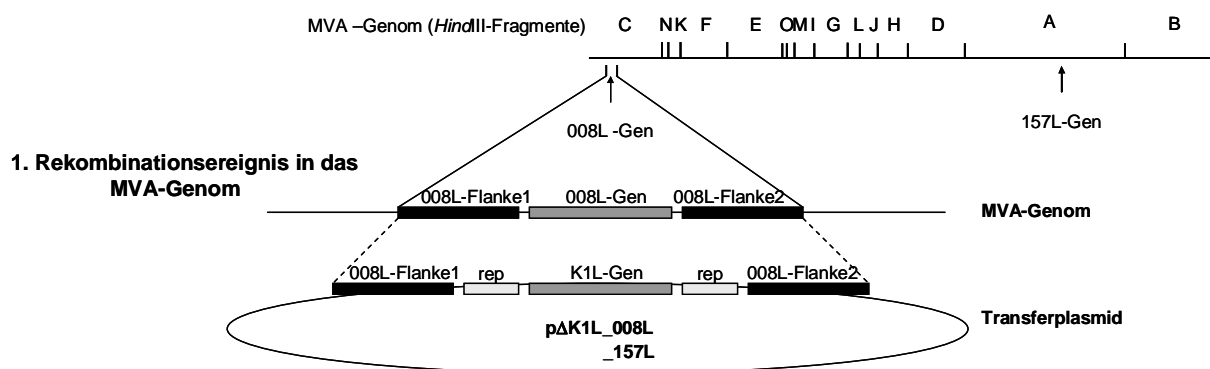
Als Grundlage zur Generierung der Deletionsmutanten diente MVA als Wildtypvirus. Die Deletion des Gens des viralen IL-1 $\beta$ R war in unserem Labor bereits durchgeführt worden (Staub, Kisling *et al.* 2005), so dass neben MVA auch die Mutante MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R vergleichend untersucht werden konnte. Die Eliminierung der Gene 008L (vIL-18BP) und 157L (v3 $\beta$ -HSD) in MVA führte zu zwei weiteren Einzelmутanten, die nachfolgend unter Einbeziehung von MVA  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R zur Konstruktion von drei verschiedenen Zweifach- und einer Dreifachdeletionsmutante verwendet werden konnten. Folgende Tabelle beinhaltet die Auflistung aller untersuchten Deletionsmutanten:

Einfach-MVA-Deletionsmutanten	$\Delta$ IL-1 $\beta$ R ( $\Delta$ 184R)	kodierende Sequenz (bp) 184R: MVA-Nukleotide 162021-163001*
	$\Delta$ IL-18BP ( $\Delta$ 008L)	kodierende Sequenz (bp) 008L: MVA-Nukleotide 13414-13052 *
	$\Delta$ 3- $\beta$ -HSD ( $\Delta$ 157L)	kodierende Sequenz (bp) 157L: MVA-Nukleotide 143577-142537*
Zweifach-MVA-Deletionsmutanten	$\Delta$ IL-1 $\beta$ R $\Delta$ IL-18BP	
	$\Delta$ IL-1 $\beta$ R $\Delta$ 3- $\beta$ -HSD	
	$\Delta$ IL-18BP $\Delta$ 3- $\beta$ -HSD	
Dreifach-MVA-Deletionsmutante	$\Delta$ IL-1 $\beta$ R $\Delta$ IL-18BP $\Delta$ 3- $\beta$ -HSD	

**Tabelle 4: Übersicht der MVA-Deletionsmutanten.** Nach Konstruktion der Einzeldelentionsmutanten erfolgte basierend auf diesen die Generation aller möglichen Kombinationen an Doppelmутanten und darauffolgend der Tripelmutante. \*Angabe des Genlokus im MVA-Genom aus (Antoine, Scheifflinger *et al.* 1998).

#### 4.1.1 Herstellung der Plasmidvektoren zur Deletion der MVA vIL-18BP/v $\beta$ -HSD-Gensequenzen

Pockenvirusgenome besitzen ein hohes Potential für homologe Rekombination, welches neben dem Einbringen von Fremdgenen auch zur Deletion bestimmter Gene im MVA-Genom sehr gezielt genutzt werden kann (*Staib, Drexler et al. 2000*). Hierfür wird über ein Transferplasmid eine für einen Selektionsmarker kodierende Gensequenz anstelle des zu deletierenden Gens in das Virusgenom inseriert, wobei beidseitig an das Zielgen angrenzende MVA-Genabschnitte zur präzisen Steuerung des Rekombinationsvorganges dienen (*siehe Abbildung 9, S.80*).



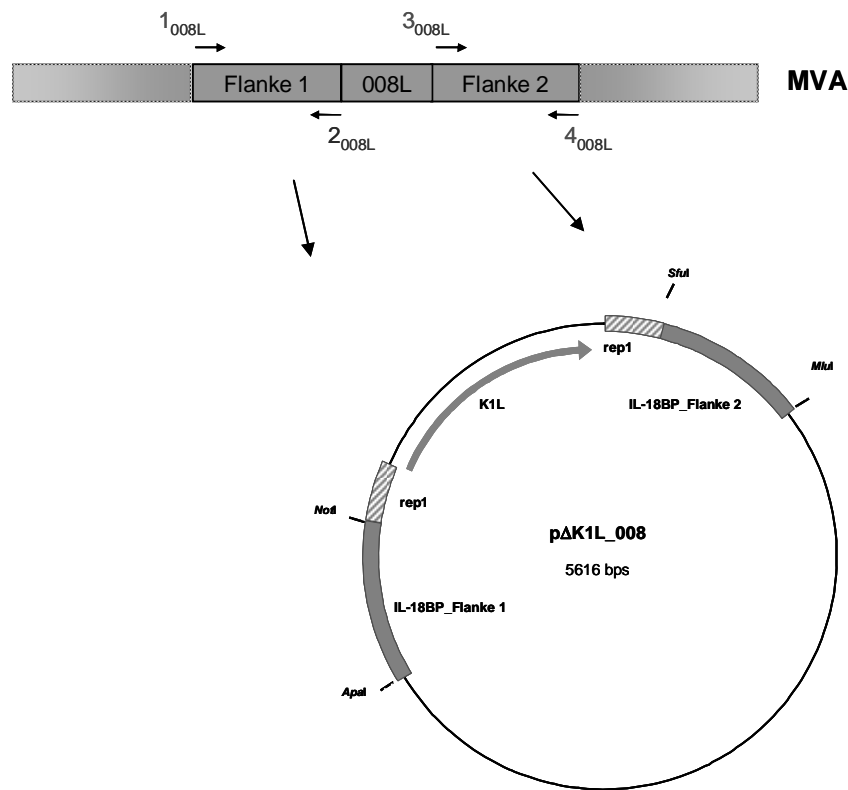
**Abbildung 9: Schematische Darstellung des Rekombinationsvorgangs zur Deletion spezifischer Gene.** Einteilung des MVA-Genoms in Segmente nach alphabetischer Ordnung, entsprechend der MVA-HindIII-Restriktionskarte. Die Genloci 008L (vIL-18BP) und 157L (v $\beta$ -HSD) sind mit Pfeilen markiert. Durch Klonierung der flankierenden Sequenzen des zu deletierenden Gens in das Transferplasmid (hier dargestellt für das Gen 008L) kann über homologe Rekombination die Deletion des Gens bei gleichzeitiger Insertion einer Selektionskassette (rep-K1L-rep) stattfinden.

Für die Konstruktion des Transferplasmids wurden die an das virale Gen anschließenden DNA-Abschnitte durch eine präparative Polymerase-Kettenreaktion (*siehe 3.2.3.2, S.50*) aus MVA amplifiziert.

Die stromabwärts in Leserichtung des Gens liegende DNA-Sequenz erhielt dabei für das vIL-18BP die Bezeichnung IL-18BP\_Flanke 1 und umfasste die Nukleotide 12443-13055 des MVA-Genoms (*Antoine, Scheiflinger et al. 1998*). Der stromaufwärts liegende, von 13415-13996 reichende DNA-Abschnitt erhielt den Namen IL-18BP\_Flanke 2. Die für die flankierenden Sequenzen des Gens der v $\beta$ -HSD gewählten Bezeichnungen waren

dementsprechend 3 $\beta$ -HSD\_Flanke 1 und 3 $\beta$ -HSD\_Flanke 2 und betrafen im MVA-Genom die Nukleotide 441896-442500 (3 $\beta$ -HSD\_Flanke 1) und 143578-144173 (3 $\beta$ -HSD\_Flanke 2). Die Wahl der spezifischen PCR-Oligonukleotide erfolgte so, dass während der PCR die Erkennungssequenz jeweils einer Restriktionsendonuklease an den Amplifikatenden eingeführt wurde. Mit Hilfe dieser Schnittstellen konnten die PCR-Produkte IL-18BP\_Flanke 1 (615 bp) und IL-18BP\_Flanke 2 (586 bp) in das Plasmid p $\Delta$ K1L (*Staib, Drexler et al. 2000*) kloniert werden (*siehe 3.2.6, S.52*), wodurch das Transferplasmid p $\Delta$ K1L\_008L entstand (*siehe Abbildung 10, S.82*). Die Klonierung der 3 $\beta$ -HSD\_Flanke 1 (607 bp) und 3 $\beta$ -HSD\_Flanke 2 (601 bp) in das Plasmid p $\Delta$ K1L\_2 führte zur Entstehung des Transferplasmid p $\Delta$ K1L\_2\_157L. Verwendet wurden die Erkennungssequenzen der Enzyme *Apa*I (Primer 1) und *Not*I (Primer 2) für die jeweilige Flanke 1, die Restriktionsstellen *Sfu*I (Primer 3) und *Mlu*I (Primer 4) für die Sequenzen der Flanke 2. Als Insertionsstellen dienten im Transferplasmid beide Seiten der Markerkassette, damit die Flanken diese für die folgende Selektion rekombinanter Viren umschlossen.

Die folgende Abbildung (*siehe Abbildung 10, S.82*) zeigt am Beispiel des vIL-18BP die Klonierung der flankierenden Gensequenzen in das Transferplasmid p $\Delta$ K1L.



**Abbildung 10: Generierung des Transferplasmids pΔK1L\_008L.** An die Amplifikation der flankierenden Sequenzen des vIL-18BP-Gens 008L schloß sich deren Klonierung in das Plasmid pΔK1L an. Die Konstruktion des Transferplasmids pΔK1L\_157L erfolgte nach demselben Schema mit den Flanken des 3β-HSD-Gens 157L.

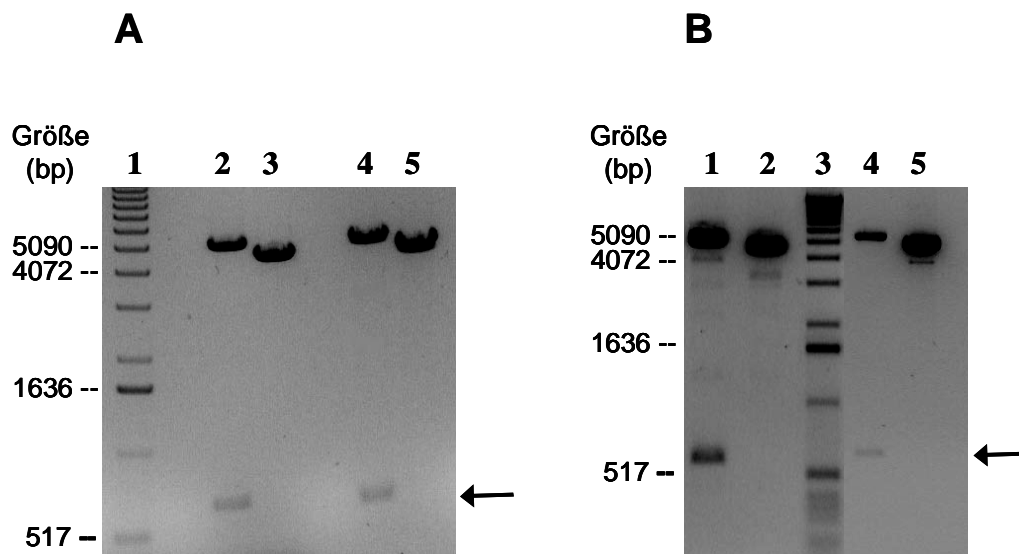
Die nach Ligation (*siehe* 3.2.6.2, S.53) und Transformation (*siehe* 3.1.4, S.46) isolierten Plasmidklone wurden im Restriktionsverdau (*siehe* 3.2.6.1, S.52) überprüft. Dabei erlaubte der Einsatz der Restriktionsenzyme *ApaI*/*PmeI* und *SfuI*/*MluI* den Nachweis spezifischer Banden und damit die Auswahl der erwünschten Transferplasmide.

Abbildung 11 A ( S.84) präsentiert das Ergebnis der Restriktionsanalyse von pΔK1L\_008L (Spur 2 und 4) und pΔK1L (Spur 3 und 5) mit den Enzymen *ApaI*/*PmeI* und *SfuI*/*MluI*. Die Verwendung dieser Enzyme ermöglichte die Exzision der IL-18BP\_Flanke 1 und IL-18BP\_Flanke 2 aus pΔK1L\_008L. Anstelle des zur Klonierung der Flanke 1 eingesetzten Restriktionsenzym *NotI* bot sich hier zur Exzision aufgrund der gleichen benötigten Pufferbedingungen die Kombination der Enzyme *ApaI*/*PmeI* an. Die Erkennungssequenz von *PmeI* liegt im Transferplasmid unmittelbar neben der *NotI*-Schnittstelle, so dass die 625 bp

große DNA-Bande in Spur 2 der IL-18BP\_Flanke 1 entspricht. Das in dieser Spur zudem vorhandene 4991 bp große Fragment stellt die Plasmid-DNA einschließlich der IL-18BP\_Flanke 2 dar. Als Kontrolle wurde der Leervektor pΔK1L verdaut, der hier eine Größe von 4440 bp aufweist.

Die Spaltung des rekombinanten Transferplasmids pΔK1L\_008L mit den Enzymen *SfuI* und *MluI* (Spur 4) bestätigte die Insertion der IL-18BP-Flanke 2 (586 bp). Mit 5030 bp verblieb hier pΔK1L\_008L-Flanke 1. Das *SfuI/MluI* behandelte Kontrollplasmid pΔK1L ist mit 4430 bp in Spur 5 zu sehen.

Die Restriktionsanalyse des für die Deletion der v3β-HSD klonierten Transferplasmids pΔK1L\_2\_157L wurde mit den gleichen Restriktionsenzymen durchgeführt und ist in *Abbildung 11 B (S.84)* dokumentiert. Aus der Spaltung des Transferplasmids mit den Enzymen *ApaI/PmeI* (Spur 1) gingen die 3β-HSD\_Flanke 1 (617 bp) und das Fragment des Transferplasmids pΔK1L\_2\_157L-Flanke 2 (5050 bp) hervor, als Kontrolle ist in Spur 2 der Leervektor pΔK1L\_2 mit 4484 bp gezeigt. Der Einsatz der Restriktionsenzyme *SfuI/MluI* resultierte in der 601 bp betragenden 3β-HSD\_Flanke 2 und dem hier verbleibenden 5066 bp großen Fragment des Transferplasmids pΔK1L\_2\_157L-Flanke 1 (Spur 4) bzw. zeigt mit 4474 bp das linearisierte Plasmid pΔK1L\_2 (Spur 5).



**Abbildung 11: Restriktionsanalyse der Transferplasmide *pΔK1L\_008L* und *pΔK1L\_157L*.** Die Restriktionsspaltung mit den Enzymen *Apal/PmeI* und *SfuI/MluI* bestätigte die Insertion der flankierenden DNA-Sequenzen von (A) *vIL-18BP* und (B) *v3β-HSD* in die Transferplasmide. (A) Spaltung von *pΔK1L\_008L* (Spur 2) und *pΔK1L* (Spur 3) mit *Apal/PmeI* und *pΔK1L\_008L* (Spur 4) und *pΔK1L* (Spur 5) mit *SfuI/MluI*. (B) Spaltung von *pΔK1L\_2\_157L* (Spur 1) und *pΔK1L\_2* (Spur 2) mit *Apal/PmeI* und *pΔK1L\_2\_157L* (Spur 4) und *pΔK1L\_2* (Spur 5) mit *SfuI/MluI*. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in einem 1% Agarosegel. Als Längenstandard ((A) Spur 1 und (B) Spur 3) diente eine 1kb-DNA-Leiter.

Die Sequenzierung (siehe 3.2.7, S.54) der klonierten DNA-Abschnitte bestätigte abschließend deren korrekte Sequenz.

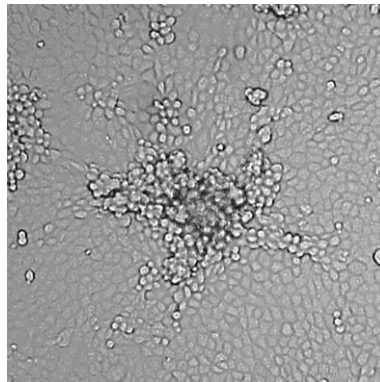
## 4.1.2 Konstruktion der MVA-Deletionsmutanten

### 4.1.2.1 Transiente K1L-Selektion der mutierten Viren

Die Infektion von CEF- bzw. BHK-21-Zellen mit MVA und nachfolgende Transfektion mit dem rekombinanten Transferplasmid *pΔK1L\_008L* oder *pΔK1L\_2\_157L* (siehe 3.5.6.1, S.69) führte zu Viren, welche die Gensequenz des Selektionsmarkers anstelle des Gens 008L (*vIL-18BP*) oder 157L (*v3β-HSD*) enthielten. Dabei erfolgte die Deletion des gewünschten Gens unter gleichzeitiger Insertion der Markerkassette durch homologe Rekombination über die beiden Flanken (siehe Abbildung 9, S.80). Der Einsatz der MVA-Einzelmutante  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R zur Infektion der Zellen, statt des Wildtypvirus MVA, ermöglichte die Konstruktion der

Zweifachmutanten  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP und  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ 3 $\beta$ -HSD. Nach der Fertigstellung von MVA  $\Delta$ IL-18BP diente dieses Virus als Basis zur Herstellung der Virusmutante  $\Delta$ IL-18BP  $\Delta$ 3 $\beta$ -HSD und mit der Zweifachmutante  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP gelang die Konstruktion der Dreifachmutante  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP  $\Delta$ 3 $\beta$ -HSD.

Die Markerkassette beinhaltet das Vacciniavirus-Gen K1L, eingerahmt von zwei homologen, repetitiven DNA-Sequenzen. Durch Expression des K1L-Gens wird die enge Wirtszellspezifität von MVA auf die Zelllinie RK13 erweitert (*Sutter, Ramsey-Ewing et al. 1994*), so dass sich bei Infektion dieser Zellen mit dem Transfektionsansatz ausschließlich rekombinante MVA-Viren produktiv vermehren können. Die Ausbildung von Infektionsherden in Form von Zellaggregaten, auf dem infizierten Zellrasen (*siehe Abbildung 12, S.85*) erlaubte in mehreren, aufeinanderfolgenden Infektionspassagen die Isolation einzelner rekombinanter Viruskclone (*siehe 3.5.6.2, S.69*).



**Abbildung 12: MVA-K1L-Infektion in RK13-Zellen.** Die Infektion von RK13-Zellen mit K1L-rekombinantem MVA oder MVA-Derivaten führt zur Bildung von Zellaggregaten, die unter Vergrößerung (hier 400x) an der Plattenunterseite mit einem Stift markiert und anschließend mit einer Pipette isoliert werden können.

Über die Isolierung genomischer Virus-DNA und deren Analyse in einer PCR gelang es die Reinheit der einzelnen Viruskclone auf möglicherweise noch vorhandene Wildtypviren zu überprüfen (*siehe 3.5.5, S.68 und 3.2.3.1, S.49*). Mit den bereits für die Amplifikation der Flanken verwendeten Primern 1 und 4 (*siehe 2.7, S.37*) umfasste das PCR-Produkt einer DNA-Präparation aus mutiertem MVA beide Flanken sowie die Markerkassette, bestehend aus der K1L-Gensequenz und zwei repetitiven Fragmenten (*siehe Abbildung 13, S.87*). War

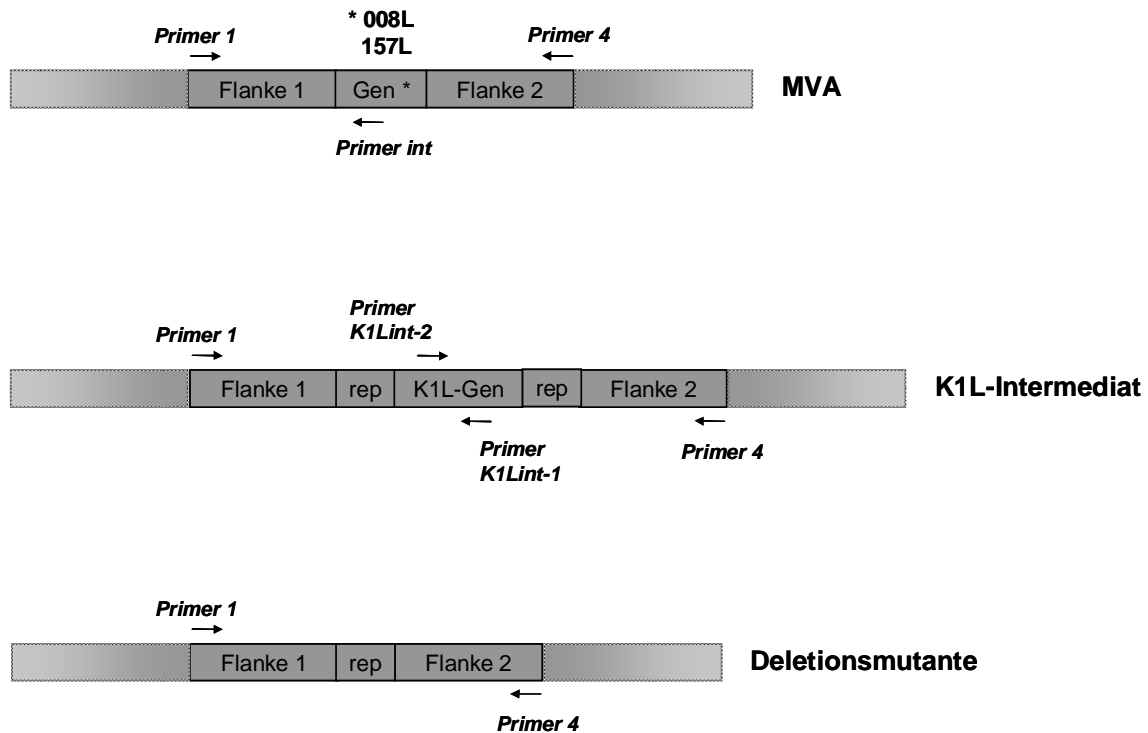


zusätzlich Wildtyp-DNA als Matrize vorhanden entstand ein weiteres Amplifikat, welches beide Flanken und das nicht-deletierte Gen beinhaltet. Eine Übersicht über die Größen der erwarteten Fragmente gibt *Tabelle 5 (S.86)* wider.

<u><b>Virus-DNA</b></u>	<u><b>008L (vIL-18BP) Deletions-Primer</b></u>			<u><b>157L (v3<math>\beta</math>-HSD) Deletions-Primer</b></u>		
	1 <sub>008L</sub> /4 <sub>008L</sub>	1 <sub>008L</sub> /int <sub>008L</sub>	K1Lint-1/ K1Lint-2	1 <sub>157L</sub> /4 <sub>157L</sub>	1 <sub>157L</sub> /int <sub>157L</sub>	K1Lint-1/ K1Lint-2
MVA WT	~1600 bp	~700 bp	—	~2250 bp	~1100 bp	—
K1L-Intermediat	~2700 bp	—	~300 bp	~2700 bp	—	~300 bp
Deletionsmutante	~1400 bp	—	—	~1400 bp	—	—

**Tabelle 5: Erwartete PCR-Fragmentgrößen bei Verwendung der verschiedenen Primer-Paare.**

Um ferner sicherzustellen, dass es sich um reine Klone mutierter Viren handelt wurde ein Primer, dessen Bindungsstelle innerhalb (Primer *int*) des zu deletierenden Gens liegt, verwendet. In Kombination mit Primer 1 war ein PCR-Produkt nur bei Vorhandensein von Wildtypvirus-DNA zu erwarten. Durch K1L-spezifische Primer (K1Lint-1/K1Lint-2) konnte weiterhin die Präsenz der Selektionskassette gezeigt werden.

