

---

Technische Universität München  
Institut für Virologie

**Das murine Gammaherpesvirus 68 als *in vivo* Modell  
zur Evaluierung von Antigen-spezifischen Vakzinen**

Susanne El-Gogo

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät  
Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt  
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
**Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. H. H. D. Meyer

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. S. Scherer  
2. Priv.-Doz. Dr. G. Sutter  
3. Priv.-Doz. Dr. H. Adler  
(Ludwig-Maximilians-Universität München)

Die Dissertation wurde am 01.06.06 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung  
und Umwelt am 26.10.06 angenommen

---

## Inhaltsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| Inhaltsverzeichnis .....  | 1         |
| Abkürzungsverzeichnis .....   | 6         |
| <b>1 Einleitung.....</b>  | <b>10</b> |
| <b>1.1 Chronische Virusinfektionen.....</b>                             | <b>10</b> |
| 1.1.1 Das Hepatitis C Virus .....                                       | 10        |
| 1.1.1.1 Das HCV Strukturprotein CORE.....                               | 13        |
| 1.1.1.2 Das HCV Nichtstrukturprotein NS3.....                           | 13        |
| <b>1.2 Entwicklung von Vakzinen gegen HCV .....</b>                     | <b>14</b> |
| <b>1.3 Rekombinante Viren als Impfvektoren.....</b>                     | <b>15</b> |
| 1.3.1 Modifiziertes Vacciniavirus Ankara (MVA).....                     | 15        |
| 1.3.2 Rekombinante Adenoviren .....                                     | 17        |
| <b>1.4 Modelle zur Untersuchung von Vakzinen gegen Hepatitis C.....</b> | <b>18</b> |
| 1.4.1 <i>In vitro</i> Modelle.....                                      | 18        |
| 1.4.2 <i>In vivo</i> Modelle.....                                       | 19        |
| <b>1.5 Das Murine Gammaherpesvirus 68 (MHV-68) .....</b>                | <b>19</b> |
| 1.5.1 Eigenschaften von MHV-68.....                                     | 19        |
| 1.5.2 Infektionsbiologie von MHV-68 .....                               | 20        |
| <b>Zielsetzung.....</b>   | <b>22</b> |
| <b>2 Material .....</b>   | <b>23</b> |
| <b>2.1 Chemikalien .....</b>  | <b>23</b> |
| <b>2.2 Puffer und Lösungen.....</b>                                     | <b>25</b> |
| <b>2.3 Nährmedien.....</b>  | <b>27</b> |
| 2.3.1 Nährmedien für Bakterien .....                                    | 27        |
| 2.3.2 Nährmedien für eukaryontische Zellen .....                        | 27        |
| <b>2.4 Verbrauchsmaterialien .....</b>                                  | <b>28</b> |
| <b>2.5 Kommerzielle Reaktionssätze .....</b>                            | <b>29</b> |
| <b>2.6 Plasmide .....</b>   | <b>30</b> |
| <b>2.7 Synthetische Oligonukleotide (Primer) .....</b>                  | <b>31</b> |
| <b>2.8 Synthetische Oligopeptide .....</b>                              | <b>32</b> |
| <b>2.9 Enzyme .....</b>   | <b>32</b> |
| <b>2.10 Antikörper.....</b>   | <b>33</b> |
| <b>2.11 Viren .....</b>   | <b>33</b> |
| <b>2.12 Organismen.....</b>   | <b>34</b> |
| 2.12.1 Bakterien.....   | 34        |
| 2.12.2 Eukaryontische Zellen.....                                       | 34        |
| 2.12.3 Mäuse.....   | 35        |
| <b>2.13 Geräteliste .....</b>   | <b>35</b> |

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| 2.14       | Computerprogramme .....   | 37        |
| <b>3</b>   | <b>Methoden .....</b>   | <b>38</b> |
| <b>3.1</b> | <b>Bakteriologische Methoden .....</b>  | <b>38</b> |
| 3.1.1      | Kultivierung von Bakterien .....  | 38        |
| 3.1.2      | Kryokonservierung prokaryontischer Zellen (Glyzerinkultur).....   | 38        |
| 3.1.3      | Herstellung transformationskompetenter Bakterien.....   | 38        |
| 3.1.3.1    | <i>Herstellung elektrokompetenter Bakterien.....</i>  | 38        |
| 3.1.3.2    | <i>Herstellung chemischkompetenter Bakterien.....</i>   | 39        |
| 3.1.4      | Transformation von Bakterien.....   | 39        |
| 3.1.4.1    | <i>Elektrotransformation von Bakterien .....</i>  | 39        |
| 3.1.4.2    | <i>Hitzeschocktransformation von Bakterien.....</i>   | 39        |
| 3.1.5      | Shuttle Mutagenese.....   | 40        |
| <b>3.2</b> | <b>Molekularbiologische Methoden.....</b>   | <b>41</b> |
| 3.2.1      | Plasmidisolierung .....   | 41        |
| 3.2.1.1    | <i>Plasmidisolierung im analytischen Maßstab (Mini-Präparation).....</i>  | 41        |
| 3.2.1.2    | <i>BAC-Plasmidisolierung im analytischen Maßstab.....</i>   | 41        |
| 3.2.1.3    | <i>Isolierung von Plasmiden und BAC-Vektoren im präparativen Maßstab (Maxi-Präparation) .....</i>                       | 42        |
| 3.2.2      | Amplifikation von Nukleinsäuren .....   | 42        |
| 3.2.2.1    | <i>Analytische PCR .....</i>  | 42        |
| 3.2.2.2    | <i>Präparative PCR.....</i>   | 44        |
| 3.2.2.3    | <i>Aufreinigung des Amplifikats.....</i>  | 44        |
| 3.2.3      | Analyse von Nukleinsäuren mittels Gelelektrophorese.....  | 44        |
| 3.2.3.1    | <i>Auftrennung von DNA nach Größe in Agarosegelen.....</i>  | 45        |
| 3.2.3.2    | <i>Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen im präparativen Maßstab.....</i>                                      | 45        |
| 3.2.4      | Phenol/Chloroform-Extraktion.....   | 45        |
| 3.2.5      | Ethanolpräzipitation von DNA.....   | 46        |
| 3.2.6      | Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....   | 46        |
| 3.2.6.1    | <i>Photometrische Bestimmung.....</i>   | 46        |
| 3.2.6.2    | <i>Abschätzung mittels Gelelektrophorese.....</i>   | 46        |
| 3.2.7      | Klonierung rekombinanter Plasmide .....   | 46        |
| 3.2.7.1    | <i>Spaltung von Nukleinsäuren durch Restriktionsendonukleasen.....</i>  | 46        |
| 3.2.7.2    | <i>Erzeugung kompatibler DNA Enden.....</i>   | 47        |
| 3.2.7.3    | <i>Dephosphorylierung von DNA.....</i>  | 48        |
| 3.2.7.4    | <i>Ligation von DNA .....</i>   | 48        |
| 3.2.8      | Sequenzanalyse von Nukleinsäuren .....  | 49        |
| 3.2.9      | Detektion spezifischer Nukleinsäure- Fragmente mittels markierter, einzelsträngiger DNA im Southern Blot Verfahren..... | 49        |
| 3.2.9.1    | <i>Transfer von DNA auf eine Nylonmembran (Southern Blot).....</i>  | 49        |
| 3.2.9.2    | <i>Herstellung einer Digoxigenin-markierten Sonde.....</i>  | 50        |
| 3.2.9.3    | <i>Hybridisierung von DNA mit einer Digoxigenin-markierten Sonde.....</i>   | 50        |

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| <b>3.3</b> | <b>Proteinbiochemische Methoden .....</b>   | <b>51</b> |
| 3.3.1      | Auftrennung von Proteinen in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ..... | 51        |
| 3.3.2      | Immunochemische Detektion von Proteinen im <i>Western Blot</i> -Verfahren .....       | 51        |
| <b>3.4</b> | <b>Zellkultur-Techniken .....</b>   | <b>52</b> |
| 3.4.1      | Kultivierung eukaryontischer Zelllinien.....  | 52        |
| 3.4.2      | Zucht adhärent wachsender Zellen .....  | 52        |
| 3.4.3      | Kryokonservierung eukaryontischer Zellen .....  | 53        |
| 3.4.4      | Auftauen kryokonservierter eukaryontischer Zellen.....                                | 53        |
| <b>3.5</b> | <b>Virologische Methoden .....</b>  | <b>54</b> |
| 3.5.1      | Rekonstitution rekombinanter MHV-68 in Zellkultur.....                                | 54        |
| 3.5.1.1    | <i>Transfektion viraler DNA in eukaryontische Zellen</i> .....                        | 54        |
| 3.5.1.2    | <i>Herstellung und Selektion BAC-Sequenz freier MHV-68</i> .....                      | 54        |
| 3.5.2      | Vermehrung von MHV-68 in Zellkultur .....   | 55        |
| 3.5.3      | Bestimmung des Titers von MHV-68 ( <i>Plaque-Assay</i> ).....                         | 55        |
| 3.5.4      | Bestimmung des Wachstumsverhaltens von MHV-68 <i>in vitro</i> .....                   | 56        |
| 3.5.5      | Isolierung viraler DNA (Hirt-Extrakt).....  | 56        |
| <b>3.6</b> | <b>Tierexperimentielle und immunologische Methoden.....</b>                           | <b>57</b> |
| 3.6.1      | Haltung von Versuchstieren .....  | 57        |
| 3.6.2      | Infektion von Versuchstieren.....   | 57        |
| 3.6.2.1    | <i>Intranasale Infektion</i> .....  | 57        |
| 3.6.2.2    | <i>Intraperitoneale Infektion</i> .....   | 57        |
| 3.6.3      | Präparation von Organhomogenaten .....  | 57        |
| 3.6.3.1    | <i>Herstellung von Lungenhomogenaten</i> .....  | 57        |
| 3.6.3.2    | <i>Gewinnung von Milzhomogenaten</i> .....  | 58        |
| 3.6.4      | Präparation von Splenozyten aus der Maus.....   | 58        |
| 3.6.5      | <i>Ex vivo</i> Reaktivierungs-Assay .....   | 59        |
| 3.6.6      | Intrazelluläre Zytokinfärbung.....  | 59        |
| 3.6.6.1    | <i>Vorbereitung der Stimulatorzellen</i> .....  | 59        |
| 3.6.6.2    | <i>Stimulation von T-Lymphozyten und IFN-<math>\gamma</math> Messung</i> .....        | 60        |
| 3.6.7      | Tetramerfärbung von T-Lymphozyten .....   | 61        |
| 3.6.8      | Messung der Aktivität zytotoxischer T-Zellen.....                                     | 61        |
| 3.6.8.1    | <i>Anlegen einer Primärkultur</i> .....   | 61        |
| 3.6.8.2    | <i>Vorbereitung der Zielzellen</i> .....  | 62        |
| 3.6.8.3    | <i><sup>51</sup>Cr Freisetzung und Messung</i> .....                                  | 62        |
| <b>4</b>   | <b>Ergebnisse.....</b>  | <b>63</b> |
| <b>4.1</b> | <b>Generierung rekombinanter MHV-68 .....</b>   | <b>63</b> |
| 4.1.1      | Insertion von Genen in das MHV-68 Genom.....  | 64        |
| 4.1.1.1    | <i>Herstellung von MHV-68-OVA</i> .....   | 67        |
| 4.1.1.2    | <i>Herstellung von MHV-68-NS3</i> .....   | 67        |
| 4.1.1.3    | <i>Herstellung von MHV-68-NS3-RO</i> .....  | 67        |
| 4.1.1.4    | <i>Herstellung von MHV-68-CORE</i> .....  | 67        |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| 4.1.2      | Deletion inserierter Gene aus dem MHV-68 Genom.....  | 68        |
| <b>4.2</b> | <b><i>In vitro</i> Charakterisierung rekombinanter MHV-68.....</b>   | <b>68</b> |
| 4.2.1      | Analyse rekombinanter MHV-68 auf genomischer Ebene.....  | 69        |
| 4.2.1.1    | <i>Charakterisierung des Genoms durch Restriktionsanalyse.....</i>   | <i>69</i> |
| 4.2.1.2    | <i>Kontrolle genomischer Integrität im Southern Blot.....</i>  | <i>70</i> |
| 4.2.2      | Nachweis der Expression von OVA, NS3 und CORE in MHV-68 infizierten NIH3T3 Zellen....  | 71        |
| 4.2.3      | Wachstumsanalyse von MHV-68-OVA, MHV-68-NS3 und MHV-68-CORE in NIH3T3 Zellen.....  | 73        |
| <b>4.3</b> | <b><i>In vivo</i> Charakterisierung rekombinanter MHV-68.....</b>  | <b>73</b> |
| 4.3.1      | Lytische Replikation rekombinanter MHV-68.....   | 74        |
| 4.3.1.1    | <i>Lytische Replikation rekombinanter MHV-68 in der Lunge.....</i>   | <i>74</i> |
| 4.3.1.2    | <i>Lytische Replikation rekombinanter MHV-68 in der Milz.....</i>  | <i>75</i> |
| 4.3.2      | Latenzverhalten rekombinanter MHV-68.....  | 75        |
| 4.3.2.1    | <i>Bestimmung der Splenomegalie und Splenozytenzahl nach Infektion mit rekombinanten MHV-68.....</i>   | <i>76</i> |
| 4.3.2.2    | <i>Bestimmung der Frequenz reaktivierender Splenozyten nach Infektion mit rekombinanten MHV-68.....</i>  | <i>77</i> |
| 4.3.2.3    | <i>Untersuchungen zur Infektionskinetik von MHV-68-NS3.....</i>  | <i>79</i> |
| 4.3.2.4    | <i>Charakterisierung von MHV-68 Revertanten.....</i>   | <i>80</i> |
| <b>4.4</b> | <b>Untersuchungen zum attenuierten Phänotyp von MHV-68-NS3.....</b>  | <b>81</b> |
| 4.4.1      | Rekonstitution der Splenomegalie nach Infektion mit MHV-68-NS3-RO.....   | 82        |
| 4.4.2      | mRNA Nachweis von NS3 in Zellkultur nach Infektion mit MHV-68-NS3-RO.....  | 82        |
| <b>4.5</b> | <b>Untersuchung der Schutzwirkung von MVA-OVA vor einer Belastungsinfektion mit MHV-68-OVA.....</b>  | <b>84</b> |
| 4.5.1      | Reduktion MHV-68-OVA induzierter Parameter nach Belastungsinfektion <i>in vivo</i> .....   | 84        |
| 4.5.1.1    | <i>Reduktion von lytischem Virus in der Lunge.....</i>   | <i>86</i> |
| 4.5.1.2    | <i>Reduktion von lytischem Virus in der Milz.....</i>  | <i>87</i> |
| 4.5.1.3    | <i>Reduktion von Splenomegalie und Splenozytenzahl.....</i>  | <i>87</i> |
| 4.5.2      | Untersuchung Ovalbumin-spezifischer Immunantworten in <i>ex vivo</i> Versuchen.....  | 89        |
| 4.5.2.1    | <i>Bestimmung der Frequenz reaktivierender Splenozyten nach Belastungsinfektion mit MHV-68-OVA.....</i>  | <i>89</i> |
| 4.5.2.2    | <i>Detektion Ovalbumin-spezifischer T-Lymphozyten durch intrazelluläre IFN<math>\gamma</math>-Färbung nach Belastungsinfektion mit MHV-68-OVA.....</i>           | <i>90</i> |
| 4.5.2.3    | <i>Detektion Ovalbumin-spezifischer T-Lymphozyten durch Tetramerfärbung nach Belastungsinfektion mit MHV-68-OVA.....</i>   | <i>92</i> |
| 4.5.2.4    | <i>Detektion Ovalbumin-spezifischer T-Lymphozyten durch intrazelluläre IFN<math>\gamma</math>-Färbung nach Immunisierung (ohne Belastungsinfektion).....</i>     | <i>94</i> |
| 4.5.2.5    | <i>Messung Ovalbumin-spezifischer Zellyse im Zytotoxizitätstest.....</i>   | <i>95</i> |
| <b>4.6</b> | <b>Untersuchung der Schutzwirkung homologer oder heterologer Immunisierung mit MVA-NS3 bzw. Ad-NS3/MVA-NS3 vor einer Belastungsinfektion mit MHV-68-NS3.....</b> | <b>97</b> |
| 4.6.1      | Reduktion MHV-68-NS3 induzierter Parameter nach Belastungsinfektion <i>in vivo</i> .....   | 97        |

|            |   |            |
|------------|---|------------|
| 4.6.1.1    | Reduktion von lytischem Virus in der Lunge .....  | 98         |
| 4.6.1.2    | Reduktion von lytischem Virus in der Milz.....  | 99         |
| 4.6.1.3    | Reduktion von Splenomegalie und Splenozytenzahl.....  | 100        |
| 4.6.2      | Charakterisierung NS3-spezifischer Immunantworten in <i>ex vivo</i> Versuchen.....  | 102        |
| 4.6.2.1    | Bestimmung der Frequenz reaktivierender Splenozyten nach Belastungsinfektion mit MHV-68-NS3.....  | 102        |
| 4.6.2.2    | Detektion NS3-spezifischer T-Lymphozyten durch intrazelluläre IFN $\gamma$ -Färbung nach Belastungsinfektion mit MHV-68-NS3.....                            | 104        |
| 4.6.2.3    | Detektion NS3-spezifischer T-Lymphozyten durch intrazelluläre IFN $\gamma$ -Färbung nach Immunisierung (ohne Belastungsinfektion) .....                     | 106        |
| 4.6.2.4    | Messung NS3-spezifischer Zelllyse im Zytotoxizitätstest.....  | 107        |
| <b>4.7</b> | <b>Untersuchung der Schutzwirkung der Immunisierung mit MVA-CORE bzw. Ad-CORE/MVA-CORE Vektorimpfstoffen durch Belastungsinfektion mit MHV-68-CORE.....</b> | <b>109</b> |
| 4.7.1      | Charakterisierung MHV-68-CORE induzierter Parameter nach Belastungsinfektion <i>in vivo</i> .....   | 109        |
| 4.7.1.1    | Bestimmung von lytischem Virus in der Lunge.....  | 110        |
| 4.7.1.2    | Bestimmung von lytischem Virus in der Milz.....   | 111        |
| 4.7.1.3    | Messung von Splenomegalie und Splenozytenzahl .....   | 112        |
| 4.7.2      | Untersuchung CORE-spezifischer Immunantworten in <i>ex vivo</i> Versuchen.....  | 114        |
| 4.7.2.1    | Bestimmung der Frequenz reaktivierender Splenozyten nach Belastungsinfektion mit MHV-68-CORE.....   | 115        |
| 4.7.2.2    | Untersuchung CORE-spezifischer T-Zellantwort durch intrazelluläre IFN $\gamma$ -Färbung.....  | 116        |
| 4.7.2.3    | Bestimmung CORE-spezifischer Zelllyse im Zytotoxizitätstest.....  | 117        |
| <b>5</b>   | <b>Diskussion.....</b>  | <b>119</b> |
|            | <b>Zusammenfassung.....</b>   | <b>133</b> |
|            | <b>Literaturverzeichnis.....</b>  | <b>135</b> |

**Abkürzungsverzeichnis**

|                    |   |
|--------------------|---|
| A                  | Adenin bzw. Ampère  |
| Ad                 | Adenovirus  |
| AIDS               | Acquired Immunodeficiency Syndrom   |
| Amp                | Ampicillin  |
| APS                | Ammoniumperoxodisulfat  |
| AS                 | Aminosäure(n)   |
| ATP                | Adenosintriphosphat   |
| BAC                | Bacterial Artificial Chromosome<br>(Bakterielles artifizielles Chromosom) |
| bp                 | Basenpaar(e)  |
| BHK-21             | „Baby Hamster Kidney“-Zellen  |
| BSA                | bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)                                 |
| bzw.               | beziehungsweise   |
| C                  | Cytosin   |
| °C                 | Grad Celsius  |
| Cam                | Chloramphenicol   |
| Ci                 | Curie   |
| CIP                | calf intestinal phosphatase   |
| cm                 | Zentimeter  |
| CPE                | cytopathic effect (Zytopathischer Effekt)                                 |
| <sup>51</sup> Cr   | Radioaktiv Chrom  |
| Cre                | Cre- (Cyclization recombination) Rekombinase des<br>Phagen P1             |
| Da                 | Dalton  |
| dCTP               | Desoxycytidintriphosphat  |
| d.h.               | das heißt   |
| 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-Immunsorbent-Assay  |
| EMA              | Ethidium Monoazid Bromid  |
| ER               | Endoplasmatisches Retikulum   |
| Evtl.            | eventuell   |
| F                | Farad   |
| FACS             | fluorescence activated cell sorter<br>(Fluoreszenzaktivierter Zellsorter) |
| FITC             | Fluoresceinisothiocyanat  |
| FBS              | Fetal Bovine Serum (Fötale Rinderserum)                                   |
| FSC              | Forward Scatter (Vorwärtsstreulicht)                                      |
| g                | Gramm bzw. Erdbeschleunigung  |
| G                | Guanin  |
| <i>gfp</i> , GFP | green fluorescent protein   |
| GTP              | Guanosintriphosphat   |
| h                | Stunde  |
| HCV              | Hepatitis C Virus   |
| IE               | Infektiöse Einheiten  |
| i.m.             | intramuskulär   |
| i.n.             | intranasal  |
| i.p.             | intraperitoneal   |
| IFN              | Interferon  |
| IL               | Interleukin   |
| k                | Kilo  |
| Kan              | Kanamycin   |
| l                | Liter   |
| LB               | Luria Bertani   |
| lox P            | <u>l</u> ocus of <u>X</u> -over of <u>P</u> 1                             |
| m                | Milli   |
| M                | Molar   |
| μ                | Mikro   |
| MC3T3            | C57/Bl6-Mausembryo-Fibroblasten   |



|           |  |
|-----------|--|
| MHC       | Major Histocompatibility Complex<br>(Haupthistokompatibilitätskomplex) |
| MHV-68    | Murines Gammaherpesvirus 68  |
| min       | Minute   |
| mm        | Millimeter   |
| MOI       | multiplicity of infection  |
| mRNA      | messenger RNA - Boten-RNA  |
| MVA       | Modifiziertes Vacciniavirus Ankara                                     |
| MW        | molecular weight (Molekulargewicht)                                    |
| n         | Nano   |
| NIH3T3    | Swiss-Mausembryo-Fibroblasten  |
| NK-Zellen | Natürliche Killerzellen  |
| NS3       | Nichtstrukturprotein 3   |
| $\Omega$  | Ohm  |
| OD        | Optische Dichte  |
| ORF       | open reading frame (offener Leserahmen)                                |
| OVA       | Ovalbumin  |
| p         | Pico   |
| p.i.      | post infectionem   |
| PAGE      | Polyacrylamidgel-Elektrophorese  |
| PBS       | phosphat buffered saline (Phosphat gepufferte<br>Salzlösung)           |
| PCR       | polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)                  |
| PE        | R-Phycoerythrin  |
| PerCP     | Peridininchlorophyll Protein   |
| PFA       | Paraformaldehyd  |
| PMSF      | Phenylmethylsulfonylfluorid  |
| PO        | Peroxidase   |
| r         | rekombinant  |
| RNA       | Ribonukleinsäure   |
| RT        | Raumtemperatur   |
| SDS       | Sodiumdodecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)                             |
| s / sek   | Sekunde  |
| s.o.      | siehe oben   |

|       |  |
|-------|--|
| SSC   | Sideward Scatter (Seitwärtsstreulicht) bzw. Saline Sodium Citrat |
| s.u.  | siehe unten  |
| T     | Thymin   |
| TAE   | Tris Acetat EDTA   |
| TBE   | Tris Borsäure EDTA   |
| TBS   | Tris Buffered Saline(Tris gepufferte Salzlösung)                 |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethyldiamin                                      |
| TE    | Tris EDTA-Puffer   |
| TH1   | T-Helfer(zellen)-1   |
| TPB   | Tryptose Phosphat Broth  |
| Tris  | Trishydroxymethylaminomethan                                     |
| U     | Uracil bzw. Unit (Enzymeinheit)                                  |
| ÜN    | über Nacht   |
| Upm   | Umdrehungen pro Minute   |
| UV    | Ultraviolett   |
| v     | viral  |
| V     | Volt   |
| Vol.  | Volumen  |
| VACV  | Vacciniavirus  |
| W     | Watt   |
| w     | weight (Gewicht)   |
| WB    | Western-Blot   |
| WT    | Wildtyp  |
| z.B.  | zum Beispiel   |

# **1 Einleitung**

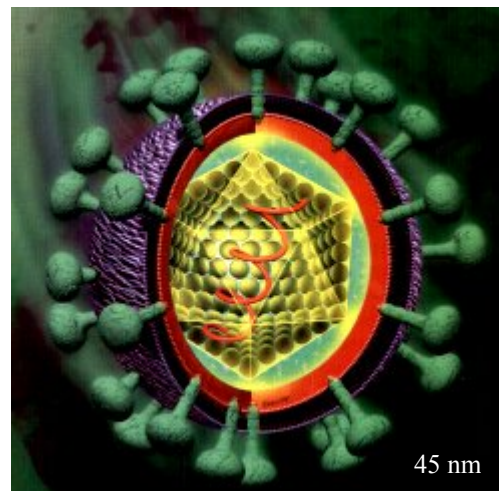
## **1.1 Chronische Virusinfektionen**

Chronische Virusinfektionen wie AIDS und Hepatitis C gehören weltweit zu den größten Gesundheitsproblemen und stellen daher eine große Herausforderung bei der Entwicklung von präventiven und therapeutischen Maßnahmen dar. Die Überlebensstrategie chronisch-persistierender Viren besteht darin, der Immunantwort des Wirts durch effiziente Evasionsmechanismen dauerhaft zu entgehen statt diesen durch massive lytische Replikation zu zerstören. Daher bieten diese Viren wenig Angriffsfläche, um wirksame Therapeutika zur Bekämpfung von Infektionen zu finden. Zusätzlich erschwert das Fehlen geeigneter Tiermodelle eine Überprüfung der Wirksamkeit von Impfstoffen.

### **1.1.1 Das Hepatitis C Virus**

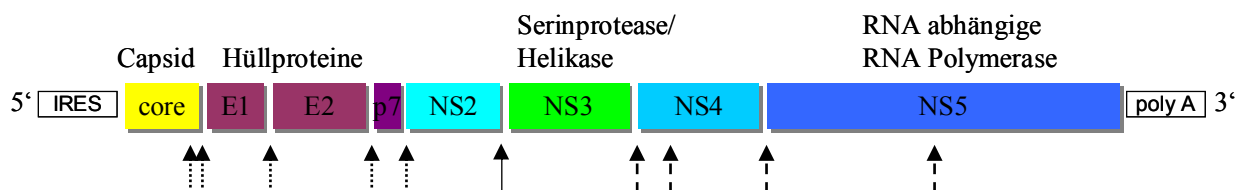
Mit mehr als 170 Millionen chronisch infizierten Menschen weltweit gehört das Hepatitis C Virus (HCV) zu den Hauptursachen für chronische Hepatitis, Leberzirrhose und hepatozellulärem Karzinom. In Deutschland gibt es etwa 400 000-500 000 Infizierte, wobei jährlich etwa 7 000-8 000 neue Fälle gemeldet werden (Anonym 2005b). Die Übertragung von HCV erfolgt hauptsächlich über das Eindringen von infiziertem Blut in die Blutbahn oder das Gewebe. Während bei 20-40% der Fälle die Infektion akut verlaufen kann, entwickelt sich bei 60-80% eine chronische Hepatitis. Davon kann in 5-20% der Fälle eine Zirrhose entstehen, bei etwa 4% von diesen entwickelt sich ein Leberzellkarzinom.

Nach seiner Entdeckung 1989 wurde HCV aufgrund seiner molekularbiologischen Charakteristika dem Genus der Flaviviren zugeordnet (Choo QL et al. 1989). Das Virus wird in sechs verschiedene Genotypen (1-6) und mehr als 50 Subtypen (1a, 1b, 1c usw.) eingeteilt, wobei in Westeuropa vorwiegend die Genotypen 1a, 1b und 2a nachgewiesen werden (Simmonds et al. 1993; Bukh et al. 1995).



**Abb. 1.1.1a Schematische Darstellung des Hepatitis C Virus.** Die grün dargestellten Spike-Proteine setzen sich aus den Strukturproteinen E1 und E2 zusammen und sind in der Hüllmembran (violett-rot) verankert, die dem ER der infizierten Zelle entstammt. Das ikosaedrische Kapsid wird von den CORE Proteinen gebildet (gelb), an deren Innenseite die RNA (rot) des Virus assoziiert ist (Bildquelle: Bayer-Forschungsmagazin 1998).

HCV besitzt ein einzelsträngiges RNA-Genom in Plusstrangorientierung mit einer Größe von etwa 9,6 Kilobasen, das für verschiedene Struktur- und Nichtstrukturproteine codiert (Abb. 1.1.1a). Ausgehend von einer IRES (*internal ribosomal entry site*) Sequenz im 5' nichtkodierenden Bereich wird ein Vorläuferpolyprotein synthetisiert, das später ko- und posttranslational an der Membran des endoplasmatischen Reticulums (ER) in einzelne Komponenten proteolytisch gespalten wird (Abb. 1.1.1b).



**Abb. 1.1.1b Genomorganisation des Hepatitis C Virus.** Ein durchgehend offener Leserahmen codiert für ein Polyprotein von 3010 Aminosäuren, das ausgehend von einer IRES Sequenz im 5' nichttranslatierten Bereich synthetisiert wird. Anschließend folgt die Spaltung durch zelluläre Signalasen des endoplasmatischen Retikulums (gepunkteter Pfeil) und durch virale Proteasen (NS2/3 durchgezogener Pfeil, NS3 gestrichelter Pfeil) in die Strukturproteine CORE, E1, E2 und p7 sowie die Nichtstrukturproteine NS2, NS3, NS4 und NS5. (Bildquelle nach (Kato 2001)).

Die Proteine NS3 und CORE werden in den Kapiteln 1.1.1.1 und 1.1.1.2 näher beschrieben. Bei den Strukturproteinen E1 und E2 handelt es sich um glykosylierte Membranproteine, die Heterodimere bilden und mit der Membran des ER assoziiert sind. E2 besitzt eine hypervariable Region am N-Terminus, die für die große Verschiedenartigkeit von HCV Isolaten in einem Individuum verantwortlich ist. Die Funktion von E1/E2 soll in der Bindung an und dem Eintritt von HCV in die Zelle liegen. Es konnte eine Bindung von E2 an das Transmembranprotein CD81 nachgewiesen werden, das daher neben anderen noch unbekanntem Faktoren als Korezeptor von HCV gilt (Pileri et al. 1998; Cormier et al. 2004). Als weitere Rezeptoren für HCV werden auch der *low density* Lipoprotein Rezeptor (LDLR) und Glykosaminoglykane vermutet (Flint et al. 2001).

Bei dem Nichtstrukturprotein NS2 handelt es sich um eine Zink-abhängige Metalloprotease, die ihre für die Infektiosität von HCV wichtige, autoproteolytische Aktivität nur in Assoziation mit NS3 entfalten kann (Grakoui et al. 1993; Hijikata et al. 1993).

NS4 wird proteolytisch in die Proteine NS4A und NS4B gespalten. Während die Eigenschaften von NS4B weitgehend unbekannt sind, konnte für NS4A eine Funktion als Kofaktor für die proteolytische Aktivität von NS3 gezeigt werden (Failla et al. 1994).

Bei NS5 erfolgt eine Prozessierung in die Proteine NS5A und NS5B. NS5B stellt die RNA-abhängige RNA Polymerase von HCV dar (Behrens et al. 1996). Aufgrund der fehlenden Korrekturlesefähigkeit ist sie für die hohe Mutationsrate von HCV verantwortlich, die bei  $2 \times 10^{-3}$  liegt (Modrow 2003). Die genaue Funktion von NS5A ist noch unbekannt, jedoch handelt es sich um ein Phosphoprotein, das bei der Resistenz gegen Interferon  $\alpha$  eine Rolle zu spielen scheint (Gale MJ. et al. 1999).

Der Nachweis einer Infektion beruht zum einen auf der Detektion von Antikörpern gegen verschiedene HCV Antigene im Serum mittels ELISA Tests und zum anderen auf der Amplifikation von HCV RNA in Leberbiopsien über die Polymerase-Kettenreaktion nach Herstellung von cDNA (RT-PCR). Die Messung von Leberenzymen (Transaminasen) kann Aufschluss über den Schweregrad einer HCV Infektion geben.

Bisher werden HCV Infektionen meist mit pegyliertem Interferon- $\alpha$  in Kombination mit dem Nukleosid Analogon Ribavirin behandelt, jedoch zeigen sich oft Nebenwirkungen. Der Erfolg einer Behandlung hängt hauptsächlich vom HCV Genotyp ab (Hugle et al. 2003). So liegt die Ansprechrate bei Genotyp-2 Patienten bei ca. 80%, während sie jedoch bei Patienten des in

Mitteleuropa häufigsten Genotyps 1 nur etwa 45% beträgt (Lorke et al. 2005). Eine Vakzinierung gegen HCV ist derzeit noch nicht möglich.

### **1.1.1.1 Das HCV Strukturprotein CORE**

Das CORE Protein entsteht aus dem N-terminalen Teil des HCV Polyproteins und kann, je nach Prozessierungsgrad, ein Molekulargewicht von 16 bis 23 kD aufweisen (Liu et al. 1997; Yasui et al. 1998). Durch Interaktion hochkonservierter basischer Aminosäuren des N-Terminus mit dem 5' untranslatierten Bereich des RNA-Genoms von HCV scheint CORE das ikosaedrische Nukleokapsid des Virus zu bilden (Santolini et al. 1994; Fan et al. 1999). Diese These wird auch durch den Nachweis der Multimerisierung von CORE gestützt (Matsumoto et al. 1996). Des Weiteren soll CORE an der Inkorporation von E1 in die ER-Membran beteiligt sein, da eine Bindung zwischen beiden Proteinen gezeigt werden konnte (Lo et al. 1996). CORE ist hauptsächlich mit der Membran der zytoplasmatischen Seite des ER assoziiert, soll jedoch zum Teil, besonders die verkürzte, reife Form des Proteins, auch im Nukleus lokalisiert sein (Lo et al. 1995; Liu et al. 1997).

Dem CORE Protein wurde auch die Beeinflussung verschiedener zellulärer Funktionen zugeschrieben. So wurden in verschiedenen Experimenten onkogenes Potential, Beeinflussung von Apoptose und transkriptioneller Regulation durch CORE beobachtet (Ray et al. 1995; Ray et al. 1996; Ruggieri et al. 1997; Moriya et al. 1998; Kato 2001).

### **1.1.1.2 Das HCV Nichtstrukturprotein NS3**

NS3 gehört zu den Nichtstrukturproteinen von HCV, hat ein Molekulargewicht von 70 kD und besitzt sowohl die Funktion einer Serinprotease als auch die einer Nukleosid Triphosphatase (NTPase) und RNA Helikase. Die Proteaseaktivität ist in den ersten 180 Aminosäuren des N-terminalen Bereichs von NS3 lokalisiert. Mit dem Kofaktor NS2 proteolytisch spaltet NS3 die NS2/3 Schnittstelle, mit NS4A als Kofaktor werden die übrigen, stromabwärts gelegenen Schnittstellen des Vorläuferproteins in die einzelnen Komponenten gespalten (Abb. 1.1.1b). Kristallographische und NMR Analysen konnten die Struktur von NS3 auflösen (Kim et al. 1996; Kim et al. 1998; Barbato et al. 1999) und zeigen, dass hochkonservierte Aminosäuren das katalytische Zentrum der Serinprotease bilden.

Die RNA Helikase und NTPase Funktion konnten den 465 Aminosäuren des C-Terminus des Proteins zugeordnet werden. Unter Spaltung von NTP oder dNTP kann die NS3 Helikase doppelsträngige RNA oder RNA-DNA Heteroduplices entwinden (Gwack et al. 1997).

Die hochkonservierten Sequenzen und katalytischen Zentren von NS3 und seine Schlüsselfunktion bei der Prozessierung und damit Amplifikation von HCV machen das Protein zu einem wichtigen Ziel für die Entwicklung von Inhibitoren und Impfstoffen. So konnten die Protease Inhibitoren BILN 2061 und VX-950 bereits in klinischen Studien antivirale Wirkung zeigen, da sie die Viruslast von HCV senken konnten (Lamarre et al. 2003; Anonym 2005a).

Da sowohl NS3 als auch CORE Schlüsselfunktionen bei der Replikation und Pathogenese von HCV einnehmen, sind sie als Ziel für die Herstellung von Impfstoffen besonders interessant. Ihre relativ gut konservierten Sequenzen können dabei die Entwicklung von Vakzinen erleichtern.

### 1.2 Entwicklung von Vakzinen gegen HCV

Die Entwicklung von Vakzinen gehörte zu den wichtigsten Errungenschaften der Medizin bei der Bekämpfung von viralen und bakteriellen Infektionskrankheiten. Seit den ersten Schutzimpfungen vor etwa 200 Jahren durch Edward Jenner, der durch die Verabreichung von Kuhpockenviren Pockeninfektionen beim Menschen verhindern konnte (Fenner et al. 1988), konnten Vakzine und Vakzinierungsstrategien stetig weiterentwickelt und verbessert werden. Neben den konventionellen Strategien, die virale oder bakterielle Organismen als Ganzes entweder als Lebend- oder Totimpfstoff einsetzen, lassen sich nun durch gezielte Genmanipulation attenuierte Organismen, die dadurch zumindest einen Teil ihrer Pathogenität verloren haben, zur Immunisierung verwenden (Co et al. 2002; Kotloff et al. 2002). Neuere Entwicklungen basieren auf einzelnen Komponenten von Organismen, d.h. von Proteinen oder Peptiden, die als Antigene spezifische, protektive Immunantworten auslösen sollen. Dabei entstanden verschiedene Systeme, um Proteine oder Peptide in den Organismus einzuführen und Antigene zu exprimieren. So kann beispielsweise Plasmid-DNA, die für gewünschte Antigene codiert, mittels intramuskulärer Injektion oder *gene gun* (Beschuss von Gewebe mit DNA-beladenen Goldpartikeln) in Zellen transferiert werden, in denen das inserierte Antigen exprimiert wird und Immunantworten auslösen kann (Arnon et al. 2003). DNA-Vakzine, die rekombinant für die HCV Proteine E1 und E2 sind, konnten in präklinischen Studien eine humorale Antwort gegen E1 und E2 hervorrufen (O'Hagan et al. 2004). Obwohl DNA-Vakzine Schutz gegen virale Infektionen im Tiermodell auslösen (Orson et al. 2006), muss jedoch die Immunogenität im Menschen durch DNA-

Modifikationen oder den Zusatz von Genen für Zytokine verbessert werden (Donnelly et al. 2005).

Eine weitere Vakzinierungsstrategie besteht in der Applikation von rekombinanten Proteinen, die *in vitro* hergestellt und aufgereinigt wurden. So konnten mit rekombinantem Hepatitis B Oberflächen-Antigen (HbsAg) erfolgreiche Vakzinierungen gegen Hepatitis B im Menschen durchgeführt werden (Goldfarb et al. 1994; Diminsky et al. 1999). Auch in Hinblick auf HCV war es möglich, durch die Verabreichung von rekombinanten E1/E2 Proteinen Schimpansen vor einer chronischen Infektion mit HCV zu schützen (Choo et al. 1994). Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, mit Peptiden bzw. spezifischen Epitopen zu immunisieren. Dies erlaubt eine gezielte, Antigen-restringierte Immunantwort (Arnon et al. 2003). Die Kopplung an Adjuvantien soll die Effizienz dieser sonst wenig immunogenen Vakzinierungsstrategien steigern. Im Menschen konnte das rekombinante E1 Protein von HCV in Verbindung mit Aluminiumsalzen erfolgreich humorale und zelluläre Immunantworten auslösen (Leroux-Roels et al. 2004).

Eine wirkungsvolle Methode, Antigene in Organismen einzubringen und spezifische humorale oder zelluläre Immunantworten auszulösen, ist der Einsatz von rekombinanten Viren als Impfvektoren. Dabei ist vor allem wichtig, durch gezielte Manipulation effiziente Antigenexpression und eine sichere Anwendung dieser Vektoren zu gewährleisten. Zwei häufig eingesetzte und bereits in der Praxis bewährte Vektorsysteme, rekombinante Vacciniaviren und Adenoviren, werden im folgenden Kapitel näher beschrieben.

Als besonders effiziente Vakzinierungsstrategie hat sich die Kombination verschiedener Impfstoffe in Initial- und Folgeimpfungen bewährt. In Hinblick auf HCV erlaubte die Kombination von DNA und rekombinantem Kanarienvirus, die kodierende Gene für mehrere HCV Proteine tragen, die Induktion zellulärer Immunantworten in der Maus (Pancholi et al. 2003). Die Verwendung von DNA-Vakzinen und rekombinanten HCV Proteinen konnte eine HCV Infektion im Schimpansen kontrollieren (Rollier et al. 2004).

### **1.3 Rekombinante Viren als Impfvektoren**

#### **1.3.1 Modifiziertes Vacciniavirus Ankara (MVA)**

Das Vacciniavirus MVA ist ein doppelsträngiges DNA-Virus und gehört zum Genus der Orthopoxviren. Es entstand als eigenständiger Virusstamm durch mehr als 570-faches Passagieren in primären Hühnerembryo-Fibroblasten, wodurch virale Gene deletiert wurden, die für die Reproduktion in Säugerzellen und Virulenz des Vacciniavirus wichtig sind (zur



Übersicht Sutter et al. 2003). MVA als Vektor verfügt über hohe Verpackungskapazität rekombinanter DNA und kann trotz seiner Replikationsdefizienz auch fremde Gene effizient in humanen Zellen exprimieren (Sutter et al. 1992).

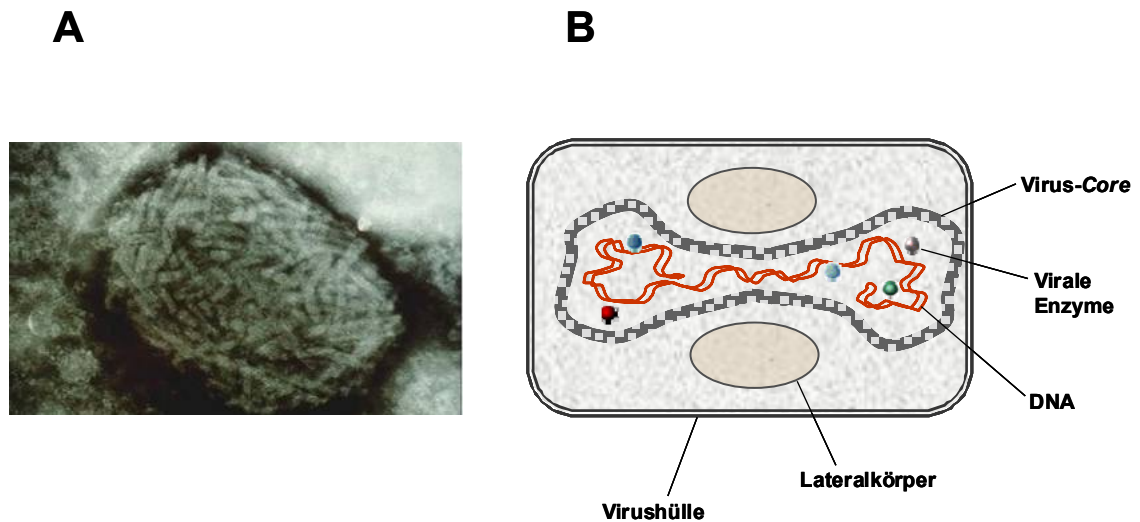


Abb.1.3.1. **Vacciniavirus.** (A) Elektronenmikroskopische Aufnahme von MVA (Bildquelle: D. Spehner und G. Sutter); (B) Vacciniavirus-Querschnitt (Schematische Darstellung frei nach (Modrow 2003)).

Durch die Attenuierung und Einschränkung des Wirtsspektrums bezüglich vieler Säugetierzellen konnte MVA ohne Komplikationen bei der Immunisierung gegen Pockenviren eingesetzt werden (Stickl et al. 1974; Earl et al. 2004; Wyatt et al. 2004). Inzwischen konnte MVA zu einem sicheren Vektorsystem entwickelt werden, das bereits in präklinischen als auch klinischen Impfstudien erfolgreich eingesetzt wurde. Die einfache Herstellung rekombinanter MVA mit Insertionen verschiedener Antigene und die hohe Immunogenität machten zusätzlich die Verwendung von MVA zur Untersuchung seiner Wirkung als Vakzine gegen Krebs und parasitäre und virale Infektionskrankheiten möglich (zur Übersicht Sutter et al. 2003; Drexler et al. 2004; Staib et al. 2004). Dabei bewährten sich oft heterologe Impfschemata mit rekombinantem MVA zur Induktion humoraler und zellulärer Immunantworten (Ramsburg et al. 2004; Hutchings et al. 2005).

In Hinblick auf Krebserkrankungen konnte in klinischen Studien durch die Impfung mit MVA, in das das Protein E2 des humanen Papillomavirus (HPV) eingesetzt wurde, eine therapeutische Wirkung gegen HPV-assoziiertes Cervixkarzinom beobachtet werden (Corona Gutierrez et al. 2002; Garcia-Hernandez E et al. 2006).

Auch bei parasitären Infektionen war es möglich, einen Impfeffekt mit rekombinantem MVA zu erzielen. So konnten Mäuse bei Belastung mit Plasmodien vor dem Ausbruch einer Malaria geschützt werden, da eine Vakzinierung mit rekombinantem MVA die CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort gegen Epitope von Plasmodien verstärken konnte (Gonzalez-Aseguinolaza et al. 2003; Anderson et al. 2004). Die Sicherheit, Immunogenität und Schutzwirkung des Vektors konnte in klinischen Versuchen auch im Menschen bestätigt werden (McConkey et al. 2003; Webster et al. 2005; Dunachie et al. 2006).

In Bezug auf virale Infektionskrankheiten beschäftigen sich einige Impfstudien mit der Evaluierung von rekombinantem MVA hinsichtlich der Wirkung gegen SIV im Tiermodell oder HIV im Menschen. So ließen sich in heterologen Immunisierungsschemata mit MVA Antikörpertiter und zytotoxische T-Zellantwort erhöhen und die Viruslast nach Infektion mit SIV in Makaken reduzieren (Vogel et al. 2003; Ramsburg et al. 2004). Die Sicherheit von MVA Vektoren ermöglichte es, eine immuntherapeutische Wirkung im Menschen zu testen, wobei festgestellt wurde, dass HIV-antigen-spezifische T-Helferzellantworten durch rekombinantes MVA verstärkt werden konnten (Cosma et al. 2003; Mwau et al. 2004; Cebere et al. 2006). Im Hinblick auf HCV erlaubte für E1/E2 rekombinantes MVA die Induktion zellulärer Immunantworten in der Maus (Abraham et al. 2004).

### 1.3.2 Rekombinante Adenoviren

Adenoviren sind doppelsträngige DNA Viren, die beim Menschen nach Eindringen über die Atemwege in 50 % der Fälle meist erkältungsähnliche Symptome oder Infektionen des Gastrointestinaltraktes hervorrufen können. Nach dem Einsatz von Adenoviren als Vakzine gegen Adenovirus-assoziierte Krankheiten konnten adenovirale Vektoren durch den Austausch von adenoviralen Strukturproteinen gegen gewünschte Gene auch für die Immuntherapie verschiedener anderer Infektionskrankheiten weiterentwickelt werden (Gray et al. 1999; Santosuosso et al. 2005). Somit entstanden immunogene Vektoren, die durch ihr breites Wirtsspektrum effektiv Gene transferieren können und durch das Auslösen humoraler, mukosaler und zellulärer Immunantworten bereits in verschiedenen Impfstudien Anwendung finden konnten (Ferreira et al. 2005). Immunisierungsversuche mit Plasmodium-Antigen produzierenden Adenoviren in Mäusen zeigten, dass durch Antigen-spezifische CD8<sup>+</sup> zelluläre und humorale Immunantworten eine parasitäre Infektion inhibiert werden konnte (Ophorst et al. 2006). Auch die Anwendung in Impfstudien gegen SIV und HIV resultierte zum einen in spezifischen Immunantworten und zum anderen in der Reduktion der Viruslast nach Belastungsinfektion in Rhesusaffen (Casimiro et al. 2005; Suh et al. 2005; Xin et al.

2005; Barratt-Boyes et al. 2006). Des Weiteren konnten rekombinante Adenoviren in Mäusen sowohl nach systemischer als auch mukosaler Vakzinierung erfolgreich gegen eine Infektion mit HSV eingesetzt werden (McDermott et al. 1989; Gallichan et al. 1998). In Bezug auf HCV fanden Adenoviren, die für Struktur- oder Nichtstrukturproteine von HCV rekombinant sind, in mehreren Studien Verwendung, um effizient zelluläre Immunantworten in Mäusen oder Rhesusaffen hervorzurufen (Matsui et al. 2003; Park et al. 2003; Rollier et al. 2005; Capone et al. 2006)

### 1.4 Modelle zur Untersuchung von Vakzinen gegen Hepatitis C

Lange Zeit war es aufgrund fehlender Zellkultursysteme und geeigneter Tiermodelle nicht möglich, detailliert die Eigenschaften von HCV zu analysieren und Therapeutika und Vakzine effizient zu testen. Nachfolgend werden *in vitro* und *in vivo* Modelle angeführt, die bisher für Untersuchungen von HCV verwendet wurden und solche, die neue Perspektiven zur Charakterisierung und dem Einsatz von Therapeutika eröffnen.

#### 1.4.1 *In vitro* Modelle

Eines der ersten erfolgreichen Amplifikationssysteme konnte mittels subgenomischer Replikons etabliert werden (Lohmann et al. 1999). Die Replikons der ersten Generation basierten auf dem HCV Genotyp 1b, dessen Strukturgene gegen Resistenzmarker ersetzt wurden. Nach Transfektion dieser RNA in Huh-7 Zellen, einer humanen Hepatomzelllinie, konnten durch Antibiotikaselektion Zellklone isoliert werden, in denen HCV RNA repliziert wurde und somit Analysen der HCV Replikation ermöglichten. Durch adaptive Mutationen der Nichtstrukturgene konnten subgenomische Replikons auch in anderen Zelllinien effizienter replizieren (Bartenschlager et al. 2004). Es bestand allerdings das Problem, dass diese Replikons meist keine infektiösen Viruspartikel produzieren konnten. Es gelang jedoch durch die Klonierung von HCV-Isolaten aus einem Patienten mit ausgeprägter Hepatitis, subgenomische Replikons herzustellen, die das gesamte Genom ohne adaptive Mutationen enthielten und in Zellkultur replizieren konnten (Kato et al. 2003). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Viruspartikel aus infizierten Huh-7 Zellen sezerniert wurden und infektiös für Schimpansen waren (Lindenbach et al. 2005; Wakita et al. 2005). Damit wird es möglich sein, in Zukunft in Zellkultur Studien bezüglich des viralen Replikationszyklusses sowie der Anwendung antiviraler Strategien durchzuführen.

### **1.4.2 *In vivo* Modelle**

Trotz der immer effizienteren Produktion von HCV Viruspartikeln in Zellkultur sind jedoch *in vivo* Studien unumgänglich, um Therapeutika im Zusammenspiel von Virus und Immunsystem eines Organismus zu testen. Bisher konnte nur der Schimpanse erfolgreich für die Untersuchung von HCV eingesetzt werden, da nur hier ein zum Menschen ähnlicher Infektions- und Krankheitsverlauf beobachtet werden konnte. Viele wichtige Informationen hinsichtlich Infektion, Replikationszyklus, Proteinfunktionen, Ausbreitung des Virus und Immunantworten gegen HCV konnten in diesem Tiermodell gewonnen werden (Rehermann et al. 2005). Da der Schimpanse jedoch ein sehr kostspieliges und - auch aus ethischen Gründen - limitiertes Tiermodell darstellt, wurden transgene Mäuse hergestellt, die Einblick in die Funktion von HCV Proteinen und im humanisierten Mausmodell (humane MHC Moleküle) die Identifizierung von HLA-A2 restringierten Epitopen von HCV ermöglichten (Shirai et al. 1995). In Mäusen, die für das Protein CORE oder HCV Polyproteine transgen sind, konnte man die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms und weiterer HCV Symptome beobachten (Fimia et al. 2003). Allerdings sind diese Gene intrinsisch und stellen daher, im Gegensatz zu einer natürlichen Infektion, ein artifizielles System dar. Gleiches gilt für „Trimer-Mäuse“, in die nach Immunsuppression zunächst Knochenmark immundefizienter Mäuse und anschließend HCV-infiziertes humanes Lebergewebe transplantiert wurde, was die Replikation von HCV in diesen Mäusen ermöglichte (Ilan et al. 2002). Dieses Modell erlaubt zwar eine Evaluierung verschiedener Agentien gegen HCV Proteine, eine Vakzinierung mit Virus-Vektoren und Analyse von Immunantworten ist aufgrund der Immunsuppression der Mäuse jedoch nicht möglich.

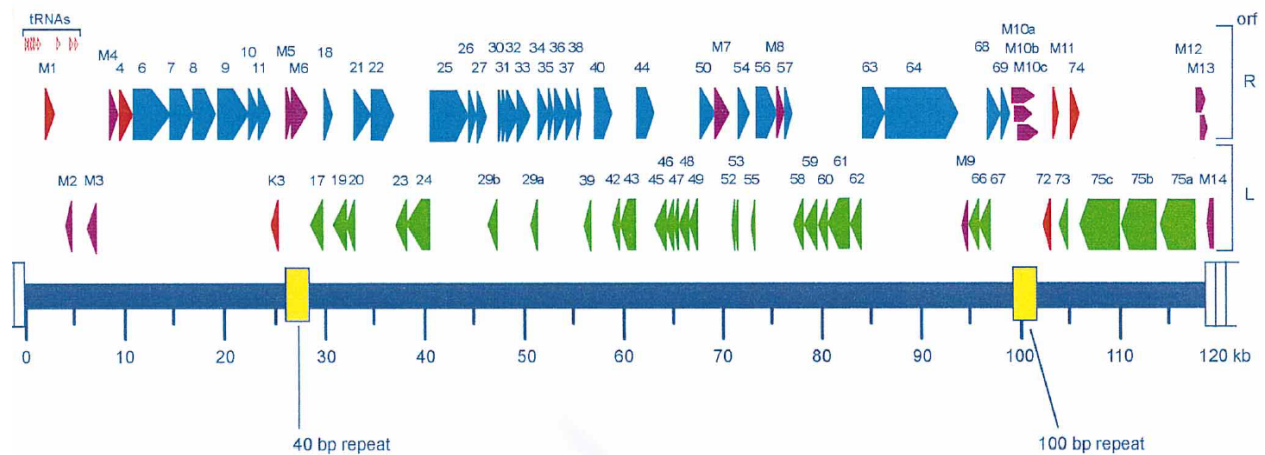
## **1.5 Das Murine Gammaherpesvirus 68 (MHV-68)**

### **1.5.1 Eigenschaften von MHV-68**

Das murine Gammaherpesvirus 68 (MHV-68) ist ein natürliches Pathogen kleiner Nagetiere, das ursprünglich aus der Rötelmaus isoliert wurde (Blaskovic et al. 1980). Es gehört, wie z.B. auch das Epstein-Barr-Virus, zu den  $\gamma$ -Herpesviren und ist ein doppelsträngiges DNA Virus von ca. 120 kbp (Efsthathiou et al. 1990). Bisher konnten ca. 73 offene Leserahmen (ORFs) identifiziert werden, die zum Teil Homologien mit anderen  $\gamma$ -Herpesviren oder mit zellulären Genen aufweisen oder MHV-68 spezifisch sind (Abb.1.5.1) (Virgin IV et al. 1997).

Bei MHV-68 kann wie auch bei anderen Herpesviren ein lytischer und latenter Infektionszyklus unterschieden werden. Während des lytischen Vermehrungszyklus erfolgt

die Replikation der DNA nach dem Prinzip des *rolling circle*, bei dem ausgehend von dem Replikationsursprung *oriLyt* ein DNA-Strang mit mehreren Einheiten des Genoms in konkatemerer Anordnung synthetisiert wird. Anschließend werden die einzelnen Genome in Viruspartikel verpackt und die Viren können durch Zellzerstörung freigesetzt und zur Neuinfektion benachbarter Zellen verbreitet werden (Modrow 1998; Deng et al. 2004).



**Abb. 1.5.1 Schematische Darstellung des Genoms von MHV-68.** Das MHV-68 Genom (blauer Balken) besitzt eine Größe von ca. 120 kb und wird von terminalen Wiederholungssequenzen flankiert (weiße Boxen). Innerhalb des Genoms befinden sich 40 bp bzw. 100 bp Wiederholungssequenzen (gelbe Boxen). Die Richtung der Pfeile zeigt die Richtung an, in der die offenen Leserahmen (ORF) transkribiert werden. Grün, blau und rot dargestellte ORFs weisen auf Homologien zu anderen  $\gamma$ -Herpesviren hin, violett dargestellte ORFs zeigen MHV-68 spezifische Gene, die mit „M“ bezeichnet werden (Virgin IV et al. 1997).

In der latenten Phase liegt das Virus-Genom als extrachromosomales Episom in mehreren Kopien in der Zelle vor. Es wird parallel zum Zellgenom durch die zelluläre DNA-Polymerase repliziert und an die Tochterzellen weitergegeben (Modrow 1998). In der latenten Phase ist die Genexpression stark reduziert, so dass latent infizierte Zellen kaum Angriffsfläche für eine antivirale Immunantwort bieten können und das Virus daher in der Zelle fortbestehen kann.

### 1.5.2 Infektionsbiologie von MHV-68

MHV-68 etabliert in der Maus nach einer anfänglichen lytischen Infektionsphase eine lebenslange chronisch-latente Infektion in verschiedenen Zelltypen. Die natürliche Infektionsroute ist bisher unbekannt, in Analogie zu anderen  $\gamma$ -Herpesviren lässt sich jedoch

eine Übertragung über den Respirationstrakt vermuten (Nash et al. 2001). Werden Mäuse intranasal mit MHV-68 infiziert, führt dies hauptsächlich in den Epithelzellen der Lunge zu einer produktiven lytischen Replikation (Sunil-Chandra et al. 1992a). Einhergehend mit einer interstitiellen Lungenentzündung erreichen die lytischen Virustiter in der Lunge zwischen Tag 5 und 7 nach Infektion ihren Höhepunkt. MHV-68 wird vor allem durch den Einfluss von Makrophagen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen innerhalb von etwa 10-12 Tagen in der Lunge eliminiert (Ehtisham et al. 1993; Weck et al. 1996), scheint aber in Epithelzellen der Lunge weiterhin zu persistieren (Stewart et al. 1998).

Ausgehend von der Lunge gelangt MHV-68 zu den mediastinalen Lymphknoten (MLN) und infiziert dort dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen (Nash et al. 2001). Schließlich erfolgt von dort aus, vermutlich vermittelt durch B-Zellen, die Etablierung einer latenten Infektion in der Milz, die etwa zwei Wochen nach der Infektion mit einer massiven Proliferation von B- und T-Zellen einhergeht und zu transienter Splenomegalie, d.h. zu einer vorübergehenden Vergrößerung der Milz, führt (Sunil-Chandra et al. 1992a; Usherwood et al. 1996a). Die Proliferation und Anzahl infizierter Zellen während der Splenomegalie ist hauptsächlich von CD4-positiven T-Zellen abhängig (Usherwood et al. 1996a). Vor allem in Gedächtnis-B-Zellen, B-Zellen der Milz, Peritonealzellen, dendritischen Zellen und Makrophagen kann später eine chronisch-latente MHV-68 Infektion nachgewiesen werden (Flano et al. 2000; Flano et al. 2002), die lebenslang in der Maus bestehen bleibt.

Besonders die genetischen und infektionsbiologischen Parallelen zu anderen  $\gamma$ -Herpesviren wie dem Epstein-Barr-Virus machen MHV-68 als Modell für die Untersuchung der Pathogenese von  $\gamma$ -Herpesviren attraktiv (Simas et al. 1998; Speck et al. 1999). Die einfache Manipulation und Herstellung rekombinanter MHV-68 durch die Einführung der BAC-Technologie eröffnen jedoch weitere Anwendungsmöglichkeiten (Adler et al. 2000). So könnte die Einführung von verschiedenen Antigenen in MHV-68 die Möglichkeit bieten, Vakzine gegen diese Antigene zu testen. Dabei sind vor allem Antigene chronisch-persistierender Viren, wie z.B. des Hepatitis C Virus, interessant, um Impfstoffe im Kontext einer chronischen Infektion in der Maus zu überprüfen, und damit die Etablierung eines Mausmodells zu ermöglichen.

### Zielsetzung

Die Entwicklung effizienter Vakzine gegen chronische Viruskrankheiten wird bisher durch das Fehlen geeigneter Kleintier-Modelle eingeschränkt.

Das murine Gammaherpesvirus 68 (MHV-68) ist ein natürliches murines Pathogen, das in der Maus sowohl eine akute als auch chronische Infektion auslöst.

Ziel dieser Arbeit war es, die Eignung rekombinanter MHV-68, in die verschiedene, zusätzliche Antigene inseriert wurden, als Testsystem für Vakzine gegen diese Antigene zu prüfen. Damit sollte ein Mausmodell etabliert werden, das unter Anwendung rekombinanter MHV-68 als Belastungsviren vor allem die Untersuchung von Vakzinen gegen chronisch-persistierende Viren, wie z.B. das Hepatitis C Virus (HCV) erlaubt.

Zur Etablierung des Systems sollte das Modell-Antigen Ovalbumin verwendet werden, um Immunisierungs- und Belastungsschemata zu entwickeln, die später eine effiziente Untersuchung von Vakzinen gegen die HCV Antigene NS3 und CORE ermöglichen sollten. Die Herstellung von MHV-68-OVA, MHV-68-NS3 und MHV-68-CORE sollte mit Hilfe der BAC-Technologie erfolgen.

Danach sollten die rekombinanten MHV-68 zunächst *in vitro* und *in vivo* charakterisiert werden, um nach Insertion der Antigene Aussagen über Expression der Proteine und Replikationsfähigkeit der Viren treffen zu können.

Nach der Immunisierung mit Antigen-spezifischen Vakzinen, die auf dem modifizierten Vacciniavirus Ankara (MVA) oder Adenoviren (Ad) basieren, sollte untersucht werden, ob durch Antigen-spezifische Immunantworten die nachfolgende Infektion mit rekombinanten MHV-68 beeinflusst werden kann. Dazu wurden zum einen spezifische Parameter der MHV-68 Infektion gemessen und zum anderen die zellulären Immunantworten durch intrazelluläre Zytokinfärbung, Tetramerfärbung und <sup>51</sup>Cr-Freisetzungs-Analysen untersucht.

Gleichzeitig sollte getestet werden, ob durch rekombinantes MHV-68 als Stimulator *in vitro* eine Amplifikation Antigen-spezifischer T-Zellen aus vakzinierten Mäusen möglich ist.

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien

| Bezeichnung                         | Bezugsquelle                               |
|-------------------------------------|--|
| <b>1 Kb DNA-Größenstandard</b>      | Invitrogen GmbH ( <i>Karlsruhe</i> )       |
| <b>2-Mercaptoethanol</b>            | Sigma ( <i>München</i> )                   |
| <b><math>\alpha</math>-MEM</b>      | Biochrom KG ( <i>Berlin</i> )              |
| <b>Agarose</b>                      | Gibco/BRL ( <i>Eggenstein</i> )            |
| <b>Ammoniumchlorid</b>              | Roth ( <i>Karlsruhe</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>Borsäure</b>                     | Roth ( <i>Karlsruhe</i> )                  |
| <b>Brefeldin A (BD Golgi Plug)</b>  | BD Pharmingen ( <i>Hamburg</i> )           |
| <b>Bromphenolblau</b>               | Serva ( <i>Heidelberg</i> )                |
| <b>Carboxymethylzellulose</b>       | Sigma ( <i>München</i> )                   |
| <b>Chloramphenicol</b>              | Appligene Oncor                            |
| <b>Chloroform</b>                   | Merck ( <i>Darmstadt</i> )                 |
| <b>D(+)-Glucose</b>                 | Merck ( <i>Darmstadt</i> )                 |
| <b>Desoxyribonukleotide</b>         | Roche ( <i>Mannheim</i> )                  |
| <b>DMSO</b>                         | Merck ( <i>Darmstadt</i> )                 |
| <b>Dulbeccos-MEM High Glucose</b>   | Cell Concepts GmbH ( <i>Umkirch</i> )      |
| <b>EDTA</b>                         | Sigma ( <i>München</i> )                   |
| <b>EMA</b>                          | Invitrogen GmbH ( <i>Karlsruhe</i> )       |
| <b>Ethanol</b>                      | Merck ( <i>Darmstadt</i> )                 |



|  |   |
|--|---|
| <b>Ethidiumbromid</b>  | Serva ( <i>Heidelberg</i> )   |
| <b>FBS (<i>Fetal Bovine Serum</i>)</b>                             | Biochrom KG ( <i>Berlin</i> )   |
| <b>Formaldehyd</b>   | Merck ( <i>Darmstadt</i> )  |
| <b>G418</b>  | Calbiochem ( <i>Schwalbach</i> )  |
| <b>Glyzerin</b>  | Roth ( <i>Karlsruhe</i> )   |
| <b>Glasgow MEM</b>   | Biochrom KG ( <i>Berlin</i> )   |
| <b>Hepes</b>   | ICN Biomedicals ( <i>Ohio</i> )   |
| <b>Isoamylalkohol</b>  | Merck ( <i>Darmstadt</i> )  |
| <b>Isopropanol</b>   | Merck ( <i>Darmstadt</i> )  |
| <b>Kalium-Hydrogencarbonat</b>                                     | Roth ( <i>Karlsruhe</i> )   |
| <b>Kalziumchlorid</b>  | Roth ( <i>Karlsruhe</i> )   |
| <b>Kanamycin</b>   | BioGene ( <i>Cambridge</i> )  |
| <b>Kristallviolett</b>   | Merck ( <i>Darmstadt</i> )  |
| <b>L-Glutamin</b>  | Serva ( <i>Heidelberg</i> )   |
| <b>Magermilchpulver</b>  | Töpfer ( <i>Dietmannsried</i> )   |
| <b>Natriumazid</b>   | Merck ( <i>Darmstadt</i> )  |
| <b>Natriumbicarbonat</b>   | Merck ( <i>Darmstadt</i> )  |
| <b>NaOH</b>  | Merck ( <i>Darmstadt</i> )  |
| <b>N,N'-Bisacrylamid</b>   | Serva ( <i>Heidelberg</i> )   |
| <b>Nomidet P-40 (NP-40)</b>  | Serva ( <i>Heidelberg</i> )   |
| <b>Pen-Strep</b><br>(10000 u Penicillin/ml, 10 mg/ml Streptomycin) | Cambrex, BioWhittaker ( <i>Verviers, Belgien</i> )<br>Gibco/BRL ( <i>Eggenstein</i> ) |
| <b>Phenol/Chloroform</b>   | Roth ( <i>Karlsruhe</i> )   |
| <b>PMSF</b>  | Sigma ( <i>München</i> )  |
| <b>Protein-Größenstandard</b><br>„BroadRange“ (6-175 kDa)          | New England BioLabs ( <i>Schwalbach</i> )   |

|                                 |                                 |
|---------------------------------|---------------------------------|
| <b>RPMI 1640 (1x)</b>           | Biochrom KG ( <i>Berlin</i> )   |
| <b>SDS</b>                      | Serva ( <i>Heidelberg</i> )     |
| <b>Sucrose</b>                  | Roth ( <i>Karlsruhe</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>Trypsin-EDTA</b>             | Biochrom KG ( <i>Berlin</i> )   |
| <b>Tryptose Phosphate Broth</b> | Biochrom KG ( <i>Berlin</i> )   |
| <b>Tween 20</b>                 | Sigma ( <i>München</i> )        |
| <b>Yeast Extract</b>            | Gibco/BRL ( <i>Eggenstein</i> ) |

## 2.2 Puffer und Lösungen

| Bezeichnung                           | Zusammensetzung   |
|---------------------------------------|---|
| <b>DNA-Probenpuffer (5x)</b>          | 50 % TE<br>50 % Glycerin<br>0,04 % Bromphenolblau                                   |
| <b>Erythrozyten-Lysepuffer pH 7,2</b> | 0,15 M NH <sub>4</sub> Cl<br>10 mM KHCO <sub>3</sub><br>0,1 mM Na <sub>2</sub> EDTA |
| <b>FACS-Puffer</b>                    | PBS-Puffer pH 7,4<br>1 % FBS<br>0,02 % NaN <sub>3</sub>                             |
| <b>Impfstoffpuffer</b>                | PBS   |
| <b>Kristallviolett-Färbelösung</b>    | 10% Formaldehyd in PBS<br>1% Kristallviolett  |
| <b>NP40-Zellysepuffer</b>             | 50 mM Tris pH 7,5<br>0,15 M NaCl<br>1,0 % NP-40<br>0,1 % SDS                        |

|   |   |
|---|---|
| <b>Overlay-Medium</b>                         | 10x BHK-Medium<br>0,75% Carboxymethylzellulose<br>5% FBS<br>5% TPB<br>1% Pen/Strep<br>2 mM L-Glutamin<br>33 mM NaHCO <sub>3</sub> |
| <b>PBS-Puffer pH 7,4</b>                      | 0,14 M NaCl<br>2,7 mM KCl<br>3,2 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                    |
| <b>4% Sammelgel</b>                           | 4% Acrylamid<br>1x Sammelgelpuffer<br>0,1% APS<br>0,1% TEMED  |
| <b>4x Sammelgelpuffer</b>                     | 0,5 M Tris/HCL pH 6,8<br>0,4 % SDS  |
| <b>SDS-PAGE-Laufpuffer (10x) pH 8,3</b>       | 25 mM Tris<br>192 mM Glycin<br>0,1 % SDS  |
| <b>SDS-PAGE-Probenpuffer (5x)</b>             | 250 mM Tris pH 6,8<br>10 % SDS<br>0,5 % Bromphenolblau<br>12,5 % 2-Mercaptoethanol<br>20 % Glyzerin                               |
| <b><i>Southern Blot</i>-Fixationspuffer</b>   | 0,25 M HCl  |
| <b><i>Southern Blot</i>-Hybridisierlösung</b> | 0,25 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>7,0 % SDS  |
| <b><i>Southern Blot</i>-Transferpuffer</b>    | 0,4 M NaOH<br>0,6 M NaCl  |
| <b><i>Southern Blot</i>-Waschpuffer 1</b>     | 20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>5,0 % SDS   |
| <b><i>Southern Blot</i>-Waschpuffer 2</b>     | 20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>1,0 % SDS   |
| <b>SSC (10x) pH 7,5</b>                       | 1,5 M NaCl<br>0,15 M Na-Citrat  |
| <b>TAE-Puffer pH 7,8</b>                      | 40 mM Tris/HCl pH 8,0<br>1 mM EDTA<br>20 mM Natriumacetat   |
| <b>TBE-Puffer (10x) pH 8,3</b>                | 1M Tris<br>830 mM Borsäure<br>10 mM EDTA  |
| <b>TBS-Puffer (10x) pH 7,4</b>                | 200 mM Tris<br>9% NaCl  |

|   |  |
|---|--|
| <b>TE-Puffer</b>                          | 10 mM Tris/HCl<br>0,1 mM EDTA pH 8,0                         |
| <b>12% Trenngel</b>                       | 12% Acrylamid<br>4x Trenngelpuffer<br>0,1% APS<br>0,1% TEMED |
| <b>4x Trenngelpuffer</b>                  | 1,5 M Tris/HCl pH 8,8<br>0,4% SDS                            |
| <b>Western Blot-Transferpuffer pH 8,3</b> | 1x SDS-PAGE Laufpuffer<br>20 % MeOH                          |
| <b>Western Blot-Waschpuffer</b>           | TBS-Puffer pH 7,4<br>0,05 % Tween 20                         |

## 2.3 Nährmedien

### 2.3.1 Nährmedien für Bakterien

| Bezeichnung   | Zusammensetzung  |
|---|--|
| <b>LB-Agar</b>  | LB-Medium mit 1,5 % Agar   |
| <b>LB-Medium</b>  | 1 % Caseinextrakt<br>0,5 % Yeast Extrakt<br>0,5 % NaCl<br>0,1 % Glukose pH 7,0 |
| <b>LB-Medium bzw. LB-Agar</b><br>+Amp oder<br>+Cam oder<br>+Kan | LB-Medium<br>100 µg/ml<br>13,6 µg/ml<br>50 µg/ml                               |

### 2.3.2 Nährmedien für eukaryontische Zellen

| Bezeichnung           | Zusammensetzung   |
|-----------------------|---|
| <b>BHK-21-Medium</b>  | Glasgow-MEM<br>5 % FBS (bei 56°C hitzeinaktiviert)<br>5% TPB<br>1 % Pen-Strep |
| <b>Einfriermedium</b> | 90 % FBS (bei 56°C hitzeinaktiviert)<br>10 % DMSO                             |
| <b>NIH3T3-Medium</b>  | DMEM<br>10 % BSA<br>1 % Pen/Strep<br>1% L-Glutamin                            |

|                       |   |
|-----------------------|---|
| <b>MC3T3-Medium</b>   | α-MEM<br>20% FBS<br>1% Pen/Strep<br>1% L-Glutamin           |
| <b>REF/Cre-Medium</b> | DMEM<br>10% FBS<br>1% Pen/Strep<br>1% L-Glutamin<br>1% G418 |
| <b>T-Zell-Medium</b>  | RPMI 1640<br>10% FBS<br>1% Pen/Strep                        |

## 2.4 Verbrauchsmaterialien

| Bezeichnung  | Bezugsquelle   |
|--|--|
| <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><i>Falcon</i>-Röhrchen (15 ml, 50 ml)</b>   | BD Biosciences ( <i>Bedford, USA</i> )                     |
| <b>Injektionskanülen (27G 3/4) <i>Sterican 100</i><br/>(20G x 1-1/2-Kanüle) <i>Eco Lab</i></b> | Braun ( <i>Melsungen</i> )<br>NeoLab ( <i>Heidelberg</i> ) |
| <b>Injektionsspritzen (<i>Omnifix-F 1 ml, 5 ml, 20 ml</i>)</b>                                 | Braun ( <i>Melsungen</i> )                                 |
| <b>Kryoröhrchen „<i>Cryo Tube Vials</i>“</b>   | Nunc ( <i>Wiesbaden</i> )                                  |
| <b>Nitrozellulosefilter</b>  | Schleicher & Schuell ( <i>Dassel</i> )                     |
| <b>Nitrozellulosemembran (0,2 µm) <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 µm</i>)</b>  | Sartorius AG ( <i>Göttingen</i> )                          |

|   |   |
|---|---|
| <b>TopCount Mikroplatten 96-well</b>                | Packard (Downers Grove)   |
| <b>Ultrazentrifugenröhrchen (<i>UltraClear</i>)</b> | Beckman ( <i>München</i> )  |
| <b>Zellkulturplatten / -flaschen</b>                | Greiner ( <i>Nürtingen</i> ),<br>Corning Inc. ( <i>New York, USA</i> )<br>Nunc ( <i>Wiesbaden</i> ) |
| <b>Zellschaber</b>                                  | Corning Inc. ( <i>New York, USA</i> )   |
| <b>Zellsiebe (<i>Falcon 40 µm</i>)</b>              | BD Biosciences ( <i>Bedford, USA</i> )  |

## 2.5 Kommerzielle Reaktionssätze

| Bezeichnung  | Bezugsquelle                             |
|--|--|
| <b>Amersham Gel Extraction Kit</b>                           | Amersham Biosciences ( <i>Freiburg</i> ) |
| <b>Amersham Miniprep Kit</b>                                 | Amersham Biosciences ( <i>Freiburg</i> ) |
| <b>BD Cytotfix/Cytoperm</b>                                  | BD Pharmingen ( <i>Hamburg</i> )         |
| <b>DIG DNA Labelling Kit</b>                                 | Roche (Mannheim)                         |
| <b>First strand cDNA Synthesis for RT-PCR</b>                | Roche (Mannheim)                         |
| <b>FuGENE 6<sup>®</sup> Transfektions-Reagenz</b>            | Roche (Mannheim)                         |
| <b>Lumi-Light<sup>®</sup> (<i>Western Blot Substrat</i>)</b> | Roche (Mannheim)                         |
| <b>Nucleobond PC 500 Maxi-Prep</b>                           | Macherey-Nagel ( <i>Düren</i> )          |
| <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>QIAGEN Superfect Transfection Kit</b>                     | QIAGEN (Hilden)                          |

## 2.6 Plasmide

| Bezeichnung                | Bezugsquelle                                    |
|----------------------------|---|
| <b>pcDNA1-<i>ns3</i></b>   | (Staib et al. 2000)                             |
| <b>pcDNA1-<i>core</i></b>  | Im Labor vorhanden, unveröffentlicht (C. Staib) |
| <b>pMCMV4</b>              | M. Messerle                                     |
| <b>pMCMV4-<i>ova</i></b>   | Im Labor vorhanden                              |
| <b>pST76K-SR-M1/M2-UCR</b> | M. Messerle                                     |

## 2.7 Synthetische Oligonukleotide (Primer)

| Bezeichnung | Länge (bp) | Sequenz                               | Hybridisierungstemperatur (°C) | Verwendungszweck  |
|-------------|------------|---------------------------------------|--------------------------------|---|
| HCVcore fw  | 24         | 5'-GGC CCT GCA GAT GAG CAC AAA TCC-3' | 37                             | Primer 1 zur Klonierung von <i>core</i> : Amplifikation des Gens aus dem Plasmid pcDNA1-core unter Insertion der Restriktionsschnittstelle <b>PstI</b>  |
| HCVcore bw  | 24         | 5'-CCG GGG ATC CTT AAG CCG AAG CTG-3' | 37                             | Primer 2 zur Klonierung von <i>core</i> : Amplifikation des Gens aus dem Plasmid pcDNA1-core unter Insertion der Restriktionsschnittstelle <b>BamHI</b> |
| core-fw-seq | 15         | 5'-GCA GGA TGG CTC CTG-3'             | 55                             | Primer 1 zur Sequenzierung von <i>core</i>  |
| core-bw-seq | 16         | 5'-CCA ACT AGG CCG AGA G-3'           | 55                             | Primer 2 zur Sequenzierung von <i>core</i>  |
| ns3-fw-seq  | 16         | 5'-CAC CGT GCC CCA AGA C-3'           | 55                             | Primer 1 zur Sequenzierung von <i>ns3</i>   |
| ns3-bw-seq  | 15         | 5'-CTG TGA AGA CCG GAG-3'             | 55                             | Primer 2 zur Sequenzierung von <i>ns3</i>   |
| ns3 III     | 17         | 5'-GTG GAC CAC TGC TTT GC-3'          | 53                             | Primer 3 zur Sequenzierung von <i>ns3</i> ;<br>Primer 1 zum Nachweis von ns3 cDNA   |
| ns3 IV      | 15         | 5'-GAT GCC ACT CCT GCC-3'             | 53                             | Primer 4 zur Sequenzierung von <i>ns3</i> ;<br>Primer 2 zum Nachweis von ns3 cDNA   |



## 2.8 Synthetische Oligopeptide

| Kurzbezeichnung | Aminosäuresequenz | Ursprung            |
|-----------------|-------------------|---------------------|
| <b>β-Gal</b>    | ICPMYARV          | β-Galaktosidase     |
| <b>SIN</b>      | SIINFEKL          | Hühner-Ovalbumin    |
| <b>NS3</b>      | LGAVQNEITLTHPIT   | NS3 Protein von HCV |

## 2.9 Enzyme

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

## 2.10 Antikörper

| Antikörperspezifität                            | Konjugat   | Isotyp                    | Verwendungszweck  | Bezugsquelle            |
|---|------------|---------------------------|---|-------------------------|
| <b>Anti-OVA (monoklonal)</b>                    | -          | Maus                      | Primärantikörper zur Detektion von OVA (siehe 3.3.2)          | C. Staib                |
| <b>Anti-HCV (polyklonal)</b>                    | -          | Kaninchen                 | Primärantikörper zur Detektion von CORE und NS3 (siehe 3.3.2) | C. Staib                |
| <b>Anti-Mouse CD16/CD32 (monoklonal)</b>        | -          | Rat IgG <sub>2b</sub>     | F <sub>c</sub> -Block (siehe 3.6.6 und 3.6.7)                 | BD Pharmingen (Hamburg) |
| <b>Anti-Mouse CD4 (monoklonal)</b>              | APC        | Rat IgG <sub>2a</sub> , κ | FACS-Färbung (siehe 3.6.6 und 3.6.7)                          | BD Pharmingen (Hamburg) |
| <b>Anti-Mouse CD4 (monoklonal)</b>              | PerCP      | Rat IgG <sub>2a</sub> , κ | FACS-Färbung (siehe 3.6.6 und 3.6.7)                          | BD Pharmingen (Hamburg) |
| <b>Anti-Mouse CD8a (monoklonal)</b>             | PE         | Rat IgG <sub>2a</sub> , κ | FACS-Färbung (siehe 3.6.6 und 3.6.7)                          | BD Pharmingen (Hamburg) |
| <b>Anti-Mouse CD8a</b>                          | FITC       | Rat IgG <sub>2a</sub> , κ | Tetramer-Färbung (siehe 3.6.7)                                | Caltag                  |
| <b>Anti-Mouse CD62L (monoklonal)</b>            | APC        | Rat IgG <sub>2a</sub> , κ | FACS-Färbung (siehe 3.6.6 und 3.6.7)                          | 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  | 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) |

## 2.11 Viren

| Bezeichnung                      | Beschreibung                             |
|----------------------------------|--|
| <b>Adenovirus-CORE (Ad-CORE)</b> | Gen für HCV CORE inseriert in Adenovirus |
| <b>Adenovirus-NS3 (Ad-NS3)</b>   | Gen für HCV NS3 inseriert in Adenovirus  |

|  |   |
|--|---|
| <b>MHV-68-WT*</b>  | Murines Gammaherpesvirus 68 rekonstituiert aus als BAC kloniertem MHV-68 (Adler et al. 2001)              |
| <b>MHV-68-CORE</b>   | Gen für HCV CORE inseriert in MHV-68  |
| <b>MHV-68-NS3</b>  | Gen für HCV NS3 inseriert in MHV-68   |
| <b>MHV-68-OVA</b>  | Gen für Hühner-Ovalbumin inseriert in MHV-68  |
| <b>Modifiziertes Vacciniavirus Ankara MVA-II<sub>new</sub> (MVA (Wildtyp))</b> | Wildtypvirus basierend auf MVA-F6 (Staib et al. 2003)<br>Virus stand im Labor bereits zur Verfügung       |
| <b>MVA-OVA</b>   | Gen für Hühner-Ovalbumin inseriert in MVA-II <sub>new</sub><br>Virus stand im Labor bereits zur Verfügung |
| <b>MVA-NS3</b>   | Gen für HCV NS3 inseriert in MVA-II <sub>new</sub><br>Virus stand im Labor bereits zur Verfügung          |
| <b>MVA-CORE</b>  | Gen für HCV CORE inseriert in MVA-II <sub>new</sub><br>Virus stand im Labor bereits zur Verfügung         |

## 2.12 Organismen

### 2.12.1 Bakterien

| Bakterienstamm             | Genotyp   | Bezugsquelle                   |
|----------------------------|---|--------------------------------|
| <b><i>E.coli</i> DH10B</b> | F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) F80 <i>lacZ</i> ΔM15<br><i>lacX74 recA1 endA1 araΔ139</i> Δ ( <i>ara, leu</i> )7697 <i>galU</i><br><i>galK</i> Δ- <i>rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>nupG</i> | Invitrogen GmbH<br>(Karlsruhe) |

### 2.12.2 Eukaryontische Zellen

| Zelllinie     | Beschreibung                    | Bezugsnummer  |
|---------------|---------------------------------|---------------|
| <b>BHK-21</b> | Hamsternieren-Fibroblasten      | ATCC CCL-10   |
| <b>NIH3T3</b> | Swiss-Mausembryo-Fibroblasten   | ATCC CRL-1658 |
| <b>MC3T3</b>  | C57BL/6 Mausembryo-Fibroblasten | DSMZ ACC 210  |

|                      |   |      |
|----------------------|---|------|
| <b>REF/Cre</b>       | Rattenembryo-Fibroblasten stabil mit Cre-Rekombinase transfiziert | ATCC |
| <b>T-Lymphozyten</b> | Primäre murine Lymphozyten  |      |

### 2.12.3 Mäuse

Für alle Tierexperimente wurden ausschließlich C57BL/6 Mäuse von Charles River (*Sulzfeld*) verwendet.

### 2.13 Geräteliste

| Gerätebezeichnung                         | Modell / Typ                             | Bezugsquelle  |
|---|--|---|
| <b>Blockthermostat</b>                    | BT 1302                                  | HLC BioTech ( <i>Bovenden</i> )   |
| <b>Elektrotransformator</b>               | <i>E. coli</i> Pulser                    | Bio-Rad ( <i>München</i> )  |
| <b>Fluoreszenzdurchflusszytometer</b>     | FacsCALIBUR<br>FacsCANTO                 | BD Biosciences ( <i>Heidelberg</i> )  |
| <b>Gefrierschrank (-20°C)</b>             | Comfort                                  | Liebherr ( <i>Ochsenhausen</i> )  |
| <b>Gefrierschrank (-80°C)</b>             | Ult 2090                                 | Revco ( <i>Asheville, USA</i> )   |
| <b>Geigerzähler (beta-gamma-Detektor)</b> | LB 122                                   | Berthold ( <i>Bad Wildbad</i> )   |
| <b>Gel-Analysegerät</b>                   | Gel Doc 2000                             | Bio-Rad ( <i>München</i> )  |
| <b>Glaskugeln (Ø 1mm)</b>                 |  | Roth ( <i>Karlsruhe</i> )   |
| <b>Hämatocytometer</b>                    | Neubauer Zählkammer                      | Karl Hecht KG ( <i>Sondheim</i> )   |
| <b>Inkubationsschüttler</b>               | Innova 4430                              | New Brunswick Scientific ( <i>Nürtingen</i> )                                     |
| <b>Kühlschrank (4 °C)</b>                 | UT6-K                                    | Bauknecht ( <i>Stuttgart</i> )  |
| <b>Magnetrührer</b>                       | Ikamag Reo                               | IKA Werke ( <i>Staufen</i> )  |
| <b>Mehrkanalpipetten</b>                  | Transferpette-12 (20-200)<br>Calibra 852 | Brand ( <i>Wertheim</i> )<br>Socorex ( <i>Ecublens, Schweiz</i> )                 |
| <b>Mikropipetten</b>                      | Pipetman P10-1000                        | Gilson ( <i>Middleton, USA</i> )  |
| <b>Mikroskope</b>                         | Optech Biostar B5<br>Axiovert 25         | Binder Labortechnik ( <i>Herbertshausen</i> )<br>Carl Zeiss ( <i>Oberkochen</i> ) |

|  |   |  |
|--|---|--|
| <b>Mikrowellenherd</b>                           | 900W  | Siemens ( <i>München</i> )                               |
| <b>Minipistill für 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen</b> |   | Roth ( <i>Karlsruhe</i> )                                |
| <b>Netzgeräte</b>                                | Model 200 / 2.0<br>PowerPac 300                 | Bio-Rad ( <i>München</i> )<br>Bio-Rad ( <i>München</i> ) |
| <b>PCR-Gerät</b>                                 | GeneAmp 2400<br>GeneAmp 2700                    | Perkin Elmer ( <i>Rodgau</i> )                           |
| <b>pH-Meter</b>                                  | InoLab pH Level 1                               | WTW GmbH ( <i>Weilheim</i> )                             |
| <b>Pipettierhilfe</b>                            | Pipetus-akku                                    | Hirschmann ( <i>Eberstadt</i> )                          |
| <b>Spektralphotometer</b>                        | Cary 50 Bio<br>Gene Quant II                    | Varian ( <i>Darmstadt</i> )<br>Pharmacia Biotech         |
| <b>Sterilbank</b>                                | HERAsafe HS 12                                  | Heraeus ( <i>Hanau</i> )                                 |
| <b>Strahlungsmessgerät</b>                       | TopCount NXT                                    | Packard ( <i>Downers Grove</i> )                         |
| <b>Thermoschüttler</b>                           | Thermomixer 5436                                | Eppendorf ( <i>Hamburg</i> )                             |
| <b>Ultraschallgerät</b>                          | Sonopuls HD200<br>Schallspitzen: TS73,<br>UW200 | Bandelin ( <i>Berlin</i> )                               |
| <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<br>( <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)

SigmaPlot 9.0

EndNote Program 9

## 3 Methoden

### 3.1 Bakteriologische Methoden

#### 3.1.1 Kultivierung von Bakterien

Die Anzucht der Bakterien zur Herstellung transformationskompetenter Zellen (siehe 3.1.3) oder zur Isolation von DNA (siehe 3.2.1) erfolgte in antibiotikumhaltigem LB-Flüssigmedium über Nacht im Schüttler bei der jeweils erforderlichen Temperatur. Um Einzelkolonien zu erhalten wurden antibiotikumhaltige LB-Agar-Platten verwendet, die ebenfalls über Nacht bei entsprechenden Temperaturen inkubiert wurden.

#### 3.1.2 Kryokonservierung prokaryontischer Zellen (Glyzerinkultur)

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 transformationskompetenter Bakterien

##### 3.1.3.1 Herstellung elektrokompenter Bakterien

Zur Herstellung elektrokompenter Bakterien wurden die *E. coli*-Stämme wie in Tabelle 2.12.1 eingesetzt.

5 ml einer ÜN-Kultur, angeimpft aus einer Einzelkolonie oder Glyzerinkultur, 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 0,5-0,7. Die Bakteriensuspension wurde in einem Eisbad für 20 min abgekühlt und die Bakterien anschließend bei 3500 Upm (4°C, 20 min) pelletiert (Zentrifuge Avanti J-25, Rotor JA-10, Beckman), jeweils 1x in 250 ml eisgekühltem ddH<sub>2</sub>O bzw. 200 ml kaltem 0,2 mM HEPES gewaschen und in 10 ml 15% Glycerinlösung resuspendiert. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 3500 Upm (4°C, 20 min) wurden die Bakterien in 4-5 ml eisgekühlter 10% Glycerinlösung aufgenommen und sofort in Aliquots von 50 µl in 0,5 ml-Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

### **3.1.3.2 Herstellung chemischkompetenter Bakterien**

Für die Erzeugung chemischkompetenter Bakterien wurden die Zellen zunächst wie in 3.1.3.1 beschrieben bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,5-0,7 angezchtet. Abkühlung auf Eis und Zentrifugation erfolgten ebenfalls wie in 3.1.3.1. Nach Resuspendierung des Bakterienpellets in 20 ml eiskaltem 0,1 M  $CaCl_2$  folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (3500 Upm, 20 min, 4°C) und die Aufnahme der Zellen in 4 ml kaltem 0,1 M  $CaCl_2$ . Die Bakterien wurden erneut pelletiert, in 2 ml kalter 10%-iger Glycerinlösung resuspendiert und sofort in 50 µl Aliquots bei -80°C eingefroren. Die Bakterien wurden bei -80°C gelagert.

### **3.1.4 Transformation von Bakterien**

#### **3.1.4.1 Elektrotransformation von Bakterien**

Die elektrokompenten Bakterienzellen (50 µl) wurden 10 min auf Eis aufgetaut und anschließend 1 min mit 1-5 ng Plasmid-DNA oder 10 µl Ligationsansatz inkubiert. Die Transformation der Zellsuspension erfolgte in einer Elektrotransformationsküvette (Ø 2 mm) bei 2,5 kV, 200 Ω und 25 µF (*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 antibiotikumhaltigen LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die erhaltenen Einzelkolonien wurden auf die transformierte DNA durch Plasmidisolierung (siehe 3.2.1) und Restriktionsverdau (siehe 3.2.7.1) untersucht.

#### **3.1.4.2 Hitzeschocktransformation von Bakterien**

Neben Elektroschock können Bakterien auch durch Temperaturerhöhung für die Aufnahme von DNA sensitiv gemacht werden. 50 µl chemisch kompetenter *E.coli* Bakterien wurden dazu auf Eis aufgetaut, 20 min mit 1-5 ng Plasmid-DNA oder 10 µl Ligationsansatz inkubiert und anschließend bei 42°C für 2 min transformiert. Nach 1 min Abkühlung auf Eis wurden die Bakterien nach Zugabe von 1 ml LB-Medium bei 30°C oder 37°C 1,5 bis 2 h geschüttelt, auf LB-Agar-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 30°C bzw. 37°C inkubiert. Die Analyse der erhaltenen Einzelkolonien erfolgte durch Plasmidisolierung (siehe 3.2.1) und Restriktionsverdau (siehe 3.2.7.1).



### 3.1.5 Shuttle Mutagenese

Bei der so genannten Shuttle-Mutagenese wird das Shuttle Plasmid pST76K-SR-M1/M2-UCR, in das zuvor die gewünschten Sequenzen kloniert wurden, mittels Elektrotransformation (siehe 3.1.3.1) in *E.coli* Bakterien eingebracht, die ein Wildtyp- oder rekombinantes BAC-MHV-68 Genom tragen. Durch verschiedene Selektionsschritte auf antibiotikumhaltigen LB-Agar-Platten kann so eine homologe Rekombination (möglich durch das *recA* Genprodukt des Shuttle-Plasmids) zur Einführung des gewünschten Gens in das BAC-MHV-68 Genom erfolgen. Dazu wurden die *E.coli* Bakterien mit dem Shuttle-Plasmid transformiert, nach in Tabelle 3.1.5 aufgeführter Reihenfolge ausgestrichen und über Nacht bei jeweiliger Temperatur inkubiert:

| Antibiotikum auf LB-Agar-Platten | Temperatur | Ziel  |
|----------------------------------|------------|---|
| Kan/Cam                          | 30°C       | Bildung von Cointegraten zwischen Shuttle Plasmid (Kan-Resistenz) und BAC-MHV-68 Genom (Cam-Resistenz) durch erste homologe Rekombination |
| Kan/Cam                          | 43°C       | Selektion gegen temperatursensitives Shuttle-Plasmid, Selektion auf Cointegrate   |
| Cam                              | 37°C       | Auflösung von Cointegraten durch zweite homologe Rekombination, Entstehung von für das gewünschte Gen rekombinantem BAC-MHV-68 Genom      |
| Cam/Saccharose                   | 30°C       | Selektion gegen Cointegrate, SacB- Gen des Shuttle-Plasmids verhindert Bakterienwachstum auf Saccharose                                   |

**Tab. 3.1.5 Arbeitsschritte zur Durchführung einer Shuttle-Mutagenese.**

Anschließend wurde bei 37°C eine Parallelinkubation von Einzelkolonien auf Kan- und zusätzlich auf Cam-LB-Agar-Platten durchgeführt. Für eine Analyse durch BAC-Plasmidisolierung (siehe 3.2.1.2) und nachfolgender Restriktion (siehe 3.2.7.1) wurden nur

Einzelkolonien verwendet, die auf Cam- und nicht auf Kan-LB-Agar-Platten angezüchtet werden konnten. Nur so kann ausgeschlossen werden, dass sich noch Cointegrate in den Bakterien befinden.

### 3.2 Molekularbiologische Methoden

#### 3.2.1 Plasmidisolierung

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*-Zellen beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse der Zellen durch einen SDS-haltigem Puffer. Die chromosomale DNA sowie Proteine können hierbei durch Zentrifugation abgetrennt und die Plasmid-DNA dann durch Fällung isoliert werden. Bei der Verwendung von Kits wird die Plasmid-DNA über Ionenaustauschersäulen mit einer Silikatgel- bzw. DEAE-Matrix aufgrund der Bindung von negativ geladenen Phosphatgruppen von den restlichen Bestandteilen des Bakterienlysats getrennt.

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

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 erfolgte die Abtrennung der Plasmid-DNA durch Bindung an die Matrix kleiner Säulen.

Es wurden 3 ml antibiotikumhaltiges LB-Medium mit der Bakterienkultur angeimpft und über Nacht im Schüttler bei 200 Upm 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.

##### 3.2.1.2 BAC-Plasmidisolierung im analytischen Maßstab

BAC-Plasmide wurden ebenfalls nach dem Prinzip der alkalischen Lyse gewonnen, müssen jedoch aufgrund ihrer Größe vorsichtig, d.h. mit abgeschnittenen Pipettenspitzen, behandelt werden, um eine Zerstörung der Plasmide durch Scherkräfte zu verhindern. Für die Isolierung wurden 10 ml LB-Cam-Medium mit Bakterienkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C und 180 Upm inkubiert. 9 ml dieser Kultur wurden bei 3500 Upm 10 min zentrifugiert und das Bakterienpellet mit den Puffern 1-3 des *Qiagen* Plasmid Maxi Kits behandelt (200 µl P1, 300 µl P2, 300 µl P3). Nach Abtrennung chromosomaler DNA und Proteinen durch Zentrifugation

erfolgte die Plasmid-Gewinnung allerdings über Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanolpräzipitation statt durch Aufreinigung über eine Säule. Die BAC-Plasmid-DNA wurde in 100 µl TE + Rnase (1 µg/ml) gelöst.

### **3.2.1.3 Isolierung von Plasmiden und BAC-Vektoren im präparativen Maßstab (Maxi-Präparation)**

Die DNA-Gewinnung im größeren Maßstab erfolgte mit Hilfe des *QIAGEN* Plasmid Maxi Kits bzw. mit dem *Nucleobond* Kit bei BAC-Plasmiden. Hierfür wurden 200 ml (bei BAC-Plasmiden 500 ml) antibiotikumhaltiges LB-Medium mit 1 ml einer Bakterien-Vorkultur angeimpft und über Nacht im Schüttler (150 Upm) inkubiert. Gereinigt wurde durch Anionenaustauscher-Säulen unter Verwendung der mitgelieferten Wasch- und Elutionspuffer. Durch anschließende Fällung mit Isopropanol konnte die DNA aufkonzentriert und in 200 µl ddH<sub>2</sub>O oder TE-Puffer gelöst werden.

### **3.2.2 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 komplementäre Sequenz des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts und die Synthese (Elongation, ca. 1000 bp/min) des neuen DNA-Strangs in 5'-3' Richtung durch eine hitzebeständige DNA-Polymerase. Über die Primer (siehe 2.7) ist es möglich kurze DNA-Sequenzen, z.B. Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen, einzuführen.

#### **3.2.2.1 Analytische PCR**

Zum Nachweis bestimmter DNA-Sequenzen mittels analytischer PCR wurden die einzelnen Komponenten in folgenden Endkonzentrationen eingesetzt:

PCR-Ansatz:

|                                    |           |
|------------------------------------|-----------|
| DNA                                | 50µg      |
| 10x Platinum Taq Polymerase Puffer | 1x        |
| Primer 1                           | 0,05 µmol |
| Primer 2                           | 0,05 µmol |
| MgCl <sub>2</sub>                  | 1,5 mM    |
| dNTPs                              | 0,2 mM    |
| Platinum Taq Polymerase            | 1 Unit    |
| ddH <sub>2</sub> O ad 20 µl        |           |

Als Negativkontrolle diente ein PCR-Ansatz ohne Zugabe von DNA.

PCR-Programm:

|                              | Temperatur | Zeit  | Zyklen |
|------------------------------|------------|-------|--------|
| <b>Initial-Denaturierung</b> | 94°C       | 2 min | 1x     |
| <b>Denaturierung</b>         | 94°C       | 30 s  | 25-35x |
| <b>Hybridisierung</b>        | X °C       | 40 s  |        |
| <b>Elongation</b>            | 72°C       | 1 min |        |
| <b>Finale Elongation</b>     | 72°C       | 5 min | 1x     |

Tab. 3.2.2.1 Standardprogramm für die Amplifikation von DNA

\*Die Hybridisierungstemperatur wurde für jedes Primerpaar angepasst (siehe 2.7).

Die optimale Hybridisierungstemperatur liegt 4°C unter der Schmelztemperatur (T<sub>M</sub>) der Primer. Um eine optimale Bindung der Primer zu gewährleisten, wurde sie für jedes Primerpaar über deren Basenzusammensetzung separat ermittelt:

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

### 3.2.2.2 Präparative PCR

Zur Amplifikation von DNA, die zu Klonierungszwecken weiterverwendet wird, wird eine Polymerase benutzt, die 3'-5'- Exonukleaseaktivität besitzt. Durch diese Fähigkeit zur Fehlerkorrektur kann das Risiko, dass bei der Amplifikation der DNA Sequenzfehler entstehen, verringert werden.

PCR-Ansatz (angegeben sind Endkonzentrationen):

|                              |          |
|------------------------------|----------|
| DNA                          | 20 ng    |
| 10x Pwo-Polymerase Puffer    | 1x       |
| dNTP                         | 0,2 mM   |
| Primer 1                     | 0,8 pmol |
| Primer 2                     | 0,8 pmol |
| Pwo Polymerase               | 2,5 U    |
| ddH <sub>2</sub> O ad 100 µl |          |

Zur Amplifikation wurde das unter 3.2.2.1 beschriebene PCR-Programm verwendet.

### 3.2.2.3 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 (Qiagen)* oder *Amersham Gel Extractions-Kit* gereinigt werden.

### 3.2.3 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.

### 3.2.3.1 Auftrennung von DNA nach Größe in Agarosegelen

Die optimale Auftrennung der DNA-Abschnitte konnte über die Wahl des Agaroseanteils in der Gelmixtur erreicht werden. Für die Auftrennung von ca. 1000 bp-Fragmenten wurde ein 1%iges Gel in TAE-Puffer, für größere, z.B. bei der Analyse von BAC-Plasmiden, ein 0,8%iges Gel in TBE-Puffer verwendet. Die Agarose wurde im entsprechenden Volumen TAE- oder TBE-Puffer durch Erhitzen gelöst und für den Nachweis der Nukleinsäuren mit Ethidiumbromid (0,0005%) versetzt. Nach Überschichtung mit TAE- oder TBE-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.

### 3.2.3.2 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 *QIAquick* (Qiagen) oder *Amersham Gel Extraction Kit* durch Schmelzen der Gelsubstanz mit anschließenden Isolations- und Waschschritten entsprechend den Angaben des Herstellers.

### 3.2.4 Phenol/Chloroform-Extraktion

Bei der Phenol/Chloroform-Extraktion werden hydrophobe bzw. hydrophile Wechselwirkungen ausgenutzt, um DNA von Proteinen zu trennen und aufzureinigen. 1 Vol. Phenol/Chloroform (1:1) wurde zur aufzureinigenden Lösung gegeben, mittels Vortexer (bei BAC- und viraler DNA 10 min mittels Drehrad) gemischt und eine Minute bei 14000 Upm zentrifugiert. Dabei reichern sich die Proteine als Trennschicht zwischen der unteren hydrophoben Phenol/Chloroform-Schicht und der oberen, wässrigen Phase, in der sich die DNA löst, an. Die untere und mittlere Phase werden verworfen. Diese Schritte wurden nochmals mit reinem Chloroform wiederholt. Letzterer Schritt erhöht den Reinheitsgrad der DNA und entfernt restliches Phenol. Zum Schutz vor Fragmentierung der BAC- bzw. viralen DNA durch Scherkräfte wurden alle Pipettierschritte mit abgeschnittenen Pipettenspitzen durchgeführt.

### **3.2.5 Ethanolpräzipitation von DNA**

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

Zur DNA-Lösung wurden 2,5 Vol. 100%iger Ethanol und 1/10 Vol. 3M Natriumacetat pH 5,2 gegeben. Während der Inkubation des Gemisches bei  $-80^{\circ}\text{C}$  für 30 min oder bei  $-20^{\circ}\text{C}$  über Nacht (RT für 5 min bei BAC-Plasmiden und viraler DNA), erfolgte die Präzipitation der DNA. Schließlich wurde die DNA 20 min bei 14000 Upm und  $4^{\circ}\text{C}$  in der Mikrozentrifuge pelletiert. Nach einem Waschschrift mit 70% Ethanol zur Entfernung von Salzen wurde das Pellet getrocknet und in dem erforderlichen Volumen ddH<sub>2</sub>O oder TE-Puffer aufgenommen. Alle Pipettierschritte bei BAC- oder viraler DNA wurden mit abgeschnittenen Pipettenspitzen durchgeführt.

### **3.2.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

#### **3.2.6.1 Photometrische Bestimmung**

Die Konzentration von Nukleinsäuren in Lösungen kann durch photometrische Bestimmung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm ( $\text{OD}_{260}$ ) gegen eine H<sub>2</sub>O-Referenzprobe, ausgehend vom Lambert-Beerschen Gesetz, berechnet werden.

Eine  $\text{OD}_{260}$  von 1 entspricht dabei einer Nukleinsäure-Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  für doppelsträngige DNA, 40  $\mu\text{g/ml}$  für RNA sowie 37  $\mu\text{g/ml}$  für Oligonukleotide.

#### **3.2.6.2 Abschätzung mittels Gelelektrophorese**

Die Abschätzung des DNA-Gehalts einer Lösung ist auch 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 ng/ $\mu\text{l}$  eingesetzten Standards.

### **3.2.7 Klonierung rekombinanter Plasmide**

#### **3.2.7.1 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  $\mu\text{g}$  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 die vollständige Spaltung der vorgelegten DNA sicherzustellen, ist es sinnvoll, mehr als die berechneten Einheiten einzusetzen (in der Regel 1-2 U des Enzyms pro  $\mu\text{g}$  DNA). Hierbei ist zu beachten, dass die Enzymmenge 10% des Gesamtvolumens nicht übersteigt, da das im Enzymkonzentrat enthaltene Glycerin unspezifisches Spalten (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, Inkubationstemperatur und -zeit (meist  $37^\circ\text{C}$ , 1-2 h).

### 3.2.7.2 Erzeugung kompatibler DNA Enden

Wenn DNA-Fragmente und Vektoren ligiert werden sollen, aufgrund von Restriktion mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen jedoch keine kompatiblen überhängenden Enden aufweisen, kann eine Ligation nach Behandlung der DNA mit dem Klenow-Fragment ermöglicht werden. Diese Untereinheit der DNA-Polymerase I erzeugt durch ihre 5'-3' Polymerase- und 3'-5'- Exonukleaseaktivität glatte, ligierbare Enden bei DNA-Fragmenten. Dazu wurden folgende Mengen im Anschluss an die Restriktion eingesetzt:

|                    |                       |
|--------------------|-----------------------|
| DNA                | 1-3 $\mu\text{g}$     |
| dNTPs              | 0,4 mM/ $\mu\text{l}$ |
| 10x Puffer H       | 1x                    |
| Klenow-Fragment    | 0,5U/ $\mu\text{l}$   |
| ddH <sub>2</sub> O | ad 50 $\mu\text{l}$   |

Nach einer Inkubation von 25 min bei  $25^\circ\text{C}$  erfolgte die Hitzeinaktivierung des Enzyms ( $75^\circ\text{C}$ , 20 min) und die anschließende Aufreinigung der DNA nach Agarosegelelektrophorese mittels QIAquick (*Qiagen*) oder *Amersham* Gel Extraction Kit.