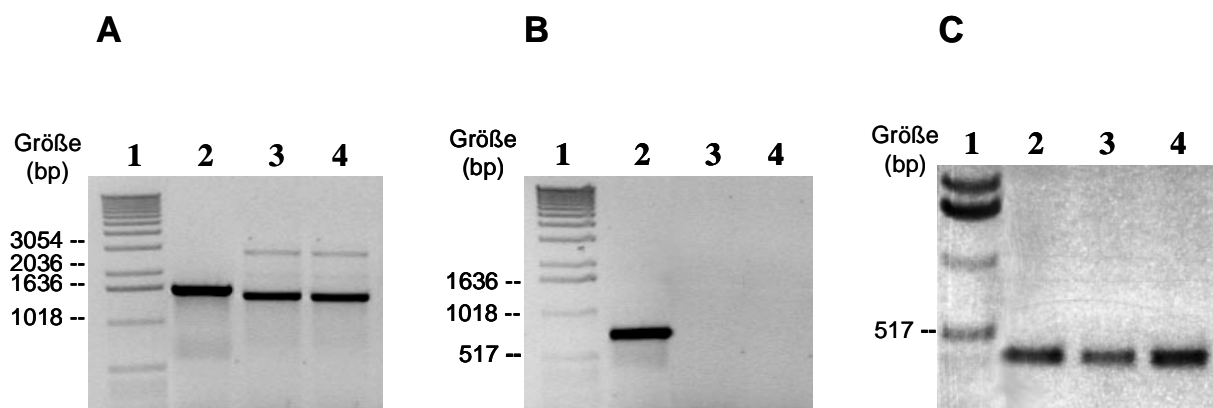


**Abbildung 13: Schematische Darstellung der Primer-Bindungsstellen.** Bei der Amplifikation der viralen DNA-Abschnitte zur Überprüfung der isolierten Virusklone fanden die bereits für die Klonierung der Transferplasmide eingesetzten Primer 1 und 4 Verwendung. Desweiteren wurde ein genspezifischer interner Primer (Primer int<sub>008L</sub> und Primer int<sub>157L</sub>) sowie Primer zur Detektion der Selektionskassette (K1Lint-1/ K1Lint-2) eingesetzt. Die „rep“-beschrifteten Fragmente bezeichnen die zur Selektionskassette gehörenden repetitiven DNA-Fragmente.

Am Beispiel der Generierung der vIL-18BP-Deletionsmutante stellt *Abbildung 14*, (S.88) das Ergebnis der PCR-Analyse reiner K1L-haltiger, mutanter Virusklone dar. Der Einsatz des Primerpaares 1<sub>008L</sub>/4<sub>008L</sub> (*Abbildung 14 A*) führte zu den gemäß *Tabelle 5*, (S.86) erwarteten Amplifikate mit ~1600 bp für MVA (Spur 1) und ~2700 bp für die K1L-Marker-haltigen Deletionsmutanten (Spur 3 und 4). Um auch die Detektion einzelner noch vorhandener Wildtypviren in dem Virusisolat eines Zellaggregats infizierter RK13-Zellen zu gewährleisten, wurde die Vermehrung der Viren zur nachfolgenden DNA-Extraktion auf CEF-Zellen (*siehe 3.5.5*, S.68) vorgenommen. Dieses ermöglichte die Eliminierung der Markerkassette (*siehe folgenden Abschnitt 4.1.2.2*, S.88), so dass das markante Signal bei ~1400 bp von bereits existenten K1L-freien Deletionsmutanten stammt.

Abbildung 14 B zeigt das ~700 bp betragende Signal der MVA-Kontrolle, welches nochmals die Abwesenheit von MVA-WT-Viren in den mutierten Virusklonen nachweist, und Abbildung 14 C bestätigt mit den Signalen der PCR-Produkte von ~300 bp die Integration des K1L-Gens in das Genom der untersuchten Viruskclone. Hier fand als Kontrolle eine DNA-Präparation des Vektorplasmids pΔK1L Verwendung, da sich die DNA des Wildtypvirus aufgrund der fehlenden K1L-Sequenz nicht als Referenz eignete.

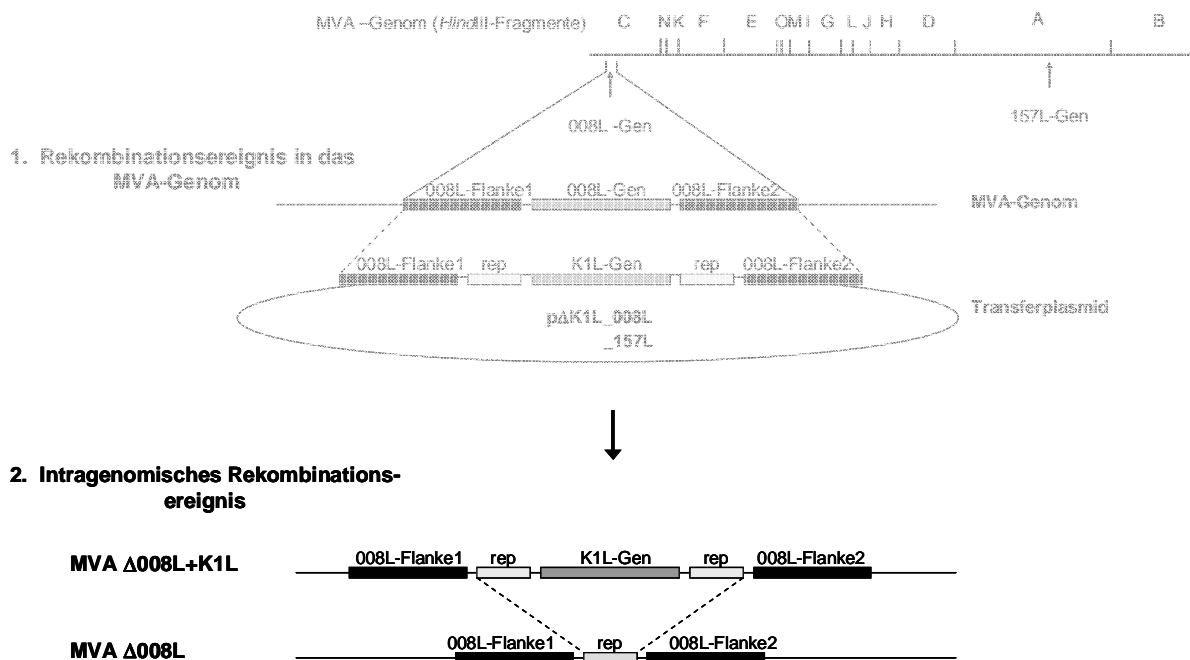
Unter Verwendung aller Primerpaare konnte somit die Selektion wildtypfreier, K1L-haltiger Viruskclone, die das Gen des vIL-18BP deletiert hatten, sichergestellt werden.



**Abbildung 14: PCR-Analyse viraler DNA.** Untersuchung rekombinanter  $\Delta$ IL-18BP-Viruskclone durch PCR-Analyse mit den Primerpaaren (A) 1<sub>008L</sub>/4<sub>008L</sub>, (B) 1<sub>008L</sub>/int<sub>008L</sub>, (C) K1Lint-1/K1Lint-2. Spur 2 in (A), (B) MVA, (C) pΔK1L. Spur 3 und 4 in (A), (B), (C)  $\Delta$ IL-18BP. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in einem 1% Agarosegel. Als Längenstandard diente eine 1kb-DNA-Leiter (Spur 1 in (A), (B), (C)).

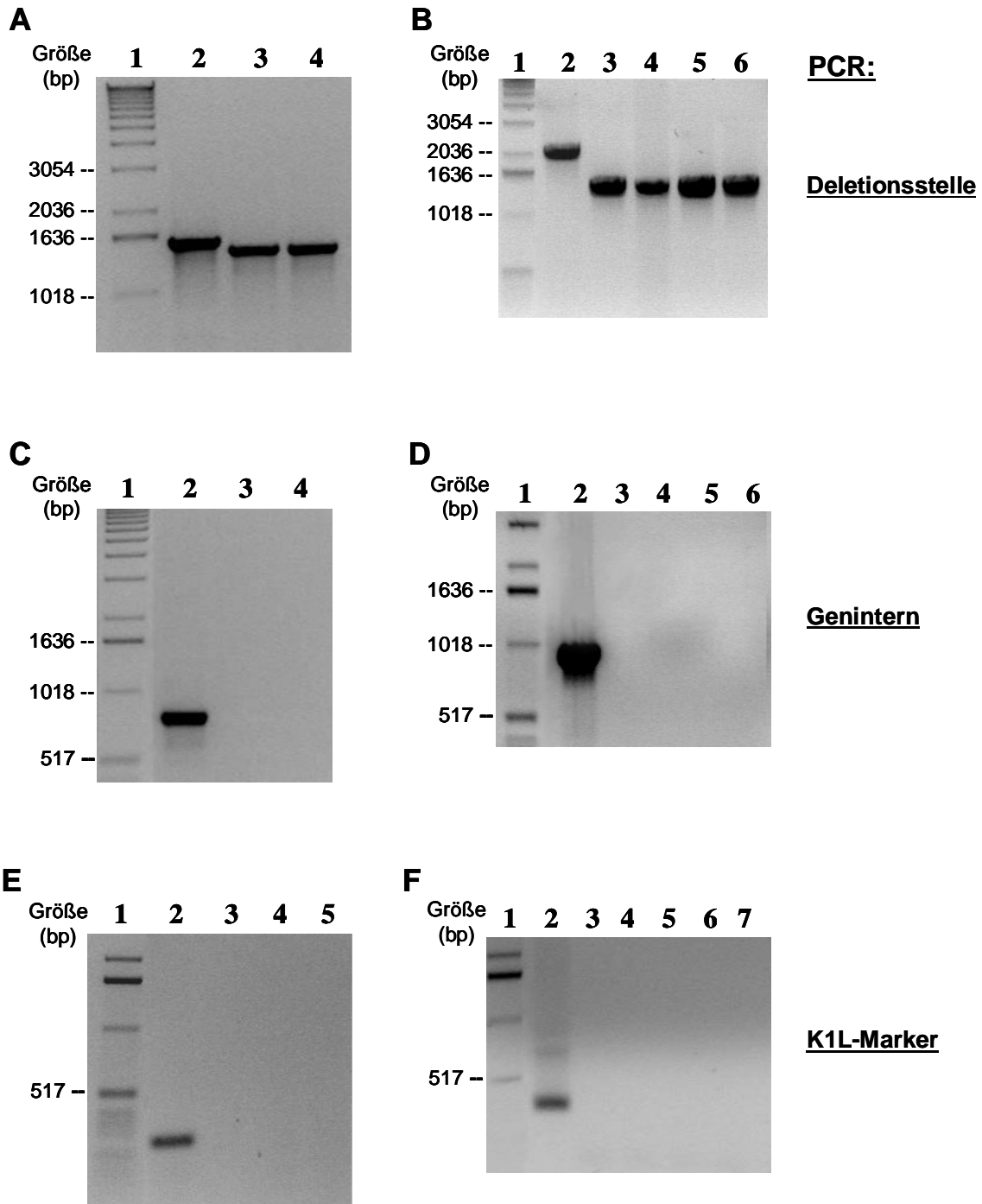
#### 4.1.2.2 Selektion der markerfreien Deletionsmutanten

Durch anschließende Kultivierung der rekombinanten MVA-Viren auf für MVA permissiven Zellen (CEF, BHK-21, siehe 2.12.2, S.42) entfiel der Selektionsdruck auf die K1L-Genfunktion. Dies ermöglichte die Eliminierung der Markerkassette durch intragenomische homologe Rekombination der repetitiven Sequenzen unter Verbleib eines dieser DNA-Fragmente (siehe Abbildung 15, S.89).



**Abbildung 15: Schematische Darstellung des intragenomischen Rekombinationsvorgangs zur Eliminierung der K1L-Markerkassette.** Nach Selektion K1L-haltiger Deletionsmutanten (hier dargestellt für die MVA-Mutante  $\Delta$ IL-18BP) wird durch Entfernen des Selektionsdrucks die Eliminierung des K1L-Markers über intragenomische Rekombination zwischen den beiden homologen repetitiven Fragmenten (rep) erreicht.

In *Abbildung 16* (S.90) ist die PCR-Analyse genomischer viraler DNA der unterschiedlichen Einzel-, Doppel- und Tripelmutanten dargestellt. Der Einsatz der Flanken-Primer 1 und 4 führte bei den  $\nu$ IL-18BP- (A) und  $\nu$ 3 $\beta$ -HSD-Deletionsmutanten (B) zu den erwarteten kleineren Amplifikaten von 1400 bp. Die PCR-Produkte der MVA-Kontrollen weisen eine der jeweiligen Genlänge entsprechende Größe von 1600 bp ((A) Spur 2) und 2250 bp ((B) Spur 2) auf. Bei Verwendung der geninternen Primer 1<sub>008L</sub>/int<sub>008L</sub> (C) und 1<sub>157L</sub>/int<sub>157L</sub> (D) wurden ausschließlich bei den Wildtyp-Kontrollen PCR-Produkte gebildet (Spur 2 in (C) 700 bp, Spur 2 in (D) 1100 bp). Ebenso entstand in der K1L-spezifischen PCR lediglich in den Kontrollansätzen mit dem Transferplasmid pΔK1L ein Amplifikat (*Abbildung 10* (E) und (F) Spur 2) von 300 bp. Die Ansätze mit DNA der unterschiedlichen Deletionsmutanten bzw. der MVA-Kontrollen ((E) Spur 5, (F) Spur 7) führten dagegen nicht zur Amplifikation eines K1L-spezifischen Fragments.



**Abbildung 16: PCR-Analyse viraler DNA.** Die Untersuchung erfolgte mit viraler DNA von Virusisolaten reiner MVA-Mutanten. Dargestellt sind in (A), (C) und (E)  $\Delta IL-18BP$  (Spur 3) und  $\Delta IL-1\beta R$   $\Delta IL-18BP$  (Spur 4); in (B), (D) und (F)  $\Delta 3\beta-HSD$  (Spur 3),  $\Delta IL-1\beta R$   $\Delta 3\beta-HSD$  (Spur 4),  $\Delta IL-18BP$   $\Delta 3\beta-HSD$  (Spur 5) und  $\Delta IL-1\beta R$   $\Delta IL-18BP$   $\Delta 3\beta-HSD$  (Spur 6). Spur 2 (A)-(D), Spur 5 (E) und Spur 7 (F) MVA. Spur 2 (E) und (F)  $p\Delta K1L$ . Die PCR wurde durchgeführt mit den Primerpaaren (A)  $1_{008L}/4_{008L}$ , (B)  $1_{157L}/4_{157L}$ , (C)  $1_{008L}/int_{008L}$ , (D)  $1_{157L}/int_{157L}$ , (E) und (F)  $K1Lint-1/K1Lint-2$ . Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in einem 1% Agarosegel. Als Längenstandard diente eine 1kb-DNA-Leiter (Spur 1 (A)-(F)).

Die erhaltenen Größen der PCR-Amplifikate stimmen mit den erwarteten Größen aus *Tabelle 5*, (S.86) überein. Somit dokumentiert das vorliegende Ergebnis die Isolierung von klonierten Viruspopulationen, die ausschließlich aus der jeweiligen Deletionsmutante bestanden.

Anschließend erfolgte die Virusamplifikation mit jeweils einem ausgewählten Klon und nach der Herstellung eines gereinigten Virusstocks (*siehe 3.5.1, S.64 und 3.5.2, S.65*) diente hieraus isolierte genomische Virus-DNA zur abschließenden Kontrolle anhand von PCR (Daten hier nicht gezeigt) und *Southern Blot* (*siehe 3.2.8, S.54*).

Bei der Analyse im Southern Blot ermöglichte der Einsatz der Restriktionsenzyme *EcoRI* oder *EcoRV* in Kombination mit bestimmten zur Hybridisierung verwendeten <sup>32</sup>P-markierten DNA-Sonden, die Unterscheidung zwischen MVA, rekombinantem K1L-haltigem Virus und endgültiger Deletionsmutante. Das Ergebnis der Behandlung der genomischen DNA von MVA,  $\Delta$ IL-18BP und  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP mit *EcoRI* und der als Sonde verwendeten IL-18BP\_Flanke 2 ist in *Abbildung 17 A* dargestellt. Diese zeigt die vIL-18BP-Deletion in DNA-Fragmenten mit geringerem Molekulargewicht (~5400 bp, Spur 2 und 3) als die entsprechenden Fragmente des Wildtypvirus (~6600 bp, Spur 1).

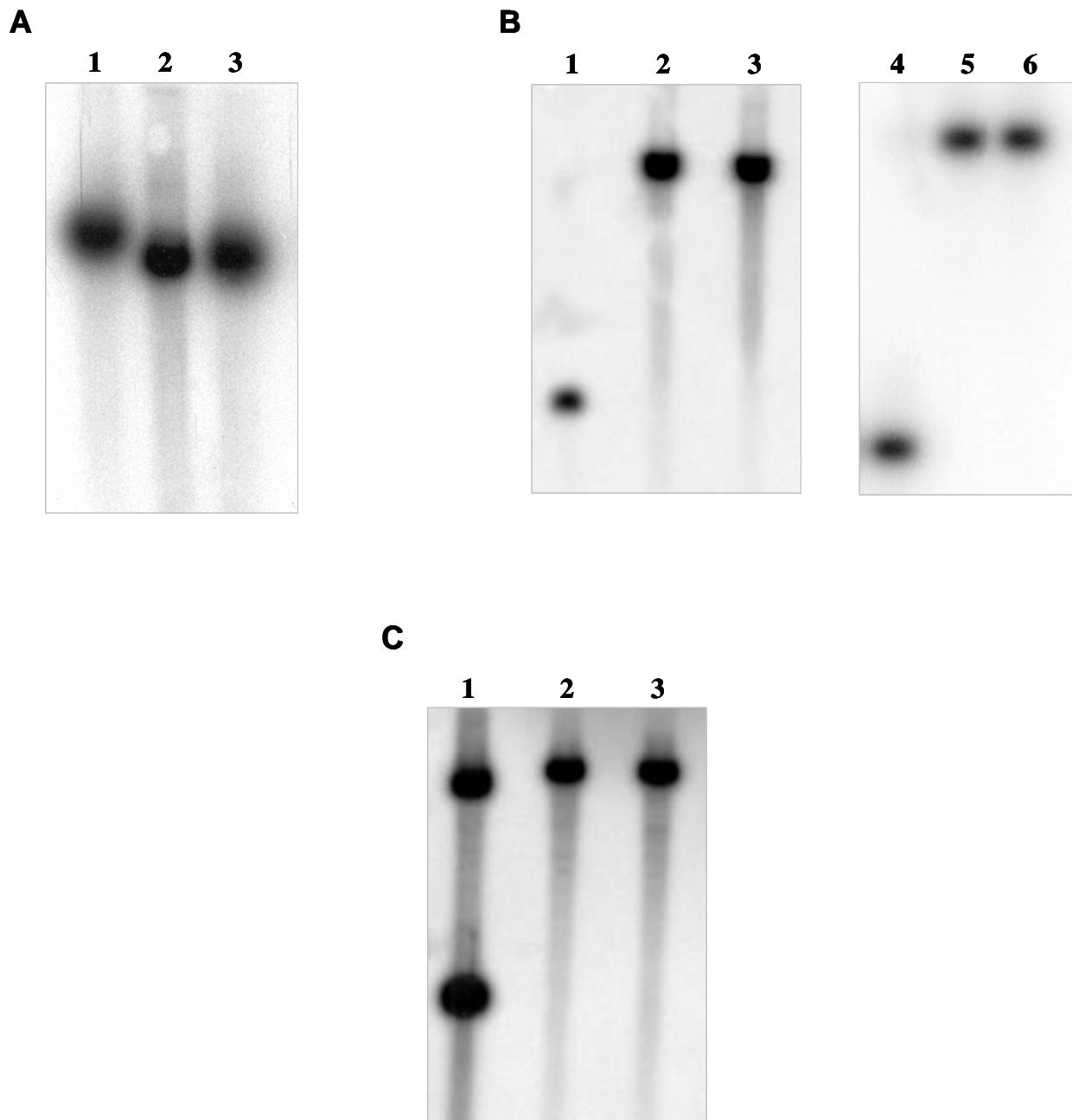
Für *Abbildung 17 B* wurde die virale DNA von MVA,  $\Delta$ 3 $\beta$ -HSD,  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ 3 $\beta$ -HSD,  $\Delta$ IL-18BP  $\Delta$ 3 $\beta$ -HSD und der Tripelmutante  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP  $\Delta$ 3 $\beta$ -HSD mit *EcoRV* gespalten und zur Hybridisierung die Flanke 1 des 3 $\beta$ -HSD-Gens eingesetzt. Die Signale in Höhe von ~1400 bp für MVA (Spur 1 und 4) und ~5900 bp für die Deletionsmutanten (Spur 2,3,5 und 6) sowie das Ausbleiben von Banden K1L-haltiger Virus-DNA in Höhe von ~1700 bp unterstützten das Vorliegen von reinen Viruspräparationen endgültiger Deletionsmutanten. Dabei ist das Signal für die Virusmutante deshalb mit einem größeren Molekulargewicht detektierbar als das Signal für die WT-Kontrolle, da durch die Eliminierung der Gensequenz auch die im Gen enthaltene *EcoRV*-Erkennungssequenz entfernt wurde.

Die fehlende Expression des v3 $\beta$ -HSD-Gens in den Virusmutanten konnte nicht in einer Western Blot Analyse dargestellt werden, da für die v3 $\beta$ -HSD kein Antikörper zur Verfügung stand. Deshalb wurde ein weiterer Southern Blot angefertigt, der durch Verwendung einer Sonde, die zusätzlich das 3 $\beta$ -HSD-Gen beinhaltete, das Fehlen dieser Sequenz im gesamten Virusgenom zeigte (*siehe Abbildung 17 C*).

Hierbei erfolgte, nach der Spaltung der viralen DNA mit dem Restriktionsenzym *EcoRI*, die Inkubation mit dem <sup>32</sup>P-markierten v3 $\beta$ -HSD-Gen einschließlich der Sequenz der Flanke 2. Das vorliegende Experiment führte, wie am Beispiel der Einzeldelentionsmutante  $\Delta$ 3 $\beta$ -HSD

und der Doppelmutante  $\Delta IL-1\beta R \Delta 3\beta\text{-HSD}$  gezeigt, zum Nachweis der Banden in Höhe von ~11 kbp (Spur 2 bzw. 3) durch Hybridisierung mit dem Sondenbereich, der die Nukleotidsequenz der  $3\beta\text{-HSD\_Flanke 2}$  darstellt. Beim Wildtypvirus (Spur 1) hybridisierte die Sequenz der Flanke 2 mit dem kleinen ~2400 bp betragenden Fragment.

Der Sondenabschnitt, der mit der Sequenz des  $v3\beta\text{-HSD-Gens}$  übereinstimmt, resultierte bei der MVA-Kontrolle in dem Signal in Höhe von ~8900 bp. Die Spuren der Virusmutanten zeigten keine durch Hybridisierung mit der  $v3\beta\text{-HSD-Gensequenz}$  nachweisbaren Banden, welches die vollständige Eliminierung des  $v3\beta\text{-HSD-Gens}$  aus dem Genom der Deletionsmutanten annehmen ließ.