### 3.2.7.3 Dephosphorylierung von DNA

Die Dephosphorylierung von DNA soll die Religierung des leeren Vektors bei Ligationen verhindern. Dazu werden die Phosphate der 5' Enden durch alkalische Phosphatase (*cal**f intestinal alkaline phosphatase*, CIP) abgespalten. Die Dephosphorylierung wird im Anschluss an die Restriktion und evtl. Klenow-Behandlung des Vektors durchgeführt. Dafür wurde folgender Ansatz verwendet:

|                               |                         |
|-------------------------------|-------------------------|
| Vektor-DNA:                   | 1-3 µg                  |
| CIP:                          | 1,0 unit/µmol DNA-Enden |
| 10x Dephosphorylierungspuffer | 1x                      |
| ddH <sub>2</sub> O ad 35 µl   |                         |

Der Ansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert. Die Aufreinigung des dephosphorylierten Vektors wurde nach Agarosegelelektrophorese durch das *QIAquick* (*Qiagen*) oder *Amersham Gel Extraction Kit* durchgeführt.

Um den Erfolg der Dephosphorylierung überprüfen und die Anzahl der evtl. dennoch auftretenden Religanden erkennen zu können, wurde bei der Ligation (siehe 3.2.7.4) zusätzlich eine Negativkontrolle mitgeführt. Dieser Ansatz enthielt lediglich Vektor-DNA, keine Insert-DNA.

### 3.2.7.4 Ligation von DNA

Durch Ligation lassen sich DNA-Fragmente und linearisierte Vektoren kovalent miteinander verknüpfen und machen so eine Klonierung möglich. Die dafür eingesetzte T4 DNA Ligase verbindet unter ATP-Verbrauch durch Bildung einer Phosphodiesterbrücke die 3'-Hydroxylgruppe und die 5'-Phosphatgruppe der kompatiblen, überhängenden oder glatten, Enden der zu ligierenden DNA-Fragmente. Das Mengenverhältnis Vektor:Insert-DNA wurde 1:6 (molar) gewählt.

|                             |      |
|-----------------------------|------|
| Ligationsansatz:            |      |
| linearisiertes Plasmid:     | x µl |
| Insert-DNA:                 | x µl |
| 10x T4 DNA Ligase Puffer:   | 1x   |
| T4 DNA Ligase:              | 1 U  |
| ddH <sub>2</sub> O ad 20 µl |      |

Inkubiert wurde 2 h bei RT oder über Nacht bei 16°C. Der Ligationsansatz konnte nachfolgend direkt zur Transformation kompetenter *E.coli*-Zellen eingesetzt werden.

### **3.2.8 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 DNA-Präparation gewonnene hochreine rekombinante Plasmid-DNA. Die Sequenzbestimmung wurde von der Firma SequiServe (Vaterstetten) durchgeführt. Die Auswertung der erhaltenen Sequenzen wurde mit dem Programm *Align Plus* (SciEd Software, NC, USA) vorgenommen.

### **3.2.9 Detektion spezifischer Nukleinsäure- Fragmente mittels markierter, einzelsträngiger DNA im *Southern Blot* Verfahren**

#### **3.2.9.1 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 BHK-21 Zellen extrahiert (siehe 3.5.5) und mit Hilfe von Restriktionsenzymen (siehe 3.2.7.1) gespalten. Nach Auftrennung in einem 0,8%igen Agarosegel (siehe 3.2.3.1) bei 60 V über einen Zeitraum von 16 h wurde das Gel 10 min in Fixationspuffer geschwenkt. Dabei erfolgt die Depurinierung der DNA, was durch Denaturierung während der Übertragung auf die Nylonmembran zur Fragmentierung der DNA führt. Dadurch kann der gleichmäßige Transfer von unterschiedlich großen DNA-Fragmenten gewährleistet werden. Als Übertragungsmethode wurde der alkalische Kapillartransfer gewählt. Hierfür wurde das Gel auf einem Whatmanpapier (*Whatman*, Maidstone (USA)) platziert 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 2x SSC- Puffer ab gespült und die

DNA bei 80 °C für 2 h kovalent auf der Membran fixiert.

### 3.2.9.2 Herstellung einer Digoxigenin-markierten Sonde

Definierte, durch Restriktion erzeugte DNA-Fragmente können nach Agarosegelelektrophorese isoliert, mit Digoxigenin markiert und zur Detektion von komplementären DNA-Sequenzen im *Southern Blot* verwendet werden. Dazu wurde die DNA 10 min bei 95°C denaturiert und während der Inkubation auf Eis folgende Komponenten des *DIG Labeling Kits* von Roche zugegeben:

|                             |      |
|-----------------------------|------|
| DNA-Fragment                | 20ng |
| 10x Hexanucleotid-Mix       | 1x   |
| 10x dNTP-Markierungsmix     | 1x   |
| Klenow-Enzym                | 2U   |
| ddH <sub>2</sub> O ad 20 µl |      |

Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurde die Reaktion mit 2 µl 0,2M EDTA gestoppt. Anschließend konnte die markierte Sonde im *Southern Blot* verwendet werden.

### 3.2.9.3 Hybridisierung von DNA mit einer Digoxigenin-markierten Sonde

Für die Hybridisierung der immobilisierten DNA-Abschnitte mit einer gewählten Sonde wurde die Membran zunächst durch Inkubation in 25 ml Hybridisierungslösung bei 68°C 2 h vorbehandelt. Die Digoxigenin-markierte Sonde wurde nach 10 minütigem Aufkochen bei 95°C zu 25 ml kalter Hybridisierungslösung gegeben und die Membran über Nacht bei 68 °C in dieser Lösung inkubiert. In einem zweimaligen Waschschrift mit je 20 ml *Southern-*Waschpuffer 1 und 2 wurde ungebundene Sonde entfernt. Nachfolgende Schritte bei RT bereiteten die Detektion der DNA vor:

30 ml DIG1, 5 min

50 ml DIG2, 30 min

20 ml DIG2 + anti-DIG AP-Konjugat, 30min

50 ml DIG1 + 0,3% Tween, 2x 15 min

2ml DIG3 + 1:100 CDP-Star, 5 min

Auf der Membran markierte DNA-Fragmente konnten mit einem Röntgenfilm detektiert werden.

### 3.3 Proteinbiochemische Methoden

#### 3.3.1 Auftrennung von Proteinen in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE werden Proteine durch SDS mit einer negativen Ladung überzogen, um ein konstantes Verhältnis von Molekülgröße zur Ladung zu schaffen und eine vertikale Auftrennung im elektrischen Feld nach der Größe der Proteine möglich zu machen. Ein 4%iges Sammelgel, das die Taschen für die Proben enthält, dient dabei der Fokussierung der Proben, im 12-15%igen Trenngel werden die Proteine aufgetrennt. Trenn- und Sammelgel werden nacheinander zwischen zwei Glasplatten in eine dafür vorgesehene Gelapparatur (*Hofer/AmershamPharmacia, Biometra*) gegossen. Dabei wird das Sammelgel erst nach Polymerisation des Trenngels hineingegossen. Die Polymerisation des Acrylamid- und Bisacrylamidanteils wird durch die Zugabe der Katalysatoren APS und TEMED eingeleitet. Für den Gellauf werden die Glasplatten mit dem Gel in einer Elektrophoresekammer befestigt und mit SDS-Laufpuffer über- und unterschichtet. Danach werden die mit 4x SDS-Auftragspuffer versetzten Proben für 5-10 min bei 95°C inkubiert, kurz abzentrifugiert und mit Kapillarspitzen in die Geltaschen pipettiert. Der pH-Gradient zwischen Sammel- und Trenngel sorgt durch das anschließend angelegte elektrische Feld für eine gleichmäßige Auftrennung der Proteine. Der Gellauf findet bei 220V, 20W und pro Gel bei 25 mA statt und wird beendet, wenn die Lauffront des SDS-Auftragspuffers aus dem Gel austritt.

#### 3.3.2 Immunochemische Detektion von Proteinen im *Western Blot*-Verfahren

Beim *Western Blotting* werden Proteine nach der *Semidry-Transfer*-Methode von einem Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrozellulosemembran elektrotransferiert. Der Nachweis eines bestimmten Proteins auf einer Nitrozellulosemembran erfolgte anschließend durch die spezifische Bindung eines primären Antikörpers, der von einem sekundären Meerettich-Peroxidase gekoppelten Antikörper erkannt wird. Durch eine von der Peroxidase katalysierten Lichtreaktion wurde die Proteinbande mit Hilfe eines Röntgenfilms detektierbar. Nitrozellulosemembran und Whatman-Filterpapiere wurden auf die Größe des Trenngels (nach SDS-PAGE) zugeschnitten. Die Membran wurde vor dem Transfer mit Methanol hydrophilisiert, die Whatman-Filterpapiere in Transferpuffer äquilibriert. Bei der Reihenfolge des Aneinanderlegens von Membran und Trenngel wurde darauf geachtet, dass Proteine wegen ihrer negativen Ladung zur Anode der Blot-Apparatur wandern. Membran und Trenngel wurden von einer je gleichen Anzahl Whatman-Filterpapiere über- und

unterschichtet, der anschließende Transfer dauerte bei  $1 \text{ mA/cm}^2$  Gel 1,3-1,5 h (bei 10V und 10W). Nach dem Transfer wurde die Membran 3 h bei RT oder über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  in TBS-Tween (TBST) + 5% Milchpulver abgesättigt, um die nicht mit Protein besetzten Bindungsstellen gegen eine unspezifische Bindung durch Antikörper zu blockieren. Vor Zugabe des primären Antikörpers wurde, ebenso wie nach allen folgenden Inkubationsschritten, 3 x je 10 min mit TBST gewaschen. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper (1h RT oder  $4^\circ\text{C}$  über Nacht) folgte der Sekundärantikörper (30-40 min, RT). Zur Detektion wurde der *Lumi-Light* Kit der Firma *Roche* verwendet. Hierfür wurden  $50 \mu\text{l/cm}^2$  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 Molekulargewichtsstandards *Broad Range* (New England BioLabs).

Alle verwendeten Antikörper, deren Verdünnungen und die Epitope, gegen die sie gerichtet sind, sind in Abschnitt 2.10 aufgelistet.

### 3.4 Zellkultur-Techniken

#### 3.4.1 Kultivierung eukaryontischer Zelllinien

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in einem mit 5%  $\text{CO}_2$  begasten Wärmeschrank unter Wasserdampfatmosfera (95% Luftfeuchtigkeit) bei  $37^\circ\text{C}$  in Zellkulturflaschen (Nunc) verschiedener Größe. Sämtliche Arbeitsschritte wurden zur Vermeidung von Kontaminationen innerhalb einer Sterilbank durchgeführt unter Verwendung steriler Lösungen, Medien und Verbrauchsmaterialien.

Unter 2.12.2 bzw. 2.3.2 sind die verwendeten Zelllinien und ihre Kultivierungsmedien aufgelistet.

#### 3.4.2 Zucht adhärent wachsender Zellen

Um ein gleich bleibendes gutes Zellwachstum zu erhalten, ist es notwendig die Zellen regelmäßig zu subkultivieren. Dazu wurden die Zellen alle 3-4 Tage nach Bildung 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 (1,5 ml bei einer Fläche von  $75\text{cm}^2$  entsprechend T75-Zellkulturflaschen) für 2-5 min bei  $37^\circ\text{C}$ . Die genaue Zellzahl

einer Suspension konnte durch eine Neubauer-Zählkammer bestimmt werden. Hierfür wurden die Zellen meist 1:5 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 Milzzellen aus Infektionsexperimenten oder bei Zelllinien Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase mit möglichst niedriger Passagenzahl verwendet. Adhärente Zellen wurden zunächst vom Flaschenboden gelöst (siehe 3.4.2) und wie auch Milzzellen bei 1500 Upm (Megafuge 1.0R, Heraeus) 5 min zentrifugiert. Mit vorgekühltem Einfriermedium wurden die Zellen vorsichtig resuspendiert und auf eine Zellzahl von  $4-5 \times 10^6$  Zellen/ml (Zelllinien) bzw.  $20-40 \times 10^6$  Zellen/ml (Milzzellen) eingestellt. Das Einfrieren erfolgte in 1 ml Aliquots in Kryoröhrchen (Nunc) mittels Einfrierboxen (Nalgene) bei  $-80^\circ\text{C}$  für 12-24 h. Anschließend wurden die Zellen zur Lagerung in flüssigen Stickstoff ( $-196^\circ\text{C}$ ) überführt (Zelllinien) oder bei  $-80^\circ\text{C}$  (Milzzellen) belassen.

### **3.4.4 Auftauen kryokonservierter eukaryontischer Zellen**

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden zügig durch Anwärmen im  $37^\circ\text{C}$  Wasserbad aufgetaut und sofort in ein Falcon-Röhrchen mit 20 ml vorgelegtem Medium (RT) überführt, um die Konzentration des im Einfriermediums enthaltenen zytotoxischen DMSO herabzusetzen. Nach Zentrifugation bei 1500 Upm, 5 min (Megafuge 1.0R, Heraeus) wurden die Zellen in frischem Medium aufgenommen. Die Kultivierung erfolgte bis zum Erreichen einer konfluenten Zellschicht in T75-Zellkulturflaschen ( $75\text{ cm}^2$ ), dann wurden die Zellen wie in 3.4.2 passagiert.

### **3.5 Virologische Methoden**

#### **3.5.1 Rekonstitution rekombinanter MHV-68 in Zellkultur**

Rekombinante, BAC-Sequenz freie MHV-68 wurden mittels verschiedener Zelllinien nach Transfektion, Cre-Rekombinase-Behandlung und Selektion gewonnen.

##### **3.5.1.1 Transfektion viraler DNA in eukaryontische Zellen**

Das Einbringen viraler DNA in BHK-21 Zellen erfolgte mit Hilfe des *Superfect Transfection Reagent* (Qiagen). Das Reagenz enthält synthetische Polymere, sog. Dendrimere, die mit negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA Komplexe bilden können. Dazu wurden 10 µl des gebrauchsfertigen *Superfect* Reagenz mit ca. 2,5 µg DNA 10 min bei 37°C inkubiert, das Gemisch anschließend mit 1 ml Zellkulturmedium versetzt und für 60 min auf den subkonfluenten Zellrasen ( $\leq 1 \times 10^6$  Zellen/Vertiefung) einer 6-Loch-Platte gegeben. Danach wurde die Transfektionslösung gegen 2 ml frisches Zellkulturmedium ausgetauscht. Der Erfolg der Transfektion konnte im Fluoreszenzmikroskop überprüft werden, da transfizierte Zellen aufgrund der Expression von *green fluorescent protein* (GFP), das in der BAC-MHV-68 DNA enthalten ist, grün erscheinen. Bei Erreichen von 80-100% CPE, ggf. nach Umsetzen der Zellen in größere Zellkultur-Flaschen, wurden die Zellen zur Virusfreisetzung zweimal gefroren (-80°C) und getaut (RT). Nach Zentrifugation (2500 Upm, 10 min, 4°C) zur Entfernung zellulärer Bestandteile wurde der virushaltige Überstand in Aliquots zu 1 ml und 10 ml bei -80°C gelagert.

##### **3.5.1.2 Herstellung und Selektion BAC-Sequenz freier MHV-68**

Um die BAC-Vektor Sequenzen einschließlich der Sequenz für GFP aus dem Genom der rekombinanten MHV-68 zu entfernen, wurden subkonfluente REF/Cre-Zellen in einer T25-Flasche mit 5-10 µl des Virusüberstandes aus der Transfektion (siehe 3.5.1.1) infiziert. REF/Cre-Zellen sind stabil mit der Rekombinase Cre transfiziert. Die Cre-Rekombinase vermittelt das Entfernen der mit lox P-Sequenzen flankierten BAC-Kassette. Bei einem CPE von ca. 80-100% wurde schließlich nach gleichem Verfahren wie in 3.5.1.1 beschrieben virushaltiger Überstand gewonnen. Um BAC-Sequenz freies Virus zu erhalten, wurden 2- oder 3-fach Verdünnungen des Virusüberstandes in Mehrfachansätzen (12 Vertiefungen/Verdünnung) auf subkonfluente NIH3T3 pipettiert (100µl/96-Loch). Die Zellen der Vertiefungen mit CPE, jedoch ohne GFP Expression (Indikator für die Entfernung der

BAC-Sequenzen), was im Fluoreszenzmikroskop überprüft wurde, wurden wie in 3.5.1.1 beschrieben geerntet und der Überstand bis zur Herstellung eines Virusstocks bei -80°C gelagert.

### 3.5.2 Vermehrung von MHV-68 in Zellkultur

Für die Charakterisierung und Verwendung von MHV-68 wurde Virus in größerem Maßstab produziert. Dazu wurden subkonfluente BHK-21 Zellen, die am Vortag in T75-Flaschen ausgesät wurden, in 5 ml BHK-Medium mit 10 µl Virusüberstand (siehe 3.5.1.2) 1 h inkubiert und die Viruslösung nachfolgend gegen frisches Medium ausgetauscht. Zeigten die Zellen nach 72-96 h 80-100% CPE, wurden sie nach Abklopfen und Trypsinierung 10 min bei 1300 Upm pelletiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Zellpellet in 0,5 bis 1 ml BHK-Medium resuspendiert und zweimal gefroren (-80°C) und getaut (RT). Virushaltiger Überstand wurde durch Zentrifugation bei 2500 Upm (10 min, 4°C) gewonnen und in Kryoröhrchen zu 0,5 ml Aliquots bei -80°C eingefroren. Nach erneutem Auftauen, Aliquotieren und Einfrieren erhielt man die Viruscharge, die für die Virustiterbestimmung sowie für die *in vitro* und *in vivo* Infektionsexperimente benutzt wurde.

### 3.5.3 Bestimmung des Titers von MHV-68 (Plaque-Assay)

Der Gehalt an infektiösen Viruspartikeln von Lösungen (Virusstocks, Überstände, Lungen- und Milzhomogenate) konnte mittels Färbung von Plaques bestimmt werden. Plaques entstehen durch die lytische Vermehrung von Virus auf adhärenen Zellen und können mit einer Kristallviolett-Lösung sichtbar gemacht werden. Dazu wurde in einem Volumen von 1 ml eine 1:5 oder 1:10 Verdünnungsreihe der Viruslösung angelegt und die Verdünnungen zur Adsorption der Viren für 90 min (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) auf 50-60% konfluente BHK-21 Zellen einer 24-Loch-Platte pipettiert. Nach der Inkubation wurde das Inokulum durch 2 ml vorgewärmtes methylzellulosehaltiges Medium (*overlay*-Medium) ersetzt, um eine Ausbreitung der Nachkommen-Viren über das Medium zu verhindern. Die Zellen wurden für 5 Tage im Wärmeschrank gehalten und das Medium anschließend abgesaugt. Fixierung und Färbung der Plaques erfolgte durch 10-15 minütige Inkubation in 350 µl 1:10 verdünnter Kristallviolett-Lösung. Die Anzahl der Plaques wurde in einer geeigneten Verdünnungsstufe (ca. 10-30 Plaques/Vertiefung) mittels Lichtmikroskop bestimmt und der Virustiter nach folgender Formel berechnet:



Anzahl Plaques x Verdünnungsstufe x Verdünnungsfaktor = Plaque forming units (PFU)/ml  
Verdünnungsfaktor = 1/ml Inokulum

### 3.5.4 Bestimmung des Wachstumsverhaltens von MHV-68 in vitro

Durch die Erstellung von Wachstumskurven konnte die Replikationsfähigkeit eines Virus beurteilt und mit anderen Viren verglichen werden. Dazu wurden die Virustiter zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion von NIH3T3 Zellen bestimmt.

Je  $0,3 \times 10^6$  NIH3T3 Zellen wurden in 6-Loch Platten ausgesät und am nächsten Tag mit 0,1 PFU pro Zelle (*multiplicity of infection*, MOI=0,1) für 60 min mit den zu testenden Viren infiziert (1ml/Vertiefung). Das Inokulum zu diesem Zeitpunkt der Infektion diente als Nullstundenwert und Kontrolle für die gleich eingesetzten Viruskonzentrationen. Nach der Infektion wurde ein Mediumwechsel (2 ml) durchgeführt und die Ansätze jeweils 24, 48, 72 oder 96 h inkubiert (37°C/5% CO<sub>2</sub>). Zellen und Medium wurden zu diesen Zeitpunkten geerntet, zweimal gefriergetaut (-80°C/RT) und die Überstände schließlich bis zur Titerbestimmung mittels *Plaque-Assay* (siehe 3.5.3) bei -80°C gelagert.

### 3.5.5 Isolierung viraler DNA (Hirt-Extrakt)

Die Aufreinigung zirkulärer DNA von MHV-68 erfolgte gemäß der Methode von Hirt (Hirt 1967). Subkonfluente BHK-21 Zellen wurden wie in 3.5.2 beschrieben infiziert und nach Auftreten von 80-90% CPE geerntet. Das Zellpellet wurde nach einmaligem Waschen mit PBS mit 500 µl 20 mM EDTA und 500 µl 1,2% SDS lysiert. Zelluläre genomische DNA und Proteine wurden durch Zugabe von 660 µl 5M NaCl während 12- bis 36 stündiger Inkubation bei 4°C präzipitiert. Zelldebris wurde schließlich durch Zentrifugation (14000 Upm, 30 min, 4°C) entfernt und der Überstand einer Phenol/Chloroform Präzipitation und Ethanolfällung unterzogen. Letztere wurden wie in 3.2.4 und 3.2.5 durchgeführt, alle Zentrifugationsschritte fanden jedoch bei 10000 Upm statt, um die aufgrund ihrer Größe empfindliche DNA nicht zu fragmentieren.

### **3.6 Tierexperimentelle und immunologische Methoden**

#### **3.6.1 Haltung von Versuchstieren**

Für alle *in vivo*-Experimente wurden weibliche C57BL/6 Mäuse (Charles River, Sulzfeld) verwendet und im Instituts-eigenen Tierstall unter pathogenfreien Bedingungen gehalten. Nach der Infektion mit MHV-68 wurden die Tiere in individuell belüftete Käfige umgesetzt, um eine Infektionsgefahr anderer Tiere auszuschließen.

#### **3.6.2 Infektion von Versuchstieren**

Die zur Immunisierung bzw. Infektion eingesetzten MVA oder MHV-68 wurden in sterilem PBS auf die gewünschte Viruskonzentration eingestellt. Alle Applikationen von MHV-68, Öffnungen von individuell belüfteten Käfigen, Tötungen von MHV-68 infizierten Mäusen mittels zervikaler Dislokation und Organentnahmen fanden innerhalb einer Sterilbank statt.

##### **3.6.2.1 Intranasale Infektion**

Vor der intranasalen Applikation von Virus wurden die Tiere durch eine intraperitoneal verabreichte Narkose mit Ketamin/Xylazin (50/15 mg/kg) anästhesiert. Die Virussuspension wurde in einem Volumen von 30 µl mit einer 200 µl-Pipettenspitze auf die Nasenöffnung der Maus gegeben und durch Einatmen aufgenommen.

##### **3.6.2.2 Intraperitoneale Infektion**

Bei der intraperitonealen Infektion wurde das Virus in einem Volumen von 250 µl verabreicht, wobei das Tier auf den Rücken gedreht und die Virussuspension vorsichtig über eine 27G 3/4-Kanüle ins Peritoneum gespritzt wurde.

#### **3.6.3 Präparation von Organhomogenaten**

Um Virustiter in Lungen oder Milzen MHV-68 infizierter Mäuse zu bestimmen, wurden Homogenate der Lunge oder der Milz hergestellt.

##### **3.6.3.1 Herstellung von Lungenhomogenaten**

Zur Entnahme des linken Lungenflügels wurden die Tiere zunächst mittels zervikaler Dislokation getötet und nach Entfernen des Fells und Desinfektion mit 80% Ethanol der

Brustkorb geöffnet. Nach steriler Überführung des Lungenflügels in ein Eppendorfgefäß auf Eis wurde das Organ auf  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur Homogenisierung des Lungengewebes wurden dem Eppendorfgefäß 20-30 Glaskügelchen ( $\varnothing$  1mm) und 100 $\mu\text{l}$  BHK-Medium zugefügt, die Lunge mit einem Minipistill durch wiederholte Drehbewegungen 3-4 min zerkleinert und schließlich 900  $\mu\text{l}$  BHK-Medium dazupipettiert. Nach zweimaligem Einfrieren und Auftauen des Homogenats konnte der Überstand nach Absinken von Geweberesten zur Titerbestimmung mittels *Plaque-Assay* verwendet werden (siehe 3.5.3).

### 3.6.3.2 Gewinnung von Milzhomogenaten

Um die Milz zu entnehmen wurde die Maus zunächst durch zervikale Dislokation getötet. Nach Entfernen des Fells unterhalb des linken Rippenbogens wurde die Schnittstelle zur Vermeidung von Kontaminationen mit 80% Ethanol gespült, schließlich die Bauchhaut durchtrennt und die Milz mit Hilfe einer Pinzette steril entnommen. Das Organ wurde von Fett und Bindegewebe befreit, in ein Eppendorfgefäß auf Eis überführt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Das Homogenat wurde entweder wie unter 3.6.3.1 beschrieben oder mit Hilfe eines Glasdouncers hergestellt. Bei letzterer Homogenisierungsweise wurde die Milz mit 1ml BHK-Medium in den Glasdouncer transferiert und das Organ durch 30-40 Auf- und Abwärtsbewegungen des Pistills zerkleinert. Nach Überführen der Lösung in ein Eppendorfgefäß und zweimaligem Einfrieren und Auftauen konnte der Überstand nach Absinken von Geweberesten zur Titerbestimmung mittels *Plaque-Assay* (siehe 3.5.3) verwendet werden.

### 3.6.4 Präparation von Splenozyten aus der Maus

Zur Gewinnung der Milzzellen wurde zunächst die Milz wie in 3.6.3.2 aus der Maus entnommen, und in 5 ml gekühltes T-Zell-Medium überführt.

In einer Petrischale ( $\varnothing = 10$  cm) wurde die Milz in 5 ml T-Zell-Medium vorsichtig zwischen den rauhen Seiten zweier Objektträger zerrieben, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Danach wurde die Suspension in ein 50 ml Falcon überführt, die Petrischale mit 10 ml T-Zell-Medium nachgespült und das Medium in das Falcon-Röhrchen zugegeben. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 1500 Upm,  $4^{\circ}\text{C}$  für 5 min (Megafuge 1.0R, Heraeus) wurden die in dem Zellsediment enthaltenen Erythrozyten durch isotonische Lyse mit 5-8 ml (je nach Milzgröße) Erythrozyten- Lysepuffer für 5 min eliminiert. Anschließend wurden die Zellen mit 10 ml Medium gewaschen, durch ein Zellsieb ( $40\mu\text{m}$ ) filtriert und in frischem Medium

resuspendiert. Mittels einer Neubauer-Zählkammer konnte dann die Zellzahl (hier in einer 1:30-Verdünnung) bestimmt werden.

### **3.6.5 *Ex vivo* Reaktivierungs-Assay**

Durch den Kontakt mit NIH3T3 Zellen kann MHV-68, das als Episom latent in Milzzellen vorliegt, wieder in den lytischen Vermehrungszyklus überführt werden, d.h. reaktivieren. Die Frequenz dieser Zellen kann im Reaktivierungs-Assay bestimmt werden. Dazu wurden Milzzellen, angefangen bei einer Konzentration von  $1,5 \times 10^5$  Zellen/Vertiefung, dreifach verdünnt und eine Hälfte der Verdünnungen in Mehrfachansätzen (24 Vertiefungen) auf NIH3T3 Zellen (100  $\mu$ l/96-Loch) pipettiert. Diese wurden am Vortag in einer Konzentration von  $8 \times 10^3/200$   $\mu$ l ausgesät. Die andere Hälfte der Verdünnungen wurden zur mechanischen Zerstörung intakter Milzzellen zweimal eingefroren und aufgetaut und nach obigem Schema auf NIH3T3 Zellen gegeben. Damit kann festgestellt werden, ob bereits lytisches Virus vor der Reaktivierung vorhanden war. Nach 7 und 14 Tagen wurden die Vertiefungen zur Bestimmung von CPE im Mikroskop abgelesen. Der Prozentsatz CPE-positiver Vertiefungen je Verdünnung konnte nach folgender Formel berechnet werden:

$(\text{CPE positive Vertiefungen latentes Virus} - \text{CPE positive Vertiefungen lytisches Virus}) \times 100/24$

### **3.6.6 Intrazelluläre Zytokinfärbung**

Um die Zytokinausschüttung antigenspezifischer T-Zellen zu messen wurden Milzzellen aus MVA immunisierten Mäusen oder aus immunisierten und MHV-68 belasteten Mäusen mit spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zell-Epitopen oder MHV-68 infizierten C57BL/6 Fibroblasten (MC3T3) stimuliert.

#### **3.6.6.1 Vorbereitung der Stimulatorzellen**

MC3T3 Zellen wurden mit verschiedenen MOI von MHV-68 1 h infiziert, die Viruslösung anschließend gegen frisches Medium ausgetauscht und die Zellen über Nacht inkubiert. Zum Schutz von Oberflächenproteinen, zu denen auch Epitop-präsentierende MHC I Moleküle gehören, wurden die MC3T3 Zellen nach dreimaligem Waschen mit PBS mittels einer 0,5 M EDTA-Lösung (1:50 in PBS) vom Flaschenboden gelöst. Die bei zu langer Inkubation zelltoxische EDTA-Lösung wurde nach Zentrifugation der Zellen in einem 50 ml Falcon-

Röhrchen (1500 Upm, 4°C, 5 min) dekantiert und die Zellen dreimal mit T-Zell-Medium gewaschen.

### **3.6.6.2 Stimulation von T-Lymphozyten und IFN- $\gamma$ Messung**

In die Vertiefungen einer 24-Loch-Platte wurden je  $1,5 \times 10^7$  Milzzellen aus MVA immunisierten Mäusen oder aus immunisierten und MHV-68 belasteten Mäusen verteilt. Peptide zur Stimulation wurden in einer Endkonzentration von  $1\mu\text{g/ml}$  zugefügt, MHV-68 infizierte MC3T3 mit einer Zellzahl von  $1,0\text{-}1,5 \times 10^6/\text{ml}$ . Durch Zugabe von  $1\mu\text{l/ml}$  Brefeldin A (BD GolgiPlug) nach 2 h Inkubation zu den Peptid- oder MC3T3-stimulierten Milzzellen wurde eine Anreicherung der Zytokine in den Zellen erreicht. Nach Ablauf der Inkubationszeit von ca. 8 h konnten die Zellen der 24-Loch-Platte 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 je Vertiefung der 24-Lochplatte wurden je in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt, für 5 min bei 1500 Upm zentrifugiert und das Zellpellet in 250  $\mu\text{l}$  FACS-Puffer resuspendiert. Diesem wurde  $1\mu\text{g/ml}$  Ethidium Bromid Monoazid (EMA) zur Anfärbung toter Zellen und  $5\mu\text{g/ml}$  anti-CD16/CD32 (Fc-Block) zur Absättigung zellulärer Fc-Rezeptoren zugesetzt. 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  $\mu\text{l}$  FACS-Puffer mit PE-anti-CD8a (1:100), APC-anti-CD62L (1:200) und bei Bedarf mit PerCP-anti-CD4 (1:200) Antikörpern resuspendiert und für 20 min unter Lichtabschluss auf Eis inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit FACS-Puffer wurden die Zellen mit 100  $\mu\text{l}$  Cytotfix/Cytoperm der Firma BD Pharmingen (Hamburg) für 15 min permeabilisiert. Im Anschluss daran konnten intrazelluläre Proteine markiert werden. Die Zellen wurden zweimal mit Permwash (BD Pharmingen, Hamburg) gewaschen und eine Hälfte des Doppelansatzes mit einem FITC-anti-IFN- $\gamma$  Antikörper, verdünnt (1:500) in Permwash, 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 Fc-Rezeptoren, überprüfen zu können. Nach 30 min Inkubation im Dunkeln wurde dreimal mit Permwash gewaschen und die Zellen dann in 300  $\mu\text{l}$  PBS/1% 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 (FacsCALIBUR oder FacsCANTO, BD Biosciences) bis zu 2 Tage bei 4°C unter Lichtabschluss gelagert werden. Alle verwendeten Antikörper sind in Tabelle unter 2.10 aufgelistet.

### **3.6.7 Tetramerfärbung von T-Lymphozyten**

Antigenspezifische T-Zellen lassen sich durch Bindung an Epitop-beladene, synthetische MHC I Komplexe, sog. Tetramere, identifizieren. Dazu wurden Milzzellen aus der Maus zunächst wie in 3.6.6.2 beschrieben zur Lebend/Tot-Selektion mit EMA gefärbt. Anschließend folgte ebenso wie in 3.6.6.2 die Färbung von Oberflächenproteinen mit FITC-anti-CD8 (CALTAG) und APC-anti-CD62L. Zusätzlich enthielt die Antikörperlösung jedoch Epitop-spezifische oder Kontroll-Tetramere in einer Konzentration von 1:50. Nach 3 Waschschritten mit FACS-Puffer folgte die Fixierung der Zellen in 300µl PBS/1% PFA und die Messung mit dem Fluoreszenzdurchflusszytometer (FacsCALIBUR oder FacsCANTO, BD Biosciences). Eine Liste verwendeter Antikörper und Tetramere ist in der Tabelle unter 2.10 aufgeführt.

### **3.6.8 Messung der Aktivität zytotoxischer T-Zellen**

Neben der antigenspezifischen Messung von IFN- $\gamma$  lässt sich auch die Funktionalität zytotoxischer T-Zellen messen, indem die spezifische Lyse von Zielzellen durch Freisetzung von radioaktiv-markiertem Chrom ( $^{51}\text{Cr}$ ) bestimmt wird.

#### **3.6.8.1 Anlegen einer Primärkultur**

Um die zytotoxische Aktivität von T-Lymphozyten aus geimpften Mäusen zu bestimmen wurden die isolierten Milzzellen (siehe 3.6.4) in einer Primärkultur zunächst zur Proliferation stimuliert. Dies erfolgte durch Koinkubation mit naiven Milzzellen, die zuvor 1,5 h bei 37°C mit entsprechendem MHV-68 infiziert, danach gewaschen und mit 3000 rad bestrahlt wurden. Die Bestrahlung soll die Proliferation der naiven Milzzellen verhindern. Die Stimulation der T-Lymphozyten erfolgte in 24-Loch-Platten, wobei in Mehrfachansätzen (3-7) je Vertiefung in einem Volumen von 2 ml  $6 \times 10^6$  Zellen aus geimpften Mäusen und  $6 \times 10^6$  bestrahlte Stimulatorzellen zugegeben wurden. Nach einer Inkubation von 5 Tagen bei 37°C wurden die Zellen geerntet und für die Weiterverwendung im Zytotoxizitäts-Assay (siehe 3.6.8.3) gezählt.

### **3.6.8.2 Vorbereitung der Zielzellen**

MC3T3 wurden mit EDTA vom Flaschenboden gelöst, gewaschen (siehe 3.6.6.1) und mit MHV-68 (MOI=10) 1,5 h bei 37°C in einer Zellkulturflasche infiziert. Danach wurden die Zellen wiederum mit EDTA abgelöst und gewaschen (siehe 3.6.6.1). Nach der Übertragung von maximal  $1,2 \times 10^6$  Zellen in ein 15 ml Falcon-Röhrchen folgte die Resuspendierung der Zellen in 15  $\mu$ l FBS und die Zugabe von  $^{51}\text{Cr}$  (37,5 $\mu$ Ci). Bei leicht geöffnetem Schraubverschluss der Falcon-Röhrchen wurden die Zellen 1,5 h bei 37°C inkubiert, schließlich gewaschen und die Zellzahl mit T-Zell-Medium auf  $10^4/100 \mu\text{l}$  eingestellt.

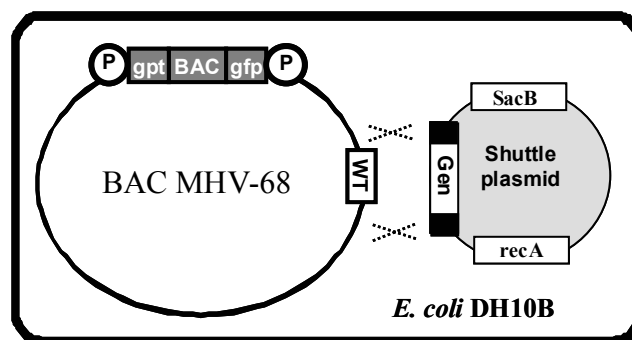
### **3.6.8.3 $^{51}\text{Cr}$ Freisetzung und Messung**

Der direkte Kontakt zwischen Effektorzellen und Zielzellen ermöglicht über Antigenerkennung spezifische Zellyse und die darausfolgende  $^{51}\text{Cr}$  Freisetzung. Um dabei auch die Effektivität der Effektorzellen zu bestimmen, wurden verschiedene Verhältnisse von Effektor- zu Zielzellen gewählt, d.h. die Zellzahl der Effektorzellen bei konstanter Zielzellzahl ( $10^4/\text{Vertiefung}$ ) in Dreifach-Verdünnungen verringert. Effektor- und Zielzellen wurden in 96-Loch-Rundbodenplatten 6h bei 37°C koinkubiert, bei 1200 Upm und 4°C für 9 min ohne Zuschalten der Bremse zentrifugiert und 30  $\mu$ l des Überstandes auf TopCount-Mikroplatten transferiert. Der  $^{51}\text{Cr}$  Gehalt der einzelnen Vertiefungen konnte nach Trocknen der Platten über Nacht gemessen werden (TopCount NXT, Packard).

## 4 Ergebnisse

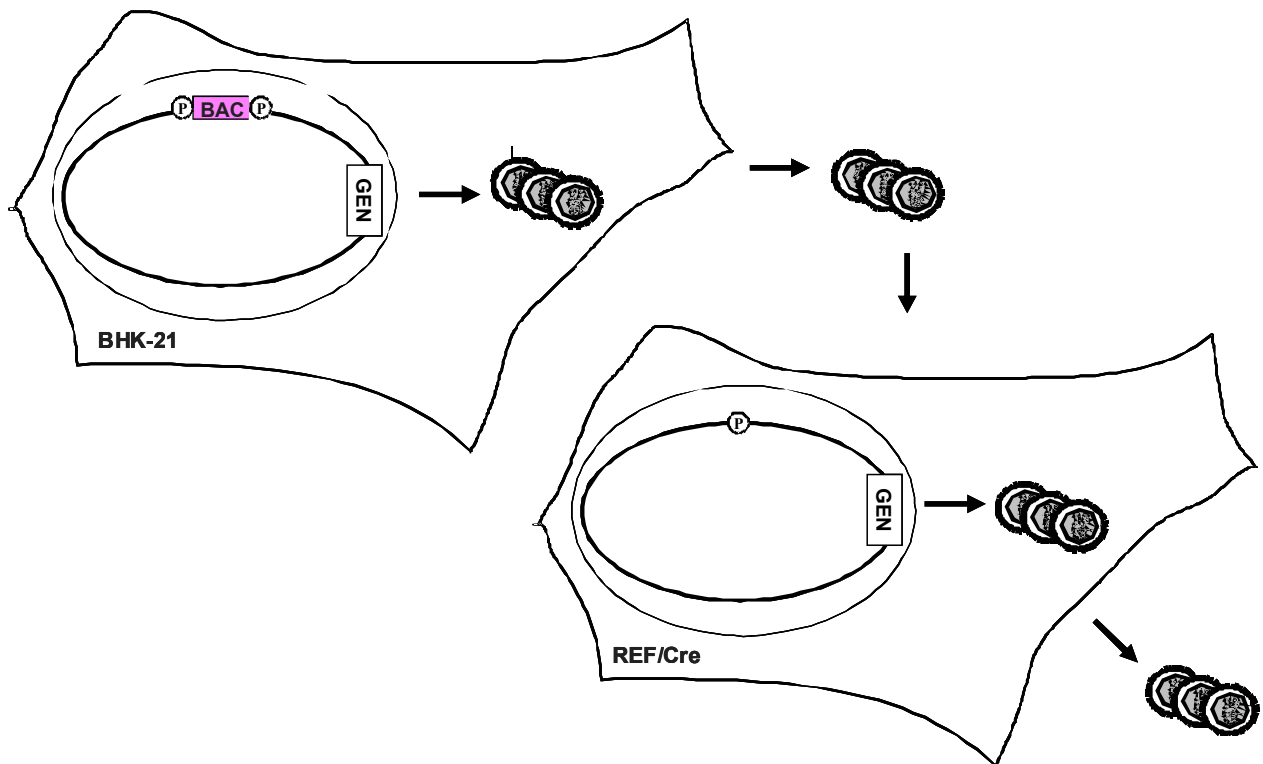
### 4.1 Generierung rekombinanter MHV-68

Die Generierung der rekombinanten Viren MHV-68-OVA (*ovalbumin*), MHV-68-NS3 (Nichtstrukturprotein 3 aus HCV), MHV-68-NS3-RO (reverse Orientierung) und MHV-68-CORE (CORE Protein aus HCV) erfolgte im Wesentlichen in drei Arbeitsschritten: der Klonierung der Gene in das Shuttle-Plasmid pST76K-SR-M1/M2-UCR (*uncoding region*, nicht codierende Region), der Shuttle-Mutagenese auf bakterieller Ebene und der Rekonstitution der Mutanten in Zellkultur. Die Shuttle-Mutagenese ermöglichte durch homologe Rekombination in Bakterien, die ein als BAC (*bacterial artificial chromosome*) kloniertes MHV-68 Genom (BAC MHV-68) tragen, die Insertion gewünschter Gene in das MHV-68 Genom (Abb. 4.1a). Nach Selektion und Identifikation positiver Klone erfolgte schließlich die Rekonstitution der rekombinanten Viren in Zellkultur (Abb. 4.1b). Da alle verwendeten rekombinanten Viren auf gleiche Weise generiert wurden, wird auf die Herstellung im Folgenden zunächst allgemein, auf die Klonierung der einzelnen Gene dann im Speziellen eingegangen. Als Wildtyp wurde ein MHV-68 gewählt, das ebenso wie die Mutanten aus BAC MHV-68 DNA rekonstituiert wurde und daher im Gegensatz zum eigentlichen Wildtyp MHV-68-WT als MHV-68-WT\* bezeichnet wird.



**Abb. 4.1a Vereinfachtes Schema der Shuttle-Mutagenese in *E. coli*.** Das Shuttle-Plasmid pST76K-SR trägt das zu inserierende Gen zwischen den zum MHV-68 Genom homologen Genabschnitten (schwarze Rechtecke). *rec A* ermöglicht die Rekombination in Bakterien, *Sac B* ist ein Selektionsmarker. Das MHV-68 Genom liegt als BAC in *E. coli* mit den für die Replikation nötigen Sequenzen (BAC) vor. Zusätzlich zur BAC-Sequenz sind in der BAC-Kassette auch die Sequenzen für *gpt* (*guanosine phosphoribosyl transferase*, Selektionsmarker für die Herstellung von BAC MHV-68) und *gfp* (*green fluorescent protein*) enthalten. Die BAC-Kassette ist von lox P-Sequenzen flankiert, die später der Excision der BAC-Kassette durch die Cre-Rekombinase dienen.

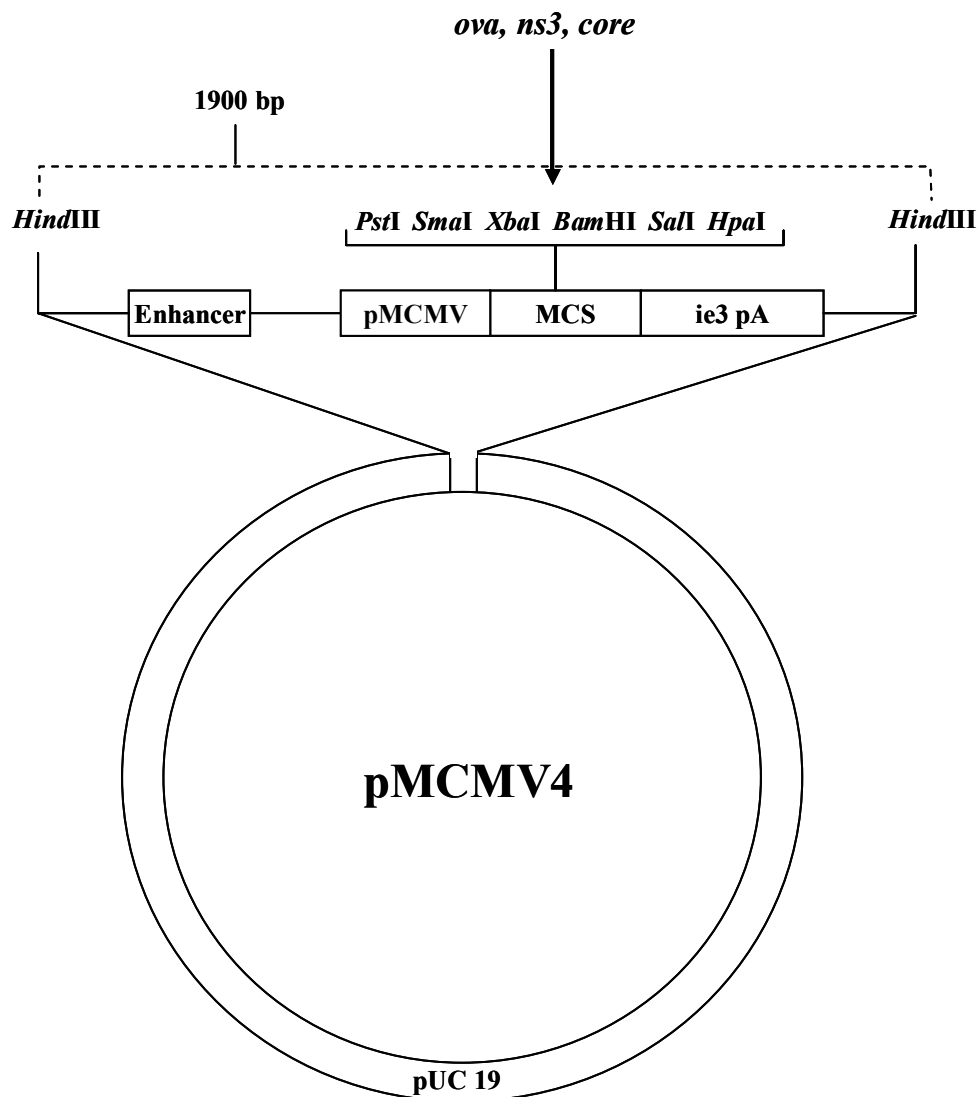




**Abb.4.1b Rekonstitution von MHV-68 in Zellkultur.** Durch Transfektion von BAC MHV-68-DNA in permissive BHK-21 Zellen erfolgt die Rekonstitution infektiöser Viren. Zur Entfernung der BAC Sequenz (mit *gpt* und *gfp*) werden anschließend REF/Cre-Zellen infiziert, welche die Rekombinase Cre exprimieren.

#### 4.1.1 Insertion von Genen in das MHV-68 Genom

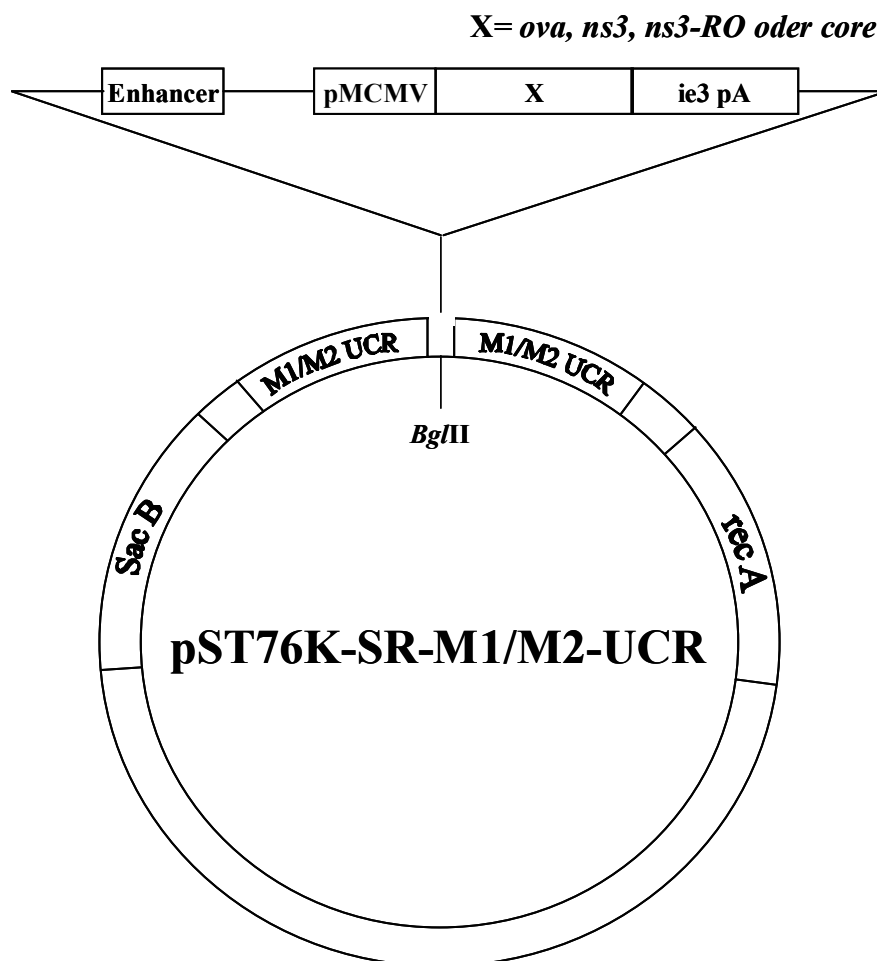
Die Gene *ova*, *ns3* und *core* wurden zunächst in die *multiple cloning site* (MCS) des Vektors pMCMV4 inseriert, um eine spätere Expression der Gene unter Kontrolle des MCMV Promotors und eine Polyadenylierung durch das MCMV *immediate early* Polyadenylierungssignal zu gewährleisten. Zusätzlich trägt die Expressionskassette eine Enhancer-Sequenz zur Unterstützung der Promotorregion (Abb. 4.1.1a).



**Abb. 4.1.1a Klonierung von *ova*, *ns3* und *core* in die Expressionskassette des Vektors pMCMV4.** Die Expressionskassette des Plasmids pMCMV4 trägt Sequenzen für eine Enhancer Region, den MCMV ie (*immediate early*) Promotor, eine *multiple cloning site* (MCS) und ein Polyadenylierungssignal (ie3 pA). Flankiert wird die Kassette von Restriktionsschnittstellen für *Hind*III zum Transfer in das Shuttle-Plasmid pST76K-SR-M1/M2-UCR.

Nach der Klonierung der Gene *ova*, *ns3* und *core* in die Expressionskassette von pMCMV4 erfolgte der Transfer der Kassette nach Restriktion mit *Hind*III in das Shuttle-Plasmid pST76K-SR-M1/M2-UCR (Abb. 4.1.1b). Das Shuttle-Plasmid trägt stromauf- und stromabwärts der Insertionsstelle (= *Bgl*II-Schnittstelle bei Position 3846 des MHV-68

Genoms) nicht-kodierende (*uncoding region*, UCR) Genabschnitte (Position 2406-6261 des MHV-68 Genoms), die sich zwischen den Genen M1 und M2 des MHV-68 Genoms befinden. Diese Sequenzen ermöglichen nach der Transformation des Shuttle-Plasmids in *E.coli* die homologe Rekombination und somit Insertion der Expressionskassette in das MHV-68 Genom.



**Abb. 4.1.1b Klonierung der Expressionskassette aus pMCMV4 in das Shuttle-Plasmid pST76K-SR-M1/M2-UCR.** Die Expressionskassette mit den Genen *ova*, *core*, *ns3* oder *ns3RO* wurde nach Restriktion mit *HindIII* in das *BglIII* geschnittene Shuttle-Plasmid kloniert. Sowohl bei der Expressionskassette als auch dem Shuttle-Plasmid wurden vor der Ligation kompatible, glatte Enden erzeugt (siehe 3.2.7.2, 3.2.7.4).

#### **4.1.1.1 Herstellung von MHV-68-OVA**

Das Plasmid pMCMV4-*ova* lag bereits im Labor vor und konnte direkt wie in 4.1.1 beschrieben für den Transfer der Expressionskassette in das Shuttle-Plasmid verwendet werden.

#### **4.1.1.2 Herstellung von MHV-68-NS3**

Das *ns3* Gen (1909 bp) des HCV Genotyps 1b wurde zunächst mittels Restriktion mit *EcoRI* aus dem Plasmid pcDNA1-*ns3* isoliert und nach der Erzeugung kompatibler, glatter Enden in die *multiple cloning site* von pMCMV4 kloniert. pMCMV4 wurde zuvor mit *SmaI* gespalten und besaß daher bereits glatte Enden. Da sich bei einer Klonierung mit glatten Enden Gene nach der Ligation in beiden Leserichtungen in der Zielsequenz befinden können, wurden durch entsprechende Restriktionsanalysen Klone identifiziert, deren Transkriptionsstart sich in Leserichtung des Promotors befindet, um eine Expression von NS3 zu gewährleisten. Nach der Sequenzierung der *ns3*-Sequenz aus pMCMV4-*ns3* erfolgte die Umklonierung der Expressionskassette in das Shuttle-Plasmid wie unter 4.1.1 beschrieben.

#### **4.1.1.3 Herstellung von MHV-68-NS3-RO**

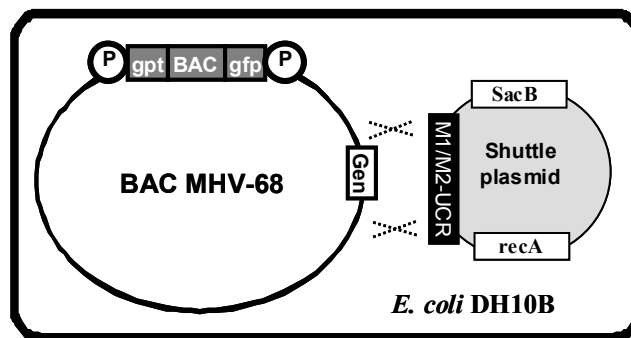
Um die Studien zum attenuierten Phänotyp von MHV-68-NS3 durchzuführen, war es nötig, das *ns3* Gen in reverser Orientierung (RO) in die Expressionskassette einzusetzen. Dies sollte eine Expression von NS3 verhindern, da sich der Promotor nicht in Leserichtung des Gens befindet. *ns3* wurde zunächst wie in 4.1.1.2 beschrieben in die Expressionskassette kloniert, jedoch wurden diejenigen Plasmide für die weitere Klonierung verwendet, die die Restriktionsbedingungen für die reverse Orientierung von *ns3* in der Expressionskassette erfüllten. Danach wurde die Expressionskassette in das Shuttle-Plasmid transferiert (siehe 4.1.1)

#### **4.1.1.4 Herstellung von MHV-68-CORE**

Zur Klonierung von *core* (573 bp) wurde das Gen zunächst mittels PCR unter Einführung der Restriktionsschnittstellen *PstI* (5'-Ende) und *BamHI* (3'-Ende) aus dem Vektor pcDNA1-*core* amplifiziert und in die entsprechende Zielsequenz der Expressionskassette von pMCMV4 eingesetzt. Nach Identifizierung positiver Klone durch Restriktion und anschließender Überprüfung der *core*-Sequenz aus pMVMV4-*core* durch Sequenzierung folgte die Umklonierung in das Shuttle-Plasmid (siehe 4.1.1).

#### 4.1.2 Deletion inserierter Gene aus dem MHV-68 Genom

Da die rekombinanten MHV-68 im Vergleich zum verwendeten Wildtyp einen veränderten Phänotyp aufweisen, wurden Revertanten generiert, um zu überprüfen, ob der Phänotyp durch das inserierte Gen oder Genprodukt oder durch weitere, unbeabsichtigte Modifikationen im MHV-68 Genom ausgelöst wurde. Dazu wurden *E.coli* Bakterien, die bereits mit BAC MHV-68-DNA der jeweiligen rekombinanten Genome transformiert waren, elektrokompent gemacht und als Ausgangspunkt für die Shuttle-Mutagenese verwendet. Das jeweils inserierte Gen im MHV-68 Genom wurde durch homologe Rekombination mit den Sequenzen M1/M2-UCR des eingebrachten Shuttle-Plasmids wieder entfernt (Abb. 4.1.2). Nach Rekonstitution der Revertanten in Zellkultur konnten die Viren für *in vivo* Studien eingesetzt werden (siehe 4.3.2.4).



**Abb. 4.1.2 Vereinfachtes Schema zur Herstellung von MHV-68 Revertanten.** Ein Shuttle-Plasmid, welches das MHV-68-Fragment M1/M2-UCR (Position 2406-6261 des MHV-68 Genoms) enthält, wird in *E.coli* eingeführt, die das BAC MHV-68 Genom mit dem zuvor inserierten Gen tragen. Homologe Rekombination entfernt das inserierte Gen nach dem Prinzip der Shuttle-Mutagenese (siehe 3.1.5).

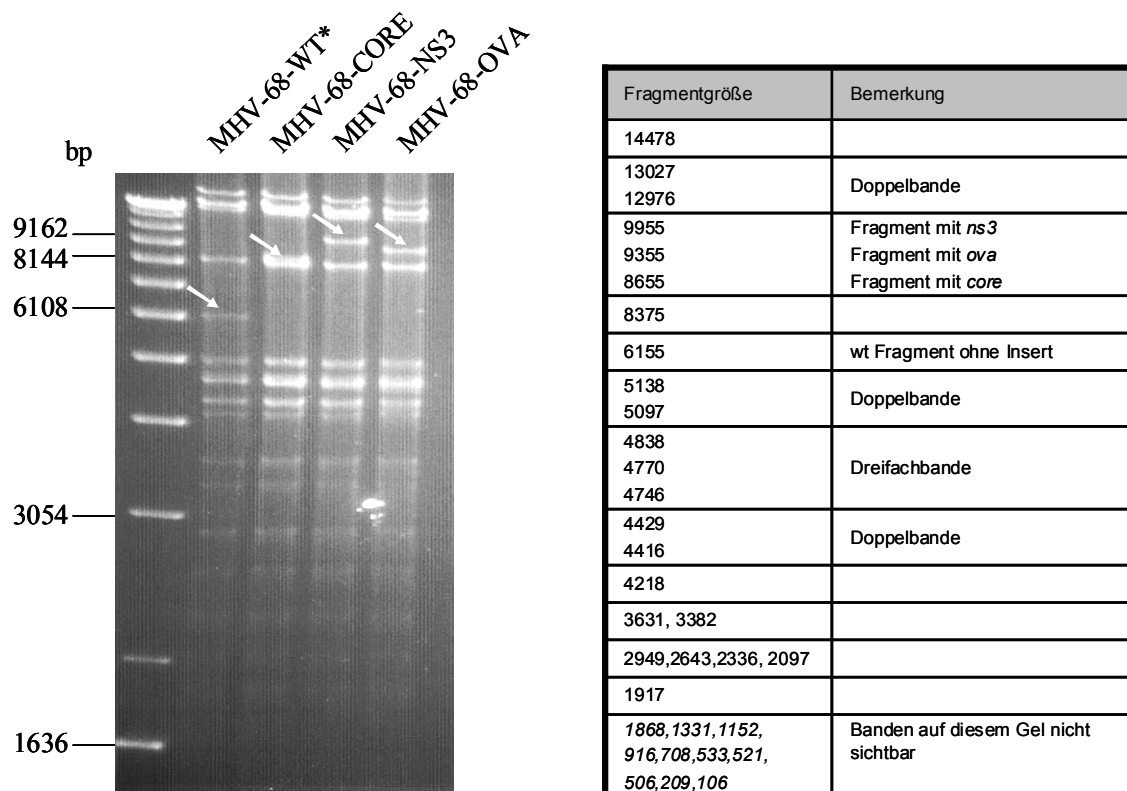
#### 4.2 *In vitro* Charakterisierung rekombinanter MHV-68

Nach der Generierung der rekombinanten MHV-68 ermöglichten zum einen Restriktions- und *Southern Blot*-Analysen die Überprüfung der Viren auf genomischer Ebene, zum anderen sollten proteinbiochemische Methoden Aufschluss über die Expression der Proteine OVA, NS3 und CORE geben. Des Weiteren konnte das Wachstumsverhalten der rekombinanten MHV-68 durch die Erstellung von Wachstumskurven im Vergleich zum Wildtyp untersucht werden.

## 4.2.1 Analyse rekombinanter MHV-68 auf genomischer Ebene

### 4.2.1.1 Charakterisierung des Genoms durch Restriktionsanalyse

Die Restriktion der rekombinanten MHV-68 durch mehrere Restriktionsendonukleasen nach Isolierung der viralen DNA aus NIH3T3 Zellen bestätigte die Insertion oder, im Fall der Revertanten, die Deletion von Genen und die Vollständigkeit der rekombinanten Genome. Abbildung 4.2.1.1 zeigt exemplarisch das Restriktionsmuster der Virus-DNA von MHV-68-OVA, MHV-68-NS3 und MHV-68-CORE nach Verdau mit *Hind*III im Vergleich zum Wildtyp. Die *Hind*III-Fragmente, die durch die Insertion der Expressionskassette vergrößert wurden, weisen, verglichen zum Wildtyp-Signal von 6155 bp, ein verändertes Laufverhalten im Gel auf. So befindet sich das entsprechende *Hind*III-Fragment von MHV-68-CORE bei 8655 bp, da das Fragment um die Größe der Kassette von 2500 bp erweitert wurde. Ebenso ändert sich die Laufhöhe des *Hind*III-Fragments von MHV-68-NS3 um 3800 bp und liegt nach der Insertion bei 9955 bp, das Fragment von MHV-68-OVA vergrößert sich um 3200 bp auf 9355 bp. Auch alle anderen Restriktionsfragmente zeigten die erwarteten Größen wie in Abb. 4.2.1.1 aufgelistet.



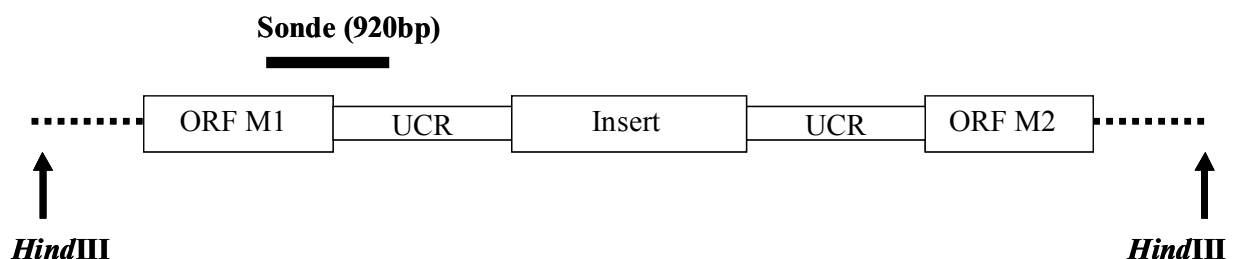
**Abb. 4.2.1.1** Restriktionsanalyse der viralen DNA von MHV-68-CORE, MHV-68-NS3 und MHV-68-OVA im Vergleich zu MHV-68-WT\*. MHV-68-WT\*, MHV-68-CORE, MHV-68-NS3 und MHV-68-OVA wurden mit *Hind*III verdaut und im 0,8% Agarosegel aufgetrennt. Die Pfeile in der Grafik zeigen das entsprechende *Hind*III Fragment vor (MHV-68-WT\*, 6155 bp) und nach der Insertion der jeweiligen Expressionskassetten (MHV-68-CORE: 8655 bp; MHV-68-NS3: 9955 bp; MHV-68-OVA: 9355 bp).

Zur genaueren Strukturanalyse des MHV-68 Genoms wurden weitere Restriktionen, die hier jedoch nicht gezeigt sind, mit den Enzymen *HpaI* und *EcoRI* durchgeführt. Mit beiden Enzymen konnte die Vollständigkeit der Mutanten demonstriert werden. Die Behandlung mit dem Enzym *EcoRI* gab auch Aufschluss darüber, inwieweit die Anzahl der 40 bp Sequenz-Wiederholungen (siehe Abb. 1.5.1) durch die Shuttle-Mutagenese verändert wurde. Die Rekombinationsfähigkeit von *E.coli* durch *recA* (siehe Abb. 4.1a) kann zum partiellen Verlust dieser Sequenzen führen. Daher wurden Klone ausgewählt, die möglichst wenige Wiederholungssequenzen verloren haben. Das entsprechende *EcoRI*-Fragment mit der vollständigen Anzahl an Wiederholungssequenzen liegt bei 5159 bp, eine mit dem Verlust aller Sequenzen bei ca. 3900 bp. Alle verwendeten rekombinanten MHV-68 zeigten Signale zwischen diesen beiden Fragmentgrößen. Als Wildtyp wurde ein Virus gewählt, das im *EcoRI* Verdau vergleichbar reduzierte Wiederholungssequenzen aufwies und deshalb als MHV-68-WT\* bezeichnet wurde.

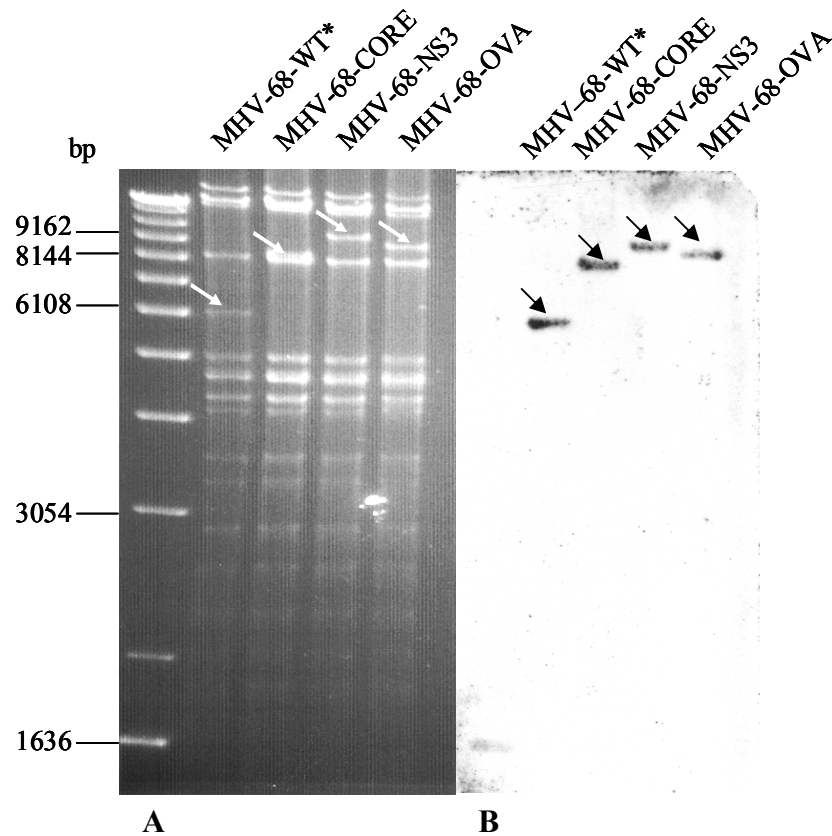
Ebenso wurden auch die MHV-68 Revertanten einer Genomanalyse unterzogen. Eine *HindIII* Restriktion der MHV-68 Revertanten konnte eine Verschiebung des jeweiligen *HindIII* Fragments durch die Entfernung der Expressionskassette auf Wildtyp-Größe bestätigen (Daten nicht gezeigt).

#### 4.2.1.2 Kontrolle genomischer Integrität im *Southern Blot*

Neben der Restriktionsanalyse fand zur Kontrolle des Genoms rekombinanter MHV-68 auch der *Southern Blot* Anwendung. Dieser gab Aufschluss darüber, ob die gewünschten Gene *ova*, *ns3* und *core* in die gewünschte Stelle des MHV-68 Genom inseriert wurden. Wie Abb. 4.2.1.2b zeigt, erzeugte die gewählte Sonde (Abb. 4.2.1.2a) auf dem *HindIII*-Fragment, das die inserierten Gene trägt, ein Signal, was den erwarteten Banden von 6155 bp beim Wildtyp MHV-68-WT\*, 8655 bp bei MHV-68-CORE, 9955 bp bei MHV-68-NS3 und 9355 bp bei MHV-68-OVA entspricht.



**Abb. 4.2.1.2a Sonde zur Kontrolle der Insertion von Genen in das MHV-68 Genom.** Die gewählte Sonde von 920 bp bindet eine Teilsequenz des Gens M1 und der nachfolgenden nicht-kodierenden Region (*uncoding region*, UCR) auf dem *HindIII*-Fragment, das die inserierten Gene *ova*, *ns3* oder *core* (Insert) trägt.

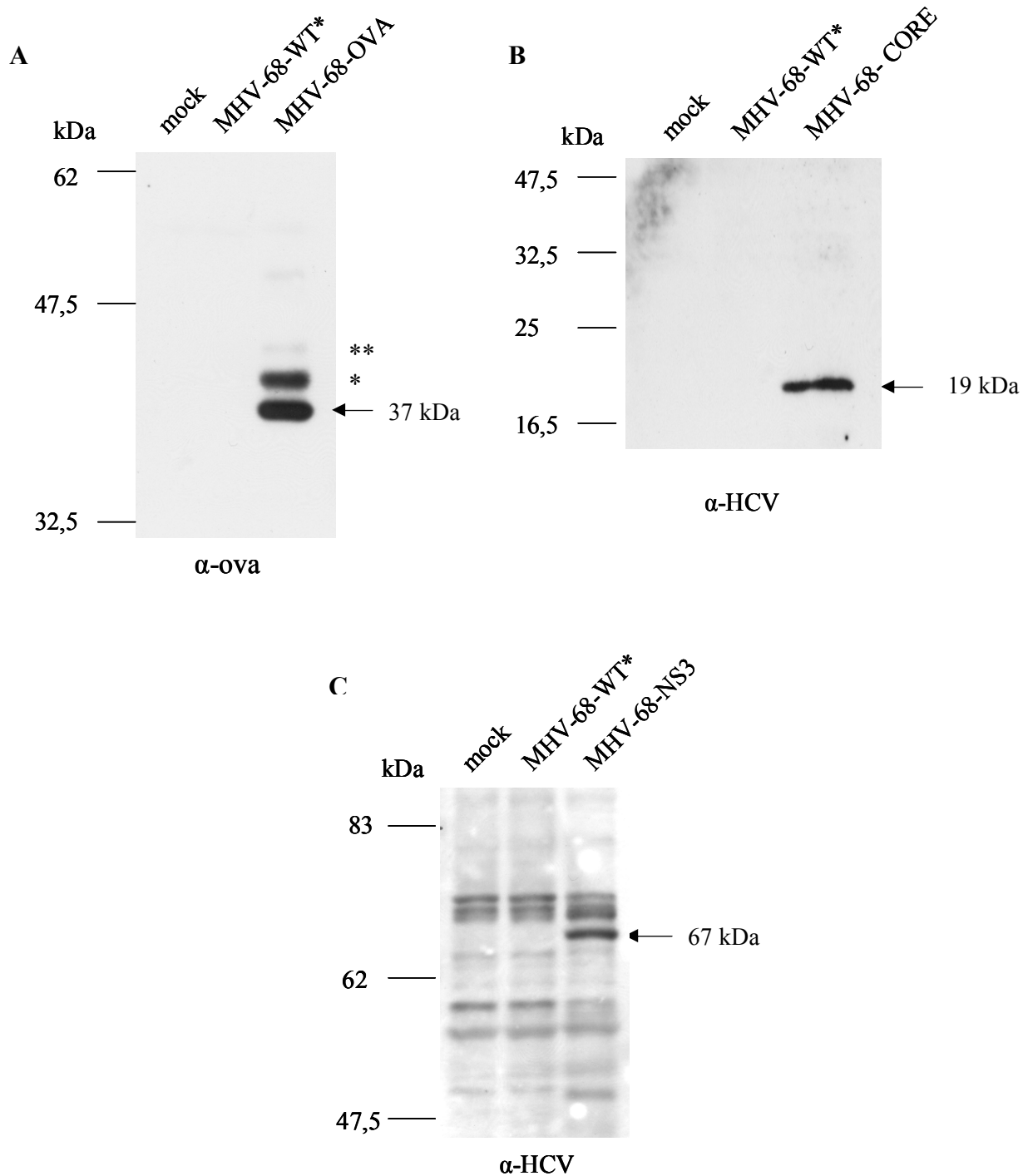


**Abb. 4.2.1.2b A, B Southern Blot zur Analyse rekombinanter MHV-68.** Nach Restriktion rekombinanter MHV-68 mit *Hind*III und der Auftrennung im 0,8%-igen Agarosegel (A) erfolgte der Transfer der DNA auf eine Nitrozellulosemembran (B) zur Hybridisierung mit einer Digoxigenin-markierten Sonde. Die weißen Pfeile markieren die *Hind*III-Fragmente ohne (MHV-68-WT\*) oder mit den inserierten Genen, das entsprechende Signal nach Detektion mittels Röntgenfilm ist mit schwarzen Pfeilen gekennzeichnet.

#### 4.2.2 Nachweis der Expression von OVA, NS3 und CORE in MHV-68 infizierten NIH3T3 Zellen

Nachdem die genomische Analyse die korrekte Struktur von MHV-68-OVA, MHV-68-NS3 und MHV-68-CORE bestätigte, war es hinsichtlich der späteren Impfstudien auch notwendig, die Expression der Proteine OVA, NS3 und CORE nachzuweisen. So konnte 48 h nach der Infektion von NIH3T3 Zellen mit den entsprechenden MHV-68 in Zelllysaten im *Western Blot* ein Signal für das jeweilige Protein detektiert werden (Abb. 4.2.2 A-C). Dabei zeigten die Proteine die erwarteten Größen von 37 kDa (OVA), 19 kDa (CORE) und 67 kDa (NS3). Zusätzlich konnten sich bei OVA zwei glykosylierte Formen des Proteins detektiert werden, deren Molekulargewicht etwas höher lag als das des unglykosylierten Proteins. Kontroll-Zelllysate von NIH3T3 Zellen, die nicht oder mit Wildtyp MHV-68-WT\* infiziert wurden, zeigten erwartungsgemäß keine Signale der Proteine.

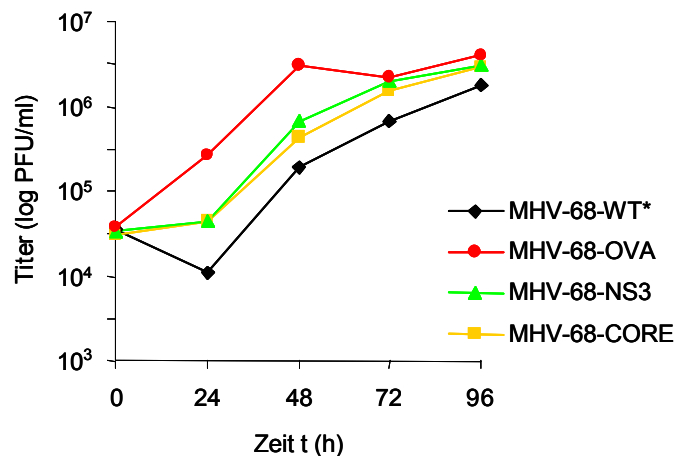




**Abb. 4.2.2 Expression von OVA (A), CORE (B) und NS3 (C) in infizierten NIH3T3 Zellen.** NIH3T3 Zellen wurden 48-72 h nach Infektion mit MHV-68-OVA, MHV-68-CORE oder MHV-68-NS3 (MOI=1) geerntet und die Zelllysate in einem 15%-igen (bei NS3 in einem 8%-igen) SDS-Gel aufgetrennt. Im *Western Blot* erfolgte der Nachweis der Proteine mit den Antikörpern  $\alpha$ -ova: (1:5000) und  $\alpha$ -HCV (für CORE: 1:10000; für NS3: 1:1000). Die Detektion erfolgte mittels Chemilumineszenz auf einem Röntgenfilm. mock, nicht-infizierte Zellkontrolle, \* einfach glykosyliertes OVA, \*\* zweifach glykosyliertes OVA.

#### 4.2.3 Wachstumsanalyse von MHV-68-OVA, MHV-68-NS3 und MHV-68-CORE in NIH3T3 Zellen

Um nachprüfen zu können, dass die Insertion von Genen in das MHV-68-Genom zunächst *in vitro* keine negativen Auswirkungen auf die Vermehrungsfähigkeit der rekombinanten Viren hat, wurden vergleichend zum Wildtyp Wachstumskurven erstellt. Die Wachstumskurven in Abb. 4.2.3 verdeutlichen, dass keine der MHV-68 Mutanten in ihrer Vermehrungsfähigkeit *in vitro* eingeschränkt ist. Die Werte an Zeitpunkt 0 demonstrieren gleiche Mengen an eingesetztem Virus. Nach 96 h erreichen sowohl Wildtyp als auch MHV-68 Mutanten vergleichbare Titer, was auf ein gleichwertiges Wachstum der Viren schließen lässt.



**Abb. 4.2.3 Wachstumsanalyse von rekombinanten MHV-68.** NIH3T3 Zellen wurden mit MHV-68-WT\*, MHV-68-OVA, MHV-68-NS3 und MHV-68-CORE infiziert (MOI=0,1), die Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und der Virustiter mittels Plaque-Assay bestimmt.

#### 4.3 *In vivo* Charakterisierung rekombinanter MHV-68

Zur vollständigen Charakterisierung der generierten MHV-68 Mutanten gehört auch, hinsichtlich der Arbeiten im Tiermodell, die Analyse der Wachstumseigenschaften *in vivo*. Mehrere Parameter und die Zeitpunkte ihrer Bestimmung, die zur Charakterisierung herangezogen wurden, konnten somit auch auf ihre Eignung für die späteren Impfstudien überprüft werden. So wurde zum einen die lytische Replikationsfähigkeit von MHV-68-OVA, MHV-68-NS3 und MHV-68-CORE in Lunge und Milz als auch das Latenzverhalten dieser Viren in der Milz bestimmt. Letzteres wurde ebenfalls, unter Einbeziehung entsprechender Vergleichsgruppen, bei MHV-68-NS3-RO und den Revertanten MHV-68-OVA-REV und

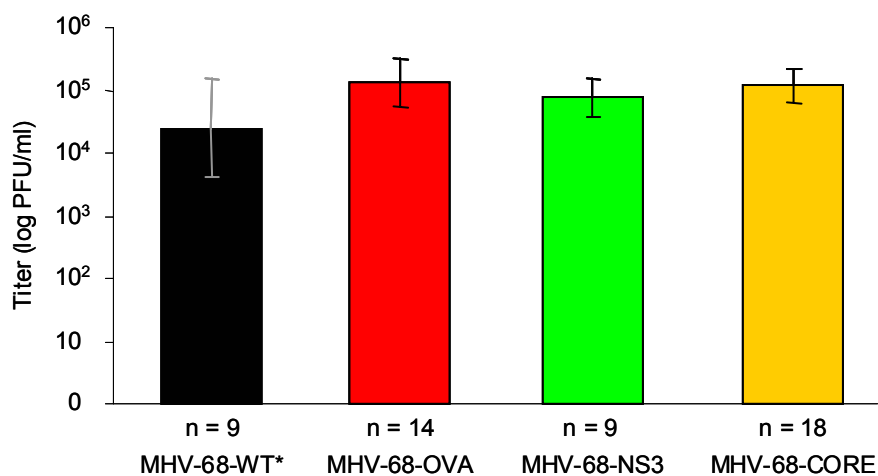
MHV-68-NS3-REV untersucht.

### 4.3.1 Lytische Replikation rekombinanter MHV-68

Um eine Aussage über die lytische Replikationsfähigkeit von MHV-68 in C57BL/6 Mäusen treffen zu können, wurden als Parameter Virustiter zum einen in der Lunge und zum anderen in der Milz herangezogen.

#### 4.3.1.1 Lytische Replikation rekombinanter MHV-68 in der Lunge

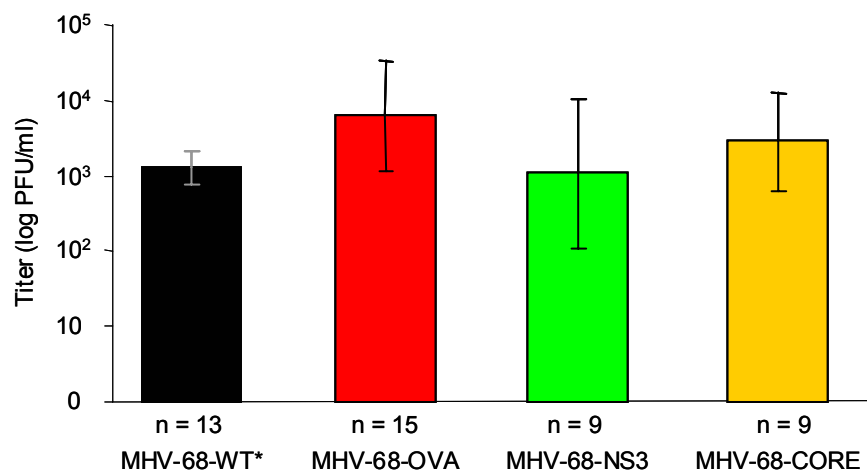
Da das Maximum der Lungen-Virustiter nach intranasaler (i.n.) Infektion mit MHV-68 zwischen Tag 5 und Tag 7 liegt, wurde den Mäusen zur Titerbestimmung die Lunge an Tag 6 entnommen. Vergleichend zum Wildtyp lässt sich feststellen, dass jedes der in Abb. 4.3.1.1 untersuchten rekombinanten MHV-68 gleichwertige Virusmengen in der Lunge aufweist, die bei ca.  $10^5$  PFU/ml liegen. Die Ergebnisse wurden aus mehreren, unabhängigen Experimenten zusammengefasst.



**Abb. 4.3.1.1 Lytische Replikation von rekombinanten MHV-68 in der Lunge.** C57BL/6 Mäuse wurden i.n. mit  $5 \times 10^4$  PFU infiziert. Nach der Entnahme des linken Lungenflügels an Tag 6 wurde nach Herstellung eines Lungenhomogenats der Virustiter mittels Plaque-Assay bestimmt. n, Zahl der Versuchstiere.

#### 4.3.1.2 Lytische Replikation rekombinanter MHV-68 in der Milz

Ebenso wie im Fall der Lunge, erfolgte die Entnahme der Milz, allerdings nach intraperitonealer (i.p.) Infektion, an Tag 6. Wie die Virustiter in der Milz in Abb. 4.3.1.2 zeigen, konnte kein Nachteil in der Replikationsfähigkeit von MHV-68-OVA, MHV-68-NS3 und MHV-68-CORE im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden. Alle Vergleichsgruppen erreichten Werte zwischen  $10^3$  und  $10^4$  PFU/ml. Die Grafik stellt die Ergebnisse mehrerer unabhängiger Experimente dar.



**Abb. 4.3.1.2 Lytische Replikation von rekombinanten MHV-68 in der Milz.** C57BL/6 Mäuse wurden i.p. mit  $1 \times 10^6$  PFU infiziert. Nach der Entnahme der Milz an Tag 6 wurde nach Herstellung eines Milzhomogenats der Virustiter mittels Plaque-Assay bestimmt. n, Zahl der Versuchstiere.

#### 4.3.2 Latenzverhalten rekombinanter MHV-68

Hinsichtlich der Untersuchung von Impfstoffen gegen chronische Virusinfektionen ist bei der Auswahl der Parameter zur Messung der Effektivität der Vakzine besonders der chronische Verlauf der MHV-68 Infektion im Tiermodell von Bedeutung. Die Etablierung einer chronischen MHV-68 Infektion bzw. der Latenz geht mit einer massiven Proliferation von Milzzellen und daher Splenomegalie einher, die bei MHV-68-WT\* ihr Maximum ungefähr an Tag 17 erreicht. Daher wurde dieser Zeitpunkt zum Vergleich der rekombinanten MHV-68 mit dem Wildtyp herangezogen. Gleichzeitig mit dem Milzgewicht wurde auch die Splenozytenzahl bestimmt. Da beide Parameter jedoch miteinander korrelieren, sind nachfolgend nur die Milzgewichte graphisch dargestellt.

#### 4.3.2.1 Bestimmung der Splenomegalie und Splenozytenzahl nach Infektion mit rekombinanten MHV-68

Im Gegensatz zu den Parametern der lytischen Replikation waren bei der Untersuchung der Splenomegalie, bestimmt durch das Milzgewicht und Splenozytenzahl, Unterschiede zwischen MHV-68-WT\* und MHV-68 Mutanten sowie zwischen den einzelnen MHV-68 Mutanten erkennbar. Diese Unterschiede im Milzgewicht wurden sowohl nach i.n. (Abb. 4.3.2.1a) als auch nach i.p. Infektion (Abb. 4.3.2.1b) deutlich (Daten aus mehreren Versuchen). Auffällig war, dass die einzelnen rekombinanten MHV-68 die Milzgewichte nicht in gleicher Weise beeinflussten. So zeigten MHV-68-OVA und MHV-68-NS3 nach i.n. Infektion eine etwa 2,75-fache Reduktion des Milzgewichts auf durchschnittlich 131 mg bzw. 110 mg, verglichen mit dem Wildtyp, dessen Milzgewicht bei 330 mg lag ( $p < 0,05$ ). Auch nach i.p. Infektion war das mittlere Milzgewicht ca. 2,5-fach auf 134 mg bzw. 142 mg signifikant ( $p < 0,05$ ) reduziert (Wildtyp: 337 mg). Bei MHV-68-CORE erhöhte sich jedoch das Gewicht und stieg nach i.n. Infektion 1,4-fach auf durchschnittlich 458 mg (Wildtyp: 330 mg) an ( $p < 0,05$ ). Im Gegensatz dazu war nach i.p. Infektion kein Unterschied zwischen dem mittleren Milzgewicht von MHV-68-WT\* (337 mg) und MHV-68-CORE (356 mg) zu erkennen ( $p = 0,77$ ).

Obwohl das Milzgewicht nach i.n. oder i.p. Infektion mit MHV-68-OVA bzw. MHV-68-NS3 deutlich reduziert war, war es immer noch signifikant höher als das Milzgewicht von nicht-infizierten, naiven Mäusen ( $p < 0,05$ ).

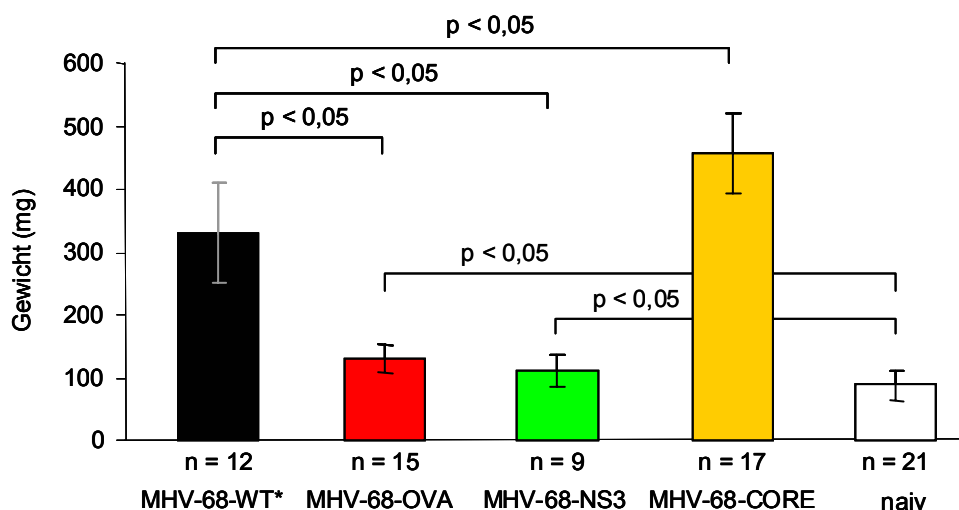
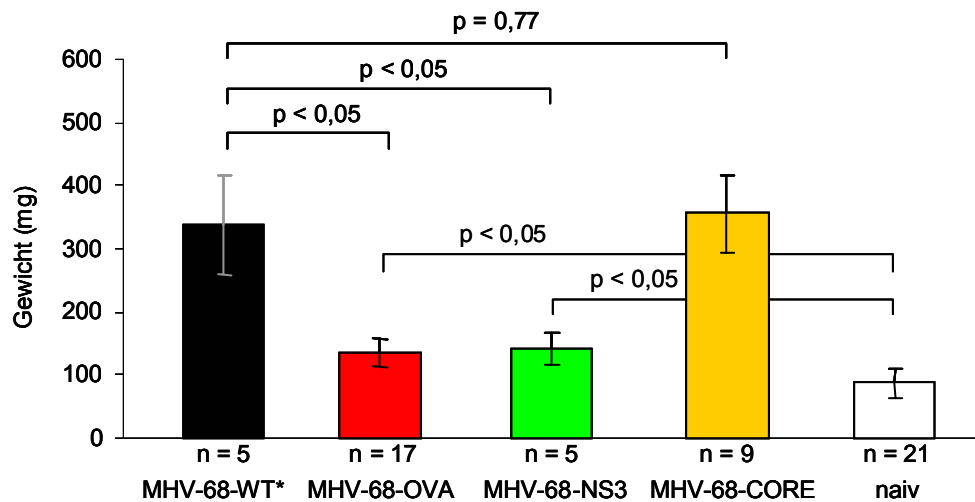


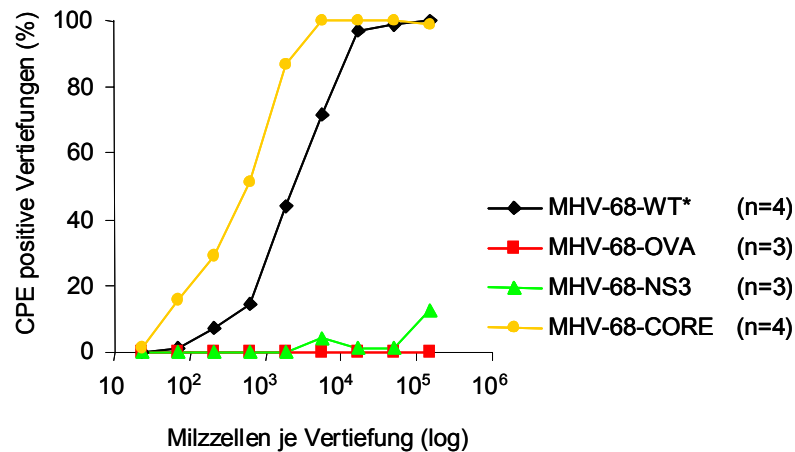
Abb. 4.3.2.1a Bestimmung des Milzgewichts nach intranasaler Infektion mit rekombinanten MHV-68. C57BL/6 Mäuse wurden i.n. mit  $5 \times 10^4$  PFU infiziert. An Tag 17 nach der Infektion wurde das Milzgewicht bestimmt. n, Zahl der Versuchstiere.



**Abb. 4.3.2.1b Bestimmung des Milzgewichts nach intraperitonealer Infektion mit rekombinanten MHV-68.** C57BL/6 Mäuse wurden i.p. mit  $1 \times 10^6$  PFU infiziert. An Tag 17 nach der Infektion wurde das Milzgewicht bestimmt. n, Zahl der Versuchstiere.

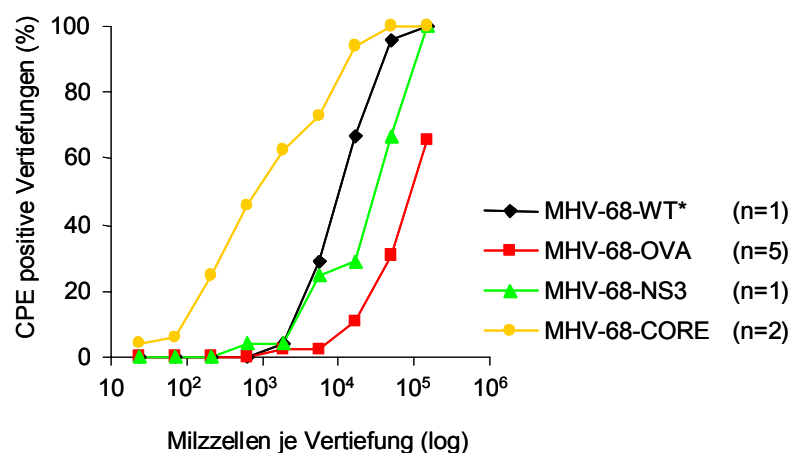
#### 4.3.2.2 Bestimmung der Frequenz reaktivierender Splenozyten nach Infektion mit rekombinanten MHV-68

Ein weiterer Parameter, der Aufschluss über das Latenzverhalten der rekombinanten MHV-68 geben kann, ist die Zahl der latent infizierten Milzzellen, in denen nach Etablierung der Latenz das MHV-68 Genom wieder in die lytische Phase eintreten kann. Diese Reaktivierung wird *ex vivo* durch den Kontakt mit Fibroblasten ausgelöst und kann in Reaktivierungs-Assays bestimmt werden. Dazu wurden die Splenozyten der Milzen verwendet, deren Gewicht zuvor gemessen wurde, die Milzzellen je Versuchsgruppe jedoch vereinigt. Zur Kontrolle, ob bereits lytisches Virus in den Milzzellen vorlag, wurde die Reaktivierung auch in Milzzellen bestimmt, die zuvor durch Frieren und Tauen mechanisch zerstört wurden (siehe 3.6.5). Ebenso wie bei der Bestimmung des Milzgewichts erfolgte die Messung der Reaktivierung sowohl nach i.n. als auch nach i.p. Infektion der Mäuse. Lag die Reaktivierung bei mindestens 63,5%, ließ sich auch die Häufigkeit der Reaktivierungsereignisse berechnen. Wie Abb. 4.3.2.2a verdeutlicht, spiegelten sich nach i.n. Infektion die Unterschiede im Milzgewicht auch in der Fähigkeit zur Reaktivierung wider. Während die Frequenz reaktivierender Zellen beim Wildtyp bei einer Milzzelle in 3700 lag, zeigten MHV-68-OVA und MHV-68-NS3 keine oder kaum Reaktivierung, so dass auch keine Frequenzberechnung möglich war. Im Gegensatz dazu ließ sich bei MHV-68-CORE deutlich höhere Reaktivierung als beim Wildtyp beobachten. So konnte bei MHV-68-CORE bereits eine in 790 Zellen reaktivieren, was somit eine 4,7-fach höhere Reaktivierung als beim Wildtyp bedeutete.



**Abb. 4.3.2.2a. Ex vivo Reaktivierung von Splenozyten nach i.n. Infektion von C57BL/6 Mäusen mit rekombinanten MHV-68.** C57BL/6 Mäuse wurden i.n. mit  $5 \times 10^4$  PFU infiziert. 17 Tage nach der Infektion erfolgte die Inkubation von 3-fach Verdünnungen der Splenozyten auf NIH3T3 Zellen. n, Zahl der zusammengefassten Experimente.

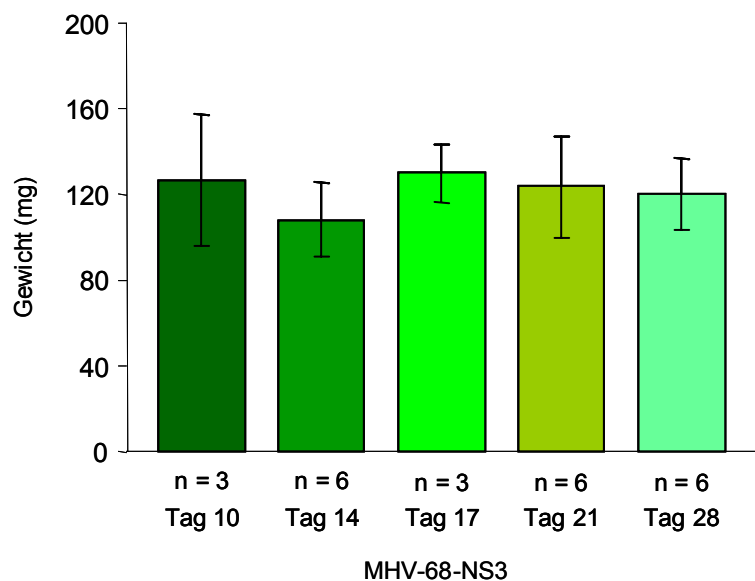
Wurde die Reaktivierung nach i.p. Infektion mit MHV-68-OVA oder MHV-68-NS3 betrachtet, so fiel auf, dass die Frequenz reaktivierender Milzzellen deutlich höher lag als nach i.n. Infektion. Während nach i.n. Infektion keine Frequenzberechnung möglich war, ergab sich für MHV-68-OVA, dass nach i.p. Infektion eine Milzzelle in  $1,4 \times 10^5$  zur Reaktivierung fähig war. Für MHV-68-NS3 erhöhte sich dieser Wert, so dass bereits eine in  $4,9 \times 10^4$  Splenozyten reaktivierte. Im Vergleich zum Wildtyp waren die Frequenzen, in Korrelation zu den Milzgewichten nach i.p. Infektion, bei MHV-68-OVA und MHV-68-NS3 niedriger. Die Reaktivierungsfrequenz des Wildtyps lag bei einer Milzzelle in  $1,4 \times 10^4$ . Im Gegensatz dazu ergab sich für MHV-68-CORE, verglichen mit dem Wildtyp, eine höhere Frequenz von einer reaktivierenden Milzzelle in 2000, obwohl bei den Milzgewichten kein Unterschied zwischen diesen Gruppen erkennbar war.



**Abb. 4.3.2.2b. Ex vivo Reaktivierung von Splenozyten nach i.p. Infektion von C57BL/6 Mäusen mit rekombinanten MHV-68.** C57BL/6 Mäuse wurden i.p. mit  $1 \times 10^6$  PFU infiziert. 17 Tage nach der Infektion erfolgte die Inkubation von 3-fach Verdünnungen der Splenozyten auf NIH3T3 Zellen. n, Zahl der zusammengefassten Experimente.

#### 4.3.2.3 Untersuchungen zur Infektionskinetik von MHV-68-NS3

Die Ergebnisse von MHV-68-OVA und MHV-68-NS3 hinsichtlich der Milzgewichte und Reaktivierung an Tag 17 nach i.n. Infektion von C57BL/6 Mäusen haben gezeigt, dass beide Viren einen attenuierten Phänotyp besitzen. Am Beispiel von MHV-68-NS3 sollte untersucht werden, ob die Insertion von NS3 möglicherweise zu einer Veränderung der Infektionskinetik führen und daher bei den Milzen zu einem anderen Zeitpunkt nach Infektion höhere Milzgewichte oder Reaktivierung beobachtet werden könnten. Zu diesem Zweck wurden beide Parameter an Tag 10, 14, 17, 21 und 28 bestimmt.

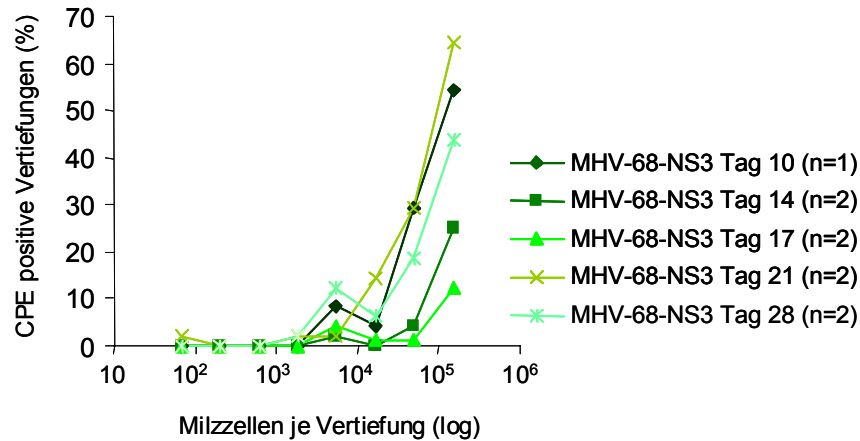


**Abb. 4.3.2.3a Kinetikstudien zum Milzgewicht nach intranasaler Infektion mit MHV-68-NS3.** C57BL/6 Mäuse wurden i.n. mit  $5 \times 10^4$  PFU infiziert und das Milzgewicht zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion bestimmt. n, Zahl der Versuchstiere.

Wie die Graphik 4.3.2.3a verdeutlicht, konnten außer einer leichten Gewichtsreduktion an Tag 14 keine Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden.

Betrachtet man die Reaktivierungsdaten (Abb. 4.3.2.3b), lässt sich an Tag 21 tendenziell die höchste Reaktivierungsrate beobachten. Das Ausmaß der Reaktivierung korreliert dabei nicht mit den Zeitpunkten nach der Infektion, da nach Tag 21 zuerst Tag 10, danach Tag 28 die nächsthöheren Reaktivierungswerte aufweisen. Tag 14 und nachfolgend Tag 17 zeigten die geringste Reaktivierung. Ein Vergleich der Frequenzen war wegen der fehlenden 63,5 % Werte nicht möglich. Aufgrund der Ergebnisse wurde bezüglich der Impfstudien für NS3 für die Messung der Milzgewichte und der Reaktivierung Tag 21 zur Milzentnahme festgesetzt.

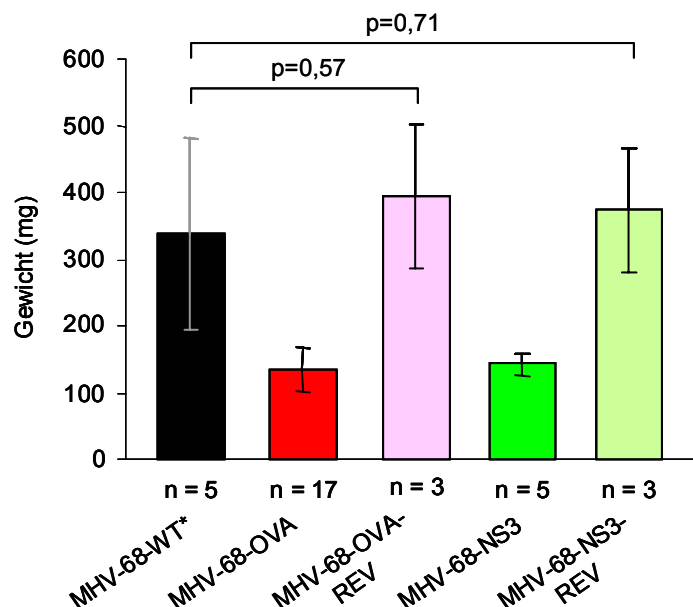




**Abb. 4.3.2.3b. Kinetikstudien zur *ex vivo* Reaktivierung von MHV-68-NS3.** C57BL/6 Mäuse wurden i.n. mit  $5 \times 10^4$  PFU infiziert und die *ex vivo* Reaktivierung zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion bestimmt. n, Zahl der Versuchstiere.

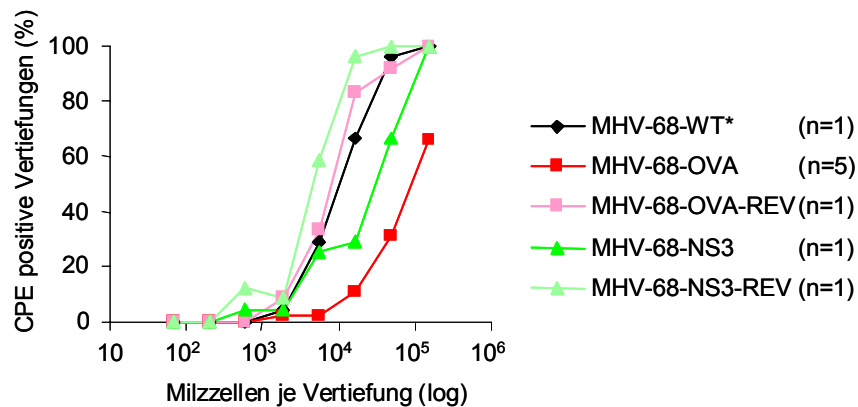
#### 4.3.2.4 Charakterisierung von MHV-68 Revertanten

Da MHV-68-OVA und MHV-68-NS3, verglichen mit dem Wildtyp, ein geringeres Maß an Splenomegalie und Reaktivierung zeigten, sollten Infektionsexperimente mit den zugehörigen Revertanten ausschließen, dass, außer der Insertion der zusätzlichen Gene, andere, ungewollte Modifikationen des MHV-68 Genoms für den attenuierten Phänotyp verantwortlich waren.



**Abb. 4.3.2.4a Vergleich der Milzgewichte nach intraperitonealer Infektion mit rekombinanten MHV-68 und deren Revertanten.** C57BL/6 Mäuse wurden i.p. mit  $1 \times 10^6$  PFU infiziert. 17 Tage nach der Infektion erfolgte die Bestimmung des Milzgewichts. n, Zahl der Versuchstiere.

Aus Abb. 4.3.2.4a geht hervor, dass durch das Entfernen der inserierten Gene *ova* und *ns3* der Phänotyp des Wildtyps hinsichtlich der Splenomegalie völlig rekonstituiert werden konnte. So erreichten die Revertanten von MHV-68-OVA und MHV-68-NS3 nach i.p. Infektion Milzgewichte, die mit dem mittleren Milzgewicht des Wildtyps vergleichbar waren ( $p=0,57$  bzw.  $p=0,71$ ).



**Abb. 4.3.2.4b Ex vivo Reaktivierung von rekombinanten MHV-68 und ihrer Revertanten.** C57BL/6 Mäuse wurden i.p. mit  $1 \times 10^6$  PFU infiziert. 17 Tage nach der Infektion erfolgte die Inkubation von 3-fach Verdünnungen der Splenozyten auf NIH3T3 Zellen. n, Zahl der zusammengefassten Experimente.

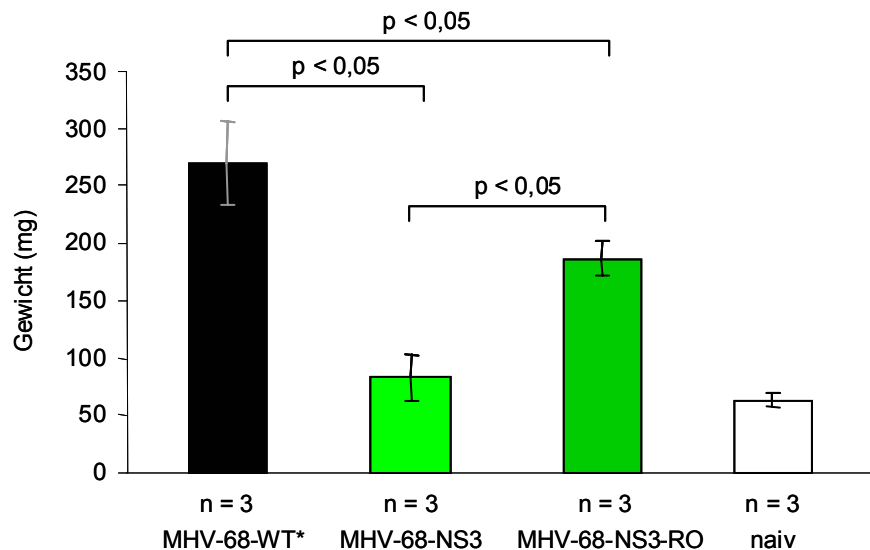
Die Reaktivierungsdaten (Abb. 4.3.2.4b) bestätigten dieses Ergebnis, da beide Revertanten ähnliche bzw. höhere Reaktivierungsfrequenzen als der Wildtyp aufwiesen. Während beim Wildtyp eine Milzzelle in 14600 Zellen reaktiviert, lag diese Zahl bei MHV-68-OVA-REV bei einer von 10100 Zellen. Bei MHV-68-NS3-REV ließ sich sogar eine Frequenz von einer reaktivierenden Milzzelle in 6000 beobachten.