**Abbildung 17: Southern Blot-Analyse viraler DNA.** Die Behandlung von Virus-DNA mit den Restriktionsenzymen EcoRI (A), (C) und EcoRV (B) und nachfolgende Hybridisierung mit  $^{32}\text{P}$ -markierten Sonden erlaubte die Identifizierung von MVA- und Mutanten-DNA. Als Sonden dienten die für die Klonierung des jeweiligen Transfervektors amplifizierte DNA-Abschnitte (A) IL-18BP\_Flanke 2 und (B)  $3\beta$ -HSD\_Flanke 1. In (C) fand eine aus dem  $v3\beta$ -HSD-Gen und anschließender  $3\beta$ -HSD\_Flanke 2 bestehende Sonde Verwendung. (A) MVA (Spur 1),  $\Delta$ IL-18BP (Spur 2),  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP (Spur 3). (B) MVA (Spur 1 und 4),  $\Delta$   $3\beta$ -HSD (Spur 2),  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ 3 $\beta$ -HSD (Spur 3),  $\Delta$ IL-18BP  $\Delta$ 3 $\beta$ -HSD (Spur 5) und  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP  $\Delta$ 3 $\beta$ -HSD (Spur 6). (C) MVA (Spur 1),  $\Delta$ 3 $\beta$ -HSD (Spur 2),  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ 3 $\beta$ -HSD (Spur 3). Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in 0,8% Agarosegelen mit anschließendem Transfer auf Nitrozellulosemembranen. Zur Detektion der markierten DNA nach Hybridisierung wurden Röntgenfilme belichtet.



Die zusätzliche Überprüfung aller angefertigten Virusmutanten durch Southern Blot-Analysen bestätigte die erfolgreiche Eliminierung des vIL-18BP- und/oder v $\beta$ -HSD-Gens. Zudem zeigten sie, dass die Virusisolate ausschließlich aus den Deletionsmutanten bestehen und keine MVA- oder K1L-haltigen Viren enthalten.

## 4.2 *In vitro*-Charakterisierung der generierten MVA-Deletionsmutanten

### 4.2.1 Wachstumsanalyse der MVA-Deletionsmutanten

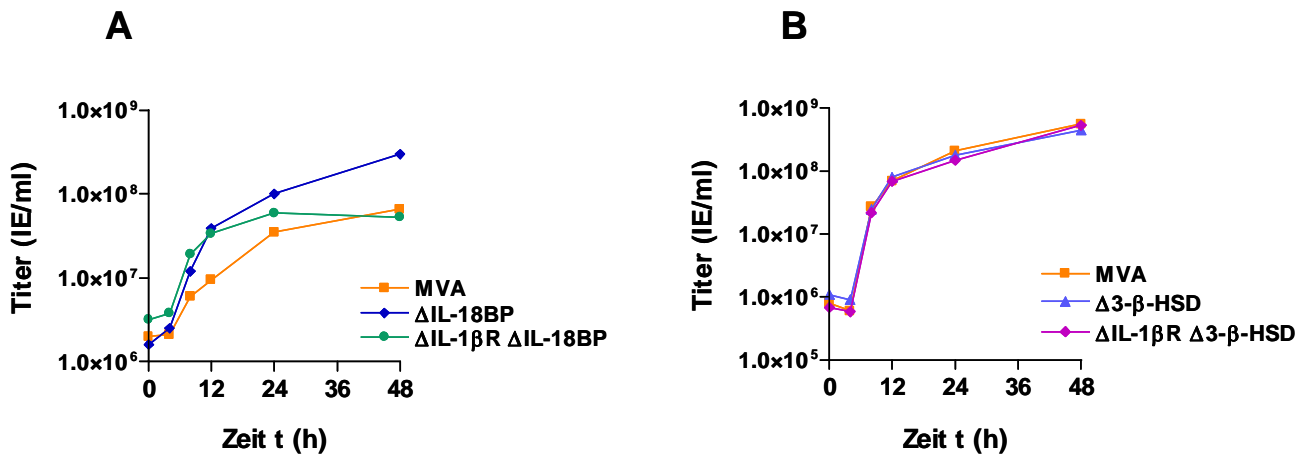
Nach erfolgreicher Konstruktion der MVA-Deletionsmutanten sollten nun Untersuchungen zum Wachstumsverhalten der Viren Aufschluß darüber geben, ob die herbeigeführten Veränderungen im Genom Auswirkungen auf die Vermehrungsfähigkeit der Viren in Zellkultur haben. Wichtig war hierbei vor allem auszuschließen, dass sich die Eliminierung der Gene hemmend auf die Virusvermehrung auswirkt, welches beispielsweise nachteilig für die Impfstoffproduktion wäre. Zur Untersuchung des Wachstumsverhalten erfolgte die Anfertigung von Ein-Schritt- und Mehr-Schritt-Wachstumskurven (*siehe 3.5.4, S.67*).

Bei der Erstellung der Ein-Schritt-Wachstumskurven wird durch die hohe Infektionsdosis gewährleistet jede Zelle mit mindestens einem Viruspartikel zu infizieren. Dieses ermöglichte es, mit zunehmender Länge der Inkubationszeit den Anstieg der Infektiosität zu messen (*siehe Abbildung 18, S.95*). Dabei kam es unmittelbar nach der Infektion teilweise zu einer Reduktion der nachweisbaren infektiösen Viren in dieser Phase des Entpackens, weshalb viele infektionstüchtige Viruspartikel bei der Titerbestimmung (*siehe 3.5.3, S.65*) nicht einbezogen wurden.

Als Maßstab für das Wachstumsverhalten der Virusmutanten diene jeweils die in allen Experimenten mitgeführte MVA-WT-Kontrolle. Aus den erstellten Wachstumskurven ist ersichtlich, dass die Viruskonzentrationen in den  $\Delta\beta$ -HSD- oder  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta\beta$ -HSD-infizierten Zellproben (*Abbildung 18 B*) genauso zunahmen wie nach Infektion mit MVA. Die Virusmutanten  $\Delta$ IL-18BP  $\Delta\beta$ -HSD und  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP  $\Delta\beta$ -HSD zeigten ebenfalls ein mit MVA übereinstimmendes Wachstumsverhalten in Ein-Schritt-Infektionsexperimenten.

Ein von der WT-Kontrolle abweichendes Wachstumsverhalten wiesen dagegen  $\Delta$ IL-18BP und  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP auf (*Abbildung 18 A*). Bei beiden Deletionsmutanten war bis zum 24 h Zeitpunkt eine schnellere Zunahme der Viruskonzentration zu beobachten.

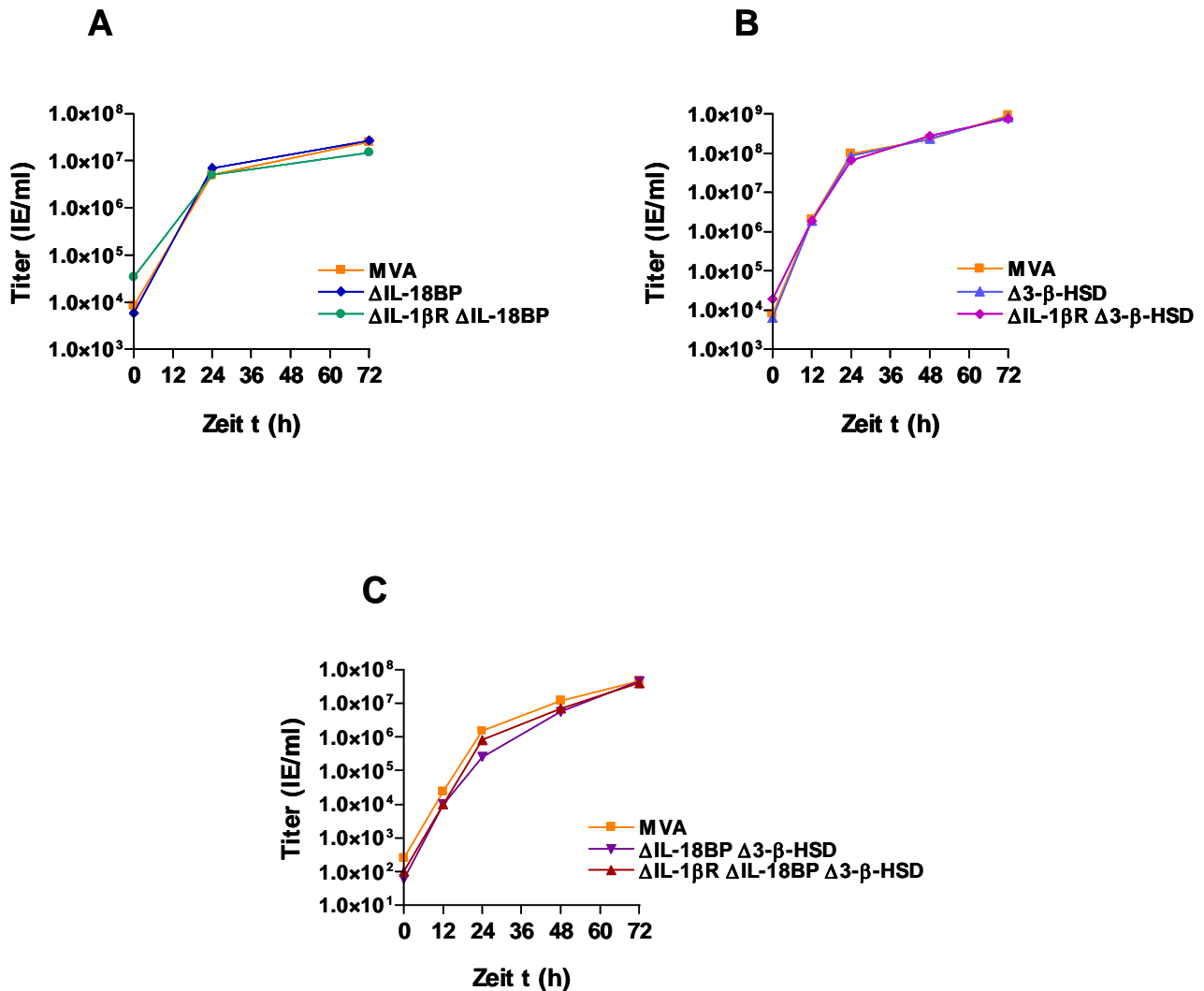
Aus den erstellten Ein-Schritt-Wachstumskurven ist somit ersichtlich, dass, im Vergleich zu MVA, die Virusinfektiösität aller untersuchten Viren gleich bzw. schneller zunahm und diese somit kein nachteilig verändertes, sondern dem Wildtypvirus gleichwertiges Replikationsverhalten aufweisen (*siehe Abbildung 18, S.95*).



**Abbildung 18: Ein-Schritt-Wachstumsanalyse.** Wachstumsanalyse der Deletionsmutanten nach Infektion von CEF-Zellen mit einer hohen Dosis an infektiösen Einheiten ( $10 \text{ IE/Zelle}$ ).

Bei der besonders aufschlussreichen Infektion von Zellen mit einer niedrigen Anzahl an infektiösen Einheiten (Mehr-Schritt-Wachstumsanalyse) kann zusätzlich zu dem in den Ein-Schritt-Wachstumskurven gezeigten intrazellulären Replikationsvermögen überprüft werden, wie effizient sich die Viren in einer Kultur von Zelle zu Zelle ausbreiten können (*siehe 3.5.4.2, S.67*). Die gewählte Infektionsdosis von  $0,05 \text{ IE/Zelle}$  bewirkte die Infektion von lediglich einem Bruchteil der Zellen. Die schnelle Zunahme der Viruskonzentrationen im Verlauf dieser Mehr-Schritt-Wachstumskurven ist auf die Replikation und anschließende Neuinfektion von Nachbarzellen durch neugebildete Viren zurückzuführen (*siehe Abbildung 19, S.96*). Entsprechend der Versuchsdurchführung bei der Ein-Schritt-Wachstumsanalyse beinhalten die dargestellten Wachstumskurven die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten (*Abbildung 19 A, B und C*). Vermutlich aufgrund verschiedener CEF-Präparationen waren zum Nullstundenzeitpunkt teilweise unterschiedliche Mengen an Infektiösität nachweisbar. In der Zunahme der Virustiter lassen sich für  $\Delta 3\beta\text{-HSD}$  oder  $\Delta IL-1\beta R \Delta 3\beta\text{-HSD}$  (*Abbildung 19 B*) keine und für  $\Delta IL-18BP$  und  $\Delta IL-1\beta R$ -

$\Delta$ IL-18BP (Abbildung 19 A) bzw.  $\Delta$ IL-18BP  $\Delta$ 3 $\beta$ -HSD und  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP  $\Delta$ 3 $\beta$ -HSD (Abbildung 19 B) nur unerhebliche Unterschiede zwischen den Viren erkennen. Die im Experiment der Abbildung 18 A vorhandene etwas schnellere Zunahme der Viruskonzentration der Deletionmutanten  $\Delta$ IL-18BP und  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP trat hier nicht auf.



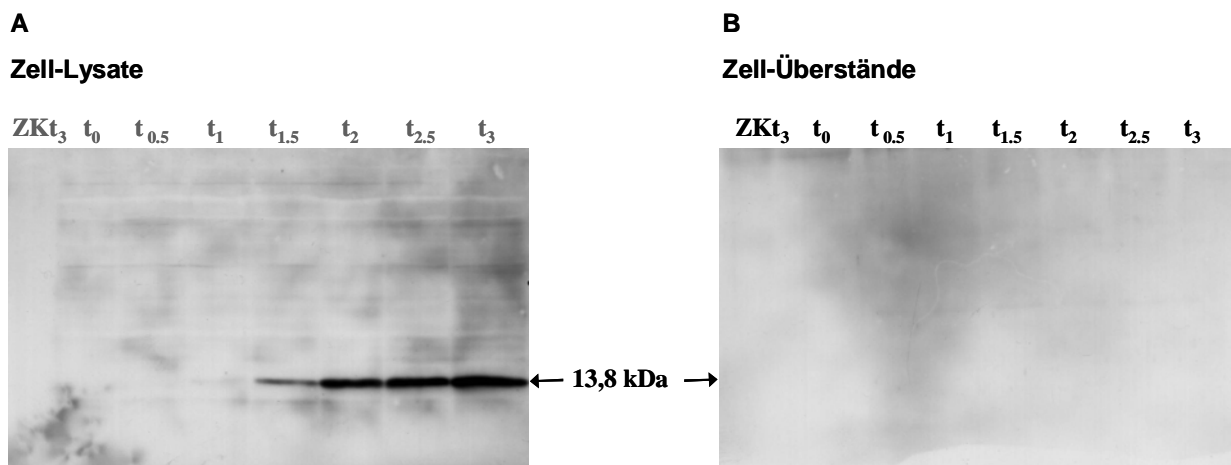
**Abbildung 19: Mehr-Schritt-Wachstumsanalyse.** Wachstumsanalyse der Deletionsmutanten nach Infektion von CEF-Zellen mit einer niedrigen Dosis an infektiösen Einheiten (0,05 IE/Zelle).

Die Resultate der Experimente zeigen, dass die Deletion der Gene in den hergestellten MVA-Mutanten weder in den Ein-Schritt- noch in den Mehr-Schritt-Wachstumsanalysen gegenüber MVA zu einem verringerten Wachstumsvermögen führten.

#### 4.2.2 Analyse der Synthese und Sekretion des viralen IL-18-Bindungsproteins in MVA-infizierten Zellen

Da die Synthese des VV WR-IL-18BP in der frühen Phase des Infektionszyklus stattfindet und dieses Protein, wie auch für das MVA-IL-18BP gezeigt, als lösliches Protein in den Extrazellulärraum sezerniert wird (Symons, Adams *et al.* 2002), sollte in einem nächsten Experiment die Produktion des vIL-18BP durch MVA zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion untersucht werden. Hierfür wurden HeLa-Zellen mit 12,5 IE/Zelle infiziert und anschließend sowohl die Überstände der Zellen gesammelt, wie auch zytoplasmatische Extrakte der infizierten Zellen hergestellt.

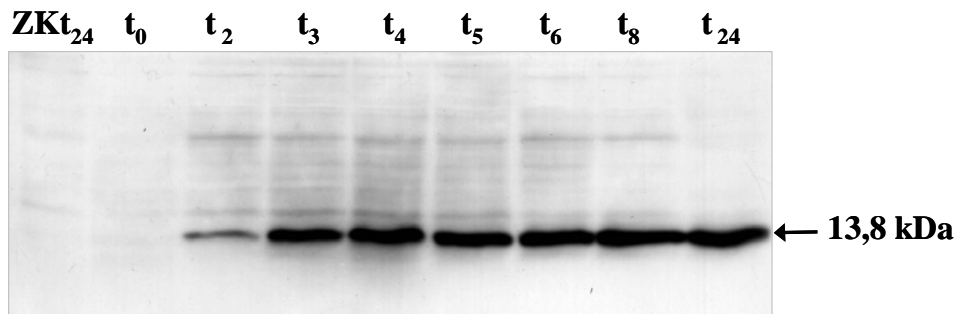
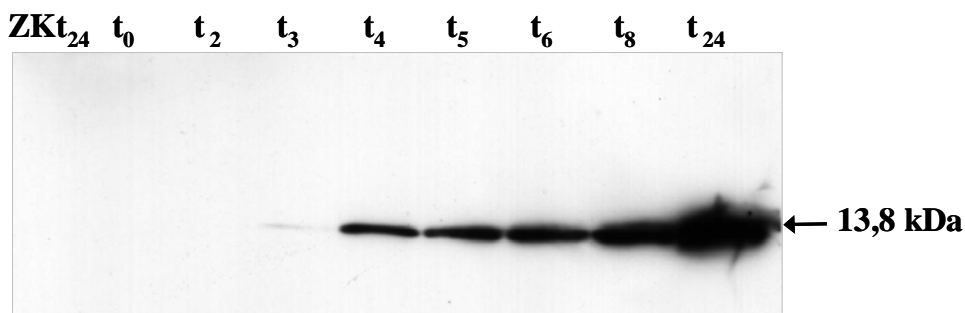
Bereits 90 min nach der Infektion von HeLa-Zellen war in Zelllysaten im Western Blot ein Signal für das 13,8 kDa betragende IL-18BP detektierbar (siehe Abbildung 20, S.97) und die Synthese des Proteins nahm über den Beobachtungszeitraum von drei Stunden stetig zu. Während dieser Periode war allerdings noch kein sezerniertes Protein nachzuweisen. Erst 4 h nach der Infektion konnte im Zellmedium vIL-18BP detektiert werden (siehe Abbildung 20, S.97 und Abbildung 21, S.99).



**Abbildung 20: Kinetik der viralen IL-18BP-Synthese in HeLa-Zellen.** Lysate (A) und Überstände (B) von MVA-infizierten HeLa-Zellen (12,5 IE/Zelle) wurden in einem 15% SDS-Gel aufgetrennt und nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran im Western-Blot auf das Vorhandensein des vIL-18BP untersucht. Der verwendete anti-IL-18BP-Antikörper wurde 1:5000-verdünnt eingesetzt. Die Detektion erfolgte durch Chemielumineszenz auf einem Röntgenfilm. (A) Lysate von HeLa-Zellen zu den Stundenzeitpunkten t(0) – t(4) nach Infektion mit MVA. ZK, Zellkontrolle (Lysat uninfizierter Zellen) 3 h nach der Infektion. (B) Überstände von HeLa-Zellen zu den Stundenzeitpunkten t(0) – t(4) nach Infektion mit MVA. ZK, Überstand uninfizierter Zellen 3 h nach der Infektion.

Die Kinetik der Synthese des vIL-18BP zu späteren Zeitpunkten nach Infektion wurde in einem weiteren Infektionsexperiment in HeLa-Zellen untersucht:

Wie aus *Abbildung 21*, (S.99) ersichtlich, wurde das vIL-18BP frühzeitig exprimiert, blieb aber auch zu späteren Zeitpunkten in den Lysaten nachweisbar. So war die Proteinbande zwei Stunden nach der Infektion detektierbar, nahm bis zum nächsten Stundenwert an Stärke zu und blieb in gleicher Intensität auch bis 24 h p.i. (Latein: post infektionem (p.i.)) erhalten. Ebenso verhielt es sich, wenn auch mit einer zeitlichen Verzögerung, mit in den Überstand der infizierten Zellen sezerniertem vIL-18BP. Drei Stunden nach der Infektion konnte hier bereits ein schwaches Proteinsignal detektiert werden, welches bei den nachfolgenden Stundenwerten stetig an Stärke zunahm. Um zu zeigen, dass die konstante Nachweisbarkeit in der hohen Stabilität des Proteins begründet liegt und nicht in dessen Genexpression während des gesamten Infektionszyklus, wurde der Versuch unter Zusatz von Cytosin-Arabinose (Ara C) durchgeführt. Ara C interkaliert als Nukleotidanalogen zu dCTP in die DNA und verhindert so die DNA-Replikation. Als Folge davon ist in MVA der Übergang von der frühen zur mittleren Genexpression nicht möglich, wodurch die Synthese aller, auch zu einem späteren Zeitpunkt als 5 h p.i. vorhandenen viralen Proteine, in der frühen Phase des Infektionszyklus erfolgte.

**A****Zell-Lysate****B****Zell-Überstände**

**Abbildung 21: Kinetik der viralen IL-18BP-Synthese in HeLa-Zellen unter Hemmung der viralen intermediären und späten Genexpression.** Die Ernte MVA-infizierter (12,5 IE/Zelle) und Ara C-behandelter HeLa-Zellen erfolgte zu den Zeitpunkten t (0) – t (24) h p.i. (A) Lysate und (B) Zellüberstände wurden in einem 15% SDS-Gel aufgetrennt und nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran im Western-Blot auf das Vorhandensein des vIL-18BP untersucht. Der verwendete anti-IL-18BP-Antikörper wurde 1:5000-verdünnt eingesetzt. Die Detektion erfolgte durch Chemielumineszenz auf einem Röntgenfilm. ZK, Zellkontrolle, (A) Lysat und (B) Überstand uninfizierter Zellen 24 h nach der Infektion.

Neben der Infektion der Zellen mit MVA wurden in den hier gezeigten Experimenten auch Lysate und Überstände von Zellen eingesetzt, die mit den Deletionsmutanten  $\Delta$ IL-18BP und  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP infiziert worden waren. In keinem der Ansätze konnte ein vIL-18BP-spezifisches Signal detektiert werden, wodurch das Fehlen des Proteins nach Deletion der kodierenden Gensequenz nochmals bestätigt werden konnte (siehe Abbildung 22, S.100, Spur 3, 4, 7, 8).

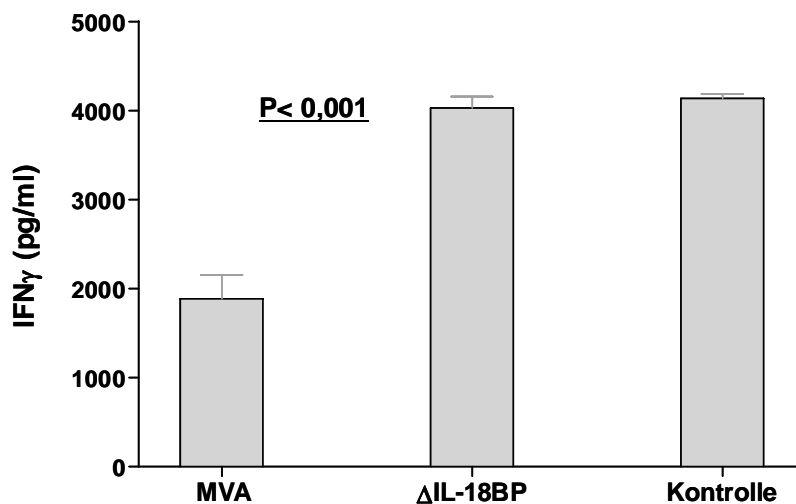


**Abbildung 22: vIL-18BP-Synthese MVA-,  $\Delta$ IL-18BP- und  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP-infizierter Zellen.** CEF-Zellen wurden mit 20 IE/Zelle für 4 h infiziert. Lysate (Spur 1-4) und Zellüberstände (Spur 5-8) wurden in einem 15% SDS-Gel aufgetrennt und nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran im Western-Blot auf das Vorhandensein des vIL-18BP untersucht. Der verwendete anti-IL-18BP-Antikörper wurde 1:5000-verdünnt eingesetzt. Die Detektion erfolgte durch Chemielumineszenz auf einem Röntgenfilm. (Spur 1 und 5) ZK, uninfizierte Zellen, (Spur 2 und 6) MVA, (Spur 3 und 7)  $\Delta$ IL-18BP, (Spur 4 und 8)  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP.