#### 4.4 Untersuchungen zum attenuierten Phänotyp von MHV-68-NS3

Nach der Charakterisierung der Revertanten von MHV-68-OVA und MHV-68-NS3 sollte nun ein weiterer Ansatz die Ursache für den attenuierten Phänotyp der Mutanten klären. Am Beispiel von NS3 sollte geprüft werden, ob das Insert an sich oder das Genprodukt NS3 für die Attenuierung des Virus verantwortlich ist. Dazu wurde, wie in 4.1.1.3 beschrieben die Mutante MHV-68-NS3-RO (reverse Orientierung) hergestellt, die zwar das *ns3* Gen und damit die gleiche Insertgröße trägt, das Insert sich jedoch in reverser Orientierung befindet, so dass keine Expression von NS3 möglich sein sollte.

#### 4.4.1 Rekonstitution der Splenomegalie nach Infektion mit MHV-68-NS3-RO

Nach i.n. Infektion von C57BL/6 Mäusen mit rekombinantem MHV-68, das NS3 in der reversen Orientierung trägt, wurde beobachtet, dass die Splenomegalie im Vergleich zum Wildtyp nur partiell wiederhergestellt wurde. Zwar lag das Milzgewicht mit durchschnittlich 187 mg deutlich über dem von MHV-68-NS3 mit 83 mg ( $p < 0,05$ ), dennoch wurde das mittlere Milzgewicht des Wildtyps von 270 mg nicht erreicht ( $p < 0,05$ ).

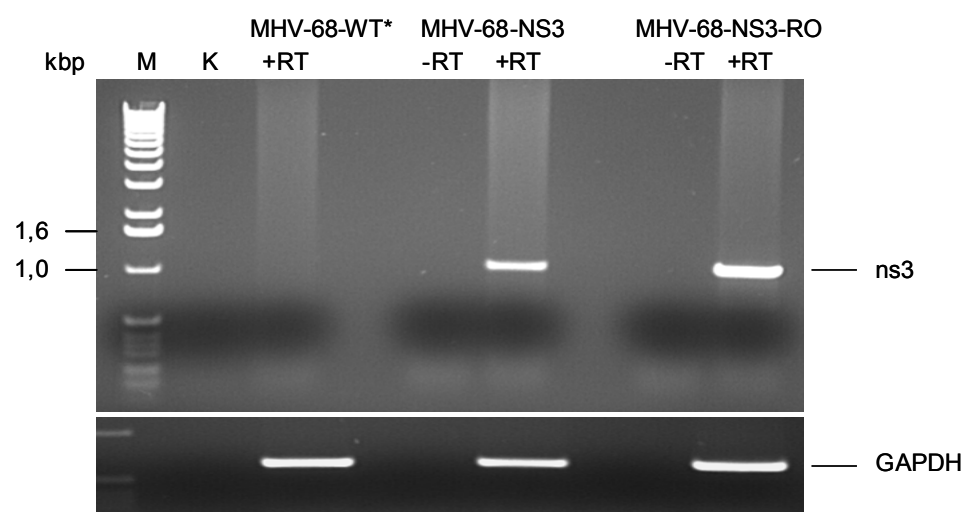


**Abb. 4.4.1 Partielle Rekonstitution der Splenomegalie mit NS3 in reverser Orientierung.** An Tag 17 nach i.n. Infektion von C57BL/6 Mäusen mit  $5 \times 10^4$  PFU wurde das Milzgewicht bestimmt. n, Zahl der Versuchstiere.

#### 4.4.2 mRNA Nachweis von NS3 in Zellkultur nach Infektion mit MHV-68-NS3-RO

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass die Splenomegalie nach Infektion mit MHV-68-NS3-RO nur zum Teil rekonstituiert werden konnte. Es wurde deshalb die Hypothese aufgestellt, dass das NS3 Gen vielleicht auch in der reversen Orientierung exprimiert werden könnte, allerdings aufgrund der reversen Orientierung nicht unter der Kontrolle des Promotors der Expressionskassette. Um festzustellen, ob NS3 möglicherweise durch einen benachbarten Promotor des MHV-68 Genoms exprimiert wird, wurde versucht, mRNA von NS3 in MHV-68-NS3-RO infizierten NIH3T3 Zellen mittels RT-PCR nachzuweisen. Aus Abb. 4.4.2 geht hervor, dass in Zellen, die mit MHV-68-NS3-RO infiziert wurden, das *ns3* Gen transkribiert wurde, obwohl der MCMV Promotor der Expressionskassette nicht in Transkriptionsrichtung des Gens liegt und somit, zumindest von diesem Promotor aus, keine Transkription erfolgen kann. Wie erwartet wurde nach der Infektion mit MHV-68-NS3 mRNA für NS3

nachgewiesen (Positivkontrolle). Durch Kontrollen, bei denen keine reverse Transkriptase zur cDNA Herstellung zugegeben wurde, konnte ausgeschlossen werden, dass das detektierte PCR-Signal von genomischer DNA stammt. Auch die Kontrollen, die H<sub>2</sub>O oder Wildtyp-cDNA enthielten, waren erwartungsgemäß negativ. Im Vergleich zu MHV-68-NS3 wurde bei MHV-68-NS3-RO ein stärkeres PCR-Signal beobachtet. Die Banden für GAPDH, das als interne Kontrolle für die eingesetzte cDNA Menge diente, zeigten jedoch, dass unterschiedliche Ausgangsmengen an cDNA verwendet wurden.



**Abb. 4.4.2 PCR zum Nachweis von NS3-mRNA in infizierten NIH3T3 Zellen.** NIH3T3 Zellen wurden mit MHV-68 (MOI 1) infiziert und nach 24 h RNA isoliert. Nach Herstellung von cDNA erfolgte der Nachweis mittels PCR. M, Marker; K, H<sub>2</sub>O-Kontrolle; RT, reverse Transkriptase; GAPDH, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase.

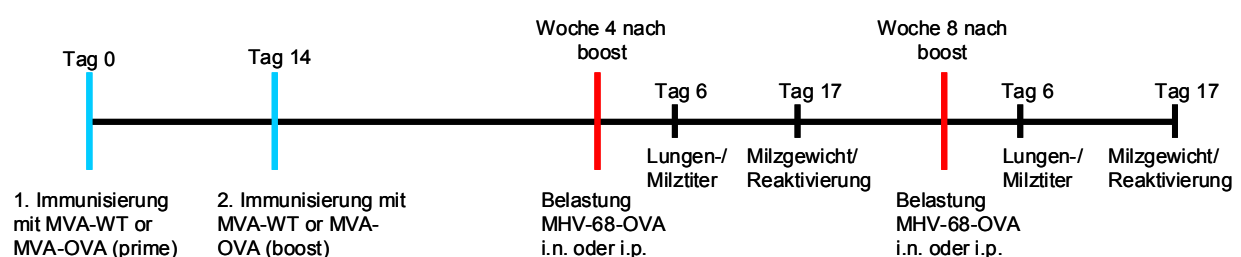
Nach der Analyse von MHV-68-OVA, MHV-68-NS3 und MHV-68-CORE hinsichtlich ihrer genomischen Struktur und ihres Wachstumsverhaltens *in vitro* und *in vivo* konnten die Vorstudien zur Charakterisierung der rekombinanten MHV-68 abgeschlossen werden. Somit folgen nun die Immunisierungsexperimente, die MHV-68 als chronisches Infektionsmodell zur Untersuchung von Vakzinen etablieren sollen.

#### 4.5 Untersuchung der Schutzwirkung von MVA-OVA vor einer Belastungsinfektion mit MHV-68-OVA

Für die Etablierung eines Mausmodells zur Untersuchung von Vakzinen auf der Basis von Hepatitis C Virus-Antigenen galt es zunächst, die Schutzwirkung einer Immunisierung mit MVA anhand eines Modellantigens zu testen. Zu diesem Zweck wurde Ovalbumin als Modellantigen eingesetzt, da es als sehr immunogenes Protein gilt und es daher möglich machen sollte, Ovalbumin-spezifische T-Zellantworten nach Immunisierung zu messen sowie Route und Zeitpunkt einer Belastungsinfektion mit MHV-68 zu untersuchen. Die Beurteilung eines Impfschutzes nach einer *prime-boost* (Initial- und Folge- bzw. 1. und 2. Immunisierung) Vakzinierung mit MVA-OVA bedeutet, messbare Parameter sowohl einer akuten als auch chronischen Infektion mit MHV-68-OVA spezifisch zu bestimmen bzw. deren Manifestierung gänzlich zu verhindern. Analysiert wurde die Impfeffizienz zum einen durch die Messung dieser *in vivo* Parameter nach Belastung mit MHV-68-OVA, zum anderen durch die Detektion Ovalbumin-spezifischer T-Zellantworten in *ex vivo* Versuchen.

##### 4.5.1 Reduktion MHV-68-OVA induzierter Parameter nach Belastungsinfektion *in vivo*

Wie schon die Vorversuche zur Charakterisierung von MHV-68-OVA gezeigt haben, ließen sich *in vivo* sowohl nach i.n. als auch nach i.p. Infektion MHV-68-spezifische Parameter bestimmen, die bei den Impfstudien zur Untersuchung der Schutzwirkung von MVA-OVA herangezogen werden konnten.



**Abb. 4.5.1 Schematische Darstellung der getesteten Immunisierungs-/Belastungsregimen.** Nach der 1. (*prime*) und 2. (*boost*) i.p. Immunisierung mit je  $1 \times 10^7$  IE MVA-WT bzw. MVA-OVA erfolgte 4 oder 8 Wochen nach der 2. Immunisierung die Belastungsinfektion mit MHV-68-OVA. Für i.n. Infektion wurden  $5 \times 10^4$ , für i.p. Infektion  $1 \times 10^6$  PFU eingesetzt. Jeweils 6 Tage nach Belastungsinfektion wurden Virustiter in der Lunge bzw. Milz, 17 Tage nach Belastungsinfektion Milzgewicht und Reaktivierung gemessen.

Um eine effiziente Impfwirkung von MVA-OVA ermitteln zu können, wurde wie in Abb. 4.5.1 dargestellt, die Belastungsinfektion zu verschiedenen Zeitpunkten (4 oder 8 Wochen) nach der 2. Immunisierung mit MVA-OVA mittels unterschiedlicher Infektionsrouten durchgeführt (i.n oder i.p.). Anschließend erfolgte jeweils die Messung der Lungen- bzw. Milztiter (Tag 6), des Milzgewichts (Tag 17) und der Reaktivierung (Tag 17). Damit wurde mit der Messung von Virustitern der Lunge und Milz die akute, lytische Phase als auch mit der Bestimmung des Milzgewichts und der Reaktivierung die chronische, latente Phase der MHV-68 Infektion für eine Untersuchung der Schutzwirkung von MVA berücksichtigt.

Als effizient bei der Analyse der Impfwirkung wurden die Immunisierungs-/Belastungsregimen angesehen, die bei den gemessenen Parametern signifikante Unterschiede zur Kontrollimpfung mit MVA-WT hervorriefen. Diese Kombinationen wurden schließlich sowohl für die Wiederholungsexperimente mit MHV-68-OVA als auch für die Impfstudien mit NS3 beibehalten und werden im weiteren Verlauf der Arbeit präsentiert. Sie sind in Tabelle 4.5.1 zusammengefasst.

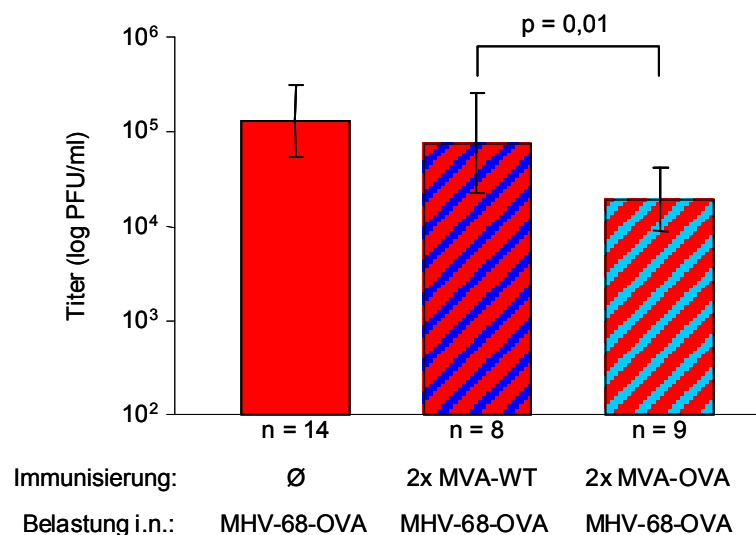
| Initial-/Folge-<br>(prime/boost)<br>Immunisierung | Belastung  | Zeitpunkt der<br>Belastung nach boost | Route | Zeitpunkt<br>nach<br>Belastung | Gemessener<br>Parameter  |
|---|------------|---------------------------------------|-------|--------------------------------|--|
| 2x MVA-WT<br>bzw. 2x MVA-<br>OVA                  | MHV-68-OVA | 8 Wochen                              | i.n.  | Tag 6                          | Virustiter Lunge   |
| 2x MVA-WT<br>bzw. 2x MVA-<br>OVA                  | MHV-68-OVA | 8 Wochen                              | i.p.  | Tag 6                          | Virustiter Milz  |
| 2x MVA-WT<br>bzw. 2x MVA-<br>OVA                  | MHV-68-OVA | 4 Wochen                              | i.p.  | Tag 17                         | Milzgewicht,<br>Reaktivierung,<br>T-Zellantworten<br>(ICS, Tetramer) |
| 2x MVA-WT<br>bzw. 2x MVA-<br>OVA                  | MHV-68-OVA | 8 Wochen                              | i.n.  | Tag 17                         | Milzgewicht,<br>Reaktivierung,<br>T-Zellantworten<br>(ICS, Tetramer) |

**Tab. 4.5.1 Für die Untersuchung der Schutzwirkung von MVA-OVA verwendete Impf-/Belastungsschemata und gemessene Parameter.** MVA-WT, Kontrollimpfung; ICS, *intracellular cytokine staining*, intrazelluläre Zytokinfärbung; Tetramer, Ovalbumin-spezifische Tetramerfärbung.

Die Untersuchung von T-Zellantworten mittels intrazellulärer Zytokinfärbung (*intracellular cytokine staining*, ICS) und Tetramerfärbung wurde erst nach der Etablierung der verwendeten Impf-/Belastungsschemata zur Analyse der Impfwirkung hinzugenommen.

#### 4.5.1.1 Reduktion von lytischem Virus in der Lunge

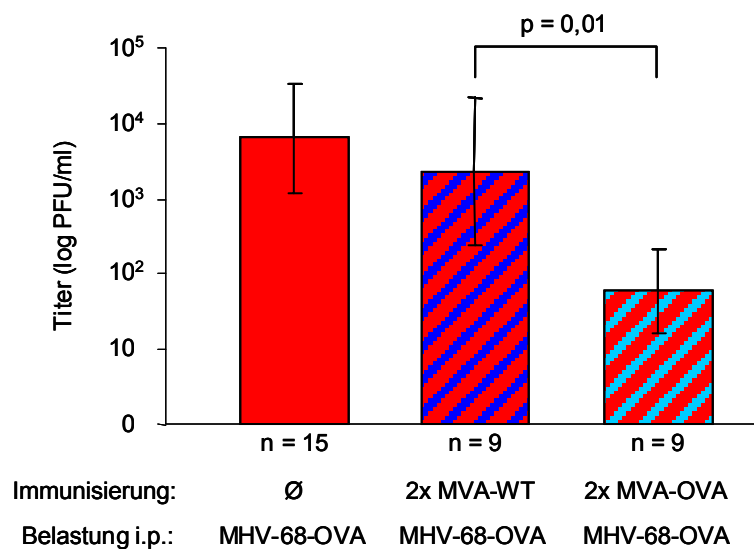
Durch die Bestimmung des Virustiters in der Lunge nach Immunisierung mit MVA-OVA ließ sich eine Aussage darüber machen, inwieweit die Impfung Parameter der akuten Phase einer MHV-68-OVA Infektion beeinflussen konnte. Abb. 4.5.1.1 verdeutlicht, dass eine spezifische Vakzinierung mit MVA-OVA zwar nicht gänzlich vor einer Infektion mit MHV-68-OVA (8 Wochen nach *boost*) schützt, jedoch den Virustiter in der Lunge um das 5-fache ( $p=0,01$ ) im Vergleich zur Kontrollimpfung mit MVA-WT reduzieren konnte (3 unabhängige Experimente). Die Kontrollvakzinierung ließ dabei keinen Impfeffekt erkennen, da die durchschnittlichen Titer keinen Unterschied zu den Titern einer Belastungsinfektion mit MHV-68-OVA ohne Immunisierung aufwiesen ( $p=0,22$ ). Die Gruppe ohne Immunisierung sollte des Weiteren zeigen, dass die Belastungsinfektion mit MHV-68-OVA erfolgreich war.



**Abb. 4.5.1.1 Reduktion der Titer von MHV-68-OVA in der Lunge nach spezifischer Immunisierung mit MVA-OVA.** C57BL/6 Mäuse wurden an Tag 0 und an Tag 14 mit je  $1 \times 10^7$  IE MVA-WT oder MVA-OVA i.p. immunisiert. Eine Kontrollgruppe blieb ohne Immunisierung. 8 Wochen nach der 2. Immunisierung folgte die Belastungsinfektion mit MHV-68-OVA ( $5 \times 10^4$  PFU; i.n.). An Tag 6 nach Belastung wurde der Virustiter in der Lunge durch einen Plaque-Assay ermittelt. n, Zahl der Versuchstiere.

#### 4.5.1.2 Reduktion von lytischem Virus in der Milz

Der Virustiter von MHV-68-OVA in der Milz stellte neben den Titern in der Lunge einen weiteren Parameter der akuten Phase einer MHV-68 Infektion zur Untersuchung einer Impfwirkung von MVA-OVA dar. Wie schon bei den Virustitern der Lunge ließ sich auch hier eine Ovalbumin-spezifische, allerdings 100-fache, signifikante ( $p=0,01$ ) Reduktion der MHV-68-OVA Titer in der Milz beobachten, nachdem die Tiere mit MVA-OVA immunisiert wurden (Abb. 4.5.1.2). Die Kontrollvakzinierung mit MVA-WT konnte keine Titerreduktion bewirken, wie der Vergleich mit der Gruppe ohne Impfung verdeutlicht ( $p=0,5$ ). Die Belastung mit MHV-68-OVA erfolgte 8 Wochen nach der 2. Immunisierung.



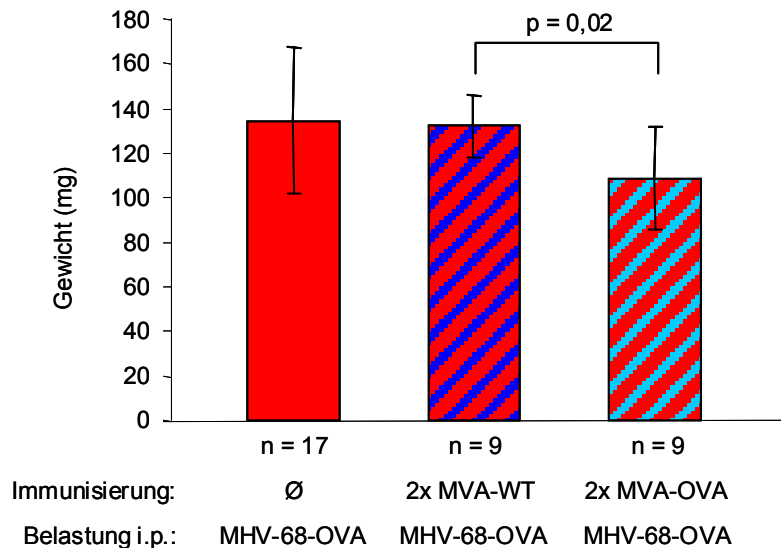
**Abb. 4.5.1.2 Reduktion der Titer von MHV-68-OVA in der Milz nach spezifischer Immunisierung mit MVA-OVA.** C57BL/6 Mäuse wurden an Tag 0 und an Tag 14 mit je  $1 \times 10^7$  IE MVA-WT oder MVA-OVA i.p. immunisiert. Eine Kontrollgruppe blieb ohne Immunisierung. 8 Wochen nach *boost* folgte die Belastungsinfektion mit MHV-68-OVA ( $1 \times 10^6$  PFU; i.p.). An Tag 6 nach Belastung wurde der Virustiter in der Milz durch einen Plaque-Assay ermittelt. n, Zahl der Versuchstiere.

#### 4.5.1.3 Reduktion von Splenomegalie und Splenozytenzahl

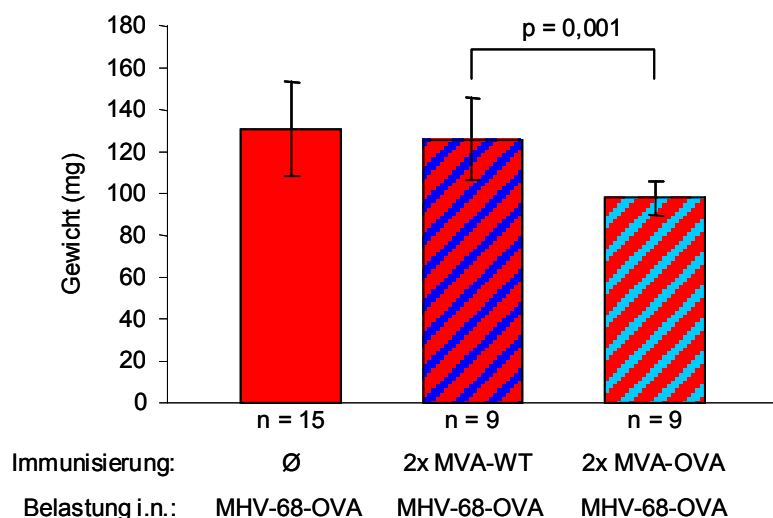
Neben der Reduktion der lytischen Viruslast als Parameter der akuten Phase einer MHV-68 Infektion war es in Hinblick auf die Antigene NS3 und CORE des chronischen Hepatitis C Viruses wichtig, die Schutzwirkung von rekombinantem MVA bei der Etablierung der chronischen Phase der MHV-68 Infektion zu analysieren. Als ein Parameter dieser Infektionsphase wurden die Splenomegalie und Splenozytenzahl nach Immunisierung mit MVA-OVA sowohl nach i.n. als auch nach i.p. Belastung mit MHV-68-OVA gemessen. Da



die Zahl der Milzzellen mit dem Gewicht der Milzen korrelierte, werden diese Daten nicht gezeigt. Wie aus Abb. 4.5.1.3a hervorgeht, konnte man bei einer Vakzinierung mit MVA-OVA nach i.p. Belastung mit MHV-68-OVA (4 Wochen nach *boost*) eine im Vergleich zur Kontrollimpfung signifikante Reduktion ( $p=0,02$ ) des Milzgewichts beobachten (3 unabhängige Experimente).



**Abb. 4.5.1.3a Reduktion der von MHV-68-OVA induzierten Splenomegalie nach spezifischer Immunsierung mit MVA-OVA.** C57BL/6 Mäuse wurden an Tag 0 und Tag 14 je mit  $1 \times 10^7$  IE MVA-WT oder MVA-OVA i.p. immunisiert. Eine Kontrollgruppe blieb ohne Immunsierung. 4 Wochen nach der 2. Immunsierung folgte die Belastungsinfektion mit MHV-68-OVA (i.p.,  $1 \times 10^6$  PFU). An Tag 17 nach Belastung wurde das Milzgewicht bestimmt. n, Zahl der Versuchstiere.



**Abb. 4.5.1.3b Reduktion der von MHV-68-OVA induzierten Splenomegalie nach spezifischer Immunsierung mit MVA-OVA.** C57BL/6 Mäuse wurden an Tag 0 und Tag 14 je mit  $1 \times 10^7$  IE MVA-WT oder MVA-OVA i.p. immunisiert. Eine Kontrollgruppe blieb ohne Immunsierung. 8 Wochen nach *boost* folgte die Belastungsinfektion mit MHV-68-OVA (i.n.,  $5 \times 10^4$  PFU). An Tag 17 nach Belastung wurde das Milzgewicht bestimmt. n, Zahl der Versuchstiere.

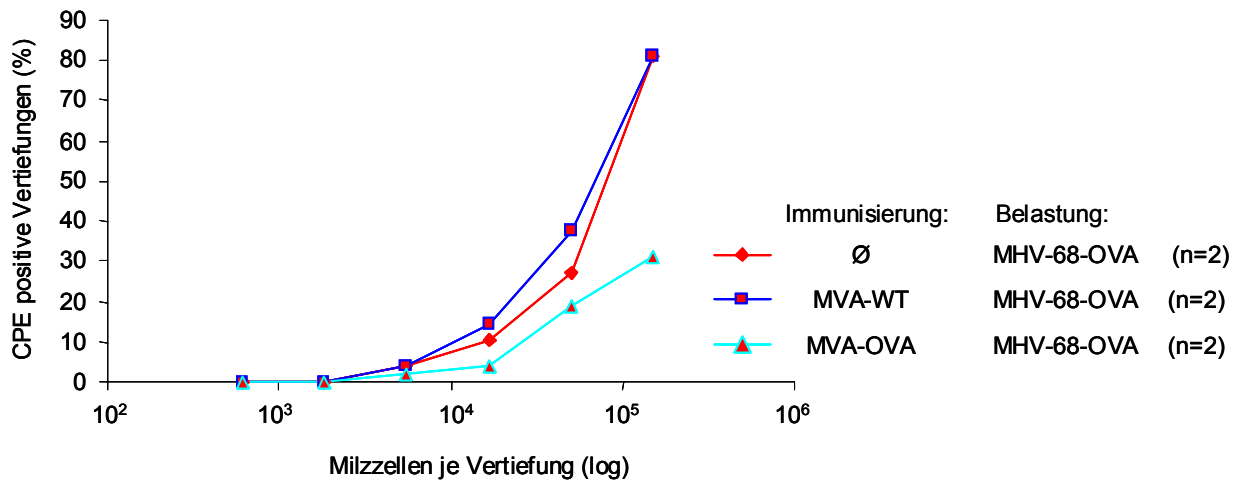
Wurden die Tiere mit MHV-68-OVA intranasal 8 Wochen nach der 2. Immunisierung belastet, war ebenso eine signifikante Verringerung ( $p=0,001$ ) des Milzgewichts festzustellen, wenn mit MVA-OVA immunisiert wurde (Abb. 4.5.1.3b). Erfolgte die Vakzinierung jedoch mit MVA-WT, konnte man, wie der Vergleich mit der Gruppe ohne Impfung verdeutlicht, keinen Effekt erkennen.

#### **4.5.2 Untersuchung Ovalbumin-spezifischer Immunantworten in *ex vivo* Versuchen**

Nach der Messung MHV-68-OVA spezifischer Parameter *in vivo* sollten Versuche *ex vivo* weiteren Aufschluss über den Impfeffekt von MVA-OVA geben. Dazu gehörten zum einen die Bestimmung der Reaktivierung von Milzzellen und zum anderen die Quantifizierung Ovalbumin-spezifischer T-Lymphozyten mittels intrazellulärer Zytokinfärbung und Tetramerfärbung nach einer Belastungsinfektion mit MHV-68-OVA. Des Weiteren sollten intrazelluläre Zytokinfärbungen und Zytotoxizitätstests zeigen, inwiefern sich MHV-68-OVA durch *in vitro* Infektion von Fibroblasten zur Amplifizierung Ovalbumin-spezifischer T-Lymphozyten eignet. Die Auswertung von ICS und Tetramerfärbungen erfolgten mittels Durchflusszytometrie.

##### **4.5.2.1 Bestimmung der Frequenz reaktivierender Splenozyten nach Belastungsinfektion mit MHV-68-OVA**

Neben der Analyse der Splenomegalie nach den Belastungsinfektionen mit MHV-68-OVA konnten die Milzzellen aus einem Teil dieser Experimente (siehe 4.5.1.3) auch zur Messung der Reaktivierung verwendet werden, um einen Impfeffekt durch MVA-OVA zu untersuchen. Abb. 4.5.2.1a zeigt die zusammengefassten Reaktivierungsdaten zweier unabhängiger Experimente, bei denen mit MVA-WT oder MVA-OVA vakziniert und 4 Wochen nach *boost* mit MHV-68-OVA belastet wurde.



**Abb. 4.5.2.1a Reduktion der Frequenz reaktivierender Milzzellen nach spezifischer Immunisierung mit MVA-OVA.** C57BL/6 Mäuse (3 je Gruppe) wurden an Tag 0 und Tag 14 je mit  $1 \times 10^7$  IE MVA-WT oder MVA-OVA i.p. immunisiert. Eine Kontrollgruppe blieb ohne Immunisierung. 4 Wochen nach *boost* folgte die Belastungsinfektion mit MHV-68-OVA (i.p.,  $1 \times 10^6$  PFU). An Tag 17 nach Belastung wurden die Milzzellen je Gruppe vereinigt und die Reaktivierung in 3-fach Verdünnungen bestimmt. n, Zahl der zusammengefassten Experimente.

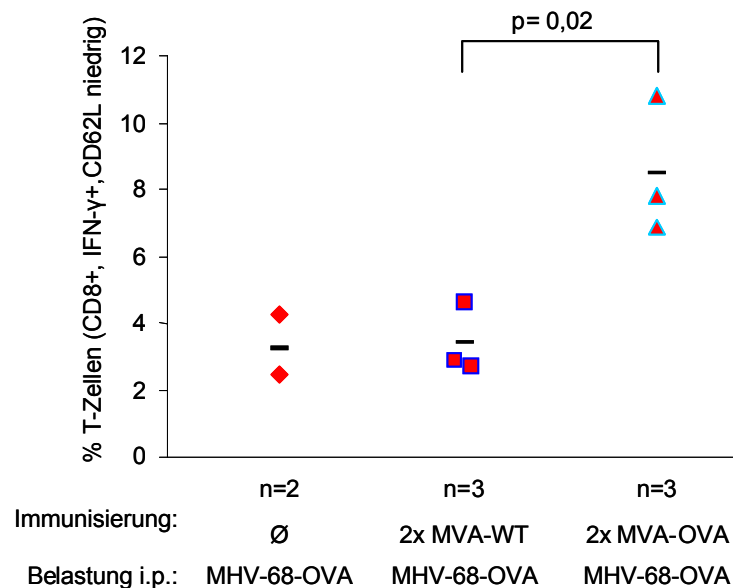
Während die Versuchsgruppe ohne Immunisierung bzw. mit Kontrollvakzinierung wie erwartet ähnliche Frequenzen (eine reaktivierende Milzzelle in  $1 \times 10^5$  bzw. eine in  $1,2 \times 10^5$ ) aufwies, war die Reaktivierung nach spezifischer Impfung mit MVA-OVA soweit reduziert, dass keine Frequenzberechnung möglich war.

In den Impfexperimenten, bei denen 8 Wochen nach *boost* i.n. mit MHV-68-OVA belastet worden war, ließ sich, wie schon die Vorversuche mit MHV-68-OVA gezeigt haben (siehe 4.3.2.2), in keiner der Versuchsgruppen eine Reaktivierung beobachten. Daher war auch hinsichtlich der Reaktivierung keine Aussage über den Impfeffekt von MVA-OVA möglich.

#### 4.5.2.2 Detektion Ovalbumin-spezifischer T-Lymphozyten durch intrazelluläre IFN $\gamma$ -Färbung nach Belastungsinfektion mit MHV-68-OVA

Die Reduktion MHV-68-OVA spezifischer Splenomegalie und Reaktivierung hat einen Vakzinierungseffekt von MVA-OVA deutlich gemacht. In einem weiteren Schritt galt es nun, auf immunologisch-zellulärer Ebene herauszufinden, inwieweit CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten an diesem Effekt beteiligt sind. Daher wurden Milzzellen aus einem Teil der Versuche zur Splenomegaliereduktion neben der Analyse der Reaktivierung auch zur intrazellulären Zytokinfärbung genutzt, um Ovalbumin-spezifische, CD8<sup>+</sup> und IFN $\gamma$ -produzierende T-Zellen

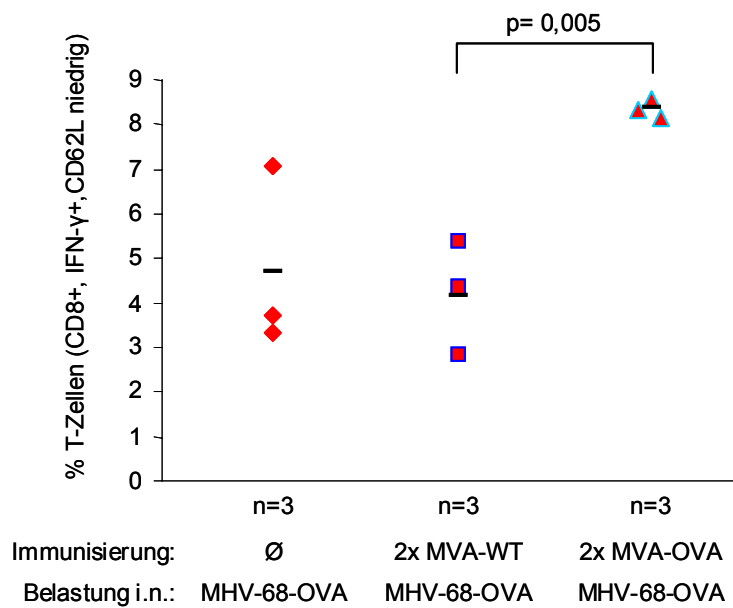
zu detektieren. Die Detektion erfolgte nach Stimulation der Zellen mit dem Ovalbumin-spezifischen Epitop SIINFEKL oder dem Kontrollpeptid  $\beta$ -Gal.



**Abb. 4.5.2.2a Erhöhung des Anteils Ovalbumin-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Immunisierung mit MVA-OVA und i.p. Belastungsinfektion mit MHV-68-OVA.** C57BL/6 Mäuse wurden wie in 4.5.1.3a beschrieben immunisiert und belastet (4 Wochen nach 2. Immunisierung, i.p.). Milzzellen wurden an Tag 17 nach Belastung mit SIINFEKL oder einem Kontrollpeptid stimuliert und schließlich mittels intrazellulärer Zytokinfärbung der Anteil lebender, CD8<sup>+</sup>, aktivierter (CD62L niedrig) und IFN $\gamma$ -produzierender T-Lymphozyten bestimmt. n, Zahl der Versuchstiere.

Aus Abb. 4.5.2.2a geht hervor, dass die Vakzinierung mit MVA-OVA den Anteil an IFN $\gamma$ -produzierenden, aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten nach einer i.p. Belastung mit MHV-68-OVA (4 Wochen nach der 2. Immunisierung) signifikant ( $p=0,02$ ) erhöhen konnte. Während der Anteil dieser Zellen nach Impfung mit MVA-OVA bei durchschnittlich 8,5% lag, zeigten die Kontrollen erwartungsgemäß niedrigere Werte. Die Versuchsgruppe ohne Immunisierung erreichte 3,2%, die Gruppe mit Kontrollimpfung 3,4%. Wurden die Milzzellen nicht mit SIINFEKL, sondern einem irrelevantem Peptid stimuliert, ließen sich wie erwartet keine CD8<sup>+</sup> T-Zellen detektieren (Daten nicht gezeigt).

Auch in den Experimenten, bei denen 8 Wochen nach der 2. Immunisierung i.n. mit MHV-68-OVA belastet wurde, konnte ein erhöhter Anteil Ovalbumin-spezifischer, aktivierter IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten nach Vakzinierung mit MVA-OVA nachgewiesen werden (Abb. 4.5.2.2b).



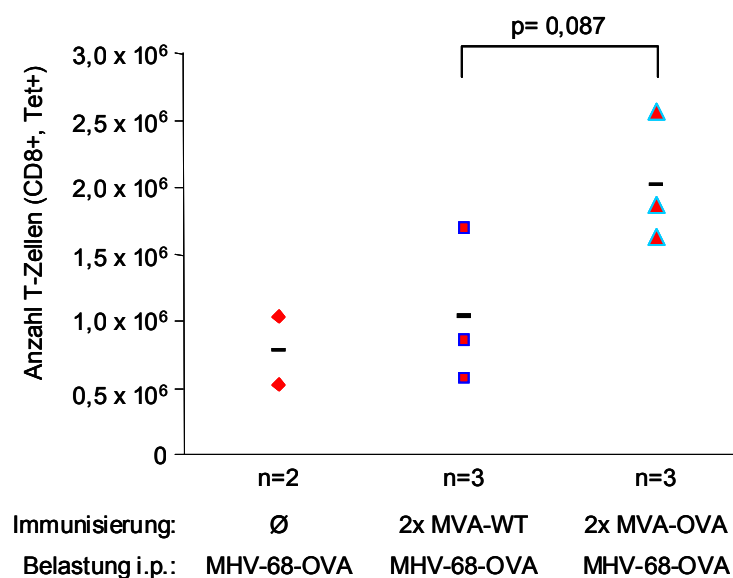
**Abb. 4.5.2.2b Erhöhung des Anteils Ovalbumin-spezifischer CD8+ T-Zellen nach Immunisierung mit MVA-OVA und i.n. Belastungsinfektion mit MHV-68-OVA.** C57BL/6 Mäuse wurden wie in 4.5.1.3b beschrieben immunisiert und belastet (8 Wochen nach 2. Immunisierung, i.n.). Milzzellen wurden an Tag 17 nach Belastung mit SIINFEKL oder einem Kontrollpeptid stimuliert und schließlich mittels intrazellulärer Zytokinfärbung der Anteil CD8+, aktivierter (CD62L niedrig) und IFN $\gamma$ -produzierender T-Lymphozyten bestimmt. n, Zahl der Versuchstiere.

Nach Immunisierung mit MVA-OVA waren mit durchschnittlich 8,4 % signifikant ( $p=0,005$ ) mehr Ovalbumin-spezifische CD8+ T-Zellen vorhanden als nach Kontrollvakzinierung mit 4,2 %, deren Wert mit dem der Gruppe ohne Immunisierung von 4,7% vergleichbar war. Alle Kontrollen mit irrelevantem Peptid waren erwartungsgemäß negativ (Daten nicht gezeigt).

#### 4.5.2.3 Detektion Ovalbumin-spezifischer T-Lymphozyten durch Tetramerfärbung nach Belastungsinfektion mit MHV-68-OVA

Eine weitere Möglichkeit, einen spezifischen Impfeffekt von MVA-OVA nachzuweisen, ist die Detektion Ovalbumin-spezifischer T-Lymphozyten mittels Bindung an MHC I-Tetramerkomplexe, die mit dem Peptid SIINFEKL beladen sind. Als Kontrolle für die Spezifität der Bindung dienten Tetramere mit einem irrelevanten Peptid. Der Anteil der T-Lymphozyten, die unspezifisch an das Kontrollpeptid banden, wurde von dem Anteil SIINFEKL-Tetramer bindender Zellen subtrahiert.

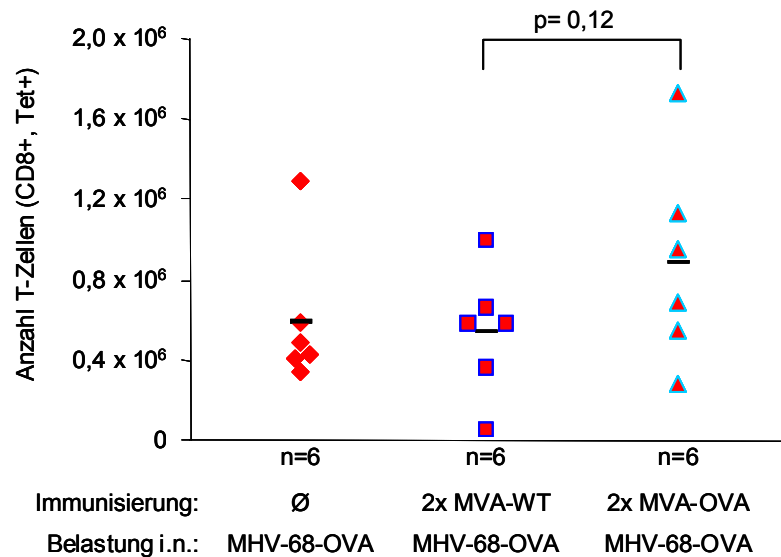
Die Milzzellen aus einem Teil der Belastungsexperimente mit MHV-68-OVA konnten direkt ohne Peptidstimulation, wie dies bei der intrazellulären Zytokinfärbung der Fall war, für die Tetramerfärbung verwendet werden. Die Anzahl SIINFEKL-Tetramer-positiver CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde sowohl für i.p. (4 Wochen nach *boost*) als auch i.n. (8 Wochen nach *boost*) Belastungsexperimente bestimmt (vgl. 4.5.1.3). Abb. 4.5.2.3a verdeutlicht bei i.p. Belastung (4 Wochen nach *boost*), dass eine Vakzinierung mit MVA-OVA die Zahl an CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten, die SIINFEKL-Tetramere binden, erhöhen konnte. Zwar ließen sich mit  $2 \times 10^6$  Zellen doppelt so viele Ovalbumin-spezifische T-Lymphozyten wie in der Gruppe mit Kontrollimpfung nachweisen ( $1 \times 10^6$ ), der Unterschied erreichte jedoch wegen der hohen Streuung der Werte und der geringen Zahl getesteter Versuchstiere ( $n=3$ ) noch keine statistische Signifikanz ( $p=0,087$ ). Die Werte der Kontrollimpfung waren wie erwartet mit denen der Gruppe ohne Immunisierung ( $0,77 \times 10^6$ ) vergleichbar.



**Abb. 4.5.2.3a.** Erhöhung des Anteils Ovalbumin-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Immunisierung mit MVA-OVA und i.p. Belastungsinfektion mit MHV-68-OVA. C57BL/6 Mäuse wurden wie in 4.5.1.3a beschrieben immunisiert und belastet (4 Wochen nach *boost*, i.p.). Milzzellen wurden an Tag 17 nach Belastung mit SIINFEKL-Tetramer oder einem Kontrolltetramer inkubiert und schließlich der Anteil CD8- und Tetramer-positiver T-Lymphozyten bestimmt. n, Zahl der Versuchstiere.

Bei i.n. Belastung mit MHV-68-OVA 8 Wochen nach *boost* ließ sich, in zwei unabhängigen Experimenten, ebenso ein erhöhter Anteil SIINFEKL-Tetramer-positiver T-Zellen ( $0,9 \times 10^6$ ) nachweisen, ein signifikanter Unterschied war jedoch im Vergleich zur Kontrollimpfung ( $0,6 \times 10^6$ ) nicht vorhanden ( $p=0,12$ ), da die Werte einer hohen Streuung unterlagen. Der

Anteil der T-Lymphozyten nach Kontrollimmunisierung lag im Bereich der Zellzahlen der Gruppe ohne Immunisierung ( $0,54 \times 10^6$ ) (Abb. 4.5.2.3b).

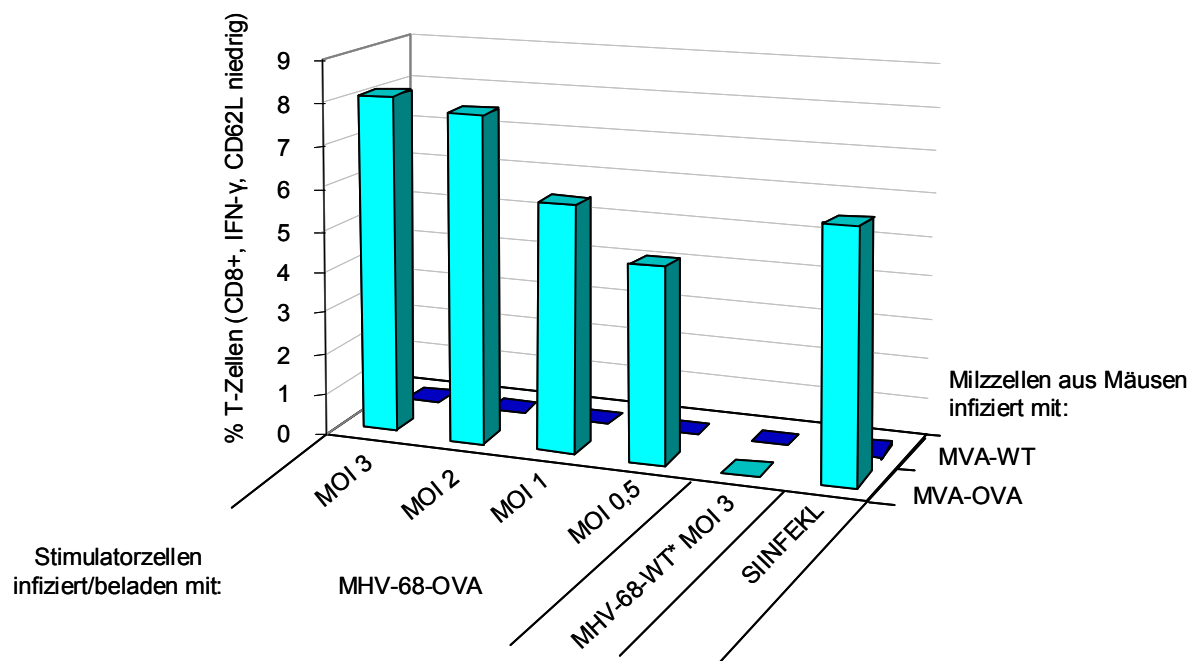


**Abb. 4.5.2.3b. Erhöhung des Anteils Ovalbumin-spezifischer CD8+ T-Zellen nach Immunisierung mit MVA-OVA und i.n. Belastungsinfektion mit MHV-68-OVA.** C57BL/6 Mäuse wurden wie in 4.5.1.3a beschrieben immunisiert und belastet (8 Wochen nach *boost*, i.n.). Milzzellen wurden an Tag 17 nach Belastung mit SIINFEKL-Tetramer oder einem Kontrolltetramer inkubiert und schließlich der Anteil CD8- und Tetramer-positiver T-Lymphozyten bestimmt. n, Zahl der Versuchstiere.

#### 4.5.2.4 Detektion Ovalbumin-spezifischer T-Lymphozyten durch intrazelluläre IFN $\gamma$ -Färbung nach Immunisierung (ohne Belastungsinfektion)

Neben der Eignung als Belastungsvirus zur Validierung von MVA Impfstoffen, sollte auch getestet werden, ob MHV-68-OVA als Stimulator eingesetzt werden kann, um *ex vivo* Ovalbumin-spezifische T-Lymphozyten zu vermehren. Zu diesem Zweck wurden MC3T3 Fibroblasten, die *in vitro* mit MHV-68-OVA infiziert worden waren, als Stimulator für Milzzellen aus MVA-OVA-immunisierten Mäusen eingesetzt. Die Infektion sollte die Prozessierung und Präsentation von Ovalbumin-Epitopen ermöglichen. Abb. 4.5.2.4 zeigt das Ergebnis einer intrazellulären Zytokinfärbung, bei der Stimulatorzellen mit verschiedenen MOIs mit MHV-68-OVA oder mit MHV-68-WT (Negativkontrolle) infiziert wurden. Die Beladung der Zellen mit dem SIINFEKL-Peptid diente als Positivkontrolle. Die Messung von IFN $\gamma$ -produzierenden, aktivierten CD8+ T-Lymphozyten aus MVA infizierten Mäusen machte deutlich, dass nur dann T-Zellen aus MVA-OVA-immunisierten Mäusen amplifiziert

wurden, wenn sie mit SIINFEKL-beladenen oder mit MHV-68-OVA-infizierten Stimulatorzellen inkubiert wurden. Der Anteil dieser T-Zellen war dabei von der eingesetzten MOI von MHV-68-OVA abhängig. So konnten 8,1% Ovalbumin-spezifische CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten bei einer MOI von 3, 7,8% bei einer MOI von 2, 5,9% bei einer MOI von 1 und 4,6% bei einer MOI von 0,5 nachgewiesen werden. Wurden jedoch mit MHV-68-WT\*-infizierte Fibroblasten zur Stimulation eingesetzt, konnten, wie erwartet, keine CD8<sup>+</sup>-T-Zellen amplifiziert werden. Auch die Verwendung von Milzzellen aus MVA-WT-immunisierten Mäusen konnte die Ovalbumin-restringierte Spezifität der Amplifikation bestätigen, da keine T-Zellen nachgewiesen werden konnten.



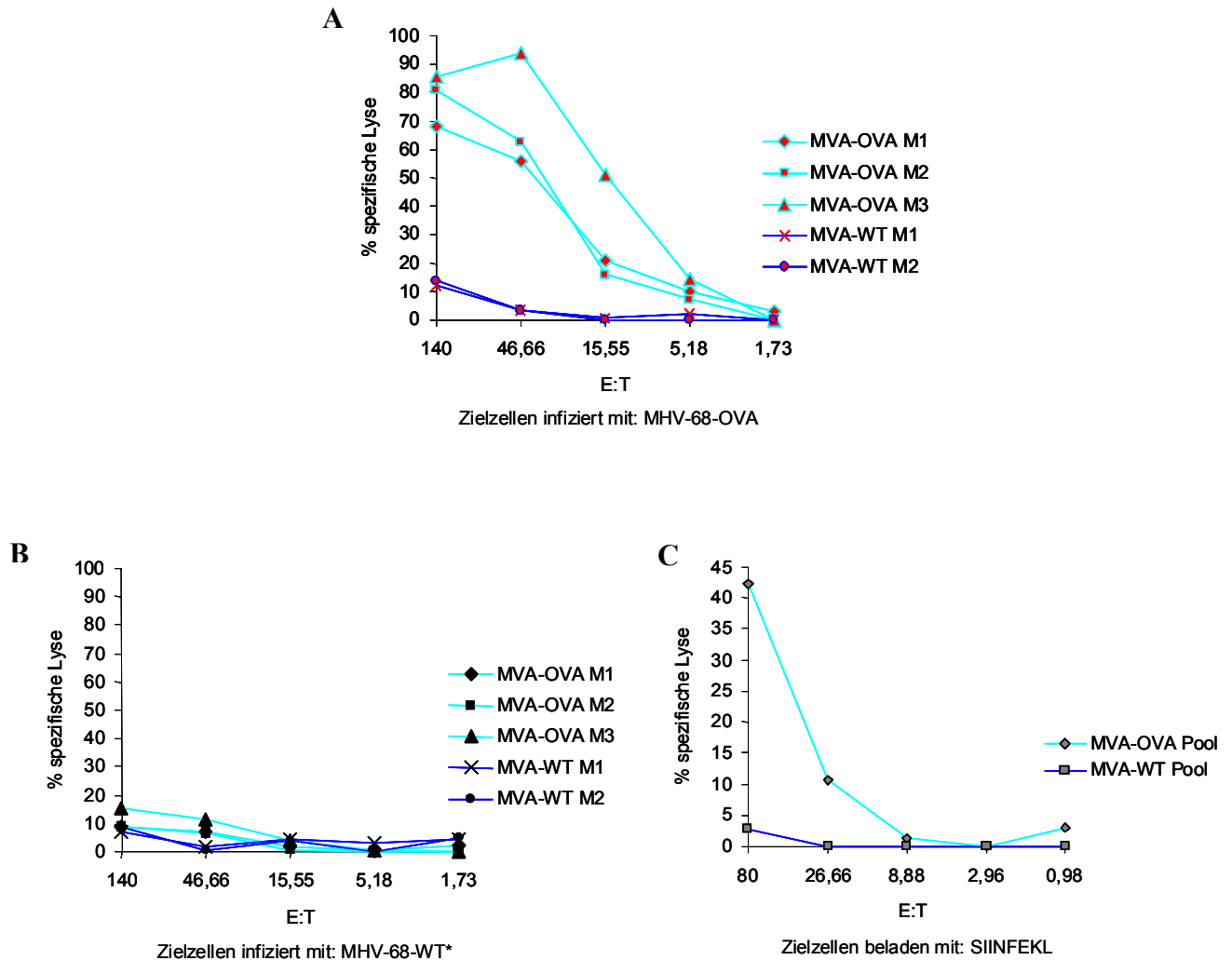
**Abb. 4.5.2.4 Amplifikation von Ovalbumin-spezifischen CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten.** MC3T3 Fibroblasten wurden mit verschiedenen MOI von MHV-68-OVA oder von MHV-68-WT\* über Nacht infiziert oder mit SIINFEKL beladen. Nach 10-stündiger Inkubation mit vereinigten Milzzellen aus drei mit MVA-OVA- oder zwei mit MVA-WT-immunisierten Mäusen wurde mittels ICS der Anteil IFN $\gamma$ -produzierender, aktivierter (CD62L niedrig) CD8<sup>+</sup>-T-Zellen bestimmt.

#### 4.5.2.5 Messung Ovalbumin-spezifischer Zellyse im Zytotoxizitätstest

Nach der erfolgreichen Amplifikation von Ovalbumin-spezifischen CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten galt es jedoch nachzuweisen, ob diese T-Zellen auch ihre zytotoxische Funktion erfüllen konnten. Dazu wurde MHV-68-OVA zur Infektion von MC3T3 Fibroblasten eingesetzt, um dadurch Zielzellen für eine spezifische Zellyse durch Ovalbumin-spezifische Effektorzellen



zu erhalten. Abb. 4.6.2.4 zeigt die Ergebnisse der  $^{51}\text{Cr}$  (radioaktives Chrom) Freisetzung des Zytotoxizitätstests.