#### 4.2.3 Nachweis der Funktionalität des viralen IL-18-Bindungsproteins

Durch die Expression eines funktionsfähigen viralen IL-18BP besitzt MVA das Potential, der Immunantwort des infizierten Organismus entgegenzuwirken. Nachdem gezeigt werden konnte, dass das Genprodukt bereits 90 min nach Infektion von HeLa-Zellen mit MVA in deutlich nachweisbaren Konzentrationen vorliegt, wurde im Folgenden die Funktionalität des IL-18-Inhibitors untersucht (*siehe* 3.3.4, S.59). Hierfür wurde folgender Funktionstest entwickelt: Primäre Milzzellen werden mit murinem IL-18 und IL-12 zur Sekretion von IFN $\gamma$  angeregt. Durch Zugabe von aktivem vIL-18BP aus MVA-infizierten Zellen sollte IL-18 gebunden und in seiner Wirkungsweise behindert werden. Die jeweilige IFN $\gamma$ -Konzentration sowohl stimulierter, als auch stimulierter und mit Virusüberständen (MVA oder  $\Delta$ IL-18BP) behandelter Ansätze, kann anschließend anhand eines IFN $\gamma$ -ELISA's bestimmt werden. Im nachfolgenden Experiment wurden HeLa-Zellen mit MVA bzw.  $\Delta$ IL-18BP infiziert und die

Überstände nach vier Stunden gesammelt. Diese wurden dann mit IL-18/IL-12-stimulierten Milzzellen für 36 h kokultiviert, die Überstände abgenommen und im IFN $\gamma$ -ELISA getestet. *Abbildung 23(S.101)* zeigt das Ergebnis eines Experiments, repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Versuchsansätze. Die IFN $\gamma$ -Konzentration der Milzzellproben, die mit MVA-infizierten HeLa-Zellüberständen inkubiert wurden, ist signifikant ( $p < 0,001$ ) niedriger als der IFN $\gamma$ -Gehalt in den Kontrollansätzen. Das Fehlen des vIL-18BP in den  $\Delta$ IL-18BP-infizierten HeLa-Zellüberständen hatte keinen Einfluß auf die IFN $\gamma$ -Ausschüttung in den Milzzellen und führte somit zu gleich hohen IFN $\gamma$ -Werten wie die Behandlung mit reinen uninfizierten Kontrollüberständen. Das vIL-18BP von MVA ist somit in der Lage durch Bindung an IL-18 die Stimulation der IFN $\gamma$ -Sekretion durch dieses Interleukin zu hemmen.



**Abbildung 23: Reduktion der IFN $\gamma$ -Sekretion in Milzzellen nach Inkubation mit vIL-18BP-haltigen Zellüberständen.** Primäre Milzzellen wurden mit IL-18 und IL-12 stimuliert und währenddessen mit Überständen virusinfizierter HeLa-Zellen inkubiert. Die Infektion der HeLa-Zellen erfolgte mit MVA und  $\Delta$ IL-18BP. Als Kontrolle dienten Überstände uninfizierter HeLa-Zellen.



### 4.3 Vergleichende Untersuchungen zur Immunogenität der Deletionsmutanten und MVA im Mausmodell

Die Eliminierung des vIL-18BP-Gens in dem für Mäuse virulenten Vacciniavirusstamm VV WR führte zur Attenuierung des Virus nach intranasaler Infektion. Dieses äußerte sich in einer Zunahme der NK-Zellpopulationen in verschiedenen Geweben (Lunge, Milz, mediastinale Lymphknoten) und einer erhöhten TH1-Immunantwort in den infizierten Tieren. Hier konnte eine vermehrte Aktivität der zytotoxischen T-Lymphozyten und eine erhöhte IFN $\gamma$ -Produktion (im Respirationstrakt nach intranasaler Applikation) gemessen werden (*Reading and Smith 2003 a*). Ähnliche Beobachtungen wurden bei Deletion der v $\beta$ -HSD in VV WR gemacht (*Reading, Moore et al. 2003*). Neben der in Lunge und Plasma von Mäusen festgestellten Erhöhung des Anteils zytotoxischer T-Lymphozyten und der vermehrten IFN $\gamma$ -Sekretion zeigte sich die  $\beta$ -HSD-Deletionsmutante, wie die vIL-18BP-Deletionsmutante, attenuiert gegenüber dem Wildtypvirus VV WR.

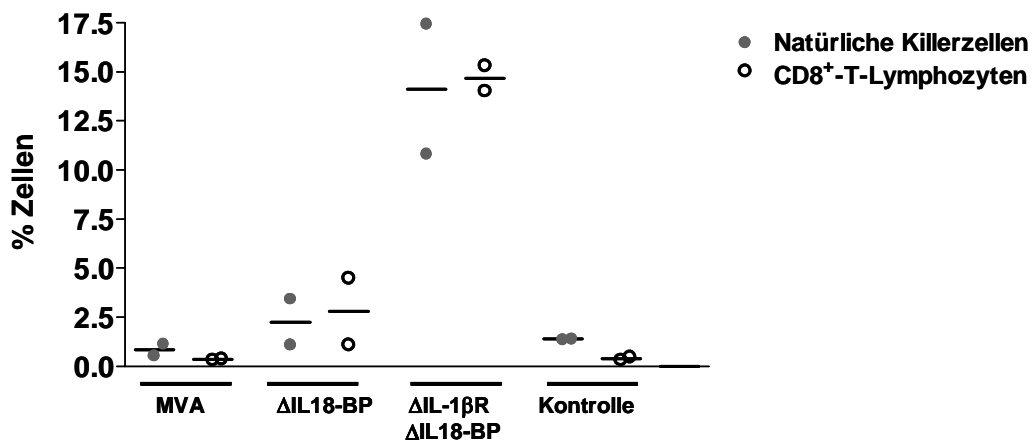
Im Kontext des hochattenuierten Vacciniavirus MVA ist noch nichts über die Aktivität dieser Moleküle im Wirt während einer Virusinfektion, und wie sie hier die Ausbildung der antiviralen Schutzwirkung und Entwicklung der adaptiven Immunantwort beeinflussen können, bekannt. Deshalb war es im Folgenden interessant den potentiellen Einfluß dieser Immunmodulatoren auf die akute- und Langzeitimmunität, wie auch auf die Schutzwirkung von MVA zu untersuchen.

#### 4.3.1 Einfluß der vIL-1 $\beta$ R-, vIL-18BP- und v $\beta$ -HSD-Proteine auf die unmittelbare Immunantwort

Um den Einfluß der vIL-1 $\beta$ R-, vIL-18BP- und v $\beta$ -HSD-Proteine auf die unmittelbare Immunantwort untersuchen zu können, erfolgte die Immunisierung von Mäusen intranasal oder intraperitoneal mit MVA und Deletionsmutanten. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Impfung wurden Broncheoalveolarlavagen oder Peritoneallavagen durchgeführt. Die Analyse der isolierten Zellsuspensionen erlaubte eine Quantifizierung der vorhandenen NK-Zellen sowie CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten.

In einem ersten Experiment wurden je zwei Tiere intranasal mit MVA,  $\Delta$ IL-18BP und  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP ( $10^8$  IE) oder Impfstoffpuffer ohne Virus (als Negativkontrolle) (*siehe 3.6.1.1, S.72*) immunisiert und die Lungen 96 h nach der Infektion gespült (*siehe 3.6.2.1, S.72*). Die Zellsuspensionen wurden anschließend mit NK-Zell- und CD8<sup>+</sup>-spezifischen

Antikörpern inkubiert und im Durchflusszytometer analysiert. Hier zeigte sich nach Immunisierung mit  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP eine erhöhte Anzahl sowohl an NK- (14,1%) als auch an CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (14,7%) gegenüber den mit MVA,  $\Delta$ IL-18BP oder Impfstoffpuffer behandelten Tieren, bei welchen die Werte zwischen 0,4% (MVA/Kontrolle) und 2,8% ( $\Delta$ IL-18BP) lagen (siehe Abbildung 24, S.103).



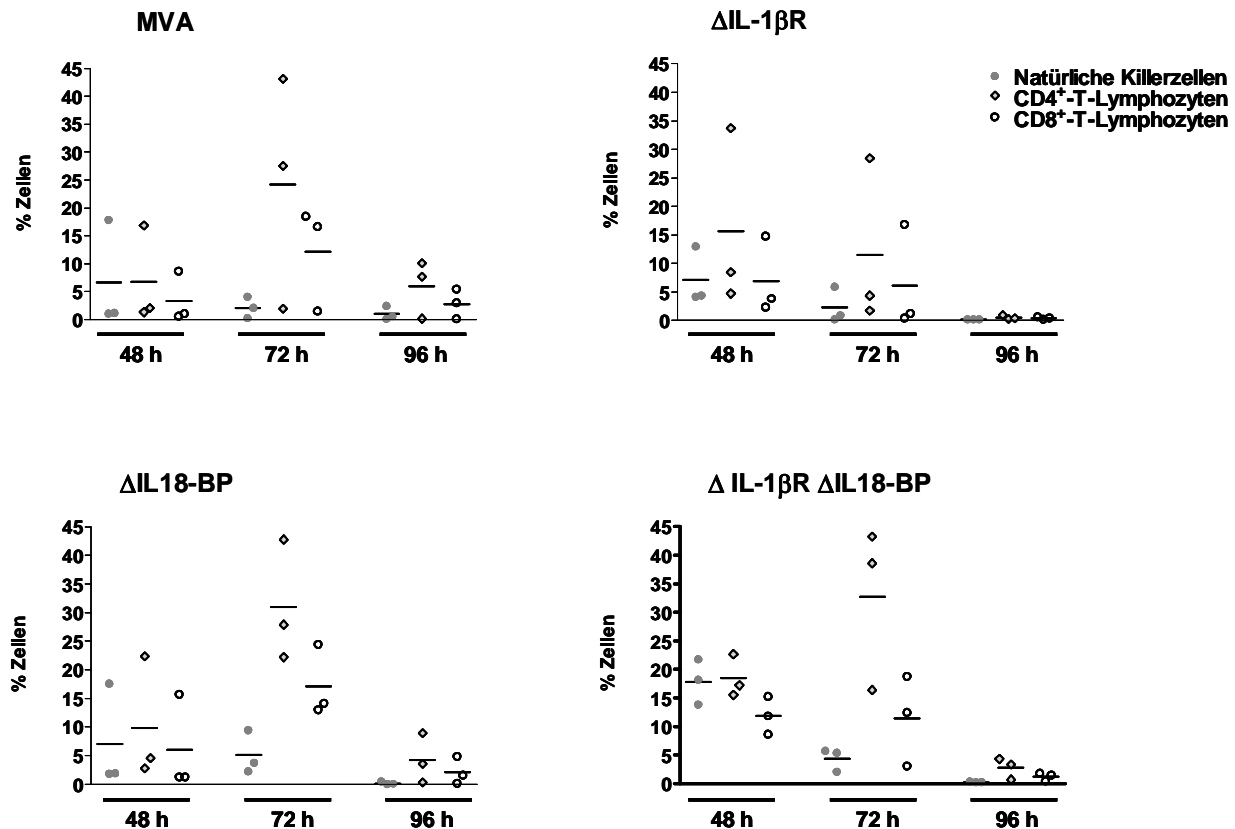
**Abbildung 24: Anteil an NK-Zellen und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in Bronchoalveolar-lavage-Suspensionen 96 h nach Immunisierung.** Intranasale Immunisierung von je zwei Mäusen mit MVA,  $\Delta$ IL-18BP und  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP. Die Kontrollgruppe erhielt Impfstoffpuffer. 96 h p.i. wurden die Lungen gespült und der Anteil an NK-Zellen und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in den Suspensionen per FACS analysiert. Darstellung der Werte der Einzeltiere mit Gruppenmittelwert.

Da Immunantworten immer einer Kinetik unterliegen, sollte im folgenden Experiment der optimale Zeitpunkt für die Durchführung einer Bronchoalveolarlavage nach Immunisierung mit MVA und MVA-Mutanten ermittelt werden. Hierfür wurden BALB/c-Mäuse (n=3) erneut intranasal mit MVA,  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R,  $\Delta$ IL-18BP und  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP geimpft ( $10^8$  IE) und die Spülung der Lungen 48 h, 72 h und 96 h p.i. durchgeführt. Zusätzlich zur Bestimmung des Anteils an NK-Zellen und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten wurde auch die Population der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen bestimmt.

Wie aus der Darstellung der Ergebnisse in Abbildung 25 (S.105) ersichtlich, scheint der maximale Anteil von NK-Zellen am Frühesten erreicht zu sein. Bereits beim ersten Analysenzeitpunkt 48 h p.i. wurden die höchsten Werte gemessen, wohingegen die Populationen der

CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen bis 72 h nach der Infektion zunahmen. So waren zu diesem Zeitpunkt die meisten T-Lymphozyten vorhanden, die Einzelwerte weisen hier jedoch ausgeprägte Varianzen auf. Eine Reduktion der Anteile aller drei Zelltypen zeigten die 96 h-Werte. Beim Vergleich der drei Zeitpunkte untereinander lassen sich Unterschiede zwischen den Impfgruppen 48 h p.i. klarer erkennen als zu den späteren Messungen 72 h und 96 h nach der Infektion.

Mäuse, die mit  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP immunisiert worden waren, zeigten nach 48 h mit 17,9% NK-Zellen einen deutlich höheren Anteil als Tiere, die mit MVA (6,6%) oder den Einzelmantanten  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R und  $\Delta$ IL-18BP (je 7,1%) geimpft wurden. Ähnlich verhielt es sich mit den T-Lymphozyten. Nach Verabreichung der Doppelmutante konnten 18,5% CD4<sup>+</sup>- und 11,9% CD8<sup>+</sup>-T-Zellen gemessen werden. Die Immunisierung mit MVA führte dagegen zu 6,7% und 3,4%, mit  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R zu 15,6% und 7,0% und  $\Delta$ IL-18BP zu 9,9% und 6,1% CD4<sup>+</sup>- bzw. CD8<sup>+</sup>-T-Zellen. Aufgrund der zu diesem frühen Zeitpunkt zu beobachtenden virus-spezifischen Unterschiede wurde für die Durchführung der folgenden Experimente eine Inkubationszeit von 48 h gewählt.

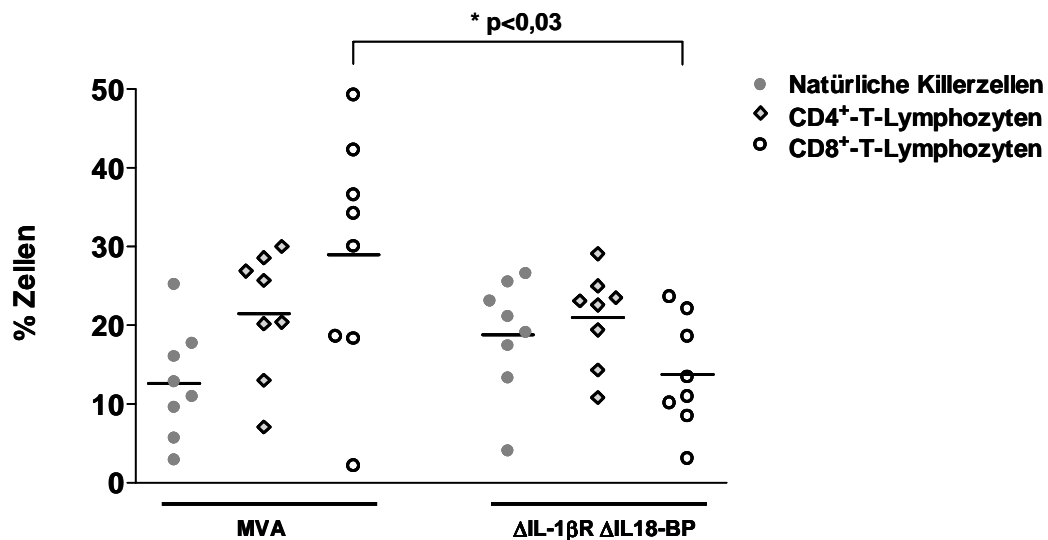


**Abbildung 25: Anteil an NK, CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in Bronchoalveolarlavage-Suspensionen von BALB/c-Mäusen.** Je neun Mäuse wurden intranasal mit MVA,  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R,  $\Delta$ IL-18BP und  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP immunisiert. Nach 48 h, 72 h und 96 h erfolgte bei drei Tieren je Virusgruppe die Spülung der Lungen und die Ermittlung des Gehalts an NK-Zellen, CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in den gewonnenen Suspensionen durch FACS-Analyse. Darstellung der Werte der Einzeltiere mit Gruppenmittelwert.

Ein großer angelegter Versuchsansatz ermöglichte die Untersuchung, ob es sich bei dem Anstieg in den NK- und T-Zellpopulationen nach Immunisierung mit  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP (48 h p.i.) im Vergleich zu MVA um einen signifikanten Effekt handelt.

Jeweils acht BALB/c-Mäuse wurden intranasal mit  $10^8$  IE MVA oder der Doppelmutante  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP infiziert. Nach 48 h folgte die Spülung der Lungen und die Bestimmung des Gehalts an NK-Zellen, CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in den gewonnenen Zellen. Bei Betrachtung der Daten (*siehe Abbildung 26, S.106*) zeigte sich eine beträchtliche Divergenz in den Immunreaktionen der Individuen, wobei die Einzelwerte der NK-Populationen in beiden Impfgruppen die geringsten Abweichungen vom Mittelwert aufwiesen. Der Vergleich zeigt, dass der Anteil an NK-Zellen der mit  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP geimpften Mäuse mit durchschnittlich 18,8% um 6,2% höher liegt als der durchschnittliche NK-Anteil in den MVA-

immunisierten Tieren. Umgekehrt verhält es sich dagegen bei den CD8<sup>+</sup>-T-Zellpopulationen, die bei der MVA-Gruppe (28,9%) signifikant größer ist als nach Verabreichung der Zweifachmutante (13,8%). Der Anteil CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten ist bei beiden Immunisierungsgruppen nahezu gleich (MVA 21,5%,  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP 21,0%).

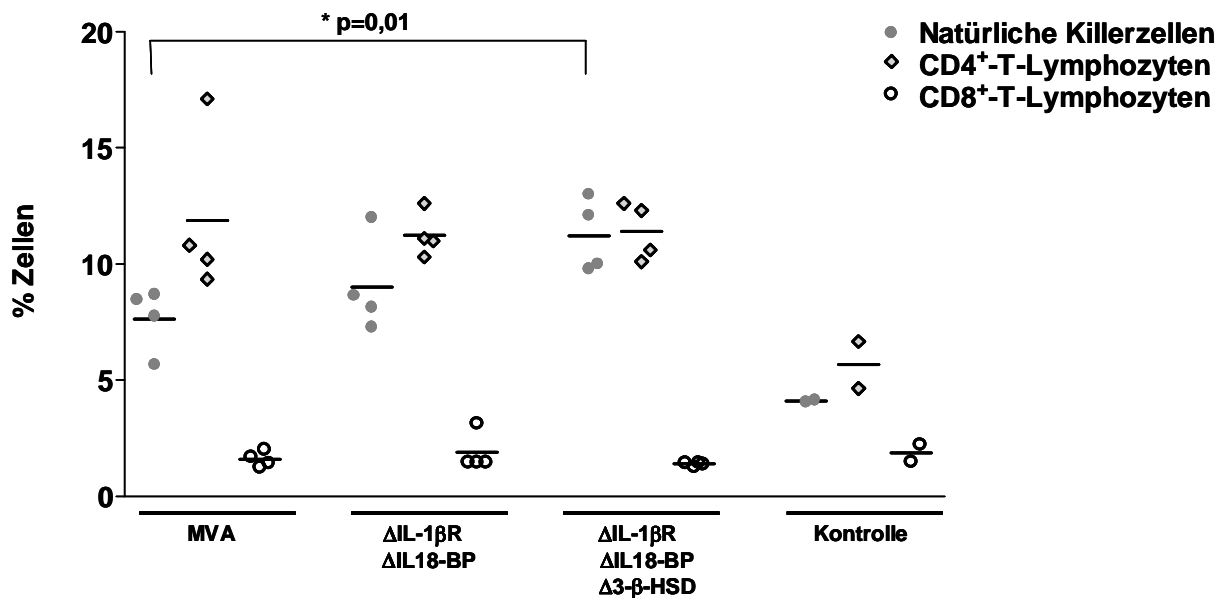


**Abbildung 26: Anteil an NK-Zellen, CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in Bronchoalveolarlavage-Suspensionen 48 h nach Immunisierung.** 48 h nach intranasaler Immunisierung mit MVA oder  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP (acht Tiere je Gruppe) wurden die Lungen der Mäuse gespült und NK-Zellen, CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten aus den Zellsuspensionen in einer FACS-Messung untersucht. Darstellung der Werte der Einzeltiere mit Gruppenmittelwert.

In einer Variation des Versuchsaufbaus wurde als ein weiterer Ansatz zur Untersuchung der angeborenen Immunantwort die Isolierung und Analyse von Zellen aus dem Bauchraum nach intraperitonealer Applikation ( $10^8$  IE) der Viren (siehe 3.6.2.2, S.73) gewählt. Neben der Immunisierung mit MVA und  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP wurde hier die Dreifachmutante  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP  $\Delta$ 3 $\beta$ -HSD miteinbezogen. 48 h nach der Immunisierung erfolgte eine Peritoneallavage zur Isolierung der im Bauchraum befindlichen Zellpopulationen. Der Vergleich der Virusgruppen mit der Impfstoffpuffer-Kontrolle belegte, dass auch durch intraperitoneale Immunisierung mit MVA NK- und CD4<sup>+</sup>-T-Zellpopulationen induziert werden können (siehe Abbildung 27, S.107).

Die Werte der Individuen innerhalb der Impfgruppen waren in diesem Versuchsansatz homogener. Unterschiede zwischen den drei Virusgruppen zeichneten sich in den Populationen der NK-Zellen ab. So zeigten die mit den Mutanten immunisierten Gruppen eine höhere NK-Zell-Antwort als die WT-Gruppe (7,6%), wobei die Dreifachmutante (11,2%) mit einem signifikanten Unterschied ( $p < 0,01$ ) zu MVA zu einer größeren NK-Zell-Population führte als die Zweifachmutante (9,0%).

Im Gegensatz dazu war sowohl bei den  $CD4^+$ - als auch bei den  $CD8^+$ -T-Zellen kein Unterschied zwischen den verabreichten Viren ersichtlich.



**Abbildung 27: Anteil an NK-Zellen, CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in Peritoneal-lavage-Suspensionen.** Je drei Mäuse wurden intraperitoneal mit MVA,  $\Delta IL-1\beta R$   $\Delta IL-18BP$  und  $\Delta IL-1\beta R$   $\Delta IL-18BP$   $\Delta 3\beta$ -HSD immunisiert. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten Impfstoffpuffer. 48 h p.i. erfolgte die Spülung des Bauchraumes und die Analyse des Anteils an NK-Zellen und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in den Suspensionen per FACS. Darstellung der Werte der Einzeltiere mit Gruppenmittelwert.

Beim Vergleich der Ergebnisse der dargestellten Experimente ließ sich erkennen, dass die NK-Populationen nach Immunisierung mit den Deletionsmutanten tendenziell größer waren als nach Immunisierung mit MVA. Für den Anteil der T-Lymphozyten konnte diese Beobachtung nicht gemacht werden.

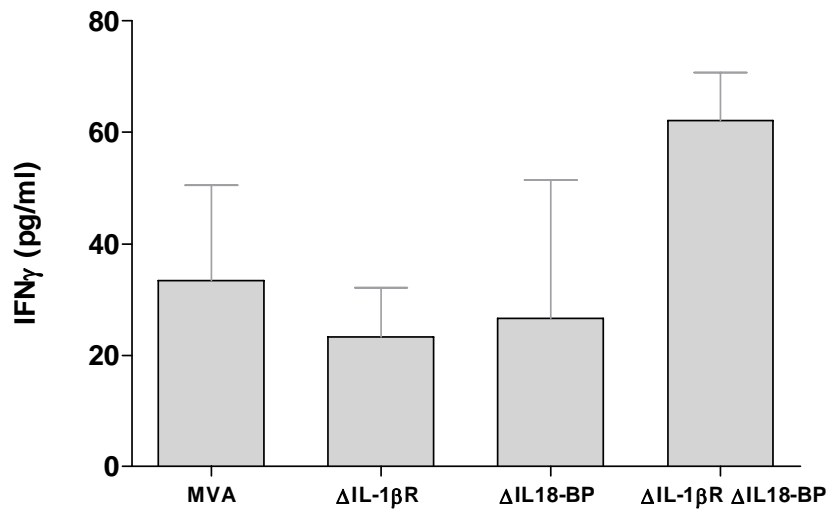
Um detailliertere Aussagen über die Auswirkungen der Deletionen auf die Immunogenität des Virus machen zu können, war es sinnvoll als einen weiteren Messparameter für die Aktivität der NK- und T-Zellen die Untersuchung der IFN $\gamma$ -Sekretion hinzuzuziehen.

#### **4.3.2 Extrazelluläre IFN $\gamma$ -Konzentration in Bronchoalveolarlavage-Suspensionen und primären Milzzellkulturen**

Interferone haben einen direkten antiviralen Effekt und spielen eine wichtige Rolle in der Ausbildung der adaptiven Immunantwort (*Malmgaard 2004*), deren zelluläre Abwehr wiederum wichtig für die Genesung von einer Orthopockenvirusinfektion ist (*Lane, Ruben et al. 1969*). Die Ausschüttung von Interleukinen wie IL-18 oder IL-1 $\beta$  führt in Synergie mit IL-12 zur IFN $\gamma$ -Sekretion. IFN $\gamma$  ist ein starker Stimulator der TH1-Immunreaktion, die für die Beseitigung von viralen Infektionen große Bedeutung hat. Da MVA durch den vIL-1 $\beta$ R oder das vIL-18BP und durch die Synthese einer eigenen v3 $\beta$ -HSD in die unmittelbare Immunabwehr des Wirtes gegen die Virusinfektion eingreifen könnte, sollte untersucht werden, ob die Deletion der Gene eine nachweisbare Steigerung der IFN $\gamma$ -Konzentration mit sich bringt.

Im nachfolgenden Experiment fanden die Überstände von Zellsuspensionen der Bronchoalveolarlaven und Milzzellen, die 48 h nach intraperitonealer Immunisierung von BALB/c-Mäusen durch Entnahme der Milz isoliert wurden, Verwendung. Vorhandenes IFN $\gamma$  wurde im ELISA nachgewiesen (*siehe 3.6.4, S.74*).

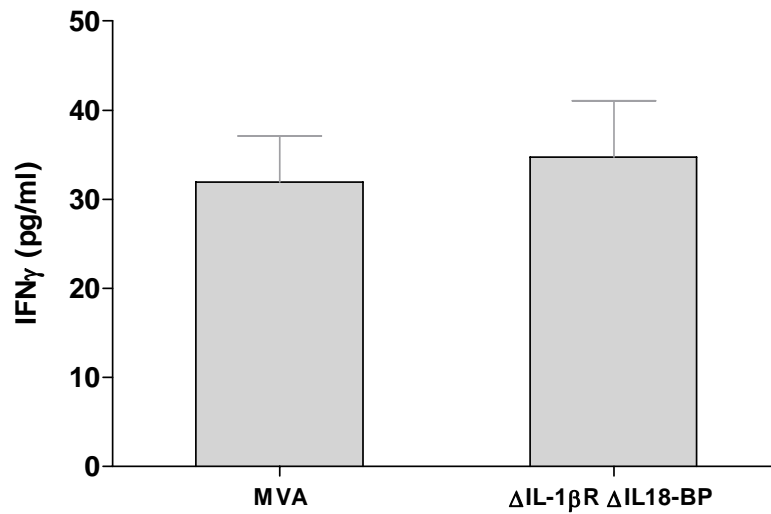
Als erstes erfolgte die Analyse von Überständen der Lungenspülungen (48 h p.i.): In den Proben der Tiere, die mit der Doppelmutante  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP immunisiert worden waren, ließen sich wesentlich höhere IFN $\gamma$ -Konzentrationen (62,1 pg/ml) messen als in den Proben der mit den jeweiligen Einzelmutanten ( $\Delta$ IL-1 $\beta$ R 23,2 pg/ml,  $\Delta$ IL-18BP 26,6 pg/ml) oder mit MVA immunisierten Mäuse (33,4 pg/ml) (*siehe Abbildung 28, S.109*). Diese Ergebnisse stehen in gutem Einklang mit den Resultaten der erhöhten NK- und T-Zell-Populationen 48 h nach Immunisierung in *Abbildung 25, S.105*.



**Abbildung 28: Extrazelluläre IFN $\gamma$ -Konzentration in Bronchoalveolarlavage-Suspensionen.** Die Bestimmung der IFN $\gamma$ -Konzentration von Bronchoalveolarlavage-Suspensionen erfolgte im ELISA. Den Mäusen wurde MVA,  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R,  $\Delta$ IL-18BP oder  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP intranasal verabreicht und die Spülung der Lungen 48 h p.i. vorgenommen. Die Ergebnisse stellen die Gruppenmittelwerte mit Standardfehlern von je drei Einzeltieren dar.

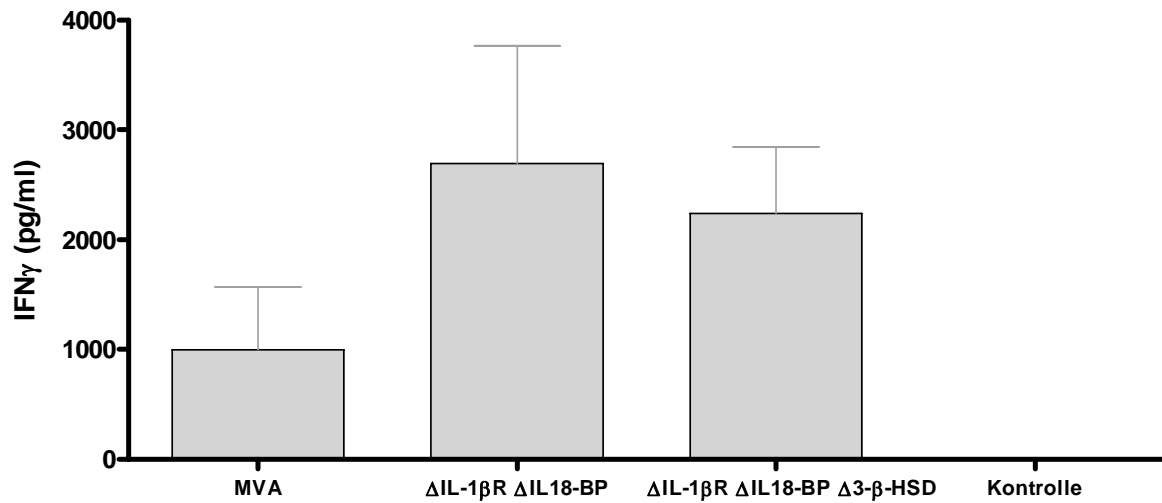
Ebenso spiegelte die Ermittlung der IFN $\gamma$ -Werte in den Zellsuspensionen der 16 mit MVA oder Doppelmutante  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP behandelten Tiere das Ergebnis der Immunzellfärbung wider (siehe Abbildung 26, S.106). Die Immunreaktion auf die Verabreichung der Viren zeigte sich im ELISA in einer deutlich nachweisbaren Ausschüttung von IFN $\gamma$ , allerdings lag die durchschnittliche IFN $\gamma$ -Konzentration von den mit der Deletionsmutante behandelten Mäusen nicht wesentlich höher als die von den MVA-behandelten Tieren. Abbildung 29 (S.110) präsentiert den Durchschnitt der Messwerte beider Virusgruppen.





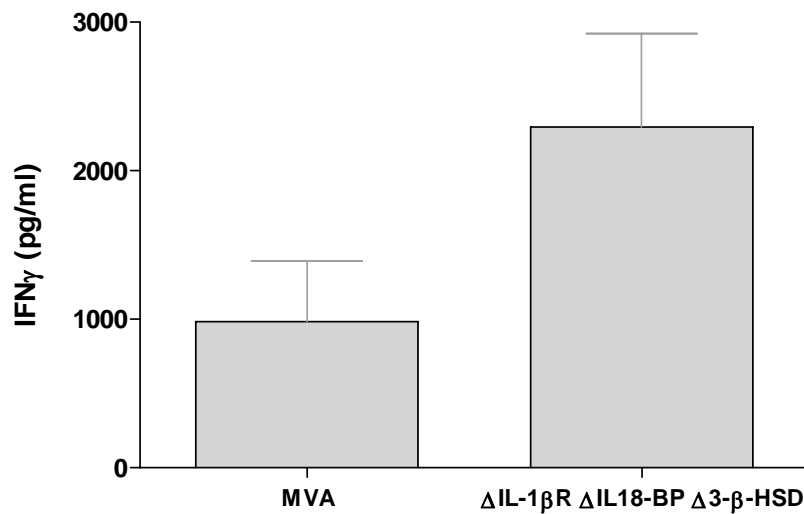
**Abbildung 29: Extrazelluläre IFN $\gamma$ -Konzentration in Bronchoalveolarlavage-Suspensionen.** Je acht Mäuse erhielten intranasal MVA und  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP. Die Spülung der Lungen wurde 48 h p.i. vorgenommen und die IFN $\gamma$ -Konzentration im ELISA bestimmt. Die Ergebnisse stellen die Gruppenmittelwerte mit Standardfehlern dar.

Für die Analyse der IFN $\gamma$ -Sekretion primärer Milzzellen aus immunisierten Mäusen wurden die Organe entnommen und die Zellen nach ihrer Präparation (*siehe* 3.6.5, S.74) zunächst 24 h kultiviert. Während dieser Periode wurden die Milzzellen mit MVA (1IE/Zelle) zur Abgabe des Zytokins stimuliert und anschließend der Überstand auf den Gehalt an IFN $\gamma$  untersucht. Da durch die Stimulation der Zellen hohe IFN $\gamma$ -Konzentrationen zu erwarten waren, wurde eine Kontrolle mitgeführt, die Auskunft darüber geben sollte, ob eine Inkubation der Milzzellen mit Virus alleine ausreichend ist um eine ausgeprägte IFN $\gamma$ -Ausschüttung zu bewirken. Im folgenden Experiment erfolgte die Immunisierung von je vier BALB/c-Mäusen mit Viruspräparationen von MVA,  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP und  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP  $\Delta$ 3 $\beta$ -HSD intraperitoneal ( $10^8$  IE). Die aus zwei Tieren bestehende Kontrollgruppe erhielt Impfstoffpuffer.



**Abbildung 30: Extrazelluläre IFN $\gamma$ -Konzentration in Milzzellkulturen.** 48 h nach intra-peritonealer Verabreichung von MVA,  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP,  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP  $\Delta$ 3 $\beta$ -HSD oder Impfstoffpuffer erfolgte die Isolierung der Milzzellen der Tiere und deren Stimulierung in Kultur für 24 h mit MVA (1 IE/Zelle). Die Bestimmung des sezernierten IFN $\gamma$  wurde im ELISA vorgenommen. Die Ergebnisse stellen die Gruppenmittelwerte mit Standardfehlern von je drei Einzeltieren in den Virusgruppen und zwei Einzeltieren in der Kontrollgruppe dar.

Wie *Abbildung 30 (S.111)* zeigt, rief die Inkubation der Milzzellen der Kontrolltiere mit MVA keine im ELISA nachweisbare IFN $\gamma$ -Sekretion hervor. Die IFN $\gamma$ -Produktion wurde demnach durch die Immunisierung mit MVA und MVA-Mutanten ausgelöst und durch die anschließende Inkubation mit MVA lediglich stimuliert. Dabei ist ersichtlich, dass die Deletionsmutanten in den Milzzellen nach 48 h eine höhere IFN $\gamma$ -Ausschüttung induzieren als das Wildtypvirus (0,99 ng/ml;  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP 2,7 ng/ml,  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP- $\Delta$ 3 $\beta$ -HSD 2,24 ng/ml). Beim Vergleich der Mutanten scheint es, dass das zusätzliche Fehlen der v3 $\beta$ -HSD in der Tripelmutante zu keiner weiteren Steigerung der IFN $\gamma$ -Sekretion führt. Ein nachfolgendes Experiment beinhaltete die Immunisierung von nochmals je drei Mäusen mit MVA und der Dreifachmutante unter gleichen Versuchsbedingungen mit anschließender Bestimmung der IFN $\gamma$ -Ausschüttung der Milzzellen im ELISA (*siehe Abbildung 31, S.112*).



**Abbildung 31: Extrazelluläre IFN $\gamma$ -Konzentration in Milzzellkulturen.** Nach intra-peritonealer Immunisierung mit MVA oder  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP  $\Delta$ 3 $\beta$ -HSD folgte 48 h p.i. die Isolation der Milzzellen und deren Stimulation mit MVA (1 IE/Zelle) für 24 h. Die anschließende Bestimmung der extrazellulären IFN $\gamma$ -Konzentration in den Überständen wurde im ELISA durchgeführt. Die Ergebnisse stellen die Gruppenmittelwerte mit Standardfehlern von je drei Einzeltieren dar.

Die in *Abbildung 31* (S.112) dargestellten Werte zeigen erneut eine erhöhte IFN $\gamma$ -Sekretion nach Impfung mit  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP  $\Delta$ 3 $\beta$ -HSD (2,29 ng/ml) gegenüber MVA (0,98 ng/ml).

### 4.3.3 Vergleich der Gedächtnisantwort nach Immunisierung mit MVA und MVA-Deletionsmutanten durch Untersuchung der zellulären Immunantwort

Die Impfung mit MVA induziert nach der unmittelbaren Immunantwort die Ausbildung eines spezifischen Immunschutzes einschließlich des Aufbaus einer Gedächtnisantwort. Anhand der T-Zell-vermittelten Antwort sollte untersucht werden, ob die Impfung mit den Deletionsmutanten zu einer vom WT abweichenden virusspezifischen T-Zell-Antwort führt.

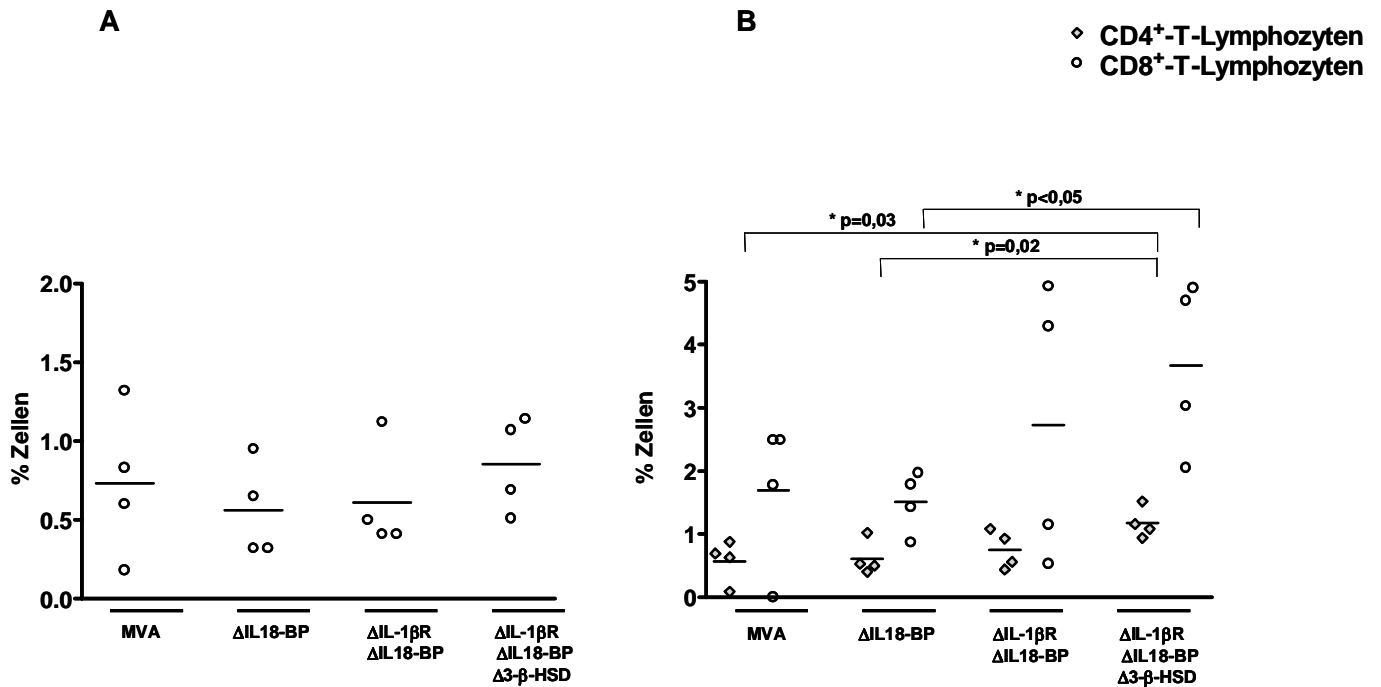
Hierfür wurden HLA-A\*0201-transgene Mäuse (HHD) mit MVA,  $\Delta$ IL-18BP,  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP und  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP  $\Delta$ 3 $\beta$ -HSD geimpft ( $10^8$  IE i.p.) und nach drei Monaten deren Milzzellen präpariert (*siehe 3.6.5, S.74*). Zur Aktivierung der virusspezifischen T-Lymphozyten erfolgte die Stimulation der Milzzellen mit dem HLA-A\*0201-restringierten MVA-Epitop VP35#1 (*Drexler, Staib et al. 2003*) und in einem weiteren Ansatz mit MVA. Durch eine intrazelluläre Zytokinfärbung konnte anschließend der Anteil an aktivierten (CD62L<sup>-</sup>)-IFN $\gamma$ -produzierenden T-Zellen bestimmt werden (*siehe 3.6.6, S.75*).

Drei Monate nach der Immunisierung mit MVA oder den Deletionsmutanten ließen sich in den Milzzellen aller Tiere aktivierte VP35#1-spezifische CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten nachweisen (*siehe Abbildung 32 A, S.114*). Die Werte der aktivierten CD8<sup>+</sup>-T-Zellen erreichten in allen Gruppen allerdings nur Größenordnungen von 0,6% - 0,9% der Zellen.

Bei der in vitro Stimulation mit dem kompletten Virus konnte hingegen ein durchschnittlich höherer Anteil an vacciniaspezifischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in den Milzen der Mäuse beobachtet werden, die mit der Doppel- oder Tripelmutante immunisiert worden waren (*siehe Abbildung 32 A, S.114*). Hier wurde nach MVA- und  $\Delta$ IL-18BP-Impfung ein CD8<sup>+</sup>-T-Zellanteil von 1,7% und 1,5% gemessen, während in den Milzzellen der  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP behandelten Tiere 2,7% und in den  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP  $\Delta$ 3 $\beta$ -HSD-Proben 3,7% aktivierte CD8<sup>+</sup>-T-Zellen vorhanden waren. Der Vergleich der Werte ergab einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) zwischen der Einzel- und Tripeldeletionsmutante.

Dieser Effekt zeigte sich auch in der Population der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen. Deren Anteil lag nach Immunisierung mit MVA,  $\Delta$ IL-18BP und  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP bei 0,6% - 0,8%. Ein leicht erhöhter Anteil an aktivierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen war in den Milzzellen  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP  $\Delta$ 3 $\beta$ -HSD-immunisierter Tiere vorhanden. Der Vergleich der CD4<sup>+</sup>-T-Zellpopulationen von MVA, der Einzel- und Tripeldeletionsmutante zeigte, dass die

Tripelmutante zu signifikant höheren  $CD4^+$ -T-Zellpopulationen führte ( $\Delta IL-18BP/\Delta IL-1\beta R \Delta IL-18BP \Delta 3\beta-HSD$   $p=0,02$ ; MVA// $\Delta IL-1\beta R \Delta IL-18BP \Delta 3\beta-HSD$   $p=0,03$ ).



**Abbildung 32: Analyse VP35#1- und MVA-spezifischer T-Zell-Gedächtnisantworten.** 3 Monate nach Immunisierung (i.p.) der Mäuse mit MVA,  $\Delta IL-18BP$ ,  $\Delta IL-1\beta R \Delta IL-18BP$  oder  $\Delta IL-1\beta R \Delta IL-18BP \Delta 3\beta-HSD$  wurde in Milzzellsuspensionen in einer FACS-Analyse der Anteil an aktivierten  $CD62L^+$ -T-Lymphozyten nach in vitro-Stimulation der Zellen durch Inkubation mit (A) VP35#1 oder (B) MVA bestimmt. Darstellung der Werte der Einzeltiere mit Gruppenmittelwert.

#### 4.3.4 Schutzwirkung der MVA-Deletionsmutanten gegen eine tödliche Orthopockenvirusbelastung

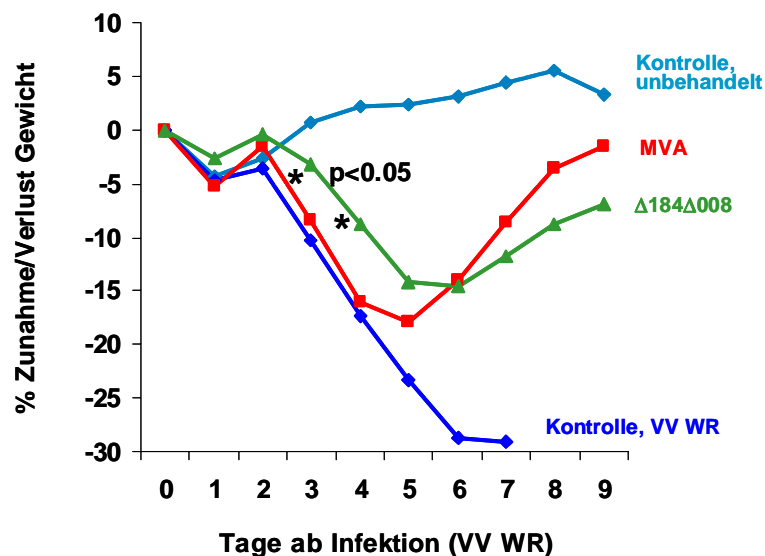
Beim Aufbau eines Immunschutzes gegen eine Orthopockeninfektion, beispielsweise durch Verabreichung des konventionell verwendeten Impfvirusstammes Wyeth, spielt ebenso wie bei der Immunisierung mit MVA, die Bildung neutralisierender Antikörper eine wichtige Rolle (*Belyakov, Earl et al. 2003*). Epitopspezifische CD8<sup>+</sup>-T-Zellantworten konnten nachgewiesen werden (*Drexler, Staib et al. 2003*), dennoch scheinen CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in der Immunabwehr gegen eine solche Infektion eine untergeordnete Funktion zu haben (*Belyakov, Earl et al. 2003*). Kleine Veränderungen in der Immunogenität der zur Impfung eingesetzten Viren, z.B durch Deletion von viralen Immunmodulatoren, können in diesem komplexen immunologischen Zusammenspiel Auswirkungen auf die Schutzwirkung zeigen. So führte beispielsweise die Deletion des vIL-1 $\beta$ R in MVA nach Immunisierung mit der MVA-Mutante zu einer erhöhten Gedächtnis-T-Zellantwort und zu einem verbesserten Langzeitimpfschutz (*Staib, Kisling et al. 2005*).