**Abb. 4.5.2.5 Ovalbumin-spezifische Zellyse MHV-68-OVA-infizierter Fibroblasten im  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungs-Assay.** MC3T3 Fibroblasten wurden mit einer MOI von 10 mit MHV-68-OVA (A) oder MHV-68-WT\* (B) infiziert oder mit SIINFEKL (C) beladen. Nach der Aufnahme von  $^{51}\text{Cr}$  folgte die 6-stündige Inkubation mit der Primärkultur von Milzzellen aus MVA-OVA- oder MVA-WT-immunisierten Mäusen. Anschließend wurde das von den Zielzellen freigesetzte  $^{51}\text{Cr}$  gemessen. E:T, Verhältnis Effektorzelle zu Zielzelle (T, *target*); M1, M2, M3, Maus 1, 2 oder 3; Pool, Milzzellen vereinigt aus verschiedenen, individuellen Mäusen.

Die Ergebnisse der spezifischen Zellyse aus Abb. 4.5.2.5A lassen erkennen, dass nur Effektorzellen aus MVA-OVA-immunisierten Mäusen imstande waren, MHV-68-OVA-infizierte Fibroblasten zu lysieren. Dabei sank die spezifische Lyse mit der Reduktion der Anzahl eingesetzter Effektorzellen. Die Negativkontrolle mit Zellen aus MVA-WT-

vakzinieren Mäusen zeigte keine Lyse. Auch die weiteren Kontrollen waren, wie in Abb. 4.5.2.5B dargestellt, negativ, da weder durch Effektorzellen aus MVA-OVA- noch aus MVA-WT-immunisierten Mäusen Zellyse bei einer Inkubation mit MHV-68-WT\*-infizierten Fibroblasten zu erwarten war. Betrachtet man die Positivkontrolle aus Abb. 4.5.2.5 C, ließ sich die Ovalbumin-spezifische Lyse durch Effektorzellen aus MVA-OVA-vakzinieren Mäusen bestätigen, da SIINFEKL-beladene Fibroblasten lysiert wurden. Effektorzellen aus MVA-WT-immunisierten Tieren waren nicht zur Lyse dieser Zellen fähig.

Die Verwendung von MHV-68-OVA, das das Modellantigen Ovalbumin produziert, ermöglichte die Etablierung des Mausmodells zur Untersuchung der Schutzwirkung von Vakzinen, so dass nun gezielt die etablierten Impf- und Belastungsschemata sowie virologischen und immunologischen Assays für die Untersuchung von Vakzinen gegen die Hepatitis C Virus Antigene NS3 und CORE eingesetzt werden konnten.

#### **4.6 Untersuchung der Schutzwirkung homologer oder heterologer Immunisierung mit MVA-NS3 bzw. Ad-NS3/MVA-NS3 vor einer Belastungsinfektion mit MHV-68-NS3**

Durch die Analyse der Schutzwirkung von MVA-OVA vor einer Belastungsinfektion mit MHV-68-OVA in Mäusen kristallisierten sich Immunisierungs- und Belastungsschemata heraus, die einen Impfeffekt durch die rekombinanten MVA Vakzine beobachten ließen. Nun galt es zu testen, ob sich dieses Mausmodell zur Evaluierung von Impfstoffen gegen eine chronische Virusinfektion wie HCV eignet. Hierfür wurde neben rekombinanten MVA, das für das CORE Protein kodiert, zunächst MVA-NS3 untersucht. Die Vakzinierung erfolgte entweder homolog, d.h. durch zweimalige Immunisierung mit dem gleichen Impfstoff (MVA-NS3) oder heterolog d.h. durch zweimalige Impfung mit verschiedenen Vakzinen (MVA-NS3/Ad-NS3) Der Einfluss der Immunisierung auf die akute und chronische Phase einer MHV-68 Infektion *in vivo* und auf T-Zellantworten in *ex vivo* Versuchen sollte Aufschluss über den Erfolg der Vakzinierung geben.

##### **4.6.1 Reduktion MHV-68-NS3 induzierter Parameter nach Belastungsinfektion *in vivo***

Zur Untersuchung der Schutzwirkung wurde zunächst für NS3 die homologe Impfung mit MVA-NS3 eingesetzt, die später bei einigen Experimenten durch eine heterologe Immunisierung mit Ad-NS3 als Vektor für die Initialvakzinierung erweitert wurde. Die

Belastung wurde mit MHV-68-NS3 durchgeführt und, wie schon bei Ovalbumin, wurden sowohl Parameter der akuten sowie der chronischen Infektionsphase als auch die T-Zellantwort in Hinblick auf CD8+ T-Lymphozyten bestimmt. Tab. 4.6.1 zeigt die verwendeten Impf- und Belastungsschemata sowie die gemessenen Parameter.

| Initial-/Folge-<br>(prime/boost)<br>Immunisierung   | Belastung  | Zeitpunkt der<br>Belastung nach<br>boost | Route | Zeitpunkt nach<br>Belastung | Gemessener<br>Parameter                                    |
|---|------------|--|-------|-----------------------------|--|
| 2x MVA-WT bzw.<br>2x MVA-NS3 bzw.<br>Ad-NS3/MVA-NS3 | MHV-68-NS3 | 8 Wochen                                 | i.n.  | Tag 6                       | Virustiter Lunge   |
| 2x MVA-WT bzw.<br>2x MVA-NS3 bzw.<br>Ad-NS3/MVA-NS3 | MHV-68-NS3 | 8 Wochen                                 | i.p.  | Tag 6                       | Virustiter Milz  |
| 2x MVA-WT bzw.<br>2x MVA-NS3 bzw.<br>Ad-NS3/MVA-NS3 | MHV-68-NS3 | 4 Wochen                                 | i.p.  | Tag 21                      | Milzgewicht,<br>Reaktivierung,<br>T-Zellantworten<br>(ICS) |
| 2x MVA-WT bzw.<br>2x MVA-NS3 bzw.<br>Ad-NS3/MVA-NS3 | MHV-68-NS3 | 8 Wochen                                 | i.n.  | Tag 21                      | Milzgewicht,<br>Reaktivierung,<br>T-Zellantworten<br>(ICS) |

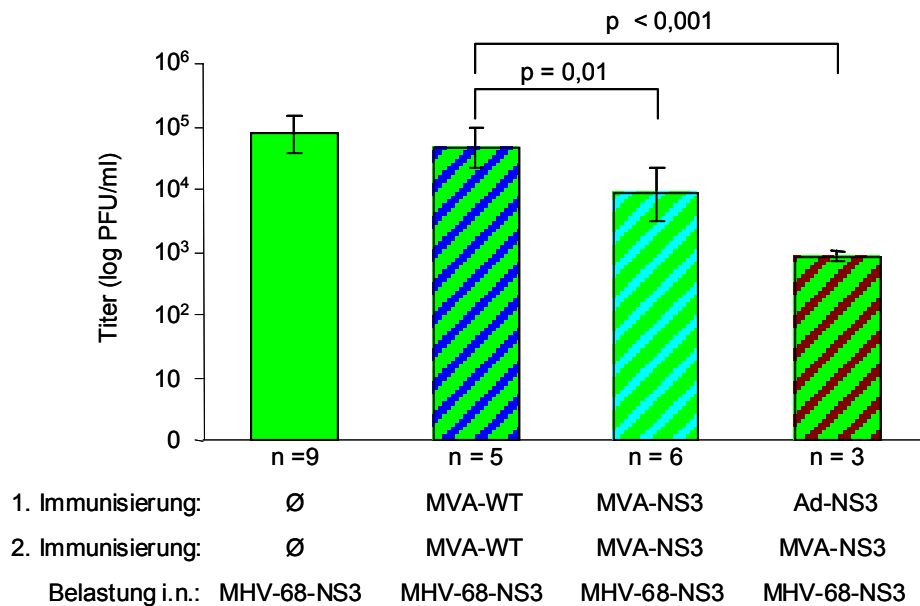
**Tab. 4.6.1** Für die Untersuchung der Schutzwirkung von MVA-NS3 bzw. Ad-NS3/MVA-NS3 verwendete Impf-/Belastungsschemata und gemessene Parameter. MVA-WT, Kontrollimpfung; ICS, *intracellular cytokine staining*, intrazelluläre Zytokinfärbung.

#### 4.6.1.1 Reduktion von lytischem Virus in der Lunge

Als ein Parameter der akuten Phase einer MHV-68-NS3 Infektion sollte der Einfluss auf den lytischen Virustiter in der Lunge Hinweise auf den Erfolg einer Vakzinierung mit MVA-NS3 bzw. Ad-NS3/MVA-NS3 geben.

Wie Abb. 4.6.1.1 verdeutlicht, konnte sowohl durch homologe als auch heterologe Vakzinierung mit MVA-NS3 bzw. Ad-NS3/MVA-NS3 der Virustiter von MHV-68-NS3 verringert werden. In beiden Fällen war die Reduktion im Vergleich zur Kontrollvakzinierung mit MVA-WT signifikant ( $p=0,01$  bzw.  $p< 0,001$ ), wobei die heterologe Impfung eine stärkere Reduktion (ca. 100-fach) als die homologe (ca. 10-fach) zur Folge hatte. Die

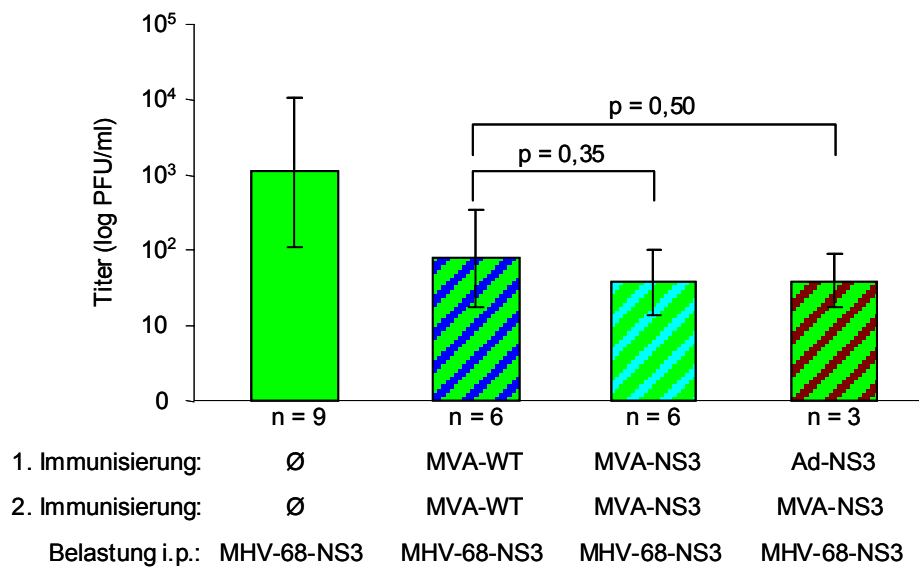
Immunisierung mit MVA-WT hatte keinen Einfluss auf den Virustiter der Lunge, wie der Vergleich mit der Versuchsgruppe ohne Immunisierung zeigt.



**Abb. 4.6.1.1 Reduktion der Titer von MHV-68-NS3 in der Lunge nach homologer und heterologer Immunisierung mit MVA-NS3 bzw Ad-NS3/MVA-NS3.** C57BL/6 Mäuse wurden an Tag 0 und an Tag 14 homolog mit je  $1 \times 10^8$  IE MVA-WT bzw.  $1 \times 10^8$  IE MVA-NS3 oder heterolog mit  $1 \times 10^9$  PFU Ad-NS3 und  $1 \times 10^8$  IE MVA-NS3 i.p. immunisiert. Eine Kontrollgruppe blieb ohne Immunisierung. 8 Wochen nach der 2. Immunisierung folgte die Belastungsinfektion mit MHV-68-NS3 ( $5 \times 10^4$  PFU; i.n.). An Tag 6 nach Belastung wurde der Virustiter in der Lunge durch einen Plaque-Assay ermittelt. n, Zahl der Versuchstiere.

#### 4.6.1.2 Reduktion von lytischem Virus in der Milz

Als weiterer Parameter einer akuten MHV-68-NS3 Infektion zur Überprüfung eines Impfeffekts durch Vakzinierung mit MVA-NS3 oder Ad-NS3/MVA-NS3 diente die Messung des Virustiters in der Milz nach i.p. Belastung mit MHV-68-NS3. Abb. 4.6.1.2 zeigt die Ergebnisse des Einflusses der Vakzinierung auf den Virustiter in der Milz. Zwar reduzierte sowohl die homologe Impfung mit MVA-NS3 als auch die heterologe Impfung mit Ad-NS3/MVA-NS3 den Titer von MHV-68-NS3, der Effekt war jedoch nicht spezifisch, da auch die Kontrollvakzinierung mit MVA-WT den Titer in gleichem Maße verringerte ( $p=0,35$  bzw.  $p=0,5$ ). Im Vergleich zu den nicht-immunisierten Tieren war der Virustiter in allen drei vakzinieren Gruppen ca. 10-fach reduziert.

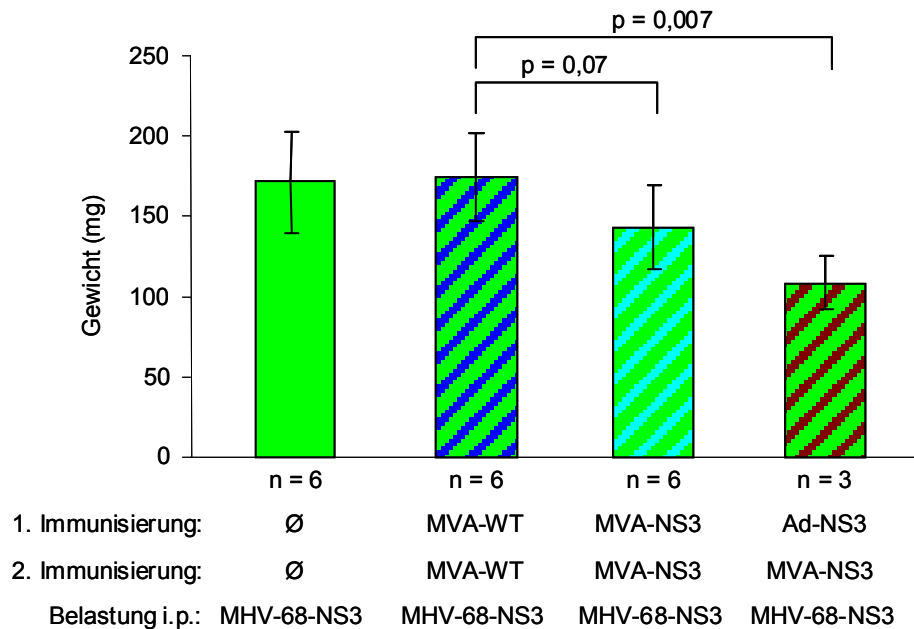


**Abb. 4.6.1.1 Reduktion der Titer von MHV-68-NS3 in der Milz nach homologer und heterologer Immunisierung mit MVA bzw. Ad-NS3/MVA-NS3.** C57BL/6 Mäuse wurden an Tag 0 und an Tag 14 homolog mit je  $1 \times 10^8$  IE MVA-WT bzw.  $1 \times 10^8$  IE MVA-NS3 oder heterolog mit  $1 \times 10^9$  PFU Ad-NS3 und  $1 \times 10^8$  IE MVA-NS3 i.p. immunisiert. Eine Kontrollgruppe blieb ohne Immunisierung. 8 Wochen nach der 2. Immunisierung folgte die Belastungsinfektion mit MHV-68-NS3 ( $1 \times 10^6$  PFU; i.p.). An Tag 6 nach Belastung wurde der Virustiter in der Milz mittels *Plaque-Assay* ermittelt. n, Zahl der Versuchstiere.

#### 4.6.1.3 Reduktion von Splenomegalie und Splenozytenzahl

Für die Etablierung des Mausmodells zur Untersuchung von Vakzinen war es in Hinblick auf eine Hepatitis C Infektion, die einen chronischen Verlauf nehmen kann, wichtig, den Effekt einer Vakzinierung gegen HCV Antigene vor allem im Kontext der chronischen Infektion durch MHV-68 zu untersuchen. Daher konnte, wie auch schon bei Ovalbumin, die Splenomegalie als ein Parameter der chronischen Phase der Infektion für die Untersuchung einer homologen oder heterologen Immunisierung mit MVA-NS3 oder Ad-NS3/MVA-NS3 herangezogen werden. Die Splenomegalie, gemessen durch das Milzgewicht, wurde jedoch nicht wie bisher an Tag 17, sondern, aufgrund der Ergebnisse zur Infektionskinetik von MHV-68-NS3 (siehe 4.3.2.3), an Tag 21 bestimmt. Die Belastungsinfektion mit MHV-68-NS3 erfolgte i.p. 4 Wochen oder i.n. 8 Wochen nach *boost*. Im ersten Fall gelang es, wie aus Abb. 4.6.1.3 ersichtlich, sowohl durch eine homologe Vakzinierung mit MVA-NS3 als auch durch eine heterologe Impfung mit Ad-NS3/MVA-NS3 das Milzgewicht im Vergleich zur

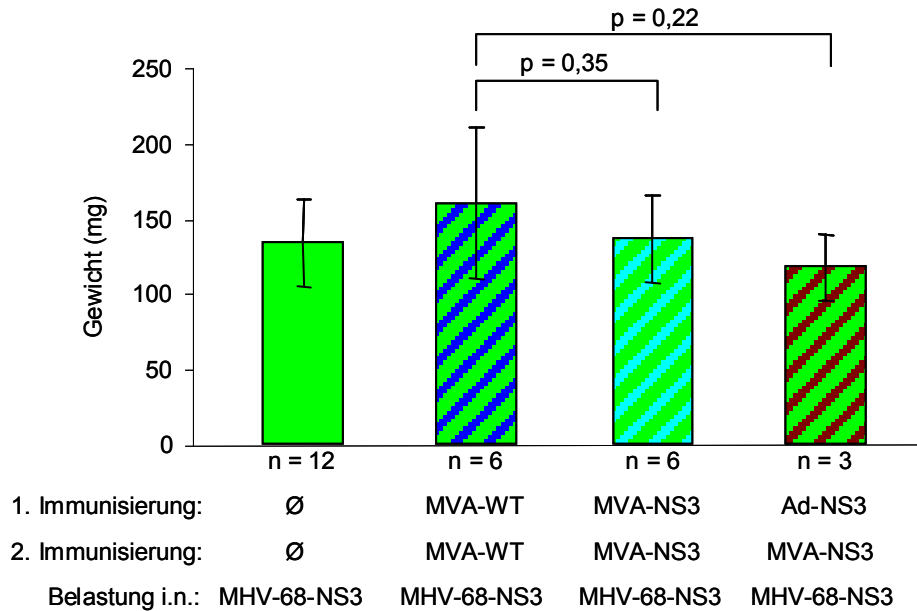
Kontrollimpfung von durchschnittlich 174 mg (Kontrolle) auf 143 mg (MVA-NS3) bzw. 109 mg (Ad-NS3/MVA-NS3) zu senken.



**Abb. 4.6.1.3a Reduktion der von MHV-68-NS3 induzierten Splenomegalie nach homologer und heterologer Immunisierung mit MVA-NS3 bzw. Ad-NS3/MVA-NS3.** C57BL/6 Mäuse wurden an Tag 0 und an Tag 14 homolog mit je  $1 \times 10^8$  IE MVA-WT bzw.  $1 \times 10^8$  IE MVA-NS3 oder heterolog mit  $1 \times 10^9$  PFU Ad-NS3 und  $1 \times 10^8$  IE MVA-NS3 i.p. immunisiert. Eine Kontrollgruppe blieb ohne Immunisierung. 4 Wochen nach *boost* folgte die Belastungsinfektion mit MHV-68-NS3 (i.p.,  $1 \times 10^6$  PFU). An Tag 21 nach Belastung wurde das Milzgewicht bestimmt. n, Zahl der Versuchstiere.

Die Milzen der kontrollgeimpften Tiere wiesen ein ähnliches mittleres Gewicht auf wie die Milzen der Gruppe ohne Immunisierung (171 mg), dennoch war die Reduktion der Milzgewichte durch die spezifischen Impfungen nur im Fall der heterologen Immunisierung signifikant ( $p=0,007$ ). Die homologe Vakzinierung ergab tendenziell ähnliche Resultate, war jedoch statistisch nicht signifikant ( $p=0,07$ ).

Bei der i.n. Belastungsinfektion 8 Wochen nach *boost* (Abb. 4.6.1.3b) zeigte sich, dass weder eine homologe noch heterologe Vakzinierung das Milzgewicht signifikant verringern konnte ( $p=0,35$  bzw.  $p=0,22$ ). Die heterologe Impfung hatte den größeren Effekt, da die mittleren Milzgewichte ohne Immunisierung bei 147 mg, mit Kontrollimmunisierung bei 161 mg, bei homologer Impfung bei 138 mg und nach heterologer Vakzinierung bei 118 mg lagen.



**Abb. 4.6.1.3b Einfluss auf die von MHV-68-NS3 induzierte Splenomegalie durch homologe oder heterologe Immunisierung mit MVA bzw. Ad-NS3/MVA-NS3.** C57BL/6 Mäuse wurden an Tag 0 und an Tag 14 homolog mit je  $1 \times 10^8$  IE MVA-WT bzw.  $1 \times 10^8$  IE MVA-NS3 oder heterolog mit  $1 \times 10^9$  PFU Ad-NS3 und  $1 \times 10^8$  IE MVA-NS3 i.p. immunisiert. Eine Kontrollgruppe blieb ohne Immunisierung. 8 Wochen nach *boost* folgte die Belastungsinfektion mit MHV-68-NS3 (i.n.,  $5 \times 10^4$  PFU). An Tag 21 nach Belastung wurde das Milzgewicht bestimmt. n, Zahl der Versuchstiere.

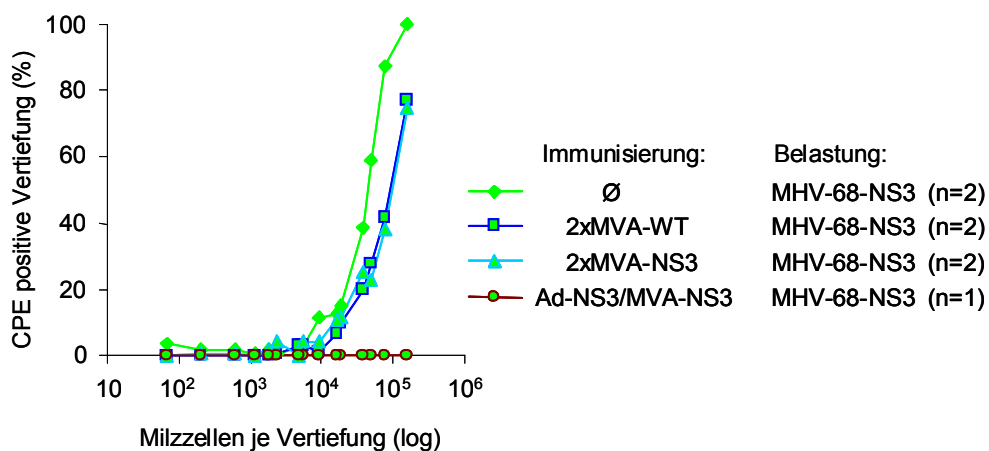
## 4.6.2 Charakterisierung NS3-spezifischer Immunantworten in *ex vivo* Versuchen

Nach der Untersuchung des Einflusses einer homologen bzw. heterologen Impfung mit MVA-NS3 bzw. Ad-NS3/MVA-NS3 auf *in vivo* Parameter einer MHV-68-NS3 Infektion sollten *ex vivo* Experimente näheren Einblick in die Reaktivierung von latentem MHV-68-NS3 und in immunologisch-zelluläre Komponenten der Immunantwort geben.

### 4.6.2.1 Bestimmung der Frequenz reaktivierender Splenozyten nach Belastungsinfektion mit MHV-68-NS3

Ein Teil der Splenozyten aus den unter 4.6.1.3 beschriebenen Versuchen wurde zur Bestimmung der Reaktivierung nach homologer bzw. heterologer Impfung mit MVA-NS3

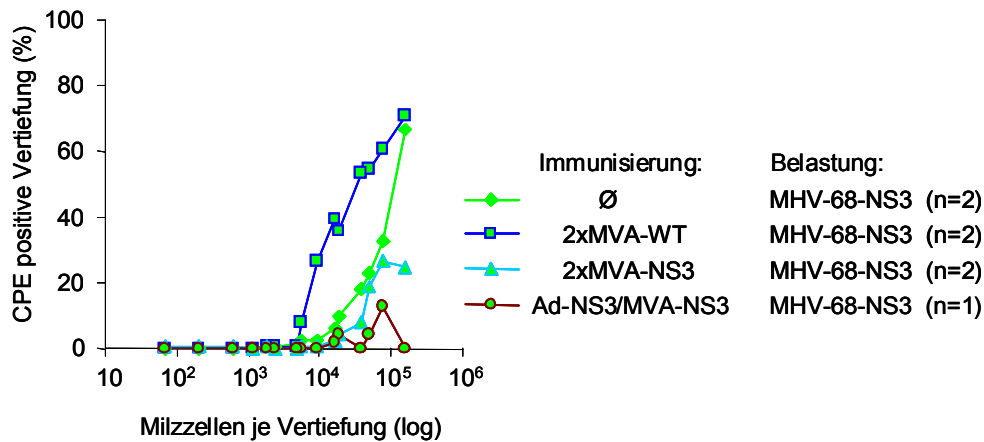
bzw. Ad-NS3/MVA-NS3 verwendet. Bei i.p. Belastung 4 Wochen nach der 2. Immunisierung war nach heterologer Impfung mit Ad-NS3/MVA-NS3 keine Reaktivierung mehr nachweisbar (Abb. 4.6.2.1a). Nach homologer Vakzinierung reduzierte sich die Reaktivierung nicht. Es zeigte sich kein Unterschied zur Frequenz nach Immunisierung mit MVA-WT. Bei beiden betrug die Frequenz der Reaktivierung eine Milzzelle in 120000 Milzzellen und somit reaktivierten in beiden Fällen etwa nur halb so viele Milzzellen wie in der Gruppe ohne Immunisierung (eine reaktivierende Milzzelle in 53000).



**Abb. 4.6.2.1a Reduktion der Frequenz reaktivierender Milzzellen nach heterologer Immunisierung mit Ad-NS3/MVA-NS3.** C57BL/6 Mäuse (3 je Gruppe) wurden an Tag 0 und an Tag 14 homolog mit je  $1 \times 10^8$  IE MVA-WT bzw.  $1 \times 10^8$  IE MVA-NS3 oder heterolog mit  $1 \times 10^9$  PFU Ad-NS3 und  $1 \times 10^8$  IE MVA-NS3 i.p. immunisiert. Eine Kontrollgruppe blieb ohne Immunisierung. 4 Wochen nach *boost* folgte die Belastungsinfektion mit MHV-68-NS3 (i.p.,  $1 \times 10^6$  PFU). An Tag 21 nach Belastung wurden die Milzzellen je Gruppe vereinigt und die Reaktivierung in 2- oder 3-fach Verdünnungen bestimmt. n, Zahl der zusammengefassten Experimente; Ø, keine Immunisierung.

Betrachtet man die Reaktivierungsdaten in Abb. 4.6.2.1b nach i.n. Belastung (8 Wochen nach *boost*) wird deutlich, dass sowohl nach homologer und in stärkerem Maße auch nach heterologer Immunisierung mit MVA-NS3 bzw. Ad-NS3/MVA-NS3 die Reaktivierung reduziert werden konnte. Die Vakzinierung mit MVA-WT führte jedoch nicht zu einer verringerten Reaktivierungsfrequenz, da eine in 90000 Milzzellen reaktivierte. Die Reaktivierungsfrequenz lag damit sogar höher als bei der Gruppe ohne Immunisierung (eine reaktivierende Milzzelle in 140000).





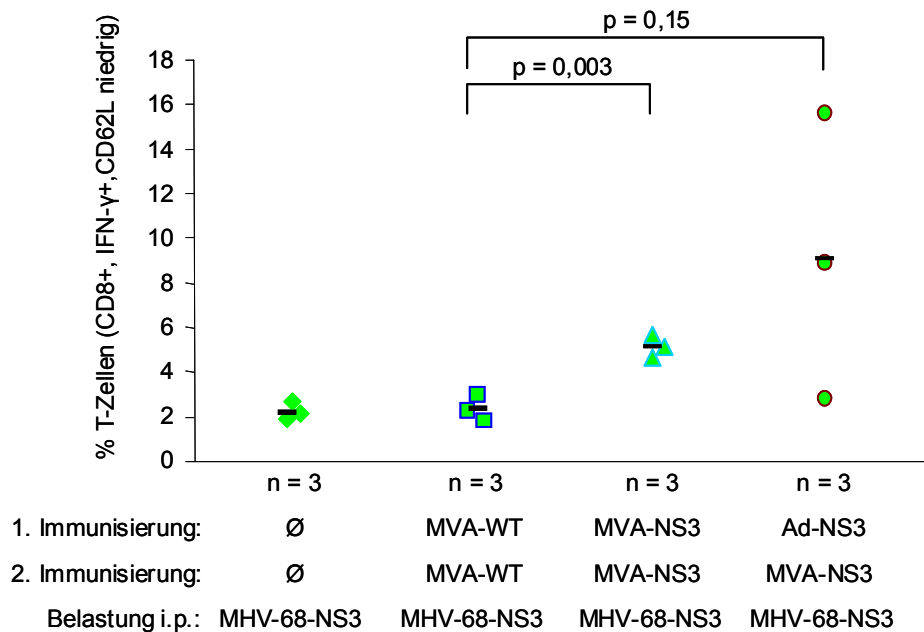
**Abb. 4.6.2.1b Reduktion der Frequenz reaktivierender Milzzellen nach homologer und heterologer Immunisierung mit MVA-NS3 bzw. Ad-NS3/MVA-NS3.** C57BL/6 Mäuse (3 je Gruppe) wurden an Tag 0 und an Tag 14 homolog mit je  $1 \times 10^8$  IE MVA-WT bzw.  $1 \times 10^8$  IE MVA-NS3 oder heterolog mit  $1 \times 10^9$  PFU Ad-NS3 und  $1 \times 10^8$  IE MVA-NS3 i.p. immunisiert. Eine Kontrollgruppe blieb ohne Immunisierung. 8 Wochen nach *boost* folgte die Belastungsinfektion mit MHV-68-NS3 (i.n.,  $5 \times 10^4$  PFU). An Tag 21 nach Belastung wurden die Milzzellen je Gruppe vereinigt und die Reaktivierung in 2- oder 3-fach Verdünnungen bestimmt. n, Zahl der zusammengefassten Experimente; Ø, keine Immunisierung.

#### 4.6.2.2 Detektion NS3-spezifischer T-Lymphozyten durch intrazelluläre IFN $\gamma$ -Färbung nach Belastungsinfektion mit MHV-68-NS3

Neben den Auswirkungen der Immunisierungen auf die Splenomegalie und Reaktivierung war es hinsichtlich der zellulären Immunantwort wichtig, zu analysieren, inwieweit zytotoxische T-Lymphozyten an diesen Effekten beteiligt waren. So konnten Zellen aus einem Teil der in 4.6.1.3 beschriebenen Versuche zur Detektion NS3-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen mittels intrazellulärer Zytokinfärbung verwendet werden. Zur Stimulation der Milzzellen wurde ein Peptid benutzt, das sich in einer Aminosäure von dem für C57BL/6 Mäuse bekannten Epitop unterschied. Diese Aminosäure befand sich jedoch an einer für die Bindung an MHC I nicht relevanten Position.

Abb. 4.6.2.2a zeigt die Ergebnisse eines ICS von Zellen aus Tieren, die 4 Wochen nach *boost* i.p. mit MHV-68-NS3 belastet wurden. So ließen sich sowohl nach homologer als auch heterologer Impfung mit MVA-NS3 bzw. Ad-NS3/MVA-NS3 deutlich erhöhte Anteile NS3-spezifischer, IFN $\gamma$ -produzierender, aktivierter CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten nachweisen (5,4% bzw.

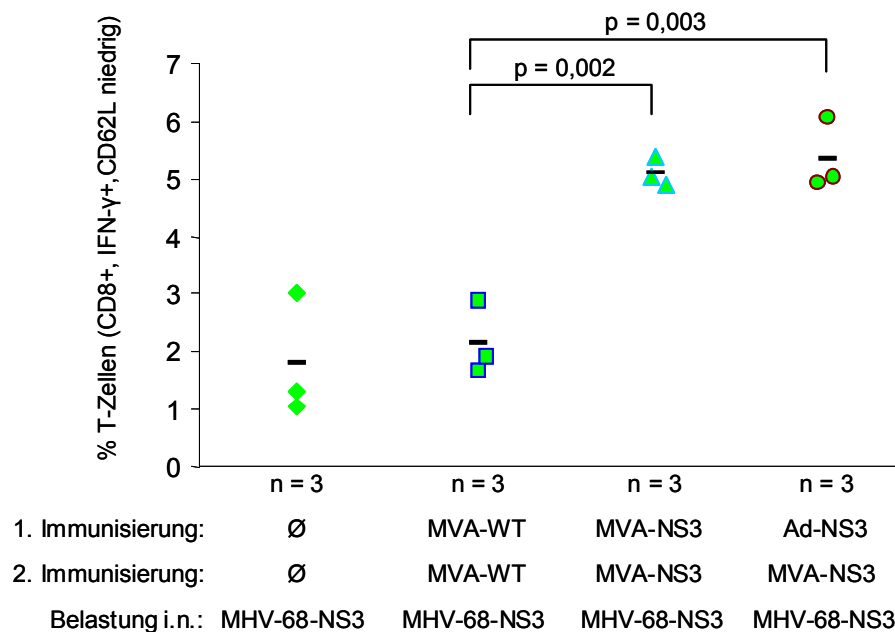
9,1%). Dennoch waren die Unterschiede zur Kontrollvakzinierung (2,4%) nur im Fall der homologen Impfung signifikant ( $p=0,003$ ). Nach heterologer Immunisierung zeigten die gemessenen Werte eine zu hohe Streuung und waren trotz des höheren Mittelwertes von 9,1% NS3-spezifischer T-Zellen aufgrund der geringen Zahl getesteter Versuchstiere nicht signifikant unterschiedlich zur Kontrollimpfung mit MVA-WT ( $p=0,15$ ).



**Abb. 4.6.2.2a Erhöhung des Anteils NS3-spezifischer CD8+ T-Zellen nach homologer oder heterologer Immunisierung mit MVA-NS3 bzw. Ad-NS3/MVA-NS3 und i.p. Belastungsinfektion mit MHV-68-NS3.** C57BL/6 Mäuse wurden an Tag 0 und an Tag 14 homolog mit je  $1 \times 10^8$  IE MVA-WT bzw.  $1 \times 10^8$  IE MVA-NS3 oder heterolog mit  $1 \times 10^9$  PFU Ad-NS3 und  $1 \times 10^8$  IE MVA-NS3 i.p. immunisiert. Eine Kontrollgruppe blieb ohne Immunisierung. 4 Wochen nach *boost* folgte die Belastungsinfektion mit MHV-68-NS3 (i.p.,  $1 \times 10^6$  PFU). Milzzellen wurden an Tag 21 nach Belastung mit einem NS3-spezifischen- oder einem Kontrollpeptid stimuliert und schließlich mittels intrazellulärer Zytokinfärbung der Anteil CD8+, aktivierter (CD62L niedrig) und IFN $\gamma$ -produzierender T-Lymphozyten bestimmt. n, Zahl der Versuchstiere.

Der Anteil an T-Lymphozyten nach Kontrollimpfung war mit dem der Gruppe ohne Vakzinierung (2,2%) vergleichbar. Bei Stimulation mit einem Kontrollpeptid (Negativkontrolle) waren in keiner der Gruppen T-Zellen nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Erfolgte die Belastung i.n. 8 Wochen nach der 2. Immunisierung, war ebenso wie nach i.p. Belastung 4 Wochen nach *boost* eine Zunahme NS3-spezifischer, IFN $\gamma$ -produzierender, aktivierter CD8+ T-Lymphozyten durch spezifische Immunisierung zu beobachten. So steigerte sich der Anteil NS3-spezifischer T-Zellen nach homologer Impfung auf 5,1% und nach heterologer Immunisierung auf 5,3% im Vergleich zur Kontrollimpfung mit 2,1%. In

beiden Fällen war die Erhöhung signifikant unterschiedlich zur Vakzinierung mit MVA-WT ( $p=0,002$  bzw.  $p=0,003$ ). Die Impfung mit MVA-WT hatte erwartungsgemäß ähnliche Werte wie die der Gruppe ohne Immunisierung (1,8%) zur Folge. Wurde die Stimulation mit einem Kontrollpeptid durchgeführt, ließen sich wie erwartet keine NS3-spezifischen T-Zellen nachweisen (Daten nicht gezeigt).



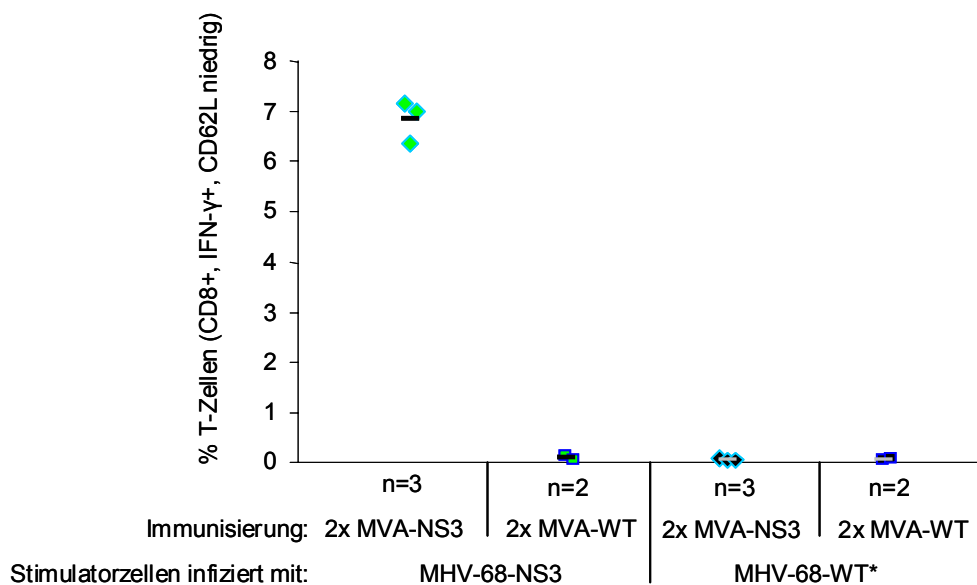
**Abb. 4.6.2.2b Erhöhung des Anteils NS3-spezifischer CD8+ T-Zellen nach homologer oder heterologer Immunisierung mit MVA-NS3 bzw. Ad-NS3/MVA-NS3 und i.n. Belastungsinfektion mit MHV-68-NS3 (ICS).** C57BL/6 Mäuse wurden an Tag 0 und an Tag 14 homolog mit je  $1 \times 10^8$  IE MVA-WT bzw.  $1 \times 10^8$  IE MVA-NS3 oder heterolog mit  $1 \times 10^9$  PFU Ad-NS3 und  $1 \times 10^8$  IE MVA-NS3 i.p. immunisiert. Eine Kontrollgruppe blieb ohne Immunisierung. 8 Wochen nach *boost* folgte die Belastungsinfektion mit MHV-68-NS3 (i.n.,  $5 \times 10^4$  PFU). Milzzellen wurden an Tag 21 nach Belastung mit einem NS3-spezifischen- oder einem Kontrollpeptid stimuliert und schließlich mittels intrazellulärer Zytokinfärbung der Anteil CD8+, aktivierter (CD62L niedrig) und IFN $\gamma$ -produzierender T-Lymphozyten bestimmt. n, Zahl der Versuchstiere.

#### 4.6.2.3 Detektion NS3-spezifischer T-Lymphozyten durch intrazelluläre IFN $\gamma$ -Färbung nach Immunisierung (ohne Belastungsinfektion)

Neben der Verwendung von MHV-68-NS3 als Belastungsvirus in Impfstudien sollte ebenso wie bei MHV-68-OVA getestet werden, ob sich MHV-68-NS3 auch zur Amplifikation NS3-spezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten *ex vivo* eignet. Dazu wurden *in vitro* mit MHV-68-NS3-infizierte MC3T3 Fibroblasten benutzt, um Milzzellen aus MVA-NS3-vakzinieren Mäusen zu stimulieren. Als Negativkontrollen dienten zum einen Stimulatorzellen, die mit

MHV-68-WT\* infiziert wurden, und zum anderen Milzzellen aus MVA-WT-immunisierten Tieren.

Aus Abb. 4.6.2.3 wird ersichtlich, dass nur dann NS3-spezifische, IFN $\gamma$ -produzierende aktivierte und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten nachzuweisen waren, wenn Milzzellen aus MVA-NS3-immunisierten Mäusen mit MHV-68-NS3-infizierten MC3T3 stimuliert wurden (6,9%). Wurden Splenozyten aus MVA-WT-vakzinierten Tieren verwendet, erfolgte keine Amplifikation durch MHV-68-NS3-infizierte Fibroblasten. Erfolgte die Stimulation mit MHV-68-WT\*-infizierten MC3T3, konnten weder CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus MVA-NS3- noch aus MVA-WT-immunisierten Mäusen nachgewiesen werden.



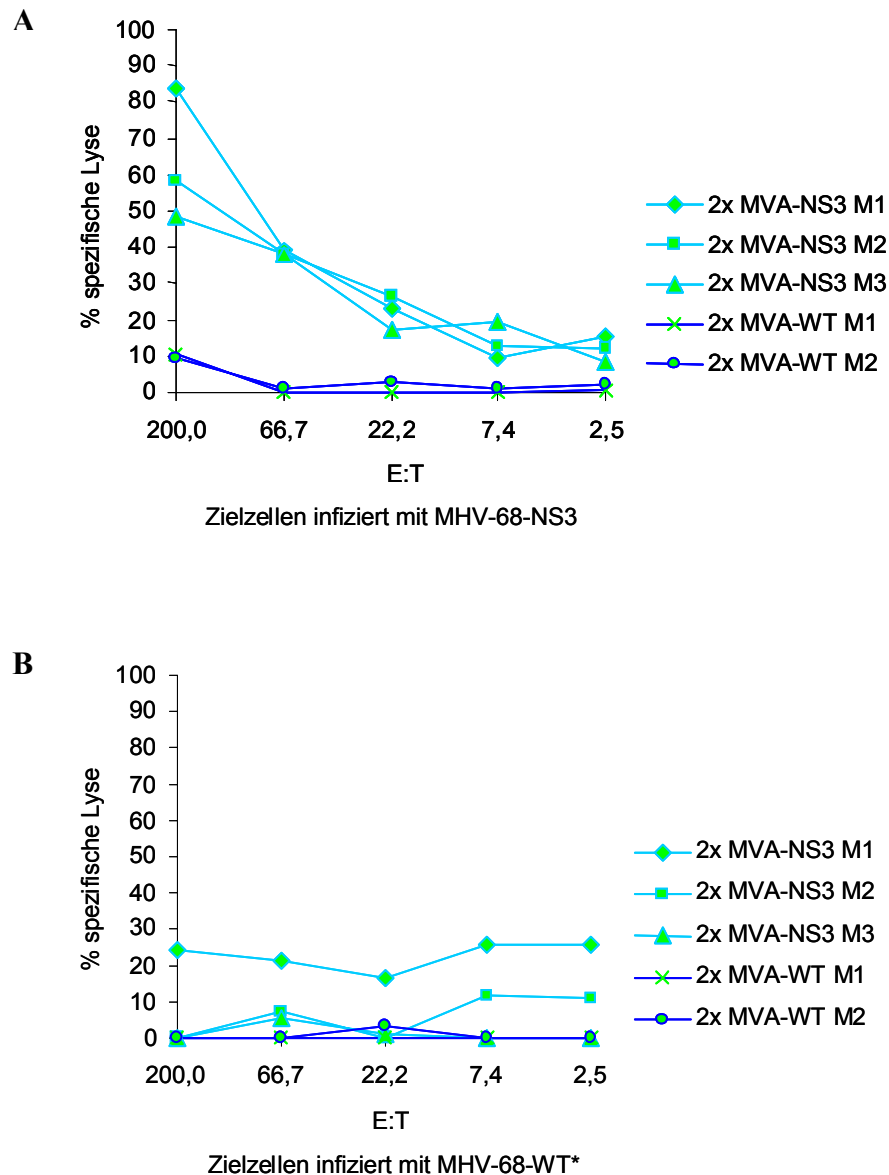
**Abb. 4.6.2.3 Amplifikation NS3-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten.** MC3T3 Fibroblasten wurden jeweils mit einer MOI von 1 mit MHV-68-NS3 oder MHV-68-WT\* infiziert. Nach 16 h erfolgte eine 10-stündige Inkubation mit Milzzellen aus MVA-NS3- oder MVA-WT-immunisierten C57BL/6 Mäusen. Mittels ICS wurde der Anteil IFN $\gamma$ -produzierender, aktivierter (CD62L niedrig) CD8<sup>+</sup> T-Zellen bestimmt. n, Zahl der Versuchstiere.

#### 4.6.2.4 Messung NS3-spezifischer Zellyse im Zytotoxizitätstest

Um nach Amplifikation auch die Funktionalität der NS3-spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten zu testen, wurde ein <sup>51</sup>Cr Freisetzung-Assay durchgeführt, bei dem MHV-68-NS3-infizierte MC3T3 Fibroblasten als Zielzellen für die Zellyse eingesetzt wurden.

Die Ergebnisse der <sup>51</sup>Cr Freisetzung in Abb. 4.6.2.4A lassen erkennen, dass nur Effektorzellen aus MVA-NS3-immunisierten Mäusen MHV-68-NS3-infizierte Zielzellen lysieren konnten, wobei die spezifische Lyse mit sinkender Effektorzellzahl abnahm.

Effektorzellen aus kontrollvaksinieren Tieren waren dazu nicht imstande. Auch die weiteren Negativkontrollen (Abb. 4.6.2.4B) zeigten keine spezifische Zelllyse. So konnten erwartungsgemäß weder Effektorzellen aus MVA-NS3- noch aus MVA-WT-immunisierten Tieren Zielzellen lysieren, die mit MHV-68-WT\* infiziert worden waren.



**Abb. 4.6.2.4 NS3-spezifische Zelllyse MHV-68-NS3 infizierter Fibroblasten im  $^{51}\text{Cr}$  Freisetzungs-Assay.** MC3T3 Fibroblasten wurden mit einer MOI von 10 mit MHV-68-NS3 (A) oder MHV-68-WT\* (B) infiziert. Nach der Aufnahme von  $^{51}\text{Cr}$  folgte die 6-stündige Inkubation mit der Primärkultur von Milzzellen aus MVA-NS3- oder MVA-WT-immunisierten Mäusen. Anschließend wurde das von den Zielzellen freigesetzte  $^{51}\text{Cr}$  gemessen. E:T, Verhältnis Effektorzelle zu Zielzelle (T, *target*); M1, M2, M3, Maus 1, 2 oder 3.

#### **4.7 Untersuchung der Schutzwirkung der Immunisierung mit MVA-CORE bzw. Ad-CORE/MVA-CORE Vektorimpfstoffen durch Belastungsinfektion mit MHV-68-CORE**

Neben NS3 wurde CORE als ein zweites Hepatitis C Virus Antigen zur Untersuchung einer Schutzwirkung von auf MVA oder Adenovirus basierenden Impfstoffen gewählt. Ebenso wie bei NS3 wurden homologe und heterologe Impfschemata eingesetzt, um den Effekt einer Immunisierung zu untersuchen. Dabei wurde MHV-68-CORE zum einen für eine Belastungsinfektion *in vivo* eingesetzt, um durch die Messung entsprechender Parameter den Erfolg einer Vakzinierung zu testen. Zum anderen sollte MHV-68-CORE auch zur Amplifikation CORE-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie zur Überprüfung der Funktionalität dieser Zellen verwendet werden.

##### **4.7.1 Charakterisierung MHV-68-CORE induzierter Parameter nach Belastungsinfektion *in vivo***

Ebenso wie schon bei Ovalbumin und NS3 wurden auch bei CORE akute und chronische Infektionsphasen einer MHV-68-CORE Belastung untersucht, um Aussagen über den Impfeffekt einer homologen oder heterologen Vakzinierung mit MVA-CORE bzw. Ad-CORE/MVA-68-CORE treffen zu können. Als Kontrollimpfung wurde jedoch Ad-NS3/MVA-NS3 anstelle von MVA-WT eingesetzt. Tab. 4.7.1 fasst die getesteten Impfschemata, Zeitpunkte und Routen der Belastung und gemessenen Parameter zusammen.

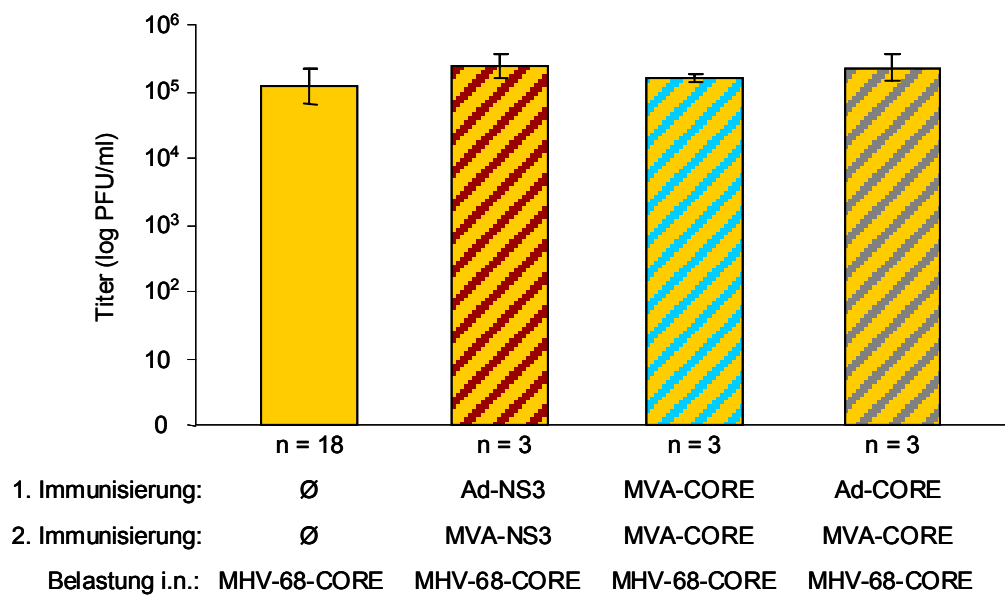
Bei den nachfolgenden Ergebnissen muss allerdings beachtet werden, dass zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit die Immunisierungsexperimente für CORE jeweils nur einmal durchgeführt werden konnten und die statistischen Auswertungen daher nur eine sehr niedrige Anzahl an Versuchstieren berücksichtigen. Die Ergebnisse lassen deshalb noch keine eindeutigen bzw. endgültigen Schlüsse bezüglich einer Impfwirkung zu, sondern können aufgrund der geringen Anzahl an Versuchstieren nur Tendenzen wiedergeben.

| Initial-/Folge-<br>(prime/boost)<br>Immunisierung           | Belastung       | Zeitpunkt der<br>Belastung nach<br>boost | Route | Zeitpunkt nach<br>Belastung | Gemessener<br>Parameter       |
|---|-----------------|--|-------|-----------------------------|-------------------------------|
| 2x MVA-CORE<br>bzw. Ad-CORE/MVA-CORE<br>bzw. Ad-NS3/MVA-NS3 | MHV-68-<br>CORE | 8 Wochen                                 | i.n.  | Tag 6                       | Virustiter Lunge              |
| 2x MVA-CORE<br>bzw. Ad-CORE/MVA-CORE<br>bzw. Ad-NS3/MVA-NS3 | MHV-68-<br>CORE | 8 Wochen                                 | i.p.  | Tag 6                       | Virustiter Milz               |
| 2x MVA-CORE<br>bzw. Ad-CORE/MVA-CORE<br>bzw. Ad-NS3/MVA-NS3 | MHV-68-<br>CORE | 4 Wochen                                 | i.p.  | Tag 17                      | Milzgewicht,<br>Reaktivierung |
| 2x MVA-CORE<br>bzw. Ad-CORE/MVA-CORE<br>bzw. Ad-NS3/MVA-NS3 | MHV-68-<br>CORE | 8 Wochen                                 | i.n.  | Tag 17                      | Milzgewicht,<br>Reaktivierung |

**Tab. 4.7.1** Für die Untersuchung der Schutzwirkung von MVA-CORE bzw. Ad-CORE/MVA-CORE verwendete Impf-/Belastungsschemata und gemessene Parameter. Ad-NS3/MVA-NS3, Kontrollimpfung

#### 4.7.1.1 Bestimmung von lytischem Virus in der Lunge

Als einen Parameter der akuten Infektionsphase von MHV-68-CORE sollte anhand des Virustiters in der Lunge getestet werden, ob nach homologer oder heterologer Vakzinierung mit MVA-CORE bzw. Ad-CORE/MVA-CORE eine Reduktion des Titers möglich ist. Wie jedoch aus Abb. 4.7.1.1 ersichtlich ist, konnte weder eine homologe noch eine heterologe Impfung den Virustiter von MHV-68-CORE in der Lunge verringern, da in beiden Fällen der Titer bei ca.  $1 \times 10^5$  PFU/ml lag und damit mit den Virustitern der Gruppe mit Kontrollimpfung und der Gruppe ohne Immunisierung vergleichbar war. Da dieses Impf-/Belastungsschema, das zwar bei Belastung mit MHV-68-OVA eine spezifische Reduktion des Titers in der Lunge zeigte, im Fall von CORE keinen Effekt hatte, wurde eine Belastung mit MHV-68-CORE 4 Wochen nach der 2. Immunisierung durchgeführt. Dabei wurden ähnliche Ergebnisse erzielt (Daten nicht gezeigt).

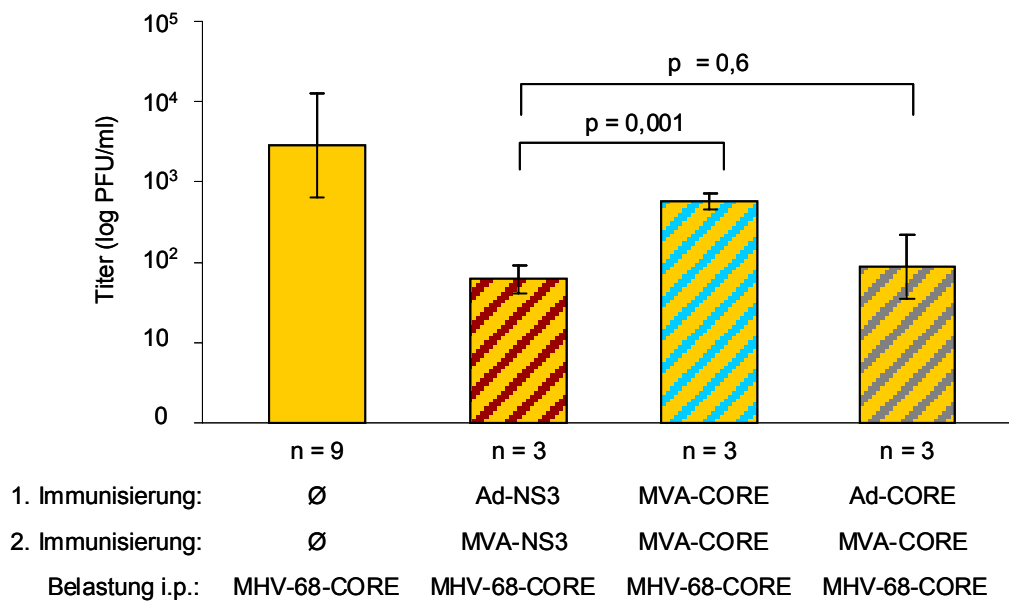


**Abb. 4.7.1.1 Einfluss von homologer und heterologer Immunisierung mit MVA bzw. Adenovirus auf den Virustiter von MHV-68-CORE in der Lunge.** C57BL/6 Mäuse wurden an Tag 0 i.p. mit  $1 \times 10^9$  PFU Ad-NS3,  $1 \times 10^8$  IE MVA-CORE oder  $1 \times 10^9$  PFU Ad-CORE immunisiert. An Tag 14 erfolgte eine i.p. Impfung mit  $1 \times 10^8$  IE MVA-NS3 oder  $1 \times 10^8$  IE MVA-CORE. Eine Kontrollgruppe blieb ohne Immunisierung. 8 Wochen nach der 2. Immunisierung folgte die Belastungsinfektion mit MHV-68-CORE ( $5 \times 10^4$  PFU; i.n.). An Tag 6 nach Belastung wurde der Virustiter in der Lunge durch einen Plaque-Assay ermittelt. n, Zahl der Versuchstiere.

#### 4.7.1.2 Bestimmung von lytischem Virus in der Milz

Mit der Bestimmung des Virustiters in der Milz konnte ein weiterer Parameter der akuten Infektionsphase von MHV-68-CORE herangezogen werden, um den Effekt einer homologen oder heterologen Vakzinierung mit MVA-CORE bzw. Ad-CORE/MVA-CORE zu analysieren. So konnte, wie Abb. 4.7.1.2 verdeutlicht, zwar im Falle einer heterologen Immunisierung mit Ad-CORE/MVA-CORE der Virustiter gesenkt werden, jedoch zeigte sich nach Kontrollimpfung ebenso eine Verringerung des Titers. Daher kann die Reduktion nicht als signifikant unterschiedlich zur Kontrolle angesehen werden ( $p=0,6$ ). Gleiches gilt auch für die homologe Vakzinierung: So war nach Immunisierung mit MVA-CORE im Vergleich zur Gruppe ohne Immunisierung eine leichte Reduktion der Titer zu beobachten, allerdings zeigte die Kontrollimpfung ebenso eine Reduktion des Titers. Durch die Kontrollimpfung wurde der Titer sogar signifikant ( $p=0,001$ ) zur spezifischen, homologen Vakzinierung verringert. Auch eine Belastung 4 Wochen nach der 2. Immunisierung erbrachte ein ähnliches Ergebnis (Daten nicht gezeigt).

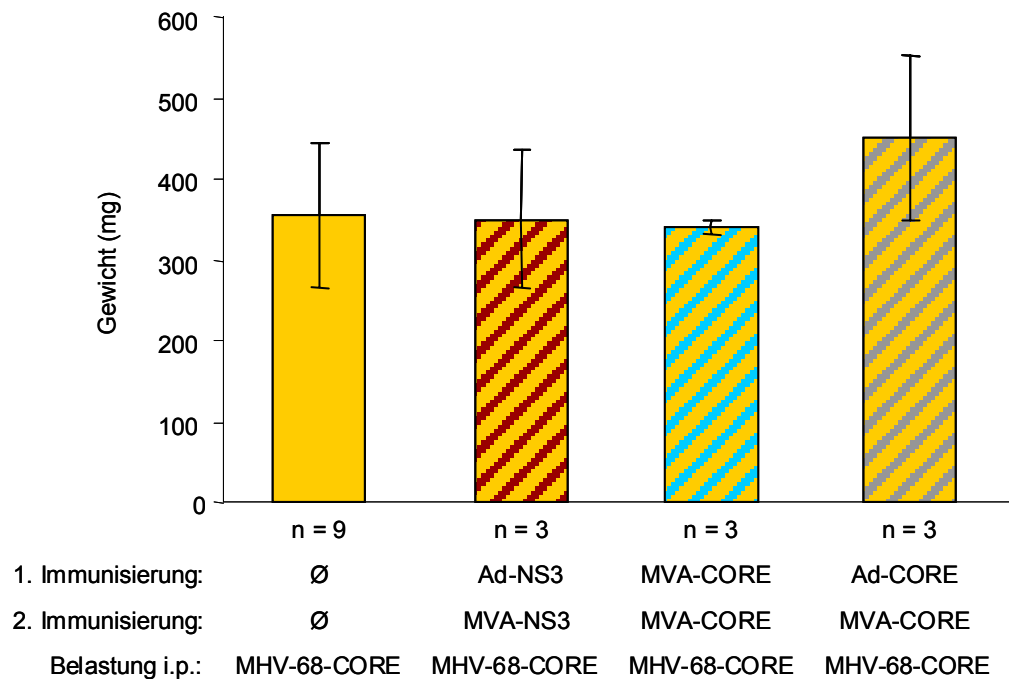




**Abb. 4.7.1.2 Einfluss von homologer und heterologer Immunisierung mit MVA bzw. Adenovirus auf den Virustiter von MHV-68-CORE in der Milz.** C57BL/6 Mäuse wurden an Tag 0 i.p. mit  $1 \times 10^9$  PFU Ad-NS3,  $1 \times 10^8$  IE MVA-CORE oder  $1 \times 10^9$  PFU Ad-CORE immunisiert. An Tag 14 erfolgte eine i.p. Impfung mit  $1 \times 10^8$  IE MVA-NS3 oder  $1 \times 10^8$  IE MVA-CORE. Eine Kontrollgruppe blieb ohne Immunisierung. 8 Wochen nach der 2. Immunisierung folgte die Belastungsinfektion mit MHV-68-CORE ( $1 \times 10^6$  PFU; i.p.). An Tag 6 nach Belastung wurde der Virustiter in der Milz durch einen Plaque-Assay ermittelt. n, Zahl der Versuchstiere.

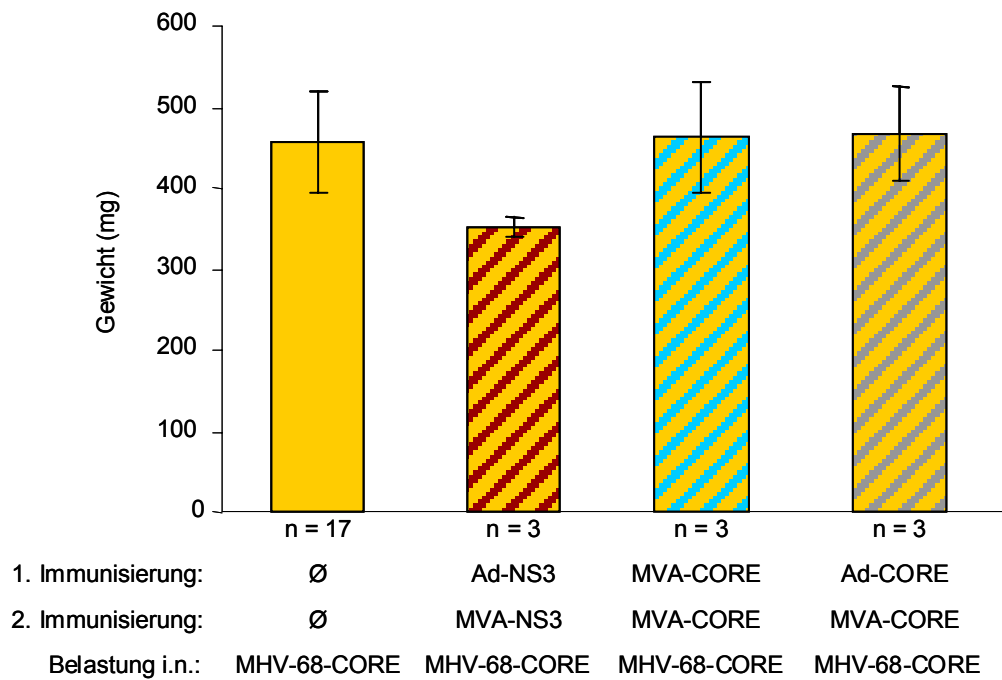
#### 4.7.1.3 Messung von Splenomegalie und Splenozytenzahl

Wie schon bei NS3 war es auch bei CORE wichtig, den Effekt einer Immunisierung hinsichtlich der chronischen Phase einer MHV-68-CORE Infektion zu untersuchen. Die Messung der Splenomegalie anhand des Milzgewichts sollte Aufschluss über den Einfluss einer homologen oder heterologen Vakzinierung mit MVA-CORE bzw. Ad-CORE/MVA-CORE auf die Etablierung der chronischen Infektionsphase von MHV-68-CORE geben. Wurde i.p. 4 Wochen nach der 2. Immunisierung belastet, so lässt sich erkennen (Abb. 4.7.1.3a), dass keine der spezifischen Impfungen in der Lage war, das Milzgewicht im Vergleich zur Kontrollvakzinierung mit Ad-NS3/MVA-NS3 zu senken. So lag das mittlere Milzgewicht nach der Kontrollimpfung bei 350 mg, nach homologer Immunisierung mit MVA-CORE bei 340 mg und stieg bei heterologer Vakzinierung sogar auf 450 mg. Bei der Gruppe ohne Immunisierung ließ sich ein durchschnittliches Milzgewicht von 356 mg messen. Führte man eine i.p. Belastung 8 Wochen nach der 2. Impfung durch, war das Ergebnis vergleichbar (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 4.7.1.3a Einfluss auf die von MHV-68-CORE induzierte Splenomegalie nach homologer und heterologer Immunisierung mit MVA bzw. Adenovirus.** C57BL/6 Mäuse wurden an Tag 0 i.p. mit  $1 \times 10^9$  PFU Ad-NS3,  $1 \times 10^8$  IE MVA-CORE oder  $1 \times 10^9$  PFU Ad-CORE immunisiert. An Tag 14 erfolgte eine i.p. Impfung mit  $1 \times 10^8$  IE MVA-NS3 oder  $1 \times 10^8$  IE MVA-CORE. Eine Kontrollgruppe blieb ohne Immunisierung. 4 Wochen nach der 2. Immunisierung folgte die Belastungsinfektion mit MHV-68-CORE ( $1 \times 10^6$  PFU; i.p.). An Tag 17 nach Belastung wurde das Milzgewicht bestimmt. n, Zahl der Versuchstiere.

Erfolgte die Belastung mit MHV-68-CORE i.n. 8 Wochen nach der 2. Immunisierung (Abb. 4.7.1.3b), war ebenso keine Reduktion des durchschnittlichen Milzgewichts durch die spezifische homologe oder heterologe Vakzinierung zu beobachten (463 mg bzw. 467 mg). Dies verdeutlicht der Vergleich mit der Kontrollimpfung, die das mittlere Milzgewicht sogar reduzierte (353 mg). Eine i.n. Belastung 4 Wochen nach der 2. Immunisierung führte zu einem ähnlichen Ergebnis (Daten nicht gezeigt).



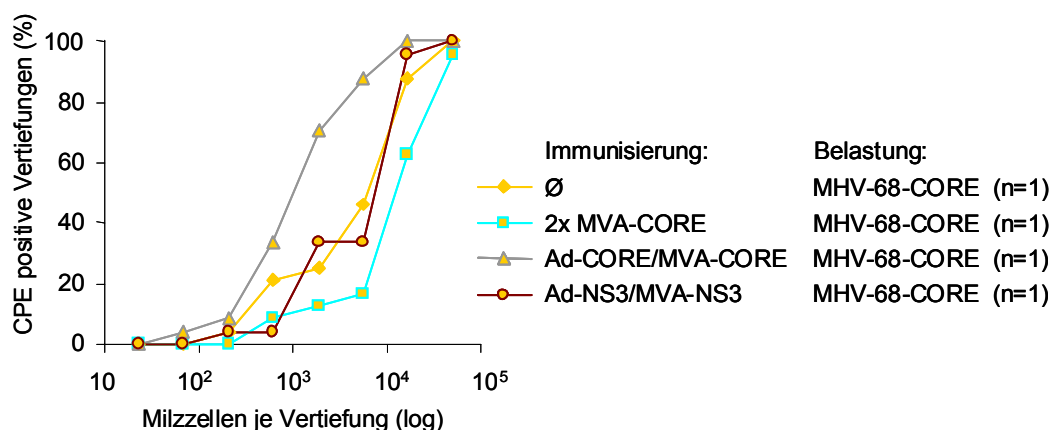
**Abb. 4.7.1.3b Einfluss auf die von MHV-68-CORE induzierte Splenomegalie nach homologer und heterologer Immunisierung mit MVA bzw. Adenovirus.** C57BL/6 Mäuse wurden an Tag 0 i.p. mit  $1 \times 10^9$  PFU Ad-NS3,  $1 \times 10^8$  IE MVA-CORE oder  $1 \times 10^9$  PFU Ad-CORE immunisiert. An Tag 14 erfolgte eine i.p. Impfung mit  $1 \times 10^8$  IE MVA-NS3 oder  $1 \times 10^8$  IE MVA-CORE. Eine Kontrollgruppe blieb ohne Immunisierung. 8 Wochen nach der 2. Immunisierung folgte die Belastungsinfektion mit MHV-68-CORE ( $5 \times 10^4$  PFU; i.n.). An Tag 17 nach Belastung wurde das Milzgewicht bestimmt. n, Zahl der Versuchstiere.

#### 4.7.2 Untersuchung CORE-spezifischer Immunantworten in *ex vivo* Versuchen

Wie die Messung der Splenomegalie aus den in 4.7.1.3 beschriebenen Experimenten gezeigt hat, konnte kein spezifischer Impfeffekt durch eine homologe oder heterologe Immunisierung mit MVA-CORE bzw. Ad-CORE/MVA-CORE nachgewiesen werden. Daher sollten nun *ex vivo* Versuche Aufschluss darüber geben, inwieweit die Reaktivierung MHV-68-CORE-infizierter Milzzellen durch eine Immunisierung beeinflusst wurde. Des Weiteren wurde mittels MHV-68-CORE versucht, CORE-spezifische T-Lymphozyten zu amplifizieren, um einen Einblick in die zelluläre Immunantwort gegen CORE zu gewinnen.

#### 4.7.2.1 Bestimmung der Frequenz reaktivierender Splenozyten nach Belastungsinfektion mit MHV-68-CORE

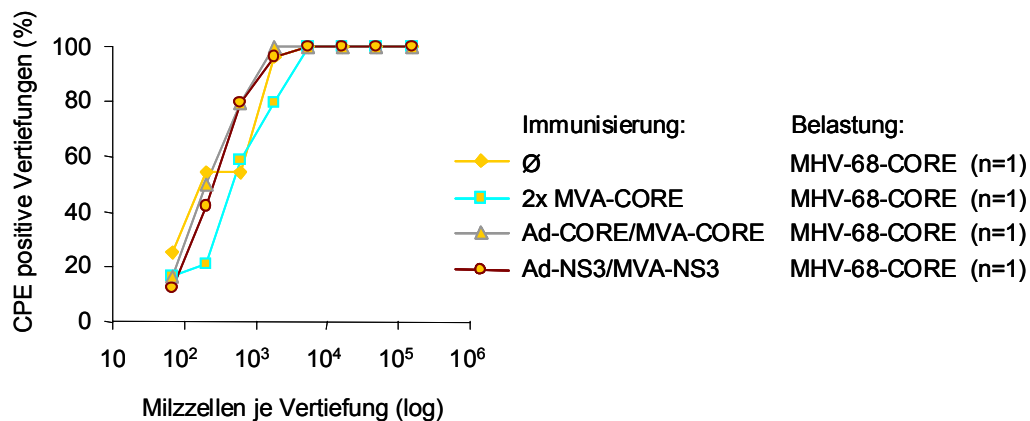
Zusätzlich zur Bestimmung der Splenomegalie wurden Zellen aus einem Teil der in 4.7.1.3 beschriebenen Versuche zur Messung des Anteils der Milzzellen verwendet, die aus der Latenz reaktivieren. Dabei wurde erwartet, dass nach homologer und heterologer Immunisierung mit MVA-CORE bzw. Ad-CORE/MVA-CORE die Reaktivierung MHV-68-CORE-infizierter Splenozyten abnimmt. Erfolgte eine Belastung i.p. 4 Wochen nach der 2. Immunisierung, ist aus Abb. 4.7.2.1a ersichtlich, dass nur eine homologe Impfung mit MVA-CORE die Frequenz reaktivierender Splenozyten reduzieren konnte, da eine in 17500 Zellen reaktivierte, während die Reaktivierungsfrequenz der Kontrollimpfung mit Ad-NS3/MVA-NS3 bei 1: 8700 lag und damit mit der Gruppe ohne Vakzinierung vergleichbar war (eine reaktivierende Milzzelle in 8600). Dagegen war nach heterologer Immunisierung mit Ad-CORE/MVA-CORE die Reaktivierung mit einer Zelle in 1500 etwa sechsmal höher als bei den Kontrollen.



**Abb. 4.7.2.1a** Frequenz reaktivierender Milzzellen nach homologer und heterologer Immunisierung mit MVA bzw. Adenovirus. C57BL/6 Mäuse wurden an Tag 0 i.p. mit  $1 \times 10^9$  PFU Ad-NS3,  $1 \times 10^8$  IE MVA-CORE oder  $1 \times 10^9$  PFU Ad-CORE immunisiert. An Tag 14 erfolgte eine i.p. Impfung mit  $1 \times 10^8$  IE MVA-NS3 oder  $1 \times 10^8$  IE MVA-CORE. Eine Kontrollgruppe blieb ohne Immunisierung. 4 Wochen nach der 2. Immunisierung folgte die Belastungsinfektion mit MHV-68-CORE ( $1 \times 10^6$  PFU; i.p.). An Tag 17 nach Belastung wurden die Milzzellen je Gruppe vereinigt und die Reaktivierung in 3-fach Verdünnungen bestimmt. n, Zahl der Experimente; Ø, keine Immunisierung.

Auch bei einer i.n. Belastung 8 Wochen nach der 2. Immunisierung zeigte sich, dass eine Impfung mit MVA-CORE die Frequenz reaktivierender Milzzellen um mehr als die Hälfte auf 1:840 reduzieren konnte, während bei der Kontrollimpfung eine Zelle in 370 reaktivierte.

Es ließ sich jedoch auch beobachten, dass die heterologe Immunisierung mit Ad-CORE/MVA-CORE keine Reduktion der Frequenz zur Folge hatte, da der Wert mit einer reaktivierenden Milzzelle in 320 mit dem der Kontrollvakzinierung vergleichbar war. Die Frequenz der Gruppe ohne Vakzinierung lag mit einer reaktivierenden Milzzelle in 550 zwischen der homologen Impfung und der heterologen spezifischen bzw. Kontrollimmunisierung.

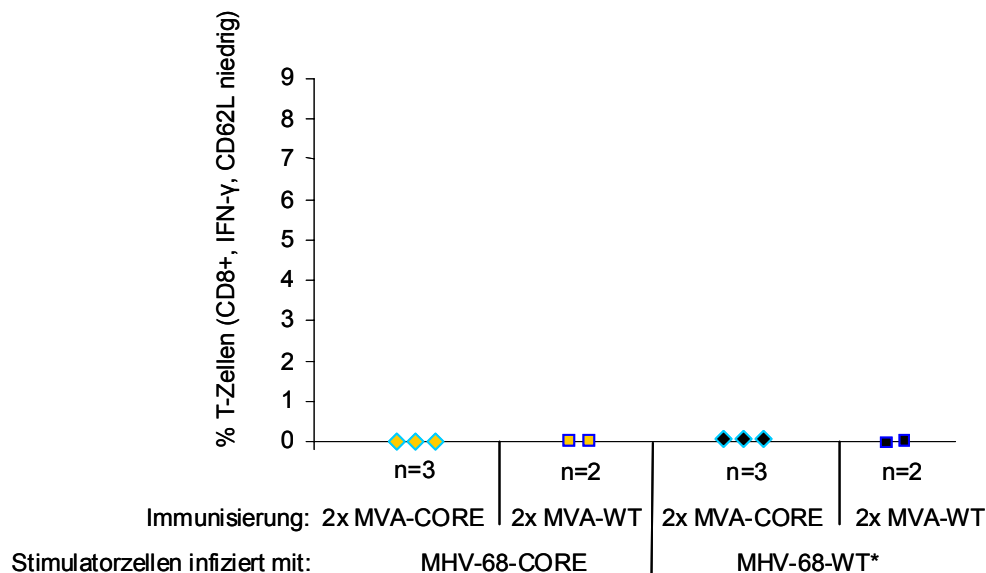


**Abb. 4.7.2.1b** Frequenz reaktivierender Milzzellen nach homologer und heterologer Immunisierung mit MVA bzw. Adenovirus. C57BL/6 Mäuse wurden an Tag 0 i.p. mit  $1 \times 10^9$  PFU Ad-NS3,  $1 \times 10^8$  IE MVA-CORE oder  $1 \times 10^9$  PFU Ad-CORE immunisiert. An Tag 14 erfolgte eine i.p. Impfung mit  $1 \times 10^8$  IE MVA-NS3 oder  $1 \times 10^8$  IE MVA-CORE. Eine Kontrollgruppe blieb ohne Immunisierung. 8 Wochen nach der 2. Immunisierung folgte die Belastungsinfektion mit MHV-68-CORE ( $5 \times 10^4$  PFU; i.n.). An Tag 17 nach Belastung wurden die Milzzellen je Gruppe vereinigt und die Reaktivierung in 3-fach Verdünnungen bestimmt. n, Zahl der Experimente; Ø, keine Immunisierung

#### 4.7.2.2 Untersuchung CORE-spezifischer T-Zellantwort durch intrazelluläre IFN $\gamma$ -Färbung

Durch intrazelluläre Zytokinfärbung sollte gezeigt werden, ob durch die Stimulation von Milzzellen mit MC3T3 Fibroblasten, die *in vitro* mit MHV-68-CORE infiziert worden waren, eine Amplifikation CORE-spezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten aus mit MVA-CORE-immunisierten Mäusen möglich ist. Wie aus Abb. 4.7.2.2 hervorgeht, ließen sich jedoch keine IFN $\gamma$ -produzierenden, aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen nachweisen, wenn Milzzellen aus MVA-CORE-immunisierten Tieren mit MHV-68-CORE-infizierten MC3T3 inkubiert wurden. Alle anderen Gruppen zeigten als Negativkontrollen erwartungsgemäß keine Amplifikation von

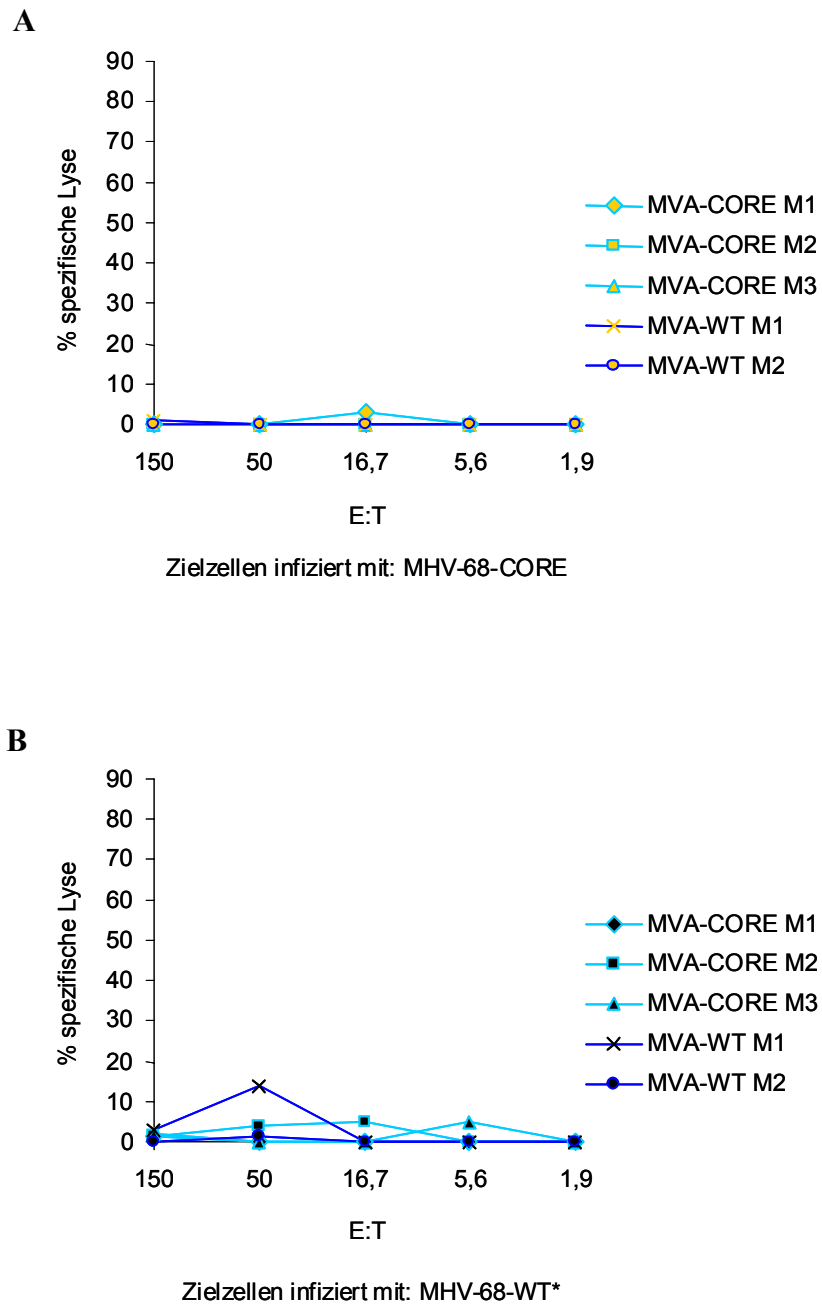
CORE-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten. Eine Positivkontrolle war allerdings nicht möglich, da im Labor keine C57BL/6-restringierten Peptiddepote von CORE zur Verfügung standen.



**Abb. 4.7.2.2 ICS zum Nachweis CORE-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten.** MC3T3 Fibroblasten wurden jeweils mit einer MOI von 1 mit MHV-68-CORE oder MHV-68-WT\* infiziert. Nach 16 h erfolgte eine 10-stündige Inkubation mit Milzzellen aus MVA-CORE- oder MVA-WT-immunisierten C57BL/6 Mäusen. Mittels ICS wurde der Anteil IFN $\gamma$ -produzierender, aktivierter (CD62L niedrig) CD8<sup>+</sup>-T-Zellen bestimmt.

#### 4.7.2.3 Bestimmung CORE-spezifischer Zelllyse im Zytotoxizitätstest

Da nach Impfung mit MVA-CORE keine CORE-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten durch intrazelluläre IFN $\gamma$ -Färbung nachgewiesen werden konnten, wurde aufgrund der höheren Sensitivität ein <sup>51</sup>Cr-Freisetzung-Assay durchgeführt. Damit sollte versucht werden, zytotoxische Aktivität der Zellen zu zeigen, die sich evtl. unterhalb der Nachweisgrenze des ICS befanden. So wurde wegen des gemeinsamen Antigens CORE erwartet, dass Zielzellen, die mit MHV-68-CORE infiziert worden waren, durch Effektorzellen aus MVA-CORE immunisierten Mäusen lysiert werden. Wie jedoch aus Abb. 4.7.2.3 A hervorgeht, war keine CORE-spezifische Lyse nachzuweisen. In allen anderen Ansätzen (Negativkontrollen) konnte erwartungsgemäß keine Zelllyse gemessen werden. Eine Positivkontrolle war nicht möglich, da im Labor keine C57BL/6-restringierten Peptiddepote von CORE zur Verfügung standen.



**Abb. 4.6.2.4**  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungs-Assay zum Nachweis CORE-spezifischer Zelllyse MHV-68-CORE infizierter Fibroblasten. MC3T3 Fibroblasten wurden mit einer MOI von 10 mit MHV-68-CORE (A) oder MHV-68-WT\* (B) infiziert. Nach der Aufnahme von  $^{51}\text{Cr}$  folgte die 6-stündige Inkubation mit der Primärkultur von Milzzellen aus MVA-CORE- oder MVA-WT-immunisierten Mäusen. Anschließend wurde das von den Zielzellen freigesetzte  $^{51}\text{Cr}$  gemessen. E:T, Verhältnis Effektorzelle zu Zielzelle (T, *target*); M1, M2, M3, Maus 1, 2 oder 3.

## 5 Diskussion

Für viele chronische Virusinfektionen wie AIDS oder Hepatitis C existieren bisher noch keine Vakzine, die diese Krankheiten präventiv oder therapeutisch bekämpfen können. Die Entwicklung solcher Impfstoffe wird vor allem durch das Fehlen geeigneter Kleintier-Modelle stark eingeschränkt. Zwar entstanden für Hepatitis C Zellkulturmodelle, die eine effiziente Replikation von HCV und Untersuchungen des viralen Zellzyklusses ermöglichen (Kato et al. 2003; Lindenbach et al. 2005; Wakita et al. 2005; Zhong et al. 2005), allerdings erlaubt dies keine Analyse von Immunantworten im Zusammenspiel von Virus und Wirtsorganismus. Des Weiteren existieren Mausmodelle, die transgen für einzelne Hepatitis C Virus Proteine oder HCV Polyproteine sind und bei denen teilweise die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms festgestellt werden konnte (Moriya et al. 1998; Disson et al. 2004). Allerdings wurden in den transgenen Modellen in Hinblick auf den Phänotyp des jeweiligen Transgens in der Maus sehr kontroverse Ergebnisse beobachtet (Fimia et al. 2003). Außerdem sind diese HCV Proteine intrinsisch und nicht, wie dies bei einer HCV Infektion eigentlich der Fall ist, von außen in den Organismus gelangt. So werden aufgrund eines ähnlichen Krankheitsverlaufs von HCV wie beim Menschen die meisten Studien zur Effizienz von Vakzinen im Schimpansen durchgeführt, was neben den hohen Kosten und der geringen Verfügbarkeit auch ethisch ein Problem darstellt.

Das murine Gammaherpesvirus 68 sollte es daher ermöglichen, Vakzine gegen HCV Antigene im Zusammenhang mit einer chronischen Virusinfektion zu untersuchen. Im Kontext von MHV-68 können diese Antigene dauerhaft in die Maus eingebracht werden und erlauben damit, die Wirkung von Impfstoffen über einen längeren Zeitraum zu beobachten. Da MHV-68 jedoch auch eine akut-lytische Infektionsphase aufweist, ist es genauso geeignet, Antigene von Erregern zu untersuchen, bei denen nicht die chronische Infektion im Vordergrund steht. MHV-68 kann somit sowohl in der akuten als auch chronischen Phase der Infektion als Monitor fungieren, der es erlaubt, Impfstoffe gegen die verschiedensten Antigene zu überprüfen.

Voraussetzung dafür ist zum einen, dass die zu untersuchenden Antigene leicht in MHV-68 eingebracht werden können und zum anderen, dass definierte Parameter einer MHV-68 Infektion für die Untersuchung eines Impfeffekts herangezogen werden können.

Die BAC-Technologie hat es ermöglicht, MHV-68 als bakterielles, artifizielles Chromosom zu klonieren und damit das relativ große Genom von MHV-68 auf bakterieller Ebene einfach und schnell zu manipulieren (Adler et al. 2000; Adler et al. 2001). Der Vorteil, eine Insertion



oder Deletion von Genen in Bakterien durchzuführen, liegt in der einfachen Selektion rekombinanter MHV-68 ohne, wie dies oft in Zellkultur der Fall ist, ein Verschleppen von Wildtyp-Virus zu riskieren. Außerdem ist die Häufigkeit homologer Rekombinationsereignisse in Bakterien höher als in eukaryontischen Zellen, so dass die Herstellung rekombinanter MHV-68 schneller und effektiver durchgeführt werden kann (Messerle et al. 1997; Adler et al. 2000). Das Prinzip der Shuttle-Mutagenese nutzt diese Rekombination, und so konnten durch das Einbringen eines Shuttle-Plasmids mit dem gewünschten Gen und anschließender Rekombination mit dem MHV-68 Genom die Gene für Ovalbumin (OVA), HCV NS3 und HCV CORE leicht in das MHV-68 Genom eingebracht werden. Die Insertion der Gene erfolgte am linken Ende des MHV-68 Genoms in eine nicht-kodierende Region zwischen ORF M1 und ORF M2 und sollte daher die Expression von MHV-68 Genen nicht stören. Nach der Rekonstitution der rekombinanten MHV-68 und der Behandlung mit der Rekombinase Cre in Zellkultur, erleichterte das in der BAC-Sequenz vorhandene *green fluorescent protein* (GFP) die Selektion rekombinanter MHV-68 ohne BAC-Sequenz. Die BAC-Sequenz mit Markern und dem gfp-Gen musste aus den rekombinanten MHV-68 entfernt werden, da gezeigt wurde, dass zwar nicht das Wachstumsverhalten *in vitro*, wohl aber die Replikationsfähigkeit von rekombinanten MHV-68 *in vivo* durch die BAC-Sequenz eingeschränkt war (Adler et al. 2001). Die Analyse der rekombinanten MHV-68 durch Restriktionsenzymverdau und anschließendem *Southern Blot* konnte die Integration der Gene an die gewünschte Stelle im Genom bestätigen (Abb. 4.2.1.1 und 4.2.1.2). Des Weiteren gaben Restriktionsanalysen Aufschluss darüber, inwieweit die 40 bp Wiederholungssequenzen von MHV-68 durch die Mutagenese beeinflusst wurden (vgl. Abb. 1.5.1). In *E.coli* kann es während der Shuttle-Mutagenese zu Rekombinationen zwischen den 40 bp Wiederholungen kommen, welche Deletionen dieser Sequenzen verursachen (Adler et al. 2000). Es gibt Hinweise, dass ein vollständiger, aber nicht ein partieller Verlust dieser Sequenzen zu einer Verminderung von Splenomegalie und Reaktivierungsfrequenz führen kann (N. Thakur unveröffentlichte Daten). Da eine partielle Reduktion der 40 bp Sequenzen nicht zu vermeiden ist (Virgin IV et al. 1997; Adler et al. 2000), wurden Klone gewählt, die eine geringe Reduktion der 40 bp Sequenzen aufwiesen und ein entsprechender MHV-68 Wildtyp als Kontrolle verwendet.

Voraussetzung dafür, dass durch die Immunisierungen Immunantworten gegen die Antigene OVA, NS3 und CORE ausgelöst werden, ist die Expression dieser Proteine. *Western Blot* Analysen konnten eine erfolgreiche *in vitro* Expression der Proteine nachweisen (Abb. 4.2.2), da jeweils Signale der erwarteten Größen von 37 kDa für OVA, 19 kDa für CORE und

67 kDa für NS3 detektiert werden konnten. *In vivo* wurde keine Expressionsanalyse durchgeführt, jedoch gibt die Veränderung des Phänotyps der rekombinanten MHV-68 im Hinblick auf Splenomegalie und Reaktivierungsfrequenz einen Hinweis auf die Expression der Proteine (s.u.).

Nach erfolgreicher Herstellung der rekombinanten MHV-68 und dem Expressionsnachweis der eingebrachten Proteine galt es durch *in vitro* und *in vivo* Infektion zu prüfen, ob die Insertion der Gene Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten der Viren hatte. *In vitro* konnte durch den Vergleich der Mutanten- und WT-Viren in Wachstumskurven (Abb. 4.2.3) festgestellt werden, dass die Mutanten, verglichen zum Wildtyp, nicht in ihrer Replikationsfähigkeit eingeschränkt waren, da sie 96h nach Infektion zu ähnlichen Titern wie MHV-68-WT\* führten. Dies ermöglichte somit die einfache Produktion ausreichender Mengen der verschiedenen rekombinanten MHV-68, die später in den Impfstudien in kleinem und somit für die Größe der Maus unbedenklichem Volumen eingesetzt werden konnten.

In Hinblick auf die später geplanten Arbeiten im Tiermodell war es wichtig, die Eigenschaften der rekombinanten MHV-68 *in vivo* zu charakterisieren. Zu diesem Zweck wurden sowohl Parameter der lytischen als auch latenten Infektionsphase von MHV-68 gemessen. Um zu späteren Zeitpunkten die Wirksamkeit von Vakzinen untersuchen zu können, wurde überprüft, ob der *in vivo* Phänotyp der rekombinanten MHV-68 dem des Wildtyp-Virus entsprach, d.h., ob ein deutlicher Unterschied zu nicht-infizierten Mäusen bestand. Falls die Insertion zu einer Attenuierung im Phänotyp führen würde, so dass die Parameter der lytischen und latenten Infektionsphase nicht messbar wären, wäre ohne oder mit Vakzinierung kein Unterschied zwischen den Parametern und daher kein Impfeffekt feststellbar.

Studien zur Pathogenese von MHV-68 haben gezeigt, dass die Titer der lytischen Replikation von MHV-68 in der Lunge nach intranasaler und in der Milz nach intraperitonealer Infektion ihren Höhepunkt zwischen Tag 5 und Tag 7 nach Infektion erreichen (Sunil-Chandra et al. 1992a). Daher wurde zur Titerbestimmung Tag 6 nach Infektion gewählt. Es konnte gezeigt werden, dass MHV-68-OVA, MHV-68-NS3 und MHV-68-CORE sowohl in der Lunge als auch in der Milz die gleichen Titer wie MHV-68-WT\* aufwiesen (Abb. 4.3.1.1 und 4.3.1.2). Somit hatte die Insertion der Gene keinen Einfluss auf die Replikationsfähigkeit der rekombinanten MHV-68 in der lytischen Phase der Infektion. Dies verdeutlicht auch, dass diese Parameter für die Untersuchung einer Immunantwort nach Vakzinierung in der akuten Phase einer Infektion geeignet sind.

Im Zusammenhang mit einer chronischen Infektion, wie Hepatitis C, war es bei der

Überprüfung der Effizienz von Vakzinen wichtig, auch Parameter der latenten MHV-68 Infektion zu untersuchen. Die Etablierung der Latenz geht mit einer Infektion und massiven Proliferation von Milzzellen und daher Splenomegalie einher, die zwischen Tag 14 und 21 ihr Maximum erreicht (Sunil-Chandra et al. 1992a). Deshalb wurde die Splenomegalie und die Frequenz latent infizierter Milzzellen für MHV-68-OVA, MHV-68-NS3 und MHV-68-CORE zunächst an Tag 17 bestimmt. Im Gegensatz zur lytischen Infektionsphase konnten sowohl nach i.n. als auch nach i.p. Infektion deutliche Unterschiede zwischen den rekombinanten Viren untereinander und im Vergleich zu MHV-68-WT\* festgestellt werden. Das von MHV-68-OVA bzw. MHV-68-NS3 induzierte Milzgewicht war bei beiden Infektionsrouten im Vergleich zum Wildtyp-Virus stark reduziert. Entsprechend zeigte sich auch eine Reduktion der Frequenz reaktivierender Milzzellen, die nach i.n. Infektion so drastisch war, dass fast keine Reaktivierung mehr messbar war. Nach i.p. Infektion war die Reaktivierung hoch genug, um Frequenzberechnungen durchführen zu können. Trotz der Reduktion des Milzgewichts im Vergleich zu MHV-68-WT\* war das Milzgewicht von MHV-68-OVA und MHV-68-NS3 nach beiden Infektionsrouten signifikant höher als das von nicht-infizierten Mäusen und daher durchaus als Parameter für die Untersuchung von Vakzinierungseffekten einsetzbar. Gleiches galt für die Reaktivierung beider Viren nach i.p. Infektion. Im Gegensatz zu MHV-68-OVA und MHV-68-NS3 wurde nach Infektion mit MHV-68-CORE keine Reduzierung von Splenomegalie und Reaktivierung beobachtet. Verglichen mit dem Wildtyp-Virus war das Milzgewicht nach i.n. Infektion nicht verändert bzw. nach i.p. Infektion erhöht. Die Reaktivierung war bei beiden Infektionsrouten sogar deutlich höher als beim Wildtyp-Virus. Eigenschaften des CORE Proteins könnten eine mögliche Erklärung für diesen Phänotyp bieten (s.u.).

Nachdem sowohl die Insertion von OVA als auch von NS3 eine Verringerung von Milzgewicht und Reaktivierung zur Folge hatten, sollte am Beispiel von NS3 geklärt werden, ob die Insertion an sich, d.h. die Größe des Inserts im MHV-68 Genom, oder das Genprodukt Ursache dafür waren. Daher wurde MHV-68-NS3-RO konstruiert, welches das Gen für NS3 in reverser Orientierung (RO) zum Promotor trägt, so dass die gleiche Insertgröße vorhanden ist, jedoch keine Expression stattfinden sollte. Wäre die Insertgröße für die Veränderung des Phänotyps verantwortlich, wäre derselbe attenuierte Phänotyp zu erwarten, läge die Ursache jedoch beim Protein NS3, sollte aufgrund der fehlenden Expression von NS3 der Phänotyp des Wildtyps rekonstituiert werden. Wie jedoch die Ergebnisse aus 4.4 gezeigt haben, konnte mit MHV-68-NS3-RO das Milzgewicht zwar im Vergleich zu MHV-68-WT\* zu zwei Dritteln wiederhergestellt werden, blieb aber dennoch signifikant reduziert. Der Nachweis

von NS3-mRNA in MHV-68-NS3-RO infizierten Zellen durch RT-PCR brachte Aufschluss darüber, dass immer noch eine Expression von NS3, möglicherweise durch einen benachbarten Promotor im MHV-68-Genom, stattfand. Eine schwache Expression von NS3 konnte auch in MHV-68-NS3-RO infizierten Zellen im *Western Blot* detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Daher scheint wohl hauptsächlich das Protein NS3 für den attenuierten Phänotyp von MHV-68-NS3 verantwortlich zu sein, da der Wildtyp-Phänotyp durch die reverse Orientierung zum Großteil wiederhergestellt werden konnte, eine geringe Expression von NS3 jedoch eine gänzliche Rekonstitution verhindert hat. Um die Frage, ob die Insertgröße einen Beitrag zum attenuierten Phänotyp leistet, eindeutig zu klären, soll in weiteren Versuchen eine MHV-68 Mutante hergestellt werden, die das NS3 Gen mit einer Stop-Mutation oder Mutation zur Verschiebung des Leserasters trägt, um eine Expression des Proteins zu verhindern.

Allerdings gibt es mehrere Hinweise, die auf das Genprodukt als Ursache für den veränderten Phänotyp in Bezug auf Splenomegalie und Reaktivierung hindeuten. Durch die Insertion von OVA bzw. NS3 in MHV-68 und deren Expression können beide Proteine im MHV-68-Kontext als Antigen fungieren und Antigen-spezifische Immunantworten auslösen, die das jeweilige rekombinante MHV-68 zwar nicht an einer lytischen Replikation (s.o.), wohl aber an der Etablierung der Latenz hindern können. Die Ergebnisse der Ovalbumin-spezifischen Tetramerfärbung und der Ovalbumin- bzw. NS3-spezifischen intrazellulären Zytokinfärbung verdeutlichen, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen an diesem Effekt beteiligt sein könnten. Denn nach Infektion mit rekombinanten MHV-68 ohne vorhergehende Vakzinierung lassen sich bereits ca. 3,5-4,5% Ovalbumin- bzw. ca. 2% NS3-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten in der Maus nachweisen (siehe 4.5.2.2 und 4.6.2.2). Außerdem konnten Arbeiten anderer Autoren mit einem weiteren für Ovalbumin rekombinanten MHV-68 zeigen, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellantworten für eine Limitierung latenter Infektion verantwortlich sind (Braaten et al. 2005). Einen weiteren Hinweis, dass das Genprodukt für die Veränderung des Phänotyps verantwortlich ist, liefert die Tatsache, dass bei MHV-68-CORE trotz der Insertion von CORE keine Attenuierung zu beobachten war, sondern nach i.n. Infektion sogar ein erhöhtes Milzgewicht und eine erhöhte Reaktivierungsfrequenz im Vergleich zum Wildtyp-Virus festzustellen war. Des Weiteren wird im Labor mit einer MHV-68 Mutante gearbeitet, die an gleicher Stelle wie die in der Arbeit verwendeten rekombinanten MHV-68 ein Insert gleicher Größe trägt und verglichen mit MHV-68-WT\* keine Veränderung der Splenomegalie und der Reaktivierung aufweist.

Damit zusätzlich geklärt werden konnte, ob der von MHV-68-OVA und MHV-68-NS3

ausgelöste, attenuierte Phänotyp möglicherweise durch eine zusätzliche, ungewollte Modifikation, also nicht durch die Insertion der entsprechenden Gene, verursacht wurde, wurden Mäuse mit Revertanten der jeweiligen Viren infiziert. Da dadurch der Phänotyp von MHV-68-WT\* wiederhergestellt werden konnte, konnte dies als Ursache für den veränderten Phänotyp der rekombinanten MHV-68 ausgeschlossen werden.

Um ein Mausmodell mit MHV-68 als Belastungsvirus für die Untersuchung von Vakzinierungseffekten etablieren zu können, wurde zunächst Ovalbumin als Modell-Antigen eingesetzt, weil es als sehr immunogen gilt und gut definierte Epitope besitzt. Es wird daher häufig für die Analyse von Immunantworten benutzt (Parks et al. 2002; Sparks-Thissen et al. 2004; Braaten et al. 2005; He X et al. 2005; He Y et al. 2005). Mit Hilfe von MHV-68-OVA konnten durch die Analyse verschiedener Zeitpunkte und Routen (siehe 4.5.1) der Infektion die Belastungsschemata optimiert werden, die nach Immunisierung den größten Impfeffekt gezeigt haben, d.h. bei denen die größte Reduktion MHV-68 spezifischer Parameter hervorgerufen wurde (Tab. 4.5.1). Bei den Parametern, die für die Untersuchung einer Vakzinierungseffizienz herangezogen wurden, handelte es sich um solche der lytischen sowie der latenten Phase einer MHV-68 Infektion, die bereits zur Charakterisierung der rekombinanten MHV-68 herangezogen wurden. So erfolgte nach i.n. und nach i.p. Belastung mit den jeweiligen rekombinanten MHV-68 die Bestimmung der lytischen Titer in der Lunge und in der Milz an Tag 6, die Messung der Splenomegalie und der Frequenz reaktivierender Milzzellen an Tag 17 bzw. bei MHV-68-NS3 an Tag 21 (siehe 4.3.2.3). Für die Belastung mit den rekombinanten MHV-68 wurden die intranasale sowie die intraperitoneale Infektionsroute gewählt. Die intranasale Route wird in Analogie zu anderen  $\gamma$ -Herpesviren als die wahrscheinlichste natürliche Infektionsroute vermutet (Nash et al. 2001) und wird, neben der intraperitonealen, für MHV-68 Experimente am häufigsten in der Literatur erwähnt (Stevenson et al. 1999; Tibbetts et al. 2003; Simas et al. 2004; Sparks-Thissen et al. 2004). Als weitere Parameter konnten bei Wiederholungen der Immunisierungs- und Belastungsexperimente auch intrazelluläre Zytokinfärbungen und teilweise Tetramerfärbungen Aufschluss über Antigen-spezifische Immunantworten geben.

Für die Immunisierungen wurden rekombinantes modifiziertes Vacciniavirus Ankara sowie zum Teil auch rekombinante Adenoviren verwendet. Beide Vektoren haben sich bei Impfxperimenten als immunogene und sichere Vektoren herausgestellt, die effizient Immunantworten gegen inserierte Antigene auslösen und Schutzwirkung gegen Infektionen vermitteln können (Pastoret et al. 1996; Sullivan et al. 2000; Souza et al. 2005). Die Immunisierungen wurden dabei in *prime-boost* Sequenzen, d.h. mit einer Initial- und einer

verstärkenden Folgevakzinierung durchgeführt, weil sich diese Schemata als besonders effizient für das Hervorrufen von Immunantworten erwiesen haben (Woodland 2004). Versuche zur Detektion Antigen-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellantworten haben außerdem gezeigt, dass mit einem Abstand von zwei Wochen zwischen *prime* und *boost* die besten Ergebnisse erzielt werden konnten (Daten nicht gezeigt). Die zweimalige Vakzinierung erfolgte homolog, d.h. zweimal mit rekombinatem MVA (rMVA) oder heterolog, d.h. jeweils einmal mit rMVA bzw. mit rekombinatem Ad (rAd). Die Belastung mit den rekombinanten MHV-68 (rMHV-68) erfolgte frühestens 4 Wochen nach *boost*, weil bekannt ist, dass MVA aufgrund seiner Immunogenität das angeborene Immunsystem längere Zeit nach einer Immunisierung stark stimulieren kann (Franchini et al. 2004). Daher wäre ein Antigen-spezifischer, auf erworbene Immunität beruhender Impfeffekt durch unspezifische Immunantworten des MVA-Vektors maskiert worden. Um auch die auf Gedächtniszellen basierenden Immunantworten nach Vakzinierung abzugreifen, wurde als ein zweiter Zeitpunkt für die Belastung 8 Wochen nach *boost* gewählt.

Betrachtet man die lytischen und latenten Parameter einer Belastung mit MHV-68-OVA bzw. MHV-68-NS3 nach *prime-boost* Immunisierung mit MVA-OVA oder MVA-NS3 bzw. Ad-NS3/MVA-NS3, lässt sich feststellen, dass in beiden Fällen ein Vakzinierungseffekt erzielt werden konnte. Durch Antigen-spezifische Immunisierung konnten sowohl die lytischen Virustiter in der Lunge und in der Milz als auch die Splenomegalie und Frequenz reaktivierender Milzzellen signifikant reduziert werden. Ausnahmen wurden nur in zwei Fällen beobachtet. Bei den lytischen Titern der Milz nach i.p. Belastung mit MHV-68-NS3 war es nicht möglich, die Milztiter durch Immunisierung spezifisch zu senken (Abb. 4.6.1.2). Gleiches galt auch zum Teil für das Milzgewicht und die Reaktivierungsfrequenz nach i.p bzw. i.n. Belastung mit MHV-68-NS3 (Abb. 4.6.1.3 und 4.6.2.1). Obwohl die lytischen Milztiter durch die homologe bzw. heterologe Immunisierung mit MVA-NS3 bzw. Ad-NS3/MVA-NS3 stark reduziert werden konnten, kann der Effekt wegen der Reduktion der Titer durch die Kontrollimpfung mit MVA-WT nicht als spezifisch angesehen werden. So scheint in diesem Fall die hohe Immunogenität von MVA-WT auch über 8 Wochen nach der Belastung mit MHV-68-NS3 das Immunsystem so anzuregen, dass eine unspezifische Titerreduktion möglich war. In Hinblick auf die Splenomegalie nach i.n. Belastung mit MHV-68-NS3 konnten weder die homologe noch die heterologe Impfung mit MVA-NS3 bzw. Ad-NS3/MVA-NS3 das Milzgewicht spezifisch reduzieren. Wird jedoch die entsprechende Reaktivierungsfrequenz betrachtet, war bei beiden Immunisierungsschemata eine Reduktion der latent infizierten Zellen möglich. Eine Erklärung dafür könnte darin liegen, dass durch

Proliferation von NS3-spezifischen Immunzellen in der Milz nach Stimulation mit MHV-68-NS3 das Milzgewicht erhöht und daher die auf der Impfung basierende Reduktion des Milzgewichts teilweise kompensiert wurde. Deshalb scheint die Bestimmung der Reaktivierungsfrequenz in diesem Fall der geeigneteren Parameter zur Evaluation einer Impfwirkung zu sein.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass im Fall von NS3 bei allen Parametern eine heterologe Immunisierung mit Ad-NS3 und MVA-NS3 wesentlich effektiver war als eine homologe Vakzinierung mit MVA-NS3. In dieser Arbeit wurde generell eine Reduktion MHV-68-NS3 spezifischer Parameter nach homologer Vakzinierung mit MVA-NS3 erzielt. Damit konnten Ergebnisse anderer Arbeiten bestätigt werden, bei denen eine homologe Impfung mit dem gleichen MVA-Vektor trotz MVA-spezifischer Vektorimmunität möglich war (Ramirez et al. 2000; Wang et al. 2004). Durch eine heterologe Immunisierung konnte die Impfwirkung gesteigert werden. Auch andere Experimente verdeutlichen die hohe Vakzinierungseffizienz einer heterologen Immunisierung mit rekombinanten Adenoviren und rekombinanten MVA (Bruna-Romero et al. 2001; Gilbert et al. 2002; Casimiro et al. 2004).