In den im Folgenden dargestellten Experimenten erfolgte deshalb die Untersuchung der Schutzwirkung der Deletionsmutanten  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP und  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP  $\Delta$ 3 $\beta$ HSD. Durch eine einmalige Impfung mit MVA kann ein Schutz vor einer drei Wochen bzw. vier bis sechs Monate später folgenden tödlichen VV WR-Belastungsinfektion erzielt werden (*Drexler, Staib et al. 2003; Staib, Kisling et al. 2005*). Da bei den in dieser Arbeit bisher beschriebenen Versuchsansätzen Unterschiede in der Immunogenität zwischen MVA und den Deletionsmutanten zu sehr frühen Zeitpunkten nach der Infektion auftraten, wurde das Modellexperiment modifiziert und die Schutzwirkung der Viren bereits 48 h nach der Impfung gegen eine VV WR-Infektion erprobt (*siehe 3.6.8, S.77*). Für die in *Abbildung 33, S.116* dargestellten Ergebnisse wurden BALB/c-Mäuse intranasal mit 10<sup>7</sup> IE MVA oder  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP immunisiert. Die Gabe des pathogenen VV WR erfolgte intranasal mit 10<sup>6</sup> IE, welches einer 20-fachen LD<sub>50</sub> entspricht.

Die intranasale Infektion von BALB/c-Mäusen mit VV WR beginnt mit einer Entzündung des oberen Respirationstrakt und der Lunge, gefolgt von der systemischen Ausbreitung in weitere Organe (*Reading and Smith 2003 b*). Der Gesundheitszustand von Mäusen korreliert mit dem Gewicht der Tiere. So geht bei einer Infektion der Mäuse mit einem pathogenen Erreger das Auftreten von Krankheitssymptomen mit dem Verlust an Körpergewicht einher (*Alcami and Smith 1992; Alcamí and Smith 1996*).

Die tägliche Beurteilung des Gesundheitszustandes beinhaltete deshalb auch immer die Bestimmung des Gewichts der Tiere, welches als Parameter für die Erstellung der gezeigten

Graphen diente. In der Kontrollgruppe ohne Impfung war bis sieben Tage nach der Verabreichung von VV WR bei allen Tieren eine drastische Gewichtsreduktion festzustellen (siehe Abbildung 33, S.116), wobei ein Verlust von 30% des ursprünglichen Körpergewichtes als Versuchsausschlusskriterium galt. Die Impfung mit den beiden Viren konnte den tödlichen Verlauf der VV WR-Belastungsinfektion verhindern. Eine Immunisierung mit der Doppelmutante führte zu einem signifikant verbesserten Impfschutz ( $p < 0,05$ ), der sich durch eine geringere Gewichtsabnahme abzeichnete. Das Minimum in der MVA-Gruppe liegt bei 20%.

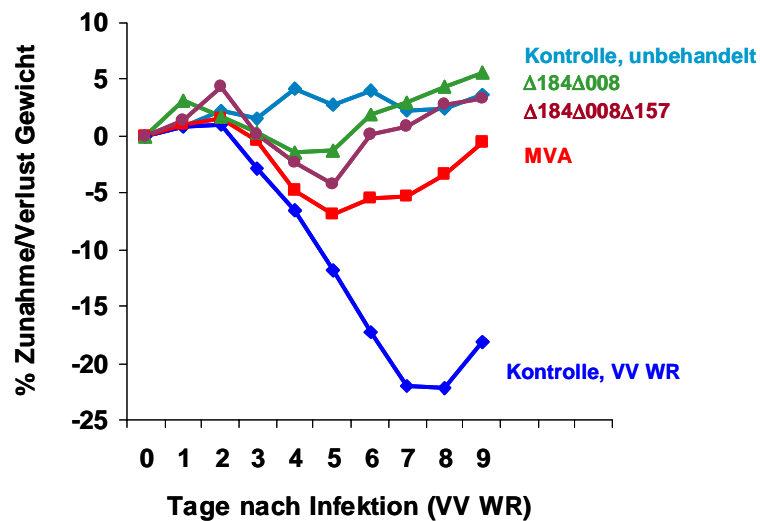


**Abbildung 33: Impfschutz vor einer tödlichen Orthopockenvirusbelastung durch intranasale Immunisierung mit MVA-Mutanten.** Zur Impfung wurden  $10^7$  IE MVA oder  $\Delta IL-1\beta R \Delta IL-18BP$  eingesetzt und 48 h danach  $10^6$  IE VV WR verabreicht. Die Applikation erfolgte intranasal. Die Werte präsentieren prozentual den mittleren Gewichtsverlust von je fünf Tieren einer Impfgruppe.

Um zu ermitteln inwiefern sich die Deletion des  $3\beta$ -HSD-Gens in der Dreifachmutante gegenüber der MVA-Mutante  $\Delta IL-1\beta R \Delta IL-18BP$  auswirkt, erfolgte die Immunisierung von BALB/c-Mäusen erneut intranasal oder intramuskulär. Die VV WR-Infektion ( $10^6$  IE) fand nach 48 h statt.

Wie in dem vorhergehenden Experiment zeigte sich auch hier, dass nach intranasaler Impfung, die durch die Doppelmutante hervorgerufene Immunabwehr zu einem geringeren Verlust an Körpergewicht führte als die Impfung mit MVA und den Tieren zudem zur schnelleren Regeneration verhalf (siehe Abbildung 34, S.117). Nicht so stark ausgeprägt, aber

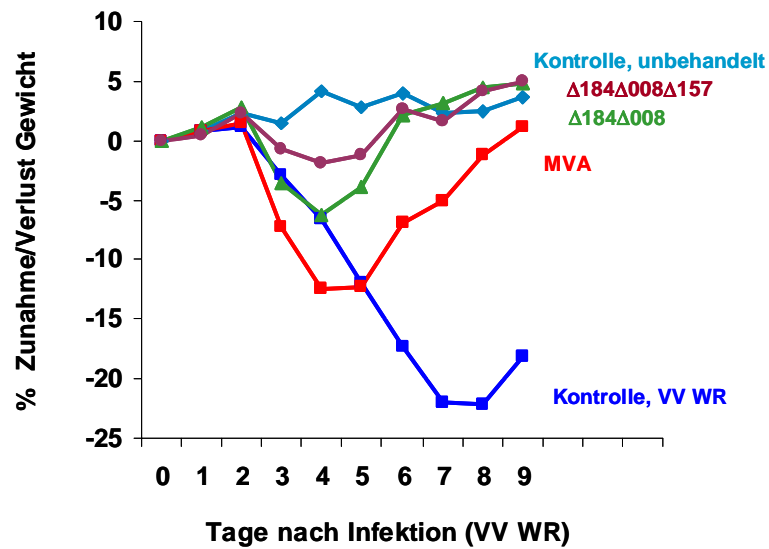
dennoch deutlich war dieser Effekt auch bei der Dreifachmutante zu beobachten. Die Gewichtskurven der Tiere beider Kontrollgruppen verliefen wie erwartet: In der ungeschützt und uninfiziert belassenen Gruppe war ein leichtes Ansteigen des Gewichts bedingt durch das Wachstum der Tiere zu verzeichnen, während die ungeschützt mit VV WR infizierte Kontrollgruppe stetig Körpergewicht verlor.



**Abbildung 34: Impfschutz vor einer tödlichen Orthopockenvirusbelastung durch intranasale Immunisierung mit MVA-Mutanten.** 48 h nach Impfung mit MVA,  $\Delta IL-18BP$ ,  $\Delta IL-1\beta R \Delta IL-18BP$  oder  $\Delta IL-1\beta R \Delta IL-18BP \Delta \beta\text{-HSD}$  wurden die Mäuse mit  $10^6$  IE VV WR infiziert. Die Applikation der Viren erfolgte intranasal. Die Werte stellen prozentual den Gewichtsverlust von je fünf Einzeltieren als Gruppenmittelwert dar.

Das Resultat der intramuskulären Impfung mit  $10^8$  IE bestätigte die vorhandenen Ergebnisse nochmals (siehe Abbildung 35, S.118). Beide MVA-Mutanten (1-5%) schützten die Mäuse besser vor einem gravierenden Gewichtsverlust als MVA (12% Verlust). Dabei wurde die größere Wirkung hier durch Immunisierung mit der Dreifachmutante erzielt.





**Abbildung 35: Impfschutz vor einer tödlichen Orthopockenvirusbelastung durch intramuskuläre Immunisierung mit MVA-Mutanten.** 48 h nach der intramuskulären Verabreichung von  $10^8$  IE MVA,  $\Delta IL-18BP$ ,  $\Delta IL-1\beta R$   $\Delta IL-18BP$  oder  $\Delta IL-1\beta R$   $\Delta IL-18BP$ - $\Delta 3\beta$ -HSD erfolgte die intranasale Infektion mit  $10^6$  IE VV WR. Die Werte stellen prozentual den Gewichtsverlust von je fünf Einzeltieren als Gruppenmittelwert dar.

## 5 Diskussion

Vacciniaviren kodieren für eine ganze Reihe von regulatorischen Virusproteinen, deren Rolle im Infektionszyklus nicht geklärt ist und deren Auswirkungen auf den Wirtsorganismus nur teilweise verstanden sind.

So führt die Verabreichung von Impfstoffen auf der Basis von Vacciniaviren, wie VV Elstree oder VV Wyeth, zum erfolgreichen Aufbau eines Immunschutzes gegen eine Orthopockenvirusinfektion, birgt dabei aber auch das Risiko für Impfkomplikationen. Diese können besonders dann auftreten, wenn es einem geschwächten Immunsystem nicht gelingt die Vermehrung und Ausbreitung des Impfvirus zu kontrollieren. Die Kenntnis der Funktion viraler Proteine mit potentiell immunmodulierenden Eigenschaften kann dazu beitragen, Mechanismen der Virus-Wirtsinteraktion zu verstehen. Dabei kann die Generierung von Deletionsmutanten als Werkzeug dienen, die Funktion und Wirkungsweise dieser Proteine aufzuklären. So wurden in mehreren Forschungsprojekten bereits unterschiedliche Gene verschiedener Vacciniaviren deletiert und die erhaltenen Viren hinsichtlich ihrer Virulenz und immunisierenden Eigenschaften untersucht (*Alcami and Smith 1992; Sroller, Kutinova et al. 1998; Symons, Tschärke et al. 2002; Tschärke, Reading et al. 2002; Jackson, Ilyinskii et al. 2005*). Dabei neugewonnene Erkenntnisse könnten für die Herstellung von verbesserten Virusimpfstoffen wichtig sein.

Auch im Genom des bereits hoch attenuierten MVA sind noch einige Proteine mit potentiell immunmodulierender Wirkungsweise kodiert. Führt die Eliminierung eines oder mehrerer dieser Gene durch gezielte gentechnische Manipulation zur Zunahme der Immunogenität des Virus, könnte dieses einen Schritt zur Optimierung des MVA-Vektorsystems darstellen. In dieser Arbeit erfolgte deshalb die Generierung von sechs verschiedenen MVA-Deletionsmutanten und deren anschließende Charakterisierung in Zellkulturexperimenten und im Tiermodell Maus.

Mit den Genen für das vIL-18BP und die v3 $\beta$ -HSD kodiert MVA für zwei Proteine, die auch von vielen Zellen verschiedener Wirtsorganismen synthetisiert werden und dort regulierende Funktionen haben. Die Auswahl dieser Gene erfolgte mit dem Hintergrund, dass ihre Genprodukte einerseits potentiell immunmodulierende Eigenschaften aufweisen und andererseits von verschiedenen Orthopockenviren kodiert werden und auch funktionell sind, weshalb anzunehmen ist, dass sich die Synthese dieser Proteine vorteilhaft für die Viren auswirkt (*Moore and Smith 1992; Sroller, Kutinova et al. 1998; Xiang and Moss 1999; Smith, Bryant et al. 2000; Calderara, Xiang et al. 2001; Symons, Adams et al. 2002*). Die Eliminierung beider Gensequenzen wurde in dieser Arbeit in MVA und zudem in der bereits

charakterisierten MVA-Deletionsmutante  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R (Staib, Kisling *et al.* 2005) in verschiedenen Kombinationen vorgenommen, so dass außer den Einzelmутanten alle möglichen Kombinationen an Mehrfachmutanten vorliegen.

In Zellkultur wurde zunächst überprüft, ob die konstruierten Viren ein abweichendes, verringertes Wachstum im Vergleich zum Wildtypvirus MVA zeigen. Veränderungen im Wachstumsverhalten von MVA mit bestimmten Fremdgeninsertionen oder Deletionen im MVA-Genom, traten schon mehrfach auf. So konnten Wyatt *et al.* beobachten, dass die Insertion des Parainfluenzavirus-3-Gens für das Hemagglutinin-Neuraminidase-Glykoprotein in MVA unter der Kontrolle eines starken Promotors durch Überexpression des Gens zu einem verminderten Wachstum des rekombinanten Virus führte (Wyatt, Shors *et al.* 1996). Das Einführen von Deletionen kann sich ebenso auswirken, wenn das eliminierte Genprodukt beispielsweise Apoptose inhibiert oder eine Funktion für die Wirtszellspezifität hat und das resultierende Virus hierdurch in seinem Wirtszelltropismus eingeschränkt wird, wie es überraschend für das MVA-IFN-Resistenzgen E3L in CEF gezeigt wurde (Hornemann, Harlin *et al.* 2003).

Bei der Deletion der hier ausgewählten Gene waren solche Auswirkungen prinzipiell nicht zu erwarten, da die meisten immunmodulatorisch wirkenden Virusproteine nicht essentiell für die Virusreplikation sind. Dennoch war es wichtig das Wachstumsverhalten der generierten Viren zu überprüfen, um mögliche Einflüsse spontaner Mutationen an anderen Stellen im Genom ausschließen zu können. Alle konstruierten Viren zeigten in diesen Untersuchungen ein nahezu unverändertes Replikationsverhalten und ließen sich in ihrem Vermögen sich in Kultur von Zelle zu Zelle auszubreiten nicht vom WT-Virus unterscheiden. Somit ist gewährleistet, dass die MVA-Deletionsmutanten für eine mögliche zukünftige Impfstoffproduktion im großen Maßstab geeignet sind.

Die Funktionalität der viralen Proteine IL-18BP und 3 $\beta$ -HSD wurde bereits bei verschiedenen Pockenviren in *in vitro*-Untersuchungen nachgewiesen. So konnte die Aktivität der v3 $\beta$ -HSD beispielsweise in den Vacciniaviren WR, Copenhagen, Praha, Tian Tan, Wyeth und MVA *in vitro* durch den Nachweis bestätigt werden, dass das virale Enzym ebenso wie das wirtseigene Analogon die in der Steroidbiosynthese wichtige Reaktion der Bildung von Progesteron aus Pregnenolon katalysiert (Moore and Smith 1992; Sroller, Kutinova *et al.* 1998; Reading, Moore *et al.* 2003). Neben der Fähigkeit viraler IL-18-Bindungsproteine an IL-18 zu binden wurde in Versuchen zur biologischen Aktivität gezeigt, dass z. B. das vIL-18BP des Molluscum Contagiosumvirus oder von Ectromelia-, Kuhpocken und verschiedenen Vacciniaviren die IL-18-vermittelte NF $\kappa$ B-Aktivierung oder IFN $\gamma$ -Sekretion

unterdrückt ((Xiang and Moss 1999; Born, Morrison et al. 2000; Calderara, Xiang et al. 2001; Symons, Adams et al. 2002). Untersuchungen des vIL-18BP von MVA ergaben, dass das Protein IL-18-Moleküle binden kann (Smith, Bryant et al. 2000) und Symons et al. (Symons, Adams et al. 2002) zeigten, dass hierdurch die Ausschüttung von IFN $\gamma$  verhindert wird. Ein ähnlicher Versuchsansatz zur Reduktion der IL-12/IL-18 stimulierten IFN $\gamma$ -Sekretion muriner Milzzellen führte auch in dieser Arbeit zur Bestätigung der funktionellen Wirksamkeit des MVA-IL-18BP und wies zusätzlich das Fehlen des Proteins in der Deletionsmutante nach.

Da noch keine Forschungsergebnisse über den Einfluß der hier ausgewählten MVA-Proteine im Wirt auf dessen Immunreaktion vorliegen, wurden in verschiedenen Versuchsansätzen die Auswirkungen der Gendeletionen bei der Infektion von Mäusen untersucht.

Pockenviren können u. a. aerogen von einem Organismus auf den Anderen übertragen werden, weshalb die experimentell gut kontrollierte intranasale Infektion der Tiere besonders vorteilhaft schien. Die daraufhin zunächst vor allem im Respirationstrakt zu erwartende Immunreaktion wurde deshalb anschließend in Zellsuspensionen von Lungenspülungen untersucht. Vergleichsweise wurde aber auch eine weitere Applikationsroute, die intra-peritoneale Verabreichung der Viren, vorgenommen und dementsprechend Peritoneallavagen durchgeführt. Die Untersuchungsergebnisse zeigen unter den hier ausgewählten Messparametern keine kompartimentbezogenen Unterschiede, so dass von einem generellen Mechanismus der Immunreaktion ausgegangen werden kann.

Als gewählte Parameter für den Vergleich der Immunantworten dienten die Anteile an NK-Zellen und CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten. Die Untersuchungen wurden auf diese Populationen fokussiert, da einerseits vor allem IL-18 eine aktivierende Wirkung auf NK- und T-Zellen hat (Okamura, Tsutsi et al. 1995; Okamoto, Kohno et al. 1999; Tanaka-Kataoka, Kunikata et al. 1999), andererseits hier zu beobachtende Veränderungen auch deshalb von besonderem Interesse sind, da die zellvermittelte Immunreaktion in Abwesenheit von neutralisierenden Antikörpern eine bedeutende Rolle in der antiviralen Abwehr spielt (Belyakov, Earl et al. 2003).

Der Vergleich der Zellpopulationen verschiedener Immunisierungsgruppen (MVA,  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R,  $\Delta$ IL-18BP und  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP) zu den Zeitpunkten 48 h, 72 h und 96 h nach der Infektion ergab eine Zunahme des T-Zellanteils bis 72 h p.i., während die NK-Zellen bereits nach 48 h ihren höchsten Wert erreicht hatten. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Funktion der NK-Zellen dazu beizutragen, virusinfizierte Wirtszellen schnell im Rahmen der unmittelbaren Immunantwort zu eliminieren (Welsh 1978; Karupiah, Coupar et al. 1990;

*Tanaka-Kataoka, Kunikata et al. 1999*). Nach 96 h waren die Populationsgrößen sowohl der NK-, als auch CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten bereits wieder deutlich reduziert. Bei der intranasalen Infektion von Mäusen mit VV WR wurde der maximale T-Zellanteil in Zellsuspensionen aus Lungenspülungen, wie von *Reading und Smith* gezeigt, erst zehn Tage nach der Infektion erreicht (*Reading and Smith 2003 b*). Da MVA bei der Infektion der Mäuse die Wirtszellen zwar infizieren, sich aber nicht produktiv vermehren kann, war die gewählte Impfdosis (10<sup>8</sup> IE) deutlich höher als die von *Reading und Smith* verabreichte Dosis (10<sup>4</sup> IE) des replikationskompetenten VV WR. Hierdurch und auch aufgrund der bei MVA vorhandenen geringeren Bandbreite immunmodulierender viraler Proteine, welche die Immunreaktion des Organismus beeinträchtigen können, ist es möglich eine ausgeprägte Immunantwort bei MVA bereits zu früheren Zeitpunkten festzustellen. Virusspezifische Unterschiede in der Größe der Zellpopulationen zeichneten sich am stärksten beim 48 h Zeitpunkt ab. Nach Immunisierung mit der Doppelmutante  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP oder der Tripelmutante  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP  $\Delta$ 3 $\beta$ -HSD zeigte sich überwiegend eine Zunahme der CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellanteile, aber in allen Experimenten waren in diesen Gruppen erhöhte NK-Zellpopulationen vorhanden. Diese Daten korrelieren mit der deutlich erhöhten Aktivität an NK-, aber auch an T-Zellen, die durch die VV WR-IL-18BP-Deletionsmutante hervorgerufen wurde (*Reading and Smith 2003 a*). Für die VV WR-3 $\beta$ -HSD-Einzeldelentionsmutante konnten *Reading et al.* ebenfalls eine erhöhte Aktivität zytotoxischer T-Zellen in Lungengewebe messen und zeigten zudem, dass der maximale T-Lymphozytenanteil in Bronchoalveolarlavage-Suspensionen schneller erreicht wurde als bei einer Infektion mit dem Wildtypvirus (*Reading, Moore et al. 2003*). Die Erhöhung der Zellpopulationen und dabei speziell der NK-Zellen zu einem so frühen Zeitpunkt nach der Virusinfektion lässt darauf schließen, dass die Mehrfachmutanten durch das Fehlen der viralen Proteine die angeborene Immunantwort im Wirtsorganismus schneller bzw. effizienter induzieren könnten. Die angeborene, unmittelbare Immunantwort wird ausgelöst sobald ein Erreger, z. B. infektiöse Partikel wie Viren oder auch Bakterien, in den Organismus eindringen. Aktivierende und regulierende Funktionen haben dabei Zytokine und Interferone.

Das Zytokin IL-18 wirkt aktivierend auf NK-Zellen, indem es z. B. deren lytische und zytotoxische Aktivität Perforin-abhängig (*Lauwerys, Garot et al. 2000*) oder Fas-Liganden-vermittelt (*Tsutsui, Nakanishi et al. 1996*) steigert und stimulierend auf die INF $\gamma$ -Sekretion einwirkt. Die Zunahme des NK-Zellanteils nach Immunisierung mit den Virusmutanten könnte demnach durch die Deletion des vIL-18BP herbeigeführt werden. Gegen diese Annahme spricht aber die Feststellung, dass sich in diesem Versuchsansatz die beiden Einzel-

mutanten  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R und  $\Delta$ IL-18BP wie MVA verhielten und damit dieses Ergebnis jeweils alleine nicht hervorriefen. Möglich ist, dass dennoch jede der beiden Einzelmutanten, wenn auch vielleicht nur in geringem Ausmaß, diesen Effekt bedingt, er aber erst in der additiven Wirkung der Doppelmutante detektierbar ist. Zudem ist ein Synergieeffekt denkbar, durch den sich die Auswirkungen zusätzlich potenzieren. Ob die gegenüber der Zweifachmutante dann nochmals gesteigerte NK-Zell-Antwort der Dreifachmutante durch die zusätzliche Eliminierung der v $\beta$ 3-HSD additiv oder ausschließlich als Synergismus der drei fehlenden Proteine auftritt, oder sich hier auch in der Einzelmutante  $\Delta$ 3 $\beta$ -HSD zeigt, muß noch untersucht werden.

Weitere, ebenso wichtige Faktoren für die antivirale Immunabwehr sind die durch IL-18 im Zusammenwirken mit IL-12 geförderte Differenzierung naiver T-Zellen zu TH1-Zellen (*Überblick in (Dinarello 1999; Nakanishi, Yoshimoto et al. 2001)*) und die Induktion der IFN $\gamma$ -Produktion in NK-, aber auch in B- und T-Zellen (*Yoshimoto, Takeda et al. 1998*). IL-1 regt ebenfalls die Produktion von IFN $\gamma$  an (*Delaleu and Bickel 2004*) und auch die durch die 3 $\beta$ -HSD katalysierten Glukokortikoide beeinflussen indirekt die IFN $\gamma$ -Sekretion, indem sie u.a. die Immunantwort der T-Zellen hemmen, die im aktiven Zustand IFN $\gamma$  produzieren (*Überblick in (Ashwell, Lu et al. 2000)*). Es war somit interessant zu untersuchen, ob MVA mit der Synthese der beiden löslichen Proteine vIL-1 $\beta$ R und vIL-18BP sowie dem intrazellulär wirkenden Enzym v $\beta$ 3-HSD die IFN $\gamma$ -Ausschüttung der Wirtszellen verringert und ob infolgedessen die Mehrfachmutanten, auch im Vergleich zu den Einzelmutanten, eine höhere IFN $\gamma$ -Sekretion zulassen. Bei der Bestimmung der Konzentrationen von IFN $\gamma$  in den Zellüberständen der Lungenspülungen und in Milzzell-Überständen konnte diese Kausalität weitgehendst bestätigt werden, womit auch eine Übereinstimmung mit Ergebnissen vorliegt, die für die vIL-18BP- und v $\beta$ 3-HSD-Deletionsmutanten in VV WR erhalten wurden. So zeigte *Reading et al. (Reading and Smith 2003 a)*, dass die intranasale Infektion von Mäusen mit der VV WR-IL-18BP-Deletionsmutante in Zellüberständen von Lungenspülungen ebenso wie die VV WR-3 $\beta$ -HSD-Deletionsmutante (*Reading, Moore et al. 2003*) zu einer höheren IFN $\gamma$ -Sekretion führt als das Wildtypvirus. Die beiden MVA-Einzelmutanten zeigten in den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen eine mit MVA vergleichbare IFN $\gamma$ -Sekretion. Es ist denkbar, dass diesem Resultat ebenfalls die vermutete additive Wirkung bzw. der Synergieeffekt von  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R und  $\Delta$ IL-18BP zugrunde liegt, da die Zellüberstände der Doppel- und Tripelmutante in drei von den vier hier dargestellten Experimenten deutlich höhere IFN $\gamma$ -Konzentrationen aufwiesen als die MVA-

Proben. In dem hiervon abweichenden Experiment, welches jeweils acht mit MVA oder  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP infizierte Tiere beinhaltete, zeigten die mittleren IFN $\gamma$ -Werte keinen Unterschied. Bei der Untersuchung der Zellpopulationen in diesem Versuchsansatz hatte die Doppelmutante hingegen zu einem deutlich höheren mittleren NK-Zellanteil geführt als MVA. Obwohl NK-Zellen wesentlich zur Produktion von IFN $\gamma$  beitragen, stellt das von ihnen ausgeschüttete IFN $\gamma$  nur einen Teil der hier gemessenen Konzentration dar. Die erhaltenen Werte geben den IFN $\gamma$ -Gehalt der Zellsuspensionen der Lungenspülungen an, welche ein Gemisch heterogener Zellpopulationen sind. Die hier gemessene IFN $\gamma$ -Konzentration wird auch durch die Sekretion der T-Zellen bestimmt und da deren mittlerer Zellanteil in diesem Experiment eine gegenläufige Tendenz zeigte und für die Doppelmutante niedriger war als für MVA wurde in den Zellproben dieser Tiere möglicherweise auch insgesamt weniger IFN $\gamma$  ausgeschüttet. Virusspezifische Unterschiede sind hierdurch dann auch nicht mehr klar erkennbar. Ein weiterer Hinweis, dass eine erhöhte NK-Zellpopulation nicht auch unbedingt alleine die Steigerung der IFN $\gamma$ -Sekretion nach sich zieht, ergibt sich aus dem Vergleich der beiden Mehrfachmutanten. Obwohl in den Immunisierungsgruppen der Zweifach- und Dreifachmutante gleich hohe CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozytenanteile vorlagen und die Tiere der  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP  $\Delta$ 3 $\beta$ -HSD-Gruppe eine größere NK-Zellpopulation aufwiesen, konnten hier keine höheren IFN $\gamma$ -Werte detektiert werden. Ob NK-Zellen aufgrund ihrer Rolle in der unmittelbaren Immunantwort und damit frühen Aktivierung letztendlich überhaupt maßgeblich an den hier beobachteten Effekten beteiligt sind und welchen Einfluß andere Zellpopulationen haben, soll in weiterführenden Experimenten, beispielsweise mit NK-Zell-defizienten Mäusen, geklärt werden.

Nach der unmittelbaren Immunantwort erfolgt die Aktivierung und Vermehrung spezifischer CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten, welche die Eliminierung virusbefallener Zellen bewirken und zum Aufbau eines immunologischen Gedächtnisses beitragen, dass dem Organismus zu einer gezielten, schnellen Immunabwehr bei erneuter Infektion mit demselben Erreger verhilft.

Der Aufbau einer Langzeitimmunität nach Immunisierung mit den MVA-Deletionsmutanten wurde durch Untersuchung der zellulären Immunantwort drei Monate nach Immunisierung mit MVA verglichen. Für die MVA-Einzelmutante  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R ist gezeigt, dass das Fehlen dieses immunmodulierenden Proteins die Ausbildung einer größeren Anzahl MVA-spezifischer oder gegen das HLA-A\*0201-restringierte MVA-Epitop VP35#1 (Drexler, Staib *et al.* 2003) gerichteter CD8<sup>+</sup>-T-Zellen hervorruft als MVA (Staib, Kisling *et al.* 2005). Da

die Mehrfachmutanten bei der Untersuchung der akuten Immunität eine schnellere Aktivierung der Immunantwort zeigten, ist es denkbar, dass sie hierdurch auch zur Bildung einer ausgeprägteren Gedächtnisimmunantwort führen.

In der nach drei Monaten durchgeführten Untersuchung fanden sich für die Doppel- und vor allem für die Tripelmutante teilweise signifikant erhöhte MVA-spezifische T-Zellpopulationen. Die VP35#1-spezifische Analyse zeigte dagegen keine virusspezifischen Unterschiede. Da dieses Epitop hinsichtlich seiner Prozessierung und Präsentation aber noch nicht vollständig charakterisiert ist, sind Schlussfolgerungen auf die Bedeutung und Wirkung der deletierten Gene hier nur sehr spekulativ möglich. Bei der Stimulierung mit MVA wurde neben CD4<sup>+</sup>-T-Zellen auch ein größeres Repertoire an CD8<sup>+</sup>-T-Zellen untersucht, die bei der VP35#1-Peptidstimulierung nicht angesprochen werden. Die CD4<sup>+</sup>-T-Zellpopulationen der Tripelmutante waren gegenüber der MVA-Gruppe und Einzeldelentionsmutante  $\Delta$ IL-18BP signifikant ( $p=0,03$  und  $p=0,02$ ) höher. Eine ähnliche Verteilung konnte für die CD8<sup>+</sup>-T-Zellen gezeigt werden, deren Populationen bei Immunisierung mit  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP und besonders mit  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP  $\Delta$ 3 $\beta$ -HSD deutlich größer waren als nach der Impfung mit MVA oder  $\Delta$ IL-18BP. Ausschlaggebend hierfür ist wahrscheinlich die größere Immunogenität der Mehrfachmutanten, herbeigeführt durch den Verlust der immunmodulierenden Genprodukte. Wie von *Reading und Smith* (*Reading und Smith 2003 a*) gezeigt, werden durch die Deletion des vIL-18BP in VV WR höhere zytotoxische T-Zellantworten ausgelöst. Da Glukokortikoide eine hemmende Funktion auf zytotoxische T-Zellen ausüben (*Schleimer, Jacques et al. 1984*) und für die 3 $\beta$ -HSD-Deletionsmutante in VV WR dementsprechend auch eine stärkere Aktivität dieser Zellen in der Lunge nachgewiesen wurde (*Reading, Moore et al. 2003*), ist anzunehmen, dass die höheren Werte der spezifischen Gedächtnis-T-Zellen der Tripelmutante im Vergleich zur Doppelmutante auf die Deletion der v3 $\beta$ -HSD zurückzuführen sind. Die für die Zweifachdeletionsmutante erhaltenen höheren T-Zellaktivitäten könnten, wie zuvor diskutiert, durch das Fehlen des vIL-1 $\beta$ R und vIL-18BP über additive oder synergistische Effekte entstehen. Da die MVA-IL-1 $\beta$ R-Einzelmutante aber zu einem deutlich größeren Anteil spezifischer CD8<sup>+</sup>-T-Zellen führte als MVA (*Staub, Kisling et al. 2005*), die vIL-18BP-Einzelmutante hier dagegen keinen größeren Anteil an Gedächtnis-T-Zellen zeigte, ist für die ausgeprägtere Gedächtnisimmunantwort der  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP-Mutante möglicherweise hauptsächlich die Deletion des vIL-1 $\beta$ R ausschlaggebend.



Aus den vorangehenden Ergebnissen geht hervor, dass die Mehrfachmutanten  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP und  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP  $\Delta$ 3 $\beta$ -HSD in der akuten Phase der Immunreaktion eine erhöhte NK-Zellaktivität und vermehrte IFN $\gamma$ -Sekretion zulassen und damit eine höhere unmittelbare Immunantwort auslösen. Diese Beobachtungen führten zu der Fragestellung, ob hierdurch möglicherweise bereits zu frühen Zeitpunkten nach der Immunisierung mit den Deletionsmutanten auch eine höhere Schutzwirkung gegen eine Orthopockenbelastungsinfektion erzielt wird als nach Verabreichung von MVA.

Wie bei den Experimenten zur unmittelbaren Immunantwort wurden auch hier zwei Applikationsformen gewählt. Hohe Relevanz für eine Notimpfung hat die Immunisierung über die Schleimhäute des Nasen-Rachen-Raumes, die zudem weit verbreitet zur Beurteilung der Virulenz von Vacciniavirusmutanten verwendet wird (*Williamson, Reith et al. 1990; Tschärke, Reading et al. 2002; Ramirez, Finke et al. 2003*). Die intramuskuläre Verabreichung stellt dagegen beim möglichen zukünftigen Einsatz im klinischen Bereich eine, auch in der Routine praktikable Applikationsform dar.

Unabhängig von der Impfroute wurde mit den Mehrfachmutanten ein Immunschutz erzielt, der die Tiere vor der tödlichen VV WR-Dosis schützte und dabei, wie der geringere Gewichtsverlust zeigte, tatsächlich eine noch bessere Schutzwirkung aufwies als die Impfung mit MVA. Wie für VV WR gezeigt führt die Deletion der Gene des vIL-18BP's und der v3 $\beta$ -HSD zu höherer Immunogenität und einem attenuierten Phänotyp bei intranasaler wie auch intradermaler Infektion von Mäusen (*Symons, Adams et al. 2002; Reading and Smith 2003 a; Moore and Smith 1992; Tschärke, Reading et al. 2002; Reading, Moore et al. 2003*). Die Eliminierung der MVA-Gensequenzen resultiert in einer gesteigerten Immunogenität der Deletionsmutanten, die sich in einer besseren Schutzwirkung äußert. Dieser Effekt, durch einen stimulierenden Einfluß auf die Immunantwort einen verbesserten frühen Impfschutz zu erwirken, wurde auch für andere stark immunstimulierende Faktoren, z. B. für CpG-DNA, gezeigt (*Rees, Gates et al. 2005*). Die bessere Schutzwirkung der Tripelmutante gegenüber der Doppelmutante bei intramuskulärer Impfung könnte mit der Verabreichungsform in Zusammenhang stehen. Möglich wäre, dass im Gegensatz zur intramuskulären Verabreichung bei der intranasalen Impfung innerhalb kürzester Zeit so viele Immunzellen in die Schleimhäute des Respirationstrakts infiltrieren, dass diese ausreichen den Organismus vor der hier ebenfalls intranasal verabreichten VV WR-Infektion sehr gut zu schützen. Virusspezifische Unterschiede fallen infolgedessen bei der intranasalen Applikation möglicherweise insgesamt geringer aus. Somit wäre auch zu erklären, warum die MVA-Gruppe in diesen beiden Experimenten keine deutlich größeren Gewichtsverluste aufweist.

Dennoch ist dieser Versuchsaufbau sehr gut geeignet virusspezifische Unterschiede aufzuzeigen, da z. B. klar erkennbar ist, dass MVA gegenüber den beiden Mehrfachmutanten die geringste Schutzwirkung hat und sich damit eindeutig, und zumindest im ersten Experiment gegenüber  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP auch signifikant, von den Virusmutanten unterscheidet. Bei der intramuskulären MVA-Impfung mit anschließender intranasaler VV WR-Infektion werden die Viren in zwei verschiedene Organsysteme inokuliert, wodurch es einer bereits generalisierten Immunreaktion bedarf, um den Organismus vor der tödlichen VV WR-Belastung zu schützen. Möglicherweise machen sich virusspezifische Unterschiede deshalb in größeren Gewichtsunterschieden bemerkbar. Von dieser Hypothese ausgehend würde die Dreifachmutante eine größere Schutzwirkung erzielen, wodurch die  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP -  $\Delta$ 3 $\beta$ -HSD-immunisierten Mäuse damit nicht nur gegenüber der MVA-Gruppe, sondern auch gegenüber der  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R  $\Delta$ IL-18BP-Gruppe im Vorteil sind.

Es konnte gezeigt werden, dass die Eliminierung beider oder aller drei Gene für vIL-1 $\beta$ R und vIL-18BP oder vIL-1 $\beta$ R, vIL-18BP und v3 $\beta$ -HSD aus MVA zur erfolgreichen Verbesserung der frühen Schutzwirkung gegen VV WR führte. Zur Verifizierung dieses Ergebnisses sollen weitere Experimente folgen, die auch die Untersuchung der Einzelmutanten einschließen. Die Fokussierung auf die Mehrfachmutanten erfolgte zunächst aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse der Untersuchungen zur unmittelbaren Immunantwort. Außerdem bieten sich mehrere Versuchsansätze zur weiteren Analyse der festgestellten Immunwirkung an - eine interessante Möglichkeit stellt beispielsweise die *in vivo*-Untersuchung in IL-18-defizienten Mäusen dar, deren Unvermögen IL-18 zu exprimieren, bei einem synergistischen Effekt der Gendeletionen nicht nur in der Einzelmutante, sondern auch in den Mehrfachmutanten zur Aufhebung bzw. Abnahme des Effekts führen müsste. Ein ebenso interessanter Aspekt ist, ob die höhere Immunogenität der Deletionsmutanten auch zu einem schnelleren Aufbau einer spezifischen Immunantwort führt, welches sich vorteilhaft für die Verwendung als Impfvektor auswirken könnte. Bei der Verabreichung eines optimierten rekombinanten MVA-Virus sollte die erzielte ausgeprägte Immunantwort den Aufbau eines ausreichenden Impfschutzes gegen das von dem Virus exprimierte Fremdprotein fördern. Dieser Frage könnte nachgegangen werden, indem rekombinante MVA-Viren (MVA und Deletionsmutanten) hergestellt werden, die beispielsweise ein Protein wie Ovalbumin exprimieren. Anschließend könnten dann Versuchstiere mit den verschiedenen Viruskonstrukten immunisiert und die Kinetik der Bildung der spezifischen Immunantwort, die gegen dieses rekombinante Antigen gerichtet ist, untersucht werden. Sollten hierbei virusspezifische Unterschiede auftreten, die sich bei den Deletionsmutanten in einer schnelleren antigenspezifischen Immunantwort äußern als bei

MVA, würde das einerseits bestätigen, dass die immunogenitätssteigernde Wirkung der Gendeletionen eine schnellere Immunantwort ermöglicht und andererseits zeigen, dass hierdurch, im Einklang mit den für die Deletionsmutanten erhaltenen höheren T-Zell-Gedächtnisantworten, auch die Ausbildung höherer antigenspezifischer Immunantworten ermöglicht wird.

Da die bessere Schutzwirkung für die Deletionsmutanten frühzeitig nach der Immunisierung gezeigt wurde, ist anzunehmen, dass die hierbei beteiligten Faktoren vor allem in der akuten Phase der Immunantwort eine wichtige Rolle spielen. Mit dem verbesserten Langzeitimpfschutz, der zudem durch die  $\Delta$ IL-1 $\beta$ R-Mutante hervorgerufen wird (*Staib, Kisling et al. 2005*), besteht die Möglichkeit durch die Konstruktion von Mehrfachmutanten, wie die hier generierten Zweifach- oder die Dreifachmutante(n), ein modifiziertes MVA zu erhalten, dass sich in verschiedenen Aspekten der Immunabwehr gegenüber dem Wildtypvirus MVA unterscheidet und dadurch größere Immunität bei gleichbleibender Attenuierung erlangt.

Ein wichtiger Aspekt ist neben der möglichen Verwendung dieser Viren in Form von rekombinanten Impfstoffen aber auch der Einsatz in der Pockenschutzimpfung. Sollte die im Mausmodell beobachtete bessere Schutzwirkung der Deletionsmutanten auch auf andere Organismen übertragbar sein, könnten diese veränderten MVA-Viren auch im Fall einer unvermittelt eintretenden, akuten Infektionsgefahr durch Variolaviren verabreicht werden. Durch ihr Vermögen besonders schnell die unmittelbare Immunreaktion auszulösen, sollte es möglich sein, gefährdete Personen vor einer Pockenerkrankung zu schützen.

Die in dieser Arbeit konstruierten Viren sollen als Basis für Untersuchungen von Mechanismen der Virus-Wirtsinteraktion dienen und damit zur Herstellung eines vielseitig einsetzbaren MVA-Vektors beitragen. Erste Schritte zur Charakterisierung der Viren im lebenden Organismus, der Maus, wurden unternommen und führten zu interessanten und vielversprechenden Ergebnissen. Es erscheint sehr vielversprechend, diese Charakterisierung in den nächsten Jahren, vielleicht auch unter Einbeziehung weiterer noch herzustellender Deletionsmutanten, fortzusetzen, um damit dem Ziel, der Generierung eines ausgefeilten viralen Vektorsystems näher zu kommen.

## 6 Literaturverzeichnis

- Adachi, O., T. Kawai, et al. (1998). "Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function." Immunity **9**(1): 143-50.
- Alcami, A., A. Khanna, et al. (1999). "Vaccinia virus strains Lister, USSR and Evans express soluble and cell-surface tumour necrosis factor receptors." J Gen Virol **80** ( Pt 4): 949-59.
- Alcami, A. and U. H. Koszinowski (2000). "Viral mechanisms of immune evasion." Trends Microbiol **8**(9): 410-8.
- Alcami, A. and G. L. Smith (1992). "A soluble receptor for interleukin-1 beta encoded by vaccinia virus: a novel mechanism of virus modulation of the host response to infection." Cell **71**(1): 153-67.
- Alcami, A. and G. L. Smith (1995). "Vaccinia, cowpox, and camelpox viruses encode soluble gamma interferon receptors with novel broad species specificity." J Virol **69**(8): 4633-9.
- Alcami, A. and G. L. Smith (1996). "A mechanism for the inhibition of fever by a virus." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(20): 11029-34.
- Amara, R. R., F. Villinger, et al. (2001). "Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine." Science **292**(5514): 69-74.
- Antoine, G., F. Scheifflinger, et al. (1998). "The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses." Virology **244**(2): 365-96.
- Ashwell, J. D., F. W. Lu, et al. (2000). "Glucocorticoids in T cell development and function\*." Annu Rev Immunol **18**: 309-45.
- Baldick, C. J., Jr. and B. Moss (1993). "Characterization and temporal regulation of mRNAs encoded by vaccinia virus intermediate-stage genes." J Virol **67**(6): 3515-27.
- Ball, L. A. (1987). "High-frequency homologous recombination in vaccinia virus DNA." J Virol **61**(6): 1788-95.
- Barouch, D. H., S. Santra, et al. (2001). "Reduction of simian-human immunodeficiency virus 89.6P viremia in rhesus monkeys by recombinant modified vaccinia virus Ankara vaccination." J Virol **75**(11): 5151-8.
- Baroudy, B. M., S. Venkatesan, et al. (1982). "Incompletely base-paired flip-flop terminal loops link the two DNA strands of the vaccinia virus genome into one uninterrupted polynucleotide chain." Cell **28**(2): 315-24.
- Baxby, D. (1999). "Edward Jenner's Inquiry; a bicentenary analysis." Vaccine **17**(4): 301-7.
- Belyakov, I. M., P. Earl, et al. (2003). "Shared modes of protection against poxvirus infection by attenuated and conventional smallpox vaccine viruses." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(16): 9458-63.

- Bisht, H., A. Roberts, et al. (2004). "Severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein expressed by attenuated vaccinia virus protectively immunizes mice." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(17): 6641-6.
- Blanchard, T. J., A. Alcami, et al. (1998). "Modified vaccinia virus Ankara undergoes limited replication in human cells and lacks several immunomodulatory proteins: implications for use as a human vaccine." J Gen Virol **79** ( Pt 5): 1159-67.
- Blasco, R. and B. Moss (1992). "Role of cell-associated enveloped vaccinia virus in cell-to-cell spread." J Virol **66**(7): 4170-9.
- Boone, R. F. and B. Moss (1977). "Methylated 5'-terminal sequences of vaccinia virus mRNA species made in vivo at early and late times after infection." Virology **79**(1): 67-80.
- Boone, R. F. and B. Moss (1978). "Sequence complexity and relative abundance of vaccinia virus mRNA's synthesized in vivo and in vitro." J Virol **26**(3): 554-69.
- Bordenave, G. (2003). "Louis Pasteur (1822-1895)." Microbes Infect **5**(6): 553-60.
- Born, T. L., L. A. Morrison, et al. (2000). "A poxvirus protein that binds to and inactivates IL-18, and inhibits NK cell response." J Immunol **164**(6): 3246-54.
- Boumpas, D. T., G. P. Chrousos, et al. (1993). "Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates." Ann Intern Med **119**(12): 1198-208.
- Cairns, J. (1960). "The initiation of vaccinia infection." Virology **11**: 603-23.
- Calderara, S., Y. Xiang, et al. (2001). "Orthopoxvirus IL-18 binding proteins: affinities and antagonist activities." Virology **279**(1): 22-6.
- Carroll, M. W. and B. Moss (1997). "Host range and cytopathogenicity of the highly attenuated MVA strain of vaccinia virus: propagation and generation of recombinant viruses in a nonhuman mammalian cell line." Virology **238**(2): 198-211.
- Carter, G. C., M. Law, et al. (2005). "Entry of the vaccinia virus intracellular mature virion and its interactions with glycosaminoglycans." J Gen Virol **86**(Pt 5): 1279-90.
- Chang, H. W., J. C. Watson, et al. (1992). "The E3L gene of vaccinia virus encodes an inhibitor of the interferon-induced, double-stranded RNA-dependent protein kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(11): 4825-9.
- Corona Gutierrez, C. M., A. Tinoco, et al. (2002). "Clinical protocol. A phase II study: efficacy of the gene therapy of the MVA E2 recombinant virus in the treatment of precancerous lesions (NIC I and NIC II) associated with infection of oncogenic human papillomavirus." Hum Gene Ther **13**(9): 1127-40.
- Cosma, A., R. Nagaraj, et al. (2003). "Therapeutic vaccination with MVA-HIV-1 nef elicits Nef-specific T-helper cell responses in chronically HIV-1 infected individuals." Vaccine **22**(1): 21-9.
- Cudmore, S., P. Cossart, et al. (1995). "Actin-based motility of vaccinia virus." Nature **378**(6557): 636-8.