Neben der höheren Effizienz einer heterologen Vakzinierung wurde bei den Immunisierungsstudien auch deutlich, dass die MHV-68-OVA- bzw. MHV-68-NS3-spezifischen lytischen Titer in stärkerem Maße reduziert wurden, wenn die Belastung i.p. erfolgte. Da sowohl Immunisierung als auch Belastung i.p. durchgeführt wurden, scheint eine zusätzliche, lokale Immunantwort dafür verantwortlich zu sein, dass die Milztiter stärker reduziert wurden als die Lungentiter nach i.p. Immunisierung und i.n. Belastung. So konnte bei Versuchen zu mukosaler Verabreichung von MVA eine erhöhte lokale Immunantwort nachgewiesen werden (Evans et al. 2003). Auch Studien zur Vakzinierung gegen Tumoren zeigten einen lokalen Immunisierungseffekt von MVA (Horig et al. 2003; Kaufman et al. 2006). Um den lokalen Immunisierungseffekt von MVA hinsichtlich einer Belastung mit rekombinanten MHV-68 zu bestätigen, könnte in weiteren Experimenten geklärt werden, ob nach i.n. Immunisierung eine stärkere Reduktion von Lungentitern erzielt werden könnte als nach i.p. Immunisierung. Für die latenten Parameter von MHV-68-OVA bzw. MHV-68-NS3 war nach i.p. Immunisierung und Belastung kein lokaler Effekt zu beobachten. Da nach beiden Belastungsrouten länger Zeit für eine Immunantwort blieb (mind. 17 Tage statt 6 Tage), schienen lokale Immunantworten keine Rolle zu spielen bzw. durch systemische Immunantworten ausgeglichen zu werden.

ICS und Tetramerfärbungen deuteten darauf hin, dass Antigen-spezifische CD8<sup>+</sup>, aktivierte und IFN $\gamma$ -produzierende T-Lymphozyten an der Reduktion MHV-68 spezifischer Parameter

beteiligt waren (siehe 4.5.2.2, 4.5.2.3 und 4.6.2.2). Dies steht im Einklang mit Ergebnissen, dass MVA effektiv zelluläre, insbesondere auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen basierende Immunantworten auslösen kann (Sutter et al. 1994; Schneider et al. 1998; Zavala et al. 2001). Die Tatsache, dass durch MVA als *boost*-Vektor auch lang anhaltende Gedächtnis-T-Zellantworten induziert werden können (Amara et al. 2002; Vuola et al. 2005), spiegelt sich darin wider, dass MHV-68-OVA- bzw. MHV-68-NS3-spezifische Parameter sogar noch über 8 Wochen nach der Folgeimmunisierung reduziert waren (4.5.1 und 4.6.1). Sowohl nach homologer Immunisierung mit rMVA als auch, im Fall von NS3, nach heterologer Immunisierung mit rAd und rMVA, waren erhöhte Frequenzen Antigen-spezifischer, zytotoxischer T-Zellen zu beobachten. Dass diese T-Lymphozyten auch imstande waren, ihre zytotoxische Funktion zu erfüllen, konnte durch die Antigen-spezifische Lyse MHV-68-OVA- bzw. MHV-68-NS3-infizierter Zielzellen bestätigt werden (4.5.2.5 und 4.6.2.4). Dabei wurde auch gezeigt, dass die Präsentation der Antigene und die Zelllyse hauptsächlich MHC Klasse I restringiert ist, da, im Fall von Ovalbumin, MHC I blockierende Antikörper eine Zelllyse inhibieren konnten (Daten nicht gezeigt). An dieser Stelle wurde auch deutlich, dass rekombinante MHV-68 nicht nur *in vivo* zur Evaluierung von Impfstoffen, sondern auch *ex vivo* durch die Infektion von Stimulatorzellen zur Expansion Antigen-spezifischer T-Lymphozyten geeignet waren. So konnten Ovalbumin- bzw. NS3-spezifische T-Lymphozyten aus MVA-infizierten Mäusen durch Stimulation mit MHV-68-OVA- bzw. MHV-68-NS3-infizierten Zellen amplifiziert und im ICS nachgewiesen werden. Die anschließende Verwendung der rekombinanten MHV-68 zur Infektion von Zielzellen, die eine Präsentation des Antigens über MHC Klasse I ermöglichten, konnte eine Antigen-spezifische Zytotoxizität der CD8<sup>+</sup> T-Zellen in <sup>51</sup>Cr Freisetzung-Assays nachweisen.

Dass eine Beteiligung des zellulären Arms des Immunsystems als Effektor bei der Antigen-spezifischen Reduktion der rMHV-68-Parameter nachgewiesen werden konnte, ist besonders dahingehend von Bedeutung, da zelluläre Immunantworten vor allem bei der Bekämpfung chronischer Virusinfektionen eine große Rolle spielen (Seder et al. 2000; Zinkernagel 2002). So konnten in dieser Arbeit durch zelluläre Immunantworten zwar sowohl lytische als auch latente Parameter einer Infektion mit MHV-68-OVA bzw. MHV-68-NS3 reduziert werden, dennoch war es durch die Vakzinierungen nicht möglich, die Etablierung einer chronisch-persistierenden Infektion gänzlich zu verhindern. *Tibbetts et al.* (Tibbetts et al. 2003) konnten jedoch zeigen, dass bereits bei einer Infektion mit sehr geringen Mengen an MHV-68 eine Etablierung der Latenz erfolgt. Daher müsste der Titer von MHV-68 sehr stark reduziert werden, um eine persistierende Infektion mit MHV-68 zu verhindern.



Die Immunisierungsstudien haben Hinweise darauf gegeben, dass die Impfeffizienz stark vom Antigen abhängig zu sein scheint. Während die Vakzinierungen für die immunogenen Proteine Ovalbumin und NS3 effektive spezifische Immunantworten hervorgerufen haben, konnten diese Effekte für CORE nicht beobachtet werden. Zwar reduzierte sich die Reaktivierungsfrequenz MHV-68-CORE-infizierter Milzzellen durch eine homologe Vakzinierung mit MVA-CORE, aufgrund der geringen Anzahl an Experimenten sind diese Ergebnisse jedoch eher vorsichtig zu interpretieren. Dazu kommt, dass eine Immunisierung mit Ad-CORE/MVA-CORE durch die eigentlich verstärkende Wirkung des heterologen Impfschemas einen größeren Impfeffekt hätte haben sollen, wider Erwarten allerdings keine Reduktion der Reaktivierungsfrequenz zu beobachten war. Auch die lytischen Titer von MHV-68-CORE in Lunge und Milz konnten nicht durch eine spezifische Impfung verringert werden. Dies lässt vermuten, dass CORE seine immunmodulatorischen Eigenschaften auch in der Maus ausüben und so eine Immunantwort supprimieren kann. Von Kittlesen *et al.* (Kittlesen *et al.* 2000) wurde gezeigt, dass CORE an den Komplementrezeptor gC1qR, der auf Makrophagen und T-Zellen exprimiert wird, binden kann. Dies führt zu einer verringerten IL-12 Ausschüttung (Eisen-Vandervelde *et al.* 2004). Damit können die Differenzierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu proinflammatorischen T<sub>H</sub>1-Zellen inhibiert und deren Effektorfunktionen eingeschränkt werden. Ergänzt wird die Suppression der T-Zellfunktionen durch die Tatsache, dass die Bindung von CORE an gC1qR die Proliferation von und die IL-2- und IFN $\gamma$ -Ausschüttung durch T-Zellen verhindern kann (Kittlesen *et al.* 2000). Auch *in vivo* ließ sich, wie dies Daten HCV-infizierter Patienten zeigten, ein Zusammenhang zwischen verringerter IL-2 Produktion und verminderter T-Zelldifferenzierung beobachten (Francavilla *et al.* 2004). Des Weiteren wurde in Versuchen gezeigt, dass CORE die Differenzierung dendritischer Zellen beeinträchtigte, wodurch diese Zellen stark in ihrer Funktion als Antigen-präsentierende Zellen eingeschränkt waren (Dolganiuc *et al.* 2003; Sarobe *et al.* 2003). Dies verhinderte *in vitro* und *in vivo* die Induktion von T-Zellantworten (Sarobe *et al.* 2002; Sarobe *et al.* 2003). Diese Ergebnisse zu den immunmodulatorischen Eigenschaften von CORE geben einen Hinweis darauf, weshalb in dieser Arbeit zum einen *in vitro* keine Anreicherung CORE-spezifischer T-Lymphozyten möglich war (4.7.2.2 und 4.7.2.3) und zum anderen *in vivo* kein CORE-spezifischer Impfeffekt beobachtet werden konnte. Unveröffentlichte Daten aus der Arbeitsgruppe von C. Staib konnten jedoch zeigen, dass nach heterologer Immunisierung von HLA.A\*0201 Mäusen (C57BL/6 Mäuse mit humanisierten MHC Klasse I Molekülen) mit Ad-CORE/MVA-CORE effektiv CORE-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellantworten induziert werden konnten. Allerdings wurde in diesen Experimenten ein CORE-Peptid zur

Stimulation der T-Zellen verwendet und nicht, wie in dieser Arbeit, MHV-68-CORE. Da MHV-68 das gesamte CORE-Protein trägt, liegt die Vermutung nahe, dass in diesem Fall CORE seine immunmodulatorischen Funktionen im Kontext von MHV-68 ausüben konnte und daher keine Stimulation CORE-spezifischer T-Zellen möglich war. Die Induktion CORE-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen in C57BL/6 Mäusen nach Immunisierung mit Ad-CORE/MVA-CORE müsste in weiteren Versuchen durch Stimulation mit einem C57BL/6-CORE-Peptid nachgewiesen werden, da nach *ex vivo* Stimulation mit MHV-68-CORE im ICS keine CORE-spezifischen T-Zellen detektiert werden konnten. Die immunsupprimierende Wirkung von CORE im Kontext von MHV-68 könnte zudem erklären, weshalb durch eine Immunisierung größtenteils keine Reduktion MHV-68-CORE spezifischer Parameter möglich war. Zwar könnten durch eine Vakzinierung mit Ad-CORE/MVA-CORE, wie unveröffentlichte Daten aus der Arbeitsgruppe von C. Staib vermuten lassen (s.o.), genug CORE-spezifische T-Zellen induziert worden zu sein, allerdings konnten diese keine Belastungsinfektion durch MHV-68-CORE beeinflussen. Versuche im Mausmodell von *Large et al.* (Large et al. 1999) konnten zudem bestätigen, dass CORE im Kontext anderer Viren eine Immunantwort gegen diese Viren beeinflussen konnte. Durch Infektion von Mäusen mit Vacciniaviren, in welche das Gen für CORE inseriert wurde, ließ sich eine verminderte IL-2- und IFN $\gamma$ -Produktion nachweisen, was zu einer verringerten Aktivität Vacciniavirus-spezifischer zytotoxischer T-Zellen führte. In Bezug auf die Ergebnisse dieser Arbeit scheint sich also für CORE im Kontext von MHV-68 eine immunsupprimierende Wirkung durch Beeinträchtigung von T-Lymphozyten zu bestätigen, da im Allgemeinen kein spezifischer Impfeffekt gegen MHV-68-CORE erzielt wurde. Bekräftigt wird der suppressive Effekt von CORE vor allem durch die Tatsache, dass sich CORE auf das Latenzverhalten von MHV-68-CORE auswirkte, was bei den Vorstudien zur Charakterisierung der rekombinanten MHV-68 deutlich wurde. Nach Infektion mit MHV-68-CORE reaktivierten wesentlich mehr latent infizierte Milzzellen als nach Infektion mit MHV-68-WT (4.3.2.2). CORE scheint somit durch seine immunmodulierende Wirkung CD8<sup>+</sup> T-Zellantworten, die für die Kontrolle der MHV-68 Latenz wichtig sind (Usherwood et al. 2000), zu reduzieren, so dass sich daher durch die eingeschränkte Immunkontrolle die Zahl latent infizierter Milzzellen erhöhte. Aufgrund der Tatsache, dass CORE nach Insertion in Vacciniaviren die Immunantwort gegen Vacciniaviren einschränken konnte (Large et al. 1999), stellte sich die Frage, ob CORE im Hinblick auf eine MHV-68-spezifische Impfung auch eine MHV-68-spezifische Immunantwort beeinflussen konnte. Nach einer Vakzinierung mit MHV-68 kann eine Überinfektion mit MHV-68 verhindert werden (Tibbetts et al. 2003; Boname et al. 2004). Versuche im Zuge dieser Arbeit

konnten allerdings zeigen, dass CORE keinen Einfluss auf eine Vakzinierung gegen MHV-68 hatte, da nach einer Vorimmunisierung mit MHV-68-CORE keine Überinfektion mit MHV-68-WT\* oder MHV-68-CORE möglich war (Daten nicht gezeigt).

Sowohl die Vorstudien zur Charakterisierung rekombinanter MHV-68 als auch die Immunisierungsstudien zur Antigen-spezifischen Reduktion spezifischer Parameter der MHV-68 Infektion haben deutlich gemacht, dass jedes Antigen seine Eigenschaften in Hinblick auf die Immunogenität im MHV-68 Kontext beibehalten konnte. Daher war eine Immunisierung gegen das immunogene Modell-Antigen Ovalbumin möglich, obwohl, wahrscheinlich basierend auf seiner Immunogenität, die latenten Parameter Splenomegalie und Reaktivierung einer MHV-68-OVA-Infektion schon ohne Vakzinierung deutlich reduziert waren. Ein ähnlicher Phänotyp durch ein für Ovalbumin rekombinantes MHV-68 wurde auch in den Arbeiten von Braaten et al. (Braaten et al. 2005) beobachtet. Allerdings stellte man fest, dass die latente Viruslast in Peritonealzellen von mit rekombinantem Virus infizierten Mäusen im Vergleich zu MHV-68-WT\*-infizierten Mäusen kaum verändert war. Daher soll bei weiteren Immunisierungsstudien die Untersuchung der Impfeffizienz um diesen Parameter erweitert werden. Außerdem sollen *real-time*-Polymerasekettenreaktionen angewendet werden, um die Viruslast nach Vakzinierung zu bestimmen, da die Frequenz Genom-tragender Zellen höher als die reaktivierender Zellen ist.

Auch die Vakzinierung gegen das als immundominant geltende NS3 (Diepolder et al. 1995; Diepolder et al. 1997) war generell erfolgreich. NS3 hatte aber, vermutlich aufgrund seiner Immunogenität, auch Auswirkungen auf Splenomegalie und Reaktivierungsfrequenz von MHV-68-NS3. Ob allerdings auch die Insertgröße an der Veränderung MHV-68-NS3-spezifischer Parameter beteiligt ist, soll durch weitere Versuche mit MHV-68-NS3-Mutanten geklärt werden (s.o.).

Auch CORE konnte seine immunmodulatorischen Funktionen im MHV-68 Kontext beibehalten, was erklären könnte, weshalb durch Vakzinierung keine Reduktion CORE-spezifischer Parameter möglich war. In weiteren Versuchen mit MHV-68-CORE sollen die auf CORE beruhenden Effekte bestätigt und eventuell weitere Funktionen dieses Proteins bestimmt werden. Da in der Maus eine Belastung mit MHV-68-CORE nicht beeinflusst werden konnte, stellt sich jedoch die Frage, inwieweit durch Vakzinierung mit MVA-CORE bzw. Ad-CORE/MVA-CORE eventuell trotz der Induktion CORE-spezifischer T-Lymphozyten eine Belastung mit HCV im Menschen verhindert werden könnte, bzw. ob CORE überhaupt ein geeignetes Impfantigen bei der Vakzinierung gegen HCV darstellt.

Obwohl es hochkonservierte Aminosäuren besitzt (Santolini et al. 1994), die es im Gegensatz zu dem mutationsanfälligen Strukturprotein E2 (Weiner et al. 1992) als Ziel für eine Vakzinierung gegen Hepatitis C attraktiv machen, erschwerte es, wohl aufgrund seiner immunmodulatorischen Eigenschaften, eine Immunisierung. Einige weitere Impfstrategien, die zum Teil auf der Verwendung von Adjuvantien beruhten (Encke et al. 2003; Matsui et al. 2003; Gehring et al. 2005), konnten ebenso CORE-spezifische Immunantworten auslösen (Duenas-Carrera et al. 2002; Park et al. 2003). Allerdings wurden nur wenige in einem Belastungsmodell getestet (Matsui et al. 2003; Encke et al. 2005). MHV-68-CORE bietet sich daher im Mausmodell als Belastungsvirus an, Immunisierungsschemata zu testen und zu verbessern und wirkungsvolle Impfstrategien gegen CORE zu entwickeln. Dabei können verschiedene Vakzine, unterschiedliche Impfstoffkombinationen, Applikationsformen und Impfstoffdosen sowie Adjuvantien getestet werden. So ist es beispielsweise möglich, modifizierte MVA-Vektoren, deren Immunogenität durch das Ausschalten immunmodulatorischer Gene erhöht wurde, für die Untersuchung von Vakzinierungseffekten zu verwenden (Staib et al. 2005; Clark et al. 2006).

Die Notwendigkeit eines Belastungsmodells wird insbesondere dahingehend deutlich, Impfstoffe vor der Anwendung in der Klinik auf ihre Wirksamkeit und Anwendbarkeit prüfen zu können. Dies unterstreicht umso mehr die Eignung von MHV-68 als Screening-Modell, um zum einen diverse Vakzine zu testen und diese zum anderen gegen verschiedenste Antigene einzusetzen. MHV-68 ermöglicht im Rahmen einer natürlichen Infektion, Antigene in die Maus einzubringen und bietet daher einen deutlichen Vorteil zu transgenen Tiermodellen für HCV, deren Antigene intrinsisch und nicht von außen in den Organismus gelangt sind (Fimia et al. 2003). Auch der Vergleich zu weiteren Tiermodellen für HCV unterstreicht die Vorteile von MHV-68 als Testsystem für Vakzine. Einige Mausmodelle verwenden Tumorzellen, die HCV Antigene exprimieren, als Monitor, um die Effizienz von Impfstoffen anhand des Tumorwachstums zu überprüfen (Encke et al. 1998; Encke et al. 2005; Gehring et al. 2005). Im Gegensatz zu MHV-68 als Modell spiegelt die Verwendung von Tumorzellen jedoch keine natürliche Virusinfektion wider. In Maus-Chimer- oder Trimer-Modelle konnte zwar humanes HCV-infiziertes Lebergewebe eingebracht werden (Ilan et al. 2002; Meuleman et al. 2005), allerdings ist die Transplantation des Gewebes in die Tiere kurz nach ihrer Geburt technisch sehr anspruchsvoll und die Immundefizienz der Mäuse lässt keine Analyse von Immunantworten zu.

Damit kristallisiert sich heraus, dass der Vorteil, MHV-68 als Belastungsvirus einzusetzen zum einen darin liegt, im Gegensatz zu artifiziellen Tumor-, Chimer-/Trimer- und transgenen

Mausmodellen eine natürliche Infektion im natürlichen Wirt Maus etablieren zu können. Zum anderen können dabei durch die einfache Anwendung der BAC-Technologie verschiedenste Antigene in MHV-68 eingesetzt werden. Dies bietet somit die Möglichkeit, die Impfeffizienz diverser Vakzine gegen Antigene akuter und chronischer Virusinfektionen im Kontext einer akuten sowie chronischen Infektion von MHV-68 zu untersuchen und einen Hinweis auf die Eignung von Antigenen für eine Vakzinierung zu erhalten.

## **Zusammenfassung**

Die Entwicklung wirksamer Impfstoffe gegen chronische Infektionskrankheiten wie AIDS oder Hepatitis C wird durch das Fehlen geeigneter Kleintier-Modelle stark beeinträchtigt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass rekombinantes murines Gammaherpesvirus 68 (MHV-68) als Testsystem geeignet ist, die Potenz Antigen-spezifischer Testvakzine im Kontext einer natürlichen chronischen Infektion zu evaluieren. Nach der Etablierung des Systems mit dem Modell-Antigen Ovalbumin wurden als Antigene einer wichtigen chronischen Virusinfektion des Menschen die Proteine NS3 und CORE des Hepatitis C Virus gewählt. Die BAC-Technologie erlaubte die einfache und schnelle Herstellung der rekombinanten MHV-68-OVA, MHV-68-NS3 und MHV-68-CORE. Vorstudien zur Charakterisierung der rekombinanten MHV-68 zeigten, dass die Insertion der Gene eine effiziente Expression der Proteine in Zellkultur ermöglichte und die Replikationsfähigkeit der Viren *in vitro* nicht eingeschränkt war. Die *in vivo* Charakterisierung der rekombinanten MHV-68 verdeutlichte, dass zwar die lytischen Titer vergleichbar zum Wildtyp, die latenten Parameter Splenomegalie und Zahl latent infizierter Milzzellen, abhängig vom inserierten Antigen, jedoch verändert waren.

Am Beispiel von MHV-68-OVA gelang es erstmals, eine Belastungsinfektion im Kontext einer Immunisierung zu etablieren und einen Vakzinierungseffekt durch Messung MHV-68-spezifischer Parameter zu untersuchen. Nach Ovalbumin-spezifischer Immunisierung mit MVA-OVA konnten sowohl die lytische als auch die latente Infektion mit MHV-68-OVA signifikant beeinflusst werden. Genauso effizient wurden die Parameter einer Belastungsinfektion mit MHV-68-NS3 nach Vakzinierung mit MVA-NS3 oder *prime-boost* Immunisierung mit Ad-NS3/MVA-NS3 verringert. Intrazelluläre Zytokinfärbungen, Tetramerfärbungen und <sup>51</sup>Cr-Freisetzungs-Assays zeigten, dass CD8+, aktivierte, IFN $\gamma$ -produzierende T-Lymphozyten an der Antigen-spezifischen Immunantwort und der Reduktion spezifischer Parameter der MHV-68 Infektion beteiligt waren. Gleichzeitig verdeutlichten diese Methoden, dass MHV-68 zudem als Stimulator für die effiziente Expansion Antigen-spezifischer T-Zellen geeignet ist.

Die verwendeten Antigene konnten ihre Eigenschaften hinsichtlich ihrer Immunogenität auch nach Insertion in MHV-68 beibehalten. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen daher die Eignung von MHV-68 als Modell zur Impfstoffevaluierung. Der Möglichkeit, diverse Vakzine mit verschiedenen Impfstrategien, Applikationsformen und Adjuvantien zu verwenden, sind dabei keine Grenzen gesetzt. Im Vergleich zu bisherigen Mausmodellen

stellt MHV-68 eine attraktive Option dar, um Impfstoffe gegen verschiedenste Antigene im Zusammenhang einer akuten sowie chronischen Infektion zu evaluieren.

## Literaturverzeichnis

- Abraham, J. D., N. Himoudi, et al. (2004). "Comparative immunogenicity analysis of modified vaccinia Ankara vectors expressing native or modified forms of hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins." Vaccine **22**(29-30): 3917-28.
- Adler, H., M. Messerle, et al. (2001). "Virus reconstituted from infectious bacterial artificial chromosome (BAC)-cloned murine gammaherpesvirus 68 acquires wild-type properties in vivo only after excision of BAC vector sequences." J Virol **75**(12): 5692-6.
- Adler, H., M. Messerle, et al. (2000). "Cloning and mutagenesis of the murine gammaherpesvirus 68 genome as an infectious bacterial artificial chromosome." J Virol **74**(15): 6964-74.
- Amara, R. R., F. Villinger, et al. (2002). "Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine." Vaccine **20**(15): 1949-55.
- Anderson, R. J., C. M. Hannan, et al. (2004). "Enhanced CD8+ T cell immune responses and protection elicited against Plasmodium berghei malaria by prime boost immunization regimens using a novel attenuated fowlpox virus." J Immunol **172**(5): 3094-100.
- Anonym (2005a). <http://www.vrtx.com/Pressreleases2005/pr051705.html>, Vertex Pharmaceuticals.
- Anonym (2005b). "Zur Situation wichtiger Infektionskrankheiten in Deutschland." Epidemiologisches Bulletin des Robert Koch Instituts **46**.
- Arnon, R. and T. Ben-Yedidia (2003). "Old and new vaccine approaches." Int Immunopharmacol **3**(8): 1195-204.
- Barbato, G., D. O. Cicero, et al. (1999). "The solution structure of the N-terminal proteinase domain of the hepatitis C virus (HCV) NS3 protein provides new insights into its activation and catalytic mechanism." J Mol Biol **289**(2): 371-84.
- Barratt-Boyes, S. M., A. C. Soloff, et al. (2006). "Broad cellular immunity with robust memory responses to simian immunodeficiency virus following serial vaccination with adenovirus 5- and 35-based vectors." J Gen Virol **87**(Pt 1): 139-49.
- Bartenschlager, R., M. Frese, et al. (2004). "Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence." Adv Virus Res **63**: 71-180.
- Bayer-Forschungsmagazin, R.-D. (1998). **10**.
- Behrens, S. E., L. Tomei, et al. (1996). "Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus." Embo J **15**(1): 12-22.



- Blaskovic, D., M. Stancekova, et al. (1980). "Isolation of five strains of herpesviruses from two species of free living small rodents." Acta Virol **24**(6): 468.
- Boname, J. M., H. M. Coleman, et al. (2004). "Protection against wild-type murine gammaherpesvirus-68 latency by a latency-deficient mutant." J Gen Virol **85**(Pt 1): 131-5.
- Braaten, D. C., R. L. Sparks-Thissen, et al. (2005). "An optimized CD8+ T-cell response controls productive and latent gammaherpesvirus infection." J Virol **79**(4): 2573-83.
- Bruna-Romero, O., G. Gonzalez-Aseguinolaza, et al. (2001). "Complete, long-lasting protection against malaria of mice primed and boosted with two distinct viral vectors expressing the same plasmodial antigen." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(20): 11491-6.
- Bukh, J., R. H. Miller, et al. (1995). "Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes." Semin Liver Dis **15**(1): 41-63.
- Capone, S., A. Meola, et al. (2006). "A novel adenovirus type 6 (Ad6)-based hepatitis C virus vector that overcomes preexisting anti-ad5 immunity and induces potent and broad cellular immune responses in rhesus macaques." J Virol **80**(4): 1688-99.
- Casimiro, D. R., A. J. Bett, et al. (2004). "Heterologous human immunodeficiency virus type 1 priming-boosting immunization strategies involving replication-defective adenovirus and poxvirus vaccine vectors." J Virol **78**(20): 11434-8.
- Casimiro, D. R., F. Wang, et al. (2005). "Attenuation of simian immunodeficiency virus SIVmac239 infection by prophylactic immunization with dna and recombinant adenoviral vaccine vectors expressing Gag." J Virol **79**(24): 15547-55.
- Cebere, I., L. Dorrell, et al. (2006). "Phase I clinical trial safety of DNA- and modified virus Ankara-vectored human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) vaccines administered alone and in a prime-boost regime to healthy HIV-1-uninfected volunteers." Vaccine **24**(4): 417-25.
- Choo QL, K. G., Weiner AJ, et al. (1989). "Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome." Science **244**: 359-362.
- Choo, Q. L., G. Kuo, et al. (1994). "Vaccination of chimpanzees against infection by the hepatitis C virus." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(4): 1294-8.
- Clark, R. H., J. C. Kenyon, et al. (2006). "Deletion of gene A41L enhances vaccinia virus immunogenicity and vaccine efficacy." J Gen Virol **87**(Pt 1): 29-38.
- Co, M. D., M. Terajima, et al. (2002). "Human cytotoxic T lymphocyte responses to live attenuated 17D yellow fever vaccine: identification of HLA-B35-restricted CTL epitopes on nonstructural proteins NS1, NS2b, NS3, and the structural protein E." Virology **293**(1): 151-63.

- Cormier, E. G., F. Tsamis, et al. (2004). "CD81 is an entry coreceptor for hepatitis C virus." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(19): 7270-4.
- 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.
- Deng, H., J. T. Chu, et al. (2004). "Identification of cis sequences required for lytic DNA replication and packaging of murine gammaherpesvirus 68." J Virol **78**(17): 9123-31.
- Diepolder, H. M., J. T. Gerlach, et al. (1997). "Immunodominant CD4+ T-cell epitope within nonstructural protein 3 in acute hepatitis C virus infection." J Virol **71**(8): 6011-9.
- Diepolder, H. M., R. Zachoval, et al. (1995). "Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection." Lancet **346**(8981): 1006-7.
- Diminsky, D., N. Moav, et al. (1999). "Physical, chemical and immunological stability of CHO-derived hepatitis B surface antigen (HBsAg) particles." Vaccine **18**(1-2): 3-17.
- Disson, O., D. Haouzi, et al. (2004). "Impaired clearance of virus-infected hepatocytes in transgenic mice expressing the hepatitis C virus polyprotein." Gastroenterology **126**(3): 859-72.
- Dolganiuc, A., K. Kodys, et al. (2003). "Hepatitis C virus core and nonstructural protein 3 proteins induce pro- and anti-inflammatory cytokines and inhibit dendritic cell differentiation." J Immunol **170**(11): 5615-24.
- Donnelly, J. J., B. Wahren, et al. (2005). "DNA vaccines: progress and challenges." J Immunol **175**(2): 633-9.
- Drexler, I., C. Staib, et al. (2004). "Modified vaccinia virus Ankara as antigen delivery system: how can we best use its potential?" Curr Opin Biotechnol **15**(6): 506-12.
- Duenas-Carrera, S., L. Alvarez-Lajonchere, et al. (2002). "Enhancement of the immune response generated against hepatitis C virus envelope proteins after DNA vaccination with polyprotein-encoding plasmids." Biotechnol Appl Biochem **35**(Pt 3): 205-12.
- Dunachie, S. J., M. Walther, et al. (2006). "A clinical trial of prime-boost immunisation with the candidate malaria vaccines RTS,S/AS02A and MVA-CS." Vaccine **24**(15): 2850-9.

- Earl, P. L., J. L. Americo, et al. (2004). "Immunogenicity of a highly attenuated MVA smallpox vaccine and protection against monkeypox." Nature **428**(6979): 182-5.
- Efstathiou, S., Y. M. Ho, et al. (1990). "Cloning and molecular characterization of the murine herpesvirus 68 genome." J Gen Virol **71 ( Pt 6)**: 1355-64.
- Ehtisham, S., N. P. Sunil-Chandra, et al. (1993). "Pathogenesis of murine gammaherpesvirus infection in mice deficient in CD4 and CD8 T cells." J Virol **67**(9): 5247-52.
- Eisen-Vandervelde, A. L., S. N. Waggoner, et al. (2004). "Hepatitis C virus core selectively suppresses interleukin-12 synthesis in human macrophages by interfering with AP-1 activation." J Biol Chem **279**(42): 43479-86.
- Encke, J., J. Findelee, et al. (2005). "Prophylactic and therapeutic vaccination with dendritic cells against hepatitis C virus infection." Clin Exp Immunol **142**(2): 362-9.
- Encke, J., J. zu Putlitz, et al. (1998). "Genetic immunization generates cellular and humoral immune responses against the nonstructural proteins of the hepatitis C virus in a murine model." J Immunol **161**(9): 4917-23.
- Encke, J., J. zu Putlitz, et al. (2003). "CpG immuno-stimulatory motifs enhance humoral immune responses against hepatitis C virus core protein after DNA-based immunization." Arch Virol **148**(3): 435-48.
- Evans, D. T., L. M. Chen, et al. (2003). "Mucosal priming of simian immunodeficiency virus-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in rhesus macaques by the Salmonella type III secretion antigen delivery system." J Virol **77**(4): 2400-9.
- Failla, C., L. Tomei, et al. (1994). "Both NS3 and NS4A are required for proteolytic processing of hepatitis C virus nonstructural proteins." J Virol **68**(6): 3753-60.
- Fan, Z., Q. R. Yang, et al. (1999). "Specific in vitro association between the hepatitis C viral genome and core protein." J Med Virol **59**(2): 131-4.
- Fenner, F., D. A. Henderson, et al. (1988). "Smallpox and Its Eradication." W.H.O., Geneva.
- Ferreira, T. B., P. M. Alves, et al. (2005). "Use of adenoviral vectors as veterinary vaccines." Gene Ther **12 Suppl 1**: S73-83.
- Fimia, G. M., M. Tripodi, et al. (2003). "Transgenic models for Hepatitis C virus pathogenesis." Cell Death Differ **10 Suppl 1**: S16-8.
- Flano, E., S. M. Husain, et al. (2000). "Latent murine gamma-herpesvirus infection is established in activated B cells, dendritic cells, and macrophages." J Immunol **165**(2): 1074-81.

- Flano, E., I. J. Kim, et al. (2002). "Gamma-herpesvirus latency is preferentially maintained in splenic germinal center and memory B cells." J Exp Med **196**(10): 1363-72.
- Flint, M., E. R. Quinn, et al. (2001). "In search of hepatitis C virus receptor(s)." Clin Liver Dis **5**(4): 873-93.
- Francavilla, V., D. Accapezzato, et al. (2004). "Subversion of effector CD8+ T cell differentiation in acute hepatitis C virus infection: exploring the immunological mechanisms." Eur J Immunol **34**(2): 427-37.
- Franchini, M., H. Hefti, et al. (2004). "Dendritic cells from mice neonatally vaccinated with modified vaccinia virus Ankara transfer resistance against herpes simplex virus type I to naive one-week-old mice." J Immunol **172**(10): 6304-12.
- Gale MJ., Kwieciszewski B., et al. (1999). "Antiapoptotic and oncogenic potentials of hepatitis c virus are linked to interferon resistance by viral repression of the PKR protein kinase." J Virol **73**: 6506-6516.
- Gallichan, W. S. and K. L. Rosenthal (1998). "Long-term immunity and protection against herpes simplex virus type 2 in the murine female genital tract after mucosal but not systemic immunization." J Infect Dis **177**(5): 1155-61.
- Garcia-Hernandez E, Gonzalez-Sanchez JL, et al. (2006). "Regression of papilloma high-grade lesions (CIN 2 and CIN 3) is stimulated by therapeutic vaccination with MVA E2 recombinant vaccine." Cancer Gene Ther **Epub ahead of print**.
- Gehring, S., S. H. Gregory, et al. (2005). "Type 1 interferon augments DNA-based vaccination against hepatitis C virus core protein." J Med Virol **75**(2): 249-57.
- Gilbert, S. C., J. Schneider, et al. (2002). "Enhanced CD8 T cell immunogenicity and protective efficacy in a mouse malaria model using a recombinant adenoviral vaccine in heterologous prime-boost immunisation regimes." Vaccine **20**(7-8): 1039-45.
- Goldfarb, J., J. Baley, et al. (1994). "Comparative study of the immunogenicity and safety of two dosing schedules of Engerix-B hepatitis B vaccine in neonates." Pediatr Infect Dis J **13**(1): 18-22.
- Gonzalez-Aseguinolaza, G., Y. Nakaya, et al. (2003). "Induction of protective immunity against malaria by priming-boosting immunization with recombinant cold-adapted influenza and modified vaccinia Ankara viruses expressing a CD8+-T-cell epitope derived from the circumsporozoite protein of Plasmodium yoelii." J Virol **77**(21): 11859-66.
- Grakoui, A., D. W. McCourt, et al. (1993). "A second hepatitis C virus-encoded proteinase." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(22): 10583-7.
- Gray, G. C., J. D. Callahan, et al. (1999). "Respiratory diseases among U.S. military personnel: countering emerging threats." Emerg Infect Dis **5**(3): 379-85.

- Gwack, Y., D. W. Kim, et al. (1997). "DNA helicase activity of the hepatitis C virus nonstructural protein 3." Eur J Biochem **250**(1): 47-54.
- He X, X., T. C. Tsang, et al. (2005). "Antigen epitope-expressing cytokines for DNA immunization." Vaccine **23**(16): 1966-72.
- He Y, Y., J. Zhang, et al. (2005). "Immunization with lentiviral vector-transduced dendritic cells induces strong and long-lasting T cell responses and therapeutic immunity." J Immunol **174**(6): 3808-17.
- Hijikata, M., H. Mizushima, et al. (1993). "Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus." J Virol **67**(8): 4665-75.
- Hirt, B. (1967). "Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures." J Mol Biol **26**(2): 365-9.
- Horig, H. and H. L. Kaufman (2003). "Local delivery of poxvirus vaccines for melanoma." Semin Cancer Biol **13**(6): 417-22.
- Hugle, T. and A. Cerny (2003). "Current therapy and new molecular approaches to antiviral treatment and prevention of hepatitis C." Rev Med Virol **13**(6): 361-71.
- Hutchings, C. L., S. C. Gilbert, et al. (2005). "Novel protein and poxvirus-based vaccine combinations for simultaneous induction of humoral and cell-mediated immunity." J Immunol **175**(1): 599-606.
- Ilan, E., J. Arazi, et al. (2002). "The hepatitis C virus (HCV)-Trimera mouse: a model for evaluation of agents against HCV." J Infect Dis **185**(2): 153-61.
- Kato, N. (2001). "Molecular virology of hepatitis C virus." Acta Med Okayama **55**(3): 133-59.
- Kato, T., T. Date, et al. (2003). "Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon." Gastroenterology **125**(6): 1808-17.
- Kaufman, H. L., S. Cohen, et al. (2006). "Local Delivery of Vaccinia Virus Expressing Multiple Costimulatory Molecules for the Treatment of Established Tumors." Hum Gene Ther.
- Kim, J. L., K. A. Morgenstern, et al. (1998). "Hepatitis C virus NS3 RNA helicase domain with a bound oligonucleotide: the crystal structure provides insights into the mode of unwinding." Structure **6**(1): 89-100.
- Kim, J. L., K. A. Morgenstern, et al. (1996). "Crystal structure of the hepatitis C virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide." Cell **87**(2): 343-55.

- Kittlesen, D. J., K. A. Chianese-Bullock, et al. (2000). "Interaction between complement receptor gC1qR and hepatitis C virus core protein inhibits T-lymphocyte proliferation." J Clin Invest **106**(10): 1239-49.
- Kotloff, K. L., D. N. Taylor, et al. (2002). "Phase I evaluation of delta virG Shigella sonnei live, attenuated, oral vaccine strain WRSS1 in healthy adults." Infect Immun **70**(4): 2016-21.
- Lamarre, D., P. C. Anderson, et al. (2003). "An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus." Nature **426**(6963): 186-9.
- Large, M. K., D. J. Kittlesen, et al. (1999). "Suppression of host immune response by the core protein of hepatitis C virus: possible implications for hepatitis C virus persistence." J Immunol **162**(2): 931-8.
- Leroux-Roels, G., E. Depla, et al. (2004). "A candidate vaccine based on the hepatitis C E1 protein: tolerability and immunogenicity in healthy volunteers." Vaccine **22**(23-24): 3080-6.
- Lindenbach, B. D., M. J. Evans, et al. (2005). "Complete replication of hepatitis C virus in cell culture." Science **309**(5734): 623-6.
- Liu, Q., C. Tackney, et al. (1997). "Regulated processing of hepatitis C virus core protein is linked to subcellular localization." J Virol **71**(1): 657-62.
- Lo, S. Y., F. Masiarz, et al. (1995). "Differential subcellular localization of hepatitis C virus core gene products." Virology **213**(2): 455-61.
- Lo, S. Y., M. J. Selby, et al. (1996). "Interaction between hepatitis C virus core protein and E1 envelope protein." J Virol **70**(8): 5177-82.
- Lohmann, V., F. Korner, et al. (1999). "Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line." Science **285**(5424): 110-3.
- Lorke, J., A. Avci, et al. (2005). "[Current treatment of hepatitis C virus infection]." Dtsch Med Wochenschr **130**(30): 1773-7.
- Matsui, M., O. Moriya, et al. (2003). "Enhanced induction of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes and protective efficacy in mice by DNA vaccination followed by adenovirus boosting in combination with the interleukin-12 expression plasmid." Vaccine **21**(15): 1629-39.
- Matsumoto, M., S. B. Hwang, et al. (1996). "Homotypic interaction and multimerization of hepatitis C virus core protein." Virology **218**(1): 43-51.

- 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.
- McDermott, M. R., F. L. Graham, et al. (1989). "Protection of mice against lethal challenge with herpes simplex virus by vaccination with an adenovirus vector expressing HSV glycoprotein B." Virology **169**(1): 244-7.
- Messerle, M., I. Crnkovic, et al. (1997). "Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(26): 14759-63.
- Meuleman, P., L. Libbrecht, et al. (2005). "Morphological and biochemical characterization of a human liver in a uPA-SCID mouse chimera." Hepatology **41**(4): 847-56.
- Modrow, S. (1998). Molekulare Virologie. Heidelberg Berlin, Spektrum Akademischer Verlag.
- Modrow, S., Falke, D., Truyen, U. (2003). Molekulare Virologie. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Moriya, K., H. Fujie, et al. (1998). "The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice." Nat Med **4**(9): 1065-7.
- Mwau, M., I. Cebere, et al. (2004). "A human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) clade A vaccine in clinical trials: stimulation of HIV-specific T-cell responses by DNA and recombinant modified vaccinia virus Ankara (MVA) vaccines in humans." J Gen Virol **85**(Pt 4): 911-9.
- N. Thakur (unveröffentlichte Daten). "Functional characterization of the 40 bp internal repeat of murine gammaherpesvirus 68."
- Nash, A. A., B. M. Dutia, et al. (2001). "Natural history of murine gamma-herpesvirus infection." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **356**(1408): 569-79.
- O'Hagan, D. T., M. Singh, et al. (2004). "Cationic microparticles are a potent delivery system for a HCV DNA vaccine." Vaccine **23**(5): 672-80.
- Ophorst, O. J., K. Radosevic, et al. (2006). "Immunogenicity and Protection of a Recombinant Human Adenovirus Serotype 35-Based Malaria Vaccine against Plasmodium yoelii in Mice." Infect Immun **74**(1): 313-20.
- Orson, F. M., B. M. Kinsey, et al. (2006). "Protection against influenza infection by cytokine-enhanced aerosol genetic immunization." J Gene Med.
- Pancholi, P., M. Perkus, et al. (2003). "DNA immunization with hepatitis C virus (HCV) polycistronic genes or immunization by HCV DNA priming-recombinant canarypox

- virus boosting induces immune responses and protection from recombinant HCV-vaccinia virus infection in HLA-A2.1-transgenic mice." J Virol **77**(1): 382-90.
- Park, S. H., S. H. Yang, et al. (2003). "Efficient induction of T helper 1 CD4+ T-cell responses to hepatitis C virus core and E2 by a DNA prime-adenovirus boost." Vaccine **21**(31): 4555-64.
- Parks, G. D. and M. A. Alexander-Miller (2002). "High avidity cytotoxic T lymphocytes to a foreign antigen are efficiently activated following immunization with a recombinant paramyxovirus, simian virus 5." J Gen Virol **83**(Pt 5): 1167-72.
- Pastoret, P. P. and B. Brochier (1996). "The development and use of a vaccinia-rabies recombinant oral vaccine for the control of wildlife rabies; a link between Jenner and Pasteur." Epidemiol Infect **116**(3): 235-40.
- Pileri, P., Y. Uematsu, et al. (1998). "Binding of hepatitis C virus to CD81." Science **282**(5390): 938-41.
- Ramirez, J., M. Gherardi, et al. (2000). "Attenuated Modified Vaccinia Virus Ankara Can Be Used as an Immunizing Agent under Conditions of Preexisting Immunity to the Vector " J Virol **74**: 7651-7655.
- Ramsburg, E., N. F. Rose, et al. (2004). "Highly effective control of an AIDS virus challenge in macaques by using vesicular stomatitis virus and modified vaccinia virus Ankara vaccine vectors in a single-boost protocol." J Virol **78**(8): 3930-40.
- Ray, R. B., L. M. Lagging, et al. (1995). "Transcriptional regulation of cellular and viral promoters by the hepatitis C virus core protein." Virus Res **37**(3): 209-20.
- Ray, R. B., K. Meyer, et al. (1996). "Suppression of apoptotic cell death by hepatitis C virus core protein." Virology **226**(2): 176-82.
- Rehermann, B. and M. Nascimbeni (2005). "Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection." Nat Rev Immunol **5**(3): 215-29.
- Rollier, C., E. Depla, et al. (2004). "Control of heterologous hepatitis C virus infection in chimpanzees is associated with the quality of vaccine-induced peripheral T-helper immune response." J Virol **78**(1): 187-96.
- Rollier, C., E. J. Verschoor, et al. (2005). "Modulation of vaccine-induced immune responses to hepatitis C virus in rhesus macaques by altering priming before adenovirus boosting." J Infect Dis **192**(5): 920-9.
- Ruggieri, A., T. Harada, et al. (1997). "Sensitization to Fas-mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein." Virology **229**(1): 68-76.



- Santolini, E., G. Migliaccio, et al. (1994). "Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein." J Virol **68**(6): 3631-41.
- Santosuosso, M., S. McCormick, et al. (2005). "Adenoviral vectors for mucosal vaccination against infectious diseases." Viral Immunol **18**(2): 283-91.
- Sarobe, P., J. J. Lasarte, et al. (2002). "Abnormal priming of CD4(+) T cells by dendritic cells expressing hepatitis C virus core and E1 proteins." J Virol **76**(10): 5062-70.
- Sarobe, P., J. J. Lasarte, et al. (2003). "Hepatitis C virus structural proteins impair dendritic cell maturation and inhibit in vivo induction of cellular immune responses." J Virol **77**(20): 10862-71.
- Schneider, J., S. C. Gilbert, et al. (1998). "Enhanced immunogenicity for CD8+ T cell induction and complete protective efficacy of malaria DNA vaccination by boosting with modified vaccinia virus Ankara." Nat Med **4**(4): 397-402.
- Seder, R. A. and A. V. Hill (2000). "Vaccines against intracellular infections requiring cellular immunity." Nature **406**(6797): 793-8.
- Shirai, M., T. Arichi, et al. (1995). "CTL responses of HLA-A2.1-transgenic mice specific for hepatitis C viral peptides predict epitopes for CTL of humans carrying HLA-A2.1." J Immunol **154**(6): 2733-42.
- Simas, J. P. and S. Efstathiou (1998). "Murine gammaherpesvirus 68: a model for the study of gammaherpesvirus pathogenesis." Trends Microbiol **6**(7): 276-82.
- Simas, J. P., S. Marques, et al. (2004). "The M2 gene product of murine gammaherpesvirus 68 is required for efficient colonization of splenic follicles but is not necessary for expansion of latently infected germinal centre B cells." J Gen Virol **85**(Pt 10): 2789-97.
- Simmonds, P., E. C. Holmes, et al. (1993). "Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region." J Gen Virol **74** ( Pt 11): 2391-9.
- Souza, A. P., L. Haut, et al. (2005). "Recombinant viruses as vaccines against viral diseases." Braz J Med Biol Res **38**(4): 509-22.
- Sparks-Thissen, R. L., D. C. Braaten, et al. (2004). "An optimized CD4 T-cell response can control productive and latent gammaherpesvirus infection." J Virol **78**(13): 6827-35.
- Speck, S. H. and H. W. Virgin (1999). "Host and viral genetics of chronic infection: a mouse model of gamma-herpesvirus pathogenesis." Curr Opin Microbiol **2**(4): 403-9.
- 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., I. Drexler, et al. (2004). "Construction and isolation of recombinant MVA." Methods Mol Biol **269**: 77-100.
- Staib, C., S. Kisling, et al. (2005). "Inactivation of the viral interleukin 1beta 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.
- Stevenson, P. G., R. D. Cardin, et al. (1999). "Immunological control of a murine gammaherpesvirus independent of CD8+ T cells." J Gen Virol **80** ( Pt 2): 477-83.
- Stewart, J. P., E. J. Usherwood, et al. (1998). "Lung epithelial cells are a major site of murine gammaherpesvirus persistence." J Exp Med **187**(12): 1941-51.
- Stickl, H., V. Hochstein-Mintzel, et al. (1974). "[MVA vaccination against smallpox: clinical tests with an attenuated live vaccinia virus strain (MVA) (author's transl)]." Dtsch Med Wochenschr **99**(47): 2386-92.
- Suh, Y. S., K. S. Park, et al. (2005). "Reduction of viral loads by multigenic DNA priming and adenovirus boosting in the SIVmac-macaque model." Vaccine.
- Sullivan, N. J., A. Sanchez, et al. (2000). "Development of a preventive vaccine for Ebola virus infection in primates." Nature **408**(6812): 605-9.
- Sunil-Chandra, N. P., S. Efstathiou, et al. (1992a). "Virological and pathological features of mice infected with murine gamma-herpesvirus 68." J Gen Virol **73** ( Pt 9): 2347-56.
- 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., 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.
- Tibbetts, S. A., J. Loh, et al. (2003). "Establishment and maintenance of gammaherpesvirus latency are independent of infective dose and route of infection." J Virol **77**(13): 7696-701.
- Tibbetts, S. A., J. S. McClellan, et al. (2003). "Effective vaccination against long-term gammaherpesvirus latency." J Virol **77**(4): 2522-9.
- Usherwood, E. J., A. J. Ross, et al. (1996a). "Murine gammaherpesvirus-induced splenomegaly: a critical role for CD4 T cells." J Gen Virol **77** ( Pt 4): 627-30.

- Usherwood, E. J., D. J. Roy, et al. (2000). "Control of gammaherpesvirus latency by latent antigen-specific CD8(+) T cells." J Exp Med **192**(7): 943-52.
- Virgin IV, H. W., P. Latreille, et al. (1997). "Complete sequence and genomic analysis of murine gammaherpesvirus 68." J Virol **71**(8): 5894-904.
- Vogel, T. U., M. R. Reynolds, et al. (2003). "Multispecific vaccine-induced mucosal cytotoxic T lymphocytes reduce acute-phase viral replication but fail in long-term control of simian immunodeficiency virus SIVmac239." J Virol **77**(24): 13348-60.
- Vuola, J. M., S. Keating, et al. (2005). "Differential immunogenicity of various heterologous prime-boost vaccine regimens using DNA and viral vectors in healthy volunteers." J Immunol **174**(1): 449-55.
- Wakita, T., T. Pietschmann, et al. (2005). "Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome." Nat Med **11**(7): 791-6.
- Wang, Z., C. La Rosa, et al. (2004). "Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing a soluble form of glycoprotein B causes durable immunity and neutralizing antibodies against multiple strains of human cytomegalovirus." J Virol **78**(8): 3965-76.
- 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.
- Weck, K. E., M. L. Barkon, et al. (1996). "Mature B cells are required for acute splenic infection, but not for establishment of latency, by murine gammaherpesvirus 68." J Virol **70**(10): 6775-80.
- Weiner, A. J., H. M. Geysen, et al. (1992). "Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(8): 3468-72.
- Woodland, D. L. (2004). "Jump-starting the immune system: prime-boosting comes of age." Trends Immunol **25**(2): 98-104.
- 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.
- Xin, K. Q., N. Jounai, et al. (2005). "Prime-boost vaccination with plasmid DNA and a chimeric adenovirus type 5 vector with type 35 fiber induces protective immunity against HIV." Gene Ther **12**(24): 1769-77.
- Yasui, K., T. Wakita, et al. (1998). "The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein." J Virol **72**(7): 6048-55.

- Zavala, F., M. Rodrigues, et al. (2001). "A striking property of recombinant poxviruses: efficient inducers of in vivo expansion of primed CD8(+) T cells." Virology **280**(2): 155-9.
- Zhong, J., P. Gastaminza, et al. (2005). "Robust hepatitis C virus infection in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(26): 9294-9.
- Zinkernagel, R. M. (2002). "Immunity, immunopathology and vaccines against HIV?" Vaccine **20**(15): 1913-7.
- zur Übersicht 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.

## Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. S. Scherer für die Begutachtung meiner Dissertation bedanken.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. V. Erfle, der mir die Möglichkeit gab, diese Doktorarbeit am Institut für Virologie anzufertigen.

Besonderen Dank richte ich an Dr. Gerd Sutter, Dr. Heiko Adler und Dr. Caroline Staib für die großartige und gut organisierte Betreuung, die stets neuen Anregungen und daher problemlose Durchführung meiner Doktorarbeit.

Vielen Dank auch an Georg Gasteiger und Wolfgang Kastenmüller für deren ausdauernde Hilfe bei sämtlichen Fragen und Problemen zur Messung und Auswertung an den FACS-Geräten.

Ein besonders großes Dankeschön richte ich an all meine Kollegen aus dem „Stadtlabor“ und aus dem „Großhadern-Labor“, die immer hilfsbereit waren und für eine lockere und doch professionelle Arbeitsatmosphäre sorgten.

Herzlichen Dank auch an alle Tierpfleger der GSF für die hervorragende Zusammenarbeit im Tierstall.

Vor allem möchte ich mich bei Matthias und meiner Familie bedanken, die mir privat stets den Rücken freigehalten und mir so die Durchführung der Arbeit wesentlich erleichtert haben.

## Lebenslauf

**Name:** Susanne El-Gogo  
**Geburtsdatum:** 20.11.76  
**Geburtsort:** München

## Schulbildung

1983-87 Canisius-Grundschule in München  
1987-96 Gymnasium Fürstenried-West in München  
Juni 1996 Abschluss der allgemeinen Hochschulreife

## Akademische Ausbildung

1996-2002 Studium der Biologie an der LMU München  
Oktober 1998 Diplom-Vorprüfungen  
März 2001 Diplom-Hauptprüfung  
Mai 2001-Februar 2002 Diplomarbeit unter Anleitung von Dr. Stefan Weiss im Bereich Prionenforschung am Genzentrum der LMU München  
Thema: „Bindungs- und Internalisierungsstudien des murinen Scrapie Prion Proteins moPrP27-30 an Säugetierzellen mit Hilfe des Semliki-Forest-Virus“  
  
Dezember 2002- Oktober 2006  
Dissertationsarbeit unter Anleitung von Dr. Gerd Sutter am Institut für Virologie der Technischen Universität München  
Thema: „Das murine Gammaherpesvirus 68 als *in vivo* Modell zur Evaluierung Antigen-spezifischer Vakzine“