- Cyrklaff, M., C. Risco, et al. (2005). "Cryo-electron tomography of vaccinia virus." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(8): 2772-7.
- Davies, M. V., O. Elroy-Stein, et al. (1992). "The vaccinia virus K3L gene product potentiates translation by inhibiting double-stranded-RNA-activated protein kinase and phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2." J Virol **66**(4): 1943-50.
- Delaleu, N. and M. Bickel (2004). "Interleukin-1 beta and interleukin-18: regulation and activity in local inflammation." Periodontol 2000 **35**: 42-52.
- Dinarello, C. A. (1999). "IL-18: A TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family." J Allergy Clin Immunol **103**(1 Pt 1): 11-24.
- Drexler, I., K. Heller, et al. (1998). "Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara replicates in baby hamster kidney cells, a potential host for virus propagation, but not in various human transformed and primary cells." J Gen Virol **79** ( Pt 2): 347-52.
- Drexler, I., C. Staib, et al. (2003). "Identification of vaccinia virus epitope-specific HLA-A\*0201-restricted T cells and comparative analysis of smallpox vaccines." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(1): 217-22.
- Dumbell, K. and M. Richardson (1993). "Virological investigations of specimens from buffaloes affected by buffalopox in Maharashtra State, India between 1985 and 1987." Arch Virol **128**(3-4): 257-67.
- Esposito, J. J., Fenner, F. (2001). Poxviruses. Fields Virology, 4th ed. D. M. Knipe, Howley P. M. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. **2**: 2885-2921.
- Feery, B. J. (1976). "The conquest of smallpox." Aust Fam Physician **5**(6): 720-33.
- Fenner, F., Henderson, D. A., Arita, I., Jezek, Z. & Ladnyi, I. D. (1988). Smallpox and Its Eradication (W.H.O., Geneva).
- Flexner, C., A. Hugin, et al. (1987). "Prevention of vaccinia virus infection in immunodeficient mice by vector-directed IL-2 expression." Nature **330**(6145): 259-62.
- Garon, C. F., E. Barbosa, et al. (1978). "Visualization of an inverted terminal repetition in vaccinia virus DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **75**(10): 4863-7.
- Griffiths, G., R. Wepf, et al. (2001). "Structure and assembly of intracellular mature vaccinia virus: isolated-particle analysis." J Virol **75**(22): 11034-55.
- Gubser, C., S. Hue, et al. (2004). "Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis." J Gen Virol **85**(Pt 1): 105-17.
- Hiller, G. and K. Weber (1985). "Golgi-derived membranes that contain an acylated viral polypeptide are used for vaccinia virus envelopment." J Virol **55**(3): 651-9.
- Hochstein-Mintzel, V., T. Hanichen, et al. (1975). "[An attenuated strain of vaccinia virus (MVA). Successful intramuscular immunization against vaccinia and variola (author's transl)]." Zentralbl Bakteriol [Orig A] **230**(3): 283-97.

- Hornemann, S., O. Harlin, et al. (2003). "Replication of modified vaccinia virus Ankara in primary chicken embryo fibroblasts requires expression of the interferon resistance gene E3L." J Virol **77**(15): 8394-407.
- Imura, H. and J. Fukata (1994). "Endocrine-paracrine interaction in communication between the immune and endocrine systems. Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in inflammation." Eur J Endocrinol **130**(1): 32-7.
- Jackson, S. S., P. Ilyinskii, et al. (2005). "Role of genes that modulate host immune responses in the immunogenicity and pathogenicity of vaccinia virus." J Virol **79**(10): 6554-9.
- Joklik, W. K. and Y. Becker (1964). "The Replication and Coating of Vaccinia DNA." J Mol Biol **10**: 452-74.
- Karupiah, G., B. E. Coupar, et al. (1990). "Elevated natural killer cell responses in mice infected with recombinant vaccinia virus encoding murine IL-2." J Immunol **144**(1): 290-8.
- Kates, J. and J. Beeson (1970). "Ribonucleic acid synthesis in vaccinia virus. II. Synthesis of polyriboadenylic acid." J Mol Biol **50**(1): 19-33.
- Kates, J. R. and B. R. McAuslan (1967). "Poxvirus DNA-dependent RNA polymerase." Proc Natl Acad Sci U S A **58**(1): 134-41.
- Keck, J. G., C. J. Baldick, Jr., et al. (1990). "Role of DNA replication in vaccinia virus gene expression: a naked template is required for transcription of three late trans-activator genes." Cell **61**(5): 801-9.
- Kim, S. H., M. Eisenstein, et al. (2000). "Structural requirements of six naturally occurring isoforms of the IL-18 binding protein to inhibit IL-18." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(3): 1190-5.
- Kohonen-Corish, M. R., N. J. King, et al. (1990). "Immunodeficient mice recover from infection with vaccinia virus expressing interferon-gamma." Eur J Immunol **20**(1): 157-61.
- Labrie, F., J. Simard, et al. (1992). "Structure and tissue-specific expression of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/5-ene-4-ene isomerase genes in human and rat classical and peripheral steroidogenic tissues." J Steroid Biochem Mol Biol **41**(3-8): 421-35.
- Lane, J. M., F. L. Ruben, et al. (1969). "Complications of smallpox vaccination, 1968." N Engl J Med **281**(22): 1201-8.
- Lauwerys, B. R., N. Garot, et al. (2000). "Cytokine production and killer activity of NK/T-NK cells derived with IL-2, IL-15, or the combination of IL-12 and IL-18." J Immunol **165**(4): 1847-53.
- Law, M., R. Hollinshead, et al. (2002). "Antibody-sensitive and antibody-resistant cell-to-cell spread by vaccinia virus: role of the A33R protein in antibody-resistant spread." J Gen Virol **83**(Pt 1): 209-22.
- Malmgaard, L. (2004). "Induction and regulation of IFNs during viral infections." J Interferon Cytokine Res **24**(8): 439-54.

- Martel, C., M. H. Melner, et al. (1994). "Widespread tissue distribution of steroid sulfatase, 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4 isomerase (3 beta-HSD), 17 beta-HSD 5 alpha-reductase and aromatase activities in the rhesus monkey." Mol Cell Endocrinol **104**(1): 103-11.
- Massung, R. F., L. I. Liu, et al. (1994). "Analysis of the complete genome of smallpox variola major virus strain Bangladesh-1975." Virology **201**(2): 215-40.
- Mayr, A., P. A. Bachmann, et al. (1974). Zellkulturen. Virologische Arbeitsmethoden. G. Wittmann. Stuttgart, Gustav Fischer Verlag. **Band 1**.
- Mayr, A. and K. Danner (1978). "Vaccination against pox diseases under immunosuppressive conditions." Dev Biol Stand **41**: 225-34.
- Mayr, A., V. Hochstein-Mintzel, et al. (1975). "Abstammung, Eigenschaften und Verwendung des attenuierten Vaccinia-stammes MVA." Infection **3**: 6-14.
- Mayr, A., H. Stickl, et al. (1978). "[The smallpox vaccination strain MVA: marker, genetic structure, experience gained with the parenteral vaccination and behavior in organisms with a debilitated defence mechanism (author's transl)]." Zentralbl Bakteriol [B] **167**(5-6): 375-90.
- McConkey, S. J., W. H. Reece, et al. (2003). "Enhanced T-cell immunogenicity of plasmid DNA vaccines boosted by recombinant modified vaccinia virus Ankara in humans." Nat Med **9**(6): 729-35.
- Men, R., L. Wyatt, et al. (2000). "Immunization of rhesus monkeys with a recombinant of modified vaccinia virus Ankara expressing a truncated envelope glycoprotein of dengue type 2 virus induced resistance to dengue type 2 virus challenge." Vaccine **18**(27): 3113-22.
- Merchlinsky, M. and B. Moss (1989). "Resolution of vaccinia virus DNA concatemer junctions requires late-gene expression." J Virol **63**(4): 1595-603.
- Meyer, H., G. Sutter, et al. (1991). "Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence." J Gen Virol **72** ( Pt 5): 1031-8.
- Modrow, S., Falke, D., Truyen, U. (2003). Molekulare Virologie. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Moore, J. B. and G. L. Smith (1992). "Steroid hormone synthesis by a vaccinia enzyme: a new type of virus virulence factor." Embo J **11**(9): 3490.
- Moss, B. (2001). Poxviridae: the viruses and their replication. Fields Virology, 4th ed. D. M. Knipe, Howley P. M. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. **2**: 2849-2883.
- Moss, B., M. W. Carroll, et al. (1996). "Host range restricted, non-replicating vaccinia virus vectors as vaccine candidates." Adv Exp Med Biol **397**: 7-13.
- Moss, S. S., G. L., J. A. Symons, et al. (1999). "Immune modulation by proteins secreted from cells infected by vaccinia virus." Arch Virol Suppl **15**: 111-29.



- Mulryan, K., M. G. Ryan, et al. (2002). "Attenuated recombinant vaccinia virus expressing oncofetal antigen (tumor-associated antigen) 5T4 induces active therapy of established tumors." Mol Cancer Ther **1**(12): 1129-37.
- Munyon, W., E. Paoletti, et al. (1967). "RNA polymerase activity in purified infectious vaccinia virus." Proc Natl Acad Sci U S A **58**(6): 2280-7.
- Murphy, P. M. (2001). "Viral exploitation and subversion of the immune system through chemokine mimicry." Nat Immunol **2**(2): 116-22.
- Nakanishi, K., T. Yoshimoto, et al. (2001). "Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu." Cytokine Growth Factor Rev **12**(1): 53-72.
- Nakanishi, K., T. Yoshimoto, et al. (2001). "Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses." Annu Rev Immunol **19**: 423-74.
- NHS (2004 a) <http://www.immunisation.nhs.uk/article.php?id=347>, Stand 01.06.2005
- NHS (2004 b) <http://www.immunisation.nhs.uk/article.php?id=349>, Stand 01.06.2005
- Novick, D., S. H. Kim, et al. (1999). "Interleukin-18 binding protein: a novel modulator of the Th1 cytokine response." Immunity **10**(1): 127-36.
- Okamoto, I., K. Kohno, et al. (1999). "Development of CD8+ effector T cells is differentially regulated by IL-18 and IL-12." J Immunol **162**(6): 3202-11.
- Okamura, H., H. Tsutsi, et al. (1995). "Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells." Nature **378**(6552): 88-91.
- Olszewska, W., Y. Suezer, et al. (2004). "Protective and disease-enhancing immune responses induced by recombinant modified vaccinia Ankara (MVA) expressing respiratory syncytial virus proteins." Vaccine **23**(2): 215-21.
- O'Neill, L. A. and C. A. Dinarello (2000). "The IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily: crucial receptors for inflammation and host defense." Immunol Today **21**(5): 206-9.
- O'Neill, L. A. and C. Greene (1998). "Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants." J Leukoc Biol **63**(6): 650-7.
- Paoletti, E. and L. J. Grady (1977). "Transcriptional complexity of vaccinia virus in vivo and in vitro." J Virol **23**(3): 608-15.
- Pascolo, S., N. Bervas, et al. (1997). "HLA-A2.1-restricted education and cytolytic activity of CD8(+) T lymphocytes from beta2 microglobulin (beta2m) HLA-A2.1 monochain transgenic H-2Db beta2m double knockout mice." J Exp Med **185**(12): 2043-51.
- Pastoret, P. P. and A. Vanderplasschen (2003). "Poxviruses as vaccine vectors." Comp Immunol Microbiol Infect Dis **26**(5-6): 343-55.
- Payne, L. (1978). "Polypeptide composition of extracellular enveloped vaccinia virus." J Virol **27**(1): 28-37.

- Pelletier, G., E. Dupont, et al. (1992). "Ontogeny and subcellular localization of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase (3 beta-HSD) in the human and rat adrenal, ovary and testis." *J Steroid Biochem Mol Biol* **43**(5): 451-67.
- Peters, D. and G. Mueller (1963). "The Fine Structure of the DNA-Containing Core of Vaccinia Virus." *Virology* **21**: 267-9.
- Pogo, B. G., M. O'Shea, et al. (1981). "Initiation and termination of vaccinia virus DNA replication." *Virology* **108**(1): 241-8.
- Ramirez, J. C., D. Finke, et al. (2003). "Tissue distribution of the Ankara strain of vaccinia virus (MVA) after mucosal or systemic administration." *Arch Virol* **148**(5): 827-39.
- Reading, P. C., J. B. Moore, et al. (2003). "Steroid hormone synthesis by vaccinia virus suppresses the inflammatory response to infection." *J Exp Med* **197**(10): 1269-78.
- Reading, P. C. and G. L. Smith (2003 a). "Vaccinia virus interleukin-18-binding protein promotes virulence by reducing gamma interferon production and natural killer and T-cell activity." *J Virol* **77**(18): 9960-8.
- Reading, P. C. and G. L. Smith (2003 b). "A kinetic analysis of immune mediators in the lungs of mice infected with vaccinia virus and comparison with intradermal infection." *J Gen Virol* **84**(Pt 8): 1973-83.
- Rees, D. G., A. J. Gates, et al. (2005). "CpG-DNA protects against a lethal orthopoxvirus infection in a murine model." *Antiviral Res* **65**(2): 87-95.
- Rochlitz, C., R. Figlin, et al. (2003). "Phase I immunotherapy with a modified vaccinia virus (MVA) expressing human MUC1 as antigen-specific immunotherapy in patients with MUC1-positive advanced cancer." *J Gene Med* **5**(8): 690-9.
- Roos, N., M. Cyrklaff, et al. (1996). "A novel immunogold cryoelectron microscopic approach to investigate the structure of the intracellular and extracellular forms of vaccinia virus." *Embo J* **15**(10): 2343-55.
- Ruzek, M. C., A. H. Miller, et al. (1997). "Characterization of early cytokine responses and an interleukin (IL)-6-dependent pathway of endogenous glucocorticoid induction during murine cytomegalovirus infection." *J Exp Med* **185**(7): 1185-92.
- Salzman, N. P. (1960). "The rate of formation of vaccinia deoxyribonucleic acid and vaccinia virus." *Virology* **10**: 150-2.
- Schleimer, R. P., A. Jacques, et al. (1984). "Inhibition of T cell-mediated cytotoxicity by anti-inflammatory steroids." *J Immunol* **132**(1): 266-71.
- Schmelz, M., B. Sodeik, et al. (1994). "Assembly of vaccinia virus: the second wrapping cisterna is derived from the trans Golgi network." *J Virol* **68**(1): 130-47.
- Schneider, J., J. A. Langermans, et al. (2001). "A prime-boost immunisation regimen using DNA followed by recombinant modified vaccinia virus Ankara induces strong cellular immune responses against the Plasmodium falciparum TRAP antigen in chimpanzees." *Vaccine* **19**(32): 4595-602.

- Seth, A., I. Ourmanov, et al. (2000). "Immunization with a modified vaccinia virus expressing simian immunodeficiency virus (SIV) Gag-Pol primes for an anamnestic Gag-specific cytotoxic T-lymphocyte response and is associated with reduction of viremia after SIV challenge." J Virol **74**(6): 2502-9.
- Shchelkunov, S. N., P. F. Safronov, et al. (1998). "The genomic sequence analysis of the left and right species-specific terminal region of a cowpox virus strain reveals unique sequences and a cluster of intact ORFs for immunomodulatory and host range proteins." Virology **243**(2): 432-60.
- Simard, J., M. L. Ricketts, et al. (2005). "Molecular biology of the 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase gene family." Endocr Rev **26**(4): 525-82.
- Sims, J. E. (2002). "IL-1 and IL-18 receptors, and their extended family." Curr Opin Immunol **14**(1): 117-22.
- Smith, G. L. and G. McFadden (2002). "Smallpox: anything to declare?" Nat Rev Immunol **2**(7): 521-7.
- Smith, G. L. and B. Moss (1983). "Infectious poxvirus vectors have capacity for at least 25 000 base pairs of foreign DNA." Gene **25**(1): 21-8.
- Smith, V. P., N. A. Bryant, et al. (2000). "Ectromelia, vaccinia and cowpox viruses encode secreted interleukin-18-binding proteins." J Gen Virol **81**(Pt 5): 1223-30.
- Spriggs, M. K., D. E. Hruby, et al. (1992). "Vaccinia and cowpox viruses encode a novel secreted interleukin-1-binding protein." Cell **71**(1): 145-52.
- Sroller, V., L. Kutinova, et al. (1998). "Effect of 3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene deletion on virulence and immunogenicity of different vaccinia viruses and their recombinants." Arch Virol **143**(7): 1311-20.
- Staib, C., I. Drexler, et al. (2000). "Transient host range selection for genetic engineering of modified vaccinia virus Ankara." Biotechniques **28**(6): 1137-42, 1144-6, 1148.
- Staib, C., S. Kisling, et al. (2005). "Inactivation of the viral interleukin 1 {beta} receptor improves CD8+ T-cell memory responses elicited upon immunization with modified vaccinia virus Ankara." J Gen Virol **86**(Pt 7): 1997-2006.
- Staib, C., M. Lowel, et al. (2003). "Improved host range selection for recombinant modified vaccinia virus Ankara." Biotechniques **34**(4): 694-6, 698, 700.
- Stittelaar, K. J., T. Kuiken, et al. (2001). "Safety of modified vaccinia virus Ankara (MVA) in immune-suppressed macaques." Vaccine **19**(27): 3700-9.
- Stittelaar, K. J., L. S. Wyatt, et al. (2000). "Protective immunity in macaques vaccinated with a modified vaccinia virus Ankara-based measles virus vaccine in the presence of passively acquired antibodies." J Virol **74**(9): 4236-43.
- Stokes, G. V. (1976). "High-voltage electron microscope study of the release of vaccinia virus from whole cells." J Virol **18**(2): 636-43.

- Stryer, L., Berg, J. M., Tymoczko, J. L. (2003). Biochemie. L. Stryer, Berg, J. M., Tymoczko, J. L. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Sutter, G. and B. Moss (1992). "Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(22): 10847-51.
- Sutter, G., A. Ramsey-Ewing, et al. (1994). "Stable expression of the vaccinia virus K1L gene in rabbit cells complements the host range defect of a vaccinia virus mutant." J Virol **68**(7): 4109-16.
- Sutter, G. and C. Staib (2003). "Vaccinia vectors as candidate vaccines: the development of modified vaccinia virus Ankara for antigen delivery." Curr Drug Targets Infect Disord **3**(3): 263-71.
- Sutter, G., L. S. Wyatt, et al. (1994). "A recombinant vector derived from the host range-restricted and highly attenuated MVA strain of vaccinia virus stimulates protective immunity in mice to influenza virus." Vaccine **12**(11): 1032-40.
- Symons, J. A., E. Adams, et al. (2002). "The vaccinia virus C12L protein inhibits mouse IL-18 and promotes virus virulence in the murine intranasal model." J Gen Virol **83**(Pt 11): 2833-44.
- Symons, J. A., D. C. Tschärke, et al. (2002). "A study of the vaccinia virus interferon-gamma receptor and its contribution to virus virulence." J Gen Virol **83**(Pt 8): 1953-64.
- Tanaka-Kataoka, M., T. Kunikata, et al. (1999). "In vivo antiviral effect of interleukin 18 in a mouse model of vaccinia virus infection." Cytokine **11**(8): 593-9.
- Tartaglia, J., M. E. Perkus, et al. (1992). "NYVAC: a highly attenuated strain of vaccinia virus." Virology **188**(1): 217-32.
- Tolonen, N., L. Doglio, et al. (2001). "Vaccinia virus DNA replication occurs in endoplasmic reticulum-enclosed cytoplasmic mini-nuclei." Mol Biol Cell **12**(7): 2031-46.
- Tschärke, D. C., P. C. Reading, et al. (2002). "Dermal infection with vaccinia virus reveals roles for virus proteins not seen using other inoculation routes." J Gen Virol **83**(Pt 8): 1977-86.
- Tsutsui, H., K. Nakanishi, et al. (1996). "IFN-gamma-inducing factor up-regulates Fas ligand-mediated cytotoxic activity of murine natural killer cell clones." J Immunol **157**(9): 3967-73.
- Ushio, S., M. Namba, et al. (1996). "Cloning of the cDNA for human IFN-gamma-inducing factor, expression in Escherichia coli, and studies on the biologic activities of the protein." J Immunol **156**(11): 4274-9.
- Webster, D. P., S. Dunachie, et al. (2005). "Enhanced T cell-mediated protection against malaria in human challenges by using the recombinant poxviruses FP9 and modified vaccinia virus Ankara." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(13): 4836-41.
- Welsh, R. M., Jr. (1978). "Mouse natural killer cells: induction specificity, and function." J Immunol **121**(5): 1631-5.

- WHO (1999). "Smallpox eradication. Destruction of variola virus stocks." Wkly Epidemiol Rec **74**(24): 188-91.
- Williamson, J. D., R. W. Reith, et al. (1990). "Biological characterization of recombinant vaccinia viruses in mice infected by the respiratory route." J Gen Virol **71** ( Pt 11): 2761-7.
- Wittek, R. and B. Moss (1980). "Tandem repeats within the inverted terminal repetition of vaccinia virus DNA." Cell **21**(1): 277-84.
- Woodson, B. (1967). "Vaccinia mRNA synthesis under conditions which prevent uncoating." Biochem Biophys Res Commun **27**(2): 169-75.
- Wyatt, L. S., P. L. Earl, et al. (2004). "Highly attenuated smallpox vaccine protects mice with and without immune deficiencies against pathogenic vaccinia virus challenge." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(13): 4590-5.
- Wyatt, L. S., S. T. Shors, et al. (1996). "Development of a replication-deficient recombinant vaccinia virus vaccine effective against parainfluenza virus 3 infection in an animal model." Vaccine **14**(15): 1451-8.
- Wyatt, L. S., S. S. Whitehead, et al. (1999). "Priming and boosting immunity to respiratory syncytial virus by recombinant replication-defective vaccinia virus MVA." Vaccine **18**(5-6): 392-7.
- Xiang, Y. and B. Moss (1999). "Identification of human and mouse homologs of the MC51L-53L-54L family of secreted glycoproteins encoded by the Molluscum contagiosum poxvirus." Virology **257**(2): 297-302.
- Xiang, Y. and B. Moss (1999). "IL-18 binding and inhibition of interferon gamma induction by human poxvirus-encoded proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(20): 11537-42.
- Yang, Z. Y., L. S. Wyatt, et al. (2003). "Overcoming immunity to a viral vaccine by DNA priming before vector boosting." J Virol **77**(1): 799-803.
- Yoshimoto, T., K. Takeda, et al. (1998). "IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production." J Immunol **161**(7): 3400-7.

# ***Danksagung***

An erster Stelle danke ich Prof. Dr. Volker Erfle für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Mein spezieller Dank gilt Priv.-Doz. Dr. Gerd Sutter für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können. Danke für die intensive Betreuung und die vielen fachlichen Anregungen in zahlreichen Doktorandenseminaren.

In meinen Dank einschließen möchte ich sodann Prof. Dr. Susanne Modrow für die Übernahme der Beurteilung dieser Arbeit als Erstgutachterin.

Meiner Betreuerin Caroline Staib danke ich ganz besonders herzlich für ihren unermüdlichen Einsatz bei der Beantwortung fachlicher Fragen und bei der Anleitung zu vielen Arbeitsschritten während der drei Jahre. Während der Schreibphase waren Ihr großes Engagement beim Korrekturlesen und ihre Verbesserungsvorschläge sehr hilfreich und wertvoll.

Ein außerordentlicher Dank gilt auch meinen beiden ehemaligen Mitdoktoranden Yasemine Süzer und Marcus Meyr und meinen beiden derzeitigen Mitstreitern Susanne El Gogo und Simone Bakkes für ihre Unterstützung und Motivation durch ihre immer offene und hilfsbereite Art.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Marianne Löwel, deren geduldiges Beantworten von Fragen oftmals so hilfreich war sowie bei allen „Mäusehelfern“ Sigrid Kisling, Georg Gasteiger, Wolfgang Kastenmüller und Ronny Ljapoci. Danke an unsere „Labormama“ Eliane Bilir, besonders für die manchmal unentbehrliche Material-Notversorgung. Ute Finkel möchte ich danken für ihre große Hilfe in der Endphase der praktischen Laborarbeit.

Bei allen weiteren Kollegen, Andrea Troppmann, Ingo Drexler, Michael Lehmann, Robert Baier, Andrea Schmidbauer und ehemaligen Kollegen Holger Ludwig und Moritz Klemm, bedanke ich mich für das gute Arbeitsklima und die lockere Atmosphäre im Labor. Danke für die vielen lustigen Momente, nicht nur im Labor, und die große Hilfsbereitschaft.

Weiterhin bedanken möchte ich mich auch bei Matthias Lochner, dessen Hilfe zum erfolgreichen Nachweis der Proteinfunktion beigetragen hat.

Unersetzlich waren für mich zudem meine „Computerhelden“ Marcus Meyr und Stefan Zinsberger, die mir sehr oft geholfen haben scheinbar unlösbare Computerprobleme doch zu lösen.

Ich danke meinen Freunden und hier speziell denen aus Regensburger Studienzeiten für Aufmunterung, wenn es nötig war. Danke an Jimena, Christoph und Henning für die ruhige Arbeitsatmosphäre daheim über einen so langen Zeitraum!

Unschätzbarer Dank gilt aber ganz besonders meinen Eltern und meiner Schwester Judith für ihre begleitende Unterstützung und die große Anteilnahme am Gelingen meiner Arbeit.